

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

GC-MS stanovení izomerních mastných kyselin v potravinářských
a biologických vzorcích
Bc. Michaela Merclová

Diplomová práce
2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Merclová**
Osobní číslo: **C21431**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **GC/MS stanovení izomerních mastných kyselin v potravinářských a biologických vzorcích**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma výskyt a stanovení izomerních nenasycených mastných kyselin. Zaměřte se na metody plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií a také na způsob přípravy a úpravu vzorku.
2. V experimentální části vyvíňte a optimalizujte metodu na stanovení izomerních mastných kyselin využívající plynovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií.
3. Metodu využijte na stanovení isomerních mastných kyselin v potravinářských a biologických vzorcích.
4. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem poznání.

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

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

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

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

LS.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem GC-MS stanovení izomerních mastných kyselin v potravinářských a biologických vzorcích 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 5.5. 2023

Bc. Michaela Merclová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala panu Ing. Tomášovi Hájkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a připomínky při vypracování mé diplomové práce.

ANOTACE

Diplomová práce pojednává o stanovení mastných kyselin a izomerů mastných kyselin ve vzorcích potravinářských olejů a krevního séra. Separační metoda použitá ke stanovení byla plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem. Tuky obsahující mastné kyseliny byly před vlastním stanovením převedeny na methylestery za pomoci katalyzátoru methanolátu sodného. U vzorků krevního séra, které pocházely z krve zdravých dárců a dárců s různým stádiem rakoviny slinivky, byly před esterifikací tuky z krevního séra izolovány proteinovou precipitací. Následnou analýzou bylo zjištěno procentuální zastoupení jednotlivých majoritních i minoritních mastných kyselin ve vzorcích a zjištěné výsledky byly podrobeny statistické analýze.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mastné kyseliny, izomery mastných kyselin, esterifikace, proteinová precipitace, methylestery mastných kyselin, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, lipidomická analýza

TITLE

GC/MS Determination of Isomeric Fatty Acids in Food and Biological Samples

ANNOTATION

The determination of fatty acid and their isomers in food oils and blood serum samples is the aim of this diploma thesis. Gas chromatography with mass spectrometry was used for the separation and detection of fatty acids. The principle of determination is conversion of fatty acids to methyl esters. In the case of blood serum samples, which were prepared from the blood of healthy volunteer and volunteer with different stages of pancreatic cancer, protein precipitation was necessary to isolation of fat before esterification. The percentage representation of individual major and minor fatty acids in the samples were calculated and the results were statistically analyzed.

KEYWORDS

Fatty acid isomers, esterification, protein precipitation, fatty acid methyl esters, gas chromatography, mass spectrometry, lipidomics

OBSAH

Seznam obrázků	10
Seznam tabulek.....	12
Seznam zkratek	13
Úvod.....	15
1 Teoretická část.....	11
1.1 Lipidy	11
1.1.1 Klasifikace lipidů	12
1.1.2 Jednoduché lipidy.....	13
1.1.2.1 Acylglyceroly	13
1.1.2.2 Vosky	13
1.1.3 Složené lipidy	14
1.1.3.1 Fosfolipidy	14
1.1.3.2 Glykolipidy.....	16
1.1.3.3 Lipoproteiny	16
1.2 Mastné kyseliny.....	18
1.2.1 Klasifikace mastných kyselin.....	18
1.2.2 Názvosloví mastných kyselin.....	19
1.2.3 Nasycené mastné kyseliny.....	20
1.2.4 Mononenasyčené mastné kyseliny (MUFA).....	21
1.2.5 Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA)	22
1.2.6 <i>Trans</i> mastné kyseliny (TFA).....	23
1.3 Metody stanovení mastných kyselin	26
1.3.1 Příprava vzorku	26
1.3.2 Spektrofotometrické metody	27
1.3.2.1 Spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti	27
1.3.2.2 Spektrometrie v infračervené oblasti.....	28
1.3.2.3 Nukleární magnetická rezonance (NMR)	28
1.3.3 Chromatografické metody	29
1.3.3.1 Plynová chromatografie	29
1.3.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	33

1.3.3.3	Superkritická fluidní chromatografie	35
1.3.3.4	Argentační chromatografie.....	35
1.4	Lipidomika	36
1.4.1	Lipidomická analýza	38
2	Experimentální část.....	40
2.1	Přístroje a zařízení	40
2.2	Chemikálie.....	40
2.3	Pracovní postupy	41
2.3.1	Příprava reakčních roztoků a roztoků standardů	41
2.3.2	Příprava methylesterů ze standardů mastných kyselin kyselou katalýzou.....	42
2.3.3	Příprava vzorků olejů	42
2.3.3.1	Esterifikace vzorků olejů.....	43
2.3.4	Příprava biologických vzorků.....	43
2.3.4.1	Folchova extrakce	43
2.3.4.2	Proteinová precipitace	44
2.3.4.3	Esterifikace.....	44
2.4	Podmínky měření GC-MS.....	44
2.5	Zpracování experimentálních dat	45
3	Výsledky a diskuze	46
3.1	Optimalizace metody.....	46
3.1.1	Optimalizace parametrů plynového chromatogramu	46
3.2	Validace metody.....	51
3.2.1	Mezilehlá přesnost a opakovatelnost.....	51
3.2.2	Vyhodnocení opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti z ploch píků MK	52
3.2.3	Vyhodnocení z ploch píků MK vztažených k IS.....	53
3.2.4	Vyhodnocení z procentuálního zastoupení MK	55
3.3	Analýza vzorků olejů.....	57
3.3.1	Optimalizace přípravy a separace vzorků olejů.....	57
3.3.2	Procentuální zastoupení mastných kyselin v olejích.....	57
3.4	Analýza vzorků krevního séra	64
3.4.1	Optimalizace přípravy a dávkování vzorků krevního séra	64

3.4.2	Obsah mastných kyselin ve vzorcích krevního séra.....	65
4	Závěr.....	76
5	Použitá literatura.....	78
6	Přílohy	85

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Klasifikace lipidů.....	12
Obrázek 2 Složky triacylglycerolu a molekula triacylglycerolu	13
Obrázek 3 Struktura fosfolipidu a druhy substituentů	15
Obrázek 4 Fosfolipidová dvojvrstva ve vodném prostředí [11].....	15
Obrázek 5 Lipoproteinová částice [13]	17
Obrázek 6 Zkrácený zápis názvu mastné kyseliny.....	20
Obrázek 7 Molekula mastné kyseliny a znázornění, kde se nachází α konec a ω konec řetězce	20
Obrázek 8 Rozdíly ve struktuře cis a trans nenasycených mastných kyselin [22].....	23
Obrázek 9 Hydrogenace nenasycených mastných kyselin [20]	24
Obrázek 10 Schéma vzniku methylesterů MK.....	33
Obrázek 11 Činidla používaná pro derivatizaci mastných kyselin pro kapalinovou chromatografii	35
Obrázek 12 Dělení lipidů podle systému LIPID MAPS [66].....	37
Obrázek 13 Chromatogram 37 Component FAME mix	48
Obrázek 14 Chromatogramy standardů C18:1 (trans Δ^6 , cis Δ^6 , trans Δ^9 , cis Δ^9 , trans Δ^{11} , cis Δ^{11}), C19:1 (cis cis Δ^{10}), 16-methyl C17:0 a 15-methyl C17:0 v porovnání se směsí standardů 37 Component FAME Mix	49
Obrázek 15 Směs cis a trans izomerů C18:1 separace na koloně TR FAME (60 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m)	50
Obrázek 16 Směs cis a trans izomerů C18:1 separace na koloně SELECT FAME (50 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m).....	50
Obrázek 17 Průměrné plochy píků majoritních MK ve vzorku séra a jejich směrodatné odchylky (chybové úsečky) (3 dny, 3 opakování)	52
Obrázek 18 RSD vypočtené z ploch píků majoritních MK ve vzorku (n=9, 3 dny, 3 opakování)	53
Obrázek 19 Průměrné plochy píků majoritních MK vztažené k vnitřnímu standardu ve vzorku séra a jejich směrodatné odchylky (chybové úsečky) (3 dny, 3 opakování).....	54
Obrázek 20 RSD vypočtené z ploch píků majoritních MK vztažených k IS (n=9, 3 dny, 3 opakování).....	54
Obrázek 21 Průměrné procentuální zastoupení majoritních MK ve vzorku séra a jejich směrodatné odchylky (chybové úsečky) (3 dny, 3 opakování).....	55

Obrázek 22 RSD vypočtené z procentuálního zastoupení majoritních MK ve vzorku (n=9, 3 dny, 3 opakování).....	56
Obrázek 23 Chromatogram rakytníkového oleje	58
Obrázek 24 Poměr nasycených a nenasycených MK ve vzorcích olejů	61
Obrázek 25 Poměr ω_3 , ω_6 a ω_9 MK ve vzorcích olejů	62
Obrázek 26 Chromatogram vzorku PCO 993	66
Obrázek 27 Analýza hlavních komponent (PCA) bez informace o rozdělení do skupin.....	67
Obrázek 28 Rozdělení vzorků zdravých (zelené body) a nemocných dárců (červené body) za použití statistického modelu OPLS-DA	68
Obrázek 29 Korelační diagram vzorků zdravých a nemocných dárců.....	68
Obrázek 30 Rozdělení vzorků zdravých (zelené body) a nemocných dárců (červené body) za použití statistického modelu OPLS-DA bez C12:0, C22:0 a C20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$	69
Obrázek 31 Korelační diagram vzorků zdravých a nemocných dárců bez C12:0, C22:0 a C20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$	70
Obrázek 32 Rozdělení vzorků od nemocných dárců (červené body) a těch, kteří rakovinu prodělali (žluté body) za použití statistického modelu OPLS-DA bez C12:0, C22:0 a C20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$	70
Obrázek 33 Korelační diagram vzorků nemocných a dárců, kteří rakovinu prodělali bez C12:0, C22:0 a C20:4 cis $\Delta^{8,11,14,17}$	71
Obrázek 34 Krabicový graf kyseliny dokosaheptaenové (C22:6 cis $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$).....	72
Obrázek 35 Krabicový graf kyseliny dokosapentaenové (C22:5 cis $\Delta^{4,7,10,13,16}$).....	72
Obrázek 36 Krabicový graf kyseliny α -linolenové (C18:3 cis $\Delta^{9,12,15}$).....	73
Obrázek 37 Krabicový graf kyseliny elaidové (C18:1 trans Δ^9).....	74
Obrázek 38 Krabicový graf kyseliny palmitoolejové (C16:1 cis Δ^9).....	74
Obrázek 39 Krabicový graf kyseliny 14-methyl pentadekanové (C15:0 14-methyl)	75

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Nasycené mastné kyseliny	21
Tabulka 2 Mononenasyčené mastné kyseliny	21
Tabulka 3 Polynenasycené mastné kyseliny	23
Tabulka 4 Mastné kyseliny a od nich odvozené trans izomery.....	25
Tabulka 5 Typy materiálů stacionárních fází používané pro plynovou chromatografii a jejich polarita.....	30
Tabulka 6 Vzorčky rostlinných olejů.....	42
Tabulka 7 Podmínky měření v systému GC.....	45
Tabulka 8 Podmínky MS.....	45
Tabulka 9 Procentuální zastoupení jednotlivých MK ve vzorcích olejů	59
Tabulka 10 Rozdělení vzorků krevního séra podle zdravotního stavu dárců	65

SEZNAM ZKRATEK

APCI.....	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure ionization)
BUME	butanol-methanol
CAD	corona detektor (charged aerosol detector)
CI.....	chemická ionizace (chemical ionization)
C8	oktyl
C18	oktadecyl
ECD.....	detektor elektronového záchytu (electron capture detector)
EI.....	elektronová ionizace (electron ionization)
ELSD.....	detektor rozptylu světla (evaporative light scattering detector)
ESI.....	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FAME.....	methylestery mastných kyselin (fatty acid methyl esters)
FFA.....	volné mastné kyseliny (free fatty acids)
FID	plamenové ionizační detektor (flame ionization detector)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HDL.....	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí (hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HPLC-Ag	argentační vysokoučinná kapalinová chromatografie (silver ion high performance liquid chromatography)
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (Low Density Lipoprotein)
LCFA.....	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (long chain fatty acids)

LLE..... extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction)

MALDI..... ionizace za účasti matrice (matrix-assisted laser ionization)

MCFA..... mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (medium chain fatty acids)

MK mastné kyseliny

MS hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

MTBE..... methyl tert-butyl ether

MUFA mononenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)

NMR..... nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)

NP-HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi (normal phase high performance liquid chromatography)

PUFA..... polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)

RID refraktometrický detektor (refractive index detector)

RP-HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (reversed phase high performance liquid chromatography)

SCFA..... mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short chain fatty acid)

SFC..... superkritická fluidní chromatografie (supercritical fluid chromatography)

SIM..... monitorování vybraného iontu (selected ion monitoring)

SPE extrakce na pevné fázi (solid phase extraction)

TCD..... tepelně vodivostní detektor (thermal conductivity detector)

TFA trans mastné kyseliny (trans fatty acids)

TLC-Ag tenkovrstvá chromatografie se stříbrnou fází (silver ion thin layer chromatography)

UHPLC..... ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)

VLDL lipoprotein o velmi nízké hustotě (Very Low Density Lipoprotein)

VLFA mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (very long chain fatty acids)

ÚVOD

Lipidy, spolu se sacharidy a bílkovinami, patří mezi základní živiny, které lidský organismus potřebuje ke své správné každodenní činnosti. Základní součástí všech lipidů jsou mastné kyseliny. Mastné kyseliny mají v organismu mnoho klíčových funkcí. Ve výživě představují bohatý zdroj energie. Jsou hlavní složkou buněčných membrán, jejichž propustnost a pružnost je dána složením mastných kyselin membránových fosfolipidů. Účastní se tvorby tukové tkáně a transportu energie. Jsou prekurzory mnoha významných látek a signálních molekul, jako jsou například prostaglandiny, které se podílí na tvorbě hormonů. Co se týče výživy, nejdůležitější je příjem polynenasycených mastných kyselin $\omega 3$ a $\omega 6$. Tyto polynenasycené mastné kyseliny jsou esenciální, tělo není schopno je samo vytvořit, a tak je nezbytné přijímat je potravou. Ovlivňují zánětlivé procesy v těle, krevní srážlivost, vývoj buněk a pomáhají koordinovat buněčné procesy v těle. Jejich pravidelný a vyvážený příjem může být prevence různých problémů a onemocnění.

Všechny buňky lidského těla obsahují určité složení lipidů. Bylo zjištěno, že toto složení se mění v souvislosti se vznikem a průběhem některých nemocí, jako je například rakovina, diabetes, hypertenze či ateroskleróza. Se změnou obsahu lipidů v buňkách se rovněž mění obsah některých mastných kyselin, které mohou sloužit jako biomarker daného onemocnění.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu pro stanovení *cis* a *trans* izomerů a polohových izomerů mastných kyselin ve vzorcích rostlinných olejů a krevního séra, přičemž krevní sérum pocházelo od zdravých lidí po pacienty trpící rakovinným onemocněním.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Lipidy

Lipidy jsou pestrá skupina látek, které mohou mít rostlinný nebo živočišný původ. Mohou se vyskytovat ve formě jednoduchých organických molekul, ale i složitých molekul obsahujících nelipidovou část. Dají se charakterizovat jako estery nebo jiné deriváty mastných kyselin. Vyznačují se malou rozpustností v polárních organických rozpouštědlech jako jsou ether, chloroform nebo aceton a také se relativně málo rozpouští ve vodě (hydrofobicita) [1–4].

Lipidy představují pro lidské tělo z hlediska výživy nejbohatší zdroj energie. V trávicím traktu člověka se tuky přeměňují na jednoduché acylglyceroly, jejichž oxidací získá organismus až 38 KJ/g, což je více jak dvakrát tolik energie, kolik může tělo získat oxidací stejného množství sacharidů (17 KJ/g). Množství tuku přijaté nad normální potřebu se přemění na adipocyty (tukové buňky), které se ukládají v některých tkáních a na povrchu některých orgánů. Tuková tkáň v organismu brání ztrátám tepla i vody a zároveň slouží jako rezerva energie, v oblasti orgánů slouží především jako ochrana před mechanickým poškozením. Prostřednictvím tuků tělo přijímá lipofilní vitamíny A, D, E a K, které jsou nezbytné pro správné fungování organismu [3–7].

Lipidy jsou rovněž velmi důležitou součástí buněčných membrán. Membrány vznikají orientací polárních lipidů do dvojvrstvy. Lipidová dvojvrstva se v buňce účastní udržování homeostázy a brání samovolnému difuzi molekul [8].

Velký význam mají lipidy v nervové tkáni, ve které se jich vyskytuje poměrně velké množství. Převažují zde především složené lipidy a cholesterol. Lipidy zde vytváří myelinové pochvy, což jsou vrstvy na koncích nervových vláken, jejichž funkcí je jejich elektrická izolace.

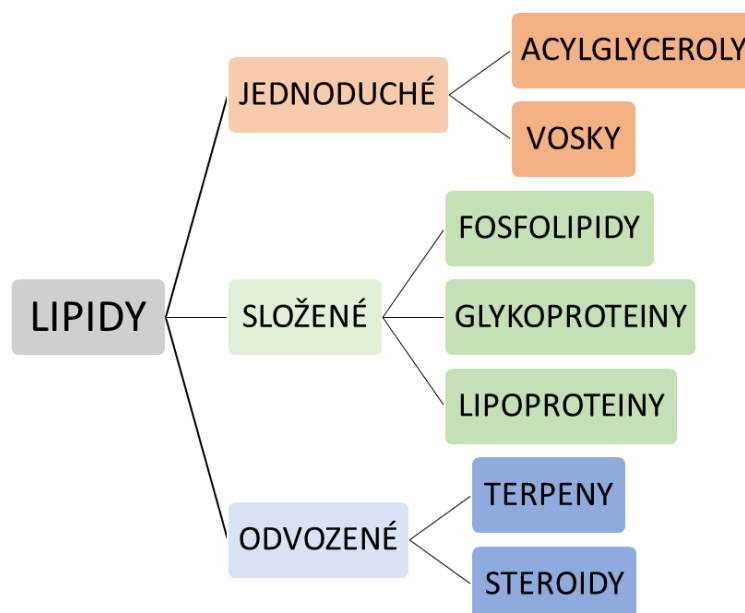
Lipidy jsou složkou stravy, jejíž nedostatek může v lidském organismu způsobit problémy jako například deficit vitamínů rozpustných v tucích, na což se váže mnoho dalších zdravotních komplikací. Naopak nadměrný příjem tuku nese rizika jako je možná obezita, onemocnění srdce, cév a zvýšené riziko vzniku nádorových onemocnění [3, 4, 6].

1.1.1 Klasifikace lipidů

Lipidy jsou velmi pestrá skupina látek. Jejich společným znakem je převaha velkých nepolárních uhlovodíkových struktur v molekule, které dodávají lipidům olejovou nebo voskovou povahu. Lipidy je možné klasifikovat podle různých hledisek či kritérií. Z chemického hlediska lipidy nejčastěji rozdělujeme do dvou skupin na podle toho, jestli je lze zmýdelnit nebo ne. Zmýdelnitelné lipidy představují estery vyšších mastných kyselin a alkoholů, nebo jejich derivátů. Působením alkalické hydrolyzy se z těchto lipidů uvolňují mastné kyseliny. Do této skupiny patří například triacylglyceroly a složené lipidy na bázi glycerolu a sfingosinu. Nezmýdelnitelné lipidy jsou sloučeniny sestavené ze zbytků isoprenu – isoprenoidy [3, 4].

Lipidy se také velmi často rozdělují podle struktury na jednoduché lipidy, na složené a na odvozené včetně jejich prekurzorů (Obrázek 1). Jednoduché lipidy jsou estery mastných kyselin a alkoholů. Do této skupiny patří tuky, které mají ve své molekule trojsytný alkohol glycerol, který tvoří vazbu s estery mastných kyselin. Dále do této skupiny řadíme vosky, jejichž struktura sestává z esterů mastných kyselin s jednosytným či dvojsytným alkoholem s dlouhým řetězcem. Složené neboli polární lipidy představují látky, které kromě mastných kyselin a alkoholů obsahují i jiné složky, které jejich molekulám dodávají amfifilní charakter. Do této skupiny patří fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteiny. Mezi odvozené lipidy a jejich prekurzory patří zejména mastné kyseliny, steroidy, terpeny, karotenoidy, alkoholy, lipofilní vitamíny a hormony. Všechny tyto zmíněné látky hrají významnou roli v metabolismu lipidů [5].

Obrázek 1 Klasifikace lipidů



1.1.2 Jednoduché lipidy

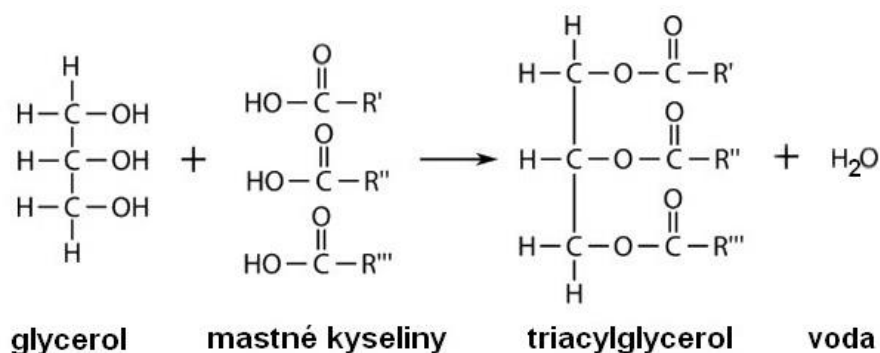
Jednoduché lipidy jsou estery mastných kyselin a alkoholů. Jsou tvořené jen hydrofobní částí. Řadíme sem acylglyceroly a vosky.

1.1.2.1 Acylglyceroly

Z chemického hlediska jsou acylglyceroly estery vyšších mastných kyselin a alkoholu propan-1,2,3-triolu, triviálním názvem glycerolu. Acylglyceroly mohou být mono-, di- nebo nejčastěji triacylglyceroly. Glycerol může být substituován stejnými, nebo různými kyselinovými zbytky. Látky spadající do této kategorie můžeme rovněž nazvat jako neutrální lipidy nebo tuky a oleje.

Triacylglyceroly jsou hlavní složkou živočišných tuků a olejů rostlinného původu. Živočišné tuky obsahují převážně nasycené mastné kyseliny, rostlinné oleje se skládají většinou z nenasycených kyselin [2–4, 7]. Z jakých složek se triacylglycerol skládá a jak vypadá jeho molekula je možné vidět na Obrázku 2.

Obrázek 2 Složky triacylglycerolu a molekula triacylglycerolu



Acylglyceroly jsou hlavními složkami zásobního tuku, tvoří až 90 % celkových tukových zásob živočichů a rostlin. V organismech mají rezervní, ochrannou a transportní funkci [3, 4].

1.1.2.2 Vosky

Vosky jsou ve vodě nerozpustné tuhé estery mastných kyselin s jednosytnými alkoholy s dlouhým lineárním řetězcem. Částými alkoholy vosků jsou například cetearylalkohol (C16), karnaubylalkohol (C24), cetylalkohol (C26) nebo myricylalkohol (C30). Živočišné tuky obsahují řetězce se šestnácti a osmnácti uhlíky a rostlinné tuky obsahují řetězce s dvaceti čtyřmi a třiceti uhlíky [3, 4].

Vosky mají ochrannou funkci tím, že vytváří hydrofobní vrstvu na vnějších částech na kůži, srsti, na listech a plodech. Průmyslově se využívá především včelí a karnaubský vosk. Vosky se hojně používají v medicíně, při výrobě kosmetiky a také v potravinářství [2].

1.1.3 Složené lipidy

Složené, nebo také polární lipidy, obsahují alkohol, zbytek vyšší mastné kyseliny a další část, podle které se dělí do skupin na fosfolipidy, lipoproteiny a glykolipidy. Fosfolipidy obsahují fosfátovou skupinu, glykolipidy obsahují molekuly sacharidu, lipoproteiny představují komplexy lipidů a proteinů [3, 4, 10].

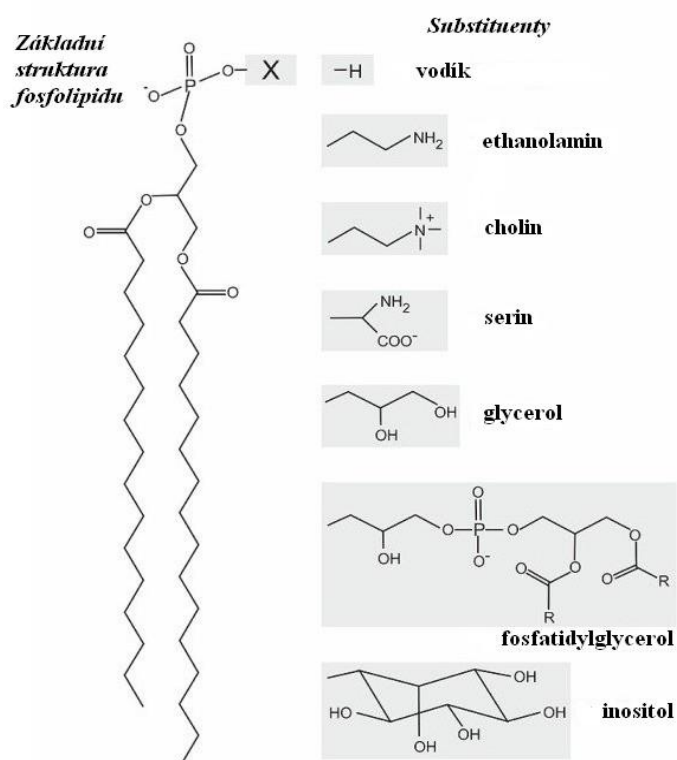
1.1.3.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy neboli fosfoacylglyceroly či fosfatidáty jsou početná skupina látek, které lze odvodit od kyseliny fosfatidové. Kyselina fosfatidová, jejíž systematický název je 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-fosforečná kyselina, je v podstatě základní stavební jednotkou pro vznik fosfolipidů a triacylglycerolů. Struktura kyseliny fosfatidové se skládá z molekuly glycerolu, jehož první a druhý uhlík je substituován zbytky mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Hydroxylová skupina glycerolu na třetím uhlíku je esterifikována kyselinou fosforečnou. Kyselina fosforečná může být dále esterifikována látkami cholinem, ethanolaminem, serinem, inositolem nebo glycerolem (Obrázek 3).

Reakcí vznikají fosfatidylcholiny, fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny, fosfatidylinositoly a fosfatidylglyceroly. Tyto fosfolipidy jsou hlavní složkou buněčných membrán živočichů. Podobnou strukturu mají látky zvané sfingomyeliny, jejichž základem je alkohol sfingosin, jehož aminoskupina tvoří vazbu s mastnou kyselinou a primární hydroxyl je esterifikován fosforylcholinem. Sfingomyeliny jsou důležitou částí biomembrán mozkových a nervových buněk [2].

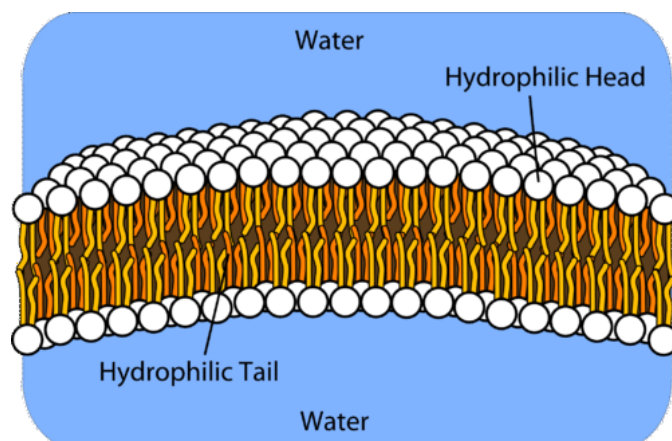
Molekuly fosfolipidů lze rozdělit na hydrofobní a hydrofilní část. Část, na které se nachází fosfátová skupina a alkohol je polární a má hydrofilní vlastnosti, díky kterým pozitivně interaguje s vodou. Druhá část obsahující řetězce mastných kyselin je nepolární a má výrazné hydrofobní účinky. Molekuly mají díky této struktuře amfifilní neboli amfipatickou povahu, která jim umožňuje organizovat se do jednovrstvých filmů či lipidových dvojvrstev [3, 8].

Obrázek 3 Struktura fosfolipidu a druhy substituentů



Jednovrstvé útvary vznikají tak, že se nepolární alifatické řetězce orientují navzájem k sobě a polární části jsou ve vodném prostředí vtahovány mezi molekuly vody. Při překročení určité koncentrace tenzidů (povrchově aktivní látka) ve vodném roztoku se fosfolipidy samovolně shlukují do jednovrstvých dutých kulovitých částic neboli micel. Díky amfifilní povaze fosfolipidů mohou vznikat fosfolipidové dvojvrstvy, které jsou nedílnou součástí buněčných membrán. Dvojvrstvy fosfolipidů vznikají seskupením hydrofobních konců, aby došlo k vytěsnění vody a vznikne dvojvrstva, ve které jsou hydrofilní části molekul lipidů orientovány k vodnému prostředí, zatímco hydrofobní části jsou orientovány dovnitř (viz Obrázek 4) [2].

Obrázek 4 Fosfolipidová dvojvrstva ve vodném prostředí [11]



1.1.3.2 Glykolipidy

Glykolipidy jsou látky, které vznikají spojením lipidové a cukerné složky. Základem molekul glykolipidů je alkohol, na který je navázán jeden nebo více zbytků mastných kyselin a monosacharidový nebo oligosacharidový zbytek. Sacharidová část molekuly má hydrofilní povahu, zatímco lipidová část molekuly je hydrofobní [12].

Glykolipidy jsou přítomny ve všech tkáních lidského těla a plní různé funkce. Nervová tkáň a šedá kůra mozku je charakteristická vysokým obsahem glykolipidů. Vyskytují se také v buněčných membránách, konkrétně na jejich vnější straně, směrem do mezibuněčného prostoru. V těchto místech vytváří složité útvary společně s povrchovými sacharidy. Významnými zástupci této skupiny látek jsou glycerolglykolipidy, glykosfingolipidy a gangliosidy.

Základem struktury glycerolglykolipidů je molekula alkoholu glycerolu, na jehož první dva uhlíky jsou navázány zbytky mastných kyselin a na zbylý třetí uhlík je navázán sacharid. Tento druh glykolipidů se nachází především u bakterií.

Glykosfingolipidy neboli cerebrosidy mají v lidském těle větší zastoupení a význam. Tvoří 1 % suché hmoty mozku, dále jsou přítomné v nervové tkáni a v malých množstvích v játrech, thymu, ledvinách a plicích. Tyto látky se také podílejí na tvorbě specifických krevních skupin a na orgánové a tkáňové imunitě. Glykosfingolipidy se skládají z molekuly aminoalkoholu sfingosinu, na který je navázán zbytek mastné kyseliny a jedna jednotka monosacharidu, nejčastěji glukóza nebo galaktóza.

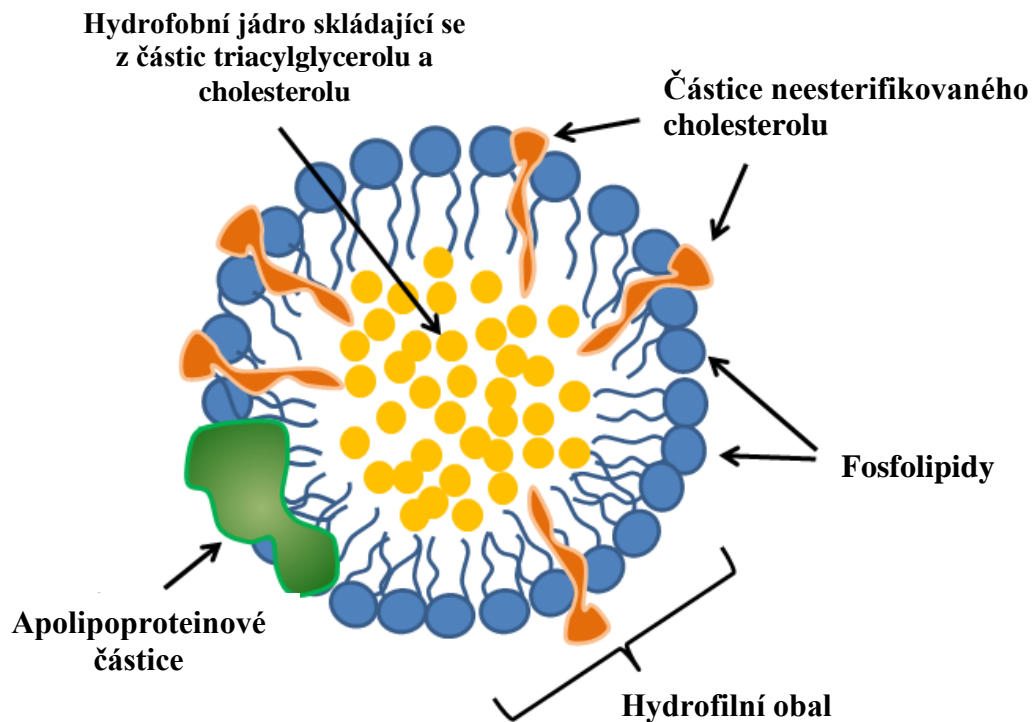
V šedé kůře mozku jsou cerebrosidy doprovázeny složitými glykolipidy zvanými gangliosidy. Kromě mozku se vyskytují i v jiných tkáních, většinou na povrchu buněk, kde plní funkci receptorů. Gangliosidy se skládají z ceramidu, sacharidu a z jedné nebo několika sialových kyselin [2–4].

1.1.3.3 Lipoproteiny

Mezi složené lipidy řadíme lipoproteiny vznikající spojením lipidů se specifickými bílkovinami nazývanými apolipoproteiny. Lipoproteiny vznikají vzájemným hydrofobním působením nepolárních oblastí obou složek. Hlavní význam tohoto spojení spočívá v tom, že bílkovina činí hydrofobní lipidové struktury dispergovatelné a stabilní ve vodném prostředí [3, 4].

Lipoproteiny vytváří sférické útvary podobné micelám, jejichž strukturu můžeme rozdělit na jádro a obal (viz. Obrázek 5). Jádro je nepolární a tvoří ho převážně komplexy triacylglycerolů, cholesterolu a jeho esterů. Obal má amfifilní charakter a sestává z jedné vrstvy fosfolipidů, jejichž hydrofilní konce směřují dovnitř lipoproteinu. V obalu jsou zabudované částice apolipoproteinu a cholesterolu.

Obrázek 5 Lipoproteinová částice [13]



Lipoproteiny jsou v lidském těle součástí buněčných membrán, cytoplazmy buněk a krevní plazmy. Plazmové lipoproteiny zajišťují transport a distribuci lipidů prostřednictvím krevní plazmy a lymfatického systému. Fungují rovněž jako regulátory metabolismu lipidů [3].

Lipoproteiny krevního séra lze dělit podle hustoty částic a elektroforetické pohyblivosti (rychlost pohyblivosti iontu v elektrickém poli) [7]. Nejvýznamnějšími lipoproteinovými částicemi v plazmě jsou chylomikra, lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL). Každý druh těchto částic má specifické funkce a vlastnosti. Hlavní funkcí chylomikronů je transport tuků z potravy. Fungují jako přenašeče triacylglycerolů, které jsou působením lipáz rozloženy na jednodušší monoacylglyceroly. VLDL částice mají za úkol přenos triacylglycerolů z jaterních buněk k ostatním tkáním. LDL částice dodávají cholesterol okolním buňkám. HDL lipoproteiny mají důležitou roli v metabolismu cholesterolu a jejich správné fungování brání hromadění cholesterolu v tkáních [1, 14].

1.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny tvoří hlavní součást tuků. Z hlediska struktury lze mastné kyseliny popsat jako alifatické monokarboxylové kyseliny s dlouhým, nevětveným řetězcem, který je tvořen čtyřmi až dvaceti šesti atomy uhlíku. Počet uhlíků v řetězcích kyselin je většinou sudý, protože jsou syntetizovány z dvou uhlíkových podjednotek. Jejich vlastnosti jsou silně ovlivněny délkou řetězce a obsahem dvojných či trojných vazeb. V organismu se mohou vyskytovat volné nebo jako složky komplexních lipidů, což rovněž záleží na struktuře. Kyseliny, které obsahují deset a více uhlíků se v buňkách vyskytují většinou vázané. Pokud má kyselina takto dlouhý řetězec a vyskytuje se v organismu volně, může narušovat buněčné struktury svou vysokou povrchovou aktivitou. Obsahují hydrofilní i hydrofobní část, díky čemuž mají amfipatickou povahu. Jsou relativně dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech [2–4].

Mastné kyseliny v lidském organismu zastávají spoustu klíčových funkcí. Jsou součástí struktur všech tuků, z čehož vyplývá, že se podílí na všech procesech, které byly popsány již v předchozích kapitolách o jednoduchých a složených lipidech. Mastné kyseliny přijaté z potravy jsou bohatým zdrojem energie. Účastní se tvorby tukové tkáně a transportu energie jako součásti triacylglycerolů, také jsou obsaženy ve struktuře fosfolipidů v buněčných membránách. V membránách se vyskytují polynenasycené mastné kyseliny, jejichž složení ovlivňuje aktivitu enzymů, které se na ně vážou. Mastné kyseliny figurují jako prekurzory signálních molekul a dalších významných látek jako jsou například prostaglandiny, které se v organismu podílí na tvorbě hormonů a srážení krve [15].

Mastné kyseliny lze separovat a identifikovat různými analytickými metodami. V dnešní době je nejvíce uplatňována plynová chromatografie, která je pro tento druh analýzy dostatečně účinná, selektivní a výsledky jsou reprodukovatelné. Před samotnou analýzou je potřeba mastné kyseliny derivatizovat převedením na jejich methylestery. Derivatizací se sníží bod varu, zvýší citlivost detekce a kvalita rozlišení píků. Jiná analytická metoda vhodná k analýze mastných kyselin je například vysokoúčinná kapalinová chromatografie [16, 17].

1.2.1 Klasifikace mastných kyselin

Mastné kyseliny lze klasifikovat několika různými způsoby – podle délky uhlovodíkového řetězce, podle přítomnosti násobné vazby, podle větvení řetězce nebo podle toho, jestli je tělo dokáže vytvořit samo nebo je potřeba přijímat potravou.

Dělení mastných kyselin podle délek řetězce:

- Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short chain fatty acids = SCFA) – C2 až C4

- Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (medium chain fatty acids = MCFA) – C6 až C12
- Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (long chain fatty acids = LCFA) – C14 až C22
- Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (very long chain fatty acids = VLFA) – C22 a více

Dělení mastných kyselin podle přítomnosti dvojných vazeb:

- Nasycené = mastné kyseliny obsahují pouze jednoduché vazby
- Nenasycené = mastné kyseliny obsahují kromě jednoduchých vazeb i jednu či více dvojných vazeb, vzácně i trojnou vazbu

Dělení mastných kyselin podle větvení řetězce:

- Lineární – většina mastných kyselin
- Rozvětvené – ojedinělé, například kyselina isovalerová

Dělení mastných kyselin podle toho, zda jsou esenciální či nikoliv:

- Esenciální
- Neesenciální

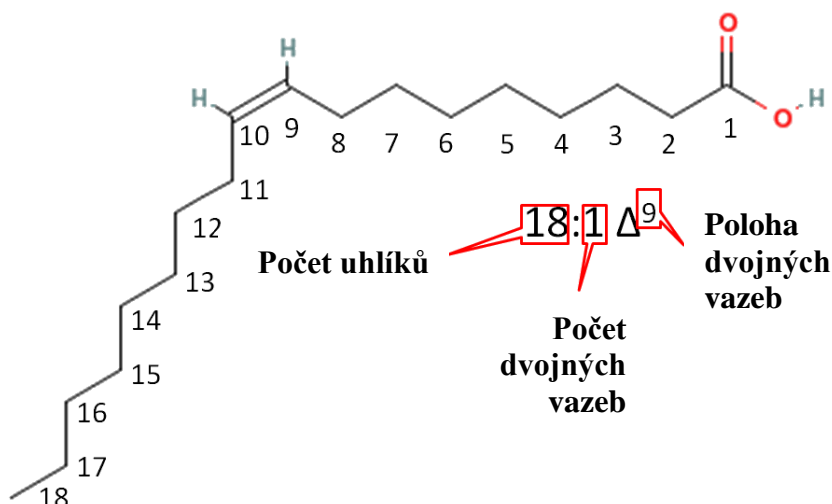
Ostatní mastné kyseliny – obsahují trojnou vazbu a různé substituenty – rozvětvené, cyklické, s dusíkatými nebo sírnými skupinami

1.2.2 Názvosloví mastných kyselin

Mastné kyseliny mají triviální a systematický název. Systematický název je odvozen od názvu uhlovodíku, který má stejný počet uhlíků, jako je počet uhlíků v řetězci konkrétní kyseliny. Dále se také velmi často název kyseliny vyjadřuje ve formě kráceného zápisu, který je podrobněji popsán níže [2].

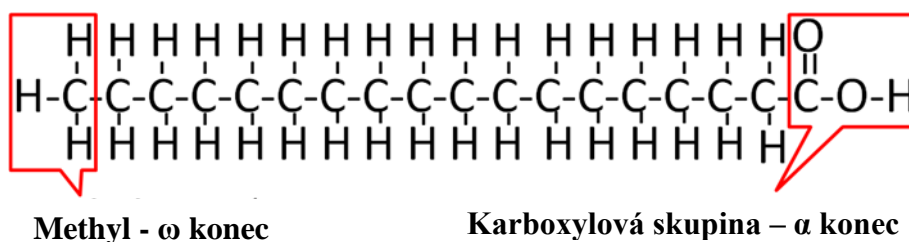
Pro konkrétnější specifikaci názvu mastných kyselin je nutné znát mechanismus číslování atomů uhlíků mastné kyseliny. Číslování začíná od uhlíku obsaženého v karboxylové funkční skupině -COOH, kterému je přiřazeno označení 1. Následující uhlík v řetězci má číslo 2 a označuje se řeckým písmenem α , další uhlík je označován číslem 3 a označuje se β atd. Koncový methyl mastné kyseliny obsahuje uhlík, kterému se obecně říká n -uhlík, nebo také ω -uhlík. Pokud mastná kyselina obsahuje jednu či více dvojných vazeb, lze jejich polohu v molekule vyjádřit dvěma způsoby. Prvním způsobem je použití kráceného zápisu v obecném tvaru $C_N:M$ $\Delta^{a,b,c}$ ve kterém N značí počet uhlíků, M počet dvojných vazeb a exponenty nad řeckým písmenem delta značí polohu dvojných vazeb, počítané od karboxylového uhlíku (viz. Obrázek 6)

Obrázek 6 Zkrácený zápis názvu mastné kyseliny



Dále lze vyjádřit polohu dvojné vazby její vzdáleností od ω uhlíku, čísla jsou tedy počítána od opačného konce molekuly (viz. Obrázek 7).

Obrázek 7 Molekula mastné kyseliny a znázornění, kde se nachází α konec a ω konec řetězce



Podle pozice dvojné vazby od ω uhlíku lze mastné kyseliny rozdělit do tří skupin: $\omega 3$ (dvojná vazba na třetím uhlíku od ω uhlíku), $\omega 6$ (na šestém uhlíku od ω uhlíku) a $\omega 9$ (na devátém uhlíku od ω uhlíku) [18].

1.2.3 Nasycené mastné kyseliny

Mastné kyseliny, které neobsahují žádnou dvojnou vazbu se nazývají nasycené. Vyznačují se obecně vyššími body tání než kyseliny nenasycené. Bod tání se zvyšuje s rostoucí délkou řetězce a klesá s přibývajícím počtem dvojných vazeb. Z toho vyplývá, že tuky, v jejichž obsahu převládá množství nasycených mastných kyselin, mají za pokojové teploty spíše pevné skupenství. Potraviny obsahující větší množství nasycených mastných kyselin jsou především masné produkty, maso, mléčné produkty a mléko, průmyslově zpracované potraviny, kokosový a palmový olej [15, 19]. Přehled nasycených mastných kyselin podle počtu uhlíků v řetězcích a jejich systematické a triviální názvy jsou v Tabulce 1.

Tabulka 1 Nasycené mastné kyseliny

Počet uhlíků řetězce	Triviální název kyselin	Systematický název kyselin
C4	Máselná	Butanová
C6	Kapronová	Hexanová
C8	Kaprylová	Oktanová
C10	Kaprinová	Dekanová
C12	Laurová	Dodekanová
C14	Myristová	Tetradekanová
C16	Palmitová	Hexadekanová
C18	Stearová	Oktadekanová
C20	Arachová	Eikosanová
C22	Behenová	Dokosanová
C24	Lignocerová	Tetrakosanová
C26	Cerotová	Hexakosanová

Ze zdravotního hlediska může být nadměrná konzumace potravin s vyšším obsahem nasycených mastných kyselin riziková. Může vést k onemocnění srdce a cév a zvýšení koncentrací cholesterolu v krvi [15].

1.2.4 Mononenasycené mastné kyseliny (MUFA)

Jak z názvu vyplývá, mononenasycené mastné kyseliny obsahují ve svých molekulách právě jednu dvojnou vazbu. Patří sem například kyselina palmitoolejová, olejová nebo eruková (Tabulka 2) [15]. Podle klasifikace omega lze vyjmenované kyseliny zařadit mezi ω 9 mastné kyseliny. Mastné kyseliny patřící do této skupiny nejsou esenciální, tělo je schopné je vytvořit z kyselin s kratšími řetězci. Skupenství tuků a olejů obsahující převážně mononenasycené mastné kyseliny je při pokojové teplotě většinou tekuté, chlazením tuhnou [19].

Tabulka 2 Mononenasycené mastné kyseliny

Zkrácený zápis kyselin	Poloha a druh dvojných vazby	Omega série	Triviální název	Systematický název
C16:1	<i>cis</i> Δ^9	ω 7	Palmitoolejová	Hexadecenová
C18:1	<i>cis</i> Δ^9	ω 9	Olejová	Oktadecenová
C20:1	<i>cis</i> Δ^{11}	ω 9	Gondová	Eikosenová
C22:1	<i>cis</i> Δ^{13}	ω 9	Eruková	Dokosenová
C24:1	<i>cis</i> Δ^{15}	ω 9	Nervonová	Tetrakosenová

Z mononenasycených mastných kyselin je nejvíce rozšířená již zmíněná kyselina olejová. Ta má vícero příznivých účinků na organismus jako je například protektivní vliv na kardiovaskulární systém a napomáhá regulovat hladinu LDL cholesterolu v krvi.

I přes příznivější fyziologické účinky, než mají nasycené mastné kyseliny, by se potraviny s vyšším obsahem mononenasycených mastných kyselin měly konzumovat střídavě. Nejvyšší obsah mononenasycených mastných kyselin mají olivový, řepkový, sezamový, ořechový olej [20].

1.2.5 Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA)

Polynenasycené mastné kyseliny označované též zkratkou PUFA (polyunsaturated fatty acids) obsahují ve svých molekulách dvě a více dvojných vazeb. Triacylglyceroly, obsahující převážně PUFA, se při pokojové teplotě vyskytují tekuté.

Obecně se PUFA účastní mnoha biologických procesů, například ovlivňují zánětlivé procesy v těle, krevní srážlivost a vývoj buněk a koordinaci buněčných procesů. Při pravidelné a vyvážené konzumaci prokazatelně snižují hladiny cholesterolu v krvi, riziko onemocnění srdce a riziko mrtvice. Nejvíce jich obsahuje slunečnicový, světlicový, kukuřičný, sójový olej, rybí tuk, vlašské ořechy a tofu.

Do skupiny PUFA řadíme velmi významné esenciální mastné kyseliny. Esenciální mastné kyseliny jsou sloučeniny, které je nezbytné přijímat s potravou, protože lidské tělo není schopné je samo vytvořit. Za devátý uhlík v řetězci, počítaný od karboxylového uhlíku, není možné v lidském těle vnést dvojnou vazbu, a proto nejsme schopni syntetizovat omega-3 a omega-6 nenasycené mastné kyseliny [3, 20].

Mezi esenciální mastné kyseliny patří kyselina linolová a α -linolenová kyselina. Kyselina arachidonová je prekurzorem biologicky aktivních látek eikosanoidů, jejichž hlavní funkcí je zajištění buněčné signalizace. Kyselina linolová má prozánětlivé účinky, stejně jako jiné ω -6 mastné kyseliny, a zvyšuje hladiny některých lipidů v plazmě. Kyselinu α -linolenová snižuje hladinu cholesterolu a triacylglycerolů v těle a snižuje tak riziko kardiovaskulárních onemocnění, má i protizánětlivé účinky. Kyselina arachidonová není esenciální, protože ji lze vytvořit z kyseliny linolové. Součástí stravy by tedy měla být buď kyselina arachidonová, nebo by měla být nahrazena linolovou a α -linolenovou kyselinou, ze kterých lze kyselinu arachidonovou syntetizovat [4, 21]. Při dlouhodobějším nedostatku jmenovaných kyselin se může projevit větší únava, nižší výkonost, větší náchylnost k infekcím, poruchy reprodukce a různé kožní problémy. Mezi potraviny bohaté na esenciální mastné kyseliny patří především

ryby, rostlinné oleje, ořechy (hlavně vlašské), lněné semínko, listová zelenina, některé živočišné tuky [20]. Příklady polynenasycených mastných kyselin a polohy jejich dvojných vazeb jsou vypsány v Tabulce 3.

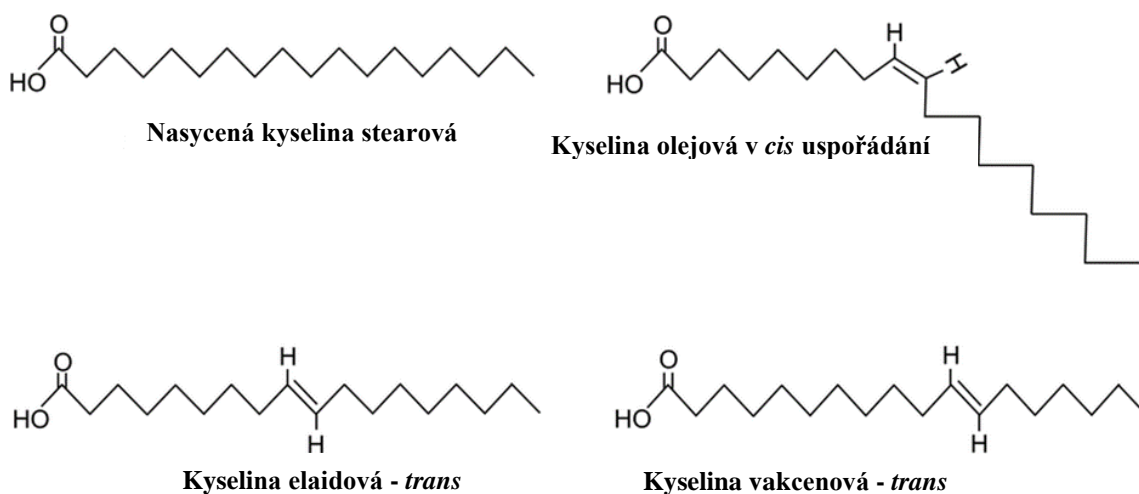
Tabulka 3 Polynenasycené mastné kyseliny

Zkrácený zápis kyselin	Poloha a druh dvojných vazby	Omega série	Systematický název	Triviální název
C18:2	<i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	$\omega 6$	Oktadekadienová	Linolová
C18:3	<i>cis</i> $\Delta^{9,12,15}$	$\omega 3$	Oktadekatrienová	α -linolenová
C18:3	<i>cis</i> $\Delta^{6,9,12}$	$\omega 6$	Oktadekatrienová	γ -linolenová
C20:4	<i>cis</i> $\Delta^{5,8,11,14}$	$\omega 6$	Eikosatetraenová	Arachidonová
C22:4	<i>cis</i> $\Delta^{7,10,13,16}$	$\omega 6$	Dokosatetraenová	Adrenová

1.2.6 *Trans* mastné kyseliny (TFA)

U nenasycených mastných kyselin existuje *cis/trans* izomerie, což je jev, který vzniká přítomností dvojných vazeb v molekule. Kolem dvojných vazeb může docházet k volné otáčivosti atomů. Tato izomerie závisí na orientaci atomů kolem osy procházející dvojnou vazbou. U *trans* izomerie se každý zbytek mastné kyseliny nachází na opačné straně dvojných vazeb, jako je tomu například u kyseliny elaidové. U *cis* konfigurace se oba zbytky mastné kyseliny nacházejí na stejné straně dvojných vazeb, což je případ kyseliny olejové [20]. Nenasycené mastné kyseliny s konfigurací *trans* mají tvar molekul velmi podobný nasyceným mastným kyselinám, řetězec je tedy napříměný [22]. Mastné kyseliny s *cis* konfigurací mají řetězec zahnutý (Obrázek 8).

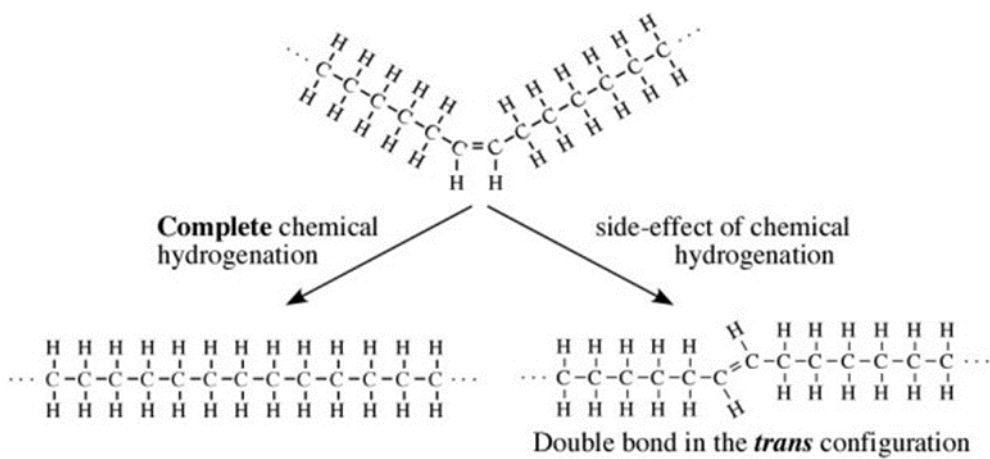
Obrázek 8 Rozdíly ve struktuře *cis* a *trans* nenasycených mastných kyselin [22]



V přírodě převažuje výskyt mastných kyselin, které mají dvojných vazeb v pozici *cis*. Mastné kyseliny s dvojnými vazbami v *trans* konfiguraci (TFA) se v menší míře mohou vyskytovat

například v molekulách sfingosinů, izoprenových lipidů a v některých specifických biologicky aktivních sloučeninách. TFA jsou také produkty mnoha bakteriálních přeměn. Přirozeně se vyskytují v malém množství v mléce a mase přežvýkavců [20, 23]. V současné době jsou jejich největším zdrojem částečně hydrogenované rostlinné oleje a potraviny, které je obsahují. TFA totiž vznikají uměle jako vedlejší produkty při procesu hydrogenace nenasycených mastných kyselin za účelem výroby margarínů [20, 23]. Proces hydrogenace a vznik *trans* nenasycených mastných kyselin je znázorněn na Obrázku 9.

Obrázek 9 Hydrogenace nenasycených mastných kyselin [20]



V potravinách obsahujících margaríny se převážně vyskytují *trans* izomery mastných kyselin obsahujících osmnáct atomů uhlíku a jednu dvojnou vazbu. V menším množství lze v těchto potravinách nalézt i konjugovanou kyselinu linolovou [23]. Příklady nenasycených mastných kyselin a od nich odvozených *trans* izomerů jsou v Tabulce 4.

Tabulka 4 Mastné kyseliny a od nich odvozené trans izomery

Zkrácený zápis kyselin	Poloha a druh dvojné vazby	Omega série	Triviální název	Systematický název
C16:1	<i>cis</i> Δ^9	$\omega 7$	Palmitoolejová	<i>Cis</i> -9-hexadecenová
	<i>trans</i> Δ^9	$\omega 7$	Palmitelaidová	<i>Trans</i> -9-hexadecenová
C18:1	<i>cis</i> Δ^6	$\omega 12$	Petroselinová	<i>Cis</i> -6-oktadecenová
	<i>trans</i> Δ^6	$\omega 12$	Petroselaidová	<i>Trans</i> -6-oktadecenová
	<i>cis</i> Δ^9	$\omega 9$	Olejová	<i>Cis</i> -9-oktadecenová
	<i>trans</i> Δ^9	$\omega 9$	Elaidová	<i>Trans</i> -9-oktadecenová
	<i>cis</i> Δ^{11}	$\omega 7$	Asklepová	<i>Cis</i> -11-oktadecenová
	<i>trans</i> Δ^{11}	$\omega 7$	Vakcenová	<i>Trans</i> -11-oktadecenová
C18:2	<i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	$\omega 6$	Linolová	<i>Cis</i> 9,12-oktadekadienová
	<i>trans</i> $\Delta^{9,12}$	$\omega 6$	Linoelaidová	<i>Trans</i> 9,12-oktadekadienová

Izomerie mastných kyselin je významná pro prostorové uspořádání molekul lipidů v buněčných membránách. Složení a struktura membrán se může měnit v závislosti na okolních podmínkách a složením přijímané stravy. Pro správnou funkci je nutné udržovat jejich fyziologickou fluiditu, která souvisí s homeostázou, normálním růstem a dělením. Fluidita membrán má klíčovou roli například při vazbě látek na membránové receptory, při interakci mezi buňkami navzájem a při regulaci aktivity membránových enzymů, receptorů a kanálů. Změny membránové fluidity byly zjištěny jako doprovodný jev u různých nemocí, jako je například hyperlipidemie, hypertenze, diabetes, a Alzheimerova choroba [23, 24]. Mastné kyseliny s dvojnými vazbami v *cis* konfiguraci zaujímají ve struktuře membrán více prostoru a brání tak stlačování molekul fosfolipidů vznikající tlakem okolních molekul v membráně, což je činí fluidnější a odolnější. Naproti tomu konfigurace *trans* kvůli své přímé struktuře požadovanou strukturu membrán spíše narušuje a snižuje tak jejich fluiditu. Mononenasyčené a polynenasycené mastné kyseliny vyskytující se ve struktuře glycerolů ve fosfolipidových membránách by tak měly být především v konfiguraci *cis* [24].

Jak tedy vyplývá z předchozích informací, nadměrná konzumace TFA může být škodlivá. *Trans* mastné kyseliny mohou zvyšovat riziko vzniku metabolických, kardiovaskulárních, neurodegenerativních onemocnění a diabetu [20, 24]. Mají rovněž nepříznivý efekt na obsah krevních lipoproteinů tím, že zvyšují hladinu LDL cholesterolu a snižují hladinu HDL cholesterolu. TFA také mohou zhoršovat inzulínovou senzitivitu [24]. Jejich denní příjem by měl být do 1 % z celkového příjmu energie, což odpovídá přibližně 2,0 až 2,5 g na den [20].

1.3 Metody stanovení mastných kyselin

V dnešní době existuje mnoho možností stanovení zastoupení mastných kyselin ve vzorcích různého typu. V současnosti se nejvíce využívají chromatografické metody jako je plynová [25–30] a kapalinová chromatografie [25, 26, 30–33]. Pro určení doplňkových ukazatelů jako je počet dvojných vazeb či zjištění polohových izomerů lze použít spektrofotometrické metody jako je například UV-VIS spektrometrie [34, 35] nebo infračervené spektroskopie (IR) [25, 36, 37]. Volné mastné kyseliny v tucích a olejích lze stanovit za použití nukleární magnetické rezonance (NMR) [38, 39].

Mastné kyseliny se v přírodě obvykle nevyskytují volně, většinou jsou zakomponované v triacylglycerolech a fosfolipidech esterovými vazbami. Prvním krokem přípravy vzorku je většinou izolace tuků s následným uvolněním mastných kyselin z tuků hydrolyzou. Často je nutné volné mastné kyseliny derivatizovat, aby bylo možné je separovat nebo detekovat pomocí chromatografických metod a různým typem detekce [40].

1.3.1 Příprava vzorku

Prvním krokem přípravy vzorku je homogenizace. Homogenizace nám zajišťuje stejnou distribuci analytu ve všech jeho částích. U kapalných vzorků je homogenizace vcelku jednoduchá, většinou stačí vzorek zředit a řádně promíchat například na vibračním míchadle Vortex. U pevných vzorků je homogenizace o něco komplikovanější. Vzorek je možné sekat, krájet nebo mlít a posléze použít například homogenizátor ULTRA TURRAX, aby došlo k dostatečnému zmenšení a dezintegraci všech částic. Po homogenizaci následuje extrakce tuku ze vzorku. To lze nejjednodušeji provést metodou dvoufázové extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) za použití nepolárních organických rozpouštědel jako je například hexan, chloroform, diethylether, petrolether nebo methyl-terc-butylether (MTBE) [40]. Pro extrakci lipidů z potravinářských vzorků nebo biologických tkání se používá Folchova nebo Bligh Dyerova metoda, při které se využívá směs rozpouštědel chloroformu, methanolu a vody [40, 41]. Dalšími možnými metodami je Soxhletova extrakce [40, 41], extrakce na pevné fázi (SPE) [40–42], mikroextrakce na pevné fázi (SPME) [42, 43] nebo extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) [40]. Pro extrakci tuku z pevných vzorků se používá Soxhletova extrakce, jejíž princip spočívá v mnohonásobné extrakci látky čistým rozpouštědlem [41]. SPE a její zmenšená varianta SPME fungují na principu rozdílné afinity látek k sorbentu umožňující zachycení analytu nebo matrice vzorku. Před nanesením vzorku na kolonku je třeba ji aktivovat promytím vhodným rozpouštědlem, poté je zaveden vzorek a po promytí následuje eluce. Tato metoda pracuje

s malými objemy rozpouštědel v porovnání s LLE [41]. Extrakce nadkritickou tekutinou využívá vlastností látky, která má při kritických podmínkách vlastnosti jako kapalina a plyn zároveň. Jako nadkritická kapalina se používá oxid uhličitý, který je nepolární, tudíž je vhodný pro extrakci polárních látek včetně lipidů [40]. Pro podpoření extrakce lze použít ultrazvuk. Ultrazvuk extrakci napomáhá tak, že způsobuje efekt kavitace, kterým dochází k rozrušení shluků částic v roztoku [40].

Po izolaci tuku následuje hydrolýza, a to buď vodou nebo hydroxidem sodným, čímž se tuk rozloží na glycerol a mastné kyseliny [40, 41]. Uvolněné mastné kyseliny je možné zakonzentrovat, k čemuž mohou sloužit například SPE kolonky s fází obsahující stříbrné ionty. Stříbrný iont je selektivní ke dvojným vazbám, protože vzájemnou interakcí dochází ke vzniku komplexů iontů stříbra a π elektronů ve dvojných vazbách. Látky obsahující dvojnou vazbu jsou kolonkou tedy velmi dobře zadrženy. Sorbent kolonky obsahuje silikagel, na kterém je navázána stříbrná fáze nebo aniont výměnná fáze, na které je navázán stříbrný iont. Tato kolonka tedy může sloužit k zakonzentrování ale i frakcionaci mastných kyselin podle počtu dvojných vazeb [44, 45].

1.3.2 Spektrofotometrické metody

Tyto metody neslouží k vlastnímu stanovení jednotlivých mastných kyselin, ale pouze ke zjištění určitých doplňkových informací, jako je například obsah cis a trans izomerů, počet dvojných vazeb nebo stanovení obsahu volných mastných kyselin v tucích či olejích.

1.3.2.1 Spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

Používá se molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové (UV) oblasti. Ultrafialové záření je druh elektromagnetického záření v oblasti vlnových délek od 190 do 380 nm. Principem metody je absorpce elektromagnetického záření atomy a molekulami analytu při průchodu paprsku světla vzorkem [45]

Spektrometrií v UV oblasti se stanovují konjugované dienové a trienové mastné kyseliny. Mastné kyseliny v základním stavu neobsahují konjugovaný systém dvojných vazeb a absorbují pouze v oblasti pod 200 nm. Avšak pokud jsou oxidovány, dochází ke vzniku hydroperoxidů a tím k posunu dvojných vazeb, přičemž jeden z oxidačních produktů obsahuje konjugované dvojnou vazbu a absorbuje UV záření v oblasti kolem 230 nm. UV spektrometrií lze určit i oxidační produkty olejů či tuků, které jsou ukazatelem míry žluknutí [34].

Lipidy jsou ze vzorku extrahovány Folchovou metodou. Extrahované lipidy jsou následně regenerovány odpařením chloroformu pod proudem dusíku. Lipidy jsou poté rozpuštěny

ve vhodném rozpouštědle, což je nejčastěji hexan. Následně se změří absorbance vzorku oproti čistému rozpouštědlu. Čím více dvojných vazeb mastná kyselina obsahuje, tím více se absorpční maximum posouvá směrem k vyšším vlnovým délkám. Obsah konjugovaných dienů a trienů se zjistí přepočtem naměřené hodnoty absorbance [34, 35].

1.3.2.2 Spektrometrie v infračervené oblasti

Infračervená spektroskopie měří absorpční spektra látek v rozsahu vlnových délek od 800 nm až 0,5 mm, což odpovídá rozsahu vlnočtu 12800 až 10 cm^{-1} . Infračervenou oblast je možné rozdělit do tří oblastí, a to na blízkou ($13000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$), střední ($4000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$) a vzdálenou oblast ($200\text{--}10\text{ cm}^{-1}$). Pro identifikaci a určování chemické struktury má největší význam střední infračervená oblast [45].

IČ spektrometrie se používá ke zjištění obsahu trans mastných kyselin ve vzorcích tuků a olejů. Deformace vazby C-H přítomné u dvojných vazeb v konfiguraci trans způsobuje absorpci v blízké infračervené oblasti vlnočtu kolem 976 a 956 cm^{-1} s maximem při 966 cm^{-1} [25, 36, 37]. Tato metoda je velmi rychlá, nedestruktivní a lze ji použít v běžném rutinním provozu. Stanovení se provádí tak, že se triacylglyceroly ve vzorku tuku převedou na methylestery mastných kyselin a poté se rozpustí v sirouhlíku. V současnosti se k tomuto účelu nejvíce používá IČ spektrometrie s Fourierovou transformací pracující v reflexním režimu [25, 36].

1.3.2.3 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Ve vzorcích tuků a olejů se mohou vyskytovat volné mastné kyseliny (FFA). FFA se uvolňují hydrolýzou, která může probíhat vlivem výrobního procesu, skladování, obecnou manipulací se surovinou nebo samovolnou degradací v čase [38]. Vyšší obsah volných mastných kyselin v olejích a tucích je ukazatelem horších organoleptických, výživových a technologických vlastností. Zavedenou metodou pro zjišťování obsahu volných mastných kyselin je tzv. číslo kyselosti, které se počítá jako množství odměrného roztoku hydroxidu draselného v miligramech, potřebné k neutralizaci všech volných mastných kyselin přítomných v jednom gramu vzorku. Číslo kyselosti se tedy stanovuje titrací vzorku standardizovaným ethanolovým roztokem hydroxidu draselného za použití fenolftaleinu jako indikátoru [38, 39, 46]. Ke zjištění množství volných mastných ve vzorcích lipidů lze rovněž použít techniku nukleární magnetické rezonance vodíkových jader ($^1\text{H-NMR}$). Příprava vzorku pro stanovení je velmi jednoduchá, olej nebo tuk stačí rozpustit v deuterovaném chloroformu. Nenasycené mastné kyseliny lze kvantifikovat pomocí píků olefinových protonů v oblasti 5,3 až 5,4 ppm, protonů vázaných na allylové uhlíky v oblasti 2,7 až 2,8 ppm a protonů vázaných na allylové uhlíky v oblasti 2,0 až 2,1 ppm. Nenasycené mastné kyseliny lze určit pomocí signálu methylenových protonů při

1,2–1,4 ppm [39, 46]. Tento způsob stanovení čísla kyselosti je rychlý, nedestruktivní a přesný. Nevýhodou jsou vysoké pořizovací a provozní náklady NMR přístroje a také vyšší ceny používaných deuterovaných rozpouštědel.

1.3.3 Chromatografické metody

V současné době se pro stanovení mastných kyselin v potravinářských a biologických vzorcích nejvíce používají chromatografické metody. Jedná se o analytické separační metody, jejichž principem je rozdělování složek obsažených ve vzorku mezi stacionární a mobilní fází. Toto dělení je založeno na rozdílné afinitě složek vzorku ke stacionární a mobilní fázi [45]. Nejúčinnější a nejpoužívanější metodou je plynová chromatografie [25–30, 52–54], často se používá také vysokoúčinná kapalinová chromatografie [25, 26, 31–33], dalšími možnostmi je argentační chromatografie [44–46] a superkritická fluidní chromatografie (SFC) [47–51].

1.3.3.1 Plynová chromatografie

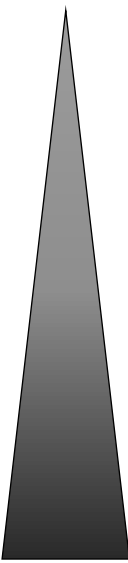
Plynová chromatografie (GC) je separační metodou, která se využívá k dělení plynů a těkavých látek, mnoha organokovových látek nebo pevných organických molekul s bodem varu do 400 °C. Mobilní fází plynové chromatografie je plyn, využívá se například helium, dusík, argon nebo vodík [45]. V plynové chromatografii se v současné době používají především kapilární kolony, které svou vysokou účinností a rychlostí separace nahradily dříve používané náplňové kolony. Kapilární kolony jsou křemenné, potažené vrstvou hliníku nebo polyimidu. Mají průměr okolo 0,1 až 0,75 mm a délka může být 5 až 150 m. Stacionární fáze je nanášena na vnitřní straně jako tenký film polymeru (open tubular wall-coated) nebo je impregnována do porézní vrstvy (porous layer/support coated open tubular) [52–55].

Pokud je stacionární fází pevná látka, pak se jedná o druh GC, při které se složky rozdělují mezi systém plyn-pevná látka (GSC). V systému plyn-pevná látka je separační mechanismus adsorpčního charakteru, kdy o separaci složek vzorku rozhoduje schopnost adsorbovat se na povrch stacionární fáze. Jinou možností je, že stacionární fází je kapalina, v tom případě se jedná o chromatografii plyn-kapalina (GLC). Separací mechanismus je v tomto systému rozdělovací a separované látky jsou mezi mobilní a stacionární fází rozděleny podle rozpustnosti a těkavosti [46, 55].

Důležitým parametrem pro separaci látek v systému GC je polarita náplně kolony. Pokud je polarita stacionární fáze a sloučeniny podobná, retenční čas se prodlužuje, protože sloučenina silněji interaguje se stacionární fází a je tak déle zadržována. V důsledku toho mají polární sloučeniny dlouhé retenční časy na polárních stacionárních fázích a kratší retenční časy

na nepolárních kolonách při použití stejné teploty. V Tabulce 5 jsou vypsané typy materiálů používané do GC kolon a jejich polarita. Málo polární kolony obsahují látky na bázi methylpolysiloxanů s obsahem fenylových skupin, jejichž obsah se postupně zvyšuje. Polárnější kolony mohou obsahovat polyethylenglykol nebo kyanopropylfenyl v kombinaci s methylpolysiloxanem [26, 27, 30, 55].

Tabulka 5 Typy materiálů stacionárních fází používané pro plynovou chromatografii a jejich polarita

	Nízká polarita	100% Dimethyl polysiloxan
		(5% Fenyl)-methylpolysiloxan
		(35% Fenyl)-methylpolysiloxan
		(50% Fenyl)-methylpolysiloxan
		(50% Kyanopropylfenyl)-methylpolysiloxan
		Polyethylenglykol
		(70% Kyanopropylfenyl)-methylpolysiloxan
	Vysoká polarita	(90% Kyanopropylfenyl)-methylpolysiloxan

Pro separaci mastných kyselin GC je možné použít prakticky všechny typy kolon, výběr konkrétní kolony závisí na požadovaném účelu separace. Lze použít různé polární kolony, například pro separaci mastných kyselin pouze podle bodu varu postačí nepolární kolony obsahující polymethylsiloxanové polymery. Použitím těchto kolon postrádáme informace o *cis* a *trans* izomerech a dvojných vazbách. Výhodou však je, že je můžeme zahřát na vyšší teploty, až cca 360 °C aniž by docházelo k degradaci stacionární fáze [25–27, 30, 55, 56].

Naproti tomu použitím polárních kolon na bázi kyanopolysiloxanů či polydimethylsiloxanů lze rozseparovat i mastné kyseliny s různou polohou dvojných vazeb a jejich *cis* a *trans* izomery. U kolon tohoto typu je nevýhodou, že nevydrží příliš vysoké teploty jako v případě nepolárních kolon. Lze použít teplotní gradient maximálně do 250 °C, což může být problém, pokud je potřeba stanovit i méně těkavé MK. Další nevýhodou je, že na kolonu nelze dávkovat vodné roztoky vzorků, protože by docházelo k rozpouštění stacionární fáze, což by se projevilo na chromatogramu jako tzv. krvácení kolony [27, 29, 55].

V plynové chromatografii se k detekci používají zejména plamenově ionizační detektor (FID), vodivostní detektor (TCD), detektor elektronového záchytu (ECD) a aktuálně velmi používaný hmotnostní spektrometr (MS).

Plamenově ionizační detektor (FID) detekuje látky obsahující efektivní atom uhlíku, tudíž je vhodný zejména pro organické sloučeniny. Látka se v plamenu oxiduje a vytváří kationty, které mění signál měřeného elektrického proudu. Čím více atomů uhlíku molekula obsahuje, tím více fragmentů se tvoří a tím citlivěji detektor na danou sloučeninu reaguje. FID je velmi citlivý, málo selektivní a destruktivní. Principem detekce tepelně vodivostního detektoru (TCD) je porovnávání vodivosti dvou proudů plynu, z nichž jedním (referenčním) prochází pouze nosný plyn a druhým prochází nosný plyn obsahující eluovanou látku. Tímto způsobem se sledují změny v tepelné vodivosti, které jsou způsobeny přítomností analytu v proudu plynu. TCD je univerzální, nedestruktivní, velmi citlivý na změny koncentrace ale má omezenou selektivitu. Detektor elektronového záchytu (ECD) funguje na principu změny vodivosti v ionizační komůrce vlivem přítomnosti detekovaných látek v plynu. Ionizační komůrka ECD obsahuje zdroj radioaktivního záření, které ionizují přiváděný inertní plyn a vytváří tok volných elektronů. Pokud je přítomna sloučenina, která obsahuje elektronegativní atomy, jsou její elektrony zachyceny za vzniku záporných iontů, které snižují měřenou vodivost. Detektor je selektivní pro sloučeniny s atomy s vysokou elektronovou afinitou. Často se používá při analýze chlorovaných sloučenin [54, 57, 58].

Hmotnostní detektor je ideální možností, je velmi spolehlivý, univerzální a citlivý. Jeho nevýhodou jsou však vysoké pořizovací a provozní náklady. Principem je tvorba fragmentů a fragmentových iontů látek, které jsou detekovány a děleny podle jejich poměru hmotnosti k náboji. Hmotnostní spektrometr se skládá z ionizační komory, ve které mohou být látky ionizovány různým způsobem. Nejvyužívanější možností je elektronová ionizace (EI), jejímž principem je srážení elektronů s atomy nebo molekulami analytu, vedoucí ke tvorbě požadovaných iontů a fragmentů. Často se používá i chemická ionizace (CI), která funguje na téměř totožném principu. Rozdílem je, že se zde vyskytuje reakční plyn, který je ionizován elektronovou ionizací a částice ionizovaného reakčního plynu následně předávají energii částicím analytu. Ionty a fragmenty vzniklé v ionizační komoře jsou dále soustředovány řadou elektrod do komory, ve které se nachází hmotnostní analyzátor. Analyzátor rozděluje ionty podle hodnot jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Pro systém GC-MS se používá především kvadrupólový analyzátor a iontová past. V posledních letech se pro tento účel stále častěji používá i analyzátor doby letu a rezonanční iontově-cyklotronový analyzátor s Fourierovou

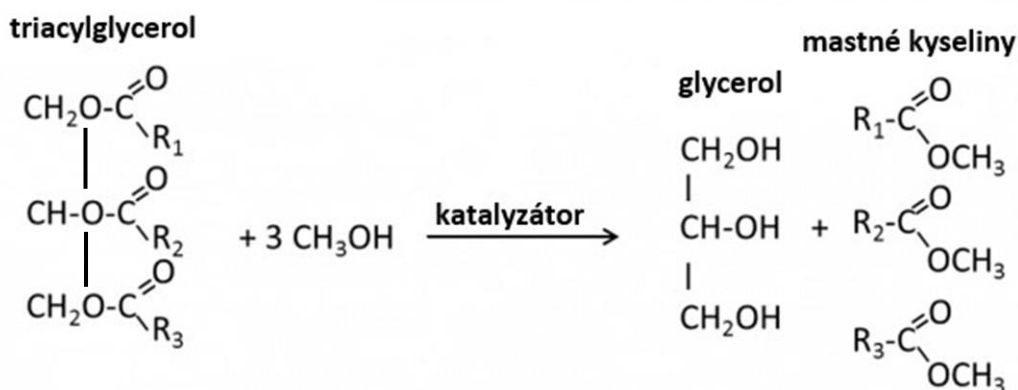
transformací. Detektor vždy skenuje určité rozmezí hodnot m/z , což přímo souvisí se selektivitou detekce. Horní hranice rozsahu skenování by měla odpovídat molekulové hmotnosti nejtěžší přítomné látky ve směsi a dolní hranice by měla být přibližně o 40–50 jednotek vyšší. Pokud je hmotnostní rozsah zvolen špatně, má to dopad na kvalitu, reprodukovatelnost a spolehlivost analýzy a získaných dat. Hmotnostní spektrometr lze nastavit tak, že se monitorují pouze vybrané ionty v úzkém rozsahu hodnot m/z (SIM), čímž lze dosáhnout větší citlivosti a selektivity než při úplném skenování všech iontů. GC-MS-SIM umožňuje selektivní detekci homologických molekul, izomerů nebo charakteristických strukturních složek. Výstupem detektoru je hmotnostní spektrum látky, které je následně možné identifikovat za použití knihovny hmotnostních spekter [54, 58].

Při analýze mastných kyselin se nejčastěji používá plamenově ionizační nebo hmotnostní detektor. Aby mohly být mastné kyseliny separovány a detekovány v systému GC, musí být nejprve převedeny na jejich těkavé deriváty. Derivatizaci MK lze provést celkem trojím způsobem [25, 26, 28, 30]. První způsob je esterifikace, kterým se MK převedou na methylestery neboli FAME (fatty acid methyl ester).

Prvním krokem je zmydelnění tuku hydroxidem sodným nebo draselným v inertní atmosféře, čímž se tuk rozdělí na glycerol a mastnou kyselinu. Druhým krokem je zavedení methylové skupiny za použití katalyzátoru fluoridu nebo chloridu boritého v prostředí methanolu. Mastná kyselina díky katalyzátoru reaguje s methanolem a vznikají methylestery, které se extrahují do hexanu nebo isooktanu. Druhý krok derivatizace lze provést i s použitím plynného chlorovodíku, který je zaváděn do bezvodého methanolu [25–27, 28, 30].

Podstatně jednodušší postup představuje transesterifikace triacylglycerolů, při které také vznikají methylestery mastných kyselin. Ke vzorku tuku se přidá methanolát sodný jako katalyzátor a methanol jako reakční medium. Následuje zahřátí na 60 °C po dobu deseti až patnácti minut. Vzniklé methylestery se nechají vysolit přidávkem nasyceného roztoku chloridu sodného a vytřepou se do hexanu [28, 29, 30]. Na Obrázku 10 je schéma reakce triacylglycerolu a methanolu za vzniku methylesterů mastných kyselin.

Obrázek 10 Schéma vzniku methylesterů MK



Třetí možností je silylace. V tomto případě se do molekul mastných kyseliny zavádí silanolové skupiny. Jako derivatizační činidlo se používá například trimethylsilychlorid, trimethylbromsilylan nebo hexamethyldisilazan. Silylací mastných kyselin vznikají jejich silylestery. Tento způsob derivatizace se používá také pro snížení meze detekce díky zvětšení molekuly a tvorby většího množství fragmentů [33].

1.3.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je metoda separace látek, která je prováděna v kapalně mobilní fázi. Průběh separace je takový, že kolonu nejprve opouštějí složky, které mají vyšší afinitu k mobilní fázi a pomaleji jsou z kolony vymývány složky, které mají vyšší afinitu ke stacionární fázi. Mobilní fáze může být jednosložková i vícesložková, používají se organická rozpouštědla s přísadou vody, solí, tlumivých roztoků, bází a kyselin. Volba mobilní fáze závisí především na polaritě separovaných látek a režimu separace. Uvnitř chromatografických kolon se nachází adsorbent, což je médium, které slouží k uchycení stacionární fáze. Takovým adsorbentem může být stěna kolony, substrát nacházející se na vnitřní stěně kolony nebo například částice silikagelu [46]. Stacionární fáze kolony může být polární, středně polární nebo nepolární. Nepolárními stacionárními fázemi jsou dlouhé uhlovodíkové řetězce navázané na silikagelu, nejčastěji oktyl (C8) a oktadecyl (C18). Polární náplň může být samotný silikagel nebo částice oxidu hlinitého. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je moderní druh kapalinové chromatografie, ve které se používají kolony obsahující malé částičky, a mobilní fáze je čerpána pod vysokým tlakem [26, 30, 46].

HPLC se dá provádět v režimu s normálními fázemi (NP HPLC) nebo s obrácenými fázemi (RP HPLC). V režimu NP HPLC je použitá stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární. Je-li stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární, měření probíhá v režimu RP HPLC [59].

Při stanovení mastných kyselin se používá HPLC s normálními i obrácenými fázemi. Při RP HPLC se jako mobilní fáze lze používat například samotný methanol nebo acetonitril, ale většinou se používá směs těchto rozpouštědel společně s vodou [25, 26, 30, 31, 59]. Při NP HPLC lze použít například směs diethyletheru a heptanu [30, 59, 60].

Jako detektory se v současné praxi velmi používají detektor rozptylu světla (ELSD – Evaporative Light Scattering detector) [61–64] a korona detektor (CAD – corona-charged aerosol detector) [63, 64], jejichž společným prvotním mechanismem je zmlžení eluátu inertním plynem, odpaření mobilní fáze a vytvoření méně těkavých částic látky. U ELSD detektoru dochází v optické komůrce k rozptylu světla na částicích aerosolu pocházejícího ze zdroje záření. Míra rozptylu světla je pak přímo úměrná koncentraci látky procházející optickým paprskem. U Corona detektoru zmlžené částice putují do kolizní komůrky, ve které je umístěna elektroda, kterou je přiváděno vysoké napětí. Na této elektrodě vzniká výboj, kterým se nosný plyn kladně nabíjí a svůj náboj pak předává částicím analytu. Takto kladně nabitý aerosol proudí do kolektoru, kterému předávají svůj náboj za vzniku proudu, který se měří citlivým elektrometrem. Signál je opět přímo úměrný koncentraci látky [61–64].

Dále lze na detekci MK použít i refraktometrický detektor (RID) nebo hmotnostní spektrometr (MS). Princip fungování RID detektoru je založen na měření změn indexu lomu eluované kapaliny, která prochází měřicí celou. Citlivost detektoru je větší, čím větší je rozdíl v indexu lomu mobilní fáze a detekovaného analytu [65]. UV-VIS a fluorescenční detektory je možné použít pouze tehdy, je-li provedena před či post kolonová derivatizace. Možností derivatizace mastných kyselin pro HPLC-UV analýzu je mnoho. Je možné použít například látku *p*-bromfenacylbromid, kdy reakcí s MK v prostředí acetonu za vyšší teploty vznikají deriváty *p*-bromfenacylestery. Podobným mechanismem reaguje například látka *p*-bromnaftacylbromid, přičemž vznikají naftacylestery. Estery absorbují při vlnové délce okolo 254 nm. Pro UV i fluorescenční detekci lze použít kumariny, které vzniknou reakcí s 4-(brommethyl)-7-methoxy benzopyronem. Maximum UV absorbance je kolem 280 nm, fluorescence je 325 nm a okolo 400 nm emise [61, 65]. Na Obrázku 11 jsou chemické vzorce činidel používaných pro derivatizaci v HPLC.

Obrázek 11 Činidla používaná pro derivatizaci mastných kyselin pro kapalinovou chromatografii



1.3.3.3 Superkritická fluidní chromatografie

K separaci a kvantifikaci mastných kyselin lze použít i superkritickou fluidní chromatografii (SFC). SFC je separační metoda, ve které mobilní fázi představuje kapalina v superkritickém stavu, což znamená, že má látka vlastnosti kapaliny i plynu zároveň. Oproti použití klasických technik jako je plynová chromatografie nebo kapalinová chromatografie má SFC některé výhody. Při GC je nutné mastné kyseliny derivatizovat na methylestery kvůli jejich nízké polaritě a těkavosti. Použitím LC je sice možné analyzovat tepelně labilní estery mastných kyselin, ale separační účinnost pro tento typ sloučenin je relativně nízká, což znemožňuje analýzu složitějších směsí. Při SFC není třeba MK derivatizovat či esterifikovat, separace mohou probíhat při nižších teplotách. Také díky nízké viskozitě mobilní fáze je možné použít vyšší průtoky a dosáhnout tak rychlejší separace. Vzorek oleje většinou stačí pouze rozpustit v n-heptanu a následně vpravit do separačního systému. Vzorek je separován na volné mastné kyseliny, cholesteroly, triacylglyceroly, estery cholesterolů, vitamín E a skvalen [49]. V současné době se SFC často používá k analytické preparativní frakcionaci polynenasycených mastných kyselin, většinou ve formě ethylesterů [52]. Jako mobilní fáze se ve většině případů používá oxid uhličitý při teplotě nad 31 °C a tlaku nad 7,39 MPa. Pro separaci mastných kyselin i jiných lipidových látek lze použít různé druhy chromatografických kolon, nejvíce se používají náplňové a kapilární kolony určené pro GC. Stacionární fáze může mít různou polaritu, lze využít nepolární C18 i polární silikagel. Při analýze nenasycených mastných kyselin je možné použít stacionární fázi obsahující stříbrné ionty [49–51]. Pro detekci se používá například plamenové ionizační detektory, ELSD detektor nebo hmotnostní spektrometr [49, 50, 52]. Pro separaci mastných kyselin byly vyvinuty i systémy dvoudimenzionální SFC (SFC×SFC) a SFC v kombinaci s kapalinovou chromatografií na obrácených fázích (SFC×RPLC) [51].

1.3.3.4 Argentační chromatografie

Argentační chromatografie je chromatografická metoda, při níž se používá stacionární fáze obsahující stříbrné soli. Používá se zejména pro frakcionaci nenasycených a nenasycených

mastných kyselin. Látky s dvojnými vazbami mají ke stacionární fázi se stříbrnými ionty vyšší afinitu než látky, které obsahují pouze jednoduché vazby. Vzájemnou interakcí dochází ke vzniku komplexů iontů stříbra a π elektronů dojné vazby [44, 45].

Náplní kolony může být aniont výměnná fáze s navázanými stříbrnými ionty nebo silikagel, na kterém je zakotvena fáze se stříbrnými ionty. Dříve se k tomuto účelu používala tenkovrstvá argentační chromatografie (TLC-Ag), dnes už se tato technika používá spíše pro přípravu vzorku před separací v systému GC. TLC-Ag nahradila argentační vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC-Ag), která kromě separace samotných mastných kyselin dokáže separovat i nenasycené triacylglyceroly a jejich směsi. V HPLC-Ag se používají totožné detektory jako u klasické HPLC. Dříve byl nejvíce používán UV spektrofotometrický detektor, v současné době ho nahrazují modernější typy, jako je například ELSD detektor. Stále více se pro detekci používá také hmotnostní spektrometr (MS) s ionizací elektrosprejem (ESI) nebo chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) [48].

1.4 Lipidomika

Lipidomika představuje relativně mladý vědní obor, který se zabývá kvalitativní a kvantitativní analýzou lipidů v biologických vzorcích. V současné době se rozvíjí v souvislosti s rychlými pokroky v lékařství, analytické chemii a informačních technologiích. Je jednou z podmnožin oboru metabolomiky, což je vědní obor zabývající se metabolismem v živých systémech [65, 66].

Předmětem lipidomiky je analýza lipidomu, což je soubor veškerých lipidů v buňce, tkáni nebo organismu. Bylo zjištěno, že složení lipidomu se mění v souvislosti se vznikem a průběhem některých metabolických nemocí, například rakoviny, diabetu, hypertenze, aterosklerózy či obezity. Přítomnost určitých druhů lipidů v buňkách pacienta nám tedy může sloužit jako biomarker onemocnění. Lipidomika analyzuje lipidy izolované z buněk, tkání nebo tělních tekutin. Princip analýzy spočívá především v identifikaci a stanovení mnoha různých druhů lipidů, zkoumá se jejich struktura, reakce s dalšími sloučeninami a jejich přeměny, které nastanou v průběhu choroby. Informace získané na základě lipidomické analýzy nám pomáhají při objasňování vzniku a průběhu nemocí na molekulární úrovni [65, 66].

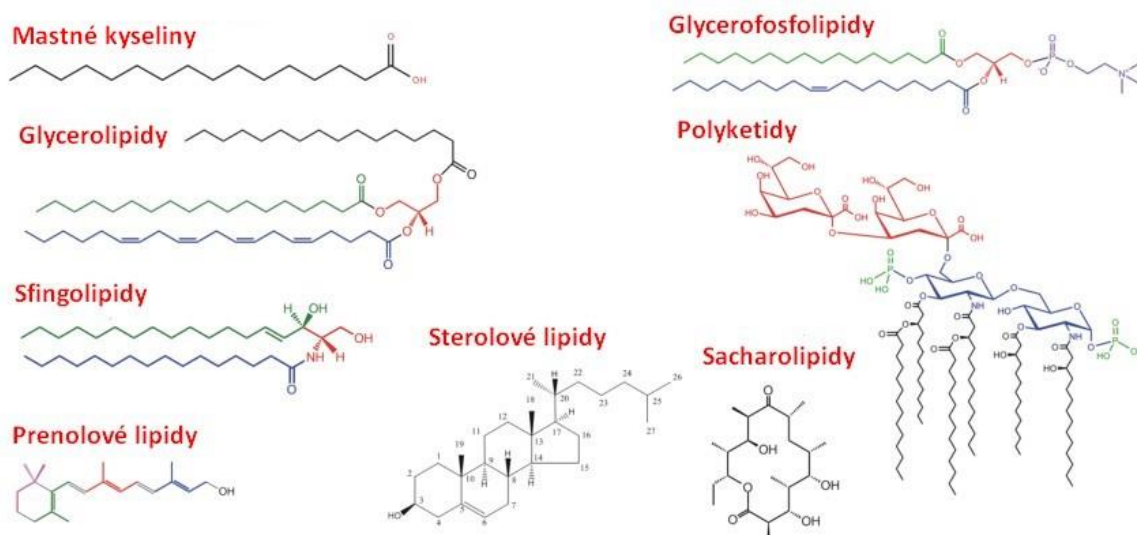
V minulosti se lipidomická analýza prováděla za použití chromatografie na tenké vrstvě nebo plynové chromatografie. V dnešní době je standardem hmotnostní spektrometrie s ionizací za atmosférického tlaku, a to buď bez separace, nebo ve spojení se separačními technikami jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), ultra vysokoúčinná kapalinová

chromatografie (UHPLC) nebo vysokoúčinná superkritická kapalinová chromatografie (UHP-SFC). Ionizační techniky používané v lipidomické analýze jsou například ionizace elektrosprejem (ESI) vhodné pro středně polární až iontové lipidy, chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), které jsou vhodné pro nepolární lipidy nebo ionizace za přítomnosti matrice (MALDI) [66–69].

Lipidy jsou různorodou skupinou látek, která zahrnuje stovky až tisíce druhů. Tyto druhy se výrazně odlišují strukturou, fyzikálně chemickými vlastnostmi což může analýzu a následné vyhodnocování výsledků značně komplikovat. Z toho důvodu byl zaveden standardizovaný klasifikační systém, který dělí lipidy do osmi kategorií (viz. Obrázek 12).

- mastné kyseliny,
- glycerolipidy,
- glycerofosfolipidy,
- sfingolipidy,
- sterolové lipidy,
- prenolové lipidy,
- sacharolipidy,
- polyketidy.

Obrázek 12 Dělení lipidů podle systému LIPID MAPS [66]



Jednotlivé kategorie jsou dále členěny a organizovány. Vzhledem ke komplexnosti dělení látek je tento systém zaveden v online databázi LIPID MAPS [66–69].

1.4.1 Lipidomická analýza

Lipidomická analýza se skládá z několika návazných kroků zahrnující identifikaci a stanovení lipidů prostřednictvím moderních analytických metod v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Výsledkem analýzy je lipidomický profil pacienta, kterým lze odhalit biomarker nemoci. Pro analýzu je nezbytně nutné přesné dodržování pracovních postupů odběru vzorku, nakládání se vzorkem a jeho následné úpravy. Pokud dojde k pochybení v jedné z těchto částí, tak je celá analýza chybná a je nemožné zaručit reprodukovatelné výsledky mezi vzorky [65, 66]. Prvním a nejdůležitějším krokem při zpracování vzorku je samotné vzorkování. Vzorkem pro lipidomickou analýzu může být krev, moč, krevní plazma, sliny, buněčná struktura nebo tkáň. V naprosté většině případů se používají tělní tekutiny. Vzorky je nutné ihned po odběru zmrazit na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v prostředí bez přístupu kyslíku, kovových iontů a peroxidů. Ke vzorku lze přidat antioxidanty, jako je butylovaný hydroxytoluen, který brání oxidaci lipidů [70].

Po odběru vzorku následuje jeho homogenizace, extrakce tuků z matrice, případně i zakonzentrování. Metody přípravy vzorků jsou popsány již v kapitole 1.3.1. Pro kvantitativní analýzu lipidů je nezbytné do vzorku přidat vhodný vnitřní standard již před samotnou extrakcí [66].

Pro samotnou analýzu vzorku existují tři možné přístupy – přímá infuzní analýza (tzv. shotgun lipidomics), separace v kapalně fázi kombinovaná s MS (obvykle kapalinová chromatografie v kombinaci s MS detekcí (LC-MS)) a desorpční ionizační techniky MS, často používané pro MS imaging [66, 67].

Při infuzní analýze je surový extrakt vzorku kontinuálně dávkován do hmotnostního spektrometru. Podmínkou reprodukovatelné analýzy je stabilní signál. Vzorek je do systému dávkován nejčastěji binární pumpou s nízkými objemy průtoku. Vliv interferentů a matrice vzorku se odstraní již během přípravy vzorku, jak je již popsáno výše, nebo během MS analýzy prostřednictvím separace uvnitř iontového zdroje, selektivní ionizací nebo kombinací obou metod. Skenování může probíhat při vysokém rozlišení (HR-MS) i při nízkém. Výstupem analýzy jsou v tomto případě pouze MS spektra, přičemž druhy lipidů jsou identifikovány molekulovými ionty. Pro infuzní analýzu se nejčastěji používá techniky trojitého kvadrupólu (QqQ), pro vyšší rozlišení je možné použít i hybridní kvadrupól (hmotnostní spektrometr, který kombinuje hmotnostní analyzátoři různého typu za účelem tandemové hmotnostní spektrometrie) v kombinaci s analyzátořem doby letu (TOF MS) [66–69].

Kombinace hmotnostní spektrometrie se separačními metodami představuje spolehlivou identifikaci a kvantifikaci analyzovaných látek. Výstupem analýzy je chromatogram i hmotnostní

spektrum. Lipidy tak lze identifikovat z retenčních času chromatogramů i z molekulového píku hmotnostního spektra. Separční techniky nám umožňují i separaci polohových izomerů lipidů. Nejpoužívanější chromatografickou separační metodou v lipidomice je HPLC s obrácenými fázemi (RP HPLC). V tomto případě se lipidy dělí podle délky uhlíkového řetězce a podle počtu dvojných vazeb. Retence látek roste s rostoucím počtem uhlíků, a naopak s rostoucím počtem dvojných vazeb retenční čas klesá. Také se používá HPLC s normálními fázemi, která odděluje lipidy na základě jejich polaritu. Argentační chromatografií na normálních fázích lze docílit přesnější analýzy včetně zjištění počtu a polohy dvojných vazeb mastných kyselin. V současné době je oblíbenou variantou UHPLC, která má oproti klasické HPLC výhody jako je kratší doba analýzy a tím i vyšší produktivita, zvýšení separační účinnosti a snížení nákladů. K analýze se také velmi využívá hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), která lipidy dělí také podle polaritu [66-69].

MS imaging je využíván méně než již zmíněné techniky. Většina lipidomických technik využívá k analýze extrakty biologických vzorků, pro MS imaging stačí použít samotný neextrahovaný vzorek. Vzorek je ionizován prostřednictvím techniky MALDI, při které je ionizován paprskem laseru, mířící na určité místo na povrchu. Spíše než k identifikaci a kvantifikaci se MS imaging používá k zobrazení distribuce lipidů ve tkáních [66, 67, 71].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

- Plynový chromatograf Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Kvadrupólový hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací Agilent 5977A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Chromatografická kolona TR FAME 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Chromatografická kolona SELECT FAME 50 m × 0,25 mm × 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Laminární box MSC Advantage 2. třídy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Analytické váhy KERN ABT 220 (Kern & Sohn, Albstadt, Německo)
- Analytické váhy Sartorius BP211D (Sartorius AG, Göttingen, Německo)
- Centrifuga Hettich EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super RK 52H (Bandelin, Berlin, Německo)
- Ultrazvuková lázeň FB Fisherbrand 15061H (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Vibrační třepačka Vortex 1 (IKA, Staufen, Německo)
- Automatické pipety s nastavitelným objemem (Sartorius AG, Göttingen, Německo; Biohit, Helsinky, Finsko)
- Mikrostríkačka (Hamilton, Bonaduz, Švýcarsko)
- Pasteurovy pipety (Thermo Fisher Scientific, Brémy, Německo)
- Topný blok (IKA, Staufen, Německo)
- Jednorázové standardní injekční stříkačky Injekt 2 ml (B.Braun, Praha, Česká republika)
- Celulózkové filtry na injekční stříkačky s póry o velikosti 0,22 μm (Teknokroma, Barcelona, Španělsko)

2.2 Chemikálie

- Hexan ≥99,9 % (Honeywell, Charlotte, USA)
- Chlorid sodný (Lach-ner, Neratovice, Česká republika)
- Metanol ≥99,9 % (Honeywell, Charlotte, USA)

- Metanolát sodný (Sigma Aldrich, Mnichov, Německo)
- Směs standardů methylesterů mastných kyselin 37 Component FAME Mix (Sigma Aldrich, Mnichov, Německo) – složení směsi je v Příloze 1
- Kyselina sírová ≥ 96 % (Penta, Praha, Česká republika)
- Diethylether $\geq 99,9$ % (Lach-ner, Neratovice, Česká republika)
- Chloroform $\geq 99,9$ % (Merck, Darmstadt, Německo)
- Butanol $\geq 99,9$ % (Merck, Darmstadt, Německo)
- Acetonitril $\geq 99,9$ % (Sigma Aldrich, Mnichov, Německo)
- Uhličitan amonný $\geq 99,9$ % (Honeywell, Seelze, Německo)
- Standardy mastných kyselin C18:1 (*trans* Δ^6 , *trans* Δ^9 , *trans* Δ^{11} , *cis* Δ^6 , *cis* Δ^9 , *cis* Δ^{11}) (Nu-chek Prep, Elysian, USA)
- Standard monoacylglycerolu C19:1 ((Nu-chek Prep, Elysian, USA)
- Standard methylesteru C17:0 (Sigma Aldrich, Mnichov, Německo)
- Standard C17 methyl 16 (Nu-chek Prep, Elysian, USA)
- Standard C17 metyl 15 (Nu-chek Prep, Elysian, USA)

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava reakčních roztoků a roztoků standardů

0,25 M methanolický roztok methanolátu sodného byl připraven rozpuštěním 0,68 mg pevného methanolátu sodného v 50 ml odměrné baňce doplněné po rysku methanolem. Roztok uhličitanu amonného o koncentraci 0,025 mol/l byl připraven rozpuštěním 6 g pevného uhličitanu amonného v 250 ml baňce doplněné po rysku destilovanou vodou. Dále bylo nutné připravit roztoky interních standardů. Pro vzorky krevní plazmy byl použit monoacylglycerol kyseliny *cis*-10-nonadekanové (C19:1 *cis* Δ^{10}) rozpuštěním 0,3 mg tohoto pevného standardu v 1 ml směsi chloroformu a methanolu (1:1). Vznikl tak roztok interního standardu s označením IS-C19:1. Pro vzorky olejů byl jako interní standard použit methylester kyseliny heptadekanové (C17:0) a roztok přidávaný do vzorků byl připraven rozpuštěním 4 mg pevného standardu v 1 ml acetonitrilu. Tento roztok vnitřního standardu měl označení IS-C17:0.

2.3.2 Příprava methylesterů ze standardů mastných kyselin kyselou katalýzou

Standardy, které byly ve formě samotných mastných kyselin bylo nutné převést na methylestery metodou kyselé katalýzy. Použití metody alkalické esterifikace nebylo možné, protože reakcí mastných kyselin s methanolátem sodným dochází k neutralizaci.

Do 10 ml vialky bylo naváženo přibližně 20 mg standardu mastné kyseliny, ke kterému bylo následně přidáno 35 mg methanolu, 100 µl diethyletheru a 4 µl koncentrované kyseliny sírové, která působila jako katalyzátor. Směs byla řádně promíchána a poté vložena na dvě hodiny do termobloku vyhřátého na 42 °C. Po vychladnutí vialek byl ke vzorku napipetován 1 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a 2 ml hexanu. Směs byla vytřepána a po oddělení fází byla odebrána vrchní hexanová vrstva. Takto připravený methylester standardu MK byl naředěn hexanem v poměru 1:10 (1 µl methylesteru standardu a 10 µl hexanu) a poté analyzován.

2.3.3 Příprava vzorků olejů

K analýze bylo vybráno devět vzorků olejů uvedených v Tabulce 6. Rozšířená tabulka s dalšími informacemi je v Příloze 2. Všechny oleje byly skladovány na čistém, suchém a tmavém místě. Každý vzorek byl před použitím řádně zhomogenizován. Mastné kyseliny byly převedeny na methylestery esterifikací methanolátem sodným za zvýšené teploty. Jako vnitřní standard byla použita kyselina heptadekanová (C17:0).

Tabulka 6 Vzorky rostlinných olejů

Číslo vzorku	Druh oleje	Charakteristika
O1	Rakytníkový olej	Olej s vitamínem E, získané z plodů rakytníku
O2	Lněný olej v bio kvalitě	Bio olej, lisovaný za studena
O3	Kokosový olej v bio kvalitě	Bio panenský olej, lisovaný za studena
O4	Řepkový olej v bio kvalitě	Bio olej, lisovaný za studena
O5	Olivový olej z pokrutin	Olej získaný zpracováním pokrutin a přímo z oliv
O6	Extra panenský olivový olej	Výběrový olej získaný přímo z oliv, první lisování za studena
O7	Extra panenský olivový olej v bio kvalitě	Výběrový olej získaný přímo z oliv, první lisování za studena
O8	Slunečnicový olej	Rafinovaný jedlý olej
O9	Olej ze lničky seté	Laboratorně vyrobený olej, degumovaný, nedeodorizovaný

2.3.3.1 Esterifikace vzorků olejů

Do 10 ml vialky se šroubovacím uzávěrem bylo naváženo přibližně 25 mg oleje a 1,5 ml 0,25 M methanolického roztoku methanolátu sodného. Vzniklá směs byla řádně protřepána a vložena na dvacet minut do termobloku vyhřátého na 60 °C. V průběhu této reakce bylo s vialkou krátce třepáno, a to vždy po uplynutí cca pěti minut. Po vychladnutí vialky bylo ke vzorku napipetováno 400 µl roztoku vnitřního standardu IS-C17:0, 1 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a 2 ml hexanu a vialkou bylo minutu intenzivně třepáno. Po vytřepání došlo k oddělení fází a odebrání vrchní hexanové vrstvy. Takto připravený vzorek oleje byl naředěn hexanem v poměru 1:4 (100 µl vzorku, 400 µl hexanu) a poté analyzován v systému GC-MS.

2.3.4 Příprava biologických vzorků

K analýze bylo poskytnuto celkem 48 vzorků krevního séra. Vzorky byly rozděleny do čtyř skupin podle zdravotního stavu dárců. Jedna skupina dárců představovala zdravé lidi bez zdravotních komplikací, další skupinou byli lidé, kteří již někdy v minulosti rakovinu prodělali, jiná skupina trpěla příznaky onemocnění, u poslední skupiny byla rakovina již diagnostikována. K analýze bylo dvanáct vzorků z každé skupiny. Studie byla schválena etickou komisí a všichni dárči podepsali informovaný souhlas.

Vzorky byly co nejdříve po odběru zmrazeny na teplotu -80 °C a uchovány na temném místě. Před analýzou bylo nutné je nechat rozmrazit a poté dostatečně zhomogenizovat.

Prvním krokem zpracování vzorků bylo odstranění rušivých látek a nečistot, což bylo možné provést dvojitým způsobem, a to za použití Folchovy extrakce nebo proteinové precipitace. Po odstranění interferentů byly mastné kyseliny ve vzorcích esterifikovány za použití roztoku methanolátu sodného. Nakonec byly vzorky zakoncentrovány. Jako vnitřní standard byl použit monoacylglycerol kyseliny *cis*-10-nonadekanové (C19:1 *cis* Δ¹⁰).

2.3.4.1 Folchova extrakce

Do 4 ml vialky bylo napipetováno 20 µl vzorku zhomogenizovaného krevního séra a 20 µl IS-C19:1. Dále bylo přidáno 2 ml chloroformu, 1 ml methanolu a vzniklá směs byla vložena na patnáct minut do ultrazvukové lázně, která měla teplotu 25 °C. Poté bylo přidáno 600 µl 250 mM roztoku uhličitanu amonného a vialka byla znovu vložena do vyhřáté ultrazvukové lázně na patnáct minut. Následně proběhlo odstředění na centrifuze při 3000 ot/min po dobu 3 minut. Poté byla Pasteurovou pipetou opatrně odebrána čirá organická spodní vrstva obsahující lipidy. Odebraný podíl byl jednoduchým extraktem, který mohl být dále odpařen pod proudem dusíku a odparek poté rozpuštěn přidáním 500 µl směsi rozpouštědel chloroformu

a methanolu (1:1) a esterifikován nebo dále zpracován za účelem získání dvojnásobného extraktu.

V případě dvojnásobného extraktu bylo ke zbytku vzorku přidáno 2 ml chloroformu, vialka byla vložena na patnáct minut do ultrazvukové lázně a potom byla tři minuty odstředována při 3000 ot./min. Po vytvoření rozhraní byla opět odebrána spodní organická vrstva, která byla přidána k prvnímu extraktu. Extrakt byl odpařen pod proudem dusíku při 35 °C a poté byl odparek rozpuštěn přidáním 500 µl směsi rozpouštědel chloroformu a methanolu v poměru 1:1.

2.3.4.2 Proteinová precipitace

Do 1,5 ml vialky bylo napipetováno 25 µl zhomogenizovaného krevního séra a 10 µl vnitřního standardu (IS-C19:1). Dále bylo přidáno 250 µl směsi rozpouštědel butanolu a methanolu (1:1) a směs byla řádně promíchána. Vialka se směsí byla vložena do ultrazvukové lázně na patnáct minut a poté do centrifugy, kde byl její obsah odstředován 5 minut při 6000 ot./min. Odstředěním se na dně vialky usadila sraženina bílkovin a tekutina nad sedimentem byla odebrána. Supernatant byl přefiltrován za použití injekční stříkačky s SPE filtrem s póry o velikosti 0,22 µm a promyt 500 µl směsí butanolu a metanolu (1:1). Takto připravený vzorek byl odpařen pod proudem dusíku do sucha a odparek byl rozpuštěn přidáním 250 µl směsi rozpouštědel chloroformu a methanolu (1:1).

2.3.4.3 Esterifikace

Do vialky bylo napipetováno přibližně 100 mg deproteinizovaného, respektive 200 mg extrahovaného vzorku, a k němu bylo přidáno 1,5 ml methanolickeho roztoku methanolátu sodného. Obsah vialky byl řádně promíchán a poté vložena na dvacet minut do termobloku vyhřátého na 60 °C, přičemž v průběhu reakce bylo s vialkou krátce třepáno vždy po uplynutí pěti minut. Po vychladnutí byl ke vzorku napipetován 1 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a 2 ml hexanu a vialkou bylo minutu intenzivně třepáno. Po protřepání došlo k oddělení fází a odebrání horní organické vrstvy. Tato část byla poté odpařena pod proudem dusíku až do sucha a následně rozpuštěna ve 100 µl hexanu. Takto připravený vzorek byl analyzován v systému GC-MS.

2.4 Podmínky měření GC-MS

Podmínky měření v systému GC jsou popsány v Tabulce 7. Hmotnostní spektra byla skenována v rozsahu od 50 m/z do 600 m/z , a nastavení hmotnostního spektrometru je blíže popsáno v Tabulce 8.

Tabulka 7 Podmínky měření v systému GC

Kolona	TR FAME 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm	
Nosný plyn	Helium	
Průtok nosného plynu	1,5 ml/min	
Teplota nástřiku	250 °C	
Teplotní program	Počáteční teplota: 80 °C Gradient: 10 °C/min do 150 °C, 3 °C/min do 235 °C Konečná teplota: 235 °C držení 20 min	
Dávkovaný objem vzorku	Oleje	1,5 μl
	Krevní plazma	4,0 μl
Splitovací poměr	Oleje	10:1
	Krevní plazma	15:1

Tabulka 8 Podmínky MS

Ionizace	Pozitivní elektronová ionizace
Zapnutí MS (Solvent delay)	7 minut
Frekvence skenování	5 skenů/s
Teplota EI zdroje	250 °C
Teplota kvadrupólu	150 °C
Teplota MSD transfer line	300 °C

2.5 Zpracování experimentálních dat

Výsledky GC-MS analýz byly interpretovány v programu Agilent MassHunter (Agilent Technologies, USA) a následně zpracovány v programu Microsoft Excel a Microsoft Word. Výsledky vzorků krevní plazmy byly poté ještě zpracovány ve statistickém programu SIMCA (Sartorius AG, Německo).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentální práce bylo vyvinout a optimalizovat GC-MS metodu na stanovení *cis* a *trans* stereoizomerů a polohových izomerů mastných kyselin v různých vzorcích. Tato metoda byla následně použita pro stanovení mastných kyselin v rostlinných olejích a ve vzorcích krevního séra s různým stádiem onemocnění rakovinou slinivky.

Mastné kyseliny obsažené ve vzorcích bylo třeba před analýzou převést na methylestery (FAME) metodou esterifikace. Esterifikace probíhala použitím methanolátu sodného za zvýšené teploty. Ze vzorků krevního séra bylo nutné před esterifikací odstranit rušivé látky a až potom mohly být MK převedeny na FAME. Esterifikace olejů a vzorků krevního séra probíhala stejným způsobem. Vzorky krevního séra byly následně před analýzou zakoncentrovány a vzorky olejů byly naopak zředěny. Metoda GC-MS byla vybrána proto, že jde o nejvhodnější a nejpoužívanější metodu pro stanovení mastných kyselin v různých druzích vzorků.

3.1 Optimalizace metody

Prvním krokem bylo nalézt vhodné podmínky separace pro co největšího množství methylesterů mastných kyselin, spolu s *cis* a *trans* izomery a polohovými izomery. Byla provedena optimalizace přípravy vzorku, teplotního programu, průtoku mobilní fáze a výběru kolony.

Pro ověření reprodukovatelnosti metody a kvantifikaci látek byly použity interní standardy. U vzorku olejů byl jako vnitřní standard zvolen methylester kyseliny heptadekanové (C17:0). Standard C17:0 byl k dispozici v dostatečném množství, nekoeluoval s píky ostatních MK a ve vzorcích olejů se tato mastná kyselina nevyskytovala. Pro vzorky krevního séra byl jako interní standard použit monoacylglycerol kyseliny nonadekanové s jednou dvojnou vazbou na desátém uhlíku (C19:1). Ke stejnému účelu byl vyzkoušen standard methylesteru kyseliny nonadekanové (C19), tuto látku však nebylo možné použít jako vnitřní standard z důvodu koeluce s methylesterem kyseliny oktadekanové se třemi dvojnými vazbami (C18:3).

3.1.1 Optimalizace parametrů plynového chromatogramu

Nejprve bylo třeba nalézt teplotní program s vhodným teplotním gradientem, aby bylo možné eluovat jak nízkovroucí (MK s kratším řetězcem) tak i vysokovroucí methylestery (MK s delším řetězcem) mastných kyselin v přijatelném čase, aniž by spolu látky koeluovaly. Při hledání vhodných teplotních podmínek byla používána směs standardů 37 Component FAME Mix

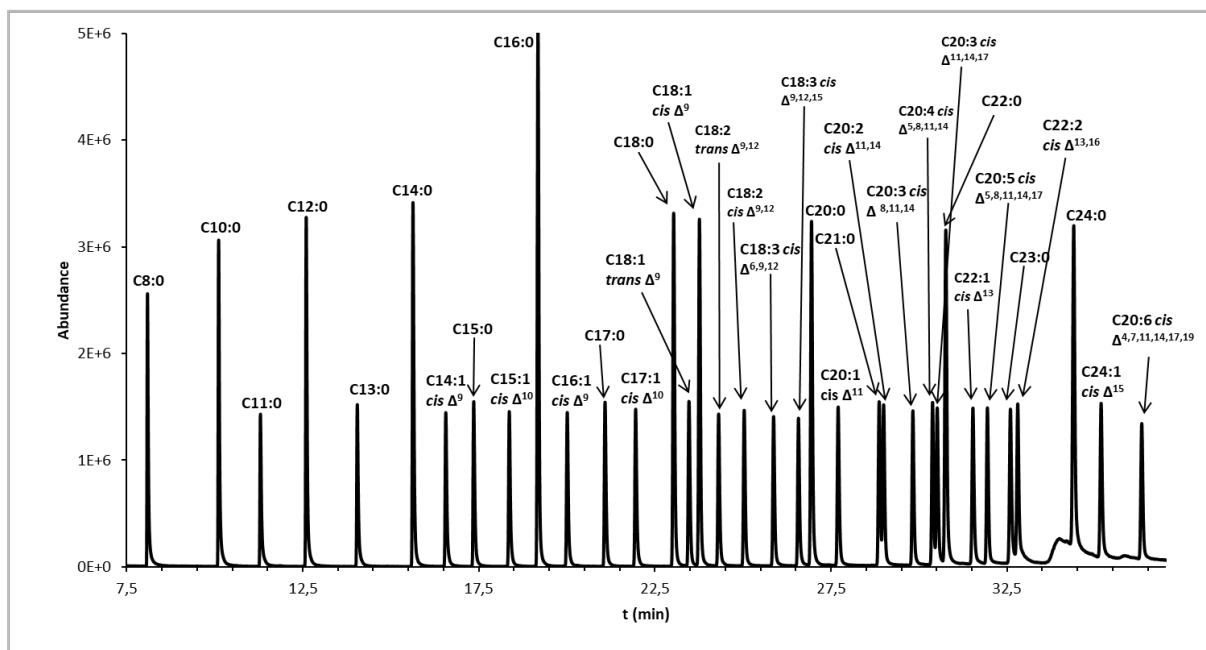
(složení směsi standardů je v Příloze 1) obsahující 37 nejběžnějších methylestrů MK. Kolona, která byla použita při hledání optimálního teplotního programu byla TR FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), mobilní fází bylo helium a dávkování bylo prováděno metodou splitu. Bylo provedeno několik pokusů s různými teplotními gradienty. Jako nejvhodnější byl zvolen teplotní program s gradientem teploty 80–235 °C, který trval 28 minut a poté byla konstantně udržována konečná teplota dalších 20 minut. Při tomto teplotním programu nebyly některé píky methylesterů nízkovroucích MK s krátkým řetězcem (C4 a C6) zaznamenány v detektoru. Eluovaly se již spolu s rozpouštědlem na začátku separace. Z důvodu ochrany detektoru hmotnostního spektrometru byla ionizace a záznam z MS spuštěn až toto rozpouštědlo opustilo kolonu (tzv. solvent delay, viz Tabulka 8). Jejich signály tedy nebylo možné vyhodnotit, nicméně tyto látky nebyly pro analýzu důležité, neboť se v přírodě vyskytují velice zřídka a ve velmi malých koncentracích. Důležité bylo rozseparovat a identifikovat FAME s delším řetězcem, u kterých se vyskytují i zmíněné *cis* a *trans* stereoizomery a polohové izomery. Ostatní kyseliny byly dostatečně separovány, aniž by docházelo ke koeluci. Při tomto teplotním programu a průtoku 1 ml/min bylo rozlišení píků *R* od 0,788 až 10,42. Hůře rozlišené byly píky, které se eluovaly v časovém rozmezí od dvaceti osmi do třiceti tří minut. Konkrétně se jednalo o dvojice píků C21:0 a C20:2 *cis* Δ^{11,14}, C20:4 *cis* Δ^{5,8,11,14} a C20:3 *cis* Δ^{11,14,17} a C23:0 a C22:2 *cis* Δ^{13,16}.

Optimalizován byl také průtok nosného plynu, kterým bylo helium. Důvodem bylo zrychlení separace na nejnižší možnou dobu. Byly vyzkoušeny různé průtoky od 1,1 ml/min do 1,5 ml/min. Rozlišení píků látek bylo při průtoku 1,1 ml/min v rozmezí 0,75–15, při průtoku 1,2 ml/min 0,73–10,9 a při průtoku 1,5 ml/min 0,62–10,9. Ačkoli se rozlišení píků při vyšším průtoku mírně zhoršilo, byl nakonec vybrán průtok 1,5 ml/min. Při tomto průtoku se látky separovaly do třiceti šesti minut a separace se zkrátila o celé tři minuty.

Na Obrázku 13 je chromatogram směsi standardů 37 Component FAME Mix změřený při výše popsaných optimalizovaných podmínkách teplotního gradientu a průtoku. Směs obsahovala třicet sedm methylesterů různých mastných kyselin, od nízkovroucích s krátkým řetězcem po FAME s dlouhým řetězcem, včetně několika *cis* a *trans* izomerů. Při separaci byly mezi prvními eluovanými látkami nasycené FAME s kratším řetězcem. Jak se teplota kolony postupně zvyšovala, byly eluovány látky s delšími řetězci podle stoupajícího počtu uhlíků v molekulách. Pořadí eluce FAME s dvojnými vazbami závisela především na jejich počtu a vzdálenosti od karboxylového uhlíku v molekule. Čím vzdálenější byla dvojná vazba od karboxylového uhlíku a čím více dvojných vazeb bylo v molekule obsaženo, tím později

byla látka eluována. Pokud byla ve směsi přítomna zároveň *trans* i *cis* forma jedné látky, nejprve byl eluován její *trans* izomer, signál *cis* izomeru následoval po něm.

Obrázek 13 Chromatogram 37 Component FAME mix



Dále byly proměřeny standardy *cis* a *trans* izomerů s jednou dvojnou vazbou odvozené od kyseliny stearové (C18:0). Konkrétně se jednalo o kyselinu petroselinovou (C18:1 *cis* Δ⁶), petroselaidovou (C18:1 *trans* Δ⁶), olejovou (C18:1 *cis* Δ⁹), elaidovou (C18:1 *trans* Δ⁹), asklepovou (C18:1 *cis* Δ¹¹) a vakcenovou (C18:1 *trans* Δ¹¹). Protože standardy byly k dispozici pouze jako samotné mastné kyseliny a alkalickou esterifikací není možné pro samotné kyseliny použít, byla provedena kyselá katalýza, kterou byly MK převedeny na FAME (postup je popsán v kapitole 2.3.2). Z těchto FAME byla vytvořena směs, která byla následně analyzována. Jako první byly eluovány píky *trans* izomerů C18:1, poté následovaly *cis* izomery. Čím vzdálenější byla dvojná vazba od karboxylového uhlíku v řetězci, tím později byl signál daného methylesterů eluován.

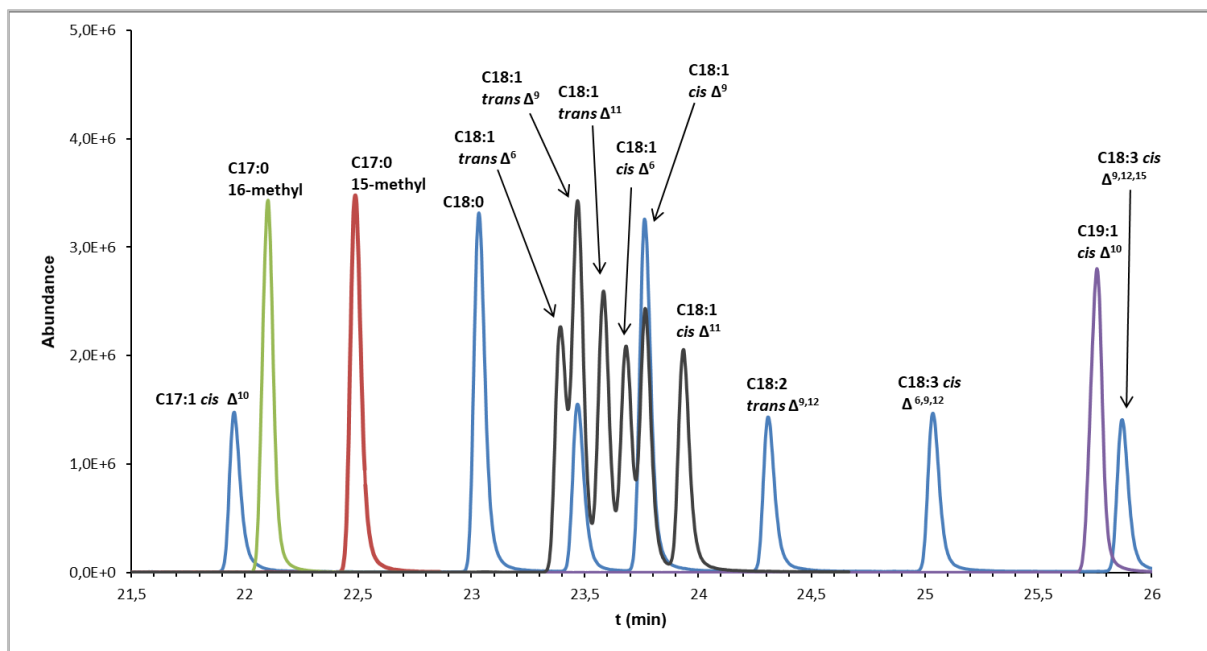
Následně byly proměřeny vybrané rozvětvené MK, které se obvykle objevují ve vzorcích krevní plazmy či krevního séra. Jednalo se o standardy kyseliny 15-methyl heptadekanové a 16-methyl heptadekanové. Standardy MK byly opět převedeny na FAME za použití kyselé katalýzy. Proměřením těchto standardů byl zjištěn retenční čas, který byl později použit k identifikaci pík látek ve vzorcích.

Proměřen byl rovněž vnitřní standard, tedy ME kyseliny *cis*-10-nonadekanové (C19:1 *cis* Δ¹⁰). Standard byl ve formě monoacylglycerolu, tudíž byla použita alkalická esterifikace

pro převedení na methylester. Bylo nutné zjistit, zda tato látka nekoeluje s píky ostatních MK a následně její retenční čas pro identifikaci.

Chromatogram na Obrázku 14 obsahuje výše jmenované proměřené standardy, porovnané se směsí standardů 37 Component FAME Mix. Tabulka s retenčními časy a všech změřených standardů je v Příloze 3.

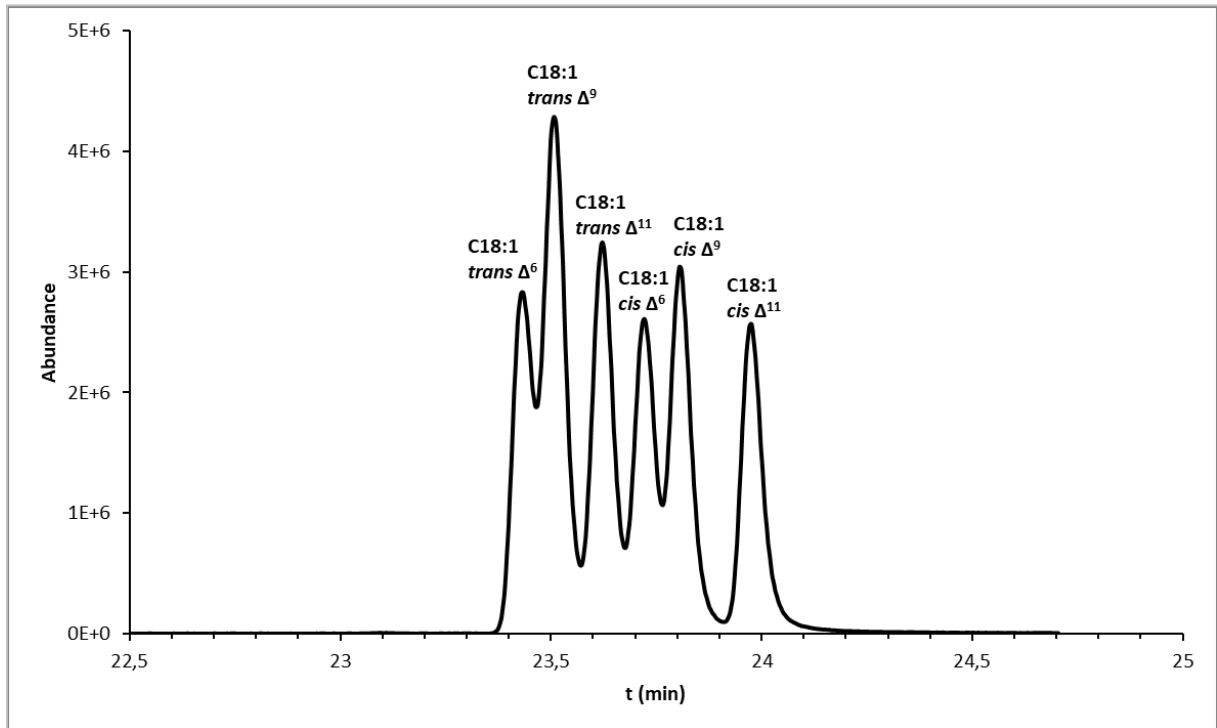
Obrázek 14 Chromatogramy standardů C18:1 (*trans* Δ^6 , *cis* Δ^6 , *trans* Δ^9 , *cis* Δ^9 , *trans* Δ^{11} , *cis* Δ^{11}), C19:1 (*cis cis* Δ^{10}), 16-methyl C17:0 a 15-methyl C17:0 v porovnání se směsí standardů 37 Component FAME Mix



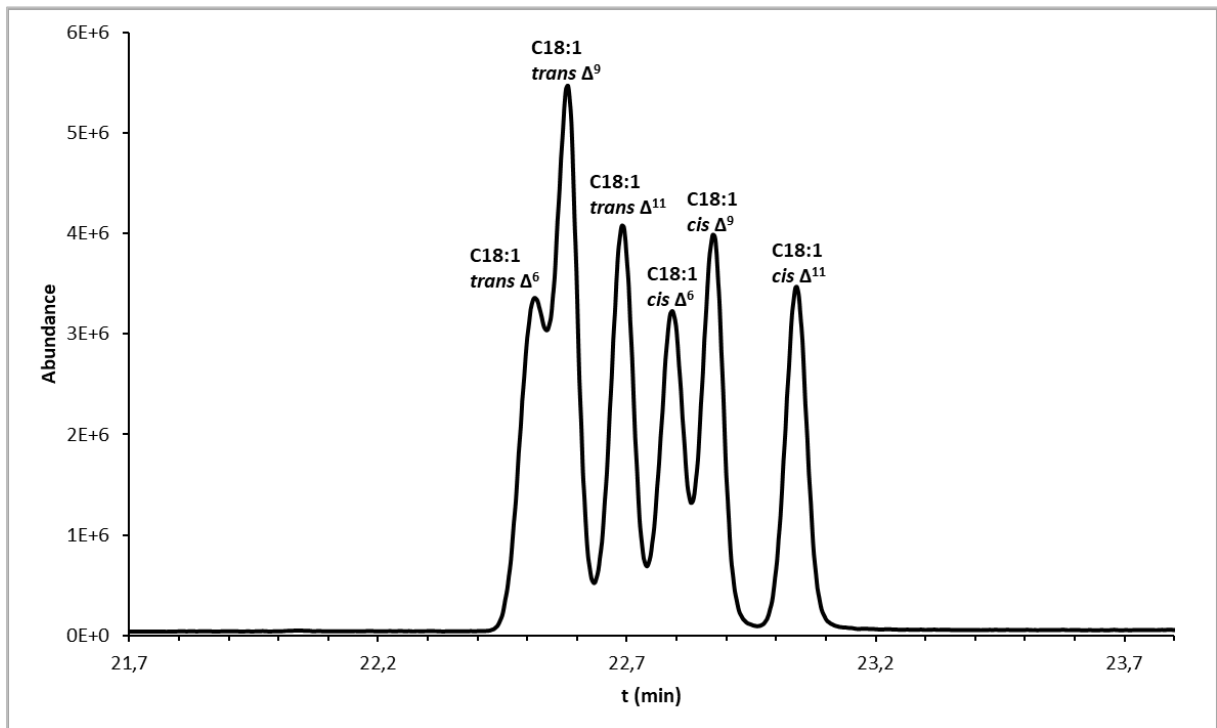
Kromě již zmíněné kolony TR FAME (Thermo Fisher Scientific) byla testována také kolona SELECT FAME (Agilent). Tato kolona je na rozdíl od TR FAME kratší o deset metrů, což by mohlo umožnit zrychlení analýzy. Obě tyto kolony jsou určeny pro separaci methylesterů mastných kyselin včetně jejich *cis*, *trans* a polohových izomerů. Pokud by byla použita kolona, která není speciálně určena pro separaci FAME, pravděpodobně by nebylo možné tyto látky dostatečně rozdělit. Stacionární fází obou zmíněných kolon je polární materiál na bázi kyanopropyl-polysiloxanů. Efektivita separace byla opakovaně porovnávána na směsi *cis* a *trans* izomerů a polohových izomerů kyseliny C18:1 pokaždé za použití stejných podmínek.

Na Obrázku 15 a 16 jsou chromatogramy směsi izomerů C18:1 naměřené při stejných podmínkách na různých kolonách. Ačkoli byla separace látek za použití SELECT FAME zhruba o minutu rychlejší, nebylo možné dostatečně rozseparovat píky polohových izomerů C18:1 *trans* Δ^6 a C18:1 *trans* Δ^9 . Pro následné analýzy byla tedy zvolena kolona TR FAME u které bylo rozdělení těchto látek o něco lepší.

Obrázek 15 Směs *cis* a *trans* izomerů C18:1 separace na koloně TR FAME (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm)



Obrázek 16 Směs *cis* a *trans* izomerů C18:1 separace na koloně SELECT FAME (50 m × 0,25 mm × 0,25 μm)



3.2 Validace metody

Pro zjištění, zda je optimalizovaná metoda vhodná pro zamýšlené použití analýzy krevního séra a rostlinných olejů byla provedena částečná validace, při které byla zjištěna opakovatelnost a mezilehlá přesnost. Metoda byla validována z hlediska procentuálního zastoupení látek ve směsi, ploch píků látek a ploch píků vztažených ke vnitřnímu standardu.

3.2.1 Opakovatelnost a mezilehlá přesnost

Opakovatelnost metody je vyjádřena těsností shody mezi výsledky navzájem nezávislých měření provedených za podmínek opakovatelnosti (stejná metoda, přístroj, experimentátor, laboratoř, materiál) během krátkého časového úseku. Mezilehlá přesnost vyjadřuje shodu mezi výsledky z vnitrolaboratorních variací způsobených náhodnými faktory, tedy změnami v průběhu několika dní, změnou analytika nebo změnou vybavení. Podmínkami mezilehlé přesnosti jsou stejný postup a místo měření, stejné nebo podobné objekty a rozšířený časový úsek. U mezilehlé přesnosti se vyhodnocuje relativní směrodatná odchylka.

Pro stanovení opakovatelnosti a mezilehlé přesnosti byla zvolena metoda tří opakovaných měření stejného vzorku po dobu tří dnů. Jako vzorek bylo použito testovací krevní sérum. Vzorek byl každý den třikrát připraven stejným způsobem, za použití stejných chemikálií a byl měřen na stejném přístroji za stejných podmínek. Jako vnitřní standard byl použit IS-C19:1, který byl ke vzorku přidán před dalšími úpravami. Postup přípravy vzorku je podrobně popsán v kapitole 2.3.4. Opakovatelnost byla vyhodnocena mírou shody měření v jednom dni a mezilehlá přesnost byla vyhodnocena mírou shody měření v rozptylu třech dní.

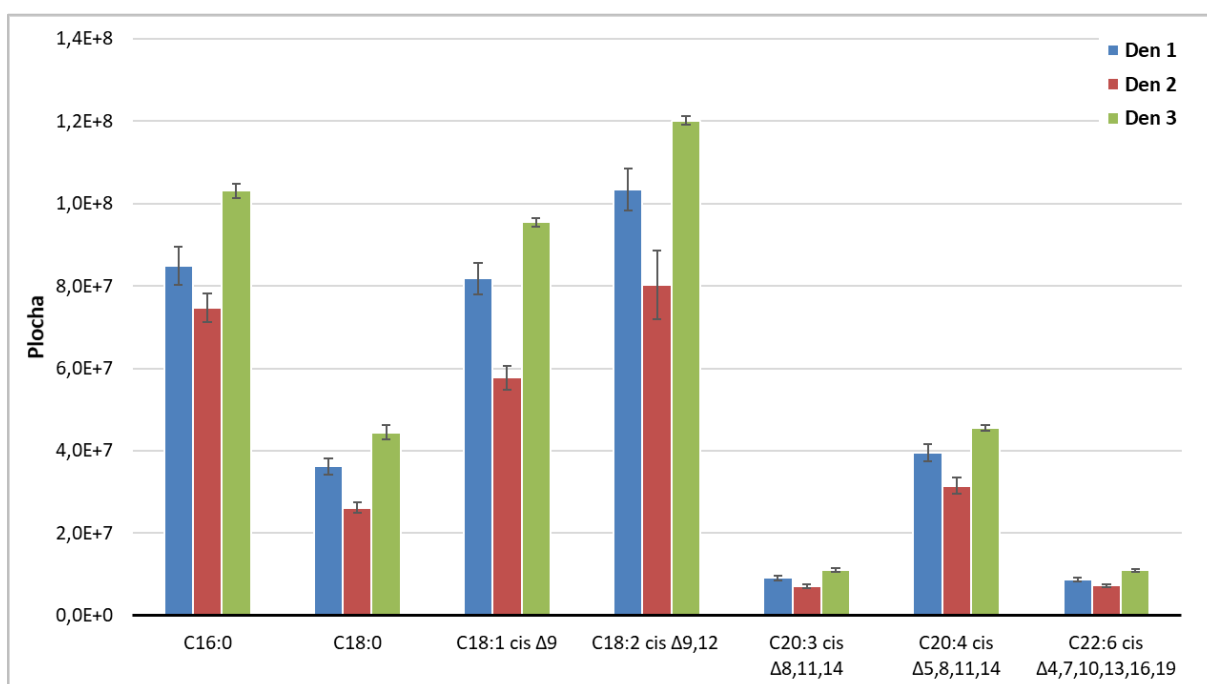
Při vyhodnocování bylo postupováno tak, že byly zjištěny plochy píků identifikovaných FAME obsažených ve vzorku. Pro zjištění mezilehlé preciznosti a opakovatelnosti bylo vybráno několik majoritních kyselin s procentuálním zastoupením od dvou do dvaceti pěti procent a několik minoritních mastných kyselin s procentuálním zastoupením menším než dvě procenta.

Validace byla provedena jednak na samotných plochách píků MK, dále na poměrech ploch jednotlivých píků MK k ploše píku vnitřního standardu a na procentuálním zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorku. Ve všech případech byl vyhodnocen průměr, směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD) za každý den jednotlivě a pro všechny dny a opakování dohromady.

3.2.2 Opakovatelnost a mezilehlá přesnost z ploch píků MK

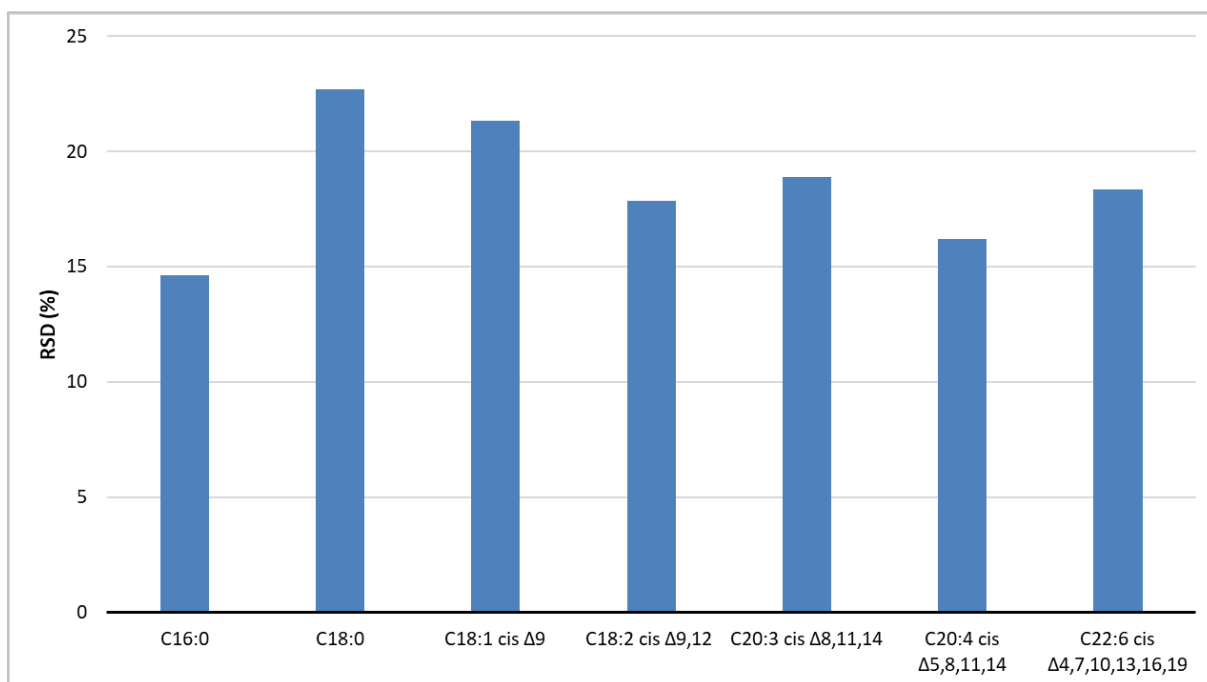
Nejprve byla zhodnocena opakovatelnost ploch píků v rámci jednotlivých dnů. Na následujícím Obrázku 17 jsou zobrazeny průměry ploch píků jednotlivých dnů a chybové úsečky znázorňující směrodatné odchylky. Průměry ploch jednotlivých dnů se mezi sebou výrazně lišily a vyšší byly i hodnoty směrodatných odchylek. RSD se v rámci všech dnů pro většinu MK pohybovala v rozmezí 0,9 až 6,3 %, jedinou výjimkou byla relativní směrodatná odchylka kyseliny linolové (C18:2 *cis* $\Delta^{9,12}$), která druhý den činila až 10 %.

Obrázek 17 Průměrné plochy píků majoritních MK ve vzorku séra a jejich směrodatné odchylky (chybové úsečky) (3 dny, 3 opakování)



Obrázek 18 znázorňuje relativní směrodatnou odchylku vypočtenou z průměrů ploch jednotlivých MK. Data vychází z opakovaných měření prováděných po dobu tří dnů, tedy celkem z devíti stanovení. Hodnoty RSD dosahovaly poměrně vysokých hodnot, například u kyseliny stearové (C18:0) byla relativní směrodatná odchylka 22,7 %. Tabulka s vypočtenými hodnotami RSD, SD a průměrů z ploch píků majoritních MK je v Příloze 4.

Obrázek 18 RSD vypočtené z ploch píků majoritních MK ve vzorku (n=9, 3 dny, 3 opakování)

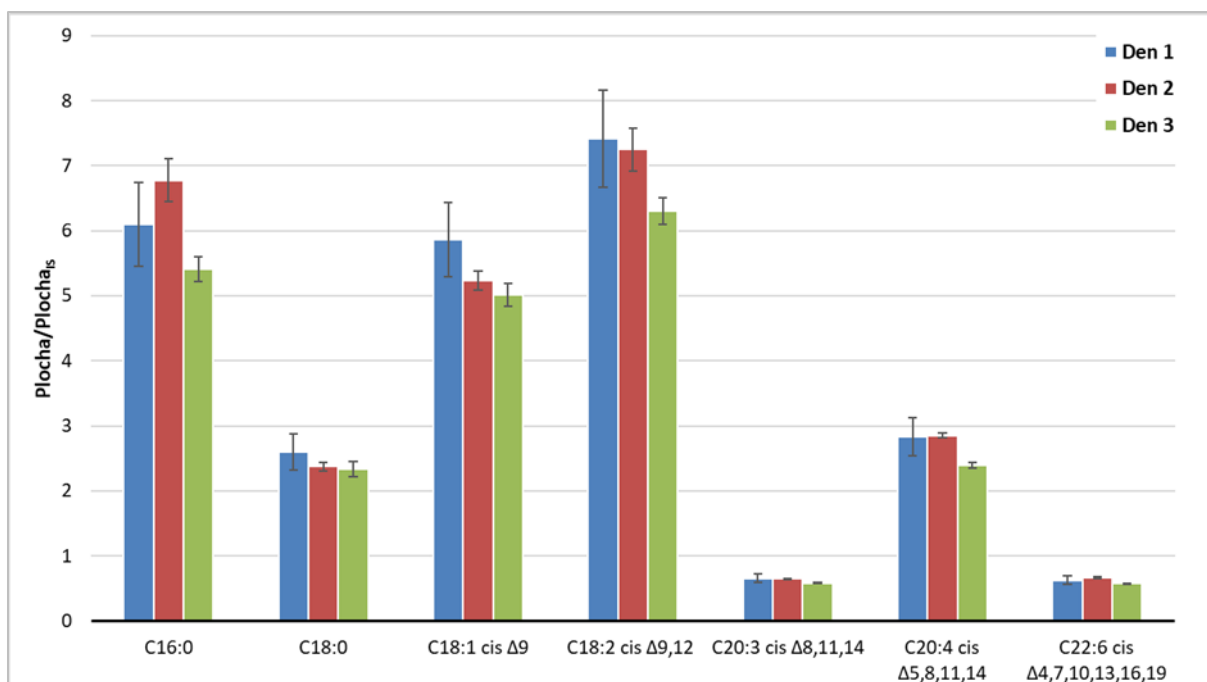


3.2.3 Opakovatelnost a mezilehlá přesnost z ploch píků MK vztažených k IS

Mezilehlá přesnost a opakovatelnost z hlediska ploch píků MK vyšla poměrně špatně, proto byly plochy píků vztaženy k plochám vnitřního standardu, který představovala látka C19:1 *cis* Δ¹⁰, jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách.

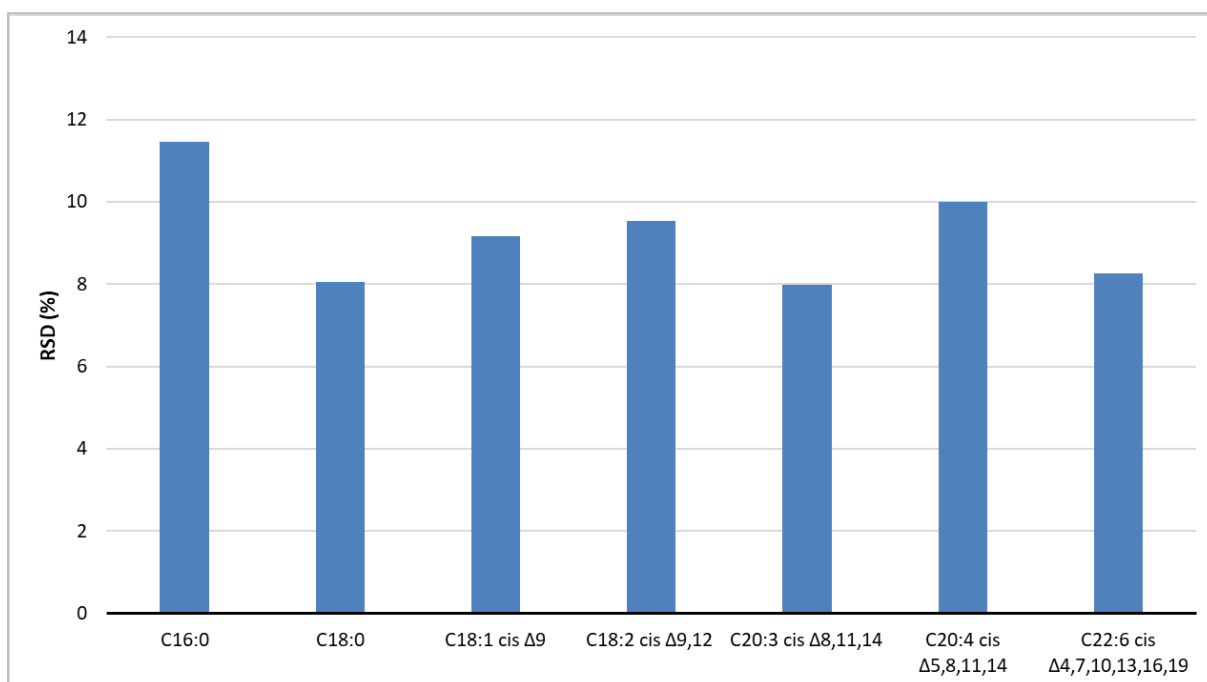
Z Obrázku 19 je na první pohled je patrné, že shoda průměrů v rámci dnů vychází mnohem lépe, u některých MK jsou téměř stejné. Naproti tomu hodnoty SD měly mnohem větší rozptyl, a to především v prvním dni měření. RSD vypočítané z SD se první den pohybovaly v rozmezí 9,8–11,2 %, což je poměrně hodně. V ostatních dnech vycházely mnohem nižší, 0,5 až 4,9 %. Ačkoli byl rozptyl RSD docela velký, i tak vycházela opakovatelnost přijatelněji než v případě vyhodnocení ploch píků látek bez přepočtu na IS.

Obrázek 19 Průměrné plochy píků majoritních MK vztažené k vnitřnímu standardu ve vzorku séra a jejich směrodatné odchylky (chybové úsečky) (3 dny, 3 opakování)



Pokud byly plochy píků přepočítány na vnitřní standard, hodnoty relativních směrodatných odchylek v rámci několika dní vycházely znatelně lépe (viz Obrázek 20). Kromě kyseliny palmitové (C16:0), jejíž RSD byla 11,46 %, vycházely hodnoty odchylek do deseti procent, což bylo přijatelné a použitelné. Tabulka s vypočtenými hodnotami RSD, SD a průměrů z ploch píků majoritních MK přepočítaných na IS je v Příloze 5.

Obrázek 20 RSD vypočtené z ploch píků majoritních MK vztažených k IS (n=9, 3 dny, 3 opakování)

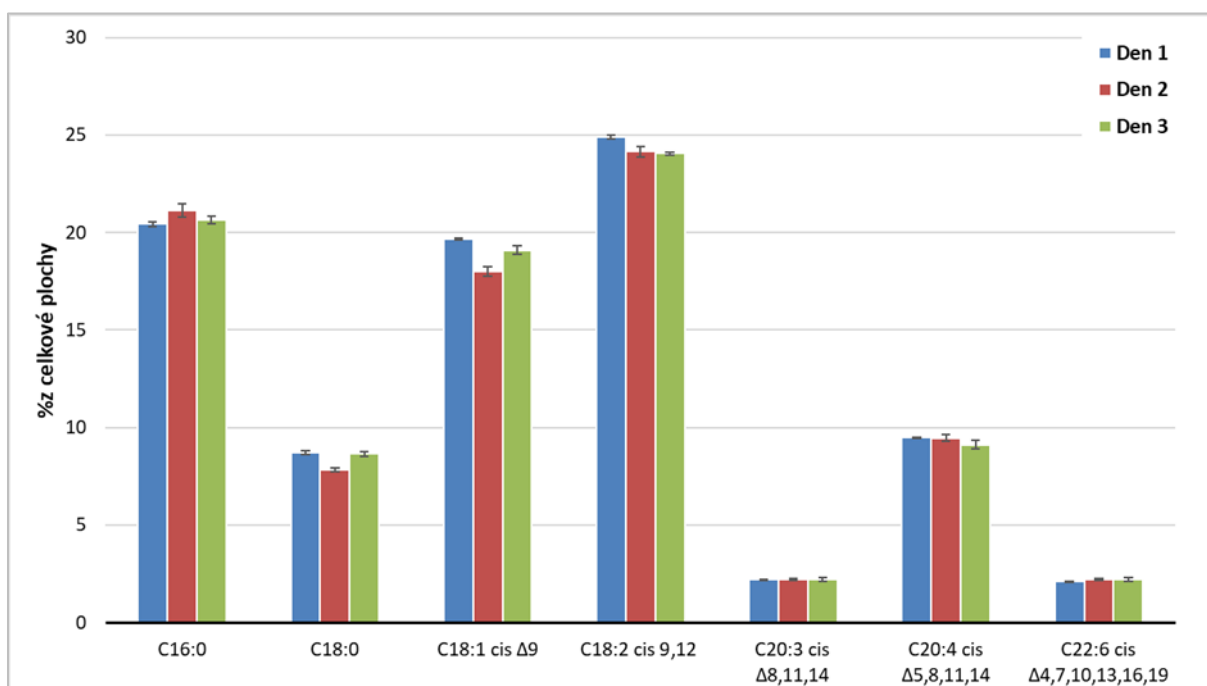


3.2.4 Opakovatelnost a mezilehlá přesnost z procentuálního zastoupení MK

Opakovatelnost a mezilehlá přesnost byla vyhodnocena rovněž z hlediska procentuálního zastoupení MK ve vzorku.

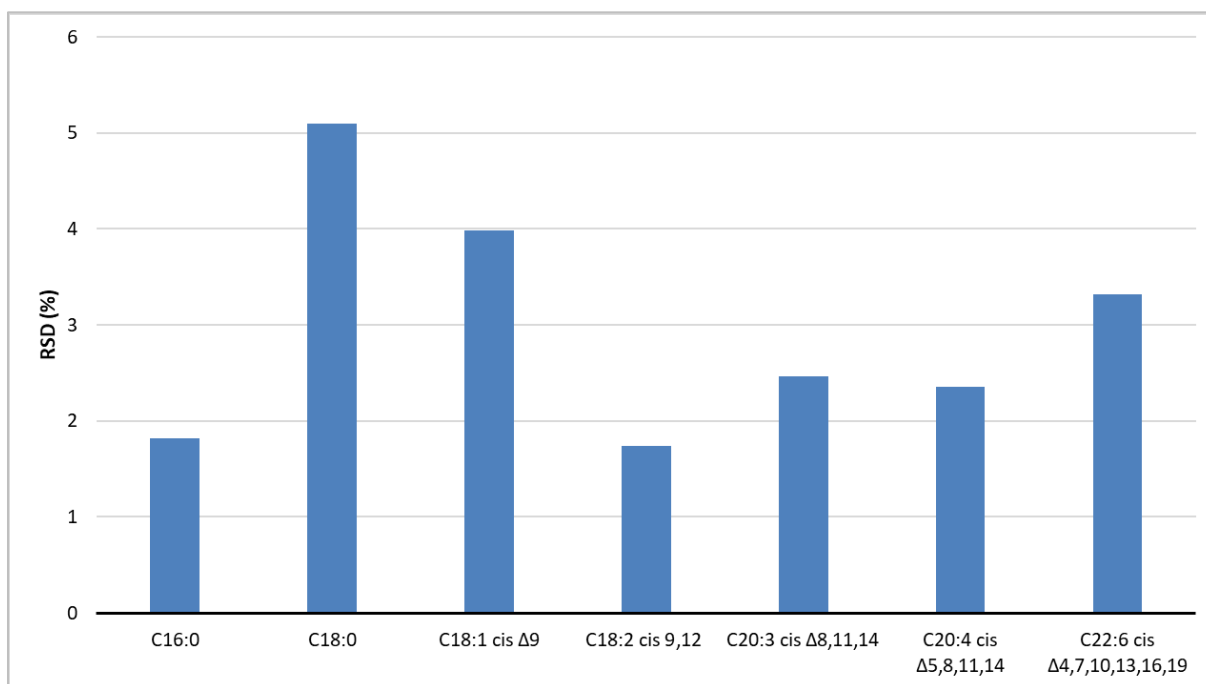
Obrázek 21 vyjadřuje průměry procentuálního zastoupení MK v jednotlivých dnech a chybové úsečky představují směrodatnou odchylku od průměru. Průměry z jednotlivých dnů se velmi dobře shodovaly a odchylky byly velmi malé (RSD 0,3–4,5 %).

Obrázek 21 Průměrné procentuální zastoupení majoritních MK ve vzorku séra a jejich směrodatné odchylky (chybové úsečky) (3 dny, 3 opakování)



Na Obrázku 22 jsou vyjádřeny relativní směrodatné odchylky vypočtené z průměru procentuálního zastoupení jednotlivých mastných kyselin. Z grafu lze vyčíst, že RSD se v tomto případě pohybuje od dvou do přibližně pěti procent, což je velmi uspokojivá hodnota. Tabulka s vypočtenými hodnotami RSD, SD a průměrů z procentuálního zastoupení ve vzorku majoritních MK je v Příloze 6.

Obrázek 22 RSD vypočtené z procentuálního zastoupení majoritních MK ve vzorku (n=9, 3 dny, 3 opakování)



Z uvedených dat vyplývá, že ačkoliv se v průběhu dnů a analýz odchylovaly plochy píků, tak procentuální zastoupení majoritních MK bylo téměř stejné, což bylo pro analýzu stěžejní. RSD vypočtené z ploch píků dosahují téměř 25 %, avšak po přepočtu k plochám vnitřního standardu vychází přibližně kolem deseti procent. RSD v rámci jednoho dne i více dní vypočtené z procentuálního zastoupení MK ve vzorku vychází nejlépe, cca do 5 %. Tyto odchylky jsou přijatelné vzhledem k tomu, že se jedná o odchylky, které zahrnují jak zpracování vzorku, esterifikaci tak vlastní GC-MS analýzu. Metoda přípravy vzorku, podmínky separace a přístup procentuálního zastoupení je tedy možné využít k následné analýze vzorků.

Mezilehlá přesnost u minoritních MK ve vzorku vycházely velmi podobně a relativní směrodatné odchylky vypočítané z procentuálního zastoupení vyšly opět nejlépe, v rozmezí od 3,5 do 14 %. Jedná o vyšší hodnoty než v případě majoritních MK, nicméně se jedná o malé píky a větší chyba mohla být způsobena i vlastní integrací plochy píků. Tabulky s vypočtenými hodnotami průměrů, SD, a RSD minoritních MK jsou v Přílohách 7–9 a příslušné grafy jsou v Přílohách 10–15.

3.3 Analýza vzorků olejů

Analýzou vzorků olejů bylo zjišťováno procentuální zastoupení *cis* a *trans* izomerů a polohových izomerů. Metodu bylo třeba upravit a optimalizovat, aby bylo možné látky spolehlivě identifikovat.

3.3.1 Optimalizace přípravy a separace vzorků olejů

Metoda přípravy vzorků olejů byla převzata z diplomové práce Ing. Michaely Kamenické [73]. Principem přípravy vzorků bylo převedení obsažených mastných kyselin na methylestery za působení methanolátu sodného. Jako vnitřní standard byl použit methylester kyseliny heptadekanové (C17:0). Tato látka byla vybrána, jelikož byla k dispozici v dostatečném množství a čistotě a nekoeluovala s píky ostatních methylesterů MK. Vnitřní standard byl přidán do vzorku po provedení esterifikace, před vytřepáním methylesterů do hexanu (postup je podrobněji popsán v kapitole 2.3.3.1). Účelem použití vnitřního standardu byla hlavně kontrola reprodukovatelnosti metody.

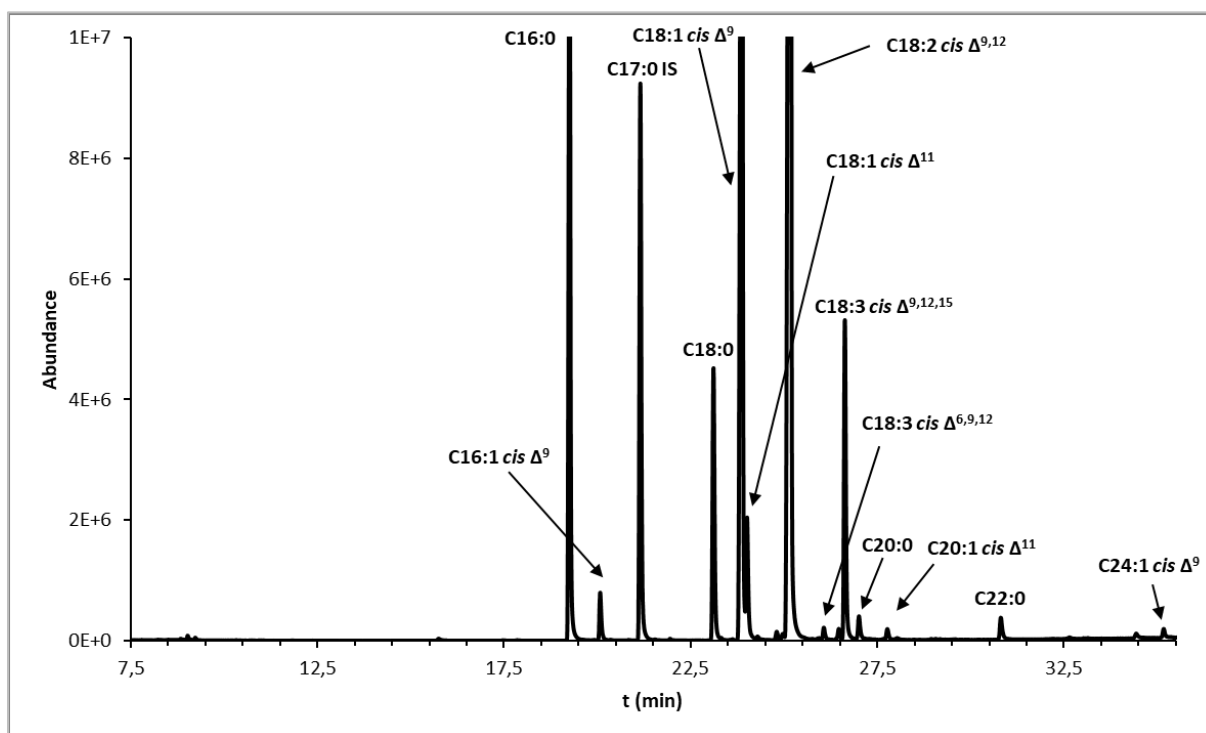
Optimalizovány byly některé parametry GC. Bylo nutné najít vhodný objem dávkovaného vzorku a splitovacího poměru tak, aby byly kromě většinově zastoupených mastných kyselin eluovány i píky menšinově zastoupených MK a daly se spolehlivě identifikovat. Nejprve byl vyzkoušen dávkovaný objem vzorku 0,5 μ l a split 15:1. Při tomto nastavení byly píky minoritních MK jen velmi malé a téměř na úrovni šumu. Nakonec byl pro analýzu vzorků použit split 10:1 a objem dávkování vzorku 1,5 μ l, přičemž při těchto podmínkách už byly látky identifikovatelné.

3.3.2 Mastné kyseliny v olejích

Mastné kyseliny byly analyzovány ve vzorcích devíti olejů, z toho tři byly olivové, lišící se charakteristikou a zemí původu. Zbývající šest vzorků byly oleje různého druhu – lněný, řepkový, kokosový, slunečnicový, rakytníkový a olej ze semene lničky seté. Všechny informace o použitých olejích jsou v Příloze 2.

Methylestery mastných kyselin byly identifikovány porovnáním retenčních časů se standardy a také porovnáním hmotnostních spekter se spektry v knihovně NIST. Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vzorcích bylo vypočteno ze sumy ploch píků MK. Na Obrázku 23 je ukázkový chromatogram rakytníkového oleje, chromatogramy ostatních olejů jsou v Přílohách 16–23.

Obrázek 23 Chromatogram rakytníkového oleje



Ve všech vzorcích se vyskytovaly ve větším množství kyseliny olejová (C18:1 *cis* Δ⁹), linolová (C18:2 *cis* Δ^{9,12}) a palmitová (C16:0) a s procentuálním zastoupením od dvou do pěti procent i kyselina stearová (C18:0). Procentuální zastoupení jednotlivých MK ve vzorcích olejů je v Tabulce 9.

Ve vzorku **rakytníkového oleje** (O1) byla nejzastoupenější kyselina linolová (C18:2 *cis* Δ^{9,12}) jejíž obsah činil 44,6 %. Druhou nejzastoupenější MK byla kyselina olejová (C18:1 *cis* Δ⁹) (26,7 %), olej dále obsahoval ve vyšším množství také kyselinu palmitovou (C16:0) (13,3 %), stearovou (C18:0) (4,9 %) a α-linolenovou (C18:3 *cis* Δ^{9,12,15}) (5,6 %), která je esenciální a patří do skupiny ω3 MK. Obsah ostatních mastných kyselin byl nižší a pohyboval se v řádech jednotek až desetin procent. Rakytníkový olej byl bohatý především na ω6 a ω9 MK, obsahoval i menší množství ω3 MK. Na rozdíl od ostatních vzorků obsahoval rakytníkový olej i malé množství kyseliny nervonové (C24:1 *cis* Δ⁹). Tabulka s retenčními časy MK je v Příloze 24.

Ve složení vzorku **lněného oleje** převažovala kyselina α-linolenová (C18:3 *cis* Δ^{9,12,15}), která, dosahovala až 51,2 % z celkového zastoupení všech MK ve vzorku. Vzorek rovněž obsahoval vysoké množství kyseliny olejové (C18:1 *cis* Δ⁹) (21,3 %) a linolové (C18:2 *cis* Δ^{9,12}) (15,2 %). Minoritními mastnými kyselinami byla kyselina palmitoolejová (C16:1 *cis* Δ⁹) (0,1 %), *cis* vakcenová (C18:1 *cis* Δ¹¹) (1,2 %) a *cis*-11-ikosanová (C20:1 *cis* Δ¹¹) (1,09 %). Lněný olej byl velmi bohatý na ω6 MK. Tabulka s retenčními časy MK je v Příloze 25

Tabulka 9 Procentuální zastoupení jednotlivých MK ve vzorcích olejů

	Vzorek, zastoupení MK [%]								
	rakytníkový	lněný	kokosový	řepkový	olivový	olivový	olivový	slunečnicový	lničkový
Mastná kyselina	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9
C8:0	-*	-*	7,4	-*	-*	-*	-*	-*	-*
C10:0	-*	-*	6,3	-*	-*	-*	-*	-*	-*
C11:0	-*	-*	39,9	-*	-*	-*	-*	-*	-*
C14:0	-*	-*	21,9	-*	-*	-*	-*	-*	-*
C16:0	13,3	6,2	10,8	4,8	13,4	17,3	12,7	7,5	6,1
C16:1 <i>cis</i> Δ^9	0,8	0,06	-*	-*	0,8	2	0,8	0,1	-*
C17:1 <i>cis</i> Δ^{10}	0,03	-*	-*	0,04	0,1	0,1	0,1	-*	-*
C18:0	4,9	4,8	4,3	1,8	3,6	2,7	3,6	4,4	3
C18:1 <i>trans</i> Δ^9	-*	-*	-*	-*	0,3	-*	-*	-*	-*
C18:1 <i>cis</i> Δ^9	26,7	21,3	8	58,1	66,6	56	71,8	32,1	16,5
C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	2,4	1,2	-*	4,3	3,7	4,5	3,4	1,3	1,2
C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	44,6	15,2	1,4	20,1	9,8	16,1	6,2	53,2	18,6
C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{6,9,12}$	0,2	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*
C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{9,12,15}$	5,57	51,2	-*	9,1	0,7	0,6	0,7	-*	30,2
C20:0	0,5	-*	-*	0,5	0,6	0,4	0,4	0,2	1,8
C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	0,2	0,1	-*	1,1	0,3	0,2	0,2	0,1	15,6
C20:2 <i>cis</i> $\Delta^{11,14}$	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	1,8
C20:3 <i>cis</i> $\Delta^{11,14,17}$	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	1,1
C22:0	0,5	-*	-*	0,2	0,2	0,1	0,05	0,8	0,3
C22:1 <i>cis</i> Δ^{13}	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	3,3
C24:0	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	0,2	-*
C24:1 <i>cis</i> Δ^9	0,2	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	0,5

* ...nenalezeno

Vzorek **kokosového oleje** (O3) se od ostatních olejů odlišoval vysokým obsahem nasycených MK. Největší zastoupení měla kyselina undekanová (C11:0) (39,9 %), poté následovala kyselina myristová (C14:0) (19,9 %) a kyselina palmitová (C16:0) (10,8 %). Vzorek v menších množstvích obsahoval nasycené MK s kratším řetězcem, které představovaly kyseliny kaprylová (C8:0) (7,4 %) a kaprinová (C10:0) (6,3 %). Z nenasycených MK obsahoval kyselinu olejovou (C18:1 *cis* Δ^9) a linolovou (C18:2 *cis* $\Delta^{9,12}$), ale v porovnání s ostatními oleji se zde tyto MK vyskytovaly v malém množství o rozsahu jednotek procent. Kokosový olej jako jediný neobsahoval kyselinu *cis* vakcenovou (C18:1 *cis* Δ^{11}). Tabulka s retenčními časy MK je v Příloze 26.

Vzorek **řepkového oleje** (O4) se vyznačoval vysokým obsahem kyseliny olejové (C18:1 *cis* Δ^9) (58,1 %), dalšími zastoupenějšími MK je kyselina linolová (C18:2 *cis* $\Delta^{9,12}$) (20,1 %) a α -linolenová (9,1 %). V menších množstvích se zde vyskytovala i kyselina stearová (C18:0), arachidonová (C20:0), behenová (C22:0) *cis*-11-ikosanová (C20:1 *cis* Δ^{11}). Řepkový olej byl bohatý především na obsah ω 9 MK a zároveň obsahoval velmi malé množství nasycených MK. Tabulka s retenčními časy MK je v Příloze 27.

Byly analyzovány tři vzorky **olivového oleje**, které se od sebe lišily mechanismem výroby a kvalitou. Konkrétně šlo o olivový olej z pokrutin (O5), panenský olivový olej lisovaný za studena (O6) a panenský olivový olej lisovaný za studena v bio kvalitě (O7). Procentuální obsah některých mastných kyselin se lišil o jednotky, výjimečně až o desítky procent. Všechny oleje se vyznačovaly vysokým obsahem kyseliny olejové (C18:1 *cis* Δ^9), jejíž obsah se ve vzorcích poměrně dost odlišoval. Nejvíce této MK bylo obsaženo v panenském oleji bio kvality (71,8 %), o něco méně bylo v olivovém oleji z pokrutin (66,6 %) a nejméně bylo v panenském olivovém oleji (56 %). V menším množství následovala kyselina palmitová (C16:0) (12,7–17,3 %), linolová (C18:2 *cis* $\Delta^{9,12}$) (6,2–16,1 %) a *cis*-vakcenová (C18:1 *cis* Δ^{11}) (3,4–4,5 %). Olivový olej byl velmi chudý na kyselinu α -linolenovou (C18:3 *cis* $\Delta^{9,12,15}$), její procentuální zastoupení se ve všech vzorcích pohybovalo kolem 0,7 %. Olivový olej z pokrutin obsahoval kromě MK vyskytujících se i v ostatních vzorcích kyselinu elaidovou (0,3 %), která je *trans* izomerem kyseliny oktadekanové (C18:0). Konzumace *trans* mastných kyselin může mít negativní dopady na lidské zdraví, jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2.6. Výskyt *trans* MK souvisí s technologií výroby olivového oleje. Pokud je olej při výrobě rafinován, přichází tím o část vitaminů a o další významné látky. Při rafinaci navíc mohou vznikat nežádoucí *trans* mastné kyseliny. Z výživového hlediska je tedy vhodnější si za příplatit za kvalitnější olivový olej lisovaný za studena, protože tato technologie výroby je značně šetrnější a škodlivé látky při ní nevznikají. Tabulky s retenčními časy MK jsou v Příloze 28, 29, 30.

V porovnání s ostatními vzorky obsahoval **slunečnicový olej** (O8) nejvyšší procentuální zastoupení kyseliny linolové (C18:2 *cis* $\Delta^{9,12}$), které dosahovalo až 53,2 %. Druhou majoritní MK byla kyselina olejová (C18:1 *cis* Δ^9) s 32,1 %. Méně zastoupenými kyselinami byly nasycené MK jako například kyselina palmitová (C16:0) (7,5 %) a stearová (C18:0) (4,4 %). Ostatní mastné kyseliny se ve slunečnicovém oleji nachází ve velmi malém množství, jejich procentuální zastoupení je kolem jednoho procenta a méně. Ve slunečnicovém oleji se jako v jediném vzorku objevila kyselina lignocerová (C24:0) jejíž obsah byl 0,2 %. Slunečnicový

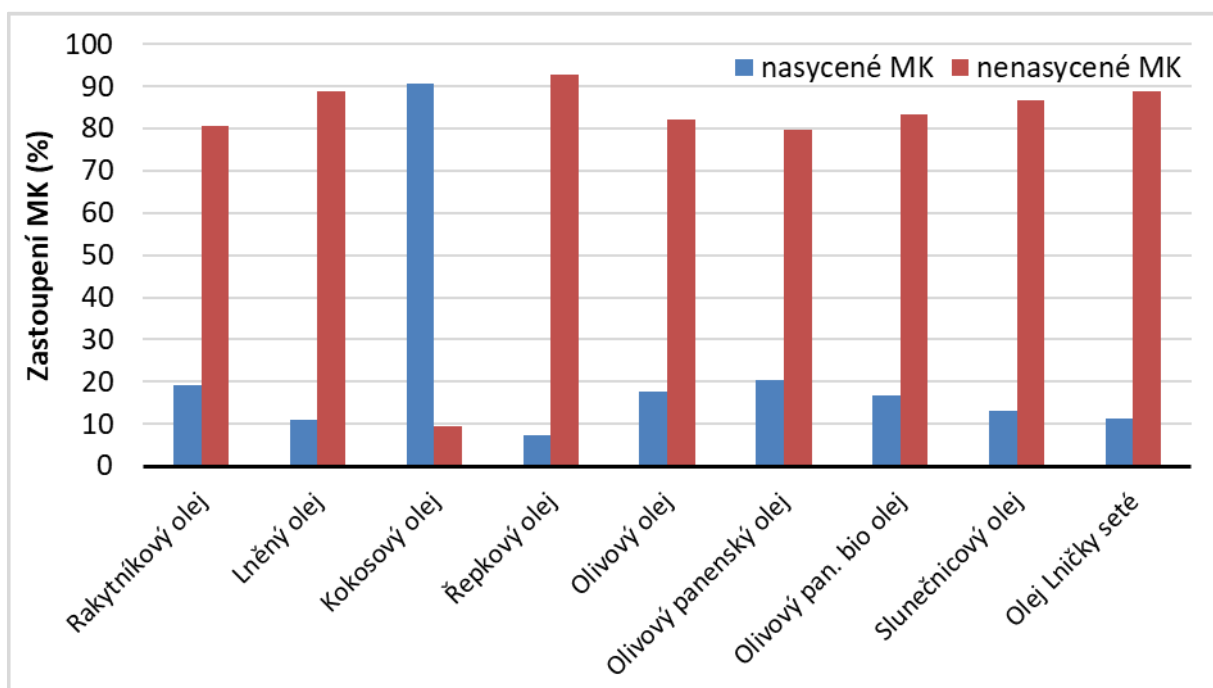
olej je tedy významným zdrojem především $\omega 6$ a $\omega 9$ MK. Tabulka s retenčními časy MK je v Příloze 31.

Ve vzorku **oleje získaný ze semen lničky seté (O9)** bylo zjištěno celkem třináct mastných kyselin, z nichž většina byly polynenasycené. Největší zastoupení měla kyselina α -linolenová (C18:3 *cis* $\Delta^{9,12,15}$) jejíž obsah byl 30,2 %. Dalšími majoritními kyselinami byla linolová (C18:2 *cis* $\Delta^{9,12}$) (18,6 %), olejová (C18:1 *cis* Δ^9) (16,5 %) a *cis*-11-ikosanová (C20:1 *cis* Δ^{11}) (15,64 %). Méně zastoupené byly nasycené MK jako například kyselina palmitová (C16:0) a stearová (C18:0) jejichž obsah se pohyboval v rozmezí jednotek procent. Tabulka s retenčními časy MK je v Příloze 32.

3.3.3 Nasycené a nenasycené mastné kyselin v olejích

Vzorky olejů lze navzájem porovnat z poměru procentuálního zastoupení nasycených a nenasycených MK (viz Obrázek 24).

Obrázek 24 Poměr nasycených a nenasycených MK ve vzorcích olejů



Z obrázku je patrné, že většina analyzovaných vzorků obsahovala převážně nenasycené MK až na kokosový olej, ve kterém nasycené MK převažovaly až o 90 % nad nenasycenými. Z toho důvodu tedy není možné doporučit kokosový olej ke každodenní konzumaci, protože nasycené mastné kyseliny mají negativní účinky na organismus, které mohou vést ke mnoha onemocněním, jak je již zmíněno v kapitole 1.2.3. Výhodou kokosového oleje je lepší oxidační stabilita, způsobená právě obsahem nasycených MK, díky čemuž tomu nežlukne tak snadno

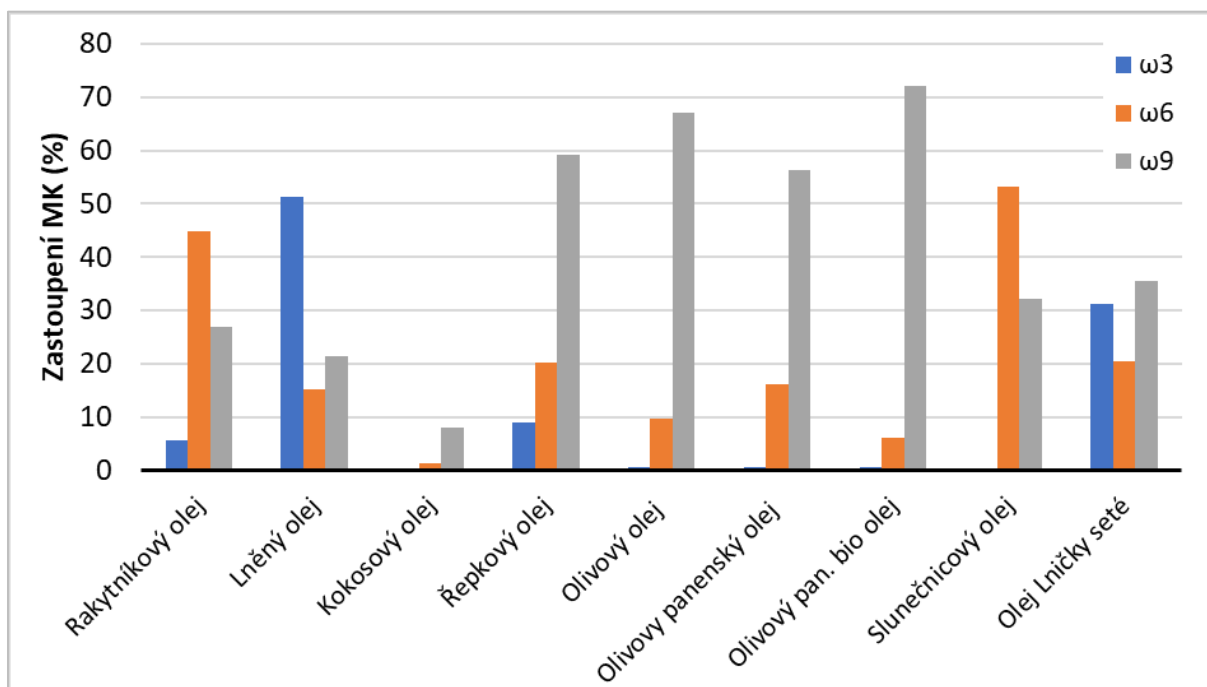
jako oleje obsahující vyšší množství nenasycených MK. Ačkoli bylo složení ostatních MK z výživového hlediska mnohem lepší, vysoký obsah nenasycených MK snižuje oxidační stabilitu oleje. Tyto oleje by proto měly být skladovány v chladu, temnu a nejlépe bez přístupu kyslíku, aby nedocházelo k oxidaci nenasycených MK a tím k rychlé degradaci.

Pokud bychom chtěli vzorky olejů porovnat z hlediska vhodnosti pro smažení, nejlepší složení má kokosový olej. Jak již bylo zmíněno výše, kokosový olej má díky svému složení, ve kterém převažují nasycené MK vysokou oxidační stabilitu. Nasycené MK při zahřátí na vysokou teplotu okolo 200 °C nepodléhají tak snadno degradačním procesům jako nenasycené MK. Nenasycené MK při zahřátí na vyšší teploty často podléhají oxidaci, hydrolýze či polymeraci, při kterých se vytváří množství zdraví škodlivých látek [74]. Nevýhodou kokosového oleje je jeho charakteristické výrazně kokosové aroma a chuť, což může být v mnoho případech nežádoucí. Dalším vhodným olejem ke smažení je slunečnicový olej se zvýšeným obsahem kyseliny olejové, který by měl být stabilní do teploty kolem 180 °C [75].

3.3.4 $\omega 3$, $\omega 6$ a $\omega 9$ mastné kyseliny v olejích

Mastné kyseliny lze mezi sebou porovnat i z hlediska obsahu nenasycených mastných kyselin, patřících do různých tzv. omega skupin (Obrázek 25).

Obrázek 25 Poměr $\omega 3$, $\omega 6$ a $\omega 9$ MK ve vzorcích olejů



Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2.5, největší přínos pozitivní fyziologické účinky pro člověka mají hlavně ω 3 MK. Ve vzorcích olejů byl největším zdrojem ω 3 MK kyselina α -linolenová (C18:3 *cis* $\Delta^{9,12,15}$), patřící rovněž do esenciálních MK, které je třeba přijímat potravou. Z obrázku je patrné, že největší podíl ω 3 MK obsahoval vzorek lněného oleje lisovaného za studena (51,2 %). Vyšší množství se vyskytovalo rovněž ve vzorcích lničkového (31,3 %), řepkového (9,1 %) a rakytníkového oleje (5,6 %). V ostatních olejích měly ω 3 MK jen velmi malé zastoupení, obsah se řádově pohyboval v desetinách procent. Hlavním zdrojem ω 6 MK v olejích byla kyselina linolová (C18:2 *cis* $\Delta^{9,12}$), která rovněž patří mezi esenciální MK a kyselina γ -linolenová (C18:3 *cis* $\Delta^{6,9,12}$). Menší množství ω 6 MK se vyskytovalo ve vzorku kokosového oleje a olivových olejích, v ostatních vzorcích byl obsah ω 6 MK poměrně vysoký, dosahoval 15 až 51 % z celkového zastoupení.

ω 3 a ω 6 MK by měly být konzumovány v poměru 1:1 až 1:4 [76, 77]. Ve vzorku rakytníkového oleje je tento poměr 1:8, ve lněném oleji 3,4:1, v řepkovém oleji 1:2,2 a ve lničkovém oleji 1,5:1. Doporučenému poměru nejlépe vyhovuje řepkový a lničkový olej. Pravidelná konzumace těchto olejů obsahujících ω 3 a ω 6 ve správném poměru tedy může být z výživového hlediska prospěšná.

ω 9 MK se vyskytovaly v každém vzorku a převažovaly u vzorků olivových olejů a řepkovém oleji. Hlavním zdrojem byla kyselina olejová (C18:1 *cis* Δ^9). Ačkoli ω 9 MK nejsou esenciální, mají protizánětlivé účinky a mohou sloužit například jako prevence rakoviny [78].

3.4 Analýza vzorků krevního séra

Dalšími vzorky, které byly analyzovány a u kterých bylo důležité zjistit procentuální zastoupení mastných kyselin, především jejich *cis* a *trans* stereoizomerů a polohových izomerů, byly krevní séra. Vzorky krevního séra pocházely od zdravých lidí po pacienty trpící rakovinným onemocněním. Metodu stanovení MK v krevním séru bylo třeba optimalizovat z hlediska postupu přípravy vzorků a dávkování do systému GC.

3.4.1 Optimalizace přípravy a dávkování vzorků krevního séra

Krevní sérum obsahuje kromě lipidů také anorganické soli, plazmatické proteiny, glukózu a další látky. Tyto látky by mohly rušit stanovení, protože by mohly způsobovat vyšší šum nebo zkreslovat signál píků FAME. Interferenty bylo nutné ze vzorků eliminovat ještě před esterifikací. K tomuto účelu lze použít Folchovu extrakci nebo proteinovou precipitaci. Metoda přípravy vzorků Folchovu extrakcí byla převzata z publikace J. Folcha [79] a metoda proteinové precipitace krevního séra byla převzata z publikace J. Blancharda [80].

Principem Folchovy extrakce je oddělení lipidů od ostatních složek matrice za použití methanolu a chloroformu. Směs těchto dvou rozpouštědel má velký rozsah polarit, a tak je možné ze vzorku extrahovat téměř všechny lipidy. Folchova extrakce může být jednoduchá, při které vznikne podíl z první extrakce, nebo dvojitá, při které se smíchá podíl z první a druhé extrakce dohromady (postup je kapitole 2.3.4.1). Proteinová precipitace je proces, jehož principem je odstranění proteinů z matrice vzorku použitím směsi butanolu a methanolu. Působením reakční směsi dojde ke vzniku sraženiny proteinů a odebere se pouze čirá tekutina, která je dále zpracována (postup je v kapitole 2.3.4.2). Obě tyto metody byly porovnány z hlediska časové náročnosti, spotřeby činidel a velikostí šumu.

Pro účely optimalizace byly k připraveny tři vzorky proteinovou precipitací, další tři vzorky byly připravené jednoduchou Folchovou extrakcí a jeden dvojnásobnou Folchovou extrakcí. U těchto vzorků byla následně provedena esterifikace, čímž byly MK ve vzorku převedeny na methylestery (postup viz kapitola 2.3.4.3), které byly následně analyzovány. Z chromatogramů v Příloze 33 je patrné, že vzorky připravené proteinovou precipitací a Folchovou extrakcí poskytují prakticky stejný počet píků, stejnou odezvu i stejně velký šum. Jako optimální způsob přípravy byla zvolena proteinová precipitace z důvodu menší časové náročnosti a menší spotřeby chemikálií.

Pro separaci vzorků krevního séra bylo potřeba nalézt i vhodný objem dávkovaného vzorku a splitovací poměr. Nejprve byla vyzkoušena separace při splitu 15:1 a dávkovaném objemu

vzorku 0,5 ul. Při těchto podmínkách byly píky látek velmi malé a identifikovat bylo možné pouze několik majoritních kyselin. Z toho důvodu bylo vyzkoušeno několik různých nastavení, a nakonec byl vybrán splitovací poměr 1:1 a dávkovaný objem 4 µl. Při těchto podmínkách bylo možné identifikovat a integrovat jak stopové mastné kyseliny, tak mastné kyseliny s největším zastoupením.

3.4.2 Obsah mastných kyselin ve vzorcích krevního séra

K analýze bylo poskytnuto celkem 48 vzorků krevní plazmy od pacientů a dobrovolníků. Vzorky byly rozděleny do čtyř skupin podle zdravotního stavu dárců. Jedna skupina dárců představovala zdravé lidi bez zdravotních komplikací (zdraví), další skupinou byli lidé, kteří již někdy v minulosti prodělali rakovinu slinivky břišní (nemocní), další skupina trpěla příznaky onemocnění (s příznaky) a u poslední skupiny byla rakovina již diagnostikována (nemoc prodělali). K dispozici bylo dvanáct vzorků z každé skupiny. Rozdělení vzorků a jejich označení je v Tabulce 10. Plazma byla skladována při teplotě -80 °C až do zpracování a analýzy vzorků.

Tabulka 10 Rozdělení vzorků krevního séra podle zdravotního stavu dárců

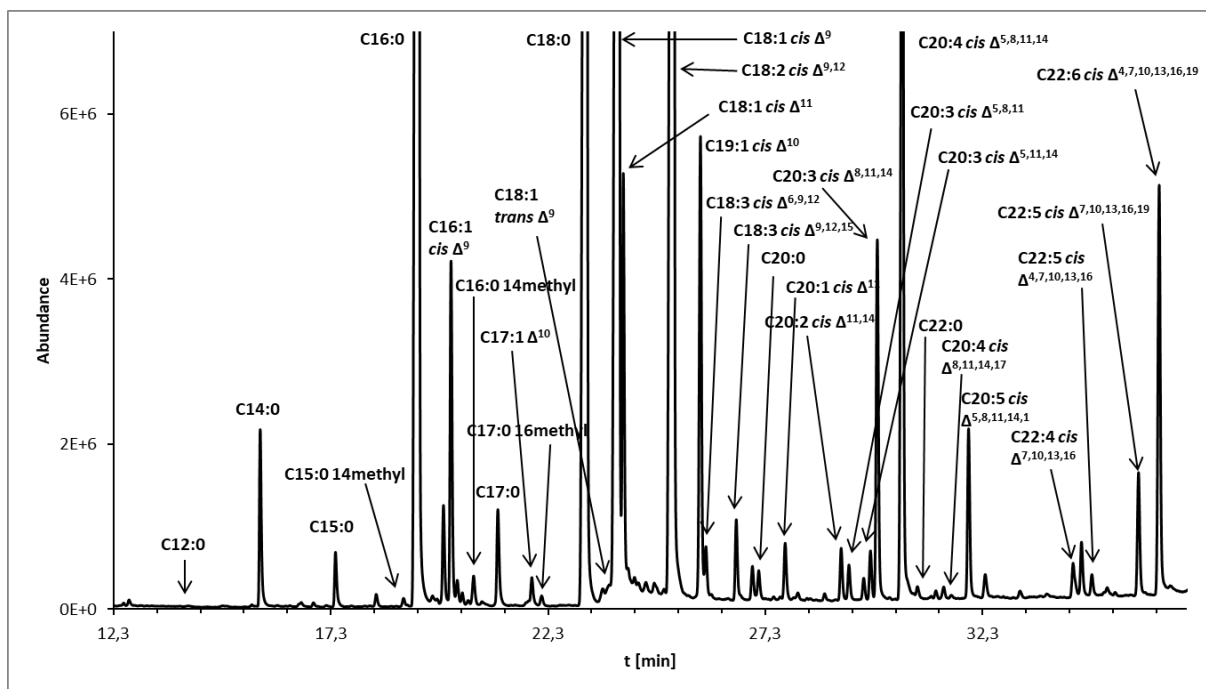
Zdraví dárci		Nemocní dárci		Dárci, kteří rakovinu prodělali		Dárci s příznaky onemocnění	
Ženy	Muži	Ženy	Muži	Ženy	Muži	bez informací o pohlaví	
PA_2	PA_10	PCO_993	PCO_881	PCO_527	PCO_525	PCO_175	PCO_1057
PA_14	PA_45	PCO_935	PCO_926	PCO_530	PCO_526	PCO_327	PCO_1065
PA_41	PA_54	PCO_951	PCO_982	PCO_535	PCO_528	PCO_342	PCO_1069
PA_110	PA_83	PCO_879	PCO_908	PCO_21	PCO_538	PCO_576	PCO_1088
PA_119	PA_124	PCO_861	PCO_866	PCO_715	PCO_273	PCO_859	PCO_1089
PA_158	PA_132	PCO_971	PCO_918	PCO_920	PCO_476	PCO_894	PCO_1090

Zpracování a analýza vzorků probíhala po dobu čtyř dnů a každý den bylo dbáno na to, aby bylo vybráno náhodně dvanáct vzorků z různých skupin. Zpracování vzorků spočívalo ve dvou krocích. Prvním krokem bylo izolace lipidů ze vzorku proteinovou precipitací a druhým krokem byla esterifikace, při které byly MK obsažené ve vzorcích převedeny na methylestery působením methanolátu sodného za vyšší teploty. Postup přípravy vzorků je podrobně popsán v kapitole 2.3.4. Takto připravené vzorky byly následně analyzovány v systému GC-MS při podmínkách popsaných v Tabulce 7 a 8. FAME byly identifikovány porovnáním retenčních časů se standardy a porovnáním hmotnostních spekter se spektry v knihovně NIST. Několik

FAME bylo identifikováno pouze na základě shody spekter se spektry v knihovně NIST, přičemž pravděpodobnost shody těchto spekter byla vyšší než 70 %.

Na Obrázku 26 je na ukázkou chromatogram krevního séra vzorku PCO 993, který pocházel od dárce s rakovinou slinivky. Tabulka s retenčními časy, plochami píků, způsobem identifikace látek a jejich procentuálním zastoupením a je v Příloze 34. V krevní plazmě se vykytovaly různé MK, od nasycených až po polynenasycené. Ve všech vzorcích byly majoritními MK kyselina olejová (C18:1 *cis* Δ^9), linolová (C18:2 *cis* $\Delta^{9,12}$), palmitová (C16:0) a stearová (C18:0). Z *trans* izomerů byla v krevní plazmě přítomná kyselina elaidová (C18:1 *trans* Δ^9). Vyskytovaly se zde i rozvětvené MK jako byla kyselina 14-methyl pentadekanová, 14-methyl hexadekanová a 16-methyl heptadekanová. V malém množství byly v krevní plazmě přítomny různé polynenasycené MK odvozené od kyseliny arachidonové (C20:0) a behenové (C22:0).

Obrázek 26 Chromatogram vzorku PCO 993



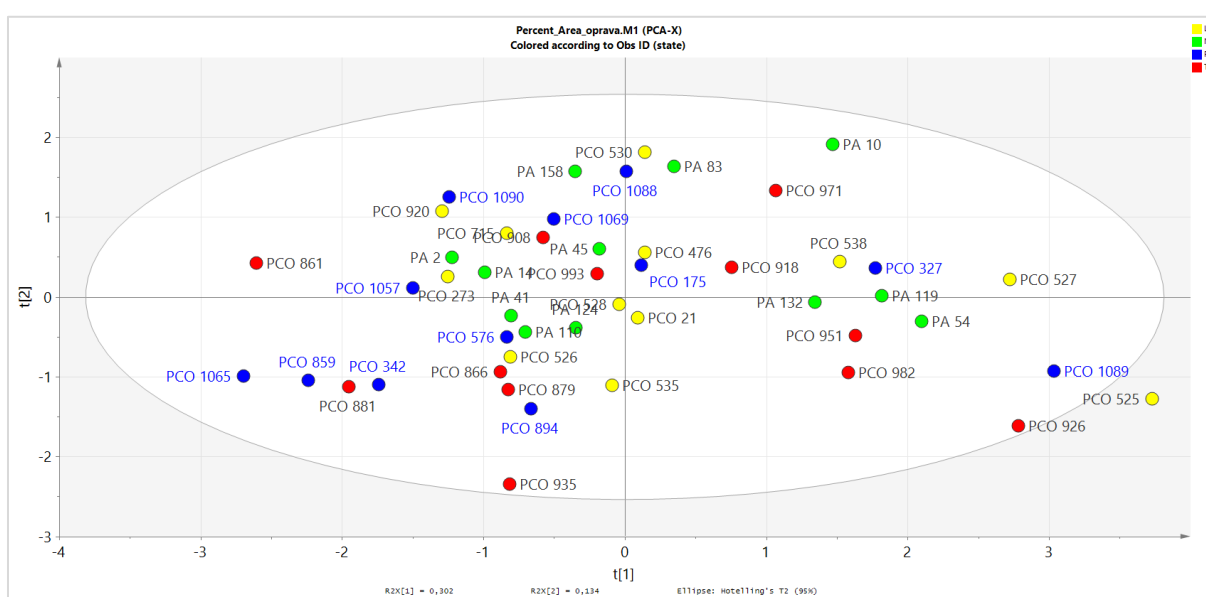
3.4.3 PCA analýza dat MK v krevním séru

Data získaná analýzou vzorků krevního séra, tedy procentuální zastoupení MK v jednotlivých vzorcích, byla statisticky zpracována metodami multivariační statistické analýzy. Cílem bylo prozkoumat strukturu dat, zda jsou u některých skupin pacientů odchylky v zastoupení mastných kyselin a zda je možné tyto odchylky použít k rozlišení vzorků podle zdravotního stavu dárce. Soubor dat obsahoval informace o názvu vzorku, skupině, pohlaví a procentuálním

zastoupení MK. Ještě před výpočtem zastoupení MK byly doplněny prázdné buňky v matici dat plochami píku, který odpovídal 60 % nejmenšího píku v souboru dat.

Prvním krokem analýzy dat bylo využití metody analýzy hlavních komponent (PCA) bez vložení informace o rozdělení do skupin (Obrázek 27). PCA transformuje původní naměřené proměnné do nových nekorelovaných proměnných tzv. hlavních komponent. Kdyby byly rozdíly v zastoupení MK ve skupinách velmi rozdílné, jednotlivé skupiny by se rozdělily do klastrů (skupiny bodů podle zdravotního stavu). Žádný takový trend bohužel nebyl patrný a barevně označené skupiny jsou v PCA poměrně náhodně rozmístěny.

Obrázek 27 Analýza hlavních komponent (PCA) bez informace o rozdělení do skupin



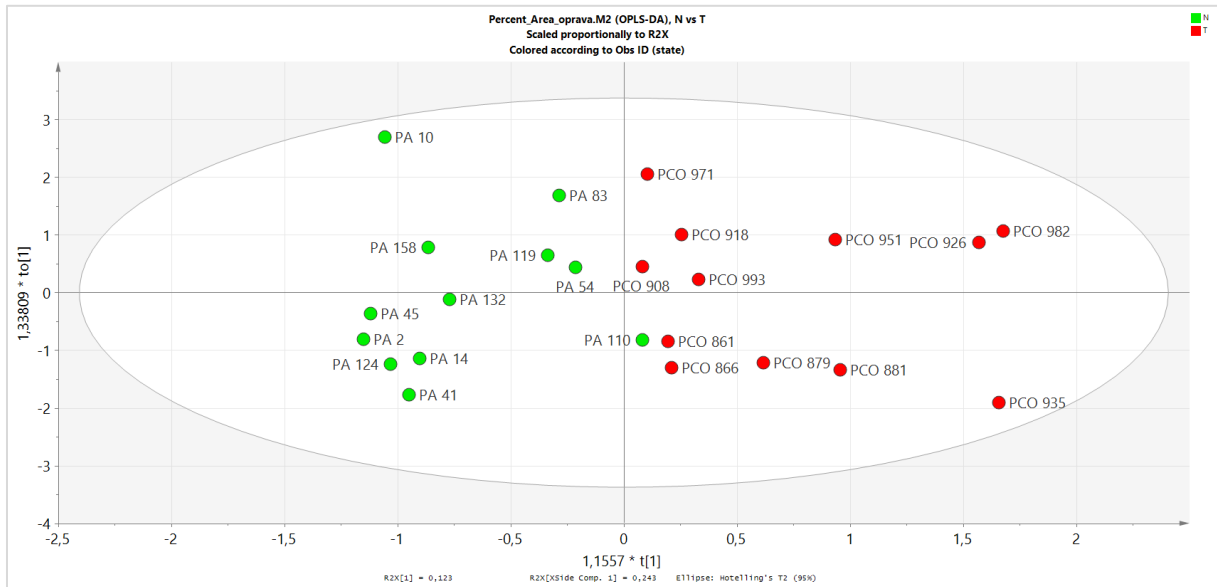
3.4.4 OPLS analýza dat MK v krevním séru

Následně byly zkoumány rozdíly mezi dvěma skupinami pomocí statistického model OPLS-DA, tj. ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců. Tato metoda již s informací o příslušnosti vzorků ke skupinám využívá. Technika OPLS je používána pro popis kvantitativního vztahu mezi hodnotami X (chromatografická data) a Y (kvantitativní hodnoty, např. koncentrace metabolitů). OPLS je možné použít i pro diskriminační analýzu (OPSL-DA), kde matice Y je nahrazena údaji o třídě (např. zdravá vs. nemocná populace) [81].

Tento statistický model (Obrázek 28) měl vzorky krevního séra dělit na vzorky od zdravých (zelené body) a nemocných pacientů (červené body) podle složení MK ve vzorcích. Z obrázku je na první pohled patrné, že vzorky byly poměrně dobře rozlišeny. Nicméně některé vzorky

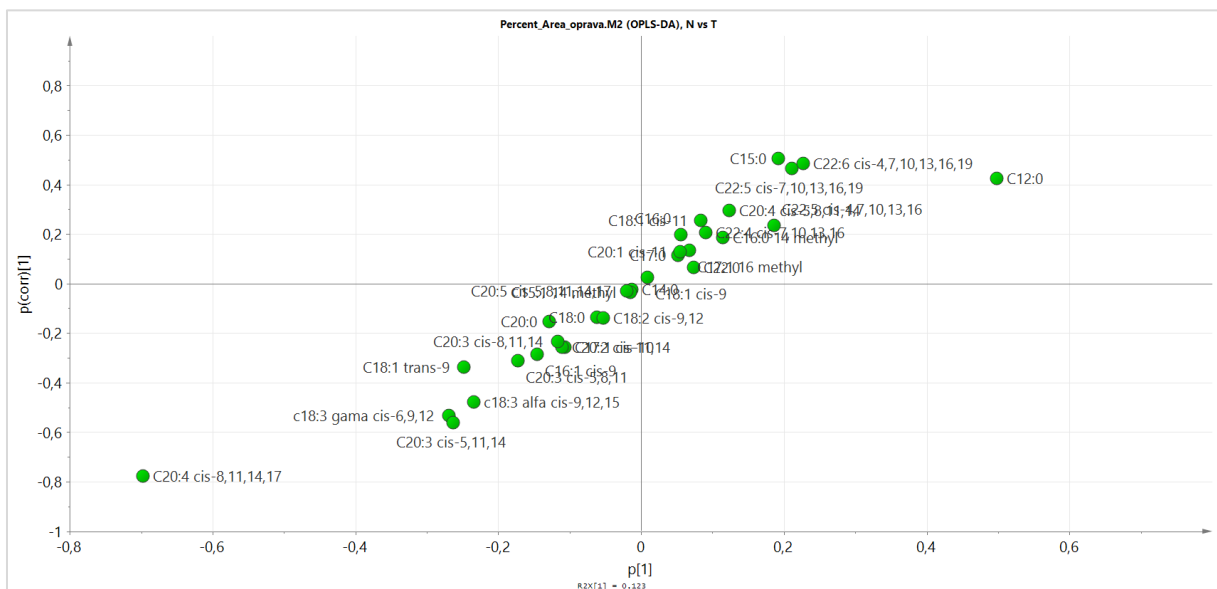
byly blízko nulové ose a jeden vzorek zdravého pacienta spadl do zóny vzorků nemocných pacientů.

Obrázek 28 Rozdělení vzorků zdravých (zelené body) a nemocných dárců (červené body) za použití statistického modelu OPLS-DA



Byl vytvořen i korelační diagram, tzv. S-plot, který sloužil ke zjištění vzájemného vztahu mezi dvěma proměnnými. V tomto případě byl porovnáván obsah jednotlivých MK ve vzorcích od zdravých a nemocných pacientů (Obrázek 29). S-plot byl vytvořen tak, aby odhalil odchylky obsahu MK vzorků nemocných jedinců od vzorků zdravých jedinců.

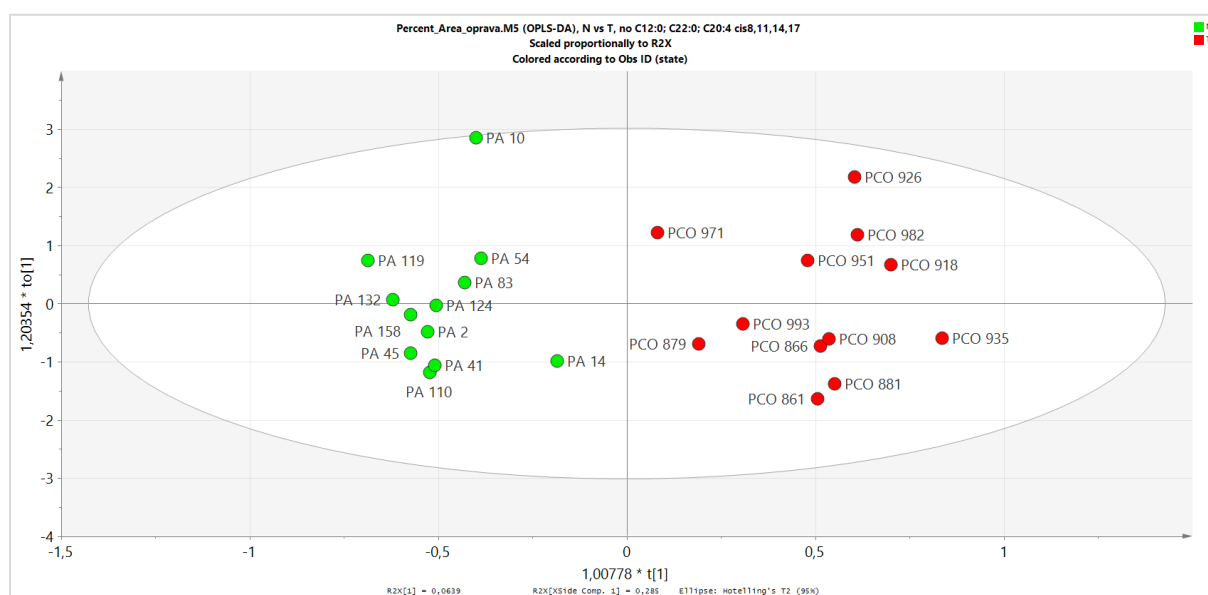
Obrázek 29 Korelační diagram vzorků zdravých a nemocných dárců



MK, které se svým obsahem neodchylovaly jsou na středu os. Čím dál jsou body MK od středu, tím více se jejich obsah ve vzorcích liší. Diagram vykazuje extrémní v nižších i vyšších hodnotách. Vzorky nemocných dárců se od zdravých lišily zvýšeným obsahem kyseliny laurové (C12:0), pentadecylové (C15:0), dokosaheptaenové (C22:6 *cis* $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$), a dokosapentaenové (C22:5 *cis* $\Delta^{4,7,10,13,16}$) a sníženým obsahem především *cis*-8,11,14,17-Ikosatetraenová (C20:4 *cis* $\Delta^{8,11,14,17}$). Látky, které mají zvýšený obsah se označují jako up-regulované, látky s nižším obsahem se označují jako down-regulované.

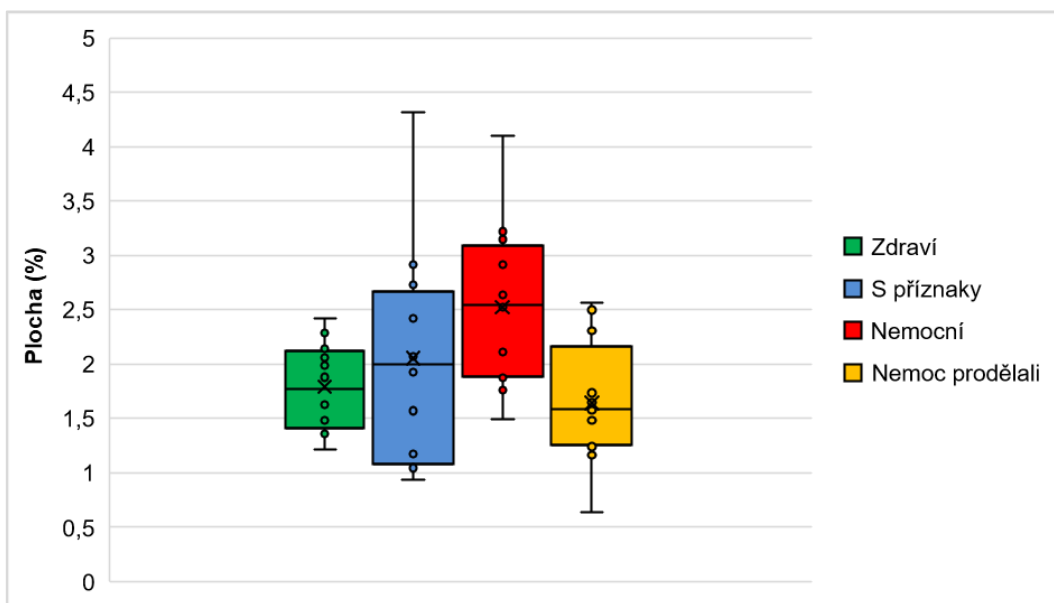
Nicméně pohled do základní matrice dat odhalil, že u řady vzorků nebyly kyseliny laurová (C12:0), behenová (C22:0) a *cis*-8,11,14,17-Ikosatetraenová (C20:4 *cis* $\Delta^{8,11,14,17}$) nalezeny. Počet chybějících dat byl 30, 20 respektive 18 vzorků. Tato chybějící data mohou způsobovat chybu statistických modelů. U ostatních vzorků byl obsah těchto kyselin většinou maximálně na úrovni desetin procent. Z tohoto důvodu byly tyto tři MK z dalších statistických modelů vyloučeny. Z takto upravených dat byl opět vytvořen OPLS-DA diagram (Obrázek 30), ve kterém byly vzorky zdravých a nemocných rozděleny mnohem lépe.

Obrázek 30 Rozdělení vzorků zdravých (zelené body) a nemocných dárců (červené body) za použití statistického modelu OPLS-DA bez C12:0, C22:0 a C20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$



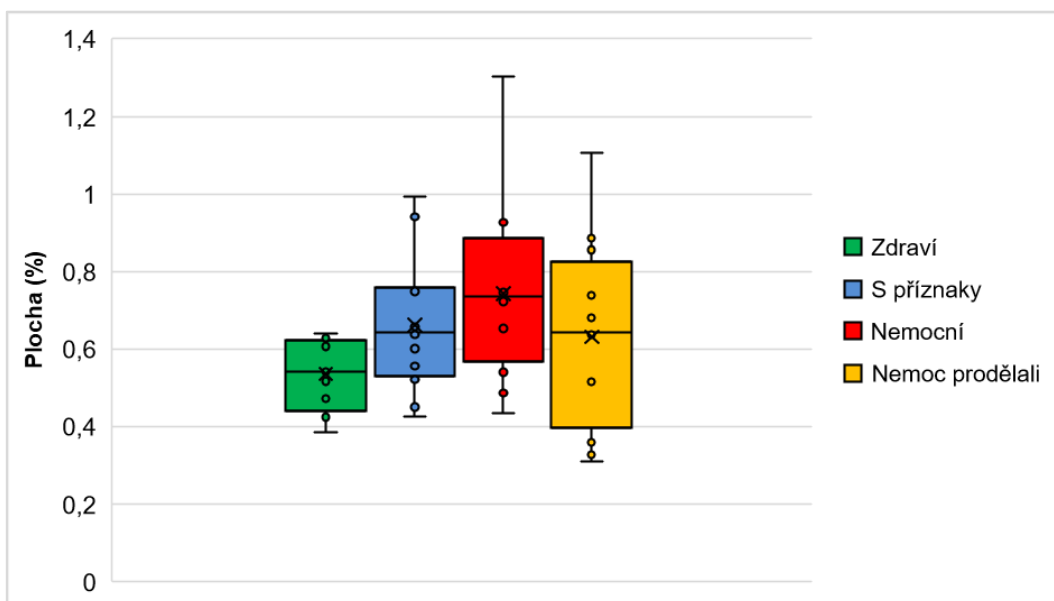
Korelační diagram (Obrázek 31) opět ukazuje na vyšší obsah kyseliny pentadecylové, dokosapentaenové, dokosaheptaenové a na nižší obsah kyseliny α -linolenové (C18:3 *cis* $\Delta^{9,12,15}$) a elaidové (C18:1 *trans* Δ^9).

Obrázek 34 Krabicový graf kyseliny dokosaheptaenové ($C_{22}:6$ *cis* $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$)



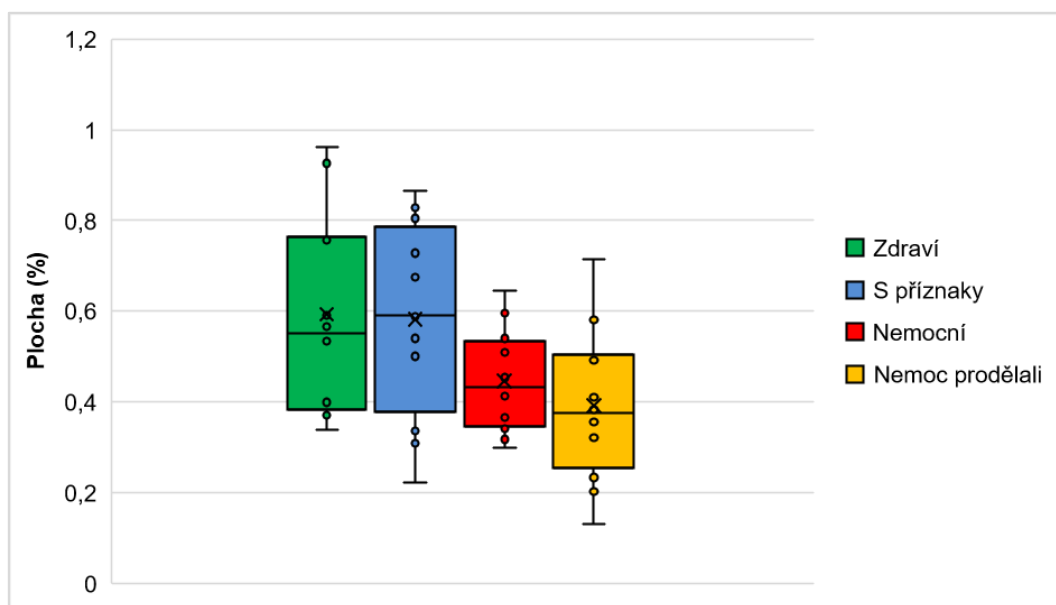
Obdobná situace nastala i u up-regulované kyseliny dokosapentaenové ($C_{22}:5$ *cis* $\Delta^{4,7,10,13,16}$), jak je patrné z Obrázku 35. Medián procentuálního zastoupení této MK je u nemocných jedinců vyšší než u zdravých jedinců, ale rozptyl zastoupení ve vzorcích je opět poměrně velký, na několika místech přesahující horní i dolní kvartil. To znamená, že ačkoliv několik vzorků má procentuální zastoupení této výrazně MK vyšší než zdraví jedinci, i tak se najdou vzorky pacientů, u nichž je obsah této MK v normálu. Rozdíl mediánů procentuálního zastoupení této MK ve zmíněných skupinách vzorků byl 0,2 %.

Obrázek 35 Krabicový graf kyseliny dokosapentaenové ($C_{22}:5$ *cis* $\Delta^{4,7,10,13,16}$)



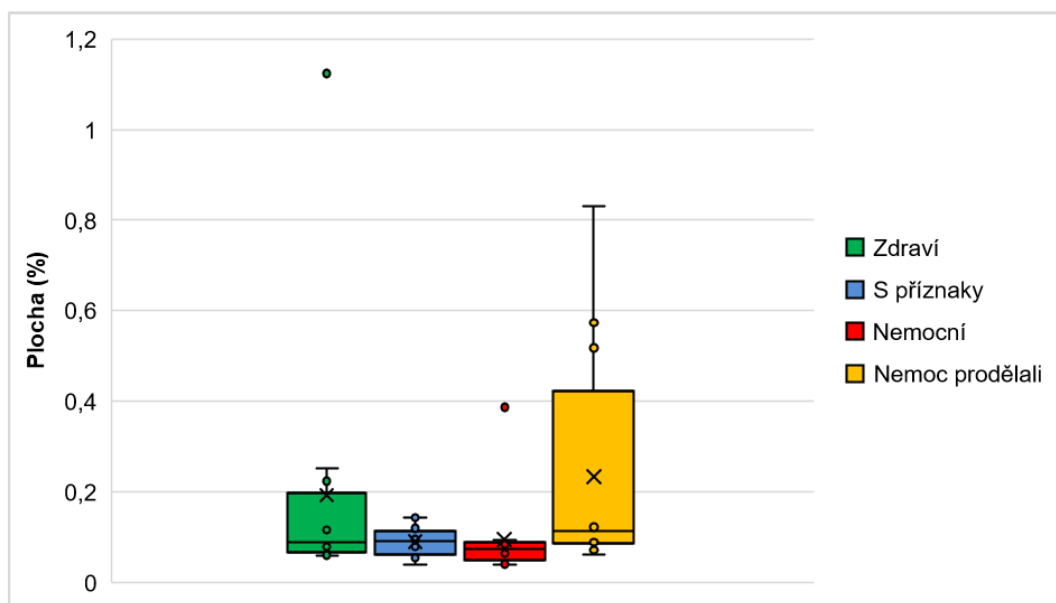
Mezi výrazně down-regulovanými při porovnání zdravých a nemocných byla MK kyselina α -linolenová (C18:3 *cis* $\Delta^{9,12,15}$). Z obrázku je na první pohled patrný poměrně velký rozdíl distribuce jednotlivých skupin vzorků, nicméně rozdíl mediánů a průměru napříč skupinami se pohyboval v řádech desetin procent (Obrázek 36). Rozdíl mediánů vypočtený z procentuálního zastoupení této mastné kyseliny u zdravých a nemocných byl přibližně 0,1 %.

Obrázek 36 Krabicový graf kyseliny α -linolenové (C18:3 *cis* $\Delta^{9,12,15}$)



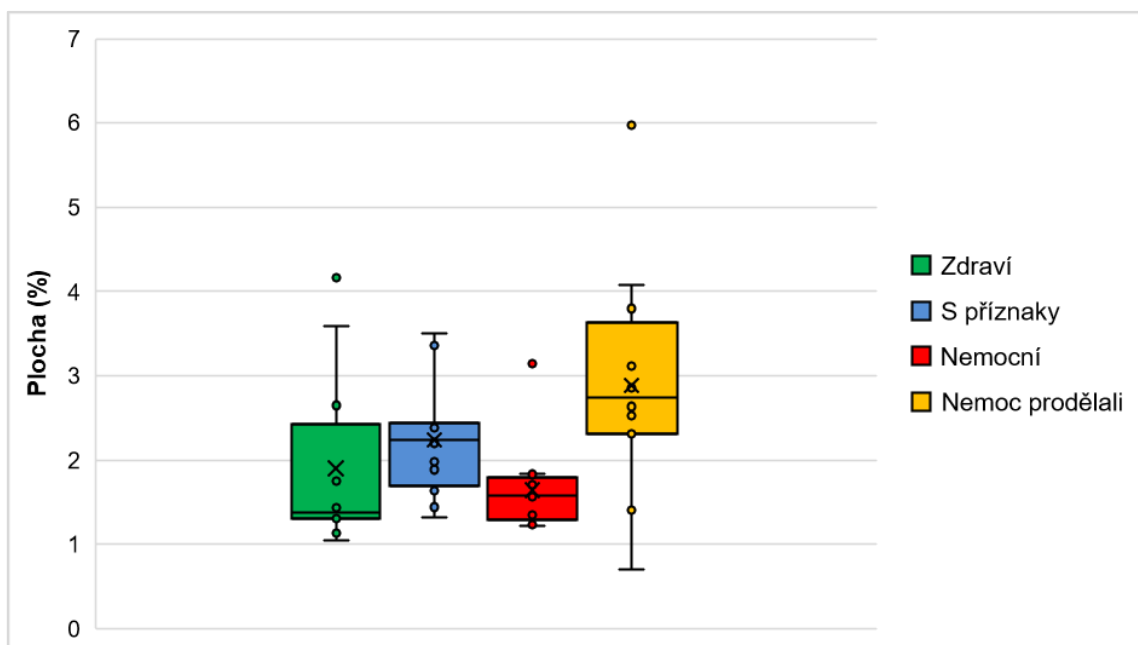
Další down-regulovanou MK byla kyselina elaidová (C18:1 *trans* Δ^9). Jak již vypovídá z Obrázku, její obsah se ve všech vzorcích se pohyboval kolem 0,1 %. U vzorků nemocných jedinců bylo procentuální zastoupení kyseliny elaidové velmi malé, blížíci se nule. U zdravých jedinců byl medián zastoupení této MK jenom o 0,05% vyšší. Z obrázku je rovněž patrný velký rozptyl vzorků dárců, kteří nemoc již prodělali a spolu s tím i to, že obsah této MK se u některých vzorků z této skupiny pohyboval až kolem 0,5 %.

Obrázek 37 Krabicový graf kyseliny elaidové (C18:1 *trans* Δ^9)



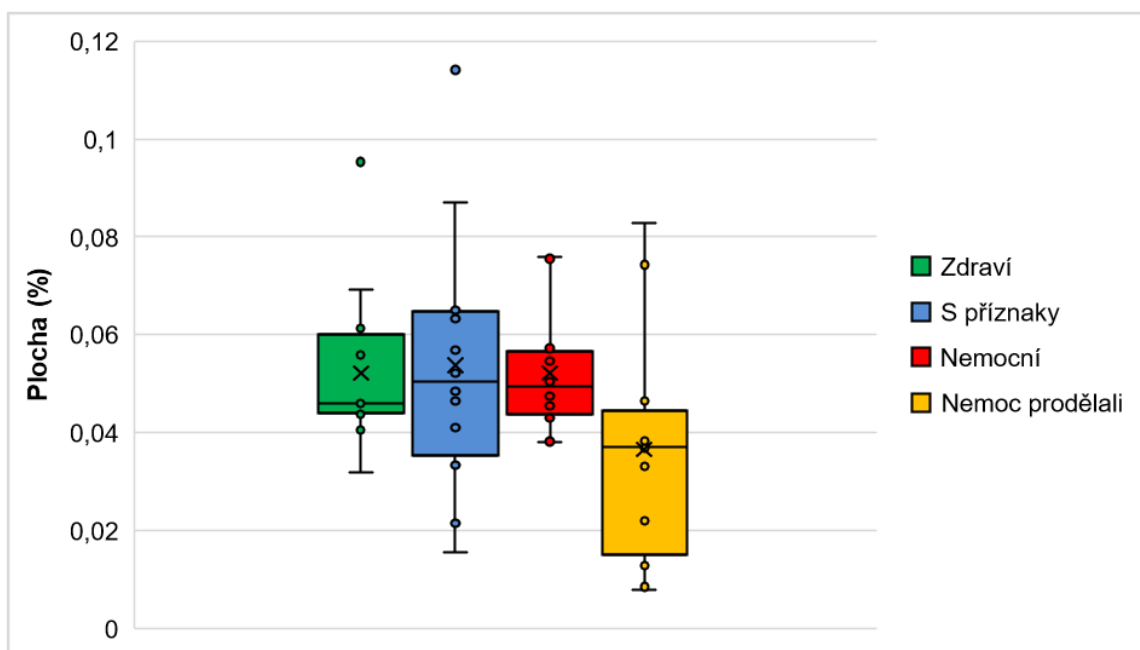
Při porovnání vzorků nemocných a dárců, kteří nemoc již dříve prodělali byla jednou z výrazněji up-regulovaných MK kyselina palmitoolejová (C16:1 *cis* Δ^9). Rozdíl mediánů procentuálního zastoupení této MK u nemocných a přeživších byl poměrně velký, až 1,17 % (viz Obrázek 38).

Obrázek 38 Krabicový graf kyseliny palmitoolejové (C16:1 *cis* Δ^9)



Ve vzorcích přeživších dárců oproti nemocným byla down-regulovaná i rozvětvená MK kyselina 14-methyl pentadekanová (C15:0 14-methyl). Zastoupení této kyseliny bylo ve všech vzorcích velmi nízké, pohybovalo se kolem 0,01 až 0,1 % (Obrázek 39). Rozdíl mediánů a průměru z procentuálního zastoupení této MK ve vzorcích nemocných dárců a dárců, kteří rakovinu již prodělali byl kolem 0,012 %.

Obrázek 39 Krabicový graf kyseliny 14-methyl pentadekanové (C15:0 14-methyl)



Z uvedených informací vyplývá, že při porovnání skupin vzorků zdravých a nemocných mají nemocní oproti zdravým lidem ve složení krevní plazmy několik MK up-regulovaných a několik down-regulovaných. Mezi výrazně up-regulované patřila kyseliny dokosahexaenové a dokosapentaenové, mezi down-regulované patřila kyselina alfa linolenová a kyselina elaidová. Nejmarkantnější rozdíl byl v procentuálním zastoupení kyseliny dokosahexaenové, rozdíl mediánů procentuálního zastoupení zdravých a nemocných činil 0,8 %. Rovněž při porovnání vzorků nemocných a přeživších byly významnější rozdíly v procentuálním zastoupení některých MK. Vzorky krevního séra přeživších oproti nemocným obsahovaly více kyseliny palmitoolejové a méně kyseliny 14-methyl pentadekanové. Rozdíl mediánů procentuálního zastoupení kyseliny palmitoolejové byl až 1,17%.

Na základě těchto poznatků lze vyslovit hypotézu, že by se mohlo složení krevního séra lišit na základě zdravotního stavu dárců. Pro potvrzení konkrétní hypotézy by bylo potřeba provést další experimenty na mnohem větším množství vzorků.

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat GC-MS metodu pro stanovení izomerních mastných kyselin, metoda byla rovněž částečně validována. Optimalizovaná a validovaná metoda byla následně aplikována na vybrané vzorky rostlinných olejů a vzorky krevního séra.

Optimalizace metody probíhala v několika krocích. Nejprve bylo nutné zjistit optimální parametry GC systému, aby bylo možné separovat větší množství mastných kyselin s dostatečným rozlišením signálů a v přijatelné čase. Při optimalizaci těchto parametrů byla použita kolona TR FAME, nosným plynem bylo helium a dávkování bylo prováděno metodou splitu. Pro zjištění ideálních podmínek separace byla proměřována směs standardů *cis* a *trans* izomerů C18:1 a směs standardů 37 methylesterů MK, která obsahovala i množství *cis* a *trans* izomerů nenasycených MK. Byla provedena optimalizace teplotního gradientu GC, při které byl jako nejvhodnější vybrán teplotní program s gradientem teploty od 80 do 235 °C a celkovým časem separace 36 min při průtoku 1,5 ml/min.

Byla tedy provedena částečná validace, při které byla zjištěna opakovatelnost a mezilehlá přesnost metody. Validace zahrnovala zpracování vzorku, esterifikaci tak vlastní GC-MS analýzu. Validací bylo zjištěno, že opakovatelnost i mezilehlá přesnost metody vychází nejlépe, pokud jsou vypočteny z procentuálního zastoupení MK ve vzorcích. RSD v rámci jednoho dne i více dní vypočtené z procentuálního zastoupení majoritních MK ve vzorku vycházela cca do 5 %, u minoritních MK do cca 14 %. Tyto odchylky byly přijatelné z hlediska složitosti přípravy vzorků a následné analýzy.

Pro analýzu bylo vybráno devět vzorků rostlinných olejů (rakytníkový, lněný, kokosový, slunečnicový, řepkový, lničkový a tři druhy olivových olejů) a čtyřicet osm vzorků krevních sér, rozdělených do čtyř skupin, podle zdravotního stavu dárců (zdraví, s příznaky, nemocní, nemoc pordělali). MK obsažené ve vzorcích byly převedeny na methylestery esterifikací, za působení methanolátu sodného při zvýšené teplotě.

Lipidy krevního séra bylo nutné ještě před samotnou esterifikací izolovat ze vzorku, přičemž způsob zpracování vzorků byl rovněž optimalizován. Lipidy je možné ze vzorku extrahovat Folchovou metodou či proteinovou precipitací. Porovnáním obou těchto metod byla nakonec zvolena proteinová precipitace z důvodu nižší spotřeby chemikálií a menší časové náročnosti.

Dále bylo třeba optimalizovat dávkování vzorků, aby bylo možné píky látek integrovat a spolehlivě identifikovat. Pro vzorky olejů byl ideální objem dávkovaného vzorku 1,5 µl

a splitovací poměr 10:1, pro vzorky krevního séra byla optimální kombinace dávkování 4 μ l a splitu 15:1.

Vzorky olejů měly různé složení. Ve vzorku rakytníkového a slunečnicového oleje převažovala kyselina linolová, ve vzorku lněného oleje α -linolenová, v kokosovém oleji undekanová a ve vzorcích olivových olejů a řepkového oleje převažovala kyselina olejová. V olejích se obecně vyskytovaly nasycené MK s krátkým i dlouhým řetězcem a nenasycené mastné kyseliny v konformaci *cis*. *Trans* izomery nebyly přítomny až na malé množství kyseliny elaidové ve vzorku oleje vyrobeného z pokrutin. Většina analyzovaných vzorků obsahovala převážně nenasycené MK až na kokosový olej, ve kterém nasycené MK převažují až o 90 % nad nenasycenými. Kokosový olej je díky svému složení, velmi vhodný pro smažení, protože s nadbytkem nasycených MK má vysokou oxidační stabilitu. Ke smažení je rovněž vhodný slunečnicový olej se zvýšeným obsahem kyseliny olejové.

ω 3 a ω 6 MK by měly být konzumovány v poměru 1:1 až 1:4 [76, 77]. Doporučenému poměru nejlépe vyhovoval řepkový a lníčkový olej. Pravidelná konzumace těchto olejů obsahující ω 3 a ω 6 ve správném poměru tedy může být z výživového hlediska prospěšná. ω 9 MK se vyskytovaly v každém vzorku. Ačkoli ω 9 MK nejsou esenciální, mají pozitivní účinky na organismus, které mohou sloužit jako prevence různých zdravotních problémů.

Analýzou vzorků krevního séra bylo zjištěno, že ve složení měly většinové zastoupení kyselina olejová, linolová, palmitová a stearová *Z trans* izomerů byla v krevní plazmě přítomná kyselina elaidová. Vyskytovaly se zde i rozvětvené MK jako byla kyselina 14-methyl pentadekanová, 14-methyl hexadekanová a 16-methyl heptadekanová.

Statistickou analýzou dat vzorků krevního séra bylo zjištěno, že při porovnání skupin vzorků zdravých a nemocných mají nemocní oproti zdravým lidem vyšší obsah kyseliny dokosaheptaenové a dokosapentaenové a nižší obsah kyseliny α -linolenové a elaidové. Nejvýznamější rozdíl byl v obsahu kyseliny dokosaheptaenové, rozdíl mediánů a průměrů procentuálního zastoupení zdravých a nemocných byl přibližně 0,8 %. Vzorky krevního séra přeživších oproti nemocným měly ve složení vyšší obsah kyseliny palmitoolejové a nižší obsah kyseliny 14-methyl pentadekanové. Rozdíl mediánů procentuálního zastoupení kyseliny palmitoolejové byl až 1,17. %.

Z uvedených informací vyplývá, že by se hypoteticky mohlo složení krevní plazmy lišit na základě zdravotního stavu dárců obsahem některých MK. Pro potvrzení konkrétní hypotézy by bylo potřeba provést další experimenty na mnohem větším množství vzorků.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Matouš B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha, Galén, 2010. ISBN: 9788072627028.
- [2] Gunstone F. A. a F. A. Norris. *Lipids in Foods: Chemistry, Biochemistry and Technology*. Přpracované vydání, USA, Pergamon Press, 2013. ISBN: 9781483148847.
- [3] Mathews Ch. K., Halde K. E, Ahern K. G., *Biochemistry*. 3. vydání, USA, Pearson Education, 1999. ISBN: 99-043683.
- [4] Voet D., Voet J. G., Pratt Ch. W., *Fundamentals of Biochemistry: life at the molecular level*. 2. vydání, USA, Willey, 2006. ISBN: 0-471-21495-7.
- [5] Murray R. K. *Harperova biochemie*. 4. vydání. Jinočany, H & H, 2002. ISBN: 8073190133.
- [6] Odstrčil J. *Biochemie*. Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN: 807013190X.
- [7] Vodrážka Z. *Biochemie*. 2. vydání. Praha, VŠCHT, 1990. ISBN: 807080081X.
- [8] Koolman J. a K. H. Rohm. *Barevný atlas biochemie*. Praha, Grada, 2012. ISBN: 9788024729770.
- [9] Mendelu. *Biochemie – přednášky: Jednoduché lipidy*. Brno, Mendelova univerzita, 2021, citováno 31.10.2022. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1529&typ=html.
- [10] E-chembook. *Biochemie: Lipidy*. Multimediální učebnice chemie. Citováno 31.10.2022. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/cz/biochemie/Lipidy.pdf>
- [11] Libre Texts – Chemistry. *Phospholipids*. USA, 2022, citováno 4.11.2022. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry/Introductory_Chemistry_\(CK-12\)/26%3A_Biochemistry/26.09%3A_Phospholipids](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry/Introductory_Chemistry_(CK-12)/26%3A_Biochemistry/26.09%3A_Phospholipids).
- [12] Kubáň P. *Analýza potravin*. Brno, Mendelova Univerzita, 2007. ISBN: 9788073750367.
- [13] Kareinen I. *Mast Cells and HDL – Studies on Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport*. Disertační práce. Helsinská univerzita 2015, citováno 4.11.2022. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/282356824>.
- [14] Dršata J. a V. Boušová. *Metabolismus lipoproteinů, dyslipoproteinemie*. Univerzita Hradec Králové, Farmaceutická fakulta, 2022.
- [15] Grofová Z.. *Mastné kyseliny*. Medicína pro praxi. 2010, **7**(10), 388–390.
- [16] Seppanen-Laakso T. a R. Hiltunen. *Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition*. Analytica Chimica acta. 2002, 465 (1-2), 39 –62. DOI:10.1016/S0003-2670(02)00397-5.

- [17] Tiuca I., K. Nagy a R. Oprean. *Recent developments in fatty acids profile determination in biological samples – a review*. Revista Română de Medicină de Laborator. 2015, 23(4), 371–383. DOI:10.1515/rrlm-2015-0035.
- [18] Wilhelm Z. *Mastné kyseliny ω -3; od teorie po klinickou praxi*. Medicína pro praxi. 2013, 10(2), 72–76.
- [19] Velíšek J. *Chemie potravin*. 2. vydání. Tábor, OSSIS, 2002. ISBN:8086659038.
- [20] Muchová L. *Metabolismus a biochemie trávení lipidů*. Univerzita Karlova, 2022, citováno 6.11.2022. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/3651/metabolismus-a-biochemie-traveni-lipidu.pdf>.
- [21] Saini R. K. a Y. S. Keum. *Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance – A review*. Life Sciences. 2018, 203, 255–267. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.04.049.
- [22] Oteng A. a K. Sander. *Mechanisms of Action of trans Fatty Acids*. *Advances in Nutrition*. 2019, 11(13), 1–12. DOI: 10.1093/advances/nmz125.
- [23] Gebauer S. K., T. L. Psota a P. M. Kris-Etherton. *The Diversity of Health Effects of Individual trans Fatty Acid Isomers*. *Lipids*. 2007, 42, 787–799. DOI: 10.1007/s11745-007-3095-8.
- [24] Maulucci G, O. Cohen, B. Daniel, A. Sansone, P. Petropoulou, S. Filou, A Spyridonidis, G. Pani, M. De Spirito, C. Chatgililoglu, C. Ferreri, K. E Kypreos, S. Sasson. *Fatty acid-related modulations of membrane fluidity in cells: detection and implications*. *Free Radical Research*. 2016, 50(1), 40–50. DOI:10.1080/10715762.2016.1231403.
- [25] Juanéda P., L. Martial a J. L. Sébédio. *Analytical methods for determination of trans fatty acid content in food*. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2007, 109(9), 901–917. DOI:10.1002/ejlt.200600277.
- [26] Arab L. a J. Akbar. *Biomarkers and the measurement of fatty acids*. *Public Health Nutrition*. 2006, 5(6), 865–871. DOI: 10.1079/PHN2002391.
- [27] Zhang H., Z. Wang a O. Liu. *Development and validation of a GC–FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2015, 5(4), 223–230. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.01.005.
- [28] Tariq M., S. Ali, F. Ahmad, M. Ahmad, M. Zafar, N. Khalid a M. A. Khan. *Identification, FT-IR, NMR (1H and 13C) and GC/MS studies of fatty acid methyl esters in biodiesel from rocket seed oil*. *Fuel Processing Technology*. 2011, 92(3), 336–341. DOI: 10.1016/j.fuproc.2010.09.025.
- [29] Collomb M., U. Butikofer, R. Sieber, B. Jeangros a J. O. Bosset. *Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography*. *International Dairy Journal*. 2002, 12(8), 649–659. DOI:10.1016/S0958-6946(02)00061-4.

- [30] Eder K. *Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1995, 671(1–2) 113–131. DOI:10.1016/0378-4347(95)00142.
- [31] Dobrowolska-Ivanek J., R. Lauterbach, H. Huras, P. Pasko, E. Prochownik, M. Wozniakewicz, S. Chrzaszcz a P. Zagrodzki. *HPLC-DAD method for the quantitative determination of short-chain fatty acids in meconium samples*. Microchemical Journal. 2020, 155, 1–7. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104671.
- [32] De Baere S., V. Eeckhaut, M. Steppe, C. De Maesschalck, P. De Backer, F. Van Immerseel a S. Croubels. *Development of a HPLC–UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2013, 80, 107–115. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.02.032.
- [33] Recknagel R. a E. Glende. *Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes*. Methods in Enzymology. 1984, 105, 331–337. DOI:10.1016/S0076-6879(84)05043-6.
- [34] Marmesat S., A. Morales, J. Velasco, M. V. Ruiz-Mendez a M.C. Dobarganes. *Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation*. Grasas y Aceites. 2009, 60(2), 155–160. DOI: 10.3989/gya.096908.
- [35] Mossoba M. M., V. Milosevic, M. Milosevic, J. K. G. Kramer a H. Azizian. *Determination of total trans fats and oils by infrared spectroscopy for regulatory compliance*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2007, 389, 87–92. DOI: 10.1007/s00216-007-1262-7.
- [36] Azizian H. a J. K. G. Kramer. *A Rapid Method for the Quantification of Fatty Acids in Fats and Oils with Emphasis on trans Fatty Acids Using Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy (FT-NIR)*. Lipids. 2005, 40(8), 855–867. DOI: 10.1007/s11745-005-1448-3.
- [37] Di Pietro M. E., A. Mannu a A. Mele. *NMR Determination of Free Fatty Acids in Vegetable Oils*. Processes. 2020, 8(4), 1–15. DOI: 10.3390/pr8040410.
- [38] Knothe G. a J. A. Kenar. *Determination of the fatty acid profile by ¹H-NMR spectroscopy*. European Journal of Lipid Science and Technology. 2004, 106, 88–96. DOI: 10.1002/ejlt.200300880.
- [39] Hewavitharana G. G., Dilini N. Perera, S.B. Navaratne a I. Wickramasighe. *Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review*. Arabian Journal of Chemistry. 2020, 13(8), str. 6865–6875. DOI: 10.1016/j.arabjc.2020.06.039.
- [40] McNichol J., K. M. Macdougall, J. E. Melanson a P. J. McGinn. *Suitability of Soxhlet Extraction to Quantify Microalgal Fatty Acids as Determined by Comparison with In Situ Transesterification*. Lipids. 2012, 47, 195–207. DOI: 10.1007/s11745-011-3624-3.

- [41] Horák T., J. Čulík, P. Čejka, M. Jurková, V. Kellner, J. Dvořák a D. Hašková. *Analysis of Free Fatty Acids in Beer: Comparison of Solid-Phase Extraction, Solid-Phase Microextraction, and Stir Bar Sorptive Extraction*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009, 57(23), 11081–11085. DOI:10.1021/jf9028305.
- [42] Rincon Arturo A., V. Pino, J. H. Ayala a A. M. Afonso. *Multiple headspace solid-phase microextraction for quantifying volatile free fatty acids in cheeses*. Talanta. 2014, 129 (1), 183–190. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.05.032.
- [43] Nikolova-Damyanova B., W. W. Christie a B. Herslof. *Mechanistic aspects of fatty acid retention in silver ion chromatography*. Journal of Chromatography A. 1996, 749(1-2), 47–54. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00365-2.
- [44] Dobson G., W. W. Christie a B. Nikolova-Damyanova. *Silver ion chromatography of lipids and fatty acids*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1995, 671(1–2), 197–222. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00157-E.
- [45] Klouda P. *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN: 80-863-6907-2.
- [46] Satyarthi J. K., D. Srinivas a P. Ratsanamy. *Estimation of Free Fatty Acid Content in Oils, Fats, and Biodiesel by 1H NMR Spectroscopy*. American Chemical Society. 2009, 23, 2273–2277. DOI: 10.1021/ef801011v.
- [47] Momchilova S. M. a B. Nikolova-Damyanova. *Advances in silver ion chromatography for the analysis of fatty acids and triacylglycerols-2001 to 2011*. Analytical Sciences. 2012, 28, 837–844. DOI: 10.2116/analsci.28.837.
- [48] Senoráns F.J. a E. Ibanez. *Analysis of fatty acids in foods by supercritical fluid chromatography*. Analytica Chimica Acta. 2002, 465(1-2), 131–144. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00208-8.
- [49] Bernal J. L., M. T. Martín a L. Toribio. *Supercritical fluid chromatography in food analysis*. Journal of Chromatography A. 2013, 1313, 24–36. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.07.022.
- [50] Francois I. a P. Sandra. *Comprehensive supercritical fluid chromatography reversed phase liquid chromatography for the analysis of the fatty acids in fish oil*. Journal of Chromatography A. 2009, 1216(18), 4005–4012. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.02.078.
- [51] Labreur L., M. Ollero a D. Touboul. *Lipidomics by Supercritical Fluid Chromatography*. International Journal of Molecular Sciences. 2015, 16(6), 13869–13884. DOI: 10.3390/ijms160613868.
- [52] Santos, F.J. a M.T. Galceran. *Modern developments in gas chromatography–mass spectrometry-based environmental analysis*. Journal of Chromatography A. 2003, 1000 (1–2), 125–151. DOI:10.1016/S0003-2670(02)00098-3.
- [53] Bartle K. D. a P. Myers. *History of gas chromatography*. Trends in Analytical Chemistry. 2002, 21(1-2), 547–557. DOI:10.1016/S0165-9936(02)00806-3.

- [54] Rahman M., A. M. Abd El-Aty, J. H. Choi, H. Ch. Shin, S. Chul Shin a J. H. Shim. *Basic Overview on Gas Chromatography Columns*. Analytical Separation Science. 5. vydání. USA: John Wiley, 2015. ISBN: 978352733374.
- [55] Ackman R. *The gas chromatograph in practical analyses of common and uncommon fatty acids for the 21st century*. Analytica Chimica Acta. 2002, 465(1–2), 175–192. DOI:10.1016/S0003-2670(02)00098-3.
- [56] Grob R. L. a E. F. Barry. *Modern Practice of Gas Chromatography*. 4. vydání. John Wiley, 2004. ISBN: 9780471651154.
- [57] Stasenko E. a J. R. Martínez. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. GUO, Xinghua. Advances in Gas Chromatography. 2014. ISBN: 978-953-51-1227-3.
- [58] Fabbri D., G. Chiavari a S. Prati. *Effect of pigments on the analysis of fatty acids in siccative oils by pyrolysis methylation and silylation*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. 2005, 74 (1–2), 39–44 DOI: 10.1016/j.jaap.2004.11.013.
- [59] Dong M. W. *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken, USA: John Wiley, 2006. ISBN: 978-0471727897.
- [60] Brondz I. *Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques*. Analytica Chimica Acta. 2002, 465, 1–37. DOI:10.1016/S0003-2670(01)01467-2.
- [61] Takahashi K., S. Kinugasa, M. Senda, K. Kimizuka, K. Fukushima, T. Matsumoto, Y. Shibata a J. Christensen. *Quantitative comparison of a corona-charged aerosol detector and an evaporative light-scattering detector for the analysis of a synthetic polymer by supercritical fluid chromatography*. Journal of Chromatography A. 2008, 1193(1–2), 151–155 DOI: 10.1016/j.chroma.2008.04.012.
- [62] Magnusson L. E., D. S. Risley a J. A. Koropchak. *Aerosol-based detectors for liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. 2015, 1421(20), 68–81. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.07.045.
- [63] Clifford R. M., Y. Bao, N. J. Benz, S. Zhang. *Comparison of the sensitivity of evaporative universal detectors and LC/MS in the HILIC and the reversed-phase HPLC modes*. Journal of Chromatography B. 2009, 877(32), 4133–4139. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.10.027.
- [64] Zhang B., X. Li a B. Yan. *Advances in HPLC detection—towards universal detection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2008, 390, 299–301. DOI: 10.1007/s00216-007-1633-0.
- [65] Yang K. a X. Han. *Lipidomics: Techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences*. Trends in Biochemical Sciences. 2016, 41(11), 1–26. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.08.010.

- [66] Holčapek M., G. Liebisch a K. Ekroos. *Lipidomic Analysis*. Analytical Chemistry. 2018, 90, 4249–4257. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b05395.
- [67] Triebel A., J. Hartler, M. Trotsmuller a H. C. Kofeler. *Lipidomics: Prospects from a technological perspective*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2017, 1862(8), 740–746. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2017.03.004.
- [68] Zullig T. a H. C. Kofeler. *High resolution mass spectrometry in lipidomics*. *Mass Spectrometry Reviews*. 2023, 42(2), 162–176. DOI: 10.1002/mas.21627.
- [69] Kofeler H. C., A. Fauland, G. N. Rechneberg a M. Trotsmuller. *Mass Spectrometry Based Lipidomics: An Overview of Technological Platforms*. *Lipidomics*. 2012, 2(1), 19–38. DOI: 10.3390/metabo2010019.
- [70] Zullig T., M. Trotsmuller a H. C. Kofeler. *Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2020, 412, 2191–2209. DOI: 10.1007/s00216-019-02241-y.
- [71] Holman B. W. B., K. L. Bailes, R. G. Meyer a D. L. Hopkins. *Effect of modified Soxhlet (Soxtec) and Folch extraction method selection on the total lipid determination of aged beef*. *Journal of Food Science and Technology*. 2019, 56, 3957–3961. DOI: 10.1007/s13197-019-03878-4.
- [72] Manirakiza P., A. Covaci a P. Schepens. *Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2001, 14, 93–100. DOI: 10.1006/jfca.2000.0972.
- [73] Kamenická Michaela. *Analyzá mastných kyselin a tokoferolů v olejích pomocí GC – MS*. Pardubice, 2020. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [74] Takeoka G. R., G. H. Full a L. T. Dao. *Effect of Heating on the Characteristics and Chemical Composition of Selected Frying Oils and Fats*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, 45, 3244–3249. Dostupné z: doi:10.1021/jf970111q
- [75] Aladedunye F. a Roman Przybylski. *Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content*. *Food Chemistry*. 2013, 141(3), 2373–2378. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.061
- [76] Maliszewska K., E. Adamska-Patrano, K. Miniewska, W. Bauer, M. Mojsak a A. Kretowski. *PET/MRI-evaluated brown adipose tissue activity may be related to dietary MUFA and omega-6 fatty acids intake*. *Scientific Reports*. 2022, 4112(12), 1–12. DOI: 10.1038/s41598-022-08125-z
- [77] A.K. Patel, A. S. Chauhan, P. Kumar, et al. *Emerging prospects of microbial production of omega fatty acids: Recent updates*. *Bioresource Technology*. 2022, 360, 1–13. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127534

- [78] Farag M. A. a M. Z. Gad. *Omega-9 fatty acids: potential roles in inflammation and cancer management*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2022, 48, 1–11. DOI: 10.1186/s43141-022-00329-0
- [79] Folch J., M. Lees a G.H. Sloane-Stanley. *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. Journal of Biological Chemistry. 1957, 226(1), 497–509.
- [80] Blanchard J. *Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1981, 226(2), 455–460.
- [81] Hrbek V. J., J. Ovesná, K. Demnerová a J. Hajšlová. *Laboratorní přístroje a postupy*. Chemické listy. 2014, 108, 875–881.

6 PŘÍLOHY

Příloha 1 Složení 37 Component FAME mix a koncentrace jednotlivých methylesterů.....	87
Příloha 2 Vzorky olejů, jejich výrobci, země původu a data expirace.....	88
Příloha 3 Pořadí píků, retenční časy a odezvové faktory proměřených standardů MK.....	89
Příloha 4 Plochy píků, průměrné plochy píků, SD a RSD majoritních MK v testovacím vzorku při opakovaném měření.....	90
Příloha 5 Poměry ploch píků majoritních MK vztažené na plochu IS, jejich průměry, SD a RSD vypočtené z při opakovaném měření v testovacím vzorku.....	91
Příloha 6 Procentuálního zastoupení majoritních MK v testovacím vzorku, jejich průměry, SD a RSD vypočtené z při opakovaném měření.....	92
Příloha 7 Hodnoty průměrů, SD a RSD vypočtené z ploch píků minoritních MK v testovacím vzorku při opakovaném měření.....	93
Příloha 8 Hodnoty průměrů, SD a RSD vypočtené z ploch píků minoritních MK vztažené na IS při opakovaném měření.....	94
Příloha 9 Hodnoty průměrů, SD a RSD vypočtené z procentuálního zastoupení minoritních MK v testovacím vzorku při opakovaném měření.....	95
Příloha 10 Průměry a SD vypočtené z ploch píků minoritních MK ve vzorku (3 dny, 3 opakování).....	96
Příloha 11 RSD vypočtené z ploch píků minoritních MK ve vzorku (n=9, 3 dny, 3 opakování).....	96
Příloha 12 Průměry a SD vypočtené z ploch píků minoritních MK přepočítaných k IS (3 dny, 3 opakování).....	97
Příloha 13 RSD vypočtené z ploch píků minoritních MK přepočítaných K IS (n=9, 3 dny, 3 opakování).....	97
Příloha 14 Průměry a SD vypočtené z procentuálního zastoupení minoritních MK (3 dny, 3 opakování).....	98
Příloha 15 RSD vypočtené z procentuálního zastoupení píků minoritních MK ve vzorku (n=9, 3 dny, 3 opakování).....	98
Příloha 16 Chromatogram lněného oleje.....	99
Příloha 17 Chromatogram kokosového oleje.....	99
Příloha 18 Chromatogram řepkového oleje.....	100
Příloha 19 Chromatogram olivového oleje z pokrutin.....	100
Příloha 20 Chromatogram panenského olivového oleje.....	101

Příloha 21 Chromatogram panenského olivového oleje v bio kvalitě	101
Příloha 22 Chromatogram slunečnicového oleje	102
Příloha 23 Chromatogram oleje ze lničky seté.....	102
Příloha 24 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK rakytníkového oleje (O1)	103
Příloha 25 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK lněného oleje (O2) ...	103
Příloha 26 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK kokosového oleje (O3)	103
Příloha 27 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK řepkového oleje (O4)	104
Příloha 28 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK olivového oleje z pokrutin (O5)	104
Příloha 29 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK panenského olivového oleje (O6).....	105
Příloha 30 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK panenského olivového oleje v bio kvalitě (O7).....	105
Příloha 31 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK slunečnicového oleje (O8)	106
Příloha 32 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK oleje lničky seté (O9)	106
Příloha 33 Chromatogramy krevního séra upravené Folchovou extrakcí (A) a proteinovou precipitací (B).....	107
Příloha 34 Pořadí píků, retenční časy a procentuální zastoupení MK ve vzorku krevního séra s označením PCO 993.....	108

Příloha 1 Složení 37 Component FAME mix a koncentrace jednotlivých methylesterů

Methylester mastné kyseliny	Vzorec	Koncentrace [μl/ml]
Máselná	C4:0	400
Kapronová	C6:0	400
Kaprylová	C8:0	400
Kaprinová	C10:0	400
Undekanová	C11:0	200
Laurová	C12:0	400
Tridecylová	C13:0	200
Myristová	C14:0	400
Myristoolejová	C14:1	200
Pentadecylová	C15:0	200
<i>Cis</i> -10 pentadecylová	C15:1 <i>cis</i> Δ ¹⁰	200
Palmitová	C16:0	600
Palmitoolejová	C16:1 <i>cis</i> Δ ⁹	200
Heptadecylová	C17:0	200
<i>Cis</i> -10 heptadecylová	C17:1 <i>cis</i> Δ ¹⁰	200
Stearová	C18:0	400
Elaidová	C18:1 <i>trans</i> Δ ⁹	200
Olejová	C18:1 <i>cis</i> Δ ⁹	400
Linoelaidová	C18:2 <i>trans</i> Δ ^{9,12}	200
Linolová	C18:2 <i>cis</i> Δ ^{9,12}	200
γ-Linolenová	C18:3 <i>cis</i> Δ ^{6,9,12}	200
α-Linolenová	C18:3 <i>cis</i> Δ ^{9,12,15}	200
Arachidonová	C20:0	400
<i>Cis</i> -11-Ikosanová	C20:1 <i>cis</i> Δ ¹¹	200
Heneikosanová	C21:0	200
<i>Cis</i> -11,14-Ikosadienová	C20:2 <i>cis</i> Δ ^{11,14}	200
<i>Cis</i> -8,11,14-Ikosatrienová	C20:3 <i>cis</i> Δ ^{8,11,14}	200
<i>Cis</i> -5,8,11,14-Ikosatetraenová	C20:4 <i>cis</i> Δ ^{5,8,11,14}	200
<i>Cis</i> -11,14,17-Ikosatrienová	C20:3 <i>cis</i> Δ ^{11,14,17}	200
Behenová	C22:0	400
Eruková	C22:1 <i>cis</i> Δ ¹³	200
<i>Cis</i> -5,8,11,14,17- Eikosapentaenová	C20:5 <i>cis</i> Δ ^{5,8,11,14,17}	200
Trikosanová	C23:0	400
<i>Cis</i> -13,16-dokosadienová	C22:2 <i>cis</i> Δ ^{13,16}	400
Lignocerová	C24:0	400
Nervonová	C24:1 <i>cis</i> Δ ⁹	400
<i>Cis</i> -4,7,10,13,16,19-dokosaheptaenová	C22:6 <i>cis</i> Δ ^{4,7,10,13,16,19}	400

Příloha 2 Vzorky olejů, jejich výrobci, země původu a data expirace

Číslo vzorku	Druh oleje	Charakteristika	Výrobce	Země původu	Datum expirace
O1	Rakytníkový olej	Olej s vitamínem E, získané z plodů rakytníku	Jiří Pantůček – Topvet, Vodova 40, Brno	Česká republika	12.10.2013
O2	Lněný olej v bio kvalitě	Bio olej, lisovaný za studena	P. Brändle GmbH, Robert Bosch 10, Empfingen, Německo	Německo	6/2020
O3	Kokosový olej v bio kvalitě	Bio panenský olej, lisovaný za studena	Massimoti s.r.l., Via Dottor Anton Mayr 17, Terzano, Itálie	Itálie	12.6.2021
O4	Řepkový olej v bio kvalitě	Bio olej, lisovaný za studena	Ölmühle Lehen GmbH, Gutenbergstrasse 16, Lehen, Německo	Německo	8.1.2021
O5	Olivový olej z pokrutin	Olej získaný zpracováním pokrutin a přímo z oliv	Giana sp. z.o.o., Nowa 23, Piaseczno, Polsko	Polsko	20.3.2019
O6	Extra panenský olivový olej	Výběrový olej získaný přímo z oliv, první lisování za studena	CHO Company Sfax, Mahdia Road, Tunisko	Tunisko	2.8.2019
O7	Extra panenský olivový olej v bio kvalitě	Výběrový olej získaný přímo z oliv, první lisování za studena	Mercaoleo S.L., Ctra. de Córdoba, Antequera, Španělsko	Španělsko	13.7.2020
O8	Slunečnicový olej	Rafinovaný jedlý olej	Tesco PLC, Welwyn Garden, Hertfordshire, Anglie	Maďarsko	16.7. 2021
O9	Olej ze lničky seté	Laboratorně vyrobený olej, degumovaný, nedeodorizovaný	Slovenská technická univerzita, Bratislava, Slovensko	Slovensko	Neuvedeno

Příloha 3 Pořadí píků, retenční časy a odezvové faktory proměřených standardů MK

Pořadí píku	Vzorec	Retenční čas [min]	Odezvový faktor
1	C8:0	8,09	1,58
2	C10:0	10,11	1,28
3	C11:0	11,30	1,19
4	C12:0	12,60	1,11
5	C13:0	14,05	1,07
6	C14:0	15,63	0,98
7	C14:1	16,56	1,06
8	C15:0	17,36	0,98
9	C15:1 <i>cis</i> Δ^{10}	18,36	1,01
10	C16:0	19,18	0,93
11	C16:1 <i>cis</i> Δ^9	20,01	1,00
12	C17:0	21,08	0,92
13	C17:1 <i>cis</i> Δ^{10}	21,95	0,96
14	C17:0 16-methyl	22,01	-
15	C17:0 15-methyl	22,49	-
16	C18:0	23,03	0,87
17	C18:1 <i>trans</i> Δ^6	23,39	-
18	C18:1 <i>trans</i> Δ^9	23,47	0,90
19	C18:1 <i>trans</i> Δ^{11}	23,577	-
20	C18:1 <i>cis</i> Δ^6	23,68	-
21	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	23,76	0,87
22	C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	23,94	-
23	C18:2 <i>trans</i> $\Delta^{9,12}$	24,31	0,97
24	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	25,03	0,94
25	C19:1 <i>cis</i> Δ^{10}	25,76	-
26	C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{6,9,12}$	25,87	0,98
27	C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{9,12,15}$	26,58	1,00
28	C20:0	26,95	0,82
29	C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	27,71	0,88
30	C21:0	28,87	0,88
31	C20:2 <i>cis</i> $\Delta^{11,14}$	28,99	0,84
32	C20:3 <i>cis</i> $\Delta^{8,11,14}$	29,83	0,94
33	C20:4 <i>cis</i> $\Delta^{5,8,11,14}$	30,39	0,93
34	C20:3 <i>cis</i> $\Delta^{11,14,17}$	30,52	0,86
35	C22:0	30,76	0,77
36	C22:1 <i>cis</i> Δ^{13}	31,53	0,84
37	C20:5 <i>cis</i> $\Delta^{5,8,11,14,17}$	31,94	0,90
38	C23:0	32,59	1,61
39	C22:2 <i>cis</i> $\Delta^{13,16}$	32,80	1,47
40	C24:0	34,40	0,64
41	C24:1 <i>cis</i> Δ^9	35,17	1,41
42	C22:6 <i>cis</i> $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	36,32	1,76

Příloha 4 Plochy píků, průměrné plochy píků, SD a RSD majoritních MK v testovacím vzorku při opakovaném měření

	Plocha píků						
	C16:0	C18:0	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	C20:3 <i>cis</i> $\Delta^{8,11,14}$	C20:4 <i>cis</i> $\Delta^{5,8,11,14}$	C22:6 <i>cis</i> $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$
Den 1-1	83 577 773	35 950 527	80 976 042	101 650 530	9 006 308	38 846 721	8 509 734
Den 1-2	81 119 760	34 362 079	78 336 948	99 493 941	8 690 534	37 720 646	8 347 313
Den 1-3	90 101 414	38 375 108	86 004 031	109 120 588	9 688 375	41 746 084	9 319 478
Průměr	84 932 982	36 229 238	81 772 340	103421686	9128406	39437817	8725508
SD	4 641 656	2 020 980	3 895 075	5051814	510002	2076796	520764
RSD [%]	5,5	5,6	4,8	4,9	5,6	5,3	6,0
Den 2-1	77 430 961	27 575 457	60 470 530	89 476 496	7 687 813	33 717 799	7 687 813
Den 2-2	70 890 905	24 981 668	58 020 486	77 606 958	7 061 423	30 952 402	7 075 147
Den 2-3	75 733 435	25 916 677	54 768 297	73 393 093	6 876 206	29 837 398	7 127 028
Průměr	74685100	26157934	57753104	80158849	7208481	31502533	7296663
SD	3393720	1313617	2860504	8339849	425319	1997839	339738
RSD [%]	4,5	5,0	5,0	10,4	5,9	6,3	4,7
Den 3-1	101 654 964	43 520 264	94 403 313	118 960 311	11 589 140	46 370 643	11 421 893
Den 3-2	102 557 401	43 332 742	96 591 196	120 317 715	10 850 784	45 445 834	10 744 866
Den 3-3	104 991 288	46 519 963	95 356 552	121 153 081	10 829 750	44 969 705	10 781 895
Průměr	103067884	44457656	95450354	120143702	11089891	45595394	10982885
SD	1725749	1788470	1096953	1106693	432490	712343	380643
RSD [%]	1,7	4,0	1,1	0,9	3,9	1,6	3,5
Vyhodnocení ze všech dnů (n=9)							
Průměr	87 561 989	35 614 943	78 325 266	101 241 413	9 142 259	38 845 248	9 001 685
SD	12 804 087	8 078 018	16 711 557	18 069 903	1 726 810	6 296 001	1 650 326
RSD [%]	14,6	22,7	21,3	17,9	18,9	16,2	18,3

Příloha 5 Poměry ploch píků majoritních MK vztažené na plochu IS, jejich průměry, SD a RSD vypočtené z při opakovaném měření v testovacím vzorku

	Plocha píků vztažená na plochu IS						
	C16:0	C18:0	C18:1 cis Δ^9	C18:2 cis $\Delta^{9,12}$	C20:3 cis $\Delta^{8,11,14}$	C20:4 cis $\Delta^{5,8,11,14}$	C22:6 cis $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$
Den 1-1	5,734	2,466	5,555	6,974	0,618	2,665	0,584
Den 1-2	5,708	2,418	5,512	7,001	0,612	2,654	0,587
Den 1-3	6,837	2,912	6,526	8,280	0,735	3,168	0,707
Průměr	6,093	2,599	5,864	7,418	0,655	2,829	0,626
SD	0,644	0,272	0,573	0,746	0,070	0,293	0,070
RSD [%]	10,6	10,5	9,8	10,1	10,6	10,4	11,2
Den 2-1	6,574	2,341	5,134	7,597	0,653	2,863	0,653
Den 2-2	6,592	2,323	5,395	7,216	0,657	2,878	0,658
Den 2-3	7,156	2,449	5,175	6,935	0,650	2,819	0,673
Průměr	6,774	2,371	5,235	7,249	0,653	2,853	0,661
SD	0,331	0,068	0,140	0,332	0,003	0,030	0,011
RSD [%]	4,9	2,9	2,7	4,6	0,5	1,1	1,6
Den 3-1	5,190	2,222	4,820	6,074	0,592	2,368	0,583
Den 3-2	5,501	2,324	5,181	6,453	0,582	2,438	0,576
Den 3-3	5,547	2,458	5,038	6,401	0,572	2,376	0,570
Průměr	5,413	2,335	5,013	6,309	0,582	2,394	0,576
SD	0,194	0,118	0,182	0,206	0,010	0,038	0,007
RSD [%]	3,6	5,1	3,6	3,3	1,7	1,6	1,2
Vyhodnocení ze všech dnů (n=9)							
Průměr	6,09	2,43	5,37	6,99	0,63	2,69	0,62
SD	0,7	0,2	0,49	0,67	0,05	0,27	0,05
RSD [%]	11,5	8,1	9,2	9,5	8	10	8,3

Příloha 6 Procentuálního zastoupení majoritních MK v testovacím vzorku, jejich průměry, SD a RSD vypočtené z při opakovaném měření

	Procentuální zastoupení						
	C16:0	C18:0	C18:1 cis Δ^9	C18:2 cis $\Delta^{9,12}$	C20:3 cis $\Delta^{8,11,14}$	C20:4 cis $\Delta^{5,8,11,14}$	C22:6 cis $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$
Den 1-1	20,37	8,76	19,74	24,78	2,20	9,47	2,07
Den 1-2	20,36	8,62	19,66	24,97	2,18	9,47	2,09
Den 1-3	20,55	8,75	19,62	24,89	2,21	9,52	2,13
Průměr	20,72	8,40	18,92	24,35	2,21	9,36	2,17
SD	0,11	0,08	0,06	0,09	0,01	0,03	0,03
RSD [%]	0,5	0,9	0,3	0,4	0,7	0,3	1,2
Den 2-1	20,80	7,95	17,86	24,04	2,17	9,33	2,17
Den 2-2	21,06	7,82	18,28	24,45	2,23	9,65	2,23
Den 2-3	21,51	7,77	17,87	23,95	2,24	9,41	2,23
Průměr	21,12	7,85	18,00	24,15	2,21	9,46	2,21
SD	0,36	0,09	0,24	0,27	0,04	0,17	0,04
RSD [%]	1,7	1,1	1,3	1,1	1,7	1,8	1,7
Den 3-1	20,46	8,76	19,00	23,94	2,33	9,33	2,30
Den 3-2	20,56	8,69	19,36	24,12	2,17	9,11	2,15
Den 3-3	20,84	8,51	18,93	24,05	2,15	8,93	2,14
Průměr	20,62	8,65	19,10	24,04	2,22	9,12	2,20
SD	0,20	0,13	0,23	0,09	0,10	0,20	0,09
RSD [%]	1,0	1,5	1,2	0,4	4,5	2,2	4,0
Vyhodnocení ze všech dnů (n=9)							
Průměr	20,72	8,40	18,92	24,35	2,21	9,36	2,17
SD	0,38	0,43	0,75	0,42	0,05	0,22	0,07
RSD [%]	1,8	5,1	4	2	2,5	2,4	3,3

Příloha 7 Hodnoty průměrů, SD a RSD vypočtené z ploch píků minoritních MK v testovacím vzorku při opakovaném měření

	Plochy píků									
	C15:0	C15:0 14 methyl	C16:0 14 methyl	C17:1 cis Δ^{10}	C18:1 trans Δ^9	C20:1 cis Δ^{11}	C20:2 cis $\Delta^{11,14}$	C20:3 cis $\Delta^{5, 8, 11}$	C20:3 cis $\Delta^{5, 11, 14}$	C20:4 cis $\Delta^{8,11,14,17}$
Den 1-1	720 066	178 498	405 330	592 350	326 078	873 044	926 307	692 165	675 704	434 191
Den 1-2	714 989	181 919	417 803	594 637	276 167	779 308	896 527	678 191	657 187	434 519
Den 1-3	796 917	203 470	485 103	673 458	295 545	916 931	1 014 799	785 364	733 086	510 558
Průměr	743 991	187 962	436 079	620 148	299 263	856 428	945 878	718 573	688 659	459 756
SD	45 906	13 539	42 912	46 182	25 162	70 300	61 517	58 263	39 573	43 996
RSD [%]	6,2	7,2	9,8	7,4	8,4	8,2	6,5	8,1	5,7	9,6
Den 2-1	812 259	229 029	420 010	498 161	234 705	758 740	952 966	680 619	648 133	400 532
Den 2-2	787 188	208 842	389 512	453 135	237 092	752 747	896 573	640 145	576 140	425 189
Den 2-3	785 661	208 487	390 563	472 916	211 522	691 790	880 626	566 441	581 210	397 090
Průměr	795 036	215 453	400 028	474 737	227 773	734 426	910 055	629 068	601 828	407 604
SD	14 935	11 759	17 312	22 568	14 124	37 045	38 008	57 889	40 182	15 326
RSD [%]	1,9	5,5	4,3	4,8	6,2	5,0	4,2	9,2	6,7	3,8
Den 3-1	935 091	279 125	613 372	785 772	430 570	1 345 665	1 425 915	915 233	942 557	711 724
Den 3-2	959 600	246 260	611 812	770 611	377 754	1 298 608	1 461 049	1 045 250	1 042 906	633 256
Den 3-3	978 492	293 679	634 125	767 126	406 585	1 319 744	1 420 937	987 718	977 740	666 336
Průměr	957 728	273 022	619 770	774 503	404 970	1 321 339	1 435 967	982 734	987 734	670 439
SD	21 761	24 292	12 457	9 913	26 445	23 569	21 864	65 152	50 916	39 395
RSD [%]	Den 3	2,3	8,9	2,0	1,3	6,5	1,8	1,5	6,6	5,2
Hodnoty vypočtené ze všech dnů (n=9)										
Průměr	832251	225479	485292	623130	310669	970731	1097300	776792	759407	512599
SD	100228	40510	104834	132434	79646	271393	257262	167650	179393	124315
RSD [%]	12,0	18,0	21,6	21,3	25,6	28,0	23,4	21,6	23,6	24,3

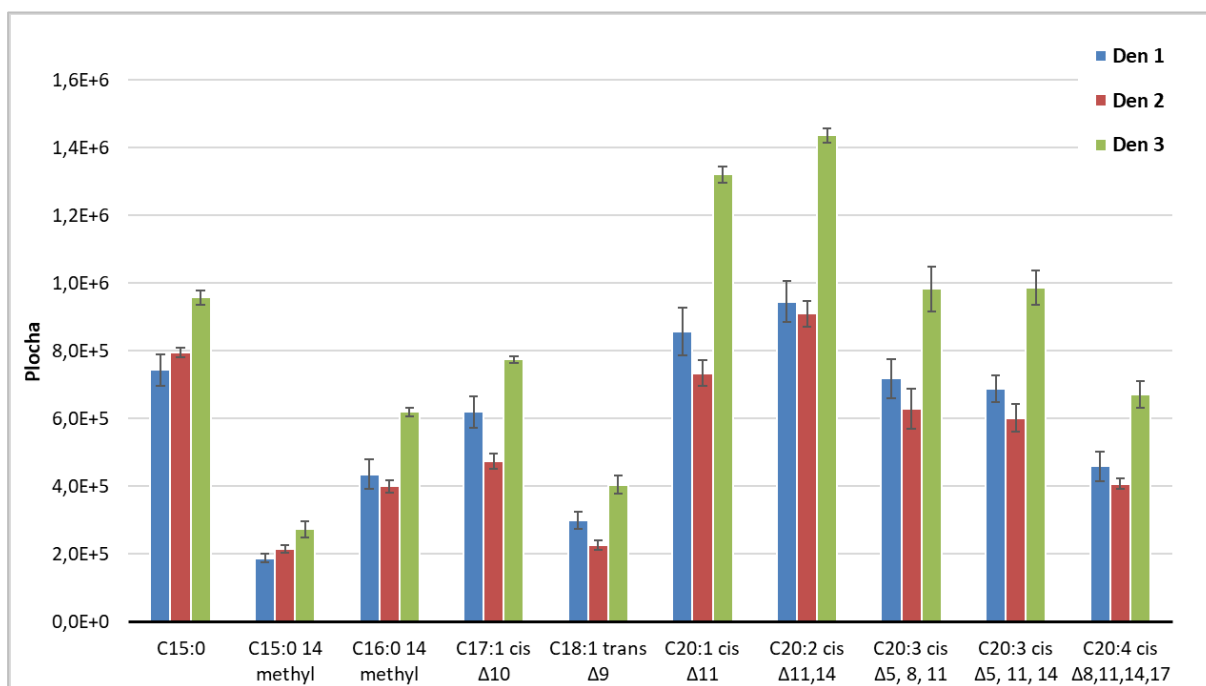
Příloha 8 Hodnoty průměrů, SD a RSD vypočtené z ploch píků minoritních MK vztažené na IS při opakovaném měření

	Plochy píků vztažené na plochu IS									
	C15:0	C15:0 14 methyl	C16:0 14 methyl	C17:1 cis Δ^{10}	C18:1 trans Δ^9	C20:1 cis Δ^{11}	C20:2 cis $\Delta^{11,14}$	C20:3 cis $\Delta^{5, 8, 11}$	C20:3 cis $\Delta^{5, 11, 14}$	C20:4 cis $\Delta^{8,11,14,17}$
Den 1-1	0,049	0,012	0,028	0,041	0,022	0,060	0,064	0,047	0,046	0,030
Den 1-2	0,050	0,013	0,029	0,042	0,019	0,055	0,063	0,048	0,046	0,031
Den 1-3	0,060	0,015	0,037	0,051	0,022	0,070	0,077	0,060	0,056	0,039
Průměr	0,0534	0,0135	0,0313	0,0445	0,0214	0,0614	0,0679	0,0516	0,0494	0,0330
SD	0,0061	0,0017	0,0048	0,0057	0,0017	0,0075	0,0079	0,0069	0,0054	0,0050
RSD [%]	11,5	12,6	15,3	12,9	8,0	12,2	11,6	13,4	10,9	15,0
Den 2-1	0,069	0,019	0,036	0,042	0,020	0,064	0,081	0,058	0,055	0,034
Den 2-2	0,073	0,019	0,036	0,042	0,022	0,070	0,083	0,060	0,054	0,040
Den 2-3	0,074	0,020	0,037	0,045	0,020	0,065	0,083	0,054	0,055	0,038
Průměr	0,0721	0,0195	0,0363	0,0430	0,0207	0,0666	0,0825	0,0569	0,0545	0,0370
SD	0,0028	0,0002	0,0006	0,0014	0,0012	0,0030	0,0014	0,0031	0,0008	0,0028
RSD [%]	3,9	0,8	1,7	3,3	5,8	4,5	1,7	5,4	1,5	7,6
Den 3-1	0,048	0,014	0,031	0,040	0,022	0,069	0,073	0,047	0,048	0,036
Den 3-2	0,051	0,013	0,033	0,041	0,020	0,070	0,078	0,056	0,056	0,034
Den 3-3	0,052	0,016	0,034	0,041	0,021	0,070	0,075	0,052	0,052	0,035
Průměr	0,0503	0,0143	0,0325	0,0407	0,0212	0,0694	0,0754	0,0517	0,0519	0,0352
SD	0,0022	0,0012	0,0011	0,0006	0,0009	0,0006	0,0028	0,0047	0,0039	0,0012
RSD [%]	4,4	8,1	3,4	1,5	4,2	0,8	3,7	9,1	7,5	3,4
Hodnoty vypočtené ze všech dnů (n=9)										
Průměr	0,059	0,016	0,033	0,043	0,021	0,066	0,075	0,053	0,052	0,035
SD	0,011	0,003	0,003	0,003	0,001	0,005	0,008	0,005	0,004	0,003
RSD [%]	18,5	19,1	10	8,0	5,6	8,1	10,1	9,7	7,7	9,6

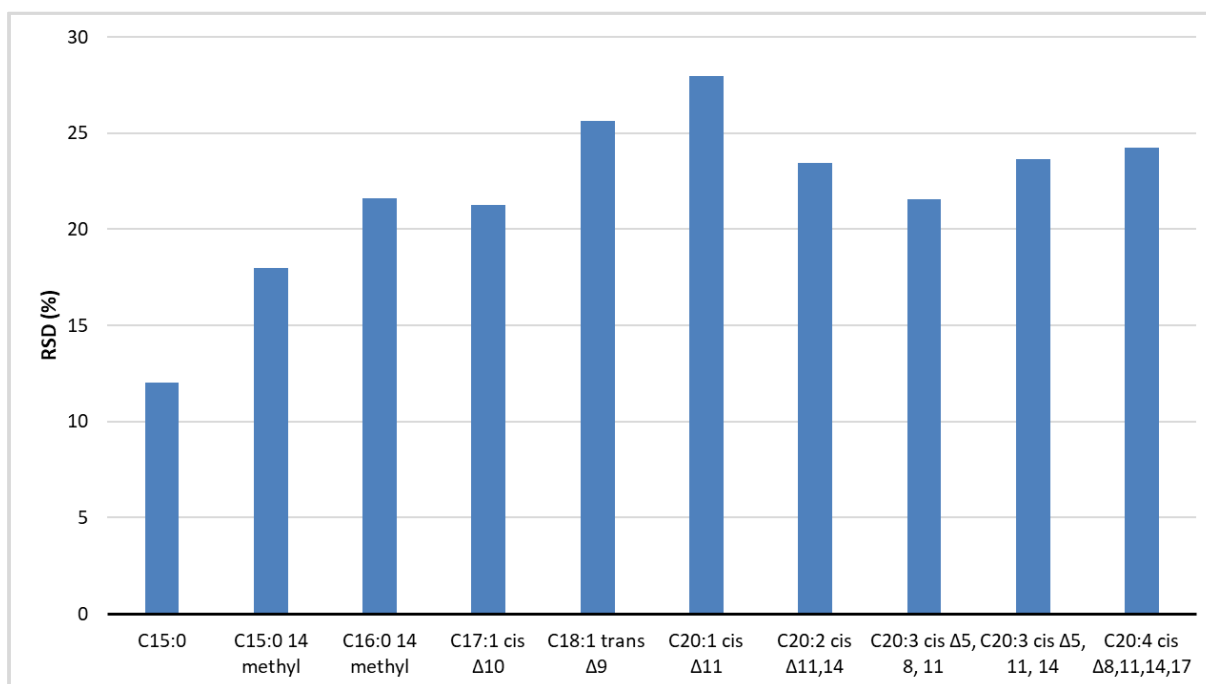
Příloha 9 Hodnoty průměrů, SD a RSD vypočtené z procentuálního zastoupení minoritních MK v testovacím vzorku při opakovaném měření

	Procentuální zastoupení									
	C15:0	C15:0 14 methyl	C16:0 14 methyl	C17:1 cis Δ^{10}	C18:1 trans Δ^9	C20:1 cis Δ^{11}	C20:2 cis $\Delta^{11,14}$	C20:3 cis $\Delta^{5, 8, 11}$	C20:3 cis $\Delta^{5, 11, 14}$	C20:4 cis $\Delta^{8,11,14,17}$
Den 1-1	0,186	0,046	0,099	0,144	0,079	0,213	0,226	0,169	0,165	0,126
Den 1-2	0,189	0,046	0,105	0,149	0,067	0,196	0,225	0,170	0,165	0,136
Den 1-3	0,182	0,046	0,111	0,154	0,067	0,209	0,231	0,179	0,167	0,136
Průměr	0,205	0,052	0,117	0,147	0,070	0,217	0,255	0,190	0,181	0,134
SD [%]	0,034	0,011	0,017	0,006	0,005	0,026	0,047	0,027	0,026	0,003
RSD [%]	16,5	20,4	14,3	4,4	7,3	12,2	18,4	14,3	14,2	2,6
Den 2-1	0,244	0,064	0,136	0,162	0,076	0,247	0,310	0,221	0,211	0,130
Den 2-2	0,206	0,061	0,127	0,147	0,077	0,245	0,291	0,208	0,187	0,138
Den 2-3	0,205	0,061	0,127	0,154	0,069	0,225	0,286	0,184	0,189	0,129
Průměr	0,200	0,059	0,126	0,154	0,077	0,247	0,288	0,192	0,189	0,144
SD [%]	0,010	0,003	0,002	0,005	0,009	0,023	0,003	0,014	0,001	0,018
RSD [%]	5,0	4,5	1,5	3,6	11,6	9,4	1,0	7,2	0,7	12,4
Den 3-1	0,188	0,056	0,123	0,158	0,087	0,271	0,287	0,184	0,190	0,163
Den 3-1	0,192	0,049	0,123	0,154	0,082	0,260	0,293	0,210	0,209	0,167
Den 3-2	0,196	0,059	0,127	0,154	0,081	0,264	0,284	0,198	0,196	0,153
Průměr	0,196	0,054	0,123	0,155	0,080	0,254	0,283	0,200	0,197	0,154
SD [%]	0,003	0,005	0,004	0,001	0,003	0,015	0,011	0,009	0,011	0,012
RSD [%]	1,6	8,7	3,0	0,5	3,9	5,9	4,0	4,6	5,8	8,1
Hodnoty vypočtené ze všech dnů (n=9)										
Průměr	0,20	0,05	0,12	0,15	0,08	0,24	0,27	0,19	0,19	0,14
SD	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02
RSD [%]	9,5	13,8	10,2	3,5	9,2	11,4	12,2	9,7	9,5	10,8

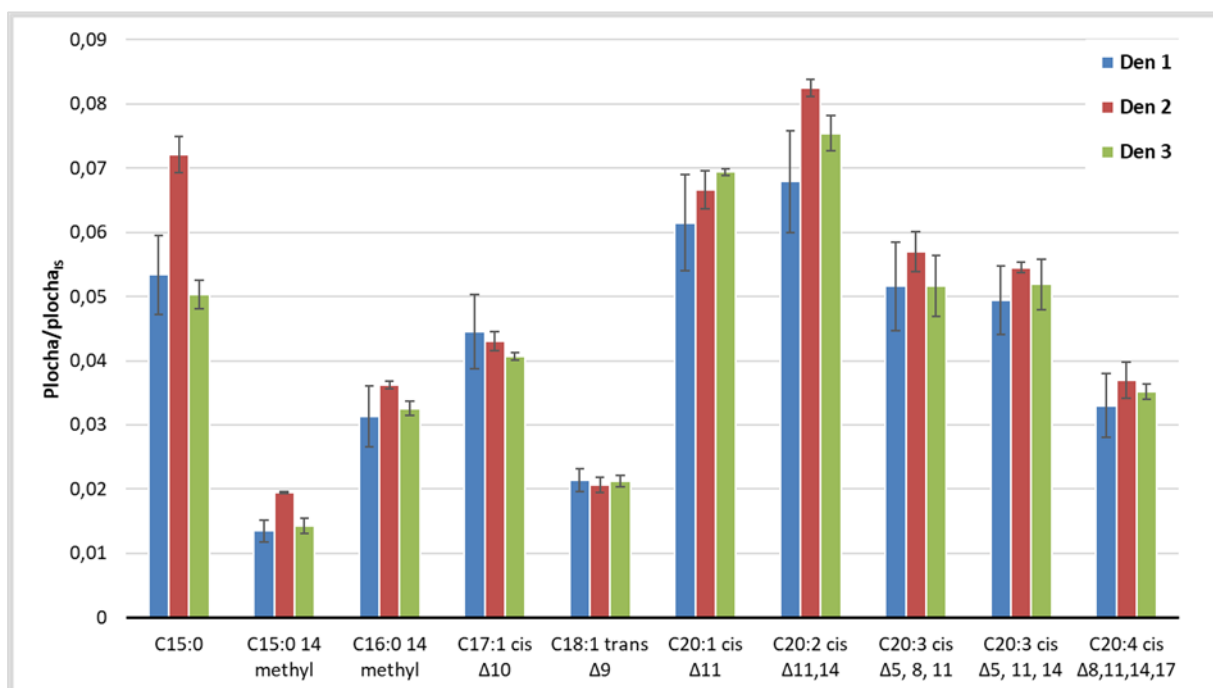
Příloha 10 Průměry a SD vypočtené z ploch píků minoritních MK ve vzorku (3 dny, 3 opakování)



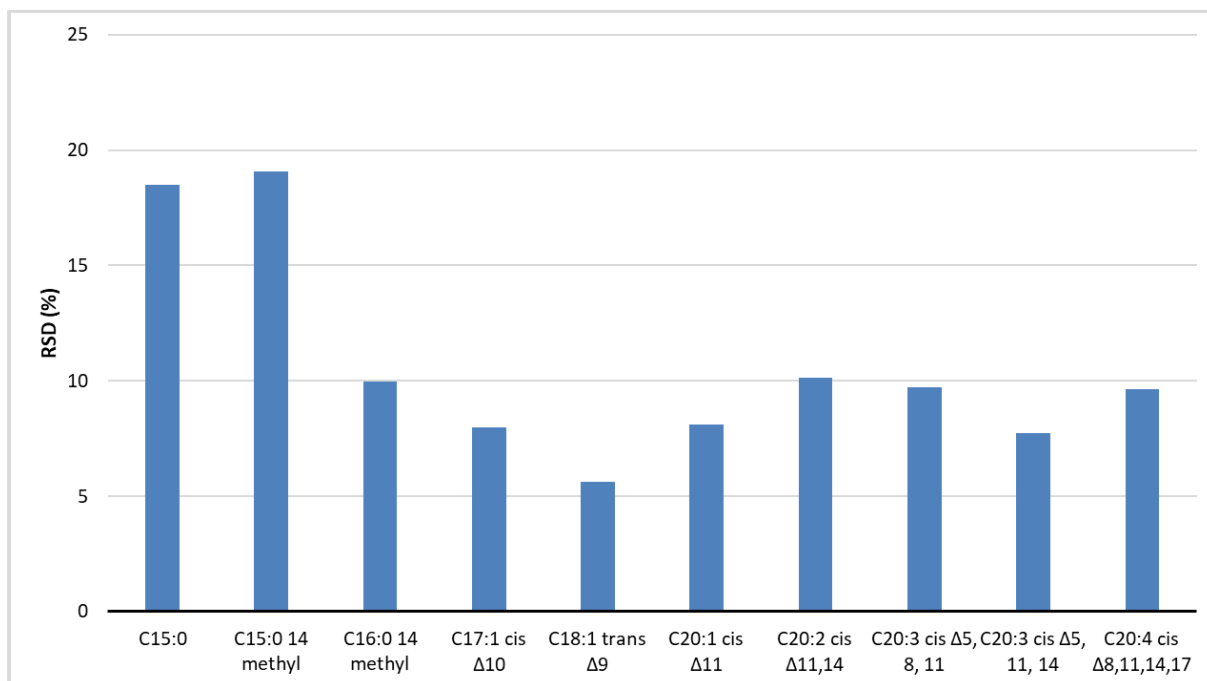
Příloha 11 RSD vypočtené z ploch píků minoritních MK ve vzorku (n=9, 3 dny, 3 opakování)



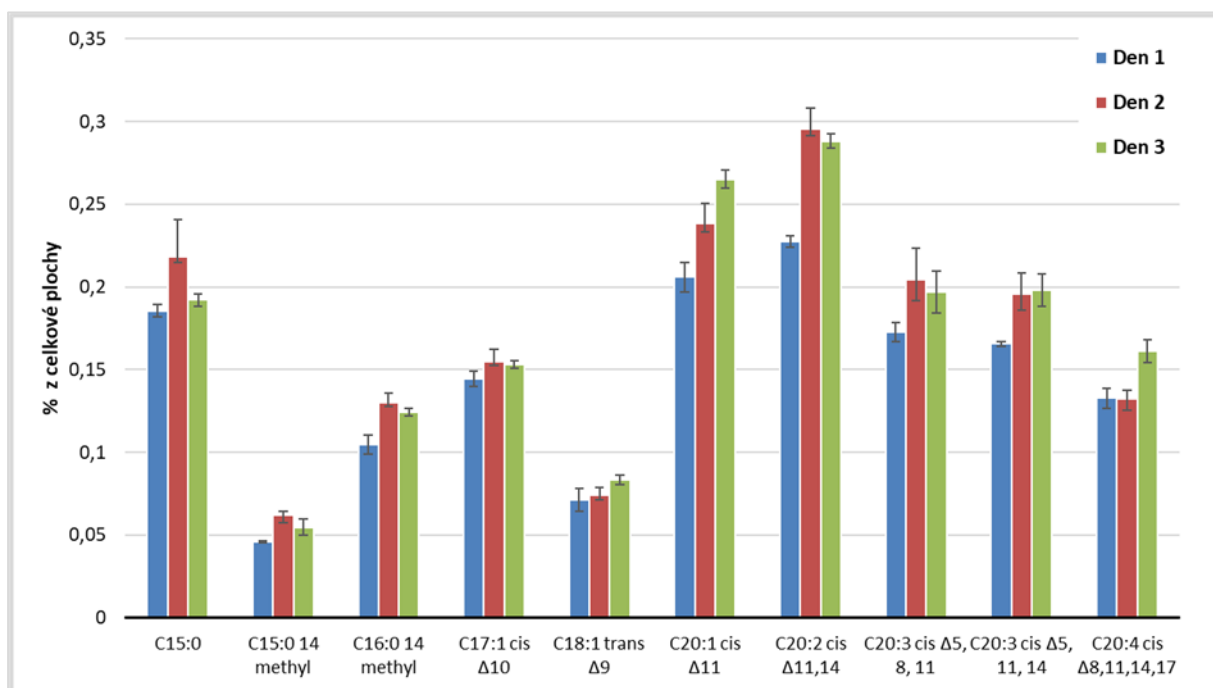
Příloha 12 Průměry a SD vypočtené z ploch píků minoritních MK přepočítaných k IS (3 dny, 3 opakování)



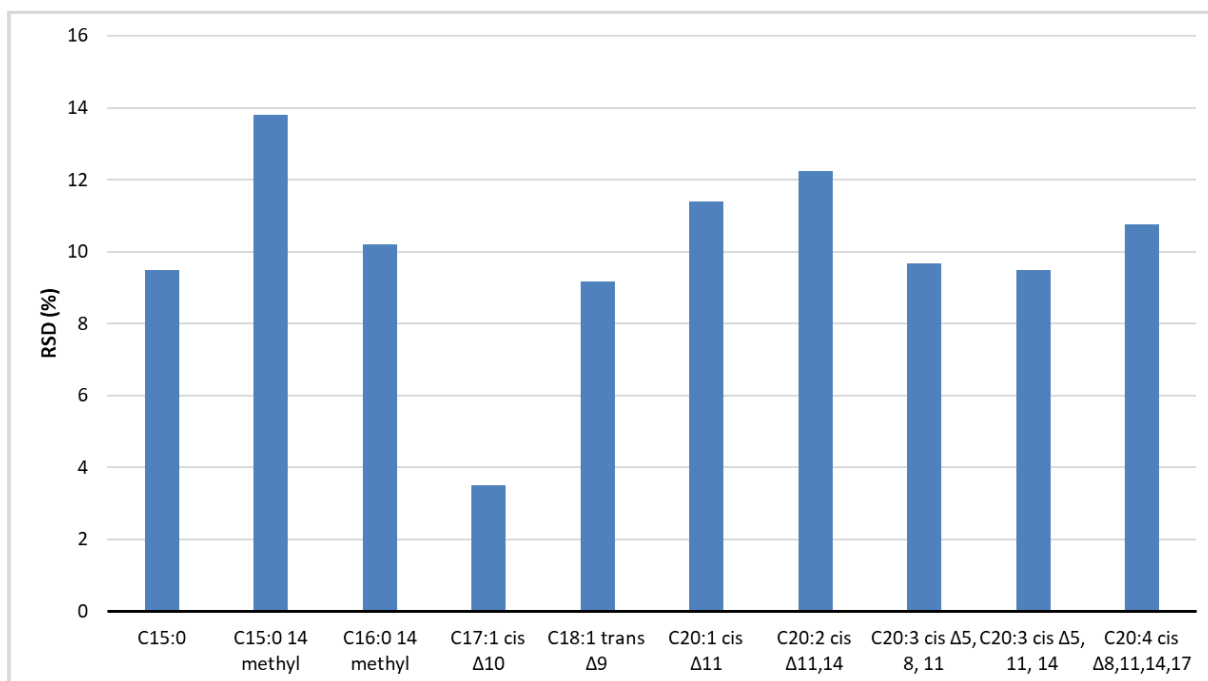
Příloha 13 RSD vypočtené z ploch píků minoritních MK přepočítaných K IS (n=9, 3 dny, 3 opakování)



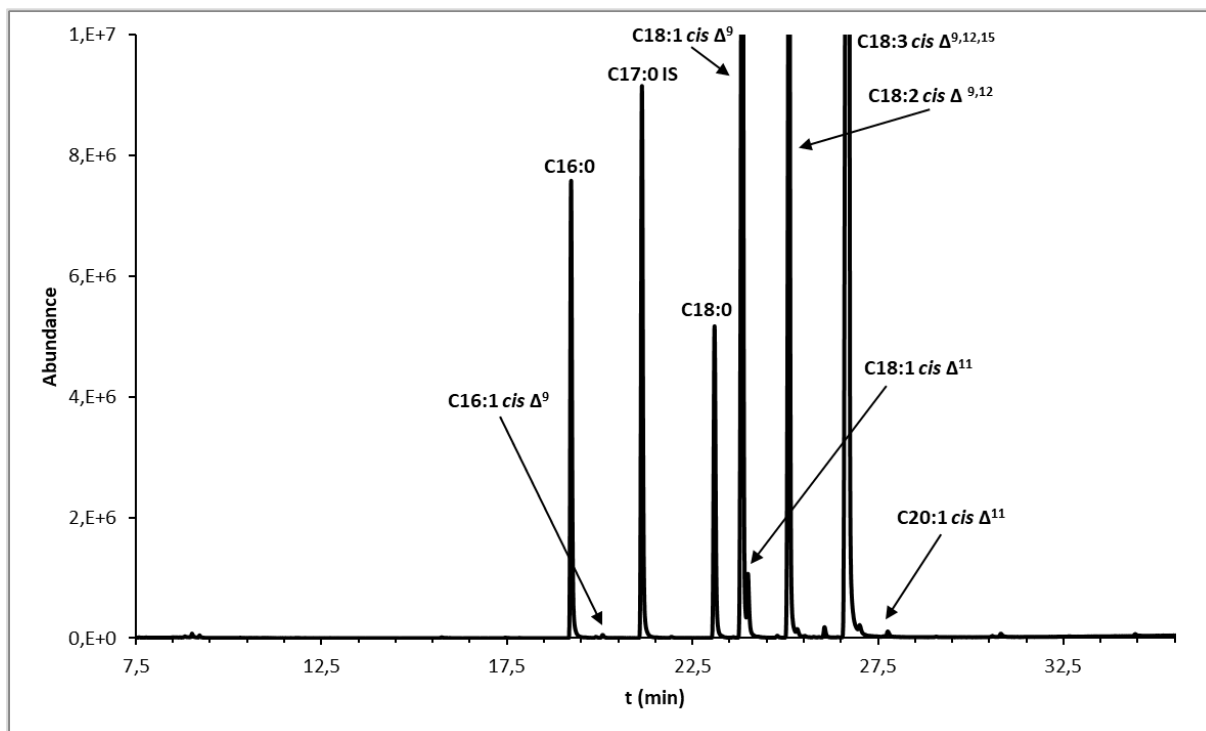
Příloha 14 Průměry a SD vypočtené z procentuálního zastoupení minoritních MK (3 dny, 3 opakování)



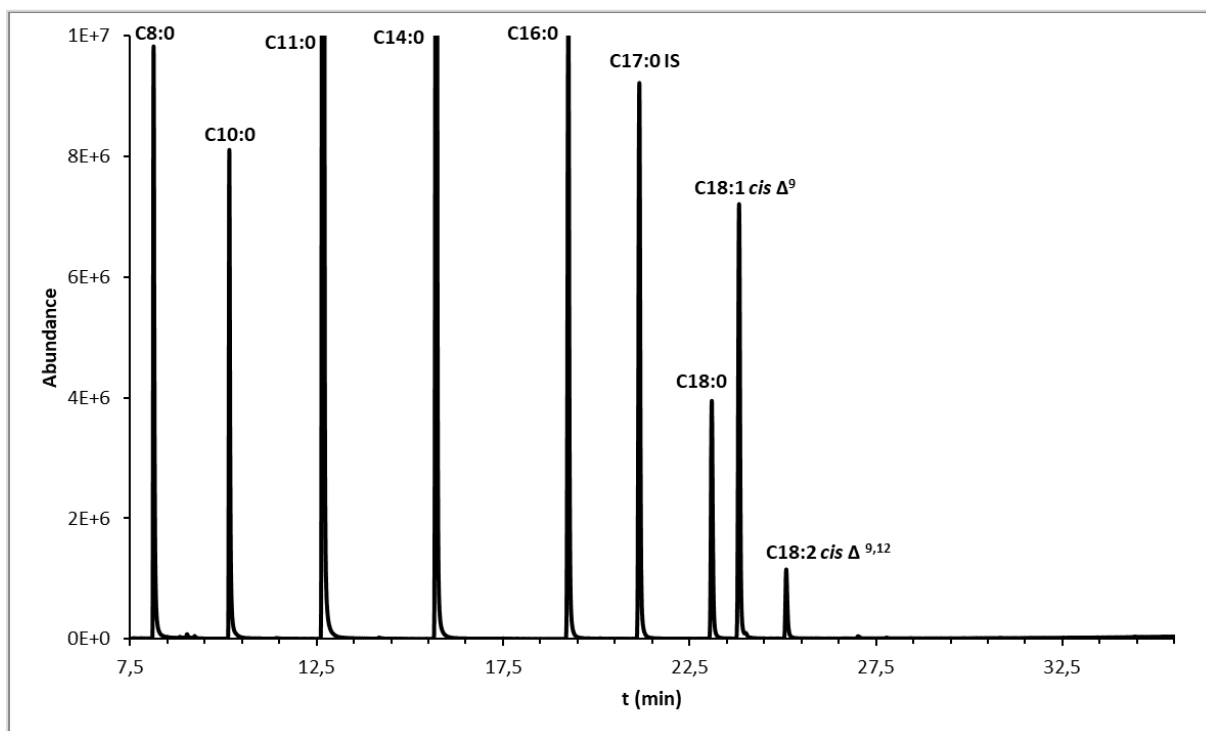
Příloha 15 RSD vypočtené z procentuálního zastoupení píků minoritních MK ve vzorku (n=9, 3 dny, 3 opakování)



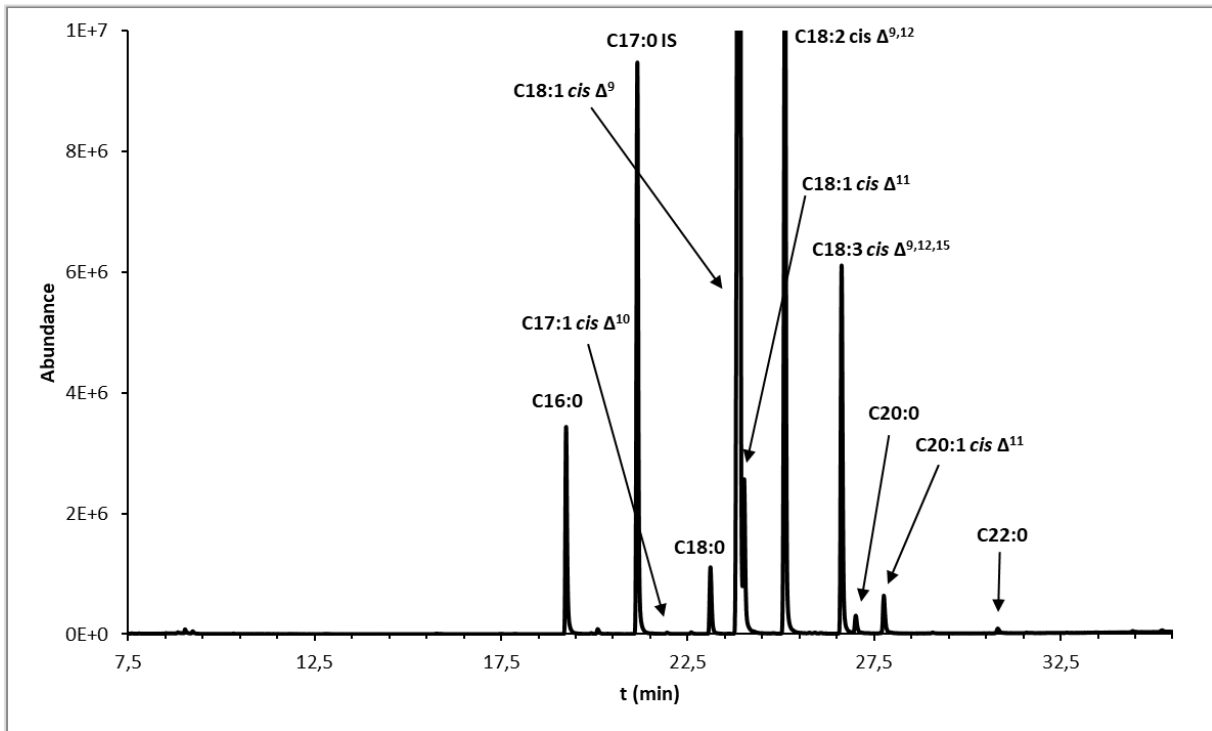
Příloha 16 Chromatogram lněného oleje



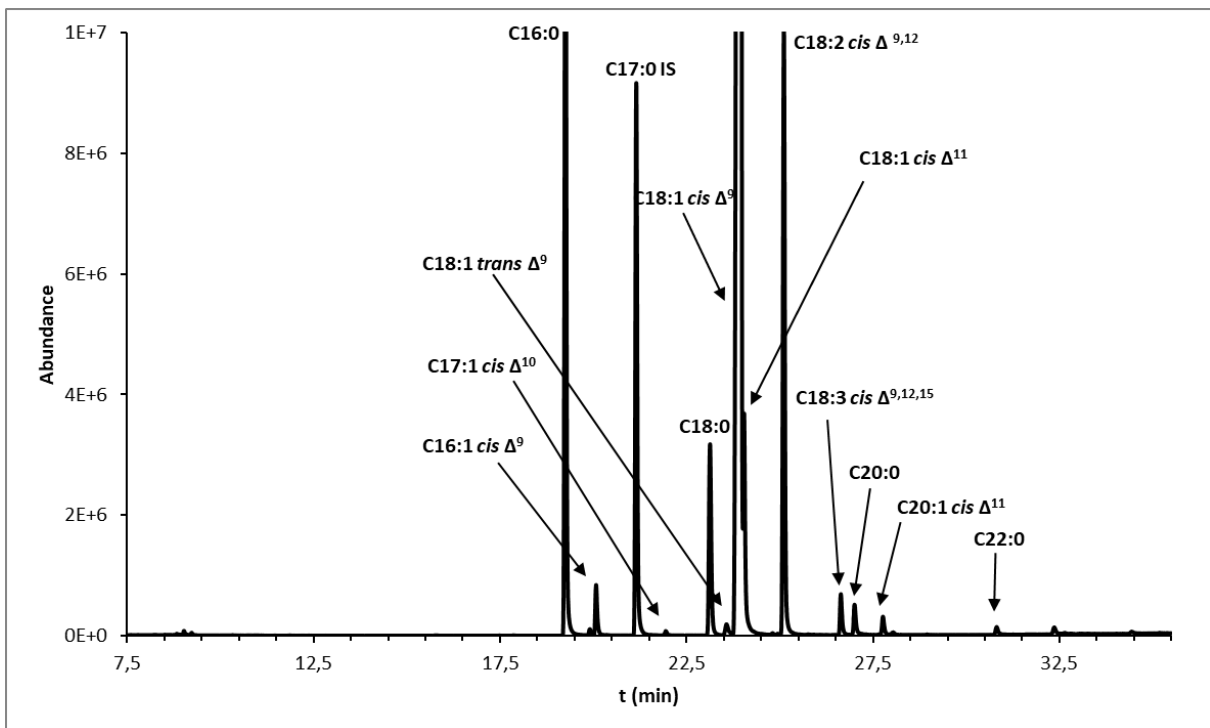
Příloha 17 Chromatogram kokosového oleje



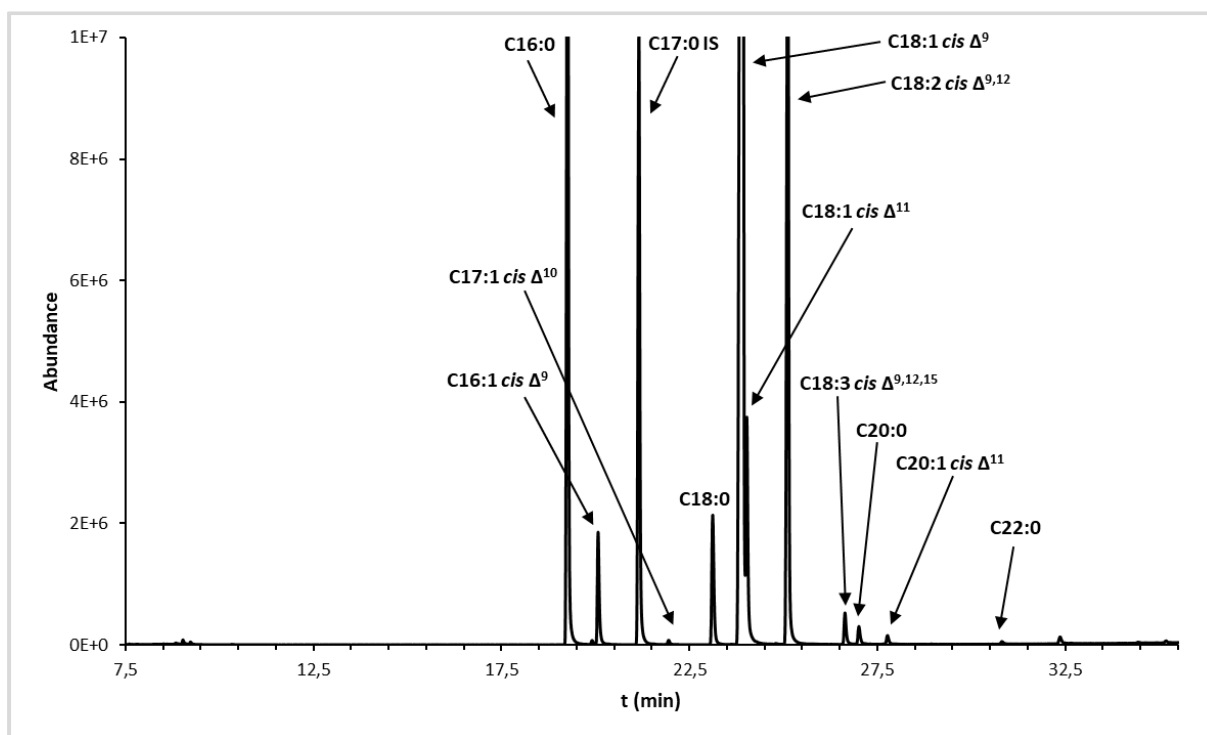
Příloha 18 Chromatogram řepkového oleje



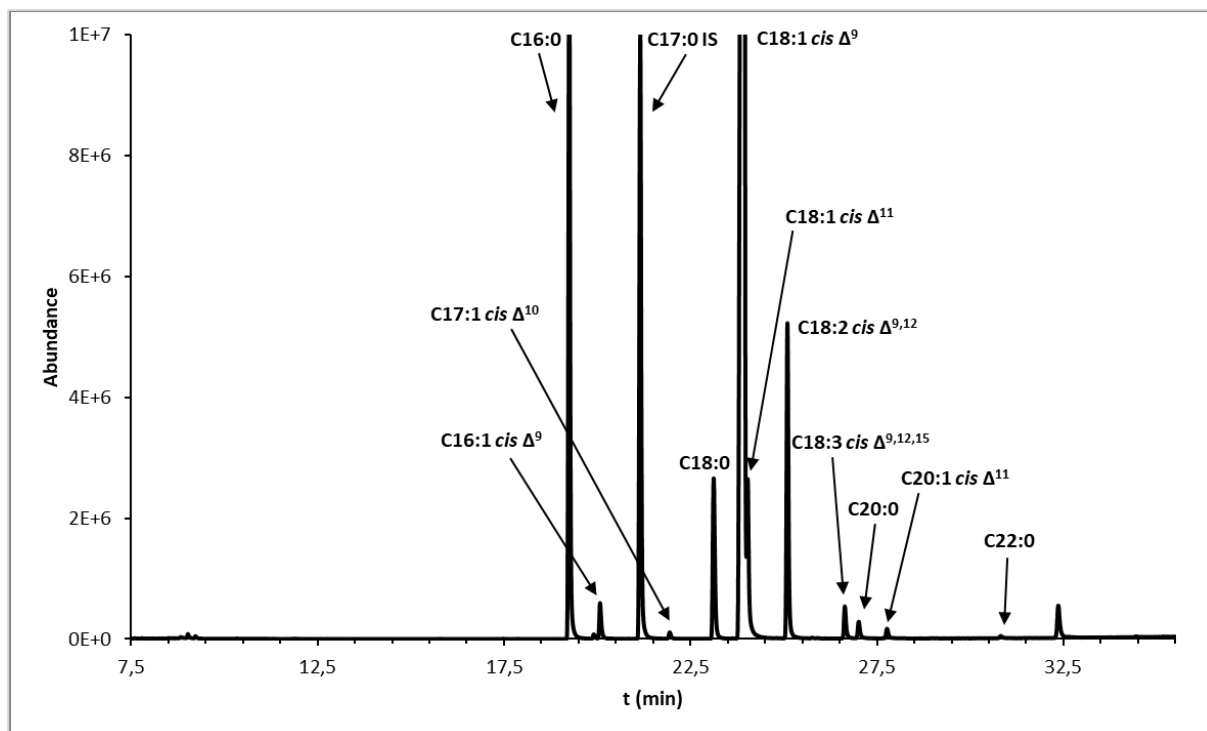
Příloha 19 Chromatogram olivového oleje z pokrutin



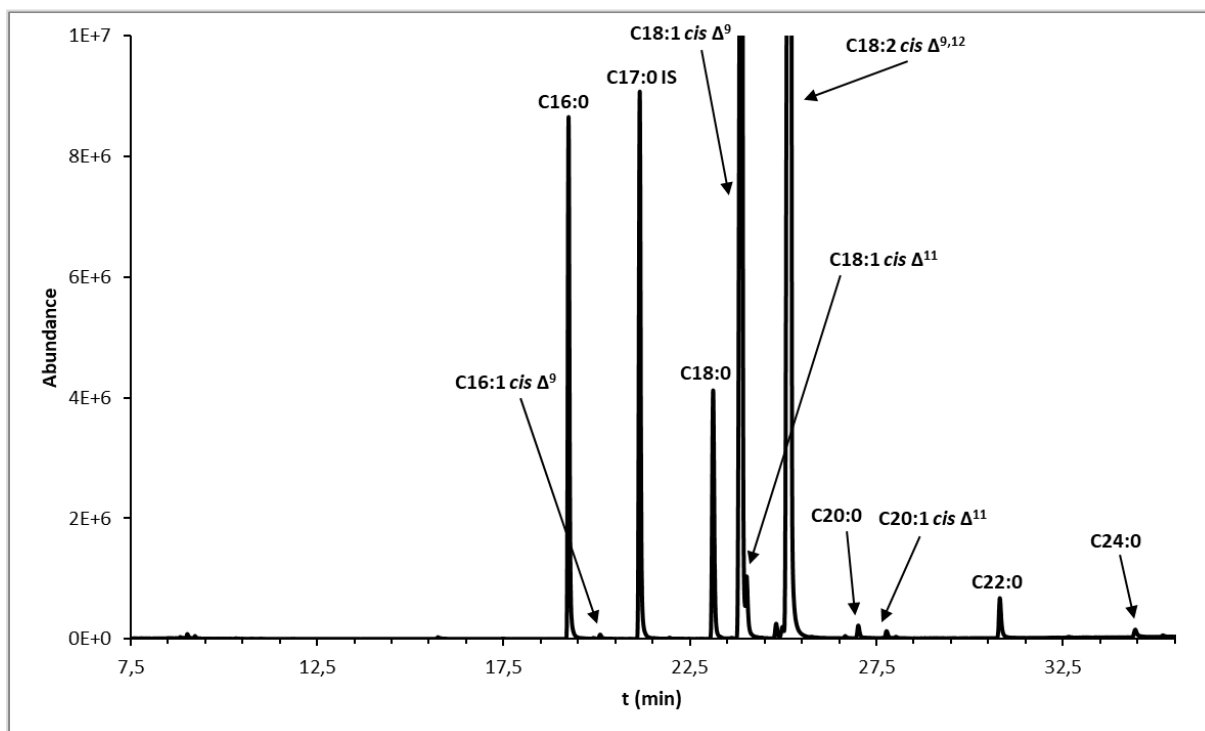
Příloha 20 Chromatogram panenského olivového oleje



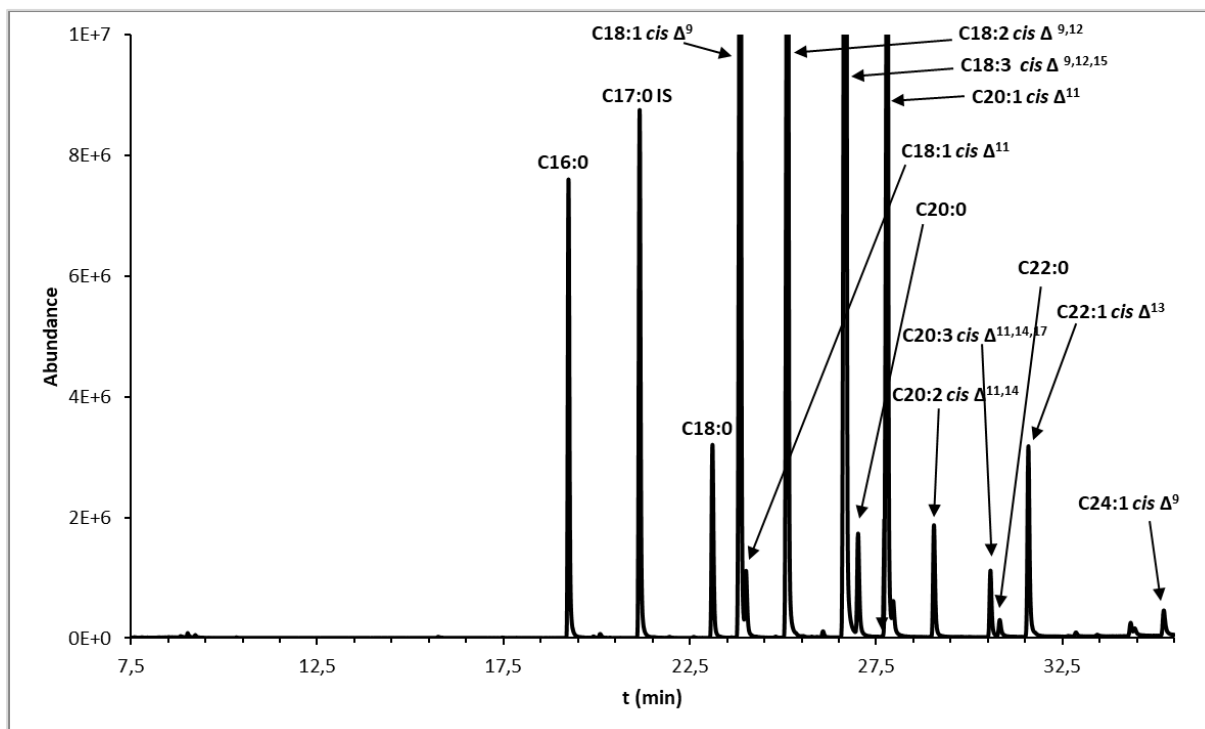
Příloha 21 Chromatogram panenského olivového oleje v bio kvalitě



Příloha 22 Chromatogram slunečnicového oleje



Příloha 23 Chromatogram oleje ze lničky seté



Příloha 24 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK rakytníkového oleje (O1)

Pořadí píku	MK	Retenční čas [min]	Plocha píku	Procenta zastoupení [%]
1	C16:0	19,26	47 395 448	13,3
2	C16:1 <i>cis</i> Δ^9	20,08	2 992 774	0,8
3	C18:0	23,11	17 518 999	4,9
4	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	23,87	94 820 854	26,7
5	C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	24,01	8 487 525	2,4
6	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	25,18	158 462 549	44,6
7	C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{6,9,12}$	26,07	857 003	0,2
8	C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{9,12,15}$	26,63	19 785 143	5,6
9	C20:0	27,01	1 773 764	0,5
10	C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	27,77	787 209	0,2
11	C22:0	30,81	1 821 046	0,5
12	C24:1 <i>cis</i> Δ^9	35,17	592 899	0,2

Příloha 25 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK lněného oleje (O2)

Pořadí píku	MK	Retenční čas [min]	Plocha píku	Procenta zastoupení [%]
1	C16:0	19,23	25 370 257	6,2
2	C16:1 <i>cis</i> Δ^9	20,07	237 918	0,1
3	C18:0	23,09	19 845 571	4,8
4	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	23,84	87 200 756	21,3
5	C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	23,99	4 762 758	1,2
6	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	25,10	62 245 805	15,2
7	C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{9,12,15}$	26,71	209 861 007	51,2
8	C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	27,76	419 136	0,1

Příloha 26 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK kokosového oleje (O3)

Pořadí píku	MK	Retenční čas [min]	Plocha píku	Procenta zastoupení [%]
1	C8:0	8,13	24 191 197	7,4
2	C10:0	10,16	20 451 864	6,3
3	C11:0	12,68	130 258 914	39,9
4	C14:0	15,71	71 502 179	21,9
5	C16:0	19,25	35 417 108	10,8
6	C18:0	23,09	14 197 497	4,3
7	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	23,83	26 105 340	8,0
8	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	25,09	4 445 360	1,4

Příloha 27 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK řepkového oleje (O4)

Pořadí píku	MK	Retenční čas [min]	Plocha píku	Procenta zastoupení [%]
1	C16:0	19,24	11 920 403	4,8
2	C17:1 <i>cis</i> Δ^{10}	21,95	87 195	0,04
3	C18:0	23,11	4 385 207	1,8
4	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	23,90	143 106 852	58,1
5	C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	24,02	10 582 975	4,3
6	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	25,11	49 568 816	20,1
7	C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{6,9,12}$	26,63	22 456 436	9,1
8	C20:0	27,01	1 268 392	0,5
9	C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	27,76	2 666 354	1,1
10	C22:0	30,81	371 952	0,2

Příloha 28 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK olivového oleje z pokrutin (O5)

Pořadí píku	MK	Retenční čas [min]	Plocha píku	Procenta zastoupení [%]
1	C16:0	19,26	51 709 709	13,4
2	C16:1 <i>cis</i> Δ^9	20,08	3 173 350	0,8
3	C17:1 <i>cis</i> Δ^{10}	21,94	256 897	0,1
4	C18:0	23,13	13 808 601	3,6
5	C18:1 <i>trans</i> Δ^9	23,57	1 029 178	0,3
6	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	23,96	256 684 712	66,6
7	C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	24,04	14 078 816	3,7
8	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	25,11	37 688 307	9,8
9	C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{9,12,15}$	26,64	2 724 401	0,7
10	C20:0	27,00	2 178 571	0,6
11	C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	27,76	1 284 486	0,3
12	C22:0	30,82	639 208	0,2

Příloha 29 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK panenského olivového oleje (O6)

Pořadí píku	MK	Retenční čas [min]	Plocha píku	Procenta zastoupení [%]
1	C16:0	19,26	56 126 067	17,3
2	C16:1 <i>cis</i> Δ^9	20,07	6 613 058	2,0
3	C17:1 <i>cis</i> Δ^{10}	21,94	288 268	0,1
4	C18:0	23,12	8 613 179	2,7
5	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	23,92	181 919 993	56,0
6	C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	24,03	14 517 294	4,5
7	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	25,12	52 369 461	16,1
8	C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{9,12,15}$	26,64	2 045 825	0,6
9	C20:0	27,01	1 302 038	0,4
10	C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	27,77	595 931	0,2
11	C22:0	30,81	185 967	0,1

Příloha 30 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK panenského olivového oleje v bio kvalitě (O7)

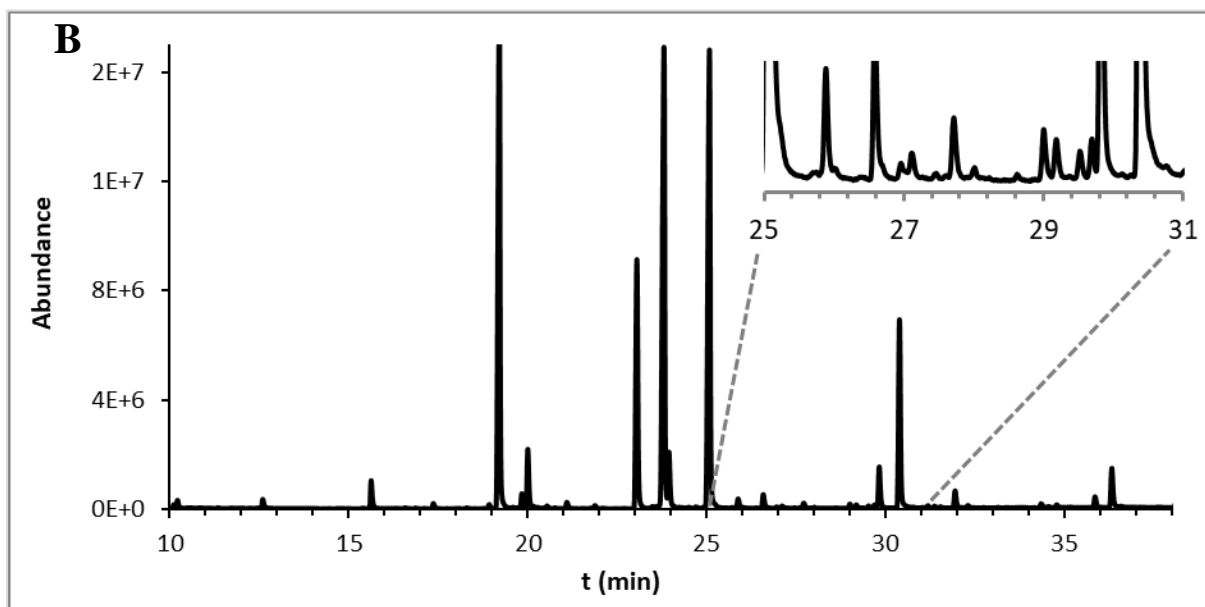
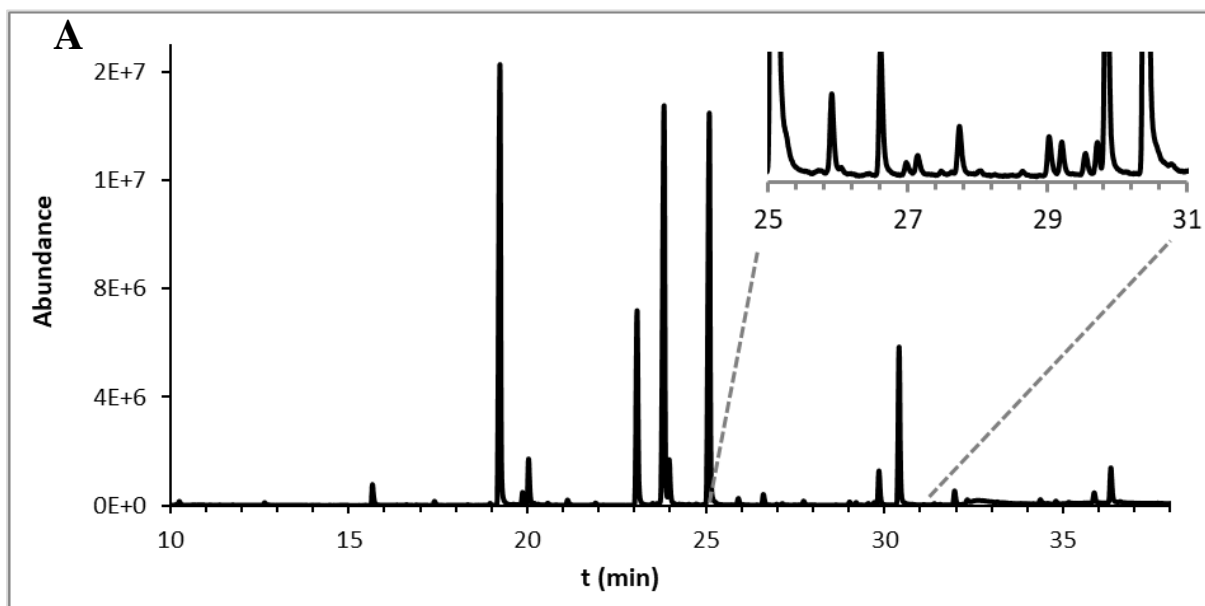
Pořadí píku	MK	Retenční čas [min]	Plocha píku	Procenta zastoupení [%]
1	C16:0	19,25	38 901 257	12,7
2	C16:1 <i>cis</i> Δ^9	20,07	2 313 697	0,8
3	C17:1 <i>cis</i> Δ^{10}	21,94	440 972	0,1
4	C18:0	23,12	11 098 995	3,6
5	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	23,94	220 574 410	71,8
6	C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	24,03	10 536 309	3,4
7	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	25,10	19 107 753	6,2
8	C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{9,12,15}$	26,64	2 115 063	0,7
9	C20:0	27,01	1 230 701	0,4
10	C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	27,77	707 458	0,2
11	C22:0	30,82	152 455	0,05

Příloha 31 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK slunečnicového oleje (O8)

Pořadí píku	MK	Retenční čas [min]	Plocha píku	Procenta zastoupení [%]
1	C16:0	19,24	28 867 848	7,5
2	C16:1 <i>cis</i> Δ^9	20,09	328 632	0,1
3	C18:0	23,12	16 741 194	4,4
4	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	23,89	122 978 852	32,1
5	C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	24,02	4 979 100	1,3
6	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	25,20	203 658 744	53,2
7	C20:0	27,01	933 646	0,2
8	C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	27,77	571 900	0,1
9	C22:0	30,81	3 142 993	0,8
10	C24:0	34,44	718 920	0,2

Příloha 32 Tabulka retenčních časů a procentuálního zastoupení MK oleje lničky seté (O9)

Pořadí píku	MK	Retenční čas [min]	Plocha píku	Procenta zastoupení [%]
1	C16:0	19,24	25 150 540	6,14
2	C18:0	23,11	12 120 487	2,96
3	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	23,86	67 691 037	16,52
4	C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	24,01	4 818 293	1,18
5	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	25,13	76 067 139	18,56
6	C18:3 <i>cis</i> $\Delta^{9,12,15}$	26,69	123 671 402	30,18
7	C20:0	27,01	7 306 954	1,78
8	C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	27,80	64 068 799	15,64
9	C20:2 <i>cis</i> $\Delta^{11,14}$	29,05	7 325 451	1,79
10	C20:3 <i>cis</i> $\Delta^{11,14,17}$	30,57	4 511 286	1,10
11	C22:0	30,82	1 398 510	0,34
12	C22:1 <i>cis</i> Δ^{13}	31,58	13 425 018	3,28
13	C24:1 <i>cis</i> Δ^9	35,22	2 208 860	0,54



Příloha 34 Pořadí píků, retenční časy a procentuální zastoupení MK ve vzorku krevního séra s označením PCO 993

Pořadí píku	Vzorec	Způsob identifikace	Retenční čas [min]	Plocha píku	Procenta zastoupení
1	C12:0	a	12,66	253 155	0,1
2	C14:0	a	15,67	7 064 854	0,9
3	C15:0	a	17,41	2 430 599	0,3
4	C15:0 14 methyl	b	18,34	595 743	0,1
5	C16:0	a	19,32	169 387 903	21,0
6	C16:1 <i>cis</i> Δ^9	a	20,07	13 401 212	1,7
7	C16:0 14 methyl	b	20,59	1 403 257	0,2
8	C17:0	a	21,14	4 761 157	0,6
9	C17:1 <i>cis</i> Δ^{10}	a	21,93	1 472 047	0,2
10	C17:0 16 methyl	a	22,15	590 973	0,1
11	C18:0	a	23,18	123 526 290	15,3
12	C18:1 <i>trans</i> Δ^9	a	23,56	544 881	0,1
13	C18:1 <i>cis</i> Δ^9	a	23,93	161 242 937	20,0
14	C18:1 <i>cis</i> Δ^{11}	a	24,03	17 464 819	2,2
15	C18:2 <i>cis</i> $\Delta^{9,12}$	a	25,19	157 525 183	19,5
16	C19:1 <i>cis</i> Δ^{10}	a	25,81	20 468 475	2,5
17	C18:3 γ <i>cis</i> $\Delta^{6,9,12}$	a	25,93	2 640 227	0,3
18	C18:3 α <i>cis</i> $\Delta^{9,12,15}$	a	26,63	3 563 224	0,4
19	C20:0	a	27,00	1 586 134	0,2
20	C20:1 <i>cis</i> Δ^{11}	a	27,76	2 723 497	0,3
20	C20:2 <i>cis</i> $\Delta^{11,14}$	a	29,05	2 362 450	0,3
21	C20:3 <i>cis</i> $\Delta^{5, 8, 11}$	b	29,22	1 668 967	0,2
22	C20:3 <i>cis</i> $\Delta^{5, 11, 14}$	b	29,56	1 024 006	0,1
23	C20:3 <i>cis</i> $\Delta^{8,11,14}$	a	29,88	16 766 647	2,1
24	C20:4 <i>cis</i> $\Delta^{5,8,11,14}$	a	30,45	53 490 921	6,6
25	C22:0	a	30,80	672 236	0,1
26	C20:4 <i>cis</i> $\Delta^{8,11,14,17}$	b	31,40	624 687	0,1
27	C20:5 <i>cis</i> $\Delta^{5,8,11,14,17}$	a	31,98	7 807 511	1,0
28	C22:4 <i>cis</i> $\Delta^{7,10,13,16}$	b	34,38	2 101 513	0,3
29	C22:5 <i>cis</i> $\Delta^{4,7,10,13,16}$	b	34,82	1 102 867	0,1
30	C22:5 <i>cis</i> $\Delta^{7,10,13,16,19}$	b	35,89	5 982 036	0,7
31	C22:6 <i>cis</i> $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	a	36,37	20 136 146	2,5

a...identifikováno podle retenčního času standardu a podle porovnání se spektry v knihovně NIST.

b...identifikováno pouze za použití knihovny spekter NIST, pravděpodobnost shody byla vyšší než 70%.