

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Stanovení spektra mastných kyselin ve vybraných potravinářských olejích

bakalářská práce

Autor práce: Markéta Tomancová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant
Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Špička, CSc.

Datum odevzdání práce: (datum odevzdání na příslušnou katedru)

Abstrakt

Stanovení spektra mastných kyselin ve vybraných potravinářských olejích.

Tématem práce je stanovení spektra mastných kyselin ve vybraných potravinářských olejích.

Cílem této práce je seznámit se s metodikou stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií s využitím MS-CI a MS-EI detekce pro identifikaci, stanovit složení mastných kyselin u vybraných komerčních potravinářských olejů a zpracovat získané výsledky.

Práce informuje o vlastnostech a zdravotním významu mastných kyselin. Dále se tato práce věnuje složení jednotlivých stanovovaných rostlinných olejů. Následuje popis metod plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, které se využívají ke stanovení mastných kyselin. Přehled teoretické části je zakončen popisem úpravy vzorků před jejich zavedením do plynového chromatografu.

Stanovovány byly oleje běžně dostupné v obchodních řetězcích, a to olivové oleje (Ondoliva a Minerva), řepkové oleje (Rapso, Manka a Lukana) a slunečnicové oleje (Vénusz, Vegetol Gold, Slunka a Slunka na smažení). Jednotlivé oleje byly měřeny ve třech sériích. Při každém měření byly z každého jednoho oleje odebrány tři vzorky. Celkově byly tedy mastné kyseliny stanovovány ve 72 vzorcích.

V olivovém oleji byla v průměru nejvíce zastoupena kyselina olejová (74,28 %) > kyselina palmitová (11,90 %) > kyselina linolová (5,76 %) > kyselina stearová (3,01 %) > kyselina vakcenová (2,59 %) > kyselina palmitolejová (0,79 %) > kyselina α -linolenová (0,65 %).

V řepkovém oleji bylo obsaženo nejvíce kyseliny olejové (57,70 %) > kyselina linolová (20,07 %) > kyselina α -linolenová (8,15 %) > kyselina palmitová (4,85 %) > kyselina vakcenová (3,54 %) > kyselina stearová (1,80 %) > kyselina eikosenová (1,25 %) > kyselina arachová (0,59 %).

Ve slunečnicovém oleji byla nejvíce obsažena kyselina linolová (61,38 %) > kyselina olejová (25,80 %) > kyselina palmitová (6,54 %) > kyselina stearová (3,42 %) > kyselina vakcenová (0,76 %) > kyselina behenová (0,68 %).

Rozdílných hodnot dosahoval slunečnicový oleje Slunka na smažení, který měl nejvíce kyseliny olejové (77,26 %) > kyselina linolová (10,49 %) > kyselina palmitová (4,75 %) > kyselina stearová (3,20 %) > kyselina vakcenová (1,26 %) > kyselina behenová (0,82 %). Jednalo se tedy zřejmě o odrůdu tzv. high oleic slunečnice se zvýšeným obsahem kyseliny olejové.

Z analýzy hlavních komponent vyplývá, že mezi olivovými, řepkovými a slunečnicovými oleji byly značné rozdíly ve složení. Avšak oleje stejného druhu ale od různých výrobců se ve svém složení nijak výrazně nelišily.

Abstract

Determination of the fatty acids composition in selected food oils

The topic of the thesis is determination of the spectrum of fatty acids in the selected nutritional oils.

The target of this thesis is to provide information about the methodology of determination of fatty acids by the method of gas chromatography applying MS-CI and MS-EI detection for identification, to determine the composition of fatty acids of the selected commercial nutritional oils and to process the acquired results.

The thesis informs of the characteristics and the medical research of fatty acids. Moreover this thesis deals with the composition of individual examined vegetable oils. The description of the method of the gas chromatography and the mass spectrometry, applied for the determination of fatty acids follows. The survey of the theoretical part is finished by the description of the treatment of samples before their introduction into the gas chromatograph.

The oils available usually in the trade chains were examined, i.e. olive oils (Ondoliva and Minerva), rape oils (Rapso, Manka and Lukana) and sunflower oils (Vénusz, Vegetol Gold, Slunka and Slunka for frying). The individual oils were measured in three series. During each measuring, three samples were taken from each oil. In total, the fatty acids were determined in 72 samples.

In the olive oil, the oleic acid had a largest share on average (74,28 %) > palmitic acid (11,90 %) > linoleic acid (5,76 %) > stearic acid (3,01 %) > vaccenic acid (2,59 %) > palmitic-oleic acid (0,79 %) > α -linolenic acid (0,65 %).

In the rape oil, there was the largest share of oleic acid (57,70 %) > linoleic acid (20,07 %) > α -linolenic acid (8,15 %) > palmitic acid (4,85 %) > vaccenic acid (3,54 %) > stearic acid (1,80 %) > eicosenic acid (1,25 %) > arachic acid (0,59 %).

In the sunflower oil, there was the largest share of linoleic acid (61,38 %) > oleic acid (25,80 %) > palmitic acid (6,54 %) > stearic acid (3,42 %) > vaccenic acid (0,76 %) > behenic acid (0,68 %).

Different values were found out in the Slunka sunflower oil for frying having contained the largest share of oleic acid (77,26 %) > linoleic acid (10,49 %) > palmitic acid (4,75 %) > stearic acid (3,20 %) > vaccenic acid (1,26 %) > behenic acid (0,82 %). It was probably made of a special kind of the so-called high oleic sunflower with an increased amount of the oleic acid.

It follows from the analysis of the main components that between the olive, rape and sunflower oil considerable differences in their composition may be established. However, the oils of the same kind and from various producers were not very different as for their composition.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Jiřímu Špičkovi, CSc. za jeho ochotu, čas, trpělivost a cenné rady při vedení mé bakalářské práce. Dále bych také ráda poděkovala celé své rodině za podporu během studia.

Obsah

ÚVOD.....	13
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1.1 Lipidy.....	15
1.1 Masné kyseliny.....	17
1.2 Rostlinné oleje.....	22
1.3 Plynová chromatografie.....	28
1.4 Plynová chromatografie s využitím hmotnostní spektrometrie detekce pro identifikaci.....	34
1.5 Příprava vzorku před zavedením do plynového chromatografu.....	38
2. CÍL PRÁCE.....	40
3. METODIKA.....	41
3.1 Materiál.....	41
3.2 Použité metody.....	42
3.3 Zpracování výsledků.....	44
4. VÝSLEDKY.....	45
5. DISKUZE.....	67
6. ZÁVĚR.....	69
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	70
8. KLÍČOVÁ SLOVA.....	74

Seznam použitých zkratek

a.s	akciová společnost
CI	Chemical Ionization (chemická ionizace)
C14:0	kyselina myristová
C16:0	kyselina palmitová
C16:1n7cis	kyselina palmitolejová
C18:0	kyselina stearová
C18:1n7cis	kyselina vakcenová
C18:1n9cis	kyselina olejová
C18:2n6cis,cis	kyselina linolová
C18:3n3cis	kyselina α -linolenová
C18:xt	všechny 18ctiuhhlíkové trans mastné kyseliny
C20:0	kyselina arachová
C20:1n9cis	kyselina eikosenová
C22:0	kyselina behenová
C22:1n9cis	kyselina eruková
č.	číslo
DHA	kyselina dokosahexaenová
EI	Electron Ionization (elektronová ionizace)
ECD	Electron Capture Detector (detektor elektronového záchytu)
EPA	kyselina ekosapentaenová
et al.	z lat. et alii (a kolektiv)
FA	Fatty acid (mastná kyselina)
FAMES	methylestery mastných kyselin
FID	Flame Ionization Detector (plamenově ionizační detektor)

GC	Gas Chromatography (plynová chromatografie)
GLC	plynová rozdělovací chromatografie
GSC	plynová adsorpční chromatografie
HDL	High-density lipoprotein
ICR	ion-cyklonová rezonance
ITD	iontová past
LA	kyselina linolová
LDL	Low-density lipoprotein
LNA	kyselina α -linolenová
MK	mastná kyselina
MS	Mass Spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
MUFA	nenasyčená mastná kyselina s jednou dvojnou vazbou
např.	například
PLOT	Porous-layer open tubular column (kolona s vrstvou pevného aktivního sorbentu na vnitřním povrchu kapiláry)
PUFA	nenasyčená mastná kyselina s více dvojnými vazbami
SAFA	nasyčená mastná kyselina
SCOT	Support – coated open column (kolona s kapalnou stacionární fází zakotvenou a na povrchu pevného nosiče na vnitřní straně kapiláry)
str.	strana
TCD	Thermal Conductivity Detector (tepelně vodivostní detektor)
TOF	průletový analyzátor
tzn.	to znamená
tzv.	takzvaný

UNFA	nenasyčená mastná kyselina
WCOT	Wall-coated open tubular column (kolona s kapalnou stacionární fází)

Úvod

Složení potravinářských olejů, je dnes hodně diskutovaným tématem. Zjišťuje se do jaké míry může mít složení olejů, které beze sporu každý člověk přijímá ve své potravě, pozitivní nebo negativní vliv na lidské zdraví.

Mastné kyseliny, jež jsou hlavní stavební složkou lipidů tedy i olejů, mají nezbytnou úlohu v lidském organismu. Mastné kyseliny přijímané v potravě jsou po natrávení vstřebávány do lymfy, následně do plasmy, kde jsou k dispozici pro další využití. Lidské tělo si z nich dokáže syntetizovat potřebné látky. Tělo si také samo dokáže některé mastné kyseliny vytvořit, avšak ty které si nedokáže vytvořit, musíme přijímat v potravě, např. také v olejích. Tyto kyseliny se nazývají esenciální a mají významnou úlohu při správné látkové výměně, což má následně vliv například na správnou funkci pokožky, jater, ledvin atd.

Tato práce se věnuje stanovení spektra mastných kyselin v potravinářských olejích metodou plynové chromatografie s využitím hmotnostní spektrometrie detekce pro identifikaci.

Metoda plynová chromatografie je separační a současně analytickou metodou, umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu plynných vzorků. Využití dnes nachází plynová chromatografie v rutinní analýze uhlovodíkových směsí. Využívá se k analýze potravin a vody. V hygienických stanicích může sloužit k určování znečištění vzduchu. V klinické biochemii a toxikologii slouží pro dělení lipidů, steroidů, hormonů a dále pro stanovení a kontrolu čistoty léčiv ve farmaceutickém průmyslu. Pracuje na principu rozdělení složek směsi mezi dvě heterogenní fáze - pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). Mobilní fázi zde vždy tvoří nosný plyn, který putuje chromatografickou kolonou. Analyzovaný vzorek je do nosného plynu aplikován nástřikovým zařízením přes vyhřívanou nástřikovou komoru, kde dojde k jeho odpaření. Poté je nosným plynem odnášen do vyhřívané kolony. Zde dochází k separaci jednotlivých složek vzorku, které pak postupně vystupují z kolony a vstupují do detektoru.

Jako detektoru byl využit hmotnostní spektrometr. Analyzuje vzorek převedený do plynného stavu z plynového chromatografu. Ten je do hmotnostního spektrometru

umístěn do prostoru iontového zdroje, kde je převeden na nabité částice - ionty. Poté jsou jednotlivé ionty separovány v analyzátoru podle poměru m/z , a následně detekovány v detektoru. Všechny tyto děje probíhají v uzavřeném prostoru, kde je udržováno stálé vakuum. Výsledkem metody je záznam iontů zkoumaného vzorku, tzv. hmotnostní spektrum. Hmotnostní spektrum neznámé látky se srovnává se spektrem současně analyzované standardní látky nebo z databank hmotnostních spekter. Hmotnostní spektrometrie patří k nejlepším a nejmodernějším analytickým metodám dneška. Obecně slouží k strukturní analýze chemických látek organického i anorganického původu. Vysoká citlivost umožňuje určení izotopového složení.

V této práci jsem provedla stanovení spektra mastných kyselin v potravinářských olejích běžně dostupných v obchodních řetězcích. Jednalo se o 2 druhy olivového oleje, 3 druhy řepkového oleje a 3 druhy slunečnicového oleje. Z těchto olejů jsem odebrala celkem 72 vzorků, u kterých jsem po jejich úpravě provedla analýzu plynovou chromatografií s využitím MS-CI a MS-EI detekce pro identifikaci.

1. Teoretická část

1.1 LIPIDY

Lipidy jsou strukturně a funkčně velmi rozmanitou skupinou přírodních látek rostlinného nebo živočišného původu. Jedná se o deriváty vyšších mastných kyselin, obsahujících v molekule více než tři atomy uhlíku, alkoholů a aminoalkoholů. Z chemického hlediska mají většinou lipidy hydrofobní charakter. Téměř všechny jsou nerozpustné ve vodě a naopak rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech.^[1,2,3]

1.1.1. Struktura a druhy lipidů

Hlavní stavební složkou lipidů jsou vyšší mastné kyseliny. Podle chemického složení se dále lipidy dělí do tří skupin na homolipidy, heterolipidy a komplexní lipidy.^[4]

Homolipidy, tzv. jednoduché lipidy, jsou estery mastných kyselin a alkoholů.

Dále se mohou rozdělit podle struktury navázaného alkoholu na:

- a) Tuky jsou estery vyšších mastných kyselin a glycerolu. V potravinářském průmyslu se prakticky dělí, při pokojové teplotě, na tuhé tuky a kapalné oleje.
- b) Vosky jsou estery vyšších mastných kyselin a jednosytných alkoholů.
- c) Glykolipidy jsou estery vyšších mastných kyselin, které obsahují glykosidovou vazbou navázané cukry.
- d) Estery vyšších mastných kyselin s glykoly, tedy dvojsytnými alkoholy.^[1,4,5,6,7]

Heterolipidy, tzv. složené lipidy, jsou estery vyšších mastných kyselin a alkoholů, které obsahují další vázané složky, např. fosfolipidy s navázanou kyselinou fosforečnou, sulfamidy s navázanou kyselinou sírovou, sulfolipidy s vázanou sulfonovou skupinou nebo lipamidy s amidově navázanými mastnými kyselinami a sfingosinem.

Komplexní lipidy obsahují kromě homolipidů a heterolipidů ještě další složky často vázané různými fyzikálními vazbami. Jedná se například o lipoproteiny, proteolipidy atd.^[4,7,8]

1.1.2 Význam lipidů

Lipidy jsou jednou z nejdůležitějších složek potřebných pro výživu, správný vývoj a fungování organismu.

Lipidy tvoří zdroj energie a její rezervu. Neutrální lipidy, triacylglyceroly, které tvoří hlavní podíl lipidů, jsou energeticky nejvýhodnější potravou. Odbouráním 1 g tuku získává organismus okolo 38 KJ, což je více než dvojnásobek než při odbourávání sacharidů nebo bílkovin. Potraviny přijaté nad potřebu jsou přeměněny na tuky a ukládají se v příslušných tkáních. V době nedostatečného příjmu potravin jsou zásobním zdrojem energie. ^[7,9,10]

Funkce stavební. Látky, které obsahují vedle velké nepolární části i polární skupiny (polární lipidy), tvoří micely, které jsou strukturálním jádrem biomembrán. Polární lipidy jsou také důležité pro přenos podnětů v nervové tkáni. ^[11]

Část tuků obaluje některé orgány a tím zastává ochrannou funkci např. před mechanickým poškozením. Podkožní tuk také chrání organismus před nadměrnou ztrátou tepla do okolí.

Jsou součástí některých hormonů. Plní funkci vhodného prostředí pro vstřebávání vitamínů rozpustných v tucích.

Pro výživu člověka mají největší význam tuky a oleje. ^[1,6,7,9,12]

1.2 MASTNÉ KYSELINY

Mastné kyseliny (FA – fatty acid) jsou hlavní stavební jednotkou lipidů (tuků a olejů). Jsou to alifatické organické sloučeniny obsahující ve své molekule funkční karboxylovou skupinu–COOH. MK v přírodních lipidech se od sebe liší délkou a charakterem uhlovodíkového řetězce.^[8]

1.2.1 Druhy a struktura MK

Podle počtu uhlíkových atomů v řetězci se MK dělí na nižší mastné kyseliny s 4-10 atomy uhlíku a na vyšší mastné kyseliny, kde je více než 10 atomů uhlíku a které se v lipidech vyskytují nejčastěji. Zpravidla jich mají v molekule sudý počet, a to 4 - 30.^[4,8]

Podle chemické vazby mezi jednotlivými uhlíky se mastné kyseliny rozdělují na nasycené s jednoduchými vazbami a nenasycené s dvojnými nebo výjimečně trojnými vazbami. Podle počtu dvojných vazeb se nenasycené mastné kyseliny dělí na monoenové a polyenové.^[7,13]

Nasycené MK

Nasycené mastné kyseliny (SAFA – saturated fatty acid) obsažené v lipidech mají sudý počet atomů uhlíků vázaných jednoduchými vazbami. Řetězec je obvykle rovný a nerozvětvený.^[3,6] Tyto mastné kyseliny jsou chemicky poměrně stálé. Ke změnám ve struktuře dochází až po dlouhodobějším zahřívání nebo vystavení vysokým teplotám. Z nasycených mastných kyselin se nejvíce v lipidech vyskytují kyseliny stearová (C:18:0) a palmitová (C:16:0). Nižší mastné kyseliny jsou obsaženy v mléčných tucích.^[4,5,8,14]

Nenasycené MK

Nenasycené mastné kyseliny (UNFA – unsaturated fatty acid) obsahují jednu nebo více násobných vazeb. Podle počtu dvojných vazeb tyto mastné kyseliny dělíme na

monoénové obsahující jednu dvojnou vazbu a polyénové obsahující více dvojných vazeb. Alkinové kyseliny s trojnou vazbou se v jedlých tucích nevyskytují.^[4,6]

Monoénové mastné kyseliny (MUFA – monosaturated fatty acid) s jednou dvojnou vazbou se liší počtem atomů uhlíku v řetězci, polohou dvojně vazby a její prostorovou konfigurací. Většina přírodních nenasycených mastných kyselin je v konfiguraci *cis*. Monoénové *trans*-kyseliny se vyskytují pouze v mléčném tuku přežvýkavců nebo v průmyslově ztužených (hydrogenovaných tucích). Monoénové mastné kyseliny jsou nejčastěji v přírodních lipidech zastoupeny kyselinou olejovou (*cis*-9-oktadecenová) a palmitolejová (*cis*-9-hexadecenová).^[1,5,6,15]

Polyénové mastné kyseliny (PUFA – polyunsaturated fatty acid) mají dvě nebo více dvojných vazeb nejčastěji v izolované poloze oddělené jednou nebo dvěma methylovými skupinami. Mastné kyseliny s polyénovými konjugovanými vazbami se vyskytují v jedlých tucích jen stopově.^[4,7]

Zde mají pro člověka největší význam tzv. esenciální mastné kyseliny. Tyto kyseliny si člověk sám nedovede nasyntetizovat a musí je přijímat v potravě. Nenasycené esenciální mastné kyseliny jsou rozdělené do tří řad: n-3, n-6 a n-9. Číslovka označuje pořadí první dvojně vazby počítané od methylového konce molekuly. Důležitá je také poloha dvojně vazby *cis* a *trans*, která v jinak na počet uhlíků stejné kyselině může způsobovat naprosto rozdílné vlastnosti.^[1,9]

Polyénové mastné kyseliny jsou svými vlastnostmi podobné kyselinám monoénovým. Jsou však více náchylné k oxidaci na vzduchu a proto je lze udržet v původním stavu jen obtížně.^[2]

Rozdíl v nasycenosti mastných kyselin ovlivňuje vlastnosti tuků a olejů. Tuky s vysokým obsahem nasycených mastných kyselin mají vyšší teplotu tání a tím i větší stabilitu. Tuky s nenasycenými mastnými kyselinami mají naopak nižší stabilitu a nižší teplotu tání, což je ovlivněno blízkostí dvojně vazby ke karboxylové skupině.^[8] Díky tomuto jsou pro člověka nasycené mastné kyseliny hůře stravitelné než kyseliny

nenасыcené s výjimkou, kdy je dvojná vazba v neobvyklé poloze, jako u některých trans kyselin. Avšak jsou-li nasyčené mastné kyseliny konzumovány ve stravě společně s nenasycenými MK je jejich stravitelnost podstatně lepší. ^[4,5,7]

1.2.2 Zdravotní význam MK pro člověka

MK člověk přijímá v potravě většinou vázané v neutrálních lipidech (triacylglycerolech) nebo fosfolipidech. Po natrávení jsou volné MK vstřebány do micel za účasti solí žlučových kyselin. Po vstřebání do lymfy a následně do plasmy jsou MK v organismu k dispozici pro další využití. Lidský organismus je také schopen MK syntetizovat z acetylkoenzymu A postupným prodlužováním řetězce o dvouuhlíkaté zbytky. Některé MK si však organismus sám nesyntetizovat nedovede a musí je přijímat potravou. Tyto MK se nazývají esenciální a jsou důležité pro správnou látkovou výměnu, což má následně vliv například na správnou funkci pokožky, jater, ledvin atd. ^[7]

Pro člověka jsou nejdůležitějšími esenciálními kyselinami kyselina linolová (LA) a kyselina α -linolenová (LNA). Kyselina linolová je PUFA z řady n-6 vyskytující se nejčastěji v oleji slunečnicovém nebo sojovém oleji. Kyselina α -linolenová je PUFA z řady n-3. Lidský organismus je schopný z těchto kyselin, pomocí enzymů desaturáz a elongáz, vytvořit metabolity z obou řad.

Nenasycené mastné kyseliny jsou rozdělené do tří řad: n-3, n-6 a n-9. Číslovka označuje pořadí první dvojně vazby počítané od methylového konce molekuly. Důležitá je také poloha dvojně vazby *cis* a *trans*, která v jinak na počet uhlíků stejné kyselině může způsobovat naprosto rozdílné vlastnosti.

Z fyziologického hlediska je nejdůležitějším metabolitem LA kyselina arachidonová (C₂₀:4n-6). Významnými metabolity LNA jsou kyselina eikosapentaenová (EPA, C₂₀:5n-3) a kyselina dokosaheptaenová (DHA, C₂₂:6n-3). Důležitými metabolity obou řad jsou eikosanoidy s významnými fyziologickými funkcemi. Mohou tvořit např. leukotrieny syntetizované v cévních výstelkách nebo prostaglandiny vznikající v krevních destičkách a trombotaxany tvořené v leukocytech. Tyto druhy eikosanoidů mají vasoaktivní účinky. Mohou působit smršťování cév

(vasokonstrikce) nebo na jejich uvolňování (vasodilataci). Dále mohou mít vliv na shlukování krevních destiček.

Z tohoto vyplývá, že PUFA mohou působit na funkci a stav cév což se může projevit aterosklerozou. V tomto důsledku mají vliv na vznik srdečně-cévních onemocnění. Je zde však rozdíl mezi eikosanoidy z řady PUFA-6 a PUFA-3.

Metabolity PUFA-6 řady působí vasokonstrikčně, prozánětlivě a způsobují shlukování trombocytů. Přijímání těchto PUFA-6 ve stravě ve větší míře zvyšuje tyto rizika. Naopak metabolity PUFA-3 řady působí vasodilatačně, protizánětlivě a působí proti agregaci trombocytů. PUFA-3 tedy spíše snižují riziko vzniku srdečně-cévních onemocnění ale i rakoviny.

Fyziologické účinky mastných kyselin jsou sledovány ve vztahu k sérovému cholesterolu. Je prokázáno, že jeho hladinu zvyšují především nasycené mastné kyseliny a to kyseliny laurová (C 12:0), myristová (C 14:0) a palmitová (C 16:0). MUFA a PUFA mají naopak pozitivní účinek. Hladinu sérového cholesterolu navíc nepříznivě zvyšují i trans nenasycené mastné kyseliny, které mají v této souvislosti podobné účinky jako nasycené mastné kyseliny. Mohou zvyšovat hladiny LDL-cholesterolu a snižovat hladinu HDL-cholesterolu. Celkově zvyšují hladiny triacylglycerolů. Tyto uvedené faktory přispívají k vzniku srdečně-cévních chorob a navíc se spekuluje o možném karcinogenním účinku trans nenasycených mastných kyselin. Toto tvrzení však nebylo jednoznačně potvrzeno.

Kvantitativně jsou pro výživu člověka v potravinách nejdůležitější tyto kyseliny: SFA kyselina palmitová (C16:0), MUFA kyselina olejová (C18:1) a PUFA kyselina linolová (C18:2 n-6) a kyselina α -linolenová (C18:3n-6).

Nenasycené mastné kyseliny jsou z pohledu výživy člověka vnímány příznivě. Za zdraví prospěšný je považován vysoký příjem kyseliny olejové např. z olivového oleje. Trans nenasycené mastné kyseliny jsou, jak už bylo výše popsáno, pro zdraví člověka nebezpečné. V potravě je lidé přijímají převážně z margarínů. Ztužováním při jejich výrobě z rostlinných olejů dochází k nežádoucím změnám v cis a trans konfiguraci

dvojných vazeb. V dnešní době se o nepříznivých účincích hydrogenovaných tuků ví a snažíme se omezit jejich výrobu a příjem v potravě.^[9]

1.3 ROSTLINNÉ OLEJE

Rostlinné oleje spadají do skupiny homolipidů, nebo-li jednoduchých lipidů. Homolipidy jsou estery vyšších mastných kyselin a glycerolu (3-hydroxy-propanol). Glycerol může být substituován jedním až třemi mastnými kyselinami. Vznikají tak monoacylglyceroly, diacylglyceroly nebo triacylglyceroly. Právě triacylglyceroly (dříve nazývané jako triglyceridy) jsou nejčastější základní složkou přírodních tuků a olejů. Obecně se olejniny a oleje rozdělují do skupin podle převážného zastoupení hlavních MK na:

- Rostliny s vysokým obsahem kyseliny laurové – kokosový olej, olej z palmy olejně
- Rostliny s vysokým obsahem kyseliny olejové a linolové – olivový olej, slunečnicový olej, bavlníkový olej, olej z podzemnice olejně
- Rostliny s obsahem kyseliny linoleové – řepkový olej, lněný olej, sojový olej^[6,8,9]

1.3.1 Řepkový olej

Řadí se do skupiny olejů s velkým obsahem kyseliny linoleové. Řepkový olej v ČR patří k nejdůležitějším olejinám. Olej se získává ze semen řepky olejně (*Brassica Napus L.*), která obsahují okolo 42% řepkového oleje. Řepkový olej obsahuje okolo 58% kyseliny olejové, 20% kyseliny linolové a 8-12% kyseliny linolenové.^[1,16,17,18]

Klasická odrůda řepky obsahovala velké množství kyseliny erukové, až 55%. Tato kyselina může ve velkých dávkách působit na lidský organismus toxicky. Proto byla vyšlechtěna odrůda, tzv. bezeruková řepka olejná, ve které se podařilo snížit obsah kyseliny erukové pod 1%. Olej z takto upravené odrůdy je nazýván canola.^[7,19]

Tabulka č.1 : Zastoupení a % obsah MK v řepkovém oleji (kanola)^[1]

Mastná kyselina	%
Laurová	0,0
Kristová	0,0 – 0,2
Palmitová	3,3 – 6,0
Palmitoolejová	0,1 – 0,6
Stearová	1,1 – 2,5

olejová	52,0 – 66,9
Linolová	16,1 – 24,8
Linolenová	6,4 – 14,1
Arachová	0,2 – 0,8
Eikosanová	0,0 – 0,1
Eikosadienová	0,0 – 0,1
Bednová	0,1 – 0,5
Dokosenová	0,0 – 4,7
Dokosadienová	0,0 – 0,1
Lignocerová	0,0 – 0,2
tetrakosenová	0,1 – 0,4

1.3.2 Slunečnicový olej

Je řazen do skupiny se zvýšeným obsahem kyseliny linolové a olejové. Olej se získává ze semen slunečnice (*Helianthus annus*). Obsah tuku v jádře je 63%, v semeni až 43%.^[20]

Rozlišují se dva druhy slunečnic, a to slunečnice standardní a tzv. high oleic slunečnice (slunečnice s vysokým obsahem kyseliny olejové). Standardní slunečnice poskytuje olej s největším podílem kyseliny linolové (až 70%) a kyseliny olejové (15 – 40%).^[16,17]

High oleic slunečnice dává olej s obsahem kyseliny olejové až 80% a kyseliny linolové jen okolo 10%. Slunečnicový olej patří mezi nejdůležitější oleje ve výživě díky vysokému obsahu esenciální kyseliny.^[21]

Tabulka č.2 : Zastoupení a % obsah MK ve slunečnicovém oleji (high oleic)^[1]

Mastná kyselina	%
myristová	0,0
palmitová	3,0 – 5,0
palmitoolejová	< 0,2
stearová	3,0 – 5,0
olejová	70,0 – 87,0
linolová	3,0 – 20,0
linolenová	0,0

1.3.3 Olivový olej

Olivový olej je získáván z plodů olivovníku (*Olea europea*) lisováním nebo jinými mechanickými postupy. Dužina plodu obsahuje 40-60% oleje. Hlavní podíl tvoří kyselina olejová (až 80%) a kyselina linolová (až 20%). Dále je v olivovém oleji obsaženo zhruba 10–18% nasycených mastných kyselin, tvořených především kyselinou palmitovou a stearovou.^[17,19,22]

Podle způsobu zpracování se olivové oleje dělení na panenské, rafinované, oleje z pokrutin a směsi těchto druhů.

Panenské olivové oleje jsou mechanicky lisované za studena (50°C).

- Extra panenský olej (Extra virgin) je olej získaný pouze mechanickými postupy za mírného tlaku. Obsah volných kyselin je méně než 0,8 g na 100 g.
- Panenský olej (Virgin) je získáván pouze mechanickými postupy a obsah volných kyselin je méně než 2,0 g na 100 g.
- Obyčejný panenský olej má obsah volných kyselin do 3,3 g na 100 g.^[19]

V poslední době je považován za zdravější než ostatní oleje, protože obsahuje značné množství antioxidantů. Obliba také vzrůstá u panenských olivových olejů.

Rafinované olivové oleje jsou získány rafinací panenského oleje. Jsou lisovány za vysokého tlaku a teplot. Poté jsou chemicky upraveny. Obsah volných kyselin není víc než 0,5 g na 100 g.

Oleje z pokrutin jsou získány z olivových výlisků použitím různých rozpouštědel nebo jiných fyzikálních metod. Obsah volných kyselin v těchto olejích je do 1 g na 100 g.^[19,23,24]

Tabulka č. 3: Zastoupení a % obsah MK v olivovém oleji^[1]

Mastná kyselina	%
myristová	0,0 – 0,1
palmitová	7,5 – 20,0
palmitoolejová	0,3 – 3,5
stearová	0,5 – 5,0
olejová	55,0 – 83,1
linolová	3,5 – 21,0
linolenová	0,0 – 1,5

arachová	0,0 – 0,8
eikosenová	0,0
behenová	0,0 – 0,2
lignocerová	0,0 – 1,0

Zastoupení a % obsah MK v olivovém oleji^[1]

Přehled o obsahu nasycených, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin v olivovém, řepkovém a slunečnicovém oleji je uveden v následující tabulce č.4.

Tabulka č.4: Obsah mastných kyselin v olejích ^[9]

Druh oleje	Mastné kyseliny (% ze sumy veškerých MK)			
	SAFA	MUFA	PUFA	Poznámka
Olivový olej	8 - 25	55 - 85	4 - 20	
Slunečnicový olej	15	15 - 40	40 - 70	Kyselina linolová (LA)
Řepkový olej	5 - 10	50 - 75	20 - 40	LA i kyselina α -linolenová (LNA)

1.3.4 Výroba a získávání olejů

Získávání tuků a olejů se liší podle původu suroviny, podle toho jestli se jedná o produkty živočišné nebo rostlinné. V průmyslu se jedlé rostlinné oleje získávají ze semen olejnin. Avšak tuk je obsažen i v oplodí (perikarpu).

Tuk z olejnin se získává lisováním pod vysokým tlakem nebo extrakcí rozpouštědly, a to nejčastěji hexanem. V praxi se kombinují oba tyto způsoby. Nejprve se semena rozdrtí, poté se odvlhčí a záhřevem se rozpustí přítomné lipoproteiny. Pak se vločky připravené ze semen lisují, nejčastěji v kontinuálních šnekových lisech. Vzniklý šrot má obsah tuku 15 – 20% a extrahuje se v kontinuálně pracujících extraktorech. Zbylý extrahovaný šrot má obsah tuku 2 – 3% s vysokým podílem heterolpidů. Extrakcí se získá roztok, který obsahuje 20-30% v hexanu, tzv. miscela, ze které se rozpouštědlo oddestiluje a zbytky se odstraní destilací vodní párou. ^[1,25]

Získávání panenských olejů

Panenské oleje se získávají pouze lisováním bez předchozího záhřevu. Panenský olej se jen přefiltruje a nerafinuje. Tento způsob je nejvýznamnější při výrobě panenského olivového oleje.

Rafinace rostlinných olejů

Oleje ze semen získané lisováním a extrakcí mají nepříjemné organoleptické vlastnosti. Stále obsahují značné množství netukových složek a nečistot. Proto se následně rafinují (čistí), aby byly pro spotřebitele přijatelnější. ^[25]

Rafinace má tento postup:

- Odslizení (hydrataci)
- Odkyselení (neutralizaci)
- Bělení
- Dezodorace

Surový olej se nejdříve zbaví tuhých podílů, buď filtrací nebo odstředěním. Bílkoviny, sacharidy, rostlinné slizy, produkty oxidace MK a heterolipidy jsou odstraněny odslizením. Toto spočívá v záhřevu surového oleje s vodou nebo s roztoky kyselin a následném oddělení sraženiny.

Poté se olej zbaví volných MK alkalickou rafinací, což je neutralizace hydroxidem nebo uhličitanem sodným.

Při bělení bělicí hlinkou nebo jiným absorbentem se odstraní barviva (chlorofyly, karotenoidy) a zbytky mýdel vzniklých během odkyselení.

Těkavé látky, které jsou hlavním zdrojem nepříjemné chuti, se odstraní destilací s vodní párou za sníženého tlaku. Tímto způsobem získáme olej sensoricky neutrální.

U tzv. fyzikální rafinace se vynechá alkalická rafinace a volné MK se oddělí až při dezodoraci. Při rafinaci se částečně oddělí z oleje většina doprovodných látek a vzniklý rafinovaný olej je téměř čistá směs triacylglycerolů pouze s malým množstvím esterů glycerolu a některých nežádoucích látek (tokoferolů a fytoosterolů).

Rafinací se výživová hodnota oleje v podstatě nezmění. Dochází však k rozložení oxidačních produktů mastných kyselin a isomeraci polyenových kyselin při zahřívání.

[1]

1.4 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

1.4.1 Definice a princip plynové chromatografie

Plynová chromatografie (GC – GAS CHROMATOGRAPHY) je separační a současně analytickou metodou, umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu plynných vzorků, nebo také vzorků kapalných a tuhých, které lze před separací převést na páry.^[26]

Principem této metody je rozdělení složek směsi mezi dvě heterogenní fáze - pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). Mobilní fázi zde vždy tvoří nosný plyn a nepohyblivou buď tuhý absorbent (adsorpční plynová chromatografie), nebo kapalina – zakotvená fáze nanesená na pevném nosiči (rozdělovací plynová chromatografie).^[27]

Mobilní fáze (nosný plyn) putuje kolonou naplněnou sorbentem. Analyzovaný vzorek je do nosného plynu aplikován nástřikovým zařízením přes vyhřívanou nástřikovou komoru, kde dojde k jeho odpaření. Poté je nosným plynem odnášen do vyhřívané kolony. Zde dochází k separaci jednotlivých složek vzorku, které pak postupně vystupují z kolony a vstupují do detektoru. Výsledkem chromatografické separace je eluční křivka (pík), který vyjadřuje závislost odezvy detektoru na čase nebo objemu proteklé mobilní fáze.^[28]

Využití již nachází plynová chromatografie v rutinní analýze uhlovodíkových směsí. Používá se k analýze potravin a vody. V hygienických stanicích slouží k určování znečištění vzduchu. V klinické biochemii a toxikologii slouží pro dělení lipidů, steroidů, hormonů a dále pro stanovení a kontrolu čistoty léčiv ve farmaceutickém průmyslu. Důležitou úlohu má v analýze ropných produktů a při posuzování jejich kvality.^[29,28]

Metody plynové chromatografie jsou velmi citlivé a rychlé. Další výhodou je, že stačí nepatrné množství analyzovaných vzorků.^[27] Nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady nebo vysoká cena nosného plynu jako je tomu v případě helia.

V praxi se často také využívá účinné separační metody plynové chromatografie s velmi citlivou detekcí hmotnostním spektrometrem.^[28]

1.4.2 Přístrojové vybavení

Dělení probíhá v přístroji zvaném plynový chromatogram. Ten je výlučně vždy složen z těchto částí:

- zdroj a regulace proudu nosného plynu
- dávkovací systém (injektor)
- chromatografická kolona – chromatografické dělení, separace vzorku
- detektor – přeměna množství na signál (citlivost a selektivita)
- termostaty pro injektor, kolonu a detektor
- vyhodnocovací zařízení (zapisovač, počítač) elektronické zpracování, přepočet signálu na množství.^[28]

Nosný plyn

Nosný plyn plní funkci mobilní fáze, která unáší analyzovaný vzorek přes chromatografickou kolonu do detektoru. Nosný plyn by měl mít vlastnosti ideálního plynu. Musí být inertní k absorbentu, zakotvené fázi i k nosiči a chromatografickým složkám. Musí být zbaven vody, kyslíku a jiných nečistot. Musí být udržován konstantní průtok plynu. Ten je zajištěn pomocí systému jehlových ventilů, stabilizátorů tlaku a průtokoměrů. Zdrojem nosného plynu bývají tlakové láhve. Nejčastěji jsou plněny vodíkem, dusíkem, heliem nebo argonem. Výběr nosného plynu se přizpůsobuje detekčnímu zařízení, koloně ale také jeho toxicitě nebo pořizovací ceně. Výhodou dusíku je levnost, jednoduché čištění, bezpečná manipulace s ním a vyšší molekulová hmotnost. Nevýhodou je však malá tepelná vodivost. U vodíku se využívá dobré tepelné vodivosti, malé viskozity a levnosti. Hrozbou je jeho hořlavost a výbušnost při kontaktu se vzduchem. Jako nejlepší se jeví helium, které spojuje výhody dusíku i vodíku.^[27,30]

Dávkování vzorku

Dávkování je u dnešních chromatogramů prováděno automaticky. Umisťuje se těsně u vstupu do kolony nebo přímo na kolonu. Aby se využilo vysoké separační účinnosti kolony, dávkuje se co nejmenší množství vzorku. To je regulováno tzv. splitem.

Vzorek je do chromatogramu vpraven nástřikovým zařízením (injektorem), zvoleným podle skupenství analyzované látky. Kapaliny se dávkují především injekčními stříkačkami propíchnutím silikonového těsnění (septa) uzavírajícího vnitřní prostor dávkovače. Plyny je možno dávkovat dávkovacími kohouty nebo mikrostříkačkou. Tuhé látky se nejčastěji dávkují mikrostříkačkou po rozpuštění v těkavých rozpouštědlech. Aby nedošlo ke kondenzaci vzorku, musí být teplota dávkovače alespoň o 50°C vyšší než bod varu nejméně těkavé látky ve vzorku.^[29]

Chromatografické kolony

Základním prvkem chromatografických přístrojů jsou dělicí kolony a jejich vhodně zvolená náplň. Podle stacionární fáze se plynová chromatografie dělí na:

- Plynovou adsorpční chromatografii (GSC), plyn – pevná látka, kde probíhá adsorpce složek z plynné fáze na povrch absorbentu.
- Plynovou rozdělovací chromatografii (GLC), plyn - kapalina, kde probíhá dělení mezi plynnou fází a stacionární kapalnou fází. Tato metoda má větší a významnější uplatnění než GSC.

Podle konstrukce se rozlišují tyto dva typy kolon:

- Náplňové
- Kapilární

Pro konstrukci kolon se využívá trubic z různého materiálu, např. skla nebo nerezavějící oceli. Kolony jsou termostatem vyhřívány na určitou teplotu.^[27]

Kapalina jako stacionární fáze musí splňovat určité parametry. Nesmí reagovat s analyzovanou látkou. Musí být teplotně i chemicky stálá. Musí mít nízkou těkavost při pracovní teplotě. Rozpustnost složek vzorku v ní musí být různá.

Náplňové kolony jsou trubice nejčastěji vyrobené ze skla, oceli, mědi nebo niklu. Průměr těchto kolon je obvykle 2-5 mm a délka je 2-6 m. Náplň je buď absorbent (GSC) nebo nosič pokrytý kapalnou stacionární fází (GLC).^[31,32] Jako neaktivní nosiče pro zakotvenou fází se používá nejběžněji křemelina. Částice absorbentů a neaktivních

nosičů mají průměr od 0,13 až po 0,40 mm. Jako zakotvená fáze se používá netěkavých inertních kapalin, které se zakotvují na povrch nosiče v množství zhruba 5 – 25 hm% použitého nosiče. Dnes jsou na výběr stovky stacionárních fází. Např. stacionární fáze na bázi siloxanů a polyethylenglykolů, estery, uhlovodíky, silikony.

Kapilární kolony jsou kapiláry o vnitřním průměru 0,1-0,75 mm, o délce desítek až stovek metrů a tloušťce stacionární fáze 0,1-7 μm. Funkci nosiče zde zastávají stěny kapiláry, které jsou pokryty kapalnou stacionární fází. Pro výrobu těchto kolon se nejčastěji využívá taveného křemene, který chrání před povrchovým poškozením.

Z hlediska charakteru stacionární fáze nanesené na vnitřní straně kapiláry se rozlišují tyto typy kolon:

- WCOT (wall – coated open tubular column) s kapalnou stacionární fází.
- SCOT (support – coated open column) s kapalnou stacionární fází zakotvenou a na povrchu pevného nosiče na vnitřní straně kapiláry.
- PLOT (porous – layer open tubular column) s vrstvou pevného aktivního sorbentu na vnitřním povrchu kapiláry.^[33]

Pro analytické účely jsou kapilární kolony mnohem účinnější než kolony náplňové. Jsou však omezeny dávkováním malého množství vzorku v řádech 10^{-6} g.^[27,31,34]

Detektory

Detektorem je zařízení, které je schopno převést výsledky dělení z chromatografické kolony do registrované formy. Detektor je schopen svým signálem reagovat na analyzovanou látku i ve velkém zředění. K tomu se využívá fyzikálních a chemických vlastností, které nosný plyn s chromatografovaným vzorkem má.

Detektor je řazen za výstupem z kolony. Jeho teplota musí být opět vyšší než teplota kolony aby nedošlo ke kondenzaci nosného plynu. Ideální detektor musí mít velkou citlivost k analyzované látce v nosném plynu a měl by okamžitě reagovat na změny v nosném plynu.^[31]

Dříve se podle způsobu činnosti rozeznávaly detektory integrální a diferenciální. Integrální detektory reagují na celkové množství analyzované látky od začátku měření až do jeho ukončení a poskytuje záznam ve tvaru stupňovité křivky.

Dnes se používají výhradně detektory diferenciální, které mají okamžitou odezvu na sledovanou složku právě procházející detektorem. Údaje z těchto detektorů jsou v chromatogramu zaznamenány ve formě píků podobných Gaussově křivce.

U plynové chromatografie se využívá těchto detektorů:

- tepelně vodivostní detektor (TCD – Thermal Conductivity Detector)
- plamenově ionizační detektor (FID – Flame Ionization Detector)
- detektor elektronového záchytu (ECD – Electron Capture Detector)
- hmotnostní spektrometr (MS)

Pro analýzu methylesterů mastných kyselin (FAMES) je nejvhodnějším detektorem FID, který má kvantitativně stejnou odezvu na většinu FAMES, a MS, který je vhodný pro přesnou kvalitativní identifikaci příslušných FAMES.

FID je tvořený malým hořákem, ve kterém je spalována směs vodíku a vzduchu a do něhož je zaveden i výstup z chromatografické kolony. Proti ústí hořáku je umístěna kovová elektroda, na níž je vloženo napětí asi 300 V. pokud do plamene přichází jenom nosný plyn tak je množství nabitých částic, které vzniknou při hoření, zanedbatelné. Jestliže je v plameni spálena látka vystupující z chromatografické kolony, počet iontů a elektronů v prostoru detektoru vzroste. Vzroste také elektrická vodivost prostředí a zvýší se hodnota procházejícího proudu. Velikost výsledného signálu závisí na typu a koncentraci detegované látky. ^[34,35]

FID má dobrou odezvu na všechny organické látky a odezva úměrná počtu uhlíkových atomů v molekule.

Termostat

Rychlost pohybu dělených složek v koloně je závislá na teplotě. K dosažení přiměřených retenčních časů se musí kolna zahřívat na určitou teplotu. Rozsah dnešních termostatů je přibližně v rozmezí -70°C až 450°C . Pro konstantní průběh analýzy musí být teplota udržována s přesností $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Teplota kolony může být zvyšována kontinuálně nebo skokově. Při zvýšení teploty dochází ke zvýšení tlaku pak a tím k snížení retenčního času.^[31,36,37]

1.5 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE S DETEKČÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ (GC – MS)

Pro identifikaci a stanovení jednotlivých složek ze vzorku analyzovaného v plynovém chromatografu lze použít hmotnostní spektrometrii (MS - mass spectrometry).

1.5.1 Definice MS a princip GC-MS

Hmotnostní spektrometr je umístěn na konci chromatografické kolony a má funkci detektoru, který snímá hmotnostní spektrum analyzované látky, anebo měří hmotnost atomů nebo molekul v ionizovaném stavu.

Vzorek je plynovou chromatografií rozdělen na dvě složky. Rozdělené čisté látky poté vstupují do hmotnostního spektrometru.

V iontovém zdroji se molekuly dostávají do ionizovaného stavu. Vznikají pozitivně nabitě ionty, které se v elektrickém a magnetickém poli hmotnostního analyzátoru vychylují ze své dráhy v závislosti na své hmotnosti (m) a elektrickém náboji (z). Čím větší je molekulová hmotnost ionizované molekuly, tím více se v magnetickém poli vychyluje její dráha a čím větší nese elektrický náboj, tím rychleji letí. Následně jsou detekovány v detektoru. Všechny tyto děje probíhají v uzavřeném prostoru, kde je udržováno stálé vakuum 10^{-3} Pa až 10^{-6} Pa

Uvedenou technikou získáme hmotnostní spektra. Hmotnostní spektrum neznámé látky, kterou bychom chtěli identifikovat srovnáme se spektrem současně analyzované standardní látky nebo se spektrem z databank hmotnostních spekter.

. Kvantitativní i kvalitativní vyhodnocení složitých hmotnostních spekter se provádí pomocí výpočetní techniky, kterou jsou moderní přístroje vybaveny.^[39,37]

Využití nachází spojení těchto dvou metod v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, toxikologii a ekologii.^[40,41,42]

1.5.2 Přístrojové vybavení

Hmotnostní spektrometry jsou složeny z těchto hlavních částí:

- iontový zdroj - slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu
- analyzátor – slouží k separaci jednotlivých iontů na základě jejich m a z
- detektor - zaznamenává vyvolané nebo aktuální průchody iontů nebo jejich dopady a následně poskytuje signál úměrný jejich počtu počítačová jednotka^[38,39]

Další důležité části přístroje jsou vakuový systém, zařízení pro zavádění vzorků (sonda), iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů, počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat, porovnání spekter s knihovnou.^[33]

Způsoby ionizace

Základní podmínkou vzniku hmotnostních spekter je vznik iontů analyzované látky. K této ionizaci může dojít různými způsoby. Pro organickou analýzu uhlíkatých vzorků (tedy i mastných kyselin) je nejčastěji používána elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI). Ionizační zdroje obvykle pracují s 70 eV, což je dostatečná energie k ionizaci jakékoliv organické látky.^[39,42]

Elektronová ionizace nebo-li EI (Electron Ionization) je nejstarší a nejpoužívanější metodou ionizace. Vzorek převedený do plynné fáze je ionizován proudem elektronů, které jsou získávány z elektricky rozžhaveného kovového vlákna, nejčastěji wolframového, rheniového nebo platinového.^[38] Analyzovaná látka interaguje s proudem urychlených elektronů za vzniku radikalkationtu. Proud elektronů je směřován prostorem iontového zdroje směrem k anodě. Vznikající ionty jsou z prostoru iontového zdroje vytlačovány elektrickým polem pomocné elektrody (repeleru). Toto je tzv. tvrdá ionizační technika. Ionizace způsobená nárazem elektronů o vysoké energii,

způsobuje fragmentaci molekul analytu. To má za následek potlačení tvorby molekulového iontu, který je důležitý pro zjištění molekulové hmotnosti analyzované látky. [34,43]

Chemická ionizace nebo-li CI (Chemical Ionization) je měkká ionizační technika z plynné fáze. Dochází zde k nepřímé ionizaci molekuly reakcí s ionty reakčního plynu. Reakčními plyny mohou být např. methan, amoniak, isobutan nebo méně časté plyny jako propan, dusík nebo některé vzácné plyny (Ar, He). Jelikož je ho při ionizaci mnohokrát více než sledované látky tak dochází k tomu, že je ionizován přednostně. Vznikají ionty, které jsou v přebytku a reagují s molekulami vzorku. Vzniká kvazimolekulární iont (kladný nebo záporný). Je stabilnější než ionty vzniklé pomocí EI a také nedochází k jeho fragmentaci. [38,41,44]

Chemická ionizace acetonitrilem

Běžné metody nejsou schopny detegovat dvojně vazby v nenasycených methylesterech MK. Proto byla v nedávné době vyvinuta metoda chemické ionizace acetonitrilem (CH₃CN). Acetonitril reaguje v iontově molekulové reakci za vzniku aktivního reakčního iontu o m/z 54 (M+54)⁺, který dále reaguje s dvojnými vazbami analytu. Následným rozpadem primárních iontů vzniknou charakteristická hmotnostní spektra pro nasycené FAMES MH⁺ a pro nenasycené (MH - 32)⁺ a (MH - 32 - 18)⁺. Charakteristická spektra pro kyselinu palmitolejovou a erukovou jsou uvedeny v následující tabulce č.5 [45].

Tabulka č. 5: Tabulka m/z iontů vzniklých při CI acetonitrilem

MK	VZNIKLÉ IONTY A JEJICH m/z			
	(MH - 32- 18) ⁺	(MH - 32) ⁺	MH ⁺	(M+54) ⁺
Kyselina palmitolejová (C16:1)	219	237	269	322
Kyselina eruková (C22:1)	303	321	359	406

Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory umožňují separaci iontů podle poměru jejich m/z . Jsou umístěny mezi iontovým zdrojem a detektorem. Jednotlivé analyzátory využívají elektrických a magnetických sil k urychlování a usměrňování iontů.

Rozlišujeme několik druhů hmotnostních analyzátorů: kvadrupólový analyzátor, průletový analyzátor (TOF), ion-cyklonová rezonance (ICR), nebo iontovou past (ITD). Pro stanovení MK byl využit kvadrupólový analyzátor s iontovou pastí. Kvadrupolový filtr je složen ze čtyř tyčí hyperbolického nebo kruhového průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a střídavého napětí. Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyče, se dostanou do střídavého elektrického pole, kde začnou oscilovat. Kvadrupolový filtr je nastaven na určitou hodnotu m/z . Změnou vkládaných napětí je možné nechat projít filtrem postupně ionty v celém rozsahu m/z .

Iontová past umožňuje účinkem elektrického pole uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Ty jsou nuceny se uvnitř pohybovat po uzavřených kruhových drahách. S rostoucím napětím se ionty s rostoucím m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor iontové pasti směrem do detektoru. ^[34,38]

Detektory

Detektory jsou řazeny za výstupem z hmotnostních analyzátorů. Ionty namířené na detektor poskytují signál úměrný jejich dopadajícímu počtu. Jsou detekovány pomocí elektrického proudu, vznikajícího přímým dopadem těchto iontů anebo pomocí elektronového násobiče pracujícího na principu sekundární emise elektronů, kde dochází k zesilování primárního signálu. Výsledkem je záznam iontů v závislosti na poměru jejich m/z zaznamenaných do tzv. hmotnostního spektra. ^[34,38]

1.6 PŘÍPRAVA VZORKU PŘED ZAVEDENÍM DO GC

Před analýzou mastných kyselin plynovou chromatografií musí být MK obsažené v olejích převedeny na těkavé a stabilní nízkomolekulární nepolární deriváty. Nejčastěji na methylestery mastných kyselin (FAMES). Získání nepolárních derivátů metylesterů se dá dosáhnout různými kroky např. esterifikací, hydrolýzou, extrakcí apod. Jedná se o postupy, kdy jsou odstraněny jiné polární funkční skupiny nebo aktivní vodíkové atomy, které by mohly zabránit správné identifikaci. A naopak někdy mohou být do analyzované látky zavedeny funkční skupiny, které by mohly napomoci v detekci. V této závislosti se poté volí vhodná metoda a rozpouštědlo.

K derivatizaci lipidů a extrakci metylesterů mastných kyselin se nejčastěji používá kyselá a bazicky katalyzovaná esterifikace.^[46]

1.6.1 Kyselá katalyzovaná esterifikace

Volné mastné kyseliny jsou esterifikovány v přebytku bezvodého metanolu za přítomnosti kyselého katalyzátoru. Vzorek musí být zbaven vody, která by mohla zabránit správné reakci. Nejběžnějším činidlem je 5 % bezvodý chlorovodík v methanolu, připravovaným probubláváním chlorovodíku methanolem. Vzorky jsou poté zahřívány na teplotu přes 50°C pod zpětným chladičem po dobu zhruba 2 hodin. Dalším vhodným činidlem je 1-2% kyselina sírová. Ta esterifikuje lipidy stejným způsobem jako předchozí 5 % bezvodý chlorovodík v metanolu. Mělo se však dát pozor aby nedošlo k rozkladu polynenasycených mastných kyselin. Mezi další činidla patří (12-14%) roztok fluoridu boritého v metanolu. Toto činidlo sice působí rychle ale má velmi omezenou trvanlivost a má za následek vznik nežádoucích artefaktů a výraznou ztrátu polynenasycených mastných kyselin. Nepolární lipidy, jako cholesterol nebo estery triacylglycerolů, jsou převážně nerozpustné v metanolvých rozpouštědlech. Esterifikace trvá velmi dlouho a musí se přidávat další rozpouštědla. K tomu se využívalo dříve benzenu, který je však velmi toxický. Dnes se používá toluen nebo tetrahydrofuran. Tímto způsobem jsou vzniklé methylestrey mastných kyselin

extrahovány do organických rozpouštědel, hexanu nebo heptanu. Oddělená uhlovodíková vrstva se dále vysušuje bezvodým síranem sodným.

1.6.2 Bazicky katalyzovaná esterifikace

Lipidy jsou rychlým způsobem, během několika minut, esterifikovány v bezvodém metanolu s bazickým katalyzátorem. Nejběžnějším činidlem je 0,5M metoxid sodný nebo hydroxid draselný v bezvodém metanolu. Reakce je poměrně rychlá, okolo 10 minut. Vzorky s metoxidem jsou opět zahřívány na teplotu přes 50°C. volné mastné kyseliny jsou jako u kyselé esterifikace extrahovány do hexanu. Pomocí pipety je odebrána vrstva hexanu s methylestery mastných kyselin a k vysušení se přidá bezvodý síran sodný. Jestliže jsou ve vzorku obsaženy nepolární lipidy, přidá se opět další rozpouštědlo, toluen nebo tetrahydrofuran.

1.6.3 Speciální případy přípravy methylesterů mk

U dalšího způsobu přípravy FAMEs se využívá diazomethanu. Diazomethan reaguje rychle s neesterifikovanými mastnými kyselinami v přítomnosti už malého množství metanolu, který katalyzuje reakci k tvorbě methylesterů. Činidlo je připravováno ve formě roztoku. Je však krátkodobě stabilní a kromě toho při jeho použití vznikají velmi karcinogenní meziprodukty (nitrosaminy).

Poněkud odlišného postupu se používá při přípravě esterů mastných kyselin s krátkými řetězci. Mohou být připraveny i výše popsanými postupy ale je obtížné je extrahovat do rozpouštědel kvůli jejich těkavosti a rozpustnosti ve vodě. Měly by také být vynechány kroky se zahříváním. Nejlepší metoda je navržena Christophersonem a Glassem. Vzorek lipidu je přímo rozpuštěn v hexanu. Přidá se 0,5M roztok metoxidu v metanolu. Vzniklá směs se lehce protřepe a nechá se stát při pokojové teplotě. Poté se přidá kyselina octová a bezvodý chlorid vápenatý. Po zhruba hodině se směs odstředí a je připravená k analýze plynovou chromatografií.^[34]

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cílem práce bylo seznámit se s metodou plynové chromatografie s využitím detekce hmotnostním spektrometrem a aplikovat tuto metodu při stanovení spektra mastných kyselin ve vybraných potravinářských olejích.

3. Metodika

3.1 Zvolený materiál

Materiálem pro kvantitativní stanovení mastných kyselin byly vybrány potravinářské oleje běžně dostupné v českých obchodních řetězcích. Jednalo se o dva olivové oleje (Minerva, Ondoliva), tři řepkové oleje (Manka, Lukana, Rapso) a tři oleje slunečnicové (Vegetol Gold, Slunka, Vénusz). Podrobnější informace jsou uvedeny v níže v tabulce č. 6.

Jednotlivé vzorky olejů byly odebrány ve třech sériích 4.7.2011, 12.10.2011 a 23.2.2012. Při každém měření byly z každého jednoho oleje odebrány tři vzorky. Celkově byly tedy mastné kyseliny stanovovány v 72 vzorcích.

Ve třetím měření byl místo slunečnicového oleje Slunka (kvůli jeho nedostupnosti) měřen slunečnicový olej Slunka na smažení.

Tabulka č. 6: Základní informace o použitém materiálu

Druh oleje	Název oleje	Výrobce
Olivový	Minerva	Minerva S.A. Edible Oils, Řecko
	Odoliva	Urzante, S.L., Španělsko
Slunečnicový	Vegetol Gold	Ústí Oils s.r.o., ČR
	Slunka, Slunka (na smažení)	Fabio Produkt spol. s.r.o., ČR
	Vénusz	Bunge Zrt., Maďarsko
Řepkový	Lukana	Ústí Oils s.r.o. ČR
	Manka	Fabio Produkt spol. s.r.o., ČR
	Rapso	Rapso, Rakousko

3.2 Použité metody

Použitou metodou byla plynová chromatografie s využitím MS-CI a MS-EI detekce pro identifikaci.

Byl použit plynový chromatograf Typ 3800 firmy Varian Techtron (USA) a hmotnostní spektrometr Typ 4000 firmy Varian Techtron (USA) s využitím standard firmy Supelco, Supleco 37 Component FAME Mix 47885-U.

Nastavení přístrojů je uvedeno níže v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Nastavení přístrojů

Nastavení plynového chromatografu	
Typ chromatografu	Typ 3800 firmy Varian Techtron (USA)
Použitá kolona	Select FAME CP 7419 <ul style="list-style-type: none">• pro analýzu FAME• délka – 50m• průměr – 0,25 mm
Split	10
Teplota injektoru	250°C
Teplota termostatu	Programovatelná teplota <ul style="list-style-type: none">• 170°C – bez nárůstu teploty, se zadržením na 6 min po celkovou dobu 6 min• 190°C – s nárůstem 2°C/min, bez zádrže po celkovou dobu 16,0 min• 210°C – s nárůstem 25°C/min, se zadržením na 15,2 min po celkovou dobu 32,0 min
Celková doba analýzy jednoho vzorku	30,01 min
Průtok He	1,5 ml/min
Nastavení FID	
Teplota detektoru FID	250°C
Make-up	25 ml/min
H ₂ Flow	30 ml/min
Air Flow	300 ml/min
Nastavení MS	
(byly použity standardní parametry pro CI acetonitrilem od firmy Varian)	
Typ hmotnostního spektrometru	Typ 4000 firmy Varian Techtron (USA)
Chemická ionizace	Acetonitril

Snímání m/z	70-450
Mrtvý čas	4,1 min

Chemikálie:

- Petrolether
- Bezvodný síran sodný
- 2M roztok KOH/CH₃OH
- 1M roztok HCl/CH₃OH

Pomůcky:

- Analytické váhy
- Vodní lázeň
- Vzorkovací lahvičky
- Pipety
- Lžičky

Pracovní postup při přípravě vzorků před zavedením do GC:

U vybraného potravinářského oleje jsem odebrala tři vzorky, každý o hmotnosti 5mg. Toto množství jsem navázila na analytických vahách do malých vzorkovacích lahviček.

Po navážení jsem ke každému vzorku přidala 1 ml petrolétheru, malou lžičku bezvodného síranu sodného, který odstraní ze vzorku vodu, a 0,2 ml 2M roztoku KOH/CH₃OH. Tyto kroky slouží k zásadité derivatizaci vzorku.

Důkladně uzavřené lahvičky jsem vložila do vodní lázně o teplotě 60°C, kde byly za stálého třepání (urychlení derivatizace) po dobu 2 minut. Po uplynutí dvou minut ve vodní lázni jsem lahvičky vyjmula a nechala vychladnout.

Následně jsem přidala 0,4ml 1M roztoku HCl/CH₃OH, který zneutralizoval přebytek hydroxidu draselného. K naředění směsi jsem přidala 2 ml petrolétheru a lahvičky jsem promíchala, aby došlo k oddělení 2 fází.

Nakonec jsem odebrala 1,5 ml vzorku z horní vrstvy a uzavřela jej do malé vzorkovací lahvičky. Takto upravený vzorek jsme vložili do autosampleru přístroje k analýze.

3.3 Statistické zpracování

Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí statistických programů Microsoft Excel a StatSoft CR. s.r.o. v Programu Statistica, verze 9.1 .

4. Výsledky

Pro účely stanovení byly výsledky upraveny. V grafech č.1 - 8 jsou uvedeny pouze kyseliny, kterých bylo ve vybraných olejích více než 0,5 %. Jak je vidět v tabulce č.8 u slunečnicového oleje Vegetol Gold, tak nízké hodnoty naměřených mastných kyselin jsou zatíženy velkou relativní chybou.

Tabulka č.8: Relativní chyba u výsledků Slunečnicového oleje Vegetol Gold

Relativní chyba výsledků Slunečnicového oleje Vegetol Gold						
Slunečnicový olej Vegetol Gold				Průměr	Směrodatná odchylka	Relativní chyba
Mastná kyselina	% zastoupení mastných kyselin					
	1. měření	2. měření	3. měření			
linolová	59,96	63,18	64,61	62,58333	1,684137	2,69%
olejová	27,54	23,95	22,21	24,56667	1,921904	7,82%
palmitová	6,71	6,77	6,9	6,793333	0,068678	1,01%
stearová	3,15	3,56	3,59	3,433333	0,173829	5,06%
vakcenová	0,79	0,75	0,65	0,73	0,05099	6,98%
behenová	0,62	0,74	0,66	0,673333	0,043205	6,41%
arachová	0,23	0,24	0,23	0,233333	0,004082	1,79%
18ctiuhlíkové trans kyseliny	0,24	0,19	0,8	0,41	0,239479	58,40%
eikosenová	0,16	0,15	0,16	0,156667	0,004082	2,60%
palmitolejová	0,11	0,09	0,07	0,09	0,014142	15,71%
α-linolenová	0,1	0,06	0,12	0,093333	0,021602	23,14%
myristová	0,12	0,07	0,07	0,086667	0,020412	23,55%
eruková	0	0	0	0	0	0%

4.1 Olivové oleje

Tabulka č. 9: Olivový olej Minerva

Olivový olej Minerva			
Mastná kyselina	% zastoupení mastných kyselin		
	1. měření	2. měření	3. měření
myristová	0,03	0	0,03
palmitová	12,84	12,35	12,68
palmitolejová	0,84	0,8	0,82
stearová	2,74	2,79	2,76
C18:xt	0,5	0	0
olejová	72,77	73,49	73,17
vakcenová	2,69	2,59	2,56
linolová	6,29	6,19	6,19
α -linolenová	0,73	0,7	0,72
arachová	0,48	0,48	0,48
eikosenová	0,28	0,29	0,29
behenová	0,15	0,16	0,15
eruková	0	0	0

Z tabulky č. 9 a z grafu č.1 je patrné, že olivový olej Minerva obsahoval nejvíce kyseliny olejové, 72,77 -73,49 %. Dále pak obsahoval 12,35 – 12,84 % kyseliny palmitové, 6,19 – 6,29 % kyseliny linolové, 2,74 – 2,79 kyseliny stearové a 2,56 – 2,69 % kyseliny vakcenové. Kyseliny palmitolejové bylo 0,8 – 0,84 % a kyseliny α -linolenové 0,7 – 0,73 %. Méně než 0,5 % pak byly zastoupeny kyseliny myristová, arachová, eikosenová, behenová, eruková a všechny 18ctihlíkové trans kyseliny.

Obsah zjištěných mastných kyselin v olivovém oleji Minerva je uveden v grafu č.1.

Graf 1: Zastoupení a % obsah mastných kyselin v olivovém oleji Minerva



Tabulka č.10 : Olivový olej Minerva

Olivový olej Ondoliva			
Mastná kyselina	% zastoupení mastných kyselin		
	1. měření	2. měření	3. měření
myristová	0	0	0
palmitová	11,15	10,42	12,01
palmitolejová	0,8	0,65	0,84
stearová	3,6	3,29	2,91
C18:xt	0,05	0	0
olejová	75,03	77,69	73,56
vakcenová	2,64	2,41	2,65
linolová	5,28	4,19	6,44
α -linolenová	0,61	0,54	0,61
arachová	0,39	0,36	0,40
eikosenová	0,22	0,22	0,26
behenová	0,1	0,1	0,11
eruková	0	0	0

Z údajů v tabulce č.10 a grafu č.2 lze vyčíst, že olivový olej Ondoliva obsahoval 73,56 – 77,69 % kyseliny olejové, 10,42 – 12,01 % kyseliny palmitové, 4,19 – 6,44 % kyseliny linolové, 2,91 – 3,6 % kyseliny stearové a 2,41 – 2,65 % kyseliny vakcínové. Dále v něm bylo obsaženo 0,65 – 0,84 % kyseliny palmitolejové a 0,54 – 0,61 % kyseliny α -linolenové. Méně než 0,5 % pak byly zastoupeny kyseliny myristová, arachová, eikosenová, behenová, eruková a všechny 18tiuhlíkové trans kyseliny.

Obsah zjištěných mastných kyselin v olivovém oleji Ondoliva je uveden v grafu č.2.

Graf 2: Zastoupení a % obsah mastných kyselin v olivovém oleji Ondoliva



4.2 Řepkové oleje

Tabulka č.11 : Řepkový olej Rapso

Řepkový olej Rapso			
Mastná kyselina	% zastoupení mastných kyselin		
	1. měření	2. měření	3. měření
myristová	0,06	0,23	0,07
palmitová	4,78	5,18	4,85
palmitolejová	0,22	0,28	0,21
stearová	1,73	2,08	1,7
C18:xt	0,38	0,44	0,41
olejová	59,51	58,15	59,23
vakcenová	3,63	3,47	3,57
linolová	18,53	18,61	18,69
α -linolenová	8,53	8,78	8,64
arachová	0,62	0,62	0,62
eikosenová	1,18	1,27	1,23
behenová	0,32	0,34	0,32
eruková	0,03	0,07	0,06

Řepkový olej Rapso obsahoval 58,15 – 59,51 % kyseliny olejové, 18,53 – 18,69 % kyseliny linolové, 8,53 – 8,78 % kyseliny α -linolenové, 4,78 – 5,18 % kyseliny palmitové, 3,47 – 3,63 % kyseliny vakcenové, 1,7 – 2,08 % kyseliny stearové, 1,18 – 1,27 % kyseliny eikosanové a 0,62 % kyseliny arachové. Z tabulky č. 11 je dále patrné, že řepkový olej Rapso obsahoval méně než 0,5 % kyseliny myristové, palmitolejové, behenové, erukové a všech 18ctiuhlíkových trans kyselin.

Obsah zjištěných mastných kyselin v řepkovém oleji Rapso je uveden v grafu č.3.

Graf 3: Zastoupení a % obsah mastných kyselin v Řepkovém oleji Rapso



Tabulka č.12 : Řepkový olej Manka

Řepkový olej Manka			
Mastná kyselina	% zastoupení mastných kyselin		
	1. měření	2. měření	3. měření
myristová	0,07	0,07	0,07
palmitová	4,73	4,66	4,92
palmitolejová	0,23	0,22	0,21
stearová	1,77	1,84	1,82
C18:xt	1,21	0,96	0,42
olejová	57,29	58,05	54,42
vakcenová	3,72	3,52	3,32
linolová	19,99	19,88	24,57
α -linolenová	8,28	7,92	7,79
arachová	0,57	0,59	0,53
eikosenová	1,22	1,25	1,08
behenová	0,29	0,32	0,32
eruková	0,16	0,14	0,1

Z tabulky č. 12 a grafu č.4 je patrné, že řepkový olej Manka obsahoval nejvíce kyseliny olejové, 54,42 – 58,05 %. Dále pak obsahoval 19,88 – 24,57 % kyseliny linolové, 7,79 – 8,28 % α -linolenové, 4,66 – 4,92 % kyseliny palmitové a 3,32 – 3,72 % kyseliny vakcenové. Kyseliny stearové bylo ve vzorku 1,77 – 1,82 %, kyseliny eikosanové 1,08 – 1,25 %, kyseliny arachové 0,53 – 0,59 % a všech 18ctiuhlíkových trans kyselin 0,42 – 1,21 %. Méně než 0,5 % pak byly zastoupeny kyseliny myristová, palmitolejová, behenová a eruková.

Obsah zjištěných mastných kyselin v řepkovém oleji Manka je uveden v grafu č.4.

Graf 4: Zastoupení a % obsah mastných kyselin v Řepkovém oleji Manka



Tabulka č.13 : Řepkový olej Lukana

Řepkový olej Lukana			
Mastná kyselina	% zastoupení mastných kyselin		
	1. měření	2. měření	3. měření
myristová	0,06	0,06	0,06
palmitová	4,86	4,81	4,94
palmitolejová	0,22	0,22	0,22
stearová	1,75	1,79	1,72
C18:xt	0,88	0,95	0,85
olejová	57,37	57,47	57,89
vakcenová	3,61	3,53	3,55
linolová	20,24	20,06	20,14
α -linolenová	7,71	7,92	7,82
arachová	0,6	0,59	0,57
eikosenová	1,43	1,42	1,24
behenová	0,31	0,31	0,3
eruková	0,49	0,4	0,28

Z údajů v tabulce č. 13 a grafu č.5 lze vyčíst, že řepkový olej Lukana obsahoval 57,37 – 57,89 % kyseliny olejové, 20,06 – 20,24 % kyseliny linolové, 7,71 – 7,92 % kyseliny α -linolenové, 4,81 – 4,94 % kyseliny palmitové, 3,53 – 3,61 % kyseliny vakcenové a 1,72 – 1,79 % kyseliny stearové. Dále v něm bylo obsaženo 1,24 – 1,43 % kyseliny eikosenové, 0,85 – 0,95 % všech 18ctiuhlíkových trans kyselin a 0,57 – 0,6 % kyseliny arachové. Méně než 0,5 % pak byly zastoupeny kyseliny myristová, palmitolejová, behenová, a eruková.

Obsah zjištěných mastných kyselin v řepkovém oleji Lukana je uveden v grafu č.5.

Graf 5: Zastoupení a % obsah mastných kyselin v Řepkovém oleji Lukana



4.3 Slunečnicové oleje

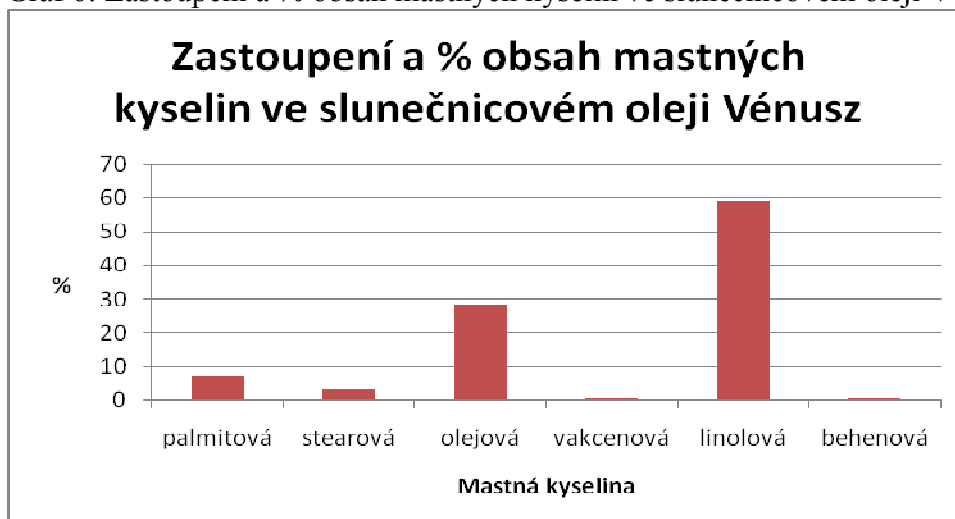
Tabulka č.14 : Slunečnicový olej Vénusz

Slunečnicový olej Vénusz			
Mastná kyselina	% zastoupení mastných kyselin		
	1. měření	2. měření	3. měření
myristová	0,09	0,08	0,08
palmitová	6,68	6,28	6,82
palmitolejová	0,1	0,08	0,08
stearová	3,2	3,25	3,53
C18:xt	0,49	0,21	0,21
olejová	28,38	28,48	23,8
vakcenová	0,77	0,77	0,7
linolová	58,9	59,45	63,37
α -linolenová	0,1	0,06	0,07
arachová	0,23	0,23	0,23
eikosenová	0,14	0,15	0,15
behenová	0,67	0,71	0,7
eruková	0	0	0

Z údajů v tabulce č. 14 a v grafu č.6 lze vyčíst, že slunečnicový olej Vénusz obsahoval 58,9 – 63,37 % kyseliny linolové, 23,8 – 28,48 % kyseliny olejové, 6,28 – 6,82 % kyseliny palmitové, 3,2 – 3,53 % kyseliny stearové. Kyseliny vakcenové bylo 0,7 – 0,77 % a kyseliny behenové 0,67 – 0,71 %. Méně než 0,5 % pak byly zastoupeny kyseliny myristová, palmitolejová, α -linolenová, arachová, eikosenová, eruková a všechny 18ctiuhlíkové trans kyseliny.

Obsah zjištěných mastných kyselin ve slunečnicovém oleji Vénusz je uveden v grafu č.6.

Graf 6: Zastoupení a % obsah mastných kyselin ve slunečnicovém oleji Vénusz



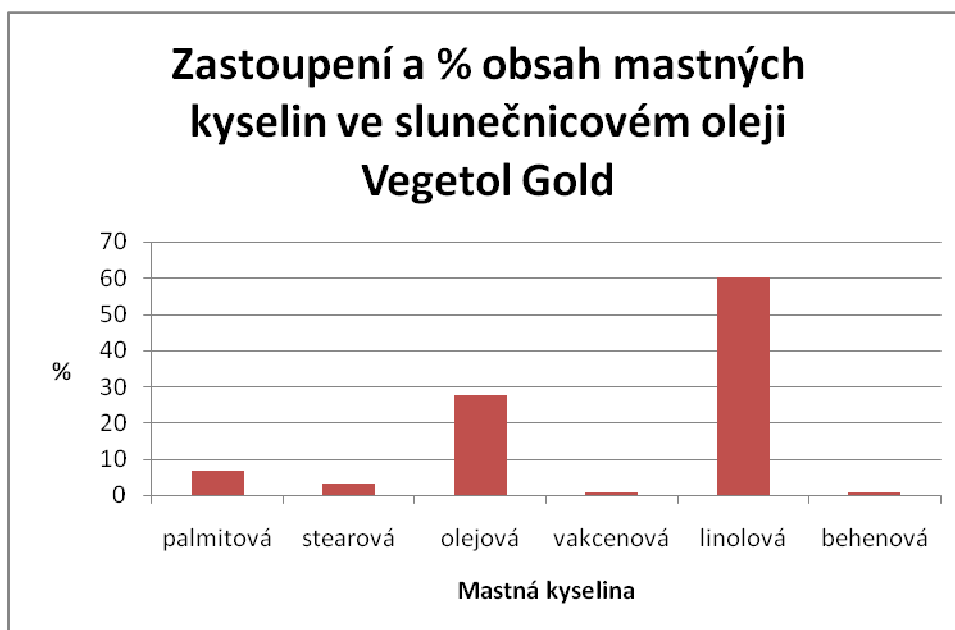
Tabulka č.15 : Slunečnicový olej Vegetol Gold

Slunečnicový olej Vegetol Gold			
Mastná kyselina	% zastoupení mastných kyselin		
	1. měření	2. měření	3. měření
myristová	0,12	0,07	0,07
palmitová	6,71	6,77	6,9
palmitolejová	0,11	0,09	0,07
stearová	3,15	3,56	3,59
C18:xt	0,24	0,19	0,8
olejová	27,54	23,95	22,21
vakcenová	0,79	0,75	0,65
linolová	59,96	63,18	64,61
α -linolenová	0,1	0,06	0,12
arachová	0,23	0,24	0,23
eikosenová	0,16	0,15	0,16
behenová	0,62	0,74	0,66
eruková	0	0	0

Z tabulky č. 15 a grafu č.7 je patrné, že slunečnicový olej Vegetol Gold obsahoval nejvíce kyseliny linolové, 59,96 – 64,61 %. Dále pak obsahoval 22,21 – 23,95 % kyseliny olejové, 6,71 – 6,9 % palmitové, 3,15 – 3,59 % kyseliny stearové, 0,65 – 0,79 % kyseliny vakcenové a 0,62 – 0,74 % kyseliny behenové. Méně než 0,5 % pak byly zastoupeny kyseliny myristová, palmitolejová, α -linolenová, arachová, eikosenová, eruková a všechny 18ctiuhlíkové trans kyseliny.

Obsah zjištěných mastných kyselin ve slunečnicovém oleji Vegetol Gold je uveden v grafu č.7.

Graf 7: Zastoupení a % obsah mastných kyselin ve slunečnicovém oleji Vegetol Gold



Tabulka č.14 : Slunečnicový olej Slunka a Slunka na smažení

Slunečnicový olej Slunka			
Mastná kyselina	% zastoupení mastných kyselin		
	1. měření	2. měření	3. měření – Slunka na smažení
myristová	0,08	0,06	0,28
palmitová	6,24	5,93	4,75
palmitolejová	0,07	0,06	0,26
stearová	3,67	3,44	3,2
C18:xt	0,73	0,28	0,52
olejová	25,32	26,72	77,26
vakcenová	0,8	0,89	1,26
linolová	61,07	60,57	10,49
α -linolenová	0,61	0,62	0,15
arachová	0,26	0,26	0,26
eikosenová	0,22	0,21	0,35
behenová	0,68	0,68	0,82
eruková	0	0	0

Slunečnicový olej Slunka obsahoval nejvíce kyseliny linolové 60,57 – 61,07 %. Dále obsahoval 25,32 – 26,72 % kyseliny olejové, 5,93 – 6,24 % kyseliny palmitové, 3,44 – 3,67 % kyseliny stearové, 0,8 – 0,89 % kyseliny vakcenové, 0,68 % kyseliny behenové, 0,61 – 0,62 % kyseliny α -linolenové a 0,28 – 0,73 % všech 18ctiuhlíkových trans mastných kyselin. Méně než 05 % pak bylo kyseliny myristové, palmitolejové, arachové a erukové.

Naopak ve slunečnicovém oleji Slunka na smažení bylo nejvíce kyseliny olejové 77,26 %. Následně pak obsahoval 10,49 % kyseliny linolové, 4,75 % kyseliny palmitové, 3,2 % kyseliny stearové, 1,26 % kyseliny vakcenové, 0,82 % kyseliny behenové a 0,52 % všech 18ctiuhlíkových trans mastných kyselin. Méně než 0,5 % obsahoval kyseliny myristové, palmitolejové, α -linolenové, arachové, eikosanové.

Obsah zjištěných mastných kyselin ve slunečnicovém oleji Slunka a Slunka na smažení je uveden v grafu č.8.

Graf 8: Zastoupení a % obsah mastných kyselin ve slunečnicovém oleji Slunka a Slunka na smažení



*Řada 1 – Slunka, Řada 2 – Slunka na smažení

Graf č. 9: Zastoupení a % obsah mastných kyselin v olivových, řepkových a slunečnicových olejích



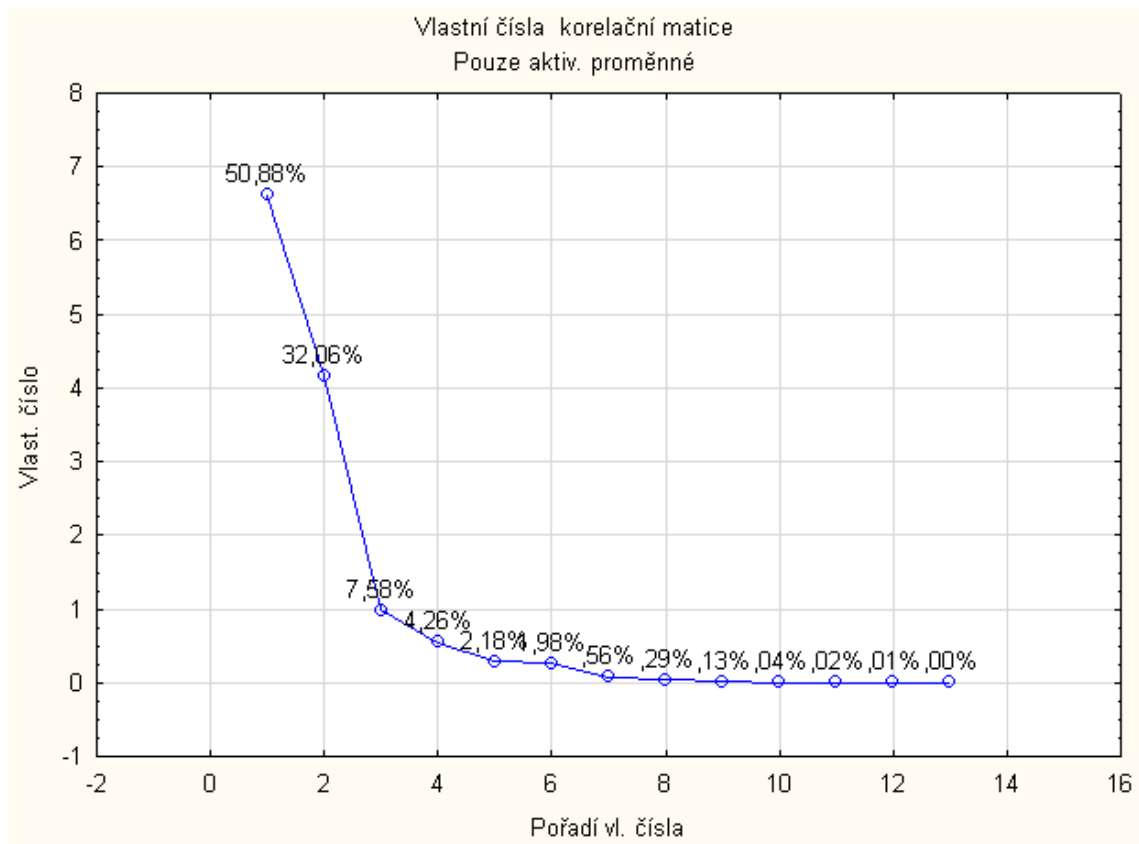
*Řada 1 – olivový olej, Řada 2 – řepkový olej, Řada 3 – slunečnicový olej

Graf č.9 ukazuje pro porovnání zastoupení a % obsah mastných kyselin v olivových, řepkových a slunečnicových olejích. Jsou zde uvedeny jen mastné kyseliny, kterých bylo v každém druhu oleje více než 0,5 %. Záměrně v něm není uveden slunečnicový olej Slunka, který dosahoval jiných hodnot než zbylé slunečnicové oleje Slunka.

Kyselina palmitové bylo v olivovém oleji (11,90 %), v řepkovém oleji (4,85 %) a ve slunečnicovém oleji (6,54 %). Kyseliny stearové bylo v olivovém oleji (3,01 %), v řepkovém (1,80 %) a ve slunečnicovém oleji (3,42 %). Kyseliny olejové bylo v olivovém oleji (74,28 %), v řepkovém oleji (57,70 %) a ve slunečnicovém oleji (25,80 %). Kyseliny vakcenové bylo v olivovém oleji (2,59 %), v řepkovém oleji (3,54 %) a ve slunečnicovém oleji (0,76 %). Kyseliny linolové bylo v olivovém oleji (5,76

%), v řepkovém oleji (20,07 %) a ve slunečnicovém oleji (61,38 %). Kyseliny α -linolenové bylo v olivovém oleji (0,65 %), v řepkovém oleji (8,15 a ve slunečnicovém oleji (0,21 %)

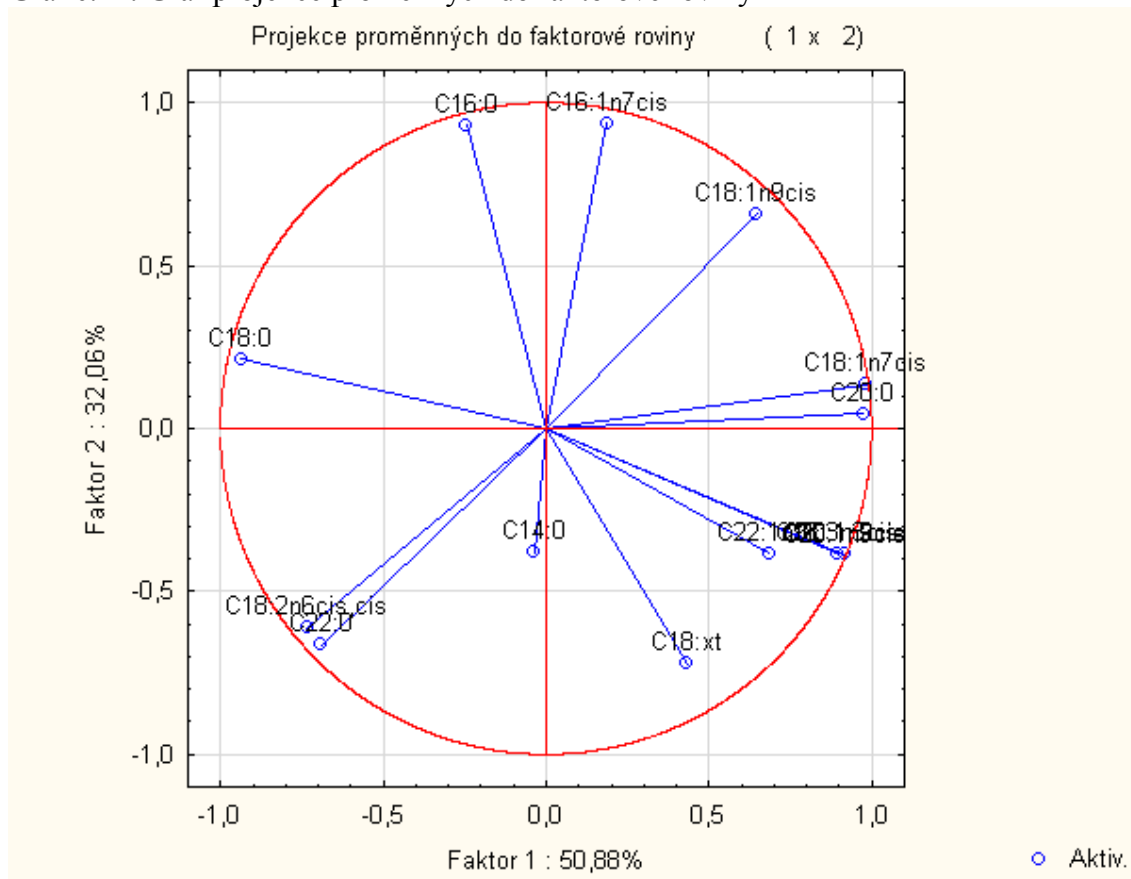
Graf č. 10: Sutinový graf Analýzy hlavních komponent



Cílem analýzy hlavních komponent bylo zjednodušit popis skupiny vzájemně lineárně závislých dat (proměnných, v tomto případě výsledků měření mastných kyselin). Dochází k transformaci původních proměnných (dat) na nové znaky – hlavní komponenty, které lépe vystihují původní proměnné. Většina informací o původních proměnných je soustředěna do prvních hlavních komponent a nejméně je popsáno v posledních komponentách. Platí, že má-li nějaká komponenta malý rozptyl, tak ztrácí vypovídající hodnotu o celkových původních proměnných.

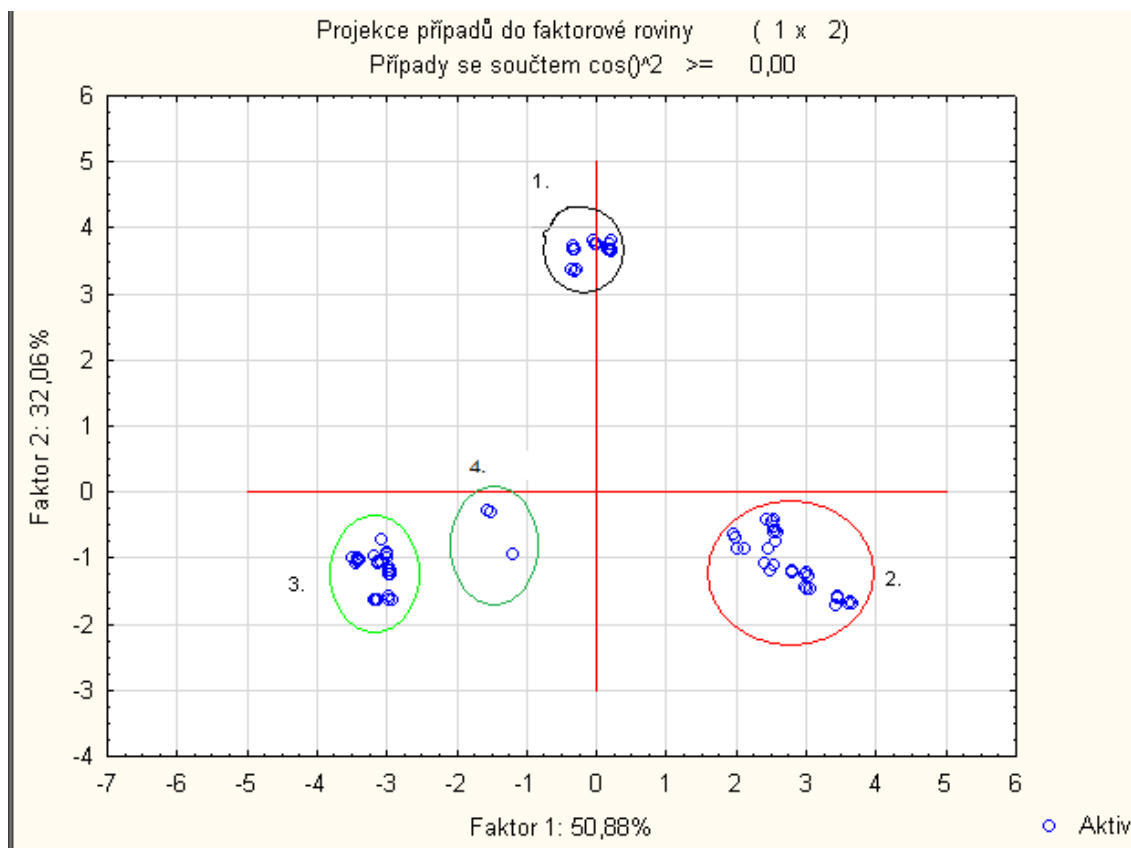
V grafu č.10 je vidět, že výsledky obsahů mastných kyselin v olejích jsou soustředěny do dvou hlavních komponent (nazývaných Faktory). Faktor 1. Ukazuje, že 50,88 % všech proměnných má společné hodnoty. A Faktor 2. ukazuje na 32,06 % společných hodnot pro výsledky.

Graf č.11: Graf projekce proměnných do faktorové roviny



V grafu č.11 jsou promítnuty proměnné (mastné kyseliny) do faktorové roviny tvořené hlavními Faktory 1 a 2. V grafu je vidět, že hlavní komponenta Faktor 1 (50,88 %) je tvořen hlavně kyselinami C:16:1n7cis, C:18:xt, C:22:1n9cis, C:20:1n9cis, C:18:3n3cis. Faktor 2 je tvořen kyselinami C:18:2n6cis,cis; C:22:0, C:16:0.

Graf č.12: Graf projekce případů do faktorové roviny



Z grafu č.12 vyplývá, že shluky případů (tedy vzorků) jsou rozděleny podle faktorů a zastoupených kyselin.

Shluk 1 odpovídá olivovému oleji, pro který byla nejvíce charakteristická kyselina palmitová (C:14:0) a palmitolejová (C16:1n7cis).

Shluk2 odpovídá řepkovému oleji, pro který byla charakteristická kyselina eikosenová (C20:1n9cis), eruková (C22:1n9cis) a kyselina α -linolenová (C18:3n3cis).

Shluk 3 představuje slunečnicový olej, pro jehož výsledky je charakteristická kyselina linolová (C18:2n6cis,cis) a behenová (C22:0).

Shluk 4 je ukazuje na samostatný slunečnicový high-oleic olej, pro který byl charakteristický obsah kyseliny myristové(C14:0).

5. Diskuze

Tato práce byla provedena ke stanovení spektra mastných kyselin ve vybraných potravinářských olejích. Ke stanovení byla použita metoda plynové chromatografie s využitím MS-CI a MS-EI detekce pro identifikaci.

Stanovovány byly oleje běžně dostupné v obchodních řetězcích, a to olivové oleje (Ondoliva a Minerva), řepkové oleje (Rapso, Manka a Lukana) a slunečnicové oleje (Vénusz a Vegetol Gold Slunka a Slunka na smažení). Jednotlivé oleje byly měřeny ve třech sériích. Při každém měření byly z každého jednoho oleje odebrány tři vzorky. Celkově byly tedy mastné kyseliny stanovovány v 72 vzorcích.

Z výsledků vychází že, v olivovém oleji byla v průměru nejvíce zastoupena kyselina olejová (74,28 %) > kyselina palmitová (11,90 %) > kyselina linolová (5,76 %) > kyselina stearová (3,01 %) > kyselina vakcenová (2,59 %) > kyselina palmitolejová (0,79 %) > kyselina α -linolenová (0,65 %).

V řepkovém oleji bylo obsaženo nejvíce kyseliny olejové (57,70 %) > kyselina linolová (20,07 %) > kyselina α -linolenová (8,15 %) > kyselina palmitová (4,85 %) > kyselina vakcenová (3,54 %) > kyselina stearová (1,80 %) > kyselina eikosenová (1,25 %) > kyselina arachová (0,59 %). U řepkového oleje je velká pozornost věnována kyselině erukové, která má nepříznivý vliv na lidský organismus. Této kyseliny bylo zjištěno méně než 1 %. Tento obsah odpovídá oleji z vyšlechtěné tzv. bezerukové řepky olejné a shoduje se s tvrzením Havelky et al. (1989)⁽⁷⁾ a Zajíce et al. (1988)⁽¹⁹⁾.

Ve slunečnicovém oleji byla nejvíce obsažena kyselina linolová (61,38 %) > kyselina olejová (25,80 %) > kyselina palmitová (6,54 %) > kyselina stearová (3,42 %) > kyselina vakcenová (0,76 %) > kyselina behenová (0,68 %). Rozdílných hodnot dosahoval slunečnicový olej Slunka na smažení, který měl nejvíce kyseliny olejové (77,26 %) > kyselina linolová (10,49 %) > kyselina palmitová (4,75 %) > kyselina stearová (3,20 %) > kyselina vakcenová (1,26 %) > kyselina behenová (0,82 %). Jednalo se tedy zřejmě o odrůdu tzv. high oleic slunečnice se zvýšeným obsahem kyseliny olejové, jak uvádí např. Pelikán (2001)⁽¹⁷⁾.

Z analýzy hlavních komponent vyplývá, že mezi olivovými, řepkovými a slunečnicovými oleji byly značné rozdíly ve složení. Avšak oleje stejného druhu ale od různých výrobců se ve svém složení nijak výrazně nelišily. Výsledky měření složení mastných kyselin olejů se shodují s údaji uváděnými v literatuře Velíšek (2002)⁽¹⁾.

6. Závěr

Cílem této práce bylo stanovit spektrum mastných kyselin ve vybraných potravinářských olejích metodou plynové chromatografie s využitím MS-CI a MS-EI detekce pro identifikaci.

Spektrum bylo stanoveno v olejích běžně dostupných v obchodních řetězcích. Celkem bylo změřeno 72 vzorků z olivové oleje (Ondoliva a Minerva), řepkové oleje (Rapso, Manka a Lukana) a slunečnicové oleje (Vénusz a Vegetol Gold Slunka a Slunka na smažení).

Statistickým zpracováním výsledků bylo zjištěno že, v olivovém oleji byla v průměru nejvíce zastoupena kyselina olejová (74,28 %) > kyselina palmitová (11,90 %) > kyselina linolová (5,76 %) > kyselina stearová (3,01 %) > kyselina vakcenová (2,59 %) > kyselina palmitolejová (0,79 %) > kyselina α -linolenová (0,65 %).

V řepkovém oleji bylo obsaženo nejvíce kyseliny olejové (57,70 %) > kyselina linolová (20,07 %) > kyselina α -linolenová (8,15 %) > kyselina palmitová (4,85 %) > kyselina vakcenová (3,54 %) > kyselina stearová (1,80 %) > kyselina eikosenová (1,25 %) > kyselina arachová (0,59 %).

Ve slunečnicovém oleji byla nejvíce obsažena kyselina linolová (61,38 %) > kyselina olejová (25,80 %) > kyselina palmitová (6,54 %) > kyselina stearová (3,42 %) > kyselina vakcenová (0,76 %) > kyselina behenová (0,68 %). Rozdílných hodnot dosahoval slunečnicový oleje Slunka na smažení, který měl nejvíce kyseliny olejové (77,26 %) > kyselina linolová (10,49 %) > kyselina palmitová (4,75 %) > kyselina stearová (3,20 %) > kyselina vakcenová (1,26 %) > kyselina behenová (0,82 %). Jednalo se tedy zřejmě o odrůdu tzv. high oleic slunečnice se zvýšeným obsahem kyseliny olejové.

Tyto výsledky se shodují s údaji o zastoupení a % obsahu mastných kyselin v potravinářských olejích v soudobé literatuře.

7. Seznam použitých zdrojů

- 1 VELÍŠEK J. et al. 1999. *Chemie potravin I*. OSSIS Tábor, 352 s.
- 2 HÁLKOVÁ, J., RUMÍŠKOVÁ, M., RIEGLOVÁ, J., 2001. *Analýza potravin*. 2.vyd. Újezd U Brna, vydal RNDR. Ivan Straka, S. 60-70.
- 3 Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/whatlip/index.htm>, staženo dne 1 7.5.2012.
- 4 DAVÍDEK, J.; JANÍČEK, G.; POKORNÝ, J., 1983. *Chemie potravin*. Praha, SNTL Praha.
- 5 KALÁČ, P., 1992. *Organická chemie – přírodní a kontaminující látky*. 1. Vydání. České Budějovice, vydala Jihočeská univerzita-zemědělská fakulta České Budějovice, Scientific – Pedagogical Publishing České Budějovice, s. 5-14.
- 6 MURRAY, K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W., 1998. *Harperova biochemie*. Druhé české vydání. Nakladatelství H&H, 872 s.
- 7 HAVELKA, K., DUFEK, M., HOCH, K., BUDSKÁ, E., 1989. *Potravinářská chemie*. 2. přepracované vydání. Praha, ČVUT v Praze, 147 s.
- 8 KALÁČ, P., 2001. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. 1. Vydání. České Budějovice, vydala Jihočeská univerzita-zemědělská fakulta České Budějovice, 120 s.
- 9 KOMPRDA, T., 2003. *Výživa člověka*. Brno, skripta MZLU.
- 10 VODRÁŽKA, Z., 1993. *Biochemie 3*. Praha, Academia nakladatelství Československé akademie věd, 191 s.
- 11 VODRÁŽKA, Z., 1992. *Biochemie 1*. Praha, Academia nakladatelství Československé akademie věd, 180 s.
- 12 Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/whatdo/index.htm>, staženo dne 17.5.2012.
- 13 VODRÁŽKA, Z., 1992. *Biochemie 2*. Praha, Academia nakladatelství Československé akademie věd, 134 s.

- 14 Dostupné z: http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/fa_sat/index.htm, staženo dne 17.5.2012.
- 15 Dostupné z: http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/fa_mono/index.htm, staženo dne 17.5.2012.
- 16 MICHALEC, Z., 1977. *Člověk a rostliny*. 1. Vydání. Praha, ROH, 272 s.
- 17 PELIKÁN, M., 2001. *Zpracování obilovin a olejnin*. 2. nezměněné vydání. Brno, skripta MZLU, 152 s.
- 18 Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/market/rapeseed.htm>, staženo dne 17.5.2012.
- 19 ZAJÍC, J, BAREŠ, M., 1988. *Chemie a technologie tuků*. 1. Vydání. Praha, VŠCHT Praha v Čs. Redakci VN MON, 224 s.
- 20 LHOTSKÁ, M., KROPÁČ, Z., 1985. *Kapesní atlas semen, plodů a klíčnicích rostlin*. 1. vydání. Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 548 s.
- 21 Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/market/sunflower.htm>, staženo dne 17.5.2012.
- 22 ZELENÝ, V., 2005. *Rostliny Středozeří*. 1. Vydání. Praha, Academia, 402 s.
- 23 FREJ, D., 2004. *Zdravé tuky omega chrání před nemocemi srdce, rakovinou, cukrovkou a podporují hubnutí*. Praha, EB, 166 s.
- 24 Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/market/olive.htm>, staženo dne 17.5.2012.
- 25 ČERVENKA, J, SAMEK, M., 2004. *Potravinářské zbožíznalství*. Praha, Česká zemědělská univerzita v Praze, Provozně ekonomická fakulta ve vydavatelství CREDIT, 214 s.
- 26 SMOLKOVÁ, E.; FELTL, L.; PACÁKOVÁ, V., 1976. *Plynová chromatografie I. – Teoretické základy*. Praha, skripta UK, 109 s.
- 27 MIKEŠ, O. A KOL., 1961. *Příručka laboratorních chromatografických metod*. Praha, SNTL- Nakladatelství technické literatury, 400 s.
- 28 DOLEŽALOVÁ, V. A KOL., 1995. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4. přepracované vydání. Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, s. 89- 127.

- 29 OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z., 2007. *Základní analytická chemie*. Praha, vydala UK v Praze nakladatelství Karolinum, 201 s.
- 30 VONDRÁK, D., VULTREIN, J., 1985. *Analytická chemie*. Praha, SNT Nakladatelství technické literatury, s. 226-249.
- 31 MIKEŠ, O., 1980. *Laboratorní chromatografické metody*. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury.
- 32 SMOLKOVÁ, E.; FELTL, L.; PACÁKOVÁ, V., 1976. *Plynová chromatografie II. – Instrumentální část*. Praha, skripta UK, 109 s.
- 33 KLOUDA, P., 2003. *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava, nakladatelství Pavel Klouda, 132 s.
- 34 CHRISTIE W. W. et al., 1989. *Gas chromatography and lipids*. Oily Press, Bridgewater, 184 s.
- 35 Dostupné z: <http://www.chromatography-online.org/GC/Detectors/Flame-Ionization/rs37.html>, staženo dne 23.6.2012.
- 36 SOMMER, L., et al., 2000. *Základy analytické chemie II*. Brno, Vutium, 347 s.
- 37 Dostupné z: <http://www.chromatography-online.org/GC/Temperature-Programmer/rs36.html>, staženo dne 23.6.2012.
- 38 AUTORSKÝ KOLEKTIV, editor: VŘEŠŤÁL, J., 2000. *Hmotnostní spektrometrie*. Brno, Masarykova univerzita v Brně, 114 s.
- 39 MOSTECKÝ, J., HÁLA, S., KURAŠ, M., POPL, M., 1984. *Analýza uhlovodíkových surovin*. Praha, SNTL-Nakladatelství technické literatury, s. 262-315.
- 40 ŠTULÍK, K., A KOL., 2005. *Analytické separační metody*. Praha, vydala UK v Praze nakladatelství Karolinum, 264 s.
- 41 BEYERMANN, K., 1987. *Organická stopová analýza*. Praha, SNT Nakladatelství technické literatury, s. 132-191.
- 42 BOHM, S., SMRČKOVÁ-VOLTROVÁ, S., 1995. *Strukturní analýza organických sloučenin*. 1. vydání, Praha, VŠCHT Praha, 152 s.
- 43 JONAS, J., 1975. *Hmotnostní spektroskopie v organické chemii*. Brno, Rektorát UJEP, 95 s.

- 44 Dostupné z: <http://www.chromatography-online.org/GC-Tandem/Mass-Spectroscopy/Sector-Mass-Spectrometer/Chemical-Ionization/rs36.html>, staženo dne 23.6.2012.
- 45 MICHAUD A. L. et al., 2002. *Double bond localization in minor homoallylic fatty acid methyl esters using acetonitrile chemical ionization tandem mass spektrometry*. *Analytical Biochemistry* 307, s.348–360
- 46 Dostupné z: http://lipidlibrary.aocs.org/GC_lipid/04_deriv/index.htm, staženo dne 23.6.2012.

8. Klíčová slova

mastná kyselina

plynová chromatografie

hmotnostní spektrometrie