

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Studium ztrát tokoferolů vyvolaných oxidovanými lipidy v
modelu trávicího traktu**

Bakalářská práce

Matyáš Krtička

Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Monika Sabolová, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Studium ztrát tokoferolů vyvolaných oxidovanými lipidy v modelu trávicího traktu" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval doktorce Monice Sabolové, se kterou byly pokusy prováděny, dále bych chtěl významně poděkovat paní docentce Zuzaně Réblové z VŠCHT Praha, za neúnavnou konzultaci a v neposlední řadě dík patří doktoru Vojtěchu Ilkovi a inženýru Diomidovi Ravencovi z VŠCHT Praha za pomoc při obsluze HPLC a konzultaci.

Studium ztrát tokoferolů vyvolaných oxidovanými lipidy v modelu trávicího traktu

Souhrn

Cílem této práce bylo zjistit míru ztrát tokoferolů vyvolaných oxidovanými lipidy v modelu trávicího traktu. K této práci byl použit *in vitro* model trávicího traktu, aby bylo možné simulovat reálné podmínky. Sledovaný byl zejména α -tokoferol, přičemž pokusy byly prováděny na řepkovém oleji, který byl oxidován zahřátím na 60 °C a 180 °C. Předpoklad pro výzkum byl, že oxidované lipidy vedou k významným ztrátám tokoferolů v modelu trávicího traktu. Cílem teoretické části bakalářské práce bylo zpracovat literárního přehled zaměřený na reakce probíhající v lipidech za zvýšené teploty a reaktivitu produktů vznikajících při těchto reakcích a jejich toxicitu.

Klíčová slova: vitamín E, antioxidant, olej, trávicí procesy, smažení

Study of tocopherol losses caused by oxidized lipids in in vitro model of the gastrointestinal tract

Summary

The aim of this work was to determine the rate of tocopherol loss induced by oxidized lipids in a digestive tract model. An in vitro model of the digestive tract was used for this work in order to simulate real conditions. In particular, α -tocopherol was monitored, and the experiments were performed on rapeseed oil, which was oxidized by heating to 60 ° C and 180 ° C. The premise for the research was that oxidized lipids lead to tocopherol losses in the digestive model. The aim of the theoretical part of the bachelor thesis was to map a focused overview of each reaction in lipids in the reaction of the literature reaction and the reactivity of products arising from these reactions and toxicity.

Keywords: vitamin E, antioxidant, oil, digestive processes, frying

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíl práce	9
3. Literární část.....	10
3.1. Reakce probíhající při tepelné oxidaci tuků a olejů a během smažení	10
3.1.1. Reakce triacylglycerolů	13
3.1.1.1. Hydrolýza.....	13
3.1.1.2. Pyrolýza	14
3.1.2. Reakce mastných kyselin	15
3.1.2.1. Oxidační reakce.....	15
3.1.2.2. Neoxidační reakce.....	17
3.2. Toxicita tuků a olejů po smažení	19
3.3. Reakce hydroperoxidů lipidů a jejich radikálů	22
3.3.1. Reaktivita aldehydů.....	25
3.3.1.1. Reakce 4-hydroxy-2-nonenalu	26
3.3.1.2. Reakce 4-oxo-2-nonenalu	30
3.3.1.3. Reakce malondialdehydu	31
3.3.1.2. Reakce oxidačních produktů lipidů s tokoferoly.....	32
4. Experimentální část	34
4.1. Použitý materiál	34
4.2. Stanovení peroxidového čísla	34
Chemikálie	34
Přístroje	34
Postup	35
4.3. Oxidace oleje	35
Přístroje	35
Postup	35

4.4.	Experiment simulovaného trávení	36
	Přístroje	37
	Postup	37
4.5.	Stanovení tokoferolů pomocí HPLC	39
	Chemikálie	39
	Přístroje	39
	Postup	40
4.6.	Zpracování výsledků.....	41
5.	Výsledky experimentu.....	42
	5.1. Charakteristika oxidovaných a neoxidovaných olejů.....	42
	5.2. Výsledky pokusů simulujících trávení	44
6.	Diskuse	47
	6.1. Diskuse charakteristiky oxidovaných a neoxidovaných olejů.....	47
	6.2. Diskuse pokusů simulujících trávení	48
	Ztráty tokoferolů v trávicím traktu.....	48
	Oxidativní ztráty α -tokoferolu.....	49
7.	Závěr.....	52
8.	Seznam použitých zkratk.....	53
9.	Seznam literatury	55

1. Úvod

Smažené jídlo patří k nejpoblárnějším pokrmům napříč celým světem. Konzumace smažených potravin je oblíbené právě kvůli látkám, které při smažení vznikají, ale mají i svou stinnou stránku, které se bude věnovat tato práce. Oblíbenost fastfoodů je stále markantní a velmi často se staví do korelace mezi častým požíváním smažených potravin a vznikem mnoha obtíží jako jsou vznik a progradace aterosklerózy, rozvoj obezity, kardiovaskulárních obtíží či vzniku cirhózy.

Ve smažící lázni vzniká mnoho toxických, karcinogenních či genotoxických látek. Kromě známého akrylamidu a heterocyklických aminů vznikají ve smažící lázni produkty oxidovaných lipidů a jejich další produkty. Velmi často zmiňovaným fenoménem je dnes téma oxidačního stresu v lidském organismu. Bylo již přesvědčivě prokázáno, že konzumace oxidovaných tuků zvyšuje míru oxidačního stresu *in vivo* trávicího traktu, ale míra této skutečnosti zatím není dostatečně probádána. Je nutno podotknout, že většina obtíží spojených s konzumací smažených potravin je multifaktoriálního charakteru a bývá obtížnější nalézt přesnou míru a daný vliv.

Experimentální část navazuje na diplomovou práci inženýrky Anety Johanidesové a předchozí diplomovou práci inženýrky Kamily Karolíny Vejdovské. Obě tyto práce se věnovaly míře ztrát α -tokoferolu vlivem oxidačních produktů lipidů. V návaznosti na tyto práce vznikl, kromě této bakalářské práce i vědecký článek doktorky Moniky Sabolové (ČZU) s názvem „Ability of oxidized plant oils to initiate α -tocopherol losses during *in vitro* gastrointestinal digestion“ pod vedením docentky Zuzany Réblové (VŠCHT Praha). Tento článek teprve bude publikován.

Cílem experimentu této bakalářské práce bylo navázat na již zmíněnou diplomovou práci a prohloubit znalosti v oblasti ztrát α -tokoferolu vyvolaných oxidovanými lipidy po průchodu *in vitro* modelem trávicího traktu.

2. Cíl práce

Hypotéza: Oxidované lipidy vedou k významným ztrátám tokoferolů v modelu trávicího traktu.

Cíle práce: Cílem teoretické části bakalářské práce bude zpracování literárního přehledu zaměřeného na reakce probíhající v lipidech za zvýšené teploty a reaktivitu produktů vznikajících při těchto reakcích. V praktické části budou sledovány ztráty tokoferolů způsobených oxidovanými tuky v modelu trávicího traktu.

3. Literární část

3.1. Reakce probíhající při tepelné oxidaci tuků a olejů a během smažení

K tepelné oxidaci tuků a olejů dochází významně v průběhu smažení. Smažení je volně definováno jako tepelná úprava potravin (pokrmů), které jsou zcela nebo částečně ponořené do tuku či oleje o teplotě přibližně 150 °C – 200 °C, v závislosti jaký pokrm se připravuje a jaký typ oleje se používá (Smoke Point of different Cooking Oils).

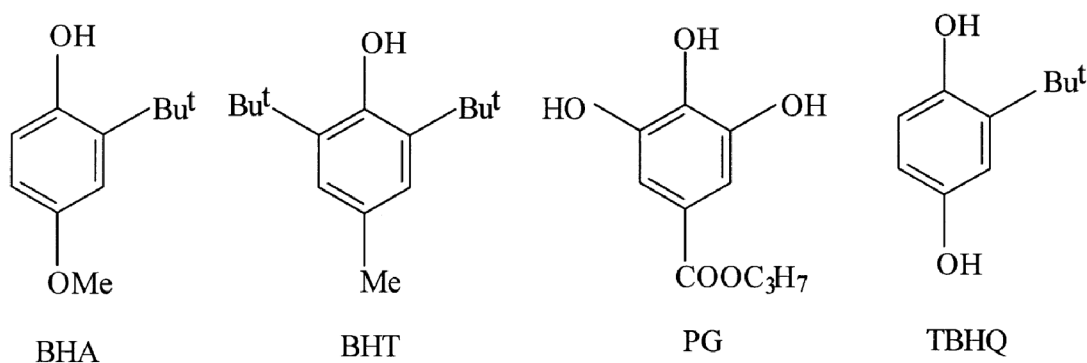
Vhodnost oleje pro smažení je definována tzv. kouřovým bodem, který udává teplotu, kdy se olej nebo tuk začíná tzv. „přepalovat“. Bod udává, při jaké teplotě se tuk začne významně tepelně rozkládat za vzniku viditelného množství těkavých degradačních produktů. Pro smažení je vhodný olej s vysokým kouřovým bodem. Za tímto účelem se provádí u olejů rafinace, jelikož oleje lisované za studena, jako například panenský olivový olej, mají nízký kouřový bod, a jsou tedy pro smažení nevhodné (Mishra & Manchanda, 2012).

Vhodnost oleje pro smažení závisí i na obsahu nenasycených mastných kyselin, vzhledem k jejich nižší odolnosti vůči oxidaci. V běžných tucích a olejích je přitom nejnáchylnější k oxidaci kyselina linolenová (Gunstone, 2009).

Rychlost chemických změn je ovlivněna poměrem styčné plochy povrchu oleje vůči množství oleje, přičemž ve fritézách s menším styčným povrchem dochází ke zpomalení oxidace. Intenzita probíhajících reakcí závisí rovněž na doplňování čerstvého oleje a koncentraci kyslíku. Vysoká teplota smažení, počet smažení, obsah polyvalentních iontů kovů snižují oxidační stabilitu a chuťovou kvalitu oleje. Tokoferoly jako přírodní antioxidanty a BHA (butylhydroxyanisol), BHT (butylhydroxytoluen), PG (propylgalát), TBHQ (terciální butylhydrochinon) jako syntetické antioxidanty, snižují rychlost oxidace oleje, ale při vzrůstající teplotě smažení snižují svou účinnost. Na obrázku 1 je znázorněna struktura tokoferolů a na obrázku 2 je zobrazena struktura ostatních syntetických antioxidantů (Gunstone, 2009).

E-vitamer	R ₁	R ₂	Trivial names	Chemical abstract names
Tocopherols				
α-Tocopherol	Me	Me	5,7,8-Trimethyl tocol ^a	3,4-Dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,5,7,8-tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-chromanol.
β-Tocopherol	Me	H	5,8-Dimethyl tocol	3,4-Dihydro-2,5,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,5,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-chromanol.
γ-Tocopherol	H	Me	7,8-Dimethyl tocol	3,4-Dihydro-2,7,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,7,8-trimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-chromanol.
δ-Tocopherol	H	H	8-Monomethyl tocol	3,4-Dihydro-2,8-dimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-ol; 2,8-dimethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-chromanol.

Obrázek 1: Struktura tokoferolů (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996)



Obrázek 2: Struktura syntetických antioxidantů (Gunstone, 2009)

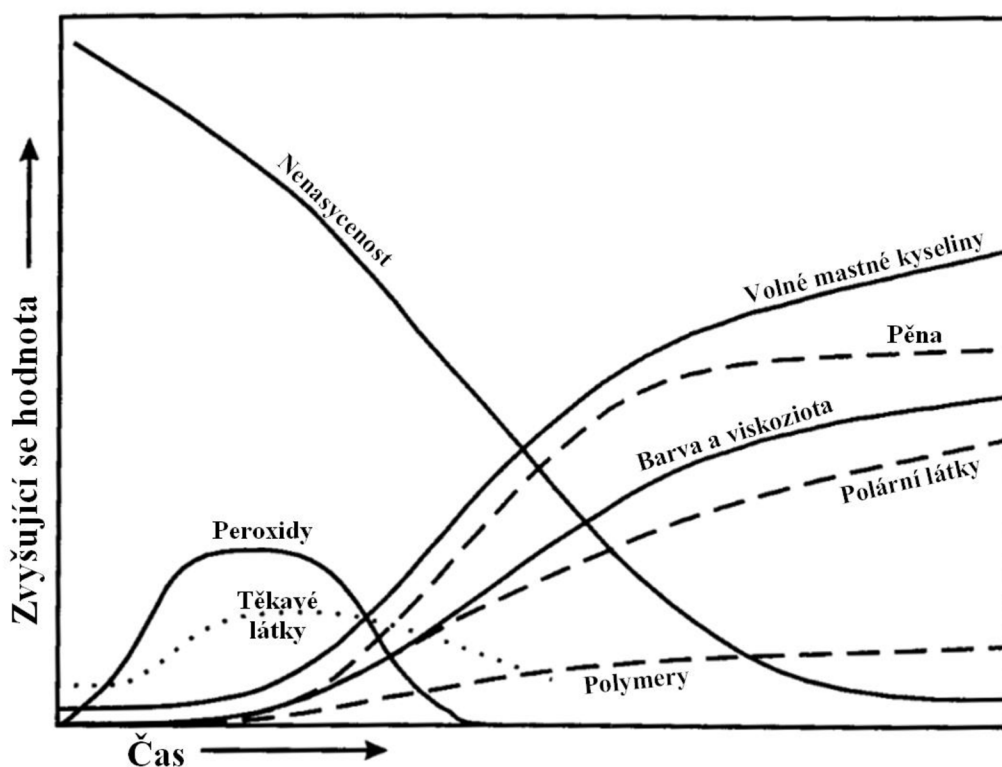
Během smažení vzniká velké množství aromatických sloučenin. Kyseliny linolová je zodpovědná za žádoucí chuť. Z ní vzniká kyselina 4-hydroxy-2-nonanová, 2, 4 – dekadial, nonalaktón a trienaly, které dodávají pokrmu typickou smaženou chuť a vůni. Chuť je ovlivněna množstvím kyslíku, jelikož nízké hodnoty kyslíku způsobují špatnou a slabou chuť a vysoké hodnoty pachou (Choe & Min, 2007).

Vznikající karbonylové sloučeniny mohou reagovat s aminokyselinami, aminy a proteiny a produkovat žádoucí ořechové aroma, za které jsou zodpovědné deriváty pyrazinu (Warner et al., 1997).

Za negativní chuťové vjemy jsou zodpovědné látky: butanal, pentanal, hexanal, heptan, pentanol, 2-hexenal, heptanal, 1-okten-5-ol a 2-pentylfuran. Některé těkavé sloučeniny vznikající při fritování jako 1,4-dioxan, benzen, toluen a hexylbenzen, nepřispívají k chuti a jsou zároveň toxické (Warner et al., 1997).

Během smažení dochází k celé řadě reakcí mezi které patří hydrolyza a pyrolýza triacylglycerolů, oxidační a neoxidační reakce mastných kyselin. Výsledkem je změna chemických i fyzikálních vlastností, které jsou popsány na obrázku 3. Na obrázku je dále popsáno jak při opakování procesu smažení a s dobou smažení přibývá polárních látek, které následně zrychlují oxidaci. Zároveň se zvyšuje pění, viskozita a mění se barva (Choe & Min, 2007).

Vybrané reakce, budou popsány detailněji v následující sekci.



Obrázek 3: Změny vybraných chemických a fyzikálních vlastností v průběhu smažení (Choe & Min, 2007)

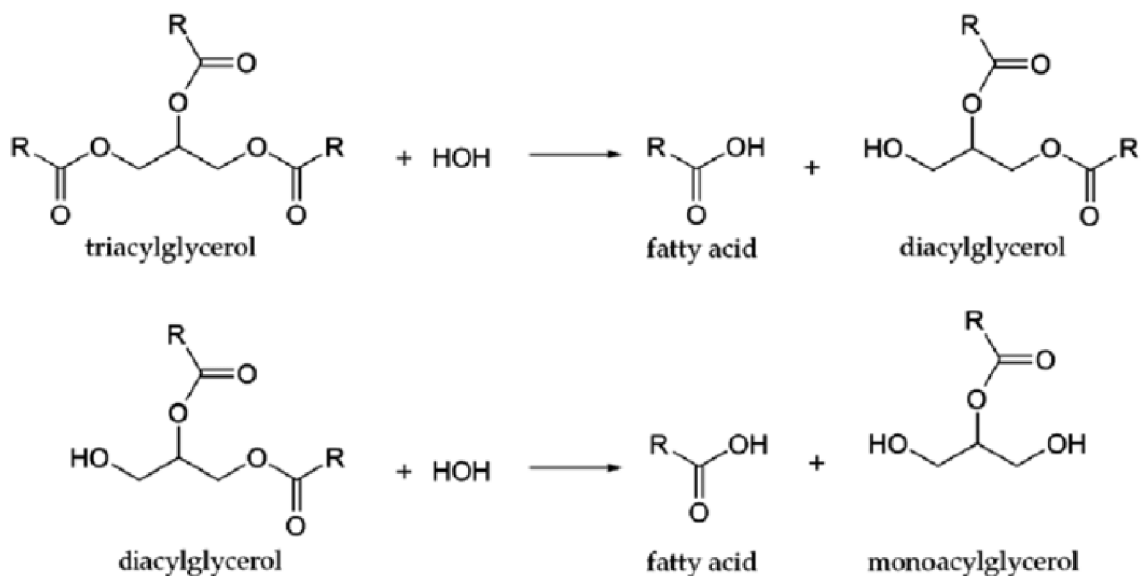
3.1.1. Reakce triacylglycerolů

Mezi základní reakce triacylglycerolů při smažení patří reakce závislé na zvýšené teplotě. Další část práce se věnuje neenzymatické hydrolýze, tedy rozpadu molekul triacylglycerolů za přítomnosti vody a pyrolýze, rozpadu molekul z příčiny vysoké teploty (Chung et al., 2004).

3.1.1.1. Hydrolýza

K hydrolýze triacylglycerolů dochází především enzymaticky, působením lipáz. S tímto typem hydrolýzy se můžeme setkat například při trávení tuků v lidském trávicím traktu. V žaludku se žaludeční lipázou tráví přibližně 10 % 30 % a zbytek se tráví pankreatickou lipázou v duodenu (Kittnar, 2011).

Lipidy se štěpí i neenzymaticky za podmínek vysoké teploty a přítomnosti vody. Olej, který při smažení má mnohem vyšší teplotu, než je bod varu vody, způsobuje odpařování vody z povrchu smažené potraviny. Voda patří mezi slabé nukleofily a při této teplotě štěpí esterové vazby triacylglycerolů na monoacylglyceroly, diacylglyceroly, glycerol a rovněž i volné mastné kyseliny. Toto můžeme pozorovat na obrázku 4. Obsah volných mastných kyselin je ovlivněn počtem opakovaného smažení (Chung et al., 2004). Volné mastné kyseliny následně způsobují snížení kouřového bodu a snížení mezifázového napětí v jehož důsledku se zvyšuje se pěnivost oleje. Pěnivost je pospána na křivce na obrázku číslo 3 (Sumnu & Sahin, 2008).



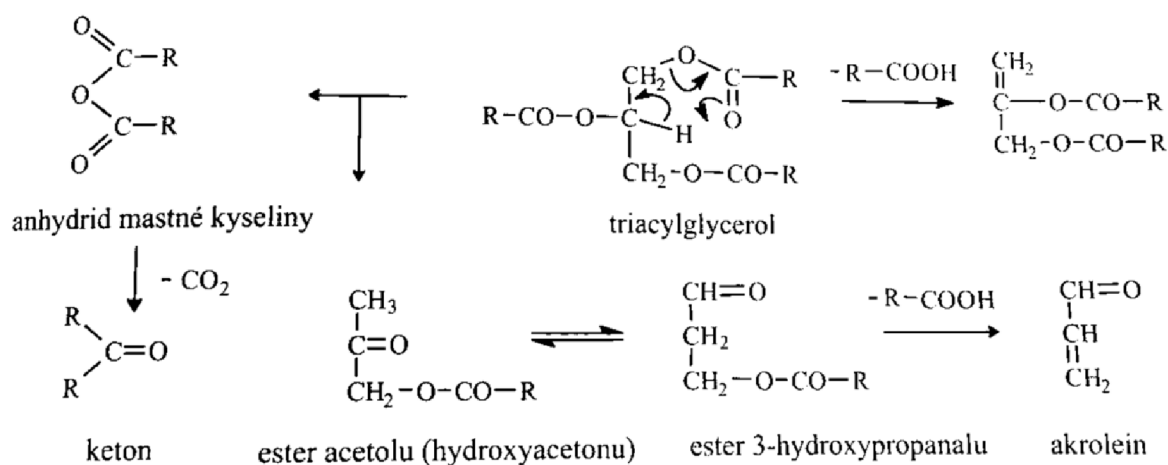
Obrázek 4: Hydrolýza Triacylglycerolů (Turner-Walker, 2012)

Triacylglyceroly obsahující krátké a nenasycené mastné kyseliny jsou rozpustnější ve vodě a snáze se hydrolyzují než ty, které obsahují dlouhé a nasycené mastné kyseliny. Voda v kapalném stavu hydrolyzuje olej rychleji než ve stavu páry (Chung et al., 2004).

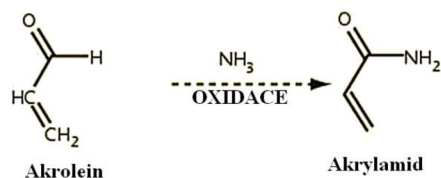
Volné mastné kyseliny obvykle sami o sobě výrazněji nemění sensorickou jakost oleje, podléhají však snadněji oxidaci. Důležitá je také skutečnost, že monoacylglyceroly, diacylglyceroly, glycerol a volné mastné kyseliny urychlují další hydrolyzu (Naz et al., 2005).

3.1.1.2. Pyrolýza

Pyrolýza je tepelný rozklad organického materiálu bez přístupu kyslíku a na rozdíl od hydrolyzy se voda pyrolytické reakce neúčastní. Během smažení dochází k pyrolýze triacylglycerolů za vzniku volných mastných kyselin. Při vyšších teplotách dochází k tvorbě akroleinu, který je poměrně jedovatý a dráždí dýchací cesty, oči a kůži. Na obrázku 5 je popsán proces vzniku akroleinu, z něhož může následně vznikat akrylamid, jehož vznik je popsán na obrázku 6. Velišek, J.; Hajšlová, J.: Chemie potravin I., 3rd ed.; OSSIS: Tábor, 2009. V případech významnější expozice akroleinu může nastat i smrt. Vystavení vysokým hladinám může také ovlivnit centrální nervový systém a akrolein je uváděn také jako možná látka způsobující rakovinu (Osório & De Lourdes Cardeal, 2013).



Obrázek 5: Schéma vzniku akroleinu (Velišek & Hajšlová, 2009)



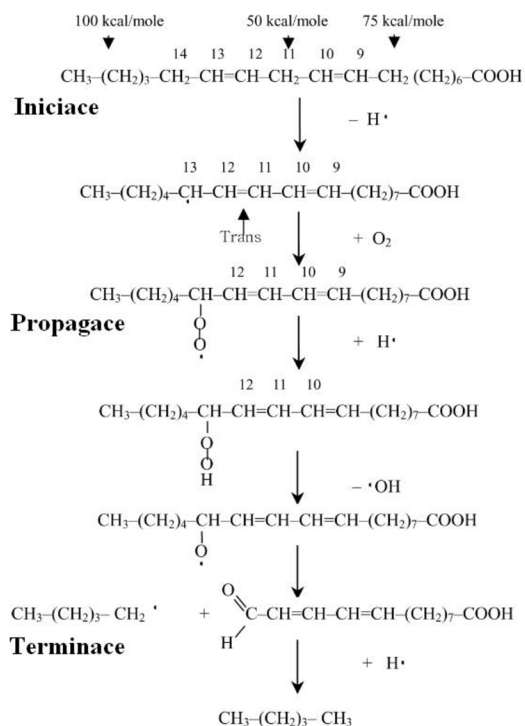
Obrázek 6: Schéma vzniku akrylamidu z akroleinu (Gertz et al.,2003)

3.1.2. Reakce mastných kyselin

Dále popsaných reakcí se účastní mastné kyseliny vázané i volné. Během smažení je rychlost oxidačních reakcí větší než rychlost hydrolytických. Při oxidačních reakcích vznikají hydroperoxydy a následně nízkomolekulární látky, jako například aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny a alkany a alkeny s krátkým řetězcem. Též vznikají dimery a polymery díky radikálovým a Diels - Alderovým reakcím (Choe & Min, 2007).

3.1.2.1. Oxidační reakce

Oxidačních reakcí se účastní kyslík, jehož množství reakce limituje. Z počátku smažení je kyslík rozpuštěn v oleji. Jedná se však o relativně malé množství, které se rychle spotřebuje, a další kyslík se do oleje dostává pouze difuzí z okolní atmosféry. Oxidační reakce mastných kyselin probíhající během smažení jsou analogické reakcím probíhajícím během skladování potravin, zejména rostlinných. Při vysokých teplotách však dochází k oxidaci i nasycených mastných kyselin a zároveň nedochází k hromadění hyperoxidů, kvůli vyšší rychlosti průběhu reakcí (Velíšek & Hajšlová, 2009).



Obrázek 7: Stupně oxidace (Choe & Min, 2007)

Na obrázku 7 je zobrazena, první fázi oxidace mastných kyselin, která se nazývá iniciace. V tomto kroku musí dojít ke vzniku volného radikálu, což je v případě smažení způsobeno zvýšenou teplotou. Ke vzniku tohoto radikálu dochází odštěpením vodíku, který je v řetězci mastné kyseliny poután k uhlíku nejslabší vazbou. Rozdílná síla vazby vodík - uhlík u různých mastných kyselin vysvětluje rozdíl v rychlosti oxidace například kyseliny stearové, olejové, linolové a linolenové. Výsledkem iniciace je alkylový radikál mastné kyseliny (Choe & Min, 2007).

Ve druhé fázi, propagaci, reaguje radikál mastné kyseliny s přítomným kyslíkem za vzniku peroxidového radikálu, který znovu reaguje s vodíkem vázaným na mastné kyselině a vzniká hydroperoxid a nový radikál mastné kyseliny (Choe & Min, 2007).

Tato reakce se nazývá „řetězová reakce volných radikálů v potravinách“ a sekvence bude pokračovat tak dlouho, dokud bude přítomna zásoba reaktantů. Nutno však dodat, že dochází k určité ztrátě alkylových a peroxidových radikálů kvůli dimerizaci za vzniku stabilních produktů, které dále nepodporují reakci (Choe & Min, 2007).

Třetí fáze, terminační, je charakterizována rekombinací volných radikálů a tvorbou neradikálových těkavých a netěkavých sloučenin. Jak je zobrazeno na obrázku 3, tak většina

těkavých látek je odstraněna z oleje párou během fritování. Množství těkavých látek se značně liší v závislosti na druhu oleje.

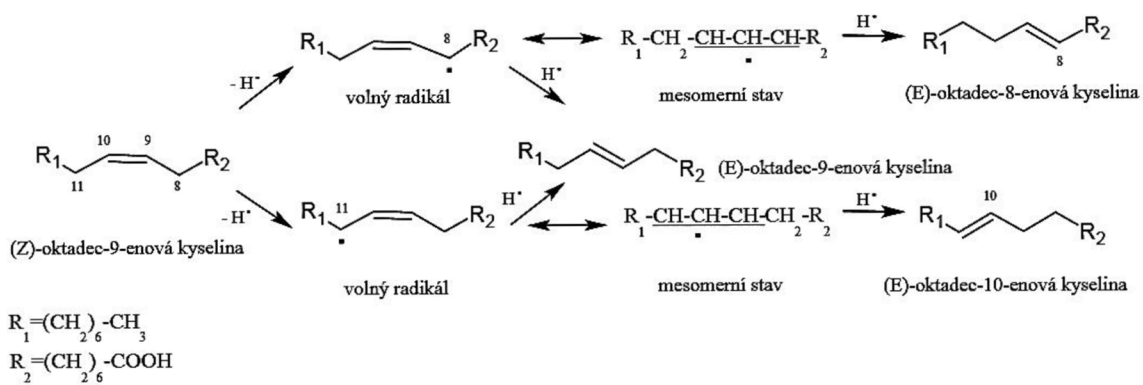
Po primární fázi oxidace přichází fáze sekundárního štěpení, z něhož nejvýznamnější je rozklad hydroperoxidů. Hydroperoxidy se rozkládají homolýzou peroxidové vazby na alkoxy radikály a hydroxy radikály. Alkoxy radikál dále reaguje s jinými alkoxy radikálem nebo se rozkládá za vzniku neradikálových produktů (Choe & Min, 2007).

Reakce hydroperoxidů mastných kyselin a jejich radikálů může probíhat třemi základními způsoby. Reakce které nemění počet atomů uhlíku mají za následek vznik cyklických peroxidů, endoperoxidů, epoxykyselin, hydroxykyselin a oxokyselin. Při lýze, kdy produkty mají nižší počet atomů uhlíku vznikají aldehydy, oxokyseliny a uhlovodíky. Třetí možností je polymerační reakce, kdy vznikají produkty o vyšším počtu atomů uhlíku (Velíšek & Hajšlová, 2009).

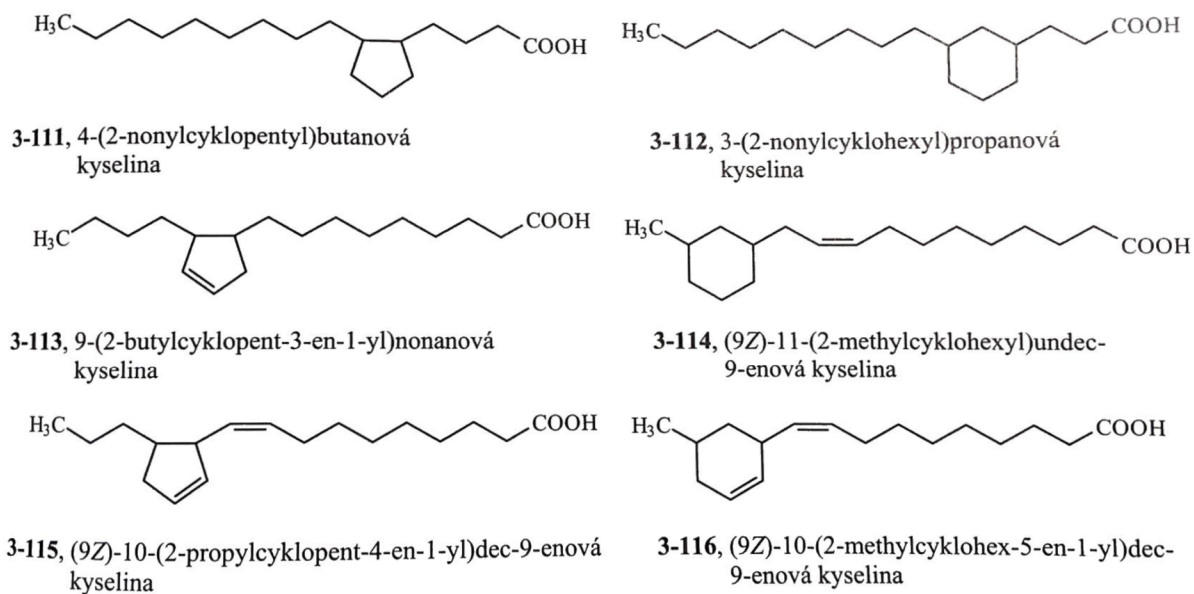
3.1.2.2. Neoxidační reakce

Během smažení (ale třeba také během deodorace rostlinných olejů) dochází ke třem hlavním typům neoxidačních reakcí mastných kyselin. Jedná se o izomeraci, polymeraci a cyklizaci. Proces izomerace je zobrazen na příkladu olejové kyseliny na obrázku 8. Výsledkem jsou především *trans*-isomery MK. *Trans* nenasycené mastné kyseliny jsou často dne výživových hodnot srovnávány s nasycenými mastnými kyselinami. Jejich vliv na kardiovaskulární systém a na vztah k diabetu 2. typu je prokázán a zároveň probíhá výzkum (Velíšek & Hajšlová, 2009).

Obrázek 9 ukazuje strukturu vybraných cyklických mastných kyselin. Cyklické mastné kyseliny odvozené od kyseliny olejové jsou nasycené. Naopak z linolové kyseliny vznikají produkty s jednou dvojnou vazbou a z linolenové kyseliny se dvěma dvojnými vazbami (Velíšek & Hajšlová, 2009).



Obrázek 8: Izomerace kyseliny olejové (Velíšek & Hajšlová, 2009)



Obrázek 9: Hlavní typy cyklických mastných kyselin (Velíšek & Hajšlová, 2009)

3.2. Toxicita tuků a olejů po smažení

Vzhledem k množství probíhajících reakcí při smažení, některé produkty vykazují toxický potenciál. Akutní toxicita u tuků po smažení není nijak zvlášť vysoká, avšak z chronického hlediska vykazují některé negativní účinky. Při dlouhodobé aplikaci na pokusná zvířata se snížil jejich celkový vrůst a zároveň se zvýšil poměr velikosti jater a ledvin k tělu. Játra vykazovala ztučnění, znaky fibrózy a cirhózy, což následně může vést ke ztrátě funkce orgánu (Réblová & Peprná, 2013).

Tento stav se nazývá „Hepatomegalie“. Výsledkem může být tzv. „Hepatorenální syndrom“, kdy ledviny selhávají v důsledku ztráty funkce jater, v tomto případě kvůli cirhóze. U lidí je tento jev spojen s tzv. Ascitem, což je hromadění volné tekutiny v dutině břišní (Lata et al., 2013).

Dále byly pozorovány v kardiovaskulární patologické změny a to konkrétně morfologické změny srdečního svalu. Tyto změny jako například hypertrofie srdce, chlopenní vady a onemocnění perikardu mohou přímo souviset s renální insuficiencí (Zemánek et al., 2001). Mezi další projevy dlouhodobé konzumace tuku po smažení patří: vyšší krevní tlak, aterosklerotické změny, vyšší výskyt nádorů, snížená glukózová tolerance, narušení funkce štítné žlázy a hemolytická anémie. U aterosklerózy se předpokládá vliv oxidace LDL lipoproteinů a to konkrétně oxidativní poškození lipidů a přítomných bílkovin. Zvýšený výskyt nádorových onemocnění může být spojen s přímou konzumací kancerogenních látek, ale zároveň může být způsoben i látkami ovlivňujícími expresy genů, exprimování některých onkogenů pak násobí možnost vzniku rakoviny nebo embryonální malformace. Mutagenita tuků a olejů po smažení byla prokázána například Amesovým testem. Bylo zjištěno, že konzumace smažených potravin zvyšuje u lidí riziko nádorů tlustého střeva (Réblová & Peprná, 2013).

Zajímavá je tato souvislost konkrétně s Českou republikou, jelikož se pravidelně umisťuje na předních příčkách výskytu kolorektálního karcinomu. Bývá zdůrazňována korelace mezi množstvím snědeného mastného, potažmo smaženého jídla, vypitého alkoholu a výskytem rakoviny tlustého střeva. Na obrázku 10 je zobrazen trend incidence kolorektálního karcinomu některých středoevropských zemí včetně ČR. Všechny tyto výše popsané obtíže, jsou ale multifaktoriálního charakteru, a tak je i jejich přímé prokázání, respektive míry vlivu, složité (Dušek et al., 2014).

Cancer registry	Colorectal cancer incidence-ASR (E)				
	1990	2000	Trend 1990-2000	2007	Trend 2000-2007
Czech Republic	50.3	62.7	+25%	59.0	-6%
Germany, Saarland	58.8	61.7	+5%	58.7	-5%
Slovakia	41.7	55.7	+33%	57.9	+4%
Austria	48.8	49.4	+1%	41.8	-16%
Poland, Kielce	19.1	34.3	+80%	35.7	+4%

Source of data: Steliarova-Foucher *et al*^[21] ECO; Czech National Cancer Registry. ASR (E): Number per 100000 population, age-standardized rate (European).

Obrázek 10: trend incidence kolorektálního karcinomu některých středoevropských zemí
(Zavoral et al., 2014)

Oxidační poškození lipidů hraje významnou roli při progradaci i vyvolání neurologických onemocnění jako například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba nebo jiné formy demence. V důsledku oxidačního stresu vznikají například u Alzheimerovy choroby tzv. Amyloidní plaky. Konkrétně vznikají v rámci poruchy konformace amyloidního proteinu na β skládaný list. Rychlost biologického stárnutí souvisí s množstvím ukládaných oxidovaných. Mozková tkáň je oproti ostatním tkáním v těle náchylnější k oxidačnímu poškození. V důsledku poškození jsou zvýšené hladiny oxidačně pozměněných biomolekul a metabolitů odpovědné za aktivaci kompenzačních mechanismů. Následně může celý proces vyústit až v apoptózu a destrukci buňky (Chmátalová & Skoumalová, 2014).

Pacienti trpící Alzheimerovou chorobou vykazují vyšší výskyt HNE - lysinových aduktů v mozkové tkáni a tyto cytotoxické produkty jako 4-hydroxy-2-nonenal jsou spojeny s úbytkem cholinergních nervů (Poli et al., 2008).

Mezi základní příčiny těchto obtíží patří nižší stravitelnost a využitelnost oxidovaných tuků, zabudovávání změněných mastných kyselin do membrán nebo také jejich vliv na metabolismus esenciálních kyselin. Za největší problém je ovšem považováno zvýšení oxidačního a karbonylového stresu v trávicím traktu nebo *in vivo* (Rěblová & Peprná, 2013).

DNA, mastné kyseliny (především polynenasycené) a další oxilabilní látky mohou být oxidovány produkty lipidů vzniklých v potravinách. Oxidační produkty lipidů (například

aldehydy) dále reagují s bílkovinami za vzniku Schiffovýchází nebo mohou tvořit adukty s DNA. Některé oxidační produkty lipidů nejsou, schopné přímo oxidačně narušovat DNA, ale způsobují ztráty antioxidantů a v důsledku se snižuje ochranná bariéra DNA před hydroxylovými radikály (Réblová & Peprná, 2013).

Následně můžeme po příjmu oxidovaných tuků pozorovat vyšší obsah sloučenin reagujících s thiobarbiturovou kyselinou, vyšší obsah oxidovaných LDL lipoproteinů v krevní plasmě, snížený obsah tokoferolů a dalších antioxidantů, oxidační poškození biomembrán, zvyšování obsahu nasycených mastných kyselin v těchto membránách či oxidační poškození bílkovin (Réblová & Peprná, 2013).

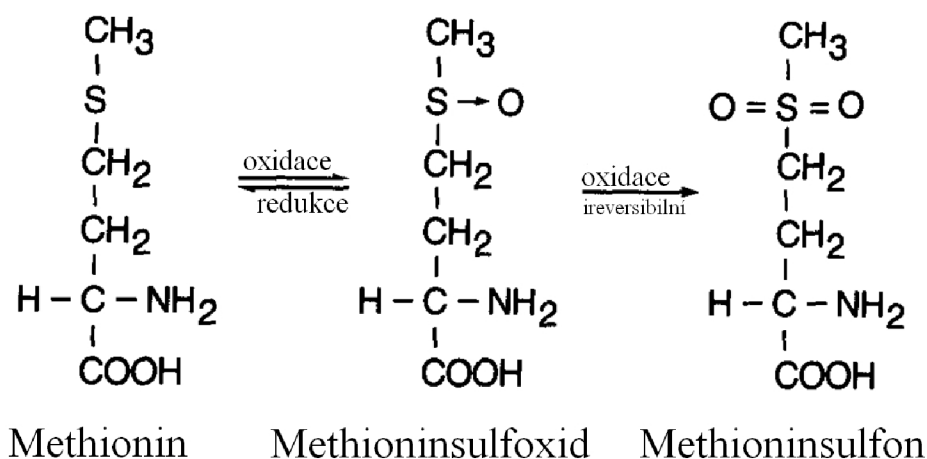
Neblahé změny lze též pozorovat v aktivitě některých enzymů a to ascendentně i descendentně. Může se ale jednat o zvýšení aktivity detoxikačních enzymů, a to svědčí o aktivaci obranné reakci organismu. Při descendentní aktivitě enzymů se může projevat jejich inaktivace vyvolaná oxidačním poškozením. Některé enzymy například ty, které se podílejí na přeměnách esenciálních mastných kyselin, tzn. metabolismus mastných kyselin, jsou inhibovány změněnými mastnými kyselinami, např. trans-isomery (Réblová & Peprná, 2013).

Znovu se jedná o multifaktoriální projevy, tudíž nelze jednoznačně vyloučit jiné vlivy.

3.3. Reakce hydroperoxidů lipidů a jejich radikálů

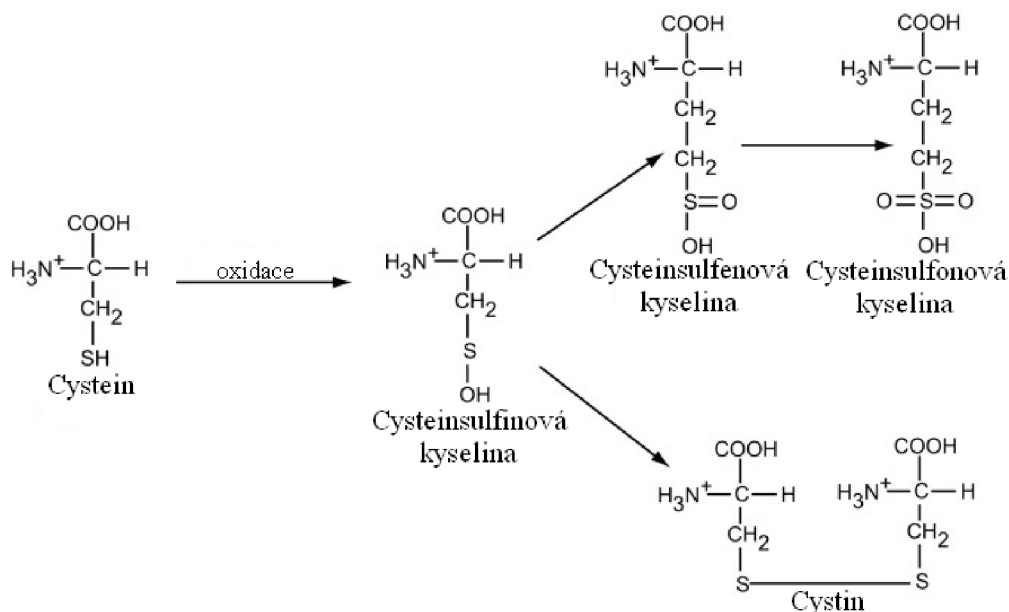
Hydroperoxydy, látky s funkční skupinou ROOH jsou schopné se přeměnit na hydroperoxylové radikály, které dále interagují například s aminokyselinami, bílkoviny, fosfolipidy i DNA. Stabilitu u hydroperoxidů podmiňuje více faktorů. Stabilitu ovlivňují faktory jako nízká teplota, přítomnost antioxidantů a absence katalyzátorů. Rozklad může být katalyzován zvýšením teploty, kovovými ionty a jejich komplexy (nejčastěji přechodné kovové prvky) a rovněž metaloproteiny (Gunstone, 2009).

Z interakcí za zmínku stojí reakce se sirnými aminokyselinami jako cystein a methionin. Na obrázku 12 můžeme vidět methionin, který se vratně oxiduje na methioninsulfoxid a ten může pokračovat v oxidaci až do ireversibilního druhého kroku za vzniku methioninsulfonu (Gunstone, 2009).



Obrázek 12: Oxidace methioninu na methioninsulfoxid a methioninsulfon (Vogt, 1995)

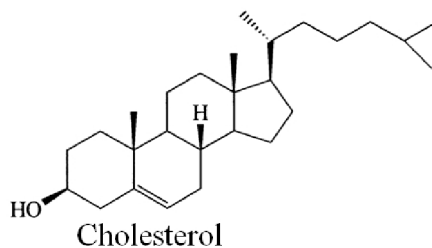
S cysteinem reagují lipidové hydroperoxydy za vzniku cysteinsulfenové kyseliny, která se ovšem dále přeměňuje buď na cystin nebo na cysteinsulfonovou kyselinu a dále na cysteinsulfonovou kyselinu, jak je vyobrazeno na obrázku 14 (Griffiths et al., 2002).



Obrázek 14: Oxidace cysteinu (Griffiths et al., 2002).

Jako příklad oxidace aminokyseliny v celém proteinu může sloužit reakce radikálu a α 1-antitrypsinu. Jak bylo zmíněno v předešlé kapitole, vlivem konzumace velkého množství oleje a jako důsledek cirhózy jater, může docházet k tzv. „Hepatonefropatii“. Nedostatek proteinu α 1-antitrypsinu je často spojován s cirhotickým stavem. Oxidace methioninu na (Met-351) nebo na (Met-358), dvou aktivních methioninových zbytcích α 1-antitrypsinu, vede k významné ztrátě inhibiční aktivity. α 1-antitrypsin hraje zásadní roli při regulaci aktivity neutrofilní elastázy. Menší roli hraje cystein, který je též na (Cys-232) k oxidaci náchylný (Griffiths et al., 2002).

V rámci oxidační procesů může dojít k oxidaci lipoproteinů LDL a VLDL, a to může následně způsobit akumulaci cholesterolu v arteriálních stěnách, což vede k iniciaci nebo rozvoji aterosklerózy. Cholesterol může být oxidován buď na Δ 5 dvojně vazbě nebo na některých uhlících postranního řetězce (C-20 a C-25). Na obrázku 15 můžeme vidět vzorec cholesterolu (Gunstone, 2009).

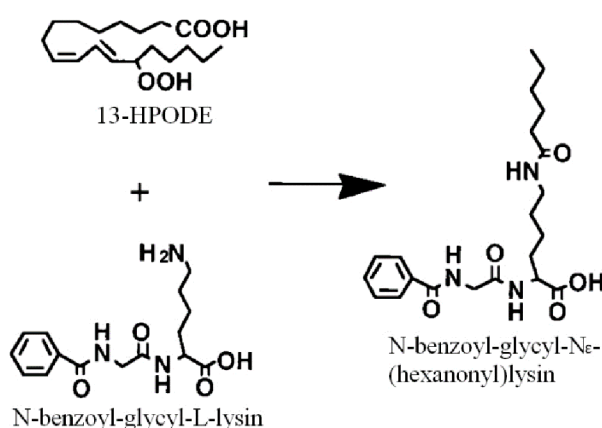


Obrázek 15: Struktura cholesterolu (Gunstone, 2009)

Fyziologické hodnoty vykazují určitý obsah oxidů cholesterolu, ale ve vyšších hladinách mohou být škodlivé. Oxidy cholesterolu mohou nahrazovat cholesterol v buněčných membránách a narušovat tak fluiditu, propustnost a stabilitu (Gunstone, 2009).

Dalšími látkami, které můžou podléhat oxidaci jsou lysinové zbytky. Určitá místa, a to konkrétně vazebná místa apoE a apoB100 mohou být poškozena lipidovými hydroperoxydy produkovanými při oxidaci VLDL. ApoE hraje důležitou roli v ochraně před aterosklerózou. Vazebná místa apoE a apoB100 obsahují ve větší míře bazické aminokyselinové zbytky včetně lysinu (Arai et al., 2004).

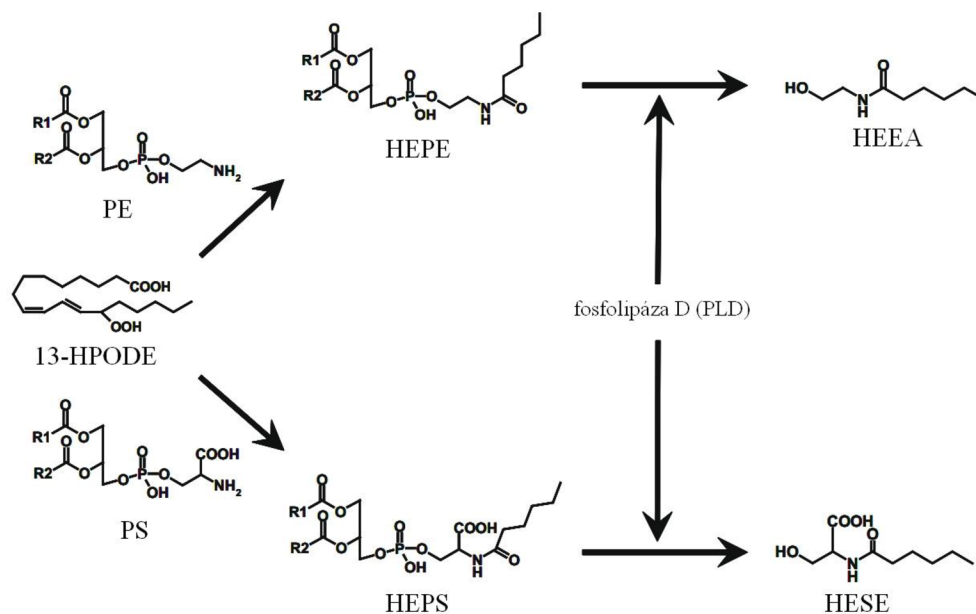
N^ε-(hexanonyl)lysin (HEL), jeden z lipidových, hydroperoxidem modifikovaných lysinových zbytků, který byl detekován v VLDL a LDL a může ovlivňovat vznik aterosklerózy (Arai et al., 2004). S lisinem interaguje 13-hydroperoxy-9,11-oktadekadienová kyselina (13-HPODE) a tato kyselina je významný hydroperoxid přítomný ve smažící lázni. Na obrázku 16 můžeme pozorovat reakci 13-HPODE s N-benzoyl-glycyl-L-lysinem za vzniku N-benzoyl-glycyl-N^ε-(hexanonyl)lysinu (Kato et. Al., 1997).



Obrázek 16: Reakce 13-HPODE s N-benzoyl-glycyl-L-lysinem za vzniku N-benzoyl-glycyl-N^ε-(hexanonyl) lysinu (Kato et al., 1999)

13-HPODE reaguje také s fosfatidylethanolaminem (PE) za vzniku (hexanonyl)fosfatidylethanolaminu (HEPE). 13-HPODE reaguje též s fosfatidylserinem a výsledkem je (hexanonyl)fosfatidylserin (HEPS). Pokud je přítomen enzym fosfolipáza D (PLD), tak se účastní reakce, kdy z HEPE vzniká N-(hexanonyl)ethanolamin (HEEA) a z HEPS vzniká N-(hexanonyl)-serin (HESE). Tento proces je popsán na obrázku 17. Dle výzkumu

Hisaka S. et al, 2010 byla prokázána koncentrace HEPE a HEPS v červených krvinkách, jako následek oxidačního stresu vyvolaným působením tetrachlormetanu (Hisaka et al., 2010).



Obrázek 17: Vybrané reakce 13-HPODE (Hisaka et al., 2010)

3.3.1. Reaktivita aldehydů

Hlavním zdrojem endogenních i exogenních aldehydů je peroxidace polyneenasycených mastných kyselin. Aldehydů vzniká hned několik, ale konkrétněji se text bude zaměřovat na nejhojnější 4-hydroxy-2-nonenal a dále na 4-oxo-2-nonenal a malondialdehyd (Davydov & Bozhkov, 2003).

Aldehydy jsou sekundární oxidační produkty a představují pro organismus znatelné riziko, jelikož reagují s fosfolipidy, proteiny, nukleovými kyselinami a obecně vytváří adukty (Adibhatla & Hatcher, 2010).

Riziko zvyšuje i poměrná stabilita molekul v organismu, na rozdíl od volných radikálů, jsou aldehydy schopny kumulace v buňkách (Adibhatla & Hatcher, 2010). Aldehydy se také účastní reakcí katalyzovaných enzymy aldehyddehydrogenázou, aldehydreduktázou a glutathion-S-transferázou a jejich hlavní cesta katabolismu je doprovázena konjugací s glutathionem (Davydov & Bozhkov, 2003).

3.3.1.1. Reakce 4-hydroxy-2-nonenalu

V další sekci se text věnuje vybraným reakcím 4-hydroxy-2-nonenalu (HNE). HNE vzorec je popsán na obrázku 17. Vzhledem k vysoké reaktivitě molekuly nelze v práci dostatečně zahrnout přehled všech reakcí.

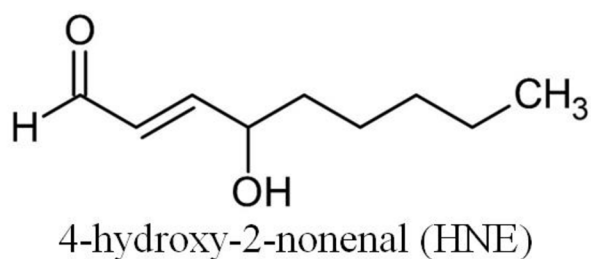
HNE vzniká oxidací omega-6 polynenasycených mastných kyselin, tj. zejména kyseliny linolové, arachidonové a γ -linolenové. HNE je jedním z nejvíce studovaných produktů peroxidace, jelikož se vyznačuje výše zmíněnou reaktivitou, ale i cytotoxicitou, mutagenitou a možná též genotoxicitou (Riahi et al., 2010).

HNE je specifická trifunkční molekula, která obsahuje hydroxyskupinu a konjugovaný systém, který tvoří dvojná vazba C = C a karbonylová skupina a dohromady tak přispívají k vysoké reaktivitě molekuly (Schaur, 2003).

V rámci výzkumu (Spickett, 2013) bylo zjištěno, že HNE proteinové adukty jsou přítomny u pacientů s aterosklerotickými lézemi. V jiném výzkumu byla prokázána korelace mezi přímou oxidací HNE v mitochondriích kardiomyocytu (skrze aldehyddehydrogenázu a aldózareduktázu) a srdeční ischemií, kvůli zvýšené tvorbě proteinových aduktů. Rovněž bylo zjištěno, že mitochondriální oxidace HNE je regulována primárně poměrem NAD/NADH (Spickett, 2013).

HNE je standartně metabolizován na méně cytotoxické sloučeniny, které jsou lépe rozpustné ve vodě a usnadňuje to jejich vylučování. Významnou roli při detoxikaci hrají hepatocyty, thymocyty a enterocyty. Degradace HNE zahrnuje konjugaci thiolové skupiny antioxidantu glutathion s glutathion-S-transferázami (zejména GSTA4-4), což má za následek vznik aduktu HNE-GSH.

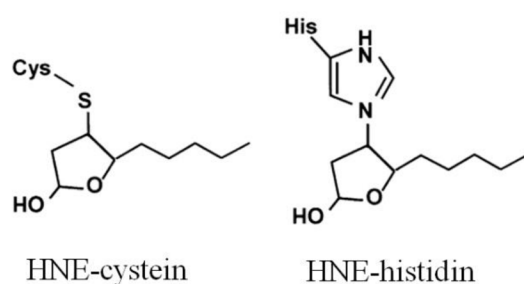
Adukt vzniká Michaelovou adicí a následným štěpením za tvorby konjugátů kyseliny merkapturové (HNA-MA) (Alary et al., 2003).



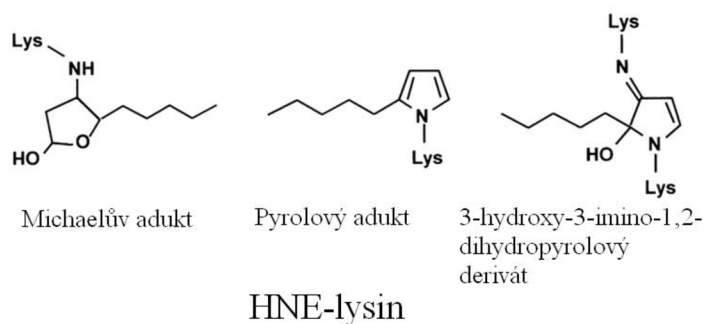
Obrázek 17: Vzorec HNE (4-Hydroxynonal, Lipid peroxidation marker)

Aldehyddehydrogenázy (ALDH) jsou také schopny alternativně oxidovat HNE na HNA kyselinu, a HNA může být hydroxylována cytochromem P450 4A za vzniku 9-hydroxy-HNA (Spickett, 2013).

S HNE reagují aminokyseliny jako cystein, histidin a lysin a to, volné i vázané v proteinech. Nejhojnější bývá reakce cysteinu skrze sulfohydrolovou skupinu. Adukty tvořené HNE se zmíněnými kyselinami můžeme vidět na obrázcích 18 a 19. Reaktanty podléhají Michaelovým adicím a v dalším kroku je možná reakce s karbonylovou a hydroxylovou skupinou. Primární aminy mohou alternativně reagovat s karbonylovou skupinou za vzniku Schiffových bází (Schaur, 2003).



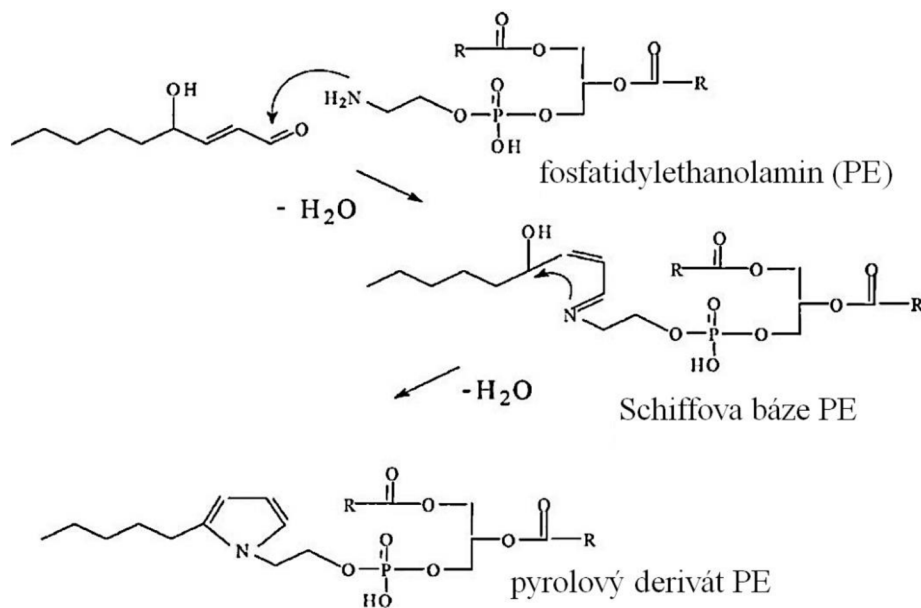
Obrázek 18: HNE-cystein a HNE-histidin (Uchida, 2003)



Obrázek 19: Adukty typu HNE-lysine (Uchida, 2003)

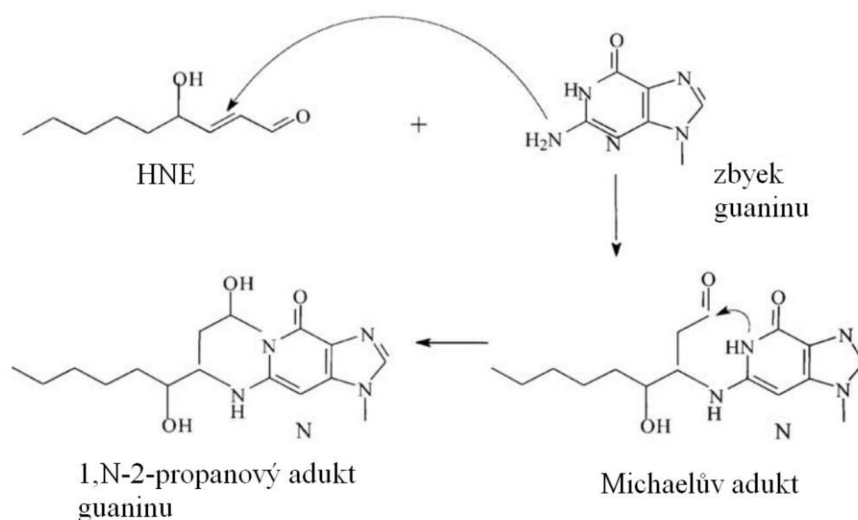
HNE může ovlivňovat aktivitu mnoha enzymů jako například: aldoreduktasy, alkoholdehydrogenasy, pyruvátdehydrogenasy, lipoxygenasy I, cytochromoxidasy. HNE vázaný v aktivním místě snižuje účinnost enzymu a výsledné adukty se akumulují v organismu. Ireversibilně se váže na enzym thioredoxinreduktasu a na jeho komplex s thioredoxinem a NADPH (Uchida, 2003).

HNE reaguje s fosfatidylethanolaminem a společně tvoří jak Michaelovi adukty, tak Schiffovy báze, které mohou procházet částečnou cyklizací za vzniku pyrolového derivátu PE. Tento proces je popsán na obrázku 20 (Schaur, 2003).



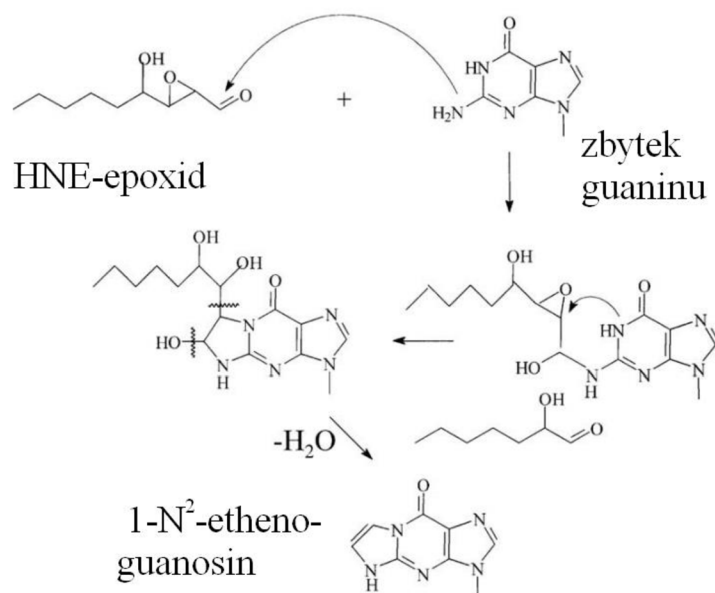
Obrázek 20: Reakce HNE s fosfatidylethanolaminem (Schaur, 2003).

HNE může narušovat strukturu DNA tím, že tvoří adukty přímou interakcí se všemi bázemi DNA, ale nejvyšší afinitu vykazuje ke guaninovému zbytku. Na obrázku 21 je zobrazena reakce HNE s guaninovým zbytkem za vzniku Michaelova aduktu, který následně přechází 1,N-2-propanový adukt guaninu. Propanový adukt vykazuje vyšší mutagenitu než adukt ethenový (Schaur, 2003).



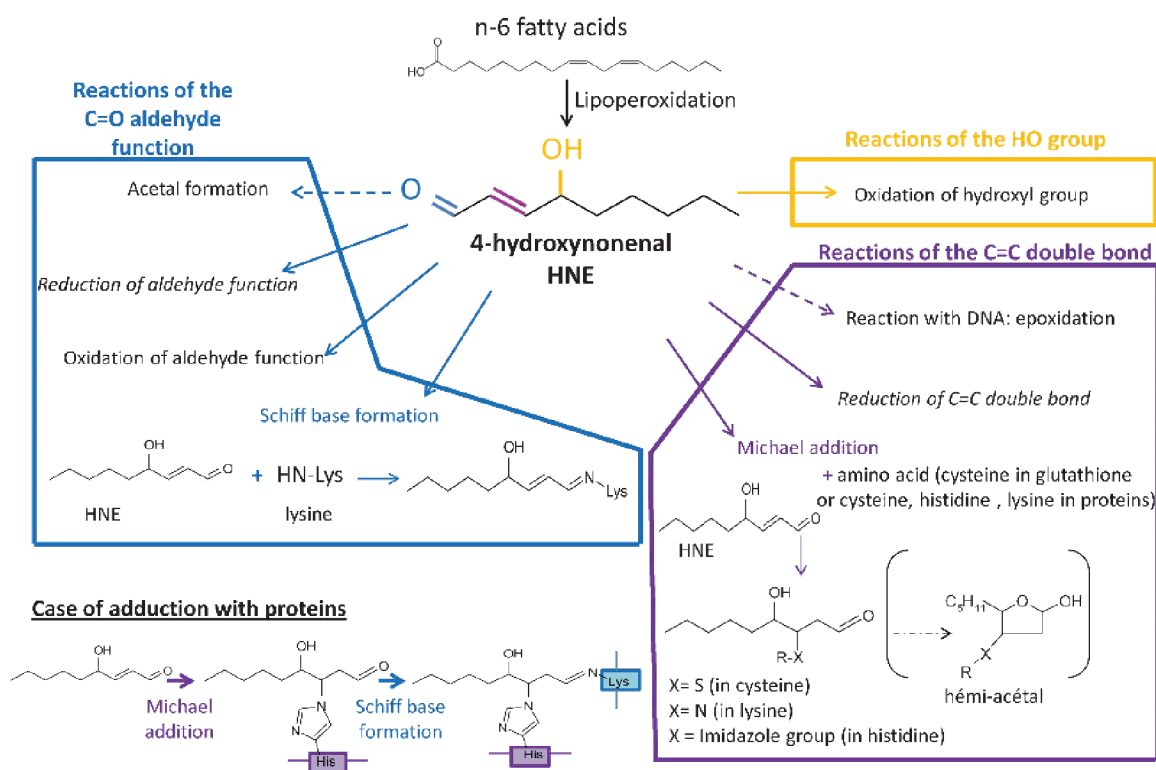
Obrázek 21: Reakce HNE s guaninovým zbytkem (Schaur, 2003)

Druhá cesta možného poškození DNA je oxidace HNE na HNE-epoxid, který dále rovněž interaguje s bázemi DNA a kromě thyminu reaguje se všemi ostatními. Na obrázku je popsán proces kde HNE-epoxid reaguje se zbytkem guaninu až na 1-N²-etheno-guanosin (Schaur, 2003).



Obrázek 22: Reakce HNE-epoxidu se zbytkem guaninu (Schaur, 2003)

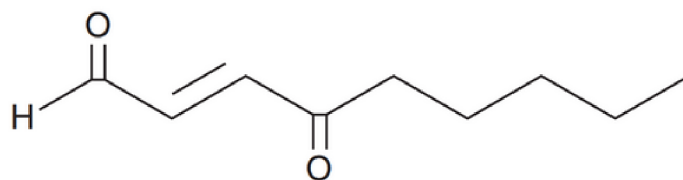
Na obrázku 23 můžeme vidět komplexní přehled většiny reakcí HNE. V textu byly shrnuty nejdůležitější reakce, ale pro důkladný rozbor všech reakcí HNE není v této práci prostor.



Obrázek 23: Komplexní přehled reakcí HNE (Dalleau et al., 2013)

3.3.1.2. Reakce 4-oxo-2-nonenalu

Stejně jako HNE může 4-Oxo-2-nonenal (ONE) reagovat s proteiny, jednotlivými aminokyselinami, fosfolipidy a tvořit adukty s DNA. Reaguje také s γ -tokoferolem, ale tomuto tématu bude věnována pozornost ve zvláštní podkapitole. Na obrázku 24 je zobrazena struktura ONE a můžeme sledovat podobnost s HNE z předešlé podkapitoly. Na rozdíl od HNE ale ONE obsahuje ketonovou skupinu (Rindgen et al., 1999).



4-oxo-2-nonenal (ONE)

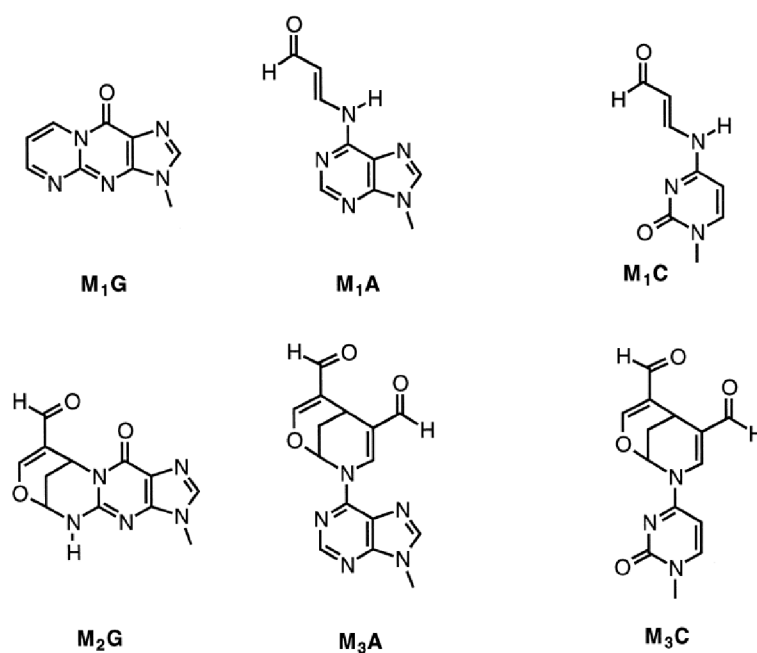
Obrázek 24: struktura ONE (4-oxo-2-Nonenal)

Stejně jako HNE, ONE reaguje s aminokyselinami jako cystein, histidin a lysin za vzniku Michaelových aduktů (Doorn & Petersen, 2002). ONE může tvořit adukty s DNA a to, s deoxyadenosinem, deoxyguanosinem a deoxycytidinem a vzniká více možných izomerů aduktů (Rindgen et al.,1999).

3.3.1.3. Reakce malondialdehydu

Malondialdehyd (MDA) je dalším aldehydem a produktem lipidové peroxidace. Nevykazuje tak vysokou toxicitu jako HNE, ale vzhledem k množství a vysoké mutagenitě, se jedná o velmi nebezpečnou substanci. MDA je v lidském organismu z výše zmíněných látek nejhojnější, a to z důvodu, že se zároveň tvoří i fyziologickou cestou z kyseliny arachidonové při syntéze prostaglandinů. MDA reaguje s proteiny, jednotlivými aminokyselinami i s bázemi DNA a tvoří adukty. S proteiny MDA reaguje za vzniku zesíťovaných proteinů a tvoří tzv. „Cross-link“ adukty například s kolagenem (Rio et al., 2005).

Nejdůležitější jsou ovšem reakce MDA s DNA. Adukty jsou popsány na obrázku 25. Nejdůležitějším aduktem je pyrimido[1,2- α]purin-10(3H)-on (M1G). M1G vykazuje vysokou schopnost mutageneze a dle výzkumů se zdá být hlavním endogenním aduktem DNA u lidí a může tak významně přispívat ke vzniku rakoviny. Ostatních aduktů je významně méně. Dalšími adukty jsou mimo jiné oxadiazabicyklo[3:3]nonen (M2G), N⁶-(3-oxopropenyl)deoxyadenin (M1A) a N⁴-(3-oxopropenyl)deoxycystidin (M1C) (Marnett, 1999).



Obrázek 25: Adukty MDA s nukleovými bázemi (Marnett, 1999)

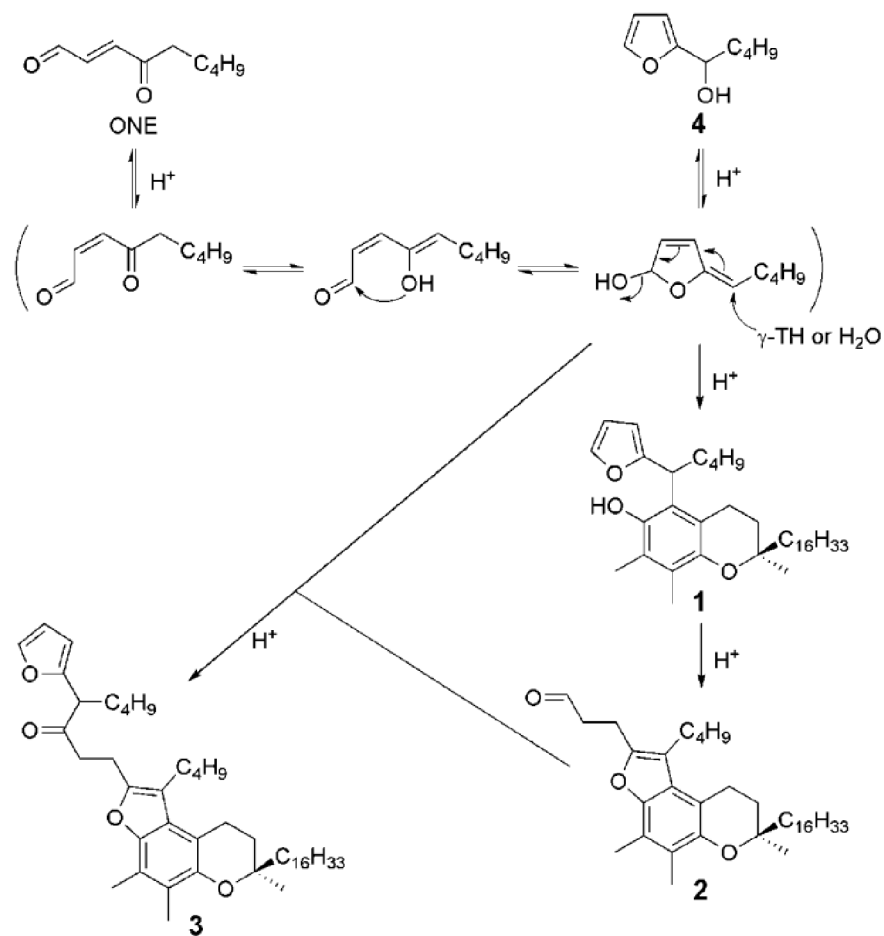
3.3.1.2. Reakce oxidačních produktů lipidů s tokoferoly

Tokoferoly, které jsou souhrnně označovány jako vitamín E, jsou velmi silné lipofilní antioxidanty, které při správné koncentraci chrání organismus před oxidačním poškozením (například buněčné membrány) v důsledku působení volných radikálů. Nejvyšší efektivitu a zároveň koncentraci v těle vykazuje α -tokoferol.

Struktura tokoferolů je popsána na Obrázku 1. Při antioxidačním působení vstupují tokoferoly do propagační fáze oxidace (viz kapitola 3.1.2.1) a reagují s volnými radikály. S α -tokoferolem můžou reagovat alkoxylové radikály za vzniku 6-O-epoxy-alkyl- α -tokoferolu a alkylové radikály za vzniku 6-O-alkyl- α -tokoferolu. α -Tokoferol a γ -tokoferol můžou také reagovat s peroxidovými radikály (Saito et al., 2010).

V této kapitole je však pozornost věnována reakcím tokoferolů s výslednými oxidačními produkty lipidů, tj. především s hydroperoxy a aldehydy.

Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole γ -tokoferol (TH) může reagovat s ONE. Na obrázku 26 je popsán vznik produktů. Produkt č. 1 se nazývá 5-(1-(furan-2-yl)-2,7,8-trimethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-ol-(5-(1-(furan-2-yl)pentyl- γ -tokoferol), produkt č. 2 3-(1-butyl-4,5,7-trimethyl-7-(4,8,12-trimethyltridecyl)-8,9-dihydro-7H-furo[3,2-f]chromen-2-yl)propanal a produkt č. 3 1-(1-butyl-4,5,7-trimethyl-7-(4,8,12-trimethyltridecyl)8,9-dihydro-7H-furo[3,2-f]chromen-2-yl)-4-(furan-2-yl)oktan-3-on (Saito et al., 2010).



Obrázek 26: Reakce γ -tokoferolu s ONE (Saito et al., 2010)

α -Tokoferol reaguje s 1-palmitoyl-2-[(9Z,11E)-(S)-13-hydroperoxy-9,11-oktadekanoyl]-3-sn-fosfatidylcholinem (13-PLPC-OOH) a tato reakce je katalyzována železitými ionty (Yamauchi et al., 1998).

4. Experimentální část

4.1. Použitý materiál

Pro experimentální část bakalářské práce byl zvolen běžný rafinovaný řepkový olej. Olej byl nakoupen s dostatečnou objemovou rezervou, se stejnou šarží a v České republice. Skladování neoxidovaného oleje probíhalo při -18°C v několika vzorkovnicích, aby nedocházelo ke zbytečnému rozmrazování celého objemu oleje. V tabulce 1 je soubor informací k zakoupenému neoxidovanému oleji.

Tabulka 1: informace o čerstvém oleji

Název výrobku	Výrobce	Datum trvanlivosti	Šarže
Řepkový olej jednodruhový	Albert Česká republika, sro, Praha IČO 44012373	11.08.2021	-

4.2. Stanovení peroxidového čísla

Peroxidové číslo udává obsah hydroperoxidů. Postup byl zvolen dle: **Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 1348/2013 ze dne 16. prosince 2013, kterým se mění nařízení (EHS) č. 2568/91 o charakteristikách olivového oleje a olivového oleje z pokrutin a o příslušných metodách analýzy**

Chemikálie

- Škrobový indikátor
- Jodid draselný
- Kyselina octová 99%
- Chloroform
- Kyselina chlorovodíková
- Thiosíran sodný
- Dichroman draselný

Přístroje

- Analytické váhy (přesnost 0,1 mg)
- Byreta 50 ml

Postup

Škrobový indikátor se připravil navážením 1 g do vysoké 250 ml kádinky, doplněním na 100 ml destilovanou vodou a spolu se skleněnou tyčinkou, kterou se roztok občas promíchal, se nechal vřít 10 minut. Odpařenou vodu bylo třeba doplnit.

Dále byl stanoven titr thiosíranu sodného. Do Erlenmeyerovy baňky bylo odváženo 2 g KI a smíseno spolu s 25 ml roztoku $K_2Cr_2O_7$ ($c = 0,005 \text{ mol/l}$) a 5 ml HCL, která byla zředěna destilovanou vodou v poměru 1:5. Následně byla baňka důkladně 1 minutu třepána. V dalším kroku se přidalo 75 ml destilované vody a 0,5 ml připraveného škrobového indikátoru. Následně byl vzorek titrován do odbarvení roztokem thiosíranu sodného.

Do Erlenmeyerovy baňky bylo odváženo 5 g vzorku oleje a smíseno s 15 ml koncentrované kyseliny octové a 10 ml chloroformu. Vzorek oleje se rozpustil v chloroformu a následně byl přidán 1 ml přesyceného roztoku KI, který se připravil rozpuštěním 75 g KI v 50 ml destilované vody. Baňka se vzorkem byla následně třepána 1 minutu a nechala se odstát cca 5 minut v temnu při pokojové teplotě. Po uplynulém čase se do baňky přidalo 30 ml destilované vody a vzorek se titroval thiosíranem sodným ($c = 0,05 \text{ mol/l}$) za použití škrobového indikátoru. Zároveň byl připraven slepý pokus. Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 1348/2013 ze dne 16. prosince 2013

4.3. Oxidace oleje

Přístroje

- Analytické váhy (přesnost 0,1 mg)
- Sušárna
- Topná deska

Postup

Oxidace řepkového oleje probíhala při dvou teplotách a to při 60 °C a 180 °C. Do kádinek o objemu 100 ml a vnitřním průměru 47 mm se navázilo 25 g oleje ($\pm 1 \%$). Kádinky byly umístěny v termostátové skříni vyhřáté na teplotu 60 °C po dobu dvou týdnů. Oxidace při teplotě 180 °C probíhala rovněž v kádinkách o objemu 100 ml a vnitřním průměru 47 mm s navázkou oleje 25 g ($\pm 1 \%$). Proces probíhal na topné desce, která byla nastavena na teplotu 220 °C, po dobu oxidace 4 hodiny. Byl použit ocelový adaptér s cylindrickými otvory pro lepší vedení tepla. Následně se po oxidaci obsah kádinek se stejně oxidovaným olejem slil do vhodné nádoby, promíchal, rozlil do většího počtu vzorkovnic a uložil do mrazicího boxu o teplotě - 18 °C.

4.4. Experiment simulovaného trávení

Cílem experimentu je napodobit funkci trávicího traktu tak, aby byl účinný i *in-vitro*. Trávení v lidském organismu začíná již v dutině ústní rozmělněním potravy a následným smísením se slinami, které kromě vody obsahují ionty, ptyalin (alfa-amyláza) a jazykovou lipázu. Dále se potrava dostává do žaludku, kde dojde k prudkému snížení pH na 1,5 - 3,5 díky HCl. HCl rovněž koaguluje proteiny. Kvůli pH se pepsinogen mění na pepsin a dále pokračuje v trávení proteinů. Kromě pepsinu se trávicí žaludeční reakce účastní i žaludeční lipáza. Po určitém čase, který závisí na stravitelnosti dané potravy se chymus přesouvá do duodena, kde se napojuje ductus choledochus a tomto místě ústí žluč. Do duodena ústí též pankreatické šťávy, díky kterým se pH zvedá na cca 6.

Následuje doba, kdy je vhodné pH pro funkci lipáz. V dalším kroku přechází trávenina do tlustého střeva, kde dochází k resorpci vody. Postupně se chymus zahušťuje až vytvoří stolicí a je vyloučen konečníkem (Your Digestive System & How it Works).

V této bakalářské práci byl použit zjednodušený model trávicího traktu. Původní model byl popsán v práci Werner S. et al, 2011. Tento výzkum měl za cíl rozšířit znalosti o biologické dostupnosti karotenoidů, tokoferolů a tokotrienolů z cereálních produktů (Werner, 2011).

Výzkumem s tematikou sledování schopnosti oxidovaných olejů iniciovat ztráty tokoferolů v modelu trávicího traktu se zabývala také diplomová práce „Reaktivita oxidačních produktů lipidů“ inženýrky Anety Johanidesové. (Johanidesová, diplomová práce) Tématu se rovněž věnuje i v následující době vydaný vědecký článek s názvem “ Ability of oxidized plant oils to initiate α -tocopherol losses during *in vitro* gastrointestinal digestion” (autoři: Monika Sabolová, Aneta Johanidesová, Kamila Karolína Vejdovská, Matěj Kohutiar, Vojtech Ilko, Matyáš Krtička, Diomid Revenco a Zuzana Réblová). Na školícím pracovišti VŠCHT Praha se již tento model trávicího traktu používal právě při těchto studiích (Sabolová et al., 2021).

Chemikálie

- Methanol
- Aceton
- DL-alfa-tocopherol
- n-Hexan
- Kyselina chlorovodíková 35%

- Hydrogenuhličitan sodný
- Extrakt žluče (prasečí)
- Pankreatin (prasečí, USP x 4),
- Pepsin (prasečí, ≥ 250 u/mg)

Přístroje

- Analytické váhy (přesnost 0,1 mg)
- Vakuová rotační odparka (při odpařování používat teplotu lázně max. 40 °C)
- Teplotní skříň
- Midl-shaker with orbit OS-10
- Centrifuga Rotina 35 R

Postup

Experiment se prováděl vždy v sérii tří vzorků. Do baňky o objemu 250 ml se napipetovalo 5 ml čerstvě připraveného roztoku α -tokoferolu v acetonu o koncentraci 0,5 mg/ml. Aceton se následně odpařil pomocí vakuové rotační odparky. Po odpaření se do baňky navážilo 2,5 g vzorku oleje (± 1 %) a přidalo se 10 ml destilované vody. Podmínky žaludku byly simulovány tak, že do takto připravené varné baňky bylo přidáno 25 ml 0,01 M kyseliny chlorovodíkové a 2 ml roztoku pepsinu v 0,01 M HCl. Varné baňky se zazátkovaly a zajistily plastovými klípsnami kvůli riziku otevření při třepání. Baňky byly následně umístěny do orbitální třepačky a vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu jedné hodiny o rychlosti 200 rpm.

Po uplynutí této doby byly simulovány podmínky v tenkém střevě. Ke směsi z modelu žaludku bylo přidáno 5 ml 0,1 M hydrogenuhličitanu sodného, 100 mg žlučového extraktu a 1 ml roztoku pankreatinu v 0,1 M NaHCO₃ (20 mg/ml). Baňky se znovu zazátkovaly a nechaly inkubovat v orbitální třepačce za stejných podmínek jednu hodinu. Po uplynutí inkubace následovala extrakce.

Do varných baněk se vzorky bylo přidáno 10 ml methanolu a po důkladném ručním protřepání bylo přidáno 20 ml hexanu. Následně se vzorky umístily do centrifugy, jelikož bylo třeba vzorky odstředit na 10000 rpm po dobu 5 minut. Po oddělení dvou fází se pomocí Pasterovy pipety a balonku odebrala horní vrstva fáze do čisté varné baňky o objemu 250 ml. Extrakce pomocí hexanu se poté ještě dvakrát opakovala. Následně byl hexan odpařen pomocí vakuové rotační odparky. Po odpaření byl získaný tuk převeden pomocí acetonu do odměrné baňky o objemu 50 ml.

V tomto stádiu byly vzorky doplněny po risku acetonem a uschovány v mrazáku při teplotě -18 °C. Následná analýza (stanovení tokoferolů) proběhla pomocí HPLC ve spolupráci s VŠCHT Praha.

Tento postup nebo jeho část byla provedena u všech následujících vzorků. V tabulce 2 jsou popsány sledované vzorky.

Tabulka 2: Popis sledovaných vzorků

Kód vzorku	Popis vzorku
1A-C	olej neoxidovaný, jen část žaludek
2A-C	olej oxidovaný při 60 °C, jen část žaludek
3A-C	olej oxidovaný při 180 °C, jen část žaludek
4A-C	olej neoxidovaný, i tenké střevo, bez přídavku pankreatinu
5A-C	olej oxidovaný při 60 °C, i tenké střevo, bez přídavku pankreatinu
6A-C	olej oxidovaný při 180 °C, i tenké střevo, bez přídavku pankreatinu
7A-C	olej neoxidovaný, celý trávicí proces
8A-C	olej oxidovaný při 60 °C, celý trávicí proces
9A-C	olej oxidovaný při 180 °C, celý trávicí proces

4.5. Stanovení tokoferolů pomocí HPLC

Chemikálie

- Acetonitril, HPLC grade, Merck
- Methanol, HPLC grade, Merck
- Chloristan lithný p.a., Aldrich
- Chlorid sodný p.a., Lachema
- Methanol p.a., Penta ČR

Přístroje

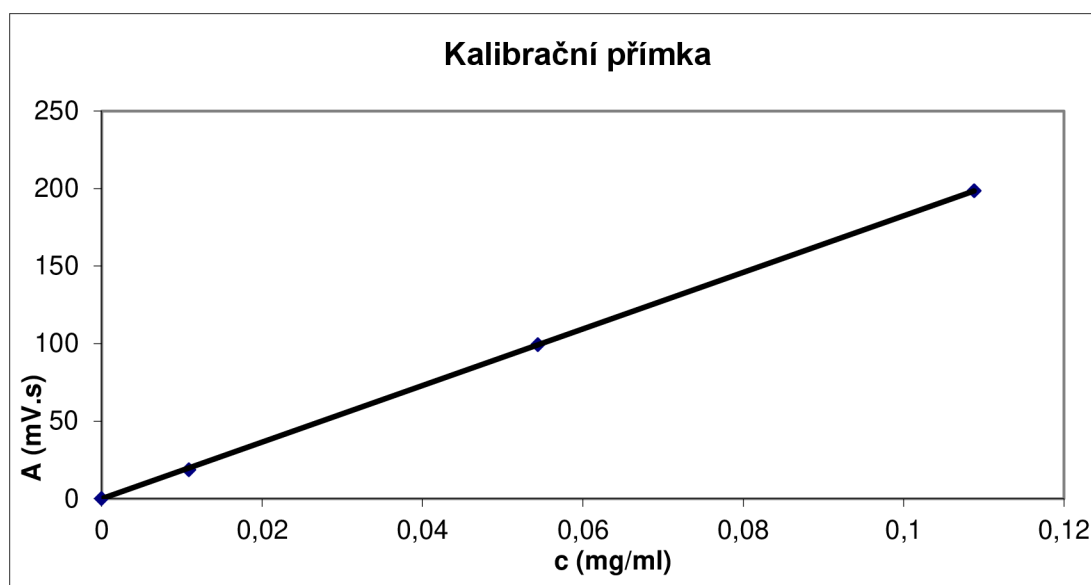
- HPLC s elektrochemickou (amperometrickou) detekcí sestávající z:
 - Čerpadlo LCP 4020.31 v nekovovém provedení, Ecom Praha
 - Kolona o rozměrech 200 x 4,6 mm, Hewlett Packard se sorbentem Hypersil ODS o zrnitosti 5 µm Hewlett Packard
 - Detektor HP 1049A, Hewlett Packard
 - Datastanice CSW 1.6, DataApex ČR
 - Termostat chromatografických kolon LCO 101, Ecom Praha

○ Nástřikový ventil, Rheodyne 7725

Postup

Nejdříve se připravily kalibrační roztoky o koncentracích 0; 0,01; 0,02; 0,05 a 0,1 mg/ml α -tokoferolu v methanolu. Tyto kalibrační roztoky se analyzovaly vždy před zahájením měření. Místnost laboratoře byla po celou dobu analýz klimatizována na 23 °C. Na grafu 1 je popsána kalibrační křivka α -tokoferolu pokusů ze dne 5.3.2021. Na ose X je znázorněna koncentrace a na ose Y je popsána plocha píku.

Graf 1: Kalibrační přímka α -tokoferolu pokusů ze dne 5.3.2021.



Tokoferoly byly stanoveny metodou HPLC s elektrochemickou (amperometrickou) detekcí. Mobilní fáze byla připravena, že se soli NaCl a chloristan sodný rozpustili v methanolu a následně se přidal acetonitril. Výsledná mobilní fáze se přefiltrovala přes membránový filtr a musela se důkladně odplynit. Mobilní fáze obsahovala směs acetonitrilu a methanolu v objemovém poměru 1 : 1 a byla obohacena o LiClO₄ (0,02 mol/l; p.a., Aldrich) a NaCl (0,005 mol/l; p.a., Lachema).

Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a kolona měla teplotu 28 °C. Objem nástřiku byl 20 μ l. Při analýzách olejů se pět gramů vzorku navážilo do odměrné baňky o objemu 50 ml, vzorek byl rozpuštěn v acetonu a obsah baňky byl doplněn po rysku. Vzorky po simulaci trávení byly analyzovány ve formě, jak je popsáno v předchozí kapitole. Detekce proběhla amperometricky detektorem Hewlett Packard v tříelektrodovém zapojení a s uhlíkovou měrnou a argentochloridovou referentní elektrodou. Detekční potenciál byl použit +1,05V s proudovým rozsahem 500 μ A. Po každé analýze bylo provedeno elektrochemické čištění povrchu pracovní

elektrody, při kterém byl na elektrody střídavě vkládán potenciál +1,5 V (0,5 s), -0,5 V (0,5 s) a detekční potenciál (0,2 s) a následně se celý cyklus opakoval 5-krát. Zpracování signálu proběhlo pomocí univerzální chromatografické datastanice CSW 1.6. TROJÁKOVÁ, L.: Dizertační práce. Praha: VŠCHT, 2001.

4.6. Zpracování výsledků

K výpočtům a statistickému zpracování byl ve všech případech využit počítačový program Microsoft Excel 365 verze 2203. Všechny experimenty byly provedeny trojmo a získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí Studentova t-testu na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$.

5. Výsledky experimentu

5.1. Charakteristika oxidovaných a neoxidovaných olejů

V této sekci budou popsány charakteristiky oxidovaných a neoxidovaných olejů. V tabulce 2 je popsáno zastoupení mastných kyselin přítomných v testovaném (neoxidovaném) oleji. Vždy je popsána daná mastná kyselina a její obsah v %.

Tabulka 2: Zastoupení mastných kyselin v oleji (doc. Doležal, VŠCHT Praha)

Mastná kyselina	Obsah [%]
Palmitová	4,33
Stearová	1,58
Ostatní nasycené	1,19
Olejová	59,87
Ostatní mononenasycené	3,66
Linolová	18,66
Linolenová	7,84
Ostatní polynenasycené	2,64
Ostatní mastné kyseliny	0,23
Nasycené celkem	7,33
Nenasycené celkem	92,67

V tabulce 3 jsou zaneseny charakteristiky čerstvého oleje, oleje oxidovaného při 60 °C a oleje oxidovaného při 180 °C. Hodnoty polymerních TAG byly získány od Doktora Vojtěcha Ilka (VŠCHT Praha)

Tabulka 3: Charakteristika oxidovaných a neoxidovaných olejů. (Výsledkem je vždy průměrná hodnota +/- směrodatná odchylka, n=3)

Parametr	Čerstvý olej	Olej oxidovaný při 60 °C	Olej oxidovaný při 180 °C
Peroxidové číslo [mEq O ₂ /kg]	2,28±0,1	140,79±5,2	12,96±0,7
Obsah polymerních TAG [%]	0,10±0,00	1,67±0,00	6,43±0,07
Obsah α-tokoferolu [mg/kg]	257,50±4,9	0,00±0,00	6,03±0,7
Obsah β+γ-tokoferolu [mg/kg]	379,01±1,2	15,19±1,4	28,90±0,2
Obsah δ-tokoferolu [mg/kg]	8,96±1,4	4,68±0,8	3,68±0,4

5.2. Výsledky pokusů simulujících trávení

V tabulce 5 jsou popsány hodnoty množství α -tokoferolu (v mg) v baňce, ve které probíhala simulace trávení, před a po trávení, a následně jsou zobrazeny výsledky ztrát α -tokoferolu při simulaci trávení. Výsledky ztrát α -tokoferolu při trávení byly vypočítány jako rozdíl množství α -tokoferolu před trávením a po trávení a výsledek byl přepočítán na 1 kg oleje. Množství α -tokoferolu po trávení bylo přitom zjištěno pomocí HPLC (ve třech paralelních pokusech) a množství α -tokoferolu před trávením bylo vypočítáno jako součet α -tokoferolu obsaženého v oleji (v 2,5 g) a množství α -tokoferolu přidaného před simulací trávení ve formě acetonového roztoku o koncentraci přibližně 0,5 mg/ml. Detailní postup byl popsán v předešlé kapitole.

V tabulce 6 jsou popsány oxidativní ztráty α -tokoferolu. Ty byly kalkulovány jako hodnoty (ztráty) zjištěné v experimentu s oxidovaným olejem mínus ztráty α -tokoferolu s neoxidovaným olejem za stejných podmínek. Oxidativní ztráty jsou ztráty α -tokoferolu vyvolané oxidačními produkty lipidů přítomnými v oxidovaných olejích.

Při výpočtu směrodatných odchylek byl v obou tabulkách použit zákon o šíření nejistot, s výjimkou hodnot množství α -tokoferolu po trávení.

Tabulka 5: Ztráty α -tokoferolu při simulaci trávení (výsledky jsou vždy vyjádřeny jako průměr +/- směrodatná odchylka; n = 3)

Kód vzorku	Popis vzorku	Množství α -tokoferolu před trávením	Množství α -tokoferolu po trávením	Ztráty α -tokoferolu při trávení
		[mg]	[mg]	[mg/ kg]
1A-C	olej neoxidovaný, jen část žaludek	2,94 \pm 0,0	2,90 \pm 0,0	19,36 \pm 20,0
2A-C	olej oxidovaný při 60 °C, jen část žaludek	2,30 \pm 0,0	2,02 \pm 0,1	110,76 \pm43,4
3A-C	olej oxidovaný při 180 °C, jen část žaludek	2,50 \pm 0,0	2,37 \pm 0,1	54,79 \pm 23,4
4A-C	olej neoxidovaný, i tenké střevo, bez přidavku pankreatinu	3,16 \pm 0,0	2,80 \pm 0,1	146,72 \pm31,1
5A-C	olej oxidovaný při 60 °C, i tenké střevo, bez přidavku pankreatinu	2,74 \pm 0,0	2,31 \pm 0,1	168,41 \pm39,1
6A-C	olej oxidovaný při 180 °C, i tenké střevo, bez přidavku pankreatinu	2,75 \pm 0,0	2,21 \pm 0,0	214,68 \pm9,8
7A-C	olej neoxidovaný, celý trávicí proces	3,13 \pm 0,0	2,93 \pm 0,1	82,04 \pm31,8
8A-C	olej oxidovaný při 60 °C, celý trávicí proces	3,73 \pm 0,0	3,35 \pm 0,0	151,22 \pm31,9
9A-C	olej oxidovaný při 180 °C, celý trávicí proces	3,74 \pm 0,0	3,59 \pm 0,1	59,92 \pm 48,3

Pozn. Tučným písmem jsou vyznačeny hodnoty, které byly statisticky významné.

Tabulka 6: Oxidativní ztráty α -tokoferolu (výsledky jsou vyjádřeny jako průměr +/- směrodatná odchylka; n = 3)

Kód vzorku	Popis vzorku	Oxidativní ztráty α -tokoferolu
		[mg/ kg]
1A-C	olej neoxidovaný, jen část žaludek	-
2A-C	olej oxidovaný při 60 °C, jen část žaludek	91,4 ±63,5
3A-C	olej oxidovaný při 180 °C, jen část žaludek	35,4 ±44,5
4A-C	olej neoxidovaný, i tenké střevo, bez přídavku pankreatinu	-
5A-C	olej oxidovaný při 60 °C, i tenké střevo, bez přídavku pankreatinu	21,7 ±70,2
6A-C	olej oxidovaný při 180 °C, i tenké střevo, bez přídavku pankreatinu	68,1 ±40,9
7A-C	olej neoxidovaný, celý trávicí proces	-
8A-C	olej oxidovaný při 60 °C, celý trávicí proces	69,2 ±63,7
9A-C	olej oxidovaný při 180 °C, celý trávicí proces	-22,1 ±80,1

6. Diskuse

6.1. Diskuse charakteristiky oxidovaných a neoxidovaných olejů

V předešlé kapitole v tabulce 2 byly popsány výsledky analýzy mastných kyselin. Dle výzkumu (Ghazani et al., 2014), který se věnoval mikronutrientům řepkového oleje, se výsledky rozboru rafinovaného oleje, od vzorku studovaného v této práci, lišily jen drobně a to tak, že nasycených mastných kyselin bylo v našem vzorku čerstvého oleje o 0,3 % více, mononenasycených náš vzorek obsahoval o 0,3 % méně a nejsignifikantnější rozdíl byl u polynenasycených mastných kyselin, kterých náš vzorek obsahoval o 1 % více než olej sledovaný ve studii Ghazani et al., 2014. Tyto rozdíly lze však považovat za zanedbatelné a odpovídající přirozené variabilitě biologických vzorků (Rěblová, ústní informace).

V tabulce číslo 3 byly popsány základní parametry v průměrných hodnotách vždy ze tří provedení a se stanovením směrodatné odchylky, a to pro peroxidové číslo, obsah polymerních TAG a obsah α , $\beta+\gamma$, δ -tokoferolu. Porovnat výsledky je možné s diplomovou studií inženýrky Anety Johanedisové (VŠCHT Praha). Peroxidové číslo se u vzorku čerstvého oleje naší práce lišilo nižší hodnotou 2,13 mEq O₂/kg. Hodnota u oxidovaného oleje při 60 °C byla ekvivalentní v rámci směrodatné odchylky a hodnota oxidovaného oleje při 180 °C byla u našeho vzorku opět nižší, a to o 5,54 mEq O₂/kg oleje. Polymerní TAG byly v práci inženýrky Johanedisové stanovovány jen u oleje oxidovaného při 180 °C a hodnota se od našeho vzorku lišila tím, že byla vyšší o 2,3 %. I přes tyto rozdíly, lze vzorky použité v mé bakalářské práci považovat za shodné se vzorky, se kterými pracovala Ing. Johanidesová a s charakteristikami odpovídajícími čerstvému rafinovanému řepkovému oleji, resp. olejům oxidovaným za daných podmínek (Rěblová, ústní informace).

Stanovení α -tokoferolu ve výše zmíněné práci bylo u čerstvého oleje o 5,02 mg/kg nižší, obsah $\beta+\gamma$ -tokoferolu byl o 30,4 mg/kg nižší. Rozdíl v obsahu δ -tokoferolu pak nebyl vzhledem ke směrodatné odchylce relevantní. I tyto rozdíly lze považovat za zanedbatelné a odpovídají přirozené variabilitě biologických vzorků (Rěblová, ústní informace). U olejů oxidovaných za obou teplotních podmínek pak došlo k výraznému poklesu obsahu všech tokoferolů, opět shodě s prací Ing. Johanidesové.

Z hlediska všech sledovaných parametrů lze tedy mnou používané vzorky považovat za shodné se vzorky, se kterými pracovala Ing. Johanidesová (Rěblová, ústní informace). To je důležité s ohledem na skutečnost, že mým úkolem bylo ověřit zajímavé výsledky získané právě Ing. Johanidesovou (viz následující kapitola).

6.2. Diskuse pokusů simulujících trávení

Ztráty tokoferolů v trávicím traktu

In vitro modely simulující trávení jsou často využívány pro studium interakcí například živin v trávicím traktu a většinou se jedná o statické modely trávení se stálým poměrem živin a ostatních látek. Modely jsou používány pro svou jednoduchost na rozdíl modelů *in vivo*, které sice mají výhodu, že poskytují komplexní pohled, ale zároveň jsou náročné a eticky diskutabilní (Minekus, 2014).

Jak již bylo řešeno v teoretické části vitamín E je obecné označení pro tokoferoly. Trávení tohoto vitamínu závisí na mnoha faktorech a může docházet kromě ztrát, díky oxidovaným lipidům, i k oxidaci tokoferolů vlivem ostatních živin. Při konzumaci běžné stravy může docházet například k oxidaci tokoferolů hemovým a nehemovým železem Fe^{2+} nebo jinými sloučeninami s prooxidační aktivitou a lze se tak domnívat, že oxidace způsobuje ztráty tokoferolů, které je třeba kvantifikovat (Terao et al., 1995).

Vitamín E, jakožto lipofilní vitamín, je vstřebáván skrze mikroklky tenkého střeva a jeho absorpci je třeba množství oleje. Absorpce je pozitivně ovlivněna množstvím tuku, ale optimální hranice ještě přínosného množství dosud nebyla stanovena. Nejprve musí být uvolněn z tzv. potravinové matrice v žaludku a následně se musí v duodenu včlenit do micel solí žlučových kyselin, pankreatické směsi a fosfolipidů (Yang & McClements, 2013).

Dle výzkumu Jeanes et al., 2004 bylo prokázáno, že u sledovaných osob, které konzumovaly převahu polynasyčených mastných kyselin došlo k zvýšení koncentrace vitamínu E v krevní plasmě o 7 %. Na využitelnost vitamínu E má rovněž vliv také textura přijímané potravy a výsledky ukazovaly, že potraviny se spongiózní strukturou jako například chléb, zvyšovaly využitelnost tokoferolů v kombinaci s tukem (Jeanes et al., 2004).

Využitelnost vitamínu E ovlivňuje i chemická povaha. Jak již bylo popsáno v literární rešerši, tokoferoly poměrně snadno podléhají oxidaci (například i fotooxidaci) a proto dlouhodobé skladování olejů není vhodné, tím spíše je nutno je skladovat v chladu a temnu. Díky těmto jevům procesů stárnutí olejů se mohou nacházet tokoferoly i v esterové formě, která má nižší využitelnost (Yang & McClements, 2013).

Ztráty α -tokoferolu, které byly dekovány jako součást této bakalářské práce byly popsány v tabulce 5 popisují rozdíl obsahu tokoferolu před trávením a po trávení. Tučným písmem byly vyznačeny hodnoty, které byly statisticky významné. U neoxidovaného oleje byla průměrná hodnota α -tokoferolu $257,50 \pm 4,88$, jak lze rozeznat z výsledkové tabulky 3. Tato hodnota se následně odečetla od příslušného přídatku α -tokoferolu.

Dle práce inženýrky Johanidesové, která byla průkazná, se dosahovalo ztrát α -tokoferolu 7 %. Ve studii Werner S. et al, 2011 tyto ztráty dosahovaly dokonce 15 % původního obsahu. Náš pokus je bohužel v tomto směru neprůkazný, jelikož v rámci Studentova t-testu ($N = 3$; $p = 0,05$; t-kritérium = 4,303) nepotvrdil statistický význam. Ztráty nebyly konzistentní v ohledu na ostatní práce. Dle t-testu byly statisticky významné jen některé výsledky a jsou popsány v tabulce 8.

Je možné, že dysbalance vznikla systematickou chybou v průběhu přípravy trávicích pokusů, či vznikla jako chyba měření.

Oxidativní ztráty α -tokoferolu

Úkolem mé bakalářské práce bylo ověřit výsledky získané v diplomové práci Ing. Johanidesové, respektive výsledky uvedené v článku připraveném k publikování, tj. článku „Ability of oxidized plant oils to initiate α -tocopherol losses during *in vitro* gastrointestinal digestion” (autoři: Monika Sabolová, Aneta Johanidesová, Kamila Karolína Vejdovská, Matěj Kohutiar, Vojtech Ilko, Matyáš Krtička, Diomid Revenco a Zuzana Réblová). V těchto předchozích experimentech byly realizovány shodné pokusy jako v mé bakalářské práci. Přitom bylo zjištěno následující:

Studie potvrdila výchozí hypotézu, tedy že při konzumaci potravin obsahujících oxidované tuky a oleje (které často neobsahují žádné tokoferoly) mohou tyto potraviny způsobit ztrátu tokoferolů z jiných potravin v trávicím traktu a tím snížit příjem vitamínu E. Tyto ztráty nejsou zanedbatelné, ale pravděpodobně je sníží současný dostatečný příjem antioxidantů, jako je kyselina askorbová.

Tabulka 7: Výsledky článku “Ability of oxidized plant oils to initiate α -tocopherol losses during *in vitro* gastrointestinal digestion”. Oxidační ztráty α -tokoferolu (mg/kg oleje) vyvolané oxidovanými rostlinnými oleji v *in vitro* modelu trávicího traktu (Sabolová et al., 2021).

Model	Rapeseed oil oxidized at 60°C for 2 weeks	Rapeseed oil oxidized at 180°C for 4 hours
Stomach only	non-significant	non-significant
Also small intestine without pancreatin	92.2 ± 23.3 ^a	non-significant
Also small intestine with pancreatin	106.6 ± 29.6 ^a	70.9 ± 24.2 ^a

Ztráty α -tokoferolu zjištěné v jednotlivých modelech trávicího traktu, které byly realizovány v této bakalářské práci s neoxidovaným řepkovým olejem, řepkovým olejem oxidovaným po dobu 2 týdnů při teplotě 60 °C a řepkovým olejem oxidovaným při 180 °C po dobu 4 h bohužel nebyly průkazné. Výsledky této bakalářské práce se, jak již bylo zmíněno, zásadně lišily od výsledků diplomové práce Ing. Johanidesové. V bakalářské práci se při výpočtu oxidativních ztrát α -tokoferolu se statistický význam neprojevil ani u jednoho vzorky. Byl použit Studentův t-test ($N = 3$; $p = 0,05$; t-kritérium = 4,303) (Johanidesová, diplomová práce).

V diplomové práci inženýrky Anety Johanidesové, na kterou tato bakalářská práce navazuje byly diskutovány zajímavé fenomény. Například, že některé složky směsi žluči a pankreatinu mají antioxidační účinky. Zejména pak poukazuje na konjugovaný bilirubin, který je významným lipofilním terčem volných radikálů a významně inhibuje lipidovou oxidaci. V tom případě se bude jednat o kompetici mezi bilirubinem a α -tokoferolem.

Zajímavým fenoménem byly v této práci zjištěné nulové oxidativní ztráty α -tokoferolu pozorované při inkubaci oleje oxidovaného při 60 °C v modelu žaludku po dobu 1 h. Předpoklad byl, že ztráty budou významně vyšší, kvůli kyselému prostředí žaludku zesilujícímu peroxidaci lipidů. Pravděpodobně byl fenomén způsoben krátkou dobou oxidace (Johanidesová, diplomová práce).

Další zajímavý výsledek studie je, jak již bylo výše zmíněno, že peroxidové číslo pro olej oxidovaný při 60 °C je $140,79 \pm 4,3$ mEq O₂/kg, ale pro olej oxidovaný při 180 °C je pouze $12,96 \pm 0,60$ 26 mEq O₂/kg. Tento výsledek lze vysvětlit, že hydroperoxydy lipidů při vysokých teplotách zahřívání podléhají poměrně rychlým následným reakcím za vzniku sekundárních oxidačních produktů lipidů. Lze se tak domnívat, že hlavními oxidačními produkty způsobujícími ztráty α -tokoferolu v oleji oxidovaného při teplotě 60 °C jsou hydroperoxydy a případně radikály vznikající jejich rozkladem. Olej oxidovaný při teplotě 180 °C má poměrně nízkou hodnotu peroxidového čísla a poměrně značný obsah polymerních triacylglycerolů (Johanidesová, diplomová práce).

Studium ztrát tokoferolů vyvolaných oxidovanými lipidy v modelu trávicího traktu, kterému se věnovala tato bakalářská práce byla předčasně ukončena, kvůli nesourodosti výsledků. Z původních plánovaných 42 vzorů bylo uskutečněno 9 v každé sérii po 6. Jak lze pozorovat na číslech, tak se při výzkumu ani po opakované korekci postupu nepovedlo standardizovat hodnoty.

Předpoklad, že tepelná oxidace po průchodu trávicím traktem snižuje hodnotu α -tokoferolu nebyl výsledky výzkumu podpořen, vzhledem k tomu, že konečná data byla nesignifikantní. Dalšímu výzkumu se věnuje tým vědců z VŠCHT Praha ČZU pod vedením doc. Zuzany Réblové (VŠCHT Praha). Nesourodost výsledků mohla být způsobena prací několika vědců na více pracovištích. V dalším výzkumu při opakování pokusu by bylo vhodné uspořádat jej na jedno pracovišti, aby se předešlo systematické chybě.

7. Závěr

Výzkum bakalářské samotné musel být zastaven z důvodu nesignifikance výsledků. Chyba mohla být systematická v rámci provádění trávicích pokusů nebo mohla být způsobena chybou měření. Hypotéze, že oxidované lipidy vedou k významným ztrátám tokoferolů v modelu trávicího traktu v této bakalářské práci nebyla potvrzena.

Pokusy se prováděly na dvou pracovištích (laboratoře ČZU a VŠCHT) pro opakování postupu autor této bakalářské práce doporučuje zvolit jen jedno pracoviště, aby se zamezilo vzniku chyb. V návaznosti na toto téma vznikl, jak již bylo v práci zmíněno vědecký článek. Bylo by žádoucí rozvinout výzkum, který se bude týkat více ovlivňujících faktorů.

8. Seznam použitých zkratk

DNA deoxyribonukleová kyselina

LDL nízkodenzitní lipoprotein

HNE 4-hydroxy-2-nonenal

MAP-Tau microtubule associated proteins

PPAR peroxisome proliferator-activated receptors

13-HPODE 13-hydroperoxy-9,11-oktadekadienová kyselina

HEPE (hexanoyl)fosfatidylethanolamin

HEEA N-(hexanoyl)ethanolamin

HEPS (hexanoyl)fosfatidylserin

HESE N-(hexanoyl)-serin

GSH glutathion

TRxR thioredoxinreduktasa

Trx thioredoxin

NADPH nikotinamidadeninukleotidfosfát

ROS reaktivní formy kyslíku

AKR aldo-keto reduktasa

DHN 1,4-dihydroxynonan

MA merkaptouronová kyselina

HNA 4-hydroxynonanová kyselina

ONE 4-oxo-2-nonenalu

MDA malondialdehyd

PGH2 prostaglandin H2

M₁G pyrimido[1,2-!]purin-10(3H)-on

M₁A N₆-(3-oxo-propenyl)deoxyadenosin

M₁C N₄-(3-oxopropenyl)deoxycytidin

M₂G oxadiazabicyklo[3:3]nonen

9. Seznam literatury

4-Hydroxynonenal, Lipid peroxidation marker. *Abcam* [online]. [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/4-hydroxynonenal-lipid-peroxidation-marker-ab141502.html>

4-oxo-2-Nonenal. *Cayman* [online]. [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://www.caymanchem.com/product/10185>

ADIBHATLA, Rao Muralikrishna; HATCHER, James Franklin. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 2010, 12.1: 125-169.

ALARY, Jacques, et al. Identification of intermediate pathways of 4-hydroxynonenal metabolism in the rat. *Chemical research in toxicology*, 2003, 16.3: 320-327.

ARAI, Hirofumi, et al. Formation of N ϵ -(Hexanonyl) lysine in Oxidized Human Very-low-density Lipoprotein. *SEIBUTSU BUTSURI KAGAKU*, 2004, 48.1: 37-40.

CHMÁTALOVÁ, Z.; SKOUMALOVÉ, A. Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2014, 22.4.

CHOE, E.; MIN, D. B. Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of food science*, 2007, 72.5: R77-R86.

CHUNG, J.; LEE, J.; CHOE, E. Oxidative stability of soybean and sesame oil mixture during frying of flour dough. *Journal of food science*, 2004, 69.7: 574-578.

DALLEAU, Sabine, et al. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death & Differentiation*, 2013, 20.12: 1615-1630.

DAVYDOV, V. V.; BOZHKOVA, A. I. Metabolism of endogenous aldehydes: participation in oxidative stress-induced lesions and its age aspects. *Biomeditsinskaja khimija*, 2003, 49.4: 374-387.

DEL RIO, Daniele; STEWART, Amanda J.; PELLEGRINI, Nicoletta. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 2005, 15.4: 316-328.

DOORN, Jonathan A.; PETERSEN, Dennis R. Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chemical research in toxicology*, 2002, 15.11: 1445-1450.

DUŠEK, Ladislav, et al. Epidemiologie kolorektálního karcinomu v mezinárodním srovnání. *Kolorektum. cz*, 2014.

GERTZ, Christian; KLOSTERMANN, Sabine; KOCHHAR, S. Parkash. Deep frying: the role of water from food being fried and acrylamide formation. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 2003, 10.4: 297-303.

GHAZANI, Saeed Mirzaee; GARCÍA-LLATAS, Guadalupe; MARANGONI, Alejandro G. Micronutrient content of cold-pressed, hot-pressed, solvent extracted and RBD canola oil: Implications for nutrition and quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2014, 116.4: 380-387.

GRIFFITHS, Steven W.; KING, Jonathan; COONEY, Charles L. The reactivity and oxidation pathway of cysteine 232 in recombinant human α 1-antitrypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277.28: 25486-25492.

GUNSTONE, Frank. The chemistry of oils and fats: sources, composition, properties and uses. John Wiley & Sons, 2009.

HISAKA, Shinsuke, et al. The immunological and chemical detection of N-(hexanoyl) phosphatidylethanolamine and N-(hexanoyl) phosphatidylserine in an oxidative model induced by carbon tetrachloride. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010, 393.4: 631-636.

JEANES, Yvonne M., et al. The absorption of vitamin E is influenced by the amount of fat in a meal and the food matrix. *British Journal of Nutrition*, 2004, 92.4: 575-579.

JOHANIDESOVÁ, Aneta, VŠCHT Praha, Diplomová práce.

KAMAL-ELDIN, Afaf; APPELQVIST, Lars-Åke. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 1996, 31.7: 671-701.

KATO, Y.; MAKINO, Y.; OSAWA, T. Characterization of a specific polyclonal antibody against 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid-modified protein: formation of lipid hydroperoxide-modified apoB-100 in oxidized LDL. *Journal of lipid research*, 1997, 38.7: 1334-1346.

KATO, Yoji, et al. Formation of N ϵ -(hexanonyl) lysine in protein exposed to lipid hydroperoxide: a plausible marker for lipid hydroperoxide-derived protein modification. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274.29: 20406-20414.

- KITTNAR, Otomar, 2011. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3068-4.
- LATA, Jan, et al. Hepatorenální syndrom. *Interní medicína pro praxi*, 2013, 15.8-9: 253-255.
- MARNETT, Lawrence J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1999, 424.1-2: 83-95.
- MINEKUS, Mans, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 2014, 5.6: 1113-1124.
- MISHRA, Sundeep; MANCHANDA, S. C. Cooking oils for heart health. *J Pre Cardio*, 2012, 1.3: 123-131.
- NAZ, Shahina, et al. Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. *Food Research International*, 2005, 38.2: 127-134.
- OSÓRIO, Vanessa Moreira; DE LOURDES CARDEAL, Zenilda. Using SPME-GC/MS to evaluate acrolein production in cassava and pork sausage fried in different vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2013, 90.12: 1795-1800.
- POLI, Giuseppe, et al. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicinal research reviews*, 2008, 28.4: 569-631.
- RÉBLOVÁ, Zuzana, VŠCHT Praha [ústní informace]. Praha, 20.4.2022.
- RÉBLOVÁ, Zuzana; PEPRNÁ, T. Představují tuky a oleje po smažení zdravotní riziko?. *Chemické listy*, 2013, 107.4: 271-276.
- RIAHI, Yael, et al. Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2010, 299.6: E879-E886.
- RINDGEN, Diane, et al. Covalent modifications to 2'-deoxyguanosine by 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation. *Chemical research in toxicology*, 1999, 12.12: 1195-1204.
- SABOLOVÁ, Monika et al. Ability of oxidized plant oils to initiate α -tocopherol losses during *in vitro* gastrointestinal digestion, 2021
- SAITO, Fumie; IWAMOTO, Satoshi; YAMAUCHI, Ryo. Reaction Products of γ -Tocopherol with (E)-4-Oxo-2-nonenal in Acidic Acetonitrile. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2010, 74.1: 168-174.

SCHAUR, R. J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular aspects of medicine*, 2003, 24.4-5: 149-159.

Smoke Point of different Cooking Oils. In: *Charts Bin* [online]. [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: <http://chartsbin.com/view/1962>

SPICKETT, Corinne M. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: advances in chemistry and analysis. *Redox biology*, 2013, 1.1: 145-152.

SUMNU, Servet Gulum; SAHIN, Serpil. *Advances in deep-fat frying of foods*. CRC Press, 2008.

TERAO, Junji, et al. Effects of rat bile-pancreatic juice on Fe²⁺ induced peroxidation of phospholipids. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1995, 59.1: 55-58.

TURNER-WALKER, Gordon. The removal of fatty residues from a collection of historic whale skeletons in Bergen: an aqueous approach to degreasing. *World Wide Web*, 2012.

UCHIDA, Koji. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in lipid research*, 2003, 42.4: 318-343.

VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 9788086659176.

VOGT, Walther. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, 18.1: 93-105.

WARNER, K.; ORR, P.; GLYNN, MJ. Effect of fatty acid composition of oils on flavor and stability of fried foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997, 74.4: 347-356.

WERNER, Susanne; BÖHM, Volker. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from pasta: evaluation of an in vitro digestion model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011, 59.4: 1163-1170.

YAMAUCHI, Ryo; GOTO, Kumiko; KATO, Koji. Reaction of α -tocopherol in heated bulk phase in the presence of methyl linoleate (13S)-hydroperoxide or methyl linoleate. *Lipids*, 1998, 33.1: 77-85.

YANG, Ying; MCCLEMENTS, David Julian. Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. *Food Chemistry*, 2013, 141.1: 473-481.

Your Digestive System & How it Works [online]. [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/digestive-system-how-it-works>

ZAVORAL, Miroslav, et al. Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2014, 20.14: 3825.

ZEMÁNEK, D., et al. 2001. Morfologické poškození srdce při onemocnění ledvin. *Prakt. Léč.* **2001**(1), 5-8.