

Stanovení tepelné degradace vybraných jedlých olejů pomocí luminiscenční spektroskopie

Bc. Jana Janáčková

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Jana Janáčková
Osobní číslo: T15282
Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Technologie potravin
Forma studia: prezenční

Téma práce: Stanovení tepelné degradace vybraných jedlých olejů pomocí
luminiscenční spektroskopie

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika jedlých olejů se zaměřením na jejich změny při tepelné zátěži.
2. Přehled laboratorních metod pro kontrolu kvality jedlých olejů.
3. Princip luminiscenční spektroskopie.

II. Praktická část

1. Příprava tepelně upravených vzorků vybraných olejů.
2. Zhodnocení vzorků vybranými laboratorními metodami.
3. Naměření a vyhodnocení luminiscenčních spekter připravených vzorků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

[1] KONGBONGA, Y. M., H. GHALILA, M. B. ONANA, Y. MAJDI, Z. B. LAKHDAR, H. MEZLINI a S. SEVESTRE-GHALILA. Characterization of Vegetable Oils by fluorescence Spectroscopy. Food and Nutrition Sciences(online). 2011, 02(07), 692–699 [cit. 2016–08–24]. DOI: 10.4236/fns.2011.27095. ISSN 2157–944x.

[2] SIKORSKA, E., T. GÓRECKI, I. V. KHMELINSKII, M. SIKORSKI a J. KOZIOŁ. Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy. Food Chemistry(online). 2005, 89(2), 217–225 [cit. 2016–08–24]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.028. ISSN 03088146.

[3] POUILLI, K. I., N. V. CHANTZOS, G. A. MOUSDIS a C. A. GEORGIU. Synchronous Fluorescence Spectroscopy: Tool for Monitoring Thermally Stressed Edible Oils. DOI: 10.1021/jf902758d. ISBN 10.1021/jf902758d. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf902758d>.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Martina Bučková, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

3. února 2017

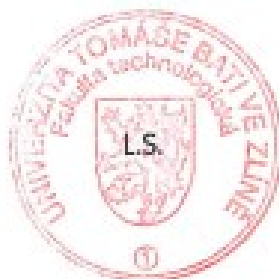
Termín odevzdání diplomové práce:

28. dubna 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ... JANAČOVÁ JANA

Obor: ... TP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně ... 26.4.2017

..... JANAČOVÁ

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezahrnuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

¹⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Nemá-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložil, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídáne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá stanovením degradace jedlých olejů s využitím luminiscenční spektroskopie, jakožto moderní rychlé a jednoduché metody bez nutnosti použití chemických činidel. Teoretická část práce je orientována na charakteristiku složení jedlých olejů se zaměřením na jejich změny při tepelné zátěži, jsou zde popsány i metody pro chemické analýzy stanovení oxidace lipidů a také popis luminiscenční spektroskopie.

Praktická část práce je zaměřena na naměření luminiscenčních spekter vybraných jedlých olejů a na jejich vyhodnocení v souvislosti s délkou záhřevu vzorků. Míru tepelné degradace vzorků pak dokreslují/dokumentují změny peroxidového čísla, čísla kyselosti a obsahu konjugovaných dienu, trienu, které byly zjištěny běžnými analytickými postupy.

Klíčová slova: rostlinné oleje, luminiscenční spektroskopie, oxidace, peroxidové číslo, číslo kyselosti

ABSTRACT

This diploma thesis deals with determination of degradation of edible oils using luminescence spectroscopy as a modern, fast and simple method without the use of chemical reagents. The theoretical part of the thesis is oriented on characteristics of edible oils composition with focus on their changes in thermal load. There are also described methods for chemical analysis of determination of lipid oxidation as well as description of luminescence spectroscopy.

The practical part is focused on the measurement of luminescence spectra of edible oils and their evaluation in relation to the length of sample heating. The degree of thermal degradation of the samples then illustrates/documents changes in the peroxide value, acid value and content conjugate diene, triene that were determined by conventional analytical procedures the performance of additional analyzes for verifying the degradation of selected samples of edible oils.

Keywords: edible oils, luminescence spectroscopy, oxidation, peroxide value, acid value

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce Mgr. Martině Bučkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a pomoc při jejím vypracování, také bych ráda poděkovala paní Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc a cenné rady při realizaci experimentu v laboratoři. A v neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině za podporu při studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA JEDLÝCH OLEJŮ SE ZAMĚŘENÍM NA JEJICH ZMĚNY PŘI TEPELNÉ ZÁTĚŽI	12
1.1 TRIACYLGLYCEROLY.....	12
1.2 MASTNÉ KYSELINY.....	13
1.3 NEGLYCEROLOVÉ SLOŽKY OLEJŮ – NEZMÝDELNITELNÉ LÁTKY	15
1.4 Vliv teploty na kvalitu oleje	16
2 PŘEHLED LABORATORNÍCH METOD PRO KONTROLU KVALITY JEDLÝCH OLEJŮ	18
2.1 ANALYTICKÉ METODY	18
2.2 STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU LIPIDŮ.....	18
2.3 SOXHLETOVA METODA	19
2.4 METODA EXTRAKCE ZA ZVÝŠENÉHO TLAKU/TEPLOTY ROZPOUŠTĚDLA	19
2.4.1 Superkritická fluidní extrakce (SFE).....	19
2.5 STANOVENÍ VLHKOSTI.....	20
2.5.1 Plotýnková metoda (hot – plate)	20
2.5.2 Sušení pomocí horkovzdušné sušárny	20
2.5.3 Metoda Karl Fischera	20
2.6 STANOVENÍ BODU TÁNÍ	20
2.6.1 Kapilární bod tání.....	21
2.7 STANOVENÍ BODU TUHNUTÍ	21
2.7.1 Stanovení bodu tuhnutí titračně.....	21
2.7.2 Stanovení bodu tuhnutí rychlou titrací	22
2.8 STANOVENÍ FUNKČNÍCH SKUPIN A CHARAKTERIZACE LIPIDŮ.....	22
2.8.1 Číslo zmydlnění	22
2.8.2 Jodové číslo	23
2.9 STANOVENÍ TRANS-NENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN	23
2.10 STANOVENÍ KONJUGOVANÝCH MASTNÝCH KYSELIN	24
2.11 STANOVENÍ ESENCIÁLNÍCH MASTNÝCH KYSELIN	24
2.12 PEROXIDOVÉ ČÍSLO (PV).....	24
2.13 THIOBARBITUROVÉ ČÍSLO (TBA).....	25
2.14 ANISIDINOVÉ ČÍSLO.....	26
2.15 STANOVENÍ PEVNÉHO PODÍLU OLEJE - SFC	26
2.16 INDEX PEVNÉHO PODÍLU TUKU – SFI.....	26
2.17 STANOVENÍ STABILITY LIPIDŮ VŮČI AUTOOXIDACI	27
2.17.1 Metoda aktivního kyslíku (AOM).....	27
2.17.2 Schaalův test.....	27
2.18 STANOVENÍ FRAKČÍ LIPIDŮ	28
2.18.1 Stanovení celkového obsahu fosfolipidů	28
3 PRINCIP LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE	29

3.1	LUMINISCENCE ORGANICKÝCH A ANORGANICKÝCH LÁTEK	29
3.2	FOTOLUMINISCENCE – FLUORESCENCE, FOSFORESCENCE	30
3.2.1	Chemiluminiscence	31
3.2.2	Singletové a tripletové excitované stavy	31
3.2.3	Deaktivační procesy – zhasení luminiscence	31
3.2.4	Typy přechodů ve fluorescenci	32
3.2.5	Fluorescence a struktura molekuly	32
3.3	EMISNÍ A EXCITAČNÍ SPEKTRA	32
3.4	VYUŽITÍ LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V POTRAVINÁŘSTVÍ	33
II	PRAKTICKÁ ČÁST	36
4	CÍL PRÁCE.....	37
5	MATERIÁL A PŘÍSTROJE	38
5.1	MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	38
5.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE, NÁDOBY.....	38
6	METODIKA.....	39
6.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ VYBRANÝCH OLEJŮ.....	39
6.2	MĚŘENÍ LUMINISCENČNÍCH SPEKTER VZORKŮ OLEJŮ	40
6.3	STANOVENÍ PEROXIDOVÉHO ČÍSLA	42
6.4	STANOVENÍ ČÍSLA KYSELOSTI	43
6.5	STANOVENÍ KONJUGOVANÝCH DIENŮ A TRIENŮ.....	43
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
7.1	MĚŘENÍ LUMINISCENČNÍCH SPEKTER	45
7.1.1	Určení excitační vlnové délky	45
7.1.2	Luminiscenční spektra testovaných olejů	46
7.2	STANOVENÍ PEROXIDOVÉHO ČÍSLA	60
7.2.1	Slunečnicový olej	60
7.2.2	Řepkový olej	61
7.2.3	Olivový olej z pokrutin	62
7.2.4	Olivový olej extra panenský.....	63
7.2.5	Palmový olej.....	64
7.3	STANOVENÍ ČÍSLA KYSELOSTI – VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN	65
7.3.1	Slunečnicový olej	66
7.3.2	Řepkový olej	67
7.3.3	Olivový olej z pokrutin	67
7.3.4	Olivový olej extra panenský.....	68
7.3.5	Palmový olej.....	69
7.4	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ	70
7.4.1	Slunečnicový olej	71
7.4.2	Řepkový olej	72
7.4.3	Olivový olej z pokrutin	72
7.4.4	Olivový olej extra panenský.....	73
7.4.5	Palmový olej.....	74
	ZÁVĚR	75
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	82
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	83
SEZNAM PŘÍLOH.....	85

ÚVOD

Znalost chemického složení olejů je velmi cenou informací pro hodnocení jejich kvality. Kromě hlavních složek, což jsou triacylglyceroly, obsahují oleje asi 2–5 % dalších sloučenin, které mají výrazný vliv na kvalitu. Mezi tyto sloučeniny patří například tokoferoly a karotenoidy ovlivňující oxidační stabilitu olejů, a také chlorofyly, jež jsou zodpovědné za fotooxidaci olejů. Oxidaci ovlivňuje i druh a množství jednotlivých mastných kyselin v triacylglycerolu.

Pro stanovení úrovně oxidace lipidů je běžně využíváno několik analytických metod. Mezi tyto metody patří stanovení peroxidového, thiobarbiturového, p-anisidinového čísla a čísla kyselosti. Pro ulehčení a urychlení analýz je snaha využívat moderní instrumentální metody, zejména tedy chromatografické a spektroskopické.

Luminiscenční (fluorescenční) spektroskopie je jednou z moderních technik, která má rostoucí význam v oblasti komplexní analýzy potravin. Mezi výhody této metody patří vyšší selektivita ve srovnání s jinými spektroskopickými metodami, vysoká citlivost na široké rozmezí potenciálních analytů, další výhodou je vyhnutí se spotřebě činidel (rozpouštědel) a rozsáhlým předúpravám vzorků.

Práce je koncipována do dvou hlavních celků – teoretické a praktické části. V teoretické části je popisována charakteristika jedlých olejů, metody pro stanovení kvality olejů a princip luminiscenční spektroskopie. Praktická část práce je zaměřena na naměření luminiscenčních spekter a provedení doplňkových analýz pro ověření degradace vybraných vzorků jedlých olejů.

Cílem práce je ověření použitelnosti metody luminiscenční spektroskopie pro stanovení tepelné degradace jedlých olejů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

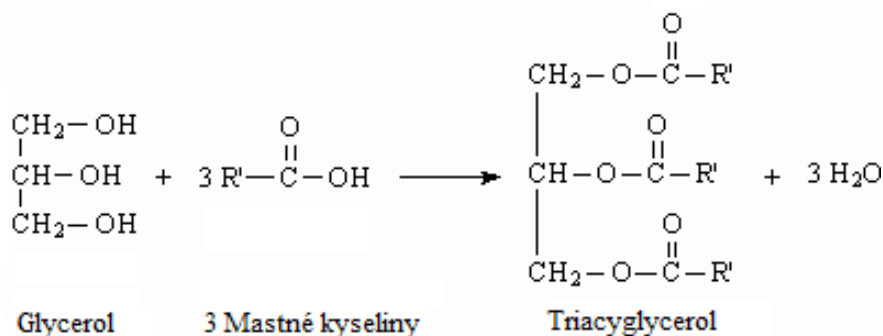
1 CHARAKTERISTIKA JEDLÝCH OLEJŮ SE ZAMĚŘENÍM NA JEJICH ZMĚNY PŘI TEPELNÉ ZÁTĚŽI

Oleje dostupné v běžném obchodě obsahují směs organických molekul. V největší míře jsou zastoupeny triacylglyceroly (běžně označované také jako triglyceridy), které jsou doprovázeny diacylglyceroly (diglyceridy), monoacylglyceroly (monoglyceridy), volnými mastnými kyselinami a dalšími složkami. Sloučeniny, jež nejsou po hydrolyze rozpustné ve vodném roztoku alkalických kovů, se označují jako nezmýdelnitelné látky. Mezi zmíněné další složky patří fosfolipidy, fytoosteroly, tokoly (tokoferoly, tokotrienoly, včetně vitamínu E). Chemické a fyzikální vlastnosti olejů jsou do značné míry určovány obsaženými mastnými kyselinami a jejich pozicí v molekule triacylglycerolu. Chemicky jsou všechny oleje estery glycerolu a mastných kyselin, nicméně fyzikální vlastnosti přírodních olejů se velmi liší, protože se jedná o různé podíly mastných kyselin a tím i struktura triacylglycerolu je pro jednotlivé oleje rozdílná. Všechny triacylglyceroly mají stejnou glycerolovou jednotku, takže jsou to právě mastné kyseliny, které ovlivňují vlastnosti. Složky mastných kyselin se liší třemi způsoby: délkou řetězce, počtem a umístěním dvojných vazeb, a polohou mastných kyselin v glycerolové molekule. Změny v jednotlivých charakteristikách jsou zodpovědné za chemické a fyzikální rozdíly ve vlastnostech jedlých olejů [1, 2].

1.1 Triacylglyceroly

Hlavní chemickou složkou jedlých tuků a olejů jsou tedy triacylglyceroly. Struktura triacylglycerolu v jedlých olejích je ovlivněna přítomností již zmíněných mastných kyselin a bodem připojení každé mastné kyseliny do glycerolu. Triacylglyceroly s třemi stejnými mastnými kyselinami se nazývají monotriacylglyceroly. Molekuly obsahující více než jeden typ mastných kyselin jsou označovány jako směsné triacylglyceroly [1, 3].

Vzorec triacylglycerolu lze vidět na Obr. 1. Většina mastných kyselin, které se přirozeně vyskytují v potravinách, má sudý počet atomů uhlíků (obvykle méně než 24) a mají spíše rovný, nerozvětvený řetězec. Jedlé oleje obsahují komplexní směsi triacylglycerolů, ale některé mastné kyseliny mohou převládat, obvykle jsou to kyselina stearová, palmitová, laurová, olejová a linolová. Kromě triacylglycerolů obsahují oleje také diacylglyceroly, monoacylglyceroly, volné mastné kyseliny a další minoritní složky [3].



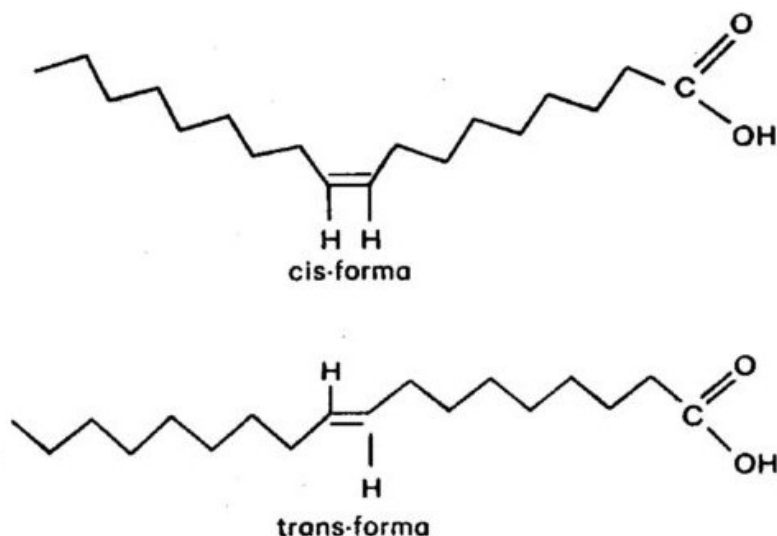
Obr. 1 Rovnice vzniku triacylglycerolu [4].

1.2 Mastné kyseliny

Označením mastné kyseliny jsou myšleny karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem, který obsahuje více než čtyři atomy uhlíku [5].

Mastné kyseliny jsou klasifikovány podle jejich stupně nasycenosti:

- Nasycené mastné kyseliny – mastné kyseliny, ve kterých všechny atomy uhlíku v řetězci obsahují dva atomy vodíku, proto nemají žádné dvojně vazby. V tucích a olejích jsou nejčastěji kyseliny $\text{C}_{12:0}$ – $\text{C}_{18:0}$. Nejběžnější je obsah kyseliny palmitové, kterou obsahují téměř všechny rostlinné i živočišné tuky [1].
- Mononenasycené mastné kyseliny – mastné kyseliny, jež mají jednu dvojnou vazbu v uhlikovém řetězci. Nejvýznamnějším zástupcem z této skupiny mastných kyselin je kyselina olejová. Jednotlivé mononenasycené mastné kyseliny se od sebe mohou lišit nejen počtem uhlíků v molekule, ale i polohou dvojně vazby a jejím prostorovým uspořádáním. Ve většině případů se jedná o prostorovou konfiguraci *cis*. Další možností prostorové konfigurace je *trans*, ale ta je poměrně vzácná, může ovšem vznikat technologickým zpracováním potravin. Jednotlivé prostorové konfigurace lze vidět na Obr. 2. Skutečnost, zdali se jedná o mastnou kyselinu s konfigurací *cis* nebo *trans*, výrazným způsobem ovlivňuje fyzikální vlastnosti, například bod tání, mastných kyselin [1, 5].



Obr. 2 Znázornění prostorové konfigurace cis a trans [5].

- Polynenasycené mastné kyseliny – mastné kyseliny, které mají dvě nebo více dvojných vazeb v uhlovodíkovém řetězci. Některé z nich se řadí mezi esenciální mastné kyseliny. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je kyselina linolová, jež je zároveň i esenciální. Dalším významným zástupcem je kyselina linolenová, α -linolenová [5].

Každá mastná kyselina má individuální bod tání. Bod tání nasycených mastných kyselin se zvyšuje s délkou řetězce a snižuje s nenasyceností mastné kyseliny. Pro danou délku řetězce mastné kyseliny, bude mít nasycená mastná kyselina vyšší bod tání než nenasycená mastná kyselina se stejnou délkou řetězce [1, 5].

Nenasycené mastné kyseliny jsou chemicky více aktivní než nasycené vlivem přítomnosti dvojných vazeb. Dvojně vazby jsou předmětem k oxidaci, polymerizaci, hydrogenaci a isomeraci. Fyzikální vlastnosti olejů závisí na stupni nenasycenosti, délce uhlíkového řetězce, konfiguraci mastné kyseliny a molekulární konfiguraci. Pokud tuky obsahují vysoký podíl nenasycených mastných kyselin, jsou obvykle při pokojové teplotě v kapalném stavu. V případě, že je podíl nenasycených mastných kapalin nižší, pak je tuk v pevném stavu. Toto všeobecné tvrzení ovšem může být ztíženo *trans*-isomery, které mají rozdílné teploty tání oproti *cis*-isomerům v nenasycených mastných kyselinách [1, 5].

1.3 Neglycerolové složky olejů – nezmýdelnitelné látky

Primární složkou, jak už bylo řečeno, v surovém oleji jsou triacylglyceroly. Olej také obsahuje různá množství minoritních složek, mnoho z nich významně ovlivňuje chemické a fyzikální vlastnosti olejů. Tyto minoritní složky, také nazývané jako nezmýdelnitelné látky, zahrnují fosfolipidy, tokoferoly, steroly, pryskyřice, sacharidy, pesticidy, proteiny, stopové kovy a pigmenty jako je gossypol, karoten a chlorofyl. Některé, ale ne všechny, neglycerolové komponenty jsou nežádoucí, proto je cílem u všech jedlých olejů odstranit tyto složky s nejmenším možným poškozením složek žádoucích [1, 3].

Fosfolipidy, nebo také fosfatidy, jsou emulgátory a brání separaci olejové a vodné fáze v procesu chemické rafinace. Dále působí jako katalytické jedy a zkracují životnost povrchů zařízení. Fosfolipidy je možné rozdělit do dvou skupin: hydrolyzovatelné a nehydrolyzovatelné, v závislosti na účinku, který na ně má voda. Hydrolyzovatelné fosfolipidy (fosfatidylcholin a fosfatidylinositol) mohou být separovány z olejové fáze s vodou. Nehydrolyzovatelné fosfolipidy (fosfatidová kyselina a lysofosfatová kyselina), vápenaté a draselné soli těchto kyselin zůstávají po odslizování zachycené v olejové fázi [1].

Tokoly, přírodní antioxidanty, se nacházejí v olejích na rostlinné bázi. Tato skupina zahrnuje čtyři tokoferoly a čtyři tokotrienolové isomery, označované jako alfa, beta, gama a delta na základě chromanového kruhu. Tokoferoly mají nasycený postranní řetězec a tokotrienoly mají postranní řetězec nenasyčený. Tyto antioxidanty pomáhají udržovat stabilitu olejů [1, 5].

Steroly jsou minoritní složkou všech přírodních tuků a olejů, zahrnující většinu nezmýdelnitelných látek. Steroly mají vysokou teplotu tání, jsou bezbarvé, tepelně stabilní a relativně inertní. Mohou být přítomny jako volné nebo esterifikované. Většina rostlinných olejů obsahuje 1000-5000 ppm (1-5 g/kg) sterolů [1, 2].

Barevné látky v tucích a olejích jsou karoteny, které dávají oleji žlutou až červenou barvu, chlorofyly, které dodávají nazelenalý odstín, degradované proteiny a sacharidy, které dávají nahnědlý odstín [1].

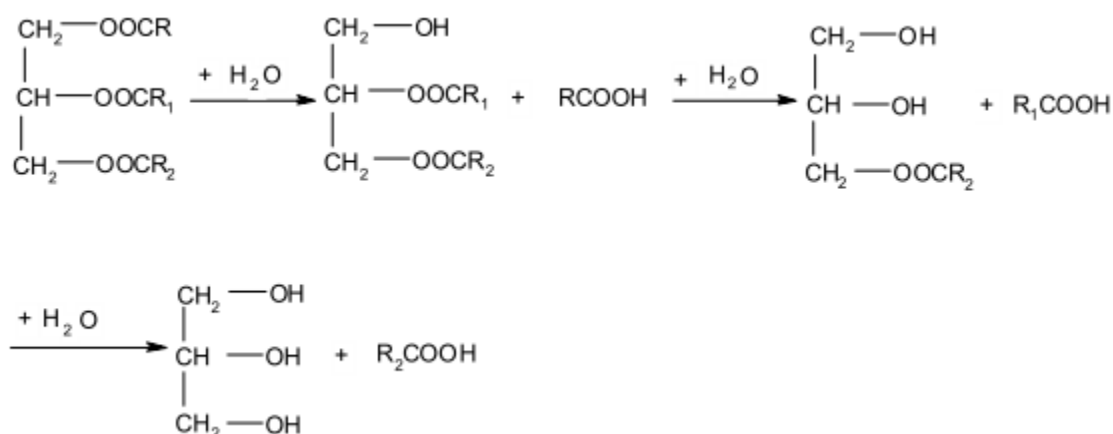
1.4 Vliv teploty na kvalitu oleje

Jeden z faktorů, které snižují kvalitu oleje, je právě teplota. Zahřátí oleje na teplotu smažení 185 °C po dobu až 6 hodin postupně zvyšuje tvorbu polárních lipofilních aldehydů. Je známo, že opětovné použití oleje na smažení je spojeno s různými zdravotními problémy. Vyšší teplota způsobuje zvyšování čísla kyselosti. Vysoké číslo kyselosti je způsobeno vysokým obsahem volných mastných kyselin, což vede ke žluknutí olejů a k tvorbě *trans*-mastných kyselin, které jsou zodpovědné za zvyšování hladiny cholesterolu v krvi, zejména ovlivňují poměr lipoproteinů s nízkou a vysokou hustotou [7].

Bylo prokázáno, že zvýšený obsah volných mastných kyselin způsobuje změnu barvy oleje, nízký bod zakouření, nízkou hodnotu jodového čísla, vysokou hodnotu peroxidového čísla, vysokou pěnovost a zvýšení viskozity. Toto vše jsou indikátory nekvalitních olejů [7].

Během smažení dochází v oleji k celé řadě reakcí, které probíhají současně a vzájemně se doplňují [8].

Jednou z těchto reakcí je hydrolýza. Hydrolýza triacylglycerolů je způsobena vodní parou, která se uvolňuje ze smažené potraviny. Hydrolýza je urychlována přítomností polárních látek jako jsou monoacylglyceroly, diacylglyceroly, jež zvyšují pěnovost oleje. Průběh této reakce lze vidět na Obr. 3 [8].



Obr. 3 Průběh hydrolýzy triacylglycerolu [8].

Dalším typem reakce, probíhající za vyšší teploty, je oxidační reakce. Nenasycené mastné kyseliny oxidují i při skladovacích teplotách, naproti tomu nasycené mastné kyseliny oxidují

jen při vyšších teplotách (smažení). Během těchto reakcí vznikají primární produkty oxidace – hydroperoxydy, které se dále rozkládají na sekundární produkty oxidace nebo polymerují. Mezi zmíněné sekundární produkty patří aldehydy, uhlovodíky a oxokyseliny [9, 10, 2].

Oxidace lipidů je tedy hlavní příčinou zhoršení jakosti. Hydroperoxydy, vzniklé reakcí mezi kyslíkem a nenasycenými mastnými kyselinami, nemají chuť nebo vůni, ale rychle se rozkládají a tvoří například zmíněné aldehydy, které mají silnou nepříjemnou chuť a vůni. Koncentrace peroxidů, obvykle vyjádřena jako peroxidové číslo, je měřítkem oxidace nebo žluknutí v jeho raných fázích. Během oxidace lipidů vzniká i malondialdehyd, minoritní složka mastných kyselin se 3 a více dvojnými vazbami, jako výsledek degradace polynenasycených mastných kyselin [1, 11].

Během tepelných úprav může docházet i k polymeračním reakcím. Polymerace doprovází isomerační reakce při extrémním záhřevu a cyklizaci mastných kyselin. Při polymeraci vznikají cyklické i lineární polymery s vazbou mastných kyselin C-C, kromě těchto polymerů se vytvářejí i lineární polymery s etherovými C-O-C a peroxidovými C-O-O-C vazbami. Vzniklé polymery urychlují průběh degradace oleje, zvyšují jeho viskozitu a pěnovost. Vznik polymerů ovlivňuje druh oleje, teplota záhřevu [2, 12, 13].

Pyrolytické reakce probíhají při teplotách smažení pouze ve velmi omezené míře. Jejich výraznější průběh začíná až při teplotách nad 200 °C. Během této reakce dochází k dehydrataci oxidačních produktů, k jejich reakci s bílkovinami nebo jinými složkami potravin, při kterých vznikají výrazně sensoricky aktivní látky. Do těchto reakcí patří i rozklad glycerolu, který se uvolňuje hydrolytickými reakcemi, na akrolein, respektive 2-propenal [12].

2 PŘEHLED LABORATORNÍCH METOD PRO KONTROLU KVALITY JEDLÝCH OLEJŮ

Přesná kvantitativní a kvalitativní analýza lipidů v potravinách je důležitá jednak z hlediska nutričního, k určení, zda potravinu splňuje standardy, a také k ověření, zda výrobek splňuje výrobní specifikace [15].

2.1 Analytické metody

Celkový obsah lipidů v potravině je běžně možné určit extrakcí organickými rozpouštědly. Přesnost těchto metod závisí ve velké míře na rozpustnosti lipidů v použitém rozpouštědle a schopnosti oddělení lipidů z komplexů s jinými makromolekulami. Obsah lipidů stanovený extrakcí jedním rozpouštědlem může být zcela odlišný od stanoveného obsahu extrakcí s jiným rozpouštědlem rozdílné polaritě. Kromě extrakčních metod s použitím rozpouštědla existují i metody mokré extrakce bez rozpouštědla a několik instrumentálních metod, které využívají chemické vlastnosti lipidů [15].

2.2 Stanovení celkového obsahu lipidů

Stanovení celkového obsahu lipidů zahrnuje sumu všech látek extrahovatelných daným rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel za podmínek dané metody. Extrakce organickými lipofilními rozpouštědly nebo směsí rozpouštědel se provádí za uzančných podmínek (návážka, čas, způsob a doba extrakce, množství a typ rozpouštědla) nebo kvantitativního průběhu extrakce. Nejčastěji používané metody jsou metoda Soxhletova, Grossfeldova nebo Gerberova [15].

Výtěžnost metody je závislá na podmínkách extrakce, především na teplotě. Ta by neměla překročit 35 °C. Při vyšších teplotách by mohlo dojít k enzymatickému štěpení (lipolytickými enzymy). Kvantitativnost extrakce ovlivňuje použité rozpouštědlo (petroletherem lze extrahovat acylglyceroly, nezmýdelnitelné látky a mnohé jiné složky, diethyletherem lze extrahovat především acylglyceroly, volné mastné kyseliny). Často se volí i směsi rozpouštědel (chloroform:metanol 1:1, diethylether:etanol 1:1). Vzorek oleje/tuku se rozpustí v příslušném rozpouštědle a následně se rozpouštědlo odpaří. Tuk se stanoví gravimetricky, denzitometricky nebo fyzikálně-chemickými metodami jako je například IR, NMR a podobně [16].

Jednou z možností stanovení je butyrometrie (Gerberova metoda). V této metodě se vzorek hydrolyzuje přidáním kyseliny sírové, následně se uvolněný tuk po přidavku 1-pentanolu (amylalkoholu) odstředí a jeho objem se odečte na kalibrované stupnici butyrometru v % m/m. Tato metoda je nejvhodnější pro maso, smetanu a sýry [16].

Další možností je denzitometrická (oleometrická) metoda, u které se po provedení extrakce rozpouštědlem 1,2-dichlorbenzenem, stanoví hustota extraktu a následně se obsah tuků odečte z kalibračního grafu. Tato metoda je vhodná pro olejiny [16].

2.3 Soxhletova metoda

Metoda dle Soxhleta patří mezi polospojité metody extrakce rozpouštědlem a slouží k určení celkového obsahu lipidů. Při této metodě se rozpouštědlo hromadí v extrakční komoře po dobu 5 – 10 minut a zcela obklopuje vzorek, poté putuje přes sifon zpět do varné baňky. Obsah tuku se stanoví jako úbytek hmotnosti vzorku nebo jako hmotnost odstraněného tuku [15].

2.4 Metoda extrakce za zvýšeného tlaku/teploty rozpouštědla

Metody extrakce lipidů, zahrnující interakce rozpouštědla se vzorkem při vysokém tlaku/teplotě, obsahují superkritickou fluidní extrakci a zrychlenou extrakci rozpouštědlem [15].

2.4.1 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Tekutina (velmi často CO₂) je přivedena ke specifické kombinaci tlaku a teploty, které umožňují dosáhnout superkritického stavu rozpouštědla, vlastností nutných pro selektivní extrakci tuku z matrice vzorku. Vzorek se tedy vystaví působení superkritického rozpouštědla za kontrolovaných podmínek času, teploty a tlaku, což umožní rozpuštění lipidů ve vzorku. Rozpuštěné lipidy se následně oddělí od rozpouštědla výrazným poklesem tlaku roztohu. Vysrážený tuk se poté suší a je vyhodnocen jako procento tuku na hmotnost vzorku [15].

2.5 Stanovení vlhkosti

Vlhkost (voda) může kontaminovat olej několika způsoby: kondenzace, záměrné přidání během zpracování apod. Zvyšující se vlhkost může vyvolávat hydrolyzu s výsledným zvýšením obsahu volných mastných kyselin a pachutí. Příkladem analytické metody k identifikování a kvantifikování vlhkosti jsou plotýnková metoda, stanovení sušení horkovzdušnou sušárnou nebo metoda Karl Fischera [1].

2.5.1 Plotýnková metoda (hot – plate)

Je jednou z nejběžnějších metod stanovení vlhkosti v oleji. Přibližně 10 gramů reprezentativního vzorku se zahřívá v kádince s jemným mícháním na topné desce až do zpěnění a začátku kouření. Úbytek hmotnosti vzorku mezi začátkem a koncem představuje vlhkost a těkavé látky [1].

2.5.2 Sušení pomocí horkovzdušné sušárny

Výsledky této metody jsou přesnější a spolehlivější než předchozí metoda, nicméně je časově náročnější. Pro tuto metodu se odváží 5 g reprezentativního vzorku do suché misky a suší se v sušárně po dobu 30 minut při teplotě 101 ± 1 °C. Tento postup se opakuje do konstantní hmotnosti. Úbytek hmotnosti se vyjádří jako vlhkost a těkavé látky [1].

2.5.3 Metoda Karl Fischera

Slouží ke stanovení vlhkosti v širokém rozmezí materiálů. Tuto odměrnou metodu pro stanovení vlhkosti lze provést běžnou vizuální titrací nebo pomocí metody elektrometrické. U běžné vizuální titrace je koncovým bodem změna barvy ze žluté na hnědou. U elektrometrické metody titrace je stanovení vlhkosti přesnější [1].

2.6 Stanovení bodu tání

Bod tání je obvykle definován jako bod, ve kterém se materiál mění z pevné látky na kapalinu. Čisté složky mají ostrý a dobře definovaný bod tání, ale tuky a oleje jsou komplexy

skládající se z více složek, které prochází postupným měknutím, před tím, než se z něj stane kapalina. Tento proces tání je dále zkomplikován i faktem, že krystalky tuku mohou existovat v několika polymorfických modifikacích, v závislosti na specifických triacylglycerolech a teplotě/času předčištění vzorku. Rozdílné krystalové formy jsou dostatečně stabilní pro rozlišení výrazného bodu tání; proto je lepší použít názvy jako rozsah tání nebo interval tání. Mnoho metod je založeno ke stanovení bodu tání nebo bodu, který je blízký bodu tání, některé přímým pozorováním a některé nepřímou a objektivní metodou [1, 15].

2.6.1 Kapilární bod tání

V této metodě jsou použity kapilární trubičky (vnitřní průměr 1 milimetr) naplněné do výšky 10 milimetrů roztaveným tukem, na konci jsou utěsněny a temperovány po dobu 16 hodin ze 4 na 10 °C. Po temperování jsou kapilární trubičky zahřívány v lázni rychlostí 0,5 °C za minutu, přičemž ohřev začíná 8 až 10 °C pod očekávaným bodem tání, dokud tuk nebude kompletně čistý [1, 15].

2.7 Stanovení bodu tuhnutí

Bod tuhnutí směsi mastných kyselin je bod, ve kterém je dosaženo rovnováhy mezi vznikajícím teplem a tepelnými ztrátami, jež se budou lišit v závislosti na míře krystalizace a stupni předchlazení kapaliny. Hodnocení těchto vlastností tuků a olejů je jedno z nejstarších a slouží pro kontrolní účely [1].

Obecně se tedy bod tuhnutí stanoví ochlazením roztaveného vzorku tuku za stálého míchání, dokud se tuk nezakalí. Vzorek se poté nechá v klidu na vzduchu při teplotě 20 °C, za těchto podmínek dojde ke zvýšení jeho teploty. Nejvyšší dosažená teplota je bod ztuhnutí, což je odhad teploty tuhnutí tuku [1].

2.7.1 Stanovení bodu tuhnutí titračně

Pro toto stanovení se nejprve vzorek musí zmýdelnit a následně vysušit. Poté se byreta naplní do objemu 57 mililitrů po rysku vysušenou mastnou kyselinou a ponechá se suspendovat ve

vzduchové lázni, která je obklopena vodní lázní s teplotou o 15 – 20 °C nižší, než je očekávaný výsledek titru. Vzorek se míchá po dobu, kdy teplota stoupá nebo do doby, kdy teplota zůstává konstantní po dobu 30 sekund. Poté se ustane s mícháním a koncový bod je zaznamenán jako maximální teplota pro krystalizaci tuku [1].

2.7.2 Stanovení bodu tuhnutí rychlou titrací

Rychlá titrace slouží jako kontrola hydrogenace pevné frakce, jež se obvykle provádí stanovením rychlého titru, protože běžná titrace je pro kontrolní účely příliš časově náročná. Analýza rychlé titrace se provádí ponořením skleněného teploměru do tekutého vzorku oleje/tuku. Otáčením stonku teploměru mezi prsty následně dochází k ochlazení oleje/tuku na pokojovou teplotu. Koncový bod je teplota, kdy se tuk na teploměru zakalí [1].

2.8 Stanovení funkčních skupin a charakterizace lipidů

Znalost složení tuků a olejů je velmi důležitá v téměř každé fázi výrobní technologie. Analytické metody pro stanovování složek tuků a olejů se vyvinuly od chemické separace po instrumentální metody. Atraktivita instrumentálních metod spočívá v jejich rychlosti a přesnosti, jejich použití však obvykle vyžaduje provedení kalibrací a standardizací [1].

2.8.1 Číslo zmydlnění

Číslo zmydlnění je měřítkem skupiny alkalicky reagujících skupin v tucích, olejích a je užitečné pro předvídání typu glycerolů ve vzorku. Obsah glycerolů s mastnými kyselinami s krátkým řetězcem mají vyšší číslo zmydlnění než ty s delším řetězcem mastných kyselin. Číslo zmydlnění spolu se stanovením jodového čísla jsou užitečné screeningové testy pro kontrolu kvality a pro charakterizaci typu tuků a olejů [1].

Číslo zmydlnění tedy udává obsah veškerých mastných kyselin (volných i těch esterově vázaných). Stanovení se provede rozpuštěním vzorku v polárním rozpouštědle (diethyleteru), následně se přítomné lipidy zmydlní za varu alkoholickým roztokem KOH ($c = 0,5 \text{ mol/l}$) pod zpětným chladičem a poté se přebytek KOH titruje HCl o koncentraci $0,5 \text{ mol/l}$ na indikátor fenolftalein [16].

Číslo zmydlení, jinak řečeno, je množství alkalického kovu (v tomto případě tedy mg hydroxidu draselného), které je potřebné ke zmydlení určitého množství oleje, protože všechny mastné kyseliny „vážou“ jednu molekulu hydroxidu draselného. Číslo zmydlení je i nepřímým měřítkem průměrné molekulové hmotnosti triacylglycerolů v oleji [17].

2.8.2 Jodové číslo

Stanovení jodového čísla je jednoduchá a rychlá metoda pro určení chemických konstant pro tuky nebo oleje. Je cennou charakteristikou v analýze tuků a s její pomocí lze zjistit obsah nenasycených mastných kyselin. Jodové číslo je užitečným nástrojem pro kontrolu procesů a specifikaci výrobku [1].

Jodové číslo udává % halogenu přepočtené na jod, které se naváže na dvojnásobné vazby za podmínek metody a charakterizuje tak stupeň nenasycenosti tuku. Vzorek tuku/oleje se rozpustí v chloroformu a působí se na něj roztokem o známé koncentraci jodmonobromidu v kyselině octové (Hanusova metoda – BrI) nebo jodmonochloridu (Wijsova metoda – ClI). Halogenidy se následně adují na násobné vazby mastných kyselin ve tmě po dobu 60 minut. Nevyžadované množství halogenidu (vyjádřené jako jod) se stanoví titračně thiosíranem sodným po přidání KI na indikátor škrobový maz. Metoda nedává spolehlivé výsledky pro vzorky oxidovaných, polymerizovaných olejů [16].

Wijsova metoda používá 0,2 N roztok kyseliny octové/tetrachloridu jako rozpouštědla. Následuje reakční doba 1 až 2 hodiny. V dnešní době se tato metoda již moc nevyužívá, kvůli toxicitě použitých rozpouštědel [17].

2.9 Stanovení trans-nenasycených mastných kyselin

Princip spočívá v převedení mastných kyselin nebo jejich esterů na methylestery. Po rozpuštění v organickém rozpouštědle se změří absorbance v IR oblasti spektra (970 cm^{-1}), spojená s deformační vibrací C-H vazby na uhlíku vázaném izolovanou trans-dvojnou vazbou [16].

2.10 Stanovení konjugovaných mastných kyselin

Již v roce 1933 byl objeven vznik konjugovaných dienů v tučích nebo olejích, které způsobily vznik píku při 230-235 nm v UV oblasti. V roce 1960 se měření konjugovaných dienů ukázalo jako užitečná technika pro studium oxidace lipidů. Během vzniku hydroperoxidů z nenasycených mastných kyselin, se vytváří konjugované dieny přesmykem dvojných vazeb. Výsledné konjugované dieny (-CH=CH-CH=CH-) vykazují intenzivní absorpci při 234 nm, podobně pak konjugované trieny (-CH=CH-CH=CH-CH=CH-) absorbují při 268 nm. Zvýšení absorpce v UV oblasti teoreticky odráží tvorbu primárních produktů oxidace v tučích a olejích [12].

UV detekce konjugovaných dienů je jednoduchá, rychlá, nevyžaduje žádná chemická činidla a je zapotřebí pouze malé množství vzorku. Tato metoda však má menší specifitu a citlivost než stanovení peroxidového čísla. Kromě toho výsledek může být ovlivněn přítomností sloučenin absorbujících ve stejné oblasti, jako jsou karotenoidy [12].

2.11 Stanovení esenciálních mastných kyselin

Principem tohoto stanovení je oxidace esenciálních mastných kyselin a jejich esterů na příslušné hydroperoxydy enzymem lipoxygenasou. Následně se stanoví úbytek kyslíku manometricky nebo absorbance konjugovaných hydroperoxidů při 232 nm, eventuálně množství Fe^{3+} vzniklé oxidací Fe^{2+} ($\text{Fe}^{2+} + \text{R-OOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{RO}^{\cdot} + \text{OH}^-$) [16].

2.12 Peroxidové číslo (PV)

Peroxidové číslo vyjadřuje množství hydroperoxidů mastných kyselin, které vzniká během skladování a zpracování tukových složek. Peroxidy uvolněný jod z KI, v kyselém prostředí, se stanoví jodometrickou titrací thiosíranem v inertním prostředí za nepřístupu světla. Výsledek se vyjádří jako peroxidové číslo v μg aktivního kyslíku na 1 g tuku [16, 18].

Oxidace lipidů zahrnuje kontinuální tvorbu hydroperoxidů jako primárních produktů, které se mohou degradovat na různé těkavé i netěkavé vedlejší produkty. Rychlost tvorby hydroperoxidů je větší v počátečních fázích oxidace. Analytické metody pro detekování hydroperoxidů v olejích mohou být klasifikovány jako stanovení celkového množství hydroperoxidů a mohou být založené na chromatografické technice, jež poskytuje podrobné informace

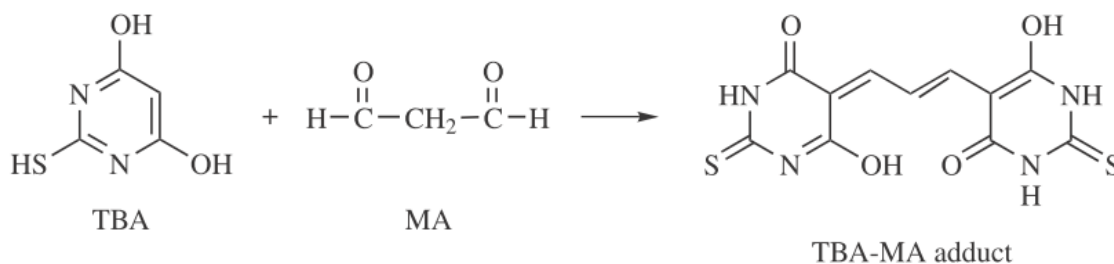
o struktuře a množství specifických hydroperoxidů v určitém vzorku oleje. PV představuje celkový obsah hydroperoxidů a je jedním z nejběžnějších indikátorů kvality olejů v průběhu výroby a skladování. Nejčastěji se pro stanovení PV používají metody jodometrická titrace, spektrofotometrické měření komplexu železitých iontů a infračervená spektroskopie [12, 18, 19].

Peroxidové číslo měří koncentraci látek (v miliekvivalentech peroxidu na 1000 gramů vzorku), které oxidují jodid draselný na jod [1].

2.13 Thiobarbiturové číslo (TBA)

Stanovení TBA je jedním z nejrozšířenějších stanovení pro detekci oxidačního poškození potravin obsahující tuk. Při této analýze se ponechá malondialdehyd (MA) reagovat s kyselinou thiobarbiturovou za vzniku růžového komplexu. Schéma zmíněného komplexu lze vidět na Obr. 5. Tento komplex je následně měřen spektrofotometricky při jeho absorpčním maximu 530 – 535 nm. Výsledek je označen jako hodnota TBA a je vyjádřen v mg malondialdehydu na kg vzorku, nebo jako mikromoly ekvivalentů malondialdehydu na gram vzorku. Ovšem musí být uvedeno, že alkenaly a alkadienaly mohou také reagovat s činidlem TBA a produkovat růžovou barvu [12, 19].

Thiobarbiturové číslo se vyjadřuje jako zvýšení absorbance při 530 nm v 1 cm kyvetě, vyvolané reakcí vzorku s činidlem v roztoku obsahujícím 1 mg tuku v 1 ml [12].

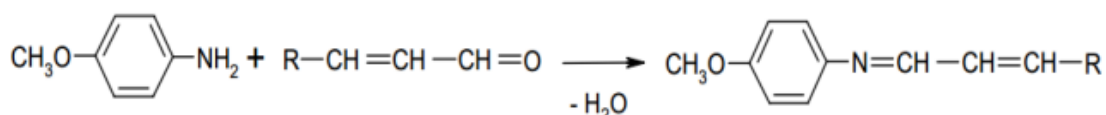


Obr. 4 Schéma vzniku barevného komplexu [18].

2.14 Anisidinové číslo

Anisidinové číslo je měřítkem množství aldehydů přítomných v olejích. Tato metoda je založena na faktu, že je přítomna kyselina octová a p-anisidin reaguje s aldehydovými sloučeninami v oleji, za vzniku žlutavého reakčního produktu. Intenzita zbarvení nezávisí pouze na množství aldehydické sloučeniny, ale také na jejich struktuře. Anisidinové číslo je měřítkem sekundárních oxidačních produktů, a proto je využíván pro hodnocení kvality surového oleje a účinnosti postupů při zpracování, ale není vhodný pro detekci oxidace [1, 20].

Principem stanovení je reakce p-anisidinu s 2-alkenaly a s jinými aldehydy za vzniku barevného (nažloutlého) kondenzačního produktu, který absorbuje při 400 nebo 430 nm. Výsledek se vyjádří jako anisidinové číslo hodnotou absorbance 1% roztoku tuku/oleje v 10 mm kvytě. Tato metoda je citlivější na nenasycené aldehydy, než na nasycené, protože barevné produkty z nenasycených aldehydů absorbují silněji na této vlnové délce [12, 16, 20].



Obr. 5 Princip metody stanovení p-anisidinového čísla [20].

2.15 Stanovení pevného podílu oleje - SFC

Množství pevných glyceridů lze změřit pomocí pulzního NMR. Vzorek se úplně roztaví a upraví na teplotu měření, vloží se do NMR a je měřeno při požadované teplotě 60 °C po 30 minutách rovnovážného stavu. Mechanismus této metody využívá toho, že rezonanční signály lze získat pouze z molekul vodíku, které jsou v kapalném stavu [13].

2.16 Index pevného podílu tuku – SFI

Index pevného tuku je empirickým měřítkem obsahu pevného tuku pomocí metody dilatometrie tuku, oleje. Roztok indikátoru (1% vodný roztok dichromanu draselného) je odvzdušněn, stejně jako vzorek, který se zahřeje na 80 °C. Roztok indikátoru (2 ml) se naváží do žárovky dilatometru. Následně je tento indikátor opatrně překryt vzorky, dokud nepřetéká. Údaje z expanze se zaznamenávají [17].

Dilatometrické stanovení indexu pevných látek se používá pro vývoj produktů, procesu kontroly a specifikace kvality pro tuky a oleje. Je vypočítáno ze specifického objemu při různých teplotách a využívající dilatometrické stupnice v jednotkách mililitry krát 1000 [1].

2.17 Stanovení stability lipidů vůči autooxidaci

Oxidační stabilita oleje závisí jednak na přítomnosti nenasycených mastných kyselin, dále na obsahu antioxidantů a také na fyzikálních a chemických podmínkách (například přístup kyslíku, teplota, osvětlení). Toto stanovení se většinou provádí pro odhad doby skladovatelnosti oleje anebo pro zjištění účinnosti antioxidantů [15].

2.17.1 Metoda aktivního kyslíku (AOM)

Tato metoda je běžně používaná pro odhadnutí oxidační stability tuků a olejů. Využívá se pro rutinní kontrolu kvality a jako výzkumný i vyvíjecí nástroj pro nové produkty. AOM využívá teplo a provzdušňování k urychlení zhoršení kvality vzorků tuků/olejů a zkracuje tím čas potřebný k ukončení této reakce, tedy k určení koncového bodu. Stanovení probíhá umístěním 20 mililitrů vzorku do speciální provzdušňovací trubky a jejím zahříváním v olejové lázni nebo za použití řízeného tepelného zdroje (heat block) při $97,8 \pm 0,2$ °C s proudem vzduchu upraveným na rychlost 2,33 mililitrů trubky za sekundu. Vzorek je vystavený působení tepla a proudění vzduchu, dokud nedosáhne předurčeného peroxidového čísla, obvykle 20 PV (peroxid value) pro masné tuky a 70 nebo 100 PV pro rostlinné oleje [1].

2.17.2 Schaalův test

Vzorky olejů se skladují při zvýšené teplotě v otevřených kádinkách v termostatu, v určitých intervalech se stanoví stupeň oxidace a určí se tzv. indukční perioda metodou Schaalova testu při 60 °C nebo metodou aktivního kyslíku při 100 °C. Pro vztah mezi délkou indukční periody (což je doba, která je potřebná k nastartování rychlé tvorby peroxidů) určené Schaalovým testem a dobou skladování za normálních podmínek platí, že 1 den testu je ekvivalentní jednomu měsíci skladování [16].

2.18 Stanovení frakcí lipidů

Pro posouzení složení olejů/tuků je nutno znát poměrné zastoupení jednotlivých skupin lipidů, případně i jednotlivé složky. Pro tento účel se používají chromatografické metody v plošném uspořádání (TLC, PC), sloupcová chromatografie (CC) nebo LC a GC [16, 21].

Při sloupcové chromatografii se vzorky rozpustí v benzenu a nanese na sloupec silikagelu (silikagel G aktivovaný při 110 °C po dobu 10 hodin). Sloupec se promyje eluotropní řadou rozpouštědel o rozdílné eluční síle (diethyleter : petrolether 1:99 – 25:75 a nakonec absolutní metanol), přičemž se postupně vymývají uhlovodíky, skvalen, estery cholesterolu, triacylglyceroly, volné mastné kyseliny a volné steroly, diacylglyceroly, monoacylglyceroly a fosfolipidy [16, 21].

Z jednotlivých frakcí se následně po odpaření a vysušení gravimetricky stanoví zastoupení jednotlivých skupiny lipidů [16].

Při dělení na tenké vrstvě (TLC), obvykle na bázi silikagelu, impregnované směsí chloroform : metanol 4:1, se po nanesení vzorku jednotlivé skupiny lipidů dělí elucí petroletherem, diethyletherem a octovou kyselinou, přičemž vzájemný poměr složek eluentu se mění z poměru 70:30:1 na začátku separace na 30:70:1 na konci separace. Detekce se následně provádí jodem, kyselinou sírovou po zahřátí, nebo kyselinou fosfomolybdenovou [16].

2.18.1 Stanovení celkového obsahu fosfolipidů

Vzorky oleje se mineralizují na suché nebo mokré cestě. Následně se provede spalování po překrytí vzorku MgO v porcelánové misce za postupného zvyšování teploty tak, aby se tuk vázal na MgO, pak se vzorek zuhelnatí a žihá při 550 °C po dobu 4 – 6 hodin. Popel se rozpustí v koncentrované HCl, obsah fosforu se stanoví jako molybdenová modř a přepočítá na obsah fosfatidylcholinu (lecitinu), jako hlavní složky fosfolipidů [16].

3 PRINCIP LUMINISCENČNÍ SPEKTROSKOPIE

Luminiscenční (fluorescenční) spektroskopie je rychlá, citlivá a nedestruktivní analytická metoda, poskytující již během několika sekund spektrální signatury, které následně mohou být použity, podobně jako u lidí otisky prstů pro hodnocení nejen potravinářských výrobků [22].

Ke vzniku luminiscence je třeba, aby látka nejprve absorbovala energii a její atomy nebo molekuly přešly na vyšší kvantové elektronové hladiny. Získanou energii pak látka opět může za příznivých okolností vyzářit jako luminiscenci [23].

Podle příčin, které vyvolávají luminiscenční záření, je možné luminiscenci rozdělit na fotoluminiscenci, chemiluminiscenci, termoluminiscenci a elektroluminiscenci [23].

Některé látky při ozáření ultrafialovým světlem nebo při excitaci jiným druhem energie buď samy vydávají charakteristické záření, nebo mohou reagovat s jinými látkami, s nimiž vytvoří svítivou látku. Podle zbarvení luminiscence, popř. podle povahy luminiscenčního spektra svítivé látky, ať již pevné nebo v roztoku, se usuzuje na přítomnost dokazované látky a podle intenzity záření (zářivého toku) na její množství. Velký počet organických látek mění zbarvení a intenzitu luminiscence podle pH roztoku, oxidačně-redukčního potenciálu. Takové látky slouží jako luminiscenční indikátory v odměrné analýze [23, 24].

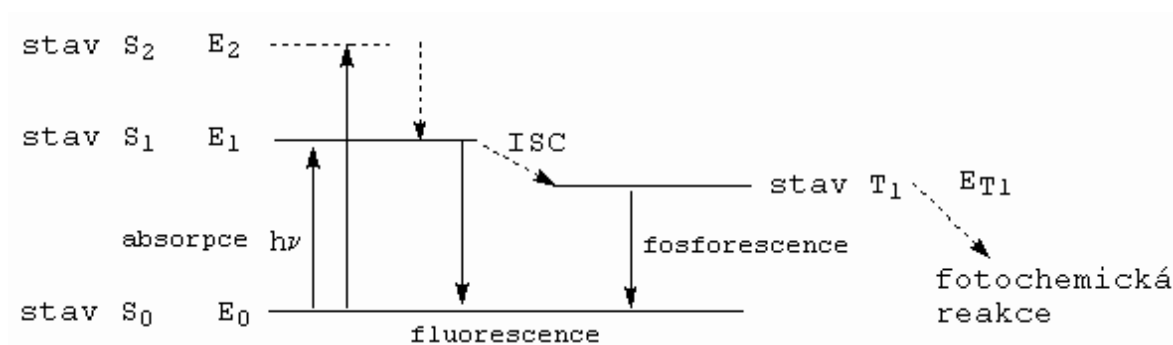
Jednou z atraktivních vlastností luminiscenčních metod je jejich vysoká citlivost. Detekční limity, které jsou často o jeden až tři řády nižší, než s jakými je možno se setkat v absorpční spektroskopii [25].

3.1 Luminiscence organických a anorganických látek

Luminiscenci vykazují většina organických látek (aromatické uhlovodíky, benzen, naftalen, antracén, organická barviva a další) stejně tak jako množství látek anorganických (iontové krystaly, polovodiče). Jejich původ je však v obou případech zásadně odlišný. V organických látkách je nositelem charakteristického luminiscenčního záření molekula. To znamená, že luminiscenční záření má v zásadě velmi podobné rysy (spektrální složení, dobu dohasínání) jak v roztoku, tak i v krystalickém stavu. Je známo, že krystaly organických látek jsou tvořeny molekulami, mezi nimiž zprostředkují vazbu jen slabé van der Waalsovy síly. Molekuly

si tedy zachovávají do značné míry svou individualitu, slabé intermolekulární síly ji modifikují jen nepatrně. Totéž platí tím spíše pro roztok, proto se luminiscenční spektrum organických látek v pevné fázi a v roztoku nepatrně liší [26].

Základní rysy luminiscence organických látek lze tedy odvodit z energetické struktury složitých organických molekul (tzv. Jablonského diagram – viz Obr. 6). Základním stavem takové molekuly je singlet S_0 , vyššími elektronovými stavy jsou především vzbuzené singletní stavy (S_1, S_2, S_3, \dots). Vyšší vzbuzené singlety S_2, S_3 velmi rychle nezářivě relaxují do stavu S_1 , přechod $S_1 \rightarrow S_0$ vede k vyzáření luminiscenčního fotonu. Tento zářivý přechod je spinově dovolený a tedy rychlý (charakteristický čas je v řádu 10^{-9} s) a nazývá se fluorescence. Existují však rovněž vzbuzené tripletní stavy T_1, T_2, T_3, \dots . Přechod $T_1 \rightarrow S_0$ je doprovázen také vyzářením fotonu, je však spinově zakázán, tudíž je pomalejší (v řádu 10^{-3} s) a nazývá se fosforescence [24, 26].



Obr. 6 Jablonského diagram [27].

3.2 Fotoluminiscence – fluorescence, fosforescence

Fluorescence a fosforescence jsou podobné v tom, že se excitace dosáhne absorpcí fotonů. Následek těchto dvou jevů je označován jako fotoluminiscence. Rozdíl mezi fluorescencí a fosforescencí spočívá ve změně spinu elektronu, při fluorescenci při elektronickém energetickém přechodu ke změně spinu nedochází. Kvůli tomu jsou excitační stavy ve fluorescenci krátkodobé, řádově $<10^{-5}$ s. Naproti tomu, změna spinu elektronu doprovázející fosforescenci, životnost excitačního stavu je o hodně delší, často je to řádově v sekundách nebo dokonce minutách. V mnoha případech, k fotoluminiscenci, ať už fluorescenci nebo fosforescenci, dochází při vlnových délkách, které jsou delší než excitační stavy [1, 28].

3.2.1 Chemiluminiscence

Třetím typem luminiscence je chemiluminiscence, založená na emisi záření z excitovaných látek, vytvořených v průběhu chemické reakce. V některých případech, jsou excitované látky produkty reakce mezi analytem a vhodným činidlem (obvykle silný oxidant jako je ozon nebo peroxid vodíku). Výsledkem je charakteristické emisní spektrum oxidačních produktů analytu nebo reakčního činidla. V ostatních případech analyt není přímo v reakci chemiluminiscence. Místo toho analyt inhibuje nebo má katalytický účinek na tyto reakce [25].

3.2.2 Singletové a tripletové excitované stavy

Molekulární elektronické stavy, ve kterých jsou všechny elektronové spiny párované, se nazývají singletové stavy, a nedochází k rozdělení elektronických energetických hladin, pokud je molekula vystavena magnetickému poli. Naproti tomu, základní stav pro volné radikály, je double stav, protože jsou přítomny dvě možné orientace pro lichý elektron v magnetickém poli a každá dodává mírně odlišnou energii do systému [25, 26].

Pokud jeden z páru elektronů v molekule je excitovaný do vyšší energetických hladin, vytvoří se singletový nebo tripletový stav. V excitovaném singletovém stavu je spin propagovaného elektronu stále spárován s elektronem na základním stavu. V tripletovém stavu se spiny dvou elektronů stanou nepárové a jsou tedy rovnoběžné [25, 28].

Vlastnosti molekuly v excitovaném tripletovém stavu se výrazně liší od těch, které jsou excitované v singletovém stavu. Důležitější je přechod singletového na tripletový, nebo opačně, jež zahrnuje změnu elektronového stavu, a je podstatně méně pravděpodobný než odpovídající přechod singlet – singlet. V důsledku toho je průměrná životnost excitovaného tripletového stavu v rozmezí 10^{-4} až několik sekund, ve srovnání s průměrnou životností 10^{-8} s excitovaného singletového stavu [25].

3.2.3 Deaktivační procesy – zhášení luminiscence

Excitovaná molekula se může vrátit na základní stav pomocí kombinace několika mechanických kroků. Dva z těchto kroků, fluorescence a fosforescence (= zářivé procesy), zahrnují emisi fotonu záření. Ostatní deaktivační kroky jsou nezářivé procesy. Zvýhodněná cesta do základního stavu je ta, která minimalizuje životnost excitovaného stavu. Proto je v případě

fluorescence deaktivace rychlá s ohledem na nezářivé procesy a je pozorována jako emise [25, 28].

3.2.4 Typy přechodů ve fluorescenci

Je důležité říct, že fluorescence málo kdy vyplývá z absorpce ultrafialového záření o vlnových délkách kratších než 250 nm, protože takové záření, které je dostatečně energetické, způsobí deaktivaci excitovaných stavů predissociací nebo disociací. Například záření při 200 nm odpovídá asi 140 kcal/mol. Mnoho organických molekul má alespoň nějaké vazby, které mohou být přetrženy energiemi této velikosti. V důsledku toho, fluorescence kvůli $\sigma^* \rightarrow \sigma$ přechodu, je pozorována jen zřídka. Naproti tomu jsou takové emise omezeny na méně energetické $\pi^* \rightarrow \pi$ a $\pi^* \rightarrow n$ procesy [25].

Empiricky se zjistilo, že je fluorescenci možné běžně nalézt ve sloučeninách, ve kterých je nejnižší energetický přechod typu $\pi \rightarrow \pi^*$ (excitovaný singletový stav) než u sloučenin, ve kterých je nejnižší energetický přechod z $n \rightarrow \pi^*$ (excitované stavy), to znamená, že kvantová účinnost je vyšší pro $\pi^* \rightarrow \pi$ přechod [25].

3.2.5 Fluorescence a struktura molekuly

Nejintenzivnější a nejužitečnější fluorescence se vyskytuje ve sloučeninách, které obsahují aromatické funkční skupiny s málo energetickými $\pi \rightarrow \pi^*$ přechody. Sloučeniny, obsahující alifatické a alicyklické karbonylové struktury nebo vyšší konjugované dvojnásobné vazby, mohou také vykazovat fluorescenci, ale jejich počet je menší než počet aromatických systémů [25].

Mnoho nesubstituovaných aromatických uhlovodíků fluoreskují v roztoku. Kvantová účinnost se obvykle zvyšuje s počtem kruhů a jejich stupněm kondenzace. Nicméně jednoduché heterocykly jako je například pyridin, furan a pyrrol fluorescenci nevykazují. Na druhou stranu, struktury s kondenzovanými kruhy obvykle fluoreskují [25].

3.3 Emisní a excitační spektra

Monochromátory slouží v této spektroskopii ke zjištění spektrálního složení luminiscenčního záření, ale také mohou být použity k výběru vhodné budící vlnové délky z excitačního světelného zdroje. Podle toho se hovoří o emisních a excitačních spektrech [26].

Excitační zdroj dodává budící energii do testovaného vzorku, emitované luminiscenční záření je rozkládáno ve spektrálním přístroji, detektor převádí optický signál na signál elektrický, který je dále zpracováván elektronickými obvody a měřicím softwarem. Výstup ve tvaru grafické závislosti intenzity luminiscence I_{lum} na vlnové délce λ_{em} luminiscenčního záření se nazývá emisní spektrum [26, 29].

Spontánní luminiscenční záření vystupuje ze vzorku v podstatě do všech směrů. K optickému sběru emitovaného záření se používají různé experimentální geometrie. Nejjednodušší z nich je tzv. uspořádání na průchod, kdy optické osy excitačního a luminiscenčního svazku splývají a luminiscence je detekována z protilehlé strany vzorku [26].

Běžněji používané je uspořádání na odraz, kde je luminiscence sbírána ze stejného místa, na které je čočkou soustředěno excitační záření. To je na vzorek nasměrováno pomocí malého totálně reflektujícího hranolku, přičemž samotný excitační zdroj je umístěn ve směru kolmém na optickou osu sběrného systému. Jedna a tatáž čočka fokusuje excitační záření na vzorek a zároveň sbírá luminiscenční záření v širokém prostorovém úhlu daném numerickou aperturou čočky. Takto vytvořený rovnoběžný svazek luminiscenčních paprsků je druhou čočkou fokusován na vstupní šterbinu spektrálního přístroje [24, 26].

Pro vstup do monochromátoru je zapotřebí luminiscenci znovu soustředit. K tomu slouží systém dvou parabolických zrcadel. Jako detektor na výstupní šterbině monochromátoru je znázorněn fotonásobič a výstupní signál z fotonásobiče se zpracovává synchronním detektorem [26, 30].

Excitačním spektrem fotoluminiscence se rozumí graf závislosti intenzity fotoluminiscence na energii fotonu excitačního záření [26].

Důvodem pro studium excitačních spekter je nízká intenzita luminiscenčního záření. Proměření excitačního spektra dá v tomto smyslu jasný návod, jak zvolit nejvhodnější excitační vlnovou délku – to je taková vlnová délka, respektive energie excitačního fotonu, při níž excitační spektrum vykazuje maximum [26].

3.4 Využití luminiscenční spektroskopie v potravinářství

Luminiscenční spektroskopii, v kombinaci s vícerozměrnými statistickými metodami, lze využít pro hodnocení kvality potravin. Ve většině výzkumů se získané luminiscenční signály

přidělí konkrétním fluoroforům (molekula schopná luminiscence), po upevnění excitační nebo emisní vlnové délky [31].

Metodu luminiscence je možné použít v případě mléka a mléčných výrobků. Tyto výrobky obsahují několik fluoroforů, které představují tedy nejdůležitější oblast fluorescenční (luminiscenční) spektroskopie. Zahrnují aromatické aminokyseliny a nukleové kyseliny (AAA + NA) - tryptofan, tyrosin a fenylalanin v proteinech, vitamíny A a B₂, nikotinamid adenin dinukleotid (NADH). Byly provedeny studie, které se zaměřily například na potenciál luminiscenční spektroskopie rozlišit mléko syrové, pasterované, homogenizované. Přičemž aplikace těchto ošetření způsobí specifické změny ve tvaru fluorescenčního spektra. V dalším výzkumu se zaměřili na vliv přidání vápníku, fosforečnanů a citrátů o různých koncentracích na molekulární strukturu odstředěného mléka. Přídavek fosforečnanů vyvolá molekulární změnu, která je odlišná od změny vyvolané vápníkem a citráty. Dále v tomto výzkumu monitorovali vývoj Maillardovy reakce neenzymatického hnědnutí pomocí luminiscence. V podobné studii, je zmíněná spektroskopie použita pro identifikaci pěti typu tepelného ošetření – pasterace, vysoká pasterace, přímý UHT záhřev, nepřímý UHT záhřev a sterilace [31, 32, 33, 34].

Další možným využitím je hodnocení masa a masných výrobků se zaměřením na fluorescenci kolagenu, tukové tkáně a bílkovin. Jak je známo, kolagen v pojivové tkáni je důležitým ukazatelem kvality masa, jelikož ovlivňuje křehkost a texturu. Existuje v různých genetických formách, přítomnost čtyř těchto forem byla nalezena ve svalech. Důležitým fluoroforem v mase je také elastin, který představuje velmi podobné vlastnosti fluorescence jako kolagen. Tuková tkáň obsahuje fluorescenční molekuly, jež jsou ovšem specifické pouze pro tuky. Také se zjistilo, že vitamíny rozpustné v tucích – vitamíny A, D a K vykazují fluorescenci v oblasti emisních vlnových délek 387–480 nm po excitaci při 308–340 nm. Získaná fluorescenční spektra různých druhů mas jsou ve vzájemné vztahu s biochemickými a sensorickými vlastnostmi. Oxidace lipidů je jedním z limitujících faktorů kvality a přijatelnosti masa a masných výrobků. Oxidaci lze stanovit různými metodami, například stanovením pomocí kyseliny 2-thiobarbiturové, sensorickou analýzou nebo pomocí plynové chromatografie s hmotností spektrometrií. Přičemž byla nalezena dobrá korelace mezi fluorescenčními spektry a stanovením thiobarbiturového čísla [35, 36, 37, 38].

Mořské ryby obsahují vysoké množství polynenasycených mastných kyselin, které při skladování a/nebo při zpracování degradují, což může vést ke vzniku primárních a sekundárních

oxidačních produktů, čímž se tvoří fluorescenční látky a zároveň dochází ke ztrátě esenciálních živin. Výsledky ze studie Olsen a spol. (2006) ukazují zvýšení intenzity fluorescence se zvyšující se dobou skladování ryb. Vědci dospěli i k závěru, že stanovení spekter aromatických aminokyselin a nukleových kyselin (AAA + NA), by mohlo sloužit k rozlišení, zda se jedná o čerstvé ryby či nikoliv [39, 40, 41].

Změny, které se dějí ve vejcích v průběhu skladování, jsou četné, složité a mají vliv na funkční vlastnosti vaječného žloutku i bílku. Tyto změny zahrnují řidnutí bílku, zvýšení pH, oslabení žloutkové membrány, zvýšení obsahu vody. Čerstvé vejce vykazuje silnější intenzitu fluorescence než vejce starší, protože intenzitu ovlivňuje množství porfyrinu na povrchu skořápky [42].

V oblasti jedlých olejů, je metoda luminiscenční spektroskopie nejčastěji zaměřena na hodnocení olivových olejů, respektive na falšování olivového oleje extra panenského, ovšem je možné nalézt i studie zaměřené na další typy olejů. Emisní spektra olivových olejů jsou spojena s jeho složením a stabilitou. Panenské olivové oleje jsou poměrně stabilní vůči oxidaci, protože obsahují fenolické sloučeniny a vitamín E, jež působí jako antioxidanty [43].

Potenciál fluorescenční spektroskopie je i v sledování kvality obilovin a výrobků z nich. Pomocí této metody lze rozlišovat mezi různými obilnými moukami (rýžová, kukuřičná apod.), ale také je možné odlišit mouky z různých odrůd pšenice [44].

Luminiscenční spektroskopie, se v kombinaci s vícerozměrnými statistickými analýzami, ukázala jako slibný způsob screeningu pro odhad kvalitativních parametrů ve vzorcích řepného cukru [45].

Pomocí zmíněné metody je možné sledovat například i fyziologický stav celých rostlin nebo jejich plodů. Fluorescence chlorofylu je považována za účinný prvek pro monitorování jablek během zrání a také pro posuzování moučnatosti jablek, jelikož je mezi těmito dvěma parametry (luminiscence a moučnatost) dobrá korelace. V jiné studii používali metodu fluorescence pro odhad anthokyanů a celkového obsahu flavonoidů v ovoci [46, 47, 48].

U vína mezi fluoreskující molekuly patří fenolové kyseliny, stilbeny, anthokyany, flavanoly a taniny. Povaha a množství těchto molekul se u jednotlivých odrůd liší. Na fenolické sloučeniny má vliv jak zpracování tak i stárnutí vína. Kromě zmíněných molekul víno obsahuje další sloučeniny, které mohou fluoreskovat, například proteiny. V tomto případě slouží fluorescence k identifikaci vín podle odrůdy. Fluorescenční spektroskopie umožňuje také sledovat změny chemického složení piva během skladování [49, 50].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo ověření použitelnosti metody luminiscenční spektroskopie pro stanovení tepelné degradace jedlých olejů.

Teoretická část byla zaměřena na:

- Charakteristiku jedlých olejů, se zaměřením na jejich změny při tepelném záhřevu
- Přehled metod pro kontrolu kvality jedlých olejů
- Popis luminiscenční spektroskopie

Praktická část byla zaměřena na použití luminiscenční spektroskopie pro stavení tepelní degradace vybraných jedlých olejů. To zahrnovalo:

- Sledování rozdílných luminiscenčních charakteristik vzorků olejů
- Pozorování vlivu délky záhřevu vzorku na luminiscenci
- Následně stanovení chemických analýz – stanovení peroxidového čísla, volných mastných kyselin, konjugovaných dienů a trienů
- Porovnání nalezených trendů luminiscence vzorků s délkou jejich záhřevu

5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

5.1 Materiál a chemikálie

Vzorky olejů – z běžně dostupných tržních sítí:

- Slunečnicový olej ARO, Německo
- Řepkový olej ARO, Polsko
- Olivový olej z pokrutin Polsko
- Olivový olej extra panenský Ballester, Španělsko
- Palmový olej Frakcionovaný, Itálie

Etanol $\geq 99,9\%$ (Lach-Ner s.ro., Neratovice)

Diethylether $\geq 99,7\%$ (Lach-Ner s.ro., Neratovice)

Jodid draselný $> 99,0\%$ (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Thiosíran sodný (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Hydroxid sodný $> 99,0\%$ (Lach-Ner s.ro., Neratovice)

Chloroform $> 99,1\%$ (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Kyselina octová 100,0% (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Indikátory – fenolftalein, škrobový maz (LACHEMA, a.s., Brno)

Isooktan (2,2,4 – trimethylpentan) - (Lach-Ner s.ro., Neratovice)

5.2 Použité přístroje, nádoby

- Elektronické analytické váhy
- UV spektrofotometr Shimadzu 1240
- PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorometer
- Vyhodnocení pomocí softwaru VINCI – Multidimensional Fluorescence Spectroscopy
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

6 METODIKA

6.1 Příprava vzorků vybraných olejů

Testované oleje byly zakoupeny v běžné tržní síti. Bylo testováno pět druhů olejů, a to olej slunečnicový, řepkový, palmový, olivový z pokrutin a olivový olej extra panenský.

Jednotlivé oleje byly vystaveny teplotě $160\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ve fritovací nádobě. Následně bylo odebíráno 100 ml vzorku, přičemž byl nejdříve odebrán vzorek, který nebyl vystaven tepelnému záhřevu, poté vzorek, který právě dosáhl stanovené teploty. Následně byl vzorek odebírán každých 30 minut záhřevu po dobu 5 hodin. Z jednoho druhu oleje bylo tedy získáno 12 vzorků, jež byly označeny čísly 0 až 5 (0 – nezahříváný vzorek, 0,1 – vzorek po dosažení teploty $160\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$, 0,5 – vzorek zahříváný půl hodiny, 5 – vzorek zahříváný po dobu 5 hodin).

Vzorky byly uchovávány ve skleněných lahvičkách uložených v lednici do provedení stanovení. Před každým stanovením byly temperovány na teplotu prostředí.

6.2 Měření luminiscenčních spekter vzorků olejů

Měření luminiscenčních spekter proběhlo pomocí přístroje PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorometer (viz Obr. 7). K vyhodnocení byl použit software VINCI – Multidimensional Fluorescence Spectroscopy.

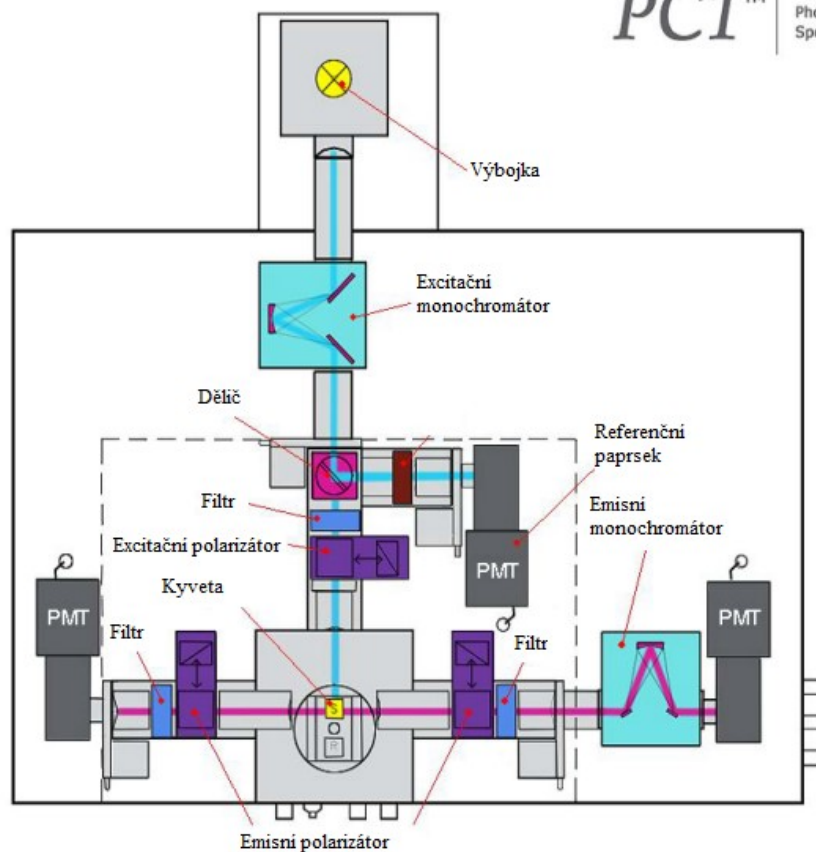
Budícím zdrojem zde byla vysokotlaká xenonová výbojka (45 mW). Rozsah monochromátorů umístěných v přístroji byl 200 nm až 1200 nm a jako detektor byl použit fotonásobič. Schéma přístroje lze vidět na Obr. 8. Výbojka dodá energii potřebnou pro excitaci, vybuzení vzorku. Paprsek z výbojky putuje přes excitační monochromátor, který vymezení excitační vlnovou délku, dopadá na 1 cm květu se vzorkem, odkud dál pokračuje v úhlu 90° na emisní monochromátor, který vymezení emisní vlnovou délku, a dopadá na detektor, v tomto případě tedy fotonásobič. Jako referenční paprsek slouží další paprsek z výbojky. Naměřené výsledky jsou uvedeny v kapitole 7 – výsledky a diskuze.



Obr. 7 Přístroj PC-1 Photon -counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter [51].



PC1™
Photon Counting
Spectrofluorometer



Obr. 8 Schéma přístroje PC-1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter [51].

6.3 Stanovení peroxidového čísla

Peroxidové číslo bylo stanoveno jodometrickou titrací. Princip spočívá v reakci peroxidů, hydroperoxidů přítomných v olejích s jodidem draselným a následné titraci uvolněného jódu thiosíranem sodným (viz kapitola 2.12). Během reakce se uvolní ekvivalentní množství jódu, které je následně titrováno thiosíranem sodným na indikátor škrobový maz za vzniku jodidu.

Hodnota PV se vypočítá podle vzorce:

$$PV = \frac{V \cdot T \cdot 1000}{m}$$

Kde:

PV peroxidové číslo [mEq O₂/kg]

V spotřeba odměrného roztoku [ml]

T přesná koncentrace odměrného roztoku [0,01 mol/l]

m navážka vzorku [g] [52]

Samotný postup stanovení spočíval v navážení 5 g vzorku oleje na analytických vahách do Erlenmeyerovy baňky. Ke vzorku se následně přidalo 10 ml chloroformu pro rozpuštění vzorku, směs se promíchala. Poté bylo k této směsi přidáno 15 ml kyseliny octové a 1 ml jodidu draselného, který byl čerstvě připraven. Baňka se uzavřela zátkou a podobu 1 minuty byla míchána. Následně se uzavřená baňka umístila do temna na dobu 5 minut. Po uplynutí doby bylo přidáno 75 ml destilované vody a 5 ml indikátoru škrobového mazu. Nyní měla směs tmavě modrou až černou barvu. Celá směs se nakonec titrovala thiosíranem sodným o koncentraci 0,01 mol/l za neustálého míchání až do odbarvení. Následně se odečetla spotřeba odměrného roztoku.

Za výsledek se považuje aritmetický průměr ze dvou provedených stanovení pro každý vzorek. Výsledky byly zpracovány do grafů a jsou uvedeny v kapitole číslo 7 - výsledky a diskuze.

6.4 Stanovení čísla kyselosti

Princip této metody spočívá v rozpuštění vzorků ve směsi rozpouštědel a přítomné volné mastné kyseliny se poté titrují roztokem hydroxidu draselného. Byla použita vizuální titrace.

Do titrační baňky bylo naváženo 10 g s přesností 0,01 g vzorku oleje. Následně bylo přidáno 50 ml směsi diethyletheru a ethanolu. Směs se promíchala lehkým protřepáním a následně se přidal indikátor fenolftalein. Poté se tato směs titrovala odměrným roztokem KOH o koncentraci 0,1 mol/l do růžového zbarvení, které vydrželo 10 sekund.

Obsah volných mastných kyselin se vypočte dle:

$$V \cdot c \cdot \frac{M}{1000} \cdot \frac{100}{m} = \frac{V \cdot c \cdot M}{10 \cdot m}$$

Kde:

V	spotřeba odměrného roztoku [ml]
c	koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného [0,5 mol/l]
m	hmotnost vzorku [g]
M	molární hmotnost kyseliny olejové [282 g/mol] [52]

Za výsledek se považuje aritmetický průměr ze dvou stanovení provedených pro každý vzorek. Výsledky byly zpracovány do grafů a jsou uvedeny v kapitole číslo 7 - výsledky a diskuze.

6.5 Stanovení konjugovaných dienů a trienů

V další části experimentu byla provedena spektrofotometrická analýza v UV oblasti. Tato analýza může poskytovat informace o jakosti oleje, stavu jeho zachovalosti a změnách způsobených technologickými procesy. Pro toto stanovení byl použit přístroj UV spektrofotometr 1240 Shimadzu.

Absorbce při vlnových délkách specifikovaných v této metodě je dána přítomností konjugovaných dienů a trienů. Tyto absorpce lze vyjádřit jako specifické extinkce $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (tedy extinkce vyvolaná 1% roztokem oleje v předepsaném rozpouštědle při tloušťce vrstvy 1 cm). Extinkce znamená zeslabení záření při průchodu prostředím [52].

Vzorek oleje se tedy rozpustí v požadovaném rozpouštědle a poté se určí extinkce roztoku při určitých vlnových délkách proti čistému rozpouštědlu. Z výsledků zjištěných při spektrofotometrickém měření se vypočtou specifické extinkce. Následně se vypočte specifická absorbance při 232 nm a 268 nm v isooktanu nebo při 232 nm a 270 nm v cyklohexanu pro koncentraci 1 g/100 ml a v 10 mm kyvetě.

Jako rozpouštědlo byl pro toto stanovení použit isooktan. Zmíněné rozpouštědlo bylo použito i jako referenční roztok pro srovnání. Pro toto stanovení byly vybrány vlnové délky 232 nm a 272 nm.

Specifická extinkce pro každou vlnovou délku se vypočte dle vzorce:

$$K_{\lambda} = \left(\frac{E_{\lambda}}{c \cdot s} \right)$$

Kde:

K_{λ} specifická extinkce při vlnové délce λ

E_{λ} extinkce měřená při vlnové délce λ

c koncentrace roztoku [g/100ml]

s tloušťka kyvety [cm] [52]

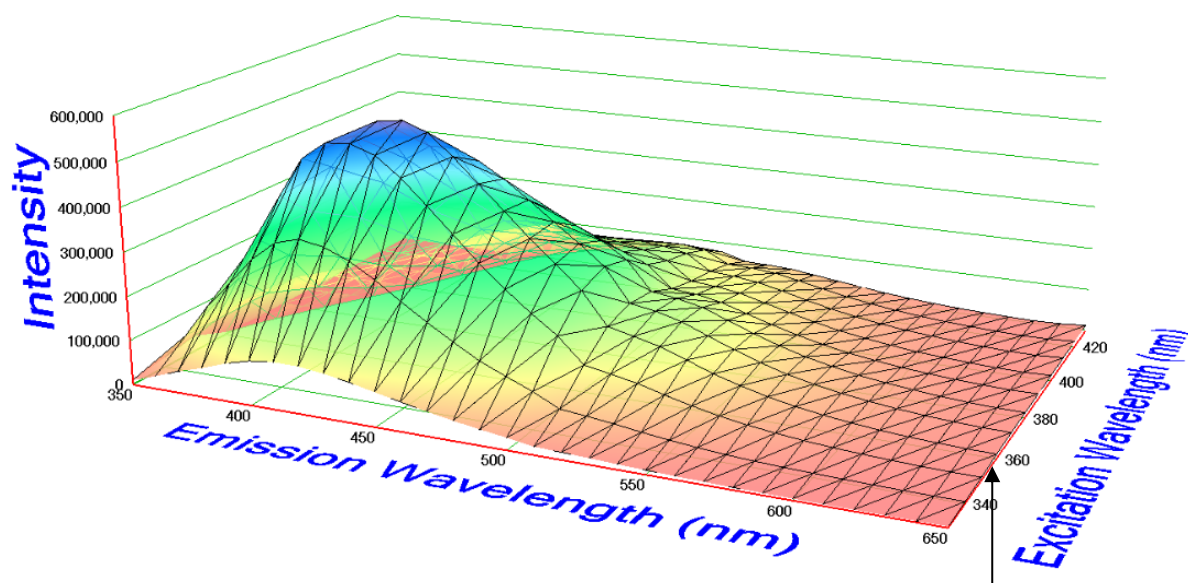
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Měření luminiscenčních spekter

7.1.1 Určení excitační vlnové délky

Pro měření emise luminiscence je nutné najít ideální podmínky pro měření intenzity luminiscence, tedy je nutné znát excitační vlnovou délku daného vzorku. Tuto vlnovou délku je možné zjistit z 3D mapy, jež zobrazuje celkovou luminiscenční charakteristiku vzorku. Na ose x leží emisní vlnová délka (v jednotkách nm), na ose y je intenzita (v jednotkách counts – tzn. Počet světelných kvant) a na ose z excitační vlnová délka (v jednotkách nm). Pro zjištění vhodné excitační vlnové délky se odečte vlnová délka na ose z, při které dosahuje vzorek nejvyšší intenzity na ose x.

Vzorek byl proměřen při rozmezí emisních vlnových délek 350 – 650 nm a při rozmezí excitačních vlnových délek 330 – 430 nm.

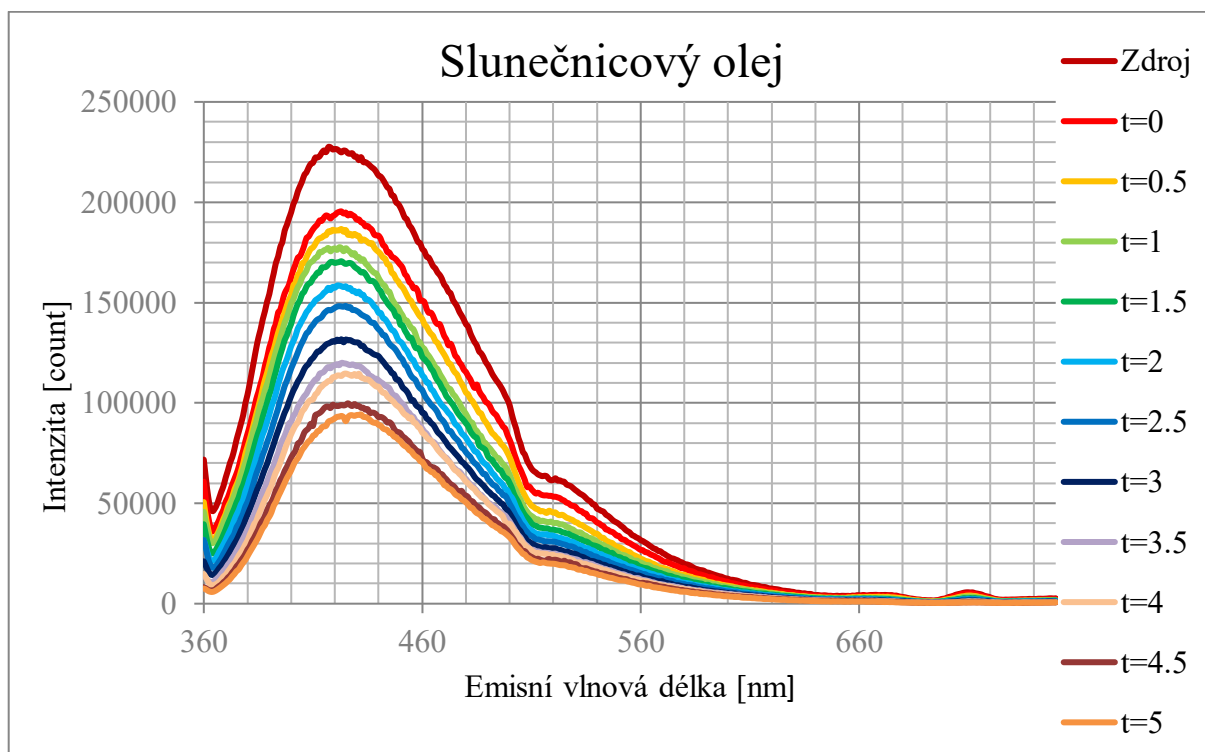


Obr. 9 3D mapa řepkového oleje – vzorek 0

Na základě vyhodnocení byla z 3D mapy, viz Obr. 9, odečtena excitační vlnová délka, tedy ta vlnová délka, při které je intenzita emise nejvyšší, tomto případě tedy 355 nm (v grafu

vyznačeno šipkou). Při vybrané excitační vlnové délce se vzorek měří dál. 3D mapy ostatních olejů jsou uvedeny v příloze P I, P II. Excitační vlnová délka 355 nm byla vybrána z důvodu maximální emise světla pro všechny testované vzorky olejů.

7.1.2 Luminiscenční spektra testovaných olejů

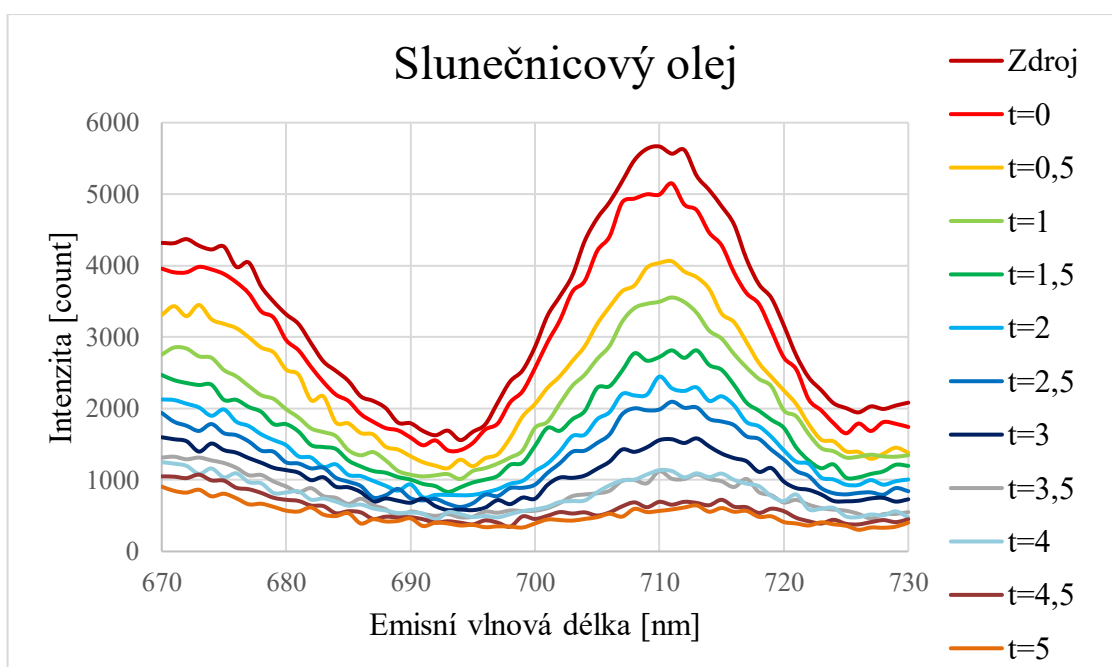


Obr. 10 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce

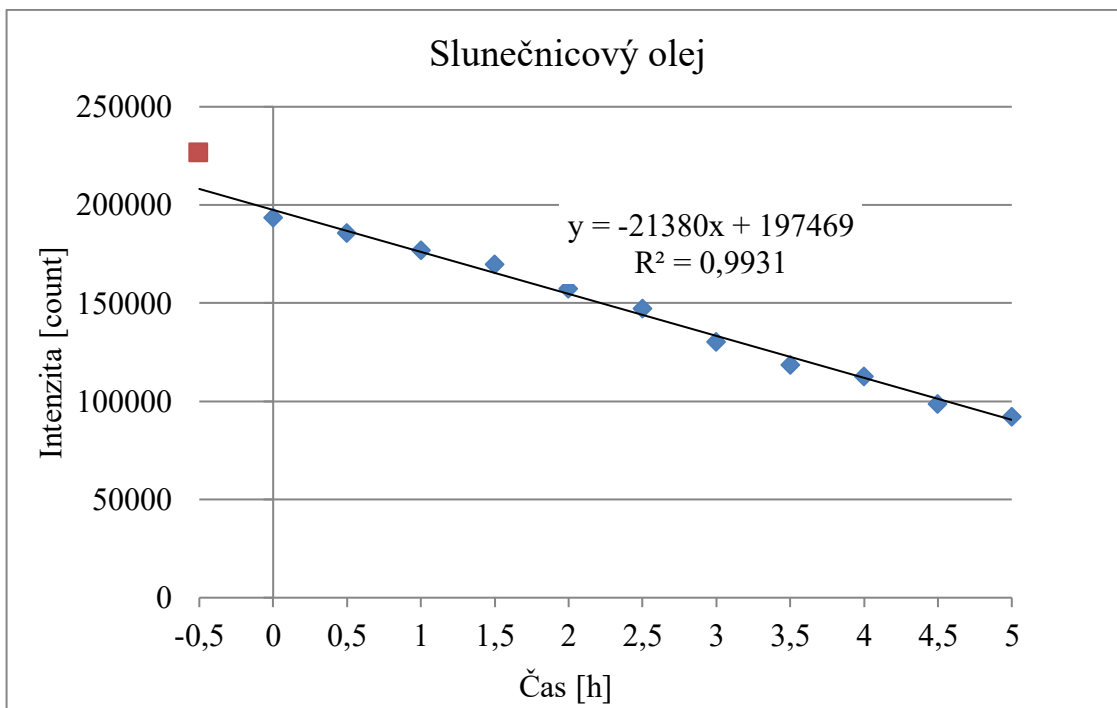
Na Obr. 10 lze vidět graf luminiscence vzorků slunečnicového oleje naměřené při excitační vlnové délce 355 nm. Jednotlivé křivky odpovídají spektrům vzorků s rozdílnou dobou zahřevu, kde $t=0$ odpovídá vzorku, jež byl odebrán v okamžiku, kdy dosáhl požadované teploty zahřevu, a $t=5$ je vzorek s nejvyšší dobou zahřevu – 5 hodin. Spektrum označené jako Zdroj, představuje vzorek, který nebyl vystaven tepelnému zahřívání. Stejně značení je použito u všech luminiscenčních spekter testovaných olejů.

Je zde jeden výrazný pík (viz Obr. 10), který se nachází v rozmezí emisní vlnové délky 360 až 500 nm, s maximem při 420 nm. Dále je zde přítomen menší pík v rozmezí 500 až 540 nm, s maximem při 525 nm. Taky je možné zde nalézt ještě další pík, který je výrazně menší, nachází se v rozmezí emisních vlnových délek 690 až 725 nm, s maximem při 710 nm. Protože maximum v oblasti kolem 710 nm je zastíněno píky s vyšší intenzitou, byl tento pík vynesena samostatně do grafu, viz Obr. 11. Z Obr. 10 je patrné, že intenzita luminiscence klesala

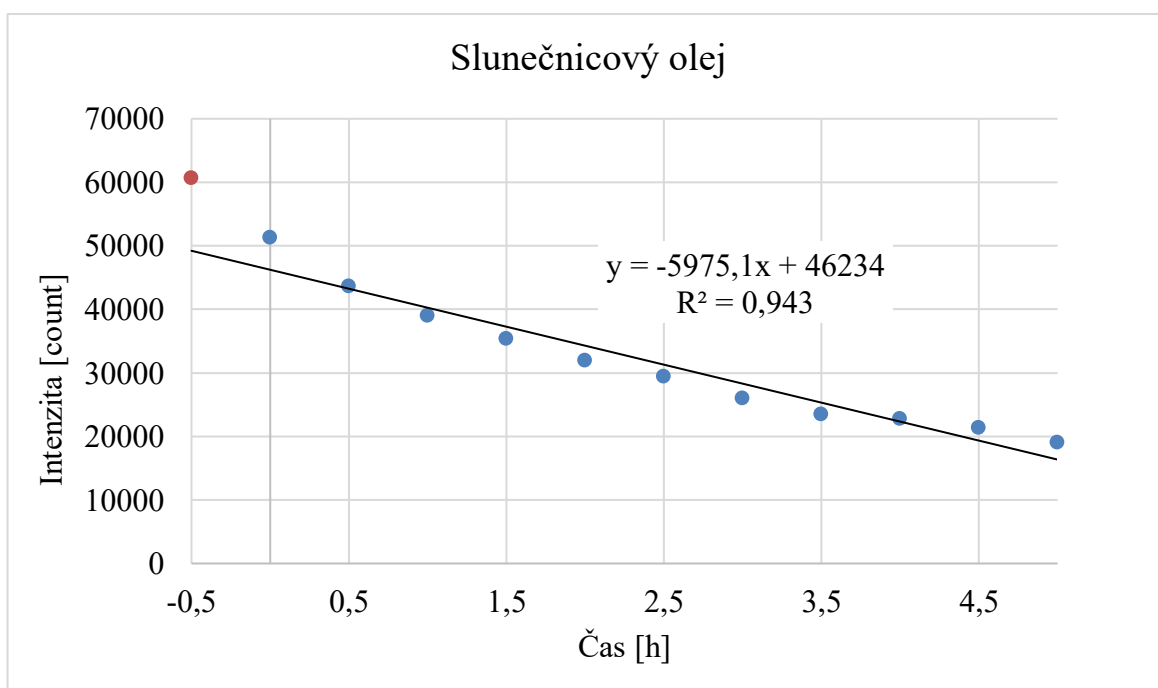
s rostoucí dobou záhřevu, tedy zdrojový vzorek vykazuje největší intenzitu záření, jeho hodnoty dosahují až k 230 000 countů a nejmenší intenzitu vykazuje vzorek, který byl vystaven tepelné zátěži po dobu 5-ti hodin. Hodnoty tohoto vzorku dosahují pouze k 95 000 countů. Z Obr. 12, který zobrazuje závislost intenzity luminiscence píku při 420 nm na době degradace, je patrné, že intenzita píku klesá téměř lineárně s časem (korelační koeficient $R^2 = 0,9931$), vyjma zdrojového vzorku. Na Obr. 13, jež zobrazuje intenzitu luminiscence píku na 525 nm na čase, je také patrný klesající trend, zde korelační koeficient činí $R^2 = 0,9430$. Podobně je tomu i na Obr. 14, kde je zobrazena závislost intenzity pro pík při 710 nm, i zde je zřejmý pokles intenzity avšak nelineární.



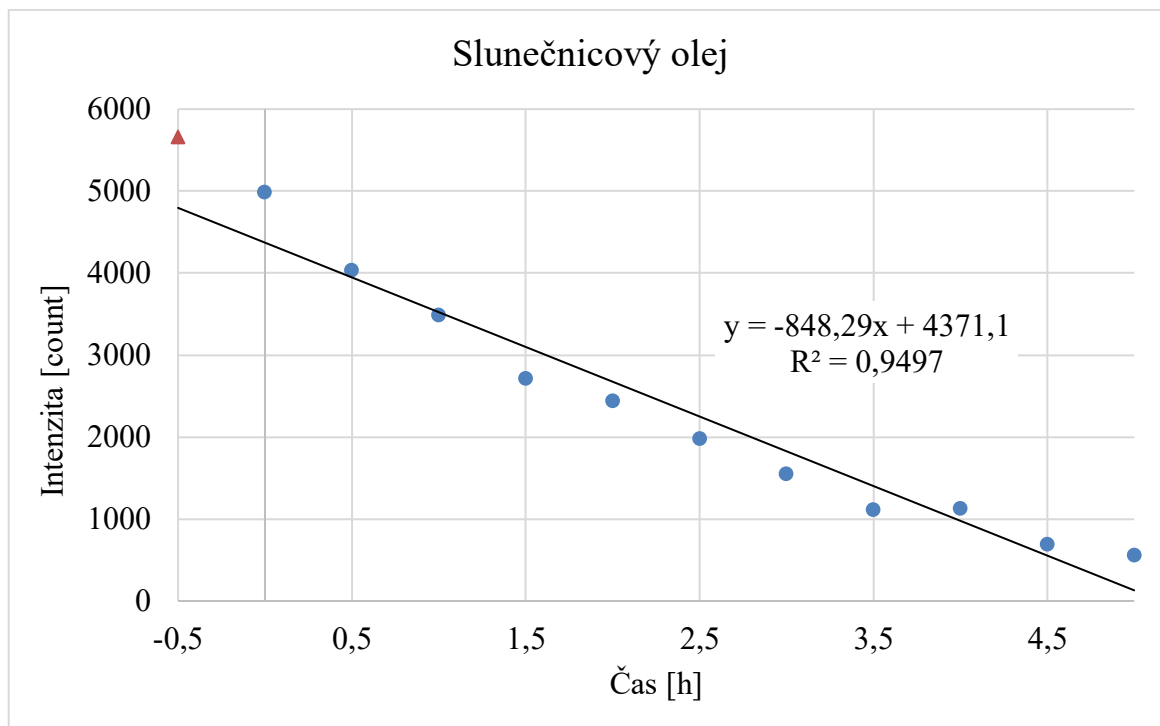
Obr. 11 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce (přibližně oblasti kolem 710 nm)



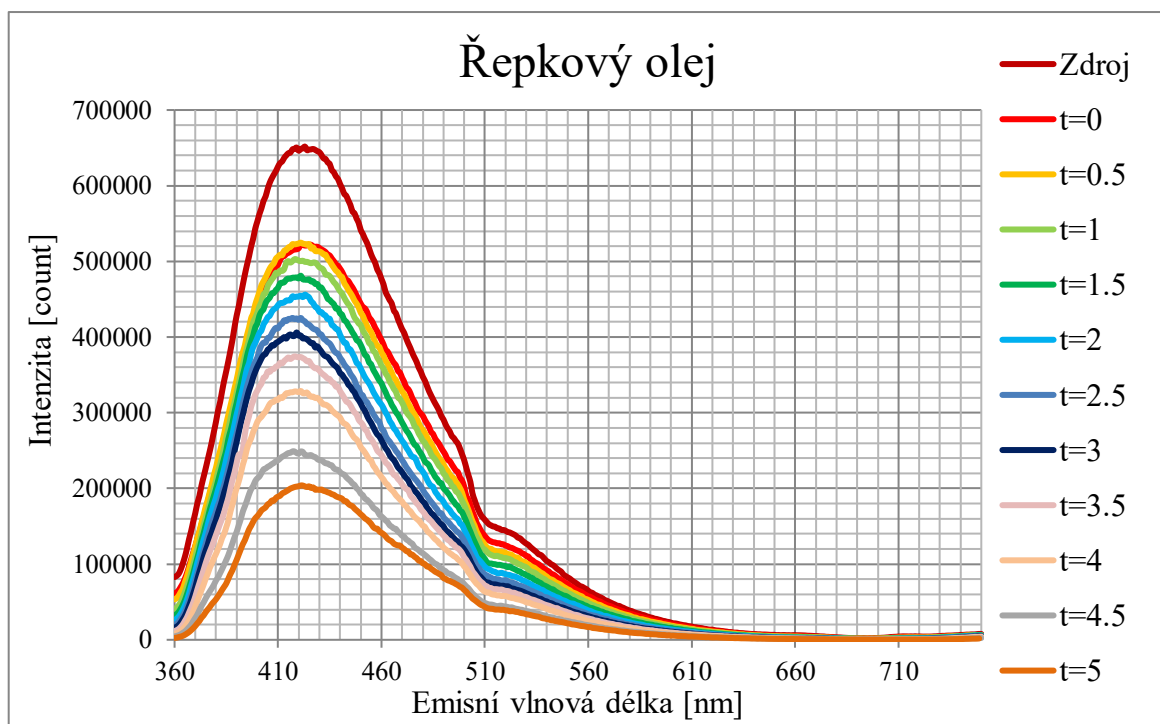
Obr. 12 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 420 nm



Obr. 13 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 525 nm

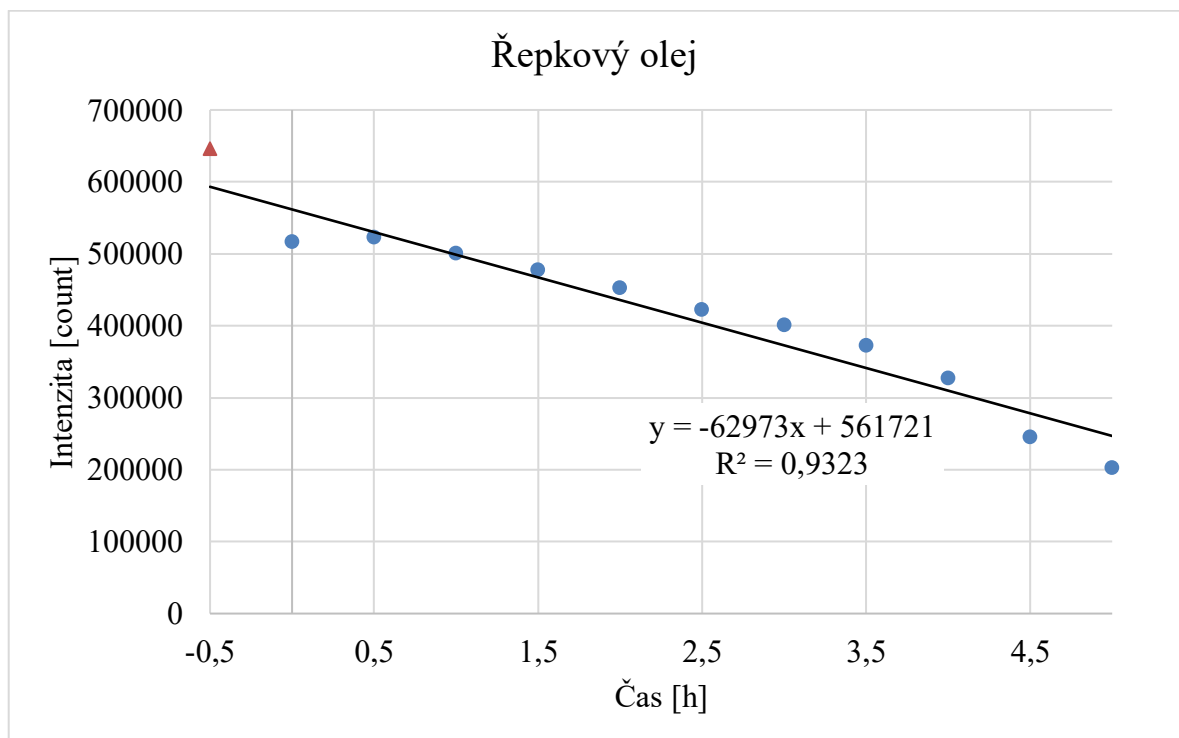


Obr. 14 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace – pik na 710 nm

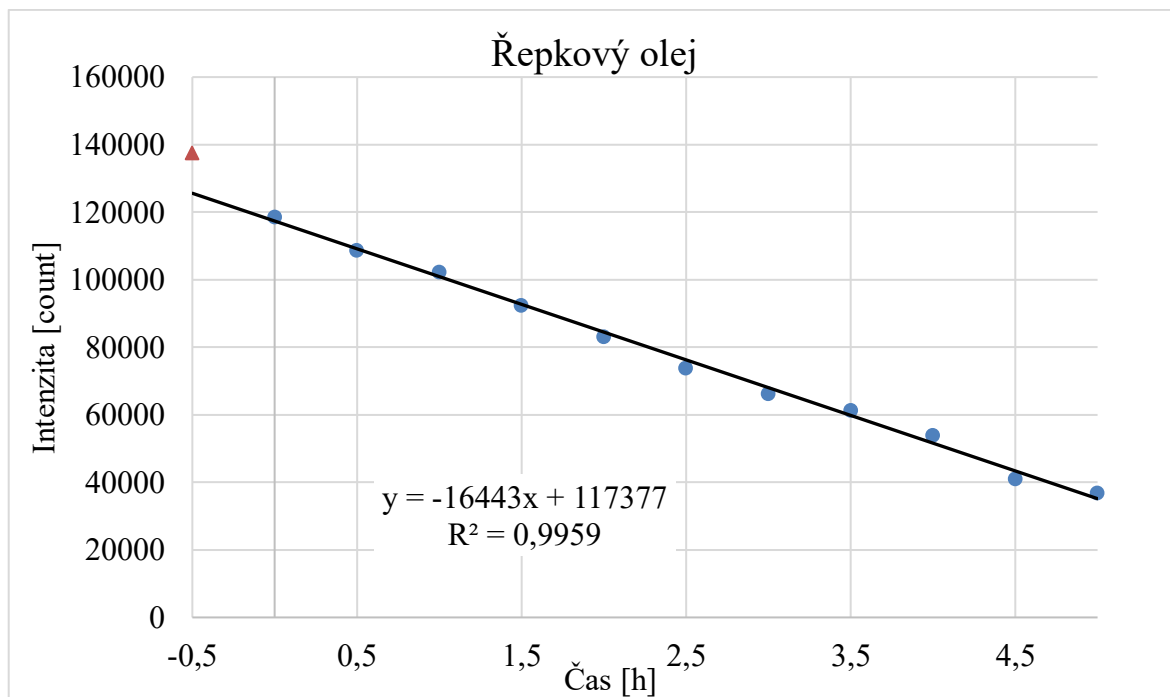


Obr. 15 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce

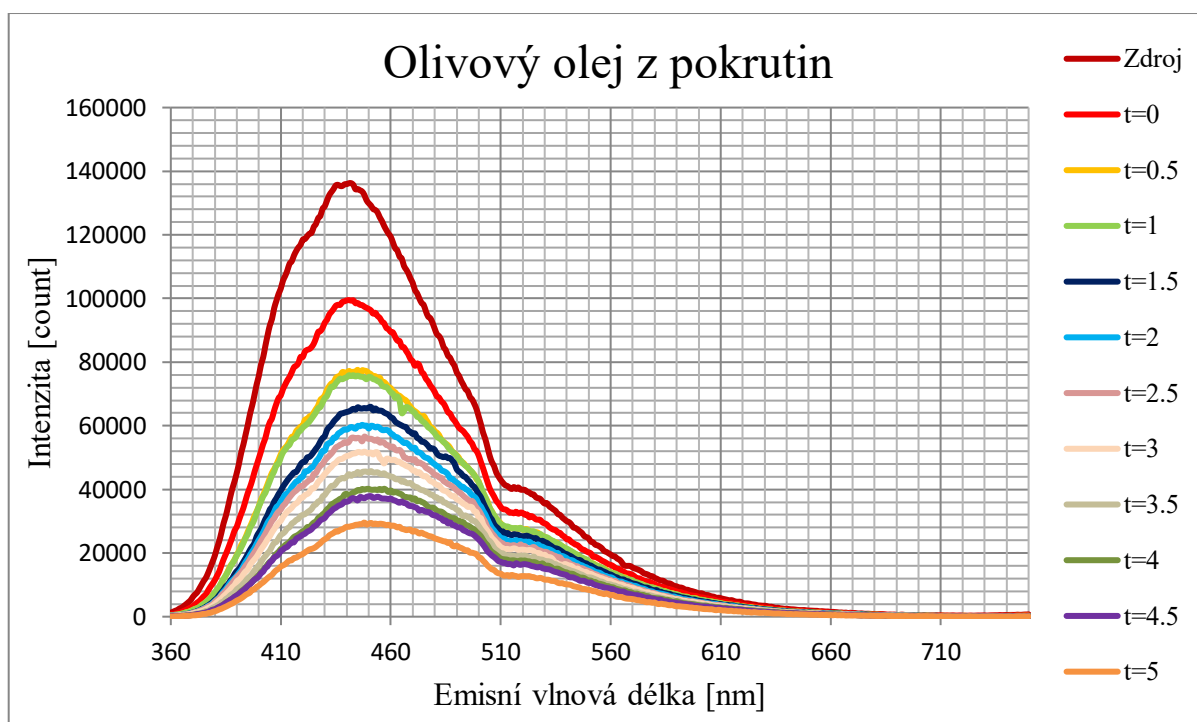
Na Obr. 15 je zobrazen graf luminiscence pro vzorky řepkového oleje naměřené také při excitační vlnové délce 355 nm. Podobně jako u slunečnicového oleje je zde jeden výrazný pík v rozmezí emisních vlnových délek 360 nm až 500 nm, s maximem při 420 nm. Další pík, který je menší lze nalézt při 520 nm. I v tomto případě platí, že s rostoucí dobou záhřevu klesá intenzita emise vzorků. Nejvyšší intenzitu vykazují opět zdrojový vzorek, jehož hodnoty dosahují 645 000 countů a nejnižší hodnoty intenzity má vzorek zahříváný po dobu 5-ti hodin, jehož hodnoty dosahují pouze k 200 000 countů. Na grafu uvedeném níže, Obr. 16, jež zobrazuje závislost intenzity luminiscence píku na 420 nm na čase degradace, lze vidět, že pokles intenzity píku při 420 nm není lineární, korelační koeficient je pouze $R^2 = 0,9323$, ale v případě následujícího grafu (Obr. 17), který zobrazuje závislost intenzity luminiscence píku na 525 nm na čase degradace, je pokles intenzity lineární ($R^2 = 0,9959$), tudíž v tomto případě je tu jistá korelace mezi dobou degradace a poklesem intenzity luminiscence.



Obr. 16 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 420 nm



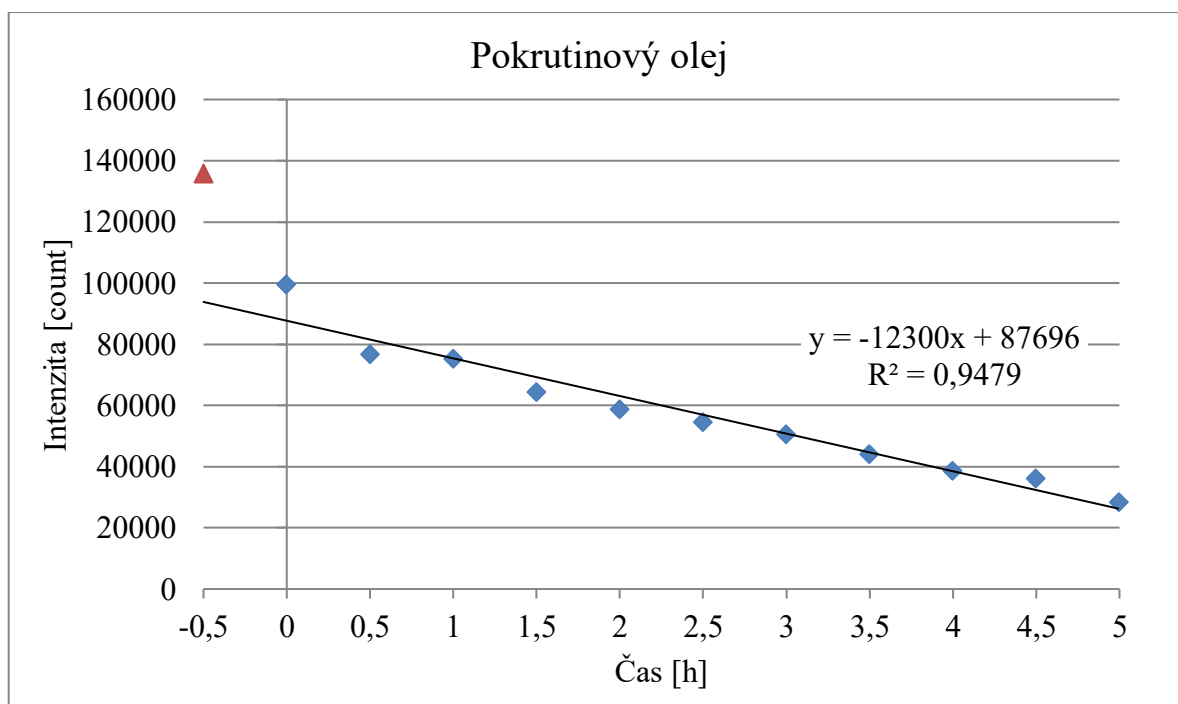
Obr. 17 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pik na 525 nm



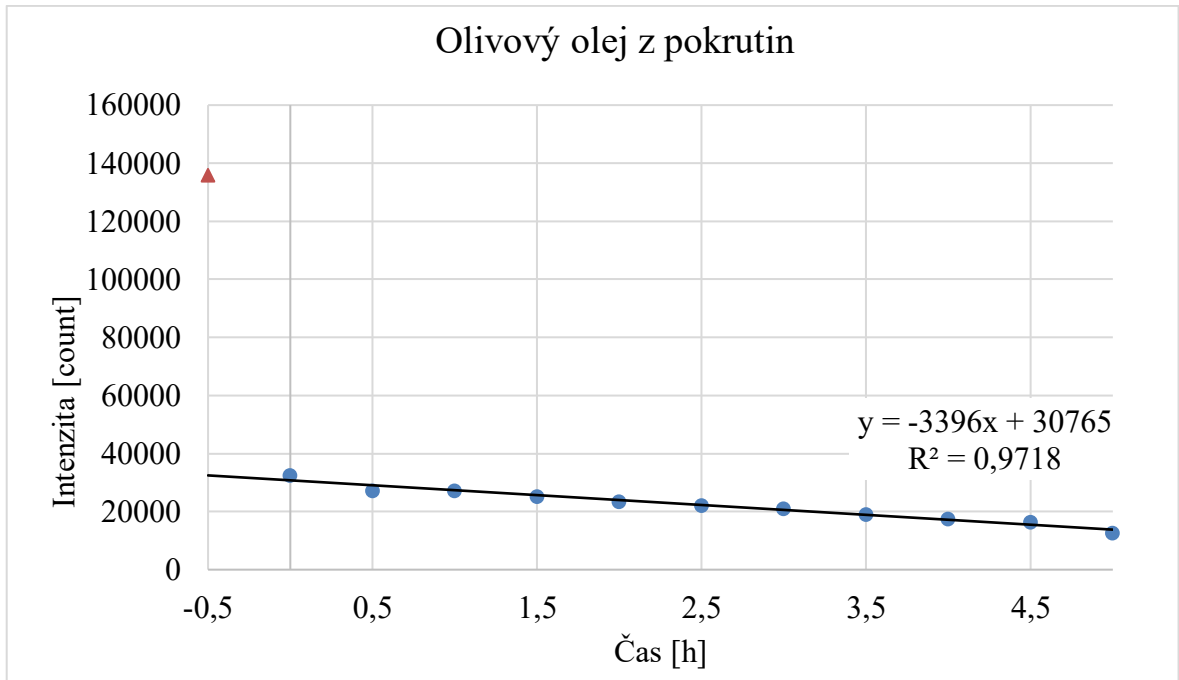
Obr. 18 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce

Na grafu luminiscence olivového oleje z pokrutin (viz Obr. 18) podobně jako na předchozích grafech, je jeden výrazný pik, který má maximum při 440 až 450 nm. V rozmezí 500 nm až

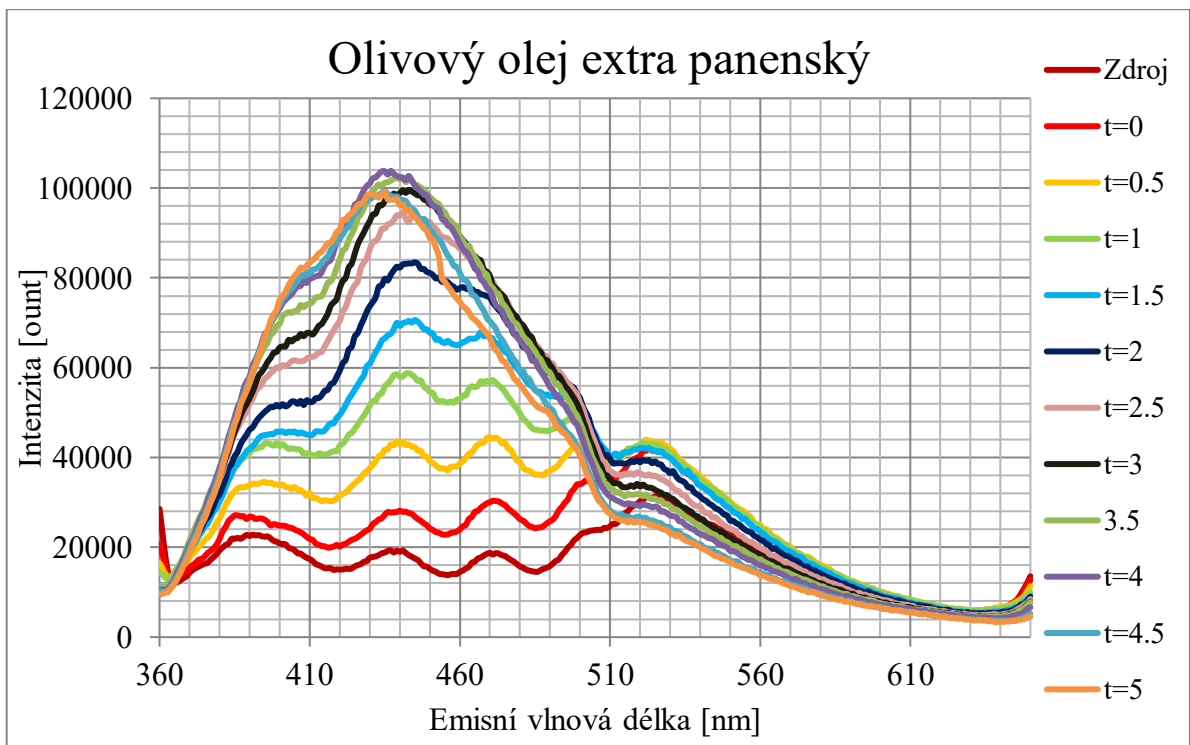
530 nm lze vidět další menší pík. Opět lze tvrdit, že s rostoucí dobou záhřevu klesá intenzita luminiscence vzorků. Tedy nejvyšší intenzitu vykazuje vzorek zdrojový, který v maximum dosahuje hodnoty 136 000 countů a vzorek zahříváný 5 hodin dosahuje 29 000 countů. Dále lze v grafu pozorovat posun maxima (vrcholu) hlavního píku, který u zdrojového vzorku je při 440 nm a u posledního vzorku se toto maximum posunulo na 450 nm. Z Obr. 19 je patrné, že pokles intenzity píku při 440 nm není úplně lineární, vzhledem ke korelačnímu koeficientu, jež činí $R^2 = 0,9479$. Obr. 20 zobrazuje závislost poklesu intenzity luminiscence pro pík na 520 nm, jehož korelační koeficient je $R^2 = 0,9718$, ani v tomto případě se nejedná o lineární závislost.



Obr. 19 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace – pík na 440 nm



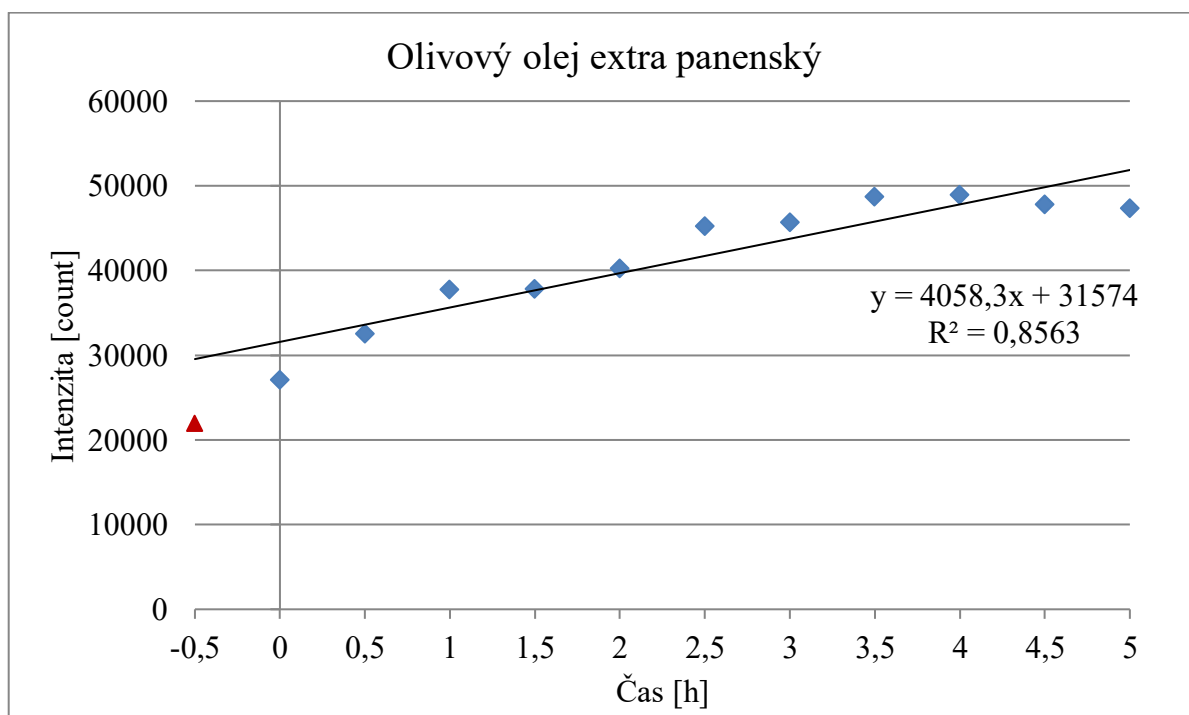
Obr. 20 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pik na 520 nm



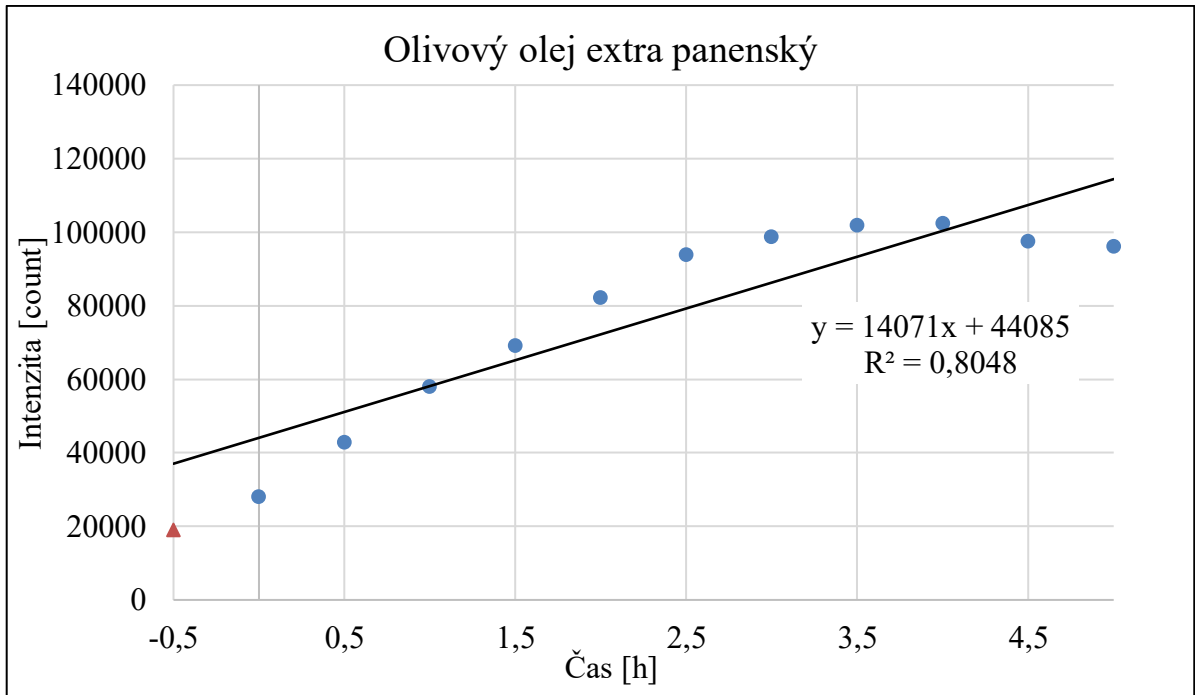
Obr. 21 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce

Z Obr. 21 je patrné, že u olivového oleje extra panenského, jako u jediného z testovaných vzorků, intenzita luminiscence naopak rostla s rostoucí dobou záhřevu. Z toho lze vyvodit, že zde záhřevem (vlivem oxidace), vznikalo mnoho sloučenin, jež jsou schopny luminiskovat. V tomto případě nejvyšší hodnoty dosahuje vzorek, který byl zahříván nejdelší dobu, dosahuje hodnoty 104 000 countů a nejnižší hodnotu intenzity vykazuje zdrojový vzorek 32 000 countů. U zdrojového vzorku lze v rozmezí 360 nm až 510 nm rozlišit tři píky, které se postupně spojují do jednoho velkého, což lze pozorovat u vzorků s dobou záhřevu 2 hodiny a výše. Pík kolem 385 nm pravděpodobně náleží kyselině gallové, která patří mezi fenolické sloučeniny, tudíž působí jako antioxidant. (Tena et al., 2009) [53]. V tomto případě do jisté míry chrání olej před oxidací, ale jak lze pozorovat s rostoucí dobou záhřevu pík zvyšuje svou intenzitu. Dochází tedy k degradaci této kyseliny.

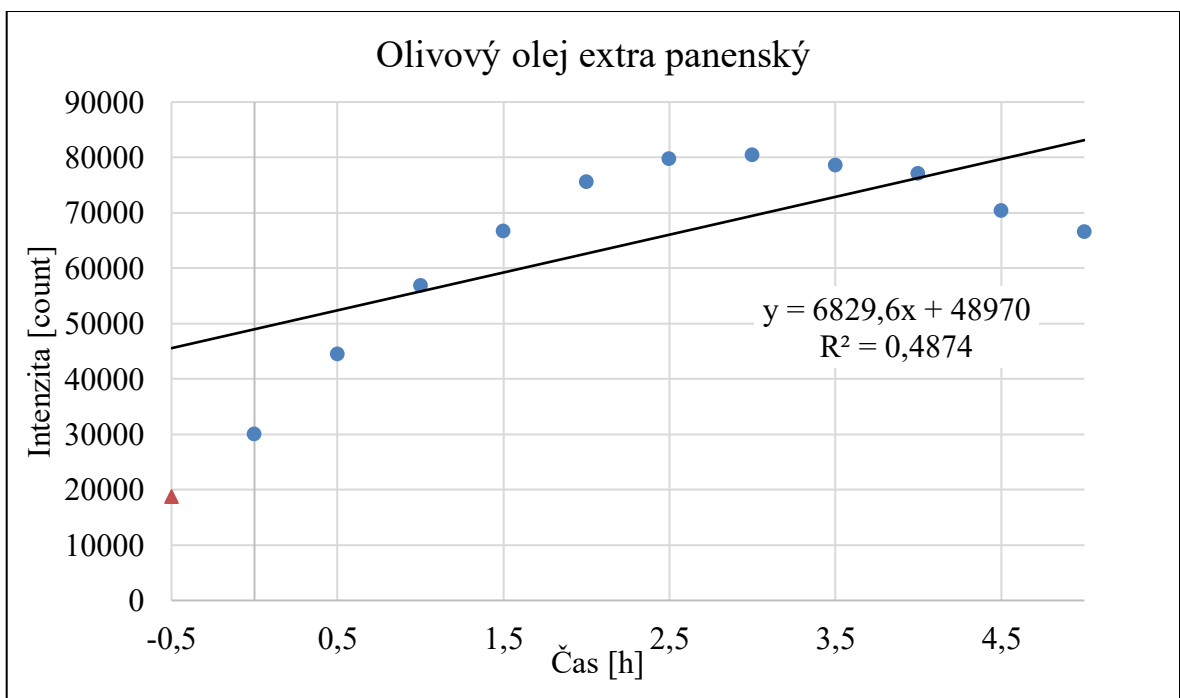
V následujících grafech Obr. 22, 23, 24, 25 je zobrazena závislost intenzity luminiscence na čase degradace pro píky při 385, 440, 470, 525 nm. Z těchto grafů je patrné, že intenzita s časem narůstá pro píky 385, 440, 470 nm, ale intenzita píku při 525 nm klesá. Ovšem ani v jednom případě nelze mluvit o lineárním nárůstu nebo poklesu, hodnoty korelačních koeficientů jsou příliš nízké.



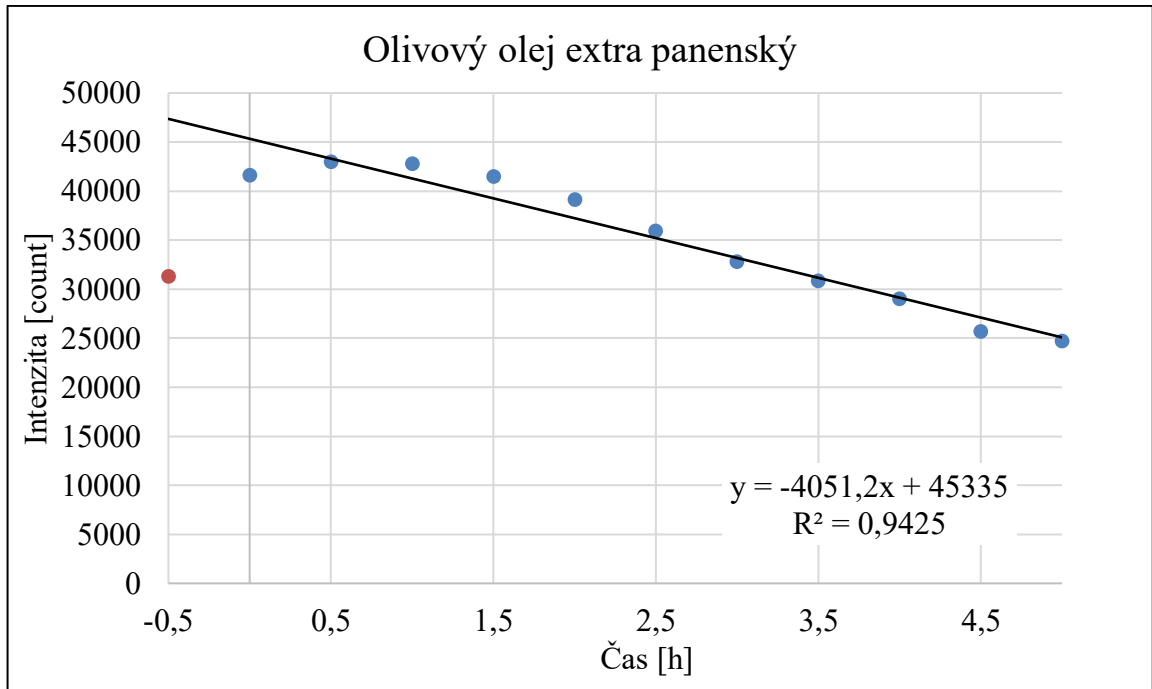
Obr. 22 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 385 nm



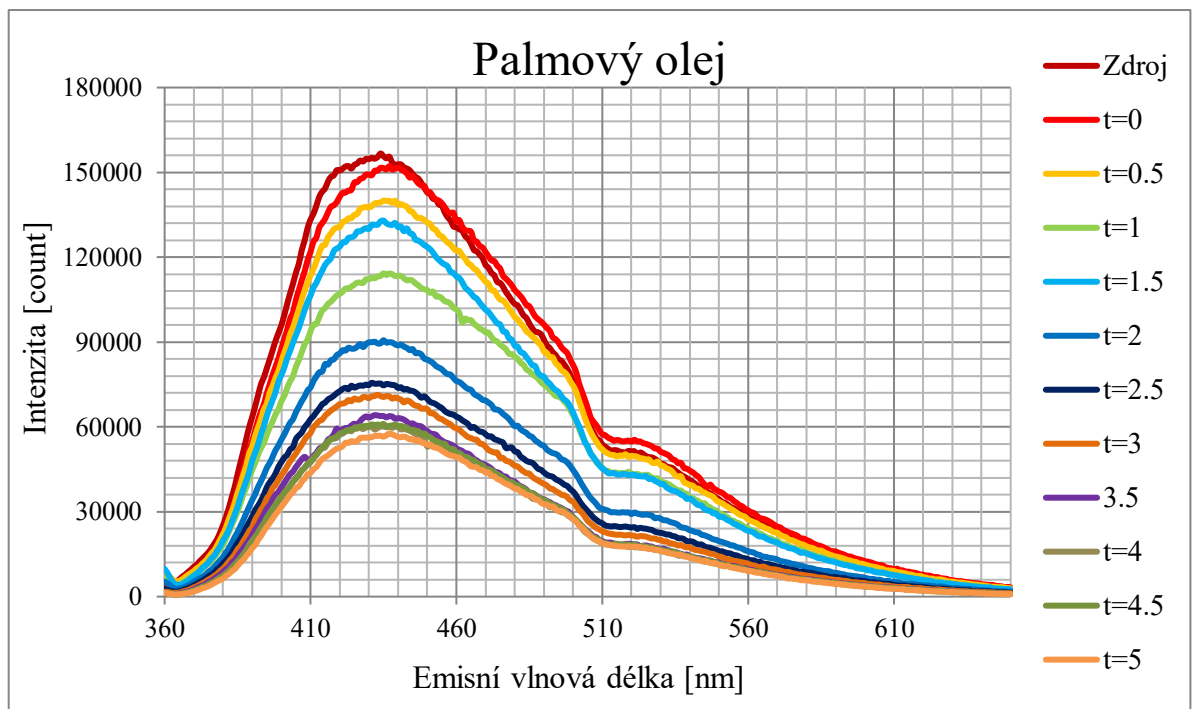
Obr. 23 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 440 nm



Obr. 24 Závislost intenzity luminiscence na čase – pík na 470 nm

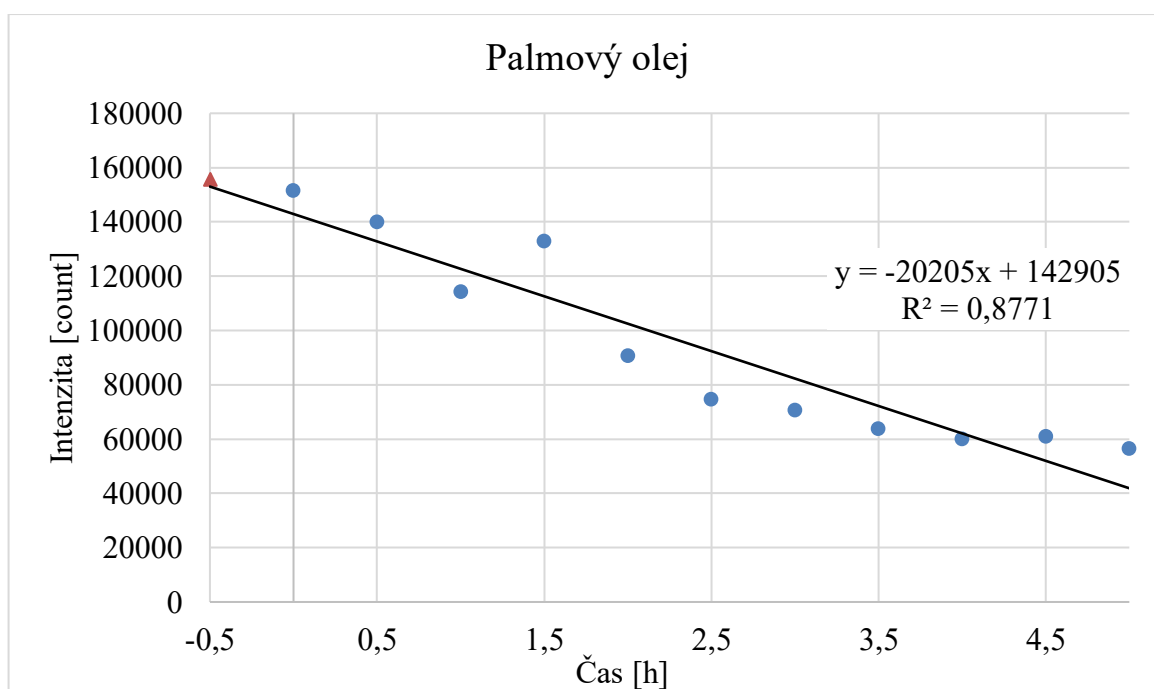


Obr. 25 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace – pík na 525 nm

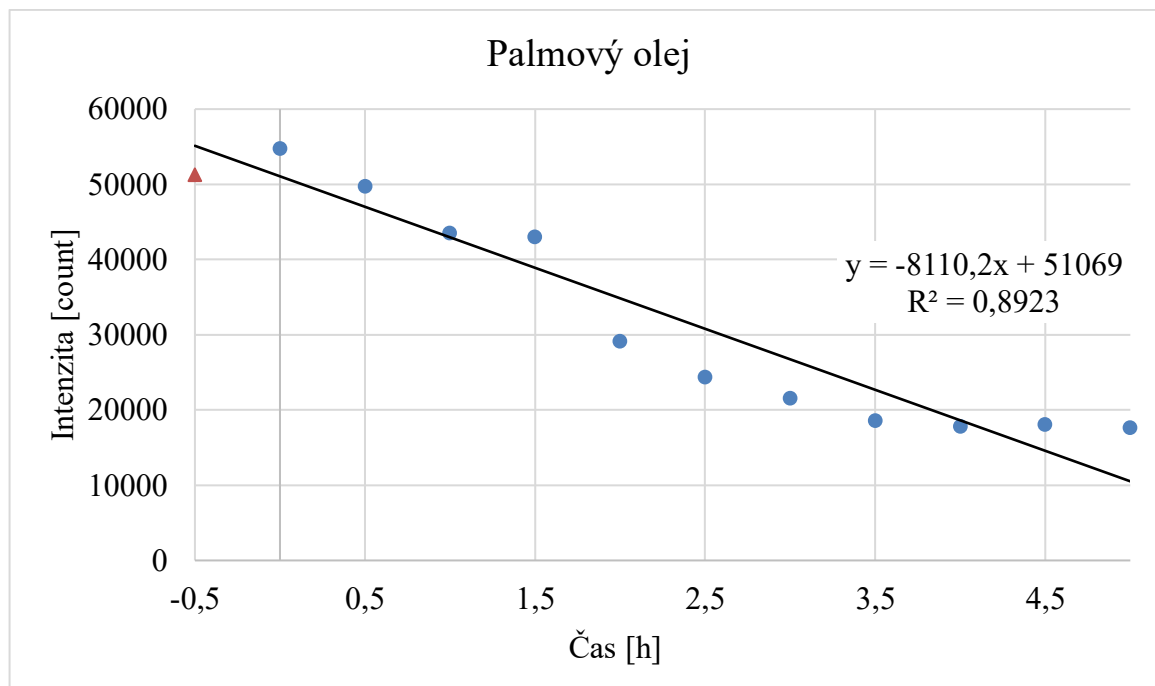


Obr. 26 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce

U vzorků palmového oleje, obdobně jako v předchozích případech, viz Obr. 26, intenzita luminiscence klesá s rostoucí dobou záhřevu. Nejvyšší hodnota, u zdrojového vzorku, dosahuje 159 000 countů a nejnižší hodnota intenzity je 55 000 countů u vzorku po záhřevu 5 hodin. Je zde přítomen jeden výrazný pík s vrcholem při 435 nm a další menší pík, který má vrchol při 520 nm. Z Obr. 27, znázorňující závislost intenzity luminiscence na čase pro pík na 435 nm, lze usoudit, že intenzita luminiscence píku klesá, ovšem ne lineárně, hodnota korelačního koeficientu je nízká. Podobně je tomu i na následujícím grafu, Obr. 28, který náleží píku při 520 nm, ani v tomto případě se tedy nejedná o lineární pokles intenzity. Avšak lze vidět klesající trend poklesu sledované intenzity luminiscence.



Obr. 27 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace – pík na 435 nm



Obr. 28 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace – pík na 520 nm

Ze studie Kongbonga et al. (2011) lze vyvodit, že píky v oblasti 400 až 500 nm odpovídají vzniklým oxidačním produktům [54].

Existenci píku v oblasti kolem 525 nm způsobuje vitamín E. Pokud by zde byly přítomny i píky v rozmezí 650 nm až 700 nm poukazovalo by to na přítomnost chlorofylů, zahrnující chlorofyl *a*, *b* a feofytiny *a*, *b* (Diaz et al., 2003). Jiná studie uvádí rozsah vlnových délek pro chlorofylová barviva 570–700 nm (Poulli et al., 2009) [55].

Píky kolem 300 nm až 350 nm by značily přítomnost fenolických sloučenin ve vzorcích, například kyseliny gallové apod. (Sikorska et al., 2005) [22].

Podle studie Poulli et al., 2009 obsahoval olivový olej extra panenský v oblasti 350–500 nm tři píky po záhřevu (30 minut při teplotě 150–190 °C). Dále byl přítomen pík v oblasti 315–350 nm, jež se snižoval po záhřevu 30 minut při teplotě 100 °C a 150 °C a úplně vymizel při 190 °C. Olivový olej z pokrutin v oblasti 350–500 nm vykazoval dva píky také po záhřevu 30 minut při 100, 150 a 190 °C. Slunečnicový olej ukazoval pík luminiscence v oblasti 340–500 nm, nicméně ten se snižoval při záhřevu na 150 a 190 °C. Píky v oblasti kolem 400–450 nm narůstaly po záhřevu 8 hodin při teplotě 190 °C [55].

Ve výzkumu, který provedl Guimet et al. 2005, vykazoval panenský olivový olej 2 malé píky při 445 a 475 nm, jeden intenzivní pík na 525 nm a další pík při 681 nm [56].

Podle studie Kyriakidise a Skarkalise píky při 445 a 475 nm odpovídají produktům oxidace a pík při 525 nm je odvozený od vitamínu E, pík při 681 nm je přisuzován chlorofylům. Velmi malá intenzita píků při 445 a 475 nm u panenského olivového oleje byla způsobena přítomností velkého obsahu mononenasycených mastných a fenolických antioxidantů, které jim poskytují větší stabilitu proti oxidaci. Všechny rafinované oleje zobrazovaly pouze jeden intenzivní široký pík na přibližně 400–560 nm, jež je způsoben vyšším stupněm oxidace olejů v důsledku vysokého obsahu polynenasycených mastných kyselin [57].

Na základě zjištěných informací lze usoudit, že byly u všech testovaných vzorků přítomny produkty oxidace (400 až 500 nm), lišila se pouze jejich emisní vlnová délka a intenzita emise. Intenzita píku odpovídající oxidačním produktům, s rostoucí dobou záhřevu klesala, s výjimkou olivového oleje extra panenského, u kterého naopak intenzita těchto píků vzrostla. Dále u všech vzorků olejů byl zaznamenán pík odpovídající vitamínu E, jehož intenzita také klesala s dobou záhřevu, opět s výjimkou u olivového oleje extra panenského, kdy se intenzita zmíněného píku zvyšovala do doby záhřevu 1 hodiny a až poté začala také klesat. U vzorku slunečnicového oleje byl přítomen i pík odpovídající chlorofylům. Pík kolem 385 nm, jež byl přítomen u olivového oleje extra panenského, je způsoben přítomností kyseliny gallové. (Tena et al., 2009) [53].

Pík kolem 445 nm může být zapříčiněn vysokým podílem polynenasycených mastných kyselin a vyššími procenty jejich oxidačních produktů [58].

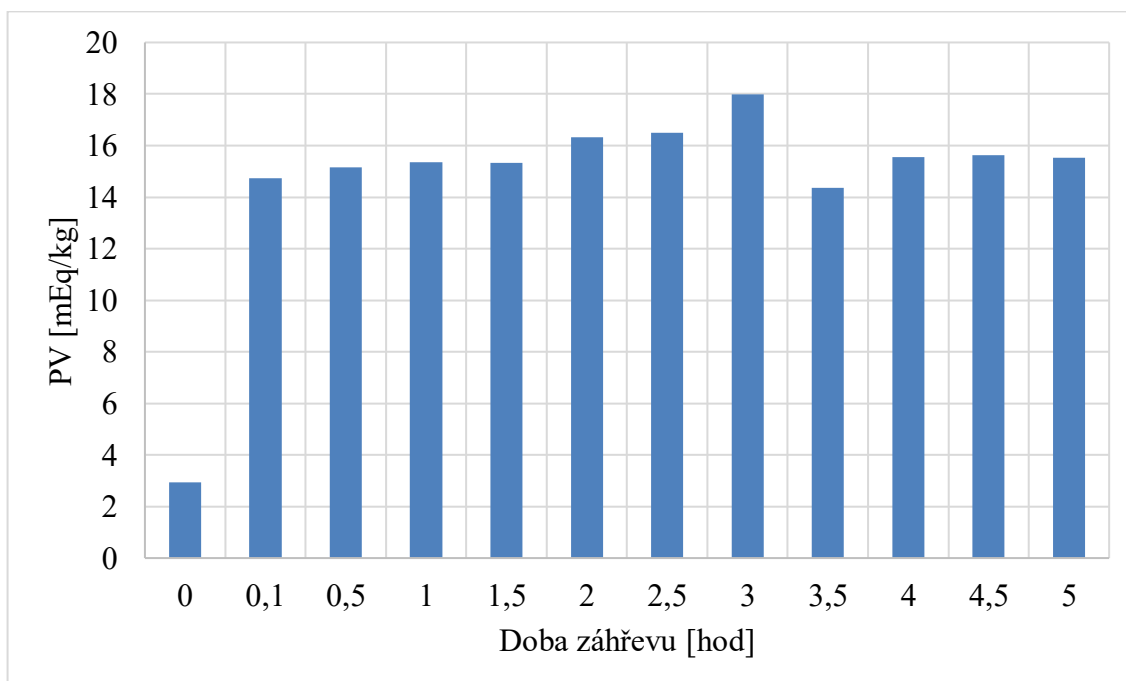
7.2 Stanovení peroxidového čísla

Peroxidové číslo je měřítkem obsahu primárních produktů oxidace tuků a olejů. Těmito produkty jsou peroxidy a hydroperoxidy, které snižují jak senzoričku, tak i nutriční hodnotu. Hydroperoxidy následně degradují za vzniků aldehydů a ketonů. Peroxidové číslo určuje množství kyslíku, který je schopný oxidovat jodid na jod za podmínek metody a vyjadřuje se v miliekvivalentech aktivního kyslíku na kg oleje. Čím je hodnota tohoto čísla vyšší, tím víc se snižuje oxidační stabilita vzorku [52, 59].

Podle nařízení EU 299/2013 je stanovena maximální hodnota peroxidového čísla pro extra panenský olivový olej ≤ 20 mEq O₂/ kg, pro olivový olej z pokrutin je tato hodnota ≤ 15 mEq O₂/ kg. Ve vyhlášce Ministerstva zemědělství č. 90/2000 je uvedena hodnota PV, která platí obecně pro všechny tuky a oleje, tato hodnota činí maximálně 10,0 mEq O₂/kg a hodnota pro oleje lisované za studena činí maximálně 15,0 mEq O₂/kg [52].

Za zvyšováním peroxidového čísla stojí oxidace, autooxidace a fotooxidace.

7.2.1 Slunečnicový olej

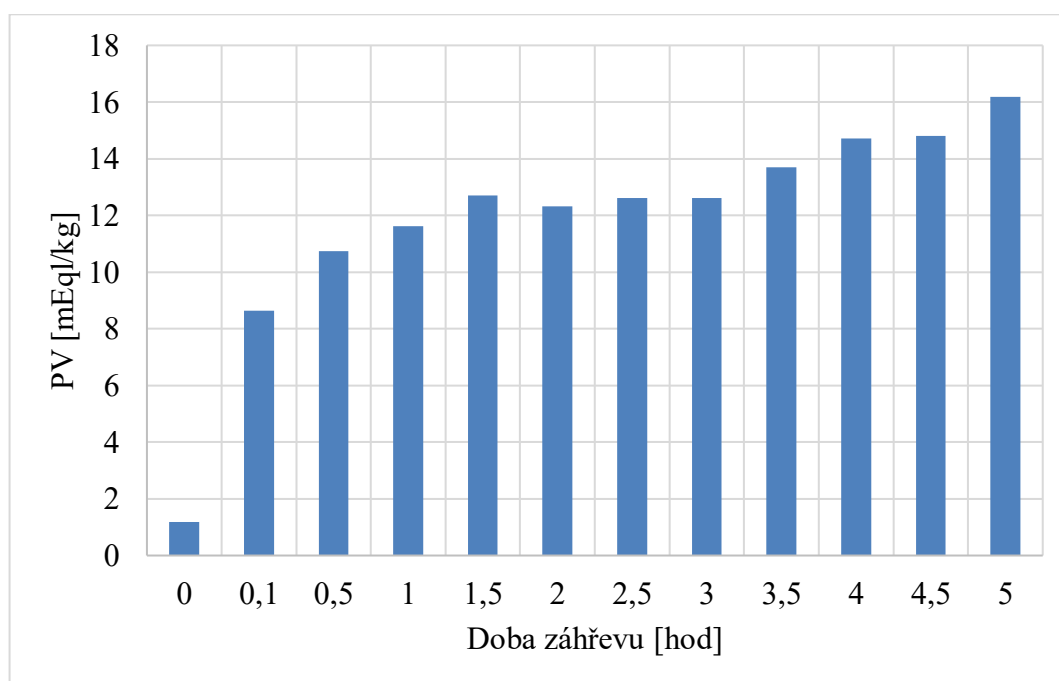


Obr. 29 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – slunečnicový olej

Pro porovnání výsledku byla vybrána studie, jež publikoval Modupe O. Dawodu a spol. V této studii je uvedena hodnota PV pro slunečnicový olej při teplotě 25 °C $2,30 \pm 0,02$ mEq O₂/kg a při teplotě 150 °C dosáhlo peroxidové číslo hodnoty $3,20 \pm 0,02$ mEq O₂/kg [7].

Hodnota peroxidového čísla u testovaného vzorku slunečnicového oleje (viz Obr. 29), který nebyl zahříván (0), byla 2,94 mEq O₂/kg a u následujícího vzorku (0,1), jež byl odebrán v okamžiku dosažení teploty 160 °C ± 5 °C, byla tato hodnota 14,73 mEq O₂/kg. Peroxidové číslo dosáhlo svého maxima u vzorku, který byl zahříván po dobu 3 hodin, následně tato hodnota poklesla. Hodnoty PV testovaných vzorků splňují zmíněnou vyhlášku jenom v případě nezahřívání vzorku.

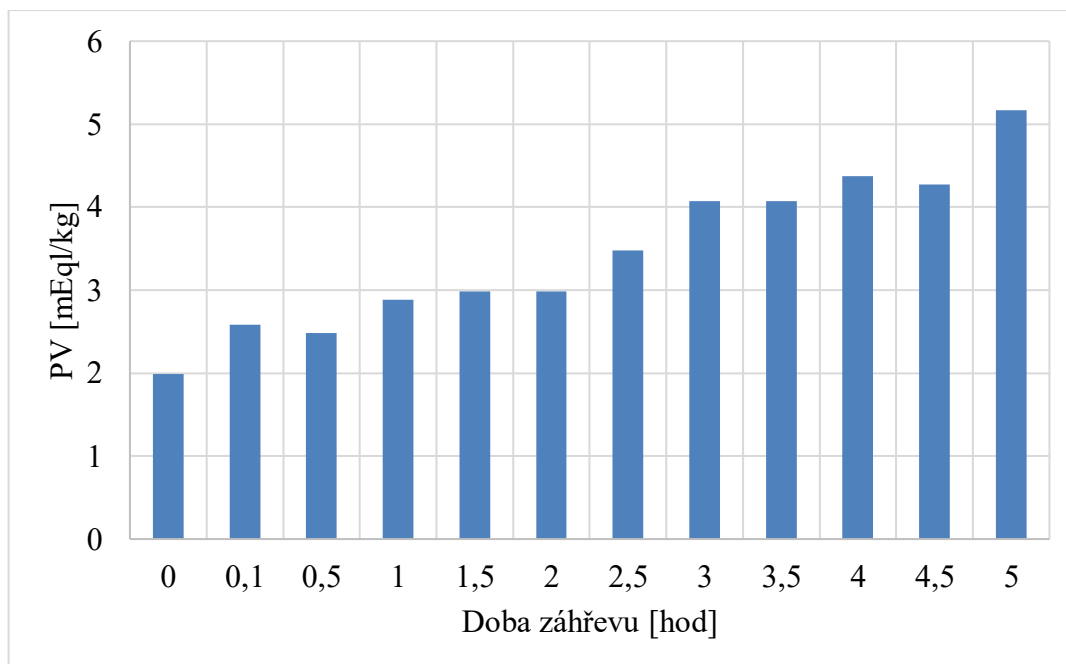
7.2.2 Řepkový olej



Obr. 30 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – řepkový olej

Na Obr. 30 lze pozorovat nárůst PV vzorků řepkového oleje se zvyšující se dobou záhřevu. Dle již zmíněné vyhlášky Ministerstva zemědělství splňuje řepkový olej hodnotu <10 mEq O₂/kg pouze u prvních dvou vzorků, u vzorku bez záhřevu (0) – 1,19 mEq O₂/kg a u vzorku (0,1), jež právě dosáhl teploty záhřevu 160 °C ± 5 °C – 8,64 mEq O₂/kg.

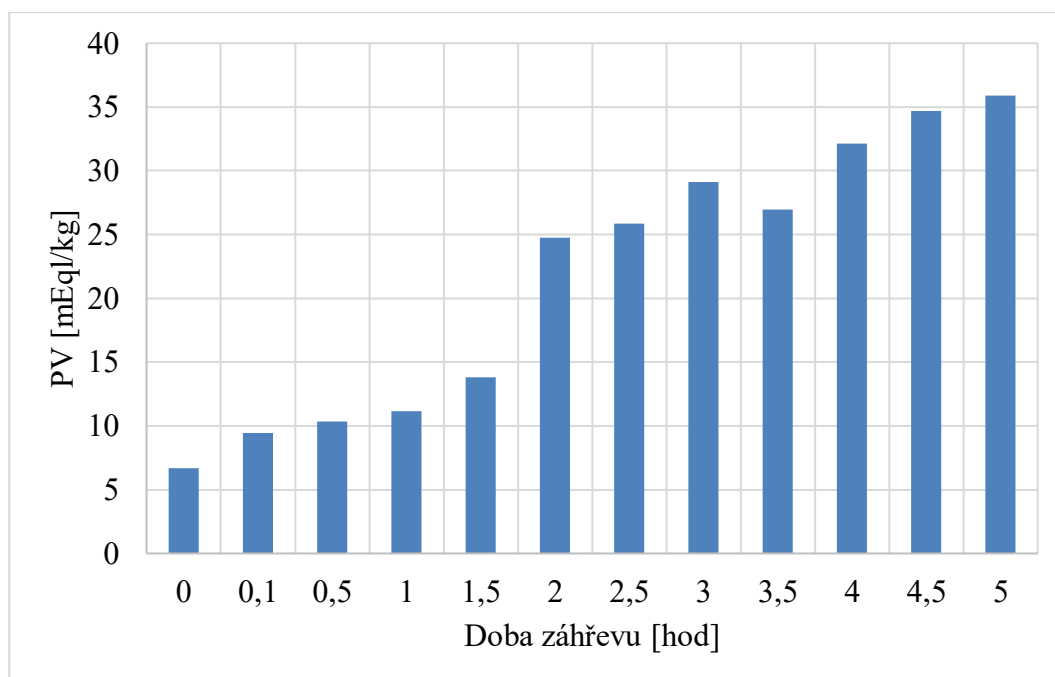
7.2.3 Olivový olej z pokrutin



Obr. 31 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – olivový olej z pokrutin

Nariadení 299/2013 udává hodnotu peroxidového čísla pro olivový olej-olej z pokrutin na ≤ 15 mEq O₂/kg. Hodnoty vzorků (viz Obr. 31) pro tento typ oleje začínají, pro nezahříváný vzorek (0), na hodnotě 1,99 mEq O₂/kg a opět s dobou záhřevu tato hodnota roste až do hodnoty 5,17 mEq O₂/kg pro tepelnou zátěž 5 hodin. Žádná hodnota peroxidového čísla nepřesáhla hodnotu danou Nařízením Komise 299/2013.

7.2.4 Olivový olej extra panenský

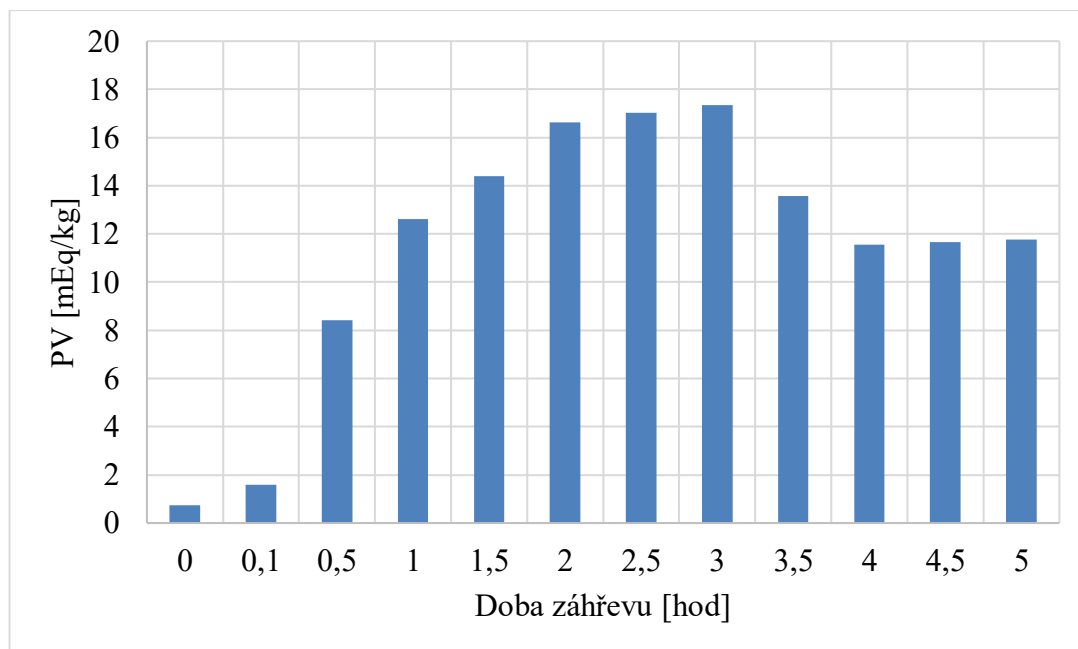


Obr. 32 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – olivový olej extra panenský

Ta samá studie (Modupe O. Dawodu a spol.) uvádí peroxidové číslo i pro olivový olej. Udává hodnotu při 25 °C $5,20 \pm 0,02$ mEq O₂/kg a při teplotě 150 °C 5,72 mEq O₂/kg. Hodnoty dané Nařízením Komise 299/2013 činí pro extra panenský olivový olej ≤ 20 mEq O₂/kg.

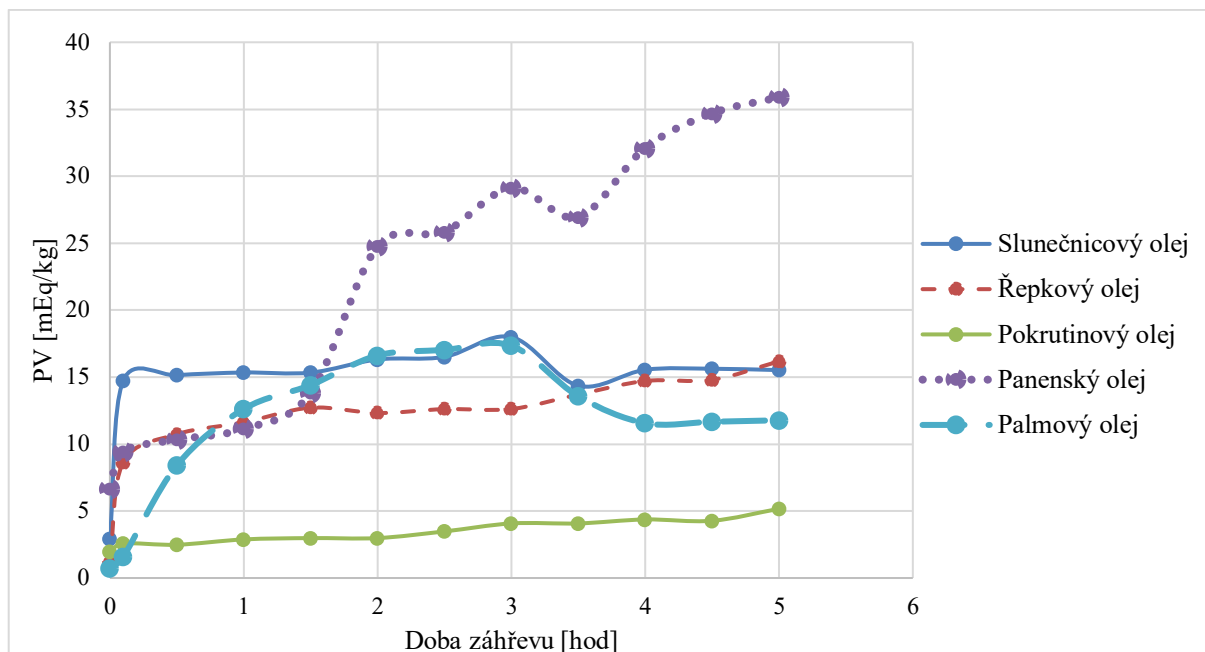
Na Obr. 32 lze pozorovat hodnoty testovaných vzorků olivového oleje extra panenského, začínající na hodnotě PV 6,66 mEq O₂/kg pro nezahříváný vzorek (0), tato hodnota dále roste s dobou záhřevu až do hodnoty, pro 5 hodin zahříváný vzorek - 35,89 mEq O₂/kg. Již od doby záhřevu 2 hodin přesahuje hodnota peroxidového čísla hodnotu danou Nařízením Komise 299/2013.

7.2.5 Palmový olej



Obr. 33 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – palmový olej

Hodnoty PV pro palmový olej uvedené ve studii Modupe O. Dawodu činí při teplotě 25 °C $1,80 \pm 0,05$ mEq O₂/kg a při teplotě 150 °C je tato hodnota $2,10 \pm 0,02$ mEq O₂/kg. Testovaný vzorek palmového oleje, který nebyl vystaven tepelné zátěži (0), má průměrnou hodnotu peroxidového čísla 0,74 mEq O₂/kg. Po dosažení teploty záhřevu 160 ± 5 °C je tato hodnota 1,58 mEq O₂/kg (vzorek 0,1) a následně PV s rostoucí dobou záhřevu stoupá až do 3 hodiny záhřevu (viz Obr. 33), kde hodnota peroxidového čísla dosáhla maxima, tedy 17,34 mEq O₂/kg, poté zase klesá. Pokles je způsoben rozkladem primárních produktů oxidace – hydroperoxidů.



Obr. 34 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – porovnání všech vzorků

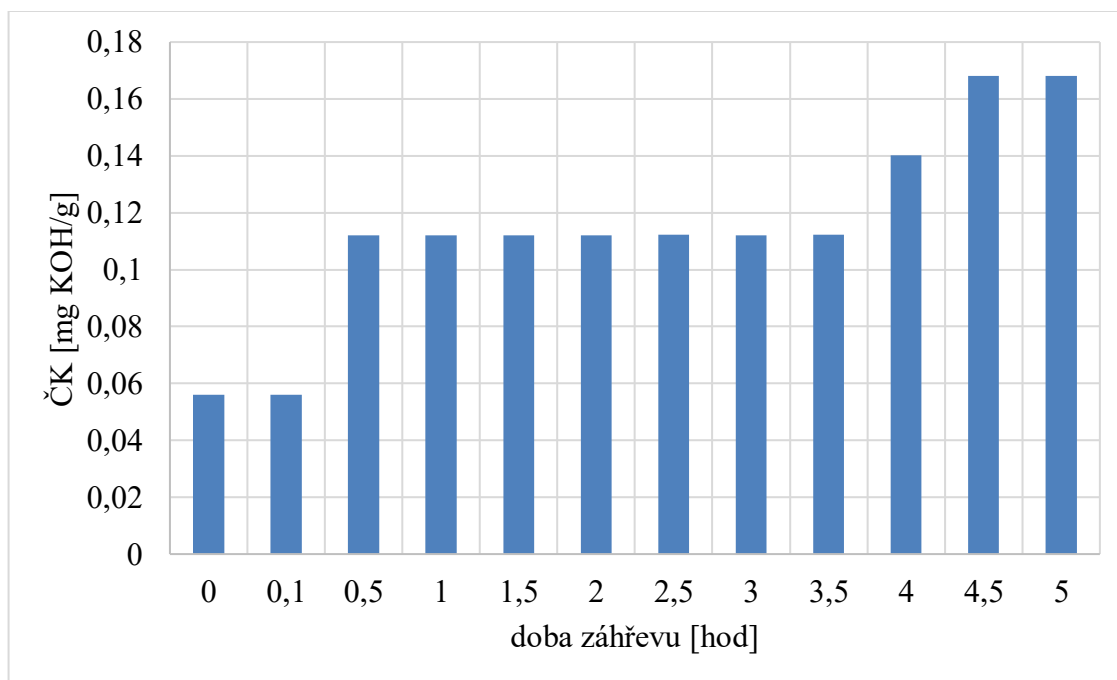
Při srovnání všech vzorků olejů, jak lze vidět i na Obr. 34, je patrné, že nejvyšší hodnotu peroxidového čísla má olivový olej extra panenský (OO), a to již v prvním vzorku, tedy ve vzorku, který nebyl podroben tepelné zátěži, tato hodnota roste s rostoucí dobou záhřevu. Tudiž se potvrdilo, že olivový olej extra panenský má využití ve studené kuchyni, nikoliv pro tepelnou úpravu potravin. Naopak nejmenší hodnotu měl olivový olej z pokrutin (OPO). Dále můžeme vidět, že podobné chování jako palmový olej (PO) vykazoval i slunečnicový olej (SO), ve smyslu, že PV dosáhlo určitého maxima a po dosažení této hodnoty zase klesalo.

7.3 Stanovení čísla kyselosti – volných mastných kyselin

Číslo kyselosti udává, kolik mg KOH je třeba na neutralizaci volných mastných kyselin, které se nacházejí v 1 g tuku. Je důležitým ukazatelem stavu lipidů, jež přímo ovlivňují kvalitu olejů. Volné mastné kyseliny vznikají hydrolyzou a zvyšují riziko oxidace olejů. Čím vyšší obsah volných mastných kyselin, tím vyšší číslo kyselosti. Lze tedy očekávat narůstající trend při záhřevu oleje.

V příloze č. 8, vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 328/1997, která byla zrušena a nahrazena vyhláškou č. 397/2016, je uvedena maximální hodnota čísla kyselosti 0,6 mg KOH/ g a maximální hodnota čísla kyselosti pro oleje lisované za studena 4,0 mg KOH/ g.

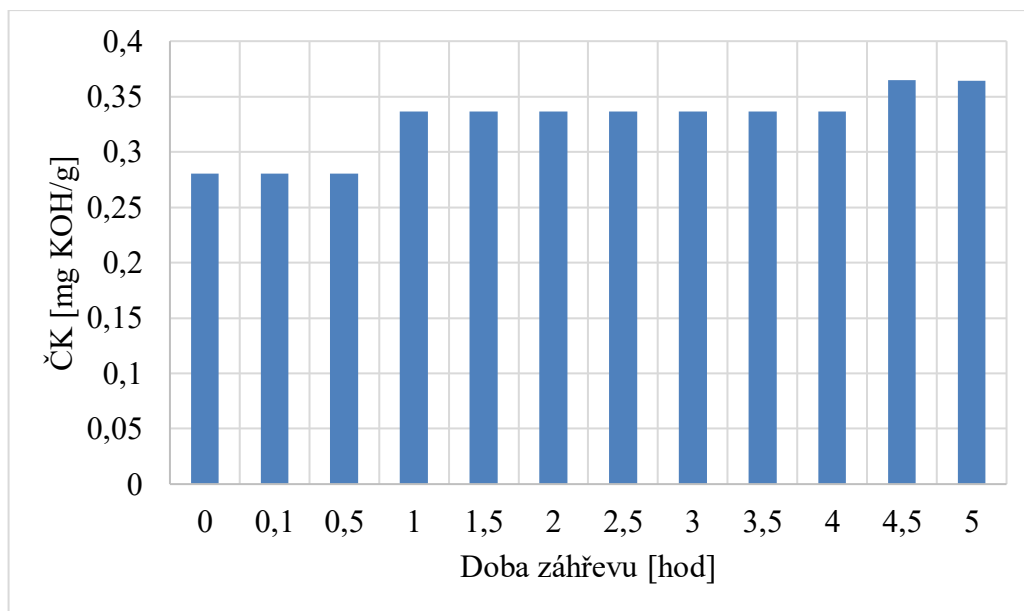
7.3.1 Slunečnicový olej



Obr. 35 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – slunečnicový olej

Z Obr. 35 je patrné, že hodnota čísla kyselosti u nezahřívajícího vzorku (0) činí (po zaokrouhlení) 0,06 mg KOH/ g, tato hodnota rostla až k hodnotě 0,17 mg KOH/g, což je maximální dosažená hodnota u vzorku slunečnicového oleje. Hodnota čísla kyselosti mírně vzrostla s rostoucí dobou záhřevu. Avšak nepřekročila maximální hodnotu danou vyhláškou.

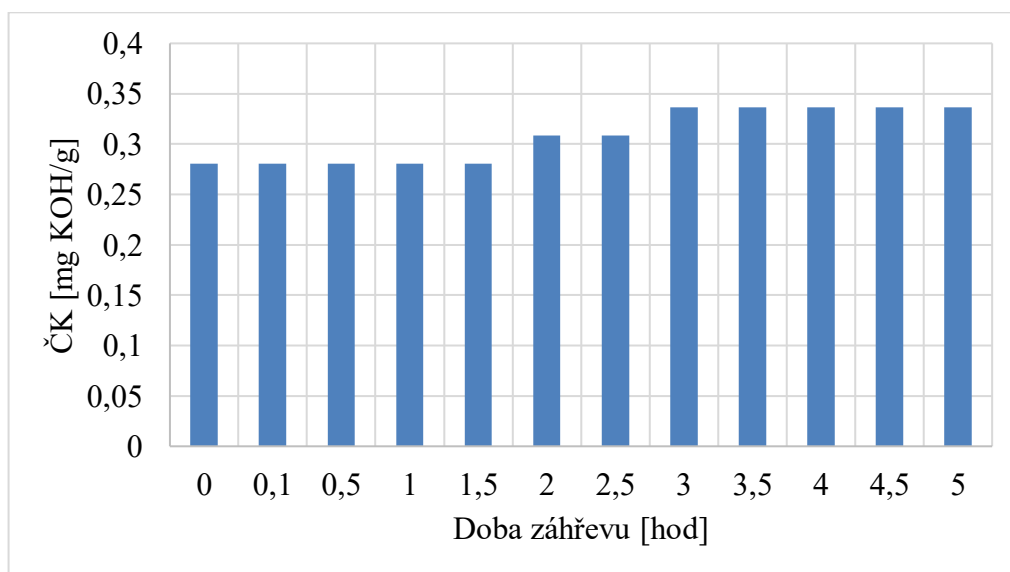
7.3.2 Řepkový olej



Obr. 36 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – řepkový olej

Stejně tak jako slunečnicový olej i řepkový olej splňuje hodnotu uvedenou ve vyhlášce. Maximální hodnota u vzorku řepkového oleje byla 0,36 mg KOH/g a nejmenší hodnota, která byla naměřena opět u nezahřívajícího vzorku (0), činí 0,28 mg KOH/g. Také lze na Obr. 36 pozorovat rostoucí trend čísla kyselosti.

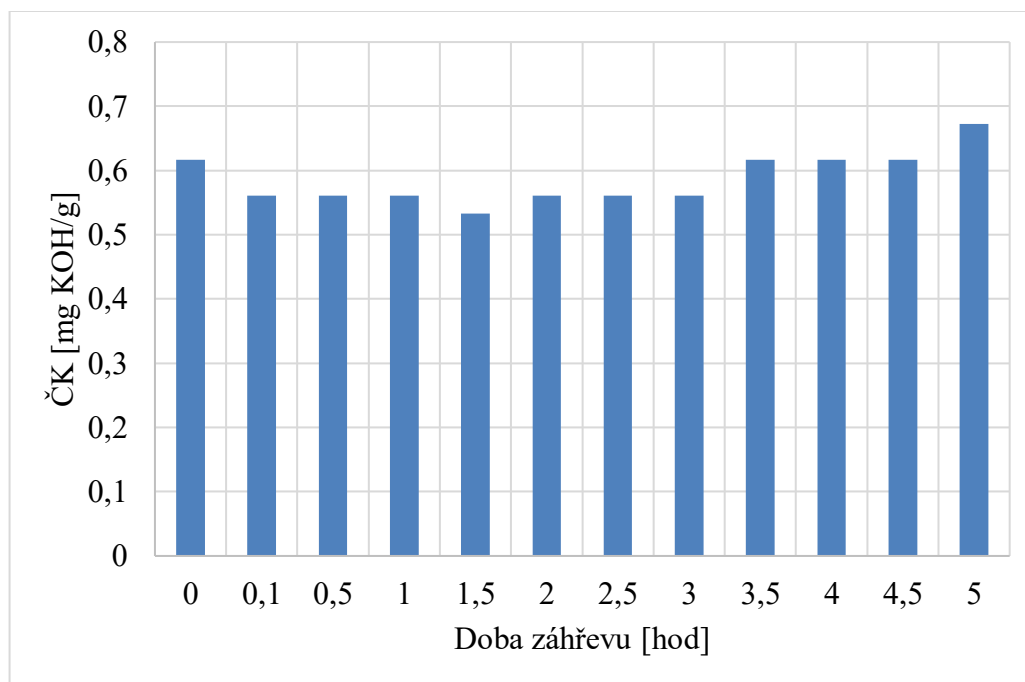
7.3.3 Olivový olej z pokrutin



Obr. 37 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – olivový olej z pokrutin

Maximální dosažená hodnota čísla kyselosti u vzorku olivového oleje z pokrutin byla 0,34 mg KOH/g a to u vzorku, jež byl zahříván po dobu 3 hodin (viz Obr. 37). Hodnota mírně rostla s dobou záhřevu, ale ne nějak razantně. Avšak opět splňuje hodnotu danou vyhláškou.

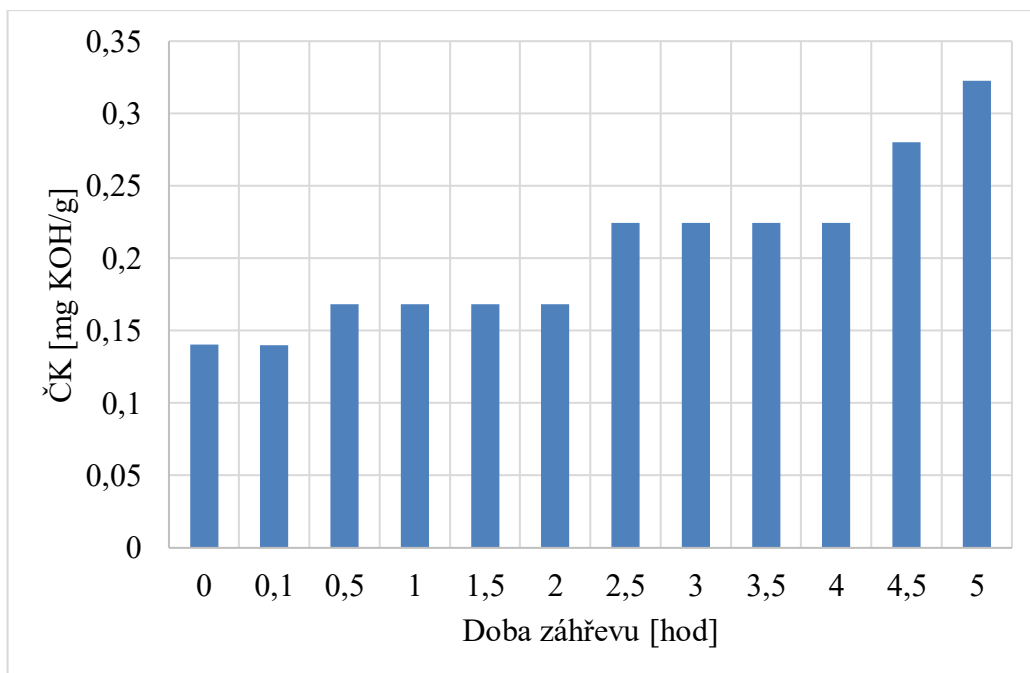
7.3.4 Olivový olej extra panenský



Obr. 38 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – olivový olej extra panenský

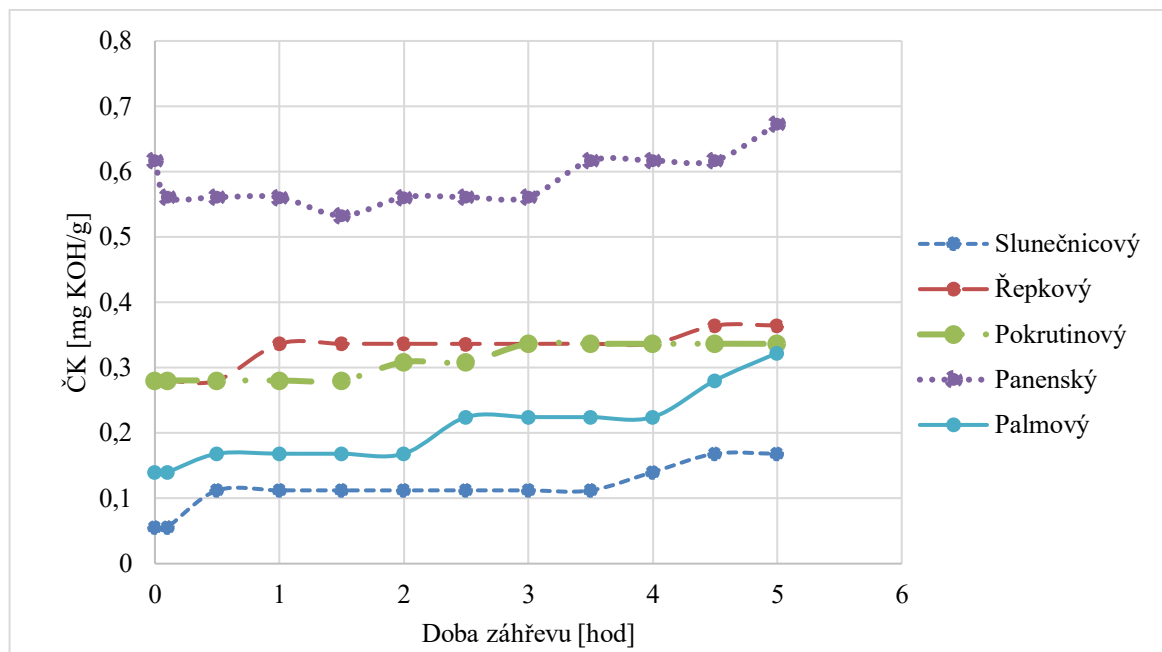
Číslo kyselosti dané toutéž vyhláškou pro oleje lisované za studena je maximálně 0,4 mg KOH/g. Testovaný vzorek olivového oleje extra panenského (viz Obr. 38) tuto hodnotu nespĺňuje ani u vzorku, který nebyl tepelně zatěžován (0). Hodnoty se pohybují v rozmezí od 0,53 mg KOH/g u vzorku 0 až 6,73 mg KOH/g u vzorku 5.

7.3.5 Palmový olej



Obr. 39 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – palmový olej

Jak je patrné z Obr. 39, hodnoty čísla kyselosti pro palmový olej s rostoucí dobou záhřevu mírně roste. Hodnoty začínají na 0,14 mg KOH/g a maximální dosažená hodnota činí 0,32 mg KOH/g. I u tohoto vzorku lze pozorovat rostoucí trend závislosti doby záhřevu na ČK. Vzorek splňuje hodnotu 0,4 mg KOH/g, která je podmíněna vyhláškou.



Obr. 40 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – srovnání všech olejů

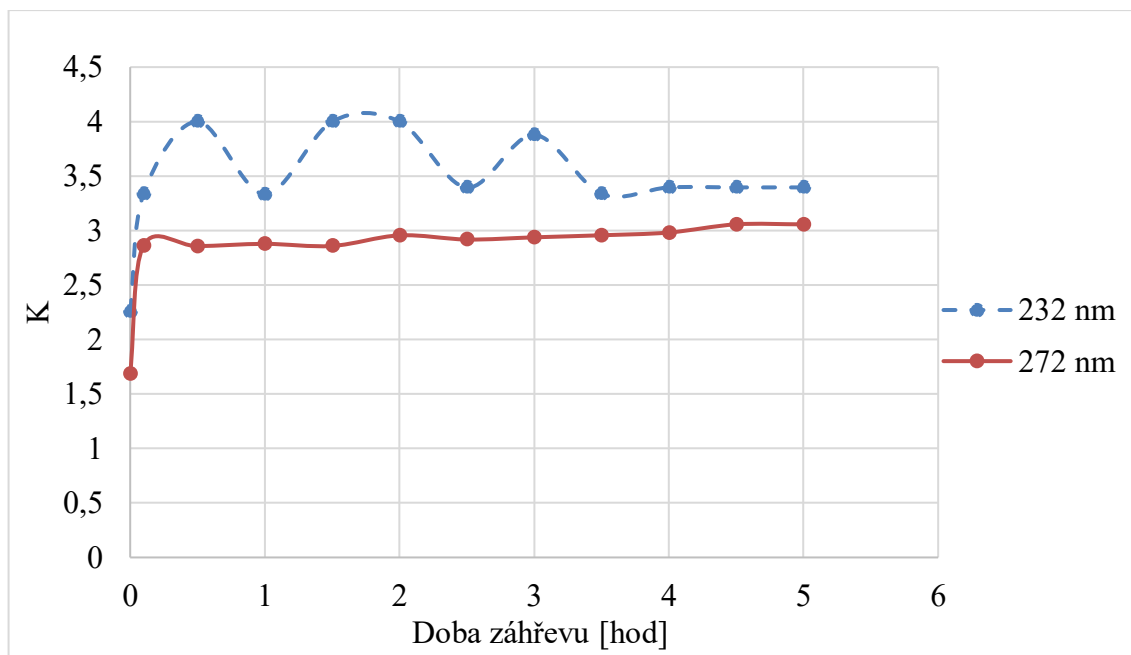
Z Obr. 40, kde lze vidět porovnání všechno vzorků olejů a jejich čísla kyselosti, je patrné, že nejvyšší hodnotu čísla kyselosti měl olivový olej extra panenský (OO), následně řepkový olej (ŘO), olivový olej z pokrutin (OPO), poté palmový olej (PO) a nakonec slunečnicový olej (SO).

7.4 Spektrofotometrické stanovení

Konjugované vazby dienů a trienů, jejichž přítomnost lze zjistit pomocí spektrofotometrického stanovení, vznikají vlivem fixace kyslíku v linolové a linolenové kyselině za vzniku hydroperoxidů [52, 60].

Prováděcí Nařízení Komise (EU) č. 299/2013, kterým se mění nařízení (EHS) č. 2568/91 o charakteristikách olivového oleje a olivového oleje z pokrutin a o příslušných metodách analýzy, stanovuje hodnotu pro olivový olej extra panenský pro $K_{232} \leq 2,50$ a hodnotu $K_{270} \leq 0,22$ a pro olivový olej-olej z pokrutin je určena pouze hodnota $K_{270} \leq 1,70$ [52].

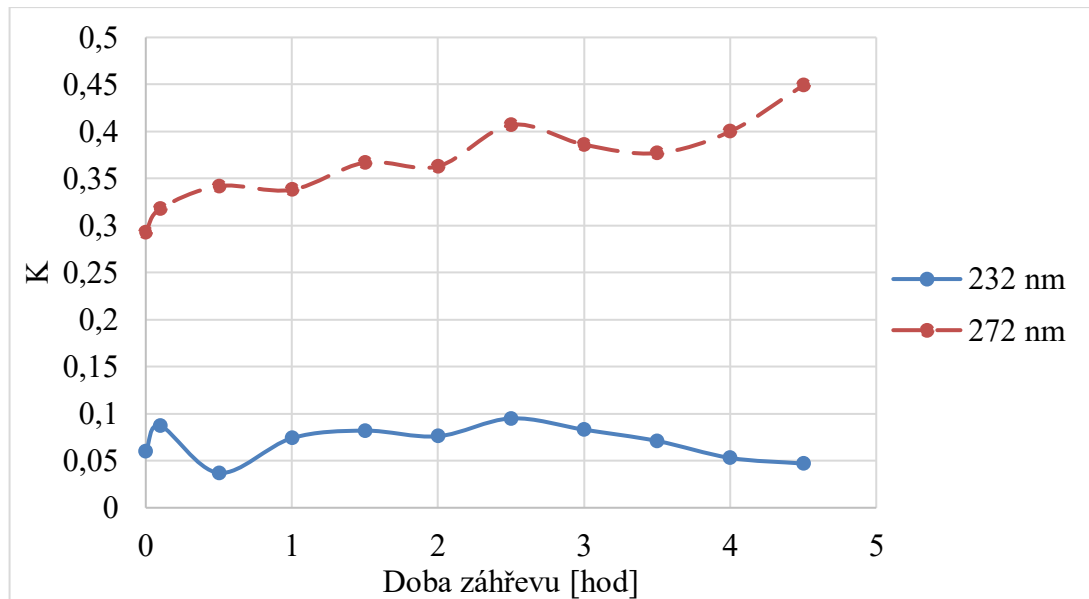
7.4.1 Slunečnicový olej



Obr. 41 Vývoj hodnoty K při 232 a 272 nm pro vzorek slunečnicového oleje

Z Obr. 41 je patrné, všechny vzorky slunečnicového oleje, kromě vzorku, který nebyl vystaven tepelnému záhřevu, přesahovaly hodnotu K_{270} 1,70 danou Nařízením Komise. Vzorek s označením 0 – bez záhřevu dosáhl hodnoty 1,69, ostatní hodnoty byly rozmezí 2,86 – 3,06.

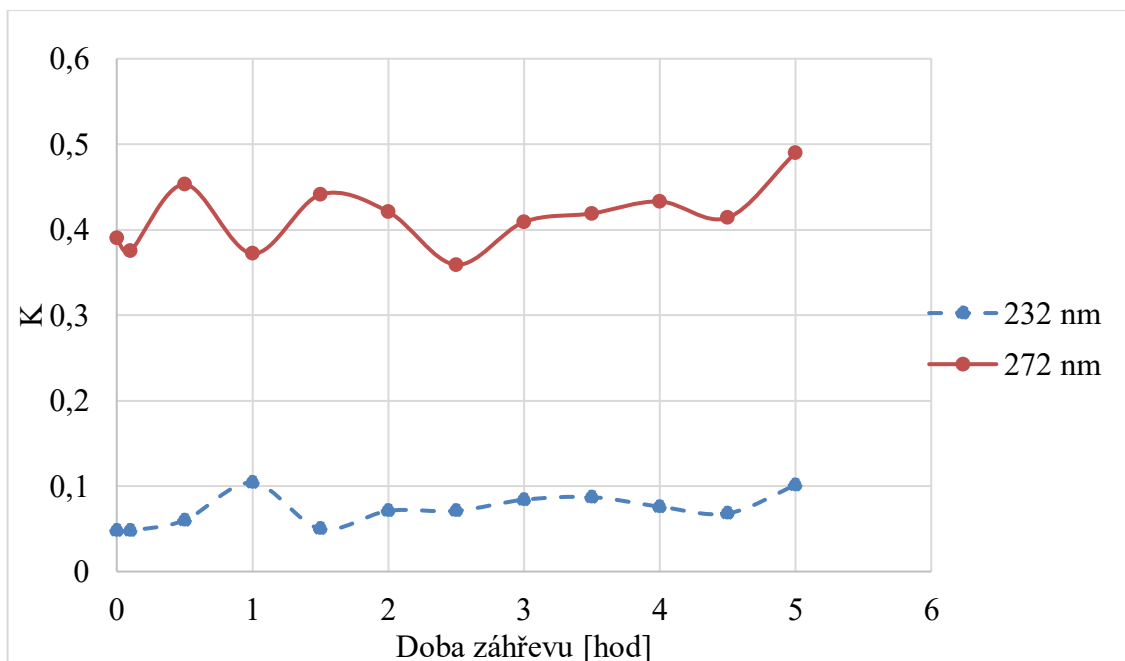
7.4.2 Řepkový olej



Obr. 42 Vývoj hodnoty K při 232 a 272 nm pro vzorek řepkového oleje

Hodnoty K_{272} řepkového oleje se pohybovaly v rozmezí 0,29 – 0,45, tady splňují maxima dané Nařízením Komise. Na Obr. 42 lze vidět, že tyto hodnoty rostou s dobou zahřívání.

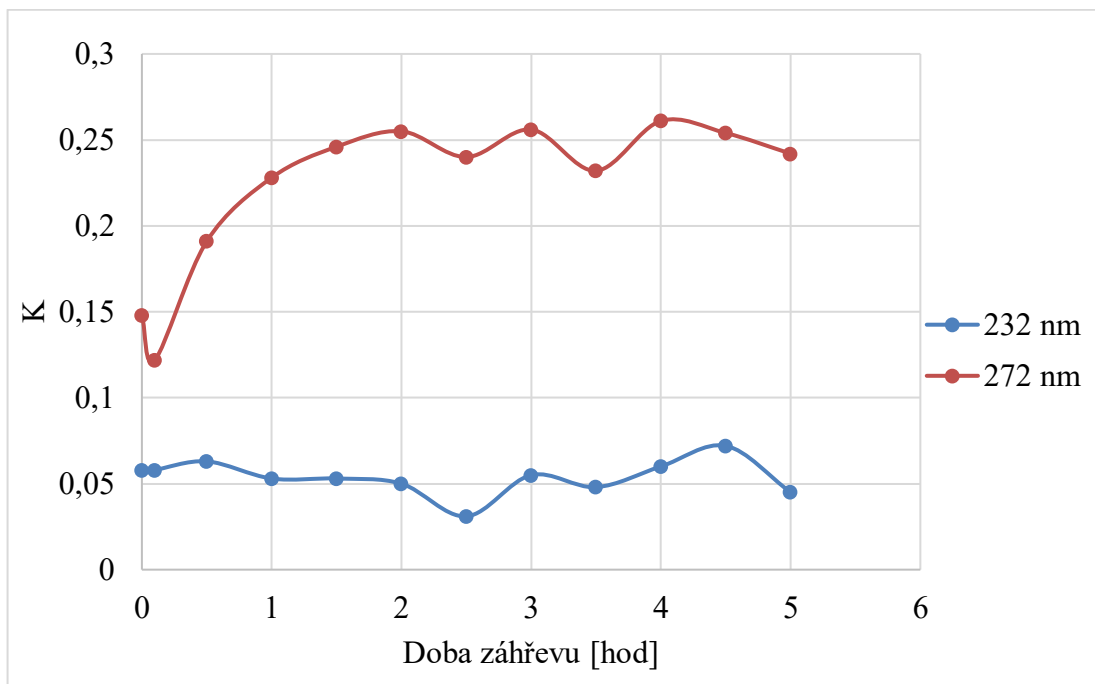
7.4.3 Olivový olej z pokrutin



Obr. 43 Vývoj hodnoty K při 232 a 272 nm pro vzorek olivového oleje z pokrutin

Jak lze z výše uvedeného grafu (Obr. 43) vyčíst, i tento olej, pro který je stanovena přímo hodnota K_{270} 1,70, tuto podmínku splňuje. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,38 až 0,49.

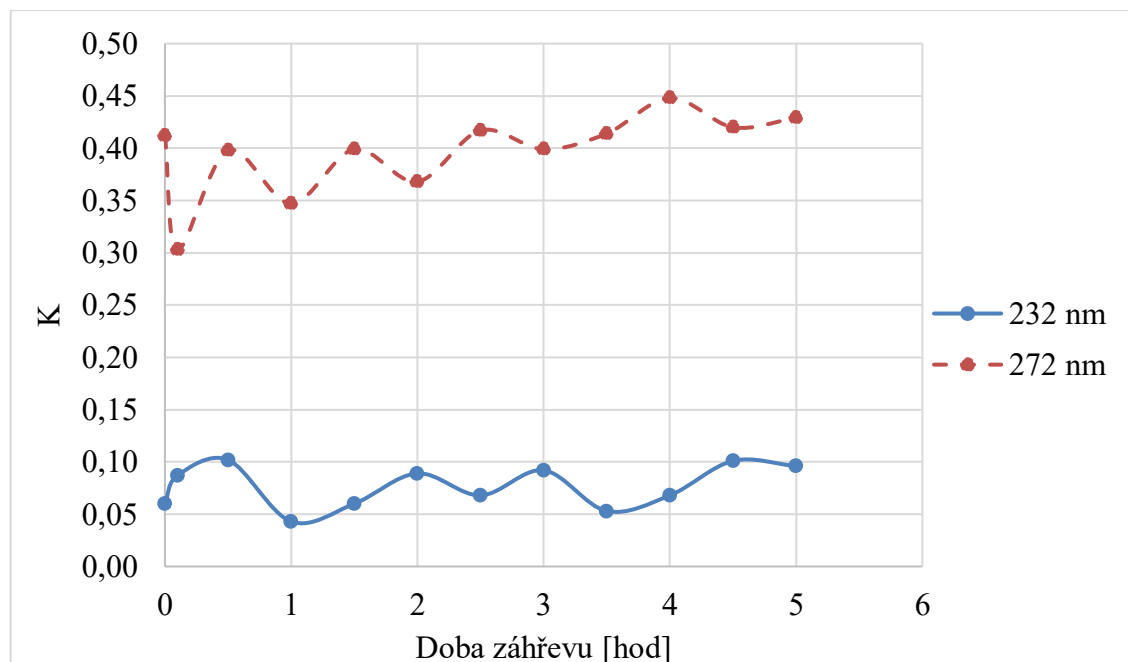
7.4.4 Olivový olej extra panenský



Obr. 44 Vývoj hodnoty K při 232 a 272 nm pro vzorek olivového oleje extra panenského

Hodnoty pro olivový olej extra panenský jsou stanoveny na $K_{232} \leq 2,50$ a hodnotu $K_{270} \leq 0,22$. Hodnoty pro vzorky tohoto oleje (viz Obr. 44) se pro K_{232} nm pohybují v rozmezí od 0,03 až 0,07, v tomto případě splňují danou podmínku. Pro K_{272} nm se pohybují v rozmezí 0,12 až 0,25, tudíž podmíněné hodnotě 0,22 odpovídají pouze první tři vzorky – vzorek 0 (bez záhřevu), 0,1 (vzorek, který právě dosáhl záhřevu na požadovanou teplotu) a 0,5 (vzorek který byl zahříván půl hodiny).

7.4.5 Palmový olej



Obr. 45 Vývoj hodnoty K při 232 a 272 nm pro vzorek palmového oleje

Hodnoty palmového oleje (viz Obr. 45) se pohybovaly v rozmezí hodnot 0,05 – 0,10 pro K_{232} , pro K_{272} je toto rozmezí 0,30 – 0,45. Ani v tomto případě vzorky oleje nepřekročily hodnotu 1,70 danou Nařízením Komise.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověření použitelnosti luminiscenční spektroskopie pro stanovení tepelné degradace jedlých olejů. Vybranými vzorky byl olej slunečnicový, řepkový, olivový olej extra panenský, olivový olej z pokrutin a palmový olej. Jako doplňkové metody pro stanovení míry oxidace vzorků byly vybrány – stanovení peroxidového čísla, čísla kyselosti a stanovení konjugovaných dienů a trienů.

Důvodem pro testování metody luminiscenční spektroskopie je její relativní rychlost, vysoká citlivost a jednoduchost provedení bez nutnosti použití chemických činidel. Což jsou výhody, pro které je tato metoda dnes stále více testována v řadě průmyslových aplikací.

Z grafů luminiscenčních spekter jednotlivých testovaných olejů lze zaznamenat velmi výraznou korelací mezi intenzitou luminiscence při excitační vlnové délce 355 nm a délkou tepelné zátěže testovaného vzorku. U slunečnicového a řepkového oleje se jednalo o pokles intenzity při emisní vlnové délce 420 nm, u olivového oleje z pokrutin je pokles při vlnové délce 440 nm a u palmového oleje při 435 nm. Tento pokles je přisuzován vzniku degradačních produktů oxidace. Naopak u olivového oleje extra panenského byl v této oblasti vlnových délek zaznamenán nárůst intenzity emitovaného světla.

U všech vzorků byl přítomen výrazný pík představující míru vzniklých oxidačních produktů, dále zde byl zaznamenán i malý pík odpovídající vitamínu E. U slunečnicového oleje byl naměřen i pík pro chlorofyl. Nejvyšší míra korelace s délkou tepelné zátěže byla zaznamenána u řepkového oleje pro pík 525 nm, u kterého hodnota korelačního koeficientu R^2 činí 0,9959 a u slunečnicového oleje pro pík 420 nm činí hodnota R^2 0,9932.

Z naměřených hodnot peroxidového čísla je patrný nárůst u olivového oleje extra panenského, jehož hodnoty byly z testovaných vzorků nejvyšší. Naopak nejnižší hodnoty vykazuje olivový olej z pokrutin, avšak tyto hodnoty se s časem také zvyšují. Podobný trend lze pozorovat i u stanovení čísla kyselosti. Naměřená data potvrzují velmi dobrou tepelnou stabilitu u olejů olivového oleje z pokrutin, řepkového, palmového i slunečnicového oleje. Naopak olivový olej extra panenský vykazuje poměrně vysokou oxidaci vlivem záhřevu, tedy nízkou stabilitu vůči tepelnému záhřevu.

Z měření provedených v této studii, ale i z dostupných publikovaných studií je zřejmé, že popis a vysvětlení konkrétních chemických změn, ke kterým v olejích při tepelném stresu dochází, je velmi složité. Nicméně i bez přesné znalosti těchto pochodů lze z dosažených

výsledků konstatovat, že metoda luminiscenční spektroskopie vykazuje velmi dobrou korelaci s dobou tepelné zátěže a bylo by možné použít tuto metodu pro sledování kvality tepelně degradovaných olejů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] O'BRIEN, Richard D. *Fats and oils formulating and processing for applications*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. ISBN 978-142-0061-673.
- [2] HAMM, Wolf., R. J. HAMILTON a Gijis. CALLIAUW. *Edible oil processing* [online]. Second edition. [cit. 2017-04-21]. ISBN 978-1-4443-3684-9.
- [3] DICKINSON, Eric. a D. J. MCCLEMENTS. *Advances in food colloids*. New York: Blackie Academic, 1996. ISBN 07-514-0203-6.
- [4] Obrázek rovnice triacylglycerolu dostupný z <http://www.chem.latech.edu/~deddy/chem121/Lipids.html>.
- [5] BAILEY, Alton Edward a Fereidoon SHAHIDI. *Bailey's industrial oil & fat products: edited by Fereidoon Shahidi*. 6th ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2005. ISBN 9780471384601.
- [6] Obrázek znázornění prostorové konfigurace cis a trans dostupný: <http://docplayer.cz/18611530-Estery-vyssich-mastnych-kyseliny-glyceridy-glycerol-oleje-vosky-alkoholy-s-dlouhym-retezcem-ostatni-cholesterol-aj.html>.
- [7] DAWODU, M. O., G. O. OLUTONA a S. O. OBIMAKINDE. Effect of Temperature on the Chemical Characteristics of Vegetable Oils Consumed in Ibadan, Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2015-10-1, 14, 698-707. DOI: 10.3923/pjn.2015.698.707.
- [8] DANA, D.; SAGUY, I. S., Frying of Nutritious Foods: Obstacles and Feasibility, *Food Sci. Technol. Res.*, 7 (2001), 265-279.
- [9] Obrázek průběhu hydrolyzy dostupný z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/ve-rejne/lekce/2495>.
- [10] MIN, D. B.; SMOUSE, H.; CHANG, S. S., *Flavor Chemistry of Lipid Foods*, The American Oil Chemists Society, USA, 1989, ISBN 0935315241.
- [11] HAJŠLOVÁ, J.; OSTRÝ, V.; RUPRICH, J. a kol., Použití odpadních rostlinných tuků po fritování bramborových lupínků (chipsů) do krmných směsí, Vědecký výbor pro potraviny, VVP: STAN/2003/1/deklas/oleje, 2003.
- [12] SHAHIDI, Fereidoon a Ying ZHONG. Lipid Oxidation: Measurement Methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2005.

- [13] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin I*, OSSIS, Tábor, 1999, ISBN 80-902391-3-7.
- [14] CHOE, E.; MIN, D. B., Chemistry of Deep-Fat Frying Oils, *Journal of Food Science*, Vol. 72, Nr. 5, 2007.
- [15] NIELSEN, S. Suzanne. *Food analysis*. 4th ed. Dordrecht: Springer, 2010. ISBN 978-1-4419-1478-1.
- [16] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [17] BOCKISCH, Michael. *Fats and oils handbook*. Champaign, Ill: AOCS Press, 1998. ISBN 978-160-1197-184.
- [18] MARINA, A. M. et al. Quantitative Analysis of Peroxide Value in Virgin Coconut Oil by ATR-FTIR Spectroscopy. *The Open Conference Proceedings Journal*. 2013, 4, 53 – 56.
- [19] DAMODARAN, S. et al. *Fennema's Food Chemistry*. 2008, UK: CRC Taylor Press, ISBN 08-493-9272-1.
- [20] LABRINEA, E. P. et al. Direct Olive Oil Anisidine Value Determination by Flow Injection. *Analytica Chimica Acta*. 2001, 448, 201 – 206.
- [21] KEALEY, D. a P. J. HAINES. *Analytical Chemistry*. 2002, United Kingdom: BIOS Press, ISBN 1-85996-189-4.
- [22] SIKORSKA, E., A. GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, I. KHMELINSKII a M. SIKORSKI. Synchronous Fluorescence Spectroscopy of Edible Vegetable Oils. Quantification of Tocopherols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, 6988-6994. DOI: 10.1021/jf0507285.
- [23] ZÝKA, Jaroslav. *Analytická příručka*. 4., upravené vyd. Praha: SNTL, 1988, 678, 831.
- [24] LAKOWICZ J., R., Principles of fluorescence spectroscopy, *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, 1999.
- [25] SKOOG, D. A., F. J., HOLLER a S. R. CROUCH. *Principles of instrumental analysis*. 6th ed. / Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, c2007. ISBN 04-950-1201-7.
- [26] PELANT, Ivan a Jan VALENTA. *Luminiscenční spektroskopie*. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1447-0.
- [27] Obrázek schéma Jablonského diagramu: <http://canov.jergym.cz/barva/a/f.html>

- [28] RENDELL, David. a David J. MOWTHORPE. *Fluorescence and phosphorescence spectroscopy*. New York: Published on behalf of ACOL, 1987. Analytical Chemistry by Open Learning. ISBN 978-047-1913-801.
- [29] W.R.G. BAEYENS, D. De KEUKELEIRE, K. KORKIDIS, *Luminescence techniques in chemical and biochemical analysis*, Marcel Dekker, Inc. New York, 1991.
- [30] SLM AMINCO, Technical Note No. 101, Urbana
- [31] DUFOUR, E., a RIAUBLANC, A. Potentiality of spectroscopic methods for the characterisation of dairy products, I — Front-face fluorescence study of raw, heated and homogenised milks. *Le Lait*, 1997, 77, 657 – 670.
- [32] KULMYRZAEV, A., LEVIEUX, D., a DUFOUR, E. Front-face fluorescence spectroscopy allows the characterization of mild heat treatment applied to milk. Relations with the denaturation of milk proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 502 – 507.
- [33] SCHAMBERGER, G. P., a Labuza, T. P. Evaluation of front-face fluorescence for assessing thermal processing of milk. *Journal of Food Science*, 2006, 71, 69 – 74.
- [34] FEINBERG, M., DUPONT, D., EFSTATIOU, T., LOUAORE, V., a GUYONNET, J. P. (2006). Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. *Food Chemistry*, 98, 188 – 194.
- [35] FRENCIA, J. P., THOMAS, E., a DUFOUR, E. Measure of meat tenderness using front face fluorescence spectroscopy. *Science des Aliments*, 2003, 23, 142 – 145.
- [36] EGELANDSDAL, B., DINGSTAD, G., TOGERSEN, G., LUNDBY, F., a LANGSRUD. (2005). Autofluorescence quantifies collagen in sausage batters with a large variation in myoglobin content. *Meat Science*, 69, 35 – 46.
- [37] SKJERVOLD, P. O., TAYLOR, R. G., WOLD, J. P., BERGE, P., ABOUELKARAM, S., CULIOLI, J., et al. (2003). Development of intrinsic fluorescent multispectral imagery specific for fat, connective tissue, and myofibers in meat. *Journal of Food Science*, 68, 1161 – 1168.
- [38] SWATLAND, H. J., NIELSEN, T., a ANDERSEN, J. R. Correlations of mature beef palatability with optical probing of raw meat. *Food Research International*, 1995, 28, 403 – 407.
- [39] GARDNER, H. W. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1979, 27, 220 – 229.

- [40] DUFOUR, E., FRENCIA, J. P., a KANE, E. Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness. *Food Research International*, 2003, 36, 415 – 423.
- [41] OLSEN, E., VEBERG, A., VOGT, G., TOMIC, O., KIRKHUS, B., EKERBERG, D., et al. Analysis of early lipid oxidation in salmon pâté with cod liver oil and antioxidants. *Journal of Food Science*, 2006, 71, 284 – 292.
- [42] POSUDIN, Y. I. (1998). *Lasers in agriculture*. New York: Science.
- [43] ZANDOMENEGHI, M., CARBONARO, L., a CAFFARATA, C. Fluorescence of vegetable oils: Olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 759 – 766.
- [44] ZANDOMENEGHI, M. Fluorescence of cereal flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47, 878 – 882.
- [45] MUNCK, L., NORGAARD, L., ENGELSEN, S. B., BRO, R., a ANDERSSON, C. A. Chemometrics in food science — A demonstration of the feasibility of a highly exploratory, inductive evaluation strategy of fundamental scientific significance. *Chemometric and Intelligent Laboratory Systems*, 1998, 44, 31 – 60.
- [46] SONG, J., DENG, W., a BEAUDY, R. M. Changes in chlorophyll fluorescence of apple fruit during maturation, ripening, and senescence. *Hort Science*, 1997, 32, 891 – 896.
- [47] MOSHOU, D., WAHLEN, S., STRASSER, R., SCHENK, A., DE BAERDEMAEKER, J., a RAMON, H. Chlorophyll fluorescence as a tool for on-line quality sorting of apples. *Biosystems Engineering*, 2005, 91, 163 – 172.
- [48] HAGEN, S. F., SOLHAUG, K. A., BENGTSSON, G. B., BORGE, G. I. A., a BILGER, W. Chlorophyll fluorescence as a tool for non-destructive estimation of anthocyanins and total flavonoids in apples. *Postharvest Biology and Technology*, 2006, 41, 156 – 163.
- [49] DUFOUR, E., LETORT, A., LAGUET, A., LEBECQUE, A., SERRA, J. N.: Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 563: 292–299.
- [50] SIKORSKA, E., GÓRECKI, T., KKHMELENSKII, I.V., SIKORSKI, M., DE KEUKELEIRE, D.: Monitoring beer during storage by fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*, 2006, 96: 632 – 639.

- [51] Obrázek spektrofluorometru: Photon Counting Steady-State Spectrofluorometer Hardware Manual.
- [52] EVROPSKÁ UNIE. Nařízení 299/2013/EU O charakteristikách olivového oleje a o příslušných metodách analýzy. Dostupné z WWW: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:090:FULL:CS:PDF>
- [53] TENA, N., GARCIA-GNONZALEZ, D. L. a APARICIO, R. Evaluation of Virgin Olive Oil Thermal Deterioration by Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 10505-10511, ISSN 1520-5118.
- [54] KONGBONGA, Y. G. M., H. GHALILA, M. B. ONANA, Y. MAJDI, Z. B. LAKHDAR, H. MEZLINI a S. SEVESTRE-GHALILA. Characterization of Vegetable Oils by Fluorescence Spectroscopy. *Food and Nutrition Sciences*. 2011, 02, 692-699 DOI: 10.4236/fns.2011.27095.
- [55] POULLI, K. I., N., V. CHANTZOS, G. A. MOUSDIS a C. A. GEORGIUO. Synchronous Fluorescence Spectroscopy: Tool for Monitoring Thermally Stressed Edible Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57, 8194-8201. DOI: 10.1021/jf902758d.
- [56] GUIMET et al 2005 - SAYAGO, A.; MORALES, M.T.; APARICIO, R. Detection of hazelnut oil in virgin olive oil by a spectrofluorimetric method. *Eur. Food Res. Technol.*, 2004, 218, 480-483.
- [57] KYRIAKIDIS, N.B.; SKARKALIS, P. Fluorescence spectra measurement of olive oil and other vegetable oils. *J. AOAC Int.*, 2000, 83, 1435-1439.
- [58] Berra, B., & Gaspeli, R., *Third International Congress on the Biological Value of Olive Oil, Chania*, 1980, Greece, 427–463.
- [59] PIZARRO, C., ESTEBAN-DIEZ, I., RODRIGUEZ-TECEDOR, S., GONZÁLEZ SAIZ, M., Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application on the stepwise orthogonalisation of predictors to mid-infrared spectra, *Food control*, 2013, s. 158-167.
- [60] Spektrofotometrie, [online]. Dostupné z WWW: <www.liceorodolico.it/articoli/usa09/english-oil.pdf>]

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

NMR	Nukleární magnetická rezonance
NIR	Near-infrared spectroscopy – spektroskopie v blízké infračervené oblasti
PV	Peroxid value – peroxidové číslo
MA	Malondialdehyd
TBA	Thiobarbiturové číslo
UV	Ultrafialová oblast
UHT	Ultra-high temperature
ml	Mililitr
mol/l	Jednotka koncentrace – moly na litr
ČK	Číslo kyselosti
K	Specifická extinkce
hod	Hodina
nm	Nanometr

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Rovnice vzniku triacylglycerolu [4].	13
Obr. 2 Znázornění prostorové konfigurace cis a trans [5].	14
Obr. 3 Průběh hydrolyzy triacylglycerolu [8].	16
Obr. 4 Schéma vzniku barevného komplexu [18].	25
Obr. 5 Princip metody stanovení p-anisidinového čísla [20].	26
Obr. 6 Jablonského diagram [27].	30
Obr. 7 Přístroj PC-1 Photon -counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter [51].	40
Obr. 8 Schéma přístroje PC-1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter [51].	41
Obr. 9 3D mapa řepkového oleje – vzorek 0	45
Obr. 10 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce	46
Obr. 11 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce (přiblížení oblasti kolem 710 nm)	47
Obr. 12 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 420 nm	48
Obr. 13 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 525 nm	48
Obr. 14 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace – pík na 710 nm.	49
Obr. 15 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce	49
Obr. 16 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 420 nm	50
Obr. 17 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 525 nm	51
Obr. 18 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce	51
Obr. 19 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace – pík na 440 nm.	52
Obr. 20 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 520 nm	53
Obr. 21 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce	53
Obr. 22 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 385 nm	54
Obr. 23 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace - pík na 440 nm	55
Obr. 24 Závislost intenzity luminiscence na čase – pík na 470 nm	55
Obr. 25 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace – pík na 525 nm.	56
Obr. 26 Graf závislosti intenzity luminiscence na emisní vlnové délce	56
Obr. 27 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace – pík na 435 nm.	57
Obr. 28 Závislost intenzity luminiscence na čase degradace – pík na 520 nm.	58
Obr. 29 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – slunečnicový olej	60
Obr. 30 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – řepkový olej	61

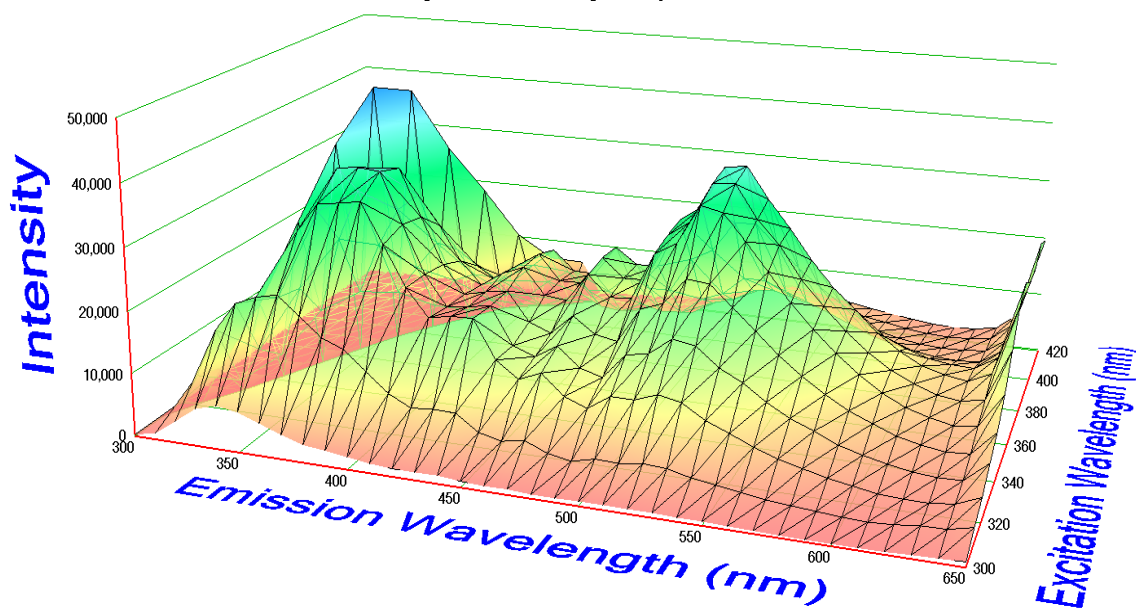
Obr. 31 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – olivový olej z pokrutin	62
Obr. 32 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – olivový olej extra panenský	63
Obr. 33 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – palmový olej	64
Obr. 34 Vliv doby záhřevu na hodnotu PV – porovnání všech vzorků.....	65
Obr. 35 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – slunečnicový olej.....	66
Obr. 36 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – řepkový olej.....	67
Obr. 37 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – olivový olej z pokrutin.....	67
Obr. 38 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – olivový olej extra panenský	68
Obr. 39 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – palmový olej.....	69
Obr. 40 Vliv doby záhřevu na hodnotu ČK – srovnání všech olejů	70
Obr. 41 Vývoj hodnoty K při 232 a 272 nm pro vzorek slunečnicového oleje	71
Obr. 42 Vývoj hodnoty K při 232 a 272 nm pro vzorek řepkového oleje.....	72
Obr. 43 Vývoj hodnoty K při 232 a 272 nm pro vzorek olivového oleje z pokrutin.	72
Obr. 44 Vývoj hodnoty K při 232 a 272 nm pro vzorek olivového oleje extra panenského	73
Obr. 45 Vývoj hodnoty K při 232 a 272 nm pro vzorek palmového oleje	74

SEZNAM PŘÍLOH

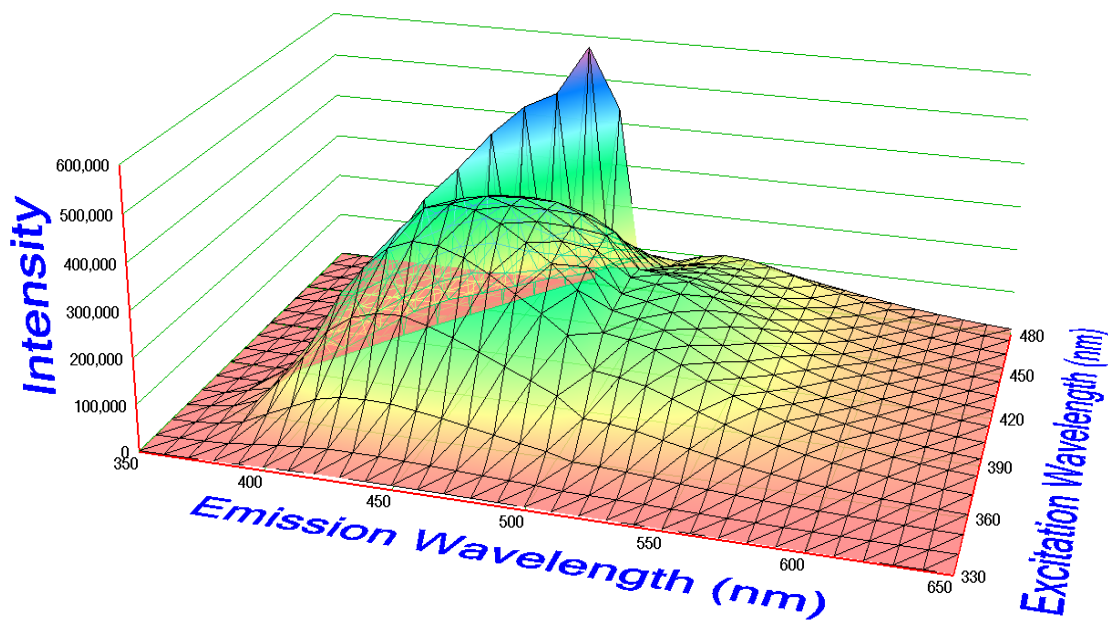
Příloha P I: 3D mapy luminiscence extra panenského olivového oleje, palmového oleje

Příloha PII: 3D mapy luminiscence olivového oleje z pokrutin, slunečnicového oleje

PŘÍLOHA P I: 3D MAPY LUMINESCENCE

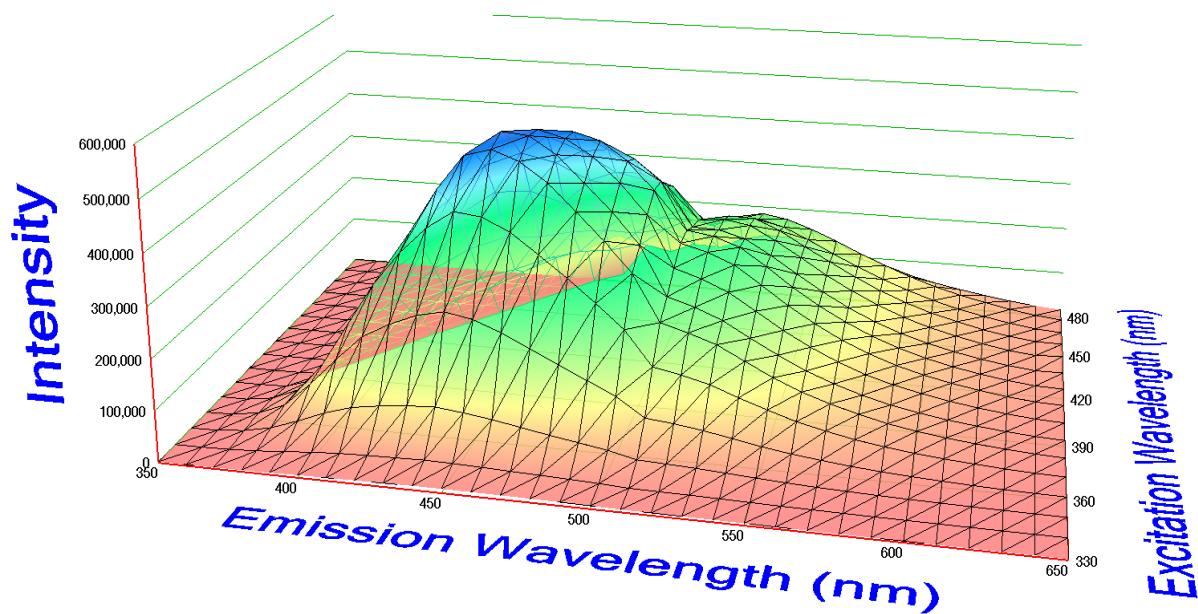


3D mapa olivového oleje extra panenského – vzorek 0

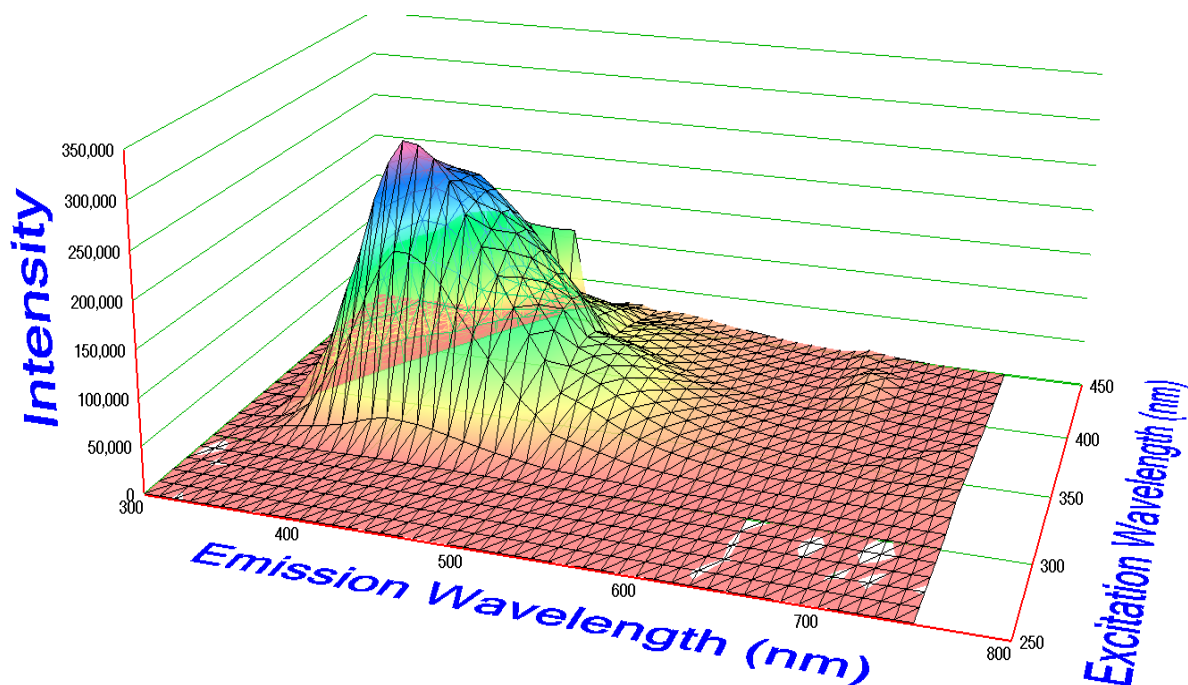


3D mapa palmového oleje – vzorek 0

PŘÍLOHA P II: 3D MAPY LUMINESCENCE



3D mapa olivového oleje z pokrutin – vzorek 0



3D mapa slunečnicového oleje – vzorek 0