

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Praha, 2019

Mgr. Martin Jaček

**Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta**

Studijní program: **Biomedicína**
Studijní obor: **Biochemie a patobiochemie**



Dizertační práce

Využití plynové chromatografie pro stanovení mastných kyselin a některých xenobiotik

The use of a gas chromatography for determination of fatty acids and certain xenobiotics

Školitel: prof. RNDr. Ing. Petr Tůma. Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29. 11. 2019

Mgr. Martin Jaček

Identifikační záznam:

JÁČEK, Martin. *Využití plynové chromatografie pro stanovení mastných kyselin a některých xenobiotik. [The use of a gas chromatography for determination of fatty acids and certain xenobiotics]*. Praha, 2019. Počet stran 128, počet příloh 3. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav hygieny – oddělení analytických metod. Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Ing. Petr Tůma, Ph.D.

Klíčová slova v ČJ:

mastné kyseliny, mononenasyčené mastné kyseliny, nasycené mastné kyseliny, plynová chromatografie, polynenasycené mastné kyseliny, spojené kolony, trans mastné kyseliny, vegani

Klíčová slova v AJ:

coupled column, fatty acids, gas chromatography, monounsaturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, saturated fatty acids, trans fatty acids, vegans

Poděkování

V úvodu této práce bych rád poděkoval všem, kteří mi byli nápomocni při mém postgraduálním studiu a to zejména prof. RNDr. Ing. Petru Tůmovi, Ph.D., který mi byl oporou a rádcem při experimentální činnosti a jako zkušený lodivod mě provedl nástrahami vědeckého publikování. Zároveň se velkou měrou zasloužil o vybroušení mé hrubě otesané disertační práce v tento svazek.

Dále děkuji všem vedoucím, ale i ostatním spolupracovníkům z výzkumných projektů OMEGA a VEGGIE, na kterých jsem se podílel a bez jejichž vzorků a finančního zaštitění uvedenými institucemi by tato práce nemohla vzniknout.

Děkuji též všem svým kolegům, ať už z Ústavu biochemie či z Ústavu hygieny, a nejbližším kolegům, kterými jsou Blanka Sommerová a RNDr. Jana Faulnerová Matějčková, Ph.D., za cenné rady a duševní podporu. Také děkuji prof. RNDr. Evě Samcové, CSc., za přátelskou atmosféru a vytvoření kolektivu, jehož jsem byl členem.

V neposlední řadě děkuji i své rodině za trpělivost a čas, který jsem studiu a práci mohl věnovat.

Obsah

Seznam zkratek	8
Seznam symbolů	12
Abstrakt.....	14
Abstract.....	14
1 ÚVOD	16
1.1 Struktura přístroje	19
1.2 Kolony pro GC.....	20
1.3 Teoretické principy chromatografie.....	23
1.3.1 Parametry z chromatogramu	24
1.3.2 Teoretická účinnost a mobilní fáze pro GC	27
1.3.3 Reálná účinnost separace	31
1.3.4 Identifikace látek.....	32
1.3.5 Kvantifikace.....	34
1.3.6 Polarita stacionární fáze.....	35
1.4 Mastné kyseliny	37
1.4.1 SCFA (Short Chain Fatty Acids).....	37
1.4.2 MCFA (Medium Chain Fatty Acids).....	38
1.4.3 LCFA (Long Chain Fatty Acids).....	40
1.4.4 TFA (Trans Fatty Acids).....	44
1.4.5 MUFA (Monounsaturated Fatty Acids).....	45
1.4.6 PUFA (Polyunsaturated Fatty Acids)	46
1.4.6.1 PUFA versus CVD.....	46
1.4.6.2 PUFA versus NAFLD.....	47
1.4.6.3 PUFA versus MetS a T2D	48
1.4.6.4 PUFA versus nervová tkáň	49
1.4.6.5 PUFA versus zánět a zánětlivá onemocnění.....	50
1.4.7 Degradace a syntéza FA	52
1.4.8 Zdroje omega-3 FA.....	54
1.4.9 Monitorování nedostatku n-3 a n-6 PUFA	56
2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	58

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	59
3.1 Přístroje.....	59
3.2 Použité chemikálie.....	59
3.3 Derivatizace FA.....	60
3.4 Syntéza izomerů C18:1 pro identifikaci.....	60
3.5 SPE extrakce cis/trans izomerů.....	62
3.6 Příprava kalibračních roztoků.....	62
3.7 Příprava interních standardů.....	63
3.8 Studie OMEGA – parametry souboru.....	64
3.9 Odběr krve pro studii OMEGA a VEGGIE.....	65
3.10 Extrakce fosfolipidů z krevních buněk.....	65
3.11 Studie VEGGIE-2 – parametry souboru.....	66
3.12 Stanovení volných mastných kyselin (FFA).....	66
3.13 Odběr tukové tkáně pro studii VEGGIE-2.....	67
3.14 Studie zastoupení TFA v mateřském mléce.....	67
3.14.1 Odběr vzorků mateřského mléka.....	67
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	70
4.1 Metoda pro stanovení základního profilu FA.....	70
4.2 Metoda pro stanovení volných mastných kyselin.....	73
4.3 Studie OMEGA.....	75
4.4 Studie VEGGIE-2.....	82
4.5 Vytvoření teplotního programu pro spojené kolony.....	88
4.5.1 Příprava izomerů C18:1.....	93
4.6 Analýza TFA v tukové tkáni veganů a omnivorů.....	98
4.7 Stanovení zastoupení TFA v mateřském mléce.....	102
5 ZÁVĚR	105
6 LITERATURA	107
Příloha 1.....	129
Příloha 2.....	136
Příloha 3.....	144

Seznam zkratek

ALA	alfa-linolenová kyselina
ALT	alaninaminotransferáza
ANOVA	analýza rozptylu
ARA	arachidonová kyselina
ARF	průměrný odezvoový faktor
AST	aspartátaminotransferáza
AT	tuková tkáň
AV	Akademie Věd
BCAA	rozvětvené aminokyseliny
BMI	“ <i>body mass index</i> ”
CoA	koenzym A
COX	cyklooxygenáza
CVD	kardiovaskulární onemocnění
CYP450	cytochrom P450
DE	diethyléter
DGAT	diglyceridacyltransferáza
DHA	dokosahexaenová kyselina
DHET	dihydroxyeikosatrienová kyselina
DM	„ <i>Diabetes mellitus</i> “
ECL	ekvivalent uhlovodíkového řetězce
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EET	epoxyeikosatrinová kyselina
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
Elovl	elongáza velmi dlouhých mastných kyselin
EPA	eikosapentaenová kyselina
FA	mastná(é) kyseliny
FABP	protein vážící mastnou kyselinu
FADS	desaturáza mastných kyselin
FAME	methyl estery mastných kyselin

FAS	syntáza mastných kyselin
FAT	translokáza mastných kyselin
FATP	protein transportující mastnou kyselinu
FCL	frakční délka řetězce
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FEV	faktor efektivity výkrmu
FFA	volné (neesterifikované) mastné kyseliny
FID	plamenově ionizační detektor
GC	“ <i>gas chromatograph(y)</i> ”
GGT	gama-glutamyltransferáza
GLC	“ <i>gas-liquid chromatography</i> ”
GLUT	glukózový transportér
GPR	receptor spřažený s G-proteinem
GRAS	obecně považované za bezpečné
GSC	“ <i>gas-solid chromatography</i> ”
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HETE	hydroxyeikosatetraenová kyselina
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra
HOMA-index	homeostatický index
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HUFA	vysoce nenasycené mastné kyseliny
IDF	Mezinárodní diabetická federace
IGT	porušená glukózová tolerance
IL	iontová kapalina
IL-	interleukin
IR	inzulínová rezistence
LA	linolová kyselina
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LCPUFA	polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
LOD	mez detekce

LOQ	mez stanovitelnosti
LOX	lipoxygenáza
LT	leukotrieny
LX	lipoxiny
OA	kyselina olejová
Mar	maresíny
MCFA	mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem
Me-Hg	methyl rtuť
MetS	metabolický syndrom
MS	hmotnostní detektor
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
NAFLD	nealkoholická jaterní steatóza
NASH	nealkoholická steatohepatitída
NF	nukleární faktor
NPD	dusíko-fosforový detektor
NPD1	neuroprotektin
PD	protektin
PE	petroléter
PEG	polyethylenglykol
PG	prostaglandiny
PHVO	částečně hydrogenované rostlinné oleje
PN	číslo polarity
PTFE	polytetrafluoroethylen (teflon)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RBC	erytrocyty
RF	odezvodový faktor
RI	retenční index
ROS	reaktivní kyslíkové druhy
Rv	resolvíny
SCD	stearyl-koenzym A desaturáza
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem

SFA	nasyčené mastné kyseliny
SN	separační číslo
SPE	extrakce na tuhou fázi
T2D	diabetes 2. typu
TAG	triacylglycerol
TFA	trans mastné kyseliny
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TLR	“ <i>toll like receptor</i> ”
TX	tromboxany
TZ	„ <i>trennzahl</i> “ = separační číslo
UK	Univerzita Karlova
VLCF	mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická
WAX	polyethylenglykol
WHO	Světová zdravotnická organizace

Seznam symbolů

$[S]_{mf}$	koncentrace v mobilní fázi
$[S]_{sf}$	koncentrace ve stacionární fázi
A	plocha píku
A_{FA}	plocha píku mastné kyseliny
A_{IS}	plocha píku interního standardu
A_S	faktor symetrie
d_f	tloušťka filmu stacionární fáze [μm]
h	výškový ekvivalent teoretického patra (HETP)
h_{min}	minimální výška teoretického patra
I_{sq}	retenční index skvalenu
I_{ti}	retenční index testované látky
I_x	retenční index
k	změna retence
k	retenční faktor
K_D	distribuční konstanta
L	délka kolony [m]
m_{FA}	množství (hmotnost) mastné kyseliny [μg]
m_{IS}	množství (hmotnost) interního standardu [μg]
n	počet teoretických pater
N	efektivní počet pater
$n_{C,x}$	počet uhlíků sledované látky
P_{sf}	celková polarita stacionární fáze
r	průměr kolony [mm]
R	rozlišení
T	termodynamická teplota [K]
T_i	„ <i>tailing</i> “ faktor
t_M	mrtvý čas [min]
t_R	retenční čas [min]
t'_R	redukovaný retenční čas [min]
\bar{u}	lineární průtoková rychlost [cm/s]

\bar{u}_{opt}	optimální lineární průtoková rychlost [cm/s]
w_b	šířka píku při základně [min]
w_h	šířka píku v polovině jeho výšky [min]
w_i	šířka píku v inflexním bodě [min]
A	separační faktor (selektivita)
B	fázový poměr
ΔI	rozdíl retenčních indexů
σ	rozptyl

Abstrakt

Předložená dizertační práce se zabývá využitím plynové chromatografie (GC) pro stanovení mastných kyselin (FA) v klinických vzorcích a studiem vlivu FA na vznik a prevenci vybraných onemocnění. Práce je zaměřena na metabolismus FA s ohledem na esenciální FA a vysoce prospěšné polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) ze skupiny omega-3, jako je kyselina eikosapentaenová (EPA) a dokosahexaenová (DHA), kterých je ve stravě západní populace nedostatek. V experimentální části se zabývá vývojem GC metod pro stanovení FA ve formě jejich methylesterů, a jejich využitím pro analýzu vzorků z intervenční klinické studie OMEGA a VEGGIE-2. Studie OMEGA je zaměřena na inkorporaci prospěšných omega-3 PUFA do potravního řetězce prostřednictvím mikrořas syntetizujících EPA a lněného semínka obsahujícího hlavně α -linolenovou kyselinu. Z těchto zdrojů byla připravena směs pro výkrm drůbeže a následně získaná vejce a kuřecí maso obohacené o omega-3 FA bylo použito jako surovina pro přípravu stravy. Po 8 týdenní dietní intervenci provedené na zdravých dobrovolnících byl nalezen statisticky významný nárůst v zastoupení DHA v erythrocytech, který činil 4,4 % před a 5,1 % po dietní intervenci u testovací skupiny. Zjištěný omega-3 index vykazoval také nárůst z 5,1 % na 5,8 % u testovací a z 5,3 % na 5,8 % u kontrolní skupiny. V rámci druhé studie VEGGIE-2 byl monitorován celkový profil FA u veganů jako modelové skupiny pro studium dietních faktorů s vlivem na inzulínovou rezistenci jako je intervence aminokyselinami s rozvětveným postranním řetězcem. Studie prokázala, že plazmatické hladiny omega-3 FA s delším řetězcem jsou u veganů sníženy z důvodu vyjmutí jejich hlavních zdrojů z diety a pomalé endogenní syntéze. Současně byla u veganů provedena detailní analýza *cis/trans* izomerů FA v tukové tkáni pomocí nově vyvinuté GC separace na dvou spojených stometrových kolonách. Analýzy ukázaly, že vegani mají srovnatelnou hladinu kyseliny elaidové 1 mg/g versus 1,2 mg/g u omnivorů a 3krát nižší hladinu kyseliny *trans*-vakcenové 0,4 mg/g versus 1,5 mg/g. Celková suma všech *trans* izomerů mastných kyselin (TFA) je 4,6 mg/g u veganů a 7,7 mg/g u omnivorů. Vegani mají také výrazně vyšší hladinu Σ PUFA s 92% zastoupením kyseliny linolové, a její koncentrace je 2krát vyšší v porovnání s omnivory. Závěrem byla vytvořená metoda aplikována pro stanovení TFA v mateřském mléce se stanovenou hladinou celkových TFA $0,9 \pm 0,27$ %, která je 3 - 4krát nižší než hodnota zjištěná na našem pracovišti v obdobné studii v roce 2007.

Abstract

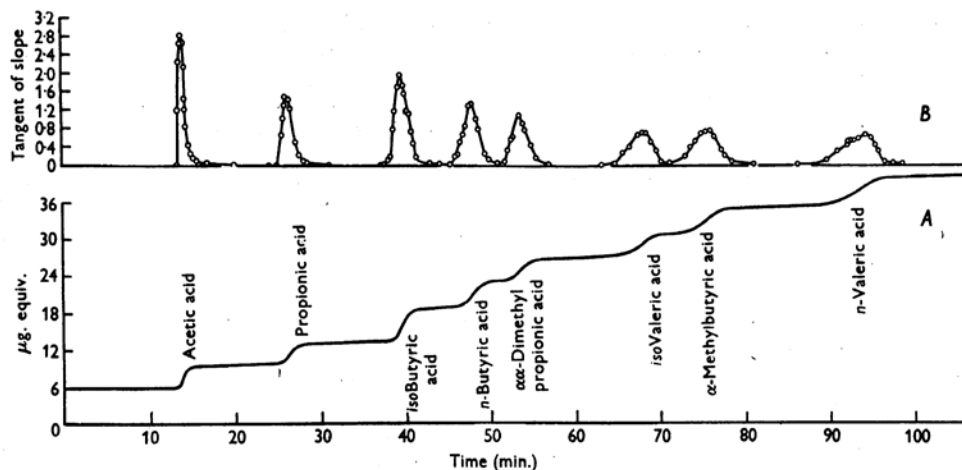
The submitted thesis is concerned with the use of gas chromatography (GC) to determine fatty acids (FA) in clinical samples and study of the effect of FA on the occurrence and prevention of selected diseases. The work is focused on FA metabolism in relation to essential FA and highly beneficial polyunsaturated fatty acids (PUFA) of the omega-3 group, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are insufficiently represented in the nutrition of western populations. The experimental part is concerned with the development of GC methods for determining FA as their methyl esters and their use for analysis of samples in intervention clinical studies of OMEGA and VEGGIE-2. The study of OMEGA concentrates on the incorporation of beneficial omega-3 PUFA into the food chain through microalgae synthesizing EPA and linseed containing mainly α -linolenic acid. These sources were employed to prepare a mixture for feeding poultry and the obtained eggs and chicken meat enhanced in omega-3 FA were used as ingredients for preparing food. Following 8-week dietary intervention performed on healthy volunteers, a statistically significant increase was found in the content of DHA in erythrocytes, equal to 4.4 % before and 5.1 % after the dietary intervention in the test group. The determined omega-3 index also exhibited an increase from 5.1 % to 5.8 % in the tested group and from 5.3 % to 5.8 % in the control group. In the second study VEGGIE-2, the overall FA profile was monitored in vegans as a model group for studying dietary factors affecting insulin resistance, such as intervention by amino acids with branched side chains. The study demonstrated that the plasmatic levels of omega-3 FA with longer chains are reduced in vegans because of elimination of their main source from the diet and slow endogenic synthesis. Simultaneously, a detailed analysis of FA *cis/trans* isomers in fat tissue was performed amongst vegans using the newly developed GC separation on two connected hundred-metre columns. The analyses demonstrated that vegans have a comparable level of elaidic acid of 1 mg/g compared to 1.2 mg/g amongst omnivores and a 3-fold lower level of *trans*-vaccenic acid of 0.4 mg/g compared to 1.5 mg/g. The total sum of all the *trans* fatty acid isomers (TFA) is 4.6 mg/g amongst vegans compared to 7.7 mg/g amongst omnivores. Vegans also have substantially higher levels of Σ PUFA, with 92% content of linoleic acid, and their concentration is twice as high as for omnivores. In conclusion, the developed method was employed for determining TFA in breast milk with a determined level of total TFA of $0.9 \pm 0.27\%$, which is 3-4 times lower than the value determined at our workplace in a similar study in 2007.

1 ÚVOD

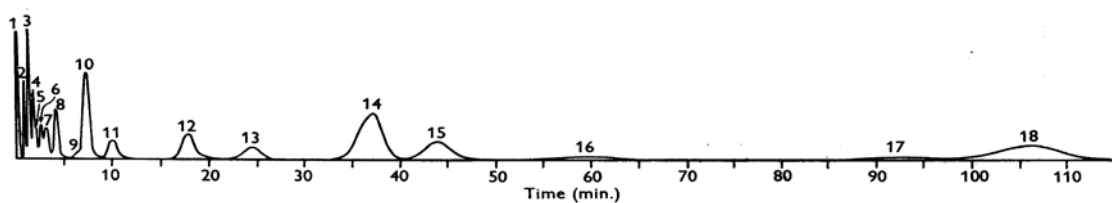
Plynová chromatografie (GC) je fyzikálně-chemická separační metoda používaná k analýze směsí látek v plynném stavu. Obecným principem chromatografických technik je rozdělování látky mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je stacionární (kapalná či pevná) a druhá je mobilní (plynná či kapalná). Každá separovaná látka má pak v ideálním případě rozdílný poměr zastoupení v mobilní a stacionární fázi a opouští separační prostředí (kolonu) v rozdílném retenčním čase. Retenční čas je tedy kvalitativní informací identifikující jednotlivé látky a plocha či výška píku (z angl. „*peak*“) získaného z časového průběhu signálu z detektoru je kvantitativní informací závislou na množství látky.

Objev chromatografie se datuje do roku 1903, kdy ji v průběhu své přednášky na Varšavské univerzitě představil botanik ruského původu M. S. Tswett, jako techniku pro separaci jednotlivých složek chlorofylu. Samotný termín „chromatografie“ byl Tswetem použit až v jeho publikaci z roku 1906 [1]. Často se uvádí, že základ tohoto slova je z řeckých slov „*chroma*“ (barva) a „*graphein*“ (psát). Tedy „psátí barvou“, což dokumentuje separaci zmíněných pigmentů na koloně naplněné uhlíčitánem vápenatým. Druhé vysvětlení zmiňuje ve svém článku Leslie S. Ettre a spočívá v příjmení autora. Jelikož „*Tsvet*“ znamená v ruštině „barvu“, jde vlastně o „Tswettovo psaní“ a jméno vynálezce metody se tak přeneseně stalo součástí jejího názvu. Tswettovi práce z roku 1906 a 1910 položili základy kapalinové adsorpční chromatografie. Možnost separace látek v plynném skupenství se objevila mnohem později. Jako objevitelé plynové chromatografie jsou nejčastěji citováni autoři Martin a Synge, díky svému článku z roku 1941 týkajícího se objevu kapalinové rozdělovací chromatografie [2]. Autoři v něm zmínili, že mobilní fází může být těž plyn a těkavé sloučeniny mohou být separovány na koloně, kterou tento „permanentní“ plyn protéká. Za objev rozdělovací chromatografie byli oba autoři v roce 1952 oceněni Nobelovou cenou. Nicméně jak ve své knize „*Chapters in the Evolution of Chromatography*“ uvádí L. S. Ettre [3], zhruba ve stejné době mnoho dalších autorů publikovalo práce zabývající se adsorpcí látek na tuhou fázi, tedy tzv. „*gas solid chromatography*“ (GSC). Jedním z nich je Hesse et al. popisující ve své práci z roku 1941 separaci par bromu a jodu v koloně naplněné škrobem s CO₂ jako mobilní fází provázenou vznikem barevných zón těchto substancí [4]. V následujícím

článku z roku 1942 je představena separace methylesterů mastných kyselin, které se nepodařilo oddělit destilací, a to na koloně naplněné silikagelem opět s CO₂ jako mobilní fází [5]. Další příklady adsorpční chromatografie, ale v jiných uspořádáních a často za jiným než analytickým účelem jsou shrnuty v review „*Early stages in history of gas chromatography*“ [6]. První publikovaná zmínka týkající se plynové rozdělovací chromatografie (GLC) pochází z roku 1952, kde autoři James a Martin provedli chromatografickou separaci těkavých mastných kyselin v plynné fázi za použití kolony obsahující křemelinu s 10% roztokem kyseliny stearové v silikonovém oleji označeném DC550 [7]. Jako mobilní fáze byl použit dusík a separována byla směs obsahující 8 karboxylových kyselin od kyseliny octové až po kyselinu valerovou. Chromatogram získaný z této analýzy a publikovaný v citovaném článku je na Obr. 1. V článku je též popsána separace dalších nasycených mastných kyselin, C6 - C12. Retenční čas kyseliny dodekanové byl 817 minut, jelikož její teplota varu (225 °C při 40 mm Hg) byla už příliš vzdálená použité teplotě kolony, tj. 137 °C a použitý detektor neumožňoval její zvýšení. V roce 1955 proto stejní autoři představili nový typ detektoru nazvaný „*gas-density meter*“, pracující na stejném principu jako dnešní tepelně vodivostní detektor [8]. Ve stejném roce publikovali článek dokumentující použití nového detektoru při analýze mastných kyselin, nyní už v derivatizované podobě ve formě methylesterů a to pro kyseliny C1 - C18 [9]. Jeden z chromatogramů získaných při analýze methylesterů mastných kyselin z článku Jamese a Martina je na Obr. 2. Vzniklé methylestery jsou těkavější, jejich zóny v koloně a tedy i výsledné píky při jejich detekci jsou výrazně užší. Zároveň dochází ke zkrácení času analýzy, což je nezbytné pro analýzu delších mastných kyselin a zlepšení tvaru jejich píků. Esterifikace či transesterifikace různými činidly s následnou analýzou na plynovém chromatografu (GC) se postupně stala zlatým standardem pro analýzu mastných kyselin přetrvávající do dnešních dnů. Prvotní detektory byly vystřídány o několik řádů citlivějším plamenově ionizačním detektorem (FID) přinášejícím největší lineárně dynamický rozsah a majícím stále poměrně jednoduchou konstrukci. V posledních 10 - 15 letech je velmi rozšiřován selektivnější hmotnostní detektor (MS), umožňující identifikovat sloučeninu nejen dle jejího retenčního času, ale též dle její molekulové hmotnosti a jejího fragmentového spektra. Nicméně cena přístroje GC-MS v porovnání s GC-FID je minimálně čtyřnásobná.



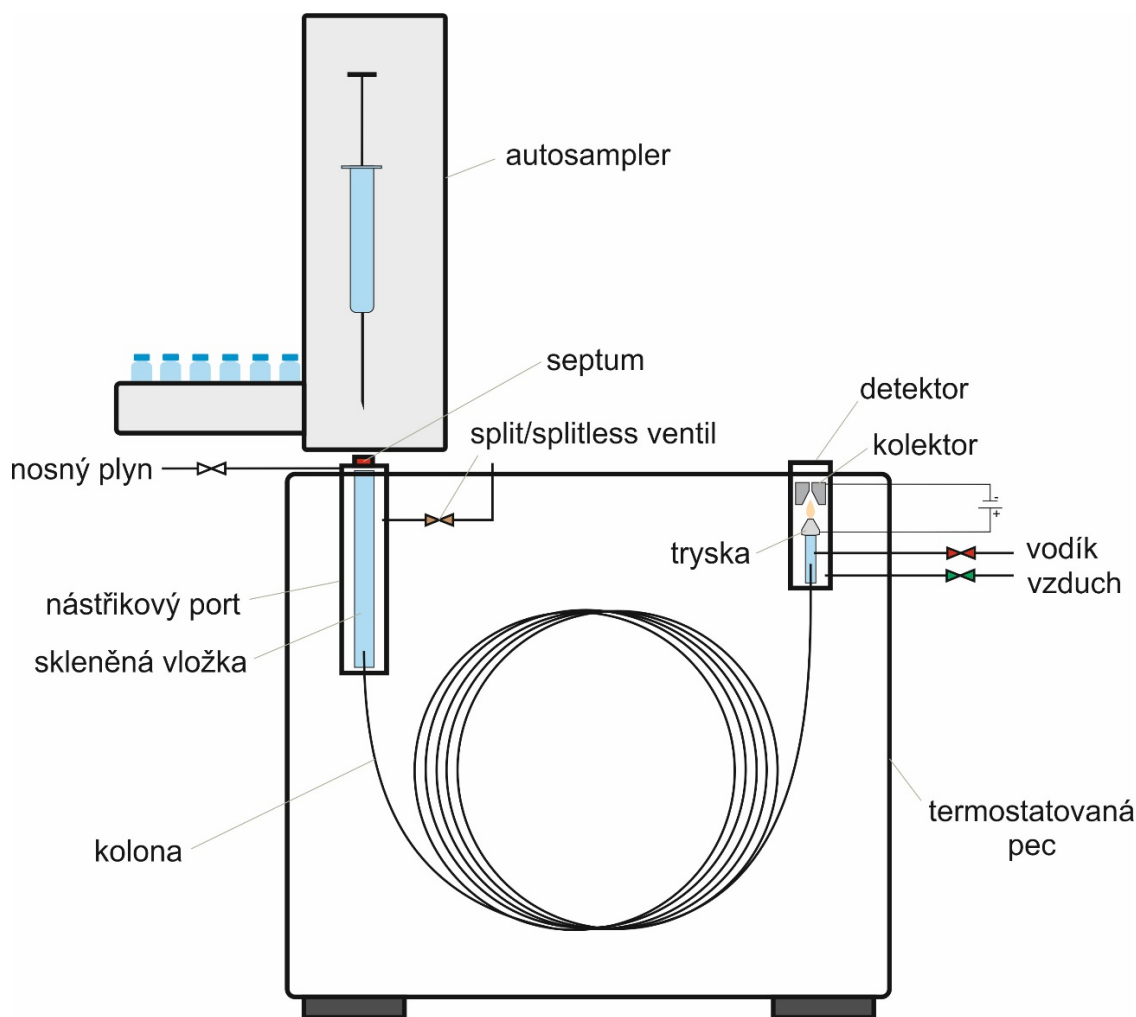
Obrázek 1. Chromatogram separace těkavých mastných kyselin v plynné fázi z původní práce Jamese a Martina [7]. Mobilní fází byl dusík o průtoku 18,2 ml/min, kolona byla náplňová obsahující křemelinu s 10% roztokem kyseliny stearové v silikonovém oleji DC550, teplota kolony 137 °C, detekce pomocí automatické titrační byrety.



Obrázek 2. Chromatogram separace methylesterů rozvětvených a nerozvětvených mastných kyselin C7-C18 z původní práce Jamese a Martina [9]. Mobilní fází - N_2 o průtoku 133 ml/min, stacionární fází byl vysokovroucí lubrikační olej, teplota kolony 197 °C. 2. heptanoát, 3. oktanoát, 5. nonanoát, 6. dekanoát, 12. tetradekanoát, 15. hexadekanoát, 18. oktadekanoát

1.1 Struktura přístroje

Současný plynový chromatograf je tvořen termostatovanou pecí, která udržuje teplotu s přesností na desetiny až setiny °C umožňuje udržovat či dle teplotního programu měnit teplotu, která je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících separaci látek. Další podstatné součásti jsou uspořádány kolem této pece či umístěny přímo v ní, jak je ukázáno na schématu na Obr. 3. Dohled nad jejich stavem je součástí práce každého operátora GC systému a má nezanedbatelný vliv na detekční limit a kvalitu získaných dat. Vzorek je vpraven do nástřikového portu mikrostříkačkou autosampleru skrze gumové septum. Životnost septa je zhruba 100 nástřiků v závislosti na výrobci septa a GC systému. Po jejím překročení může docházet ke ztrátám nejtěkavějších látek ze vzorku, což se projeví poklesem výšky píků v chromatogramu. K vaporizaci nastříknutého vzorku dochází ve skleněné vložce nástřikového portu, jejíž tvar se liší dle techniky nástřiku (*split, splitless, large volume injection, programmable temperature vaporizer*, atd.). Skleněná vložka často obsahuje skelnou vatu usnadňující vaporizaci vzorku včetně filtrace nečistot, ale na druhou stranu může způsobovat ztráty některých analytů. Jak skleněná vata, tak skleněná vložka bývají ošetřeny různými formami deaktivace pro snížení těchto ztrát. Objem vzniklých par by neměl přesáhnout 75 % objemu skleněné vložky, aby nedošlo ke znečištění dalších částí nástřikového portu, kondenzaci látek mimo skleněnou vložku a nevznikl tzv. *backflash*. Ten se projevuje vznikem nepravidelně se vyskytujících píků v různých místech chromatogramu. Na konci celého systému je umístěn detektor. Princip plamenově ionizačního detektoru (FID) spočívá v ionizaci látek vystupujících ze separační kolony, ke které dochází v kyslíkovodíkovém plameni a vzniklé ionty či radikály pak uzavírají elektrický obvod mezi dvěma elektrodami. Výsledný signál je tedy snímán jako pokles napětí či nárůst proudu. FID se skládá z trysky detektoru, která je zároveň jednou z elektrod pro získání signálu. Druhou elektrodou je kolektor vzniklých iontů umístěný nad plamenem a tryskou. Obě komponenty vyžadují občasné vyčištění. Na trysce ulpívají zplodiny spojené s degradací stacionární fáze, které při spalování vytváří SiO₂. Trysku je vhodné mechanicky očistit protažením měkkým tenkým drátkem, např. pro čištění jehel injekčních stříkaček. Zároveň je vhodné očistit kontakt spojující kovovou špičku trysky se zbytkem signálního okruhu.



Obrázek 3. Schéma plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem a autosamplerm.

1.2 Kolony pro GC

Kolona je nejdůležitější součástí chromatografického systému. Správnou volbou kolony, tedy její stacionární fáze, tloušťky jejího filmu, vnitřního průměru kapiláry a délky kolony lze významně ovlivnit separaci látek. První používané kolony byly naplněné částicemi, například SiO_2 , potaženými stacionární fází a to nejčastěji v podobě nějakého oleje. Šlo tedy o náplňové kolony o délce 1 - 5 m a tloušťce 1 - 5 mm [10]. Zmenšením částic pod 1 mm vznikly mikronáplňové kolony, jejichž délka byla omezená odporem vůči průtoku mobilní fáze. Zároveň v nich docházelo k rozšiřování zón analytů v důsledku rozdílnosti drah, které molekuly analytu urazí mezi částicemi

tvořícími náplň kolony. Následný pokrok ve vývoji plynové chromatografie přinesly kapilární kolony. První experiment s kapilární kolonou provedl Golay v roce 1956 [11] a odstranil tím oba dva výše zmíněné nedostatky, což vedlo k významnému zvýšení účinnosti separace [10, 11]. Materiálem prvních kapilárních kolon byl PTFE, sklo a celé jedno desetiletí byla používána nerezová ocel. Tyto materiály mají řadu nevýhod jako je nedostatečná tepelná odolnost, přítomnost nežádoucích příměsí obsažených v plastech, až po nedostatečnou homogenitu vnitřního povrchu kapilár z nerezové oceli vedoucí k nutnosti používat relativně tlustý film mobilní fáze pro zamezení styku analytu s materiálem kolony. Dalším materiálem byl křemen, který je inertnější než sklo a zároveň neobsahuje příměsí používané při tavení skla ani kovové či jiné ionty. Z důvodu křehkosti křemene bylo jeho využití pro výrobu kapilárních kolon posunuto až do roku 1979, kdy Dandeneau a Zerenner [12] představili tenkostěnnou flexibilní kapiláru potaženou silikonovou gumou, která byla následně nahrazena polyamidem používaným až do současnosti.

Stacionární fáze také prošla dlouhým vývojem. Počínaje silikonovým olejem obsahujícím kyselinu stearovou, přes skvalen a jiné uhlovodíky používané v kapilárách z nerezové oceli, až po současný polysiloxan a polyethylenglykol. Nejčastěji používaný polysiloxan může ve svém řetězci obsahovat čtyři typy postranních řetězců. Pokud je v postranním řetězci obsažen pouze methyl, je stacionární fáze označována jako 100% dimethylpolysiloxan. Dále se v postranním řetězci vyskytuje fenyl, který ovšem substituuje pouze malou část postranních řetězců, např. 5% difenyl a zbývajících 95 % tvoří dimethylsiloxan. Další stacionární fáze obsahují v postranním řetězci kyanopropyl a trifluoropropyl. V případě, že fenyl vytváří spojení mezi atomy křemíku, vzniká arylenová stacionární fáze, která je stabilnější s výrazně nižší úrovní degradace v porovnání s difenyl dimethylsiloxanem. Malou část, přibližně 1 %, postranních řetězců může tvořit vinyl umožňující zesíťování (*cross-linking*) polymerního řetězce. Případně umožňuje vazbu na povrch křemenné kapiláry. Označení takových mobilních fází je „*bonded*“. Tyto kolony jsou nejstabilnější a snesou nástřik všech organických rozpouštědel i vody a to i ve vyšších množstvích. Tyto kolony mohou být i vypláchnuty rozpouštědly pro odstranění kontaminantů [13]. Strukturálně odlišnou fází je polyethylenglykol, označovaný jako PEG nebo častěji jako WAX. Rozdíly mezi výrobci jsou v molekulové hmotnosti použitého polyethylenglykolu a ve způsobu jeho

zesíťování nebo navázání, „*cross-linked*“ a „*bonded*“. Jedná se o vysoce polární fázi sloužící k separaci polárních molekul. Největší nevýhodou PEG je degradace způsobená oxidací vzdušným kyslíkem, která narůstá se zvyšující se teplotou. Zároveň mají tyto kolony většinou nižší teplotní limit v porovnání s ostatními fázemi, což prodlužuje dobu analýzy. Posledním typem uvedeným v Tabulce 1 jsou stacionární fáze založené na iontových kapalinách, označené IL. Jde o organické soli s teplotou tání nižší než 100 °C, vyznačující se vysokou viskozitou i teplotní odolností. Z pohledu polarit jsou řazeny mezi extrémně polární stacionární fáze. Všechny základní typy stacionárních fází jsou shrnuty do přehledné Tabulky 1.

Tabulka 1. Základní stacionární fáze používané v plynové chromatografii seřazené dle vzrůstající polarit.

Obchodní označení	Stacionární fáze	Polarita <i>P</i>
-1	100% dimethylpolysiloxan	130
-5	5% difenyl 95% dimethylpolysiloxan	
-5MS	95% dimethyl 5% dimethylpolysilarylen	251
-35	35% difenyl 65% dimethylpolysiloxan	
-50	50% difenyl 50% dimethylsiloxan	948
-1301	6% kyanopropyl 94% dimethylpolysiloxan	
-1701	14% kyanopropyl 86% dimethylpolysiloxan	732
-1793	50% kyanopropylfenyl 50% dimethylpolysiloxan	1793
-WAX	polyethylenglykol	2324
-2330	80% biskyanopropyl 20% kyanopropylfenylpolysiloxan	3311
-2380	90% biskyanopropyl 10% kyanopropylfenylpolysiloxan	
-2560	100% biskyanopropylpolysiloxan	3572
SIL88		
IL60	1,12-di(tripropylphosphonium)dodecane bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide	2660
IL82	1,12-Di(2,3-dimethylimidazolium)dodecane bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide	3638

IL100	1,9-Di(3-vinylimidazolium)nonane bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide	4437
IL111	1,5-di(2,3-dimethylimidazolium)pentane bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide	4938

1.3 Teoretické principy chromatografie

Rozdílná rychlost průchodu látek chromatografickou kolonou je výsledkem opakovaného rozdělování látky mezi stacionární (SF) a mobilní fází (MF). Tento proces lze popsat distribuční konstantou (K_D) vyjadřující poměr mezi koncentrací analytu ve stacionární $[X]_{SF}$ a v mobilní fázi $[X]_{MF}$, který je zároveň roven součinu retenčního faktoru (k) a fázového poměru (β) [13]:

$$K_D = \frac{[X]_{SF}}{[X]_{MF}} = k \beta \quad (1)$$

a β je rovno:

$$\beta = \frac{r}{2d_f} \quad (2)$$

, kde r je průměr kolony a d_f tloušťka filmu SF a z tohoto vztahu vyplývá: Čím větší bude průměr kolony, tím nižší bude retence látky a stejně tak čím větší bude tloušťka filmu stacionární fáze, tím vyšší bude retence a naopak.

Obecně platí, že čím vyšší je hodnota K_D , tím vyšší je retence látky a zároveň, že dva analyty se stejnou hodnotou K_D koeluují. Hodnota K_D je závislá na typu použité SF a na teplotě. Právě optimalizace teplotního režimu představuje efektivní nástroj pro separaci. Pro vyjádření obecné závislosti distribuční konstanty na absolutní teplotě (T) je uváděn následující vztah [14]:

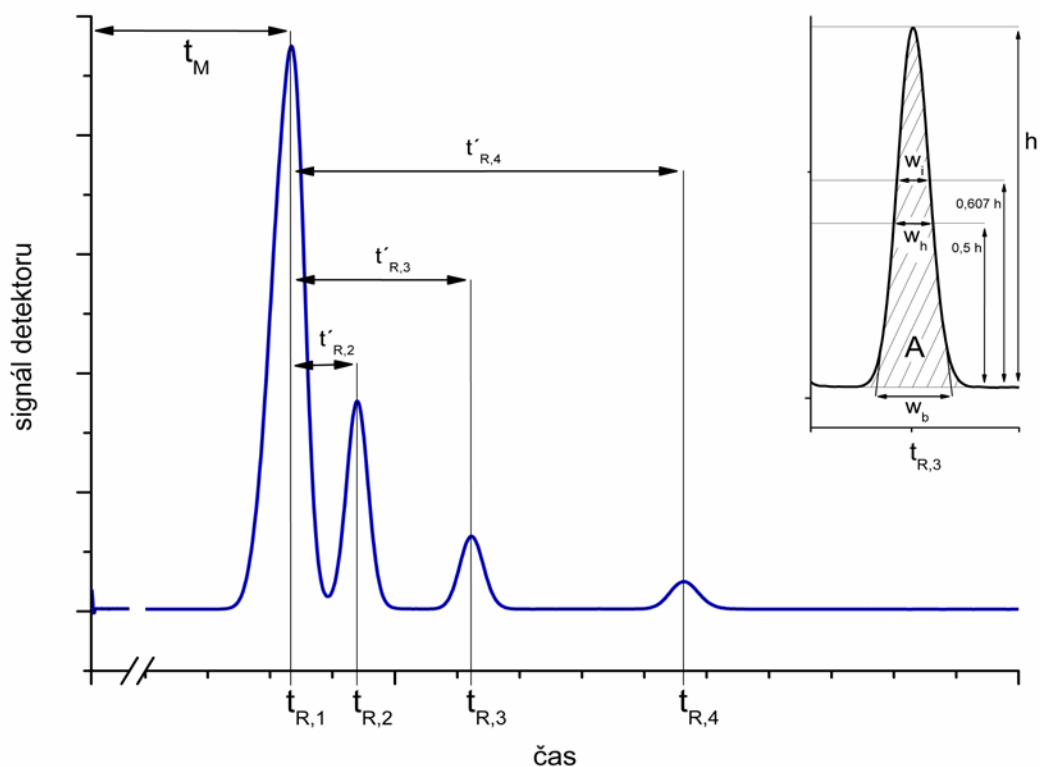
$$\log K_D = \frac{a}{T} + b \quad (3)$$

, z něhož vyplývá, že hodnota K_D s rostoucí teplotou klesá, protože se snižuje množství látky ve stacionární fázi; a a b jsou empirické konstanty. Teplota, resp. teplotní program

a volba stacionární fáze jsou tedy těmi nejdůležitějšími parametry pro úspěšnou separaci látek v plynové chromatografii.

1.3.1 Parametry z chromatogramu

Vrcholy signálu v chromatogramu odpovídají nejvyšší koncentraci látky v zóně a můžeme je definovat pomocí jejich retenčního času (t_R). Každý chromatografický pík lze dále charakterizovat prostřednictvím jeho výšky (h) a plochy (A). Oba dva parametry lze použít pro vytvoření kalibrace a následnou kvantifikaci analytu ve vzorku. Dalším parametrem je šířka píku (w) uváděná v časových jednotkách (Obr. 4). Šířku píku je možné změřit při základně, protažením tečny s inflexním bodem píku na základní linii (w_b), což je komplikované a často nepřesné. Mnohem častěji je proto měřena šířka píku v polovině jeho výšky (w_h), případně šířka píku v inflexním bodě (w_i).



Obrázek 4. Chromatogram analýzy uhlovodíků C4 - C8 provedený na 200 m koloně s vyznačením retenčního času a šířky píku.

Pokud se jedná o Gaussovský pík charakterizovaný rozptylem (σ), pak platí pro šířku píku následující vztahy:

$$w_i = 2\sigma \quad (4)$$

$$w_b = 4\sigma \quad (5)$$

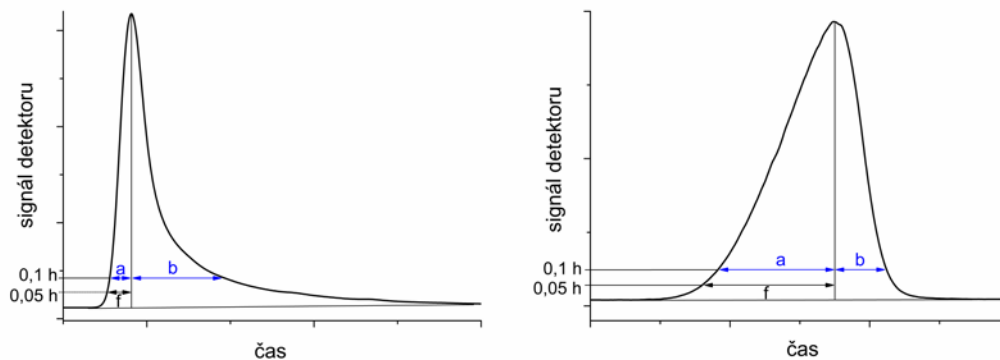
$$w_h = \sqrt{8 \ln 2} = 2,355\sigma \quad (6)$$

Tyto vztahy nelze použít pro asymetrické píky. Symetrii píku lze vyhodnotit pomocí faktoru symetrie (A_s), či jako tzv. „*tailing*“ faktor (T_f). Toto vyhodnocení spočívá ve spuštění kolmice z vrcholu píku na osu x a následném změření přední (a) a zadní (b) části šířky píku rozdělené touto kolmicí, které se měří v 10 % výšky u faktoru symetrie. V případě „*tailing*“ faktoru se porovnává přední část šířky píku (f) a celková šířka píku v 5 % výšky ($w_{0,05}$) [15], viz. Obr. 5.

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (7)$$

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f} \quad (8)$$

Za symetrický je považován pík s faktorem symetrie 1, ale tolerované rozmezí je přibližně 0,9 - 1,1. Nejčastějším důvodem vzniku asymetrického píku je předávkování kolony provázené vznikem tzv. žraločího píku, viz. Obr. 5 vpravo. Dalším důvodem je koeluce s jinou látkou ve výrazně nižší koncentraci, ať eluované před či za majoritní komponentou. Sledování symetrie píku je proto spojeno hlavně s farmaceutickým průmyslem, kde je výskyt nečistoty, či jiné příměsi, v účinné látce nežádoucí až nepřijatelný. V úvahu přichází i kontaminace injektoru nebo kolony vysokovroucími a aktivními látkami, chybná instalace kolony nebo lineru nástřikového portu a nevhodná technika nástřiku. Hlavním praktickým problémem výrazně asymetrických píků je



Obrázek 5. Asymetrické píky, **vlevo** – chvostující, **vpravo** - frontující (žraločí pík)

nepřesná integrace plochy píku vyhodnocovacím softwarem. Kromě uvedených parametrů má každý chromatografický systém takzvaný mrtvý čas (t_M), který je dán objemem kolony, části nástřikového portu a detektoru. Mrtvý čas odpovídá času, za který proteče mobilní fáze přístrojem a můžeme jej spočítat z podílu délky kolony (L) v centimetrech a lineární průtokové rychlosti (\bar{u}) v cm/s.

$$t_M = \frac{L}{60 \bar{u}} \quad (9)$$

Rozdíl $t_R - t_M$ je označován jako redukovaný retenční čas (t'_R) odpovídající době, kterou látka stráví ve stacionární fázi. Zatímco mrtvý čas odpovídá době po kterou je látka v mobilní fázi.

$$t'_R = t_R - t_M \quad (10)$$

Teoreticky lze pro stanovení mrtvého času použít látku, která má nulovou retenci a zároveň je dobře detekovatelná použitým detektorem. Pro FID či MS detektor se používá metan, případně butan, který je snadno dostupný jako náplň do zapalovačů [13]. Nicméně ve skutečnosti má každá látka, s výjimkou nosného plynu, určitou retenci a proto je tento způsob určení t'_R zatížen chybou, která následně ovlivní výpočet dalších parametrů separace. Stanovením nejpřesnější hodnoty mrtvého času se

zabývalo mnoho autorů [16-18]. Většina způsobů je založena na použití retenčních časů několika po sobě následujících alkanů, např. dle následujících vztahů [19]:

$$t_M = \frac{q t_{R,n} - t_{R,n+1}}{q - 1} \quad (11)$$

$$q = \frac{t_{R,n+1} - t_{R,n}}{t_{R,n} - t_{R,n-1}} \quad (12)$$

Z poměrů redukovaného retenčního času a mrtvého času chromatografického systému lze stanovit retenční faktor (k). Ten umožňuje porovnávat míru zadržování látek ve stacionární fázi. Pokud bude mít jedna z látek $k = 2$ a druhá $k = 4$, pak je druhá z látek zadržována SF 2krát silněji. Oproti tomu látka s $k = 1$ by nebyla zadržována vůbec a šlo by o vhodný marker pro určení t_R .

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (13)$$

Z poměru redukovaných retenčních časů dvou sousedních píků v chromatogramu získáme separační faktor (α), nazývaný také selektivita. Separační faktor nám říká kolikrát silněji je zadržována druhá látka v chromatogramu oproti látce první.

$$\alpha = \frac{t'_{R,2}}{t'_{R,1}} = \frac{k_2}{k_1} \quad (14)$$

1.3.2 Teoretická účinnost a mobilní fáze pro GC

Teoretickou účinnost chromatografického systému lze popsat pomocí počtu teoretických pater (n). Tato představa byla přejata z modelování frakční destilační kolony, kdy se po celé její délce utváří mnoho rovnovážných stavů mezi plynou a

kapalnou fází. V případě GC jde o rovnováhu přestupu molekul analytu z mobilní do stacionární fáze. Počet teoretických pater lze spočítat z retenčního času a šířky píku dle následujících vztahů, kde w_b je šířka píku při základně, w_h v polovině jeho výšky a w_i v inflexním bodě.

$$n=16\left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \quad (15)$$

$$n=5,545\left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 \quad (16)$$

$$n=4\left(\frac{t_R}{w_i}\right)^2 \quad (17)$$

Dosažením redukovaného retenčního času do výše uvedených vzorců lze získat takzvaný počet efektivních pater označený jako (N). Počet teoretických i efektivních pater je porovnatelný pouze při použití stejné látky a na stejně dlouhé koloně. Zároveň platí, že počet pater zůstává shodný pro shodný poměr délky a vnitřního průměru kolony. Pro zkrácení analýzy je tedy výhodné používat kolony o nižším průměru a kratší délce, což vede k tzv. rychlé plynové chromatografii (*fast GC*), která má svá vlastní úskalí.

Pro porovnání různě dlouhých kolon zavedl Peters, 1922 [20] tzv. výškový ekvivalent teoretického patra (HETP, h) který původně sloužil k porovnání účinnosti destilačních kolon mezi sebou. HETP lze aplikovat i na kolonovou chromatografii dle vztahu:

$$HETP=\frac{L}{N} \quad (18)$$

Čím je HETP nižší, tím více pater bude kolona mít, což znamená vyšší počet dosažených rovnováh a tím vyšší účinnost separace. Zároveň při stejné výšce

teoretického patra a prodloužení kolony se účinnost separace zvýší v důsledku navýšení počtu pater. Pro výpočet počtu teoretických (n) či efektivních pater (N) je doporučeno zvolit látku s retenčním faktorem $k > 5$ [13]. Výškový ekvivalent teoretického patra lze ovlivnit např. použitým typem mobilní fáze a rychlostí jejího průtoku. Vztah mezi lineární průtokovou rychlostí a výškovým ekvivalentem teoretického patra (h) popisuje van Deemterova rovnice z roku 1956 [21].

$$h = A + \frac{B}{u} + C u \quad (19)$$

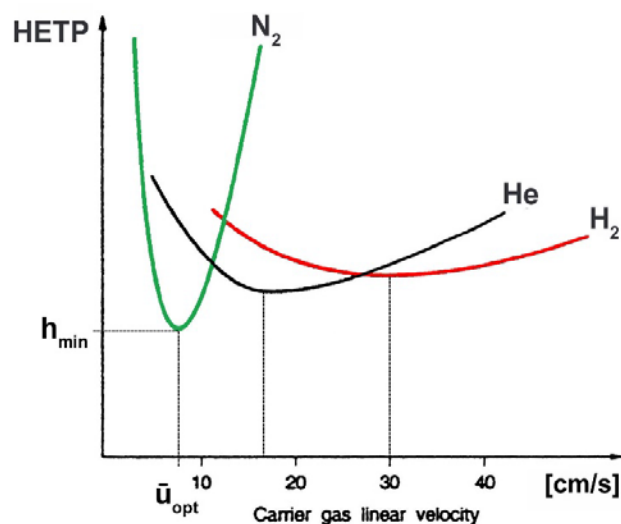
Hodnota (h) je závislá na třech členech: Člen A je vířivá a molekulární difuze v toku nosného plynu, která vzniká z nehomogenity náplně kolony. Tento člen se týká jen náplňových kolon a v případě kapilárních kolon jej lze zanedbat, čímž se vztah zjednoduší na tvar Golayovy rovnice:

$$h = \frac{B}{u} + C u \quad (20)$$

Druhým členem je podélná difuze látky v mobilní fázi (B). Posledním členem je odpor proti převodu hmoty mezi SF a MF (C). Výsledkem těchto třech působících faktorů je hyperbolická křivka s výrazným minimem odpovídajícím průtokové rychlosti, při které je dosaženo minimální výšky teoretického patra, viz. Obr. 6. Při optimální průtokové rychlosti je kolona nejefektivnější. Vliv druhého členu (B) klesá s rostoucí průtokovou rychlostí a pokud je jeho hodnota 10krát nižší než hodnota členu C , je možné jej zanedbat a použít zjednodušenou verzi rovnice [14]:

$$h = C u \quad (21)$$

Příslušná hodnota průtokové rychlosti je přibližně 1,25 – 2krát vyšší než optimální průtoková rychlost. Benefitem je kratší doba analýzy za cenu malé ztráty účinnosti separace.



Obrázek 6. van Deemterova křivka pro dusík, hélium a vodík převzatá z uživatelského manuálu Shimadzu pro GC-17A.

Hodnoty optimální průtokové rychlosti pro různé délky a průměry kolon lze nalézt v literatuře [13]. Na Obr. 6 jsou zobrazeny tvary van Deemterovy křivky pro tři nepoužívanější MF: dusík, helium a vodík. Dusík poskytuje nejnižší hodnotu h_{\min} , ovšem při velmi nízké průtokové rychlosti, což vede k velmi dlouhým analýzám. Zároveň odchýlení se od hodnoty optimálního průtoku je provázeno velkou ztrátou účinnosti separace. Hélium je zřejmě nejpoužívanějším plynem pro GC, zvláště pak pro GC-MS přístroje. Jeho optimální průtoková rychlost je dvakrát vyšší než u dusíku. S poklesem zásob helia a vzestupem jeho ceny se dobrou alternativou pro některé typy detektorů stal vodík. Jeho optimální průtoková rychlost je ještě vyšší než u hélia z důvodu nízké viskozity, která oproti ostatním plynům výrazně nevzrůstá s teplotou. Porovnání dalších fyzikálních parametrů mobilních fází je shrnuto v Tabulce 2. Van Deemterova křivka pro vodík nevykazuje výrazné minimum jako v případě dusíku a z tohoto důvodu lze použít i dvakrát vyšší průtok nosného plynu, než je \bar{u}_{opt} s relativně malou ztrátou separačních schopností. Díky tomu lze často zkrátit čas analýzy o 50 - 70 % výměnou helia za vodík, což je zvláště výhodné při analýzách na velmi dlouhých kolonách; např. analýza *cis/trans* izomerů mastných kyselin na 100 či 200 m dlouhých kolonách. Velkou nevýhodou vodíku je schopnost vytvářet se vzduchem explozivní směs, která vzniká v rozmezí 4 - 74 obj. % vodíku ve vzduchu [22]. Nicméně při

velikosti pece plynového chromatografu cca 20 dm³ a průtoku H₂ kolonou 2 ml/min by spodní hranice uvedeného intervalu bylo dosaženo za 6,5 h. Bereme-li v úvahu, že se pec chladí a větrá po každé analýze, tedy s výjimkou izotermální analýzy, pak je použití vodíku jako nosného plynu relativně bezpečné.

Tabulka 2. Fyzikální vlastnosti nosných plynů po GC

vlastnosti	dusík	helium	vodík
tepelná vodivost [W.s ⁻¹ .K ⁻¹]	0,0258	0,1513	0,1815
viskozita [μPa.s]	16,58	18,60	8,44
hustota [kg.m ⁻³] při 0 °C	1,250	0,1785	0,0852

Použití vodíku jako nosného plynu je vhodné zejména s plamenově ionizačním detektorem (FID), u kterého je vodík využit i jako palivo pro plamen přítomný v detektoru. Stejně tak lze vodík použít v kombinaci s dusíko-fosforovým detektorem (NPD). Naopak v případě hmotnostního detektoru přináší vodík určité komplikace, jako je specifická fragmentace látek a z toho plynoucí ztížená identifikace. Dále je to nižší citlivost v porovnání s analýzou za použití helia a riziko v podobě akumulace vodíku v prostoru detektoru při zrušení vakua.

1.3.3 Reálná účinnost separace

Pro praktické porovnání míry separace dvou látek je v chromatografii používáno tzv. rozlišení (R). Slouží k posouzení úrovně separace dvou vedle sebe eluovaných zón. Pro jeho výpočet je kromě retenčních časů potřeba znát i šířku píků.

$$R = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5(w_{b,1} + w_{b,2})} \quad (22)$$

$$R = 1,18 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{h,1} + w_{h,2}} \quad (23)$$

Za rozdělené považujeme zóny (píky) s $R \geq 1,5$. Přičemž k rozdělení dvou píků na základní linii detektoru dochází až při hodnotě $R > 2$. Vyšší rozlišení můžeme považovat za plýtvání časem a lze jej efektivně snížit použitím kratší separační kolony nebo změnou teplotního programu. Mezi separační účinností vyjádřenou počtem teoretických pater (N) a rozlišením dvou sousedních píků platí následující vztah, kde α je selektivita a k retenční faktor [23]:

$$R = \frac{1}{4} (\alpha - 1) \left(\frac{k}{k + 1} \right) \sqrt{N} \quad (24)$$

Při použití dvojnásobně dlouhé kolony vzroste počet efektivních pater na dvojnásobek, nicméně rozlišení stoupne pouze 1,4krát. Pro dosažení dvojnásobné hodnoty rozlišení by bylo nutné použít 4krát delší kolonu, což není běžně používaný postup a naopak je volena změna selektivity založená na volbě stacionární fáze nebo teploty. Nicméně v případě komplexních vzorků s velkým počtem podobných sloučenin je prodlužování kolony významné.

Další parametrem pro posouzení praktické účinnosti separace je separační číslo (SN) označované též zkratkou z německého „*trennzahl*“ (TZ). TZ udává počet píků totožné šířky, které lze umístit mezi dva sousední píky po sobě jdoucích alkanů a lze jej spočítat dle následujícího vzorce [13]:

$$SN = \left(\frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{h,1} + w_{h,2}} \right) - 1 \quad (25)$$

1.3.4 Identifikace látek

V chromatografii se identifikace látek provádí analýzou čistého standardu příslušné sloučeniny a stanovením jejího retenčního času (t_R) na použitém GC systému. V ideálním případě je t_R dostatečně identifikující.

Identifikaci lze také založit na porovnání redukovaných retenčních časů nebo relativní retence, která je poměrem mezi t'_R sledovaného analytu a $t'_{R,ST}$ přidaného standardu. Oba dva přístupy eliminují zkracování retenčních časů vlivem stárnutí stacionární fáze, zkracování kolony v průběhu údržby či reinstalace, včetně fluktuace teploty a tlaku.

Třetí možností je použití Kovatsovy metody retenčních indexů [24], která porovnává t_R látky oproti t_R řady n-alkanů, pro něž platí, že logaritmus jejich redukovaných retenčních časů je lineárně závislý na počtu uhlíků v molekule. Retenční index (I_x) pro izotermální analýzu n-alkanů lze spočítat dle následujícího vzorce:

$$I_x = 100 \frac{\log t'_{R,i} - \log t'_{R,n}}{\log t'_{R,n+1} - \log t'_{R,n}} + 100n \quad (26)$$

Retenční index n-alkanu je roven 100 násobku počtu jeho uhlíků. I_x butanu je tedy 400 a I_x pentanu je 500 atd. Látka eluovaná v chromatogramu mezi butanem a pentanem bude mít I_x v rozmezí 400 - 500. I_x je tedy charakteristický pro danou látku, ale je současně závislý na teplotě a polaritě stacionární fáze.

Pro gradientovou analýzu, tedy při použití teplotního programu, je vzorec modifikován dle van den Doola a Kratze [25]:

$$I_x = 100 \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)} + 100n \quad (27)$$

Obdobný vzorec použil Lee et al. [26] pro identifikaci polyaromatických uhlovodíků při gradientové analýze a Bambushok a Linstrom [27] pak uvádějí vzorec pro vztah mezi Kovatsovým retenčním indexem a Leeho retenčními indexy.

Pro identifikaci mastných kyselin, resp. metyl esterů mastných kyselin (FAME) se v plynové chromatografii často používá tzv. ekvivalent uhlovodíkového řetězce (ECL), jehož výpočet je analogický Kovatsovu indexu. ECL není vztažen k nejbližším alkanům, ale k nasyceným mastným kyselinám eluovaným před ($t'_{R,z}$) a za naším analytem ($t'_{R,z+1}$), viz. uvedený vzorec:

$$ECL_x = z + \frac{\log t'_{R,x} - \log t'_{R,z}}{\log t'_{R,z+1} - \log t'_{R,z}} \quad (28)$$

, kde z je počet uhlíků mastné kyseliny eluované před mastnou kyselinou, jejíž ECL počítáme. Ze vzorce vyplývá, že ECL kyseliny stearové bude 18, ECL kyseliny arachové bude 20, atd. [28]. Opět jde o variantu indexu použitelného pro izotermální analýzu. V případě teplotního programu je závislost nelineární a obdobně jako u Kovatsova indexu se používá upravený vzorec van den Doola a Kratze [25]:

$$ECL_x = z + \frac{t_{R,x} - t_{R,z}}{t_{R,z+1} - t_{R,z}} \quad (29)$$

, kde $t_{R,x}$ je retenční čas sledované látky, $t_{R,z}$ je retenční čas nasycené FA eluované před sledovanou látkou; $t_{R,z+1}$ je retenční čas nasycené FA eluované za naší látkou a z je počet uhlíků ve sledované FA.

Z rozdílu hodnoty ECL_x sledované FA a počtu uhlíků v dané FA ($n_{C,x}$) lze spočítat tzv. frakční délku řetězce (FCL):

$$FCL_x = ECL_x - n_{C,x} \quad (30)$$

Jak ECL tak FCL lze použít k identifikaci komplexních směsí, jako jsou např. rozvětvené mastné kyseliny s různou délkou řetězce a různou polohou methylu v řetězci [29] nebo mastné kyseliny s různým stupněm nenasycenosti a různou polohou dvojných vazeb [30-32].

1.3.5 Kvantifikace

Kvantifikaci lze při vytváření kalibrační závislosti založit jak na výšce píku (h), tak pro dosažení nižšího LOD na ploše píku (A). Nepsané pravidlo upřednostňuje výšku píků v případě nedokonalé separace s jiným analytem při rozlišení $R \leq 1$, kdy je výška

píku zatížena menší chybou než jeho plocha. Při vyšší hodnotě rozlišení volíme nejčastěji plochu píku. I v případě stanovení pouhého procentuálního zastoupení komponent ve vzorku je nutné provést adjustaci za pomoci testovací směsi, u které známe procentuální zastoupení jednotlivých složek. V případě FID je signál závislý na počtu atomů C a H v molekule a proto se odezva FID zvyšuje s rostoucí délkou řetězce. To je většinou korigováno stanovením odezvového faktoru eventuálně použitím jeho hodnoty dostupné v literatuře.

1.3.6 Polarita stacionární fáze

Pro hodnocení stacionární fáze existuje několik konceptů, z nichž nejznámější a nejpoužívanější je Rohrschneiderův [33] či rozšířený McRaynoldsův [34] koncept. Polarita je zde hodnocena jako suma různých mezimolekulových interakcí podílejících se na vyšší retenci polárních látek v polární stacionární fázi. V případě Rohrschneiderova konceptu je použito pět testovacích látek (sond), které slouží pro posouzení intenzity jednotlivých interakcí, viz. Tabulka 3. McRaynoldsův koncept zahrnuje 10 látek, z nichž prvních pět je shodných s Rohrschneiderem.

Tabulka 3. Sondy Rohrschneiderova konceptu polarity

testovací látka (sonda)	označení	typ interakcí
Benzen	<i>x</i>	π - π , van der Waalsovy, indukovaný dipól
Butanol	<i>y</i>	H-můstky, donor <i>e</i> -páru
2-pentanon	<i>z</i>	akceptor <i>e</i> -páru
Nitropropan	<i>u</i>	donor <i>e</i> -páru
Pyridin	<i>s</i>	H ⁺ akceptor

Tyto sondy jsou změřeny společně s řadou alkanů. Následně je vytvořen rozdíl Kovatsova retenčního indexu na použité stacionární fázi (I_{tl}) a na stacionární fázi tvořené 10 % skvalenem (I_{sq}).

$$\Delta I_x = I_{tl} - I_{sq} \quad (31)$$

Skvalen je zde vybrán jako látka s nulovou polaritou, poskytující pouze van der Waalsovy interakce, která byla v minulosti požívána jako stacionární fáze v plynové chromatografii. Celková polarita stacionární fáze (P_{sf}) je pak sumou všech ΔI zmíněných pěti testovaných látek a pro základní stacionární fáze je uvedena v Tabulce 1.

$$P_{sf} = \Delta I_x + \Delta I_y + \Delta I_z + \Delta I_u + \Delta I_s \quad (32)$$

Dle hodnoty celkové polarity lze stacionární fáze rozdělit na nepolární s $P < 100$, na středně polární s P v intervalu 100 - 400 a na vysoce polární s $P > 400$ [35].

U kapilárních kolon, které mají jako stacionární fázi iontovou kapalinu (IL), je součástí jejich označení takzvané číslo polarity (PN) [36]. PN je získáno vztahem celkové polarity kolony na celkovou polaritu stacionární fáze IL100, viz. následující vzorec:

$$PN_{sf} = \left(\frac{P_{sf}}{P_{SLB-IL100}} \right) 100 \quad (33)$$

1.4 Mastné kyseliny

Termínem mastné kyseliny označujeme alifatické, nerozvětvené, monokarboxylové kyseliny. Dle mnoha monografií jsou takto označovány karboxylové kyseliny mající od 2 do 80 atomů uhlíku. Nicméně dle rozšířenosti a jejich skutečného výskytu v přírodních zdrojích, tucích, jde nejčastěji o karboxylové kyseliny s délkou řetězce od 12 do 22 uhlíků. Zároveň můžeme doplnit, že mají téměř výhradně sudý počet atomů uhlíku díky syntéze vycházející z dvou uhlíkatého acetylu vázaného v buňce na koenzym A. Výjimkou jsou v tomto směru bakterie tvořící mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků a to nejčastěji C15:0, C17:0, C19:0, ale i některé podstatně delší [37]. C15:0 a C17:0 jsou díky střevní mikroflóře přežvýkavců součástí mléka a mléčných výrobků a proto byly považovány za indikátor konzumace těchto výrobků. Poměr C15:0/C17:0 je v mléce přežvýkavců 2:1, zatímco v krevní plazmě je tento poměr obrácený, což svědčí o produkci určité části C17:0 endogenní syntézou, např. z propionátu vzniklého ve střevě, či z kyseliny stearové její α -oxidací [38]. Určitá část C17:0 je též produkována z fytolu nebo kyseliny fytanové a její koncentrace v plazmě má inverzní spojení s rozvojem glukózové intolerance a může sloužit jako indikátor zdravého lipidového metabolismu [39]. Dle délky uhlovodíkového řetězce je dělíme na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), se středně dlouhým řetězcem (MCFA), s dlouhým řetězcem (LCFA) a s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA). Dále je dělíme dle množství nenasycených vazeb přítomných v uhlovodíkovém řetězci na skupinu nenasycených mastných kyselin (SFA), které neobsahují žádnou dvojnou vazbu, na skupinu mononenasycených mastných kyselin (MUFA), které obsahují v řetězci jednu dvojnou vazbu a na skupinu polynenasycených mastných kyselin (PUFA) obsahujících ve svém řetězci dvě a více dvojných vazeb. Z důvodu ztráty rotace uhlovodíkového řetězce na dvojných vazbách rozeznáváme dva konfigurační (geometrické) izomery a to *cis* a *trans*.

1.4.1 SCFA (*Short Chain Fatty Acids*)

Do této skupiny patří monokarboxylové kyseliny s 2 - 6 uhlíky. Z pohledu výskytu v přírodních lipidech jsou tyto kyseliny méně významné. Kyselinu butanovou a kapronovou lze najít v kravském mléce v koncentracích 2,5 a 2 hmot. % [40]. Kyselina

octová, propionová a butanová jsou však významným produktem fermentace solubilní vlákniny přijímané v potravě, která je tvořena polysacharidy nerozložitelnými lidskými enzymy [41]. Nicméně její rozpustná část je zpracovávána mikroorganismy našeho střevního mikrobiomu a jejím majoritním odpadním produktem jsou právě tyto tři mastné kyseliny v molárních poměrech 60 : 20 : 20 acetát/propionát/butyrát. Tyto tři karboxylové kyseliny jsou významným energetickým substrátem kolonocytů, které jejich oxidací pokryjí 60 - 70 % svých energetických potřeb. Produkce SCFA fermentací polysacharidů se pohybuje v rozsahu 0,24 - 0,38 kg · tělesná váha v kg⁻¹ · h⁻¹. To je ekvivalent přibližně 10 % celkových kalorických potřeb našeho organismu. U přežvýkavců je touto symbiózou s bakteriální mikroflórou a následnou oxidací SCFA zajištěno až 80 % energetických potřeb [42].

1.4.2 MCFA (*Medium Chain Fatty Acids*)

Alifatické, monokarboxylové kyseliny v délce od 8 do 12 uhlíků jsou řazeny do skupiny mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem. Jmenovitě jde o kyselinu kaprylovou (C8:0), kaprinovou (C10:0) a laurovou (C12:0). Jejich přírodním zdrojem jsou různé oleje. V případě kyseliny laurové je to hlavně kokosový či palmovojádrový olej. V těchto olejích tvoří MCFA až 60 hmot. %, z toho přibližně 80 % náleží kyselině laurové. Dalším přírodním zdrojem MCFA je mateřské mléko savců, jehož složení se významně liší dle druhu savce. V lidském mateřském mléce tvoří podíl MCFA 5 - 10 % a majoritní část této skupiny je tvořena kyselinou laurovou [43]. Vysoké zastoupení MCFA najdeme v krysím mléce, kde tvoří 36 hmot. % z mastných kyselin obsažených v triacylglycerolech (TAG) [44]. Nejvyšší zastoupení MCFA se nalézá v králičím mléce, kde tvoří 50 % mastných kyselin obsažených v TAG s nejvyšším zastoupením kyseliny kaprylové (26 %) a kaprinové (21%) [45].

TAG obsahující MCFA jsou přednostně hydrolyzovány acidostabilními lipázami tvořenými v dutině ústní nebo v žaludku. Vstup MCFA do buňky nevyžaduje žádný transportér nutný u mastných kyselin s dlouhým řetězcem [46]. V krvi jsou přenášeny prostřednictvím albuminu, jejich vstup do mitochondrie se děje bez pomoci karnitin-palmitoyl transferázy [47] a k jejich aktivaci navázáním na koenzym A dochází až po

vstupu do mitochondrie před vlastní β -oxidací. Celý transport MCFA je tedy podstatně jednodušší a rychlejší, než v případě mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Tato skutečnost vedla k jejich využití jako náhradního zdroje energie u pacientů s pankreatickou insuficiencí, při malabsorpci tuků, hyperchylomikronemii, Crohnově chorobě, při syndromu krátkého střeva a také jako součást enterální výživy kriticky nemocných [48].

Kromě snadnějšího transportu oproti LCFA bylo v *in vitro* experimentech s krysími játry zjištěno, že MCFA jsou oxidovány na oxid uhličitý 10krát rychleji než LCFA a pouze 5 % z nich je využito pro resyntézu TAG [49]. Jejich rychlejší transport a snazší oxidovatelnost vede při nahrazení části LCFA za MCFA v dietě ke snižování tělesné hmotnosti se zaměřením na snížení množství tělesného tuku [49]. Nicméně konzumace stravy s vysokým obsahem MCFA (38 %) se projeví zvýšenou produkcí ketolátek z přemíry produkovaného acetyl-CoA [50, 51]. Zvýšená hladina acetyl-CoA stimuluje produkci cytosolického malonyl-CoA potřebného pro *de-novo* syntézu mastných kyselin a pro elongaci mastných kyselin, což nastává pokud je kalorický příjem vyšší než energetická spotřeba organismu. Malonyl-CoA též snižuje aktivitu karnitin palmitoyl transferázy a tím inhibuje transport LCFA mastných kyselin do mitochondrie a jejich oxidaci [46]. Oba dva zmíněné faktory pak vedou ke zvýšení hladiny sérových TAG, celkového i LDL-cholesterolu. Klíčovým faktorem je množství přijímaných MCFA. Pokud je tento příjem nízký (do 10 % celkových kalorických potřeb) dochází ke snížení hladiny sérových TAG a cholesterolu [47]. Roku 1994 byl MCFA udělen GRAS status (*Generally Recognized As Safe*) americkou organizací FDA [52].

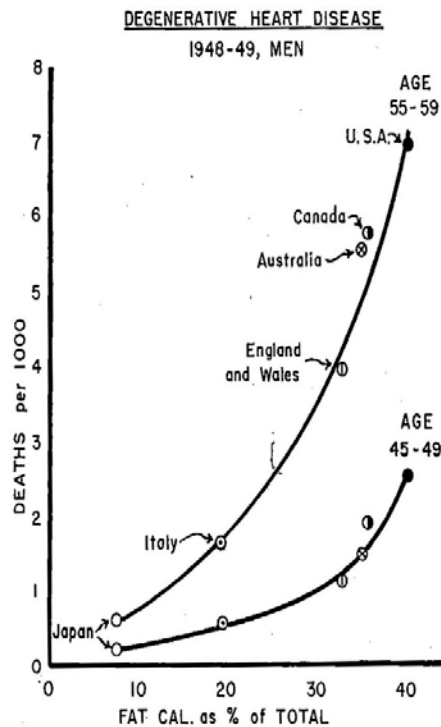
Volné mastné kyseliny ze skupiny MCFA mají společně s jejich monoacylglyceroly bakteristatické a baktericidní účinky [53]. U gram pozitivních bakterií baktericidní účinek MCFA stoupá s rostoucí délkou řetězce, zatímco u gram negativních byl pozorován obrácený efekt, což je způsobeno specifickou strukturou buněčné stěny. Monoacylglyceroly MCFA mají v porovnání s volnými MCFA několikanásobně silnější efekt [54]. Nejúčinnější z této skupiny je kyselina laurová, jejíž 10% roztok inhibuje růst *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, ale i gram negativních bakterií jako je *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli*. Inhibice jejich růstu je zhruba na stejné úrovni, jako aplikace 0,5% roztoku antibiotika ciprofloxacinu [55], čehož lze využít v medicíně i v potravinářství. Baktericidní efekt lze umocnit

kombinováním MCFA s látkami obsaženými v esenciálních olejích jako je karvakrol, eugenol a thymol [53]. Bakteriostatický či bakteriocidní účinek mají i volné mastné kyseliny z ostatních skupin jako LCFA, MUFA, PUFA, viz. podrobné review Desbois a Smith [56] shrnující i mechanismy působení.

1.4.3 LCFA (*Long Chain Fatty Acids*)

Jako mastné kyseliny s dlouhým řetězcem označujeme alifatické monokarboxylové kyseliny obsahující od 14 do 20 uhlíků. LCFA se dále dělí dle stupně nasycenosti na nasycené (SFA), mononenasycené (MUFA) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Nasycené či saturevané mastné kyseliny obsahují ve svém uhlovodíkové řetězci maximální počet atomů vodíku a tedy výhradně sigma vazby. Do skupiny SFA řadíme i výše zmíněné zástupce SCFA a MCFA. Ze samotné skupiny LCFA jde o kyselinu myristovou, palmitovou, stearovou a případně arachovou. První tři jmenované LCFA jsou hojně zastoupeny v přírodních tucích a olejích a tvoří 30 - 40 hmot. % mastných kyselin obsažených v lidských tkáních, kde jsou nejvíce zastoupeny 15 - 25 % kyselina palmitová a 10 - 20 % kyselina stearová [57]. Lidské mateřské mléko tyto mastné kyseliny obsahuje v hojném množství 40 - 60 % [58]. Nejvyšší zastoupení saturevaných LCFA je tradičně spojováno s vepřovým sádlem obsahujícím 40 % SFA s 27% podílem kyseliny palmitové. Nicméně ještě vyšší zastoupení saturevaných LCFA najdeme v másle (61 %) a dalších mléčných výrobcích [57].

Příjem potravy s vyšším podílem SFA ze skupiny LCFA je zhruba od 60. let minulého století spojován se vzestupem sérové hladiny celkového cholesterolu i jeho LDL frakce [59]. Vyšší hladina cholesterolu je od prvních experimentů na králících z počátku století [60] spojována se vznikem kardiovaskulárních onemocnění (CVD) [61, 62], která byla potvrzena v následných epidemiologických studiích. Spojitost mezi množstvím přijímaného tuku a mortalitou na CVD objevil Keys v roce 1953 [63], což vedlo k zformování dietních teorií propojujících množství tuku v dietě s hladinou plazmatického cholesterolu a s tím spojeným rizikem vzniku CVD.

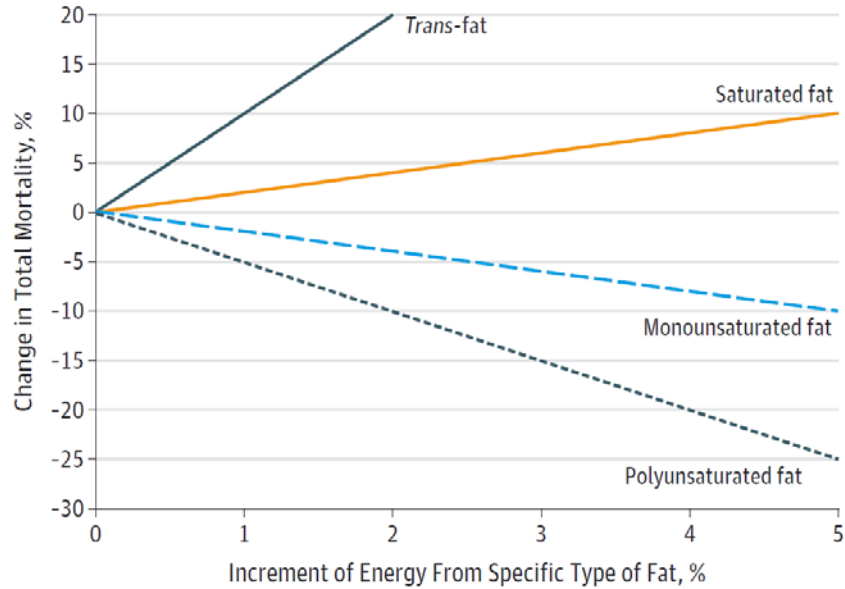


Obrázek 7. Vztah mezi mortalitou na CVD a procentuálním zastoupení tuku v energetickém příjmu dle článku Keys [63].

Následně Keys et al. zahájil *Studii Sedmi Zemí*, jednu z prvních mezikulturních prospektivních studií, která probíhala až do roku 1980. Výsledkem bylo odhalení vlivu tzv. Středomořské diety, vedoucí k nižší hladině cholesterolu a s tím spojené nižší incidenci CVD v Řecku a Itálii [64]. Nejnižší incidenci CVD i hladinu plazmatického cholesterolu mají ovšem Japonci, viz. Obr. 7. Od té doby se ovšem objevilo několik paradoxů ukazujících, že např. starší lidé (nad 60 let) s vyšší hladinou cholesterolu se dožívají vyššího věku, než lidé s nižší hladinou cholesterolu [65, 66]. Dále je tu paradox některých etnik, jako jsou Masajové, konzumující v průměru dvakrát tolik SFA ve své stravě než Američané a to s minimálním výskytem CVD [67]. Za podobný příklad platili po mnoho let Eskymáci, od nichž pochází též Eskymácká dieta s vysokým podílem tuků a proteinů, bohatá na omega-3 mastné kyseliny. Nicméně rešerše mnoha studií toto tvrzení vyvrací a ukazují, že Eskymáci mají stejný výskyt CVD jako ostatní populace [68, 69]. Tento zvrát je patrně způsoben změnou jejich stravy spojenou s výrazně zvýšeným podílem sacharidů. To dokumentuje i DiNicolantonio [70], který uvádí, že Eskymáci v roce 1885 konzumovali 2 - 8 % přijímaných kalorií ve formě sacharidů, přičemž v roce 1955 tento podíl činil již 40 %. V další letech se tento podíl

ještě navýšil a v současnosti tvoří hlavní část přijímaných sacharidů převážně rafinované sacharidy.

Zhruba v posledních dvou desetiletích se objevují studie, které vliv LCFA na hladinu cholesterolu zpochybňují. Volek et al. [71] v rešerši zmiňuje graf, ukazující závislost procentuálního příjmu energie ve formě SFA na hladině celkového plazmatického cholesterolu. Jelikož směrnice této závislosti má hodnotu pouhých 0,067 mmol/l cholesterolu / % kalorií v SFA, tak doporučené snížení SFA v přijímané stravě z 15 % na 10 % vede k poklesu plazmatického cholesterolu o pouhých 0,34 mmol/l [57]. Pokud se budeme zabývat vlivem jednotlivých nasycených LCFA, pak u kyseliny stearové bylo prokázáno, že její konzumace dokonce nemá žádný vliv na hladinu celkového cholesterolu v plazmě [72]. To je patrně zapříčiněno vysokou aktivitou enzymu $\Delta 9$ desaturázy, který kyselinu stearovou velmi rychle přemění na kyselinu olejovou (C18:1n9c) stimulující hepatocytární sekreci VLDL-TAG [73]. Přestože se pomalu ukazuje, že nelze všechny zástupce SFA posuzovat jako jednu skupinu, jejich vliv na CVD můžeme shrnout díky meta-analýze shrnující 21 studií trvajících 5 až 23 let, celkem čítající 347 741 subjektů, s prokázaným výskytem CVD u 11 006 subjektů [74]. Z této analýzy vyplynulo, že není žádný signifikantní důkaz vlivu konzumace SFA na zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění. Další dvě obdobné meta-analýzy, Chowdhury et al., 2014 [75] a de Souza et al., 2015 [76], tyto výsledky potvrzují. Je tedy důležitější, čím jsou SFA v dietě nahrazeny [77]. Budou-li nahrazeny *cis*-MUFA nebo ještě lépe *cis*-PUFA, bude riziko CVD klesat. Pokud budou nahrazeny sacharidy, bude toto riziko naopak stoupat. Záleží ovšem i na kvalitě sacharidů, kterými nahrazujeme. Pokud zvýšíme v dietě množství celozrnných produktů a vlákniny a snížíme množství rafinovaných sacharidů, bude to mít obdobně kladný dopad jako zvýšení *cis*-PUFA [78, 79]. Nejvyšší vzestup mortality, a to nejen na CVD, nastane při náhradě za *trans* mastné kyseliny (TFA) [80], viz. Obr. 8. Příjmu TFA je lépe se zcela vyhnout. Výše uvedené závěry se týkají pouze izokalorických diet. Při hyperkalorické dietě a nahrazení části SFA sacharidy, je kalorický přebytek transformován přes acetylkoenzym A na nově syntetizované FA s převahou kyseliny palmitové. Ve formě TAG jsou pak nově syntetizované mastné kyseliny transportovány a deponovány v tukové tkáni, ale též ve svalů či v játrech [57]. Stejný efekt má i konzumace alkoholu.



Obrázek 8. Změna celkové úmrtnosti ve vztahu ke zvýšení příjmu jednotlivých skupin FA v % z přijímaných kalorií. Převzato z kohortové studie Wang et al. [80].

Některé SFA jsou také používány pro acylace při posttranslačních modifikacích proteinů a při jejich aktivaci. Platí to pro kyselinu myristovou a kyselinu palmitovou při regulaci protein-proteinových a protein-membránových interakcí [73]. Kyselina myristová také reguluje bio-dostupnost některých PUFA, respektive má vliv na syntézu kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA) z esenciální α -linolenové kyseliny (ALA) ovlivněním aktivity enzymu $\Delta 6$ desaturázy. Nalezené optimum odpovídá 1,2% podílu na celkových kaloriích přijatých ve formě kyseliny myristové. Nižší i vyšší příjem kyseliny myristové vede k poklesu této aktivity [73]. Na krysách bylo prokázáno, že konzumace SFA společně s ALA vede k její výrazně vyšší inkorporaci do jaterní tkáně oproti kombinacím MUFA plus ALA či PUFA plus ALA [81]. Vyšší omezení SFA může přinést i nežádoucí účinky. Přes zpochybnění jejich vlivu na CVD zůstává dle odborníků v platnosti jejich vliv na zvýšení plazmatické hladiny TAG a LDL-cholesterolu. Vliv na hladinu LDL-cholesterolu, ale postupně klesá od kyseliny laurové až po kyselinu stearovou, jejíž efekt je téměř nulový [82]. Některé studie zmiňují, že vliv SFA na další markery rizika CVD spočívá spíše v přijímané formě. Multi-etnická studie čítající 5 209 dobrovolníků sledovaných po dobu 10 let odhalila rozdílný vliv SFA přijímaných z mléka a mléčných výrobků oproti příjmu z masa na riziko CVD [83]. SFA také regulují transkripce genů tím, že koaktivují SRBP

rodinu transkripčních faktorů vedoucích k transkripci syntázy mastných kyselin (FAS) a stearyl-CoA desaturázy (SCD-1) nebo dále přes „*toll-like receptor*“ (TLR-4) indukují zvýšení transkripčního faktoru NF- κ B vedoucího k aktivaci exprese cyklooxygenázy (COX-2) a dalších prozánětlivých cytokinů [73]. Výsledkem je systémový zánět nízké úrovně [57], který má návaznost na inzulínovou senzitivitu, obezitu [84] a metabolický syndrom [85]. Prozánětlivé postprandiální působení SFA mechanismem up-regulace prozánětlivých genů je shrnuto v review Rocha et al. [86]. V případě vysokotukové diety SFA snižují rozmanitost střevního mikrobiomu, což je zapříčiněno jejich obezogením působením, ale i inzulínovou rezistencí a systémovým zánětem nízké úrovně. Změna zastoupení kmenů bakterií je pozorovatelná při zvýšení podílu tuku a hlavně při navýšení SFA v dietě už v průběhu prvních 24 hodin. Jelikož trávicími enzymy a lipoproteinovou lipázou uvolněné FA přecházejí do distální části střeva, mohou díky svým baktericidním a bakteriostatickým účinkům měnit složení a snižovat rozmanitost střevního mikrobiomu. Všechny efekty spojené s konzumací různých typů FA a jejich vliv na mikrobiom jsou shrnuty v review Candido et al. [87]. Dle současného dietního doporučení by SFA měly tvořit méně než 10 % z celkového denního energetického příjmu vzhledem k prevenci CVD [88].

1.4.4 TFA (*Trans Fatty Acids*)

Mezi trans mastné kyseliny řadíme všechny mastné kyseliny mající alespoň jednu dvojnou vazbu v konfiguraci *trans*, a to s výjimkou konjugovaných mastných kyselin. Nejvíce zastoupenou skupinou jsou *trans* izomery kyseliny oktadecenové (C18:1) pocházející z přírodních i průmyslových zdrojů. Přírodním zdrojem TFA je zejména mléko a maso přežvýkavců a potraviny z nich vyrobené. Hlavním průmyslovým zdrojem je výroba ztužených tuků technikou částečné hydrogenace rostlinných olejů [89]. Ty se většinou nepoužívají k výrobě roztíratelných a pokrmových tuků, nicméně mohou být použity pro výrobu náhražek čokolády, polev a oplatek. TFA vznikají také při přípravě potravin, kde jde především o smažení a fritování při teplotách nad 150 °C vedoucí k transformaci *cis* izomerů na *trans* [90]. S prodlužujícím se časem a opakováním těchto procesů se obsah TFA postupně zvyšuje [91, 92]. Škodlivý vliv TFA na lidské zdraví poprvé zaznamenal Mensink a Katan [93], jejichž studie prokázala

změny hladiny LDL a HDL-cholesterolu při třítydenní stravě v níž 10 % energetického příjmu tvořily právě TFA. Následná studie z roku 1993 dala do souvislosti zvýšený přísun TFA pocházející z hydrogenovaných rostlinných olejů konzumovaných ve formě margarínů se zvýšeným výskytem kardiovaskulárních onemocnění u zdravotních sester [94]. Spektrum jejich účinků se postupně rozšířilo a upřesnilo a je shrnuto v review Mozaffarian et al. [95]. Nejvíce je zmiňován vliv TFA na zvýšení hladiny LDL-cholesterolu, snížení hladiny HDL-cholesterolu, prozánětlivý efekt spojený s produkcí některých cytokinů, vznik endoteliální disfunkce a zhoršení inzulínové rezistence. Snížení hladiny TFA v potravě vede k snížení výskytu srdečně cévních onemocnění [76], metabolického syndromu a DM. Z těchto důvodů vydala WHO v roce 2003 doporučení, aby příjem TFA tvořil méně jak 1 % celkového energetického příjmu. Americká agentura FDA v roce 2015 odejmula částečně hydrogenovaným rostlinným olejům (PHVO) tzv. GRAS status a do 18. června 2018 museli výrobci zabezpečit, že nebudou používány při výrobě potravin. V Evropě mají legislativně stanovené limity pro TFA pouze některé státy. U nás tak platí pouze vágní dietní doporučení vydané v roce 2009 agenturou EFSA (*European Food Safety Authority*), dle kterého má být hladina přijímaných TFA co nejnižší.

1.4.5 MUFA (*Monounsaturated Fatty Acids*)

Od prvních dietních změn regulujících pouze množství tuku v potravě v návaznosti na výskyt onemocnění či na mortalitu, jsme se posunuli přes vliv na hladinu cholesterolu a jeho transportní formy, k vlivu skupin mastných kyselin na vznik systémového zánětu nízké úrovně, který je spouštěcím faktorem civilizačních nemocí. Skupiny FA, které by měly nahrazovat nežádoucí TFA či omezovat zastoupení SFA, jsou právě nenasycené MUFA a PUFA [77]. MUFA jsou součástí dobře známé „Středomořské diety“, kde jejich zastoupení odpovídá 16 - 29 % přijímané energie. Jejich hlavním zdrojem je v těchto oblastech olivový olej tvořený ze 73 % kyselinou olejovou, jehož protizánětlivé, anti-aterogenní a kardioprotektivní účinky jsou dobře známy [96, 97]. Nicméně je nutné zmínit, že kladné účinky částečně přísluší i dalším látkám jako jsou polyfenoly a tokoferoly [98, 99]. MUFA mají příznivý vliv na profil sérových lipoproteinů i když jejich přímý vliv na riziko CVD je omezený a liší se studii

od studie, což shrnuje Joris a Mensink [100]. Souhrnně lze konstatovat, že nahrazení SFA za MUFA snižuje riziko vzniku metabolického syndromu [85] a diabetu mellitu 2. typu [101].

1.4.6 PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acids*)

Skupina PUFA je nejčastěji dělena na omega-3 a omega-6 FA dle pořadí uhlíku od methylenového konce (omega-konce), na kterém se vyskytuje první dvojná vazba. Obě skupiny jsou duplicitně značeny také jako n-3 a n-6. Do skupiny omega-6 PUFA patří kyselina linolová, která je pro člověka esenciální. Druhým důležitým zástupcem je kyselina arachidonová, která je prekurzorem pro syntézu eikosanoidů. Do skupiny omega-3 spadá kyselina α -linolenová (ALA), která je pro člověka druhou esenciální FA. Dále rozeznáváme skupinu PUFA s dlouhým řetězcem (LCPUFA), jejímiž nejcitovanějšími zástupci je kyselina eikosapentaenová (EPA) jako další prekurzor eikosanoidů a kyselina dokosaheptaenová (DHA) jako prekurzor maresinů a neuroprotektinů. Účinky celé této skupiny FA lze rozdělit do několika oblastí, které jsou často stále ještě předmětem výzkumu. Jde o vliv na kardiovaskulární onemocnění (CVD), nealkoholickou jaterní steatózu (NAFLD), metabolický syndrom (MetS) a diabetes 2. typu (T2D), neurodegenerativní a duševní onemocnění a vliv na zánět a zánětlivá onemocnění. Tyto oblasti se velmi prolínají a samotný zánět je do určité míry spojuje. Podobně je to se vztahem k nádorovému bujení, neboť některé eikosanoidy ovlivňují proliferaci a adhezi buněk. Nicméně i přes tyto známé mechanismy vychází výsledky 60ti studií shrnutých v review Schwab et al. [102] jako zamítavé či neprůkazné pro různé typy nádorů s výjimkou karcinomu prostaty, kde je částečně prokázána inverzní korelace s příjmem ALA a karcinomu ovarií, u kterého byla zjištěna částečně pozitivní korelace s příjmem SFA.

1.4.6.1 PUFA versus CVD

PUFA mají ze všech přijímaných FA nejvyšší schopnost snižovat hladinu celkového cholesterolu a sérových TAG [103, 104]. Zvýšení podílu PUFA na úkor SFA

vede ke snížení výskytu onemocnění srdce a krevního oběhu (CHD) [82] a snížení rizika CVD [75]. Zároveň tato záměna vede ke snížení celkové mortality, viz. Obr. 8 z článku Wang et al., 2016 [80]. Meta-analýza prospektivních kohortových studií zabývajících se vlivem kyseliny linolové (LA) na snížení rizika výskytu CHD o 15 % a pokles rizika úmrtí na CHD o 21 % [105]. Tyto závěry potvrzuje i meta-studie z roku 2019, která kromě nižšího rizika úmrtí na CVD o 23 % vlivem LA, vyvrací vliv kyseliny arachidonové, která je obecně prekurzorem prozánětlivých a prosrážecích cytokinů. Přesto kyselina arachidonová nemá vliv na výskyt CVD nebo dokonce riziko CVD snižuje [106]. PUFA s dlouhým řetězcem z podskupiny n-3 mají preventivní účinek při srdeční arytmií. Z membrány kardiomyocytů jsou uvolňovány při hypoxii, kde ovlivňují formování lipidových raftů a tím působí na iontové kanály. To navenek vede k usnadnění synchronizace kardiomyocytů při kontrakci a to hlavně při reperfúzi po hypoxických stavech. Tímto mechanismem by EPA a především DHA měly snižovat míru poškození a počet úmrtí při srdečním infarktu [107]. Zastoupení DHA v membráně kardiomyocytů je 5 - 10krát vyšší než zastoupení EPA a 2 - 3krát vyšší než zastoupení další n-3 FA, kterou je kyselina dokosapentaenová [108]. Nicméně i zde existují studie s neprůkaznými [109] či zamítavými závěry vlivu omega-3 FA na CVD [110, 111].

1.4.6.2 PUFA versus NAFLD

Nealkoholická jaterní steatóza je definována jako stav, kdy obsah tuku ve formě TAG v hepatocytech je vyšší než 5 %. Toto onemocnění často nemá žádné negativní projevy ani vliv na plazmatickou aktivitu jaterních enzymů (ALT, AST, GGT). Nicméně může s aktivací zánětu přejít v nealkoholickou jaterní steato-hepatitidu (NASH), která může vést až k jaternímu selhání. Zároveň je NAFLD spojeno s vyšším rizikem úmrtí na CVD a rizikem vzniku jaterního karcinomu [112]. Odhad celosvětové prevalence tohoto onemocnění je až 25,2 % [113]. Množství jaterního tuku může být sníženo zvýšením fyzické aktivity a úpravou stravy obsahující více PUFA než SFA [114]. Jako vysoce benefitní se i v tomto případě ukazuje účinek LCPUFA, jako jsou EPA a DHA, které kromě snížení jaterního tuku modulují zánětlivé procesy a tím brzdí společně s dalšími látkami (vitamín E, D, polyfenoly aj.) progresi onemocnění [115],

což potvrzují i provedené meta-studie [116, 117]. Příčinu vzniku NAFLD lze rozdělit na genetickou a metabolickou. Některé příznaky metabolické formy, jako obezita či porušený glukózový metabolismus, jsou charakteristické pro metabolický syndrom (MetS).

1.4.6.3 PUFA versus MetS a T2D

MetS je sdružením skupiny 4 onemocnění: obezity, dislipidemie, hypertenze a porušeného glukózového metabolismu, a z tohoto důvodu je úzce spjatý s NAFLD a T2D. Nahrazením SFA za MUFA nebo PUFA lze prokazatelně snížit riziko vzniku MetS. Zvláště n-3 PUFA mají nejvyšší schopnost snižovat hladinu TAG a celkového cholesterolu, zvyšovat hladinu HDL-cholesterolu a aktivovat lipidový metabolismus [85, 118]. Porušený glukózový metabolismus v podobě inzulínové rezistence (IR) je jedním ze spojovacích článků a zároveň předstupu T2D. PUFA, dle meta-analýzy Qian et al. [101], vedou ke snížení glykémie nalačno o 0,87 mmol/l. Konzumace rybiho oleje, bohatého na n-3 PUFA, snižuje HOMA-index, který slouží k posouzení IR. Podobně dochází ke snížení hladiny glykovaného hemoglobinu A1c a to vše po 30ti denní intervenci. Metaanalýza sledující vliv PUFA rostlinného původu, bez rozlišení na n-3 a n-6, potvrzuje snížení hladiny inzulínu nalačno a snížení HOMA-indexu, nicméně bez ovlivnění glykémie. Schwab et al. [102] v systematickém review zmiňuje inverzní korelaci mezi hladinou LA v tkáních a výskytem T2D dle 4 publikací. Podobná spojitost byla nalezena i v novější studii z roku 2019 u Američanů při porovnání příjmu LA versus příjem SFA, TFA a sacharidů [119]. Podávání samotné ALA zvyšuje inzulínovou senzitivitu a hladinu adiponektinu [118]. Meta-analýza 24 studií zahrnujících 24 509 pacientu s T2D s celkovým počtem 545 275 účastníků asijského původu, provedená Zheng et al. [120] potvrdila, že n-3 PUFA mořského původu vykazují příznivý efekt při prevenci T2D. Snižování glykémie může být vysvětleno zvýšením počtu GLUT-4 transportérů v tukové tkáni, jako následek zvýšení produkce adiponektinu [121] a to mechanismem ovlivněním PPAR alfa a gama receptorů právě pomocí n-3 PUFA stimulačních expresi genů pro adiponektin [122]. Abbott et al. [123] zmiňuje rozdílný efekt n-3 PUFA mezi pohlavími, kdy jejich konzumace snižuje inzulínovou rezistenci u žen ale u mužů nikoliv. Review Tortosa-Caparros et al. [121]

tento efekt také zmiňuje ve vazbě na hladinu adiponektinu, kdy jedna z citovaných prací uvádí vzestup adiponektinu u žen, korelující s příjmem EPA, DHA a Σ n-3 PUFA, zatímco u mužů byla nalezena korelace pouze s množstvím přijímané EPA. Nicméně pokles TAG byl pozorovaný u obou pohlaví. Některé z novějších studií efekt n-3 PUFA na pacienty s T2D zpochybňují [124, 125]. Meta-studie Telle-Hansen et al. [126] uvádí, že jedna polovina z analyzovaných studií přichází s pozitivním efektem na pacienty s T2D a zatímco druhá polovina tento vliv zpochybňuje či vyvrací. Dále zmiňuje, že důvodem této nekonzistence je patrně volba kontrolní skupiny a použití různých n-3 PUFA.

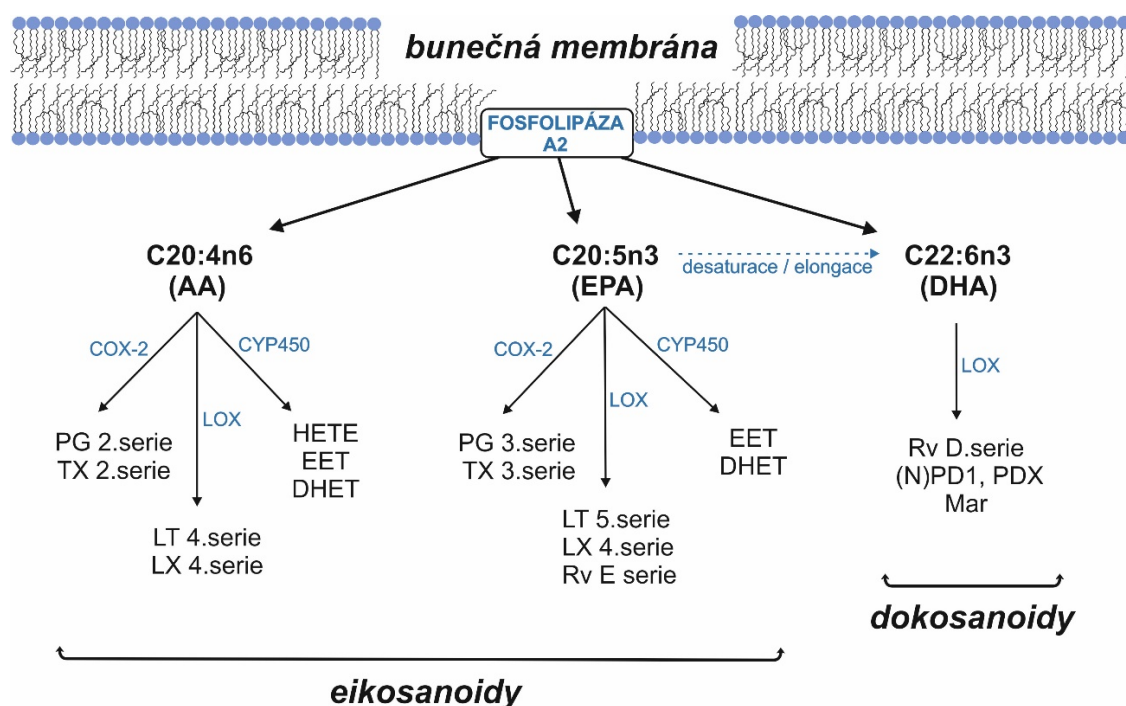
1.4.6.4 PUFA versus nervová tkáň

Po tukové tkáni je mozek druhým místem s nevyšším zastoupením lipidů. LCPUFA z nich tvoří zhruba 35 % [127]. Jde převážně o DHA, která je kromě membrán nervových buněk hojně inkorporována i do mitochondriální membrány, kde je nezbytná pro oxidativní fosforylaci. Její efekt spočívá zřejmě v udržení fluidity mitochondriální membrány, která obsahuje více proteinových komplexů, než je v membránách ostatních organel. DHA zde usnadňuje pohyb mobilních komponent dýchacího řetězce a zároveň je velice citlivým substrátem pro oxidaci způsobenou reaktivními kyslíkovými částicemi (ROS) uniklými z komplexu IV. DHA je prekurzorem pro tvorbu neuroprotektinů jako je NPD1 a PDX [128], které mají protizánětlivé neuroprotektivní účinky. Tvorba těchto neuroprotektinů může vysvětlovat spojení snížené hladiny DHA se snížením kognitivních funkcí [129]. Z DHA produkovaný NPD1 navíc prokázal schopnost snižovat produkci amyloidu β 42, inhibicí enzymů β a γ -sekretázy [130, 131]. Tento efekt může být důležitý pro prevenci a léčbu Alzheimerovy choroby, demence a pro tzv. úspěšné stárnutí. Spojení se stárnutím spočívá mimo stoupajícího rizika výskytu neurodegenerace s aktivitou enzymu Δ 6 desaturázy, která klesá s věkem [130, 132], což vede ke snížení endogenní produkce LCPUFA a tedy i NPD1. Suplementace DHA má protektivní účinek i pro vznik Parkinsonovy choroby, u které vyšší hladina DHA ochraňuje dopaminergní neurony v „*substantia nigra*“. Samotný vznik Parkinsonovy choroby je pravděpodobně iniciován volnými radikály [131] a mitochondriální disfunkcí [127]. Volné radikály aktivují

nukleární faktor NF- κ B, který zvyšuje produkci cyklooxygenázy 2 (COX-2) tvořící prozánětlivé mediátory. DHA potlačuje aktivaci NF- κ B a zároveň zvyšuje expresi neurotrofického faktoru (GDNF) a neurturinu [129, 131]. Snížená hladina DHA v plasmě, či lépe v erythrocytech, je zaznamenána i u pacientů s depresí [133] a bipolární poruchou [132, 134]. Supplementace 1000 mg n-3 PUFA po tři měsíce, vedla u těchto pacientů ke snížení závažnosti manických epizod [134].

1.4.6.5 PUFA versus zánět a zánětlivá onemocnění.

Obě dvě skupiny PUFA hrají důležitou roli při vzniku, rozvíjení, modulaci a zastavení zánětlivých procesů. Látky produkované z AA a EPA uvolněných fosfolipázou A z membrány buněk se souhrnně nazývají eikosanoidy, zatímco z uvolněné DHA jsou produkovány dokosanoidy, viz. Obr. 9.



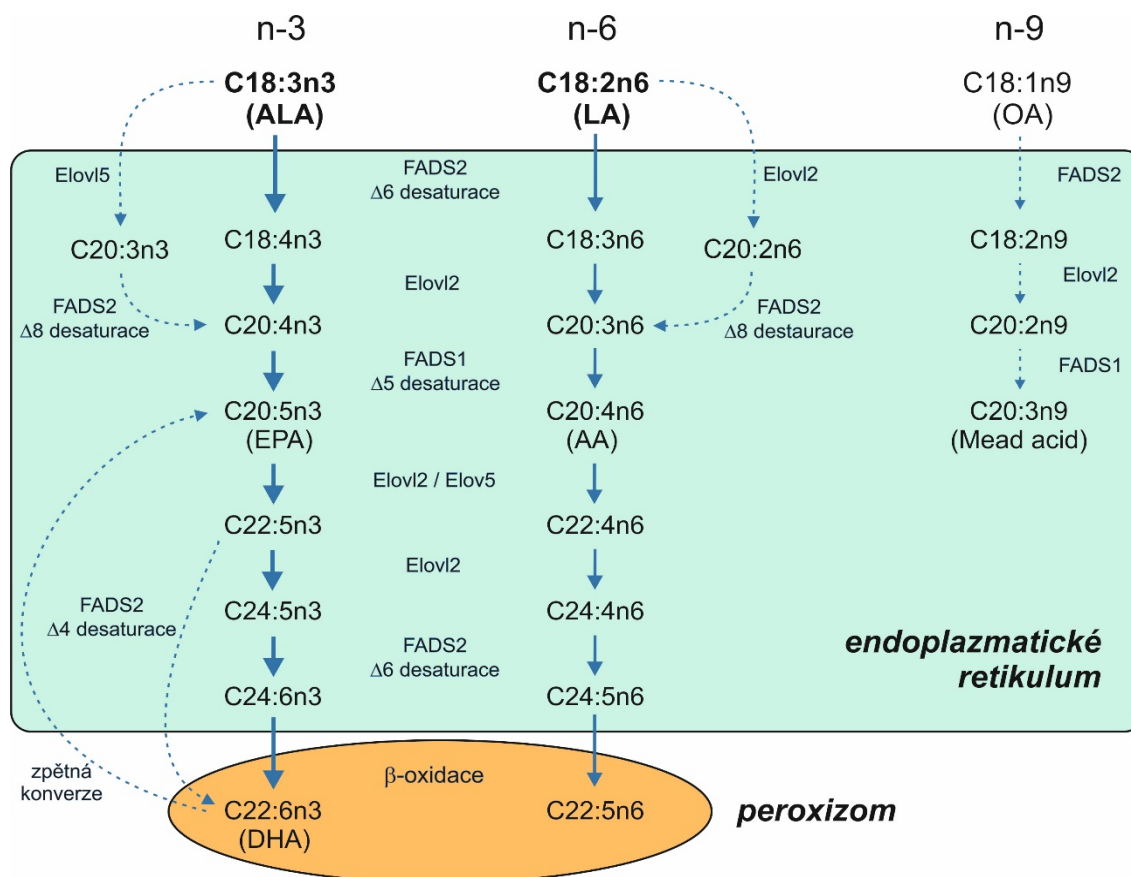
Obrázek 9. Přehled eikosanoidů a dokosanoidů produkovaných z AA, EPA a DHA. PG, prostaglandiny; TX, tromboxany; LT, leukotrieny; LX, lipoxíny; Rv, resolvíny; (N)PD, (neuro)protektíny; Mar, maresíny; EET, epoxyeikosatrienová kyselina; HETE, hydroxyeikosatetraenová kyselina, DHET, dihydroxyeikosatrienová kyselina; COX-2, cyklooxygenáza 2; LOX, lipoxygenáza; CYP450, cytochrom P450 [128, 129, 135, 138]

Syntéza těchto látek probíhá za pomoci enzymů cyklooxygenázy (COX), lipoxygenázy (LOX) a cytochromů P450 (CYP450). Mezi eikosanoidy patří prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny a lipoxíny a některé další dvacetihlíkaté deriváty jako HETE, EET, DHET. Tyto látky slouží jako komunikační molekuly ovlivňující jednotlivé fáze zánětu, který je přirozenou obrannou reakcí organismu. Pokud je však tato fyziologická reakce chybně spouštěna či nesprávně řízena a protahována, vznikají onemocnění jako je revmatoidní artritida, zánětlivá onemocnění střev či astma [135, 136]. Dříve byly eikosanoidy produkované z AA považovány souhrnně za prozánětlivé a eikosanoidy vzniklé z EPA za protizánětlivé. Toto zjednodušení je značně nepřesné, jelikož prostaglandiny derivované z AA sice zánět indukují, ale zároveň tlumí produkci prozánětlivých leukotrienů a indukují syntézu protizánětlivých lipoxínů, čímž modulují intenzitu a trvání zánětlivého procesu [137]. Oproti tomu eikosanoidy syntetizované z EPA jsou považovány za protizánětlivé pro svou nižší biologickou účinnost. V případě srovnání LT B₄ (z AA) a LT B₅ (z EPA) je to až 10krát nižší účinnost [136]. Zároveň jsou z EPA a DHA syntetizovány látky označované v literatuře souhrnně jako „specializované pro-vstřebávací či pro-rezoluční mediátory“ (SPM), kam patří lipoxíny a resolviny-E syntetizované z EPA, resolviny-D syntetizované z DHA, protektiny a maresíny vytvářené též z DHA. Tyto molekuly se uplatňují v pozdějších fázích zánětlivého procesu a jejich úkolem je jeho „vyřešení“, ukončení a vstřebání. Na této konečné fázi zánětu se podílí hlavně maresíny, které zastavují infiltraci tkáně polymorfonukleárními leukocyty a zvyšují fagocytózu a efferocytózu prováděnou makrofágy [139]. Kromě produkce výše zmíněných SPM je mechanismů protizánětlivého působení n-3 PUFA hned několik. Od prostého snížení dostupnosti substrátu, tedy AA v membráně, přes tvorbu slaběji účinných eikosanoidů z podobného substrátu kterým je EPA, inhibici prozánětlivého faktoru NF- κ B [84], snížení hladiny některých interleukinů (IL-1 a IL-6) a TNF α až po pouhé ovlivnění fluidity buněčné membrány a s tím spojený vliv na membránové receptory jako je TLR-4, GPR120 [121, 135].

1.4.7 Degradace a syntéza FA

Oxidace aktivovaných FA s krátkým, středně dlouhým, a dlouhým řetězcem probíhá převážně v mitochondriích v dráze zvané Lynenova spirála či β -oxidace. Velmi dlouhé FA jsou metabolizovány v peroxizomech též β -oxidací, která je ale katalyzovaná jinými enzymy. Vedle toho existují dvě minoritní dráhy probíhající v endoplazmatickém retikulu účinkem monooxygenáz. A to α -oxidace, která slouží jednak k odstranění rozvětvených FA jako je kyselina fytanová vznikající degradací chlorofylu a také k produkci hydroxylovaných FA pro syntézu sfingolipidů. Druhou minoritní drahou je ω -oxidace vedoucí ke vzniku dikarboxylových kyselin [140].

Syntéza mastných kyselin je lokalizována v cytoplasmě s nejvyšší aktivitou u hepatocytů, kde enzym syntáza mastných kyselin ukončuje syntézu vytvořením kyseliny palmitové. Další změny vzniklého řetězce probíhají na nebo v endoplazmatickém retikulu, kde je řetězec FA prodlužován účinkem elongáz nebo dehydrogenován působením desaturáz. Lidské buňky obsahují několik desaturáz a to stearyl-koenzym A desaturázu (SCD), která vytváří MUFA z SFA o délce 12 - 20 uhlíků s dvojnou vazbou na uhlíku číslo 9. Jde tedy o $\Delta 9$ desaturázu. SCD syntetizuje v těle hojně zastoupenou kyselinu olejovou, ale též C16:1n7 [107]. Dále jsou to desaturázy z genetické rodiny FADS a to FADS1 označovaná jako $\Delta 5$ desaturáza a FADS2 označovaná jako $\Delta 6$ desaturáza, která vykazuje i aktivitu $\Delta 8$ a $\Delta 4$ desaturázy [141, 142]. Kromě syntézy PUFA, FADS2 dehydrogenuje kyselinu palmitovou na kyselinu sapienovou (C16:1n10) vytvářenou v mazových žlázách [142]. Poslední z této rodiny je FADS3, jejíž aktivita je nejméně prozkoumaná [143]. FADS desaturázy produkují vysoce nenasycené mastné kyseliny (HUFA) sloužící jako prekurzory pro tvorbu signálních molekul [107], viz. Obr. 9. U jednobuněčných organismů, rostlin a některých ryb slouží HUFA k adaptaci na nízkou teplotu pro udržení fluidity buněčné membrány. Rostliny díky účinkům $\Delta 12$, $\Delta 15$ a $\omega 3$ desaturáz vytváří z kyseliny stearové kyselinu linolovou (LA) a α -linolenovou (ALA). Savci nejsou schopni vytvořit dvojnou vazbu v řetězci FA za devátým uhlíkem od karboxylu a dále, čímž je u nich znemožněna i přeměna z n-6 na n-3 FA. Proto je LA i ALA pro člověka esenciální a je nutné je přijímat v potravě.



Obrázek 10. Syntéza dalších n-3 a n-6 PUFA z esenciálních FA včetně elongace a desaturace C18:1n9 při jejich nedostatku. Minoritní dráhy jsou zakresleny čerchovaně. Pořadí afinity FA k uvedeným enzymům je n-3 > n-6 > n-9. FADS2, Δ6 desaturáza (Δ8 a Δ4 desaturáza); FADS1, Δ5 desaturáza; Elovl2, Elovl5, elongázy [107, 137, 141, 142, 147]

Deficit LA se projeví suchou strupovitou kůží, dermatitidou, nižším vzrůstem u kojenců a dětí, zvýšenou náchylností k infekcím a špatným hojením ran. LA je potřebná pro syntézu ceramidů přítomných v pokožce a její nedostatek vede k velké ztrátě vody kůží [107]. Z LA je v těle syntetizována kyselina arachidonová (ARA), ale endogenní produkce je velmi pomalá a v období rychlého růstu musí být dodávána potravou (maso, vejce). Je tedy považována za semi-esenciální. Nedostatek ARA je spojen se závažnou potravinovou intolerancí a zpomalením růstu [107]. Oproti tomu ALA je důležitá pro syntézu dalších PUFA s dlouhým řetězcem jako je EPA a DHA, které by vzhledem k pomalé syntéze mohly být také považovány za semi-esenciální [144]. U zdravých mladých mužů je zhruba 8 % přijaté ALA konvertováno na EPA [145]. U žen

je tato konverze vyšší a odpovídá 21 % [146]. Většina studií shrnutých v článku Domenichiello et al. [147] ukazuje, že méně než 1 % ALA se přeměňuje na DHA. Vysoká koncentrace DHA se nalézá v sítnici a mozku. Nicméně u krys je prokázána 3krát vyšší produkce DHA v játrech, než je její spotřeba v mozku. Odhad denní spotřeby DHA v lidském mozku dospělého jedince je 2,4 - 3,8 mg [127] a její dostatečný příjem je důležitý hlavně v těhotenství, u kojenců a dětí, jelikož má vliv na vývoj zraku, tvorbu neuronů a kognitivní funkce. Vysoké zastoupení DHA je také ve vnitřní mitochondriální membráně, zde je ale její hladina neustále snižována unikajícími ROS z oxidativní fosforylace [127]. Exogenně přijaté esenciální FA v následných přeměnách kompetují o stejné enzymy, viz. Obr. 10. Přestože $\Delta 6$ desaturáza preferuje n-3 FA oproti n-6 nebo n-9 FA, může zvýšený příjem LA snížit endogenní produkci EPA a DHA [129]. EPA a ARA jsou důležité pro tvorbu eikosanoidů majících vliv na dilataci cév, agregaci krevních destiček a rozvoj zánětu [108].

1.4.8 Zdroje omega-3 FA

Omega-3 FA a zvláště ty s dlouhým řetězcem jako EPA a DHA jsou vysoce benefiční a v určitých směrech protektivní. Zdrojem omega-3 LCPUFA jsou hlavně mořské ryby [108, 132, 138, 148], kryl [149] a mikrořasy [150-152], podrobný přehled viz. Tabulka 4. Cardoso et al. [132] uvádí množství přijímané DHA v západní stravě přibližně 100 mg / den, z toho nejvyšší podíl tvoří ryby a mořské plody 70 mg, maso a masné výrobky 19,6 mg, vejce a vaječné výrobky 5,1 mg. Přičemž doporučené hodnoty konzumace EPA a DHA se pohybují v rozsahu 250 - 500 mg / den [130, 132, 144, 148]. Dle doporučení EFSA z roku 2015 je tedy vhodné konzumovat 1 až 2 jídla obsahující 150 - 300 g ryb pro dosažení spodní hranice uvedeného intervalu. Negativním faktorem při konzumaci ryb a mořských produktů je jejich kontaminace metyl-rtuťí. Přesto benefity plynoucí z konzumace potravin z těchto zdrojů převažují nad negativy a to až do 4 jídel týdně [148]. Zároveň jsou hledány nové způsoby pro doplnění LCPUFA do našeho jídelníčku, než v podobě potravinových doplňků s obsahem rybího oleje, který obsahuje přibližně 18 % EPA a 12 % DHA. Vyšší zastoupení mají chemicky vyráběné koncentráty [153]. Důležité je omezit oděr rybího oleje, který je pro některé jedince téměř nepřekonatelný. Krom jeho podávání ve formě kapslí je jednou z možností

použití prekurzoru, který nemá tyto organoleptické vlastnosti. Tím je kyselina stearidonová (C18:4n3), ze které jsou n-3 LCPUFA syntetizovány efektivněji než z ALA. Další možností je chov hospodářských zvířat krmných směsí obsahující omega-3 FA rostlinného původu, jako je např. lněné semínko. Při dostatečné dávce ALA by u těchto živočichů mělo docházet i k elongaci a desaturaci na n-3 LCPUFA. K přípravě krmných směsí lze využít i některé řasy produkující přímo LCPUFA [150-152]. Tímto způsobem tedy lze z vykrmovaných zvířat přímo získávat produkty obohacené o omega-3 FA, jako je kuřecí maso či vejce. Nevýhodou je nižší organoleptická kvalita a nižší stabilita vůči oxidaci u získaných produktů [144], kterou lze zvýšit např. zahrnutím vitamínu E do krmné směsi. Obdobným způsobem lze získat kapra [154] i hovězí maso [155] se zvýšeným obsahem omega-3 FA.

Tabulka 4. Zastoupení n-3 PUFA s dlouhým řetězcem (EPA + DHA) v mg / 100 g a metyl rtuti (Me-Hg) v µg / 100 g v rybách a dalších zdrojích.

	n-3 LCPUFA	DHA	Me-Hg
tuňák	2806 (862*)	629*	29,0
makrela	2504		10,7
sleď	2482		3,6
sardel	2055*	1292*	
losos - farmový	1966*	1104*	
losos	1815	1429*	3,3
sardinky	982*	509*	
pstruh	936*	677*	
tuňák žlutoploutvý	862*	629*	
slávky	782*	506*	
síh	750		8,5
žralok	689*	431*	
štikozubec (hejk)	679		13,6
humr	515 (195*)	78*	30,2
ústřice - divoké	484*	210*	
cejn	467		22,5
platýs	403 (300*)	132*	6,4

makrela královská	401*	227*	
oliheň	350		4,6
tuňák pruhovaný	328*	237*	
kapr	296		5,5
kanic	248*	213*	
treska	245		9,4
okoun	175		16,5
<hr/>			
vejce	58*	58*	
kuřecí prsa	30*	20*	
hovězí	3*	1*	
vepřové	2*	2*	

pozn. hodnoty přejeté ze zprávy EFSA [148]; * hodnoty Mozaffarian a Wu [108]

1.4.9 Monitorování nedostatku n-3 a n-6 PUFA

Jelikož omega-3, omega-6 a omega-9 jsou dále desaturovány stejnými enzymy, dochází ke kompetici o aktivní místa uvedených enzymů. Desaturázy $\Delta 6$ a $\Delta 5$ přirozeně preferují FA v následujícím pořadí: n-3 > n-6 > n-9, což se projeví při deficitu kyseliny linolové a α -linolenové vzestupem koncentrace kyseliny C20:3n9 označované jako "*Mead acid*" [156], viz. Obr. 10. Poměr C20:3n9 / ARA > 0,2 je obecně považován za důkaz deficitu esenciálních FA [137]. Pro sledování deficitu esenciálních FA u kojenců navrhl Fokkema et al. [157] sledovat jak hladinu C20:3n9, která by měla být v erythrocytech < 0,46 mol. %, tak poměr C20:5n6/ARA a C22:5n6/DHA. C20:5n6/ARA vypovídá o deficitu omega-3 FA a jeho hraniční hodnota by měla být menší než 0,068. C22:5n6/DHA pak vypovídá o deficitu samotné DHA, např. v případě peroxizomální poruchy a jeho hodnota by měla být menší než 0,48.

Dříve byl u PUFA sledován a vyhodnocován poměr Σ n-6 FA/ Σ n-3 FA a v některých publikacích je zmiňována jeho optimální hodnota pohybující se v rozmezí 1:1 až 5:1, při které dochází k redukci exprese genů spojených se syntézou lipidů a k potlačení produkce zánětlivých cytokinů [121]. Jak uvádí Harris [158] je tento poměr dosti zavádějící a částečně založený na chybných a již vyvrácených předpokladech.

Problémem není přítomnost n-6 PUFA, ale nedostatečná konzumace n-3 PUFA v západní stravě a to především n-3 LCPUFA.

Nástupcem uvedeného poměru má být pro 21. století tzv. omega-3 index. Ten je součtem procentuálního zastoupení DHA a EPA v membránách erytrocytů. Zastoupení těchto FA koreluje s jejich výskytem v srdeční svalovině a některé observační studie tak spojují pokles omega-3 indexu s nárůstem rizika úmrtí na CHD. Za vysoce rizikový se považuje omega-3 index < 4 %; 4 - 8 % odpovídá střednímu riziku a omega-3 index > 8 % znamená nízké riziko CHD. Ovšem pouze z pohledu dostatku DHA a EPA [137, 159].

Z časového úhlu pohledu lze sledovat zmíněné FA v krevní plazmě či séru, v erytrocytech a v tukové tkáni. Zastoupení FA v krevní plazmě je svázáno s aktuálně přijatou dávkou nebo odráží příjem FA za posledních několik dní [160]. Zastoupení FA v membránách erytrocytů je vhodným dlouhodobým markerem s horizontem kolem 120 dnů [160, 161], který dobře odráží zastoupení FA v dalších tkáních jako jsou játra, srdce či ledviny [153]. Nicméně jak uvádí Domenichiello et al. [147], dle výsledků pokusu na krysách, hladina v erytrocytech nemusí odrážet koncentraci DHA v mozku. Tuková tkáň je pak matricí, v níž lze sledovat příjem daných FA v nejdelším horizontu [162]. Byť každá z těchto matric je trochu selektivní k některým FA, např. zastoupení n-3 LCPUFA v tukové tkáni je velmi nízké a celkový obsah DHA v tukové tkáni dospělého člověka je odhadován na pouhých 20 - 50 g [147].

2 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Pro projekt TAČR, TA03011027, s názvem: „Mikrořasy jako perspektivní zdroj omega-3 nenasycených mastných kyselin a jejich inkorporace do potravního řetězce člověka“ bylo provedeno stanovení profilu mastných kyselin v lidské krevní plazmě a ve fosfolipidech krevních buněk. Dobrovolníci se po 8 týdnů stravovali kuřecím masem a vejci obohacenými o omega-3 mastné kyseliny. Kontrolní skupina se stravovala běžným kuřecím masem a běžnými vejci a dílčím cílem bylo dokumentovat změnu v zastoupení omega-3 FA.

V rámci grantového projektu AZV, NT14416, s názvem: „Vliv větvených aminokyselin a satureovaných mastných kyselin na rozvoj inzulínové rezistence“ byl za využití GC s FID stanoven základní profil mastných kyselin ve frakci FFA krevní plazmy, ve fosfolipidech erytrocytů a v tukové tkáni skupiny veganů a omnivorů. Naším samostatným cílem bylo vypracovat metodu detailního stanovení *trans* mastných kyselin (TFA) v tukové tkáni. Vytvořená metoda byla dále aplikována i na vzorky mateřského mléka za účelem stanovení procentuálního zastoupení TFA.

Cíle lze shrnout do těchto bodů:

- 1) stanovit a porovnat profil celkových FA krevní plazmy a fosfolipidů krevních buněk u kontrolní a testovací skupiny před a po dietní intervenci (studie OMEGA)
- 2) stanovit a porovnat profil FA frakce FFA krevní plazmy a fosfolipidů krevních buněk mezi skupinou veganů a omnivorů, a před a po dietní intervenci rozvětvenými aminokyselinami (studie VEGGIE-2)
- 3) vypracovat metodu pro detailní stanovení TFA, jejíž součástí je i syntéza standardů izomerů C18:1
- 4) aplikovat metodu pro detailní stanovení TFA na vzorky tukové tkáně veganů a omnivorů
- 5) aplikovat metodu pro detailní stanovení TFA na vzorky mateřského mléka pražských matek

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje

Veškerá stanovení FA byla provedena na plynovém chromatografu GC-17A Verze 3 (Shimadzu, Japonsko) vybaveném autosamplerem AOC-20i upraveným pro 15 vzorků a standardním FID. K ovládání, měření a vyhodnocování chromatogramů byl použit software ClassVP 4.3. Teplota nástřikového portu a detektoru byla 250 °C a 260 °C. Pro stanovení základního profilu FA byla použita kolona Stabilwax 15 m × 0,25 mm × 0,1 μm (Restek, Bellefonte, PA, USA), nosným plynem bylo helium o průtoku 1,2 ml/min. Teplotní program začínal na 120 °C s následným gradientem 10 °C/min na 190 °C a finálním gradient 40 °C/min na 250 °C, držených 15,4 min.

Detailní analýza jednotlivých *trans/cis* izomerů C18:1 byla provedena na dvou kolonách, SLB-IL111 (100 m × 0,25 mm × 0,2 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) a SP-2560 (100 m × 0,25 mm × 0,2 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA), za sebou spojených spojkou Vu2 Union Connector (Restek). Jako nosný plyn byl použit vodík o průtoku 1,7 ml/min. Teplotní program začínal na 140 °C, držených 50 min, s následným gradientem 3 °C/min na 170 °C, držených 60 min, s následným gradientem 3 °C/min na 220 °C, držených 26 min.

3.2 Použité chemikálie

Všechny použité FA v čistotě 99 % a vyšší byly zakoupené u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Roztok 32 obj. % HBr v kyselině octové pro syntézy, diethyléter a petroléter (teplota varu 30 - 50 °C) pocházely od firmy MERCK (Darmstadt, Německo). *Tert*-butoxid draselný v čistotě 98 % byl od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Všechny další použité chemikálie byly v analytické třídě čistoty od firem Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Fluka (Steinheim, Německo), Lachner (Neratovice, ČR), Lachema (Neratovice, ČR), MERCK (Darmstadt, Německo), Penta (Chrudim, ČR). Pro SPE byla použita kolonka Discovery Ag-ION 750 mg / 6 ml, od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA).

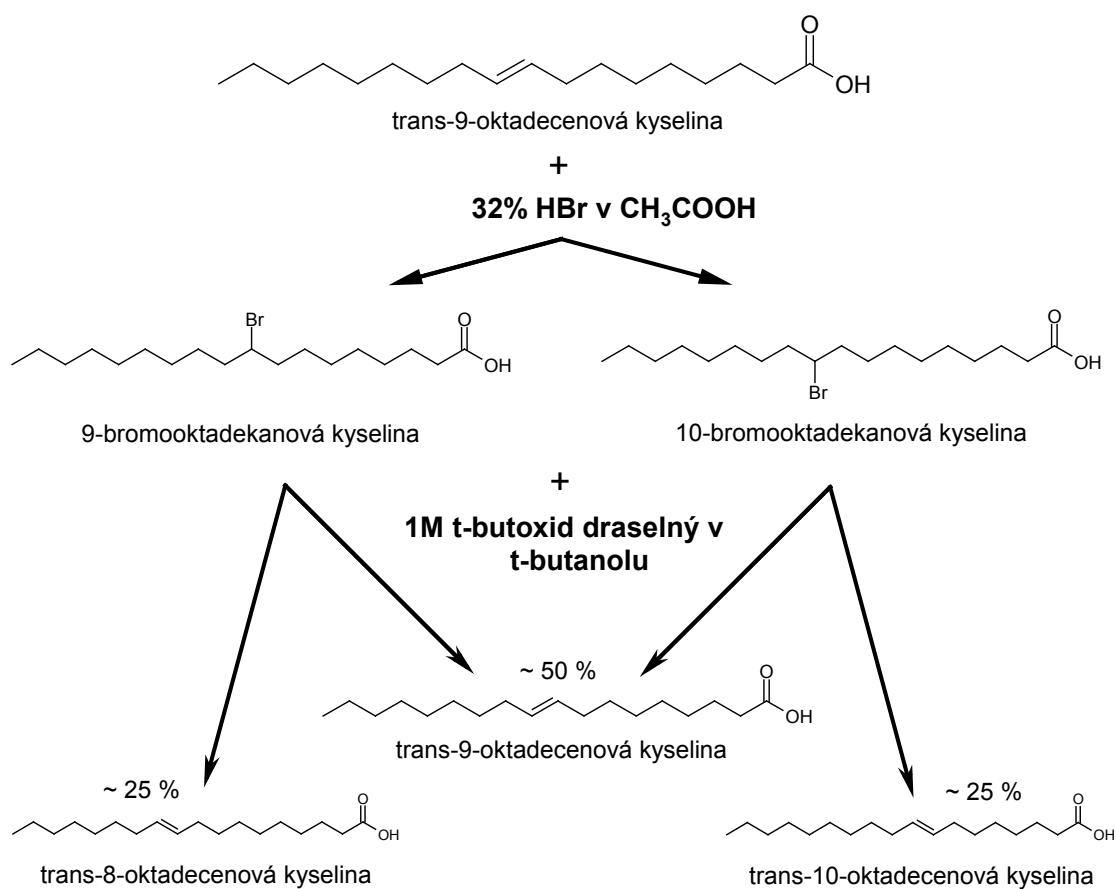
3.3 Derivatizace FA

Všechny standardy FA pro kalibraci či identifikaci, vzorky plasmy či extrakty lipidů z tukové tkáně byly před analýzou na GC esterifikovány (transesterifikovány) stejným postupem. K tomu sloužila vždy nově připravená směs methanol/toluen/acetylchlorid (3,2/0,8/0,2; v/v/v). Matrice obsahující analyzované FA byla odpipetována do bakteriologické zkumavky se závitkem GL18 o rozměrech 16 × 120 mm společně s interním standardem (C13:0) a kontrolním standardem (C17:0). Následně bylo přidáno 4,2 ml esterifikační směsi. Uzavřená zkumavka byla 10 min třepána na horizontální třepačce. Následně byly zkumavky zahřívány na vodní lázni při 100 °C po dobu 1 h. Po ochlazení a neutralizaci 12% (m/v) vodným roztokem K₂CO₃ byly zkumavky třepány 10 min na horizontální třepačce a centrifugovány. Vrchní organická fáze obsahující v toluenu rozpuštěné methylestery mastných kyselin (FAME) byla analyzována na GC.

3.4 Syntéza izomerů C18:1 pro identifikaci.

Jelikož nejsou všechny izomery kyseliny oktadecenové komerčně dostupné, byly laboratorně připraveny dle postupu založeného na opakované adici a eliminaci HBr [163], viz. schema na Obr. 10. Původní postup byl upraven následovně: k 250 mg kyseliny elaidové a 40 mg kyseliny *trans*-vakcenové bylo přidáno 2 ml 32% HBr rozpuštěné v kyselině octové a ochlazené na -15 °C; směs byla protřepána a uchována po 3 h při -15 °C v mrazáku a poté po 48 h při 5 °C v lednici. Následně byla směs třepána 3krát přídatkem 10 ml DE/PE (1:1, v/v) ve 125 ml dělicí nálevce, poté byl přidán neutralizační roztok (25 ml nasyceného roztoku NaHCO₃ a 25 ml vody) s postupným odpouštěním vzniklého CO₂ a ověřením neutrálního pH. Oddělená organická fáze byla promyta 50 ml vody s dvěma kapkami 6 M HCl a poté znovu oddělena, zfiltrována přes bezvodý síran sodný a odpařena do sucha pod proudem dusíku při 40 °C. K takto připraveným bromovaným derivátům FA bylo přidáno 5 ml 1 M *t*-butoxidu draselného v bezvodém *t*-butanolu. Skleněná zkumavka byla profouknuta dusíkem, uzavřena a zahřívána v termobloku při 100 °C po 24 h. Po ochlazení byla reakční směs opět vypláchnuta 3krát 10 ml DE/PE (1:1) v dělicí nálevce,

poté bylo přidáno 5 ml 6 M HCl a po protřepání 25 ml nasyceného NaHCO₃ a 25 ml vody. Následovalo postupné odpouštění CO₂ a po oddělení byla organická fáze promyta 50 ml vody se dvěma kapkami 6 M HCl, filtrována přes bezvodý síran sodný a odpařena do sucha pod proudem dusíku při 40 °C. Šestinásobným opakováním výše popsaného postupu adice a eliminace HBr byla připravena směs obsahující *cis/trans* izomery C18:1 s dvojnou vazbou na uhlíku 3 - 17. Připravená směs byla poté esterifikována výše uvedeným postupem.



Obrázek 11. Schema adice a eliminace HBr při přípravě izomerů C18:1

3.5 SPE extrakce *cis/trans* izomerů

Syntetizovaná směs izomerů kyseliny oktadecenové obsahovala jak *cis*, tak *trans* izomery. Jejich separace byla provedena extrakcí na tuhé fázi (SPE) s obsahem stříbrných iontů. Kolonka Discovery Ag-ION 750 mg / 6 ml (Supelco, Bellefonte, PA, USA) byla nejprve ekvilibrována 2 ml acetonitrilu, 4 ml acetonu a 4 ml hexanu. Následně na ní byl nanesen vzorek vytvořený odpipetováním 10 µl toluenu obsahujícího methylestery syntetizovaných izomerů C18:1. Toluén byl odpařen pod proudem dusíku a FAME byly rozpuštěny v 0,5 ml hexanu a nanесeny na kolonku. Frakce *trans* izomerů byla eluována 7 ml směsi hexan/aceton (96:4, v/v). Frakce *cis* izomerů byla eluována 5 ml aceton/acetonitril (60:40, v/v) a 1 ml čistého acetonitrilu v závěru. Obě frakce byly odpařeny do sucha pod proudem dusíku a rozpuštěny ve 100 µl toluenu a následně analyzovány na GC.

3.6 Příprava kalibračních roztoků

Celkem byly použity dvě kalibrační sady. První obsahovala 25 FA. Zde jsou uvedeny v pořadí dle retenčního času na 15 m koloně STABILWAX: C12:0, C14:0, C14:1n5c, C15:0, C16:0, C16:1n7, C17:0, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6cc, C18:3n6, C18:3n3, C20:0, C20:1n9c, C20:2n6, C20:3n3, C20:4n6, C20:5n3, C22:0, C22:1n9c, C24:0, C22:6n3, C24:1n9c, C26:0, C28:0, C30:0. Přibližně 30 mg každé uvedené FA bylo odváženo do odměrné baňky a rozpuštěno v 5 ml metanolu s následným doplněním do 25 ml toluenem a tím vznikl zásobní roztok. Další roztoky byly připraveny postupným ředěním metanolem v poměru 1:1. Do mikrobiologických zkumavek se zároveň bylo odpipetováno 100 µl každého kalibračního roztoku, který byl odpařen do sucha pod proudem dusíku. Esterifikací společně s interním standardem (C13:0) bylo vytvořeno 6 kalibračních úrovní. Nejvyšší 7. kalibrační úroveň vznikla použitím 200 µl zásobního roztoku. Průměrný obsah FA v uvedených sedmi kalibračních úrovních byl 3 - 190 µg.

Druhá kalibrační sada byla vytvořena pro spojené kolony SLB-IL111 a SP-2560. Obsahovala celkem 33 FA. Zde jsou uvedeny v pořadí dle retenčního času: C8:0,

C10:0, C11:0, C12:0, isoC14:0, C14:0, C14:1n5c, C15:0, isoC16:0, C16:0, isoC17:0, C16:1n9c, anteisoC17:0, C17:0, isoC18:0, C18:0, C18:1n9c, C18:2n6cc, C20:0, C18:3n6, C20:1n9c, C18:3n3, C21:0, C20:2n6, C22:0, C20:3n6, C22:1n9c, C20:4n6, C23:0, C24:0 C20:5n3, C24:1n9, C22:6n3. Přibližně 25 mg každé FA bylo odváženo s přesností na 5 desetinných míst a rozpuštěno v 10 ml metanolu a doplněno do 25 ml toluenem. Další roztoky byly vytvořeny a derivatizovány na FAME výše uvedeným způsobem. Dvě nejvyšší kalibrační úrovně byly vytvořeny odpipetováním 200 a 400 µl zásobního roztoku. Tím vzniklo 7 kalibračních úrovní průměrně obsahujících 6 - 390 µg každé FA.

3.7 Příprava interních standardů

1. IS pro stanovení FA v krevní plazmě

Bylo naváženo 10,78 mg kyseliny tridekanové C13:0 a 10,13 mg kyseliny heptadekanové C17:0 a rozpuštěno v 25 ml toluenu. Pro přípravu vzorků bylo použito 100 µl roztoku obsahující 43,12 µg C13:0 a 40,52 µg C17:0.

2. Příprava IS pro stanovení FA ve frakci FFA

Bylo odváženo 10,37 mg kyseliny tridekanové C13:0 a 11,21 mg kyseliny heptadekanové C17:0 a rozpuštěno ve 25 ml isooktanu. Vzniklý roztok by dále 10krát zředěn isooktanem. Pro přípravu vzorku bylo použito 100 µl roztoku, který obsahoval 4,148 µg C13:0 a 4,484 µg C17:0.

3. Příprava IS pro stanovení FA v krevních buňkách

Bylo odváženo 11,59 mg kyseliny tridekanové C13:0 a 11,8 mg kyseliny heptadekanové C17:0 a rozpuštěno ve 25 ml metanolu. Pro extrakci lipidů z erytrocytů bylo použito 100 µl tohoto roztoku s obsahem 46,36 µg C13:0 a 47,20 µg C17:0.

4. Příprava IS pro stanovení FA v tukové tkáni

Bylo odváženo 50,51 mg kyseliny tridekanové C13:0 a 50,18 mg kyseliny heptadekanové C17:0 a rozpuštěno v 10 ml chloroformu. Vzniklý roztok byl uchováván v lednici při 5 °C. Pro přípravu vzorků tukové tkáně bylo požito 100 µl obsahujících 505,1 µg C13:0 a 501,8 µg C17:0.

5. Příprava IS pro stanovení FA v mateřském mléce

Bylo odváženo 177,49 mg kyseliny tridekanové C13:0 a rozpuštěno v 25 ml toluenu. Pro přípravu FAME bylo použito 50 µl vzniklého roztoku obsahujícího 354,98 µg C13:0.

3.8 Studie OMEGA – parametry souboru

Dobrovolníci pro klinickou část studie OMEGA pocházeli z řad studentů lékařské fakulty. Celkem šlo o 33 zdravých dobrovolníků mužského pohlaví, netrpících chronickým onemocněním, neužívajících léky ani potravinové doplňky s obsahem omega-3 FA bez jakékoliv dietní restrikce a omezením fyzické aktivity do 12 h týdně. Dobrovolníci byli rozděleni na dvě skupiny, viz. Tabulka 5. První skupina se stravovala experimentální dietou obsahující vejce a kuřecí maso obohacené o omega-3 FA. Kontrolní skupina se stravovala běžnými vejci a běžným kuřecím masem v dávce 4krát týdně 1 vejce a 100 g masa/den. Obohacení masa a vajec o omega-3 FA bylo provedeno přidáním lněného semínka do krmné směsi jatečných brojlerů a nosnic firmou RABBIT Trhový Štěpánov a.s. Pokrmy byly navrženy nutriční terapeutkou. Stravování probíhalo ve stravovacím provozu Fakultní nemocnice Královské Vinohrady pod dozorem člena řešitelského týmu. Nutriční intervence trvala celkem 8 týdnů. Vzorky krve byly dobrovolníků odebrány celkem 4krát: před zahájením intervence, po 4 týdnech, na konci dietní intervence a jeden měsíc po jejím ukončení. V každém odběru byla provedena analýza celkových plazmatických hladin FA. Ve vstupním odběru a odběru po skončení dietní intervence byla provedena analýza fosfolipidů z krevních buněk.

Tabulka 5. Vstupní charakteristiky obou skupin dobrovolníků pro studii OMEGA

Parametr	Testovací skupina ($n = 16$)	Kontrolní skupina ($n = 17$)
Věk [rok]	21,82	21,51
Tělesná hmotnost [kg]	75,33	73,19
BMI [kg/m ²]	22,46	22,38

3.9 Odběr krve pro studii OMEGA a VEGGIE

Vzorky venózní krve byly odebrány nalačno do zkumavek Vacuette (Greiner Bio-one, Německo) s obsahem antikoagulantu EDTA. Po vychladnutí byla krev centrifugována 5 min při hodnotě zrychlení $1780 \times g$. Krevní plazma byla odebrána a zamražena. Krevní buňky byly podrobeny extrakci pro stanovení profilu FA ve fosfolipidech krevních buněk.

3.10 Extrakce fosfolipidů z krevních buněk

Ke krevním buňkám v odběrové zkumavce Vacuette byly automatickým dávkovačem přidány 3 ml fyziologického roztoku. Zkumavka byla následně 2 - 3 min třepána na horizontální třepače, centrifugována 4 min při $1780 \times g$ a následně byl fyziologický roztok odsát. Uvedený postup byl proveden celkem 4krát. Následně byl 1 ml propláchnutých krevních buněk přepipetován do bakteriologické zkumavky se závitkem, ve které bylo 100 μ l metanolu obsahujícího IS C13:0 (46 μ g) a C17:0 (47 μ g). Za třepání na vortexu bylo přidáno 5 ml izopropanolu. Zkumavka byla následně třepána 1 hod na horizontální třepače. Poté bylo do zkumavky přidáno 3,5 ml chloroformu a zkumavka byla znovu 1 hod třepána. Následně byla krátce centrifugována a vzniklý extrakt byl zfiltrován a odpařen do sucha pod proudem dusíku při 35 °C. Extrahované lipidy byly v uzavřené zkumavce ponechány v mrazáku při -25 °C až do esterifikace s následnou analýzou na GC.

3.11 Studie VEGGIE-2 – parametry souboru

Do skupiny veganů byli zařazeni jedinci konzumující veganskou stravu minimálně 3 roky, s průměrnou dobou 8,3 roku. Kontrolní skupina omnivorů byla bez dietních omezení a konzumovala maso a jiné živočišné produkty. Skupinu veganů tvořilo 12 mužů a 6 žen s průměrným věkem $32,8 \pm 5,1$ roku a průměrným BMI $23,4 \pm 2,8$ kg/m². Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 12 mužů a 8 žen s průměrným věkem $32,5 \pm 6,4$ a BMI $23,3 \pm 3,1$ kg/m².

Do intervenční části studie bylo zařazeno 8 veganů a 8 omnivorů. Intervence spočívala v podávání aminokyselin s rozvětveným postranním řetězcem (BCAA) v množství 15 g/den pro ženy a 20 g/den pro muže po dobu 3 měsíců. Vzájemný poměr leucin/valin/isoleucin byl 4 : 1 : 1. Použité tablety měly hmotnost 2 g a obsahovaly 1000 mg leucinu, 250 mg valinu, 250 mg isoleucinu a 500 mg plniv a pomocných látek. Kontroly subjektů probíhaly každý týden formou telefonního rozhovoru a každých šest týdnů byl subjekt navštíven členem výzkumného týmu. Vzorky krve pro analýzu FA byly odebrány před zahájením intervence a po jejím skončení.

3.12 Stanovení volných mastných kyselin (FFA)

Zastoupení FA ve frakci FFA krevní plazmy bylo provedeno extrakční technikou s následnou analýzou připravených methylesterů na GC dle článku Hušek et al. [164]. Do ependorfky o objemu 2 ml je napipetováno 100 μ l roztoku IS, 200 μ l plazmy, 400 μ l isooktanu a 300 μ l srážecího roztoku obsahujícího 0,125 g kyseliny šťavelové v 25 ml směsi acetonitril/metanol (2:1, v/v). Směs je protřepána na vortexu přibližně 30 s a krátce centrifugována na stolní minicentrifuze. Horní frakce je přepipetována do malé vialky společně s 300 μ l reextrakčního roztoku. Ten je směsí acetonitril/vodný roztok KOH (10 g/l) v poměru 9:1 (v/v). Vialka byla uzavřena, promíchána na vortexu, centrifugována a horní frakce obsahující neutrální lipidy byla odsáta do odpadu. Následuje dočištění přidáním 200 μ l isooktanu opět s protřepáním a centrifugací. Horní organická vrstva je znovu odsáta do odpadu. K extraktu obsahujícímu draselné soli FA je přidáno 200 μ l katalyzačního roztoku, který byl tvořen dimethylaminopyridinem (1 g/10 ml) rozpuštěným v 1,5 ml směsi dichlormethan/metanol (1:1, v/v) a doplněným

do 10 ml isooktanem. Do vialky je dále přidáno 100 µl esterifikačního roztoku obsahujícího isooktan/methylchlorformiát (9:1, v/v) a vialka je promíchána cca 15 s až do ztráty zákalu. Po jedné minutě je přidáno 200 µl 1 M HCl. Směs je promíchána na vortexu, centrifugována a horní organická vrstva obsahující isooktan a vzniklé FAME je analyzována na GC.

3.13 Odběr tukové tkáně pro studii VEGGIE-2

Vzorky podkožní tukové tkáně (AT) byly odebrány z periumbilické oblasti standardní Bergströmovou technikou pro tkáňovou biopsii [165]. Následně byly mikrodisektovány, zváženy a uskladněny při -80 °C. Před analýzou byl vzorek AT o hmotnosti 25 - 50 mg mechanicky desintegrován v třecí misce a extrahován 4 × 1 ml směsí chloroform/metanol (2:1, v/v) společně s IS C13:0 a C17:0 v množství 0,5 mg. Extrakt byl následně zfiltrován, odpařen do sucha proudem dusíku a uchováván v mrazáku při -25 °C až do esterifikace.

3.14 Studie zastoupení TFA v mateřském mléce

3.14.1 Odběr vzorků mateřského mléka

Několik odběrů zmraženého mateřského mléka od jednoho subjektu bylo rozmrazeno, homogenizováno, rozpipetováno a znovu zamrazeno k dalším analýzám. Průměrný věk kojících matek byl 30 let v rozmezí 21 - 37 let. Průměrný věk dítěte v době odběru byl 30 dnů v rozmezí 4 - 60 dnů. Průměrné BMI matek bylo 24 kg/m² a to v rozmezí 19 - 41 kg/m². Třicet devět matek bylo v oblasti normálního BMI, 11 v oblasti preobezity, 4 v oblasti obezity 1. stupně a jedna v oblasti obezity 3. stupně. Subjekty vyplnily detailní dotazník stravovacích návyků, jeho část související s TFA je v Tabulce 6.

Tabulka 6. Vybrané položky z potravinového dotazníku pražských kojících matek se vztahem k TFA.

Potravina	počet odpovědí
mléko a mléčné výrobky	
denně	52
2-3× týdně	4
„fast food“	
1× měsíčně a častěji	24
nikdy	32
pizza, popcorn a pod.	
1× týdně	4
1× měsíčně	37
nikdy	15
margaríny (Rama, Flora, atd.)	
1-3× měsíčně a častěji	16
téměř nikdy / nikdy	35
pokrmové tuky (Omega a pod.)	
1-3× měsíčně a častěji	14
téměř nikdy / nikdy	37
jemné pečivo (koláče, koblihy atd.)	
1× týdně a častěji	34
1-3× měsíčně	10
téměř nikdy / nikdy	5
z toho výrobky z listového těsta	
1× týdně a častěji	14
1-3× měsíčně	22
téměř nikdy / nikdy	12
oplatky, sušenky, perníky atd.	
2-3× týdně a častěji	19
1× týdně	13
1× měsíčně a méně často	19

náhražky čokolády	
1× týdně a častěji	24
1× měsíčně a častěji	27
smažené a fritované pokrmy	
1× týdně a častěji	14
1× měsíčně	16
téměř nikdy / nikdy	21
hranolky, chipsy	
1× týdně a častěji	8
1× měsíčně	21
téměř nikdy / nikdy	22

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Metoda pro stanovení základního profilu FA

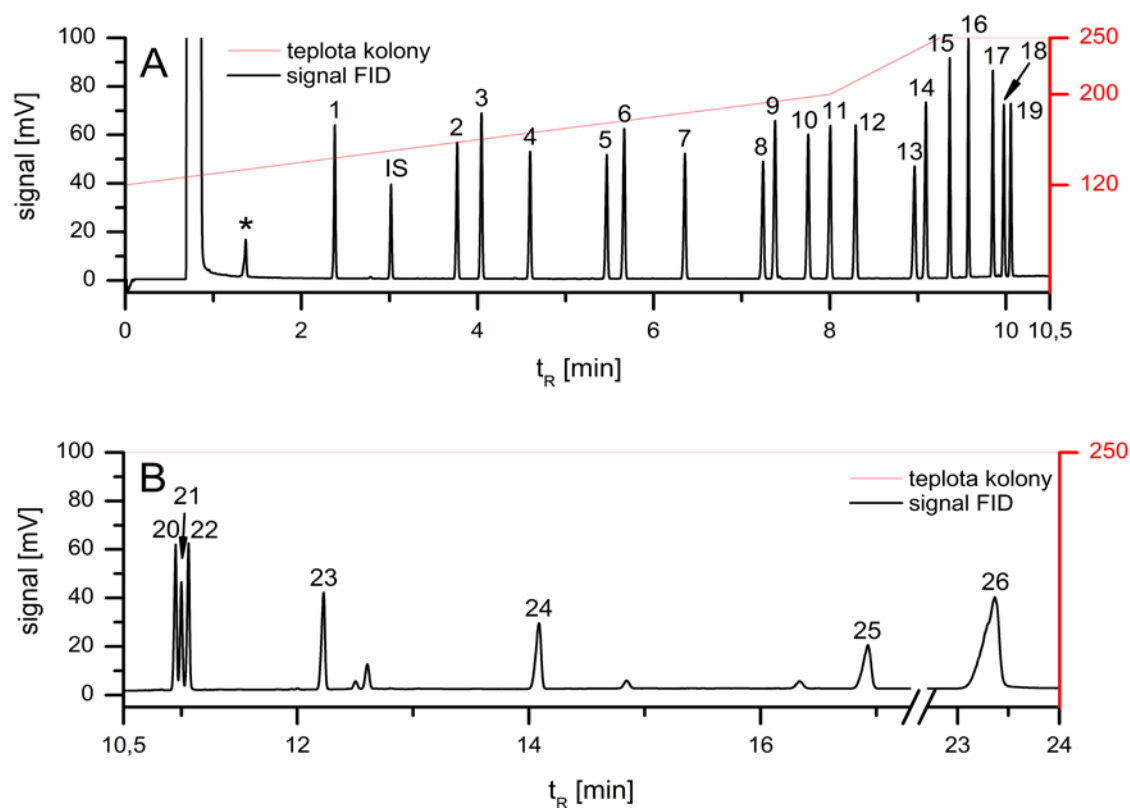
Požadavkem na metodu pro stanovení základního profilu FA bylo rozlišení všech běžně zastoupených FA ve vzorcích, které budou v budoucnu analyzovány. Dopředu bylo počítáno hlavně s krevním sérem a krevní plazmou. Dále přicházelo v úvahu mateřské mléko, lipidové extrakty z tkání a analýza přírodních tuků či olejů. Druhým faktorem byl co nejkratší čas analýzy. Z našich předchozích zkušeností s analýzou FA byla zvolena 15 m kolona STABILWAX. Pro identifikaci, byly použity standardy methylesterů jednotlivých FA. Při vývoji teplotního programu se jako klíčová ukázala být separace kritického páru kyseliny lignocerové (C24:0) a DHA (C22:6n3). Přesněji jde o triplet píků, jelikož za těmito dvěma FA je eluována ještě kyselina nervonová (C24:1). Separace zmíněných FA je dosaženo použitím dvojitého teplotního gradientu. Průběh gradientu a separace kalibrační směsi FA, viz. Obr. 11. V průběhu první části teplotního programu od 120 °C do 190 °C s gradientem 10 °C/min je eluována většina separovaných FA. Druhý gradient 40 °C/min až do maxima 250 °C slouží k rozlišení zmíněného kritického tripletu a zároveň k eluci všech dalších výše vroucích komponent vzorku. Poslední eluovanou látkou v chromatogramu je pík cholesterolu, viz. chromatogram na Obr. 11 B. Bylo zjištěno, že s postupným stárnutím kolony se snižuje rozlišení C24:0 a C22:6n3. Posunem polohy druhého gradientu lze jejich rozlišení zvýšit. U nové kolony druhý gradient začíná až při 210 °C a se stárnutím kolony je jeho začátek zkracován až ke 190 °C. Při dalším snížení rozlišení je vhodné kolonu vyměnit za novou. Následně byla provedena kalibrace metody změřením 4 kalibračních sad připravených z výše uvedených kalibračních roztoků. Vyhodnocení naměřených chromatogramů a sestavení kalibračních přímek bylo provedeno softwarem Class VP 4.3 používaným k ovládání GC. Použitý software ze změřených ploch kalibračních vzorků a zadaných množství FA vytváří kalibrační přímkou vynesením poměrů množství FA/IS proti poměru plochy FA/IS.

$$\frac{m_{FA}}{m_{IS}} = a \cdot \frac{A_{FA}}{A_{IS}} + b \quad (34)$$

Hodnoty citlivosti (a) a posunutí (b) jsou uvedeny v Tabulce 7. Dále software počítá průměrný odezvový faktor vytvořený z odezvoových faktorů (RF) jednotlivých kalibračních úrovní vyjádřených jako:

$$RF = \frac{A_{FA}/A_{IS}}{m_{FA}/m_{IS}} \quad (35)$$

Průměrný odezvový faktor (ARF), korelační koeficient (R^2), limit detekce a mez stanovitelnosti jsou také uvedeny v Tabulce 7.



Obrázek 11. Chromatogramy kalibračního vzorku 6. kalibrační úrovně, rozdělený v čase 10,5 minuty na obrázek A a obrázek B. Pořadí FA odpovídá Tabulce 7. IS = C13:0; * artefakt vzniklý při esterifikaci.

Tabulka 7. Kalibrační parametry metody pro stanovení FA na 15 m koloně STABILWAX; LOD a LOQ uvedeno v µg/ml.

	FA	<i>a</i>	<i>b</i>	ARF	<i>R</i> ²	LOD	LOQ
1.	C12:0	1,07474	0,01505	0,91749	0,99934	2,4	5,7
2.	C14:0	1,03539	0,01304	0,96545	0,99939	3,2	8,3
3.	C14:1n5	1,08243	0,01804	0,91254	0,99941	1,3	1,9
4.	C15:0	1,02590	0,01188	0,96647	0,99942	2,0	4,2
5.	C16:0	1,01785	-0,00640	1,05623	0,99950	14,5	46,0
6.	C16:1n7	1,03278	0,01844	0,94646	0,99952	1,3	2,1
7.	C17:0	1,02219	-0,01589	1,02352	0,99990	1,3	2,0
8.	C18:0	0,98179	-0,00392	1,08101	0,99957	13,8	43,6
9.	C18:1n9	1,04486	-0,00487	1,00226	0,99969	5,5	16,1
10.	C18:2n6	1,10468	0,01219	0,90616	0,99956	2,4	5,6
11.	C18:3n6	1,08271	0,00901	0,93628	0,99956	2,3	5,3
12.	C18:3n3	0,98416	0,00982	1,02164	0,99956	1,3	2,0
13.	C20:0	0,97397	0,00877	1,03006	0,99948	1,3	1,8
14.	C20:1n9	0,98978	0,01306	1,01298	0,99946	1,9	3,9
15.	C20:2n6	1,07853	0,01452	0,92528	0,99946	1,6	2,9
16.	C20:4n6	1,09454	0,01358	0,91369	0,99947	1,5	2,8
17.	C20:5n3	1,10011	0,01014	0,91258	0,99950	1,3	1,9
18.	C22:0	0,98246	0,00848	1,02227	0,99954	1,2	1,7
19.	C22:1n9	1,04640	0,00818	0,96257	0,99952	1,4	2,4
20.	C24:0	0,93861	0,01516	1,06277	0,99908	1,3	2,0
21.	C22:6n3	1,08545	-0,00124	0,94414	0,99990	1,2	1,8
22.	C24:1n9	0,94593	0,00964	1,05930	0,99950	1,3	2,1
23.	C26:0	0,95712	0,00897	1,04912	0,99949	1,3	1,8
24.	C28:0	0,96051	0,00805	1,04485	0,99958	1,5	2,6
25.	C30:0	0,97120	0,00876	1,02297	0,99961	1,7	3,2
26.	cholesterol	1,11096	-0,02945	0,91057	0,99998	3,3	8,4

4.2 Metoda pro stanovení volných mastných kyselin

Použitá metoda vychází z článku Hušek et al. [164] a je založena na extrakci FFA a jejich esterifikaci pomocí methylchlorformiátu. Tento derivatizační proces esterifikuje pouze FFA. Metoda byla vytvořena a kalibrována za použití kalibračních roztoků uvedených v experimentální části a zpracovaných popsáním extrakčním postupem pro FFA. Teplotní program a další podmínky pro GC zůstávají shodné s metodou pro stanovení celkových FA krevní plazmy. Metoda a teplotní program jsou pouze zkráceny na 13 min, jelikož další FA za C24:1n9 se ve frakci FFA nevyskytují. Kalibrační parametry společně s LOD a LOQ jsou uvedeny v Tabulce 8. Kalibrační rozsah byl 1,6 - 103 µg/ml plazmy.

Tabulka 8. Kalibrační parametry metody pro stanovení FA ve frakci FFA na 15 m koloně STABILWAX. Tučně vyznačené FA měly lineární kalibrační rozsah pouze 1,6 – 26 µg/ml plazmy. LOD a LOQ uvedeno v µg/ml.

	FA	<i>a</i>	<i>b</i>	ARF	<i>R</i> ²	LOD	LOQ
1.	C12:0	1,11396	0,05963	0,79827	0,99788	0,3	1,0
2.	C14:0	0,97298	0,02666	1,09425	0,99987	0,7	1,7
3.	C14:1n5	1,02094	0,07955	0,87424	0,99773	0,5	1,2
4.	C15:0	0,92481	0,02381	1,16048	0,99952	0,4	1,0
5.	C16:0	0,92658	-0,06915	1,34558	0,99815	2,3	5,7
6.	C16:1n7	0,93342	0,03176	1,11152	0,99921	0,5	1,2
7.	C17:0	0,86142	-0,05748	1,27130	0,99961	0,7	1,9
8.	C18:0	0,89519	-0,06454	1,39241	0,99874	2,4	6,5
9.	C18:1n9	0,83104	-0,03202	1,32151	0,99980	1,1	2,4
10.	C18:2n6	0,96219	-0,05221	1,11492	0,99917	1,0	2,1
11.	C18:3n6	0,94414	0,00140	1,06416	0,99995	0,5	1,3
12.	C18:3n3	0,78879	0,05340	1,18051	0,99830	0,4	1,1
13.	C20:0	0,71202	0,00880	1,44530	0,99905	1,5	2,3
14.	C20:1n9	0,71108	0,00459	1,43228	0,99927	0,4	0,9
15.	C20:2n6	0,85959	-0,02539	1,25810	0,99972	0,7	1,4
	C20:3n3	1,18645	-0,01003	0,86001	0,99969	0,2	0,8

16.	C20:4n6	0,84597	0,03684	1,14115	0,99902	0,5	1,3
17.	C20:5n3	081263	0,10283	1,04515	0,99717	0,2	1,0
18.	C22:0	0,70862	0,00056	1,41660	0,99968	0,5	0,9
19.	C22:1n9	0,76005	-0,00430	1,34646	0,99842	0,6	1,1
20.	C24:0	0,74849	0,00703	1,39034	0,99888	1,3	2,1
21.	C22:6n3	0,88519	0,00146	1,16705	0,99970	1,4	2,2
22.	C24:1n9	0,70910	-0,01221	1,49508	0,99910	0,1	0,8

4.3 Studie OMEGA

Na projektu participovaly následující subjekty: Rabbit Trhový Štěpánov a.s., Rabbit Chotýšany a.s., Botanický ústav AV ČR, EcoFuelLaboratories, s.r.o., Mikrobiologický ústav AV ČR, Mydlářka a.s., Ústav chemických procesů AV ČR, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze a 3. lékařská fakulta UK. Cílem projektu bylo vytvoření doplňků krmných směsí na bázi mikrořas a lněného semínka pro produkci funkčních potravin a to OMEGA vajec a OMEGA kuřecího masa. Tím by vznikla surovina zabezpečující přísun PUFA s dlouhým řetězcem jako je EPA a DHA, které jsou nezbytné pro vývoj mozku a očí u dětí, případně jsou benefitem pro kardiovaskulární a nervový systém dospělých. Běžně dostupným zdrojem těchto FA je rybí tuk, který je součástí některých potravinových doplňků používaných i pro těhotné či kojící ženy. Ten je dobře známý svou nepříjemnou chutí a vůní. Naší úlohou v projektu bylo provedení analýz biologického materiálu získaného od dobrovolníků v průběhu klinické části studie se záměrem stanovit hladiny FA v odebraném biologickém materiálu a tím potvrdit či vyvrátit smysluplnost obohacování krmných směsí.

Klinická část studie OMEGA měla celkem tři části, v jejichž průběhu dobrovolníci konzumovali maso a vejce získané z kuřic krmných za pomoci třech různých krmných směsí. V rámci této kapitoly dizertační práce předkládám výsledky pouze z druhé fáze studie OMEGA. V jejím průběhu byla testovací skupina kuřat krmena směsí obsahující 0,3 % řasy *Trachydiscus minutus* a 1 % lněného semínka. Směs kontrolní skupiny pak obsahovala pouze 1 % lněného semínka. Výkrm probíhal v první části roku 2015, klinická část s odběrem vzorků v druhé polovině téhož roku a analýzy začátkem roku 2016. Sledování FA v odebrané krevní plazmě odráží jejich krátkodobý příjem [162]. Jako indikátor dlouhodobého příjmu byly použity FA z erytrocytů [153, 160, 161], jejichž životnost se pohybuje mezi 110 - 120 dny. V průběhu 8 týdenní dietní intervence tak došlo k výměně přibližně poloviny z nich. Běžným střednědobým ukazatelem příjmu FA jsou fosfolipidy krevní plazmy [162], jejichž analýza po prvotní extrakci dále vyžaduje separaci lipidových frakcí buď pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) [166], extrakce na tuhé fázi (SPE) [166-168] nebo HPLC s odběrem frakce fosfolipidů [169, 170]. Získané fosfolipidy jsou esterifikovány a vzniklé FAME následně

analyzovány na GC. Jelikož erythrocyty nepoužívají jako energetický substrát FA, neměly by obsahovat ani FFA a TAG, což potvrzují publikace Holčapek et al. [171] a Chamorro et al. [170]. Lipidový profil erythrocytů je tvořen cholesterolem, fosfolipidy a sfingomyelinem. Proto byla zvolena metoda extrahující lipidy z erythrocytů podle modifikovaného postupu z článku Rosé a Oklander [172]. Metoda se vyznačuje nižší kontaminací extraktu hemem oproti běžné používané extrakci dle Folche [173]. Postup extrakce je uveden v Kapitole 3.10.

Stanovené plazmatické koncentrace FA v $\mu\text{g/ml}$ plazmy v průběhu všech 4 odběrů jsou uvedeny v Tabulce 9. Ze sledovaných omega-3 FA jsme našli signifikantní změnu v hodnotách koncentrací pouze u C20:3n3 v testovací skupině mezi 1. a 3. odběrem. Jde pravděpodobně o pokles vyvolaný mírně zvýšeným příjmem EPA (C20:5n3) z mikrořas, který vedl k nižší endogenní syntéze. Přibližně 13 g sušených řas obsahuje cca 88 mg EPA [150]. Přestože rozdíly mezi minimální a maximální plazmatickou hodnotou Σ FA nejsou statisticky významné, normalizovali jsme výsledky převedením na procentuální zastoupení jednotlivých FA. Procentuální zastoupení sledovaných omega-3 FA, společně s těmi FA u kterých došlo k signifikantní změně, jsou vyneseny v grafech na Obr. 12. V případě ALA, pocházející z lněného semínka v krmné směsi, byl pozorován vzestup koncentrace v průběhu dietní intervence u 2. a 3. odběru především u kontrolní skupiny. Nicméně žádný z rozdílů, ať už mezi skupinami nebo mezi jednotlivými odběry stejné skupiny, není statisticky významný. Stejný závěr platí i pro EPA (C20:5n3). V případě DHA (C22:6n3) je pozorovatelný vzestupný trend u kontrolní skupiny, ale bez statistické významnosti. Ovšem zvýšení plazmatické hladiny v první polovině dietní intervence u testovací skupiny už statisticky významné je. Signifikantní zůstává pokles hladiny C20:3n3 u testovací skupiny mezi 1. a 3. odběrem, viz. Obr. 12. Jediným rozdílem pozorovaným mezi testovací a kontrolní skupinou je postupné rozevírání nůžek v zastoupení ARA, které je signifikantní ve 3. a ve 4. odběru. Shodný rozdíl mezi skupinami platí pro jedinou nasycenou kyselinu C22:0, jejíž koncentrace v první polovině intervence nejprve klesá a následně ve 3. odběru stoupá a nejvyššího vzestupu dosahuje po vymývací periodě, tj. ve 4. odběru. Statisticky signifikantní je ovšem pouze rozdíl mezi 1. a 4. odběrem u kontrolní skupiny.

Pro sledování dlouhodobého vlivu byly analyzovány FA v erythrocytech, viz.

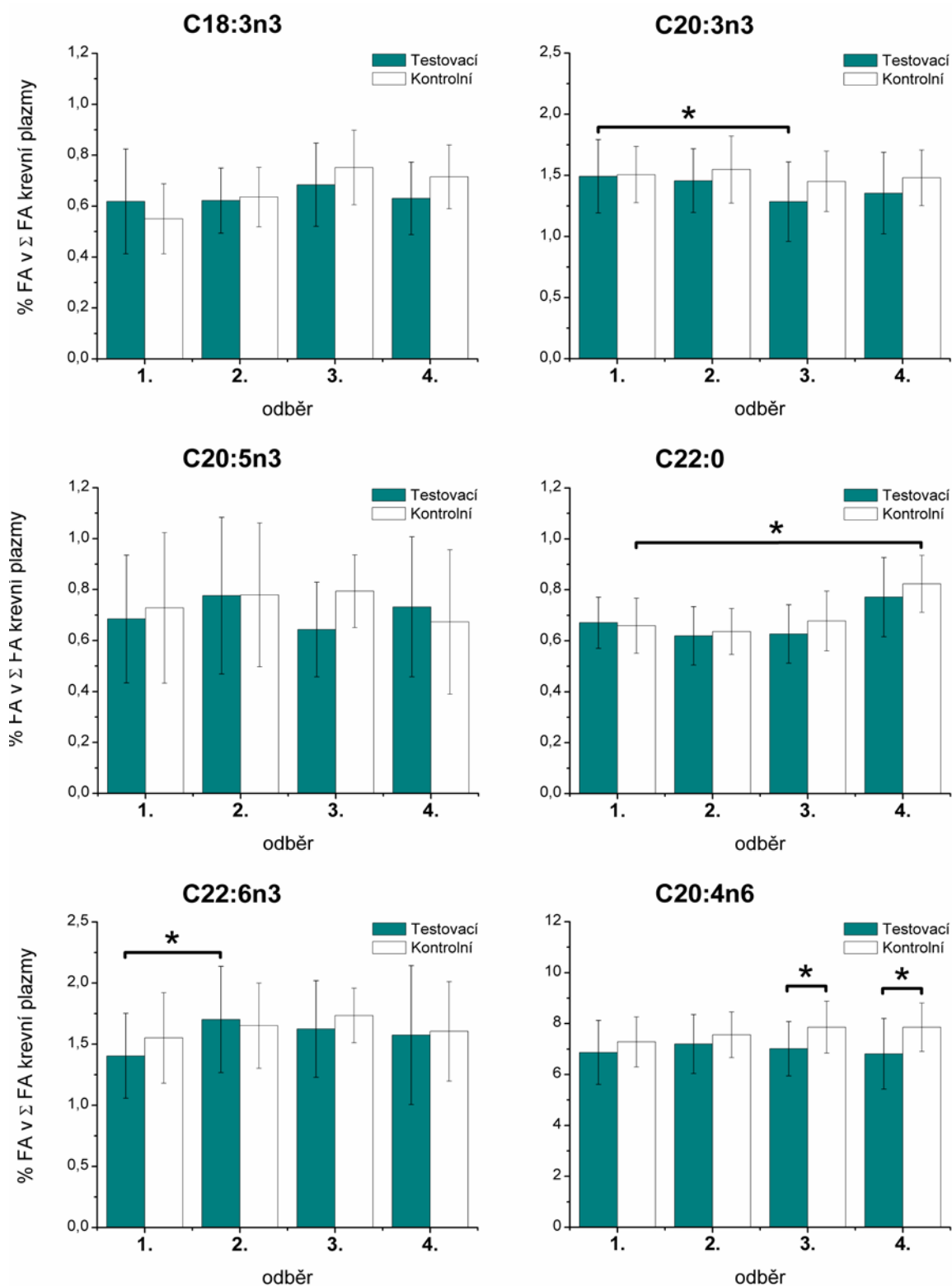
Tabulka 10. V erythrocytech byl odhalen statisticky signifikantní vzestup Σ všech FA mezi 1. a 3. odběrem u obou skupin a z tohoto důvodu byly výsledky normalizovány na procentuální zastoupení FA v extraktu z erythrocytů, viz. Obr. 13. Jedná se především o signifikantní nárůst DHA o 4,4 % v prvním a o 5,1 % ve třetím odběru u testovací skupiny. Omega-index testované skupiny vzrostl z 5,1 % na 5,8 % mezi 1. a 3. odběrem a u kontrolní skupiny z 5,3 % na 5,8 %. Podobný nárůst byl také pozorován u ARA: z 16,4 % na 16,7 % u testovací a z 16,8 % na 17,9 % u kontrolní skupiny. Jako signifikantní vychází rozdíl u kontrolní skupiny mezi 1. a 3. odběrem a mezi testovací a kontrolní skupinou ve 3. odběru, tj. na konci dietní intervence. Změny u obou FA v erythrocytech jsou i v dobré shodě s plazmatickými změnami FA v průběhu studie. Kladným efektem přidavku mikrořasy do krmné směsi je faktor efektivnosti výkrmu (FEV), uvedený v Příloze 1A závěrečné zprávy za Rabbit Trhový Štěpánov a.s., počítaný dle vzorce:

$$FEV = \frac{\% \text{ dožitých kuřat} \times \text{živá hmotnost}}{\text{stáří(dny)} \times \text{konverze krmiva}} \times 100 \quad (36)$$

Dle závěrečné zprávy FEV vychází 244 pro testovací a 227 pro kontrolní skupinu. Vzhledem k zdokumentovanému nízkému vzestupu hladiny omega-3 FA a to pouze u DHA se nabízí otázka ekonomické výhodnosti obohacování masa a vajec o omega-3 FA, byť ekologická návaznost ve zpracování fugátu z anaerobní digesce prasečí kejdy, využití odpadních sacharidů, hydrolyzátů celulózy, polyalkoholů a CO₂ ze spalných plynů pro kultivaci řas produkujících PUFA, jistě smysl dává.

Tabulka 9. Koncentrace FA v krevní plazmě probandů studie OMEGA v µg/ml; T - Testovací, K - Kontrolní

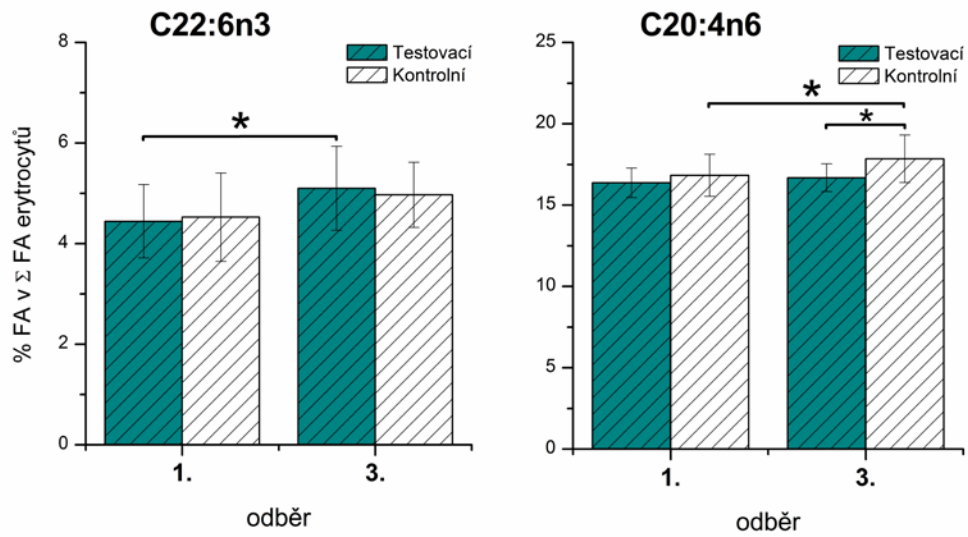
Odběr	1.		2.		3.		4.	
	T	K	T	K	T	K	T	K
FA \ počet	16	17	16	18	16	16	15	16
C14:0	28	28	28	28	27	28	34	29
C16:0	651	644	643	626	639	588	650	586
C16:1n7	58	56	53	52	50	52	59	50
C17:0	304	304	302	302	301	300	302	300
C18:0	189	185	189	184	182	174	184	172
C18:1n9c	620	610	620	605	602	543	593	539
C18:1n7c	50	51	49	49	47	43	49	46
C18:2n6cc	941	895	940	896	932	824	914	817
C18:3n6	15	16	13	16	13	15	14	14
C18:3n3	18	19	18	18	20	21	18	19
C20:0	7	7	7	7	7	7	7	7
C20:1n9c	8	7	7	7	7	6	7	7
C20:2n6	7	7	7	7	6	6	7	6
C20:3n3	45	44	44	45	38	39	40	40
C20:4n6	203	210	213	216	203	210	196	209
C20:5n3	20	21	23	23	19	21	21	20
C22:0	20	19	18	18	18	18	22	22
C24:0	20	19	20	19	19	19	20	18
C22:6n3	42	44	51	47	47	45	45	46
C24:1n9	37	37	40	38	37	35	37	37
Σ FA	2 980	2 919	2 983	2 903	2 912	2 695	2 918	2 679
Σ SFA	916	902	906	882	893	834	917	834
Σ MUFA	773	761	769	752	742	680	745	679
Σ PUFA	1 292	1 256	1 308	1 269	1 277	1 181	1 256	1 166
Σ n3 PUFA	125	128	135	133	123	126	125	120
Σ n6 PUFA	1 167	1 128	1 173	1 136	1 153	1 055	1 131	1 045



Obrázek 12. Rozdíly v procentuálním zastoupení plazmatických hladin FA u testovací a kontrolní skupiny v průběhu 4 odběrů. Statisticky významné rozdíly zjištěné pomocí ANOVA ($\alpha = 0,05$) mezi odběry i mezi skupinami jsou označeny *.

Tabulka 10. Koncentrace FA v erythrocytech probandů studie OMEGA v µg/ml; T - Testovací, K - Kontrolní

Odběr	1.		3.	
	T	K	T	K
FA \ počet	16	17	15	17
C14:0	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
C16:0	354	338	386	384
C16:1n7	6	5	5	5
C18:0	240	229	268	252
C18:1n9c	213	199	217	212
C18:1n7c	21	20	20	20
C18:2n6cc	190	171	206	196
C18:3n3	2	2	3	3
C20:0	7	7	7	8
C20:1n9c	5	5	5	5
C20:2n6	6	6	7	7
C20:3n3	30	28	31	32
C20:4n6	267	256	295	312
C20:5n3	12	12	13	14
C22:0	29	27	30	29
C24:0	81	78	86	87
C22:6n3	73	70	90	87
C24:1n9	87	82	92	94
Σ FA	1628	1538	1768	1751
Σ SFA	717	684	783	765
Σ MUFA	332	311	340	336
Σ PUFA	580	544	645	650
Σ n3 PUFA	117	111	137	135
Σ n6 PUFA	463	433	507	515



Obrázek 13. Statisticky významné rozdíly v procentuálním zastoupení FA v erythrocytech. * statisticky významné rozdíly (ANOVA, $\alpha = 0,05$).

4.4 Studie VEGGIE-2

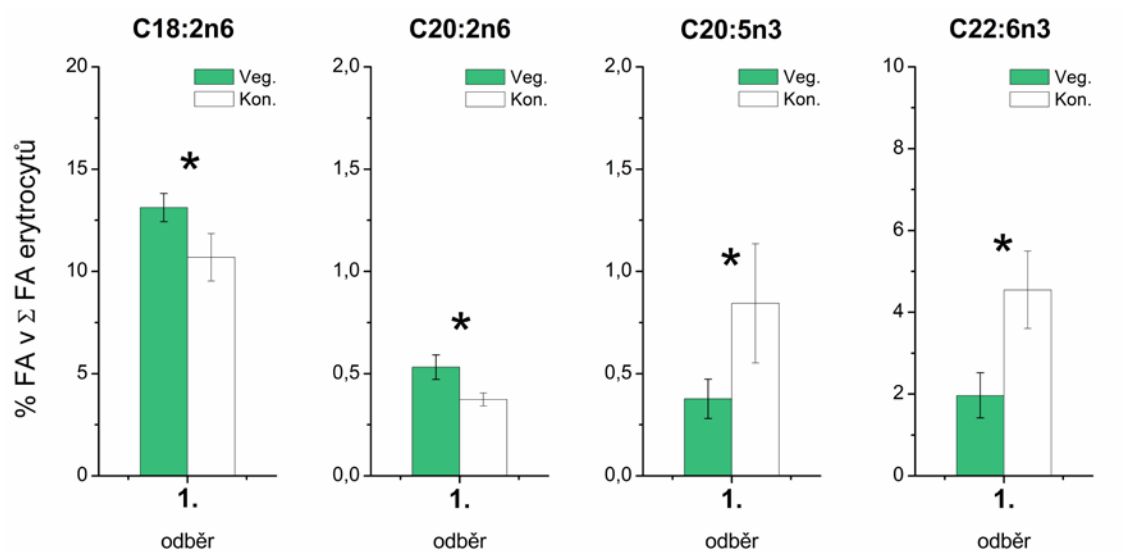
Naše společnost je sužována výskytem diabetu mellitu a komplikacemi s ním spojenými. Ty často zkracují délku života nebo snižují jeho kvalitu. Zpráva WHO z roku 2014 hovoří o 422 milionech lidí zasažených některou z forem diabetu, což činí asi 8,5 % veškeré dospělé populace na Zemi [174]. Odhady pro rok 2018 mluví už o více než 500 miliónech [175] a predikce pro rok 2045 dle IDF činí 629 milionů diabetiků s nejvyšším nárůstem v rozvojových zemích [176]. Předstupněm T2D je vznik tzv. inzulínové rezistence (IR), nazývané též jako porušená glukózová tolerance (IGT). V ČR připadalo v roce 2017 na 718 tisíc diabetiků zhruba dalších 185 tisíc lidí s IGT [177]. U lidí stravujících se veganskou či lakto-ovo-vegetariánskou stravou je prokázán nižší výskyt T2D [178-182] a nižší inzulínová rezistence [183-186]. Příjem masa a masných výrobků je spojován se vznikem IGT a T2D [187], ale dietních faktorů majících vliv na rozvoj IGT je celá řada a jejich vliv je komplexní.

V rámci studie VEGGIE-2 byly vybrány dva faktory spojené s příjmem masa a to nasycené mastné kyseliny (SFA) a rozvětvené aminokyseliny (BCAA) a byl sledován jejich vliv na inzulínovou senzitivitu, markery oxidativního stresu a mitochondriální biogeneze u veganů. Studii VEGGIE-2 vedl dr. Gojda s finančním podporou MZČR, grant NT/14416. Naší úlohou bylo stanovení FA ve frakci FFA krevní plazmy, v erytrocytech a ve vzorcích odebrané tukové tkáně. Díky časové náročnosti projektu se spektrum plánovaných úkolů zúžilo na intervenci BCAA.

Na počátku byl porovnán profil FA u skupiny veganů a omnivorů vycházející ze vstupních odběrů. U veganů byly očekávány nižší hladiny SFA a naopak vyšší hladiny PUFA oproti kontrolní skupině, což potvrzuje analýza tukové tkáně, viz. Tabulka 11, i analýza plazmatických FFA, viz. Tabulka 12. Omnivoři mají o 65 % vyšší sumární hladinu SFA ve frakci FFA oproti veganům. V tukové tkáni tento rozdíl činí 53 %. V případě PUFA mají vegani vyšší hladinu ve frakci FFA krevní plazmy o 29 % a v tukové tkáni tento rozdíl činí dokonce 95 %. Mezi tukovou tkání a frakcí FFA existuje samozřejmě úzké propojení z důvodu vyplavování zásobních lipidů při lačnění. Zajímavé je, že se tento fakt výrazně nepromítá do lipidového profilu erytrocytů. Signifikantní rozdíly v absolutních koncentracích FA se zde sice objevují, ale po přepočtení Tabulky 13 na procentuální zastoupení jsou sumární hladiny jednotlivých

skupin FA již statisticky shodné. Výjimkou jsou omega-3 FA, jejichž sumární zastoupení je na úrovni 55 % kontrolní skupiny. Průměrná hodnota omega-3 indexu je 2,3 % pro vegany a 5,4 % pro omnivory. Nedostatek omega-3 FA s dlouhým řetězcem tak patří mezi jednu z nevýhod veganské stravy. Konkrétně jde o EPA a DHA, jejichž procentuální zastoupení v erytrocytech je přibližně poloviční oproti omnivorům, viz. Obr. 14.

U intervence BCAA se nám podařilo zachytit dvě statisticky signifikantní změny ve frakci FFA a to vzestup kyseliny myristové u veganů a pokles kyseliny stearové v kontrolní skupině, viz. Tabulka 12. Stejný pokles C18:0 se objevuje i v absolutních koncentracích v erytrocytech (Tabulka 13); při porovnání procentuálního zastoupení ovšem nebyl odhalen rozdíl. V absolutních koncentracích byl zaznamenán pokles C18:1n9, C20:4n6, C24:0 a C24:1n9 u kontrolní skupiny. Ze změn v procentuálním zastoupení FA v erytrocytech byl odhalen statisticky významný nárůst kyseliny palmitové a palmitolejové u kontrolní skupiny, viz Obr. 15. Jelikož BCAA nejsou metabolizovány v játrech, ale především kosterním svalstvem a tukovou tkání, je jejich přebytek spojen s *de novo* lipogenezí [188]. To pravděpodobně vedlo k navýšení zastoupení C16:0 a C16:1n7 v erytrocytech po 3 měsíční intervenci, ale pouze u kontrolní skupiny omnivorů. Tento výsledek je v dobré shodě s analýzou exprese genů tukové tkáně publikované v článku Gojda et al. [189], kde došlo ke zvýšení exprese syntázy mastných kyselin (FAS), stearyl-CoA-desaturázy 1 (SCD1), diglyceridacyltransferázy (DGAT-2) a to vše pouze u kontrolní skupiny omnivorů. Hypotéza vysvětlující odlišné reakce na BCAA u těchto dvou skupin pravděpodobně spočívá v nižší bazální hladině BCAA u veganů. Na druhé straně u omnivorů vede jejich přebytek ke zvýšení lipogeneze v tukové tkáni [189], ale faktorů majících vliv je samozřejmě více. Jedním z dalších může být nižší hladina některých vitamínů (kobalamin 4) ovlivňující diferenciaci adipocytů a následně vedoucí k nižšímu lipogennímu efektu u veganů [189].



Obrázek 14. FA se signifikantně odlišným procentuálním zastoupením v erythrocytech veganů a omnivorů (ANOVA, $\alpha = 0,05$).

Tabulka 11. Koncentrace FA v tukové tkáni veganů ($n = 18$) a omnivorů ($n = 20$) v mg/g. Signifikantní rozdíly (ANOVA, $\alpha = 0,05$) vyznačeny **tučně**.

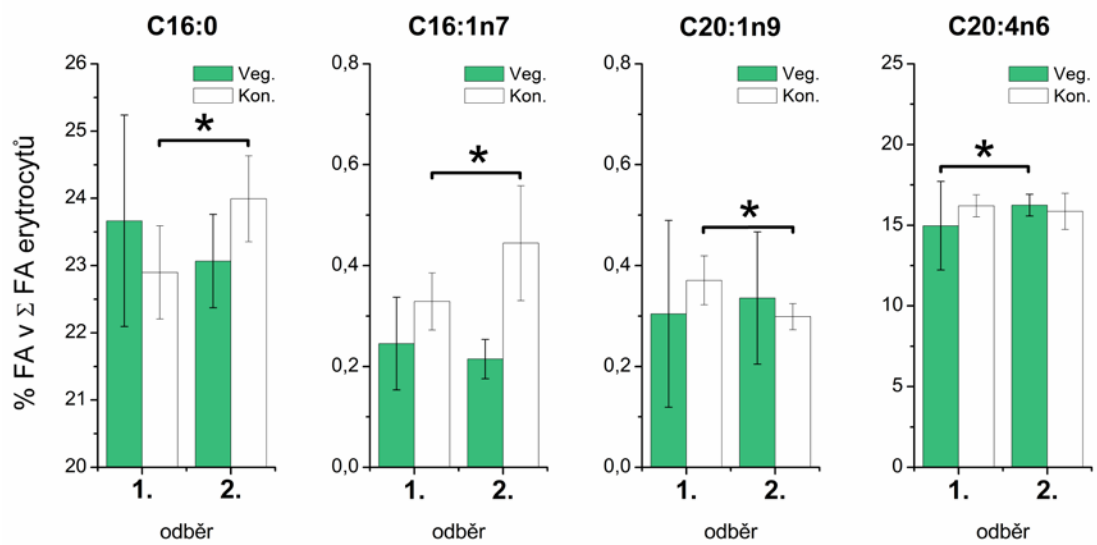
FA	Vegani	Kontroly	FA	Vegani	Kontroly
C12:0	7,1	5,5	Σ FA	783,3	785,6
C14:0	13,1	24,7	Σ SFA	187,4	286,8
C14:1	0,9	2,6	Σ MUFA	393,6	395,4
C16:0	139,2	221,6	Σ PUFA	202,3	103,4
C16:1	15	31,9			
C18:0	25,9	32,9			
C18:1	372,3	354,7			
C18:2	186,6	92,0			
C18:3n3	9,1	5,9			
C20:0	2,1	2,1			
C20:1n9	5,4	6,2			
C20:2n6	2,4	1,6			
C20:3n3	1,5	1,1			
C20:4n6	2	2			
C22:6n3	0,7	0,8			

Tabulka 12. Koncentrace jednotlivých FA ve frakci FFA krevní plazmy v $\mu\text{g/ml}$. Statisticky významné rozdíly (ANOVA, $\alpha = 0,05$) mezi skupinami ($n = 8$) před intervencí jsou vyznačeny **tučně**, signifikantní rozdíly v rámci stejné skupiny před a po intervenci jsou vyznačeny **modře**.

odběr FA	vstupní		intervence BCAA	
	Vegani	Kontroly	Vegani	Kontroly
C14:0	2,1	4,5	2,7	3,9
C16:0	28,8	50,1	31,2	40,3
C16:1n7	4,1	9,7	4,2	8,2
C18:0	10,5	13,7	9,2	10,2
C18:1n9c	66,7	89,9	69,0	71,7
C18:1n7c	3,3	5,7	3,1	4,6
C18:2n6cc	41,5	31,5	45,4	29,9
C18:3n3	3,1	2,6	3,5	2,5
C20:4n6	2,5	2,4	2,1	1,9
Σ FA	162,6	210,0	170,5	173,3
Σ SFA	41,4	68,2	43,1	54,4
Σ MUFA	74,1	105,3	76,4	84,6
Σ PUFA	47,1	36,5	51,0	34,3

Tabulka 13. Koncentrace FA v erythrocytech veganů a kontrol ($n = 8$) před a po intervenci BCAA v $\mu\text{g/ml}$; **tučně** - signifikantní rozdíly mezi skupinami (ANOVA, $\alpha = 0,05$), **modře** - signifikantní rozdíly před a po intervenci.

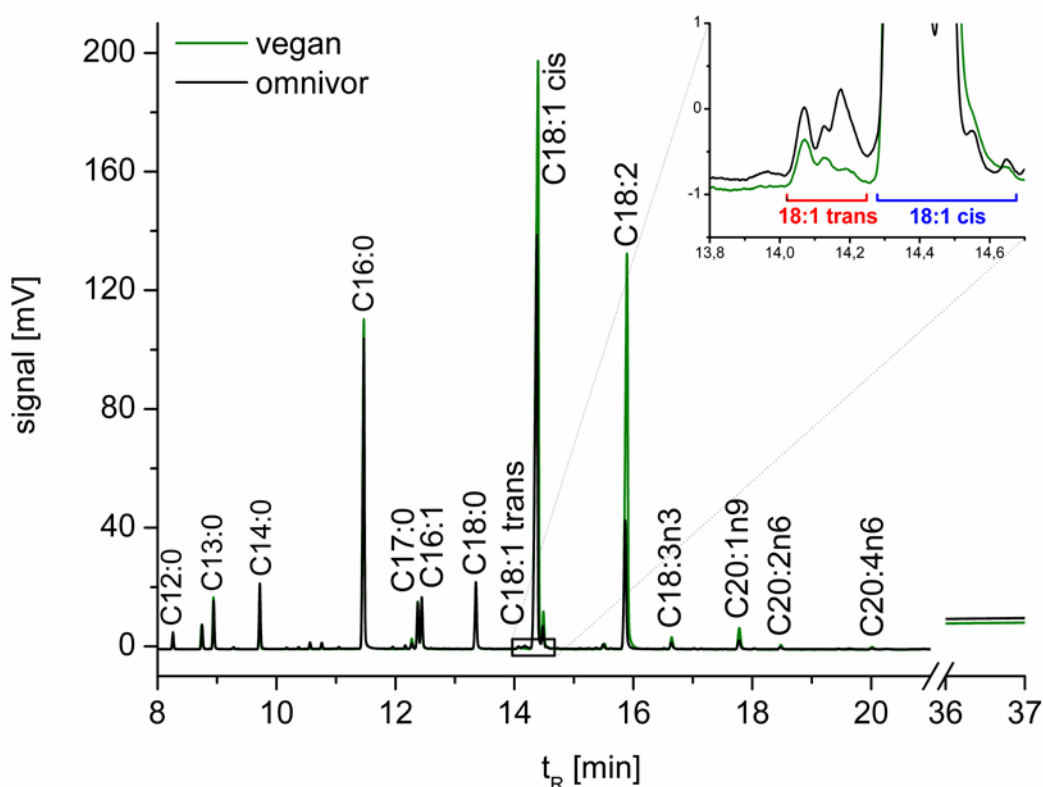
odběr FA	vstupní		intervence BCAA	
	Vegani	Kontroly	Vegani	Kontroly
C14:0	9,2	9,3	< LOQ	9,7
C15:0	5,0	5,1	4,2	5,0
C16:0	361,3	417,4	373,9	393,8
C16:1n7	3,6	6,0	3,5	7,3
C18:0	248,1	275,7	246,5	247,0
C18:1n9c	211,9	245,3	228,2	217,4
C18:1n7c	19,4	23,5	21,1	21,7
C18:2n6cc	201,5	194,5	213,0	178,7
C18:3n6	< LOQ	< LOQ	< LOD	< LOD
C18:3n3	3,0	3,7	3,0	2,6
C20:0	5,6	9,8	6,3	8,0
C20:1n9c	4,8	6,7	5,4	4,9
C20:2n6	8,2	6,8	8,4	6,3
C20:3n3	24,6	33,5	27,4	30,7
C20:4n6	230,3	295,4	263,1	260,2
C20:5n3	5,8	15,5	6,8	12,9
C22:0	22,5	30,4	21,9	26,3
C22:1n9c	< LOQ	2,5	< LOQ	< LOQ
C24:0	63,1	69,8	60,9	59,0
C22:6n3	30,3	83,2	37,6	71,5
C24:1n9	71,7	85,7	77,5	74,7
Σ FA	1533,9	1822,2	1619,4	1640,8
Σ SFA	714,8	817,6	721,4	748,8
Σ MUFA	313,1	369,7	337,4	327,8
Σ PUFA	506,0	634,9	560,6	564,2
Σ n3 PUFA	63,6	135,8	74,8	117,7
Σ n6 PUFA	434,2	492,3	477,4	440,2



Obrázek 15. Rozdíly v procentuálním zastoupení FA v erytrocytech po intervenci BCAA u skupiny veganů a omnivorů. * signifikantní rozdíly (ANOVA, $\alpha = 0,05$).

4.5 Vytvoření teplotního programu pro spojené kolony

Vývoj metody pro GC s dvěma různými spojenými kolonami vycházel z metod pro přímou GC analýzu *trans* izomerů FA na 100 metrové koloně s polární SF. *Cis* izomery FA vykazují vyšší afinitu k polární SF v porovnání s *trans* a navíc malé rozdíly v polaritě molekuly, dle pozice dvojně vazby v molekule, vedou k oddělení jednotlivých polohových izomerů. Dosahováno je vyššího rozlišení pro *cis* polohové izomery v porovnání s *trans*. Z používaných SF jde především o kyanopropylovou fázi CP-Sil88, SP-2560 a zatím nejvíce polární fázi IL111. Pro všechny tyto kolony existují metody umožňující stanovit sumu *trans* C18:1 izomerů ve vzorku, viz. chromatogram na Obr. 16. Separace všech pozičních *trans* či *cis* izomerů kyseliny oktadecenové v přírodním nebo biologickém materiálu se na těchto kolonách dosáhnout nepodařilo.



Obrázek 16. Separace mastných kyselin na 100 m koloně SLB-IL111 se zvětšením zóny obsahující *trans/cis* izomery C18:1. Průtok $H_2 = 2,1$ ml/min. Teplotní program: 140 °C po 5 min, gradient 8 °C/min na 190 °C držených 16 min, gradient 27 °C/min na 260 °C držených 5 min.

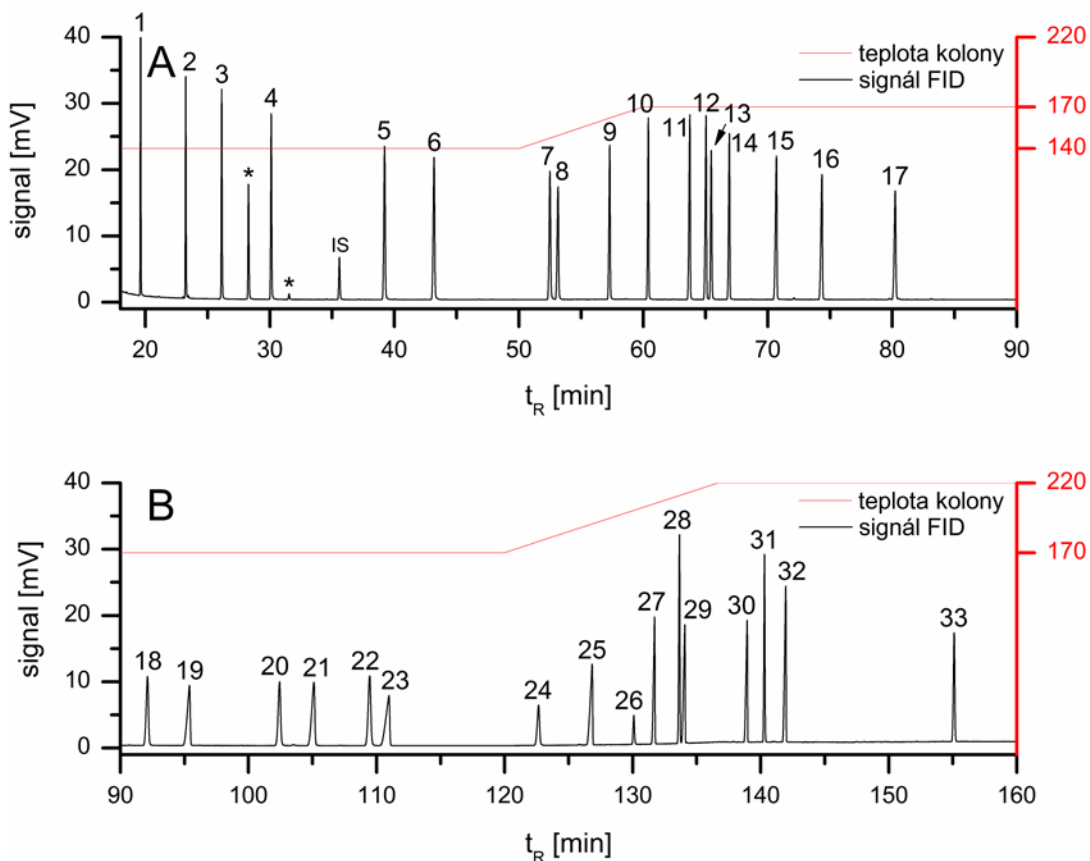
Yoshinaga et al. [190] byl tomuto cíli nejbližší: Z 13ti pozičních *trans* izomerů bylo plně odděleno 9 izomerů, částečně separovány byly izomery *trans*-8 a *trans*-9 a izomery *trans*-6 a *trans*-7 koeluovaly. To vše při době analýzy 165 min pro vzorek obsahující pouze C18:1 izomery. Rozdělení některých pozičních izomerů v mléce dosáhl Delmonte et al. [191] při spojení dvou 100 metrových kolon SLB-IL111. Přesto např. izomery *trans*-8 a *trans*-9, *trans*-13 a *trans*-14 a *cis*-6 a *cis*-7 koeluovaly.

S cílem provést co nejlepší separaci jednotlivých *trans* izomerů jsme se rozhodli vydat stejnou cestou. Pro analýzu jsme použili starší kolonu SLB-IL111 a zcela novou kolonu SP-2560, které jsme spojili spojkou. Vývoj teplotního programu vycházel ze znalosti ideální teploty pro separaci C18:1 izomerů při izotermální eluci. Pro kolonu SP-2560 je to teplota 180 °C, zatímco pro kolonu SLB-IL111 je to 168 - 170 °C. Při této teplotě ale docházelo ke koeluci C14:1n5c a C15:0. Z tohoto důvodu začínal teplotní program na nižší teplotě 140 °C držených až do eluce tohoto kritického páru, následoval gradient na teplotu 170 °C. Zde se ukázalo jako klíčové rozlišení kyseliny elaidové, *trans*-10-oktadecenové a kyseliny *trans*-vakcenové od ostatních izomerů kyseliny oktadecenové. Tyto zmíněné tři *trans* izomery C18:1 totiž společně tvoří téměř polovinu všech TFA přítomných v našich vzorcích. Výřez zóny chromatogramů ukazující separaci C18:1 izomerů je na Obr. 20. Při teplotě 170 °C sice dochází ke koeluci C18:3n6ac, C18:3n3tct a C20:1n9t, nicméně chyba při kvantifikaci majoritní C18:3n6 je díky jejich malému výskytu nízká. Plato 170 °C bylo drženo až do eluce dalšího kritického páru C18:3n3 a C21:0, pro jejichž rozdělení je tato teplota také vhodná. Následoval opět teplotní gradient v jehož průběhu dochází k eluci C20:3n3, C20:4n6 a C23:0. Poslední teplotní plato 220 °C bylo zvoleno s ohledem na co nejrychlejší eluci zbývajících FAME a zároveň s ohledem na životnost kolony.

Autoři již citovaného článku Delmonte et al. [191] navíc využili pro zkrácení analýzy průtokový gradient na výsledný průtok 3 ml/min. Dosahují tak v porovnání s námi výrazně kratšího času analýzy, tj. 87,5 min. Bohužel tato cesta pro nás byla uzavřena, díky limitu tlakového regulátoru našeho GC systému. Jeho hodnota udaná výrobcem je 400 kPa a při průtoku vodíku 1,7 ml/min a splitu 1:100 byl tlak na počátku kolony 381 kPa. Další zvyšování průtoku tedy nebylo možné.

V průběhu analýz bylo pozorováno zkracování retenčních časů hlavně PUFA. Tento jev je také zmíněn v publikaci Delmonte et al. [191] a je přičítán stárnutí kolony, které se projeví poklesem polarity SF a díky tomu je zkrácení t_R úměrné stupni nenasyčenosti FA. Retenční čas poslední identifikované FA v chromatogramu, tj. DHA, se v průběhu 100 analýz zkrátil přibližně o 5,5 min a u kyseliny olejové o 2 min. Proto je vhodné po každých 10 vzorcích provést analýzu kalibračního vzorku pro kontrolu identifikace FA. Naše vzorky byli před analýzou *cis/trans* izomerů vysušeny přidavkem bezvodého síranu sodného. Přesto však mohly obsahovat stopové množství metanolu, který přispívá ke zkrácení t_R . Podobné platí pro cholesterol a jiné výše vroucí komponenty, které zůstávají v dlouhé koloně s vysoce polární SF trvale absorbovány.

Metoda byla dokončena změřením a vyhodnocením kalibrační sady popsané v experimentální části pomocí softwaru Class VP 4.3. Parametry kalibrační závislosti a vzorec pro průměrný odezvový faktor zůstává shodný s výše uvedeným. Hodnoty citlivosti (a), posunutí (b), průměrné odezvové faktory a korelační koeficienty kalibrační přímky (R^2) jsou uvedeny v Tabulce 14. Pro nekalibrované FA byl nastaven ARF podle příslušného izomeru obsaženého v kalibraci: pro C14:1n5t to byl ARF C14:1n5c, pro C16:1n7t a C16:1n9c ARF C16:1n7c; pro všechny izomery C18:1 pak hodnota ARF C18:1n9c, pro izomery C18:2 hodnota ARF C18:2n6ac a pro C18:3n3 izomery hodnota C18:3n3ac. Uvedené hodnoty LOD a LOQ odpovídají poměru *signál/šum* = 3, respektive 10.



Obrázek 17. Chromatogram kalibračního vzorku 6. úrovně rozdělený v čase 90 min na dvě poloviny, viz. A a B. Pořadí FA odpovídá Tabulce 14. IS = C13:0; * artefakt vzniklý při esterifikaci.

Tabulka 14. Kalibrační parametry metody pro stanovení FA na spojených kolonách SLB-IL111 a SP-2560. LOD a LOQ uvedeno v $\mu\text{g/ml}$.

	FA	<i>a</i>	<i>b</i>	ARF	R^2	LOD	LOQ
1.	C8:0	1,13638	0,05256	0,78454	0,99993	4,1	13,5
2.	C10:0	1,03584	0,03596	0,87561	0,99894	4,5	15,0
3.	C11:0	1,01328	0,00308	1,02154	0,99963	5,1	17,1
4.	C12:0	1,00493	0,00920	0,97128	0,99979	6,0	20,0
5.	isoC14:0	1,01292	0,00414	0,97659	0,99994	8,6	28,8
6.	C14:0	0,98620	0,01745	0,97566	0,99967	9,2	30,6
7.	C14:1n5c	1,03998	0,01605	0,92140	0,99968	9,7	32,3

8.	C15:0	0,97442	0,01644	0,96277	0,99967	8,5	28,3
9.	isoC16:0	1,00831	0,00437	0,98151	0,99995	7,0	23,4
10.	C16:0	0,97428	0,01054	0,99953	0,99939	5,8	19,3
11.	isoC17:0	0,95737	0,00868	1,02970	0,99993	6,4	21,2
12.	anteisoC17:0	1,01319	0,00870	0,96903	0,99994	7,0	23,5
13.	C16:1n7c	0,99531	0,01809	0,96438	0,99979	7,3	24,3
14.	C17:0	0,94194	0,00050	1,05621	0,99968	6,3	21,1
15.	isoC18:0	0,98992	0,01289	0,98254	0,99986	7,7	25,8
16.	C18:0	0,93262	0,00080	1,11408	0,99973	7,7	25,7
17.	C18:1n9c	0,95275	0,00054	1,03606	0,99953	9,1	30,5
18.	C18:2n6ac	1,23908	-0,02064	0,84299	0,99932	14,6	48,7
19.	C20:0	0,91902	0,01359	1,03773	0,99974	13,2	44,0
20.	C18:3n6ac	1,08967	0,01956	0,87104	0,99983	16,4	54,8
21.	C20:1n9c	0,93974	0,02063	1,00769	0,99990	15,1	50,3
22.	C18:3n3ac	0,98600	0,01514	0,96657	0,99973	16,0	53,4
23.	C21:0	0,99636	0,01498	1,01068	0,99790	17,0	56,5
24.	C20:2n6ac	1,84523	0,01254	0,52488	0,99990	24,9	83,0
25.	C22:0	0,92125	0,01248	1,04717	0,99975	9,9	33,0
26.	C20:3n6ac	1,87337	0,00560	0,51856	0,99952	15,3	51,0
27.	C22:1n9c	0,99830	0,01253	0,96544	0,99977	7,1	23,7
28.	C20:4n6ac	1,04701	0,01807	0,92358	0,99967	6,9	22,8
29.	C23:0	0,89929	0,01979	1,04372	0,99943	6,1	20,3
30.	C24:0	0,90579	0,01088	1,06484	0,99979	5,7	19,1
31.	C20:5n3ac	1,05339	0,01397	0,90986	0,99980	6,4	21,5
32.	C24:1n9c	0,92256	0,01679	1,03298	0,99975	6,0	20,2
33.	C22:6n3ac	1,10528	0,01275	0,86916	0,99975	9,7	32,4

4.5.1 Příprava izomerů C18:1

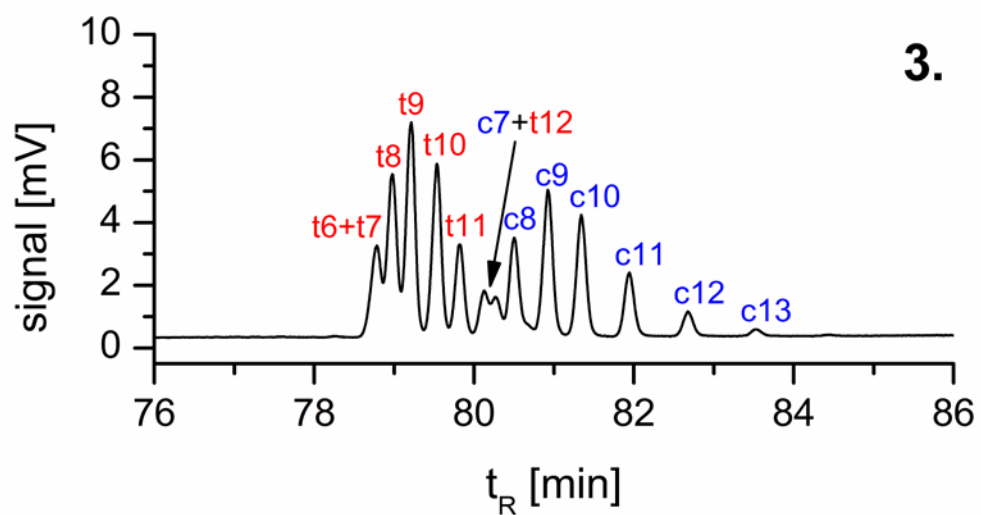
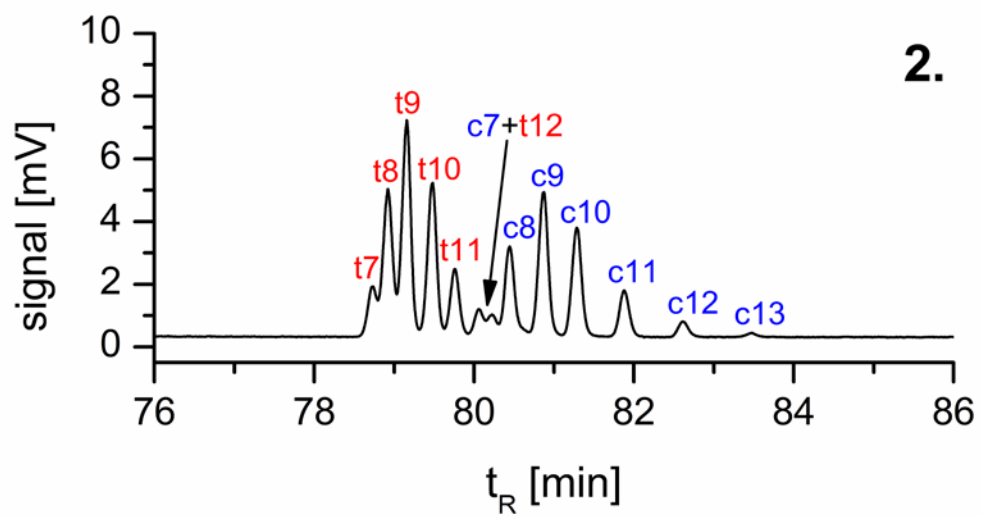
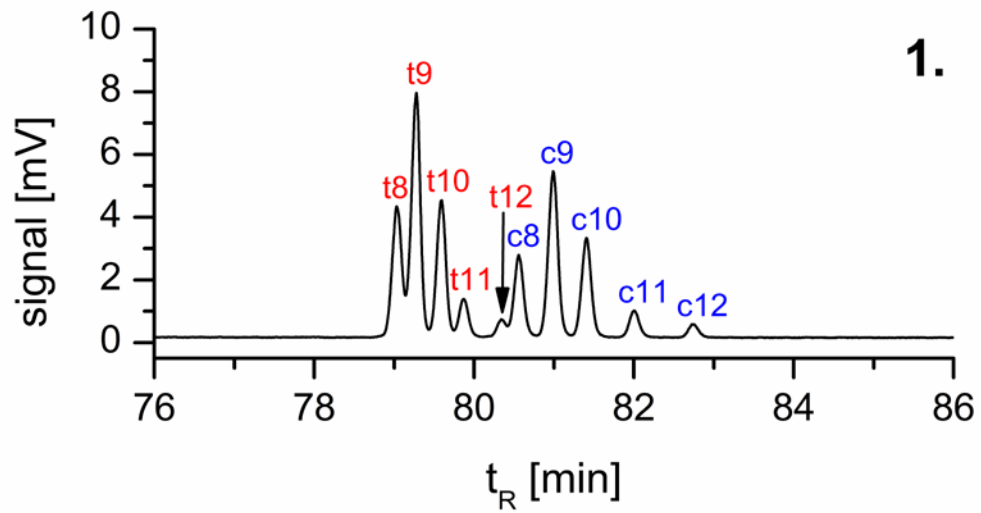
Komerčně dostupný je pouze izomer *trans*-9, tj. kyselina elaidová, a *trans*-11, tj. kyselina *trans*-vakcenová. Z tohoto důvodu byly ostatní izomery kyseliny oktadecenové C18:1 syntetizovány v laboratoři dle článku Delmonte et al. [192]. Syntéza vycházela z kyseliny elaidové a vakcenové, čímž se ušetřilo jedno opakování adice/eliminace HBr. Jednotlivé kroky adice/eliminace HBr byly 6krát opakovány, což by mělo vést k získání *cis/trans* izomerů s dvojnou vazbou na 3. až 17. uhlíku. Po každé provedené adici/eliminaci HBr byla část produktu (cca 10 mg) esterifikována a analyzována na GC za účelem správné identifikace vzniklých izomerů. Získané chromatogramy těchto kontrolních analýz jsou na Obr. 18 a Obr. 19. Každé opakování uvedeného postupu vede k produkci izomerů majících dvojnou vazbu o 1 uhlík dále a o 1 uhlík blíže karboxylu a to v množství odpovídajícím přibližně jedné čtvrtině výchozího izomeru, viz. schéma na Obr. 11. Z výchozích dvou FA teoreticky vzniká kyselina *trans*-8, *trans*-10 a *trans*-12-oktadecenová, ale ve skutečnosti byly syntetizovány i *cis* izomery uvedených kyselin, viz. Obr. 18. Ve 2. opakování již byly očekávány *cis/trans* izomery s dvojnou vazbou na uhlíku 7 - 13. Izomer *trans*-13 je zřejmě vinou malé navážky kyseliny *trans*-vakcenové vyprodukován ve velmi malém množství a koeluuje v patě píku izomeru *cis*-8. Analýza produktů třetího opakování adice/eliminace HBr nepřinesla žádné nové píky, ale došlo k nárůstu píku *trans*-7 izomeru, což naznačuje koeluci s *trans*-6 izomerem. To bylo potvrzeno až po posledním, tedy 6. opakování, které vedlo k vytvoření *trans*-7 izomeru, jehož pík je vyšší než následující pík *trans*-8 izomeru. Jelikož každý další izomer nalevo i napravo od výchozí kyseliny elaidové by měl mít postupně snižující se koncentraci, musí tento pík obsahovat izomery dva.

Dle původního článku Delmonte et al. [192] je vznik *trans* izomerů termodynamicky zvýhodněn a při této syntéze vznikají ve 2krát vyšších koncentracích než *cis* izomery, v průběhu naší syntézy vzniklo 2,8krát více *trans* izomeru oproti *cis*. Pro naše účely byla klíčová syntéza *trans* izomerů a *cis* izomery vznikly jako vedlejší produkty, a proto byla závěrečná izomerizace s kyselinou *p*-toluensulfonovou, umožňující převést *trans* izomery v *cis* a obráceně, vynechána.

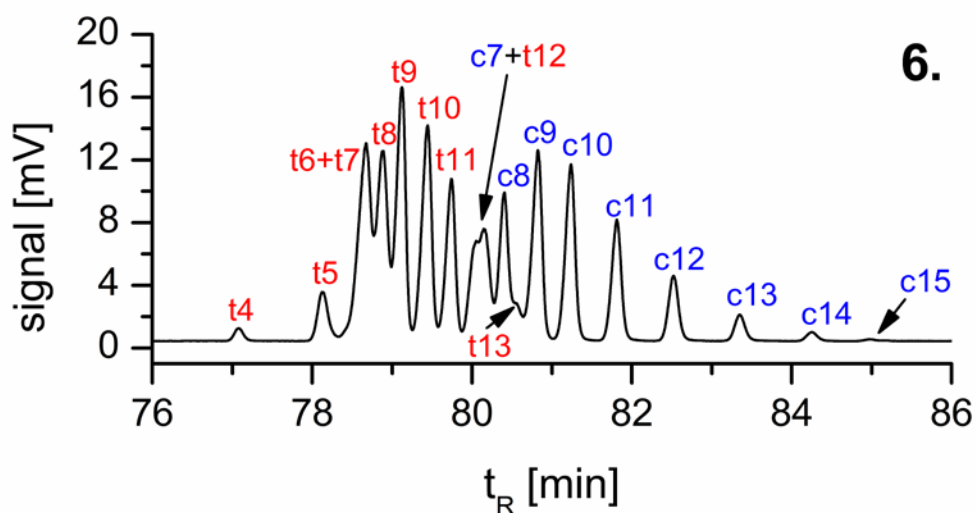
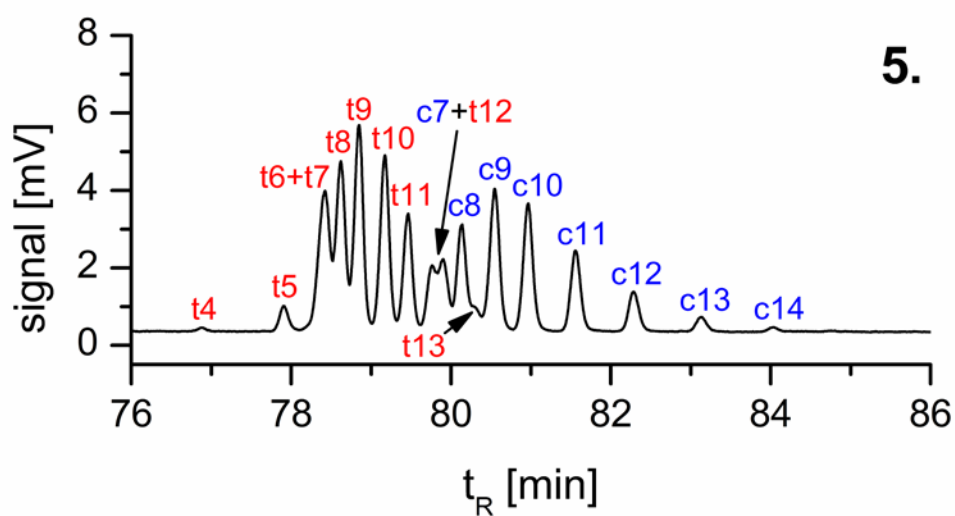
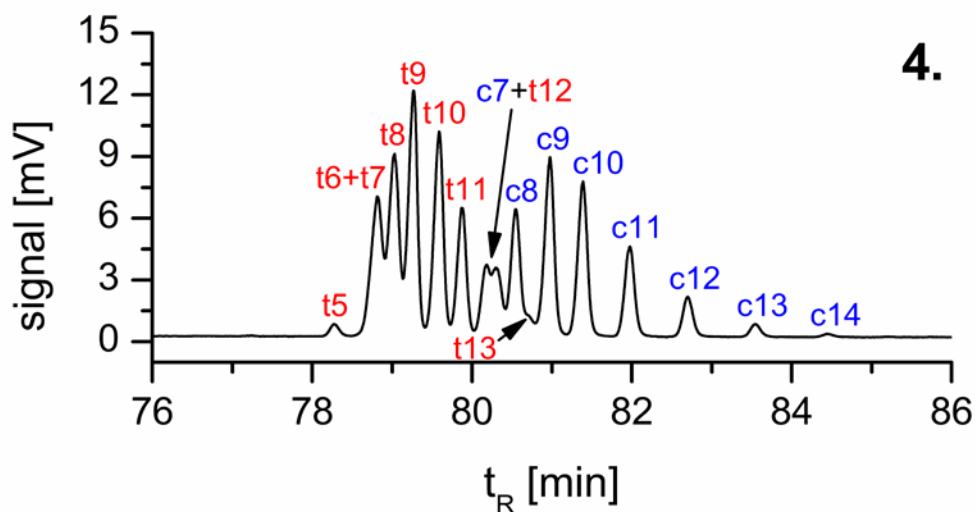
Posledním krokem přípravy *trans* izomerů C18:1 byla separace na Ag-SPE založená na interakci stříbrných iontů s π -elektrony dvojných vazeb. Jelikož je tato

interakce silnější pro *cis* izomery, je možné z kolonky eluovat nejprve *trans* izomery C18:1 a následně zvýšením eluční síly i zbývající *cis* izomery. Výrobce udaná maximální kapacita použité Ag-SPE kolonky je 1 mg FA nebo FAME, ale ve skutečnosti jsme museli dávkované množství snížit až na pouhých 10 µl esterifikované směsi syntetizovaných izomerů, což odpovídá přibližně 1/10 množství udaného výrobcem. Čistota získaných frakcí byla ověřena analýzou na GC se spojenými kolonami. Chromatogramy získaných *cis* C18:1 izomerů, viz. Obr. 20B, *trans* C18:1 izomery, viz. Obr. 20A. Nejnižší rozlišení je mezi *t*7 a *t*8, *t*8 a *t*9 a má hodnotu 0,9. V získaných chromatogramech byl identifikován izomer *cis*-6, který koeluuje s izomerem *cis*-7 a stejně tak izomer *trans*-14 koeluuje s izomerem *trans*-13. Koeluze těchto dvou párů zmíněných izomerů je ve shodě s publikací Delmonte et al. [191], kde na dvou spojených 100 metrových kolonách SLB-IL111 jsou tyto dva páry také koeluovány.

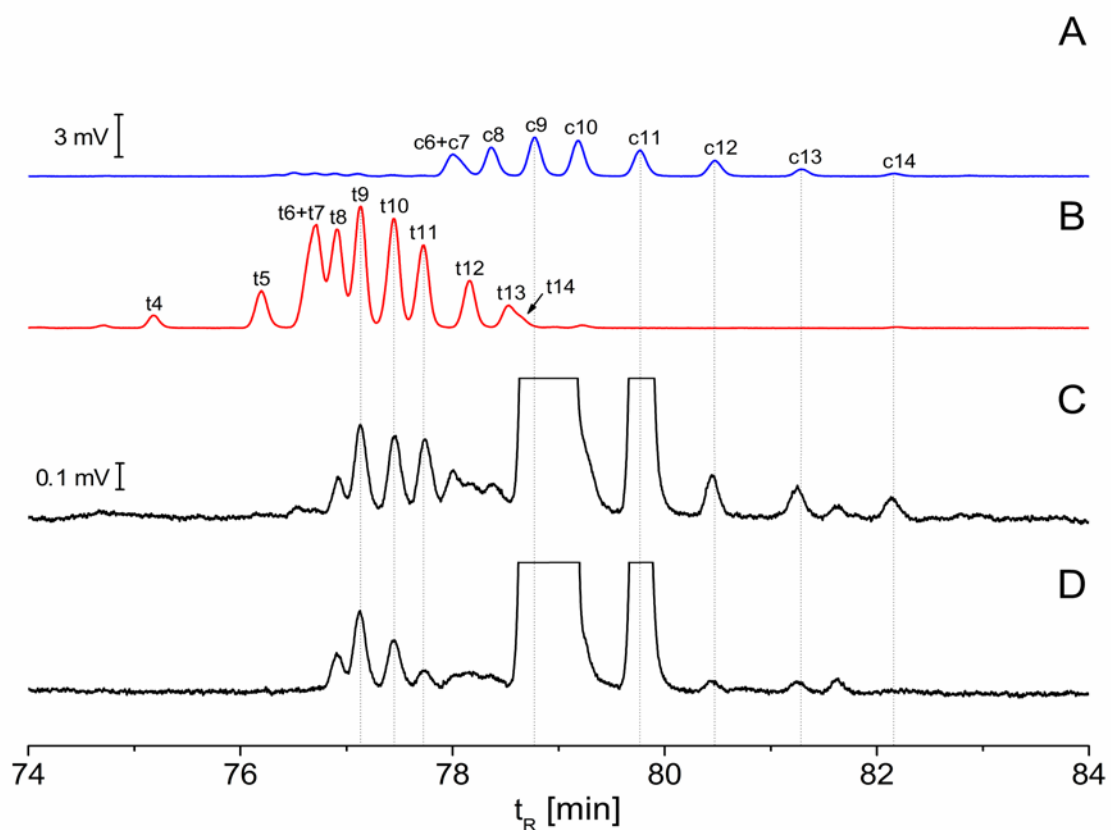
Celkem se nám uvedeným postupem povedlo získat *cis* izomery C18:1 s dvojnou vazbou na 6. až 14. uhlíku a *trans* izomery s dvojnou vazbou na 4. až 14. uhlíku, viz. Obr. 19. Izomery *cis*-3, *cis*-4, *cis*-5, *cis*-15, *cis*-16 a *cis*-17 oktadecenové kyseliny už při našem postupu detekovány nebyly. Stejně tak izomery *trans*-3, *trans*-15, *trans*-16 a *trans*-17. Nicméně analýzy našich vzorků neukazují žádné neidentifikované píky s retenčním časem kratším než má *trans*-4 a delším retenčním časem než má *cis*-14 izomer, viz. Obr. 20.



Obrázek 18. Chromatogramy směsi izomerů C18:1 po 1., 2., 3. adici/eliminaci HBr na spojených kolonách SLB-IL111 + SP2560.



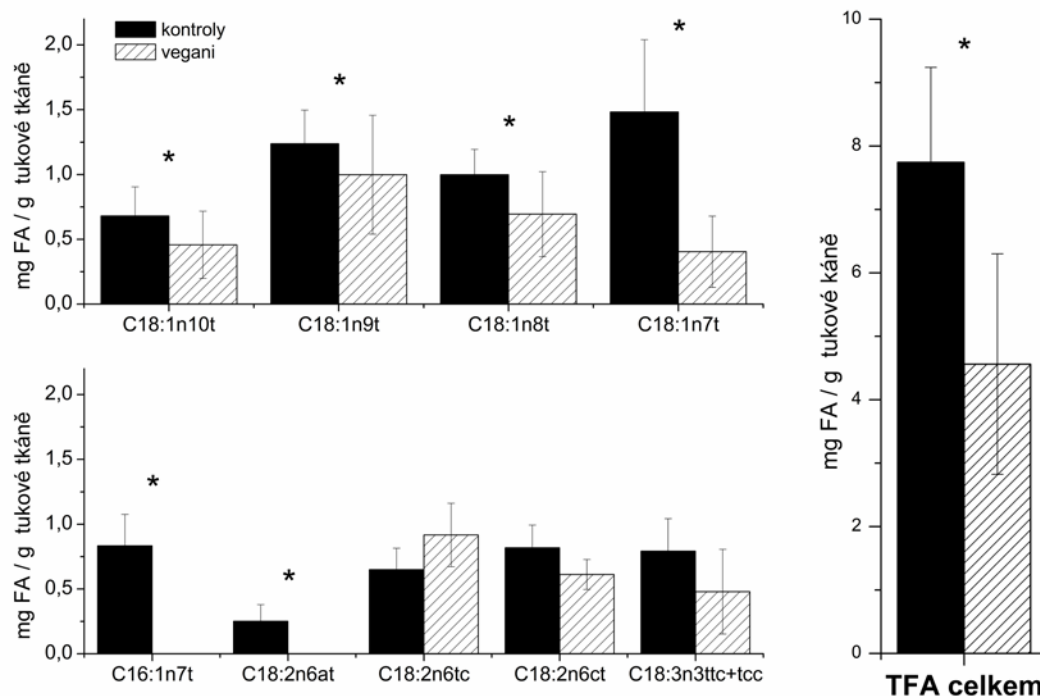
Obrázek 19. Chromatogramy směsi izomerů C18:1 po 4., 5., 6. adici/eliminaci HBr na spojených kolonách SLB-IL111 + SP2560.



Obrázek 20. Detail oblasti C18:1 izomerů v chromatogramech získaných při analýze na spojených kolonách SLB-IL111 + SP2560; **A** - frakce *cis* izomerů po Ag-SPE, **B** - frakce *trans* izomerů po Ag-SPE, **C** - analýza tukové tkáně omnivora, **D** - analýza tukové tkáně vegana.

4.6 Analýza TFA v tukové tkáni veganů a omnivorů

Vzorky tukové tkáně získané v rámci studie VEGGIE-2 byly po svém zpracování, esterifikaci a analýze na 15 m koloně uschovány v mrazáku při $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla provedena detailní GC analýza TFA na dvou spojených stometrových kolonách. Předpokládali jsme nižší hladiny TFA u veganů díky vyloučení mléka a mléčných výrobků, které jsou jejich přírodním zdrojem. Zároveň odlišný způsob přípravy pokrmů u veganů s omezeným smažením či fritováním, by měl také snižovat hladinu TFA. První analýza byla provedena na 100 m koloně SLB-IL111, viz. Obr. 16. Získané výsledky prokázaly téměř poloviční hladinu TFA u veganů a byly předběžně prezentovány na 69. zjazdu chemiků ve Starém Smokovci. Skutečná detailní analýza byla provedena až na spojených kolonách SLB-IL111 a SP-2560, data viz. Tabulka 15. Příslušný chromatogram se zvětšeným výřezem zóny obsahující C18:1 izomery vzorku vegana je na Obr. 20D, a Obr. 20C zobrazuje stejnou část chromatogramu ze vzorku od omnivora. Nejnižší rozlišení je mezi t_8 a t_9 s hodnotou $R_{t_8, t_9} = 0,9$. Zjištěná koncentrace TFA v tukové tkáni je u veganů 4,6 mg/g oproti 7,7 mg/g u omnivorů.



Obrázek 21. Porovnání jednotlivých izomerů TFA ve vzorcích tukové tkáně veganů a omnivorů vyjádřené v mg/g tukové tkáně; * signifikantní rozdíl (ANOVA, $\alpha = 0,05$)

Trans C18:1 izomery se podílí na sumě všech TFA přibližně z 56 % pro obě skupiny. U veganů je nejvíce zastoupená kyselina elaidová (22 %) zatímco u omnivorů je to kyselina vakcenová (19 %). Koncentrace jednotlivých TFA společně se sumou TFA u obou skupin jsou vyneseny v grafu na Obr. 21. Kyselina vakcenová je dominantní TFA kravského mléka [191], proto je její koncentrace u veganů třetinová oproti omnivorům, což potvrzují i nižší hladiny rozvětvených FA pocházející z tohoto zdroje. Oproti tomu je kyselina elaidová dominantní TFA ve ztužených tucích, či potravinách vystavených vysokým teplotám, např. ze smažení či fritování. Zde však není mezi skupinou veganů a omnivorů žádný rozdíl, přestože byl očekáván vzhledem k rozdílným technikám přípravy pokrmů. Některé další TFA jako je C16:1n7t a C18:2n6at nebyly u veganů vůbec detekovány. Zvláštností je vyšší hladina C18:2n6tc u veganů oproti omnivorům. Tento rozdíl není statisticky významný a vysvětlení pro něj zatím nemáme. Tyto výsledky, Tabulka 15 a Obr. 21, společně s metodou pro spojené kolony jsou shrnuty v publikaci Jaček et al. [193] uvedené v příloze této dizertační práce.

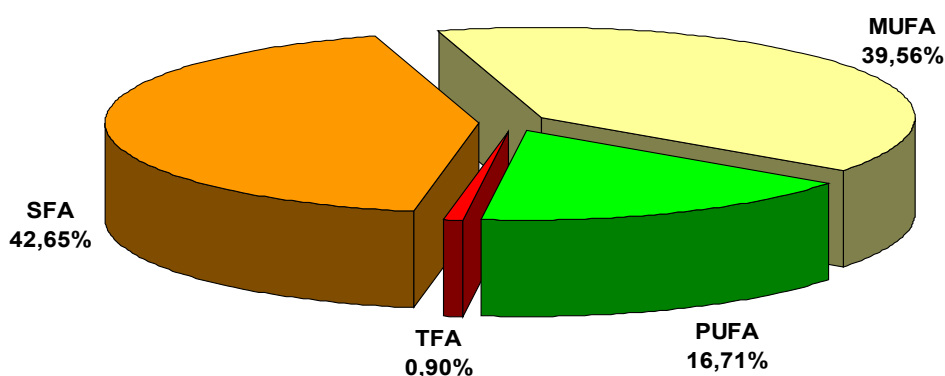
Tabulka 15. Detailní analýza tukové tkáně provedená na spojených kolonách SLB-IL111 a SP2560 včetně cis/trans izomerů v mg/g tukové tkáně. Signifikantní rozdíly (ANOVA, $\alpha = 0,05$) vyznačeny **tučně**.

FA	Vegani	Omnivoři	Název FA
C8:0	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.3	oktanová
C10:0	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.3	kaprinová
C12:0	6.4 ± 2.8	5.1 ± 1.4	laurová
C14:0	12.6 ± 2.6	23.8 ± 4.7	myristová
C14:1n5c	0.9 ± 0.4	2.6 ± 0.7	myristolejová
C15:0	0.9 ± 0.3	2.5 ± 0.6	pentadekanová
isoC16:0	nd	0.7 ± 0.2	isopalmitová
C16:0	156.1 ± 36.1	238.9 ± 42.1	palmitová
C16:1n7t	nd	0.8 ± 0.2	palmitelaidová
isoC17:0	nd	0.3 ± 0.1	15-methylpalmitová
C16:1n9c	4.1 ± 1.4	4.2 ± 0.7	hypogeová
anteisoC17:0	nd	1.5 ± 0.3	14-methylpalmitová
C16:1n7c	14.2 ± 6.2	30.8 ± 5.6	palmitolejová
C18:0	26.2 ± 6.3	33.3 ± 6.2	stearová
C18:1n10t	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.2	trans-8-oktadecenová
C18:1n9t	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.3	elaidová
C18:1n8t	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.2	trans-10-oktadecenová
C18:1n7t	0.4 ± 0.3	1.5 ± 0.6	vakcenová
C18:1n11c, 10c, 6t, 5t	0.5 ± 0.3	1.6 ± 0.3	
C18:1n9c	382.8 ± 98.2	350.9 ± 69.5	olejová
C18:1n8c	0.5 ± 0.5	0.6 ± 0.2	cis-10-oktadecenová
C18:1n7c	10.6 ± 1.9	13.3 ± 2.0	cis-vakcenová
C18:1n6c	nd	0.5 ± 0.1	cis-12-oktadecenová
C18:1n5c	nd	0.4 ± 0.1	cis-13-oktadecenová
C18:1n4c	nd	0.4 ± 0.2	cis-14-oktadecenová
C18:2n6at	nd	0.3 ± 0.1	
C18:2n6ct	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.2	
C18:2n6tc	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2	

C18:2n6ac	206.8 ± 40.8	103.5 ± 13.5	linolová
C20:0	2.0 ± 0.5	1.8 ± 0.4	arachová
C18:3n6ac	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.2	γ-linolenová
C18:3n3ctt+cct	0.5 ± 0.3	0.8 ± 0.2	
C20:1n9c	5.3 ± 1.1	5.6 ± 0.9	gondová
C18:3n3ctc	nd	nd	
C18:3n3tcc	nd	nd	
C18:3n3ac	8.7 ± 2.4	5.8 ± 1.2	α-linolenová
C20:2n6ac	3.4 ± 1.4	2.7 ± 0.5	eikosadienová
C22:0	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1	behemová
C20:3n6ac	2.7 ± 0.8	2.1 ± 0.7	Dihomo-γ-linolenová
C22:1n9c	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.1	eruková
C20:4n6	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.6	arachidonová
C24:0	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	lignocerová
C20:5n3ac	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2	EPA
C24:1n9c	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	nervonová
C22:6n3	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.2	DHA
Σ FA	856.9 ± 148.0	848.4 ± 120.7	
Σ SFA	207.0 ± 41.0	310.0 ± 46.3	
Σ MUFA	422.7 ± 131.6	417.3 ± 112.7	
Σ PUFA	227.1 ± 43.5	120.4 ± 15.1	
Σ TFA	4.6 ± 1.7	7.7 ± 1.5	

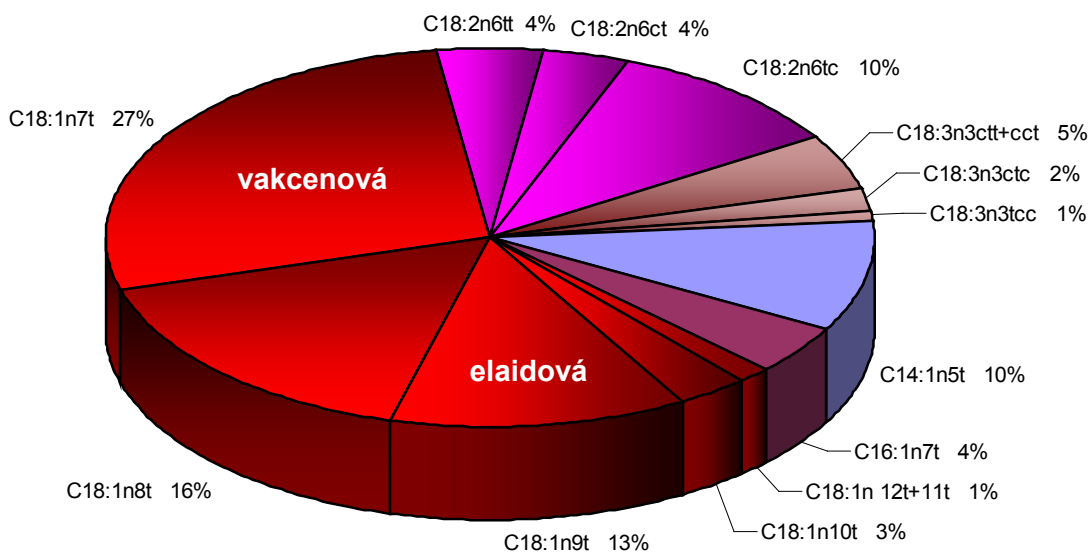
4.7 Stanovení zastoupení TFA v mateřském mléce

Vyvinutá metoda pro spojené kolony SLB-IL111 a SP-2560 byla použita i pro sledování hladiny TFA v mateřském mléce pražských matek v roce 2017. Postup odběru a zpracování vzorků je společně s charakteristikou celého souboru subjektů uveden v experimentální části. Mateřské mléko odráží jak FA aktuálně přijímané z potravy, tak v mnohem větší míře FA deponované v tukové tkáni matky. Díky tomu se stává dobrým markerem dlouhodobého příjmu TFA naší populace. Další výhodou je získání vzorků neinvazivním způsobem. Zajištění odběru a celého projektu bylo v gesci prof. Černé, v rámci spolupráce Ústavu hygieny 3. lékařské fakulty a Státního zdravotního ústavu. Kojící matky, které se průzkumu účastnily, vyplnily podrobný dotazník konzumace vybraných potravin za uplynulé 3 měsíce. Část tohoto dotazníku, s počtem příslušných odpovědí k potravinám obsahujícím TFA, uvádím v experimentální části v Tabulce 6. Celkem bylo analyzováno 50 vzorků mateřského mléka, jejichž průměrné procentuální zastoupení je uvedeno v Tabulce 16. Celkový obsah FA se pohyboval v rozmezí 13,5 - 80,3 mg/ml. Široké rozmezí koncentrací je dáno širokým rozmezím stáří kojeného dítěte, které se pohybovalo od 4 do 60 dnů. Tuk je obecně v mateřském mléce nejvíce variabilní položkou. Jeho zastoupení vzrůstá v průběhu vývoje od kolostra (1. – 5. den), přes přechodné mléko (6. – 15. den) až po mateřské mléko (> 15. den), kde tvoří 3 - 5 hmot. % [43, 194] a zároveň stoupá množství tuku v průběhu kojení v tzv. předním, středním a zadním mléce [195].



Obrázek 22. Procentuální zastoupení jednotlivých tříd FA v mateřském mléce pražských matek.

Námi stanovené průměrné procentuální zastoupení TFA bylo $0,9 \pm 0,27 \%$. Zastoupení dalších tříd FA v mateřském mléce je vyneseno v grafu na Obr. 22. Více než polovinu všech TFA tvořili *trans* izomery C18:1, viz Obr. 23. Díky detailní analýze na spojených kolonách bylo zjištěno, že nejvíce zastoupenou TFA je kyselina vakcenová tvořící 27,3 % ze všech TFA. Na dalších dvou místech se umístila kyselina *trans*-10-oktadecenová (16,3 %) a kyselina elaidová (12,6 %). Zastoupení dalších TFA podílejících se na sumě TFA je vyneseno v grafu na Obr. 23. Podobný průzkum byl na našem pracovišti proveden v roce 2007 se zaměřením na skladbu FA v mateřském mléce Rómských matek versus majoritní části populace [196]. Analýza byla provedena na 100 m koloně CP-Sil 88 a poskytla informaci o sumě *trans* C18:1 izomerů a některých dalších TFA. Námi zjištěná hodnota je 3 - 4krát nižší než procentuální zastoupení v mateřském mléce běžné populace v roce 2007. Můžeme tedy říci, že jak doporučení WHO, tak evropské agentury EFSA ohledně množství TFA v denním energetickém příjmu nesou své ovoce v podobě lepšího a zdravějšího profilu FA v naší populaci.



Obrázek 23. Procentuální zastoupení jednotlivých TFA v mateřském mléce pražských matek.

Tabulka 16. Zastoupení FA v mateřském mléce pražských matek.

FA	%	FA	%
C8:0	0,86 ± 0,30	C18:2n6at	0,04 ± 0,03
C10:0	1,73 ± 0,48	C18:2n6ct	0,03 ± 0,03
C11:0	0,01 ± 0,02	C18:2n6tc	0,09 ± 0,04
C12:0	4,82 ± 1,31	C18:2n6ac	12,65 ± 2,71
isoC14:1	0,02 ± 0,03	C20:0	0,30 ± 0,07
C14:0	5,77 ± 1,31	C18:3n6ac	0,28 ± 0,14
C14:1n5t	0,09 ± 0,06	C18:3n3ctt+cct	0,04 ± 0,04
C14:1n5c	0,53 ± 0,15	C20:1n9c	0,63 ± 0,13
C15:0	0,34 ± 0,27	C18:3n3ctc	0,02 ± 0,02
isoC16:0	0,12 ± 0,05	C18:3n3tec	0,01 ± 0,02
C16:0	21,83 ± 2,41	C18:3n3ac	1,10 ± 0,32
isoC17:0	0,20 ± 0,06	C20:2n6ac	0,57 ± 0,15
C16:1n7t	0,04 ± 0,02	C22:0	0,18 ± 0,08
anteisoC17:0	0,28 ± 0,07	C20:3n6ac	0,75 ± 0,16
C16:1n7c	2,52 ± 0,47	C22:1n9c	0,23 ± 0,07
C17:0	0,30 ± 0,04	C20:4n6	0,69 ± 0,16
isoC18:0	0,05 ± 0,07	C23:0	0,01 ± 0,03
C18:0	5,64 ± 0,78	C24:0	0,19 ± 0,06
C18:1; 6t+7t	0,01 ± 0,02	C20:5n3ac	0,23 ± 0,08
C18:1; 8t	0,03 ± 0,02	C24:1n9c	0,26 ± 0,09
C18:1; 9t	0,11 ± 0,03	C22:6n3	0,45 ± 0,15
C18:1; 10t	0,15 ± 0,04		
C18:1; 11t	0,25 ± 0,07		
C18:1; 7c,8c,12t,13t	0,18 ± 0,07		
C18:1; 9c	33,42 ± 3,72		
C18:1; 10c	0,09 ± 0,04		
C18:1; 11c	1,66 ± 0,24		
C18:1; 12c	0,09 ± 0,03		
C18:1; 13c	0,06 ± 0,02		
C18:1; 14c	0,09 ± 0,03		

5 ZÁVĚR

V průběhu celé studie OMEGA bylo na našem pracovišti analyzováno celkem přes 600 vzorků, v nichž byl stanoven základní profil FA. V rámci této dizertační práce uvádím pouze výsledky z II. fáze této studie. V ní se nám podařilo po statistické analýze získaných dat nalézt malý, ale přesto signifikantní nárůst v procentuálním zastoupení DHA v krevní plazmě mezi 1. a 2. odběrem. Můžeme zároveň konstatovat, že tento nárůst byl potvrzen i signifikantním nárůstem DHA v erytrocytech testovací skupiny. FA v erytrocytech slouží jako marker dlouhodobého příjmu omega-3 FA po 8 týdenní intervenci vejci a masem obohaceným o omega-3 FA s delším řetězcem. V době vypracování této práce jsme měli pouze informaci o rozdílech v krmné směsi nosnic a jatečních brojlerů. Výsledky analýzy vzniklých omega-vajec a omega-kuřecího masa provedené na VŠCHT nám nebyly poskytnuty, tudíž nevíme kolik kyseliny α -linolenové z lněného semínka bylo v kuřatech transformováno v EPA a DHA, případně kolik EPA z řasy bylo dále přeměněno na DHA. Stejně tak nemáme povědomí o efektivitě kultivace mikrořasy či výsledcích napojení na využití odpadů při její kultivaci. Proto utváření komplexnějších závěrů z této studie je z důvodu nedostatku informací velmi obtížné.

V rámci studie VEGGIE-2 bylo analyzováno přes 150 vzorků, v nichž byl opět stanoven základní profil FA. Zdokumentovali jsme rozdíly mezi oběma skupinami a prokázali dvakrát vyšší hladiny kyseliny linolové a naopak významně nižší hladiny SFA u veganů oproti běžné populaci. V návaznosti na studii OMEGA zmíním pozorovaný deficit omega-3 FA s dlouhým řetězcem jako je EPA a DHA v erytrocytech veganů. Jejich dostatečný přísun nelze zabezpečit pouze z konzumace rostlinné stravy, a proto možnost jejich příjmu z jiných než živočišných zdrojů zůstává lákavá. Po předchozí intervenci BCAA byla v erytrocytech omnivorů nalezena zvýšená hladina kyseliny palmitové a palmitolejové, což koresponduje se zvýšenou aktivitou lipogenních genů tukové tkáně vedoucích ke zvýšení syntézy FA.

Pro stanovení TFA jsme vyvinuli metodu na spojených kolonách, která je i přes dlouhou dobu analýzy aplikovatelná na běžné GC-FID přístroje. Navíc metoda poskytuje detailní informaci o C18:1 izomerech jako dominantní frakci TFA. Vegani kromě zmíněných rozdílů v základním profilu FA mají signifikantně nižší hladinu TFA

a zhruba třetinovou hladinu kyseliny vakcenové, což koresponduje s absencí masa, mléka a mléčných výrobků v jejich stravě. Hladina kyseliny elaidové je u obou skupin totožná a tudíž nesouvisí s odlišnou technikou přípravy pokrmů. Můžeme konstatovat, že z hlediska analýzy FA jsme z poměrně cenných vzorků tukové tkáně vytěžili maximum. Vzniklá metoda je použitelná i pro analýzu FA v jiných matricích, což jsme prokázali analýzou mateřského mléka od pražských matek.

Bohužel za uplynulých 5 let mého postgraduálního studia se mi nepodařilo dostat druhé části názvu této práce. Veškerá xenobiotika, která byla v uplynulých letech stanovována, nebyla vhodná pro stanovení na GC a byla analyzována metodou HPLC. Z důvodu udržení konzistence této práce a nerozměňování jejího obsahu nejsou další analytické techniky uváděny. Přesto byla na našem pracovišti úspěšně analyzována anestetika na GC-NPD. Snad tedy i tato má práce dokazuje, že GC od svého vzniku zůstává přes dlouhých 60 let úzce spojená s analýzou FA a je stále zlatým standardem pro tuto oblast.

6 LITERATURA

1. TSWETT, M. Adsorptionsanalyse und Chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 1906. **24**, 384-393. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1906.tb06534.x.
2. MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins*. 1941. **35**(12), 1358-1368. DOI: 10.1042/bj0351358.
3. ETTRE, L. S. *Chapters in the evolution of chromatography*. HINSHAW, J. V. (ed.). London: Imperial College Press, 2008. ISBN 978-1-86094-943-2.
4. HESSE, G.; EILBRACHT, H.; REICHENEDER, F. Das krystallisierte Calotropis-Harz. III. Mitteilung über afrikanische Pfeilgifte. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1941. **546**(3), 233-252. ISSN 0075-4617. DOI: 10.1002/jlac.19415460302.
5. HESSE, G.; TSCHACHOTIN, B. Adsorptionsanalyse von Gasen und Dämpfen. *Naturwissenschaften*. 1942. **30**(25), 387-392. ISSN 1432-1904. DOI: 10.1007/bf01475303.
6. KOLOMNIKOV, I. G.; EFREMOV, A. M.; TIKHOMIROVA, T. I.; SOROKINA, N. M.; ZOLOTOV, Y. A. Early stages in the history of gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2018. **1537**, 109-117. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.01.006.
7. JAMES, A. T.; MARTIN, A. J. Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemical Journal*. 1952. **50**(5), 679-690. ISSN 0264-6021. DOI: 10.1042/bj0500679.
8. MARTIN, A. J. P.; JAMES, A. T. Gas-liquid chromatography: the gas-density meter, a new apparatus for the detection of vapours in flowing gas streams. *Biochemical Journal*. 1956. **63**(1), 138-143. DOI: 10.1042/bj0630138.
9. JAMES, A. T.; MARTIN, A. J. P. Gas-liquid chromatography: the separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to *n*-octadecanoic acid. *Biochemical Journal*. 1956. **63**(1), 144-152. DOI: 10.1042/bj0630144.
10. BARTLE, K. D.; MYERS, P. History of gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 2002. **21**(9), 547-557. ISSN 0165-9936. DOI: 10.1016/S0165-9936(02)00806-3.

11. ETTRE, L. S. Evolution of capillary columns for gas chromatography. *LC-GC North America*. 2001. **19**, 48-58. ISSN 1527-5949.
12. DANDENEAU, R. D.; ZERENNER, E. H. An investigation of glasses for capillary chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1979. **2**(6), 351-356. DOI: 10.1002/jhrc.1240020617.
13. ROOD, D. *A practical guide to the care, maintenance, and troubleshooting of capillary gas chromatographic systems*. 3rd, rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. ISBN 3-52729750-2.
14. ROTZSCHE, H. *Stationary Phases in Gas Chromatography*. Leipzig: Elsevier Science, 1991. ISBN 0-444-98733-9
15. AGILENT. *The Secrets of Good Peak Shape in HPLC* [online]. Agilent Technologies, 2004 [cit. 10.10.2019]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/secrets%20of%20good%20peak%20shape%20in%20hplc.pdf>.
16. PETERSON, M. L.; HIRSCH, J. A calculation for locating the carrier gas front of a gas-liquid chromatogram. *Journal of Lipid Research*. 1959. **1**(1), 132-134. ISSN 0022-2275.
17. WATANACHAIYONG, T.; JEYASHOKE, N.; KRISNANGKURA, K. A Convenient Method for Routine Estimation of Dead Time in Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 2000. **38**(2), 67-71. ISSN 0021-9665. DOI: 10.1093/chromsci/38.2.67.
18. WU, L.; CHEN, M.; CHEN, Y.; LI, Q. X. Determination and evaluation of gas holdup time with the quadratic equation model and comparison with nonlinear models for isothermal gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2013. **1297**, 196-203. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.04.078.
19. WU, N. S.; WU, G. S.; WU, M. Y. A Comparative Study of Methods for Determining Gas Hold-Up Time. *Journal of Chromatographic Science*. 2006. **44**(5), 244-246. ISSN 0021-9665. DOI: 10.1093/chromsci/44.5.244.
20. PETERS, W. A., JR. The Efficiency and Capacity of Fractionating Columns. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*. 1922. **14**(6), 476-479. ISSN 0095-9014. DOI: 10.1021/ie50150a002.
21. VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*. 1956. **5**(6), 271-289. ISSN 0009-2509. DOI: 10.1016/0009-2509(56)80003-1.

22. ADAM, P. LINDE GAS. *Vodík jako alternativa helia v plynové chromatografii* [online]. Linde Gas, ©2012 [cit. 22.10.2019]. Dostupné z: https://www.linde-gas.cz/cs/images/Aplikacni_list_vodik_jako_alternativa_helia_v_GC-web_tcm79-117459.pdf.
23. RESTEK. *Guide to GC Column Selection and Optimizing Separations* [online]. Restek, ©2013 [cit. 10.10.2019]. Dostupné z: <https://www.restek.com/pdfs/GNBR1724-UNV.pdf>.
24. KOVÁTS, E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*. 1958. **41**(7), 1915-1932. ISSN 0018-019X. DOI: 10.1002/hlca.19580410703.
25. VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1963. **11**, 463-471. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.
26. LEE, M. L.; VASSILAROS, D. L.; WHITE, C. M. Retention indices for programmed-temperature capillary-column gas chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical Chemistry*. 1979. **51**(6), 768-773. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac50042a043.
27. BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J. On the Relationship Between Kováts and Lee Retention Indices. *Chromatographia*. 2004. **60**(11), 725-728. ISSN 1612-1112. DOI: 10.1365/s10337-004-0450-2.
28. MJØS, S. A. Identification of fatty acids in gas chromatography by application of different temperature and pressure programs on a single capillary column. *Journal of Chromatography A*. 2003. **1015**(1-2), 151-161. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/s0021-9673(03)01240-8.
29. KUBINEC, R.; BLAŠKO, J.; GÓROVÁ, R.; ADDOVÁ, G.; OSTROVSKÝ, I.; AMANN, A.; SOJÁK, L. Equivalent chain lengths of all C4–C23 saturated monomethyl branched fatty acid methyl esters on methylsilicone OV-1 stationary phase. *Journal of Chromatography*. 2011. **1218**(13), 1767-1774. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.065.
30. FARDIN-KIA, A. R.; DELMONTE, P.; KRAMER, J.; JAHREIS, G.; KUHN, K.; SANTERCOLE, V.; RADER, J. Separation of the Fatty Acids in Menhaden Oil as Methyl Esters with a Highly Polar Ionic Liquid Gas Chromatographic Column and Identification by Time of Flight Mass spectrometry. *Lipids*. 2013. **48**(12), 1279-1295. DOI: 10.1007/s11745-013-3830-2.

31. WASTA, Z.; MJØS, S. A. A database of chromatographic properties and mass spectra of fatty acid methyl esters from omega-3 products. *Journal of Chromatography A*. 2013. **1299**(July), 94-102. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.05.056.
32. ZENG, A. X.; CHIN, S.-T.; NOLVACHAI, Y.; KULSING, C.; SIDISKY, L. M.; MARRIOTT, P. J. Characterisation of capillary ionic liquid columns for gas chromatography–mass spectrometry analysis of fatty acid methyl esters. *Analytica Chimica Acta*. 2013. **803**(November), 166-173. ISSN 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2013.07.002.
33. ROHRSCHEIDER, L. Eine methode zur chrakterisierung von gaschromatographischen trennflüssigkeiten. *Journal of Chromatography A*. 1966. **22**, 6-22. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)97064-5.
34. MCREYNOLDS, W. O. Characterization of Some Liquid Phases. *Journal of Chromatographic Science*. 1970. **8**(12), 685-691. ISSN 0021-9665. DOI: 10.1093/chromsci/8.12.685.
35. SUPELCO BULLETIN 880. *The retention index system in gas chromatography: McReynolds Constants* [online]. Sigma-Aldrich Co., ©1997 [cit. 22.10.2019]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/7800/7741.pdf>.
36. RAGONESE, C.; SCIARRONE, D.; TRANCHIDA, P. Q.; DUGO, P.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Evaluation of a Medium-Polarity Ionic Liquid Stationary Phase in the Analysis of Flavor and Fragrance Compounds. *Analytical Chemistry*. 2011. **83**(20), 7947-7954. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac202012u.
37. REZANKA, T.; SIGLER, K. Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. *Progress in lipid research*. 2009. **48**(3-4), 206-238. ISSN 0163-7827. DOI: 10.1016/j.plipres.2009.03.003.
38. JENKINS, B.; WEST, J. A.; KOULMAN, A. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (C15:0) and heptadecanoic acid (C17:0) in health and disease. *Molecules*. 2015. **20**(2), 2425-2444. ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules20022425.
39. JENKINS, B. J.; SEYSSEL, K.; CHIU, S.; PAN, P. H.; LIN, S. Y.; STANLEY, E.; AMENT, Z.; WEST, J. A.; SUMMERHILL, K.; GRIFFIN, J. L.; VETTER, W.; AUTIO, K. J.; HILTUNEN, K.; HAZEBROUCK, S.; STEPANKOVA, R.; CHEN, C. J.; ALLIGIER, M.; LAVILLE, M.; MOORE, M.; KRAFT, G.; CHERRINGTON, A.; KING, S.; KRAUSS, R. M.; DE SCHRYVER, E.; VAN VELDHOVEN, P. P.; RONIS, M.; KOULMAN, A. Odd Chain Fatty Acids; New Insights of the Relationship Between the Gut Microbiota, Dietary Intake,

- Biosynthesis and Glucose Intolerance. *Scientific Reports*. 2017. **7**, 44845. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/srep44845.
40. RUTKOWSKA, J.; ADAMSKA, A.; BIALEK, M. Comparison of fatty acid composition in mare's and cow's milk fat. *Food Science Technology Quality*. 2011. **1**(74), 28-38. ISSN 1425-6959. DOI: 10.15193/zntj/2011/74/028-038.
 41. INSTITUTE_OF_MEDICINE. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*. Washington: The National Academies Press, 2005. ISBN 978-0-309-08525-0.
 42. DEN BESTEN, G.; VAN EUNEN, K.; GROEN, A. K.; VENEMA, K.; REIJNGOUD, D. J.; BAKKER, B. M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*. 2013. **54**(9), 2325-2340. ISSN 0022-2275. DOI: 10.1194/jlr.R036012.
 43. JENSEN, R. G. The lipids in human milk. *Progress in lipid research*. 1996. **35**(1), 53-92. ISSN 0163-7827.
 44. FERNANDO-WARNAKULASURIYA, G. J.; STAGGERS, J. E.; FROST, S. C.; WELLS, M. A. Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. I. Fatty acid composition and concentrations of major lipid components. *Journal of lipid research*. 1981. **22**(4), 668-674. ISSN 0022-2275.
 45. MAERTENS, L.; LEBAS, F.; SZENDRŐ, Z. Rabbit milk: A review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. *World Rabbit Science*. 2006. **14**(4), 205-230. ISSN 1257-5011. DOI: 10.4995/wrs.2006.565.
 46. MARTEN, B.; PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIR, J. Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal*. 2006. **16**, 1374-1382. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.06.015.
 47. LEMARIE, F.; BEAUCHAMP, E.; LEGRAND, P.; RIOUX, V. Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation. *Biochimie*. 2016. **120**(January), 40-48. ISSN 0300-9084. DOI: 10.1016/j.biochi.2015.08.002.
 48. WU, G. H.; ZANIOLO, O.; SCHUSTER, H.; SCHLOTZER, E.; PRADELLI, L. Structured triglycerides versus physical mixtures of medium- and long-chain triglycerides for parenteral nutrition in surgical or critically ill adult patients: Systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*. 2017. **36**(1), 150-161. ISSN 0261-5614. DOI: 10.1016/j.clnu.2016.01.004.
 49. TAKEUCHI, H.; SEKINE, S.; KOJIMA, K.; AOYAMA, T. The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2008. **17**(1), 320-323. ISSN 0964-7058.

50. SEATON, T. B.; WELLE, S. L.; WARENKO, M. K.; CAMPBELL, R. G. Thermic effect of medium-chain and long-chain triglycerides in man. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1986. **44**(5), 630-634. ISSN 0002-9165. DOI: 10.1093/ajcn/44.5.630.
51. BACH, A. C.; INGENBLEEK, Y.; FREY, A. The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *Journal of Lipid Research*. 1996. **37**(4), 708-726. ISSN 0022-2275.
52. TRAU, K. A.; DRIEDGER, A.; INGLE, D. L.; NAKHASI, D. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food and Chemical Toxicology*. 2000. **38**(1), 79-98. ISSN 0278-6915.
53. KIM, S. A.; RHEE, M. S. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β -resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control*. 2016. **60**(February), 447-454. ISSN 0956-7135.
54. UMERSKA, A.; CASSISA, V.; MATOUGUI, N.; JOLY-GUILLOU, M. L.; EVEILLARD, M.; SAULNIER, P. Antibacterial action of lipid nanocapsules containing fatty acids or monoglycerides as co-surfactants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016. **108**(November), 100-110. ISSN 0939-6411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.09.001.
55. NITBANI, F. O.; JUMINA; SISWANTA, D.; SOLIKHAH, E. N. Isolation and Antibacterial Activity Test of Lauric Acid from Crude Coconut Oil (*Cocos nucifera* L.), in: *Molecular and Cellular Life Sciences: Infectious Diseases, Biochemistry and Structural Biology 2015 Conference*, HASE, T. et al. (ed.). Amsterdam: Elsevier Science Bv. 2016. Vol. 18. s. 132-140. ISBN 1876-6196.
56. DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. **85**(6), 1629-1642. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-009-2355-3.
57. RUIZ-NUNEZ, B.; DIJCK-BROUWER, D. A. J.; MUSKIET, F. A. J. The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016. **36**, 1-20. ISSN 0955-2863. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.12.007.
58. KOLETZKO, B.; THIEL, I.; ABIODUN, P. O. The fatty-acid composition of human-milk in europe and africa. *Journal of Pediatrics*. 1992. **120**(4), S62-S70. ISSN 0022-3476. DOI: 10.1016/s0022-3476(05)81238-7.

59. KEYS, A.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H. W.; VAN BUCHEM, F. S.; BUZINA, R.; DJORDJEVIC, B. D.; DONTAS, A. S.; FIDANZA, F.; KARVONEN, M. J.; KIMURA, N.; LEKOS, D.; MONTI, M.; PUDDU, V.; TAYLOR, H. L. Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. *Acta Medica Scandinavica. Supplementum*. 1966. **460**, 1-392. ISSN 0365-463x.
60. IGNATOWSKI, A. C. Influence of animal food on the organism of rabbits. *Izvest Imper Voennomed Akad St Petersburg*. 1908. **16**, 154-173.
61. WILLETT, W. C. Dietary fats and coronary heart disease. *Journal of Internal Medicine*. 2012. **272**(1), 13-24. ISSN 0954-6820. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2012.02553.x.
62. DALEN, J. E.; DEVRIES, S. Diets to Prevent Coronary Heart Disease 1957-2013: What Have We Learned? *American Journal of Medicine*. 2014. **127**(5), 364-369. ISSN 0002-9343. DOI: 10.1016/j.amjmed.2013.12.014.
63. KEYS, A. Atherosclerosis: a problem in newer public health. *Journal of the Mount Sinai Hospital*. 1953. **20**(2), 118-139. ISSN 0099-9695.
64. ANDRADE, J.; MOHAMED, A.; FROHLICH, J.; IGNASZEWSKI, A. Ancel Keys and the lipid hypothesis: From early breakthroughs to current management of dyslipidemia. *British Columbia Medical Journal*. 2009. **51**(2), 66-72. ISSN 0007-0556.
65. TUIKKALA, P.; HARTIKAINEN, S.; KORHONEN, M. J.; LAVIKAINEN, P.; KETTUNEN, R.; SULKAVA, R.; ENLUND, H. Serum total cholesterol levels and all-cause mortality in a home-dwelling elderly population: a six-year follow-up. *Scandinavian Journal of Primary Health Care*. 2010. **28**(2), 121-127. ISSN 0281-3432. DOI: 10.3109/02813432.2010.487371.
66. RAVNSKOV, U.; DIAMOND, D. M.; HAMA, R.; HAMAZAKI, T.; HAMMARSKJOLD, B.; HYNES, N.; KENDRICK, M.; LANGSJOEN, P. H.; MALHOTRA, A.; MASCITELLI, L.; MCCULLY, K. S.; OGUSHI, Y.; OKUYAMA, H.; ROSCH, P. J.; SCHERSTEN, T.; SULTAN, S.; SUNDBERG, R. Lack of an association or an inverse association between low-density-lipoprotein cholesterol and mortality in the elderly: a systematic review. *British Medical Journal Open*. 2016. **6**(6), e010401. ISSN 2044-6055. DOI: 10.1136/bmjopen-2015-010401.
67. MANN, G. V.; SPOERRY, A.; GRAY, M.; JARASHOW, D. Atherosclerosis in the Masai. *American Journal of Epidemiology*. 1972. **95**(1), 26-37. ISSN 0002-9262. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a121365.
68. BJERREGAARD, P.; YOUNG, T. K.; HEGELE, R. A. Low incidence of cardiovascular disease among the Inuit--what is the evidence? *Atherosclerosis*.

2003. **166**(2), 351-357. ISSN 0021-9150. DOI: 10.1016/s0021-9150(02)00364-7.
69. FODOR, J. G.; HELIS, E.; YAZDEKHASTI, N.; VOHNOUT, B. "Fishing" for the Origins of the "Eskimos and Heart Disease" Story: Facts or Wishful Thinking? *Canadian Journal of Cardiology*. 2014. **30**(8), 864-868. ISSN 0828-282X. DOI: 10.1016/j.cjca.2014.04.007.
70. DINICOLANTONIO, J. J. Increase in the intake of refined carbohydrates and sugar may have led to the health decline of the Greenland Eskimos. *Open Heart*. 2016. **3**(2), e000444. ISSN 2053-3624. DOI: 10.1136/openhrt-2016-000444.
71. VOLEK, J. S.; FERNANDEZ, M. L.; FEINMAN, R. D.; PHINNEY, S. D. Dietary carbohydrate restriction induces a unique metabolic state positively affecting atherogenic dyslipidemia, fatty acid partitioning, and metabolic syndrome. *Progress in Lipid Research*. 2008. **47**(5), 307-318. ISSN 0163-7827. DOI: 10.1016/j.plipres.2008.02.003.
72. YU, S. M.; DERR, J.; ETHERTON, T. D.; KRISETHERTON, P. M. Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic-acid is neutral and monounsaturated fatty-acids are hypocholesterolemic. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1995. **61**(5), 1129-1139. ISSN 0002-9165.
73. LEGRAND, P.; RIOUX, V. The Complex and Important Cellular and Metabolic Functions of Saturated Fatty Acids. *Lipids*. 2010. **45**(10), 941-946. ISSN 0024-4201. DOI: 10.1007/s11745-010-3444-x.
74. SIRI-TARINO, P. W.; SUN, Q.; HU, F. B.; KRAUSS, R. M. Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010. **91**(3), 535-546. ISSN 0002-9165. DOI: 10.3945/ajcn.2009.27725.
75. CHOWDHURY, R.; WARNAKULA, S.; KUNUTSOR, S.; CROWE, F.; WARD, H. A.; JOHNSON, L.; FRANCO, O. H.; BUTTERWORTH, A. S.; FOROUHI, N. G.; THOMPSON, S. G.; KHAW, K. T.; MOZAFFARIAN, D.; DANESH, J.; DI ANGELANTONIO, E. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine*. 2014. **160**(6), 398-406. ISSN 0003-4819. DOI: 10.7326/m13-1788.
76. DE SOUZA, R. J.; MENTE, A.; MAROLEANU, A.; COZMA, A. I.; HA, V.; KISHIBE, T.; ULERYK, E.; BUDYLOWSKI, P.; SCHUNEMANN, H.; BEYENE, J.; ANAND, S. S. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *British Medical Journal*. 2015. **351**, 3978. ISSN 0959-8138. DOI: 10.1136/bmj.h3978.

77. GIVENS, D. I. Saturated fats, dairy foods and health: A curious paradox? *Nutrition Bulletin*. 2017. **42**(3), 274-282. ISSN 1471-9827. DOI: 10.1111/nbu.12283.
78. FOSCOLOU, A.; D'CUNHA, N.; NAUMOVSKI, N.; TYROVOLAS, S.; CHRYSOHOOU, C.; RALLIDIS, L.; MATALAS, A. L.; S. SIDOSSIS, L.; PANAGIOTAKOS, D. The Association between Whole Grain Products Consumption and Successful Aging: A Combined Analysis of MEDIS and ATTICA Epidemiological Studies. *Nutrients*. 2019. **11**, 1221. DOI: 10.3390/nu11061221.
79. REYNOLDS, A.; MANN, J.; CUMMINGS, J.; WINTER, N.; METE, E.; TE MORENGA, L. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet*. 2019. **393**(10170), 434-445. ISSN 0140-6736. DOI: 10.1016/s0140-6736(18)31809-9.
80. WANG, D. D.; LI, Y.; CHIUVE, S. E.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E.; RIMM, E. B.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Association of Specific Dietary Fats With Total and Cause-Specific Mortality. *JAMA Internal Medicine*. 2016. **176**(8), 1134-1145. ISSN 2168-6106. DOI: 10.1001/jamainternmed.2016.2417.
81. MACDONALD-WICKS, L. K.; GARG, M. L. Incorporation of n-3 fatty acids into plasma and liver lipids of rats: Importance of background dietary fat. *Lipids*. 2004. **39**(6), 545-551. ISSN 0024-4201. DOI: 10.1007/s11745-004-1261-z.
82. NETTLETON, J. A.; LOVEGROVE, J. A.; MENSINK, R. P.; SCHWAB, U. Dietary Fatty Acids: Is it Time to Change the Recommendations? *Annals of Nutrition & Metabolism*. 2016. **68**(4), 249-257. ISSN 0250-6807. DOI: 10.1159/000446865.
83. DE OLIVEIRA OTTO, M. C.; MOZAFFARIAN, D.; KROMHOUT, D.; BERTONI, A. G.; SIBLEY, C. T.; JACOBS, D. R., JR.; NETTLETON, J. A. Dietary intake of saturated fat by food source and incident cardiovascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012. **96**(2), 397-404. ISSN 1938-3207. DOI: 10.3945/ajcn.112.037770.
84. CALDER, P. C.; AHLUWALIA, N.; BROUNS, F.; BUETLER, T.; CLEMENT, K.; CUNNINGHAM, K.; ESPOSITO, K.; JONSSON, L. S.; KOLB, H.; LANSINK, M.; MARCOS, A.; MARGIORIS, A.; MATUSHESKI, N.; NORDMANN, H.; O'BRIEN, J.; PUGLIESE, G.; RIZKALLA, S.; SCHALKWIJK, C.; TUOMILEHTO, J.; WARNBERG, J.; WATZL, B.; WINKLHOFER-ROOB, B. M. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *The British journal of nutrition*. 2011. **106**(Suppl 3), S5-S78. ISSN 0007-1145. DOI: 10.1017/s0007114511005460.
85. JULIBERT, A.; BIBILONI, M. D. M.; TUR, J. A. Dietary fat intake and metabolic syndrome in adults: A systematic review. *Nutrition, Metabolism, and*

Cardiovascular Diseases. 2019. **29**(9), 887-905. ISSN 0939-4753. DOI: 10.1016/j.numecd.2019.05.055.

86. ROCHA, D. M.; BRESSAN, J.; HERMSDORFF, H. H. The role of dietary fatty acid intake in inflammatory gene expression: a critical review. *Sao Paulo Medical Journal*. 2017. **135**(2), 157-168. ISSN 1516-3180. DOI: 10.1590/1516-3180.2016.008607072016.
87. CANDIDO, F. G.; VALENTE, F. X.; GRZESKOWIAK, L. M.; MOREIRA, A. P. B.; ROCHA, D.; ALFENAS, R. C. G. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2018. **69**(2), 125-143. ISSN 0963-7486. DOI: 10.1080/09637486.2017.1343286.
88. European Food Information Council. *Food-Based Dietary Guidelines in Europe* [online]. EUFIC, ©2010 [cit. 6.9.2019]. Dostupné z: <https://www.eufic.org/en/healthy-living/article/food-based-dietary-guidelines-in-europe>.
89. BRÁT, J.; POKORNÝ, J. Fatty Acid Composition of Margarines and Cooking Fats Available on the Czech Market. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2000. **13**(4), 337-343. DOI: 10.1006/jfca.1999.0877.
90. LI, C.; ZHANG, Y.; LI, S.; WANG, G.; XU, C.; DENG, Y.; WANG, S. Mechanism of formation of trans fatty acids under heating conditions in triolein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013. **61**(43), 10392-10397. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf402854b.
91. WANG, Y.; HUI, T.; ZHANG, Y. W.; LIU, B.; WANG, F. L.; LI, J. K.; CUI, B. W.; GUO, X. Y.; PENG, Z. Q. Effects of frying conditions on the formation of heterocyclic amines and trans fatty acids in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Food Chemistry*. 2015. **167**, 251-257. ISSN 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.109.
92. SANTOS, C. S. P.; MOLINA-GARCIA, L.; CUNHA, S. C.; CASAL, S. Fried potatoes: Impact of prolonged frying in monounsaturated oils. *Food Chemistry*. 2018. **243**(November), 192-201. ISSN 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.09.117.
93. MENSINK, R.; B. KATAN, M. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *New England Journal of Medicine*. 1990. **323**(7), 439-445. DOI: 10.1056/NEJM199008163230703.
94. WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; ROSNER, B. A.; HENNEKENS, C. H.; HENNEKENS, C. H.; WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; SAMPSON, L. A.; ROSNER, B. A. Intake of trans fatty acids and risk of

- coronary heart disease among women. *Lancet*. 1993. **341**(8845), 581-585. ISSN 0140-6736. DOI: 10.1016/0140-6736(93)90350-P.
95. MOZAFFARIAN, D.; ARO, A.; WILLETT, W. C. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2009. **63**(Suppl. 2), S5-S21. ISSN 0954-3007. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1602973.
 96. NOCELLA, C.; CAMMISOTTO, V.; FIANCHINI, L.; D'AMICO, A.; NOVO, M.; CASTELLANI, V.; STEFANINI, L.; VIOLI, F.; CARNEVALE, R. Extra virgin olive oil and cardiovascular diseases: benefits for human health. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*. 2018. **18**(1), 4-13. ISSN 1871-5303. DOI: 10.2174/1871530317666171114121533.
 97. CASAS, R.; ESTRUCH, R.; SACANELLA, E. The protective effects of extra virgin olive oil on immune-mediated inflammatory responses. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*. 2018. **18**(1), 23-35. ISSN 1871-5303. DOI: 10.2174/1871530317666171114115632.
 98. SANTANGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DE SANCTIS, P.; GIOVANNINI, C.; D'ARCHIVIO, M.; MASELLA, R. Anti-inflammatory activity of extra virgin olive oil polyphenols: which role in the prevention and treatment of immune-mediated inflammatory diseases? *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*. 2018. **18**(1), 36-50. ISSN 1871-5303. DOI: 10.2174/1871530317666171114114321.
 99. WONGWARAWIPAT, T.; PAPAGEORGIOU, N.; BERTSIAS, D.; SIASOS, G.; TOUSOULIS, D. Olive oil-related anti-inflammatory effects on atherosclerosis: potential clinical implications. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*. 2018. **18**(1), 51-62. ISSN 1871-5303. DOI: 10.2174/1871530317666171116103618.
 100. JORIS, P. J.; MENSINK, R. P. Role of cis-monounsaturated fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Current Atherosclerosis Reports*. 2016. **18**(7), 38. ISSN 1523-3804. DOI: 10.1007/s11883-016-0597-y.
 101. QIAN, F.; KORAT, A. A.; MALIK, V.; HU, F. B. Metabolic effects of monounsaturated fatty acid-enriched diets compared with carbohydrate or polyunsaturated fatty acid-enriched diets in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Care*. 2016. **39**(8), 1448-1457. ISSN 0149-5992. DOI: 10.2337/dc16-0513.
 102. SCHWAB, U.; LAURITZEN, L.; THOLSTRUP, T.; HALDORSSONI, T.; RISERUS, U.; UUSITUPA, M.; BECKER, W. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. *Food & Nutrition Research*. 2014. **58**, ISSN 1654-661x. DOI: 10.3402/fnr.v58.25145.

103. MENSINK, R. P.; KATAN, M. B. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arteriosclerosis and Thrombosis*. 1992. **12**(8), 911-919. ISSN 1049-8834.
104. MENSINK, R. P. *Effects of saturated fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a systematic review and regression analysis* [online]. WHO, ©2016 [cit. 7. 10. 2016]. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246104/9789241565349-eng.pdf>.
105. FARVID, M. S.; DING, M.; PAN, A.; SUN, Q.; CHIUVE, S. E.; STEFFEN, L. M.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Dietary linoleic acid and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation*. 2014. **130**(18), 1568-1578. ISSN 0009-7322. DOI: 10.1161/circulationaha.114.010236.
106. MARKLUND, M.; WU, J. H. Y.; IMAMURA, F.; DEL GOBBO, L. C.; FRETTS, A.; DE GOEDE, J.; SHI, P.; TINTLE, N.; WENNBERG, M.; ASLIBEKYAN, S.; CHEN, T. A.; DE OLIVEIRA OTTO, M. C.; HIRAKAWA, Y.; ERIKSEN, H. H.; KROGER, J.; LAGUZZI, F.; LANKINEN, M.; MURPHY, R. A.; PREM, K.; SAMIERI, C.; VIRTANEN, J.; WOOD, A. C.; WONG, K.; YANG, W. S.; ZHOU, X.; BAYLIN, A.; BOER, J. M. A.; BROUWER, I. A.; CAMPOS, H.; CHAVES, P. H. M.; CHIEN, K. L.; DE FAIRE, U.; DJOUSSE, L.; EIRIKSDOTTIR, G.; EL-ABBADI, N.; FOROUHI, N. G.; MICHAEL GAZIANO, J.; GELEIJNSE, J. M.; GIGANTE, B.; GILES, G.; GUALLAR, E.; GUDNASON, V.; HARRIS, T.; HARRIS, W. S.; HELMER, C.; HELLENIUS, M. L.; HODGE, A.; HU, F. B.; JACQUES, P. F.; JANSSON, J. H.; KALSBECK, A.; KHAW, K. T.; KOH, W. P.; LAAKSO, M.; LEANDER, K.; LIN, H. J.; LIND, L.; LUBEN, R.; LUO, J.; MCKNIGHT, B.; MURSU, J.; NINOMIYA, T.; OVERVAD, K.; PSATY, B. M.; RIMM, E.; SCHULZE, M. B.; SISCOVICK, D.; SKJELBO NIELSEN, M.; SMITH, A. V.; STEFFEN, B. T.; STEFFEN, L.; SUN, Q.; SUNDSTROM, J.; TSAI, M. Y.; TUNSTALL-PEDOE, H.; UUSITUPA, M. I. J.; VAN DAM, R. M.; VEENSTRA, J.; MONIQUE VERSCHUREN, W. M.; WAREHAM, N.; WILLETT, W.; WOODWARD, M.; YUAN, J. M.; MICHA, R.; LEMAITRE, R. N.; MOZAFFARIAN, D.; RISERUS, U. Biomarkers of Dietary Omega-6 Fatty Acids and Incident Cardiovascular Disease and Mortality. *Circulation*. 2019. **139**(21), 2422-2436. ISSN 0009-7322. DOI: 10.1161/circulationaha.118.038908.
107. NAKAMURA, M. T.; NARA, T. Y. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annual Review of Nutrition*. 2004. **24**, 345-376. ISSN 0199-9885. DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211.
108. MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. (n-3) fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012. **142**(3), 614S-625S. ISSN 0022-3166. DOI: 10.3945/jn.111.149633.

109. WALZ, C. P.; BARRY, A. R.; KOSHMAN, S. L. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in the prevention of cardiovascular disease. *Canadian Pharmacists Journal / Revue des Pharmaciens du Canada*. 2016. **149**(3), 166-173. DOI: 10.1177/1715163516640812.
110. AUNG, T.; HALSEY, J.; KROMHOUT, D.; GERSTEIN, H. C.; MARCHIOLI, R.; TAVAZZI, L.; GELEIJNSE, J. M.; RAUCH, B.; NESS, A.; GALAN, P.; CHEW, E. Y.; BOSCH, J.; COLLINS, R.; LEWINGTON, S.; ARMITAGE, J.; CLARKE, R. Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77917 Individuals. *JAMA Cardiology*. 2018. **3**(3), 225-234. DOI: 10.1001/jamacardio.2017.5205.
111. RIZOS, E. C.; NTZANI, E. E.; BIKA, E.; KOSTAPANOS, M. S.; ELISAF, M. S. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2012. **308**(10), 1024-1033. ISSN 0098-7484. DOI: 10.1001/2012.jama.11374.
112. EKSTEDT, M.; HAGSTROM, H.; NASR, P.; FREDRIKSON, M.; STAL, P.; KECHAGIAS, S.; HULTCRANTZ, R. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015. **61**(5), 1547-1554. ISSN 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.27368.
113. ZHU, X.; BIAN, H.; WANG, L.; SUN, X.; XU, X.; YAN, H.; XIA, M.; CHANG, X.; LU, Y.; LI, Y.; XIA, P.; LI, X.; GAO, X. Berberine attenuates nonalcoholic hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019. **141**(September), 192-204. ISSN 0891-5849. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.019.
114. YKI-JARVINEN, H. Nutritional modulation of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nutrients*. 2015. **7**(11), 9127-9138. ISSN 2072-6643. DOI: 10.3390/nu7115454.
115. DONGIOVANNI, P.; LANTI, C.; RISO, P.; VALENTI, L. Nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016. **29**, 1-11. ISSN 0955-2863. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.024.
116. SPOONER, M. H.; JUMP, D. B. Omega-3 fatty acids and nonalcoholic fatty liver disease in adults and children: where do we stand? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2019. **22**(2), 103-110. ISSN 1363-1950. DOI: 10.1097/mco.0000000000000539.
117. YAN, J. H.; GUAN, B. J.; GAO, H. Y.; PENG, X. E. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and non-alcoholic fatty liver disease A meta-analysis

of randomized controlled trials. *Medicine*. 2018. **97**(37), e12271. ISSN 0025-7974. DOI: 10.1097/md.00000000000012271.

118. SILVA FIGUEIREDO, P.; CARLA INADA, A.; MARCELINO, G.; MAIARA LOPES CARDOZO, C.; DE CASSIA FREITAS, K.; DE CASSIA AVELLANEDA GUIMARAES, R.; PEREIRA DE CASTRO, A.; ARAGAO DO NASCIMENTO, V.; AIKO HIANE, P. Fatty acids consumption: the role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. *Nutrients*. 2017. **9**(10), 1158. ISSN 2072-6643. DOI: 10.3390/nu9101158.
119. ZONG, G.; LIU, G.; WILLETT, W. C.; WANDERS, A. J.; ALSSEMA, M.; ZOCK, P. L.; HU, F. B.; SUN, Q. Associations between linoleic acid intake and incident type 2 diabetes among us men and women. *Diabetes Care*. 2019. **42**(8), 1406-1413. ISSN 0149-5992. DOI: 10.2337/dc19-0412.
120. ZHENG, J. S.; HUANG, T.; YANG, J.; FU, Y. Q.; LI, D. Marine N-3 polyunsaturated fatty acids are inversely associated with risk of type 2 diabetes in asians: a systematic review and meta-analysis. *Plos One*. 2012. **7**(9), e44525. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0044525.
121. TORTOSA-CAPARROS, E.; NAVAS-CARRILLO, D.; MARIN, F.; ORENES-PINERO, E. Anti-inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017. **57**(16), 3421-3429. ISSN 1040-8398. DOI: 10.1080/10408398.2015.1126549.
122. VON FRANKENBERG, A. D.; REIS, A. F.; GERCHMAN, F. Relationships between adiponectin levels, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes: a literature review. *Archives of Endocrinology Metabolism*. 2017. **61**(6), 614-622. ISSN 2359-3997. DOI: 10.1590/2359-3997000000316.
123. ABBOTT, K. A.; BURROWS, T. L.; THOTA, R. N.; ACHARYA, S.; GARG, M. L. Do omega-3 PUFAs affect insulin resistance in a sex-specific manner? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2016. **104**(5), 1470-1484. ISSN 0002-9165. DOI: 10.3945/ajcn.116.138172.
124. BROWN, T. J.; BRAINARD, J.; SONG, F.; WANG, X.; ABDELHAMID, A.; HOOPER, L.; AJABNOOR, S.; ALABDULGHAFOOR, F.; BRAINARD, J.; BROWN, T. J.; DONALDSON, D.; HOOPER, L.; JIMOH, O. F.; O'BRIEN, A.; SONG, F. J.; WANG, X.; WINSTANLEY, L.; ALKHUDAIRY, L.; REES, K.; BISWAS, P.; DEANE, K.; HANSON, S.; THORPE, G.; BRIDGES, C.; MARTIN, N.; GRP, P. Omega-3, omega-6, and total dietary polyunsaturated fat for prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *British Medical Journal*. 2019. **366**, 14697. ISSN 1756-1833. DOI: 10.1136/bmj.l4697.

125. JOVANOVSKI, E.; LI, D.; THANH HO, H. V.; DJEDOVIC, V.; RUIZ MARQUES, A. D. C.; SHISHTAR, E.; MEJIA, S. B.; SIEVENPIPER, J. L.; DE SOUZA, R. J.; DUVNJAK, L.; VUKSAN, V. The effect of alpha-linolenic acid on glycemic control in individuals with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Medicine*. 2017. **96**(21), e6531. ISSN 1536-5964. DOI: 10.1097/MD.00000000000006531.
126. TELLE-HANSEN, V. H.; GAUNDAL, L.; MYHRSTAD, M. C. W. Polyunsaturated fatty acids and glycemic control in type 2 diabetes. *Nutrients*. 2019. **11**(5), 1067. ISSN 2072-6643. DOI: 10.3390/nu11051067.
127. ECKERT, G. P.; LIPKA, U.; MULLER, W. E. Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: focus on mitochondria. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 2013. **88**(1), 105-114. ISSN 0952-3278. DOI: 10.1016/j.plefa.2012.05.006.
128. SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *Journal of Clinical Investigation*. 2018. **128**(7), 2657-2669. ISSN 1558-8238. DOI: 10.1172/JCI97943.
129. JANSSEN, C. I.; KILIAAN, A. J. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Progress in Lipid Research*. 2014. **53**(January), 1-17. ISSN 0163-7827. DOI: 10.1016/j.plipres.2013.10.002.
130. AVALLONE, R.; VITALE, G.; BERTOLOTTI, M. Omega-3 fatty acids and neurodegenerative diseases: new evidence in clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. **20**(17), 4256. ISSN 1422-0067.
131. BAZAN, N. G.; MOLINA, M. F.; GORDON, W. C. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annual Review of Nutrition*. 2011. **31**, 321-351. ISSN 1545-4312. DOI: 10.1146/annurev.nutr.012809.104635.
132. CARDOSO, C.; AFONSO, C.; BANDARRA, N. M. Dietary DHA and health: cognitive function ageing. *Nutrition Research Reviews*. 2016. **29**(2), 281-294. ISSN 0954-4224. DOI: 10.1017/s0954422416000184.
133. GROSSO, G.; PAJAK, A.; MARVENTANO, S.; CASTELLANO, S.; GALVANO, F.; BUCOLO, C.; DRAGO, F.; CARACI, F. Role of omega-3 fatty acids in the treatment of depressive disorders: a comprehensive meta-analysis of randomized clinical trials. *PloS One*. 2014. **9**(5), e96905. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0096905.

134. MCNAMARA, R. K.; WELGE, J. A. Meta-analysis of erythrocyte polyunsaturated fatty acid biostatus in bipolar disorder. *Bipolar Disorders*. 2016. **18**(3), 300-306. ISSN 1399-5618. DOI: 10.1111/bdi.12386.
135. CALDER, P. C. n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2013. **72**(3), 326-336. ISSN 0029-6651. DOI: 10.1017/s0029665113001031.
136. CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*. 2001. **36**(9), 1007-1024. ISSN 1558-9307. DOI: 10.1007/s11745-001-0812-7.
137. OREGON STATE UNIVERSITY - LINUS PAULING INSTITUTE. *Essential Fatty Acids* [online]. LPI, ©2003-2019 [cit. 30.9.2019]. Dostupné z: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/other-nutrients/essential-fatty-acids>.
138. WALL, R.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews*. 2010. **68**(5), 280-289. ISSN 0029-6643. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2010.00287.x.
139. TANG, S.; WAN, M.; HUANG, W.; STANTON, R. C.; XU, Y. Maresins: specialized proresolving lipid mediators and their potential role in inflammatory-related diseases. *Mediators of Inflammation*. 2018. **2018**, 2380319. DOI: 10.1155/2018/2380319.
140. DEVLIN, T. M. *Textbook of Biochemistry: with Clinical Correlations*. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, 2006. ISBN 0-471-67808-2.
141. LEE, J. M.; LEE, H.; KANG, S.; PARK, W. J. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*. 2016. **8**(1), 23. ISSN 2072-6643. DOI: 10.3390/nu8010023.
142. PARK, W. J.; KOTHAPALLI, K. S.; LAWRENCE, P.; TYBURCZY, C.; BRENNAN, J. T. An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product Delta8-desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3. *Journal of Lipid Research*. 2009. **50**(6), 1195-1202. ISSN 0022-2275. DOI: 10.1194/jlr.M800630-JLR200.
143. ZHANG, J. Y.; QIN, X.; LIANG, A.; KIM, E.; LAWRENCE, P.; PARK, W. J.; KOTHAPALLI, K. S. D.; BRENNAN, J. T. Fads3 modulates docosahexaenoic acid in liver and brain. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2017. **123**(August), 25-32. ISSN 0952-3278. DOI: 10.1016/j.plefa.2017.07.001.
144. GIVENS, D. I. Manipulation of lipids in animal-derived foods: Can it contribute to public health nutrition? *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2015. **117**(9), 1306-1316. ISSN 1438-7697. DOI: 10.1002/ejlt.201400427.

145. BURDGE, G. C.; JONES, A. E.; WOOTTON, S. A. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men*. *British Journal of Nutrition*. 2002. **88**(4), 355-363. ISSN 0007-1145. DOI: 10.1079/bjn2002662.
146. BURDGE, G. C.; WOOTTON, S. A. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *British Journal of Nutrition*. 2002. **88**(4), 411-420. ISSN 0007-1145. DOI: 10.1079/bjn2002689.
147. DOMENICHIELLO, A. F.; KITSON, A. P.; BAZINET, R. P. Is docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid sufficient to supply the adult brain? *Progress in Lipid Research*. 2015. **59**(July), 54-66. ISSN 0163-7827. DOI: 10.1016/j.plipres.2015.04.002.
148. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. *Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood* [online]. EFSA, ©2015 [cit. 30.9.2019]. Dostupné z: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.3982>.
149. SATI, A.; BHATT, P. Krill oil: the most powerful omega 3 known on earth. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. **9**(7), 2693-2699. ISSN 0975-8232. DOI: 10.13040/ijpsr.0975-8232.9(7).2693-99.
150. REZANKA, T.; PETRANKOVA, M.; CEPÁK, V.; PRIBYL, P.; SIGLER, K.; CAJTHAML, T. *Trachydiscus minutus*, a new biotechnological source of eicosapentaenoic acid. *Folia microbiologica*. 2010. **55**(3), 265-269. ISSN 0015-5632. DOI: 10.1007/s12223-010-0039-0.
151. XUE, Z.; WAN, F.; YU, W.; LIU, J.; ZHANG, Z.; KOU, X. Edible oil production from microalgae: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2018. **120**(6), 1700428. ISSN 1438-7697. DOI: 10.1002/ejlt.201700428.
152. JONASDOTTIR, S. H. Fatty acid profiles and production in marine phytoplankton. *Marine Drugs*. 2019. **17**(3), 151. ISSN 1660-3397. DOI: 10.3390/md17030151.
153. SCHUCHARDT, J. P.; HAHN, A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2013. **89**(1), 1-8. ISSN 0952-3278. DOI: 10.1016/j.plefa.2013.03.010.
154. ZAJÍC, T.; MRÁZ, J.; KOZÁK, P.; ADÁMKOVÁ, V.; PICKOVÁ, J. Maso kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) se zvýšeným obsahem omega 3 mastných kyselin jako nástroj prevence a rehabilitace kardiovaskulárních onemocnění. *Interní medicína pro praxi*. 2012. **14**(11), 437-440. ISSN 1212-7299.

155. VAHMANI, P.; MAPIYE, C.; PRIETO, N.; ROLLAND, D. C.; MCALLISTER, T. A.; AALHUS, J. L.; DUGAN, M. E. R. The scope for manipulating the polyunsaturated fatty acid content of beef: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2015. **6**(1), 29. ISSN 1674-9782. DOI: 10.1186/s40104-015-0026-z.
156. FULCO, A. J.; MEAD, J. F. Metabolism of essential fatty acids. VIII. Origin of 5,8,11-eicosatrienoic acid in the fat-deficient rat. *Journal of Biological Chemistry*. 1959. **234**(6), 1411-1416. ISSN 0021-9258.
157. FOKKEMA, M. R.; SMIT, E. N.; MARTINI, I. A.; WOLTIL, H. A.; BOERSMA, E. R.; MUSKIET, F. A. J. Assessment of essential fatty acid and ω 3-fatty acid status by measurement of erythrocyte 20:3 ω 9 (Mead acid), 22:5 ω 6/20:4 ω 6 and 22:5 ω 6/22:6 ω 3. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2002. **67**(5), 345-356. ISSN 0952-3278. DOI: 10.1054/plef.2002.0440.
158. HARRIS, W. S. The Omega-6:Omega-3 ratio: A critical appraisal and possible successor. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 2018. **132**(May), 34-40. ISSN 0952-3278. DOI: 10.1016/j.plefa.2018.03.003.
159. ALFADDAGH, A.; ELAJAMI, T. K.; SALEH, M.; MOHEBALI, D.; BISTRAN, B. R.; WELTY, F. K. An omega-3 fatty acid plasma index \geq 4% prevents progression of coronary artery plaque in patients with coronary artery disease on statin treatment. *Atherosclerosis*. 2019. **285**(June), 153-162. ISSN 0021-9150. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.04.213.
160. RISÉ, P.; ELIGINI, S.; GHEZZI, S.; COLLI, S.; GALLI, C. Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2007. **76**(6), 363-369. DOI: 10.1016/j.plefa.2007.05.003.
161. POPPITT, S. D.; KILMARTIN, P.; BUTLER, P.; KEOGH, G. F. Assessment of erythrocyte phospholipid fatty acid composition as a biomarker for dietary MUFA, PUFA or saturated fatty acid intake in a controlled cross-over intervention trial. *Lipids in Health and Disease*. 2005. **4**, 30. ISSN 1476-511x. DOI: 10.1186/1476-511x-4-30.
162. SERRA-MAJEM, L.; NISSENSOHN, M.; OVERBY, N. C.; FEKETE, K. Dietary methods and biomarkers of omega 3 fatty acids: a systematic review. *British Journal of Nutrition*. 2012. **107**(2), S64-S76. ISSN 0007-1145. DOI: 10.1017/s000711451200147x.
163. DELMONTE, P.; HU, Q.; KIA, A. R. F.; RADER, J. I. Preparation, chromatographic separation and relative retention times of cis/trans heptadecaenoic (17:1) fatty acids. *Journal of Chromatography A*. 2008. **1214**(1-2), 30-36. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.10.086.

164. HUŠEK, P.; ŠIMEK, P.; TVRZICKÁ, E. Simple and rapid procedure for the determination of individual free fatty acids in serum. *Analytica Chimica Acta*. 2002. **465**(1), 433-439. ISSN 0003-2670. DOI: 10.1016/S0003-2670(02)00574-3.
165. BERGSTROM, J. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1975. **35**(7), 609-616. ISSN 0036-5513.
166. RUIZ, J.; ANTEQUERA, T.; ANDRES, A. I.; PETRON, M. J.; MURIEL, E. Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods. *Analytica Chimica Acta*. 2004. **520**(1), 201-205. ISSN 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2004.04.059.
167. KALUZNY, M. A.; DUNCAN, L. A.; MERRITT, M. V.; EPPS, D. E. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*. 1985. **26**(1), 135-140. ISSN 0022-2275.
168. BONDIA-PONS, I.; MORERA-PONS, S.; CASTELLOTE, A. I.; LOPEZ-SABATER, M. C. Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2006. **1116**(1-2), 204-208. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.023.
169. GERITS, L. R.; PAREYT, B.; DELCOUR, J. A. Single run HPLC separation coupled to evaporative light scattering detection unravels wheat flour endogenous lipid redistribution during bread dough making. *LWT - Food Science and Technology*. 2013. **53**(2), 426-433. ISSN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.03.015.
170. CHAMORRO, L.; GARCIA-CANO, A.; BUSTO, R.; MARTINEZ-GONZALEZ, J.; ALBILLOS, A.; LASUNCION, M. A.; PASTOR, O. Quantitative profile of lipid classes in blood by normal phase chromatography with evaporative light scattering detector: application in the detection of lipid class abnormalities in liver cirrhosis. *Clinica chimica acta*. 2013. **421**(June), 132-139. ISSN 0009-8981. DOI: 10.1016/j.cca.2013.02.007.
171. HOLČAPEK, M.; CIFKOVÁ, E.; ČERVENÁ, B.; LISÁ, M.; VOSTÁLOVÁ, J.; GALUSZKA, J. Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2015. **1377**(January), 85-91. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.12.023.
172. ROSE, H. G.; OKLANDER, M. Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *Journal of Lipid Research*. 1965. **6**, 428-431. ISSN 0022-2275.

173. FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957. **226**(1), 497-509. ISSN 0021-9258.
174. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global report on diabetes* [online]. WHO, ©2016 [cit. 6.9.2019]. Dostupné z: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf;jsessionid=EACC47F4F27E44679A774DE8B17FB726?sequence=1.
175. KAISER, A. B.; ZHANG, N.; DER PLUIJM, W. V. Global prevalence of type 2 diabetes over the next ten years (2018-2028). *Diabetes*. 2018. **67**(Suppl. 1), 202-LB. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db18-202-LB.
176. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *Diabetes Atlas - Global Fact Sheet* [online]. IDF, ©2017 [cit. 6.9.2019]. Dostupné z: <https://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>.
177. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *Czech Rep. Country report 2017 & 2045* [online]. IDF, ©2017 [cit. 6.9.2019]. Dostupné z: <https://reports.instantatlas.com/report/view/704ee0e6475b4af885051bcec15f0e2c/CZE>.
178. HUA, N. W.; STOOHS, R. A.; FACCHINI, F. S. Low iron status and enhanced insulin sensitivity in lacto-ovo vegetarians. *British Journal of Nutrition*. 2001. **86**(4), 515-519. ISSN 0007-1145. DOI: 10.1079/bjn2001421.
179. TONSTAD, S.; BUTLER, T.; YAN, R.; FRASER, G. E. Type of vegetarian diet, body weight, and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009. **32**(5), 791-796. ISSN 0149-5992. DOI: 10.2337/dc08-1886.
180. TONSTAD, S.; STEWART, K.; ODA, K.; BATECH, M.; HERRING, R. P.; FRASER, G. E. Vegetarian diets and incidence of diabetes in the Adventist Health Study-2. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*. 2013. **23**(4), 292-299. ISSN 0939-4753. DOI: 10.1016/j.numecd.2011.07.004.
181. APPLEBY, P. N.; KEY, T. J. The long-term health of vegetarians and vegans. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2016. **75**(3), 287-293. ISSN 0029-6651. DOI: 10.1017/s0029665115004334.
182. MELINA, V.; CRAIG, W.; LEVIN, S. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: vegetarian diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2016. **116**(12), 1970-1980. ISSN 2212-2672. DOI: 10.1016/j.jand.2016.09.025.
183. GOFF, L. M.; BELL, J. D.; SO, P. W.; DORNHORST, A.; FROST, G. S. Veganism and its relationship with insulin resistance and intramyocellular lipid. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2005. **59**(2), 291-298. ISSN 0954-3007. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1602076.

184. VALACHOVICOVA, M.; KRAJCOVICOVA-KUDLACKOVA, M.; BLAZICEK, P.; BABINSKA, K. No evidence of insulin resistance in normal weight vegetarians. A case control study. *European Journal of Nutrition*. 2006. **45**(1), 52-54. ISSN 1436-6207. DOI: 10.1007/s00394-005-0563-x.
185. GOJDA, J.; PATKOVÁ, J.; JAČEK, M.; POTOČKOVÁ, J.; TRNKA, J.; KRAML, P.; ANDĚL, M. Higher insulin sensitivity in vegans is not associated with higher mitochondrial density. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2013. **67**, 1310-1315. ISSN 0954-3007. DOI: 10.1038/ejcn.2013.202.
186. CUI, X.; WANG, B.; WU, Y.; XIE, L.; XUN, P.; TANG, Q.; CAI, W.; SHEN, X. Vegetarians have a lower fasting insulin level and higher insulin sensitivity than matched omnivores: A cross-sectional study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*. 2019. **29**(5), 467-473. ISSN 0939-4753. DOI: 10.1016/j.numecd.2019.01.012.
187. AUNE, D.; URSIN, G.; VEIEROD, M. B. Meat consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia*. 2009. **52**(11), 2277-2287. ISSN 0012-186X. DOI: 10.1007/s00125-009-1481-x.
188. GREEN, C. R.; WALLACE, M.; DIVAKARUNI, A. S.; PHILLIPS, S. A.; MURPHY, A. N.; CIARALDI, T. P.; METALLO, C. M. Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nature Chemical Biology*. 2016. **12**(1), 15-21. ISSN 1552-4469. DOI: 10.1038/nchembio.1961.
189. GOJDA, J.; ROSSMEISLOVA, L.; STRAKOVA, R.; TUMOVA, J.; ELKALAF, M.; JACEK, M.; TUMA, P.; POTOCKOVA, J.; KRAUZOVA, E.; WALDAUF, P.; TRNKA, J.; STICH, V.; ANDEL, M. Chronic dietary exposure to branched chain amino acids impairs glucose disposal in vegans but not in omnivores. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2017. **71**(5), 594-601. ISSN 0954-3007. DOI: 10.1038/ejcn.2016.274.
190. YOSHINAGA, K.; ASANUMA, M.; MIZOBE, H.; KOJIMA, K.; NAGAI, T.; BEPPU, F.; GOTOH, N. Characterization of cis- and trans-octadecenoic acid positional isomers in edible fat and oil using gas chromatography-flame ionisation detector equipped with highly polar ionic liquid capillary column. *Food Chemistry*. 2014. **160**(October), 39-45. ISSN 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.069.
191. DELMONTE, P.; FARDIN-KIA, A. R.; KRAMER, J. K.; MOSSOBA, M. M.; SIDISKY, L.; TYBURCZY, C.; RADER, J. I. Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat. *Journal of Chromatography A*. 2012. **1233**(April), 137-146. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.02.012.

192. DELMONTE, P.; HU, Q.; KIA, A. R.; RADER, J. I. Preparation, chromatographic separation and relative retention times of cis/trans heptadecaenoic (17:1) fatty acids. *Journal of Chromatography A*. 2008. **1214**(1-2), 30-36. ISSN 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.10.086.
193. JAČEK, M.; GOJDA, J.; DLOUHÝ, P.; TŮMA, P. The use of coupled gas chromatography columns for the determination of individual isomers of trans fatty acids in the adipose tissue of vegans. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2019. **150**(8), 1417-1424. ISSN 1434-4475. DOI: 10.1007/s00706-019-02481-9.
194. WEI, W.; YANG, J.; XIA, Y.; CHANG, C.; SUN, C.; YU, R.; ZHOU, Q.; QI, C.; JIN, Q.; WANG, X. Tocopherols in human milk: Change during lactation, stability during frozen storage, and impact of maternal diet. *International Dairy Journal*. 2018. **84**(September), 1-5. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.03.009.
195. NEVILLE, M.; P KELLER, R.; SEACAT, J.; E CASEY, C.; C ALLEN, J.; P.C, A. Studies on human lactation. I. Within-feed and between-breast variation in selected components of human milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1984. **40**(3), 635-646. DOI: 10.1093/ajcn/40.3.635.
196. MARHOL, P.; DLOUHÝ, P.; RAMBOUSKOVÁ, J.; POKORNÝ, R.; WIEREROVÁ, O.; HRNČÍŘOVÁ, D.; PROCHÁZKA, B.; ANDĚL, M. Higher content of C18:1 trans fatty acids in early human milk fat of Roma breast-feeding women. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 2007. **51**(5), 461-467. ISSN 0250-6807. DOI: 10.1159/000111167.