

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie

**VÝVOJ MODERNÍCH ANALYTICKÝCH METOD PRO ANALÝZU
BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK**

Jitka Klikarová

DISERTAČNÍ PRÁCE

2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Ing. Jitka Klikarová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za její čas, obětavost, trpělivost, vstřícný přístup, cenné rady a odborné, profesionální vedení během celé naší spolupráce.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu nejen při studiu.

ANOTACE

Disertační práce se zabývá vývojem analytických metod pro stanovení vybraných biologicky aktivních látek ve třech rozdílných maticích. Pomocí kapalinové chromatografie byl objasněn fenolický profil v italských extra panenských olejích a aminokyselinový profil v českých medovinách. Posledním typem vzorků byly energetické nápoje, v nichž bylo sledováno množství diskutabilní β -aminokyseliny taurinu. Získané výsledky mohou sloužit k hodnocení kvality a autenticity daných produktů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fenolické látky, aminokyseliny, extra panenské olivové oleje, medoviny, energetické nápoje, kapalinová chromatografie

TITLE

Development of modern analytical methods for analysis of biologically active substances

ANNOTATION

The dissertation deals with the development of analytical methods for the determination of selected biologically active compounds in three different matrices. The phenolic profile in Italian extra virgin oils and the amino acid profile in Czech mead were elucidated by liquid chromatography. The last type of samples were energy drinks, in which the amount of disputable β -amino acid taurine was monitored. The obtained results can be used for evaluation of the quality and authenticity of the products.

KEYWORDS

Phenolic compounds, amino acids, extra virgin olive oils, meads, energy drinks, liquid chromatography

OBSAH:

Seznam obrázků.....	8
Seznam tabulek.....	10
Seznam zkratk.....	11
ÚVOD.....	15
1 FENOLICKÉ LÁTKY V EXTRA PANENSKÉM OLIVOVÉM OLEJI.....	18
<i>1.1 EXTRA PANENSKÝ OLIVOVÝ OLEJ.....</i>	<i>18</i>
1.1.1 Základní údaje, výroba, producenti a použití.....	18
1.1.2 Složení.....	20
1.1.3 Stabilita.....	20
1.1.4 Charakterizace.....	21
1.1.5 Falšování.....	23
<i>1.2 FENOLICKÉ LÁTKY.....</i>	<i>25</i>
1.2.1 Základní charakteristika, dělení a vlastnosti.....	25
1.2.2 Obecné metody stanovení fenolických látek v různých maticích.....	27
1.2.3 Fenolické látky olivového oleje a jejich stanovení.....	31
<i>1.3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</i>	<i>34</i>
1.3.1 Přístroje a příslušenství.....	34
1.3.2 Použité chemikálie.....	34
1.3.3 Analýza fenolických látek v italských EVOO.....	35
1.3.3.1 Analyzované vzorky EVOO.....	35
1.3.3.2 Příprava standardů fenolických látek.....	35
1.3.3.3 Extrakce fenolických látek z EVOO.....	39
1.3.3.4 Podmínky chromatografické separace a detekce fenolických látek.....	40
1.3.3.5 Podmínky NMR analýzy fenolických látek v EVOO.....	40
1.3.3.6 Statistická analýza fenolických látek nalezených v EVOO.....	41
<i>1.4 VÝSLEDKY A DISKUSE.....</i>	<i>42</i>
1.4.1 Izomerace fenolických látek olivového oleje.....	42
1.4.2 Optimalizace a validace extrakce fenolických látek z EVOO.....	44
1.4.3 Optimalizace a validace HPLC stanovení fenolických látek v EVOO.....	46
1.4.4 Porovnání HPLC a NMR výsledků.....	48
1.4.5 Statistické hodnocení italských EVOO na základě fenolického profilu.....	54
1.4.5.1 Faktorová analýza.....	57
1.4.5.2 Diskriminační analýza.....	60
<i>1.5 ZÁVĚREČNÉ SHRNUTÍ K EVOO.....</i>	<i>63</i>
<i>1.6 POUŽITÁ LITERATURA.....</i>	<i>65</i>

2	AMINOKYSELINY V NÁPOJÍCH.....	80
2.1	<i>AMINOKYSELINY.....</i>	<i>80</i>
2.1.1	Základní charakteristika, dělení a vlastnosti.....	80
2.1.2	Důvody stanovení	81
2.1.3	Metody stanovení.....	83
2.2	<i>MED A MEDOVINA.....</i>	<i>88</i>
2.2.1	Základní charakteristika a složení medu.....	88
2.2.2	Vlastnosti a využití medu	88
2.2.3	Kvalita a autenticita medu	90
2.2.4	Stabilita medu	91
2.2.5	Důležité dusíkaté látky v medu.....	91
2.2.6	Medovina a její historický původ	92
2.2.7	Výroba medoviny	93
2.2.8	Kvasinky pro výrobu medoviny	94
2.2.9	Kvalita medoviny.....	95
2.2.10	Druhy medovin	96
2.3	<i>ENERGETICKÉ NÁPOJE.....</i>	<i>98</i>
2.3.1	Definice, složení a konzumace energetických nápojů	98
2.3.2	Základní charakteristika, metabolismus, vlastnosti a výskyt taurinu	100
2.3.3	Metody stanovení taurinu	103
2.4	<i>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</i>	<i>106</i>
2.4.1	Přístroje a příslušenství.....	106
2.4.2	Použité chemikálie	107
2.4.3	Stanovení prolinu v medovinách po jeho DNS-Cl derivatizaci.....	109
2.4.3.1	Vzorky analyzovaných medovin	109
2.4.3.2	Extrakce prolinu a jeho DNS-Cl derivatizace.....	109
2.4.3.3	Podmínky chromatografické analýzy DNS-Cl derivátu prolinu.....	111
2.4.3.4	Kvantifikace prolinu ve vzorcích medovin.....	111
2.4.4	Stanovení AMK v medovinách po jejich PITC derivatizaci	112
2.4.4.1	Standardy AMK a vzorky medovin.....	112
2.4.4.2	PITC derivatizace směsi 21 AMK.....	112
2.4.4.3	Chromatografická analýza PITC derivátů AMK	113
2.4.4.4	Referenční metoda	114
2.4.5	Stanovení taurinu v energetických nápojích.....	114
2.4.5.1	Vzorky energetických nápojů	114
2.4.5.2	Příprava a HPLC stanovení PITC derivátů taurinu	115
2.4.5.3	Stanovení taurinu jako OPA derivátu	115
2.4.6	Statistické vyhodnocení experimentálních dat	116
2.5	<i>VÝSLEDKY A DISKUSE.....</i>	<i>117</i>
2.5.1	DNS-Cl deriváty prolinu v medovinách	117

2.5.1.1	Optimalizace extrakce prolinu ze vzorků medovin	117
2.5.1.2	Optimalizace DNS-Cl derivatizace prolinu	119
2.5.1.3	Optimalizace HPLC analýzy	121
2.5.1.4	Kvantifikace prolinu v medovinách a vyhodnocení naměřených dat.....	123
2.5.2	PITC deriváty AMK v medovinách.....	125
2.5.2.1	Příprava vzorku a PITC derivatizace AMK.....	125
2.5.2.2	Optimalizace RP-HPLC analýzy PITC derivátů	127
2.5.2.3	Kvantitativní analýza AMK v medovinách	130
2.5.3	Taurin v energetických nápojích.....	135
2.5.3.1	Stanovení taurinu jako PITC derivátu	135
2.5.3.2	Stanovení taurinu jako OPA derivátu	137
2.5.3.3	Analýza energetických nápojů.....	140
2.6	<i>ZÁVĚREČNÉ SHRNUTÍ KE STANOVENÍ AMINOKYSELIN</i>	142
2.7	<i>POUŽITÁ LITERATURA</i>	146
	PŘÍLOHY	161

Seznam obrázků

Obrázek 1 Mechanismus antioxidační aktivity fenolů	26
Obrázek 2 Chemické struktury hlavních secoiridoidů.	43
Obrázek 3 Schéma hlavních degradačních, přesmykových a izomerních reakcí, kterým podléhají deriváty kyseliny elenolové, vedoucí k různým chemickým formám.	44
Obrázek 4 Celkové množství izomerů oleuropein aglykonu (HTY-EA der.) ve 32 vzorcích EVOO získaných analýzou HPLC-DAD (červeně) a NMR (modře).....	51
Obrázek 5 MS záznam při stanovení vzorku 13. A: TIC (celkový iontový chromatogram), B: RIC (rekonstruovaný iontový chromatogram) oleaceinu ($m/z = 319$).....	51
Obrázek 6 HPLC/DAD chromatogram vzorku EVOO číslo 30 pocházejícího z města Catanzaro v Kalábrii.	53
Obrázek 7 Ilustrativní mapa Itálie znázorňující geografický původ vzorků EVOO, včetně jejich konkrétního zařazení do jedné ze tří skupin (Sicílie, severní Itálie a jižní Itálie).....	54
Obrázek 8 Graf stanoveného celkového množství fenolických látek ve vzorcích EVOO.....	56
Obrázek 9 Graf faktorových zátěží pro všech 40 proměnných po normalizované rotaci metodou varimax (STATISTICA 12, StatSoft).....	58
Obrázek 10 Graf faktorového skóre prvního a druhého faktoru pro všech 68 EVOO vzorků (STATISTICA 12, StatSoft).....	59
Obrázek 11 Diagram lineárního diskriminačního skóre rozděluje vzorky EVOO do tří skupin podle jejich zeměpisného původu: severní Itálie – skupina A, jižní Itálie – skupina B, Sicílie – skupina C (STATISTICA 12, StatSoft).....	62
Obrázek 12 Obecné reakční schéma tvorby derivátu dansylchloridu s aminokyselinou (DNS-AMK).....	111
Obrázek 13 Obecné schéma reakce PITC činidla s AMK.	113
Obrázek 14 Schéma derivatizační reakce taurinu s činidlem OPA v přítomnosti ethanthiolu.	116
Obrázek 15 Vliv použitého elučního činidla na kvalitu píku DNS-Cl derivátu prolinu.	118
Obrázek 16 Vliv rozpouštědla použitého pro přípravu DNS-Cl činidla na derivatizaci standardu prolinu. V červeném záznamu byl k přípravě použit acetonitril a v modrém záznamu metanol.	119
Obrázek 17 Vliv přídavku Na_2CO_3 a Li_2CO_3 na derivatizaci extraktu standardu prolinu. ...	120

Obrázek 18 Časová závislost tvorby DNS-Cl derivátu prolinu při laboratorní teplotě (25 °C) a při teplotě 40 °C. Měření probíhalo ihned po smíchání (0 min), po 60 min a po 24 hodinách.	121
Obrázek 19 Chromatogram DNS-Cl derivátu standardu prolinu s různou koncentrací TEA ve vodné mobilní fázi.	122
Obrázek 20 Chromatogram extraktu standardu prolinu ($c = 115 \text{ mg/l}$) po DNS-Cl derivatizaci (modrá křivka) a chromatogram derivatizovaného extraktu medoviny po jejím desetinasobném zakoncentrování (červená křivka). V obou případech byla pro extrakci použita kolona SPE Strata SCX.	122
Obrázek 21 Kalibrační křivka standardu prolinu po jeho extrakci a DNS-Cl derivatizaci, včetně příslušné rovnice regrese.	123
Obrázek 22 Graf znázorňující obsah prolinu stanovený ve 24 vzorcích medovin včetně linie určující jeho limitní množství (50,4 mg/l) zavedené pro medoviny.	124
Obrázek 23 Vliv pH mobilní fáze na chromatografickou separaci PITC derivátů AMK.	129
Obrázek 24 Optimalizovaná separace standardů 21 AMK po jejich PITC derivatizaci.	130
Obrázek 25 Vyhodnocení množství prolinu v 10x zředěném vzorku č. V pomocí metody vícenasobného standardního přídávku.	131
Obrázek 26 Příklad chromatogramu zderivatizované medoviny č. III včetně všech standardních přídávků prolinu.	132
Obrázek 27 Kalibrační křivka standardu taurinu derivatizovaného PITC činidlem, včetně příslušné rovnice regrese.	136
Obrázek 28 Chromatogramy osmi kalibračních roztoků PITC derivátů taurinu v koncentračním rozmezí 100–800 $\mu\text{g/ml}$	136
Obrázek 29 Chromatogramy 10x zředěného vzorku „Red Bull classic“ po jeho derivatizaci PITC činidlem. Derivát byl analyzován 3x.	137
Obrázek 30 Časová závislost tvorby OPA derivátu taurinu sledovaná spektrofotometricky při dvou vlnových délkách ($\lambda = 226$ a 328 nm).	138
Obrázek 31 UV spektra 95% metanolu (slepý pokus), směsi OPA o $c = 0,25 \text{ mmol/l}$ s ethanthiolem o $c = 0,47 \text{ mmol/l}$ (činidlo) a OPA derivátů taurinu s různou koncentrací taurinu (82; 159; 258; 307; 378; 447; 514; 579; 642 a $703 \mu\text{g/ml}$).	139
Obrázek 32 Koncentrační rozmezí lineární závislosti OPA derivátu taurinu stanovené spektrofotometricky při dvou vlnových délkách ($\lambda = 226$ a 328 nm).	140

Seznam tabulek

Tabulka 1 Seznam EVOO vzorků včetně informací o jejich botanickém a zeměpisném původu	36
Tabulka 2 Validacioní parametry HPLC analýzy fenolických látek	45
Tabulka 3 Kvantifikace fenolických látek NMR a DAD technikou. Pokud má látka více relativních forem, je výsledek uveden jako jejich součet	49
Tabulka 4 Celkové množství fenolických látek stanovené ve vzorcích EVOO.....	56
Tabulka 5 Seznam 24 analyzovaných českých medovin, včetně jejich původu a způsobu přípravy.....	110
Tabulka 6 Pět zkoumaných extrakčních kolonek s odpovídajícími hodnotami extrakčních účinností [%] a intervalů spolehlivosti	118
Tabulka 7 Množství prolinu [mg/l] ve 24 analyzovaných vzorcích českých medovin uvedené včetně jejich příslušných intervalů spolehlivosti	124
Tabulka 8 Koncentrace [mg/l] prezentovaných AMK v pěti vzorcích českých medovin....	133
Tabulka 9 Koncentrace prolinu [mg/l] stanovená ve vzorcích medovin vyvinutou chromatografickou (HPLC) a referenční spektrofotometrickou (SFM) metodou.....	133
Tabulka 10 Porovnání chromatografických výsledků kvantitativního stanovení taurinu v šesti vybraných energetických nápojích s výsledky získanými pomocí SWV a s deklarovaným množstvím taurinu uvedeným na jejich obale	141

Seznam zkratek

5-HMF	5-hydroxymetylfurfural
AMK	aminokyselina
APDS	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl- <i>N</i> -pyridin-3-ylkarbamát
AQC	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl- <i>N</i> -chinolin-6-ylkarbamát
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
CEC	kapilární elektrochromatografie (Capillary ElectroChromatography)
DA	diskriminační analýza (Discriminant Analysis)
DABS-Cl	4'-(<i>N,N</i> -dimethylamino)azobenzen-4-sulfonylchlorid
DAD	detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
DEEMM	diethyl-ethoxymetylenmalonát
DBS-Cl	dabsylchlorid (DaBSyl Chloride)
DNS-Cl	dansylchlorid (DaNSyl Chloride)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
EI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací (Mass Spectrometry with Electron Ionization)
ELSD	detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector)
EMA	ekonomicky motivované falšování (Economically Motivated Adulteration)
EOF	elektroosmotický tok (ElectroOsmotic Flow)
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (Mass Spectrometry with ElectroSpray Ionization)
EU	Evropská Unie

EVOO	extra panenský olivový olej (Extra Virgin Olive Oil)
FAN	volné dusíkaté látky (Free Amino Nitrogen)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FMOC-Cl	9-fluorenylmetyl-chlorformiát
FOSF	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-N-[tris(pyrrolidin-1-yl)fosforanylidenamino]karbamát
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier Transform InfraRed spectroscopy)
FTIR-ATR	FTIR s technikou zeslabeného úplného odrazu (Attenuated Total Reflection)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (Glassy Carbon Electrode)
HAT	metody založené na přenosu atomu vodíku (Hydrogen Atom Transfer)
HILIC	kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (High-Performance Thin-Layer Chromatography)
ChOP	Chráněné Označení Původu (Protected Designation of Origin)
ChZO	Chráněné Zeměpisné Označení (Protected Geographical Indication)
IHC	Mezinárodní komise pro med (International Honey Commission)
IR	infračervené záření (Infrared)
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LDL	lipoproteinové částice cholesterolu s nízkou hustotou (Low Density Lipoprotein)

LLE	extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction)
LoD	limit detekce (Limit of Detection)
LoQ	limit kvantifikace (Limit of Quantification)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (Micellar ElectroKinetic Chromatography)
MF	mobilní fáze
MK	mastná kyselina
MIP	molekulově imprintované polymery (Molecularly Imprinted Polymer)
MIR	střední oblast infračerveného světla (Middle InfraRed)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
NIR	blízká oblast infračerveného světla (Near InfraRed)
NMR	nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
NP	normální fáze (Normal Phase)
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd
ORAC	kapacita absorbovat volné radikály kyslíku (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PP	(poly)fenolické látky (polyphenols)
PITC	fenylisothiokyanát (Phenyl IsoThioCyanate)
PLS-DA	diskriminační analýza s metodou částečných nejmenších čtverců (Partial Least Squares Discriminant Analysis)
PTFE	polytetrafluorethylen
RIC	rekonstruovaný iontový proud (Reconstructed Ion Chromatogram)
RP	obrácené fáze (Reverse Phase)

RP-HPLC	kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography)
SET	metody založené na přenosu elektronu (Single Electron Transfer)
SF	stacionární fáze
SIMCA	měkké nezávislé modelování podobnosti tříd (Soft Independent Modelling by Class Analogy)
SINA	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-naftalen-1-ylacetát
SPE	extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
SWV	square wave voltametrie (Square Wave Voltammetry)
TAHS	4-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yloxykarbonylamino) fenyltrimetylamonium jodid
TEA	triethylamin
TIC	celkový iontový proud (Total Ion Current)
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-Performance Liquid Chromatography)
UV-VIS	ultrafialová-viditelná oblast spektra (UltraViolet-VISible spectrum)

ÚVOD

Potravinářský průmysl je kvůli neustálému růstu populace jedním z nejrychleji se rozvíjejících oblastí hospodářství. S rostoucí poptávkou se však současně zvyšují i nároky na potraviny. Producenti se předbíhají v rozmanitosti produktů a jejich cenách. Někteří z nich pak za účelem rychlých zisků uvádějí na trh potraviny, u nichž byla úmyslně zhoršena kvalita. Takové jednání se pak označuje jako "falšování potravin" [1].

Není třeba příliš zdůrazňovat, že konzumace nedostatečně kvalitních potravin může vážně ohrozit lidské zdraví. Rozsáhlé kontroly ve všech odvětvích potravinářského průmyslu jsou však nezbytné nejen ze zdravotních, ale také z ekonomických (cenových), senzorických i náboženských důvodů. Hlavními cíli veřejného zájmu je proto dnes kontrola kvality, znalost geografického a botanického původu potravin, monitorování nebezpečných reziduí v potravinách, eliminace falšovaných produktů a v neposlední řadě i stanovení výživové hodnoty potraviny. Z tohoto důvodu je třeba zajistit důkladnou kontrolu celého procesu výroby od použitých ingrediencí, zpracování, balení, přepravy a skladování až po označování potravin, použití růstových hormonů či genetických modifikací (geneticky modifikované potraviny a krmiva) a dalších faktorů ovlivňujících chemické a biochemické vlastnosti potravin [1–4].

Kvůli mnohočetným přestupkům byl americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v květnu roku 2009 vytvořen termín ekonomicky motivované falšování (EMA), jakožto podkategorie potravinových podvodů. EMA lze definovat jako úmyslná náhrada nebo přidání látky do výrobku se záměrem zvýšení jeho zdánlivé hodnoty či snížení nákladů na jeho výrobu. Zahrnuje tedy i ředění výrobku, jež se provádí za účelem vyšších výtěžků či snížení koncentrace kontaminantů na vládou povolené limity, a také metodu tzv. maskování, kdy dochází k přidávání látek do naředěného, či nekvalitního produktu, čímž se maskují jeho nedostatky. Nejčastějším podvodným postupem je částečná nebo úplná náhrada autentické složky nebo materiálu za levnější a snadno dostupné látky. Výsledkem je pak méně kvalitní výrobek, který v některých případech může ovlivňovat lidské zdraví. Nejznámějším novodobým českým příkladem je metanolová aféra z roku 2012, která mimo Českou republiku zasáhla i Polsko a Slovensko, a při níž došlo k mnohačetným otravám po požití lihovin, v nichž byl etanol částečně nahrazen levnějším, jedovatým metanolem [2].

Pravost některých produktů, jako je např. med, víno, olivový olej, čaj a některé mléčné nebo masné výrobky, je spojována se zeměpisnou oblastí produkce a/nebo specifickou technologií zpracování. Průzkum anglické společnosti Food Standards Agency odhalil,

že spotřebitelé vyžadují nebo minimálně preferují označování původu produktu na etiketě [5]. Bylo zjištěno, že až 82 % zákazníků se rozhoduje o koupi či nezakoupení produktu právě na základě jeho geografické produkce. Tento zvýšený zájem konzumentů proudí z rozdílných organoleptických vlastností spojených s původem potraviny, dále z vlastenectví, tlaku médií, nedůvěry v kvalitu a bezpečnost potravin produkovaných mimo jejich region, zem či Evropskou unii a v neposlední řadě i z morálních (etických) důvodů, jako je blahobyt chovaných zvířat či produkce potravin šetrná k životnímu prostředí [5]. Kvůli dychtivosti spotřebitelů po detailnějších informacích o produktech vydala Evropská unie v roce 1992 nařízení 2081/92 a 2082/92, která vysvětlují a ustanovují způsob označování produktů, včetně jejich původu [5]. K ochraně specifických regionálních potravin před zneužitím a napodobováním byla dále v letech 2006 [6] a 2012 [7] Evropskou unií vytvořena dvě nařízení, na jejichž základě byly ustanoveny termíny: (a) Chráněné Označení Původu (ChOP), kdy produkt musí být vyprodukován, zpracován a připraven ve stejné oblasti s použitím tradičních metod, (b) Chráněné Zeměpisné Označení (ChZO), kdy produkt musí být vyprodukován, zpracován nebo alespoň připraven v dané oblasti, a (c) Zaručené Tradiční Speciality (ZTS), kdy produkt není spojen s geografickou polohou, ale s tradičním postupem výroby či jeho tradičním složením. Jelikož produkty s tímto označením spadají do vyšší cenové kategorie, je třeba ověřovat jejich původ, a tím předcházet praktikám klamání spotřebitele [2,5,8,9].

Za účelem kontroly jakosti a původu potravin se neustále vyvíjejí nové, modernější techniky [1,10]. Setkáme se s biologickými, spektroskopickými, separačními i chemickými technikami a jejich různými kombinacemi. Z biologických technik jsou to zejména metody enzymologie a molekulární biologie, jako je například polymerázová řetězová reakce. Mezi spektroskopické techniky patří hmotnostní spektrometrie, spektroskopie s ultrafialovým nebo viditelným zářením, atomová absorpční či emisní spektroskopie, spektroskopie Fourierovy transformace v různých oblastech infračerveného záření, nukleární magnetická rezonanční spektroskopie a fluorescenční spektroskopie. Právě spektroskopické techniky jsou často použity v kombinaci se separačními technikami, jako je plynová či kapalinová chromatografie nebo kapilární elektroforéza, v nichž jsou analyty nejprve rozděleny a až následně detekovány. Z chemických technik jsou dnes populární metody využívající senzory, jako je tzv. elektronický nos, který je rychlou a levnou alternativou plynové chromatografie. Dokáže totiž stanovit těkavé látky bez jejich předchozí separace a úpravy [2,5,8,11–13]. Neméně důležitá je i senzorická analýza zkoumající organoleptické vlastnosti produktu [13].

Ve spojení s vícerozměrnou statistickou analýzou se tyto techniky staly mocnými nástroji pro stanovení pravosti potravin.

Jelikož je v dnešní době moderní žít zdravým životním stylem, došlo v posledních letech k rostoucímu zájmu o tzv. „funkční potraviny“. Tyto produkty splňují nejen základní nutriční a energetické požadavky, ale jako bonus poskytují i nemalé zdravotní benefity. Termín "funkční potraviny" byl poprvé použit v 80. letech minulého století v Japonsku pro potraviny obsahující některé fyziologicky výhodné složky. V současné době definujeme „funkční potravinu“ jako produkt s příznivým či blahodárným účinkem na alespoň jednu fyziologickou funkci (zvyšuje pohodu organismu a/nebo snižuje riziko vzniku chorobného stavu). Funkčnost určité potraviny se obvykle vztahuje ke složkám, které obsahuje. Tyto složky obvykle extrahujeme z rostlin, vedlejších produktů potravin nebo z jiných, zpravidla přírodních zdrojů (dnešní spotřebitel upřednostňuje jejich přírodní než syntetický původ) [3]. Mezi tyto funkční složky patří i obšírně studovaná skupina fenolických látek a aminokyselin, které hrají důležitou roli ve výživě a pozitivně ovlivňují zdraví člověka [14].

Extra panenský olivový olej i med, respektive z něj vyráběná medovina, mohou být díky svým prokazatelným zdravotním benefitům bezpochyby považovány za funkční potraviny. Oba produkty se zároveň řadí do ekonomicky nákladnějšího (luxusního) zboží, a tudíž se velmi často stávají středem zájmu podvodníků a dochází k jejich falšování, které může být odhaleno stanovením profilu některých biologicky aktivních látek. Z tohoto důvodu byla pozornost zaměřena právě na analýzu fenolických látek v italských extra panenských olivových olejích a dále na analýzu aminokyselin v českých medovinách.

1 FENOLICKÉ LÁTKY V EXTRA PANENSKÉM OLIVOVÉM OLEJI

1.1 EXTRA PANENSKÝ OLIVOVÝ OLEJ

1.1.1 Základní údaje, výroba, producenti a použití

Extra panenský olivový olej (EVOO) je nepolární kapalina patřící do kategorie rostlinných olejů, které se vyznačují vyšší prodejní cenou, nezaměnitelným složením a specifickou chutí. Pro výrobu olivového oleje se používají pouze plody rostliny *Olea europaea*. Ty v závislosti na jejich kultivaru obsahují 12–28 % oleje.

Na celém světě nalezneme nespočet různých kultivarů olivovníků. Jedním z nejznámějších a nejrozšířenějších je španělská odrůda *Arbequina*. Přestože je olej z tohoto kultivaru velmi aromatický, nevykazuje výraznou hořkost a štiplavost. Obsahuje navíc menší množství polyfenolů, což způsobuje jeho předčasné žluknutí. Dalším velmi významným španělským kultivarem je *Empeltre*, z něhož je po zpracování získán velmi lehký a ovocný olej se středním obsahem polyfenolů a vynikající jakostí. Nesmíme opomenout ani italské odrůdy, mezi něž patří třeba *Grappolo* nebo *Coratina*. Tyto kultivary jsou známé pro svůj vysoký obsah polyfenolů, a tím velkou stabilitu. Jsou také často přidávány do směsí s rafinovanými oleji, které pak nazýváme tzv. blend oleje. Pravým opakem je pak portugalská odrůda *Galega*, jež je šlechtěna výhradně k výrobě extra panenského olivového oleje. Z řeckých kultivarů je naprosto nezbytné zmínit alespoň odrůdu *Koroneiki*, která poskytuje velmi aromatické a zároveň stabilní oleje [15].

Obecný postup výroby rostlinného oleje je velmi jednoduchý. Zahrnuje pouze drcení semen či plodů olejnatých rostlin v mlecích stolicích a následné lisování narušených plodin za tepla či za studena. Zbytky oleje ve výliscích (tzv. pokrutinách) mohou být dále extrahovány vhodným organickým rozpouštědlem a přidány k hlavnímu podílu či použity k jiným účelům. Šrot zbylý po extrakci pak slouží jako cenný zdroj bílkovin a vlákniny v krmivech zvířat. Surový olej je před balením do lahví obvykle rafinován. Rafinace oleje probíhá ve čtyřech krocích známých jako hydratace, neutralizace, bělení a dezodorace, během nichž je olej zbaven nežádoucích nečistot, fosfolipidů, volných mastných kyselin, pigmentů či nepříjemných pachů a chuťových látek. Rafinačním procesem bohužel dochází k výskytu nežádoucích reakcí vedoucích k tvorbě kontaminantů, a dále také ke ztrátě některých

prospěšných komponent přirozeně se vyskytujících v olejích, mezi něž patří například fenolické látky, fytoosteroly, tokoferoly nebo karoteny [11,16].

Příprava běžného olivového oleje se nijak neliší od obecné přípravy rostlinných olejů a kopíruje tedy výše uvedený proces. Pokud však chceme připravit extra panenský olivový olej, pro nějž zlidovělo přívlastko „král rostlinných olejů“, musíme striktně dodržovat předepsaný technologický postup. V tomto případě se sbírají jen kvalitní, čerstvé, neporušené olivy přesné zralosti, z kterých je olej získán výhradně mechanickým oddělením (lisováním) za studena, a to dokonce i bez předchozího drcení oliv. Jelikož je během celého výrobního procesu EVOO přísně zakázáno přidávat jakákoli aditiva, nesmí do něj být přimícháván olivový olej získaný extrakcí pokrutin a stejně tak ani nevstupuje do rafinačního procesu, jenž je pro ostatní rostlinné oleje samozřejmostí. Pro úpravu vylisovaného EVOO jsou dále povoleny pouze definované mechanické postupy, mezi něž se řadí dekantace, centrifugace a filtrace. Díky těmto přísným výrobním regulím tak může být EVOO dokonce považován za přírodní ovocnou šťávu [11–13,17,18].

Přestože máme produkci i konzumaci EVOO silně spjatou zejména se středomořskými zeměmi, jako je Španělsko, Itálie, Řecko, Portugalsko, Sýrie, Tunisko nebo Maroko, jeho výroba je poměrně dobře zakořeněna i v jihoamerických státech, z nichž je významným producentem například Peru, Chile, Brazílie nebo Argentina [19]. Pro charakteristické organoleptické vlastnosti a blahodárné účinky na lidské zdraví je však s oblibou konzumován po celém světě. Tento obrovský celosvětový zájem spotřebitelů zásadně přispěl k rozšíření pěstování a zpracování oliv i do netradičních států, jako je USA, Austrálie nebo Čína [19].

Kromě přímé konzumace se olivový olej rovněž používá jako přísada do průmyslových receptur, omáček, koření, zálivek, náplní, těstovin a různých pekařských výrobků [10]. Žluklý, použitý či přepálený olivový olej z kuchyně lze dále zužitkovat stejně jako ostatní rostlinné oleje. Ty mohou být například vstupní surovinou při výrobě ekologických pohonných hmot. Nejznámějším ekologickým palivem je bionafta, která v porovnání s běžnou naftou poskytuje větší výkon motoru a méně emisí. Pozor si však musíme dát na polymerizované triglyceridy a vysokou koncentraci volných mastných kyselin (MK) přítomných po smažení oleje. Výrazně totiž ovlivňují proces transesterifikace a následně i vlastnosti nafty [18]. Mimo potravinářský a automobilový průmysl se olivový olej hojně využívá i v průmyslu farmaceutickém a kosmetickém, a to pro výrobu hydratačních krémů, krémů na ochranu proti nebezpečnému ultrafialovému (UV) záření, krémů při léčbě strií a také produktů, které pomáhají při udržování a stabilizaci buněčných membrán [10].

1.1.2 Složení

Složení EVOO je ovlivňováno mnoha faktory, které pak následně předurčují i jeho kvalitu a sensorické (chuť, barva a aroma), nutriční, fyzikální a chemické vlastnosti. Největší vliv na složení EVOO má kultivar olivovníku a pedoklimatické podmínky jeho růstu, mezi něž spadá množství přirozené vláhy, intenzita slunce, zeměpisné souřadnice (zeměpisná šířka a délka a nadmořská výška) a v neposlední řadě také kvalita a složení půdy. Dalšími důležitými faktory jsou pak technologické aspekty pěstování olivovníků (hnojení a zavlažování) a zralost a zpracování vypěstovaných oliv [9,20–22]. Právě v průběhu zrání oliv dochází k významným změnám jejich chemického složení. Během zrání se snižuje koncentrace sterolů, terpenových uhlovodíků, oleuropeinu, tokoferolů a kyseliny olejové a palmitové. Na druhé straně roste koncentrace kyseliny linolové a celkový obsah fenolických látek, který ale v poslední fázi zrání začne opět nepatrně klesat [4,23–26].

V nejvyšším množství v oleji nalezneme triacylglyceroly (99 %), diacylglyceroly a volné MK [27], které určují kyselost oleje. Ta je udávána jako množství kyseliny olejové a nesmí v souladu s platnými předpisy překročit 1 % [17]. EVOO je znám pro své vyvážené množství nasycených, mononenasycených a polynenasycených MK [28]. Mastným kyselinám dominuje mononenasycená kyselina olejová, která tvoří až 64 %. Právě kyselina olejová je spolu s dalšími, minoritními složkami odpovědná za zdravotní benefity olivového oleje. Tyto minoritní látky zahrnují až 230 chemických sloučenin ze skupiny alifatických a di- a tri-terpenických alkoholů, uhlovodíků, vitamínů (tokoferoly, obzvláště α -tokoferoly), těkavých sloučenin, sterolů, barviv a dalších biologicky aktivních látek, mezi které řadíme i zde studované fenolické sloučeniny [8,17,29–33]. Efekt fenolických látek je navíc umocňován některými přítomnými barvivy, jako jsou žluté karotenoidy nebo zelené chlorofyly. Karotenoidy zhášejí singletní kyslík, čímž inhibují fotosenzitivní oxidaci, a fungují tak jako antioxidanty. Zvláštní chování mají chlorofyly. Zatímco za světla se chovají jako tzv. prooxidanty zvyšující oxidační stres organismu, ve tmě vykazují antioxidační aktivitu. Chlorofyly navíc patří mezi jedny z kvalitativních parametrů oleje a jsou zodpovědné za zelenou barvu oliv [27].

1.1.3 Stabilita

Rostlinné oleje podléhají relativně snadno oxidaci neboli tzv. žluknutí oleje. Tím se výrazně mění jejich výsledná chuť, vůně, nutriční hodnota a následně i cena. Oxidace je iniciována přítomností světla, kyslíku a vysokých teplot. Ke žluknutí může dojít již během

produkce oleje, avšak častěji nastává až během jeho nevhodného skladování. Oxidační proces vede k tvorbě toxických volných radikálů, z nichž nejznámější je skupina tzv. superoxidů [15,31,34]. Odpověď olejů na oxidaci závisí na jejich chemickém složení [33,35,36]. Odolnost EVOO vůči oxidaci je ve srovnání s ostatními rostlinnými oleji naprosto jedinečná. Může za to mnohonásobně vyšší množství přirozeně se vyskytujících antioxidantů, které zpomalují oxidaci lipidů a tvorbu nežádoucích těkavých sloučenin. Mezi takové antioxidanty patří například fenolické látky [22,32,34]. Pro zjištění míry oxidace oleje se dle Evropského nařízení [37] stanovují v olejích tzv. tuková čísla.

K zachování kvality oleje výrazně napomáhá správný výběr jeho obalu. Olivový olej se obvykle balí do skleněných, kovových nebo plastových obalů. Nejprve byly k balení olejů dlouho používány plechovky. Nabízely totiž úplnou ochranu proti světlu, kyslíku a vlhkosti. Aby nedocházelo ke korozi kovového povrchu, byl jejich vnitřek potažen pryskyřicemi. Dnes se však s plechovkami setkáme jen výjimečně. Byly totiž postupně vytlačeny jedním z nejvíce inertních materiálů, sklem. Pro oleje by se mělo používat sklo barevné, jež pak zaručuje stejně dobrou ochranu proti vlhkosti a oxidaci kyslíkem i světlem jako plechovka. Posledním běžně používaným obalovým materiálem pro uchování olejů je plast. Plastové obaly se však z důvodu nedostatečné ochrany oleje před vlivem kyslíku a světla nedoporučují [15].

Jelikož vysoké teploty významně podporují oxidační procesy, je také důležité vědět, jak s různými druhy olejů nakládat v kuchyni, kde jsou běžně používány na smažení, pečení, vaření či během mikrovlnného ohřevu, a to navíc v kombinaci s kyslíkem. Obecně platí, že čím je vyšší stupeň nenasycenosti oleje (obsah nenasycených MK), tím je olej citlivější na tepelnou degradaci, jako je hydrolyza, oxidace polynenasycených MK, *cis/trans* izomerace a peroxidace lipidů s následnou polymerací vzniklých peroxidačních produktů. EVOO je velmi bohatý na polynenasycené MK, a proto není vhodný pro tepelnou úpravu, obzvláště pak na smažení. Měl by se tedy používat výhradně při přípravě studených pokrmů [38].

1.1.4 Charakterizace

Určení kvality rostlinných i živočišných tuků, tedy i olivového oleje, vyžaduje nejen komplexní znalost jejich složení, ale i senzorické hodnocení a stanovení četného množství fyzikálně-chemických vlastností, které odhalují kvalitativní parametry, jako je například čerstvost oleje nebo zralost použitých surovin. Pro běžnou charakterizaci oleje a kontrolu jeho čerstvosti se stanovují již zmíněná tuková čísla, mezi něž řadíme číslo peroxidové, esterové, hydroxylové, *p*-anisidinové, thiobarbiturové a číslo kyselosti a zmýdelnění. Přesné stanovení

těchto čísel je popsáno v českých (ČSN) i mezinárodních (ISO) normách. Zralost použitých oliv pak odhaluje obsah alkyl-esterů [39–43].

Číslo kyselosti se stanovuje alkalimetry a je dáno obsahem volných MK, které vznikají hydrolytickou degradací triacylglycerolů během zpracování nebo skladování oleje, případně činností přítomných enzymů (lipázy) a mikroorganismů. Olivové oleje vyrobené ze zdravých oliv pomocí šetrných výrobních procesů povolených správnou výrobní praxí obsahují obvykle nízký obsah volných MK, a mají tak malou kyselost, respektive malé číslo kyselosti [39,40,43].

Peroxidové číslo, někdy také uváděné jako číslo jodové, nám poskytuje informaci o míře primární oxidace oleje korelující s množstvím hydroperoxidů, jež vznikají degradačními procesy z nenasycených MK. Koncentrace hydroperoxidů v oleji je kvůli jejich vysoké nestabilitě proměnná: nejprve roste a po dosažení maxima opět klesá vlivem jejich degradace na sekundární oxidační produkty [39,40,43–45]. Stanovení lze provést jodometricky [37] nebo instrumentálně s využitím elektrochemie, chromatografie či spektrálních technik jako jsou spektrofotometrie v UV a viditelné oblasti či fluorescenční, chemiluminiscenční nebo infračervená spektroskopie. Výhodou instrumentálních technik je jejich vysoká efektivita, jednoduchost, nízká spotřeba činidel, vzorku či rozpouštědel a menší časová náročnost [34,38,39,43].

Hydroperoxy MK reagují dále s jejich radikály za vzniku sekundárních oxidačních produktů, jako jsou hydroxykyseliny a oxokyseliny, které se štěpí na ketony, aldehydy a konjugované dieny. Pro stanovení všech sekundárních oxidačních produktů neexistuje univerzální metoda, proto se jednotlivé skupiny látek stanovují samostatně. Množství karbonylových sloučenin ve vzorku vyjadřuje thiobarbiturové číslo, které se stanovuje reakcí karbonylů s thiobarbiturovou kyselinou za vzniku červených fluoreskujících produktů. Přítomnost konjugovaných dienů, jež jsou důkazem velmi pokročilé žluklosti oleje, odhaluje *p*-anisidinové číslo. Principem této spektrofotometrické metody je reakce dienů s *p*-anisidinem v nevodném prostředí za vzniku žlutých produktů [43,45–47]. Konjugované dieny a trieny se mohou v olejích detekovat i pomocí specifických absorpčních koeficientů stanovitelných ztrátou některých absorpčních pásů v UV-VIS oblasti [39,48].

Esterové číslo, hydroxylové číslo a číslo zmydlnění již nevypovídají o žluklosti oleje, ale charakterizují daný acylglycerol. Číslo zmydlnění udává množství všech MK ve vzorku. Na rozdíl od čísla kyselosti tedy započítává i MK, které jsou vázané na glycerol [49]. Esterové číslo získáme odečtením čísla kyselosti od čísla zmydlnění, čímž dostaneme

množství esterově vázaných MK. Počet volných hydroxylových skupin v glycerolu vyjadřuje hydroxylové číslo, které se stanovuje stejně jako číslo zmýdelnění, avšak po acetylaci volných hydroxylů acetanhydridem. Rozdíl čísla zmýdelnění před acetylací (původního vzorku) a po acetylaci určuje číslo hydroxylové [41].

Kvalitativním znakem použitých oliv a jejich řádného zpracování je obsah alkyl-esterů MK, které vznikají esterifikací volných MK s nižšími alkoholy (metanol či etanol). Poškozené olivy podléhají snáze fermentaci a hydrolytickým procesům, proto dochází k syntéze těchto produktů ve větší míře. Zvýšený obsah esterů MK může být způsoben použitím nekvalitních oliv pro výrobu EVOO, špatným technologickým postupem (lisování oliv za zvýšené teploty), nebo smícháním EVOO s olivovými oleji nízké kvality. Stanovení obsahu esterů MK v olejích se provádí nejčastěji pomocí plynové chromatografie [39].

Senzorická analýza je stejně důležitým měřítkem kvality oleje jako fyzikálně-chemické testy. Během sensorické analýzy je hodnotiteli posuzována především hořkost, ostrost a samozřejmě chutnost oleje. Nežádoucími vjemy je pak zatuchlé, vodnaté, kyselé nebo bahnitě aroma či chuť [39].

1.1.5 Falšování

EVOO je dnes naprosto běžným zbožím na pultech obchodů po celém světě. Vzhledem k jeho poměrně vysoké prodejní ceně však patří mezi velmi často falšovanou komoditu. Za účelem vyšších zisků přidávají nepoctiví výrobci k EVOO nejen méně kvalitní olivové oleje či úplně jiné rostlinné oleje, ale neváhají dokonce použít i chemické látky či materiály, které nejsou vhodné ke konzumaci, a mohou tak vážně ohrozit zdraví spotřebitele. Žádnou výjimkou není ani kontaminace EVOO nebezpečnými patogenními mikroorganismy [10,39].

Přestože databáze o podvodech v potravinách ukazují, že se v případě EVOO jedná především o ekonomicky motivované falšování, při němž je olivový olej obvykle smíchán s levnějšími rostlinnými oleji, jakými je nejčastěji olej sójový, řepkový, kukuřičný, slunečnicový, palmový, sezamový či ořechový [11,12,29,50], poměrně často se setkáváme i s případy falšování EVOO, jež nesouvisí se správnou výrobní praxí. V tomto případě dochází k záměnám jeho zeměpisného původu, případně neoprávněným použitím ochranných známek ChZO či ChOP, jež se považují za záruku kvality, pravosti, tradice a bezpečnosti, a oleje s tímto označením mají zpravidla vyšší tržní cenu [5,9,21,39].

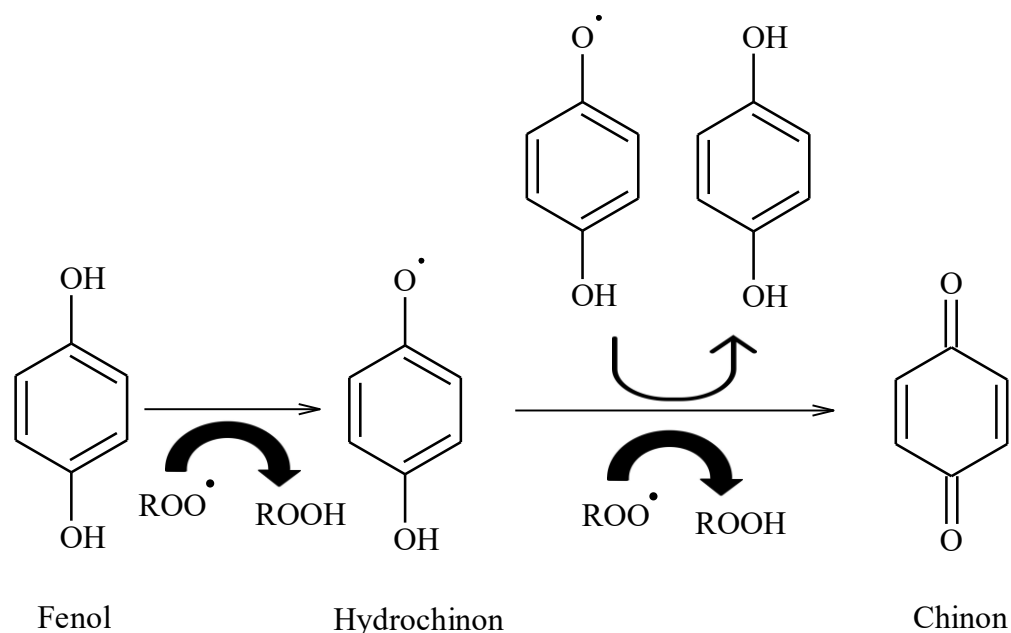
Pro posouzení celkové kvality a pravosti olivového oleje, včetně jeho diferenciaci a klasifikaci podle zeměpisného a botanického původu, byla již navržena celá řada analytických metod. Tyto metody se obvykle zaměřují na stanovení různých organických sloučenin oleje [5,39]. Prvně zkoumanou skupinou látek byly těkavé sloučeniny. Ty totiž z velké části determinují chuť a aroma produktu, a jsou tak klíčovými faktory určujícími kvalitu potravin. Některé těkavé látky pocházejí již ze surovin, jiné vznikají během výroby, zrání a skladování produktu. Změna jejich složení v potravinách se tedy zdá vhodným měřítkem pro posouzení pravosti potravin. V praxi se bohužel toto stanovení ukázalo za nedostatečné [2,5,8,11–13]. Často se proto setkáme se stanovením profilu MK a triglyceridů [51–53], případně pak dalších komponent oleje, jako jsou volné steroly, alifatické a terpenické alkoholy, fenolické sloučeniny, tokoferoly, uhlovodíky a pigmenty [8,52,53]. Analýza zmíněných organických látek probíhá zpravidla plynovou či kapalinovou chromatografií s různými typy detekce. Pro získání základních informací o oleji můžeme provést i screening jeho minerálního složení. V současné době se pro tento účel používá hmotnostní či optická emisní spektrometrie, obě ve spojení s indukčně vázanou plazmou. Analýzy těmito technikami jsou v porovnání s technikami chromatografickými velmi rychlé a jednoduché [21].

1.2 FENOLICKÉ LÁTKY

1.2.1 Základní charakteristika, dělení a vlastnosti

Fenolické sloučeniny neboli (poly)fenoly (PP) jsou jedny z nejdůležitějších rostlinných látek. Vyskytují se v listech, stoncích i kořenech a chrání rostlinu před býložravci a mikroorganismy [3,54–57]. PP hrají klíčovou roli v mnoha rostlinných procesech. Ovlivňují rostlinnou patogenezí, výsledné zbarvení rostliny, produkci kořenových nodulů, interakci s hmyzem a symbiózu rostlin. Dále se podílí na mechanismu reakce rostliny proti stresu [56] a jsou hlavními signálními látkami rostlinné reprodukce [3,55,57,58].

PP jsou dnes vědci a výživovými poradci skloňovány ve všech pádech. Důvodem je řada prokázaných zdravotních benefitů, jež je spjata s jejich pravidelnou konzumací [59,60]. Tyto biologicky aktivní látky mají antimikrobiální (antibakteriální, antivirotický, antimykotický a antiparazitický), protizánětlivé, antialergenní, antitrombotické, imunostimulační, chemopreventivní, analgetické a vasodilatační vlastnosti a snižují riziko rakoviny, neurologické degenerace, aterosklerózy, cukrovky, obezity a kardiovaskulárních a plicních onemocnění [3,32,55,56,59,61–63]. Nejvíce se však v souvislosti s PP diskutuje o jejich vysoké antioxidační aktivitě, jež tkví ve snížení hladiny či úplné eliminaci volných radikálů kyslíku nebo dusíku v lidském těle. Reakcí antioxidantu s reaktivním volným radikálem totiž vzniká nereaktivní radikál antioxidantu, čímž dochází ke snížení oxidačního stresu organismu, který je spojován s mnoha zdravotními problémy. Mechanismus antioxidační aktivity fenolů, při níž dochází k přenosu radikálu vodíku za vzniku stabilní sloučeniny, vysvětluje obrázek 1 [32]. Většina PP vykazuje největší kapacitu při blokování těch volných radikálů, které vznikají během prvního kroku oxidace, a řadí se proto mezi tzv. primární antioxidanty [22,32,34]. Volné radikály jsou mutagenní, teratogenní a karcinogenní činidla významně zvyšující riziko infarktu a trombózy. V potravinách vznikají převážně oxidací nenasycených MK. Během zpracování nebo skladování potravin pak velmi ochotně reagují s jejími ostatními složkami, což vede mimo jiné i ke zhoršení organoleptických vlastností a nutriční hodnoty potravin. PP tedy chrání potraviny a posléze i člověka proti oxidační degradaci [32]. PP mohou také ovlivňovat enzymy zapojené do vnitrobuněčné signalizace [56]. Neméně důležitou roli hrají PP také v konzervaci potravin a nápojů a v utváření jejich organoleptických vlastností [3,59,64,65]. Kvůli těmto jedinečným vlastnostem jsou PP stále hlavním tématem mnoha studií [59].



Obrázek 1 Mechanismus antioxidační aktivity fenolů [32].

Doposud bylo zaznamenáno kolem 8000 zástupců fenolických látek, které mohou být dle jejich základní struktury rozděleny nejméně na 10 tříd: jednoduché fenoly, fenolické kyseliny, kumariny, isokumariny, naftochinony, xantony, stilbeny, antrachinony, flavonoidy a lignany [3]. Za nejdůležitější třídy polyfenolů je považována skupina flavonoidů a fenolických kyselin (deriváty benzoové a skořicové kyseliny), jež dohromady čítají více než 5000 popsanych látek a představují až dvě třetiny všech fenolických látek přítomných v potravinách [3,55,58]. Flavonoidy jsou dále klasifikovány na 12 podtříd. Nejznámější a největší podtřídou je s přibližně 3000 zástupci podtřída flavonů. Za nimi jsou se 700 zástupci isoflavony. Dalšími důležitými, ne však již tak početnými skupinami jsou flavonoly, flavanony, flavanonoly, antokyany, katechiny a stilbeny [56]. Flavonoidy jsou známé svou vysokou antioxidační aktivitou, kterou vykazují hned několika různými způsoby: přímo zachytávají reaktivní formy kyslíku, inhibují enzymy odpovědné za produkci superoxidových aniontů, chelatují přechodné kovy a snižují množství alkoxylových a peroxylových radikálů, čímž předchází procesu peroxidace. Epidemiologické studie pak poukazují na jejich zvláštní význam v prevenci kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny [3,55,56].

Fenolické látky velice ochotně reagují se sacharidy za tvorby glykosidů. Část molekuly glykosidů bez cukerné složky nazýváme aglykony. V rostlinách se vyskytují obvykle O-glykosidy, méně častý je pak výskyt C-glykosidů. O-glykosidy mají cukerný substituent vázan k aglykonu přes hydroxylové skupiny v poloze 3 nebo 7. C-glykosidy mají cukerné jednotky vázané většinou k šestému nebo osmému uhlíku aglykonu. Nejběžněji

vázanými sacharidy jsou glukóza (glukosidy), ramnóza, galaktóza a arabinóza. Výjimkou není ani tvorba diglykosidů. Poměrně častá je i další substituce cukru acylovými zbytky, jako je malonát či acetát. Z výše uvedeného je tedy zřejmé, že nomenklatura fenolických látek není vždy jednoduchá, a proto se poměrně často setkáváme i s různými triviálními názvy [56,66].

1.2.2 Obecné metody stanovení fenolických látek v různých maticích

V souvislosti s PP se často setkáváme se stanovením tzv. antioxidační kapacity. Celková antioxidační kapacita se nejčastěji stanovuje pomocí různých spektrofotometrických metod. Tyto metody se dle reakčního mechanismu dělí do dvou hlavních skupin, jež do jisté míry probíhají současně, avšak na základě struktury antioxidantu a pH prostředí je vždy jedna z nich dominantní. První skupinou jsou tzv. SET metody neboli testy založené na přenosu elektronu. V tomto případě se sleduje změna barvy roztoku v důsledku redukce sloučeniny, která od antioxidantu přijme jeden elektron. Velikost změny barvy přitom koreluje s koncentrací antioxidantů ve vzorku. Do této skupiny spadá například metoda FRAP nebo stanovení pomocí radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH•). Druhou skupinou jsou pak tzv. HAT metody neboli testy založené na přenosu atomu vodíku, kdy dochází ke zhášení radikálu dodáním atomu vodíku. Z těchto metod je velmi známá například metoda ORAC nebo TRAP. Jelikož antioxidační vlastnosti nevykazují pouze PP, ale i jiné organické sloučeniny, nejsou spektrofotometrické metody přesným měřítkem obsahu fenolů ve vzorku [3,22,34,67–70].

Pokud nás zajímá kvalitativní či kvantitativní zastoupení jednotlivých fenolických sloučenin, musíme zvolit komplexnější metody. Obecný postup stanovení profilu a obsahu PP spočívá většinou v jejich extrakci z matrice vzorku, analytické separaci, identifikaci a závěrečné kvantifikaci [3,55].

Vzhledem ke komplexnosti matic potravinářských vzorků a současně k nízké koncentraci hledaných látek je před vlastní analýzou nezbytné zařadit krok izolace a obohacení analytu v předloženém vzorku. K tomuto účelu jsou vhodné různé tradiční i moderní extrakční techniky. Pozor si přitom vždy musíme dát na ztrátu některých stopových analytů [55,71,72]. Pro izolaci PP je stále nejvíce používaná extrakce kapalina-kapalina (LLE) s využitím polárních rozpouštědel, a to i přesto, že příprava vzorku touto cestou je velmi zdoluhavá a vyžaduje jistou míru zručnosti [55,59]. Další, dnes již tradiční obohacovací technikou je i extrakce na tuhé fázi (SPE). Přestože je SPE obecně považována za techniku univerzální, jednoduchou, účinnou a zároveň i jednu z nejlevnějších, pro izolaci PP je až

na druhém místě [55,59,64]. Relativně nedávno byly však pro extrakci PP navrženy i modernější techniky [54], mezi něž patří například SPE či LLE mikroextrakce, sorpční extrakce míchadlem [59], kapalinová extrakce podporovaná tlakem, mikrovlnným ohřevem či ultrazvukem, superkritické fluidní extrakce nebo extrakce disperzní tuhou fází [54,55]. Tyto inovativní postupy jsou oproti těm tradičním velmi rychlé, účinné, šetří energii, činidla i rozpouštědla a jejich optimalizace je nenáročná a mnohdy ani není nutná [72].

Po izolaci PP přichází v naprosté většině případů na řadu některá separační analytická technika, jakou je například plynová chromatografie (GC). GC byla pro analýzu PP použita již na začátku šedesátých let. První publikace zabývající se GC analýzou fenolických látek popisuje separaci derivatizovaných flavonoidů na silikonové polymerní koloně s následnou tepelně vodivostní detekcí. Přestože má GC obrovskou výhodu ve vysokém rozlišení píků a nízkých detekčních limitech [56], její zásadní nedostatek tkví v nutnosti derivatizace přirozeně netěkavých PP [55]. PP navíc obsahují více než jednu hydroxylovou skupinu, a produkují tak hned několik derivátů, s čímž následně souvisí i jejich obtížná kvantifikace. Nejčastějšími derivatizačními činidly jsou N,O-bis-(trimetylsilyl)-trifluoroacetamid a N-(*tert*-butyldimetylsilyl)-N-metyltrifluoroacetamid, které PP převádí na těkavé silyl deriváty. Separace derivátů pak probíhá na nepolární koloně s lineárním teplotním programem (nejvýše 300 °C) a dlouhými separacemi trvajících až 90 min. K detekci se v současné době využívá hmotnostní spektrometrie (MS) s elektronovou ionizací (EI), která díky rozsáhlé knihovně spekter významně usnadňuje identifikaci sloučenin [56]. V publikacích využívajících GC instrumentaci byly analyzovány především flavonoidy v rostlinách, a to za účelem určení taxonomie rostlin a specifikace jejich léčebného významu. Dalšími častými vzorky jsou potravinářské produkty, v nichž je na základě profilu a množství PP posuzována antioxidační kapacita a pravost výrobku. Poslední skupinou vzorků jsou pak tělní tekutiny lidí i zvířat, v nichž se sleduje metabolismus fenolických látek. Kvůli komplikacím spojených s nutnou derivatizací byla GC instrumentace postupně nahrazena jinými analytickými technikami [56].

Absolutně nepoužívanější separační technikou se pro stanovení PP stala vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC) [55,56,71], při nichž je mobilní fáze (MF) polárnějšího charakteru než fáze stacionární (SF). Pro separaci PP jsou používány převážně kolony plněné chemicky vázaným silikagelem, nejčastěji oktadecyl-silikagelem (C18) nebo oktyl-silikagelem (C8). Dále se s úspěchem využívají pentafluorfenylové, fenylhexylové či amidové stacionární fáze. Pokud potřebujeme pracovat při nízkých zpětných tlacích či při vysokých průtocích, lze s výhodou využít i dnes

velmi populární monolitické kolony [55]. Z důvodu poměrně vysoké tepelné labilitě PP není vhodné kolony vyhřívat na vysoké teploty. Během analýz se tedy udržuje teplota kolem 30 °C [38,64,73–75]. Protože je obvykle PP frakce v analyzovaných vzorcích velmi komplexní, je k separaci využívána gradientová eluce mobilních fází obsahujících vždy vodnou složku a polární organické rozpouštědlo, kterým je tradičně acetonitril nebo metanol. Vodná složka či obě složky MF jsou zpravidla okyselovány organickými (kyselina mravenčí či octová) nebo anorganickými kyselinami (kyselina fosforečná) [3,55,56,64,75]. Jelikož PP ve své struktuře přirozeně obsahují chromofor a někteří zástupci dokonce i fluorofor, jejich nejběžnějším detekčním systémem je spektrofotometrický [71] či fluorescenční detektor [55]. Standardně se dnes používá i citlivá MS detekce, která zároveň poskytuje strukturální informace o eluovaných sloučeninách. Citlivost a selektivita MS instrumentace může být navíc zvýšena použitím tandemové MS [55]. Velmi vhodnou metodou analýzy PP je rovněž HPLC spojená s coulometrickou detekcí s elektrodovým polem. Poskytuje totiž vysokou selektivitu a citlivost (je mnohem citlivější než spektrofotometrická detekce) a vzorek není nutné extrahovat, čistit nebo zakoncentrovávat. Tato metoda byla již úspěšně aplikována pro stanovení PP v přírodních nápojích, rostlinných výtažcích, džusech, pivu a vínu [75].

Nedávno bylo dosaženo zlepšení účinnosti chromatografického stanovení zavedením ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). UHPLC pro separace využívá velkou průtokovou rychlost v kombinaci s kolonami plněnými velmi malými částicemi (1,8 µm) pravidelného tvaru. Jelikož se pracuje při vysokých zpětných tlacích, jsou u této techniky kladeny vysoké nároky na kvalitu a stabilitu čerpadel. Hlavními výhodami UHPLC jsou oproti konvenční HPLC významně kratší retenční časy, lepší rozlišení a vyšší citlivost. Spojení UHPLC-MS je dnes rovněž rutinní technikou [55,76–78].

Kapilární elektroforéza (CE) představuje doplňkovou a dalo by se říct i alternativní analytickou separační techniku stanovení některých PP. Použití CE s sebou přináší mnoho benefitů, mezi něž patří zejména vysoká rychlost, účinnost a rozlišení, nízké náklady a extrémně malé množství potřebného separačního pufru a analyzovaného vzorku [3,54,59]. Pomocí CE lze však separovat pouze nabitě analyty. Z fenolických látek proto může být CE aplikována pouze na fenolické kyseliny, které jsou v mírně alkalickém pH disociovány [55,56]. Standardním detekčním systémem je spektrofotometrický detektor [55,59]. Díky hydroxylovým skupinám fenolů, které jsou při mírném oxidačním potenciálu elektroaktivní, se však může použít i velice citlivá, selektivní a přesná elektrochemická detekce. Výjimkou dnes není ani MS detekce [55]. CE je oproti kapalinové chromatografii mnohem více závislá

na matici vzorku, nemá příliš příznivou opakovatelnost a poskytuje až 10x horší meze stanovitelnosti. Významného HPLC konkurenta z ní však dělá až 5× kratší doba analýzy [56].

Pro stanovení PP je dále vhodná i technika micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) [55]. MEKC je hybridní technika kombinující principy RP-HPLC a CE, což vede k možnosti separace neutrálních i elektricky nabitých látek v jedné analýze. MEKC je totiž založena na hydrofobicitě, díky níž dochází k rozdělování analytu nejen mezi elektricky nahanou MF (elektrolytem) a na koloně ukotvenou SF, ale do fázových rovnováh vstupuje i tzv. pseudostacionární micelární fáze. Micely mohou s opačně nabitými analyty tvořit elektroneutrální iontové asociáty, které jsou spolu s ostatními neutrálními látkami unášeny elektroosmotickým tokem (EOF) k detektoru. Eluce analytů je závislá na jejich afinitě k vodné MF, micelární pseudostacionární fázi a tenzidem pokryté SF [56]. Jako separační médium se zde často používá kombinace borátového pufru o vysokém pH a micel tenzidu dodecyl síranu sodného [3]. MEKC vykazuje natolik dobrou selektivitu, že poskytuje dokonce lepší separace než CE [55,56]. Porovnááme-li MEKC s HPLC, je kvalita dosažených dat shodná, avšak v případě MEKC jsou dané výsledky získané v polovičním čase. Zásadní nevýhodou MEKC je její náročnější optimalizace [56].

V odvětví PP byla aplikována i další hybridní technika spojující výhody a principy CE a HPLC. Touto technikou je poměrně málo diskutovaná kapilární elektrochromatografie (CEC) [55]. CEC separace probíhají obvykle na klasické nepolární koloně pomocí běžně užívaných MF. Hlavním rozdílem mezi CEC a HPLC je způsob čerpání mobilní fáze kolonou. CEC totiž využívá EOF. Detekce PP je pak standardně pomocí UV-VIS spektroskopie [56]. Nedostatkem CEC je však dlouhá doba potřebná pro ustálení základní linie [55]. Samotné analýzy jsou oproti LC mírně kratší a pořadí eluovaných látek je přesně opačné [56].

Zajímavé je i stanovení PP technikami infračervené spektroskopie. Pro tyto účely se využívá blízká infračervená (NIR), případně střední infračervená (MIR) oblast spektra, ale výjimkou není i použití složitější instrumentace, jako je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) kombinovaná s technikou zeslabeného úplného odrazu (FTIR-ATR) či Ramanova spektroskopie. Tyto metody jsou všestranné, jednoduché a rychlé a jsou používány pro identifikaci i kvantifikaci významných sloučenin v potravinářských výrobcích, zejména ve vzorcích masa, ryb, piva, ovocných šťáv a nyní také olivového oleje [4,10].

1.2.3 Fenolické látky olivového oleje a jejich stanovení

Přestože jsou PP pouze minoritními složkami EVOO, hrají důležitou roli v jeho organoleptických vlastnostech. Dávají olejům jejich typickou vůni a chuť, obzvláště pak ostrost, hořkost a štiplavost [36]. Dle již dokončených studií je navíc naprosto zřejmý příznivý vliv PP olivového oleje na lidské zdraví. Tyto biologicky aktivní látky jsou dnes proto důkladně zkoumány s cílem stanovit jasný vztah mezi jejich příjmem a rizikem výskytu mnoha více či méně závažných onemocnění [32,79–81].

Ačkoli se během výrobního procesu dostanou z oliv do oleje pouze 2 % PP, jeho extrakcí polárními rozpouštědly získáme fenolickou frakci, která běžně obsahuje více než 36 strukturně odlišných fenolických sloučenin zahrnujících fenolické kyseliny a alkoholy, secoiridoidy, flavonoidy, lignany a aldehydy. Celkové množství PP přítomných v EVOO se pak obvykle pohybuje v rozsahu 50–1500 mg/kg. Ze všech fenolických látek se v EVOO nachází v naprosto nejvyšším množství secoiridoidy. Majoritními a zároveň nejznámějšími secoiridoidy olivového oleje jsou deriváty a izomery oleuropeinu a ligstrosidu, což jsou dialdehydické formy kyseliny elenolové spojené s fenolickými alkoholy hydroxytyrosolem či tyrosolem. Z fenolických kyselin může být detekována kyselina *p*- a *o*-kumarová, vanilová, kávová, syringová, sinapová, *p*-hydroxybenzoová či protokatechová. Mezi lignany oleje patří 1-acetoxypinoresinol či 1-pinoresinol. Z flavonoidů je v EVOO zastoupen luteolin a apigenin. Vanilin je pak téměř jediným zástupcem ze skupiny aldehydů, jež se v EVOO může objevit [9,32,34,72,79,82–84].

PP s vyšším počtem hydroxylových skupin jsou extrémně silnými antioxidanty, poněvadž jsou při reakci s volnými radikály schopné tvořit intramolekulární vodíkové vazby. Vazba fenyl-OH je navíc oslabována elektron-donorovým substituentem, což také stabilizuje fenoxyl-radikál. Právě z těchto důvodů jsou secoiridoidy či fenolické alkoholy (hydroxytyrosol a tyrosol) bezesporu nejsilnějšími antioxidanty olivového oleje [32]. Zvláštní pozornost ze všech přítomných fenolických sloučenin přitahuje hydroxytyrosol, jehož silná antioxidační kapacita je přisuzována hlavně orto-difenolové struktuře. Hydroxytyrosol je specifický také tím, že může být syntetizován endogenně v lidském těle. Je totiž produktem oxidativního metabolismu dopaminu [35]. Olivový olej se relativně nedávno dostal do povědomí globálně významných orgánů, jako je Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) nebo Evropské komise, coby důležitý zdroj právě hydroxytyrosolu a jeho derivátů (tyrosolu a forem oleuropeinu), jež chrání lipoproteinové částice cholesterolu s nízkou hustotou (LDL) před oxidačním poškozením [85]. Evropská komise tuto hypotézu oficiálně potvrdila

v květnu roku 2012, když prohlásila: “Polyfenoly z olivového oleje přispívají k ochraně krevních lipidů před oxidativním stresem“. Toto tvrzení je platné pro všechny EVOO obsahující nejméně 5 mg hydroxytyrosolu a jeho derivátů ve 20 g oleje [86]. Množství fenolických alkoholů je přitom nejnižší u čerstvě vylisovaných olejů. V důsledku hydrolýzy secoiridoidů během skladování oleje pak dochází k nárůstu koncentrace těchto látek [32].

Je známo, že obsah a složení PP v EVOO je ovlivňováno mnoha faktory, jako je botanický (kultivar olivovníku) a geografický (zeměpisná šířka a výška) původ oliv, jejich stupeň zralosti, zemědělské technologické postupy (zalévání, hnojení, druh a kvalita půdy), podnebí včetně klimatických podmínek během růstu a v neposlední řadě také celý proces zpracování, výroby a uchování oleje [19,32,34,87–91]. Zatímco celkový obsah PP poskytuje informace o kvalitě oleje, fenolický profil je užitečný pro monitorování dodržení technologického postupu a charakterizace EVOO. Díky této unikátní formě tzv. fingerprintu (otisku prstu) tak můžeme rozlišit pravost olejů, s čímž souvisí i odhalení jejich zeměpisného či botanického původu [89,92,93]. Právě z výše uvedených důvodů je velký zájem o vyvinutí univerzální, citlivé, rychlé a pro životní prostředí šetrné metody absolutní kvantifikace těchto biologicky aktivních sloučenin v komerčně dostupných olivových olejích [9,94].

Pro stanovení PP olivového oleje je nejvýznamnější technikou RP-(U)HPLC na nepolárních C18 kolonách s následnou spektrofotometrickou, fluorescenční nebo elektrochemickou detekcí, či ve spojení s hmotnostní nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií. HPLC stanovení PP je však poměrně zdoluhavý proces. Separace PP totiž trvá 30–90 min a experiment navíc zásadně prodlužuje nezbytný a zpravidla časově náročný krok přečištění a zakoncentrování PP pomocí LLE (mikro)extrakce nebo SPE extrakce na C18 kolonkách [9,29,78,84,90,95,96]. Kvalitativní a kvantitativní stanovení pak komplikuje především obrovské množství izomerních forem secoiridoidů, a dále také velmi častá koeluce a rozšiřování píků [96].

Kapilární elektroforéza by se mohla zdát vhodnou alternativou, protože obecně poskytuje vysokou separační účinnost a krátké separační časy. Bohužel nejdůležitější polyfenoly olivového oleje (secoiridoidy) nebylo možné touto metodou analyzovat a již publikované poznatky jsou navíc neúplné [20,28,58,83].

Spektrofotometrické metody jsou sice jednoduché a levné, nicméně tyto metody neposkytují žádné kvalitativní informace o PP ve vzorku. Často jsou však používány pro rychlé stanovení různých antioxidačních kapacit nebo celkového obsahu fenolických látek v EVOO [78,95].

Identifikace i kvantifikace fenolů olivových olejů je samozřejmě možná i pomocí dalších technik, jako je plynová chromatografie, nukleární magnetická rezonance (NMR) nebo IR spektroskopie, avšak studií zabývajících se těmito metodami není mnoho [11,89,93,97–99]. Přitom například NMR spektroskopie je dnes považována za jeden z důležitých nástrojů ke zjištění hlavního chemického profilu jakékoli komplexní matrice. Navzdory nižší citlivosti, kterou je možné razantně zvýšit pečlivou optimalizací, umožňuje tato technika detekovat a kvantifikovat analyty ve vzorcích bez jejich zdlouhavých chemických úprav nebo předchozích separací [100]. Obzvláště dobré výsledky pak NMR poskytuje v případě kapalných vzorků [101], mezi něž spadají právě i rostlinné oleje [102–104]. Kvůli současnému pozoruhodnému zájmu o stanovení fenolických látek v EVOO bylo nedávno publikováno několik studií, v nichž byly oleje analyzovány právě NMR technikou bez jejich předchozí úpravy a detekovaným fenolickým látkám byly přiřazeny specifické rezonance [105–108].

Analytické techniky vytvářejí obecně velké datové sady, které vyžadují použití pokročilých chemometrických metod pro získání maximálního množství užitečných informací. S výhodou se používá lineární diskriminační analýza, analýza hlavních komponent, faktorová analýza, diskriminační analýza s metodou částečných nejmenších čtverců (PLS-DA) nebo klasifikační metoda SIMCA (Soft Independent Modelling by Class Analogy), která kombinuje lineární regresní analýzu s analýzou hlavní komponenty. Nové algoritmy, jako jsou umělé neuronové sítě a podpůrné vektorové stroje nebo tzv. náhodný les, navíc prokázaly v posledních deseti letech vynikající výsledky při analýze komplexních datových souborů v mnoha oblastech výzkumu, včetně potravinářského [21].

1.3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1.3.1 Přístroje a příslušenství

Pro analýzu fenolických látek byl použit kapalinový chromatograf složený z degaseru DGU-20 A₃R, čerpadel LC-20AD, detektoru s diodovým polem SPD-M20A (DAD) a hmotnostním detektorem LCMS-2020 (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko). MS detektor byl vybaven elektrosprejovou ionizací (ESI) a jednoduchým kvadrupolovým analyzátozem. Bylo použito manuální dávkování s vnější dávkovací smyčkou o objemu 5 μ l (model 7725 Rheodyne, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Separace byly provedeny na analytických kolonách Ascentis Express C18: 15 cm \times 4,6 mm \times 2,7 μ m, Ascentis Express F5: 15 cm \times 4,6 mm \times 2,7 μ m a Ascentis Express C18: 15 cm \times 3 mm \times 2,0 μ m (všechny kolony Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Při LLE extrakci fenolů z EVOO byla pro efektivní oddělení fází použita centrifuga ICB (model 4222, ICB collection, Itálie) pracující při 4000 otáčkách za minutu.

Pro odpaření extraktu byla využívána odparka EZ-2 (Genevac Ltd, Ipswich, Anglie).

Všechny vzorky připravené k nástřiku byly před vlastní HPLC analýzou přefiltrovány přes 0,45 μ m stříkačkové nylonové filtry (Agilent, Santa Clara, USA).

1.3.2 Použité chemikálie

Použité standardy fenolických látek

Apigenin, ≥ 99 %	Extrasynthese, Genay, Francie
Ethylgalát, ≥ 96 %	Sigma-Aldrich
Hydroxytyrosol, ≥ 90 %	Extrasynthese
Kyselina ferulová, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Kyselina gallová, $> 97,5$ %	Sigma-Aldrich
Kyselina kávová, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Luteolin, ≥ 97 %	Sigma-Aldrich
Oleuropein, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Tyrosol, ≥ 95 %	Extrasynthese

Ostatní chemikálie

HCOOH, 99%	Sigma-Aldrich
Metanol, p.a.	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Hexan, 99%	Sigma-Aldrich
Acetonitril, p.a.	Sigma-Aldrich

Redestilovaná voda (18 MΩ/cm) byla získána pomocí systému Milli-Q SP Reagent Water System (Millipore, Bedford, MA, USA)

1.3.3 Analýza fenolických látek v italských EVOO

1.3.3.1 Analyzované vzorky EVOO

Pomocí RP-HPLC-DAD/MS bylo analyzováno 68 italských EVOO. Vzorky byly získány přímo od výrobců z 9 italských regionů: 18 vzorků pocházelo z Apulie, 10 vzorků ze Sicílie, 14 vzorků z Lazia, 15 vzorků z Toskánska, 2 vzorky z Umbrie, 4 vzorky z tzv. Gardy (Lombardie, Benátsko a Tridentsko-Horní Adiže), 2 vzorky z Kalábrie, 2 vzorky z Ligurie a 1 vzorek z Kampánie. Některé vzorky EVOO se pyšnily chráněným označením (ChOP nebo ChZO) či certifikátem ekologického zemědělství (BIO), jiné byly směsí různých druhů oliv (tzv. blend oleje). Informace o číslování vzorků a jejich geografickém a botanickém původu jsou uvedeny v tabulce 1. Všechny EVOO byly ze sklizně roku 2017. Informace o podmínkách růstu olivovníků, sběru a zralosti oliv a technologickém zpracování oleje nejsou známy. Všechny vzorky byly uchovávány ve tmě při laboratorní teplotě a byly zpracovány ihned po jejich otevření [84,109].

1.3.3.2 Příprava standardů fenolických látek

Kalibrační roztoky hydroxytyrosolu, tyrosolu, kyseliny kávové, ferulové, gallové, apigeninu, luteolinu a oleuropeinu byly připraveny z jejich standardních zásobních roztoků o koncentraci 1 g/l v metanolu. Kalibrační rozsah byl 0,1–100 mg/kg a každý kalibrační roztok obsahoval 50 mg/kg ethylgalátu jako vnitřního standardu (IS) [84].

Tabulka 1 Seznam EVOO vzorků včetně informací o jejich botanickém a zeměpisném původu.

Poznámky: B.-A.-T. = Barletta-Andria-Trani, BIO = produkt byl připraven za podmínek ekologického zemědělství, ChOP = chráněného označení původu, ChZO = chráněné zeměpisné označení, NS = nespecifikováno, P/V = pobřeží (P)/vnitrozemí (V), ZP = zeměpisné poloha (S = sever, J = jih, Sc = Sicílie).

Vzorek číslo	Město	Region	ZP	P/V	Druh oliv, Označení kvality
1	Trapani	Sicílie	Sc	P	100 % <i>Nocellara del Belice</i> , ChOP, Valle del Belice
2	Trapani	Sicílie	Sc	P	100 % <i>Nocellara del Belice</i> , ChOP, Valle del Belice
3	Ragusa	Sicílie	Sc	P	100 % <i>Tonda Iblea</i>
4	Trapani	Sicílie	Sc	P	<i>Cerasuola-Nocellara del Belice</i> , BIO
5	Trapani	Sicílie	Sc	P	100 % <i>Nocellara del Belice</i> , ChOP, Valle del Belice
6	Trapani	Sicílie	Sc	P	ChOP, Val di Mazara
7	Palermo	Sicílie	Sc	P	<i>Biancolilla-Nocellara del Belice</i> , ChOP, Val di Mazara
8	Syrakusy	Sicílie	Sc	P	100 % <i>Tonda Iblea</i> , ChOP
9	Trapani	Sicílie	Sc	P	100 % <i>Nocellara del Belice</i> , ChOP, Valle del Belice
10	Ragusa	Sicílie	Sc	P	100 % <i>Tonda Iblea</i>
11	Benevento	Kampánie	S	V	100 % <i>Ortice</i>
12	B.-A.-T.	Apulie	J	P	100 % <i>Frantoio</i>
13	B.-A.-T.	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i> , ChOP, Terra di Bari
14	Bari	Apulie	J	P	NS
15	Bari	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i> , ChOP, Terra di Bari
16	Bari	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i>
17	B.-A.-T.	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i>
18	Bari	Apulie	J	P	100 % <i>Ogliarola</i>
19	Bari	Apulie	J	P	ChOP, Terra di Bari

Vzorek číslo	Město	Region	ZP	P/V	Druh oliv, Označení kvality
20	Bari	Apulie	J	P	ChOP, Terra di Bari
21	Bari	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i> , ChOP, Castel del Monte
22	B.-A.-T.	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i> , ChOP, Castel del Monte
23	Bari	Apulie	J	P	ChOP, Terra di Bari
24	B.-A.-T.	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i> , ChOP, Castel del Monte
25	B.-A.-T.	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i> , ChOP, Castel del Monte
26	Bari	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i> , ChOP, Castel del Monte
27	B.-A.-T.	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i> , ChOP, Castel del Monte
28	Bari	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i>
29	Bari	Apulie	J	P	100 % <i>Coratina</i> , Castel del Monte, ChOP
30	Catanzaro	Kalábrie	J	P	100 % <i>Carolea</i> , ChOP, Lametia
31	Catanzaro	Kalábrie	J	P	100 % <i>Carolea-Lametia</i> , ChOP, Lametia
32	Terni	Umbrie	S	V	ChOP, Umbria, Colli Orvietani
33	Perugia	Umbrie	S	V	BIO
34	Latina	Lazio	S	P	NS
35	Viterbo	Lazio	S	V	100 % <i>Leccino</i>
36	Viterbo	Lazio	S	V	BIO
37	Viterbo	Lazio	S	V	NS
38	Viterbo	Lazio	S	V	ChOP, Tuscia
39	Řím	Lazio	S	P	<i>Leccino-Carboncella</i> , ChOP, Sabina

Vzorek číslo	Město	Region	ZP	P/V	Druh oliv, Označení kvality
40	Řím	Lazio	S	P	<i>Leccino-Carboncella</i> , ChOP, Sabina
41	Řím	Lazio	S	P	<i>Leccino-Carboncella</i> , ChOP, Sabina
42	Řím	Lazio	S	P	ChOP, Sabina
43	Rieti	Lazio	S	V	<i>Raja-Carboncella</i> , ChOP, Sabina
44	Rieti	Lazio	S	V	<i>Leccino-Frantoio</i> , ChOP, Sabina
45	Řím	Lazio	S	P	<i>Carboncella-Leccino-Salviana</i> , ChOP, Sabina
46	Řím	Lazio	S	P	<i>Leccino-Frantoio</i> , ChOP, Sabina
47	Viterbo	Lazio	S	V	100 % <i>Leccino</i>
48	Livorno	Toskánsko	S	P	<i>Frantoio-Moraiolo-Maurino-Picholine</i>
49	Florence	Toskánsko	S	V	BIO, ChZO, Toscano, Colline di Firenze
50	Florence	Toskánsko	S	V	BIO
51	Florence	Toskánsko	S	V	ChZO, Toscano
52	Florence	Toskánsko	S	V	<i>Moraiolo</i> , ChZO, Toscano
53	Florence	Toskánsko	S	V	ChOP, Chianti Classico
54	Grosseto	Toskánsko	S	P	100 % <i>Olivastra Seggianese</i> , ChOP, Seggiano
55	NS	Toskánsko	S	V	ChZO, Toscano
56	NS	Toskánsko	S	V	ChZO, Toscano
57	Florence	Toskánsko	S	V	BIO, ChZO, Toscano, Colline di Firenze
58	Florence	Toskánsko	S	V	<i>Moraiolo-Frantoio-Leccino-Americano</i> , BIO, ChOP, Toscano
59	Florence	Toskánsko	S	V	40 % <i>Frantonio</i> -30 % <i>Moraiolo</i> -30 % <i>Leccino</i> , ChZO, Toscano
60	Florence	Toskánsko	S	V	<i>Moraiolo</i> , ChZO, Toscano

Vzorek číslo	Město	Region	ZP	P/V	Druh oliv, Označení kvality
61	Florencie	Toskánsko	S	V	ChOP, Chianti Classico
62	Grosseto	Toskánsko	S	P	100% <i>Olivastra Seggianese</i> , ChOP, Seggiano
63	Janov	Ligurie	S	P	<i>Lavagnina</i> , ChOP, Riviera Ligure
64	Imperia	Ligurie	S	P	<i>Taggiasca</i> , ChOP, Riviera Ligure
65	Trento	Garda (Tridentsko-Horní Adiže)	S	V	<i>Casaliva-Leccino</i> , ChOP, Garda Trentino
66	Verona	Garda (Benátsko)	S	V	<i>Casaliva-Leccino</i> , ChOP, Garda Orientale
67	Verona	Garda (Benátsko)	S	V	<i>Casaliva-Leccino</i> , ChOP, Garda Orientale
68	Brescia	Garda (Lombardie)	S	V	100% <i>Leccino</i> , ChOP, Garda Bresciano

1.3.3.3 Extrakce fenolických látek z EVOO

Fenolické sloučeniny byly z EVOO extrahovány nepatrně modifikovaným postupem dle Ricciutelliho [110]. V 1 ml *n*-hexanu byl rozpuštěn 1,0 g olivového oleje a následně byl přidán 1 ml směsi metanol/voda (3:2; v:v). Po důkladném promíchání a centrifugaci po dobu 5 minut při 4000 rpm byla dolní polární fáze odebrána. Tento proces byl opakován 3×. Ke spojené polární fázi byl přidán 1 ml *n*-hexanu pro odstranění zbytků oleje. Po centrifugaci byla znovu oddělena polární fáze s vyextrahovanými PP. Po přidání vnitřního standardu byl extrakt odpařen do sucha a odparek byl pro RP-HPLC-DAD/MS analýzu rozpuštěn v 0,5 ml metanolu a přefiltrován přes 0,45 μm nylonový filtr. Extrakce byla u všech vzorků provedena třikrát a každý extrakt byl poté třikrát analyzován (n = 9 pro každý vzorek) [84].

Účinnost LLE extrakce byla zjištěna za použití vzorku zelného oleje [110]. Zelný olej byl předtím analyzován pro potvrzení, že neobsahuje stejné polyfenoly jako EVOO [111]. Postup extrakce byl proveden po přidání známého množství kyseliny gallové, kávové, ferulové, luteolinu, oleuropeinu, apigeninu, tyrosolu a hydroxytyrosolu do 10 g vzorku. Jeden

gram tohoto obohaceného oleje byl následně extrahován výše uvedeným postupem, včetně přídavku vnitřního standardu [84].

1.3.3.4 Podmínky chromatografické separace a detekce fenolických látek

Separace byla provedena na analytické koloně Ascentis Express C18 (15 cm × 4,6 mm × 2,7 μm). Mobilní fáze byla složená z 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě (A) a 0,1% kyseliny mravenčí v acetonitrilu (B). K separaci byla využita gradientová eluce s následujícím programem: 0 min – 10 % B; 4 min – 35 % B; 12 min – 47 % B; 12,5 min – 60 % B; 16 min – 75 % B; 21 min – 100 % B. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, teplota kolony 25 °C a dávkovaný objem 5 μl.

Detektor s diodovým polem byl nastaven na sledování vlnové délky při 280 nm. Hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem pracoval za následujících podmínek: snímání záporných iontů v rozsahu m/z 100–800, teplota odpařování 300 °C, průtok rozprašovacího plynu (dusík) 1,5 l/min, průtok sušícího plynu (dusík) 5 l/min a teplota 350 °C [84].

1.3.3.5 Podmínky NMR analýzy fenolických látek v EVOO

NMR analýza neproběhla u všech vzorků EVOO z důvodu vážné poruchy přístroje. K porovnání výsledků RP-HPLC-DAD/MS a NMR spektroskopie bylo proto použito pouze 32 vzorků. Vzorky byly analyzovány při konstantní teplotě 298 K na 500 MHz NMR spektrometru Agilent ProPulse vybaveném gradientní sondou One NMR. Spektra byla měřena s rozlišením lepším než 1,5 Hz (vztaženo k signálu referenčního standardu tetrametylsilanu). Detailní parametry jednotlivých NMR experimentů jsou uvedeny v příslušné literatuře [84,100,112]. Všechna NMR spektra byla zpracována (fázování, integrace, kalibrace) pomocí počítačových programů ACD/Labs NMR 2012, MestreNova 6.6.2 a TopSpin 3.7.

Vzorky oleje byly před NMR analýzou rozpuštěny v deuterovaném chloroformu (CDCl₃) se stopami tetrametylsilanu. Dle literatury [113] je nezbytné udržovat přesný poměr oleje k CDCl₃, který v našem případě odpovídal množstvím 122 μl oleje a 478 μl CDCl₃. Zkumavky s touto směsí byly okamžitě utěsněny, aby se zabránilo odpařování rozpouštědla, které by mohlo ovlivnit chemický posun mnoha signálů.

NMR analýza nebyla předmětem této práce, a nebyla tedy provedena autorkou. Stanovení PP pomocí NMR bylo provedeno v rámci spolupráce během Erasmus pobytu

na Univerzitě v Messině (Sicílie, Itálie). Podrobnější informace o optimalizaci NMR analýzy a podmínkách a výsledcích měření jsou popsány ve společném článku [84].

1.3.3.6 Statistická analýza fenolických látek nalezených v EVOO

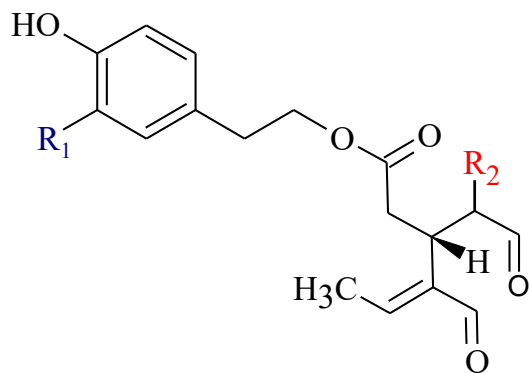
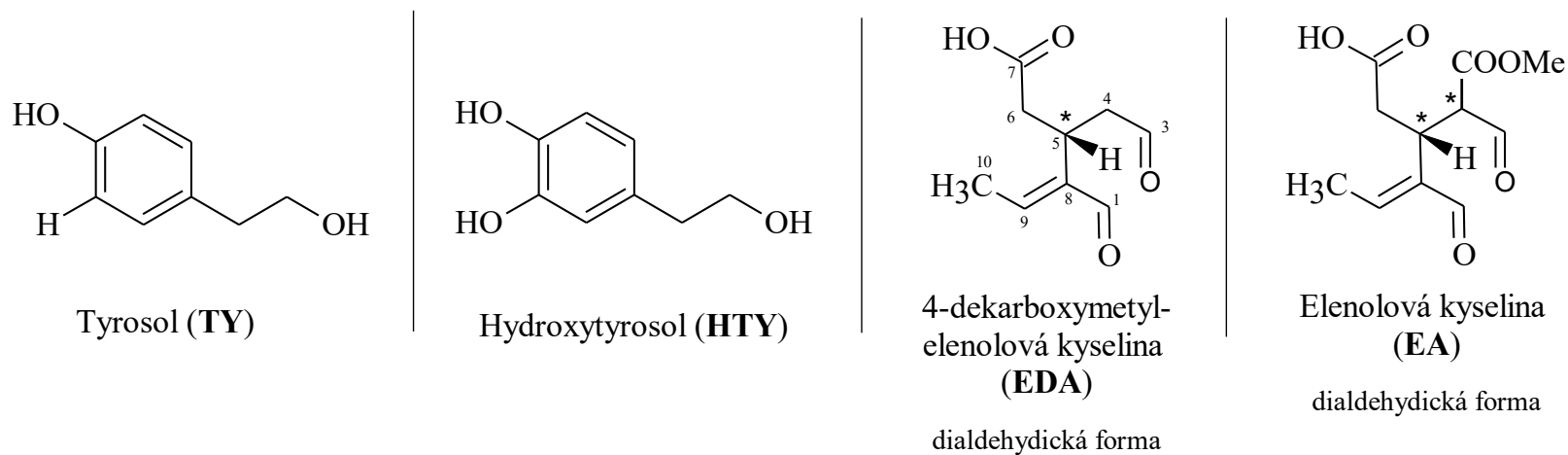
Získaná data byla podrobena statistické analýze pomocí jednorozměrných i vícerozměrných statistických metod. Pro stanovení statistické významnosti jednotlivých proměnných byla využita analýza rozptylu (ANOVA) v programu QC Expert 2.5 (Trilobyte, ČR). Pro zjištění vztahu mezi množstvím fenolických látek a kvalitou olivového oleje byly použity tři vícerozměrné statistické metody: faktorová analýza (FA), analýza hlavních komponent (PCA) a lineární diskriminační analýza (DA). Pro vícerozměrnou analýzu dat byl využit program Statistica 12 (StatSoft, Inc.; Tulsa, OK, USA). FA a PCA poskytují informace o vzájemném vztahu objektů. Objekty umístěné blízko sebe jsou si podobné, a naopak objekty od sebe vzdálené jsou si nepodobné. Třetí kategorií jsou tzv. outliery, což jsou objekty významně odlehle od ostatních objektů. Rozdíl v těchto metodách je, že zatímco u FA je důraz kladen na transformaci pozorovaných proměnných ze základních faktorů, u PCA je důraz kladen na transformaci hlavních složek z pozorovaných proměnných. Další z použitých statistických technik byla DA, která na základě známé grupovací proměnné klasifikuje objekty do skupin [109,114]. V této studii byl sledován vliv zeměpisného původu oleje na obsah a profil fenolických látek.

1.4 VÝSLEDKY A DISKUSE

1.4.1 Izomerace fenolických látek olivového oleje

Nejdůležitější skupinou fenolických látek v olivových olejích jsou secoiridoidy. Mezi nejběžnější zástupce secoiridoidů v EVOO patří oleuropein (HTY-EA) a ligstrosid (TY-EA), včetně jejich dekarboxymetylovaných analogů oleaceinu (HTY-EDA) a oleokantalu (TY-EDA). Molekula zmíněných čtyř sloučenin se skládá z tyrosolu (TY) nebo hydroxytyrosolu (HTY) a kyseliny elenolové (EA), případně její dekarboxymetylované formy (EDA). Chemické struktury těchto sloučenin jsou přehledně znázorněny na obrázku 2.

Secoiridoidy podléhají velmi často mnoha různým strukturním přeskupením a degradačním procesům vedoucím k tvorbě velkého množství jejich analogů a izomerů [89,94]. Hlavní degradační, přesmykové a izomerní reakce jsou spolu s produkty a jejich kódovými znaky znázorněny na obrázku 3. Jak je z obrázků 2 a 3 patrné, každá chemická forma jednotlivého secoiridoidu může mít díky četným chirálním centřům mnoho dalších izomerů. Simultánní detekce a kvantifikace i jen některých analogů secoiridoidů je pro jejich vzájemné dynamické propojení velkou výzvou. Tato problematika je pak ještě komplikovanější použitím polárních a protických rozpouštědel, protože jakákoli aldehydická skupina může být jednoduše transformována do acetalové, poloacetalové či hydratované formy.



Dialdehydické formy fenolických látek olivového oleje

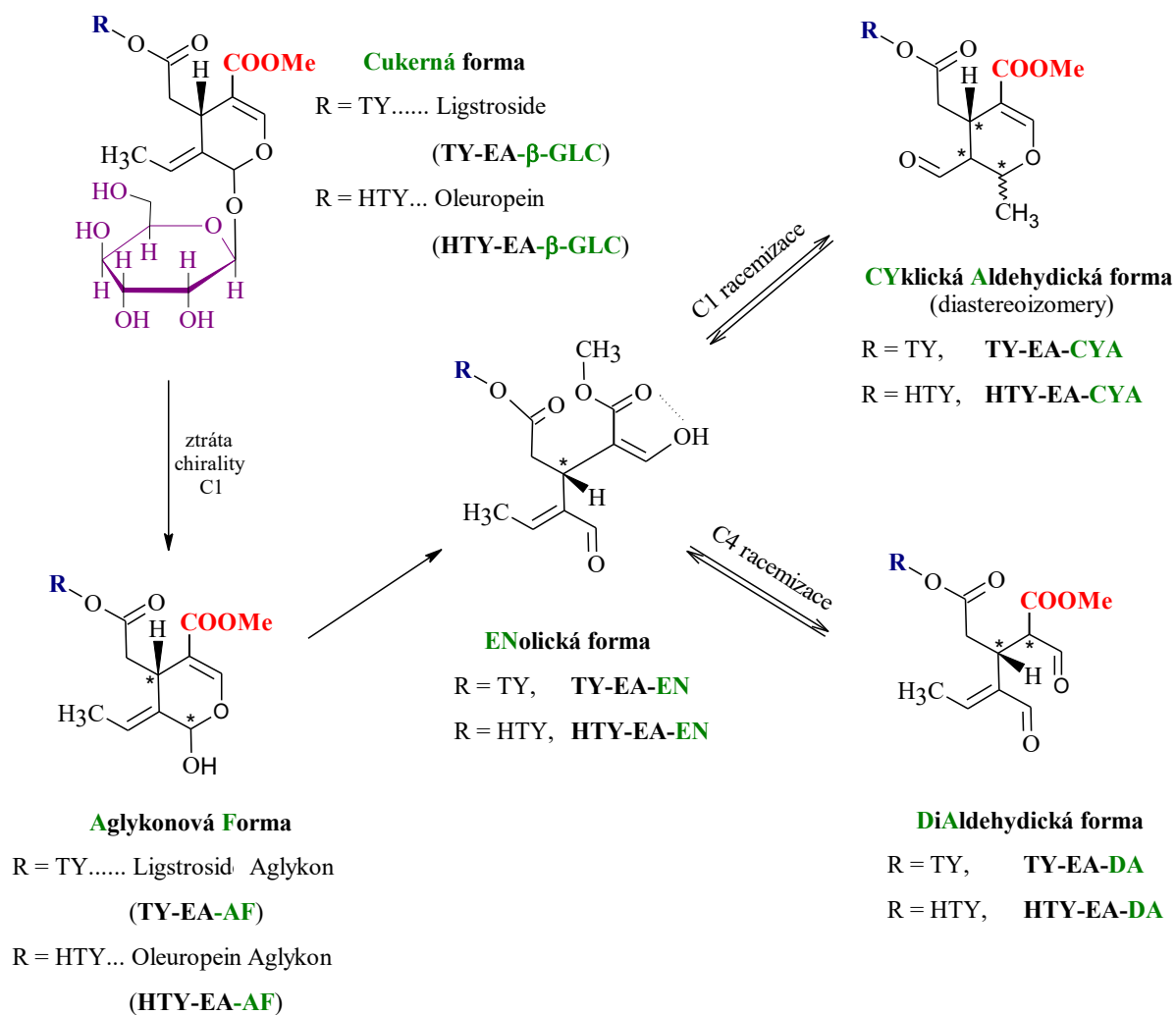
$R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{COOMe}$ Oleuropein aglykon (**HTY-EA**)

$R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{COOMe}$ Ligstrosid aglykon (**TY-EA**)

$R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$ Oleacein (**HTY-EDA**)

$R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$ Oleokantal (**TY-EDA**)

Obrázek 2 Chemické struktury hlavních secoiridoidů.



Obrázek 3 Schéma hlavních degradačních, přesmykových a izomerních reakcí, kterým podléhají deriváty kyseliny elenolové, vedoucí k různým chemickým formám.

1.4.2 Optimalizace a validace extrakce fenolických látek z EVOO

Při optimalizaci extrakce bylo porovnáváno pět různých extrakčních metod: miniaturizovaná LLE extrakce podle Impellizzeriho a Lina [115], metoda Montedora a kol. [116,117] a její miniaturizovaná verze, SPE extrakce dle De Nina a kol. [118] a v neposlední řadě LLE extrakce vyvinutá skupinou Ricciutelliho [110]. V rámci optimalizace bylo testováno množství vzorku potřebného k extrakci, druh a množství extrakčních rozpouštědel a časová a manuální náročnost extrakce (včetně procesu sušení). Maximální výtěžek fenolických sloučenin byl získán mírně modifikovaným extrakčním postupem dle Ricciutelliho a kol. [110], jenž byl následně aplikován na veškeré EVOO vzorky. Modifikovaný Ricciutelliho postup extrakce je detailně vysvětlen v kapitole 1.3.3.3. Všechny vzorky byly extrahovány třikrát a každý z extraktů byl následně třikrát analyzován pomocí

RP-HPLC spojené s DAD a ESI-MS detekcí (n = 9). Zatímco kvantifikace fenolických sloučenin byla uskutečněna z dat získaných pouze DAD detekcí, k identifikaci PP byly použity informace získané z obou detekčních systémů.

Za účelem zjištění účinnosti extrakce bylo třeba najít takový vzorek rostlinného oleje, který neobsahuje stejné fenolické látky jako EVOO. Z rostlinných olejů byl testován sójový a zelný olej a pro porovnání byl použit i běžný minerální olej. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pomocí oleje zelného, který byl prostý PP typických pro EVOO, což je i v souladu s již publikovanými daty [111]. Postup obohacení vzorku zelného oleje známým množstvím jednotlivých standardů ve dvou koncentračních stupních je včetně jejich následné extrakce popsán v kapitole 1.3.3.3. Každý koncentrační stupeň byl extrahován v trojím provedení a každý extrakt byl následně třikrát analyzován (n = 9). Účinnost extrakce byla pro jednotlivé standardy získána porovnáním koncentrace vypočítané z příslušné rovnice regrese, do níž byla dosazena plocha píku dané látky po její HPLC analýze, se známou koncentrací použitou k obohacení vzorku. Procentuální hodnoty účinnosti extrakce se pohybovaly v rozmezí 84–100 % a jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Validační parametry HPLC analýzy fenolických látek.

Poznámky: R^2 = koeficient determinace, LoD = limit detekce, LoQ = limit kvantifikace.

Standard	Účinnost extrakce [%]	Kalibrační křivka	R^2	LoD [µg/kg]	LoQ [µg/kg]
GA	89,1	$y = 0,8016x - 0,0139$	0,9997	13,5	44,9
HTY	84,3	$y = 0,4054x - 0,00008$	0,9994	21,9	73,1
TY	95,5	$y = 0,24x + 0,00016$	0,9999	26,5	88,3
CA	95,3	$y = 1,3074x - 0,0048$	0,9999	5,2	17,5
FA	90,3	$y = 1,1966x - 0,0023$	0,9998	4,4	15,4
HTY-EA	91,6	$y = 0,112x - 0,0011$	0,9999	39,9	133,0
Lu	91,5	$y = 1,12x - 0,0012$	0,9996	8,9	29,5
Ap	99,5	$y = 0,751x - 0,0011$	0,9997	5,2	17,5

1.4.3 Optimalizace a validace HPLC stanovení fenolických látek v EVOO

Při optimalizaci chromatografické separace byla pozornost věnována parametrům použité kolony a druhu silnějšího elučního činidla. Byly porovnávány 3 stejně dlouhé analytické kolony lišící se SF, vnitřním průměrem či velikostí částic. Dvě kolony měly stejné rozměry (15 cm × 4,6 mm × 2,7 μm), nicméně byly plněné dvěma různými stacionárními fázemi, pentafluorfenylpropylenovou a oktadecyl-silikagelovou SF. Třetí kolona byla plněná rovněž oktadecyl-silikagelem, ale oproti předchozím měla menší vnitřní průměr (3 mm) i průměr částic (2 μm). Tyto kolony byly kombinovány s různým druhem organické složky mobilní fáze (acetonitril a metanol) a různými gradientovými programy lišící se počáteční koncentrací organického elučního činidla a strmostí a stupňovitostí eluce. Nejlepší separace PP byla získána při použití C18 kolony s vnitřním průměrem 4,6 mm a velikostí částic 2,7 μm a mobilní fáze složené z vody a acetonitrilu okyselených kyselinou mravenčí. Optimalizovaná separace trvala 21 minut a přesný program gradientu je popsán v kapitole 1.3.3.4.

Pomocí HPLC-DAD bylo ve vzorcích EVOO identifikováno a kvantifikováno celkem 40 různých derivátů a izomerů fenolických látek: hydroxytyrosol (HTY; M = 154 g/mol), tyrosol (TY; M = 138 g/mol), tyrosol glukosid (TY-Glu; M = 300 g/mol), 4 izomery elenolové kyseliny (EA iz.; M = 242 g/mol), 3 izomery verbaskosidu (VER iz.; M = 624 g/mol), apigenin (Ap; M = 270 g/mol), luteolin (Lu; M = 286 g/mol), oleacein (HTY-EDA; M = 320 g/mol), 11 izomerů oleuropein aglykonu (HTY-EA der.; M = 378 g/mol), 3 izomery glykosidu oleuropeinu (HTY-EA iz.; M = 540 g/mol), 9 izomerů ligstrosid aglykonu (TY-EA iz.; M = 362 g/mol), 3 izomery derivátu ligstrosid aglykonu (TY-EA der.; M = 394 g/mol) a acetoxypinoresinol (AOP; M = 416 g/mol). Identifikace jednotlivých látek byla provedena kombinací informací získaných z naměřených hmotnostních a DAD spekter, RIC záznamů a již publikovaných údajů [82,96,119,120]. Ve všech 68 vzorcích EVOO byly technikou HPLC nalezeny zástupci fenolických látek ze skupin secoiridoidů (oleacein, oleuropein a ligstrosid), flavonoidů (luteolin a apigenin), lignanů (acetoxypinoresinol) a fenylethanoidů (tyrosol, hydroxytyrosol a verbaskosid). Identifikace píků v chromatogramech byla kvůli velkému množství strukturních analogů secoiridoidů vysvětlené v kapitole 1.4.1 extrémně náročná. Secoiridoidy se v EVOO objevovaly v jejich plné i aglykonové formě a každá z těchto forem poskytovala velké množství izomerů a diastereoizomerů, což dohromady tvořilo velmi složitou matici. Celá problematika byla navíc ještě komplikována rozkladem secoiridoidů na jejich podjednotky a jiné degradační produkty. Z tohoto důvodu bylo v extraktech možné nalézt také například hydroxytyrosol,

tyrosol a mnoho izomerů kyseliny elenolové. Kvalitativní profil všech 68 analyzovaných vzorků EVOO byl nicméně podobný a vzorky nevykazovaly žádné významné odchylky.

PP přítomné v EVOO byly následně kvantifikovány metodou kalibrační křivky s vnitřním standardem. Kalibrační směs byla tvořena kyselinou gallovou, kávovou, ferulovou, hydroxytyrosolem, tyrosolem, glykosidickým oleuropeinem, luteolinem a apigeninem. Byly připraveny kalibrační roztoky těchto látek o koncentracích 0,1; 1; 5; 25; 50 a 100 mg/kg každé, a to v pěti opakováních pro každý koncentrační stupeň. Všechny kalibrační roztoky dále obsahovaly 50 mg/kg vnitřního standardu. Kalibrační křivky jednotlivých standardů jsou pak vyjádřením závislosti relativních ploch píků na relativní koncentraci látky (vztaženo na IS) a jejich rovnice regrese jsou uvedeny v tabulce 2. Koeficienty determinace (R^2) charakterizující danou kalibrační závislost byly ve všech případech větší než 0,9994 (tabulka 2). Kvůli nedostatku komerčně dostupných standardů PP přítomných v EVOO (zejména secoiridoidů) musela být kvantifikace některých látek provedena dle jejich strukturně nejbližšího analogu. Z tohoto důvodu byly deriváty a izomery oleuropeinu, ligstrosidu a kyseliny elenolové kvantifikovány pomocí oleuropeinu, izomery verbaskosidu a acetoxypinoresinolu pomocí hydroxytyrosolu a oleacein a tyrosol glukosid byly kvantifikovány s využitím tyrosolu.

Chromatografická metoda byla validována stanovením parametrů opakovatelnosti, limitů detekce (LoD) a limitů kvantifikace (LoQ). Opakovatelnost byla stanovena porovnáním analýz uskutečněných v jeden den (intraday) i v několika za sebou jdoucích dnech (interday). Intraday opakovatelnost retenčních časů a plochy byla kalkulována po analýze standardní směsi polyfenolů nastříknuté pětkrát v jeden den. Pro stanovení interday opakovatelnosti byly měřeny dvě různé koncentrační úrovně PP standardů ve třech za sebou jdoucích dnech. Interday opakovatelnost byla v obou případech mírně vyšší než intraday, nicméně všechny hodnoty opakovatelnosti vykazovaly velmi uspokojivé výsledky (relativní směrodatná odchylka $RSD \leq 1 \%$). Pro určení limitů detekce a kvantifikace byly použity tři různé koncentrační úrovně (80; 50 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), přičemž každá z nich byla analyzována vždy třikrát. Limity detekce a kvantifikace byly stanoveny jako trojnásobný, respektive desetinásobný poměr signálu k šumu (S/N). Hodnota LoD se pohybovala v rozmezí 4,4–39,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a hodnota LoQ v rozsahu 17,5–133,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Hodnoty LoD a LoQ jsou uvedeny v tabulce 2.

1.4.4 Porovnání HPLC a NMR výsledků

Zatímco pomocí HPLC-DAD analýzy bylo ve všech analyzovaných vzorcích EVOO stanoveno 40 derivátů a izomerů celkem třinácti fenolických látek, pomocí NMR spektroskopie bylo ve 32 vzorcích kvantifikováno 6 různých derivátů a izomerů odvozených od čtyř fenolických látek nesoucích aldehydickou funkční skupinu (tabulka 3). Pro porovnání výsledků získaných pomocí HPLC s DAD detekcí nebo s využitím NMR spektroskopie byly uvažovány pouze fenolické látky, které bylo možné oběma technikami detekovat (oleacein, ligstrosid aglykon a oleuropein aglykon). Obsah stanovovaných fenolických látek je v tabulce 3 uveden jako suma všech izomerů a derivátů.

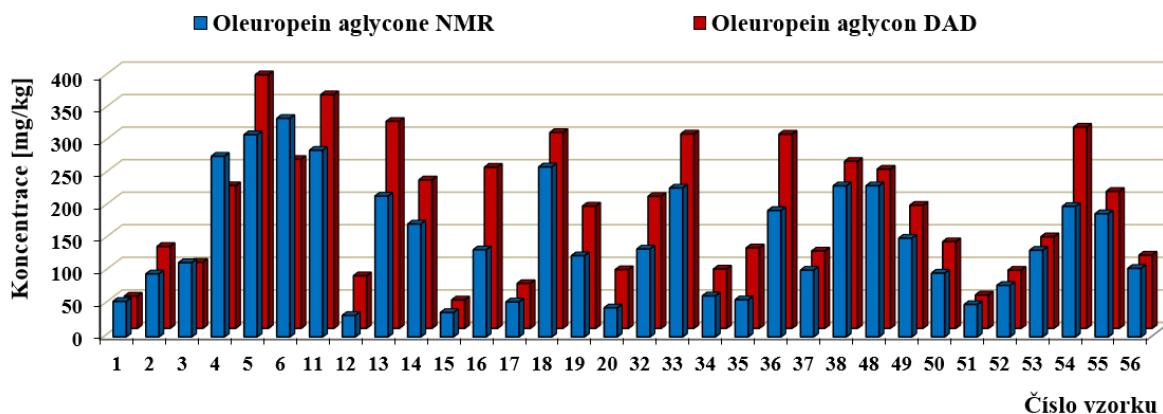
Ve všech 32 vzorcích byl u obou technik získán podobný profil sloučenin ligstrosid a oleuropein aglykonu a výsledky spolu tedy jasně korelují. Tento fakt je doložen obrázkem 4, který znázorňuje součet všech izomerů oleuropein aglykonu (HTY-EA der.) stanovený oběma metodami v předložených vzorcích. Množství oleaceinu bylo naopak velmi rozdílné v závislosti na použité technice. Pomocí NMR techniky byl oleacein kvantifikován řádově ve stejných jednotkách jako ostatní secoiridoidy. Tyto hodnoty jsou zároveň i v souladu s již publikovanými daty [108,121]. Kvantifikace oleaceinu pomocí HPLC-DAD však poskytla hodnoty o 1 řád nižší. HPLC-DAD metoda stanovení oleaceinu je totiž ovlivněna systematickou chybou, která souvisí s částečnou integrací píku. Neobvyklý profil rekonstruovaného iontového chromatogramu oleaceinu ($m/z = 319$) na obrázku 5 odhaluje přítomnost překrývajících se metastabilních forem, jejichž vznik a vztah byl již diskutován i v kapitole 1.4.1. Toto tvrzení je navíc podpořeno kolektivem vědců kolem Ammara [122] nebo Celana [96], kteří dostali obdobný profil rekonstruovaného iontového chromatogramu oleaceinu. Ammaro však díky následné MS/MS kvantifikaci získal hodnoty oleaceinu alespoň o 1 řád vyšší, než jsou běžné hodnoty při použití DAD detekce, a Celano oleacein raději nekvantifikoval vůbec.

Tabulka 3 Kvantifikace fenolických látek NMR a DAD technikou. Pokud má látka více relativních forem, je výsledek uveden jako jejich součet.

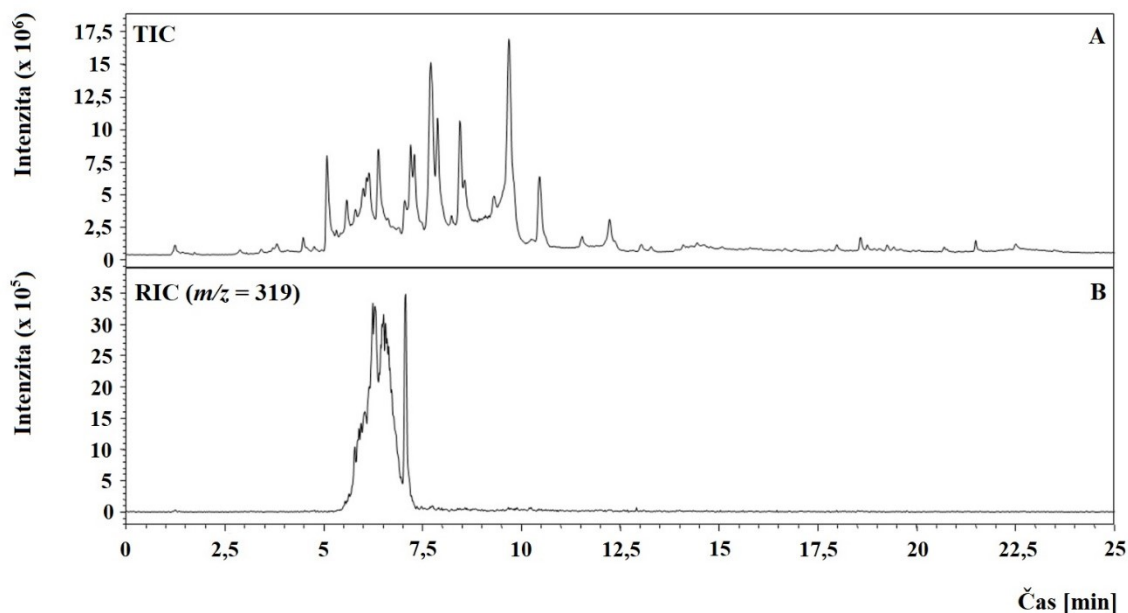
Poznámky: AOP = acetoxypinoresinol, Ap = apigenin, der. = derivát, EA = kyselina elenolová, HTY = hydroxytyrosol, HTY-EA = oleuropein, HTY-EDA = oleacein, iz. = izomer, Lu = luteolin, TY = tyrosol, TY-EA = ligstrosid aglykon, TY-EDA = oleokantal, TY-Glu = tyrosol glukosid, VER = verbaskosid.

Číslo vzorku	Koncentrace detekovaných látek pomocí NMR [mg/kg]					Koncentrace detekovaných látek pomocí DAD [mg/kg]													
	HTY-EDA	TY-EDA	TY-EA (iz.)	HTY-EA (iz.)	Celkové množství	EA (iz.)	VER (iz.)	TY-EA (der.)	TY-EA (iz.)	HTY-EA (der.)	HTY-EA (iz.)	HTY	TY	Lu	HTY-EDA	Ap	Ty-Glu	AOP	Celkové množství
1	66,9	84,0	7,2	41,9	200	57,0	6,0	42,8	35,5	45,9	30,8	26,6	38,9	0,8	3,6	0,3	1,7	0,6	290
2	95,1	145,6	13,3	26,5	281	36,1	0,5	64,7	43,2	88,9	53,4	14,9	10,9	1,5	4,4	0,7	1,2	0,6	321
3	87,6	128,0	31,6	34,5	282	25,2	3,2	48,3	37,6	48,9	64,6	7,9	16,9	1,6	3,3	0,6	1,4	0,4	260
4	107,8	109,0	11,7	19,3	248	59,2	1,4	92,4	56,8	99,7	48,3	22,2	21,8	1,8	5,6	0,9	2,8	0,5	413
5	108,6	151,0	24,4	39,7	324	33,7	2,0	54,5	41,2	72,1	55,5	11,5	7,8	0,7	3,9	0,0	1,9	0,4	285
6	92,7	114,2	41,2	79,9	328	30,8	2,7	88,3	99,4	135,1	41,2	15,7	17,9	2,3	9,4	1,4	3,4	2,7	450
11	126,5	179,1	124,1	111,1	541	55,9	2,8	44,7	93,8	142,6	49,1	3,3	7,2	3,2	10,2	1,9	5,0	2,3	422
12	146,1	180,4	94,4	91,3	512	11,3	2,2	117,8	87,2	108,8	86,5	2,7	8,1	1,3	2,0	0,8	3,6	3,5	436
13	38,0	47,0	240,8	220,3	546	10,5	0,7	83,3	169,7	216,2	84,1	3,8	7,6	0,9	4,4	0,9	5,4	8,6	596
14	58,4	92,1	261,5	262,3	674	19,2	1,4	101,5	152,4	268,4	77,3	7,1	9,5	2,0	4,3	1,2	4,8	5,5	655
15	76,7	82,2	194,2	239,9	593	28,5	0,3	115,9	225,3	442,9	42,9	11,5	13,3	2,5	4,0	2,6	12,5	14,5	917
16	50,0	92,2	132,0	108,0	382	18,4	1,3	75,8	144,7	303,2	27,0	9,0	11,7	1,5	5,2	1,4	3,8	11,5	615
17	61,7	103,1	106,7	108,5	380	18,4	1,2	90,1	137,0	246,1	82,7	10,0	13,7	1,7	4,3	1,5	4,5	7,8	619
18	130,1	112,2	117,1	187,1	546	29,9	1,4	68,1	97,3	232,1	62,4	8,0	6,7	1,6	4,3	1,6	6,0	4,7	524
19	66,1	106,8	167,9	153,4	494	34,2	1,4	125,6	238,4	374,4	36,8	15,1	17,4	2,5	0,0	2,3	7,8	13,0	869

Číslo vzorku	Koncentrace detekovaných látek pomocí NMR [mg/kg]					Koncentrace detekovaných látek pomocí DAD [mg/kg]													
	HTY-EDA	TY-EDA	TY-EA (iz.)	HTY-EA (iz.)	Celkové množství	EA (iz.)	VER (iz.)	TY-EA (der.)	TY-EA (iz.)	HTY-EA (der.)	HTY-EA (iz.)	HTY	TY	Lu	HTY-EDA	Ap	Ty-Glu	AOP	Celkové množství
20	152,0	215,4	95,5	142,3	605	28,1	1,7	96,8	116,8	243,3	46,7	16,1	18,9	2,1	9,3	1,4	4,6	5,3	591
32	190,8	156,7	88,4	139,3	575	37,2	1,9	118,0	76,7	231,4	81,1	3,4	4,2	4,3	4,0	2,4	2,5	2,5	570
33	133,7	112,2	111,5	187,1	544	26,2	1,3	126,3	107,7	264,1	53,0	5,5	3,4	3,7	3,3	2,0	2,5	2,6	602
34	90,5	98,6	23,8	45,9	259	22,8	1,8	63,6	96,6	95,7	59,9	4,2	4,0	1,2	2,6	0,9	1,8	1,9	357
35	76,1	119,5	43,4	50,6	290	32,4	1,8	38,8	83,9	112,8	33,0	10,2	11,5	2,1	9,7	2,0	2,3	3,0	344
36	90,9	91,8	22,2	33,8	239	45,2	3,3	55,4	70,9	145,0	55,5	10,5	11,2	2,5	6,5	1,5	2,7	2,4	413
37	77,4	117,9	98,9	121,8	416	27,9	1,5	84,1	135,5	241,1	19,8	8,6	11,4	1,2	9,6	0,0	4,1	6,0	551
38	96,5	93,1	51,9	78,4	320	34,4	1,0	45,2	64,3	144,7	31,4	6,5	4,3	2,0	3,8	1,3	2,2	1,6	343
48	57,3	62,9	196,4	261,7	578	35,6	5,0	109,1	191,6	430,8	60,2	7,2	8,1	3,6	3,8	2,1	4,7	5,3	867
49	127,2	130,4	123,5	173,1	554	61,1	1,6	93,8	131,7	406,1	17,5	12,4	9,0	3,0	8,3	1,6	5,0	3,9	755
50	58,3	70,5	134,4	209,1	472	29,8	1,2	124,3	159,6	457,0	33,4	11,1	7,9	4,9	3,6	2,3	6,2	6,2	848
51	53,1	100,6	82,2	100,6	337	15,2	1,3	106,5	108,2	229,8	50,5	6,0	7,5	2,3	4,5	1,8	4,9	5,4	544
52	84,9	72,7	83,2	162,3	403	35,7	1,8	89,5	144,6	335,0	21,1	13,1	7,5	3,1	4,4	1,7	4,4	4,9	667
53	86,4	84,8	101,0	165,0	437	37,6	1,5	113,4	140,8	357,0	43,5	9,8	6,5	3,5	4,0	2,3	3,5	5,2	729
54	149,1	163,0	58,6	82,9	454	34,3	1,4	80,4	80,5	154,8	40,8	3,2	2,9	3,6	4,8	1,0	2,6	1,9	412
55	100,5	113,0	29,0	41,5	284	36,8	4,8	74,6	71,0	119,2	48,7	11,0	11,3	2,0	8,9	0,0	3,7	2,1	394
56	110,1	167,0	59,2	106,8	443	22,2	1,7	96,4	83,6	140,9	40,2	7,1	14,0	2,7	7,1	1,3	2,8	2,8	423



Obrázek 4 Celkové množství izomerů oleuropein aglykonu (HTY-EA der.) ve 32 vzorcích EVOO získaných analýzou NMR (modře) a HPLC-DAD (červeně).

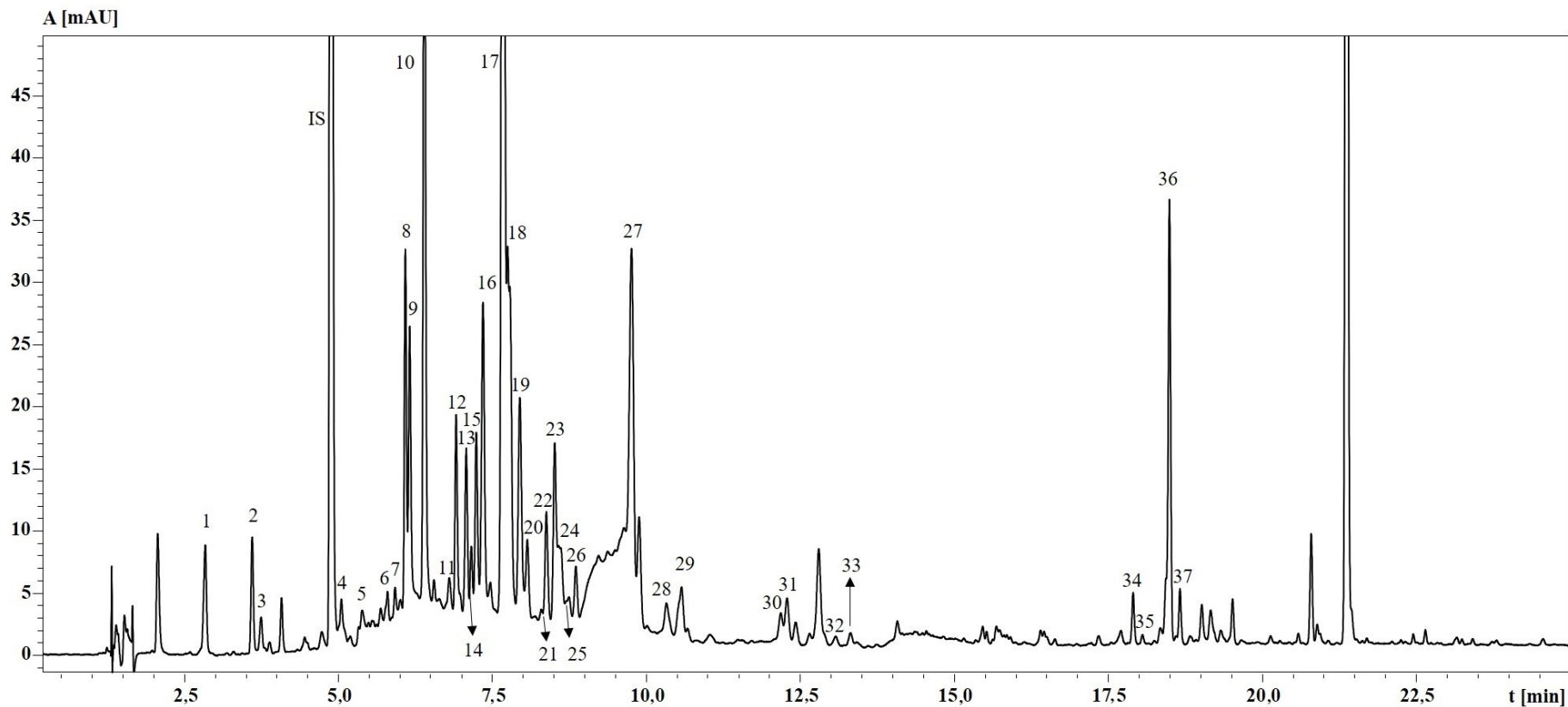


Obrázek 5 MS záznam při stanovení vzorku 13. A: TIC (celkový iontový chromatogram), B: RIC (rekonstruovaný iontový chromatogram) oleaceinu ($m/z = 319$).

Ke stanovení PP v EVOO byly tedy použity dvě naprosto rozdílné techniky lišící se nejen svou instrumentací, ale i kvantifikačními a identifikačními principy. Každá technika pak poskytuje jisté výhody i nevýhody, a je tedy na uživateli, jakou techniku bude preferovat. NMR kvantifikace je velmi spolehlivá, jelikož není založena na standardních materiálech, jak jsme zvyklí u většiny analytických metod. Instrumentální odezva NMR je totiž konstantní pro všechny látky bez ohledu na jejich chemickou povahu. NMR technika rovněž nevyžaduje časově náročné analytické postupy, jako je extrakce vzorku, nebo předchozí HPLC či GC separace stanovovaných látek. Nevýhodou této techniky je však její nižší citlivost.

Kvantifikace HPLC-DAD je oproti tomu založena na práci se standardními materiály, které jsou obvykle drahé, a ne vždy komerčně dostupné. Jediným komerčně dostupným a používaným standardem secoiridoidů je pouze jeden z izomerů oleuropein glykosidu (HTY-EA iz.), podle kterého se běžně kvantifikují nejen všechny jeho formy, ale i příbuzné sloučeniny, jako je ligstrosid nebo elenolová kyselina. Každá chemická struktura (cukerná, necukerná, dialdehydická, enolická, cyklická aldehydická forma dané látky včetně všech možných izomerů v dané formě a jejich acetalových a hemiacetalových přesmyků) však vykazuje jiné ionizační, fragmentační nebo absorpční schopnosti, a tím i jinou odezvu detektoru, a proto jejich kvantifikace pomocí jediného dostupného standardů není přesná. Přestože se tedy HPLC-DAD kvantifikace běžně používá pro stanovení fenolických látek v EVOO, musí se vždy počítat s jistou mírou nepřesnosti, jež vzniká v důsledku (a) absence potřebných standardních materiálů, (b) přítomnosti mnoha chemických forem od stejné secoiridoidní sloučeniny a (c) možného výskytu degradačních procesů některých látek, a to i během samotného zpracování či analýzy vzorku. Všechny tyto aspekty pak dohromady zapříčiňují nepřehlednost a komplikovanost chromatogramu (obrázek 6), což je důvodem velmi náročné identifikace a kvantifikace látek.

Kvůli výše diskutované problematice HPLC a NMR stanovení PP v EVOO nemůže vést kvantifikace stejné sloučeniny ke stejným numerickým hodnotám. Výsledné profily se však shodují (obrázek 4), a proto se kombinace těchto dvou zcela odlišných technik ukázala jako originální a velmi dobrý výchozí bod pro křížovou kontrolu výsledků analýz.



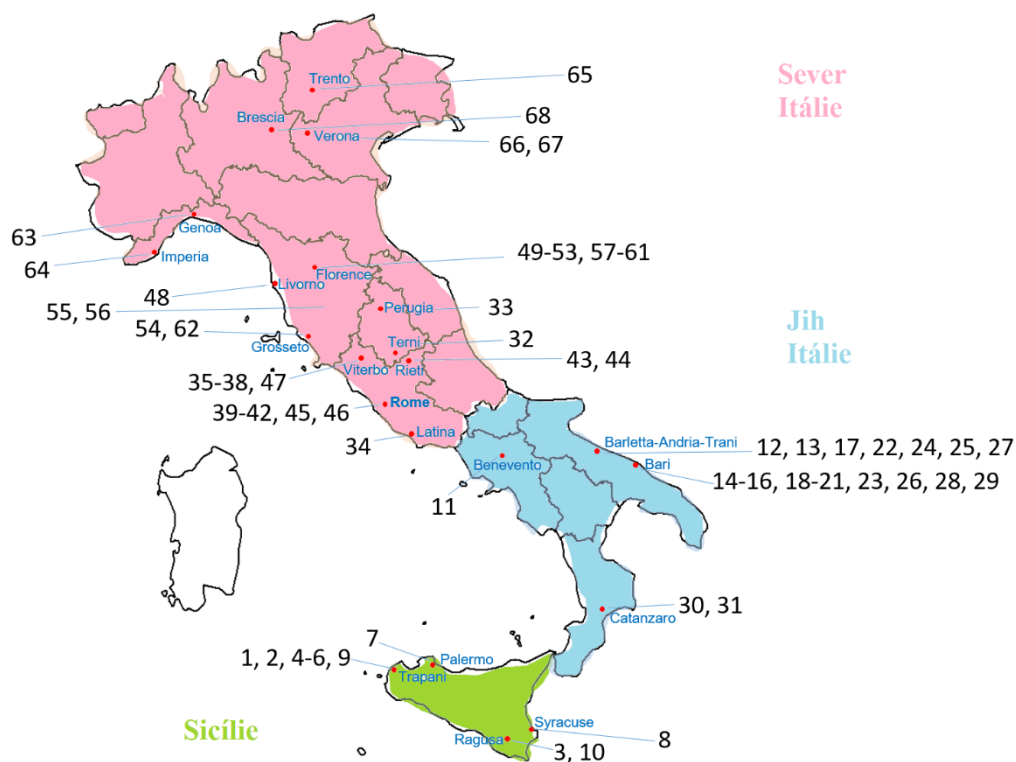
Obrázek 6 HPLC/DAD chromatogram vzorku EVOO číslo 30 pocházejícího z města Catanzaro v Kalábrii.

Ascentis Express C18 (15 cm × 4,6 mm × 2,7 μm); teplota: 25 °C; MF A: 0,1% HCOOH ve vodě; MF B: 0,1% HCOOH v acetonitrilu; gradient: 0 min – 10 % B, 4 min – 35 % B, 12 min – 47 % B, 12,5 min – 60 % B, 16 min – 75 % B, 21 min – 100 % B; průtok: 1 ml/min; 280 nm; dávkování: 5 μl.

Poznámky: IS: vnitřní standard (ethylgalát); HTY: 1; TY: 2; EA izomery: 3, 4, 5, 7; TY-EA deriváty: 6, 17, 20; HTY-EA deriváty: 8, 9, 10, 11, 14, 19, 21, 23, 27, 28; Lu: 12; HTY-EDA: 13; TY-EA izomery: 15, 16, 18, 24, 26, 29, 30, 32, 33; Ap: 22; TY-Glu: 25; AOP: 31; VER izomer: 35; HTY-EA izomery: 34, 36, 37. Zkratky: AOP = acetoxy-pinoreosinol, Ap = apigenin, EA = kyselina elenolová, HTY = hydroxytyrosol, HTY-EA = oleuropein, HTY-EDA = oleacein, Lu = luteolin, TY = tyrosol, TY-EA = ligstrosid aglykon, TY-Glu = tyrosol glukosid, VER = verbaskosid.

1.4.5 Statistické hodnocení italských EVOO na základě fenolického profilu

Pomocí optimalizované HPLC-DAD-MS metody [84] byl v 68 vzorcích EVOO pocházejících z 9 italských regionů stanoven kvalitativní i kvantitativní profil fenolických látek. Za účelem diskriminační analýzy byly dále vzorky rozděleny podle jejich geografického původu do 3 skupin: severní Itálie, jižní Itálie a Sicílie (tabulka 1 a obrázek 7). Vzorky pocházející z regionů Ligurie, Garda (Lombardie, Benátsko a Tridentsko-Horní Adiže), Lazio, Toskánsko a Umbrie spadají do oblasti severní Itálie. Naopak vzorky z regionů Kampánie, Apulie a Kalábrie patří do jižní Itálie. Poslední skupinou byla Sicílie, která jakožto ostrov byla hodnocena jako autonomní jednotka. Seznam vzorků včetně informací o jejich botanickém a geografickém původu a jejich rozdělení pro účely diskriminační analýzy je uveden v tabulce 1. Přehledná mapa Itálie znázorňující města a regiony, odkud byly vzorky získány, včetně jejich rozdělení na 3 oblasti je zobrazena na obrázku 7.

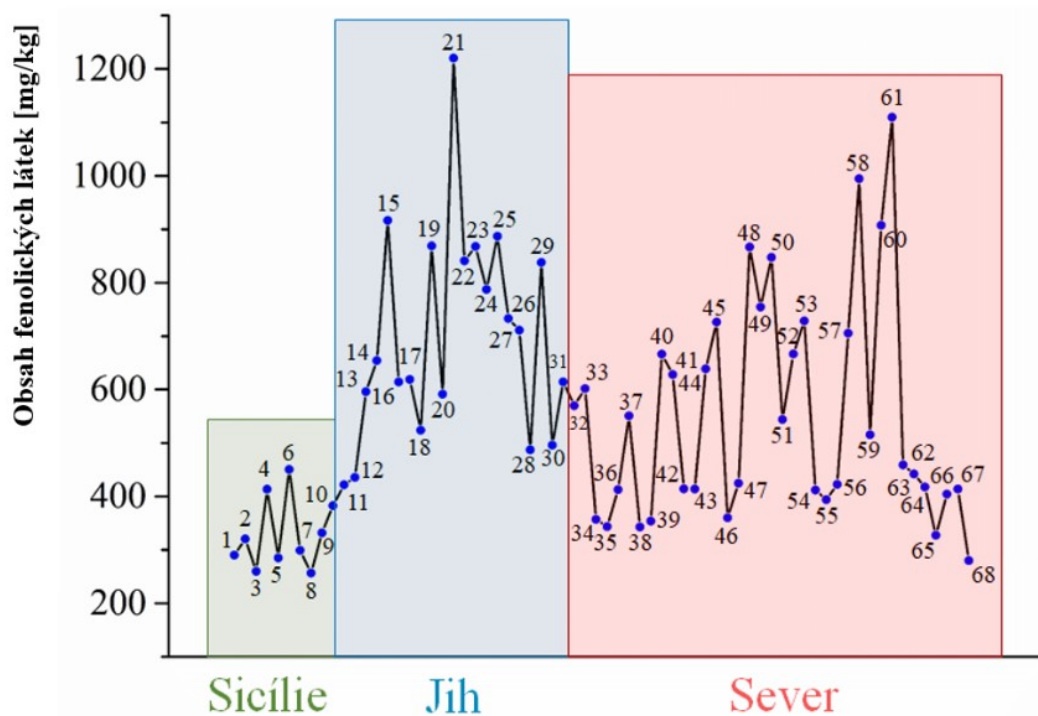


Obrázek 7 Ilustrativní mapa Itálie znázorňující geografický původ vzorků EVOO, včetně jejich konkrétního zařazení do jedné ze tří skupin (Sicílie, severní Itálie a jižní Itálie).

Jak již bylo několikrát řečeno, olivový olej je známý pro přítomnost mnoha forem fenolických látek [89]. Všechny 40 nalezených forem sledovaných PP ve všech 68 vzorcích je uvedeno v tabulce P1 (viz příloha). Nejvýznamnějšími sloučeninami byly deriváty a izomery ligstrosid aglykonu a oleuropeinu. Ze všech detekovaných látek totiž přispívaly nejvíce k celkovému množství PP v EVOO. Izomery ligstrosid aglykonu byly kvantifikovány s mediánem 106 mg/kg, zatímco jeho deriváty s mediánem 89 mg/kg. Izomery glykosidického oleuropeinu vykazovaly medián pouze 44 mg/kg, avšak jeho deriváty byly obsaženy ve velmi vysokém množství s mediánem 228 mg/kg. Minoritními sloučeninami byl v analyzovaných EVOO apigenin a izomery verbaskosidu, jejichž mediány činily pouhých 1,7 a 1,9 mg/kg.

Celkové množství PP ve vzorcích EVOO bylo získáno součtem obsahu všech fenolických látek včetně jejich derivátů a izomerů. Konkrétní čísla jsou souhrnně uvedena v tabulce 4 a rovněž přehledně zobrazena na obrázku 8. Nejnižší obsah PP obsahovaly vzorky pocházející ze Sicílie a severních italských regionů Ligurie a Gardy. Jejich průměrné množství bylo 355 mg/kg. Naprosto nejnižší množství pak bylo obdrženo u sicilského vzorku č. 3 (260 mg/kg) a č. 8 (257 mg/kg). Oba tyto vzorky byly jednodruhové oleje získané z odrůdy olivovníku s názvem *Tonda Iblea*, které pocházely z nejnižší části Sicílie. Naopak nejvyšší množství PP obsahovaly (s průměrem okolo 700 mg/kg) vzorky z Apulie a Toskánska. Naprosto nejvyšší množství fenolických látek pak bylo stanoveno ve vzorku č. 21 z Apulie (1220 mg/kg) a ve vzorku č. 61 z Toskánska (1110 mg/kg). Je známo, že celkové množství fenolických látek přítomných v EVOO nejvíce ovlivňují pedoklimatické podmínky, a to zejména geografický původ vzorku spolu s technologickými aspekty. Opakem je botanický původ oliv, který sice celkové množství PP významně neovlivňuje, avšak má zásadní vliv na jejich profil [123–127]. Právě kvůli velkému množství proměnných ovlivňujících skladbu PP v olejích můžeme zaznamenat průměrný či dokonce podprůměrný obsah fenolů i u některých vzorků pocházejících z regionů, které obecně produkují EVOO s velmi vysokým PP obsahem (Apulie a Toskánsko).

Jelikož některé analyzované EVOO byly označeny certifikovanými ochrannými známkami kvality (ChZO či ChOP) či známkou ekologického zemědělství (BIO), zajímalo nás také, zda existuje rozdíl ve skladbě fenolů mezi necertifikovanými oleji a oleji s některou ochrannou známkou, jež jsou obvykle prodávány za vyšší cenu. Žádná souvislost mezi certifikací olejů a kvalitativním či kvantitativním profilem v nich přítomných fenolických látek však nebyla zjištěna.



Obrázek 8 Graf stanoveného celkového množství fenolických látek ve vzorcích EVOO.

Tabulka 4 Celkové množství fenolických látek stanovené ve vzorcích EVOO.

Číslo vzorku	c [mg/kg]	Číslo vzorku	c [mg/kg]	Číslo vzorku	c [mg/kg]	Číslo vzorku	c [mg/kg]
1	290	18	524	35	344	52	667
2	321	19	869	36	413	53	729
3	260	20	591	37	551	54	412
4	414	21	1220	38	343	55	394
5	285	22	841	39	354	56	423
6	451	23	868	40	667	57	706
7	299	24	787	41	628	58	995
8	257	25	887	42	414	59	515
9	332	26	733	43	430	60	907
10	383	27	711	44	639	61	1110
11	422	28	487	45	726	62	459
12	436	29	838	46	360	63	442
13	607	30	496	47	425	64	418
14	655	31	615	48	868	65	327
15	917	32	570	49	755	66	404
16	605	33	602	50	848	67	414
17	620	34	357	51	544	68	280

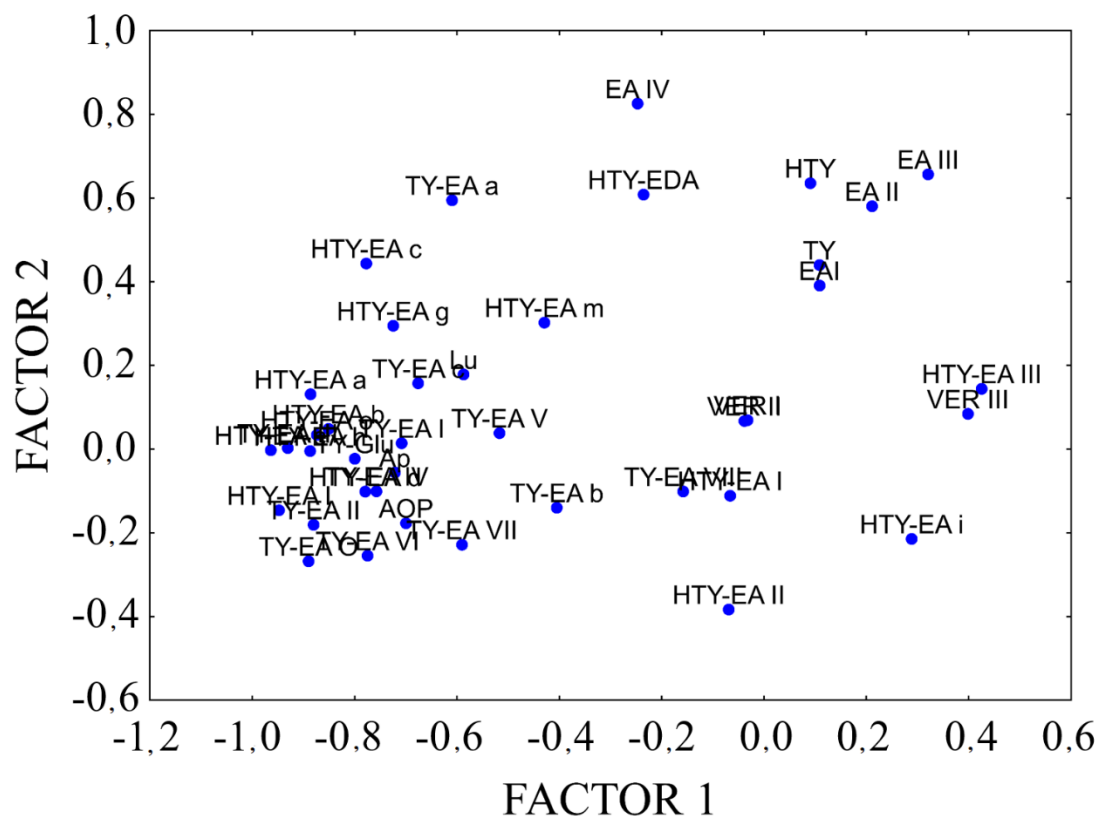
Jelikož je odrůda oliv ve většině případů svázána se specifickou oblastí (např. sicilské odrůdy nerostou v jiných italských regionech apod.), jsou literární data často v rozporu, zda skladba fenolických látek v EVOO souvisí více s geografickým nebo botanickým původem oliv. Obzvláště složitá je tato situace právě v Itálii, kde je známo více než 500 kultivarů oliv, což je v porovnání s ostatními světovými „olivovými velmocemi“ mnohonásobně větší množství. Každý z kultivarů je přitom vhodný právě pro dané pedoklimatické a geografické podmínky. Pokud je pak daný kultivar pěstován v nevhodné oblasti, získáme z něj olej o naprosto jiném PP složení [125].

Ze všech analyzovaných vzorků bylo nejnížší množství fenolických látek nalezeno v olejích ze Sicílie. Tyto vzorky byly připraveny z typických sicilských kultivarů, jako je *Tonda Iblea* nebo *Nocellara del Belice*, a průměrně v nich bylo nalezeno kolem 350 mg/kg. Získané výsledky odpovídají i datům nalezeným v literatuře [102]. Nízký obsah PP byl nalezen i ve vzorcích č. 65 a č. 68 pocházejících z jižní části nejsevernějšího italského regionu Garda. Vzorek č. 68 byl jednodruhový a byl vyroben z kultivaru *Leccino*, v případě vzorku č. 65 to byla směs *Leccino* a *Casaliva*. Nízké množství fenolů nalezené v těchto vzorcích mohlo být způsobeno netradiční polohou jejich produkce, která s sebou samozřejmě nese i nestandardní pedoklimatické podmínky pro růst olivovníků [123,126,127].

1.4.5.1 Faktorová analýza

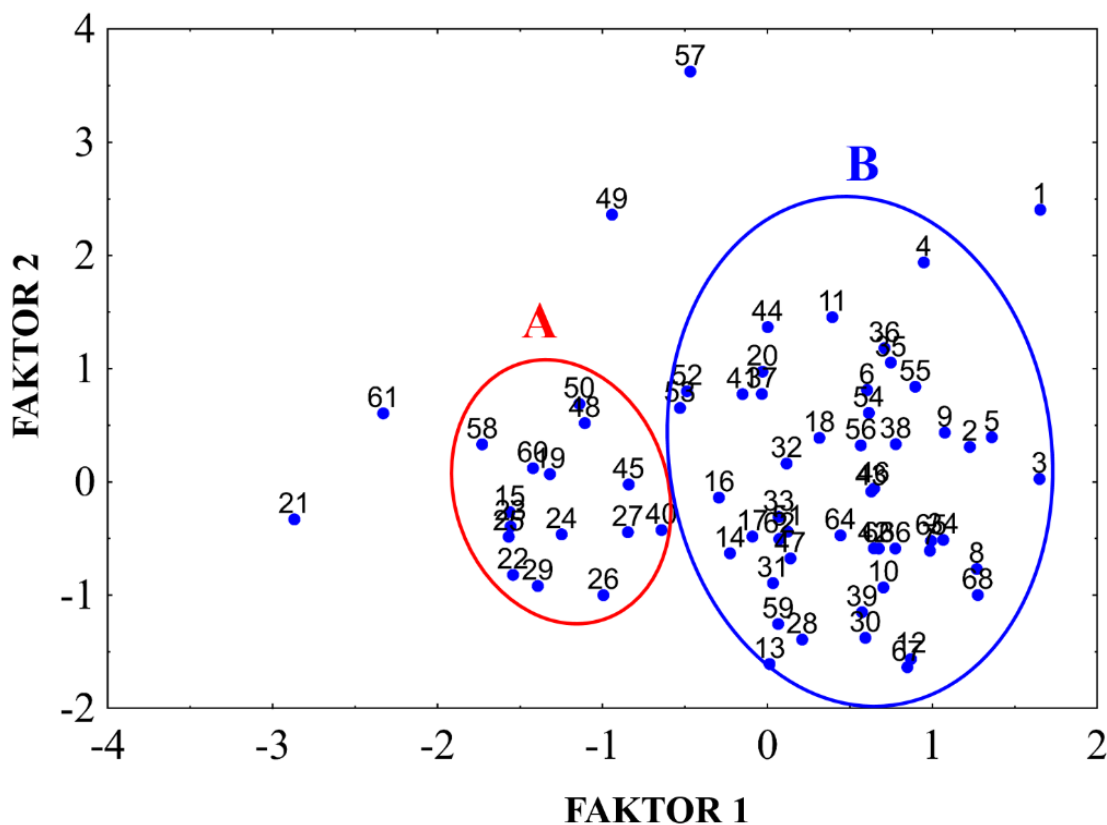
Faktorová analýza (FA) je vícerozměrná statistická metoda, která hledá vnitřní souvislosti (korelace) v datové matici, umožňuje vizualizaci rozptylu objektů (v našem případě olivových olejů a fenolických látek) a po identifikaci faktorů vysvětluje a popisuje jednotlivé objekty. Při faktorové analýze se nejprve zjistí faktorové zátěže, tzn. korelace mezi faktory a proměnnými. Graf faktorových zátěží po rotaci metodou varimax je uveden na obrázku 9. Pokud proměnné leží blízko hodnoty 1 na ose jednoho faktoru a zároveň blízko hodnoty 0 na ose druhého faktoru, jsou tzv. faktorově čisté a popisují daný faktor. Z obrázku 9 je zřejmé, že faktor 1 popisují deriváty a izomery oleuropeinu (HTY-EA) a ligstrosidu (TY-EA). Jelikož tyto dvě proměnné nejvíce přispívají k celkovému obsahu fenolických látek v EVOO, je faktor 1 spojen právě s tímto parametrem. Faktor 2 (obrázek 9) naopak popisuje proměnné hydroxytyrosol (HTY), oleacein (HTY-EDA) a izomery kyseliny elenolové (EA). Již dříve bylo zjištěno [128], že deriváty HTY-EA a izomery EA jsou ukazateli zralosti oliv. Během zrání totiž dochází k degradaci HTY-EA na její podjednotky HTY a EA. Obsah EA a HTY se tedy s dozríváním oliv zvyšuje, zatímco obsah HTY-EA

klesá. To je důvod, proč byl u přezrálých oliv pozorován velký pokles v koncentraci HTY-EA a obrovský nárůst koncentrace EA a HTY. Tyto změny ve složení fenolických látek způsobují i změnu organoleptických vlastností oleje, jelikož právě deriváty HTY-EA jsou nositelé jeho typické ostroti, hořkosti a štiplavosti [126,127]. Z výše uvedeného tedy vyplývá, že faktor 2 lze popsat jako zralost oliv použitých pro výrobu EVOO.



Obrázek 9 Graf faktorových zátěží pro všech 40 proměnných po normalizované rotaci metodou varimax (STATISTICA 12, StatSoft).

Pomocí faktorového skóre lze vzorky EVOO rozdělit do dvou skupin (obrázek 10). Vzorky obsahující velké množství fenolických látek leží v levé části grafu (skupina A) a naopak vzorky s malým množstvím PP jsou v grafu umístěny napravo (skupina B). Rozložení vzorků podél osy faktoru 2 je dáno obsahem EA a HTY-EA, a tedy zralostí použitých oliv. Vzorky ležící v horní části faktorového skóre (obrázek 10) obsahují vysoké množství EA a nízké množství HTY-EA (tabulka P1), což prozrazuje, že k výrobě olejů byly použity přezrálé olivy, což není v souladu se správnou technologickou praxí při výrobě EVOO.



Obrázek 10 Graf faktorového skóre prvního a druhého faktoru pro všech 68 EVOO vzorků (STATISTICA 12, StatSoft).

Ve skupině A (obrázek 10) jsou přítomny vzorky EVOO s vysokým obsahem fenolických látek (tabulka 4, obrázek 8), které pocházely zejména z regionu Apulie (vzorky č. 15, 19, 22–27 a 29). Dále je zde možné najít i vzorky z Toskánska (č. 48, 50, 58 a 60) nebo Lazia (č. 40 a 45). V početnější skupině B (obrázek 10) jsou pak seskupeny vzorky EVOO s průměrným nebo podprůměrným množstvím fenolů (tabulka 4, obrázek 8). V pravém dolním rohu skupiny B pak leží oleje pocházející ze severoitalských regionů (Garda a Ligurie; vzorky č. 63–68), které obecně obsahují menší množství fenolických látek. Téměř všechny sicilské vzorky EVOO (č. 2–10) byly nalezeny v pravé části skupiny B a vykazovaly nevýznamnou hodnotu faktoru 2. To znamená, že byly připraveny z dobře vyzrálých oliv, ale obsahují malé množství fenolických sloučenin. Ve faktorovém skóre (obrázek 10) bylo dále nalezeno pět olejů (vzorky č. 1, 21, 49, 57 a 61), jež nejsou součástí ani jedné skupiny, a jsou tak považovány za tzv. outliery (odlehle hodnoty). Odlehle vzorky č. 21 (Apulie) a 61 (Toskánsko) jsou ve faktorovém skóre umístěny zcela vlevo, jelikož obsahují naprosto nejvyšší množství fenolických látek ze všech 68 analyzovaných olivových olejů (tabulka 4, obrázek 8). Dva toskánské vzorky (č. 49 a 57) jsou v grafu faktorového skóre umístěny zcela

nahoře, protože ve srovnání s ostatními EVOO obsahují nadprůměrné množství elenolové kyseliny, a zároveň nízký obsah HTY-EA (tabulka P1), což může být způsobeno použitím přezrálých oliv při výrobě EVOO. Celkový obsah fenolických látek je průměrný, proto leží v blízkosti hodnoty nula na ose faktoru 1. Posledním outlierem byl v pravém horním rohu obrázku 10 sicilský vzorek č. 1. Ten obsahoval, podobně jako vzorky č. 49 a 57, velmi vysoké množství kyseliny elenolové (tabulka P1), avšak celkový obsah stanovených fenolů byl současně hluboko pod průměrnou hodnotou (tabulka 4, obrázek 8). Nejenže byl tento vzorek pravděpodobně připraven z přezrálých oliv, ale kvůli průkazným nízkým hodnotám obsahu fenolických látek zřejmě došlo i k nesprávnému zpracování či skladování oleje, případně k pěstování oliv za nevhodných podmínek.

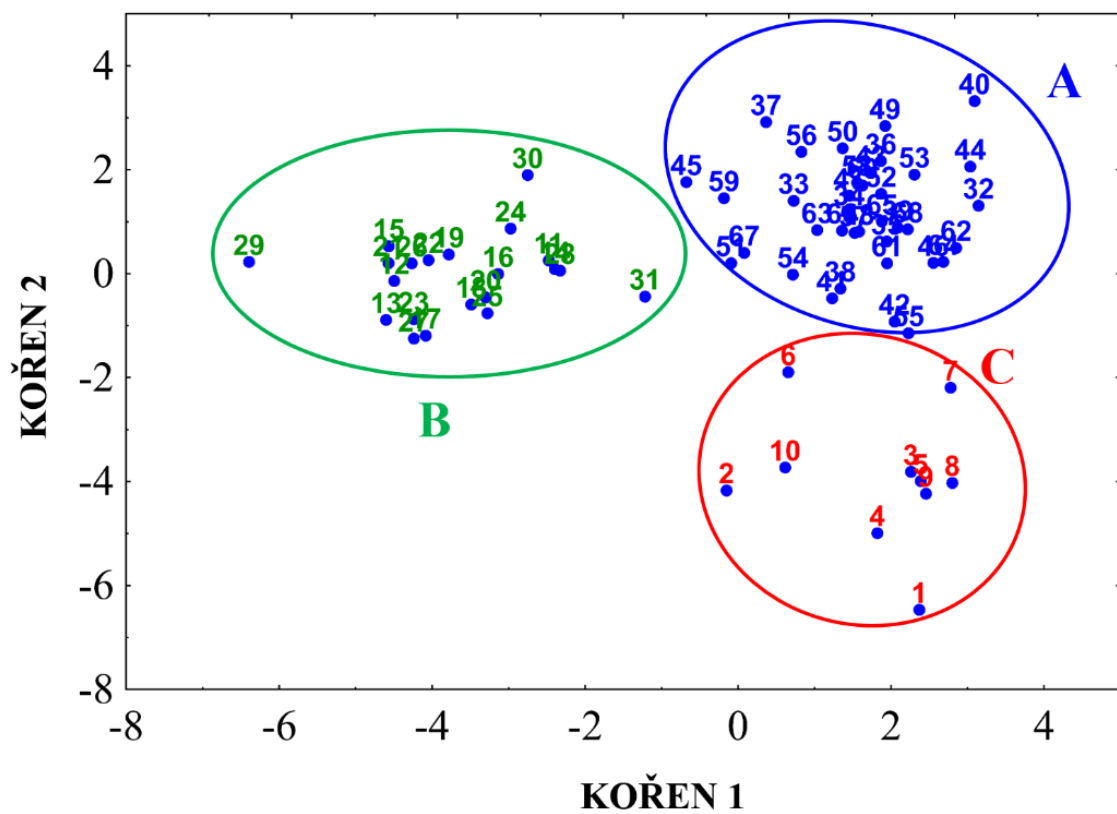
Výsledky faktorové analýzy byly potvrzeny analýzou hlavních komponent (PCA), která poskytovala totožné výsledky.

1.4.5.2 Diskriminační analýza

Vzorky analyzovaných olivových olejů byly rozděleny pomocí lineární diskriminační analýzy do tří skupin (A–C) podle jejich geografického původu (obrázek 11). EVOO pocházející ze severní části Itálie (vzorky č. 32–68) jsou na obrázku 11 sdruženy ve shluku A. Chemické složení těchto EVOO si je velmi podobné a druhy oliv použité pro jejich výrobu jsou typické pro severní italské regiony (*Casaliva, Leccino, Garda Orientale, Moraiolo, Toscano, Carboncella, Lavagnina, Taggiasca, Olivastra Seggianese* a jejich směsi). Většina těchto vzorků má navíc označení ChOP nebo ChZO. Vzorek č. 40 je nepatrně dál od ostatních, což by mohlo být způsobeno vyšším množstvím luteolinu a apigeninu. Skupina B (obrázek 11) pak zahrnuje všechny oleje vyprodukované v jižní Itálii (vzorky č. 11–31), kde se pro výrobu EVOO používá zejména kultivar oliv *Coratina*. Většina těchto vzorků pocházela z přímořských oblastí Jaderského moře (všechny vzorky z regionu Apulie; č. 12–29). Výjimkou byl vzorek č. 11 z vnitrozemské části Kampánie a dále kalábrijské vzorky č. 30 a 31 pocházející, jako jediné, z přímoří chladnějšího Jónského moře (tabulka 1 a obrázek 7). Právě tyto dva vzorky (č. 30 a 31) lze považovat za mírné outliery skupiny B. Důvodem může být nejen zeměpisná poloha produkce (nejjižnější Itálie), ale i odlišné přímořské podnebí (Jónského moře), či specifické kultivary oliv (*Carolea, Lametia*) použité při jejich výrobě. Toto tvrzení podporuje i výzkum španělských vědců [21], kteří zkoumali a prokázali vliv typu moře a zeměpisné polohy pěstování olivovníků (pobřeží versus vnitrozemí) na kvalitu španělských olivových olejů. Vzorek č. 29 je nepatrně vzdálený

od zbytku vzorků ležících ve skupině B (obrázek 11). Tento vzorek pochází z pobřeží regionu Apulie a k jeho výrobě byl použit běžný jihoitalský kultivar *Coratina*. Jelikož tento EVOO nevykazuje výjimečné složení ani původ, odchylka od ostatních olejů mohla být způsobena technologickými aspekty pěstování (růst, zavlažování a zdravotní stav olivovníku, sklizeň a sběr oliv) nebo zpracování (hlavně drcení, míchání, tlak během extrakce, odstředování a skladování) [123,125–127,129]. Posledním shlukem v grafu lineární diskriminační analýzy je skupina C, do které náleží všechny sicilské EVOO (obrázek 11). Přestože byly všechny vzorky ze shluku C vyprodukovány z typických sicilských kultivarů olivovníků *Nocellara del Belice* a *Tonda Iblea*, není tato skupina stejně kompaktní jako dvě předchozí. Důvodem je především menší počet vzorků získaných z této části Itálie. Hlavní rozdíl mezi skupinou C a předešlými dvěma skupinami A a B je však v její poloze vůči ose y (obrázek 11). Toto posunutí k záporným hodnotám kořenu 2 je pravděpodobně způsobeno v důsledku rozdílných klimatických podmínek Sicílie, jakožto ostrova, vůči zbytku pevninské Itálie.

Statistická analýza aplikovaná na vzorky olejů není dnes žádnou výjimkou. Lineární DA byla například úspěšně použita ve studii Becerra-Herrery a kol. [9] pro rozdělení španělských olejů dle jejich zeměpisného původu či kultivaru. Za pomoci PCA a lineární DA byl zas týmem italských vědců [102] zkoumán vliv pedoklimatických podmínek (provincie, klimatické podmínky, zavlažování a nadmořská výška) na profil mastných kyselin obsažených ve vzorcích EVOO pocházejících z italského regionu Lazio. Naše studie však poprvé úspěšně rozděluje italské EVOO na základě profilu PP dle jejich geografického původu.



Obrázek 11 Diagram lineárního diskriminačního skóre rozděljuje vzorky EVOO do tří skupin podle jejich zeměpisného původu: severní Itálie – skupina A, jižní Itálie – skupina B, Sicílie – skupina C (STATISTICA 12, StatSoft).

1.5 ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ K EVOO

Kvalitativní a kvantitativní profil fenolických látek olivového oleje je tradičně stanovován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií po jejich předchozí izolaci extrakčním systémem kapalina-kapalina či kapalina-pevná fáze. HPLC analýza fenolů oleje je však komplikována několika kritickými body, jež významně ztěžují správnost a přesnost jejich identifikace a kvantifikace a rovněž i orientaci v naměřených chromatogramech. Mezi tyto kritické body patří zejména: (a) různé chemické formy polyfenolů olivového oleje (secoiridoidů), které dohromady vytváří velmi složitou matici; (b) snadná degradace této třídy sloučenin, a to i za relativně mírných podmínek; (c) komerční nedostupnost standardů secoiridoidů. Vypořádání se se všemi těmito aspekty je důležitým předpokladem pro správné a efektivní stanovení fenolických látek v EVOO.

Izolace fenolických látek byla spolu s jejich RP-HPLC-DAD/MS analýzou pečlivě optimalizována a validována. LLE extrakce fenolických látek proběhla s využitím polárních rozpouštědel s účinností extrakce 84–100 %. Analýzy byly provedeny na koloně Ascentis Express C18 za využití gradientové eluce trvající 21 minut, kdy mobilní fázi tvořila 0,1% kyselina mravenčí ve vodě (A) a 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu (B). Pro identifikaci fenolů byla využita literární data kombinovaná s daty získanými z DAD a RIC záznamů. Kvantifikace fenolických látek pak byla uskutečněna metodou kalibrační křivky s vnitřním standardem, přičemž při absenci standardu byl vždy využit strukturálně nejbližší dostupný analog dané látky.

Vzhledem k náročnosti této problematiky byla vedle chromatografické techniky využita paralelně i NMR spektroskopie, jež je důležitou technikou strukturální analýzy, a může tak být velmi nápomocná pro lepší pochopení strukturálních vztahů zkoumaných látek. HPLC-DAD/MS technikou bylo kvantifikováno čtyřicet strukturálních analogů odpovídající třinácti různým fenolickým látkám. Jmenovitě se jednalo o hydroxytyrosol, tyrosol, tyrosol glukosid, luteolin, apigenin, oleacein, izomery elenolové kyseliny, izomery oleuropeinu a oleuropein aglykonu, acetoxypinoresinol, izomery a deriváty ligstrosid aglykonu a izomery verbaskosidu. NMR technika pak byla zaměřena výhradně na sloučeniny nesoucí aldehydickou funkční skupinu. Touto technikou bylo tedy stanoveno pouze šest strukturálních analogů, jež odpovídaly čtyřem fenolickým látkám: oleuropein aglykonu, oleaceinu, ligstrosid aglykonu a oleokantalu. Oběma technikami byly tedy detekovány tři stejné látky (oleuropein aglykon, ligstrosidu aglykon a oleacein), jejichž výsledky byly dále porovnávány. Ligstrosid a oleuropein aglykon vykazovaly velmi dobrou konzistenci dat, což by v budoucnu mohlo

sloužit ke křížovému ověřování správnosti analýz. Rozdílné výsledky byly však obdrženy pro oleacein, který je kvůli svým metastabilním formám velmi těžko kvantifikovatelný s využitím HPLC-DAD techniky. Pro jeho správnou kvantifikaci je tedy vhodnější použití technik NMR či MS/MS, jež vliv metastabilních stavů eliminují na minimum. Pro kompletní popsání fenolického profilu extra panenských olivových olejů je proto vhodná kombinace i několika principiálně odlišných metod a technik poskytujících rozdílné, avšak unikátní otisky prstů pro jakýkoli vzorek. Vzhledem ke specifčnosti a komplementárnosti obou použitých technik může tato studie připravit cestu novým projektům využívajících kombinaci NMR a HPLC-DAD stanovení, a tím objasnit více podrobností nejen o velmi aktuálním tématu fenolických látek v EVOO, ale i o jejich přítomnosti a roli v dalších potravinářských maticích.

Výsledky HPLC-DAD stanovení fenolů obsažených v 68 italských EVOO byly dále podrobeny vícerozměrné statistické analýze (faktorové analýze, analýze hlavních komponent a lineární diskriminační analýze) pro nalezení vnitřních korelací mezi vzorky, které by mohly vést k jejich klasifikaci dle fenolického profilu a obsahu. Faktorová analýza a analýza hlavních komponent rozdělila vzorky do dvou skupin s pěti odlehlými vzorky. Nejdůležitějšími parametry determinujícími faktorovou analýzu byl celkový obsah fenolických látek, jenž byl nejvíce ovlivněn množstvím derivátů a izomerů oleuropeinu a ligstrosidu, a dále zralost oliv použitých pro výrobu oleje, o níž nám vypovídá především množství kyseliny elenolové. Dva z pěti zmíněných odlehlých případů byly vzorky s extrémním celkovým množstvím fenolických látek. Další tři odlehlé hodnoty byly pravděpodobně připraveny z přezrálých oliv, protože množství izomerů kyseliny elenolové bylo ve srovnání s ostatními vzorky výrazně vyšší. Pomocí lineární diskriminační analýzy byla pak úspěšně provedena klasifikace vzorků dle jejich zeměpisného původu. Analyzované vzorky byly touto statistickou metodou rozděleny do tří jasně oddělených shluků podle toho, zda pocházely ze severní či jižní Itálie nebo Sicílie. Takovéto rozdělení italských olejů bylo přitom skutečně úplně poprvé. Výsledky dosažené diskriminační analýzou byly dokonce natolik jednoznačné, že by mohly být základním kamenem větších setů vzorků, které by pak v budoucnu mohly vést k odhalení falšování italských EVOO ve smyslu zaměňování či nedovoleného užití ochranných známek ChZO či ChOP.

1.6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Siddiqui A.J., Musharraf S.G., Choudhary M.I., & Atta-ur-Rahman (2017). Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chemistry*, **217**, 687–698.
- [2] Gliszczyńska-Świgło A. & Chmielewski J. (2017). Electronic Nose as a Tool for Monitoring the Authenticity of Food. A Review. *Food Analytical Methods*, **10**, 1800–1816.
- [3] Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. & Fernández-Gutiérrez A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1220–1234.
- [4] Machado M., Machado N., Gouvinhas I., Cunha M., de Almeida J.M.M.M. & Barros A.I.R.N.A. (2015). Quantification of Chemical Characteristics of Olive Fruit and Oil of cv Cobrançosa in Two Ripening Stages Using MIR Spectroscopy and Chemometrics. *Food Analytical Methods*, **8**, 1490–1498.
- [5] Luykx D.M.A.M. & van Ruth S.M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, **107**, 897–911.
- [6] Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 on setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union OJ L 364 of 19.12.2006.
- [7] Regulation (EU) No. 1151/2012 of the European Parliament and of the Council of 21 November 2012 on quality schemes for agricultural products and foodstuffs. OJ L 343 of 14.12.2012.
- [8] Alonso-Salces R.M., Héberger K., Holland M.V., Moreno-Rojas J.M., Mariani C., Bellan G., Reniero F. & Guillou C. (2010). Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, **118**, 956–965.
- [9] Becerra-Herrera M., Vélez-Martín A., Ramos-Merchante A., Richter P., Beltrán R. & Sayago A. (2018). Characterization and evaluation of phenolic profiles and color as potential discriminating features among Spanish extra virgin olive oils with protected designation of origin. *Food Chemistry*, **241**, 328–337.

- [10] Mendes T.O., da Rocha R.A., Porto B.L.S., de Oliveira M.A.L., de C. dos Anjos V. & Bell M.J.V. (2015). Quantification of Extra-virgin Olive Oil Adulteration with Soybean Oil: a Comparative Study of NIR, MIR, and Raman Spectroscopy Associated with Chemometric Approaches. *Food Analytical Methods*, **8**, 2339–2346.
- [11] Jabeur H., Zribi A. & Bouaziz M. (2016). Extra-Virgin Olive Oil and Cheap Vegetable Oils: Distinction and Detection of Adulteration as Determined by GC and Chemometrics. *Food Analytical Methods*, **9**, 712–723.
- [12] Li X., Wang S., Shi W. & Shen Q. (2016). Partial Least Squares Discriminant Analysis Model Based on Variable Selection Applied to Identify the Adulterated Olive Oil. *Food Analytical Methods*, **9**, 1713–1718.
- [13] Fiorini D., Boarelli M.C., Conti P., Alfei B., Caprioli G., Ricciutelli M., Sagratini G., Fedeli D., Gabbianelli R. & Pacetti D. (2018). Chemical and sensory differences between high price and low price extra virgin olive oils. *Food Research International*, **105**, 65–75.
- [14] Wu G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, **37**, 1–17.
- [15] Gonçalves T.R., Rosa L.N., Gonçalves R.P., Torquato A.S., Março P.H., Gomes S.T.M., Matsushita M. & Valderrama P. (2018). Monitoring the Oxidative Stability of Monovarietal Extra Virgin Olive Oils by UV–Vis Spectroscopy and MCR–ALS. *Food Analytical Methods*, **11**, 1936–1943.
- [16] Wu Y., Zhou R., Wang Z., Wang B., Yang Y., Ju X. & He R. (2019). The effect of refining process on the physicochemical properties and micronutrients of rapeseed oils. *Plos One*, **14**(3), e0212879.
- [17] Visioli F., Bellomo G. & Galli C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **247**, 60–64.
- [18] Gonzalez-Fernandez I., Iglesias-Otero M.A., Esteki M., Moldes O.A., Mejuto J.C. & Simal-Gandara J. (2019). A critical review on the use of artificial neural networks in olive oil production, characterization and authentication. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **59**(12), 1913–1926.

- [19] Gilbert-López B., Valencia-Reyes Z.L., Yufra-Picardo V.M., García-Reyes J.F., Ramos-Martos N. & Molina-Díaz A. (2014). Determination of Polyphenols in Commercial Extra Virgin Olive Oils from Different Origins (Mediterranean and South American Countries) by Liquid Chromatography–Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, **7**, 1824–1833.
- [20] del Monaco G., Officioso A., D’Angelo S., La Cara F., Ionata E., Marcolongo L., Squillaci G., Maurelli L. & Morana A. (2015). Characterization of extra virgin olive oils produced with typical Italian varieties by their phenolic profile. *Food Chemistry*, **184**, 220–228.
- [21] Sayago A., González-Domínguez R., Beltrán R. & Fernández-Recamales Á. (2018). Combination of complementary data mining methods for geographical characterization of extra virgin olive oils based on mineral composition. *Food Chemistry*, **261**, 42–50.
- [22] Fuentes E., Paucar F., Tapia F., Ortiz J., Jimenez P. & Romero N. (2018). Effect of the composition of extra virgin olive oils on the differentiation and antioxidant capacities of twelve monovarietals. *Food Chemistry*, **243**, 285–294.
- [23] Baccouri O., Guerfel M., Baccouri B., Cerretani L., Bendini A., Lercker G., Zarrouk M. & Miled D.D.B. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, **109**, 743–754.
- [24] Lukic M., Lukic I., Krapac M., Sladanja B. & Plilizot V. (2013). Sterols and triterpenic diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. *Food Chemistry*, **136**, 251–258.
- [25] Machado M., Felizardo C., Fernandes-Silva A.A., Nunes F.M. & Barros A. (2013). Polyphenolic compounds, antioxidant activity and Lphenylalanine ammonia-lyase activity during ripening of olive cv. “Cobrançosa” under different irrigation regimes. *Food Research International*, **51**, 412–421.
- [26] Matos L.C., Cunha S.C., Amaral J.S., Pereira J.A., Andrade P.B., Seabra R.M. & Oliveira B.P.P. (2007). Chemometric characterization of three varietal olive oils (cvs Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana), extracted from olives with different maturation indices. *Food Chemistry*, **102**, 406–414.

- [27] Köseoğlu O., Sevim D. & Kadiroğlu P. (2016). Quality characteristics and antioxidant properties of Turkish monovarietal olive oils regarding stages of olive ripening. *Food Chemistry*, **212**, 628–634.
- [28] Caravaca A.M.G., Pancorbo A.C., Díaz B.C., Carretero D.A.S. & Gutiérrez A.F. (2005). Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*, **26**, 3538–3551.
- [29] Mu T., Chen S., Zhang Y., Chen H., Guo P. & Meng F. (2016). Portable Detection and Quantification of Olive Oil Adulteration by 473-nm Laser-Induced Fluorescence. *Food Analytical Methods*, **9**, 275–279.
- [30] Xiang C., Xu Z., Liu J., Li T., Yang Z. & Ding C. (2017). Quality, composition, and antioxidant activity of virgin olive oil from introduced varieties at Liangshan. *LWT - Food Science and Technology*, **78**, 226–234.
- [31] Esposito S., Taticchi A., Urbani S., Selvaggini R., Veneziani G., Di Maio I., Sordini B. & Servili M. (2017). Effect of light exposure on the quality of extra virgin olive oils according to their chemical composition. *Food Chemistry*, **229**, 726–733.
- [32] Servili M., Sordini B., Esposito S., Urbani S., Veneziani G., Di Maio I., Selvaggini R. & Taticchi A. (2014). Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*, **3**, 1–23.
- [33] Cicerale S., Lucas L.J. & Keast R.S.J. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 129–135.
- [34] Lara-Ortega F.J., López B.G., Cambra M.B. & Molina-Díaz A. (2018). Multicommuted Flow Injection Analysis Using Chemiluminescence Detection (MCFIA-CL) for Olive Oil Analysis. *Food Analytical Methods*, **11**, 1804–1814.
- [35] Kouka P., Priftis A., Stagos D., Angelis A., Stathopoulos P., Xinos N., Skaltsounis A.-L., Mamoulakis C., Tsatsakis A.M., Spandidos D.A. & Kouretas D. (2017). Assessment of the antioxidant activity of an olive oil total polyphenolic fraction and hydroxytyrosol from a Greek *Olea europaea* variety in endothelial cells and myoblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, **40**, 703–712.

- [36] Andrewes P., Busch J.L.H.C., De Joode T., Groenewegen A. & Alexandre H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1415–1420.
- [37] European Commission EC (1991) Commission Regulation (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991. On characteristics of olive oil and olive residue oil and on the relevant methods of analysis.
- [38] Alvarenga B.R., Xavier F.A.N., Soares F.L.F. & Carneiro R.L. (2018). Thermal Stability Assessment of Vegetable Oils by Raman Spectroscopy and Chemometrics. *Food Analytical Methods*, **11**, 1969–1976.
- [39] Bajoub A., Bendini A., Fernández-Gutiérrez A. & Carrasco-Pancorbo A. (2018). Olive oil authentication: A comparative analysis of regulatory frameworks with especial emphasis on quality and authenticity indices, and recent analytical techniques developed for their assessment. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **58**, 832–857.
- [40] Alajtal A.I., Sherami F.E. & Elbagermi M.A. (2018). Acid, Peroxide, Ester and Saponification Values for Some Vegetable Oils Before and After Frying. *AASCIT Journal of Materials*, **4**(2), 43–47.
- [41] Ministerstvo Zdravotnictví ČR, Český lékopis 2009 – Doplněk 2013. Praha: Grada Publishing a.s., 2013. ISBN 978-80-247-4679-1.
- [42] Hálková J., Rumíšková M. & Rieglová J. (2001). Analýza potravin: laboratorní cvičení. 2. vydání, Újezd u Brna. Vydavatel: Ivan Straka. ISBN 80-86494-02-0.
- [43] Gray J. I. (1978). Measurement of Lipid Oxidation: A Review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **55**(6), 539–546.
- [44] Marina A.M., Wan Rosli W.I. & Noorhidayah M. (2013). Quantitative Analysis of Peroxide Value in Virgin Coconut Oil by ATR-FTIR Spectroscopy. *The Open Conference Proceedings Journal*, **4**(2), 53–56.
- [45] McClements D.J. & Decker E.A. (2008). Chapter 4: Lipids. In Damodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R. (Eds.), *Fennema's Food Chemistry*. Fourth edition. CRC Taylor Press, UK. ISBN 08-493-9272-1.

- [46] Shahidi F. & Zhong Y. (2007). Lipid Oxidation: Measurement Methods, **6(6)**, 357–385. In Shahidi F. (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Part 1: Edible Oil & Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA. ISBN 9780471384601.
- [47] Labrinea E.P., Thomaidis N.S. & Georgiou C.A. (2001). Direct Olive Oil Anisidine Value Determination by Flow Injection. *Analytica Chimica Acta*, **448**, 201–206.
- [48] Nařízení komise v přenesené pravomoci (EU) 2016/2095 ze dne 26. září 2016, kterým se mění nařízení (EHS) č. 2568/91 o charakteristikách olivového oleje a olivového oleje z pokrutin a o příslušných metodách analýzy. Úřední věstník Evropské unie.
- [49] Gopinath A., Puhan S. & Nagarajan G. (2009). Theoretical modeling of iodine value and saponification value of biodiesel fuels from their fatty acid composition. *Renewable Energy*, **34(7)**, 1806–1811.
- [50] Moore J.C., Spink J. & Lipp M. (2012). Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, **77**, 118–126.
- [51] Laroussi-Mezghani S., Vanloot P., Molinet J., Dupuy N., Hammami M., Grati-Kamoun N. & Artaud J. (2015). Authentication of Tunisian virgin olive oils by chemometric analysis of fatty acid compositions and NIR spectra. Comparison with Maghrebian and French virgin olive oils. *Food Chemistry*, **173**, 122–132.
- [52] Longobardi F., Ventrella A., Casiello G., Sacco D., Catucci L., Agostiano A. & Kontominas M.G. (2012). Instrumental and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Apulian virgin olive oils. *Food Chemistry*, **133**, 579–584.
- [53] Arslan D., Karabekir Y. & Schreiner M. (2013). Variations of phenolic compounds, fatty acids and some qualitative characteristics of Sariulak olive oil as induced by growing area. *Food Research International*, **54**, 1897–1906.
- [54] Verónica C.S., de los Ángeles F.M., Claudio R.G. & Fernanda S.M. (2014). Analysis of phenolic compounds in onion nectar by miniaturized off-line solid phase extraction capillary zone electrophoresis. *Analytical Methods*, **6(13)**, 4878–4884.

- [55] Pyrzynska K. & Biesaga M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, **28**(7), 893-902.
- [56] de Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C. & Brinkman U.A.T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, **1112**, 31–63.
- [57] Escriche I., Kadar M., Juan-Borrás M. & Domenech E. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*, **142**, 135–143.
- [58] Marini F., D'Aloise A., Bucci R., Buiarelli F., Magrì A.L. & Magrì A.D. (2011). Fast analysis of 4 phenolic acids in olive oil by HPLC-DAD and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **106**, 142–149.
- [59] da Rosa Neng N., Sequeiros R.C.P. & Florencio Nogueira J.M. (2014). Combining bar adsorptive microextraction with capillary electrophoresis-Application for the determination of phenolic acids in food matrices. *Electrophoresis*, **35**, 2488–2494.
- [60] Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J. & Nacoulma O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, **91**, 571–577.
- [61] Covas M. I., Nyssönen K., Poulsen H.E., Kaikkonen J., Zunft H.J.F., Kiesewetter H., Gaddi A., de la Torre R., Mursu J., Bäumlér H., Nascetti S., Salonen J.T., Fitó M., Virtanen J. & Marrugat J. (2006). The Effects of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors. *Annals of Internal Medicine*, **145**, 333–341.
- [62] Kalogeropoulos N. & Tsimidou M.Z. (2014). Antioxidants in Greek virgin olive oils. *Antioxidants*, **3**, 387–413.
- [63] Rueda A., Samaniego-Sánchez C., Olalla M., Giménez R., Cabrera-Vique C., Seiquer I. & Lara L. (2016). Combination of Analytical and Chemometric Methods as a Useful Tool for the Characterization of Extra Virgin Argan Oil and Other Edible Virgin Oils. Role of Polyphenols and Tocopherols. *Journal of AOAC International*, **99**, 489–494.

- [64] Michalkiewicz A., Biesaga M. & Pyrzynska K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*, **1187**, 18–24.
- [65] Ferreira I.C.F.R., Aires E., Barreira J.C.M. & Estevinho L.M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, **114**, 1438–1443.
- [66] Silici S., Sagdic O. & Ekici L. (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food Chemistry*, **121**, 238–243.
- [67] Ketterer B. & Coles B. (1991). Glutathione transferases and products of reactive oxygen. In Sies H. (Ed.), *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants*. London, Academic Press, 171–194.
- [68] Evans P.H. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin*, **49**(3), 577–587.
- [69] Halliwell B., Gutteridge J.M.C. & Cross C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **119**(6), 598–620.
- [70] Prior R.L., Wu X. & Schaich K. (2005). Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**(10), 4290–4302.
- [71] Biesaga M. & Pyrzynska K. (2009). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A*, **1216**, 6620–6626.
- [72] Habibi H., Mohammadi A., Farhoodi M. & Jazaeri S. (2018). Application and Optimization of Microwave-Assisted Extraction and Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Oleuropein and Hydroxytyrosol in Olive Pomace. *Food Analytical Methods*, **11**, 3078–3088.

- [73] Yao L., Datta N., Tomás-Barberán F.A., Ferreres F., Martos I. & Singanusong R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, **81**, 159–168.
- [74] Yao L., Jiang Y., Singanusong R., D'Arcy B., Datta N., Caffin N. & Raymont K. (2004). Flavonoids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, **37**, 166–174.
- [75] Kahoun D., Řezková S., Veškrnová K., Královský J. & Holčapek M. (2008). Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. *Journal of Chromatography A*, **1202**, 19–33.
- [76] Alarcón Flores M.I., Romero-Gonzalez R., Garrido Frenich A. & Martinez Vidal J.L. (2012). Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, **134**, 2465–2472.
- [77] Suárez M., Alba M., Romero M.P. & Motilva M.J. (2008). Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, **1214**, 90–99.
- [78] García-Villalba R., Carrasco-Pancorbo A., Oliveras-Ferraros C., Vázquez-Martín A., Menéndez J.A., Segura-Carretero A. & Fernández-Gutiérrez A. (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**, 416–429.
- [79] Boskou D., Tsimidou M. & Blekas G. (2006). Polar Phenolic Compounds. Chapter 5, pp. 73–92. In Boskou D. (Ed.) *Olive Oil Chemistry and Technology*, 2nd edn, Academic Press and AOCS Press, Urbana, Illinois, USA.
- [80] Storniolo C.E., Roselló-Catafau J., Pintó X., Mitjavila M.T. & Moreno J.J. (2014). Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin⁻¹. *Redox Biology*, **2**, 971–977.

- [81] Condelli N., Caruso M.C., Galgano F., Russo D., Milella L. & Favati F. (2015). Prediction of the antioxidant activity of extra virgin olive oils produced in the Mediterranean area. *Food Chemistry*, **177**, 233–239.
- [82] Kiritsakis K., Rodríguez-Pérez C., Gerasopoulos D. & Segura-Carretero A. (2017). Olive oil enrichment in phenolic compounds during malaxation in the presence of olive leaves or olive mill wastewater extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **119**, 1600425.
- [83] Bonoli M., Bendini A., Cerretani L., Lercker G. & Toschi T.G. (2004). Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7026–7032.
- [84] Klikarová J., Rotondo A., Cacciola F., Česlová L., Dugo P., Mondello L. & Rigano F. (2019). The Phenolic Fraction of Italian Extra Virgin Olive Oils: Elucidation Through Combined Liquid Chromatography and NMR Approaches. *Food Analytical Methods*, **12**, 1759–1770.
- [85] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract”(3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, (2011), **9**(4), 2033–2058.
- [86] Nařízení Komise (EU) č. 432/2012 ze dne 16. května 2012, kterým se zřizuje seznam schválených zdravotních tvrzení při označování potravin jiných než tvrzení o snížení rizika onemocnění a o vývoji a zdraví dětí. Úřední věstník Evropské unie.
- [87] Jiménez-Sánchez C., Lozano-Sánchez J., Brüggemann M., Neves-Vieira M., Rodriguez-Werner M., Schmalfuß E., Winterhalter P., Segura-Carretero A. & Fernández-Gutiérrez A. (2017). Application and comparison of high-speed countercurrent chromatography and high-performance liquid chromatography in semi-preparative separation of decarboxymethyl

oleuropein aglycone (3,4-DHPEA-EDA), a bioactive secoiridoid from extra-virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **119**, 1500532.

[88] Reboredo-Rodríguez P., Valli E., Bendini A., Di Lecce G., Simal-Gándara J. & Toschi T.G. (2016). A widely used spectrophotometric assay to quantify olive oil biophenols according to the health claim (EU Reg. 432/2012). *European Journal of Lipid Science and Technology*, **118**, 1593–1599.

[89] Cerretani L., Toschi T.G. & Bendini A. (2009). Phenolic fraction of virgin olive oil: An overview on identified compounds and analytical methods for their determination. *Functional Plant Science and Biotechnology*, **3**(1), 69–80.

[90] Mohamed M.B., Rocchetti G., Montesano D., Ali S. B., Guasmi F., Grati-Kamoun N. & Lucini L. (2018). Discrimination of Tunisian and Italian extra-virgin olive oils according to their phenolic and sterolic fingerprints. *Food Research International*, **106**, 920–927.

[91] Karabagias I., Michos C., Badeka A., Kontakos S., Stratis I. & Kontominas M.G. (2013). Classification of Western Greek virgin olive oils according to geographical origin based on chromatographic, spectroscopic, conventional and chemometric analyses. *Food Research International*, **54**(2), 1950–1958.

[92] Olmo-García L., Bajoub A, Monasterio R.P., Fernández-Gutiérrez A. & Carrasco-Pancorbo A. (2017). Metabolic profiling approach to determine phenolic compounds of virgin olive oil by direct injection and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Chemistry*, **231**, 374–385.

[93] Reddy G.N.M., Mannina L., Sobolev A.P. & Caldarelli S. (2018). Polyphenols Fingerprinting in Olive Oils Through Maximum-Quantum NMR Spectroscopy. *Food Analytical Methods*, **11**, 1012–1020.

[94] Mastralexi A., Nenadis N. & Tsimidou M.Z. (2014). Addressing analytical requirements to support health claims on “olive oil polyphenols” (EC Regulation 432/2012). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 2459–2461.

[95] Bazzu G., Molinu M.G., Dore A. & Serra P.A. (2017). Microdialysis as a New Technique for Extracting Phenolic Compounds from Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**, 1829–1835.

- [96] Celano R., Piccinelli A.L., Pugliese A., Carabetta S., Di Sanzo R., Rastrelli L. & Russo M. (2018). Insights into Analysis of Phenolic Secoiridoids in Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 6053–6063.
- [97] Bayram B., Esatbeyoglu T., Schulze N., Ozcelik B., Frank J. & Rimbach G. (2012). Comprehensive Analysis of Polyphenols in 55 Extra Virgin Olive Oils by HPLC-ECD and Their Correlation with Antioxidant Activities. *Plant Foods for Human Nutrition*, **67**, 326–336.
- [98] Christophoridou S., Dais P., Tseng L.H. & Spraul M. (2005). Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high-performance liquid chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(12), 4667–4679.
- [99] Pérez-Trujillo M., Gómez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. & Parella T. (2010). Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from *Olea europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 9129–9136.
- [100] Rotondo A., Salvo A., Gallo V., Rastrelli L. & Dugo G. (2017). Quick unreferenced NMR quantification of squalene in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **119**, 1700151.
- [101] Pauli G.F., Jaki B.U. & Lankin D.C. (2005). Quantitative ^1H NMR: development and potential of a method for natural products analysis. *Journal of Natural Products*, **68**, 133–149.
- [102] D’Imperio M., Mannina L., Capitani D., Bidet O., Rossi E., Bucarelli F.M., Quaglia G.B. & Segre A. (2007). NMR and statistical study of olive oils from Lazio: A geographical, ecological and agronomic characterization. *Food Chemistry*, **105**, 1256–1267.
- [103] Monakhova Y.B., Kuballa T. & Lachenmeier D.W. (2013). Chemometric methods in NMR spectroscopic analysis of food products. *Journal of Analytical Chemistry*, **68**, 755–766.
- [104] Salvo A., Rotondo A., La Torre G.L., Cicero N. & Dugo G. (2017). Determination of 1,2/1,3-diglycerides in Sicilian extra-virgin olive oils by ^1H -NMR over a one-year storage period. *Natural Product Research*, **31**, 822–828.

- [105] Rotondo A., Salvo A., Giuffrida D., Dugo G. & Rotondo E. (2011). NMR analysis of aldehydes in Sicilian extra-virgin olive oils by DDPFGSE techniques. *Atti Della Accademia Peloritana Dei Pericolanti Classe Di Scienze Fisiche, Matematiche E Naturali*, **89**, C1A8901002-(1-7).
- [106] Dugo G., Rotondo A., Mallamace D., Cicero N., Salvo A., Rotondo E. & Corsaro C. (2015). Enhanced detection of aldehydes in extra-virgin olive oil by means of band selective NMR spectroscopy. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, **420**, 258–264.
- [107] Diamantakos P., Velkou A., Killday K.B., Gimisis T., Melliou E. & Magiatis P. (2015). Oleokoronol and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra virgin olive oil. *Olivae*, **122**, 22–33.
- [108] Karkoula E., Skantzari A., Melliou E. & Magiatis P. (2014). Quantitative measurement of major secoiridoid derivatives in olive oil using qNMR. Proof of the artificial formation of aldehydic oleuropein and ligstroside aglycon isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 600–607.
- [109] Klikarová J., Česlová L., Kalendová P., Dugo P., Mondello L. & Cacciola F. (2020). Evaluation of Italian Extra Virgin Olive Oils Based on the Phenolic Compounds Composition Using Multivariate Statistical Methods. *European Food Research and Technology*, **246**, 1241–1249.
- [110] Ricciutelli M., Marconi S., Boarelli M.C., Caprioli G., Sagratini G., Ballini R. & Fiorini D. (2017). Olive oil polyphenols: A quantitative method by high-performance liquid-chromatography-diode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim. *Journal of Chromatography A*, **1481**, 53–63.
- [111] Cacciola F., Beccaria M., Oteri M., Utczas M., Giuffrida D., Cicero N., Dugo G., Dugo P. & Mondello L. (2016). Chemical characterization of old cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) seed oil by liquid chromatography and different spectroscopic detection system. *Natural Product Research*, **30**, 1646–1654.
- [112] Rotondo A., Mannina L., & Salvo A. (2019). Multiple assignment recovered analysis (MARA) NMR for a direct food labelling: the case study of olive oils. *Food Analytical Methods*, **12**, 1238–1245.

- [113] Girelli C.R., Del Coco L. & Fanizzi F.P. (2015). ¹H NMR spectroscopy and multivariate analysis as possible tool to assess cultivars, from specific geographical areas, in EVOOs. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **118**, 1380–1388.
- [114] Šilarová P., Česlová L. & Meloun M. (2017). Fast gradient HPLC/MS separation of phenolics in green tea to monitor their degradation. *Food Chemistry*, **237**, 471–480.
- [115] Impellizzeri J. & Lin J. (2006). A simple high-performance liquid chromatography method for the determination of throat-burning oleocanthal with probated antiinflammatory activity in extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3204–3208.
- [116] Montedoro G.F., Servili G., Baldioli M. & Miniati E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 1571–1576.
- [117] Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E. & Macchioni A. (1993). Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 2228–2234.
- [118] de Nino A., Di Donna L., Mazzotti F., Muzzalupo E., Perri E., Sindona G. & Tagarelli A. (2005). Absolute method for the assay of oleuropein in olive oils by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **77**, 5961–5964.
- [119] Bajoub A., Pacchiarotta T., Hurtado-Fernández E., Olmo-García L., García-Villalba R., Fernández-Gutiérrez A., Mayboroda O.A. & Carrasco-Pancorbo A. (2016). Comparing two metabolic profiling approaches (liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry) for extra-virgin olive oil phenolic compounds analysis: A botanical classification perspective. *Journal of Chromatography A*, **1428**, 267–279.
- [120] Olmo-García L., Polari J.J., Li X., Bajoub A., Fernández-Gutiérrez A., Wang S.C. & Carrasco-Pancorbo A. (2018). Deep insight into the minor fraction of virgin olive oil by using LC-MS and GC-MS multi-class methodologies. *Food Chemistry*, **261**, 184–193.

- [121] Ruiz-Aracama A., Goicoechea E. & Guillén M.D. (2017). Direct study of minor extra-virgin olive oil components without any sample modification. ^1H NMR multisuppression experiment: a powerful tool. *Food Chemistry*, **228**, 301–314.
- [122] Ammar S., Kelebek H., Zribi A., Abichou M., Selli S. & Bouaziz M. (2016). LC-DAD/ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Tunisian extra-virgin olive oils: effect of olive leaves addition on chemical composition. *Food Research International*, **100**, 477–485.
- [123] Di Vaio C., Nocerino S., Paduano A. & Sacchi R. (2012). Influence of some environmental factors on drupe maturation and olive oil composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93**, 1134–1139.
- [124] Inglese P., Famiani F., Galvano F., Servili M., Esposito S. & Urbani S. (2011). Factors Affecting Extra-Virgin Olive Oil Composition. *Horticultural Reviews*, **38**, 83–147.
- [125] Ripa V., De Rose F., Caravita M.A., Parise M.R., Perri E., Rosati A., Pandolfi S., Paoletti A., Pannelli G., Padula G., Giordani E., Bellini E., Buccoliero A. & Mennone C. (2008). Qualitative evaluation of olive oils from new olive selections and effects of genotype and environment on oil quality. *Advances in Horticultural Science*, **22**(2), 95–103.
- [126] Servili M. & Montedoro G.F. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 602–613.
- [127] Servili M., Selvaggini R., Esposito S., Taticchi A., Montedoro G.F. & Morozzi G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 113–127.
- [128] Esti M., Cinquanta L. & La Notte E. (1998). Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 32–35.
- [129] Gucci R., Servili M., Esposito S. & Selvaggini R. (2004). Oil quality of olive cv. 'Leccino' grown under irrigated or dry-farmed conditions. *Acta Horticulturae*, **664**, 297–302.

2 AMINOKYSELINY V NÁPOJÍCH

2.1 AMINOKYSELINY

2.1.1 Základní charakteristika, dělení a vlastnosti

Aminokyseliny (AMK) jsou organické sloučeniny obsahující dvě funkční skupiny: aminovou skupinu $-NH_2$ a karboxylovou skupinu $-COOH$. Tyto funkční skupiny mohou být ve struktuře molekuly vázány na jakýkoli její uhlík. Zvláštním případem jsou pak α -AMK, ve kterých je amino i karboxy skupina vázaná na jednom uhlíkovém atomu (tzv. α -uhlíku) současně. Kromě glycinu mají všechny α -AMK tento uhlík asymetrický (chirální) a vykazují tak optickou aktivitu. Rozlišujeme tedy pravotočivé, *D*-, a levotočivé, *L*-, izomery α -aminokyselin. V přírodě nalezneme více než 300 různých AMK. V naprosté většině případů se jedná o *L*-izomery. Pravotočivé formy se v přírodě vyskytují zcela výjimečně. V biochemii, molekulární biologii a potažmo i v potravinářství je zvláštní pozornost věnována 20 (někdy se uvádí až 23) tzv. proteinogenním *L*- α -AMK, jež jsou stavebními kameny proteinů. Bílkovinná sekvence proteinogenních *L*- α -AMK je dána genetickým kódem a určuje primární strukturu bílkovin. Většinu z těchto AMK si lidské tělo umí samo vyrobit. Výjimkou je 8 tzv. esenciálních AMK (valin, leucin, izoleucin, lysin, methionin, fenylalanin, tryptofan a threonin), které si lidský organismus neumí syntetizovat, a proto musí být jejich fyziologická potřeba pokryta výhradně stravou. Některé AMK, jako je například arginin nebo histidin, je lidské tělo schopné vytvořit jen v určitém množství. Pro zdravého, dospělého jedince je tato syntéza dostatečná, nicméně v období růstu (obzvláště tedy v dětství) či při výskytu některých onemocnění jsou nároky na jejich příjem vyšší, a je tedy nezbytné je externě doplňovat. Takové AMK pak nazýváme semiesenciální. Je třeba zmínit, že pro správnou fyziologii a funkci buněk, a tím i pro správný chod organismu, musí být denně v dostatečném množství k dispozici všech 20 proteinogenních AMK, včetně jejich metabolitů. AMK totiž nelze konzumovat „do zásoby“. V organismu se neskladují, jejich přebytek tělo deaminuje a vyloučí močí. Na druhou stranu si ale musíme dát pozor na jejich nadměrnou konzumaci, která znamená obrovskou zátěž pro organismus. AMK dostáváme do těla především ve formě bílkovin. Metabolismus bílkovin je energeticky velmi náročný proces vyžadující zapojení mnoha složek. Kromě nezbytných minerálů (zinek a vápník), enzymů (pepsin) a vitamínů (B-komplex) jsou do metabolismu významně zahrnuty i mnohé orgány jako ledviny, játra a žaludek. Ačkoli každá AMK má svou unikátní katabolickou

dráhu, jejich produkty jsou převážně společné. Mezi ně patří například amoniak, oxid uhličitý, mastné kyseliny s dlouhým i krátkým řetězcem, glukóza, sulfan, ketony, oxid dusnatý, močovina, kyselina močová, polyaminy a další dusíkaté látky. Při nadměrné konzumaci bílkovin pak musí organismus pracovat s vysokým nadbytkem těchto meziproductů a odpadních látek, což má za následek mnoho zdravotních komplikací, jako je zhoršení růstu a vývoje, výskyt dny, aterosklerózy, akné a trávicích potíží, poškození ledvin, zvýšení množství podkožního tuku, tvorbu nebezpečných nitrosaminů a biogenních aminů, narušení homeostázy celého těla a vyčerpání zmíněných vitamínů a minerálů, jejichž nedostatek (deficience) či úplná nepřítomnost (absence) způsobuje další chorobné stavy, jako je osteoporóza apod. V extrémních případech může dojít dokonce i ke smrti. Denní příjem AMK musí být tedy vyvážený.

Biochemické a fyzikální vlastnosti *L-α*-AMK souvisí s charakterem postranního řetězce α -uhlíku, který definuje i jejich následnou klasifikaci. Rozeznáváme AMK polární či nepolární, alifatické či aromatické a kyselé či bazické. Běžně se můžeme setkat i s přízvisky sirné, heterocyklické či sekundární. AMK mají nezaměnitelnou funkci v lidském těle. Zatímco proteinogenní *L-α*-AMK jsou známy zejména jako monomerní jednotky bílkovin a prekurzory hormonů a neurotransmiterů, neproteinogenní α -AMK (např. ornitin, citrulin a homocystein) a β -AMK (např. taurin a β -alanin) mají důležité funkce v buněčném metabolismu. Obecně jsou tedy AMK zásadní pro stavbu organismu a regulaci klíčových metabolických drah, jež jsou nezbytné pro růst, reprodukci a imunitu organismu [1–5]. Mimo fyziologii se pak AMK uplatňují například v potravinářství, kde se významně podílejí na tvorbě aroma, barvy a chuti potravin [1,6,7].

2.1.2 Důvody stanovení

Efektivní, rychlá a snadná detekce AMK je nezbytná v různých medicínských a potravinářských vzorcích. Denní příjem jednotlivých AMK a jejich následná koncentrace v lidském těle významně ovlivňují stav organismu. Dysbalance AMK může způsobit metabolickou nerovnováhu, acidózu, gastrointestinální poruchy, neurologické problémy, onemocnění ledvin a sepsi. U novorozenců můžeme pomocí screeningu AMK dostatečně včas identifikovat vážné dědičné monogenní poruchy zdánlivě zdravých dětí, které tak mohou být léčeny dříve, než se projeví jejich klinické symptomy. Kvantitativní i kvalitativní stanovení AMK v klinických vzorcích plazmy, séra a moči je tedy velmi důležité pro všechny věkové kategorie [2,6].

Neméně důležitá je detekce AMK v potravinářství. Změnou koncentrace AMK při výrobním procesu se sleduje například průběh fermentace či zrání [7]. Kromě toho, spotřebitelé stále více tlačí na kvalitu a nutriční hodnotu potravin, která je mimo jiné dána právě složením a množstvím přítomných AMK. Produkce některých potravin je navíc spojena s určitou zeměpisnou polohou či výrobním postupem, dle kterých je následně určena jejich pravost a prodejní cena. Potravin, u kterých byl zaměněn jejich botanický či zeměpisný původ, jsou tedy rovněž považovány za falšované. Právě znalost profilu AMK může být v mnoha případech nástrojem pro odhalení falšování potravin ve smyslu použití nevhodné, nekvalitní či dokonce zakázané suroviny. Toho se mimo jiné využívá například při analýzách medů a medovin, kdy se pomocí AMK zjišťuje nejen jejich původ, ale také kvalita použitých surovin a dodržení výrobního procesu. Profil AMK může být v tomto případě významně ovlivněn tepelným zpracováním a nevhodným skladováním medů/medovin, během nichž dochází k reakcím karbonylové skupiny redukujícího cukru s volnou aminoskupinou AMK, peptidů nebo proteinů. Tyto reakce s sebou nesou úbytek jednotlivých AMK, který navíc není kvůli jejich odlišné reaktivitě úměrný [8,9]. I přes tyto komplikace bylo zjištěno, že pro určení botanického původu medu je velmi efektivní kvalitativní a kvantitativní analýza proteinogenních i neproteinogenních AMK. Z proteinogenních AMK to je především alanin, asparagin, glutamin, glycin, histidin, fenylalanin, prolin, serin a tryptofan. Z neproteinogenních se pak často stanovuje β -alanin, kyselina γ -aminomáselná nebo ornitin [8].

V potravinách a biologických materiálech je navíc důležité monitorovat nejen vlastní AMK, ale i jejich škodlivé deriváty. Mezi ně patří zejména biogenní aminy, které vznikají dekarboxylací AMK. Biogenní aminy mají vysokou biologickou aktivitu. Mohou být prekurzory neurotransmiterů, hormonů a vitamínů a zásadně podporují růst tkání, čímž ale na druhou stranu přispívají i k rozvoji nádorových buněk. Některé z nich, jako například putrescin, kadaverin, tyramin, histamin, spermin a spermidin, jsou ale považovány za toxické, jelikož snadno reagují s dusitany za vzniku karcinogenních heterocyklických nitrosaminů [10,11]. Jejich hromadění v těle je spojeno s patologickými stavy, jako jsou bolesti hlavy, migrény, alergické reakce, dýchací potíže, hypo- nebo hypertenze, bušení srdce, nevolnost a jiné zažívací problémy [2,11,12]. Biogenní aminy však slouží také k indikaci mikrobiologického zkažení potravin [2,13]. V melisopalynologii (obor zabývající se studiem pylu v medu) mohou být využity pro kontrolu provozních podmínek a stanovení botanického původu [11]. Jejich stanovení je tedy zajímavé jak kvůli jejich možné toxicitě a zdravotním důsledkům, tak díky jejich úloze potenciálních indikátorů kvality a čerstvosti potravinářských

výrobků [10]. Z tohoto důvodu si organizace EFSA vyžádala kontroly přítomnosti biogenních aminů (histaminu, tyraminu a dalších) v potravinách a fermentovaných nápojích, tedy i v medovinách [2].

2.1.3 Metody stanovení

Screening AMK a sloučenin od nich odvozených se díky jejich obrovskému významu stal nedílnou součástí současné vědy. Ideální analytická metoda jejich stanovení by měla být rychlá, vysoce citlivá (v jednotkách pikomolů) a s velkou lineární odezvou. Při použití derivatizace by daná metoda měla navíc poskytovat stabilní a rychle se tvořící deriváty reagující s aminovou i iminovou funkční skupinou, a to bez rušivých vedlejších produktů či meziproductů [14].

Stanovení AMK je primárně založeno na separačních technikách, jako je HPLC, CE nebo GC, jež mohou být za účelem zvýšení citlivosti, selektivity a identifikační schopnosti kombinované s hmotnostním spektrometrem. Porovnááme-li četnost použití jednotlivých separačních metod v analýze AMK, zjistíme, že GC byla v posledních letech výrazně nahrazena separacemi v kapalných fázích a její použití je v tomto odvětví dnes velmi ojedinělé. CE se vyznačuje vysokou citlivostí, malou spotřebou rozpouštědel a krátkými separacemi, nicméně oproti HPLC vykazuje nižší píkovou kapacitu, která je naprosto klíčovou vlastností pro správné a přesné určení složení komplexních matric. Zařadila se proto až na druhé místo. Dominantní technikou pro stanovení AMK je kvůli jejich strukturní rozmanitosti a vysoké polaritě RP-HPLC analýza se spektrofotometrickou nebo fluorescenční detekcí [2,6,11,13,15]. Tato instrumentace tak nahradila dříve velmi rozšířenou iontově-výměnnou chromatografii spojenou s pulzní amperometrickou, vodivostní nebo spektrofotometrickou detekcí [10,11]. Před vlastní RP-HPLC separací AMK je však zpravidla nutné zařadit kroky přípravy vzorku k analýze, jež zahrnují izolaci AMK a jejich následnou derivatizaci.

Pro izolaci AMK z komplexní matrice můžeme zvolit hned několik extrakčních metod: elektromembránové extrakce, LLE extrakce, elektrodiálýzu, SPE extrakce atd. Právě SPE patronky plněné styren-divinylbenzenem s navázanou kationtově výměnnou stacionární fází se pro zakoncentrování, přečištění a izolaci AMK používají úplně nejčastěji. Tato metoda je jednoduchá, relativně rychlá a umožňuje zpracování velkého množství vzorku [7,8]. Pro účinné oddělení analytů jsou vždy klíčové vlastnosti sorbentů v SPE kolonce. Jelikož mají klasické sorbenty obvykle nízkou selektivitu a adsorpční kapacitu, vyvíjejí se nové,

selektivnější sorbenty, jako jsou molekulově imprintované polymery (MIP). Jejich příprava tkví v polymeraci monomerů navázaných v přítomnosti síťovacího činidla kovalentní nebo nekovalentní vazbou na templát a následné přerušení této interakce odstraněním templátu z polymerní matrice, čímž dojde k vytvoření selektivních vazebných míst pro cílový analyt či jemu strukturně podobné látky. MIP cílené na AMK byly poprvé připraveny v roce 1972 pomocí vysoce selektivního kovalentně imprintovaného polysacharidu. MIP však můžeme připravit mnoha polymeračními technikami za využití různých látek. Používají se polymerace precipitační, suspenzní, blokové, sol-gel, povrchové či metoda jedno- nebo více-stepňového bobtnání s následnou polymerací. Nevýhodami MIP jsou zdlouhavé syntetické kroky, možné vymývání templátů, nízká vazebná kapacita a pomalý přenos hmoty. Tyto nedostatky byly úspěšně vyřešeny použitím modernější techniky D-MIP, při níž jsou jako templáty použity strukturní analogy testovaných sloučenin, takzvané „dummy“ templáty. MIP jsou zde naroubovány na povrch pevných nosičů, jako jsou například nanočástice magnetitu, kvantové tečky, uhlíkové nanotrubičky nebo částice silikagelu, které jsou díky své stabilitě při vysokých teplotách a nízkém pH oblíbeným materiálem. Upevněním MIP byla analytům zvýšena dostupnost dutin, čímž se zároveň zlepšila i rychlost přenosu hmoty. Správně zvolený a připravený D-MIP má pak velmi vysokou selektivitu, kapacitu a citlivost [16–22].

Jelikož AMK postrádají ve své struktuře chromofor či fluorofor, je jejich přímé a zároveň dostatečně citlivé stanovení pomocí HPLC s UV-VIS či fluorimetrickou detekcí značně obtížné. Před samotnou detekcí je proto nutné provést derivatizační krok, který AMK převede na jejich absorbující či fluoreskující deriváty. Přestože derivatizace může být provedena v jakékoli fázi analýzy vzorku, včetně jeho přípravy, dávkování, separace či těsně před detekcí, nejčastěji se setkáme s předkolonovou derivatizací AMK mimo chromatografický systém [1,6]. V současné době na trhu najdeme velké množství různých derivatizačních činidel, které se používají buď samostatně, nebo se dají různě kombinovat mezi sebou. Mezi tradiční činidla patří např. ninhydrin, dansylchlorid (DNS-Cl), *o*-ftaldialdehyd (OPA), fenylisothiokyanát (PITC) a i o něco modernější 9-fluorenylmethylchlorformiát (Fmoc-Cl), dabsylchlorid (DBS-Cl) nebo diethyl-ethoxymetylenmalonát (DEEMM) [1,6]. Nedávno byly navrženy nové reagenty, které se snaží překonat ty klasické. Mezi nimi můžeme zmínit činidla 4'-(*N,N*-dimethylamino) azobenzen-4-sulfonylchlorid (DABS-Cl), 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-*N*-chinolin-6-ylkarbamát (AQC) nebo 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-naftalen-1-ylacetát (SINA) [1]. Každé derivatizační činidlo, ať už tradiční či moderní, má vždy své výhody i nevýhody, které musí být před jeho výběrem

důkladně zváženy [1]. Charakteristika nejčastěji používaných derivatizačních činidel bude uvedena v následujících odstavcích.

Pravděpodobně nejrozšířenější derivatizační činidlo pro chromatografické stanovení primárních aminokyselin a biogenních aminů je OPA, jenž bylo poprvé popsáno již v roce 1971 [10]. OPA disponuje celou řadou výhod: jednoduchost a rychlost reakce, která probíhá okamžitě (do 1 min) i při teplotě místnosti, vysoká citlivost připravených fluoreskujících derivátů (pikomoly) detekovatelných při vlnových délkách excitace 335–340 nm a emise 425–440 nm, a v neposlední řadě neschopnost fluorescence samotného OPA činidla, které by komplikovalo interpretaci chromatografických dat. Na druhou stranu nereaguje se sekundárními aminoskupinami (prolin či hydroxyprolin) a není tedy vhodné pro vzorky, které je obsahují. Pro reakci s OPA je navíc klíčové alkalické pH a přítomnost redukčního činidla obsahujícího thiol. Nejčastěji se využívá merkptoetanol neboli ethanthiol. Reakcí OPA s AMK v přítomnosti merkptoetanolu vznikají deriváty isoindolu, které ovšem nejsou příliš stabilní a musí se s nimi pracovat velmi rychle. Stabilnější deriváty pak poskytují objemnější thioly jako je N-acetyl-L-cystein nebo kyselina 3-merkptopropionová. Přestože se derivatizace OPA činidlem obvykle provádí v systému před kolonou, a to i automatizovaně přímo v dávkovací smyčce [1,10,11,14,23,24], postkolonová derivatizace není výjimkou a pro méně stabilní deriváty je dokonce i jedinou možností [25,26]. Aplikace OPA je velmi rozšířená i v klinických a nutričních studiích [1].

DNS-Cl je velmi rozšířené činidlo poskytující značně stabilní a citlivé (pikomoly) fluoreskující deriváty detekovatelné při excitační vlnové délce 286–293 nm a emisní vlnové délce 492 nm. Reakce DNS-Cl s AMK vyžaduje vysokou teplotu a dlouhou reakční dobu, a proto se používá výhradně pro předkolonovou derivatizaci. Další nevýhodou je jeho nespecifita. DNS-Cl totiž reaguje nejen s primárními a sekundárními aminy [12,13,23,26], ale také s fenoly, alifatickými alkoholy a některými cukry [23]. Většina AMK navíc produkuje více než jeden derivát, což zásadně komplikuje chromatografickou separaci a kvantitativní stanovení [14]. Problémem jsou i početné hydrolyzní fluoreskující produkty, které často překrývají samotné píky derivátů AMK [26]. Tvorbu těchto produktů však můžeme zredukovat použitím minimálního množství DNS-Cl, extrahováním hotových derivátů systémem kapalina-kapalina nebo kapalina-pevná látka či reakcí přebytku DNS-Cl s AMK přidanou do reakčního systému [26].

PITC činidlo reaguje rovněž s primárními i sekundárními aminy za vzniku velmi stabilních derivátů fenylothiokarbamylu AMK absorbujících při 254 nm a detekčními limity

v jednotkách pikomolů, avšak oproti DNS-Cl činidlu nedochází k tvorbě rušivých vedlejších produktů [14,22,27–31]. Hlavní nevýhody PITC činidla jsou obvykle nezbytné vícestupňové sušící kroky během derivatizace, což nejen významně prodloužuje čas potřebný k přípravě derivátu, ale následně to ovlivňuje i reprodukovatelnost metody [14]. Stejně jako OPA je i PITC činidlo stále velmi rozšířené pro analýzy biologických a potravinářských vzorků [1].

AQC je moderní, komerčně dostupné, předkolumnové derivatizační činidlo, které poskytuje výjimečně stabilní, fluoreskující deriváty detekovatelné při vlnových délkách excitace 250 nm a emise 395 nm. Jelikož deriváty zůstávají beze změny po dobu minimálně jednoho týdne, s oblibou se používá v automatizovaných analýzách [1,32]. Jediným významným reakčním meziproduktem je 6-aminochinolin, který rovněž fluoreskuje, avšak stanovení obvykle nijak výrazně neruší. Přestože reakce AMK s činidlem AQC vyžaduje zvýšenou teplotu a delší reakční dobu (minimálně 15 min), nabývá tato technika stále na popularitě [10].

Velmi oblíbeným a dnes již tradičním činidlem předkolumnové derivatizace AMK je FMOC-Cl, který reaguje s primárními, sekundárními i terciálními aminy za vzniku velmi stabilních fluoreskujících sloučenin [10,14,23], které se detekují při vlnové délce excitace 263 nm a emise 313 nm [1]. Obrovskou nevýhodou je fluorescence již samotného činidla a tvorba mnoha vedlejších, rovněž fluoreskujících produktů, které zásadně ztěžují separaci a velmi ovlivňují rozlišení a kvalitu chromatogramu [10,14].

Poměrně nové, avšak již komerčně dostupné, je i činidlo DEEMM, které poskytuje deriváty AMK absorbující v UV oblasti při 280 nm [1,33]. DEEMM by mohl být považován za optimální derivatizační činidlo, jelikož poskytuje podobné hodnoty limitů detekce a limitů kvantifikace jako nově syntetizovaná činidla, avšak na rozdíl od nich vykazuje i dobrou chromatografickou separaci, velký lineární rozsah a stabilitu vůči vlivu matrice. Jedinou nevýhodou je delší reakční čas (1 den) a tvorba nestabilního derivátu s prolinem, který tak vykazuje i vyšší hodnoty LoD a LoQ [34].

Většina těchto klasických derivatizačních činidel je kompatibilní i při použití hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS). Nicméně během posledních let byly vyvinuty speciální derivatizační činidla pro ESI-MS detekci, jako je 2,5-dioxypyrrolidin-1-yl-N-[tris(pyrrolidin-1-yl)fosforanylidenamino]karbamát (FOSF), 4-(2,5-dioxypyrrolidin-1-yl)oxykarbonylamino) fenytrimetylamonium jodid (TAHS) a 2,5-dioxypyrrolidin-1-yl-N-pyridin-3-ylkarbamát (APDS). Deriváty těchto činidel jsou lépe ionizovatelné, poskytují velmi stabilní signál a charakteristickou fragmentaci během tandemové hmotnostní analýzy a mají vysokou molekulovou hmotnost, což umožňuje

selektivnější detekci [6]. Tato nová činidla (TAHS, FOSF) sice nabízejí oproti klasickým derivatizačním činidlům (DNS, FMOC-Cl, DEEMM) nižší limity detekce a kvantifikace, avšak stále nejsou komerčně dostupná a vykazují horší chromatografickou separaci a nižší lineární rozsah. Za naprosto nejcitlivější činidlo je s hodnotou $LOQ \leq 117$ fmol považován TAHS [34]. Nedávno bylo prezentováno i přímé stanovení nederivatizovaných AMK pomocí kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS), jejíž instrumentace je bohužel velmi finančně náročná. Aplikace HPLC-MS/MS na potravinářské produkty je navíc stále ještě dost omezená [10,11]. Obrovskou nevýhodou MS techniky (obzvláště pak ve spojení s HPLC) je její vysoká pořizovací a provozní cena a také velký vliv matričních efektů, který je třeba maximálně minimalizovat či v lepším případě úplně odstranit. Během ionizace totiž může matrice vzorku zeslabit nebo zesílit ionizaci analytu, čímž pak zásadně ovlivní kvantitativní stanovení daného analytu ve vzorku. Ačkoli přesný mechanismus účinků matrice není znám, může být způsoben konkurenčním bojem o náboj, přítomností netěkavých přísad, párováním iontů nebo změnou viskozity a povrchového napětí kapiček [6].

Dle použitého činidla vykazuje RP-HPLC analýza derivátů AMK různé stupně citlivosti, robustnosti, selektivity a snadnosti provedení, nicméně podmínky analýzy jsou pro všechna derivatizační činidla obdobné. Pro separaci se nejčastěji používají klasické oktadecyl-silikagelové kolony temperované na teploty 16–45 °C a binární mobilní fáze různých složení s průtoky 0,5–1,5 ml/min. Vodnou mobilní fází tvoří nejčastěji pufr (např. octanový, fosfátový) rozličného pH nebo vodný roztok organické kyseliny (např. mravenčí) o nízké koncentraci. Občas se setkáme i s přidávkou malého množství organického rozpouštědla, jako je tetrahydrofuran nebo metanol (max 20 %, zpravidla však kolem 6 %). Organická mobilní fáze se obvykle skládá z acetonitrilu, metanolu či jejich kombinací, s malými přidávkami vody a případnou úpravou pH pomocí pufru, kyseliny mravenčí či trifluoroctové [1,7,10–14,23,24,26,32,33]. Separace derivátů AMK trvá standardně kolem 60 min a vyžaduje poměrně vysoké průtoky (až 1,8 ml/min). To má za následek velkou spotřebu mobilních fází. Vzhledem k rostoucím pořizovacím cenám vysoce čistých organických rozpouštědel (zejména acetonitrilu) a nákladům spojených s jejich likvidací, a dále kvůli rostoucímu zájmu o problematiku životního prostředí (tzv. zelená chemie) je dnes cílem vyvinout a validovat rychlý a ekonomický způsob rutinní analýzy AMK [10].

2.2 MED A MEDOVINA

2.2.1 Základní charakteristika a složení medu

Med je sladký, velmi chutný produkt vyráběný včelami medonosnými (*Apis mellifera*) z karbohydrátů obsažených ve výměšcích rostlin. Považuje se za jednu z nejkompexnějších přírodních potravin, která obsahuje minimálně 200 různých chemických látek [24,35].

Složení této viskózní kapaliny je kvůli rozdílným geografickým, botanickým a procesním faktorům velmi variabilní. Mezi geografické faktory patří klima, období sběru, zeměpisná poloha a okolní podmínky. Do botanických faktorů se řadí především typ rostlin a přítomnost chemického ošetření. Procesní faktory jsou pak dány hlavně včelařem a délkou a podmínkami skladování [32,35,36]. Hlavní složkou medu je směs karbohydrátů (monosacharidů, oligosacharidů i polysacharidů), z nichž je v největším množství zastoupena fruktóza a glukóza [36,37]. V minoritním množství pak v medu nalezneme aminokyseliny (v zásadě hlavně prolin) a jiné organické kyseliny, bílkoviny, fenolické látky, vitamíny (zejména B1–B6), minerály (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Zn), pigmenty, enzymy (α - a β -glukosidáza, amyláza a oxidáza) a aromáty [36,38–40]. Některé složky medu pocházejí z rostlin, jiné jsou dodávány včelami či vznikají během enzymaticky katalyzovaných biochemických reakcí v průběhu zrání medu. Všechny se pak podílejí na výsledných organoleptických vlastnostech medu [24].

V některých případech se surový med před jeho uvedením do prodeje podrobuje tepelnému zpracování. Tento proces má hned několik důvodů: (a) inhibuje nebo zpomaluje proces krystalizace, (b) eliminuje růst mikroorganismů, a tím následnou kontaminaci, a (c) snižuje viskozitu medu, čímž zjednoduší plnění lahví [39]. Proces zahřívání však může destabilizovat nebo absolutně zničit biologicky aktivní látky, zodpovědné za jeho příznivé účinky na lidské zdraví, a není proto doporučován [41].

2.2.2 Vlastnosti a využití medu

Med má díky svým organoleptickým vlastnostem a vysoké výživové hodnotě široké uplatnění v potravinářském průmyslu. Může být konzumován přímo nebo jako přísada zpracovávaných potravin [35]. Jelikož má med nižší glykemický index než klasický cukr, je oblíbeným sladidlem a zdrojem energie sportovců. Stimuluje navíc sekreci inzulínu, čímž nepřímo snižuje hladinu glukózy v krvi, což do jisté míry ocení i diabetici. Med dále zvyšuje koncentraci hemoglobinu, zlepšuje lipidový profil a má antioxidační, protirakovinové,

protizánětlivé, antimikrobiální, antiaterogenní, antitrombotické, imunomodulační a analgetické účinky. Některé studie také ukázaly, že včelí med snižuje rizikové kardiovaskulární faktory bez zvýšení tělesné hmotnosti [41].

Bylo prokázáno, že med má podobnou antioxidační kapacitu, jako mnoho druhů ovoce a zeleniny. Med inhibuje oxidační reakce, které mohou měnit barvu a chuť potravin. Mezi tyto reakce patří např. enzymatické hnědnutí ovoce a zeleniny, žluknutí a oxidace způsobené světlem, teplem a některými kovy [35,42–45]. Antioxidanty obsažené v medu jsou enzymatického i neenzymatického původu. Zatímco antioxidanty enzymového původu zahrnují glukosaoxidázu, katalázu či peroxidázu, mezi neenzymové antioxidanty patří zejména α -tokoferoly, kyselina askorbová, karotenoidy, některé produkty Maillardových reakcí, proteiny, aminokyseliny či organické kyseliny a dále více než 150 fenolických sloučenin patřících do skupiny flavonoidů, flavonolů, fenolických kyselin, katechinů nebo derivátů kyseliny skořicové [43,46,47]. Antioxidační aktivita jednotlivých medů se velmi liší v závislosti na zpracování, květinovém původu a vnějších faktorech, jako je roční období nebo životní prostředí. Botanický původ však ovlivňuje antioxidační kapacitu nejvíce [44,46,48].

Med není příliš vhodným médiem pro růst mikroorganismů. Výjimku tvoří některé silně osmoresistentní a xerofilní druhy, které jsou schopny růst i při nízkém obsahu vody a vysokém obsahu cukru. Jejich přítomnost je kvůli rozličným kontaminačním zdrojům regionálně závislá. Mezi tyto zdroje patří zejména vzduch, trávící ústrojí včel a nektar a pyl z různých květin [40]. Antibakteriální vlastnosti medu jsou navíc podporovány přítomností peroxidu, lysozymu a fenolických látek. Bohatý koktejl těchto sloučenin dává medu jedinečné vlastnosti, které se dají s výhodou uplatnit v lékařství: med čistí rány, velmi rychle potlačuje zánět a odstraňuje infekce, minimalizuje zjizvení, stimuluje angiogenezi, granulaci tkání a růst epitelu [42–44], snižuje riziko onemocnění srdce, rakoviny, šedého zákalu, předchází zánětlivým onemocněním a podporuje funkci imunitního systému [44]. Lidová léčba včelími produkty dala vznik novému oboru alternativní medicíny zvaného apiterapie. Ačkoli se zdá, že je tento vědní směr doménou moderní doby, med léčil žaludeční vředy, kožní rány a další nemoci či zranění již ve starém Egyptě a Řecku. Med byl používán rovněž preventivně na podporu celkového zdraví a pohody [45]. Jelikož med inhibuje růst patogenů, může být využíván i jako přírodní konzervační činidlo [42–44]. Včelí produkty mají dnes díky svým blahodárným účinkům nenahraditelné místo i v kosmetickém průmyslu [49].

2.2.3 Kvalita a autenticita medu

Chemické, senzorické, fyzikální a mikrobiologické vlastnosti jsou spolu s botanickým a zeměpisným původem hlavními parametry kvality a následné ceny medu. Regulační orgány, potravinářský průmysl, maloobchodníci a v neposlední řadě i spotřebitelé mají tedy obrovský zájem znát autenticitu medů [50,51,52].

Med je vzhledem k jeho delší a složitější výrobě, vysoké nutriční hodnotě a exkluzivní chuti mnohem dražší než jiná sladidla, a proto je za účelem vyšších výdělků producentů velmi často falšován. Nejčastější metodou falšování medu je přidání sacharózy, fruktózy nebo glukózy. Někde je považováno za falšování i krmení včelstev sacharózou [39,41]. Falšování medu je na rozdíl od falšování jiných sladidel poměrně snadné a těžko se odhalí. Z tohoto důvodu se rozhodl mezinárodní orgán Codex Alimentarius spolu s Mezinárodní komisí pro med (IHC) stanovit některé základní požadavky na kvalitu medu a jemu příbuzných produktů [39,41]. Tyto zákony se zabývají senzorickými i fyzikálně-chemickými vlastnostmi medu. Mezi nejdůležitější kritéria patří kyselost medu (pH 3,8–4,7), jeho barva a obsah vlhkosti (≤ 20 %), cukru (70–80 %) a popela (0,1–0,2 %) [36]. Dalšími parametry, které významně ovlivňují nutriční kvalitu, granulaci, chuť a texturu medu, jsou například mikrobiální rozmanitost [40], elektrická vodivost, aktivita diastázy a obsah pesticidů, 5-hydroxymetylfurfuralu a ve vodě nerozpustných pevných látek [33,39,41]. Problematiku však významně komplikuje proměnlivé složení medu v důsledku různých okolních vlivů (teplota), biochemických změn (fermentace) či chemických reakcí (oxidace) vyskytujících se během jeho výroby či skladování [39]. Rozdíly jsou i v jednotlivých typech medů. Medy tmavé barvy obsahují oproti světlým medům například vyšší obsah fenolických látek [44,45], minerálů [53] i živin [54]. Zavedení standardních parametrů, které by komplexně prokazovaly kvalitu všech druhů medu, je tedy téměř nemožné [39].

Botanický původ může být jednoznačně určen pouze u tzv. jednokvětých medů neboli medů pocházejících z pylu jedné rostliny, jelikož vykazují typické senzorické a fyzikálně-chemické vlastnosti. Pro hlavní evropské jednokvěté medy tedy již existují standardy stanovené orgánem IHC. Tyto medy jsou ale ve skutečnosti velmi vzácné, neboť včela se téměř nikdy neživí nektarem jednoho druhu rostliny. Pro určení botanického i zeměpisného původu medu můžeme použít profil těkavých látek, bílkovin, aminokyselin, fenolických látek, organických kyselin, cukrů, ale i minerálních látek, a to za použití různých technik, jako je fluorescenční nebo IR spektroskopie, NMR nebo MS spektrometrie, kombinovaných se separačními metodami [32,39,41]. Nicméně stále neexistují žádné oficiální metody stanovení

geografického nebo botanického původu medu, které by byly svazované vyhláškou EU či jinými orgány [7,8].

2.2.4 Stabilita medu

Nevhodné podmínky zpracování a skladování medu mohou vést k tvorbě nežádoucích produktů v důsledku reakce karbonylové skupiny na redukujícím konci cukrů s volnými aminoskupinami dusíkatých látek. Tato reakce je známá jako tzv. Maillardova reakce neboli reakce neenzymového hnědnutí. Za běžných teplot probíhají Maillardovy reakce jen velmi pomalu. Jejich průběh však významně roste se zvyšující se teplotou. V prvním kroku dochází k vytvoření tzv. amadori produktů, které se následně během skladování přeměňují na makromolekulární pigmenty melanoidiny, čímž se mění nejen složení, ale i organoleptické vlastnosti potravin (barva, chuť, vůně). Obecně Maillardovy reakce snižují nutriční hodnotu potravin, potažmo medu, protože dochází k destrukci esenciálních aminokyselin za vzniku nežádoucích látek. V některých případech jsou však Maillardovy reakce vítané. Mezi ně patří třeba výroba pekařských produktů či pečení masa [2,39].

Nejnámějším kontaminantem medu je bezbarvá organická sloučenina 5-hydroxymetylfurfural (5-HMF). 5-HMF je ve stopových množstvích naprosto neškodný a v minimálních koncentracích ho běžně nalezneme v mnoha potravinách, z nichž můžeme jmenovat například sušenky, marmelády, džusy, alkoholické nápoje nebo právě med. Ve vyšších koncentracích je však 5-HMF toxický. V potravinách se tvoří během delšího skladování nebo při degradaci cukrů (v kyselém prostředí za vyšších teplot). Je rovněž i jedním z meziproduktů Maillardových reakcí. Klíčová složka při tvorbě 5-HMF je 3-deoxyozon, který pochází z 1,2-enolizace a dehydratace glukózy nebo fruktózy. Jelikož množství 5-HMF v medu závisí zejména na jeho tepelném ošetření a délce jeho skladování, může být 5-HMF použit k indikaci čerstvosti či nadměrného záhřevu medu [39,46,55].

2.2.5 Důležité dusíkaté látky v medu

Obsah bílkovin v medu závisí na druhu včel a pohybuje se v rozsahu 0,1–3,3 %. Část proteinů tvoří i významné enzymy, jako je invertáza, α - a β -glukosidáza, kataláza, fosfatáza, glukosaoxidáza a diastázy (α - a β -amylázy) [39].

Aminokyseliny tvoří 1 % (m/m) všech složek medu. Bílkoviny a aminokyseliny přítomné v medu jsou převážně rostlinného původu. Jejich hlavním zdrojem je pyl a mohou tak sloužit pro stanovení botanického původu medu. Některé AMK se však do medu dostávají

prostřednictvím včel. Příkladem takové aminokyseliny je prolin, který je zároveň i nejvíce zastoupenou aminokyselinou v medu. Prolin se do medu dostává ze slinného sekretu včel během přeměny nektaru na med a jeho množství závisí na době, kterou nektar stráví v trávicím ústrojí včely. Představuje 50–85 % celkových aminokyselin medu, a proto slouží jako kritérium pro hodnocení zralosti a kvality medu. Dle legislativy musí být v jednom kilogramu medu minimálně 180 mg prolinu, což je hranice pro zaručení dostatečně kvalitního produktu. Kromě prolinu med obsahuje i další aminokyseliny, z nichž nejběžnější je alanin, kyselina glutamová, fenylalanin, tyrosin, leucin, izoleucin, β -alanin, ornitin nebo kyselina γ -aminomáselná [11,32,33,39].

Kvalitativní i kvantitativní změny volných AMK ve včelích produktech během jejich skladování při pokojové teplotě po dobu 24 měsíců byly studovány kolektivem autorů ze Španělska [9]. Bylo zjištěno, že koncentrace většiny volných AMK se během prvních devíti měsíců skladování výrazně snížila, nicméně po 15 měsících skladování již nebyly pozorovány žádné změny. Výjimkou byla kyselina asparagová, β -alanin a prolin, jejichž obsah během prvních šesti měsíců skladování významně vzrostl. Koncentrace prolinu po této době opět poklesla, zatímco koncentrace kyseliny asparagové klesla až po dvanácti měsících. Obsah β -alaninu se během dalších měsíců již nezměnil [39]. Změny ve složení byly zaznamenány také v medu uchovávaném při různých teplotách po dobu šesti měsíců [56]. Bylo totiž dokázáno, že polyfenoly přítomné v medu mohou být oxidovány na chinony, které následně interagují s bílkovinami za vzniku kovalentní vazby. Tyto interakce jsou zesíleny právě v případě, že je med uchovávan při vysokých teplotách, při nichž dochází k modifikaci struktury a velikosti proteinů [39], a následně vedou k tvorbě komplexu protein-polyfenol [56].

2.2.6 Medovina a její historický původ

Jelikož je včelí med hlavní surovinou pro výrobu medoviny, vykazuje medovina velmi obdobné chemické složení a vlastnosti jako med a pohlížíme na ni podobně i z hlediska hodnocení její kvality, autenticity a původu. Případné rozdíly v jejím složení jsou dány technologickým procesem přípravy, jako je fermentace, tepelné zpracování a skladování [46,55].

Medovina je tradiční alkoholický nápoj, jehož původ sahá až do dávného neolitu [40]. Stále se vedou debaty o tom, zda je nejstarším alkoholickým nápojem pivo, víno nebo právě medovina [54]. Předpokládá se, že výroba medoviny začala v Africe, odkud byla přenesena

přes Středozemní moře do Evropy [35]. Přesné časové období ani místo původu však známy nejsou [54]. Důkazy o konzumaci medoviny nalezneme téměř ve všech starých kulturách [54], které ji obvykle používaly během tradičních oslav a rituálů [57] za účelem zvýšení plodnosti a udržení zdraví [53]. Přestože byla medovina v současnosti z velké části nahrazena pivem a vínem (jsou méně nákladné a jednodušší na přípravu) [54], její konzumace je stále rozšířena celosvětově. Mezi velmi významné spotřebitele patří například Anglie, Polsko, Německo, Slovinsko, Etiopie nebo Jižní Afrika [58].

2.2.7 Výroba medoviny

Tradiční způsob výroby medoviny je jednoduchý. Med je naředěn vodou na výsledný obsah 18–37 % (v/v) a pH je upraveno na hodnoty 3,6–5,5. Dle libosti je možné přidat různá aditiva pro ochucení, obvykle se jedná o bylinné extrakty či ovocné šťávy [35,36,59]. V některých případech je dále nutné medový roztok obohatit o dusíkaté sloučeniny, které jsou klíčové pro správný růst kvasinek. Většinou se pro tento účel používají látky známé pod názvem FAN, jež zahrnují amonné ionty, krátké peptidy (di-, tri-) a aminokyseliny. Někdy se množství dusíkatých látek zvyšuje přidáním pylu, který kromě dusíku dodá i lipidy, vitamíny a minerály [11,36]. Po úpravách a suplementaci následuje u tzv. vařených medovin zahřátí či mírné povaření medového roztoku, čímž se odstraní zákalotvorné bílkoviny a nežádoucí mikroorganismy, které by mohly později zapříčinit nekontrolovanou fermentaci. Dojde tedy ke zvýšení stability výsledného produktu [60]. U tzv. nevařených medovin je tento krok vynechán. U obou technik následuje temperace na teploty 20–35 °C a inokulace medového moštu kmeny osmotolerantních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* nebo jejich směsmi. Fermentační proces končí v momentě, kdy koncentrace zbytkových cukrů klesne pod 5 g/l. V této fázi dochází k přirozenému sycení medoviny oxidem uhličitým [35]. Na závěr se pomocí dekantace, filtrace či centrifugace odstraní nežádoucí zákal a hotový produkt se plní do lahví, pasteruje a uloží k dozrání [35,61].

Jelikož působením vyšších teplot či dokonce vařením medového moštu dochází k degradaci cenných termolabilních látek (např. fenolů, enzymů či vitamínů), k oxidaci, hnědnutí a k významnému nárůstu koncentrace 5-HMF, byly již vyvinuté nové, avšak technologicky náročnější metody produkce medoviny bez použití zvýšených teplot (výroba nevařených medovin). Tyto moderní metody však obvykle vyžadují dlouhé fermentační doby, během nichž může dojít k tvorbě nežádoucích pachutí, a dále složitější odstranění zákalu [54,60,62]. Jako alternativa vařené i nevařené medoviny vznikla v současnosti metoda

využívající velmi rychlého zahřátí medového moštu na vysokou teplotu působící naprosto minimální dobu, obvykle kolem 30 s. Tento způsob přináší veškeré výhody tepelné úpravy medu, jako je stabilizace a sterilace medového moštu či odstranění nežádoucích látek způsobujících zákal, nicméně je méně pracný, energeticky méně náročný a zachovává kvalitu nevařené medoviny [54,62].

Oběma základními výrobními technologiemi (studená či teplá cesta) je výsledný obsah alkoholu v rozmezí 7–22 % [35]. Přesné procento etanolu závisí na počátečním naředění medu, které může být v poměru od 1:0,5 (med:voda) až po 1:4 [63]. Právě množství etanolu je důležitým parametrem pro následnou klasifikaci medoviny, která se tak může řadit do kategorie piva, vína nebo likérů. Tato klasifikace je možná díky stejnému fermentačnímu procesu zmíněných nápojů. Rozdílem je pouze doba hlavního kvašení, která je u medovin podstatně delší [64] a trvá obvykle od několika týdnů (při počátečním naředění medu 1:4) až po několik měsíců (ředění 1:1, 1:0,5) [65]. Dlouhá fermentační doba je zapříčiněna mnoha faktory, z nichž nejkritičtější je vysoký počáteční obsah fruktózy, nízká hladina esenciálních živin a nízká hodnota pH [64], kterou mimo jiné způsobuje i vznikající CO₂. Pokud pH klesne pod hodnotu 2,5, dochází dokonce k úplnému zastavení kvasičího procesu [62]. Přerušovaná, opožděná či pomalá fermentace s sebou přináší mnoho problémů, jako například vyšší pravděpodobnost kontaminace bakteriemi nebo nežádoucími kvasinkami [64].

2.2.8 Kvasinky pro výrobu medoviny

Kvasinky hrají zásadní roli při výrobě všech alkoholických nápojů a výběr vhodných kmenů kvasinek je nezbytný nejen pro maximální výtěžek alkoholu, ale i pro zachování kvality nápojů. Významně totiž ovlivňují chuť a aroma výsledného fermentovaného produktu [66]. Kvasinky musí v medových mošttech odolávat stresovým podmínkám, jako je vysoká osmolarita, nízká koncentrace základních živin, nízký obsah minerálů, nízké pH a nízká pufrací kapacita [64]. Obecně nejsou schopny růst v mediu, který obsahuje více než 22 % cukru a 14 % alkoholu [54]. Výrobě alkoholických nápojů proto v celosvětovém měřítku dominují kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* [66], jež mají vysokou fermentační kapacitu, jsou schopné rychlého růstu za anaerobních podmínek a mají vysokou toleranci vůči etanolu, případným růstovým či fermentačním inhibitorům a stresovým podmínkám [67]. Přestože se v menších provozovnách na výrobu vína, piva či destilovaného lihu můžeme setkat s využitím spontánní fermentace, jež je zapříčiněna původní mikrobiologickou flórou (divokými kvasinkami a bakteriemi) přítomnou v surovinách a ve výrobním zařízení,

při průmyslové výrobě zmíněných nápojů se používají zásadně čisté kultury vybraných kmenů *Saccharomyces cerevisiae* [66]. Medovina se obvykle vyrábí pomocí stejných purifikovaných a kultivovaných kvasinek [40], avšak použití netradičních druhů mikrobů, které medovinám přináší nové chutě a vlastnosti, není v současnosti výjimkou [68].

Primárním úkolem kvasinkové buňky není tvorba alkoholu, ale její reprodukce. Tyto dvě činnosti jsou spolu však neoddělitelně spojeny. Výrobou etanolu totiž rostoucí buňky udržují svoji redoxní rovnováhu. Nerostoucí kvasinky pak fermentují pouze nezbytně nutné množství cukru k dodání energie pro běžný chod buňky. Bylo dokonce vypočteno, že rostoucí kvasinkové buňky produkují etanol 33× rychleji než nerostoucí buňky [66]. Pokud se tedy kvasinkám nedaří, fermentace neprobíhá správně, a tím dochází k nedostatečné tvorbě etanolu. Dle posledních studií se však můžeme tomuto problému vyhnout přidávkem hydrokoloidů [69] nebo použitím imobilizovaných kvasinkových buněk na imobilizačním mediu [54,57,65]. Imobilizace mikrobů navíc zabraňuje tvorbě zákalů a zkracuje dobu fermentace a zrání [54,65]. Na druhou stranu ani nadměrný růst kvasinek není žádoucí, jelikož ve výsledku znamená opět ztráty alkoholu. Fermentační průmysl se proto snaží optimalizovat růst kvasinek za použití buněčných recyklických systémů, vysokých hustot kvasinkových buněk, kontinuálních/semikontinuálních fermentačních procesů a/nebo imobilizovaných kvasinkových bioreaktorů [66].

Přestože je hlavním produktem kvašení etanol a oxid uhličitý, neméně důležité jsou i sekundární fermentační metabolity kvasinek. Ačkoli jsou tyto látky produkovány v nízkých koncentracích, patří mezi velmi důležité aromatické látky fermentovaných nápojů. Obzvláště významné jsou vzniklé estery, které přináší nápojům žádoucí ovocné či květinové aroma. Svoji roli však hrají i vyšší alkoholy, polyoly, organické kyseliny, vicinální diketony a aldehydy [66].

2.2.9 Kvalita medoviny

Výroba alkoholických nápojů kvasinkami je vůbec nejstarší a ekonomicky nejdůležitější proces ze všech biotechnologií [66]. V současné době hraje odvětví lihovin klíčovou roli nejen pro spotřebitele a výrobce, ale zejména pro celý zemědělský sektor [70]. Evropská unie si tuto situaci velmi dobře uvědomuje, a má proto značný zájem na uskutečnění rozsáhlých výzkumů v odvětví lihovin vedoucích k ustanovení opatření zaměřených na ochranu spotřebitelů (zabránění klamným reklamám, správné označování potravin, ochrana zeměpisných označení, dodržování výrobního postupu, odhalování a předcházení falšování

apod.) a valorizace producentů těchto nápojů pro zajištění přehlednějšího trhu a rovných podmínek hospodářské soutěže [70].

Jakost a druh medoviny je primárně ovlivněn kvalitou použitého medu, ačkoli významnou roli v organoleptické a chemické kvalitě konečného produktu hraje také použítá kvasinková mikroflóra [40], počáteční naředění medu, přidaná aditiva (kousky ovoce, ovocné šťávy, zelenina, koření, byliny), zahřátí medu a celý fermentační proces a proces zrání [35,49].

Stejně jako u EVOO je i u medoviny důležité znát její botanický a geografický původ, který je dán původem medu a bezesporu patří do hodnocení celkové kvality produktu určující jeho výslednou cenu na pultech obchodů. Medovina je kvůli nedostatečnému legislativnímu ošetření často falšovaným zbožím. Nejběžnějším způsobem falšování medoviny je částečná nebo úplná náhrada medu levnější melasou nebo jinými cukernými roztoky. Druhý častý způsob falšování je spojen s absencí fermentačního kroku, kdy dochází k pouhému smíchání medu s etanolem, což není v souladu se správnou výrobní praxí. Mnoho tuzemských výrobců medoviny se dokonce neřídí ani minimálními požadavky danými vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb., která nařizuje použití nejméně 280 g medu na 1 litr medoviny [39,70–72]. Kvalitu medoviny je stejně jako u medu či jiných produktů možné stanovit analýzou profilu AMK [7–9,12,24,32,33,37,39], organických kyselin [55], sacharidů [55,71], fenolických látek [46,55] či kontaminantu 5-HMF [46,55,71].

2.2.10 Druhy medovin

Medovina může být stejně jako víno dělena na neperlivou, sycenou nebo šumivou, či dokonce na suchou, polosladkou nebo sladkou [54].

Kromě tradiční medoviny vyráběné pouze z medu a vody existuje i mnoho dalších druhů. Mezi nejznámější patří *bochet* někdy nazýván rovněž *burnt*, který je vyroben ze zkaramelizovaného medu. Pokud smícháme med s ovocnou šťávou, vznikne po fermentaci druh medoviny obecně známý jako *melomel*. Používají se ale džusy z různého ovoce, jako je moruše, bílé i červené hrozny vinné révy, černý rybíz, javorový sirup apod. Podle použitého ovocného džusu vzniká medovina typického charakteru, nesoucí pak vlastní název. Například *cyser* je medovina vzniklá fermentací medového roztoku a jablečného džusu. Medoviny vyráběné s přidávkem různého koření mají obecný název *metheglin*. Stejně jako u *melomelu* se i zde setkáváme se specifickými názvy dle typu přidávaného koření, přičemž druh koření obvykle závisí na zemi původu. Jedná se například o slad, chmel, chilli nebo růži. Dalším

druhem medoviny je tzv. *sack mead*. Ten se vyrábí za použití většího množství medu, takže konečný produkt obsahuje velké množství nezkvašených cukrů. Jakýkoli druh medoviny může být následně destilován za účelem výroby brandy, jež může dosahovat až 75 % alkoholu [35,54].

2.3 ENERGETICKÉ NÁPOJE

2.3.1 Definice, složení a konzumace energetických nápojů

Energetické nápoje jsou nealkoholické potravinové doplňky stravy obsahující legální přísady se stimulačními vlastnostmi [73]. Ačkoli energetické nápoje nejsou vhodným zdrojem rehydratace nebo obnovy elektrolytů v těle při běžných, natož pak sportovních aktivitách, jsou již od roku 1987, kdy byly poprvé uvedeny na světový trh, marketingem spojovány s extrémními sporty, jako je horolezení, parasailing, base jumping, snowboarding, motoristické sporty apod. Nejpopulárnější a celosvětově nejznámější a nejkonzumovanější značkou energetických nápojů je Red Bull. I když výrobci Red Bullu nikdy netvrdili, že by jejich produkt měl zvyšovat sportovní kondici, utratí přibližně třetinu svých ročních nákladů sponzorováním sportovního odvětví [74]. Nové tisíciletí pak přineslo přímo vlnu těchto syntetických, energeticky velmi bohatých nápojů cílených především na mladé spotřebitele [75]. Skandální jsou pak statistická data související s jejich prodejem. Ačkoli obaly většiny energetických nápojů přímo upozorňují na nevhodnost jejich konzumace mladistvými, až polovinu trhu s energetickými nápoji tvoří osoby mladší 25 let. Do této skupiny však nespádají pouze mladí dospělí (19–25 let), ale velkou část tvoří i dospívající (12–18 let) a děti do 12 let [76]. V roce 2009 byla ve Spojených státech odhadnuta roční spotřeba 5,25 l energetického nápoje na osobu starší 10 let [77]. V roce 2012 energetické nápoje dokonce tvořily až 20 % celkového prodeje všech nealkoholických nápojů [75]. V témže roce přesáhl pouze ve Spojených státech amerických prodej energetických nápojů sumu 12 miliard USD [77]. Ukázalo se, že k těmto neuvěřitelným číslům z velké části přispívají mladí muži nasazení v americké armádě, především ti ve válečných zónách [77]. Spotřeba energetických nápojů se za posledních 18 let mnohonásobně zvýšila. Důvodem je velmi intenzivní a efektivní marketing a také nedostatečná informovanost spotřebitelů o potenciálních škodlivých účincích spojených s konzumací těchto nápojů [75].

Na téma pozitivního přínosu energetických nápojů existuje několik výzkumů, jejichž závěry by se daly shrnout do 3 skupin: (a) konzumace energetických nápojů nepřináší žádné benefity [78,79]; (b) energetické nápoje samy o sobě nezlepšují žádné funkce v těle, za případné změny zodpovídá tzv. placebo efekt [80]; (c) pití energetických nápojů přináší jisté pozitivní účinky, nicméně míra samotného efektu není příliš významná. Po konzumaci údajně dochází k nepatrnému zlepšení fyzické výkonnosti a kognitivních funkcí, konkrétně subjektivního vnímání bdělosti, fyzické vytrvalosti, přesnosti, reakční doby při zpracování

vizuálních informací, pozornosti a psychomotorické výkonnosti, do níž se řadí i reakční doba či krátkodobá paměť [74,81–85].

Nejvíce diskutovanou složkou energetických nápojů je kofein. Kofein obsažený v energetickém nápoji má sice podobnou koncentraci jako v kávě (kolem 30 mg na 100 ml nápoje), nicméně je prodáván ve výrazně větších baleních (nejčastěji 250–500 ml), které vedou k zásadně vyššímu příjmu kofeinu [86]. Vysoká konzumace kofeinu způsobuje záchvaty, mrtvici, a dokonce až náhlou smrt [76]. Žádnou výjimkou dnes nejsou ani hospitalizace v nemocnicích či toxikologických centrech kvůli akutní otravě kofeinem spojené zpravidla s nadměrnou konzumací právě energetických doplňků stravy [75]. U dospívajících je vysoký příjem kofeinu spojen se zvýšeným krevním tlakem a poruchami spánku. Pro těhotné ženy pak znamená riziko pozdních potratů, mrtvě narozených dětí či nedostatečné velikosti kojenců v předkrmovém věku [87]. Americká vládní agentura FDA dohlíží vedle bezpečnosti léčiv (volně prodejných i na předpis), vakcín, biofarmaceutik, krevních transfuzí, zdravotnických prostředků a zařízení, kosmetických přípravků, tabákových výrobků, krmiv pro zvířata a veterinárních výrobků rovněž i na bezpečnost potravin a doplňků stravy. FDA ovšem udává povolená množství kofeinu pouze v potravinách a nealkoholických nápojích. Jelikož ale energetické nápoje spadají do kategorie potravinových doplňků, zůstávají i nadále bez právního ošetření limitů kofeinu [76,86,87]. Regulační agentury by tak měly vyžadovat zvláštní označování vysokého obsahu kofeinu na obalech nejen potravin, ale i potravinových doplňků, a dále by měly více upozorňovat na rizika spojená se spotřebou kofeinu u těhotných žen a dospívajících [87]. I když nežádoucí účinky až toxicita energetických nápojů pramení především z jejich vysokého obsahu kofeinu [75], je třeba zmínit i obrovské množství přítomného cukru, které velmi úzce souvisí s následným vznikem obezity [75]. K dalším makrosložkám energetických nápojů patří také taurin a vitamíny skupiny B [88]. Minoritními přísadami jsou pak AMK, metylxantiny [88], citikolin nebo extrakt z guarany (*Paullinia cupana*) [89] či ženšenu [75,86]. Všechny jednotlivé sloučeniny, mimo AMK a vitamínů, jsou známy pro své stimulační účinky na paměť, činnost mozku a pozornost [89]. Mezi jejich další účinky patří zvýšená vnímavost [90], bdělost, ostražitost a fyzická a duševní výkonnost [91]. Pro výše zmíněné vlastnosti jsou energetické nápoje výrobci často nadhazovány sportovcům, studentům a lidem v profesích, jež vyžadují neustálou koncentraci [75]. Bohužel jen málokdo ví, co přesně udělá směs těchto stimulačních látek s chodem lidského těla.

Energetické nápoje se na večírcích běžně konzumují v kombinaci s alkoholem a rekreačními drogami, jako je extáze nebo jiné amfetaminy [75]. Na internetu naleznete

desítky až stovky alkoholických koktejlů, v jejichž základě je použit energetický nápoj. Tyto koktejly jsou oblíbené nejen pro svou chuť, ale zejména pro oddálení únavy konzumenta a pro obecné, často mylné povědomí, že jejich konzumace snižuje typické příznaky opilosti, jako je bolest hlavy, slabost, sucho v ústech či vnímání zhoršené koordinace [74,87]. Právě snížení letargie po požití energetických alkoholických koktejlů představuje další velký problém. Udržuje totiž jedince déle vzhůru, což prodlužuje dobu konzumace, a tím zvyšuje finální příjem alkoholu. To ve výsledku znamená větší riziko závislosti na alkoholu, nemluvě o tom, že alkoholicí pak tlumí své poalkoholové stavy kofeinovými nápoji, z čehož se stává začarovaný kruh [87]. Organizace EFSA dokonce uvedla, že akutní zdravotní a fatální problémy nastaly právě v důsledku vysoké spotřeby energetických doplňků stravy, a proto by se před jejich nadměrným užitím měli mít spotřebitelé na pozoru [89]. FDA vydalo v listopadu roku 2010 oznámení, že kofein je nebezpečnou potravinářskou přídatnou látkou alkoholických nápojů. Toto oznámení tak v USA zakázalo prodej již „předmíchaných“ alkoholických energetických nápojů. Federální obchodní komise dále oznámila výrobcům, že se podílejí na případném nezákonném uvádění nebezpečných alkoholických nápojů na trh [87].

Ačkoli mohou být energetické nápoje pro střídavého, zdravého, dospělého konzumenta zcela neškodné, jejich soustavná nebo nadměrná konzumace, případně nevhodná kombinace s jinými návykovými látkami může za určitých okolností vážně poškodit zdraví spotřebitelů [73], a to dokonce i s následkem smrti [74,76].

2.3.2 Základní charakteristika, metabolismus, vlastnosti a výskyt taurinu

Taurin (2-aminoethansulfonová kyselina) je přírodní, organická [77,92], sirá [89], neproteinogenní [92,93] β -aminokyselina [93], která je v játrech člověka syntetizována dekarboxylací siráných AMK methioninu nebo cysteinu s následnou oxidací jejich thiolové skupiny [92–94]. Karboxylová funkční skupina je tak ve struktuře taurinu nahrazena kyselinou sulfonovou [92,93], což je hlavním důvodem nezačlenění této AMK do struktury bílkovin [92,93].

Taurin v těle podléhá dvěma hlavním metabolickým cestám. Devadesát pět procent je z těla vylučováno močí, z toho asi 70 % v jeho nezměněné formě a zbytek ve formě síranu. Většina síranu odvozeného od taurinu je produkována bakteriemi ve střevech a absorbována. Taurin však může být konjugován se žlučovými kyselinami syntetizovanými v játrech. Tvoří tak žlučové soli, které působí jako detergenty při emulgaci a trávení lipidů. Ve formě

žlučových solí se následně může účastnit enterohepatické cirkulace, během níž je bakteriemi přeměněn na anorganický síran, který je poté opět vyloučen močí. Přestože je taurin přítomen v mitochondriích, jejichž funkci dokonce i ovlivňuje, savci nejsou schopni taurin přímo využít pro výrobu buněčné energie. Je tak zdrojem uhlíku, dusíku, síry a energie pro střevní bakterie [77].

Taurin je jednou z hlavních složek (obvykle 0,4 %; m/m) energetických nápojů [88] a jednou z nejběžnějších volných AMK přirozeně přítomných ve stravě [89]. Mezi jeho zdroje patří drůbež, hovězí či vepřové maso, mořské plody, mléčné výrobky a ryby. Lidé konzumující tyto potraviny nemají s nízkými hladinami taurinu v těle obvykle problém. Jejich průměrný denní příjem totiž činí 100–200 mg taurinu [77,86]. Opakem jsou vegani a vegetariáni, kteří trpí nedostatečným příjmem taurinu v důsledku konzumace převážně (či zejména) rostlinné stravy, jež je na taurin velmi chudá. Zatímco vegetariánská strava poskytuje kolem 17 mg taurinu denně, veganská strava v podstatě žádný taurin neobsahuje. Jedna plechovka energetického drinku (250 ml) tak 7× zvýší průměrný denní příjem taurinu člověku s pestrou stravou, 55× vegetariánovi a pro vegana by tento příjem znamenal velmi významnou suplementaci. Při dostatku esenciálního methioninu či cysteinu však nejsme na příjmu taurinu z potravy závislí. Taurin je tedy pro dospělého zdravého člověka aminokyselinou podmíněně esenciální. Dlouhodobou nedostatečnou koncentrací taurinu v těle pak mají senioři starší 61 let. V tomto věku chybí i zdravým jedincům až 50 % jeho potřebného množství. Příčinou je zejména narušená biosyntéza endogenního taurinu v důsledku vyčerpání dekarboxyláz zodpovědných za přeměnu cysteinu či methioninu na taurin. Pro seniory se tak taurin stává aminokyselinou esenciální. Taurin je esenciální rovněž pro plod, novorozence a kojence. Je nejhojnější volnou aminokyselinou v mozku plodu a druhou nejhojnější volnou aminokyselinou v lidském mateřském mléce. Nedostatek taurinu během těhotenství ženy vede k neurologickým abnormalitám a k celoživotnímu oxidativnímu stresu potomků. Novorozenci mohou trpět absencí taurinu v případě dlouhodobé parenterální výživy. Následkem toho pak může dojít k dysfunkci sítnice, či k funkčnímu a strukturálnímu poškození mozku. Kojenci s nedostatkem taurinu mají pak zhoršenou absorpci tuku, sekreci žlučových kyselin a retinální či jaterní funkce. Kvůli vážnosti deficiencie taurinu v kojeneckém věku ($\leq 1,5$ roku) byla orgánem FDA schválena v roce 1984 suplementace kojenecké výživy taurinem. V nedávné době se však začalo spekulovat o nezbytnosti a případně i množství a době trvání této suplementace [77].

Taurin hraje důležitou roli v mnoha významných fyziologických procesech živých organismů [89]. Podílí se na osmotické regulaci a stabilizaci membrán, vychytáváním

škodlivých látek přispívá k detoxikaci jater [89], přeměnou cholesterolu na žlučové kyseliny (jedna z metabolických cest taurinu) snižuje koncentraci LDL cholesterolu v krvi [89,94] a zlepšením využitelnosti bílkovin a tuků pomáhá k tvorbě a udržení svalové hmoty [88,94]. Taurin také nepřímo zvyšuje pevnost kostí. Stimuluje totiž produkci enzymu alkalická fosfatáza, která se váže na protein osteopontin zodpovědný za proces resorpce kostí [94]. Kromě toho ovlivňuje růstový hormon [77], čímž chrání před zpomalením růstu [95]. Taurin působí preventivně proti cystické fibróze [77], nemocem ledvin a kardiovaskulárního systému [93], ischemicko-reperfúzním poškozením, sepsi, diabetu, epilepsii a dalšími záchvatovým onemocněním a chrání před několika druhy rakoviny, stejně jako před různými formami psychózy, včetně traumatu, deprese a schizofrenie [92]. Taurin rovněž ovlivňuje produkci několika hormonů, jako je například prolaktin, kortisol, pohlavní hormony nebo již zmíněný růstový hormon [77]. Za zmínku stojí i jeho protizánětlivé [89] a antioxidační účinky [93] (zachycuje reaktivní kyslík a chrání před oxidačním stresem) [77]. Taurin se často přidává do oftalmických léčiv [96], jelikož snižuje oxidativní poškození čoček, působí preventivně proti šedému zákalu (katarakta) [96], léčí retinopatii a celkově ovlivňuje vývoj a zdraví sítnice [93]. Kromě očí nalezneme taurin v různém množství i ve svalech, ledvinách, slinivce břišní, reprodukčních orgánech, slezině, tenkém střevu, plicích a v již zmíněných játrech, mozku a mateřském mléce [77]. Právě epifyza a hypofýza mozku je jeho hlavním polem působnosti [77,90]. Množství taurinu v mozku se s věkem mění. V mozku plodu je koncentrace taurinu ze všech AMK nejvyšší. S postupujícím věkem se jeho množství snižuje, zatímco se zvyšují hladiny glutamátu. Právě glutamát se v mozku dospělých jedinců stane nakonec dominantní AMK, a taurin tak zaujme až druhou pozici [77]. Taurin v mozku zastává hned několik klíčových rolí: stimulací myšlenkových procesů optimalizuje činnost centrálního nervového systému [90], funguje jako inhibiční neuromodulátor a neurotransmitter [77,89] a také chrání mozek před cytotoxickými účinky glutamátu [89]. V poslední době se používá k prevenci i k léčbě Alzheimerovy [93,95] či Huntingtonovy neurodegenerativní choroby. Dokáže totiž inhibovat apoptózu neuronů a stabilizovat proteinové konformace, čímž brání jejich agregaci a následné dysfunkci [77].

Doposud proběhlo několik studií, v nichž byl taurin suplementován v rozdílných dávkách po různě dlouhou dobu (1–10 g taurinu denně po dobu 1 týdne až 1 roku). Závěry těchto studií jsou však neúplné a nejednotné. Nebyly sice prokázány jeho teratogenní či karcinogenní účinky ani jiné akutní, subakutní či chronické stavy [77], nicméně několik výzkumů ukázalo, že nadměrný příjem taurinu způsobuje vedlejší účinky, jako je hypoglykémie, dehydratace, snížená srdeční frekvence při zvýšeném krevním tlaku, průjem,

peptidický vřed, závratě [89], kardiomyopatie či jaterní toxicita [88]. Vzhledem k tomu, že maximální denní příjem taurinu nebyl nikdy oficiálně stanoven, je naprosto nutné provést další důkladný výzkum v této oblasti [77]. Ze studií zkoumajících vliv taurinu na lidi i zvířata bylo pouze doporučeno nepřekračovat denní příjem 3 g [77,97].

Rychlé a přesné stanovení obsahu taurinu v tkáních a dalších biologických vzorcích je velmi užitečné pro včasnou diagnostiku závažných patologií a nemocí [92,95]. Neméně důležitá je však i kontrola jeho maximálních limitů v potravinách, a to zejména u kojenecké výživy [91] a potravinových suplementů, včetně energetických nápojů, kde tvoří v kombinaci s kofeinem a guaranou nevyzpytatelný koktejl látek. Vývoj a validace přesných, rychlých a levných analytických metod pro analýzu taurinu nejen v energetických nápojích je proto velmi aktuálním tématem [89].

2.3.3 Metody stanovení taurinu

Pro analýzu taurinu v potravinách a klinických vzorcích bylo již popsáno mnoho analytických metod. Z chemického hlediska je však taurin nízkomolekulární, polární, netěkavá látka s absencí chromoforu, fluoroforu či elektroforu, což ji činí nestanovitelnou pomocí běžných spektrálních, separačních či elektrochemických metod. Před analýzou je tedy většinou nezbytné zařadit derivatizační krok, který je obvykle komplikovaný, časově náročný a vyžaduje intenzivní manuální práci [89,92,93,95,98].

Nejčastější metodou stanovení taurinu je v současnosti RP-HPLC analýza se spektrofotometrickou či fluorimetrickou detekcí [91,95,99]. V tomto případě je však nezbytná předkolumnová derivatizace taurinu prováděná standardně za pomoci činidel běžně používaných pro derivatizaci α -AMK [73,89,94,96,98,100–104]. Na druhou stranu nalezneme i mnoho publikací, které popisují přímé stanovení taurinu v rozličných vzorcích (včetně energetických nápojů) pomocí kapalinové chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC), iontově-výměnné kapalinové chromatografie či klasické RP-HPLC, a to v kombinaci s detektorem rozptylu světla (ELSD) [88,105–107], hmotnostní spektrometrií [108–113] nebo pulzní amperometrickou [99] či konduktometrickou [98] detekcí. Vysoké náklady HPLC analýz (obzvláště s MS detekcí), včetně údržby přístrojů a případných nákladů na derivatizační činidlo, však činí screening a stanovení taurinu nerealizovatelné pro mnoho malých laboratoří zabývajících se kontrolou potravin [91]. Z tohoto důvodu se dnes můžeme setkat i s jednoduchým a levným spektrofotometrickým stanovením taurinu pomocí

vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie (HPTLC) po jeho předchozí derivatizaci ninhydrinem [114].

Velmi atraktivní technikou pro analýzu taurinu se nedávno stala i CE, a to zejména díky své rychlosti, vysoké účinnosti separace a nízké spotřebě vzorku, rozpouštědel a činidel [95,98]. Kromě klasického CE uspořádání se některé výzkumy zabývaly i CE v kombinaci s laserem indukovanou fluorescencí [95,115–117], či CE na mikročipech s fluorescenční detekcí [118,119]. V každém případě je však opět nutné před vlastní analýzou zařadit derivatizační krok vedoucí k fluoreskujícímu či absorbujícímu derivátu.

V jednodušších matricích a po vhodné derivatizaci můžeme taurin bez problému stanovit čistě jen spektrofotometricky [120,121], či fluorimetricky [122]. Dokonce se v dnešní době můžeme setkat i s netradičními technikami analýzy taurinu jako je $^1\text{H-NMR}$ [123] či FTIR spektroskopie [73]. Tyto techniky však neposkytují dostatečnou citlivost (spektrofotometrie), vyžadují drahé derivatizační činidlo (fluorimetrie) nebo nejsou pro menší, nespécializované laboratoře běžné (NMR, FTIR) [89].

Elektrochemická detekce představuje alternativní, snadnou, citlivou, selektivní, reprodukovatelnou, a především levnou techniku, která se velmi snadno miniaturizuje bez ztráty citlivosti [92,93,95]. Taurin však ve své struktuře neobsahuje žádná elektroaktivní centra. Existuje navíc jen několik málo publikací popisujících jeho přímé stanovení pomocí voltametrických metod. Na nemodifikovaných elektrodách, jako je zlato [124] nebo skelný uhlík [125], sice podléhá taurin polymerační reakci za vzniku polytaurinu využitelného mimo jiné pro konstrukci velmi selektivních senzorů, nicméně se ukázalo, že tuto polymerační reakci nelze pro jeho kvantitativní analýzu použít. K přímé anodické oxidaci taurinu totiž dochází při velmi vysokých potenciálech, při kterých nelze vyloučit interference doprovodných látek. Během této oxidace navíc dochází k silnému znečišťování elektrod reakčními produkty, což zásadně zhoršuje citlivost a reprodukovatelnost experimentu [92,93,95,124,125]. Popsané problémy lze však do jisté míry obejít použitím vhodných modifikací použité metody. Skupina iránských vědců například vyvinula v roce 2018 voltametrický senzor složený z α -cyklodextrinu a nanočástic stříbra vyskytujících se na povrchu elektrody ze skelného uhlíku. Pomocí takto připraveného senzoru pak dokázali přímo stanovit taurin v lidské plazmě [93]. Taurin však lze elektrochemicky stanovit i nepřímou, a to po vhodné derivatizační reakci, jejímž výsledkem je elektroaktivní derivát taurinu. Tento derivát pak můžeme detekovat elektrochemicky po předchozí HPLC či CE separaci nebo použít vhodnou voltametrickou techniku, při níž derivatizační reakce probíhá uvnitř voltametrické cely [92,95,126,127]. Příkladem vhodného derivatizačního činidla může

být například OPA v přítomnosti merkaptanů, kdy vzniká elektroaktivní isoindol [126,127]. Kromě využití speciálně modifikovaných elektrod [92,93] či přípravy derivátu, můžeme taurin stanovit i s použitím bezkontaktní vodivostní detekce po CE [91] nebo MEKC separaci [90] nebo sériovou dvojitou elektrodovou detekcí [95].

2.4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.4.1 Přístroje a příslušenství

Pro analýzu AMK byl použit kapalinový chromatograf složený z degaseru DGU-20 A₅, čerpadel LC-30AD, fluorescenčního RF-20A XS a spektrofotometrického SPD-20A detektoru (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Kompletní HPLC systém doplňoval šesticečný manuální dávkovací systém s vnější dávkovací smyčkou o objemu 2 μ l (Valco-Vici, Schenk, Švýcarsko), termostat kolon LCO 102 (Ecom, České Meziříčí, ČR) a kolony Zorbax SB-Aq: 15 cm \times 3 mm \times 3,5 μ m (Agilent, Santa Clara, USA), Ascentis Express C18: 15 cm \times 3 mm \times 2,7 μ m a 10 cm \times 2,1 mm \times 2 μ m (obě Supelco, Bellefonte, PA, USA). Vzorek byl dávkován mikrostříkačkou Hamilton (Fisher Scientific, Pardubice, ČR).

Vzorky medovin byly před DNS-Cl derivatizací extrahovány zařízením pro extrakci tuhou fází Vacuum SPE Manifold (Labcim, Olomouc, ČR) s vakuovou jednotkou Labobase SBC 860 (KnF, Stockholm, Švédsko) a regulátorem vakua CVC 3000 (Vacuubrand, Wertheim, Německo) za použití komerčně dodávaných SPE extrakčních kolonek: Supelco LC-SCX (1 ml, 100 mg; Supelco), Strata SCX (3 ml, 500 mg), Strata XC (6 ml, 500 mg), Strata Screen-C (6 ml, 500 mg) a Strata DSX-SCX (6 ml, 500 mg; všechny Strata kolony: Phenomenex, Torrance, CA, USA).

K měření excitačních a emisních spekter DNS-Cl derivátů prolinu byl použit spektrofluorometr Fluorat-02-Panorama (Lumex Instruments, St. Peterburg, Ruská federace) a křemenné kyvety o šířce 1 cm (Fisher Scientific).

Spektrofotometr UV/VIS-2450 (Shimadzu) s křemennou kyvetou o tloušťce 1 cm (Fisher Scientific) byl pak použit k měření absorbance derivátů prolinu ve vzorcích medovin po jejich reakci s derivatizačním činidlem ninhydrin a rovněž i pro měření reakční kinetiky tvorby OPA derivátu taurinu.

Filtrace mobilních fází probíhala pomocí filtrační aparatury napojené na vakuovou jednotku Labobase SBC 860 (KnF) a regulátor vakua CVC 3000 (Vacuubrand) za použití membránových filtrů (Nylon; 0,2 μ m, 47 mm).

Deriváty, vzorky či standardní roztoky byly v případě potřeby sušeny pod proudem dusíku v digitální sušicí vaně (Miulab, Hangzhou, Čína).

Při přípravě derivátů byla pro řádné smíchání všech činidel použita minitřepačka REAX Top (Heidolph, Schwabach, Německo).

Všechny deriváty byly před HPLC analýzou odstředěny na zařízení Eppendorf® 5424 (Merck, Darmstadt, Německo).

Další vybavení:

Injekční stříkačky o objemech 1 ml a 5 ml včetně polytetrafluorethylenových (PTFE) stříkačkových filtrů (0,45 µm, 13 mm a 0,45 µm, 4 mm) pro filtraci připravených derivátů (Labicom)

Mikrozkumavky Eppendorf o objemu 1,5 ml (Fisher Scientific)

pH metr (Metrohm, Praha, ČR)

Ultrazvuková vana (Kraintek, Podhájska, Slovensko)

2.4.2 Použité chemikálie

Použité standardy aminokyselin

Glycin (Gly), ≥ 99%	L-Lysin hydrochlorid (Lys), ≥ 98%
L-Alanin (Ala), ≥ 98%	L-Methionin (Met), ≥ 98%
L-Arginin hydrochlorid (Arg), ≥ 98%	L-Prolin (Pro), ≥ 99%
L-Asparagin (Asn), ≥ 98%	L-Serin (Ser), ≥ 99%
L-Asparagová kyselina (Asp), ≥ 98%	L-Taurin (Tau), > 98%
L-Cystein hydrochlorid (Cys), ≥ 98%	L-Threonin (Thre), ≥ 98%
L-Fenylalanin (Phe), ≥ 98%	<i>trans</i> -4-hydroxy-L-prolin (<i>trans</i> -Pro), ≥ 98,5%
L-Glutamin (Gln), ≥ 99%	L-Izoleucin (Ile), ≥ 98%
L-Glutamová kyselina (Glu), ≥ 99%	L-Tryptofan (Trp), ≥ 98%
L-Histidin hydrochlorid (His), ≥ 98%	L-Tyrosin (Tyr), ≥ 98%
L-Leucin (Leu), ≥ 98%	L-Valin (Val), ≥ 98%

Všechny uvedené standardy aminokyselin byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Derivatizační a pomocná reakční činidla

Chloristan lithný, 99,99%	Sigma-Aldrich
Dansylchlorid (DNS-Cl), $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich
Ethanthiol, $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich
Fenylisothiokyanát (PITC), 98%	Sigma-Aldrich
Ninhydrin, p.a.	Sigma-Aldrich
Octan sodný, p.a.	Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)
<i>o</i> -ftaldialdehyd (OPA), $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Triethylamin (TEA), 99,8%	Lach-Ner s.r.o.
Uhličitan lithný, $> 99,0\%$	Sigma-Aldrich
Uhličitan sodný, p.a.	Lachema

Ostatní chemikálie

Acetonitril, 99,9%	Sigma-Aldrich
Etanol, 96%	Lach-Ner s.r.o.
Hydroxid sodný, p.a.	Penta (Praha, ČR)
Kyselina chlorovodíková, 35%, p.a.	Lach-Ner s.r.o.
Kyselina mravenčí, 98%	Penta
Kyselina octová, 99%	Lach-Ner s.r.o.
Metanol, 99,9%	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Hexan, 99%	Sigma-Aldrich
Octan amonný, p.a.	Lachema (Brno, ČR)
Propan-2-ol, $\geq 99,5\%$	Sigma-Aldrich
Thiomočovina, p.a.	Lachema

Deionizovaná voda byla připravena pomocí čisticího zařízení Mili-Q od Merck Millipore (Darmstadt, Německo)

2.4.3 Stanovení prolinu v medovinách po jeho DNS-Cl derivatizaci

2.4.3.1 Vzorky analyzovaných medovin

Vzorky medovin byly získány od místních včelařů nebo zakoupeny v běžných obchodech. Jednotlivé medoviny se tak od sebe lišily výrobcem, způsobem výroby i svým původem. Všechny vzorky byly uchovávány v lednici a před analýzou byly vytemperovány na pokojovou teplotu [128]. Seznam analyzovaných medovin je uveden v tabulce 5.

2.4.3.2 Extrakce prolinu a jeho DNS-Cl derivatizace

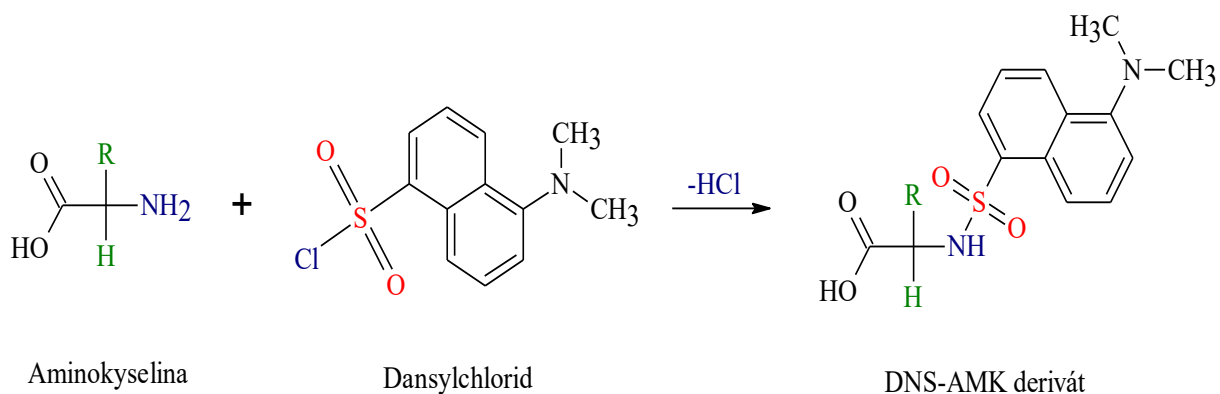
Prolin byl ze vzorku izolován extrakcí na tuhou fázi. Po důkladné optimalizaci extrakčních podmínek byla pro izolaci použita kolonka Strata SCX s následujícím postupem. Kolonka byla nejprve kondicionována 6 ml čistého metanolu a 6 ml vody okyselené koncentrovanou HCl na pH 3,0. Poté bylo aplikováno 10 ml standardního roztoku prolinu, případně 20 ml vzorku medoviny, přičemž pH obou roztoků bylo předem upraveno na hodnotu 1,9 (HCl). Případné nečistoty byly odstraněny propláchnutím kolonky 1 ml (pro standard) nebo 5 ml (pro vzorek) vody o pH 3,0. Eluce zadržovaných AMK proběhla pomocí 2 ml 1M NaOH. Průtoková rychlost byla ve všech extrakčních krocích udržována na přibližné hodnotě jedna kapka za sekundu.

Ke stanovení účinnosti extrakce byly použity tři známé koncentrace standardních roztoků prolinu (89; 238 a 298 mg/l). Každý koncentrační roztok byl extrahován v pěti replikách a každý získaný extrakt byl po jeho derivatizaci třikrát analyzován ($n = 15$). Z naměřených dat byla poté vypočtena účinnost extrakce a její směrodatná odchylka.

Celá derivatizační reakce prolinu s DNS-Cl činidlem byla prováděna za nepřístupu světla. Obecné schéma reakce DNS-Cl činidla s AMK je uvedené na obrázku 12. V mikrozkušavkách Eppendorf (Merck) obalených alobalem bylo 5 minut mícháno 0,5 ml extraktu s 5 mg uhličitanu lithného a 1 ml 0,01M DNS-Cl činidla rozpuštěného v acetonitrilu. Následně byl roztok odstředěn po dobu 2 min při 10 000 rpm, zfiltrován přes PTFE stříkačkový filtr (0,45 μm , 4 mm) a nadávkován do kapalinového chromatografu [128].

Tabulka 5 Seznam 24 analyzovaných českých medovin, včetně jejich původu a způsobu přípravy.

ČÍSLO VZORKU	ZDROJ A MÍSTO PŮVODU	PŘÍPRAVA
1	Obchod	Nevařená
2	Včelař, Pardubice	Nevařená
3	Obchod	Nevařená
4	Včelař, Nové Město nad Metují	Nevařená
5	Včelař, Vamberk	Nespecifikováno
6	Včelař, Domažlice	Nespecifikováno
7	Obchod	Nevařená
8	Včelař, Nové Město nad Metují	Nevařená
9	Obchod	Nevařená
10	Obchod	Nespecifikováno
11	Obchod	Nevařená
12	Včelař, Nové Město nad Metují	Nevařená
13	Včelař, Nové Město nad Metují	Nevařená
14	Obchod	Nevařená
15	Obchod	Vařená
16	Obchod	Nespecifikováno
17	Obchod	Nevařená
18	Obchod	Nespecifikováno
19	Včelař, Domažlice	Nevařená
20	Včelař, Pardubice	Nevařená
21	Obchod	Nevařená
22	Obchod	Vařená
23	Včelař, Domažlice	Nevařená
24	Obchod	Vařená



Obrázek 12 Obecné reakční schéma tvorby derivátu dansylchloridu s aminokyselinou (DNS-AMK).

2.4.3.3 Podmínky chromatografické analýzy DNS-Cl derivátu prolinu

Analýza DNS-prolin derivátu proběhla pomocí RP-HPLC na koloně Ascentis Express C18 (15 cm × 3 mm × 2,7 μm) za použití gradientové eluce. První složkou mobilní fáze (A) byl 0,1% roztok triethylaminu ve vodě, která byla okyselená přidávkem HCOOH na výsledné pH 3,0. Druhou složku (B) tvořil čistý acetonitril. Program gradientu byl následovný: 0 min – 40 % B, 2 min – 50 % B, 4 min – 100 % B. Průtok mobilní fáze kolonou činil 0,8 ml/min, kolona byla termostatem temperována na teplotu 30 °C a vstříkovaný objem vzorku byl 2 μl. K detekci připravených derivátů byl použit fluorescenční detektor, jehož excitační a emisní vlnové délky byly nastaveny na $\lambda_{EX} = 264$ nm a $\lambda_{EM} = 497$ nm. Ke sběru a vyhodnocení dat byl použit software Clarity (DataApex, Praha, Česká republika) [128].

2.4.3.4 Kvantifikace prolinu ve vzorcích medovin

Pro kvantifikaci prolinu v medovinách byla použita metoda kalibrační přímky. Za tímto účelem bylo připraveno sedm různě koncentrovaných standardních vodných roztoků prolinu v koncentračním rozmezí 108,2–238,0 mg/l. Extrakce, derivatizace i analýza kalibračních roztoků byla provedena postupy popsány v kapitolách 2.4.3.2 a 2.4.3.3. Každý koncentrační stupeň byl extrahován ve třech replikách a poté i třikrát analyzován (n = 9). Kalibrační přímka pak byla lineární závislostí ploch píku prolinu na jeho koncentraci [128].

2.4.4 Stanovení AMK v medovinách po jejich PITC derivatizaci

2.4.4.1 Standardy AMK a vzorky medovin

Pro analýzu AMK v medovinách byl připraven standardní roztok 21 AMK (Ala, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Ser, Thre, *trans*-Pro, Tyr, Arg, Cys, Lys, Met, Phe, Pro, Trp a Val; zkratky jsou vysvětlené v kapitole 2.4.2) o dvou různých koncentracích. Pro optimalizaci derivatizace a separace byl připraven vodný roztok směsi jmenovaných standardů AMK s konečnou koncentrací $c = 0,0476$ g/l každé z nich. V případě kvantifikace AMK byl stejným způsobem připraven vodný roztok s konečnou koncentrací $c = 0,4$ g/l každé AMK.

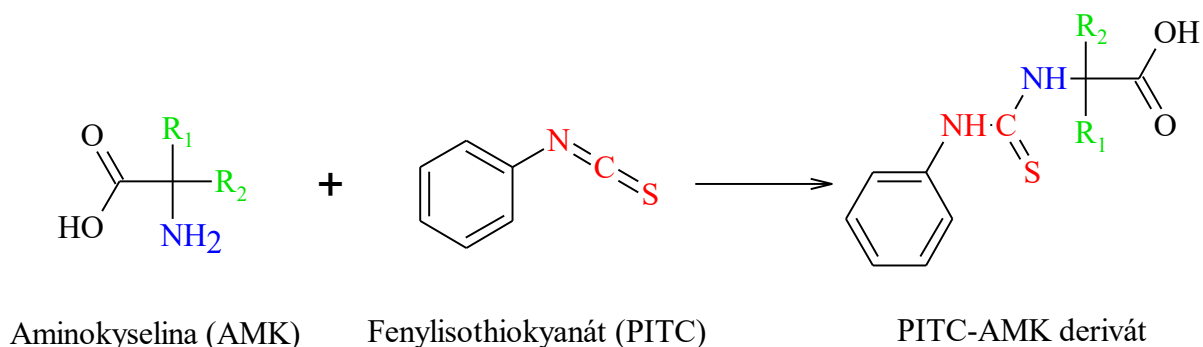
Stanovení aminokyselinového profilu bylo provedeno u pěti českých medovin (č. I–V), které však nebyly totožné s medovinami použitými pro analýzu prolinu po jeho DNS-Cl derivatizaci (kapitola 2.4.3). Tyto dva projekty neprobíhaly ve stejném časovém období a zmíněné medoviny již tedy nebyly k dispozici. Pro účely stanovení aminokyselinového profilu medovin po jejich PITC derivatizaci byly dva z analyzovaných vzorků zakoupeny na místních trzích (vzorek č. I a II) a zbylé tři vzorky byly získány přímo od českých včelařů (vzorky č. III–V). Vzorky č. I a II spadají do skupiny tzv. vařených medovin, jelikož byly před samotnou fermentací tepelně zpracovány. Vzorky získané od včelařů byly naopak připraveny studenou cestou, a říkáme jim proto medoviny nevařené. Dva výrobci poskytli další informace o svých produktech, kterými bylo dodatečné sladění medoviny cukrem (vzorek č. II) nebo medem (vzorek č. V). Vzorek č. IV spadá do skupiny tzv. medových vín, která se připravují za studena, a to pouze fermentací medového roztoku bez dalšího sladění, konzervace či dolihování, avšak často s přidavkem ovocných šťáv či koření.

Kyselost vzorků medovin byla před samotnou derivatizací upravena na pH 5 pomocí 1M NaOH.

2.4.4.2 PITC derivatizace směsi 21 AMK

PITC derivatizace AMK byla pečlivě optimalizována a výsledný postup byl následující: v mikrozkuhavce Eppendorf bylo smícháno 300 μ l vzorku medoviny (pH 5) nebo 300 μ l standardní směsi 21 AMK o koncentraci (každé z nich) $c = 0,0476$ g/l s 30 μ l vody, 50 μ l 1M octanu sodného, 50 μ l triethylaminu a 50 μ l PITC činidla. Po 20 minutách míchání při pokojové teplotě byla směs odstředěna (2 minuty, 10 000 rpm), zfiltrována přes

PTFE injekční filtr (0,45 μm , 4 mm) a analyzována. Obecné schéma reakce PITC činidla s AMK je uvedené na obrázku 13.



Obrázek 13 Obecné schéma reakce PITC činidla s AMK.

Kvantifikace AMK ve vzorcích medovin byla provedena metodou vícenásobného standardního přídávku ve třech stupních. Původní vzorek medoviny byl nejprve derivatizován dle výše popsaného postupu. Dále bylo do každého nového vzorku medoviny, namísto 30 μl vody v původním derivatizačním postupu, přidáno 10, 20 a 30 μl standardní směsi AMK o $c = 0,4 \text{ g/l}$. Jelikož celkový objem derivatizační směsi musí být konstantní, tedy 30 μl , byl do směsi vždy přidán odpovídající podíl vody, který tak činil 20, 10 nebo 0 μl . Objemy dalších složek v derivatizační směsi (octan sodný, TEA a PITC) byly identické s předchozím postupem. Při měření vzorků byl graficky zaznamenáván nárůst výšky píků daných AMK v závislosti na velikosti standardního přídávku. Z těchto záznamů byla sestrojena křivka lineární závislosti, jejíž interpolací do hodnoty $x = 0$ bylo vypočteno množství stanovované AMK v předloženém vzorku.

Všechny připravené deriváty byly následně analyzovány optimalizovanou HPLC metodou.

2.4.4.3 Chromatografická analýza PITC derivátů AMK

Chromatografická separace byla provedena na analytické koloně Zorbax SB-Aq (15 cm \times 3 mm \times 3,5 μm) s využitím mobilních fází: (A) octan amonný o $c = 70 \text{ mmol/l}$ a pH 6,55 filtrovaný přes 0,2 μm nylonový membránový filtr a (B) 60% acetonitril ve vodě. Výsledný gradientový profil byl následující: 0 min – 6 % B, 1 min – 10 % B, 4 min – 18 % B, 8,5 min – 60 % B, 9 min – 100 % B. Mrtvý objem kolony byl měřen s použitím thiomocoviny a činil $V_0 = 0,936 \text{ ml}$. Průtok mobilní fáze byl udržován na konstantní hodnotě 0,6 ml/min.

Množství nastříkovaného vzorku byl dán velikostí použité vnější smyčky o objemu 2 μ l. Kolona byla umístěna v termostatu kolon, který byl temperován na teplotu 30 °C. Absorbance derivátu byla měřena spektrofotometrickým detektorem při 254 nm. Každé měření bylo opakováno minimálně třikrát. Ke sběru a vyhodnocení dat byl použit software Clarity.

2.4.4.4 Referenční metoda

Obsah prolinu nalezený ve vzorcích medovin po jejich HPLC analýze byl potvrzen harmonizovanou metodou danou orgánem International Honey Commission [129], která je založena na sledování barevného produktu vzniklého po reakci prolinu s derivatizačním činidlem ninhydrin. Pro tuto derivatizaci bylo ve zkumavce se zábrusem smícháno 0,5 ml kalibračního roztoku nebo vhodně ředěného vzorku či destilované vody (slepý pokus) s 1 ml koncentrované kyseliny mravenčí a 1 ml 3% roztoku ninhydrinu v ethylenglykolmonometyletheru. Po uzavření zkumavky byla reakční směs 15 min třepána, dále 15 min vařena ve vroucí vodní lázni a pak 10 min temperována při teplotě 70 °C. Nakonec bylo přidáno 5 ml 50% vodného roztoku 2-propanolu a reakční směs byla temperována 45 min na teplotu 70 °C. Před spektrofotometrickým měřením byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu.

Standardní roztoky prolinu byly připraveny v koncentračním rozmezí 40–120 mg/l. Každý standardní roztok i každý vzorek medoviny byl derivatizován třikrát. Vzorek č. V musel být před reakcí zředěn z důvodu vysokého obsahu prolinu. Intenzita absorbance vzniklých derivátů byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 510 nm proti slepému pokusu. Touto metodou je možné stanovit pouze prolin, který jako jediný tvoří s ninhydrinem červený komplex. Ostatní AMK reagují za vzniku fialového komplexu, jejichž detekce probíhá při jiných vlnových délkách. Kvantifikace prolinu byla provedena pomocí dvou metod s vnějším standardem (metodou kalibrační křivky a přímého srovnání) a výsledky byly porovnány.

2.4.5 Stanovení taurinu v energetických nápojích

2.4.5.1 Vzorky energetických nápojů

Pro stanovení taurinu v energetických nápojích bylo derivatizováno a analyzováno šest u nás komerčně dostupných vzorků energetických nápojů od třech známých výrobců. Jmenovitě se jednalo o Red Bull classic, Red Bull letní edice s kokosovou příchutí, Crazy

wolf classic, Crazy wolf s příchutí rybízu, Semtex bez cukru a Semtex s příchutí grapefruitu a příměsí toniku [130].

2.4.5.2 Příprava a HPLC stanovení PITC derivátů taurinu

Příprava a RP-HPLC analýza PITC derivátu taurinu proběhla velmi obdobně, jak bylo uvedeno v kapitolách 2.4.4.2 a 2.4.4.3 zabývajících se stanovením α -AMK ve vzorcích medovin. K derivatizaci bylo za laboratorních podmínek smícháno 40 μ l TEA, 40 μ l 1M octanu sodného, 40 μ l PITC činidla a 300 μ l standardního roztoku taurinu nebo 300 μ l desetkrát zředěného vzorku energetického nápoje. Takto připravená derivatizační směs byla třepána po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Další postup zpracování vzorku byl totožný s postupem popsaným v kapitole 2.4.4.2.

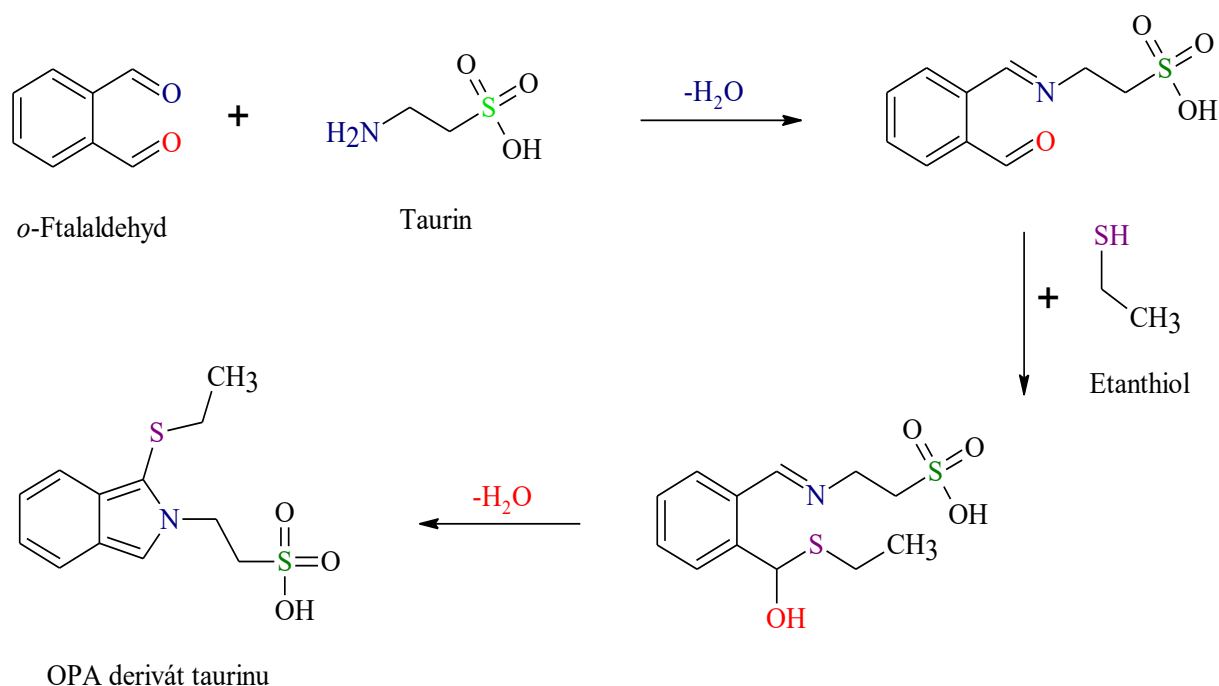
Pro kvantifikaci taurinu byla použita metoda kalibrační křivky, kdy bylo připraveno a výše uvedeným způsobem zpracováno osm standardních vodných roztoků taurinu v koncentračním rozmezí 100–800 μ g/ml. Každý kalibrační roztok byl derivatizován v trojím provedení a k sestrojení kalibrační přímky byly zaznamenávány nárůsty ploch píku. Analýzy reálných vzorků byly opakovány vždy pětkrát.

Chromatografické podmínky stanovení, jako je druh mobilní fáze a její průtok, druh a teplota kolony, vlnová délka spektrofotometrické detekce a objem nastříkovaného vzorku, byly stejné jako v kapitole 2.4.4.3, pouze gradientový program mobilní fáze se lišil a byl následovný: 0 min – 15 % B; 1 min – 20 % B; 2 min – 100 % B; 3 min – 15 % B. Ke sběru a vyhodnocení dat byl i zde použit software Clarity [130].

2.4.5.3 Stanovení taurinu jako OPA derivátu

Množství taurinu bylo ve stejných vzorcích energetických nápojů paralelně stanoveno i elektrochemicky po jeho derivatizaci činidlem OPA. Celá derivatizační reakce byla nejprve optimalizována pomocí spektrofotometrie a až následně převedena do formy vhodné pro elektrochemii. V optimalizovaném elektrochemickém postupu bylo smícháno 30 μ l vzorku s 9 ml nosného elektrolytu (0,1M LiClO₄ v 95% metanolu) a 1 ml derivatizační směsi sestávající z metanolického roztoku OPA činidla o $c = 37$ mmol/l a ethanthiolu o $c = 71$ mmol/l. Po šestiminutové derivatizační reakci byla provedena elektrochemická analýza na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) s použitím square wave voltametrie (SWV) v rozsahu potenciálů 0,2–0,8 V, s potenciálovým skokem 5 mV, potenciální amplitudou 50 mV a frekvencí 80 Hz. Schéma derivatizační reakce je uvedeno na obrázku 14.

Elektrochemické kvantitativní stanovení taurinu v uvedených energetických nápojích bylo provedeno metodou kalibrační křivky v koncentračním rozsahu 20–100 $\mu\text{mol/l}$ taurinu. Každá analýza standardního roztoku byla opakována minimálně třikrát, zatímco analýzy reálných vzorků byly opakovány vždy pětkrát [130].



Obrázek 14 Schéma derivatizační reakce taurinu s činidlem OPA v přítomnosti ethanthiolu.

2.4.6 Statistické vyhodnocení experimentálních dat

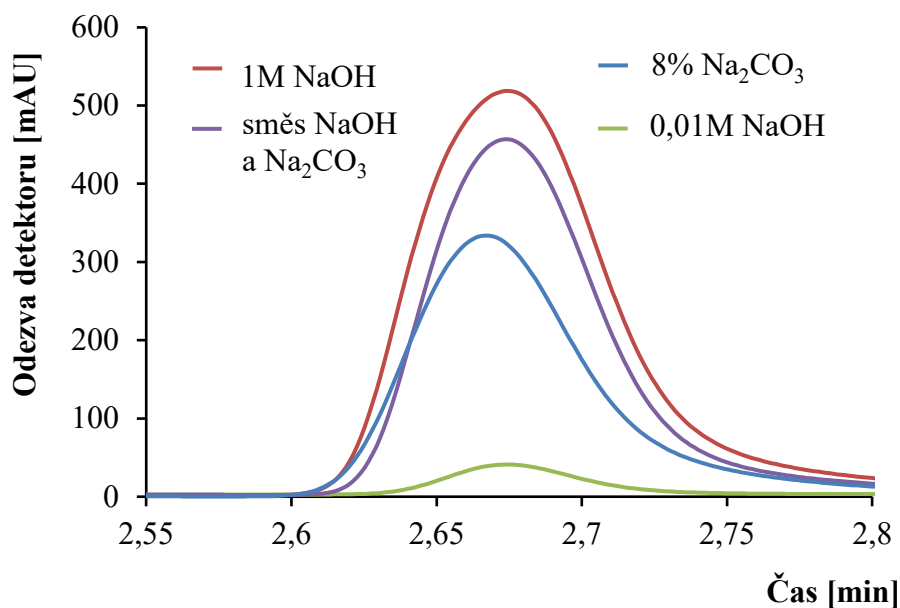
Pro statistickou analýzu experimentálních dat byl využit program QC Expert 2.9 (Trilobyte, Pardubice, ČR). Všechny kalibrační křivky byly měřeny pro nejméně sedm koncentračních hladin. Počet opakování byl $n = 3$ nebo $n = 5$ a je blíže specifikován u jednotlivých stanovení. Experimentální data byla proložena lineární regresí s využitím metody nejmenších čtverců. Regresní parametry (úsek a směrnice regresní přímky) jsou uváděny s jejich směrodatnými odchylkami. Konečné výsledky byly vypočteny jako intervaly spolehlivosti $\bar{x} \pm st_{1-\alpha}$, kde \bar{x} je aritmetický průměr, s je směrodatná odchylka a $t_{1-\alpha}$ kritická hodnota Studentovy t -distribuce pro pět (2,015) nebo pro tři (2,353) opakování při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

2.5 VÝSLEDKY A DISKUSE

2.5.1 DNS-Cl deriváty prolinu v medovinách

2.5.1.1 Optimalizace extrakce prolinu ze vzorků medovin

Za účelem eliminace matricového efektu a zvýšení koncentrace prolinu jsou AMK ze vzorků často izolovány pomocí kationtově-výměnné SPE extrakce s různou stacionární fází. Elučním činidlem pak obvykle bývá roztok NaOH v koncentračním rozsahu 0,1–1 mol/l [6–8,22,27]. Většina činidel určených pro derivatizaci AMK však poskytuje selektivní, kvantitativní a reprodukovatelnou reakci s minimálním počtem vedlejších produktů v rozmezí pH 9 až 10. Extrémně vysoké pH extrakčního eluátu, dané vysokou alkalitou elučního roztoku hydroxidu, tedy nemusí být vždy vhodným prostředím pro optimální průběh derivatizační reakce. Velmi zásadité pH navíc ve většině případů způsobuje destrukci stacionárních fází navázaných na silikagelu kolonky. Z tohoto důvodu bylo testováno 5 různých SPE kolonek (Supelco LC-SCX, Strata SCX, Strata XC, Strata Screen-C a Strata DSX-SCX) a to v kombinaci s různým typem a množstvím elučních roztoků (NaOH o $c = 0,01$ – $1,0$ mol/l, 8% Na_2CO_3 nebo jejich směsi). Porovnáním ploch píku extrahovaného a neextrahovaného DNS-Cl derivátu standardu prolinu byla nejprve hodnocena účinnost extrakce na daných patronkách. Bylo zjištěno, že 8% Na_2CO_3 a 0,01 mol/l NaOH nejsou dostatečně silnými eluenty pro narušení afinity zachycených AMK ke stacionární fázi. Při jejich užití docházelo totiž v závislosti na použité patronce k naprosto minimální či dokonce žádné eluci AMK z patronky. Vliv elučního rozpouštědla použitého pro eluci prolinu zachyceného na SPE kolonce Strata SCX je patrné z obrázku 15.



Obrázek 15 Vliv použitého elučního činidla na kvalitu píku DNS-Cl derivátu prolinu.

Nejlepším elučním činidlem byl roztok NaOH o $c = 1 \text{ mol/l}$. Účinnosti extrakce při použití tohoto elučního roztoku byly získány v rozmezí 0,0–84,2 % a jsou spolu s odpovídajícími hodnotami intervalů spolehlivosti uvedeny v tabulce 6. Přestože jsou všechny testované kolonky dle výrobců přímo určené k extrakci AMK, na kolonce Supelco LC-SCX nedošlo k žádnému záchytu analytů. Oproti tomu nejlépe dopadla kolonka Strata SCX, jejíž účinnost pro prolin činila 84,2 % (tabulka 6). Tento druh kolonky byl následně využit pro všechny další experimenty. Dále byly optimalizovány další parametry, jako je extrahované množství medoviny (10–20 ml), její počáteční pH (pH 1,6–3,0) a množství elučního roztoku (1–5 ml). Ze všech testovaných parametrů byly nejlepší výsledky získány extrakcí 20 ml medoviny předem okyselené na pH 1,9 a elucí 2 ml NaOH o $c = 1 \text{ mol/l}$ [128]. Podrobný popis extrakce je uveden v kapitole 2.4.3.2.

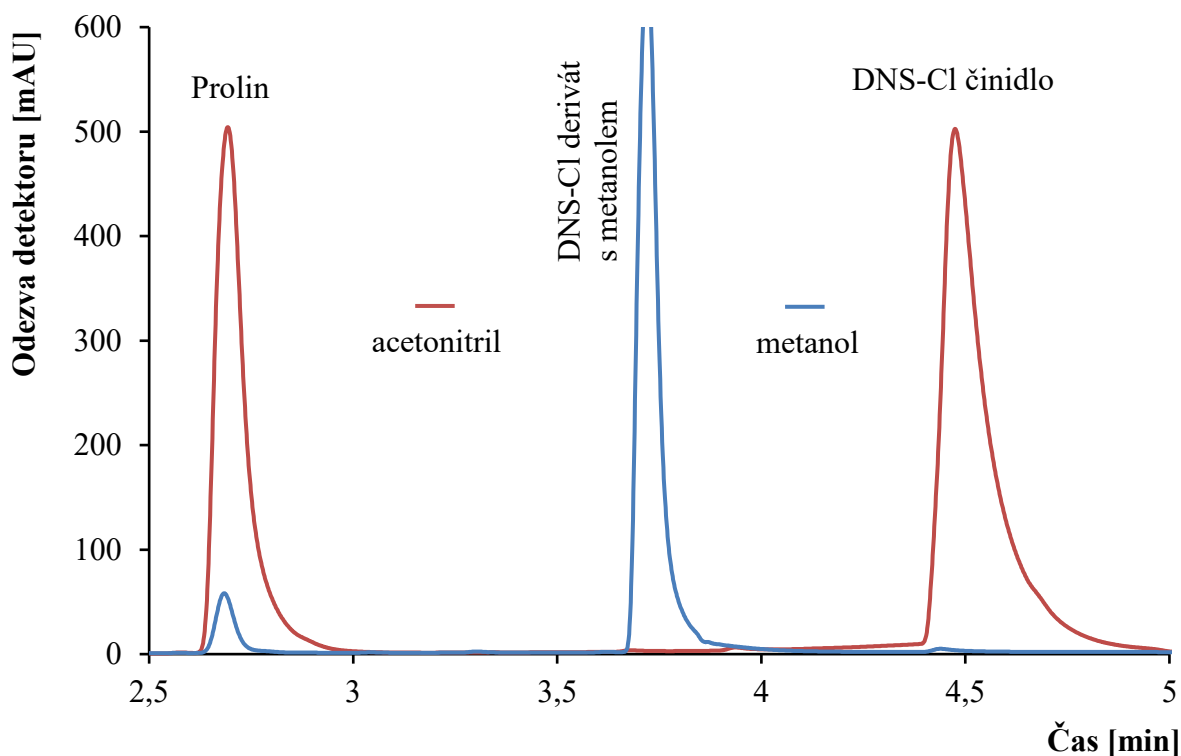
Tabulka 6 Pět zkoumaných extrakčních kolonek s odpovídajícími hodnotami extrakčních účinností [%] a intervalů spolehlivosti.

SPE KOLONKA	ÚČINNOST [%]
Supelco LC-SCX	0,0 ± 0,0
Strata X-C	67,2 ± 2,5
Strata Screen-C	31,5 ± 1,6
Strata DSC-SCX	60,7 ± 2,3
Strata SCX	84,2 ± 4,8

2.5.1.2 Optimalizace DNS-Cl derivatizace prolinu

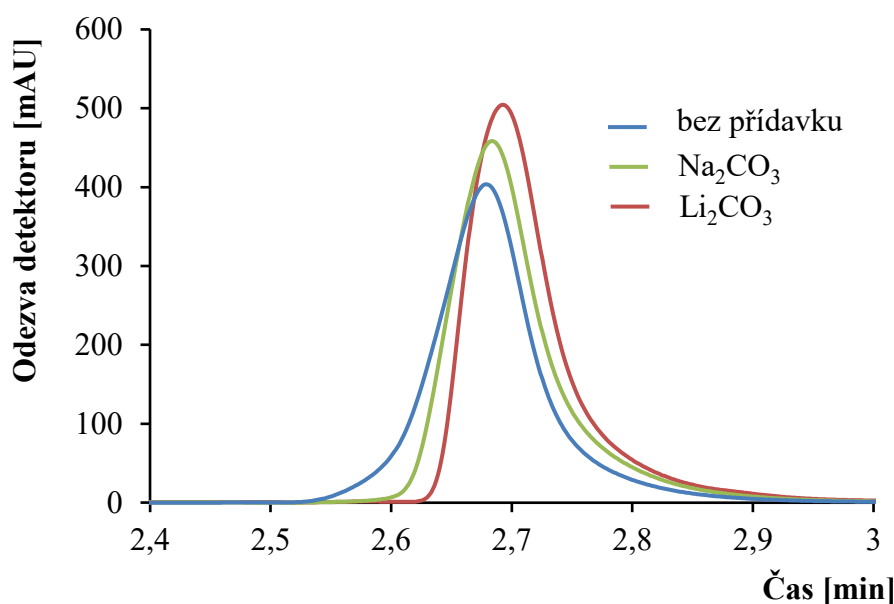
Původní derivatizační proces byl založen na relativně komplikovaném postupu [131,132], v němž AMK reagovaly s DNS-Cl činidlem v prostředí uhličitanu lithného bez přítomnosti světla, přičemž reakční směs musela být zahřívána na vodní lázni při 40 °C po dobu 20 minut a vzniklé deriváty byly analyzovány až po následném třicetiminutovém ustavení rovnováhy (ekvilibrační čas). Tato derivatizace byla velmi pečlivě optimalizována za účelem zjednodušení a zrychlení reakčního procesu, a tím zkrácení doby přípravy vzorku k analýze. Pro správný průběh derivatizační reakce bylo nezbytné najít nejvhodnější rozpouštědlo DNS-Cl činidla, vyhovující pH extraktu a vhodné poměry jednotlivých reakčních komponent. Dále bylo nezbytné ověřit význam zvýšené teploty, ekvilibračního času a přítomnosti uhličitanu lithného, stejně jako délku reakce a stabilitu získaných derivátů.

Jelikož dansylchlorid velmi snadno podléhá hydrolyze, je obvykle rozpouštěn v organických rozpouštědlech, a to zejména v metanolu nebo acetonitrilu. Porovnáním výtěžku derivatizace standardu prolinu při použití těchto dvou rozpouštědel bylo nalezeno, že derivatizace probíhá s evidentně vyšším výtěžkem, pokud je jako rozpouštědlo činidla použit acetonitril (obrázek 16).



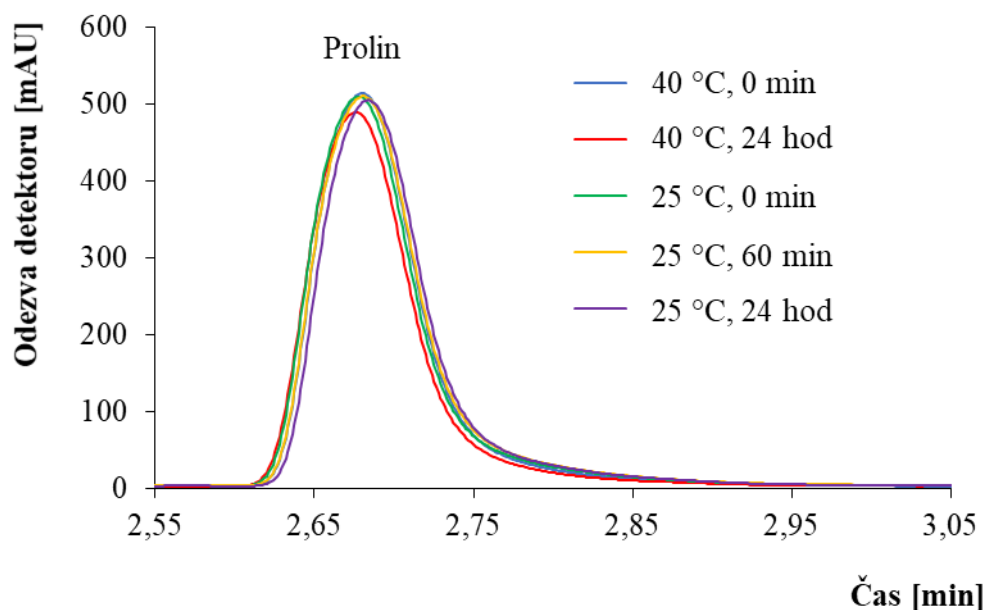
Obrázek 16 Vliv rozpouštědla použitého pro přípravu DNS-Cl činidla na derivatizaci standardu prolinu. V červeném záznamu byl k přípravě použit acetonitril a v modrém záznamu metanol.

Klíčovou roli ve správném průběhu derivatizační reakce dansylchloridem hraje pH, které musí být optimálně udržováno okolo hodnoty 9,5. Pro eluci prolinu z SPE patronky však používáme 1M NaOH, jehož pH je natolik vysoké, že způsobuje okamžitou hydrolyzu činidla, a derivatizační reakci tak není vůbec možné provést. Za účelem snížení pH extraktu či k jeho neutralizaci byl testován přídavek pevného i ve vodě rozpuštěného uhličitanu lithného nebo sodného. Nejvyšší odezva detektoru byla získána přidavkem 5 mg pevného uhličitanu lithného, který pravděpodobně plní i funkci katalyzátoru derivatizační reakce (obrázek 17).



Obrázek 17 Vliv přídavku Na₂CO₃ a Li₂CO₃ na derivatizaci extraktu standardu prolinu.

Pro zkrácení doby nezbytné ke kvantitativnímu průběhu derivatizační reakce byla testována časová závislost tvorby derivátů. V témže kroku byl rovněž ověřován i vliv teploty na reakční proces (obrázek 18). Jak je z obrázku 18 patrné, všechny píky derivátu prolinu jsou bez ohledu na reakční dobu a teplotu totožné. Z toho vyplývá, že derivatizační reakce probíhá ihned po smíchání reakčních činidel, a to i za pokojové teploty. Zahřívání derivatizační směsi na vodní lázni při 40 °C i následná ekvilibrace při laboratorní teplotě jsou tedy jasně nadbytečné kroky, které pouze zbytečně prodlužují čas přípravy vzorku k analýze. Pro všechny další analýzy byl proto použit méně časově i manuálně náročný postup důkladně popsany v experimentální části (kapitola 2.4.3.2), který nevyžaduje zvýšenou teplotu, ekvilibraci ani dlouhé reakční časy. Deriváty získané vyvinutou metodou zůstaly nezměněny po dobu nejméně 24 hodin [128].

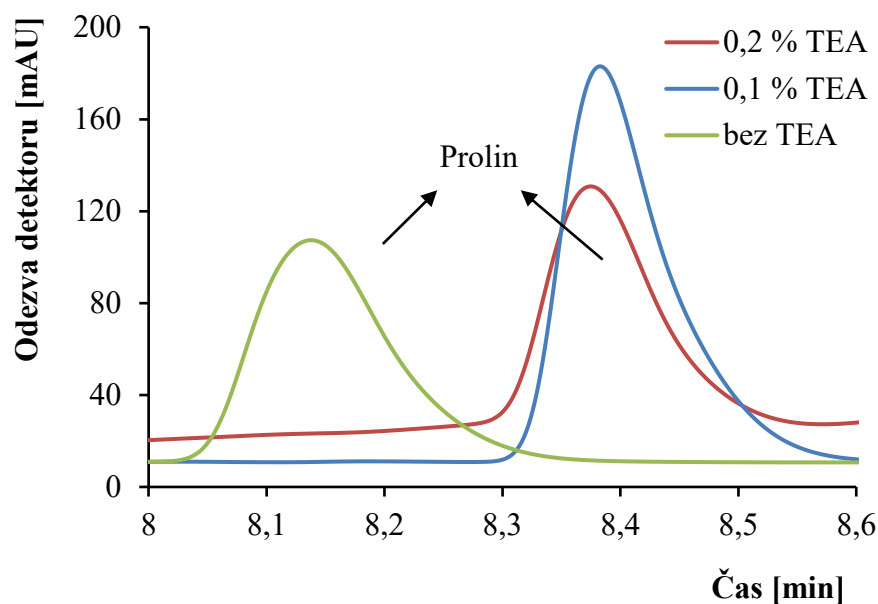


Obrázek 18 Časová závislost tvorby DNS-Cl derivátu prolinu při laboratorní teplotě (25 °C) a při teplotě 40 °C. Měření probíhalo ihned po smíchání (0 min), po 60 min a po 24 hodinách.

2.5.1.3 Optimalizace HPLC analýzy

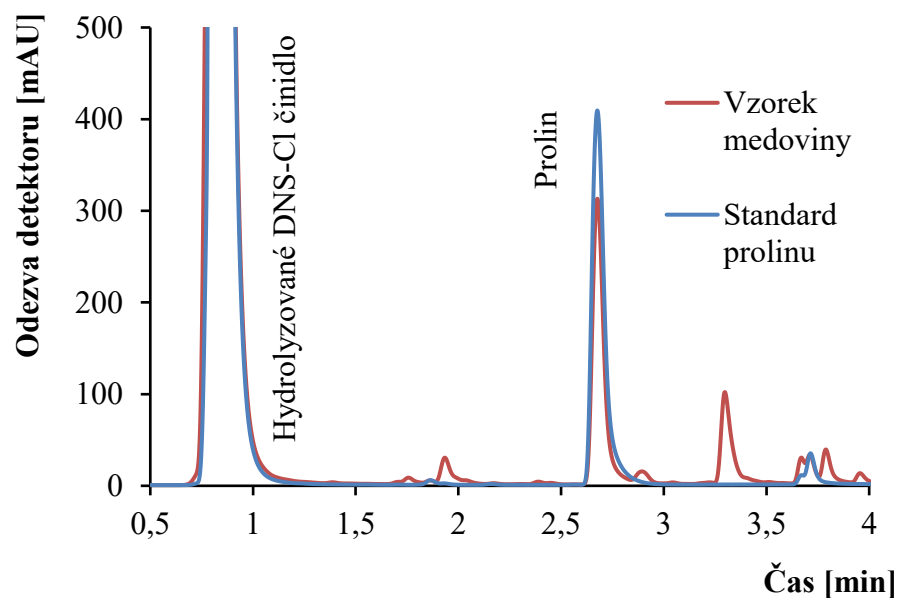
Během optimalizace RP-HPLC separace byly hodnoceny parametry, jako je druh organické složky mobilní fáze (acetonitril, metanol a různé jejich směsi), pH vodné složky mobilní fáze (pH 2,5–3,5), vliv přítomnosti TEA (0–0,2 %) ve vodné mobilní fázi (obrázek 19), strmost gradientu s různou počáteční a konečnou koncentrací organické složky a v neposlední řadě i detekční vlnové délky. Bylo zjištěno, že nejlepší separace se symetrickými a úzkými píky bylo dosaženo gradientovou elucí s binárními mobilními fázemi, kde složku (A) tvořil okyselený 0,1% TEA ve vodě a složku (B) 100% acetonitril. Vliv přítomnosti TEA v mobilní fázi na kvalitu píku prolinu a jeho retenční chování je znázorněn na obrázku 19. Gradientový eluční program byl velmi rychlý (celkový čas činil 4 min) a skládal se ze dvou lineárních částí lišící se svou strmostí, kdy první pomalá část gradientu sloužila k separaci látek a druhá rychlá k promytí kolony. Za účelem nalezení vhodných vlnových délek pro fluorescenční detekci byla na spektrofluorometru proměřena excitační a emisní spektra připraveného derivátu. DNS-Cl derivát prolinu vykazuje excitační maximum při 264 nm a emisní maximum při 497 nm. Pro detekci prolinu v medovinách byly následně použity právě tyto vlnové délky excitace a emise. Podrobný popis HPLC analýzy je uveden v kapitole 2.4.3.3.

Optimalizovaná separace derivátu standardního roztoku prolinu a desetkrát zakoncentrovaného vzorku medoviny je znázorněna na obrázku 20.



Obrázek 19 Chromatogram DNS-Cl derivátu standardu prolinu s různou koncentrací TEA ve vodné mobilní fázi.

Ascentis Express C18 (15 cm × 3 mm × 2,7 μm); teplota: 25 °C; MF A: 0–0,2% TEA v 1% vodném roztoku CH₃COOH; MF B: 100% acetonitril; gradient: 0 min – 23 % B, 4 min – 28 % B, 6 min – 38 % B, 14 min – 55 % B, 16 min – 100 % B; průtok: 0,8 ml/min; λ_{EX} = 270 nm a λ_{EM} = 500 nm; dávkování: 5 μl.



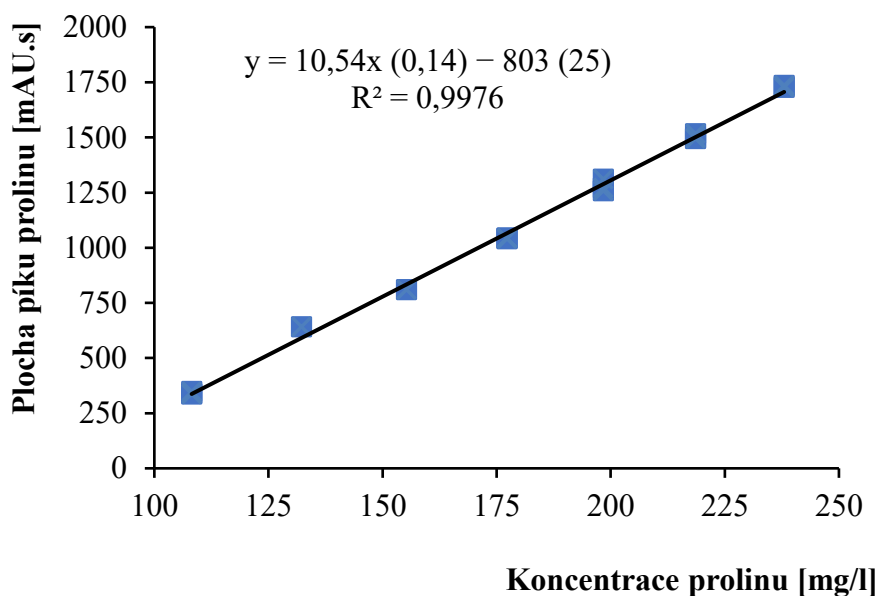
Obrázek 20 Chromatogram extraktu standardu prolinu (c = 115 mg/l) po DNS-Cl derivatizaci (modrá křivka) a chromatogram derivatizovaného extraktu medoviny po jejím desetinasobném zakoncentrování (červená křivka). V obou případech byla pro extrakci použita SPE kolonka Strata SCX.

Ascentis Express C18 (15 cm × 3 mm × 2,7 μm); teplota: 30 °C; MF A: 0,1% TEA ve vodě, pH 3,0; MF B: 100% acetonitril; gradient: 0 min – 40 % B, 2 min – 50 % B, 4 min – 100 % B; průtok: 0,8 ml/min; λ_{EX} = 264 nm, λ_{EM} = 497 nm; dávkování: 2 μl.

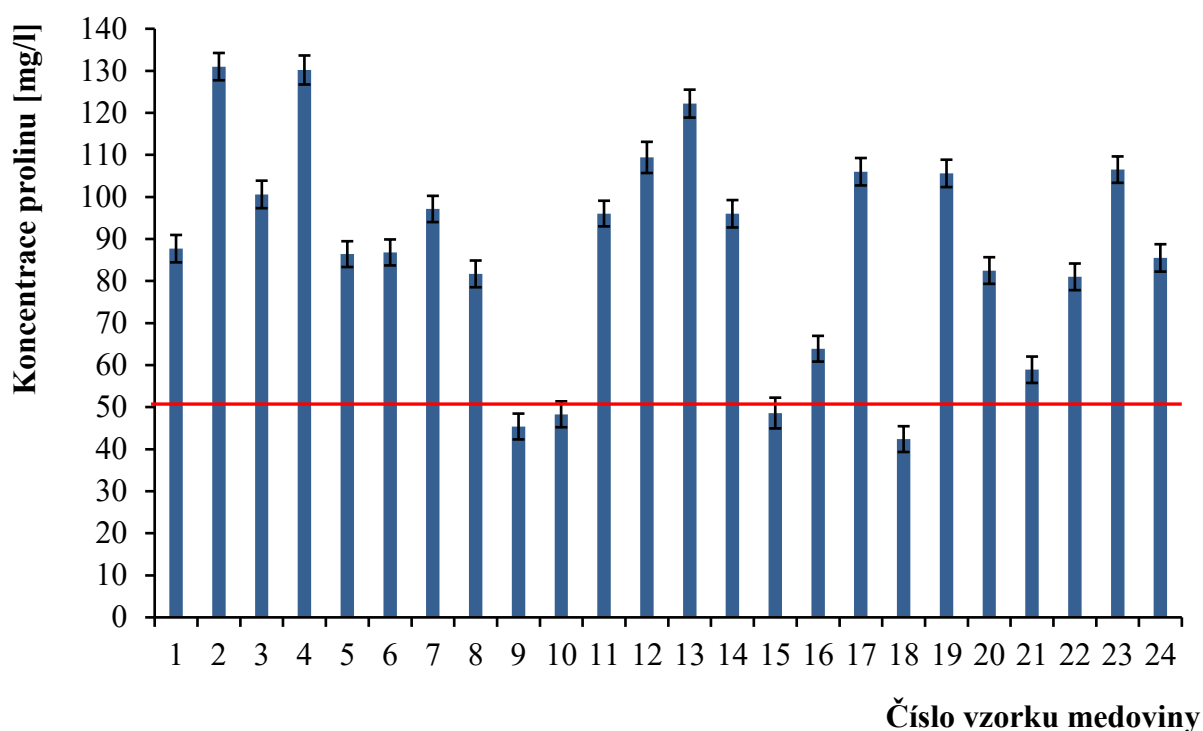
2.5.1.4 Kvantifikace prolinu v medovinách a vyhodnocení naměřených dat

Pro kvantitativní stanovení prolinu ve vzorcích medovin byly nejprve analyzovány extrakty standardů prolinu v koncentračním rozmezí 108,2–238,0 mg/l (kapitoly 2.4.3.2–2.4.3.4). Obsah prolinu v medovinách byl následně vypočten z kalibrační závislosti plochy píku prolinu na jeho koncentraci. Kalibrační křivka prolinu je spolu s příslušnou rovnicí regrese a směrodatnými odchylkami jednotlivých parametrů uvedena na obrázku 21.

Celkem 24 vzorků českých medovin bylo analyzováno optimalizovanou metodou pro stanovení obsahu prolinu, který je významným parametrem kvality a pravosti medu, respektive medovin, a může tedy sloužit k ověření dodržení jejich správné výrobní praxe. Nalezená množství prolinu ve všech vzorcích medovin jsou graficky zobrazena na obrázku 22. Přesné číselné hodnoty včetně intervalů spolehlivosti jsou pak přehledně uvedeny v tabulce 7. Obsah prolinu se v analyzovaných vzorcích medovin pohyboval mezi 42 až 131 mg/l. Nejvyšší koncentraci prolinu obsahovaly vzorky č. 2, 4 a 13 pocházející od dvou různých včelařů (obrázek 22, tabulka 5 a 7). Vzorek č. 2 je od místního pardubického včelaře a zbylé dva vzorky pochází od včelaře z Nového Města nad Metují. Všechny tři vzorky jsou medovinami nevařenými, které byly na závěr jejich výroby doslazovány medem, což pozitivně ovlivnilo množství prolinu v konečném produktu.



Obrázek 21 Kalibrační křivka standardu prolinu po jeho extrakci a DNS-Cl derivatizaci, včetně příslušné rovnice regrese.



Obrázek 22 Graf znázorňující obsah prolinu stanovený ve 24 vzorcích medovin včetně linie určující jeho limitní množství (50,4 mg/l) zavedené pro medoviny.

Tabulka 7 Množství prolinu [mg/l] ve 24 analyzovaných vzorcích českých medovin uvedené včetně jejich příslušných intervalů spolehlivosti.

ČÍSLO VZORKU	MNOŽSTVÍ PROLINU [mg/l]	ČÍSLO VZORKU	MNOŽSTVÍ PROLINU [mg/l]	ČÍSLO VZORKU	MNOŽSTVÍ PROLINU [mg/l]
1	87,7 ± 3,3	9	45,4 ± 3,1	17	106,0 ± 3,3
2	131,0 ± 3,3	10	48,3 ± 3,1	18	42,4 ± 3,1
3	100,6 ± 3,3	11	96,1 ± 3,0	19	105,6 ± 3,3
4	130,2 ± 3,5	12	109,4 ± 3,7	20	82,5 ± 3,2
5	86,4 ± 3,1	13	122,2 ± 3,3	21	58,9 ± 3,1
6	86,8 ± 3,1	14	96,0 ± 3,3	22	81,0 ± 3,2
7	97,1 ± 3,1	15	48,6 ± 3,6	23	106,5 ± 3,1
8	81,7 ± 3,2	16	63,9 ± 3,1	24	85,5 ± 3,3

Minimální množství prolinu v medu je dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady 180 mg/kg [33,70]. Pro výrobu 1 litru české medoviny je doporučeno použít minimálně 280 g medu [72]. To znamená, že koncentrace prolinu v medovinách by neměla klesnout pod 50,4 mg/l. Z obrázku 22 a tabulky 7 je zřejmé, že se čtyři analyzované vzorky (č. 9, 10, 15 a 18) pohybovaly pod limitní hranicí, přičemž dva z těchto vzorků (č. 10 a 15) by v rámci chyby měření tento limit těsně splnili. Všechny tyto vzorky byly zakoupeny v běžném obchodě, a proto nejsou známy bližší informace o produktu či jeho přesný výrobní proces. Z údajů uvedených na etiketách lahví pouze víme, že vzorek č. 15 spadá mezi medoviny vařené a vzorek č. 9 je naopak medovinou nevařenou. U zbylých dvou vzorků však nebyly poskytnuty ani tyto základní údaje. Výrobci těchto čtyř medovin zřejmě nesplnili správnou výrobní praxi související s minimálním množstvím medu nezbytného k přípravě medoviny, případně k výrobě použili nekvalitní či falšovaný med.

2.5.2 PITC deriváty AMK v medovinách

Další z testovaných derivatizačních činidel pro stanovení AMK v medovinách bylo tradiční činidlo PITC poskytující absorbující deriváty.

2.5.2.1 Příprava vzorku a PITC derivatizace AMK

Medovina je velmi komplexní matrice s vysokým obsahem cukrů a dalších interferentů, jejichž vliv je třeba před derivatizací či analýzou obvykle eliminovat. Jelikož jsou AMK pouze minoritní součástí medovin, musí být celá příprava vzorku k analýze pečlivě optimalizována.

Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, AMK jsou ze vzorků často izolovány pomocí SPE extrakce. K extrakci byla použita stejná SPE kolonka, jako v případě derivátů DNS-Cl, a opět byla testována eluce AMK elučními roztoky NaOH a Na₂CO₃ o různé koncentraci, avšak s následnou PITC derivatizací eluátu. Zkoušena byla i eluce pomocí jejich směsí, v nichž byly dané komponenty zastoupeny v různých poměrech. Bohužel se ukázalo, že pro průběh PITC derivatizace je striktně vyžadováno pH 9–10, a jakékoli eluční činidlo potřebné k eluci AMK z extrakčních patronek proto není kompatibilní s jejich následnou PITC derivatizací. V poslední řadě byla testována i neutralizace eluátu pomocí několika organických či anorganických kyselin (HCl, CH₃COOH nebo HCOOH). Přesný objem přidávané kyseliny však nebylo snadné stanovit, což významně ovlivňovalo opakovatelnost následného derivatizačního procesu, a tím i separaci derivátů. Kvůli výše zmíněným

problémům spojených s odstraněním matrice a zakoncentrováním přítomných AMK byla vyvinuta nová metoda stanovení AMK nezahrnující žádnou úpravu vzorku před jeho derivatizací.

Postup přímé PITC derivatizace AMK v neupravovaných vzorcích medovin vyžadoval důslednou optimalizaci reakčních podmínek. Pozornost musela být soustředěna na množství a typ použitých rozpouštědel, celkovou dobu derivatizace, vhodnost postupu pro vzorky medovin a kvalitu získaných chromatogramů. Byly testovány dva dříve prezentované derivatizační postupy [27,133]. Prvním z nich byla metoda derivatizace podle Komarové a kol. [133], která byla založena na reakci PITC s AMK v prostředí isopropanolu a uhličitanu sodného. Po 35minutové reakci byl vzorek odpařen do sucha, znovu rozpuštěn ve vodě a dvakrát extrahován *n*-hexanem. Vodná vrstva byla shromažďována a následně odstředěna, přefiltrována a analyzována. Výhodami této metody byla jednoduchost reakčních směsí a velmi dobrá opakovatelnost derivatizační reakce. Významnou nevýhodou pak byla nutnost sušícího kroku a dvoustupňové extrakce, jež společně zásadně prodlužovaly čas přípravy derivátu. Naše pozornost byla proto věnována derivatizačnímu postupu podle Daveye a Erssera [27]. V této metodě bylo zahrnuto sušení vzorku proudem dusíku před jeho derivatizací i po každé částečné reakci. V prvním derivatizačním kroku byla k vysušenému vzorku přidána směs metanolu, TEA a octanu sodného. Vše bylo promícháno a znovu vysušeno. V druhém kroku byla přidána směs metanolu, vody, TEA a PITC a po 20 minutách míchání opět vysušena. Sušina s již zderivatizovanými AMK byla následně rozpuštěna ve vodě, přefiltrována a analyzována. Během optimalizace byly testovány různé koncentrace a poměry jednotlivých derivatizačních složek stejně jako funkce pomocných derivatizačních činidel, jako je TEA nebo octan sodný. Bylo zjištěno, že TEA upravuje pH a katalyzuje reakci PITC s AMK. Octan sodný pak hraje roli pufru. Tento postup bohužel nemohl být z praktických důvodů použit pro reálné vzorky medovin. Medoviny mají obecně vysokou viskozitu a velké množství cukru, tudíž po jejich vysušení vznikne cukerná krusta, která jde jen velmi těžce promíchat s malými objemy reakčních směsí. Ty zas nebylo žádoucí zásadně zvyšovat kvůli spotřebě vzorků a činidel a zejména kvůli nezbytnému kontinuálnímu sušení, které velmi prodlužuje celkovou dobu derivatizace, a významně tak ovlivňuje opakovatelnost reakce.

Z již zmíněných důvodů byla metoda Daveye a Erssera [27] dále modifikována s cílem zjednodušit celý proces, a hlavně umožnit derivatizaci aminokyselin v medovině. Nejprve byla testována metoda bez počátečního sušení vzorku medoviny, přičemž ostatní derivatizační kroky byly zachovány. V druhé modifikaci byly se vzorkem nevysušené

medoviny smíchány různé kombinace a poměry derivatizačních činidel (PITC, TEA, metanol a octan sodný) a k prvnímu sušení tak došlo až po 20minutové inkubaci. Ani jedna uvedená alternativa však nevyřešila problém vysokých časových nároků, špatné opakovatelnosti a vzniku více či méně tuhé krusty.

Komplikace spojené s PITC derivatizací AMK v medovinách nás vedly k vývoji nové metody derivatizace nezahrnující jediný krok extrakce či sušení v průběhu celého procesu. Pro snížení přirozené kyselosti medovin byly vzorky nejprve upraveny 1M NaOH na pH 5. Poté byly smíchány s reakční směsí složené z octanu sodného, TEA a PITC a po 20 minutách míchání byly odstředěny, zfiltrvány a analyzovány. Podrobný popis derivatizace je uveden v kapitole 2.4.4.2. Vyvinutá metoda je rychlá, instrumentálně a manuálně nenáročná, poskytuje dobrou opakovatelnost a chromatogramy derivatizovaných vzorků neobsahují žádné nečistoty nebo vedlejší produkty reakce. Tento derivatizační proces byl použit rovněž pro optimalizaci chromatografických podmínek. Co se týká stability získaných PITC derivátů, zůstávají nezměněny po dobu několika týdnů při 5 °C.

2.5.2.2 Optimalizace RP-HPLC analýzy PITC derivátů

Jelikož byla selektivita derivátů, a tím i kvalita jejich HPLC separace zásadně ovlivněna mnoha parametry, jako je například použitá stacionární fáze, druh a pH mobilní fáze, teplota kolony, a dokonce i složení a vlastnosti dávkovaného vzorku, byla optimalizace chromatografické analýzy PITC derivátů AMK velmi náročná.

Nejprve byla pro separaci PITC derivátů použita kolona Ascentis Express C18 plněná povrchově porézními částicemi s chemicky vázaným oktadecyl-silikagelem. Bylo však zjištěno, že pro separaci vysoce polárních PITC derivátů je nutná velmi vysoká koncentrace vody v mobilní fázi, což způsobuje „zhroucení“ oktadecyl-silikagelového řetězce. Proto byla vybrána kolona Zorbax SB-Aq, která je speciálně upravena pro separaci hydrofilních sloučenin pomocí mobilních fází s vysokým procentem vodné složky.

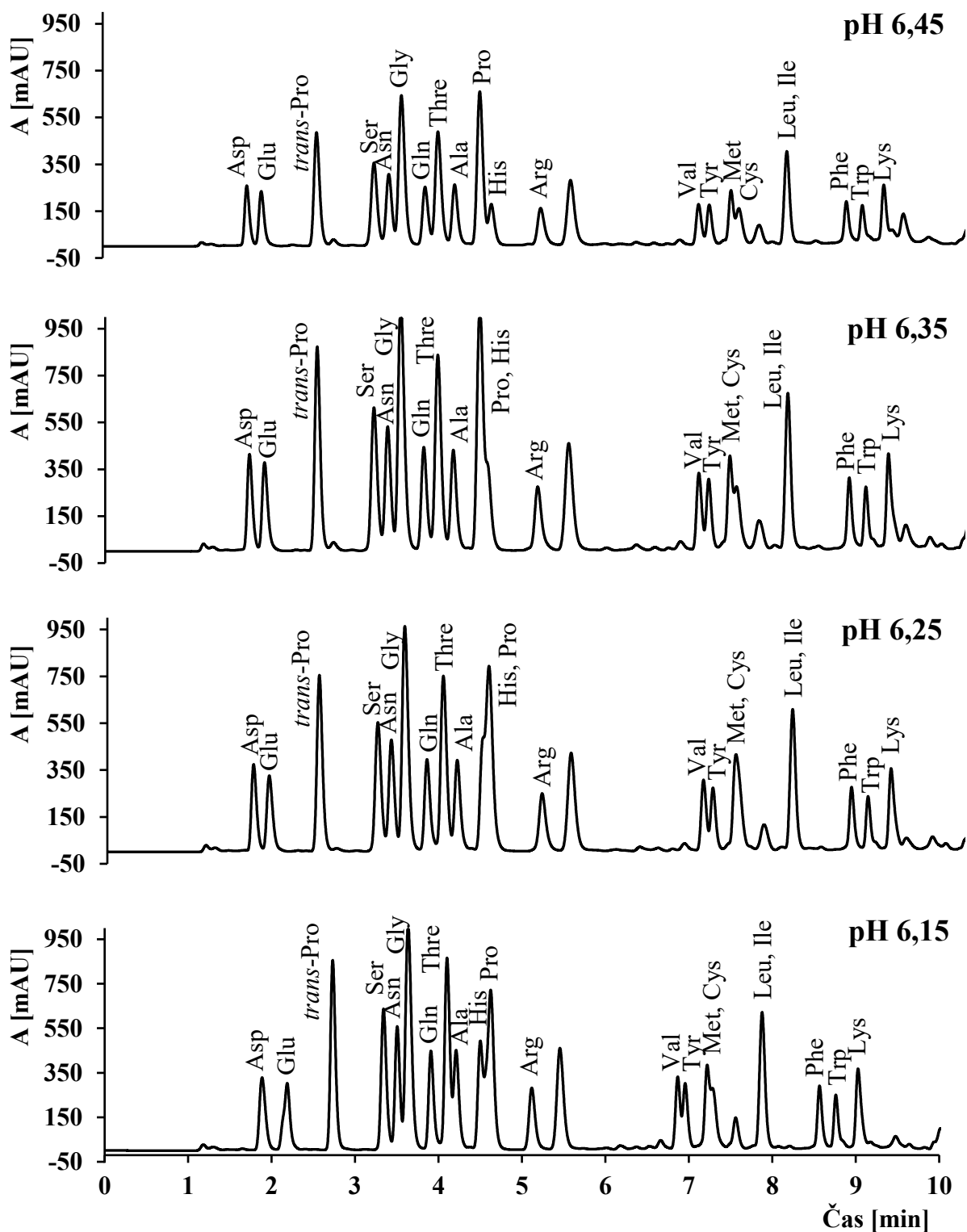
Optimalizace separace PITC derivátů byla zaměřena na složení mobilní fáze, pH vodné mobilní fáze a parametry gradientové eluce, jako je například strmost gradientu či počáteční složení mobilní fáze. První složkou mobilní fáze (A) byl vždy octan amonný ($c = 70 \text{ mmol/l}$) upravený kyselinou octovou na různé hodnoty pH (5,2; 5,8; 6,15; 6,25; 6,35; 6,45; 6,55). Bylo zjištěno, že i nepatrná změna pH způsobuje zásadní změny v separační selektivitě PITC derivátů (obrázek 23). Dokonce i rozdílné pH dávkovaného vzorku způsobovalo obrovské změny separační selektivity. Reprodukovatelný derivatizační postup,

obsáhle diskutovaný v kapitole 2.5.2.1, je tedy zcela klíčový i pro úspěšnou a reprodukovatelnou separaci.

Velmi významnou roli při separaci PITC derivátů hraje také výběr organické složky mobilní fáze (B), jakožto silnějšího elučního činidla. Byla testována dvě organická rozpouštědla, acetonitril ve vodě (60:40; obj./obj.) a metanol ve vodě (60:40; obj./obj.), včetně jejich kombinace (acetonitril:metanol:voda, 45:15:40; obj./obj.). Nejlepší selektivity separovaných derivátů a separační účinnosti bylo dosaženo s použitím směsi acetonitrilu s vodou.

Jak je z výše řečeného patrné, každá zanedbatelná změna v separačních podmínkách způsobila obrovské změny retenčního chování, selektivity a rozlišení separovaných látek. Bylo tedy extrémně náročné najít vhodné podmínky pro HPLC stanovení PITC derivátů AMK v tak složité matici, jakou je právě medovina. Po pečlivé optimalizaci derivatizačních i chromatografických podmínek bylo nakonec úspěšně rozseparováno 20 AMK z 21 analyzovaných, a to s minimálně jednotkovým rozlišením jednotlivých píků. Separace přitom proběhla v pouhých 10 minutách. Koeluovaly pouze píky dvou vzájemných izomerů, leucinu a izoleucinu, které mají velmi podobné vlastnosti, a jejich separace je proto velmi obtížná (zejména kvůli identickým hodnotám jejich disociačních konstant). Tak rychlá separace derivátů AMK, a to navíc s tak dobrými výsledky rozlišení, nebyla doposud nikde prezentována. Již publikované experimenty mají často nízkou citlivost, a i přes mnohonásobně delší separační čas (separace jsou často delší než 60 minut) obsahují velké množství koeluujících píků [1,6,11,22,29,31]. Kombinace inovativní derivatizace s takto optimalizovanou separací proto představuje nástroj neobyčejně rychlého a jednoduchého stanovení AMK v kapalných i pevných maticích.

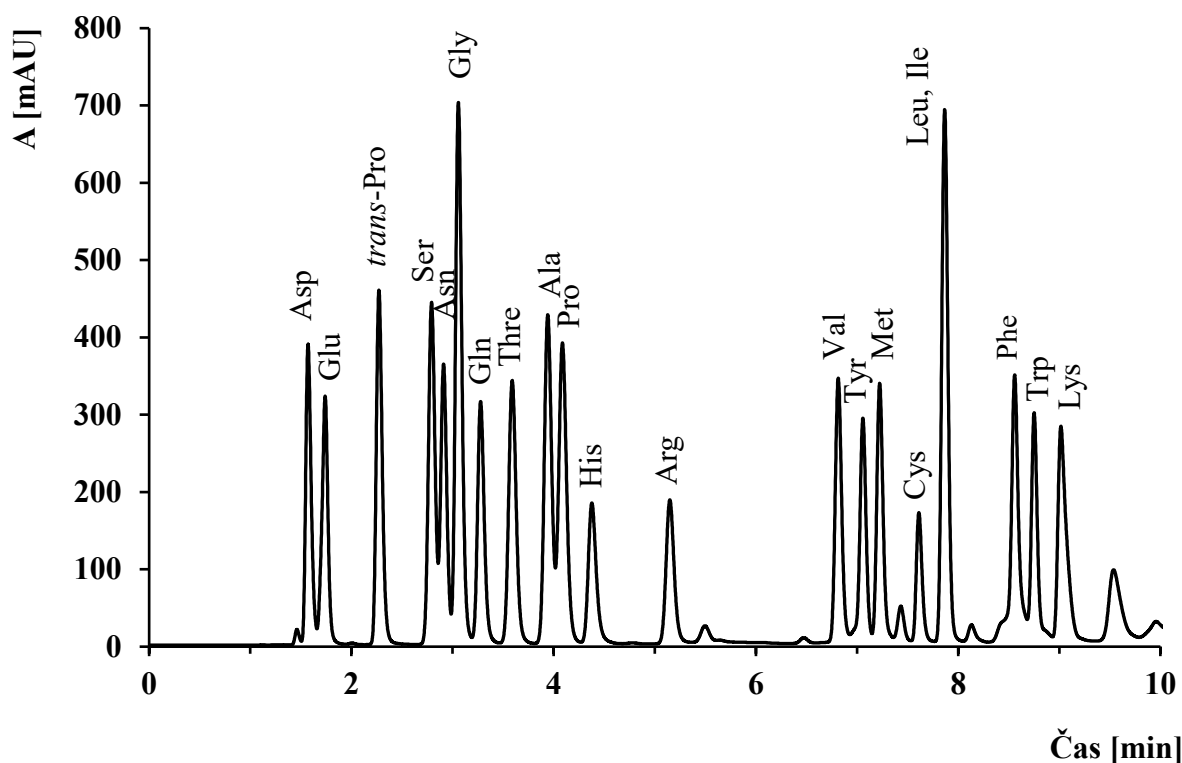
Optimalizovaná chromatografická separace směsi standardů AMK po jejich PITC derivatizaci je i s popisem jednotlivých píků znázorněna na obrázku 24.



Obrázek 23 Vliv pH mobilní fáze na chromatografickou separaci PITC derivátů AMK.

Zorbax SB-Aq (15 cm × 3 mm × 3,5 μm); teplota: 30 °C; MF A: octan amonný (c = 70 mmol/l), pH 6,15–6,45; MF B: 60% acetonitril ve vodě; gradient: 0 min – 6 % B, 1 min – 10 % B, 4 min – 18 % B, 8,5 min – 60 % B, 9 min – 100 % B; průtok: 0,6 ml/min; 254 nm; dávkování: 2 μl.

Poznámky: Asp = kyselina asparagová, Glu = kyselina glutamová, *trans*-Pro = *trans*-4-hydroxy-L-prolin, Ser = serin, Asn = asparagin, Gly = glycin, Gln = glutamin, Thre = threonin, Ala = alanin, Pro = Prolin, His = Histidin, Arg = Arginin, Val = Valin, Tyr = Tyrosin, Met = Methionin, Cys = Cystein, Leu = Leucin, Ile = Izoleucin, Phe = Fenylalanin, Trp = Tryptofan, Lys = Lysin.



Obrázek 24 Optimalizovaná separace standardů 21 AMK po jejich PITC derivatizaci.

Zorbax SB-Aq (15 cm × 3 mm × 3,5 μm); teplota: 30 °C; MF A: octan amonný (c = 70 mmol/l), pH 6,55; MF B: 60% acetonitril ve vodě; gradient: 0 min – 6 % B, 1 min – 10 % B, 4 min – 18 % B, 8,5 min – 60 % B, 9 min – 100 % B; průtok: 0,6 ml/min; 254 nm; dávkování: 2 μl.

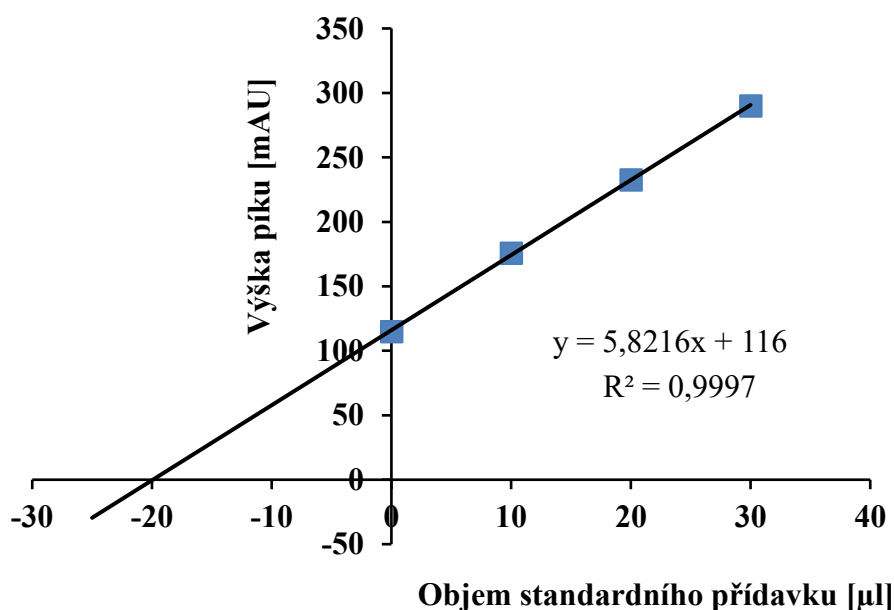
Poznámky: Asp = kyselina asparagová, Glu = kyselina glutamová, *trans*-Pro = *trans*-4-hydroxy-L-prolin, Ser = serin, Asn = asparagin, Gly = glycin, Gln = glutamin, Thre = threonin, Ala = alanin, Pro = Prolin, His = Histidin, Arg = Arginin, Val = Valin, Tyr = Tyrosin, Met = Methionin, Cys = Cystein, Leu = Leucin, Ile = Izoleucin, Phe = Fenylalanin, Trp = Tryptofan, Lys = Lysin.

2.5.2.3 Kvantitativní analýza AMK v medovinách

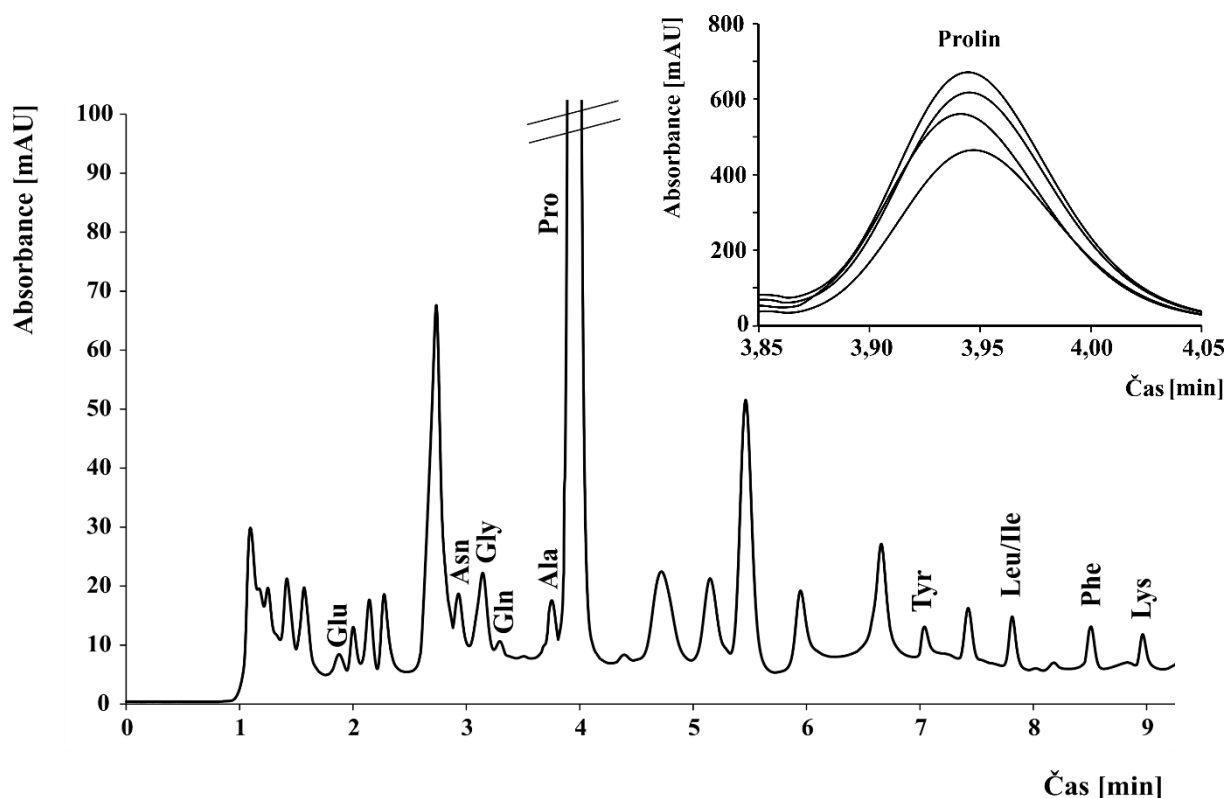
Optimalizované podmínky derivatizace a separace byly použity pro kvantitativní analýzu AMK přítomných ve vybraných vzorcích medoviny metodou vícenásobného standardního přídatku ve třech stupních. Nejprve byla provedena derivatizace a analýza původního vzorku medoviny (bez standardního přídatku) a byly zaznamenány výšky píků odpovídajících PITC derivátů AMK. Dále byly ke třem novým vzorkům stejné medoviny přidány tři známé objemy (10, 20 či 30 μl) standardní směsi AMK o koncentraci 0,4 g/l a proces derivatizace byl opakován (viz kapitola 2.4.4.2). Výšky zvyšujících se píků jednotlivých PITC derivátů po standardním přídatku byly odečteny a zaznamenány do grafické závislosti výšky píku na přidávaném objemu směsi AMK o dané koncentraci. Hodnoty odpovídající směrnici a úseku v přímkové závislosti vynesených bodů byly vypočteny metodou nejmenších čtverců (QC Expert 2.5, TriloByte, ČR). Extrapolací kalibrační přímky na nulovou hodnotu osy y byla získána hodnota x při y = 0, tedy objem

standardního roztoku AMK o $c = 0,4 \text{ g/l}$, který se nachází ve vzorku medoviny. Tento objem byl následně přepočítán na hmotnostní množství dané AMK (v miligramech) v jednom litru medoviny. Příklad kalibrační přímky aminokyseliny prolinu je znázorněn na obrázku 25. Chromatogram zderivatizovaného vzorku medoviny č. III včetně ukázky všech standardních přísadků pro prolin je zobrazen na obrázku 26.

Složení medoviny závisí na původu a kvalitě použitého medu a na celém výrobním postupu [134,135]. Z tohoto důvodu byly ve vzorcích medovin nalezeny různé kvalitativní a kvantitativní profily sledovaných AMK (tabulka 8). Ve všech vzorcích byl nalezen prolin, tyrosin, glycin, fenylalanin, leucin a izoleucin. Opačným případem jsou aminokyseliny threonin, histidin a tryptofan, které nebyly detekovány v žádném z analyzovaných vzorků. Nejvyšší počet jednotlivých AMK byl pozorován ve vzorku č. IV, kde bylo nalezeno 16 z 21 AMK. Tento vzorek pochází od včelaře a byl vyroben „studenou cestou“, při němž se medový roztok před inokulací kvasinkami nezahřívá, a nedochází tak k degradaci AMK. Ty jsou pak v medovině obsaženy ve vysoké koncentraci. Naopak nejmenší variabilita AMK byla pozorována v medovině č. I (pouze 10 AMK), která byla zakoupena v supermarketu a spadá do tzv. vařených medovin. Nízký nález rozdílných AMK v tomto vzorku mohl být způsoben zahříváním medového roztoku během přípravy medoviny, dále použitím nedostatečného množství medu nezbytného pro výrobu dobré a kvalitní medoviny, případně mohl být použit med nízké kvality. Celkový obsah AMK byl vypočítán součtem jednotlivých množství aminokyselin a pohyboval se v závislosti na vzorku v rozmezí 134–828 mg/l (tabulka 8).



Obrázek 25 Vyhodnocení množství prolinu v 10x zředěném vzorku č. V pomocí metody vícenásobného standardního přísadku.



Obrázek 26 Příklad chromatogramu zderivatizované medoviny č. III včetně všech standardních přísadků prolinu.

Zorbax SB-Aq (15 cm × 3 mm × 3,5 μm); teplota: 30 °C; MF A: octan amonný (c = 70 mmol/l), pH 6,55; MF B: 60% acetonitril ve vodě; gradient: 0 min – 6 % B, 1 min – 10 % B, 4 min – 18 % B, 8,5 min – 60 % B, 9 min – 100 % B; průtok: 0,6 ml/min; 254 nm; dávkování: 2 μl.

Poznámky: Asp = kyselina asparagová, Glu = kyselina glutamová, trans-Pro = trans-4-hydroxy-L-prolin, Ser = serin, Asn = asparagin, Gly = glycin, Gln = glutamin, Thre = threonin, Ala = alanin, Pro = Prolin, His = Histidin, Arg = Arginin, Val = Valin, Tyr = Tyrosin, Met = Methionin, Cys = Cystein, Leu = Leucin, Ile = Izoleucin, Phe = Fenylalanin, Trp = Tryptofan, Lys = Lysin.

Jelikož je prolin dominantní AMK v medu, musí být v nejvyšší koncentraci nalezen také v medovinách. Jak již bylo v kapitole 2.5.1 řečeno, jeden litr medoviny by měl obsahovat minimálně 50,4 mg prolinu [33,70]. U analyzovaných medovin byl obsah prolinu stanoven v rozmezí 30–266 mg/l (tabulka 8 a 9). Nejvyšší koncentrace prolinu byla nalezena ve vzorcích medovin č. V (266 mg/l) a č. IV (173 mg/l), jež byly vyrobeny včelaři v domácích podmínkách. Oba vzorky pak současně obsahovaly i nejvyšší celkový obsah AMK, který činil 569 mg/l pro vzorek č. V a 828 mg/l pro vzorek č. IV. Vysoké množství AMK v těchto medovinách mohlo být způsobeno dodatečným doslazováním finálního produktu medem, jenž je poměrně častým trikem včelařů pro zvýšení nutriční hodnoty a kvality medoviny a zlepšení jejích organoleptických vlastností. Naopak podlimitní koncentraci prolinu vykazoval s pouhými 30 mg/l vzorek č. I. Tento vzorek medoviny byl v předchozím odstavci diskutován i kvůli nízké variabilitě AMK. Jeho celkové množství AMK činilo pouhých 133 mg/l.

Tabulka 8 Koncentrace [mg/l] prezentovaných AMK v pěti vzorcích českých medovin.

Poznámky: Asp = kyselina asparagová, Glu = kyselina glutamová, *trans*-Pro = *trans*-4-hydroxy-L-prolin, Ser = serin, Asn = asparagin, Gly = glycin, Gln = glutamin, Thre = threonin, Ala = alanin, Pro = Prolin, His = Histidin, Arg = Arginin, Val = Valin, Tyr = Tyrosin, Met = Methionin, Cys = Cystein, Leu = Leucin, Ile = Isoleucin, Phe = Fenylalanin, Trp = Tryptofan, Lys = Lysin.

AMK	ČÍSLO VZORKU				
	I	II	III	IV	V
Asp	-	-	-	85,9 ± 1,4	82,8 ± 1,3
Glu	-	24,2 ± 1,3	18,5 ± 0,6	38,7 ± 1,3	28,4 ± 1,7
<i>trans</i>-Pro	4,6 ± 1,0	241,5 ± 2,6	-	4,5 ± 0,8	3,1 ± 0,7
Ser	-	-	-	-	75,4 ± 1,4
Asn	-	44,2 ± 1,5	46,1 ± 1,0	133,6 ± 2,1	39,6 ± 1,0
Gly	14,8 ± 0,9	11,3 ± 0,6	12,3 ± 1,0	19,2 ± 1,0	19,8 ± 0,8
Gln	-	19,7 ± 1,9	21,9 ± 1,7	41,2 ± 1,6	-
Thre	-	-	-	-	-
Ala	29,8 ± 1,2	36,7 ± 1,5	30,0 ± 0,7	81,3 ± 1,2	-
Pro	30,0 ± 1,6	82,6 ± 1,4	90,5 ± 1,5	172,7 ± 1,5	265,7 ± 0,7
His	-	-	-	-	-
Arg	-	-	-	-	-
Val	1,5 ± 0,4	-	-	31,9 ± 1,6	19,1 ± 0,7
Tyr	12,0 ± 0,6	25,3 ± 1,8	13,6 ± 0,3	15,7 ± 0,8	13,4 ± 1,1
Met	17,3 ± 0,6	19,3 ± 0,5	-	11,2 ± 0,6	-
Cys	-	-	-	112,7 ± 1,7	-
Leu + Ile	6,9 ± 0,4	7,6 ± 0,8	7,1 ± 0,8	14,8 ± 0,8	8,8 ± 0,9
Phe	7,2 ± 0,9	11,5 ± 0,4	12,2 ± 0,3	19,3 ± 0,5	12,3 ± 1,0
Trp	-	-	-	-	-
Lys	9,5 ± 1,6	-	27,6 ± 1,3	44,8 ± 1,9	-
Celkové množství AMK	133,6 ± 0,9	523,8 ± 1,3	279,8 ± 0,9	827,5 ± 1,2	568,5 ± 1,0

Velmi zajímavý nález byl pozorován v komerčním vzorku č. II. Tato medovina sice splňovala se svými 83 mg/l minimální požadavky na obsah prolinu, nicméně bylo stanoveno překvapivě velké množství *trans*-4-hydroxy-L-prolinu (*trans*-Pro). Koncentrace *trans*-Pro činila neuvěřitelných 242 mg/l, a byla tak třikrát vyšší než koncentrace prolinu, který by měl všem AMK obsaženým v medu či medovině dominovat. *Trans*-Pro je typická neesenciální AMK kolagenu, jenž může být z prolinu syntetizována v přítomnosti kyseliny askorbové [136]. Kyselina askorbová je antioxidant známý pod kódem E300, který je do potravin běžně přidáván pro jejich konzervaci a ochranu proti oxidaci, čímž se prodlužuje samotná trvanlivost potraviny. Jelikož byla na etiketě této medoviny výrobcem přímo uvedena informace o tepelném zpracování tohoto produktu, předpokládáme, že za účelem zvýšení

stability cenných bioaktivních sloučenin byla před vařením medového moštu přidána právě kyselina askorbová. Právě z důvodu potenciální degradace tepelně nestabilních sloučenin během tepelného ošetření medového moštu se v dnešní době doporučuje „studený proces“ přípravy medoviny [54,60,62].

Kvůli poměrně vysoké časové náročnosti stanovení AMK v medovinách metodou vícenásobného standardního přídávku ve třech stupních byla následně provedena i kvantifikace prolinu přímým srovnáním s jedním standardním přídávkem. Jak je z tabulky 9 patrné, obě kvantifikační metody poskytovaly téměř shodné hodnoty. Pouze získané směrodatné odchylky byly v případě přímého srovnání nepatrně vyšší.

Tabulka 9 Koncentrace prolinu [mg/l] stanovená ve vzorcích medovin vyvinutou chromatografickou (HPLC) a referenční spektrofotometrickou (SFM) metodou.

POUŽITÉ METODY KVANTIFIKACE				
ČÍSLO VZORKU	HPLC (vícenásobný standardní přídavek)	HPLC (přímé srovnání)	SFM (přímé srovnání)	SFM (kalibrační křivka)
I	30,0 ± 1,6	29,1 ± 1,7	35,9 ± 0,6	39,8 ± 0,6
II	82,6 ± 1,4	79,6 ± 1,4	78,5 ± 0,7	77,9 ± 1,0
III	90,5 ± 1,5	90,9 ± 1,8	103,8 ± 0,7	102,4 ± 1,5
IV	172,7 ± 1,5	173,0 ± 1,7	162,6 ± 1,0	160,1 ± 1,1
V	265,7 ± 1,7	262,3 ± 1,9	268,4 ± 1,0	265,3 ± 0,6

Vzhledem k absenci publikovaných dat zaměřených na analýzu AMK v medovinách jsme naměřené výsledky museli porovnat s některou ze zavedených, oficiálních metod. Jedinou, pro náš účel vhodnou porovnávací metodou bylo stanovení obsahu prolinu podle harmonizované metody etablované Mezinárodní komisí pro med [129]. Tato metoda spočívá ve spektrofotometrickém stanovení produktu vzniklého po reakci prolinu s derivatizačním činidlem ninhydrin. Intenzita tohoto barevného derivátu se měří při vlnové délce 510 nm a koncentrace prolinu ve vzorku se pak vypočítá pouhým přímým srovnáním s vnějším standardem. V našem případě byla kvantifikace provedena nejen přímým srovnáním (jak je uvedeno v protokolu této metody), ale i pomocí kalibrační křivky. Výsledky získané pomocí harmonizované metody byly následně porovnávány s výsledky získanými nově vyvinutou HPLC metodou a jsou shrnuty v tabulce 9. Z této tabulky je patrné, že obě metody poskytovaly u všech vzorků srovnatelné výsledky. Podobné porovnání HPLC metody se

standardizovanou spektrofotometrickou metodou bylo provedeno i v práci Bernala a kolektivu [1], kde byly AMK přítomné v medech derivatizovány pomocí různých derivatizačních činidel. Výsledky prolinu získané po jeho HPLC analýze pak byly porovnávány s hodnotami získanými s použitím ninhydrinové metody. V této studii bylo pozorováno, že hodnoty prolinu jsou při užití HPLC vždy nižší než hodnoty zjištěné oficiální spektrofotometrickou metodou.

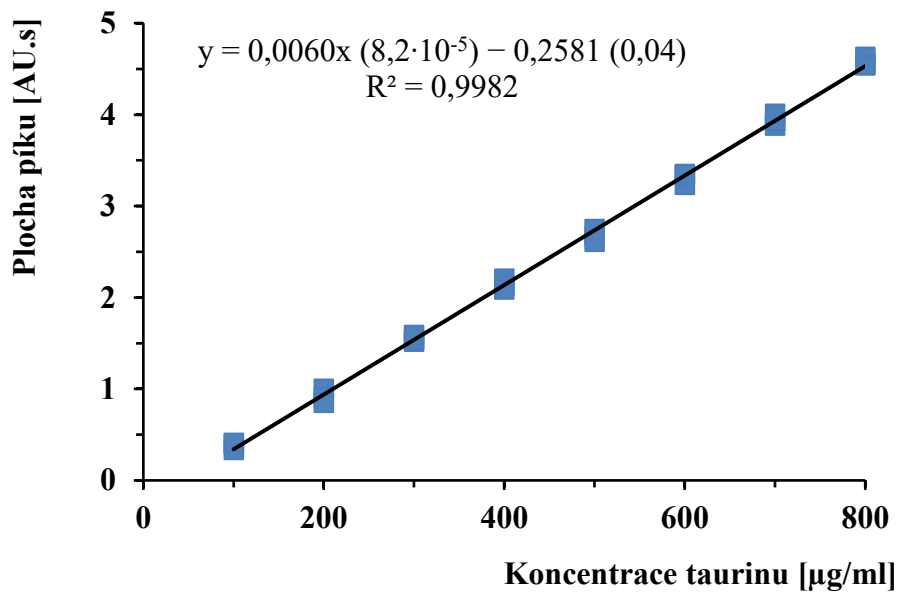
2.5.3 Taurin v energetických nápojích

2.5.3.1 Stanovení taurinu jako PITS derivátu

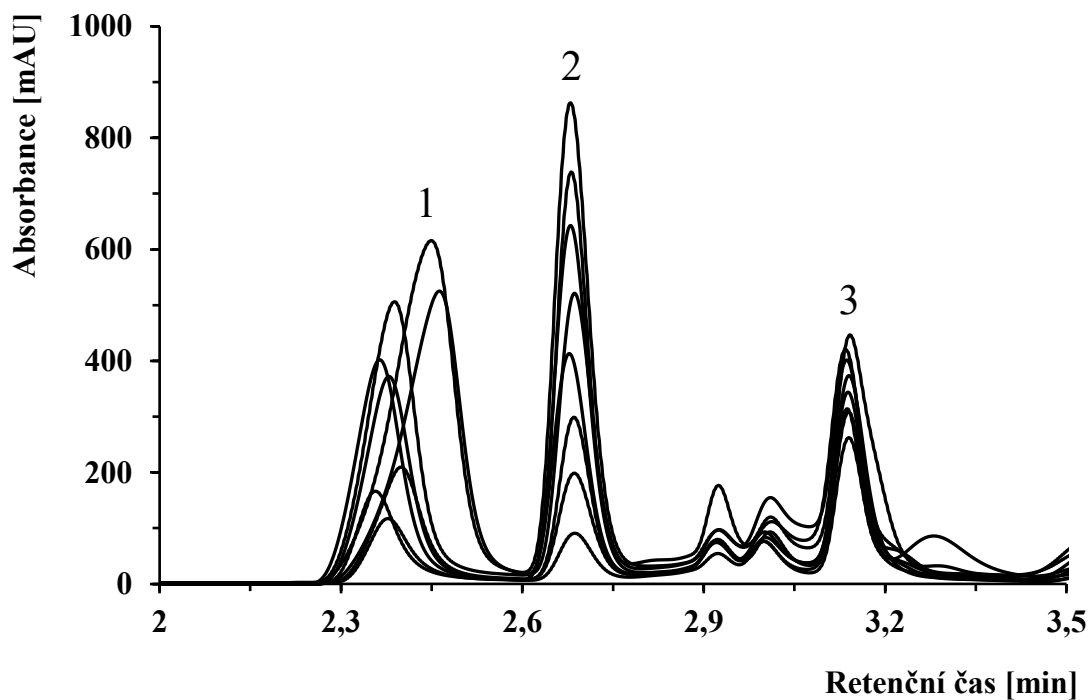
Pro stanovení taurinu v energetických nápojích byla použita stejná metoda PITS derivatizace (kapitola 2.4.4.2 a 2.4.5.2) a RP-HPLC separace (kapitola 2.4.4.3 a 2.4.5.2) jako pro analýzu AMK v medovinách. Taurin byl tedy již analyzován bez potřeby složité optimalizace a úprav vyvinuté metody. Optimalizován byl pouze čas derivatizace nezbytný pro kvantitativní průběh derivatizační reakce taurinu a PITS činidla. Konstantní plocha píku výsledného derivátu taurinu byla získána po 20 minutách, a proto byl tento čas zahrnut do derivatizačního procesu. Chromatografická separace pak proběhla standardním způsobem popsáním v kapitolách 2.4.4.3 a 2.4.5.2.

Kvantifikace taurinu byla provedena metodou kalibrační křivky, přičemž každý kalibrační roztok byl připraven třikrát. Kalibrační závislost plochy píku derivátu taurinu na jeho koncentraci je včetně příslušné rovnice regrese uvedena na obrázku 27.

Chromatogramy všech kalibračních roztoků pak shrnuje obrázek 28, v němž je v retenčním čase 2,7 dobře patrný i rovnoměrný nárůst výšky, potažmo plochy píku PITS derivátu taurinu s jeho zvyšující se koncentrací. Opakovatelnost chromatografické metody byla stanovena pomocí opakovaných měření ($n = 10$) kalibračního roztoku taurinu o koncentraci 400 $\mu\text{g/ml}$ a činila 2,9 % RSD. Správnost metody popisující rozdíl mezi stanoveným a skutečným obsahem analytu byla charakterizována pomocí účinnosti, která byla stanovena pro standardní roztok taurinu o koncentraci 320 $\mu\text{g/ml}$. Vypočtená hodnota účinnosti byla uspokojivá a činila 102,1 % [130].



Obrázek 27 Kalibrační křivka standardu taurinu derivatizovaného PITC činidlem, včetně příslušné rovnice regrese.

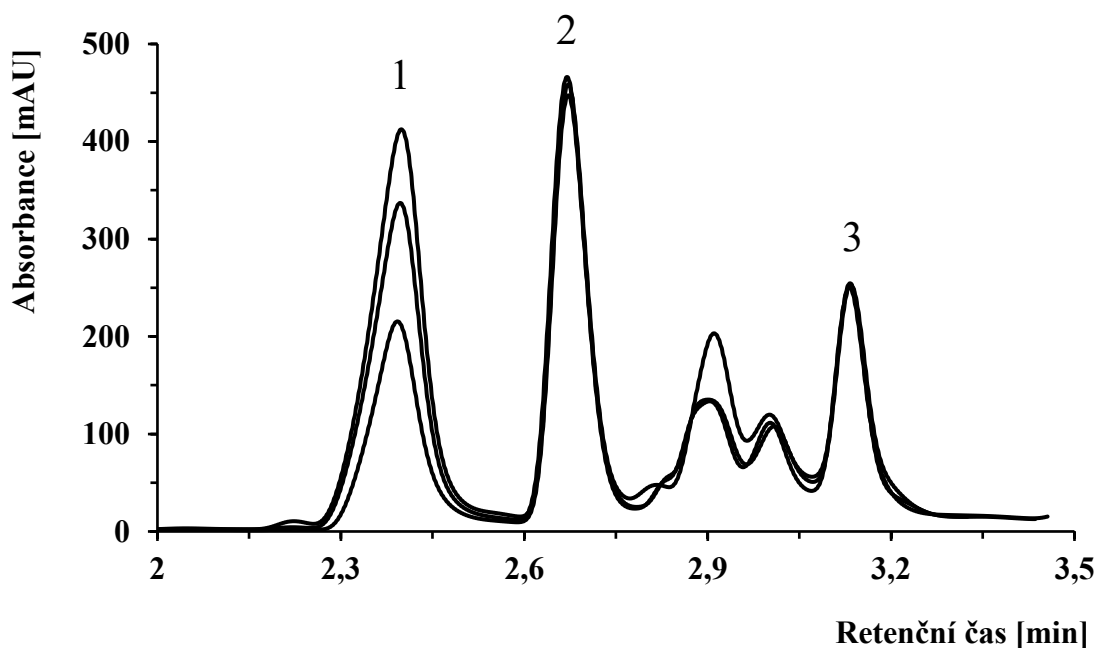


Obrázek 28 Chromatogramy osmi kalibračních roztoků PITC derivátů taurinu v koncentračním rozmezí 100–800 µg/ml.

Poznámky: (1) produkt hydrolyzy, (2) PITC derivát taurinu, (3) PITC činidlo.

Zorbax SB-Aq (15 cm × 3 mm × 3,5 µm); teplota: 30 °C; MF A: octan amonný (c = 70 mmol/l), pH 6,55; MF B: 60% acetonitril; gradient: 0 min – 15 % B; 1 min – 20 % B; 2 min – 100 % B; 3 min – 15 % B; průtok: 0,6 ml/min; 254 nm; dávkování: 2 µl.

Po důkladné optimalizaci byl taurin analyzován v šesti náhodně vybraných komerčně dostupných energetických nápojích. Příklad chromatografické separace desetkrát zředěného vzorku „Red Bull classic“ je uveden na obrázku 29. V témže obrázku je možné sledovat i velmi dobrou opakovatelnost chromatografického stanovení

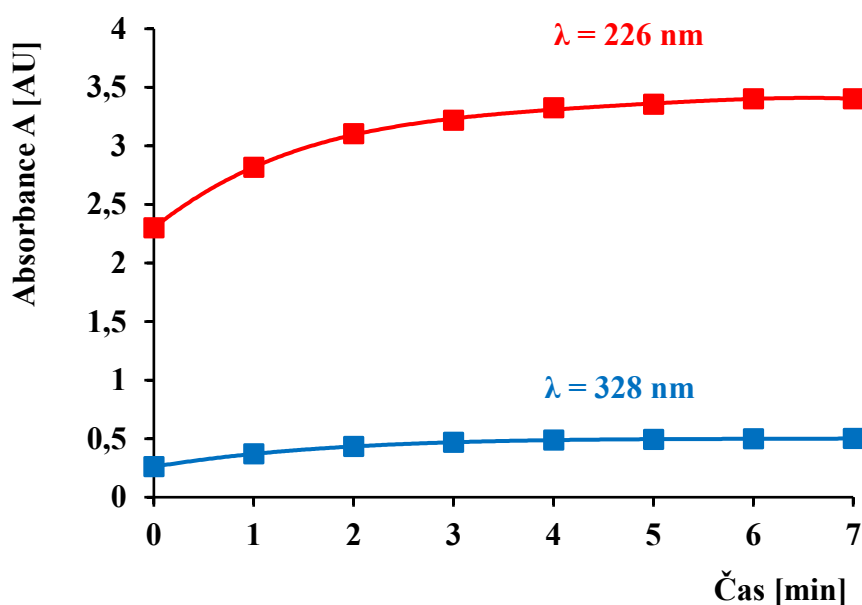


Obrázek 29 Chromatogramy 10× zředěného vzorku „Red Bull classic“ po jeho derivatizaci PITC činidlem. Derivát byl analyzován 3x. Zorbax SB-Aq (15 cm × 3 mm × 3,5 μm); teplota: 30 °C; MF A: octan amonný (c = 70 mmol/l), pH 6,55; MF B: 60% acetonitril; gradient: 0 min – 15 % B; 1 min – 20 % B; 2 min – 100 % B; 3 min – 15 % B; průtok: 0,6 ml/min; 254 nm; dávkování: 2 μl.

2.5.3.2 Stanovení taurinu jako OPA derivátu

Množství taurinu bylo v energetických nápojích dále stanoveno elektrochemicky po derivatizaci činidlem OPA a výsledky chromatografické a elektrochemické analýzy byly porovnávány. Optimalizace derivatizačního postupu [137–139] proběhla pomocí ultrafialové spektrofotometrie v rozsahu vlnových délek 200–400 nm. Nejprve byly proměřeny některé vodné roztoky taurinu lišící se jeho koncentrací, aby bylo prokázáno, že taurin nelze bez jeho předchozí derivatizace UV spektrofotometrií stanovit. Následně byla pomocí spektrofotometrie sledována kinetika celé OPA derivatizační reakce a množství nezbytných reaktantů. Bylo zjištěno, že OPA derivát taurinu poskytuje 2 absorpční maxima, a to při vlnových délkách 226 nm a 328 nm. Časovou závislost tvorby OPA derivátu taurinu při obou vlnových délkách přehledně popisuje obrázek 30. Z tohoto obrázku je patrné, že absorpce

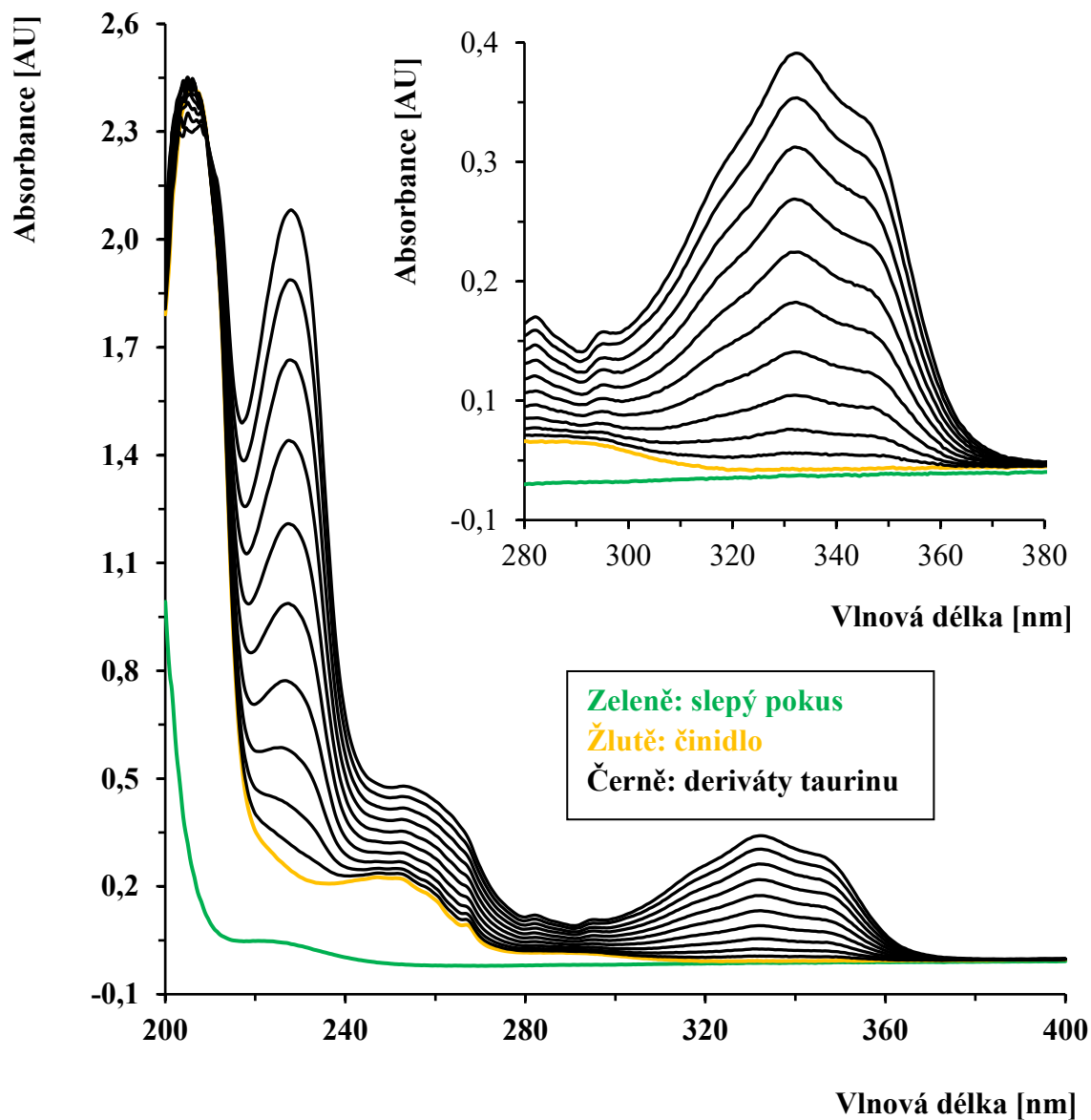
vznikajícího derivátu významně roste pouze do 4. minuty (obzvláště u vlnové délky 226 nm) a od 6. minuty je konstantní. Pro kvantitativní průběh derivatizace byla tedy naprosto dostačující reakční doba 6 min, jež byla následně dodržována ve všech experimentech. Dále bylo nutné optimalizovat správné množství jednotlivých derivatizačních komponent. Za tímto účelem byl roztok taurinu ($c = 0,5$ mmol/l) míchán s různým množstvím OPA činidla v koncentračním rozsahu $c = 0,2-4,0$ mmol/l. V momentě, kdy se zastavil nárůst absorbance vznikajícího derivátu, byla daná koncentrace činidla optimální a poměr mezi činidlem a taurinem byl zaznamenán. Množství použitého ethanthiolu bylo přitom vždy úměrné množství OPA (jejich poměr byl stejný). Podrobný derivatizační postup včetně optimálních poměrů všech reakčních komponent je uveden v kapitole 2.4.5.3 [130].



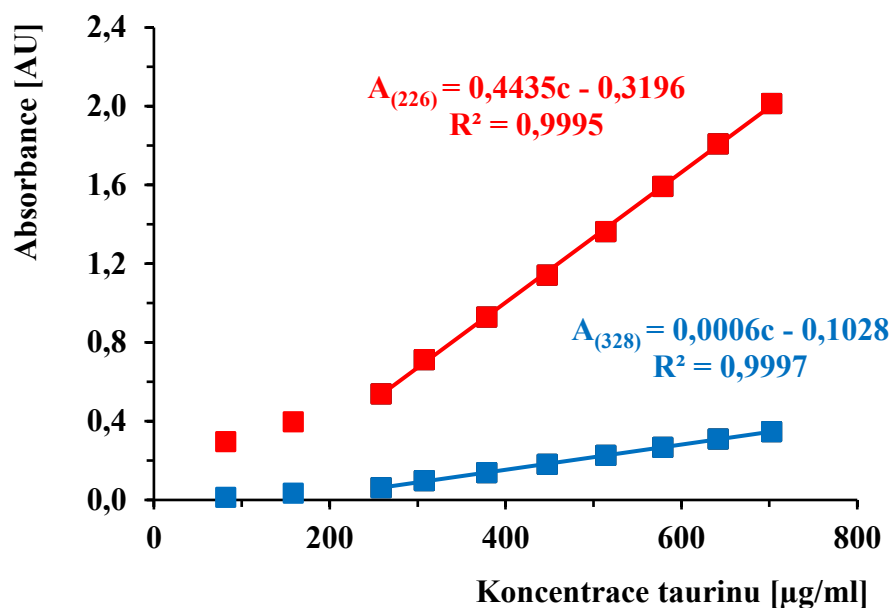
Obrázek 30 Časová závislost tvorby OPA derivátu taurinu sledovaná spektrofotometricky při dvou vlnových délkách ($\lambda = 226$ a 328 nm).

Derivatizační směs sestávající z metanolickeho roztoku OPA a ethanthiolu (bez přítomnosti taurinu) poskytovala v absorpčním spektru pouze jeden absorpční pás při 250 nm (obrázek 31). Po přidání taurinu byly pozorovány zcela nové pásy při absorpčních maximech 226 a 328 nm (obrázek 31). Naměřená maxima absorpčních pásů jsou ve shodě s experimenty publikovanými Dorresteijnem a kol. [139], kteří rovněž měřili UV spektra OPA derivátu taurinu v přítomnosti ethanthiolu. Dále bylo potvrzeno, že sledované hodnoty absorbance rostly pro obě vlnové délky lineárně se zvyšujícím se obsahem taurinu, což je prokázáno nejen absorpčními spektry OPA derivátů taurinu o deseti různých koncentracích

v rozmezí 82–703 $\mu\text{g/ml}$ na obrázku 31, ale i jejich kalibrační závislosti zobrazené i s příslušnými rovnicemi regrese na obrázku 32.



Obrázek 31 UV spektra 95% metanolu (slepý pokus), směsi OPA o $c = 0,25 \text{ mmol/l}$ s ethanthiolem o $c = 0,47 \text{ mmol/l}$ (činidlo) a OPA derivátů taurinu s různou koncentrací taurinu (82; 159; 258; 307; 378; 447; 514; 579; 642 a 703 $\mu\text{g/ml}$).



Obrázek 32 Koncentrační rozmezí lineární závislosti OPA derivátu taurinu stanovené spektrofotometricky při dvou vlnových délkách ($\lambda = 226$ a 328 nm).

Samotné elektrochemické stanovení taurinu nebylo předmětem této práce, ale sloužilo pouze pro porovnání výsledků získaných různými metodami. Detailní informace k elektrochemickému stanovení jsou uvedeny ve společné práci [130].

2.5.3.3 Analýza energetických nápojů

Stanovení obsahu taurinu v šesti energetických nápojích běžně dostupných v českých obchodních sítích proběhlo jak chromatograficky po jeho PITC derivatizaci, tak i elektrochemicky po derivatizaci činidlem OPA. Výsledky získané oběma metodami byly porovnávány a jsou spolu s deklarovaným obsahem taurinu přehledně shrnuty v tabulce 10. Naměřené hodnoty jsou uvedeny jako aritmetické průměry s odpovídajícími intervaly spolehlivosti, v nichž byl zohledněn i počet opakování. Pokud se intervaly spolehlivosti pro RP-HPLC a referenční SWV metodu překrývají, mělo by být zřejmé, že jsou metody srovnatelné [130].

Koncentrační rozsah taurinu stanovený oběma analytickými metodami byl 303–357 mg ve 100 ml vzorku energetického nápoje, což je pouze kolem 90 % deklarovaného obsahu taurinu, které činilo 350 či 400 mg/100 ml (tabulka 10). Přestože jsou obě použité analytické metody stanovení taurinu naprosto odlišné, poskytovaly srovnatelné výsledky. O něco přesnější výsledky byly získány chromatografickou metodou, o čem nás můžou přesvědčit nejenom nižší hodnoty intervalů spolehlivosti uvedené v tabulce 10,

ale i identické chromatogramy získané po třech nástřicích vzorku „Red Bull classic“ zobrazené na obrázku 29. Nicméně vyvinutá voltametrická metoda je velmi atraktivní nejen pro menší laboratoře, a to díky nižší spotřebě organických rozpouštědel, nižším počátečním nákladům na přístrojové vybavení, velmi rychlým analýzám a statisticky srovnatelným analytickým parametrům [130].

Tabulka 10 Porovnání chromatografických výsledků kvantitativního stanovení taurinu v šesti vybraných energetických nápojích s výsledky získanými pomocí SWV a s deklarovaným množstvím taurinu uvedeným na jejich obale.

VZOREK ENERGETICKÉHO NÁPOJE	MNOŽSTVÍ TAURINU [mg/100 ml]		
	SWV	HPLC	Deklarované množství
Crazy wolf classic	319,0 ± 29,2	302,6 ± 11,4	350
Crazy wolf s rybízovou příchuť	313,0 ± 8,7	311,3 ± 0,4	350
Red Bull classic	351,4 ± 34,9	357,1 ± 6,9	400
Red Bull letní edice	352,0 ± 1,81	349,6 ± 7,0	400
Semtex bez cukru	355,0 ± 16,7	334,2 ± 10,6	400
Semtex grapefruit s tonikem	328,0 ± 7,7	333,6 ± 6,5	400

2.6 ZÁVĚREČNÉ SHRnutí KE STANOVENÍ AMINOKYSELIN

Falšování medovin je v České republice obzvláště aktuálním tématem. Důvodem je nedostatečné právní ošetření, které by regulovalo správnou výrobu medoviny a zároveň i detailně specifikovalo požadované vlastnosti a složení. Pro odhalení nepoctivých producentů, a následně i pro ochranu spotřebitele před nákupem předražených výrobků neodpovídající kvality je tedy naprosto zásadní přesně a jasně etablovat konkrétní analytické postupy zaměřené na podrobný rozbor medoviny vedoucí k charakterizaci její kvality. Z tohoto důvodu byla disertační práce z velké části zaměřena právě na stanovení v medovinách přítomných AMK. AMK jsou dusíkaté sloučeniny, které se do medu dostávají z nektaru či pylu rostlin nebo trávícího ústrojí včel. Přestože jsou minoritními látkami medu, díky jejich specifickému původu může jejich kvalitativní a kvantitativní profil sloužit k hodnocení autenticity medu, a tím potažmo i medoviny.

Kvůli nedostatku literárních dat týkajících se posouzení kvality medu, respektive medoviny, je za nejvýznamnější marker kvality stále ještě považována iminokyselina prolin. Z tohoto důvodu byla optimalizována metoda kvantitativního stanovení prolinu ve 24 českých medovinách. Mezi analyzovanými vzorky byly medoviny vařené i nevařené, které byly zakoupeny od místních včelařů či v obchodních sítích. Prolin byl ze vzorku nejprve izolován extrakcí na tuhou fázi s použitím SPE kolonky Strata SCX, jež ze všech testovaných extrakčních kolonek vykazovala se svými 84 % největší extrakční účinnost. Za účelem vnesení fluoroforu do struktury prolinu byl pak získaný extrakt derivatizován pomocí DNS-Cl činidla. Během důkladné optimalizace DNS-Cl derivatizace bylo zjištěno, že tradiční, avšak velmi časově náročné kroky zahřívání a ekvibrace reaktantů nehrají při tvorbě DNS-Cl derivátu prolinu roli, a celý derivatizační proces byl tak významně zjednodušen a urychlen. Nakonec byl vzniklý DNS-Cl derivát prolinu analyzován RP-HPLC systémem spojeným s fluorescenčním detektorem nastaveným na hodnoty excitačního a emisního maxima daného derivátu ($\lambda_{EX} = 264 \text{ nm}$ a $\lambda_{EM} = 497 \text{ nm}$). Chromatografická separace proběhla na konvenční koloně Ascentis Express C18 s využitím gradientové eluce binární mobilní fáze sestávající z 0,1% vodného roztoku TEA o pH 3,0 a 100% acetonitrilu. Množství prolinu bylo v analyzovaných vzorcích vyhodnoceno metodou kalibrační křivky a pohybovalo se od 42 mg/l do 131 mg/l. Vzorky zakoupené v obchodních sítích vykazovaly obecně nižší obsah prolinu než vzorky získané od včelařů. Nejvyšší množství prolinu bylo pak nalezeno v těch nevařených medovinách, které byly na konci své výroby doslazovány medem. Na druhou stranu dokonce dva analyzované vzorky nedosáhly ani na hodnotu minimální

koncentrace prolinu (50,4 mg/l), danou Nařízením (EC) č. 110/2008 [70] a vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 248/2018 [72]. Další dva vzorky se při započtení jejich směrodatné odchylky pohybovaly těsně nad danou limitní hodnotou. Tyto čtyři medoviny byly zakoupeny v obchodních sítích, přičemž proces vaření byl z etikety potvrzen u dvou z nich. Další 2 vzorky neuváděly bližší informace. Producenti těchto výrobků zřejmě nedodrželi správný technologický postup výroby, a medoviny jsou tak považovány za falšované.

K posouzení kvality medoviny se však mohou využít i parametry přinášející komplexnější informace, mezi nimiž je i celkový profil a množství přítomných α -AMK. Za tímto účelem byla v další části práce vyvinuta rychlá a snadná metoda RP-HPLC analýzy 21 AMK s následnou spektrofotometrickou detekcí. Optimalizovaná metoda nevyžadovala jiné zpracování vzorku než jeho derivatizaci, která byla nezbytná pro zanesení chromoforu do struktury AMK, a tím jejich specifitější a citlivější detekci. K derivatizaci bylo použito komerčně dostupné a pro tyto účely běžně využívané PITC činidlo, jehož deriváty jsou dobře detekovatelné při 254 nm. Vyvinutý derivatizační postup eliminoval veškeré sušící kroky, které jsou standardně při přípravě PITC derivátů AMK zahrnuty, a proto spolu s následnou velmi rychlou HPLC separací připravených derivátů šetří manuální práci, celkovou dobu analýzy a spotřebu rozpouštědel. Tato metoda má navíc velice dobrou opakovatelnost a výbornou stabilitu vytvořených PITC derivátů (při uchování v lednici zůstávají nezměněny i několik týdnů). Během pouhých deseti minut bylo tedy rozseparováno 20 PITC derivátů AMK z 21 analyzovaných, přičemž dané píky vykazovaly minimálně jednotkové rozlišení. Byla pozorována pouze jedna koeluce, a to v případě aminokyselin leucinu a izoleucinu. Tyto dva izomery jsou si však svými vlastnostmi natolik podobné (stejně hodnoty disociačních konstant či polarita), že je jejich separace na běžných stacionárních fázích opravdu velmi náročná. Experimenty proběhly na koloně Zorbax SB-Aq s použitím gradientové eluce binární mobilní fáze sestávající z vodného roztoku octanu amonného ($c = 70 \text{ mmol/l}$) o pH 6,55 a 60% acetonitrilu ve vodě. Dle publikovaných dat je to vůbec poprvé, kdy byly PITC deriváty AMK separovány v tak krátké době a s tak dobrým rozlišením. Optimalizovaná metoda byla dále použita ke stanovení AMK v pěti vzorcích medovin. Kvantifikace přítomných AMK byla provedena metodou vícenásobného standardního přídatku ve třech stupních. Jejich celkový obsah byl stanoven součtem jednotlivých AMK a pohyboval se v rozmezí 134 až 828 mg/l. Koncentrace prolinu, jakožto nejdůležitější AMK v medovinách, byla pak v rozsahu 30–266 mg/l. Množství prolinu nalezené chromatograficky bylo potvrzeno referenční harmonizovanou metodou zavedenou Mezinárodní komisí pro med [129], která

využívá spektrofotometrické detekce barevného produktu vzniklého derivatizací prolinu s ninhydrinem. Výsledky získané oběma metodami byly porovnávány a jsou u všech vzorků medovin v mimořádně dobré shodě. Na minimální obsah prolinu (50,4 mg/l) [70,72] nedosáhl pouze jeden z analyzovaných vzorků. Tento vzorek byl zakoupen v obchodní síti a spadal do skupiny tzv. vařených medovin. Kvůli podprůměrnému nálezu prolinu lze soudit, že během jeho výroby došlo k nechtěnému či záměrnému pochybení, a vzorek medoviny tak nebyl vyroben v souladu se správnou výrobní praxí. Zajímavým překvapením byl dále nález nevídaně vysoké koncentrace *trans*-4-hydroxy-L-prolinu u jiného analyzovaného komerčního vzorku. Tato sloučenina se v medech či v medovinách přirozeně vůbec nevyskytuje. Její přítomnost byla pravděpodobně způsobena umělým přidáním kyseliny askorbové do medového moštu před jeho zahřátím. Kyselina askorbová totiž dokáže zvýšit stabilitu obsažených látek, a tím tak předejít vzniku degradačních produktů vznikajících během vaření medoviny. Prolin však v přítomnosti kyseliny askorbové přechází na *trans*-4-hydroxy-L-prolin, jenž jsme pak mohli v koncentraci téměř 242 mg/l v diskutovaném vzorku pozorovat.

Analýzy organických sloučenin přítomných v potravinách jsou důležité nejen pro hodnocení jejich autenticity, ale i pro odhalení nebezpečně vysokých koncentrací některých, v normálních hladinách zdraví prospěšných látek. V poslední části disertační práce byla proto aplikována námi vyvinutá metoda RP-HPLC analýzy PITC derivátů α -AMK na detekci kontroverzní β -aminokyseliny taurinu. Přestože je taurin pro člověka naprosto nezbytnou neproteinogenní aminokyselinou, jeho nadměrná konzumace je spojená s nemalým množstvím vedlejších, nežádoucích účinků, jejichž riziko výskytu se významně zvyšuje v kombinaci s alkoholem a vysokými dávkami kofeinu. Stále populárnější energetické nápoje představují extrémní zdroj taurinu, kofeinu a cukru dohromady. Na večírcích jsou pak energetické nápoje velmi často součástí mnoha alkoholických koktejlů. Z tohoto důvodu byl taurin analyzován právě ve vzorcích energetických nápojů. Ke stanovení bylo zakoupeno šest komerčně dostupných energetických nápojů vyrobených třemi, v České republice nejznámějšími značkami: Red Bull, Crazy Wolf a Semtex. Výsledky získané výše zmiňovanou chromatografickou metodou byly ve druhém kroku porovnávány s nově vyvinutou elektroanalytickou metodou stanovení taurinu po jeho derivatizaci OPA činidlem v prostředí ethanthiolu. Tento derivatizační proces byl nejprve důkladně optimalizován pomocí UV spektrofotometrie v rozsahu vlnových délek 200–400 nm. Sledována byla nejen reakční kinetika celé reakce, ale i optimální poměry jednotlivých reaktantů. Zderivatizovaný taurin byl poté analyzován pomocí SWV voltametrie, která je založena na přímé voltametrické oxidaci OPA derivátu na elektrodě ze skelného uhlíku s použitím nosného

elektrolytu složeného z 0,1M LiClO₄ v 95% metanolu. Hodnoty taurinu nalezené ve vzorcích nápojů chromatografickou metodou jsou statisticky srovnatelné s výsledky dosaženými metodou elektroanalytickou a pohybují se v rozsahu 303–357 mg taurinu ve 100 ml energetického nápoje. Stanovená množství však představovala pouze kolem 90 % výrobci deklarovaného množství, jež u dvou výrobků činilo 350 mg/100 ml a u dalších čtyřech 400 mg/100 ml. Přestože je vysoký příjem taurinu minimálně nezdravý a jeho nižší nálezy v analyzovaných vzorcích jsou tak z hlediska zdraví spíše ku prospěchu, ve všech případech došlo k porušení zákazu uvádět spotřebitele v omyl daného nařízením ES č. 178/2002 [140]. Pokud bychom porovnávali výhody obou analytických metod použitých pro detekci taurinu v energetických nápojích, první příčku by obsadila metoda elektroanalytická, a to i navzdory o něco méně přesným analýzám. Elektroanalytické techniky jsou obecně oceňovány pro svoji jednoduchost, nízké pořizovací i provozní náklady a velmi rychlé analýzy. To je důvodem velkého potenciálu vyvinuté metody, zejména pro malé laboratoře, které si nemohou dovolit drahé chromatografické vybavení. Tato metoda pak může sloužit ke standardnímu, efektivnímu a zároveň i levnému screeningu množství taurinu v potravinách, jako je například kojenecká či sportovní výživa, jejichž zvýšená či častá konzumace by mohla vést k potenciálním zdravotním rizikům.

2.7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Bernal J.L., Nozal M.J., Toribio L., Diego J.C. & Ruiz A. (2005). A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. *Journal of Separation Science*, **28**(9-10), 1039–1047.
- [2] Manig F., Kuhne K., von Neubeck C., Schwarzenbolz U., Yu Z., Kessler B.M., Pietzsch J. & Kunz-Schughart L.A. (2017). The why and how of amino acid analytics in cancer diagnostics and therapy. *Journal of Biotechnology*, **242**, 30–54.
- [3] Wu G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, **37**, 1–17.
- [4] Zarándi M. & Szolomájer J. (2018). Amino acids: chemistry, diversity and physical properties, pp. 1–84. In Ryadnov M., Hudecz F. (Eds.), *Amino Acids, Peptides and Proteins*, Volume 42, Specialist Periodical Reports, Royal Society of Chemistry, ISBN 9781788010023.
- [5] Damodaran S. (2008). Chapter 5: Amino acids, Peptides, and Proteins. In Damodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R. (Eds.), *Fennema's Food Chemistry*. Fourth edition. CRC Taylor Press, UK. ISBN 08-493-9272-1.
- [6] Oldekop M.L., Herodes K. & Rebane R. (2014). Study of the matrix effects and sample dilution influence on the LC-ESI-MS/MS analysis using four derivatization reagents. *Journal of Chromatography B*, **967**, 147–155.
- [7] Rebane R. & Herodes K. (2010). A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. *Analytica Chimica Acta*, **672**(1), 79–84.
- [8] Rebane R. & Herodes K. (2008). Evaluation of the Botanical Origin of Estonian Uni- and Polyfloral Honeys by Amino Acid Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(22), 10716–10720.
- [9] Iglesias M.T., Martín-Álvarez P.J., del Carmen Polo M., de Lorenzo C., Gonzalez M. & Pueyo E.N. (2006). Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 9099–9104.

- [10] Kelly M.T., Blaise A. & Larroque M. (2010). Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey. *Journal of Chromatography A*, **1217**(47), 7385–7392.
- [11] Pereira V., Pontes M., Câmara J. & Marques J.C. (2008). Simultaneous Analysis of Free Amino Acids and Biogenic Amines in Honey and Wine Samples Using in Loop Orthophthalaldehyde Derivatization Procedure. *Journal of Chromatography A*, **1189**, 435–443.
- [12] Tuberoso C.I.G., Congiu F., Serreli G. & Mamei S. (2015). Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food Chemistry*, **175**, 29–35.
- [13] Jia S., Kang Y.P., Park J.H., Lee J. & Kwon S.W. (2011). Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 9174–9182.
- [14] Gonzalez-Paramas A.M., Gómez Báñez J.A., Cordón Marcos C., Garcia-Villanova R.J. & Sánchez Sánchez J. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry*, **95**, 148–156.
- [15] Denoroy L. & Parrot S. (2017). Analysis of Amino Acids and Related Compounds by Capillary Electrophoresis. *Separation & Purification Reviews*, **46**(2), 108–151.
- [16] Cormack P.A.G. & Elorza A.Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B*, **804**(1), 173–182.
- [17] Masqué N., Marcé R.M. & Borrull F. (2001). Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, **20**(9), 477–486.
- [18] Mosbach K. (1994). Molecular imprinting. *Trends in biochemical sciences*, **19**(1), 9–14.
- [19] Sellergren B. & Hall A.J. (2012). Molecularly Imprinted Polymers, pp. 3255–3282. In Steed J.W., Gale P.A. (Eds.), *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.

- [20] Shah N., Ul-Islam M., Haneef M. & Park J.K. (2012). A Brief Overview of Molecularly Imprinted Polymers: From Basics to Applications. *Journal of Pharmacy Research*, **5**(6), 3309–3317.
- [21] Vasapollo G., del Sole R., Mergola L., Lazzoi M.R., Scardino A., Scorrano S. & Mele G. (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Science*, **12**(9), 5908–5945.
- [22] Zhu F., Wang J., Zhu L., Tan L., Feng G., Liu S., Dai Y. & Wang H. (2016). Preparation of molecularly imprinted polymers using theanine as dummy template and its application as SPE sorbent for the determination of eighteen amino acids in tobacco. *Talanta*, **150**, 388–398.
- [23] Boonchiangma S., Ratchakrut P., Chanthai S. & Srijaranai S. (2015). Reversed Phase Chromatographic Analysis of 13 Amino Acids in Honey Samples. *Chromatographia*, **78**, 923–927.
- [24] Iglesias M.T., de Lorenzo C., del Carmen Polo M., Martín-Álvarez P.J. & Pueyo E. (2004). Usefulness of Amino Acid Composition to Discriminate between Honeydew and Floral Honeys. Application to Honeys from a Small Geographic Area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 84–89.
- [25] Engbaek F. & Magnussen I. (1978). Determination of 5-hydroxytryptophan in plasma by high-performance liquid chromatography and fluorometric detection after phthaldialdehyde reaction. *Clinical Chemistry*, **24**(2), 376–378.
- [26] Kang X., Xiao J., Huang X. & Gu Z. (2006). Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. *Clinica Chimica Acta*, **366**, 352–356.
- [27] Davey J.F. & Ersser R.S. (1990). Amino acid analysis of physiological fluids by high-performance liquid chromatography with phenylisothiocyanate derivatization and comparison with ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, **528**(1), 9–23.
- [28] Harikrishna N., Mahalakshmi S., Kiran Kumar K. & Reddy G. (2017). Fish Scales as Potential Substrate for Production of Alkaline Protease and Amino Acid Rich Aqua Hydrolyzate by *Bacillus altitudinis* GVC11. *Indian Journal of Microbiology*, **57**(3), 339–343.

- [29] Hun L.T., Wani W.A., Poh H.Y., Baig U., Ti Tjih E.T., Nashiruddin N.I., Ling Y.E. & Aziz R.A. (2016). Gel electrophoretic and liquid chromatographic methods for the identification and authentication of cave and house edible bird's nests from common adulterants. *Analytical Methods*, **8**(3), 526–536.
- [30] Omole J.O., Ighodaro O.M. & Durosinolorun O. (2017). Fortification of Ogi with Whey Increases Essential Amino Acids Content of Fortified Product. *International Scholarly Research Notices*, ID 7450845.
- [31] Sato K. (2017). The presence of food-derived collagen peptides in human body-structure and biological activity. *Food & Function*, **8**(12), 4325–4330.
- [32] Kečkeš J., Trifković J., Andrić F., Jovetić M., Tesić Ž. & Milojković-Opsenica D. (2013). Amino acids profile of Serbian unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93**, 3368–3376.
- [33] Hermosín I., Chicón R.M. & Cabezudo M.D. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, **83**, 263–268.
- [34] Rebane R., Oldekop M.L. & Herodes K. (2012). Comparison of amino acid derivatization reagents for LC-ESI-MS analysis. Introducing a novel phosphazene-based derivatization reagent. *Journal of Chromatography B*, **904**, 99–106.
- [35] Cavaco T. & Figueira A.C. (2016). Functional Properties of Honey and Some Traditional Honey Products from Portugal, **24**, 339–352. In Kristbergsson K., Ótles S. (Eds.), *Functional Properties of Traditional Foods*. Springer US, New York, USA.
- [36] da Silva I.L., Pagliarini M.A., Chagas T.E., Frühauf M., Kempka A.P. & Dornelles R.C.P. (2017). Effect of supplementation with pollen and brewer's yeast in the fermentation and in the physicochemical properties of honey spirits. *International Food Research Journal*, **24**(3), 1124–1134.
- [37] Manolova V., Parvina I., Yankovska–Stefanova T., Luchanska R. & Balkanska E. (2018). Characterization of Multifloral Honeys from Angola by Their Physicochemical Parameters. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **7**(2), 1869–1875.

- [38] da Silva I.A.A., da Silva T.M.S., Camara C.A., Queiroz N., Magnani M., de Novais J.S., Soledade L.E.B., de Oliveira Lima E., de Souza A.L. & de Souza A.G. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*, **141**, 3552–3558.
- [39] da Silva P.M., Gauche C., Gonzaga L.V., Costa A.C.O. & Fett R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, **196**, 309–323.
- [40] Gangl H., Lopandic K., Tscheik G., Mandl S., Leitner G., Wechselberger K., Batusic M. & Tiefenbrunner W. (2018). Fermentation characteristics of mead and wine generated by yeasts isolated from beehives of two Austrian regions. *BioRxiv*, 300780.
- [41] Siddiqui A.J., Musharraf S.G., Choudhary M.I., & Atta-ur-Rahman (2017). Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chemistry*, **217**, 687–698.
- [42] Alvarez-Suarez J.M., Tulipani S., Diaz D., Estevez Y., Romandini S., Giampieri F., Damiani E., Astolfi P., Bompadre S. & Battino M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 2490–2499.
- [43] Ferreira I.C.F.R., Aires E., Barreira J.C.M. & Estevinho L.M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, **114**, 1438–1443.
- [44] Bertoneclj J., Doberšek U., Jamnik M. & Golob T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, **105**, 822–828.
- [45] Pyrzynska K. & Biesaga M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, **28**(7), 893–902.
- [46] Kahoun D., Řezková S., Veškrnová K., Královský J. & Holčápek M. (2008). Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. *Journal of Chromatography A*, **1202**, 19–33.

- [47] Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J. & Nacoulma O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, **91**, 571–577.
- [48] Silici S., Sagdic O. & Ekici L. (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food Chemistry*, **121**, 238–243.
- [49] Anjos O., Frazão D. & Caldeira I. (2017). Physicochemical and Sensorial Characterization of Honey Spirits. *Foods*, **6**(8), 58–72.
- [50] Escriche I., Kadar M., Juan-Borrás M. & Domenech E. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*, **142**, 135–143.
- [51] Yao L., Datta N., Tomás-Barberán F. A., Ferreres F., Martos I. & Singanusong R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, **81**, 159–168.
- [52] Yao L., Jiang Y., Singanusong R., D'Arcy B., Datta N., Caffin N. & Raymont K. (2004). Flavonoids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, **37**, 166–174.
- [53] Marinova G., Mileva S. & Batchvarov V. (2017). Mead – an ancient drink with a modern image. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, **20**(4), 229–244.
- [54] Vidrih R. & Hribar J. (2016). Mead: The Oldest Alcoholic Beverage, 325–338. In Kristbergsson K., Oliveira J. (Eds.), *Traditional Foods: General and Consumer Aspects*. Springer US, Boston, MA.
- [55] Švecová B., Bordovská M., Kalvachová D. & Hájek T. (2015). Analysis of Czech meads: Sugar content, organic acids content and selected phenolic compounds content. *Journal of Food Composition and Analysis*, **38**, 80–88.
- [56] Brudzynski K., Sjaarda C. & Maldonado-Alvarez L. (2013). A new look on protein polyphenol complexation during honey storage: is this a random or organized event with the help of dirigent-like proteins? *Plos One*, **8**, 1–9.

- [57] Martínez A.M., Vivas G.J. & Quicazánc M.C. (2016). Evaluation of Alcoholic Fermentation During the Production of Mead Using Immobilized Cells in Kappa-Carrageenan. *Chemical Engineering Transactions*, **49**, 19–24.
- [58] da Silva S.M.P.C., de Carvalho C.A.L., da Silva Sodré G. & Estevinho L.M. (2018). Production and characterization of mead from the honey of *Melipona scutellaris* stingless bees. *Journal of the Institute of Brewing*, **124**(2), 194–200.
- [59] Iglesias A., Pascoal A., Choupina A.B., Carvalho C.A., Feás X. & Estevinho L.M. (2014). Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. *Molecules*, **19**(8), 12577–12590.
- [60] Kahoun D., Řezková S. & Královský J. (2017). Effect of heat treatment and storage conditions on mead composition. *Food Chemistry*, **219**, 357–363.
- [61] Pascoal A., Oliveira J.M., Pereira A.P., Feás X., Anjos O. & Estevinho L.M. (2017). Influence of fining agents on the sensorial characteristics and volatile composition of mead. *Journal of the Institute of Brewing*, **123**(4), 562–571.
- [62] Czabaj S., Kawa-Rygielska J., Kucharska A.Z. & Kliks J. (2017). Effects of Mead Wort Heat Treatment on the Mead Fermentation Process and Antioxidant Activity. *Molecules*, **22**(5), 803–817.
- [63] Akalın H., Bayram M. & Anlı R.E. (2017). Determination of some individual phenolic compounds and antioxidant capacity of mead produced from different types of honey. *Journal of the Institute of Brewing*, **123**(1), 167–174.
- [64] Cuenca M., Ciesa F., Romano A., Robatscher P., Scampicchio M. & Biasioli F. (2016). Mead fermentation monitoring by proton transfer reaction mass spectrometry and medium infrared probe. *European Food Research and Technology*, **242**(10), 1755–1762.
- [65] Sroka P., Satora P., Tarko T. & Duda-Chodak A. (2017). The influence of yeast immobilization on selected parameters of young meads. *Journal of the Institute of Brewing*, **123**(2), 289–295.
- [66] Walker G.M. & Stewart G.G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, **2**(4), 30–41.

- [67] Amorim T.S., de Brito Lopes S., Bispo J.A.C., Bonafec C.F.S., de Carvalho G.B.M. & Martínez E.A. (2018). Influence of acerola pulp concentration on mead production by *Saccharomyces cerevisiae* AWRI 796. *LWT – Food Science and Technology*, **97**, 561–569.
- [68] Barry J.P., Metz M.S., Hughey J., Quirk A. & Bochman M.L. (2018). Two Novel Strains of *Torulaspora delbrueckii* Isolated from the Honey Bee Microbiome and Their Use in Honey Fermentation. *Fermentation*, **4**(2), 22–32.
- [69] Sroka P. & Satora P. (2017). The influence of hydrocolloids on mead wort fermentation. *Food Hydrocolloids*, **63**, 233–239.
- [70] Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 ze dne 15.1. 2008 o definici, popisu, obchodní úpravě, označování a ochraně zeměpisných označení lihovin a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 1576/89. Úřední věstník Evropské unie.
- [71] Juričová M., Řezková S., Moravcová K., Fischer J. & Česlová L. (2018). Determination of 5-Hydroxymethylfurfural and Saccharides in Mead. *Kvasný Průmysl*, **64**, 65–70.
- [72] Sbírka zákonů České republiky, částka 125, 2018, pp. 4274–4312. Vyhláška č. 248/2018 Sb. ze dne 24. října 2018 o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí.
- [73] Triebel S., Sproll C., Reusch H., Godelmann R. & Lachenmeier D.W. (2007). Rapid analysis of taurine in energy drinks using amino acid analyzer and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy as basis for toxicological evaluation. *Amino Acids*, **33**, 451–457.
- [74] Miller K.E. (2008). Wired: Energy Drinks, Jock Identity, Masculine Norms, and Risk Taking. *Journal of American College Health*, **56**(5), 481–490.
- [75] Gunja N. & Brown J.A. (2012). Energy drinks: health risks and toxicity. *The Medical Journal of Australia*, **196**(1), 46–49.
- [76] Seifert S.M., Schaechter J.L., Hershorin E.R. & Lipshultz S.E. (2011). Health Effects of Energy Drinks on Children, Adolescents, and Young Adults. *Pediatrics*, **127**(3), 511–528.
- [77] Caine J.J. & Geraciotti T.D. (2016). Taurine, energy drinks, and neuroendocrine effects. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, **83**(12), 895–904.
- [78] Carvajal-Sancho A. & Moncada-Jiménez J. (2005). The acute effect of an energy drink on the physical and cognitive performance of male athletes. *Kinesiologia Slovenica*, **11**, 5–16.

- [79] Kammerer M., Jaramillo J.A., García A., Calderón J.C. & Valbuena L.H. (2014). Effects of energy drink major bioactive compounds on the performance of young adults in fitness and cognitive tests: a randomized controlled trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **11**(1), 44.
- [80] Umaña-Alvarado M. & Moncada-Jiménez J. (2004). The effect of an energy drink on aerobic performance in male athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **36**, S174.
- [81] Cureton K.J., Warren G.L., Millard-Stafford M.L., Wingo J.E., Trilk J. & Buyckx M. (2007). Caffeinated sports drink: ergogenic effects and possible mechanisms. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, **17**, 35–55.
- [82] Alford C., Cox H. & Wescott R. (2001). The effects of Red Bull energy drink on human performance and mood. *Amino Acids*, **21**, 139–150.
- [83] Reyner L.A. & Horne J.A. (2002). Efficacy of a “functional energy drink” in counteracting driver sleepiness. *Physiology & Behavior*, **75**, 331–335.
- [84] Scholey A.B. & Kennedy D.O. (2004). Cognitive and physiological effects of an “energy drink”: an evaluation of the whole drink and of glucose, caffeine and herbal flavouring fractions. *Psychopharmacology*, **176**, 320–330.
- [85] Warburton D.M., Bersellini E. & Sweeney E. (2001). An evaluation of a caffeinated taurine drink on mood, memory and information processing in healthy volunteers without caffeine abstinence. *Psychopharmacology*, **158**, 322–328.
- [86] Babu K.M., Church R.J. & Lewander W. (2008). Energy Drinks: The New Eye-Opener for Adolescents. *Clinical Pediatric Emergency Medicine*, **9**(1), 35–42.
- [87] Arria A.M. (2011). The “High” Risk of Energy Drinks. *The Journal of the American Medical Association (JAMA)*, **305**(6), 600–601.
- [88] Tampu R., Finaru A. & Elfakir C. (2018). Optimization of a HPLC analysis method for taurine and caffeine in energy drinks. *Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, **19**(1), 23–32.
- [89] Omer M., Omar M., Thiel A. & Elbashir A. (2018). High performance liquid chromatographic methods for analysis of taurine in energy drinks after pre-column derivatization. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, **13**(5), em40.

- [90] Vochyánová B., Opekar F. & Tůma P. (2014). Simultaneous and rapid determination of caffeine and taurine in energy drinks by MEKC in a short capillary with dual contactless conductivity/photometry detection. *Electrophoresis*, **35**, 1660–1665.
- [91] Nguyen T.D., Nguyen M.H., Vu M.T., Duong H.A., Pham H.V. & Mai T.D. (2019). Dual channeled capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection for rapid determination of choline and taurine in energy drinks and dietary supplements. *Talanta*, **193**, 168–175.
- [92] Revenga-Parra M., Martínez-Periñán E., Moreno B., Pariente F. & Lorenzo E. (2017). Rapid taurine and lactate biomarkers determination with disposable electrochemical detectors. *Electrochimica Acta*, **240**, 506–513.
- [93] (8) Hasanzadeh M., Javidi E., Jouyban A., Mokhtarzadeh A., Shadjou N. & Mahboob S. (2018). Electrochemical recognition of taurine biomarker in unprocessed human plasma samples using silver nanoparticlebased nanocomposite: A new platform for early stage diagnosis of neurodegenerative diseases of the nervous system. *Journal of Molecular Recognition*, **31**, e2739.
- [94] Kominkova M., Horky P., Cernei N., Tmejova K., Ruttkay-Nedecky B., Guran R., Pohanka M., Zitka O., Adam V. & Kizek R. (2015). Optimization of the glutathione detection by high performance liquid chromatography with electrochemical detection in the brain and liver of rats fed with taurine. *International Journal of Electrochemical Science*, **10**, 1716–1727.
- [95] Du F., Zhao W., Cao S. & Fung Y.S. (2015). Determination of taurine in human tear fluid by capillary electrophoresis with indirect amperometric detection based on electrogenerated bromine. *Journal of Separation Science*, **38**, 3271–3278.
- [96] Khalikova M.A., Satinsky D., Solich P., Zinchenko A.A., Zhilyakova E.T. & Novikov O.O. (2014). A high-performance liquid chromatography method with pre-column derivatization for the simultaneous determination of reduced glutathione, carnosine and taurine, *Analytical Methods*, **6**, 1475–1481.
- [97] Shao A. & Hathcock J.N. (2008). Risk assessment for the amino acids taurine, L-glutamine and L-arginine. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **50**, 376–399.

- [98] Mou S., Ding X. & Liu Y. (2002). Separation methods for taurine analysis in biological samples, *Journal of Chromatography B*, **781**, 251–267.
- [99] Cataldi T.R.I., Telesca G., Bianco G. & Nardiello D. (2004). Quantitative determination of taurine in real samples by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Talanta*, **64**, 626–630.
- [100] Orth D.L. (2001). HPLC determination of taurine in sports drinks. *Journal of Chemical Education*, **78**, 791–792.
- [101] Sawabe Y., Tagami T. & Yamasaki K. (2008). Determination of taurine in energy drinks by HPLC using a pre-column derivative. *Journal of Health Science*, **54**, 661–664.
- [102] Triebel S., Sproll C., Reusch H., Godelmann R. & Lachenmeier D.W. (2007). Rapid analysis of taurine in energy drinks using amino acid analyzer and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy as basis for toxicological evaluation. *Amino Acids*, **33**, 451–457.
- [103] Matsuda M. & Asano Y. (2012). A simple assay of taurine concentrations in food and biological samples using taurine dioxygenase. *Analytical Biochemistry*, **427**, 121–123.
- [104] Schwarz E.L., Roberts W.L. & Pasquali M. (2005). Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta*, **354**, 83–90.
- [105] Petritis K., Elfakir C. & Dreux M. (2002). A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids. *Journal of Chromatography A*, **961**, 9–21.
- [106] Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Sakkas V.A. & Stalikas C.D. (2011). Effect of chromatographic parameters and detector settings on the response of HILIC–evaporative light-scattering detection system using experimental design approach and multicriteria optimization methodology. *Talanta*, **83**, 1126–1133.
- [107] Chirita R., Dascalu C., Gavrilă L. & Elfakir C. (2010). Simultaneous analysis of taurine and caffeine in energy drinks using hydrophilic interaction chromatography with UV and evaporative light scattering detection on-line. *Revista de Chimie*, **61**, 1173–1176.
- [108] de Person M., Hazotte A., Elfakir C. & Lafosse M. (2005). Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry assay for taurine and methionine in matrices rich in carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, **1081**, 174–181.

- [109] Chen Z., Chen B. & Yao S. (2006). High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Analytica Chimica Acta*, **569**, 169–175.
- [110] Petritis K., de Person M., Elfakir C. & Dreux M. (2004). Validation of an ion-interaction chromatography analysis of underivatized amino acids in commercial preparation using evaporative light scattering detection. *Chromatographia*, **60**, 293–298.
- [111] Marchei E., Pellegrini M., Pacifici R., Palmi I. & Pichini S. (2005). Development and validation of a high-performance liquid chromatography–mass spectrometry assay for methylxanthines and taurine in dietary supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **37**, 499–507.
- [112] Gu L., Wang X., Zhang Y., Jiang Y., Lu H., Bi K. & Chen X. (2014). Determination of 12 potential nephrotoxicity biomarkers in rat serum and urine by liquid chromatography with mass spectrometry and its application to renal failure induced by Semen Strychni. *Journal of Separation Science*, **37**, 1058–1066.
- [113] Yu Y.Y., Zheng X.X., Bian T.T., Li Y.J., Wu X.W., Yang D.Z., Jiang S.S. & Tang D.Q. (2013). Development and application of a LC–MS/MS assay for the simultaneous quantification of edaravone and taurine in beagle plasma. *Journal of Separation Science*, **36**, 3837–3844.
- [114] Aranda M. & Morlock G. (2006). Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1131**, 253–260.
- [115] Lorenzo M.P., Villaseñor A., Ramamoorthy A. & Garcia A. (2013). Optimization and validation of a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: Application to bipolar disorder study. *Electrophoresis*, **34**, 1701–1709.
- [116] O'Brien K.B., Esguerra M., Miller R.F. & Bowser M.T. (2004). Monitoring neurotransmitter release from isolated retinas using online microdialysis-capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, **76**, 5069–5074.

- [117] Deng Y.H., Wang H. & Zhang H.S. (2008). Determination of amino acid neurotransmitters in human cerebrospinal fluid and saliva by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, **31**, 3088–3097.
- [118] Shi B., Huang W. & Cheng J. (2008). Analysis of amino acids in human vascular endothelial (ECV-304) cells by microchip electrophoresis with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, **31**, 1144–1150.
- [119] Götz S., Revermann T. & Karst U. (2007). Quantitative on-chip determination of taurine in energy and sports drinks. *Lab Chip*, **7**, 93–97.
- [120] Draganov G.B., Pencheva I.P. & Todorova K.A. (2014). UV-spectrophotometry determination of taurine in energy drink mixtures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **3**, 123–126.
- [121] Mohamed S.M.K., Elbashir A.A. & Aboul-Enein H.Y. (2017). Spectrophotometric method for determination of taurine in energy drinks. *Current Pharmaceutical Analysis*, **13**, 11–17.
- [122] Sharaf El Din M.K. & Wahba M.E.K. (2015). Novel validated spectrofluorimetric methods for the determination of taurine in energy drinks and human urine. *Luminescence*, **30**, 137–143.
- [123] Hohmann M., Felbinger C., Christoph N., Wachter H., Wiest J. & Holzgrabe U. (2014). Quantification of taurine in energy drinks using ¹H NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **93**, 156–160.
- [124] Hasanzadeh M., Pournaghi-Azar M.H., Shadjou N. & Jouyban A. (2014). Electropolymerization of taurine on gold surface and its sensory application for determination of captopril in undiluted human serum. *Materials Science and Engineering: C*, **38**, 197–205.
- [125] Wang Y. & Chen Z. (2009). A novel poly(taurine) modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of epinephrine and dopamine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **74**, 322–327.
- [126] Joseph M.H. & Davies P. (1983). Electrochemical activity of o-phthalaldehyde-mercaptoethanol derivatives of amino acids: Application to high-performance liquid

chromatographic determination of amino acids in plasma and other biological materials. *Journal of Chromatography B*, **277**, 125–136.

[127] Tcherkas Y.V., Kartsova L.A. & Krasnova I.N. (2001). Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, **913**, 303–308.

[128] Klikarová J., Šebková J., Fischer J. & Česlová L. (2019). Determination of proline in meads using high performance liquid chromatography. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A; Faculty of Chemical Technology*, **25**, 15–26.

[129] Harmonised methods of the International Honey Commission, responsible for the methods: Stefan Bogdanov, 1999, pp. 1–63. Determination of proline pp. 59. Dostupné online: <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>

[130] Farag A.S., Klikarová J., Česlová L., Vytřas K. & Sýs M. (2019). Voltammetric determination of taurine in energy drinks after o-phthalaldehyde-ethanethiol derivatization. *Talanta*, **202**, 486–493.

[131] Márquez F.J., Quesada A.R., Sánchez-Jiménez F. & Núñez De Castro I. (1986). Determination of 27 dansyl amino acid derivatives in biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, **380**, 275–283.

[132] Biondi A.P., Negri A. & Ioppolo A. (1986). High-performance liquid chromatographic determination of taurine in formulations as the dansyl derivative. *Journal of Chromatography*, **369**, 431–434.

[133] Komarova N.V., Kamentsev J.S., Solomonova A.P. & Anufrieva R.M. (2004). Determination of amino acids in fodders and raw materials using capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, **800**(1), 135–143.

[134] Kaškonienė V. & Venskutonis P.R. (2010). Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **9**(6), 620–634.

[135] Se K.W., Wahab R.A., Syed Yaacob N.S. & Ghoshal S.K. (2019). Detection Techniques for Adulterants in Honey: Challenges and Recent Trends. *Journal of Food Composition and Analysis*, **80**, 16–32.

- [136] Gould B.S. & Woessner J.F. (1957). Biosynthesis of collagen; the influence of ascorbic acid on the proline, hydroxyproline, glycine, and collagen content of regenerating guinea pig skin. *Journal of Biological Chemistry*, **226**(1), 289–300.
- [137] Hill D.W., Walters F.H., Wilson T.D. & Stuart J.D. (1979). High performance liquid chromatographic determination of amino acids in the picomole range. *Analytical Chemistry*, **51**, 1338–1341.
- [138] Hanczkó Jám bor A., Perl A. & Molnár-Perl I. (2007). Advances in the o-phthalaldehyde derivatizations: Comeback to the o-phthalaldehyde–ethanethiol reagent. *Journal of Chromatography A*, **1163**, 25–42.
- [139] Dorresteyn R.C., Berwald L.G., Zomer G., de Gooijer C.D., Wieten G. & Beuvery E.C. (1996). Determination of amino acids using o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization effect of reaction conditions. *Journal of Chromatography A*, **724**(1–2), 159–167.
- [140] Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin. Úřední věstník Evropské unie, 463.

PRÍLOHY

Tabulka P1 Obsah jednotlivých fenolických sloučenin [mg/kg] ve vzorcích EVOO stanovený pomocí HPLC-DAD-ESI/MS.

Poznámky: AOP = acetoxypinoresinol, Ap = apigenin, der. = derivát, EA = kyselina elenolová, HTY = hydroxytyrosol, HTY-EA = oleuropein, HTY-EDA = oleacein, iz. = izomer, Lu = luteolin, TY = tyrosol, TY-EA = ligstrosid aglykon, TY-Glu = tyrosol glukosid, VER = verbaskosid.

Číslo vzorku	HTY	TY	TY-Glu	Lu	Ap	HTY-EDA	AOP	EA izomery				VER izomery			HTY-EA deriváty										HTY-EA izomery			TY-EA deriváty			TY-EA izomery									
								I	II	III	IV	I	II	III	a	b	c	d	e	g	h	i	l	m	o	I	II	III	a	b	c	O	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	26,6	38,9	1,7	0,8	0,3	3,6	0,6	3,6	11,3	32,3	9,8	0,7	4,4	0,9	4,2	3,3	6,1	14,0	2,7	4,1	2,8	0,0	7,4	1,4	0,0	5,4	16,7	8,7	7,1	28,8	6,9	0,0	22,2	0,0	2,9	6,8	1,7	1,9	0,0	0,0
2	14,9	10,9	1,2	1,5	0,7	4,4	0,6	0,9	1,9	18,6	14,7	0,0	0,0	0,5	13,9	7,7	7,8	11,7	15,0	5,4	8,6	5,1	12,9	0,8	0,0	2,1	36,5	14,8	7,6	43,9	13,2	5,2	26,6	0,0	3,8	4,1	1,3	1,9	0,0	0,3
3	7,9	16,9	1,4	1,6	0,6	3,3	0,4	2,3	2,7	11,6	8,6	0,0	0,8	2,4	2,7	5,0	4,3	6,2	10,4	0,0	5,3	0,0	8,7	2,6	3,6	2,1	29,7	32,7	3,1	36,0	9,2	2,3	23,7	0,0	0,0	3,2	4,6	2,2	1,6	0,0
4	22,2	21,8	2,8	1,8	0,9	5,6	0,5	1,8	3,2	27,4	26,8	0,0	1,1	0,3	0,0	19,7	14,1	14,1	13,6	9,6	12,2	0,0	16,0	0,5	0,0	1,5	28,9	17,9	10,4	69,2	12,8	0,0	39,7	0,0	7,1	6,9	1,3	1,2	0,0	0,5
5	11,5	7,8	1,9	0,7	0,0	3,9	0,4	0,1	5,6	16,2	11,8	0,0	1,4	0,6	11,7	7,6	8,3	10,7	7,9	5,5	10,0	0,0	8,9	1,5	0,0	3,1	26,9	25,5	6,5	36,2	11,8	2,4	22,0	6,4	4,9	2,0	1,0	1,3	0,7	0,5
6	15,7	17,9	3,4	2,3	1,4	9,4	2,7	1,5	3,1	8,4	17,9	0,0	1,7	1,0	14,9	15,0	7,2	5,2	21,2	6,4	20,1	0,0	33,3	3,6	8,4	3,3	16,3	21,6	5,3	67,4	15,6	9,1	33,0	13,5	11,3	10,0	14,3	6,1	0,0	2,2
7	2,1	1,6	1,4	1,4	0,9	3,4	1,2	0,3	2,6	5,7	10,2	0,0	0,9	1,0	11,9	30,2	8,9	2,9	19,1	4,4	14,5	0,0	29,8	4,6	10,1	4,2	23,2	4,6	5,1	20,9	10,8	5,6	23,4	4,9	6,3	8,2	7,0	3,3	0,8	1,4
8	3,8	8,4	1,9	2,9	1,9	2,2	1,1	0,1	2,7	5,1	4,3	0,0	2,6	0,9	5,4	7,6	5,5	4,4	9,5	3,9	5,6	3,4	16,8	4,1	3,3	4,6	33,1	34,7	3,8	8,7	13,0	3,7	22,7	6,0	2,9	5,9	6,3	3,9	0,0	0,0
9	2,9	3,6	3,2	1,6	0,7	2,6	1,3	0,5	6,5	26,0	15,0	0,0	3,7	1,0	15,4	20,9	8,3	4,1	16,2	7,9	13,2	0,0	22,4	2,9	7,9	5,3	36,4	7,2	6,8	29,6	14,0	4,7	19,0	3,8	6,6	4,1	2,9	2,7	0,0	1,2
10	3,8	19,7	5,0	3,6	2,3	1,2	1,0	0,5	5,1	2,4	4,0	0,0	9,4	1,1	6,4	7,7	6,6	13,5	19,0	5,3	6,6	6,0	17,7	2,6	3,8	3,5	80,8	21,4	3,6	10,9	20,7	9,8	28,0	14,9	11,4	7,6	6,4	7,1	1,1	1,4
11	3,3	7,2	5,0	3,2	1,9	10,2	2,3	0,7	8,4	15,2	31,7	0,6	1,2	1,0	16,5	16,5	10,1	8,6	23,0	8,0	14,7	0,0	30,6	6,9	7,6	3,9	22,3	22,9	8,5	17,7	18,5	4,3	37,4	12,3	7,4	6,0	15,0	4,4	3,8	3,3
12	2,7	8,1	3,6	1,3	0,8	2,0	3,5	0,3	1,0	5,7	4,2	1,1	0,6	0,4	9,8	14,1	3,5	9,1	15,8	3,8	16,1	0,0	31,3	0,0	5,4	1,8	63,6	21,0	2,0	105,1	10,7	13,4	18,6	23,3	6,8	10,0	8,4	5,6	0,8	0,3
13	3,8	7,6	5,4	0,9	0,9	4,4	8,6	0,5	1,0	2,6	6,5	0,0	0,5	0,2	15,3	26,8	4,8	10,7	34,7	6,2	40,4	0,0	61,8	2,2	13,4	1,8	62,6	19,7	5,5	70,8	6,9	27,0	30,8	44,3	13,9	20,0	23,3	7,4	2,4	0,7
14	7,1	9,5	4,8	2,0	1,2	4,3	5,5	0,6	1,3	2,6	14,7	0,0	1,0	0,4	25,7	50,0	9,2	16,2	39,2	9,1	37,5	0,0	56,5	4,1	20,9	2,1	52,2	23,0	11,5	79,5	10,6	25,9	33,8	41,3	12,4	13,0	14,7	6,4	2,2	2,7
15	11,5	13,3	12,5	2,5	2,6	4,0	14,5	0,5	1,8	4,5	21,8	0,0	0,0	0,3	29,6	64,5	12,7	11,4	73,4	14,2	85,0	0,0	122,3	5,5	24,4	2,9	28,6	11,4	12,7	87,8	15,4	20,0	31,6	34,9	19,3	40,0	54,2	14,3	2,2	8,7
16	9,0	11,7	3,8	1,5	1,4	5,2	11,5	0,5	2,4	2,9	12,6	0,0	0,5	0,8	15,5	27,5	9,2	7,7	55,2	11,1	54,1	0,0	88,1	23,2	11,6	2,4	13,3	11,4	8,0	56,2	11,6	14,5	23,3	27,9	11,7	22,0	25,0	12,3	0,0	8,0
17	10,0	13,7	4,5	1,7	1,5	4,3	7,8	0,6	2,4	3,6	11,7	0,0	0,6	0,6	18,3	29,6	9,4	8,9	40,0	10,7	41,5	0,0	64,0	9,8	13,8	3,1	49,7	29,9	7,3	69,1	13,7	17,0	30,4	41,7	13,8	8,0	9,7	10,4	1,5	4,5
18	8,0	6,7	6,0	1,6	1,6	4,3	4,7	0,7	3,0	10,1	16,3	0,0	0,5	0,9	21,1	28,9	9,4	8,2	38,6	9,0	36,4	0,0	51,4	15,2	13,8	1,9	28,2	32,4	10,4	46,2	11,5	8,0	23,6	22,7	7,0	15,2	13,6	3,6	0,0	3,7
19	15,1	17,4	7,8	2,5	2,3	0,0	13,0	3,4	2,6	2,1	26,1	0,0	1,0	0,4	22,0	43,5	15,0	24,4	71,5	13,8	77,0	0,0	83,9	3,5	19,9	2,3	22,3	12,2	9,6	98,5	17,6	28,6	39,5	48,9	21,2	50,0	35,4	11,8	1,5	1,5
20	16,1	18,9	4,6	2,1	1,4	9,3	5,3	0,6	3,0	2,7	21,8	0,0	0,7	1,0	20,7	28,9	12,5	8,7	41,1	13,8	37,1	0,0	51,4	15,1	14,0	2,1	20,1	24,4	6,2	72,9	17,7	13,2	26,7	21,5	11,3	20,0	13,9	6,3	0,7	3,1
21	3,1	4,8	9,4	3,7	3,2	8,2	10,5	0,4	3,2	2,3	15,6	0,0	0,7	0,8	53,5	130,2	23,3	34,2	87,0	15,2	81,4	0,0	185,8	11,1	44,9	4,4	48,9	5,5	12,3	86,5	30,2	42,4	53,7	66,9	32,0	52,8	30,3	12,1	5,4	4,4
22	4,0	6,3	8,7	3,1	2,4	3,6	5,9	0,4	3,0	2,4	12,4	0,0	3,6	0,5	42,9	78,3	12,9	33,2	61,7	13,7	43,0	0,0	91,7	8,8	39,6	3,2	46,6	5,6	8,6	57,6	20,0	41,4	53,0	30,8	26,5	32,0	14,9	12,0	4,5	2,3
23	4,5	9,1	7,3	2,6	1,7	4,1	5,7	1,2	2,8	2,5	13,3	0,0	1,7	0,4	37,0	89,2	18,8	31,7	64,2	14,9	45,7	0,0	80,8	7,4	35,3	2,6	39,7	6,9	9,8	73,4	24,6	40,0	46,7	57,6	28,0	28,0	10,6	13,0	2,8	2,6
24	8,4	14,1	7,6	3,0	2,8	5,5	8,6	0,6	2,6	2,3	10,3	0,0	2,3	0,7	27,2	66,2	12,8	19,9	52,6	15,4	47,8	0,0	99,1	7,7	22,7	3,7	21,9	3,9	7,0	72,3	20,5	29,2	41,4	43,4	21,9	40,1	23,2	12,2	3,3	3,5
25	4,8	10,6	6,0	3,6	2,7	6,6	6,5	0,6	1,9	2,7	10,6	0,6	1,2	0,5	29,0	66,3	15,0	21,7	56,1	14,3	52,3	0,0	115,0	8,8	23,9	3,5	32,7	6,2	8,6	82,1	26,9	31,4	40,0	42,1	25,2	92,1	17,6	10,0	4,2	3,0
26	2,7	6,6	3,3	2,9	3,0	4,1	4,5	0,5	3,1	1,7	6,7	0,9	1,7	0,6	28,6	52,4	11,5	22,6	51,5	9,2	37,4	0,0	91,0	6,9	23,6	4,0	22,8	2,3	6,5	91,8	21,9	34,6	47,3	35,3	18,8	38,4	12,3	13,1	3,4	3,7
27	2,8	4,9	4,8	3,3	2,2	6,6	3,7	0,3	3,3	2,6	10,3	0,0	1,2	0,3	33,9	101,3	13,7	18,7	48,0	8,4	35,0	0,0	80,9	7,6	33,3	2,1	12,3	1,3	7,3	69,3	17,1	32,0	40,5	42,0	15,5	21,8	9,8	8,0	3,8	1,4
28	4,3	4,5	4,4	2,1	1,3	3,6	3,2	0,4	0,7	2,5	4,3	0,0	1,6	0,5	22,1	61,6	5,6	11,9	22,7	3,4	18,4	0,0	51,3	5,4	24,1	2,2	28,9	5,6	4,8	43,4	7,7	24,1	27,0	40,4	10,0	16,4	5,8	6,3	2,9	1,9
29	4,4	4,7	12,1	2,5	2,6	4,6	9,7	0,3	1,5	3,1	10,6	0,0	1,2	0,6	39,7	113,4	10,9	16,9	59,2	12,9	56,4	0,0	106,7	9,9	37,0	5,4	25,0	5,6	8,8	51,9	15,5	27,8	32,5	41,4	15,9	48,7	22,2	9,0	4,8	2,7
30	1,4	2,4	1,8	1,9	0,7	2,6	1,4	1,4	2,3	2,4	2,4	0,0	1,1	0,4	21,5	62,6	4,7	13,6	21,8	3,3	16,9	5,4	36,2	5,3	21,3	2,8	21,5	2,5	4,0	134,3	8,4	14,0	26,9	23,0	7,2	6,0	3,0	3,9	1,9	2,1
31	2,4	3,2	3,9	1,9	1,4	3,0	4,0	0,5	3,6	2,8	7,1	0,0	1,1	0,7	21,0	60,8	9,9	12,5	37,0	5,9	31,9	0,0	69,5	6,4	20,2	3,6	32,7	7,7	6,4	127,9	13,1	16,0	30,5	21,9	14,3	12,1	10,7	4,7	1,1	1,1
32	3,4	4,2	2,5	4,3	2,4	4,0	2,5	0,3	2,4	10,6	23,9	0,0	1,4	0,5	25,1	33,0	13,2	9,4	30,5	8,7	35,4	0,0	54,1	4,6	17,4	4,0	59,8	17,3	12,7	88,0	17,4	8,3	24,2	10,9	5,3	10,0	12,4	4,8	0,0	0,9
33	5,5	3,4	2,5	3,7	2,0	3,3	2,6	0,4	3,6	4,9	17,3	0,0	0,7	0,6	23,9	46,8	8,9	9,9	40,5	6,5	48,3	0,0	53,4	4,4	21,5	2,2	29,1	21,7	10,8	105,6	10,0	8,9	21,1	20,1	6,0	38,0	3,8	5,2	3,4	1,1

Číslo vzorku	HTY						EA izomery				VER izomery			HTY-EA deriváty										HTY-EA izomery			TY-EA deriváty			TY-EA izomery											
	HTY	TY	TV-Glu	Lu	Ap	HTY-EDA	AOP	I	II	III	IV	I	II	III	a	b	c	d	e	g	h	i	l	m	o	I	II	III	a	b	c	O	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
34	4,2	4,0	1,8	1,2	0,9	2,6	1,9	0,3	4,2	7,0	11,2	0,0	0,4	1,4	8,0	11,3	7,1	6,6	9,6	4,7	12,3	0,0	28,3	0,0	7,7	2,5	26,7	30,8	5,4	46,6	11,6	2,3	37,7	0,0	5,9	5,0	19,0	2,9	0,0	23,8	
35	10,2	11,5	2,3	2,1	2,0	9,7	3,0	1,3	7,6	3,5	20,0	0,1	0,6	1,1	13,2	15,4	8,6	0,0	19,6	8,2	14,2	0,0	23,5	1,8	8,2	1,8	14,8	16,4	5,7	17,2	15,8	8,0	32,2	11,7	12,5	7,0	6,9	4,7	0,2	0,5	
36	10,5	11,2	2,7	2,5	1,5	6,5	2,4	0,4	5,5	11,3	28,1	0,0	0,6	2,7	20,6	22,6	10,9	7,4	13,9	6,8	14,1	0,0	21,2	15,9	11,4	1,7	18,8	35,0	8,7	33,7	13,0	6,9	28,1	11,2	3,6	8,0	3,7	3,8	5,7	0,0	
37	8,6	11,4	4,1	1,2	0,0	9,6	6,0	0,5	4,4	3,1	19,9	0,0	0,5	1,0	18,3	31,5	13,3	7,2	37,6	14,5	43,2	0,0	46,3	14,1	15,2	2,5	8,1	9,1	9,8	60,9	13,5	11,0	24,2	40,1	10,8	21,6	16,2	6,0	2,6	2,9	
38	6,5	4,3	2,2	2,0	1,3	3,8	1,6	0,4	2,5	10,8	20,7	0,0	0,3	0,7	14,1	20,5	9,6	8,2	19,8	6,4	14,1	0,0	28,1	11,3	12,6	2,4	11,2	17,8	10,1	25,9	9,2	4,5	21,1	12,3	7,3	9,4	4,0	2,1	2,4	1,1	
39	0,9	2,2	3,3	2,7	1,8	2,8	0,9	0,5	3,6	2,4	6,7	0,0	1,2	0,6	13,8	35,5	7,6	14,3	17,7	3,1	12,1	5,8	33,2	4,3	14,1	4,3	32,9	3,1	4,3	18,5	12,4	7,7	40,6	9,9	11,5	3,9	3,0	8,0	1,5	0,9	
40	3,2	5,7	3,5	5,4	3,1	5,8	2,5	0,3	3,1	2,9	12,0	0,0	1,6	0,9	32,1	91,9	13,0	18,5	37,4	6,6	31,7	0,0	73,8	7,9	31,6	2,4	39,0	5,6	8,4	64,5	18,7	21,7	34,0	28,8	12,9	11,5	7,6	12,4	3,2	1,7	
41	29,5	42,9	4,4	4,1	2,5	4,5	2,3	1,4	3,6	4,5	11,3	0,0	1,2	1,0	21,0	45,9	10,1	15,0	31,4	10,6	31,0	0,0	46,7	6,7	17,7	3,3	48,9	8,7	5,9	66,9	21,9	16,8	33,8	24,2	11,2	9,2	12,7	10,8	2,5	2,2	
42	2,4	2,9	2,6	3,4	1,7	4,2	1,5	1,1	0,8	7,4	8,9	0,0	3,7	0,8	19,4	38,1	8,8	9,1	21,7	3,7	20,6	0,0	30,4	3,6	16,9	3,3	47,6	18,2	6,9	47,5	12,3	8,3	22,4	11,8	5,6	5,9	4,3	4,4	1,0	0,9	
43	3,1	4,6	1,6	3,0	0,0	4,0	1,1	2,2	3,7	3,7	10,2	0,0	1,9	0,8	17,0	45,1	6,2	12,0	21,4	18,4	0,0	0,0	30,3	2,6	17,0	2,9	29,9	10,6	6,1	67,0	13,9	11,2	24,5	14,6	4,5	8,0	3,1	4,7	1,3	1,2	
44	28,9	32,1	4,8	4,4	2,2	5,2	1,5	3,6	4,4	5,9	19,0	0,0	2,0	1,1	29,7	65,6	9,0	16,7	29,7	9,7	21,6	0,0	45,6	5,2	26,1	2,9	60,3	8,9	7,0	61,2	20,7	13,0	29,8	15,5	14,1	9,5	15,5	5,1	0,7	1,2	
45	2,3	3,2	3,5	4,5	3,0	5,7	2,8	1,3	2,4	3,9	16,0	0,6	1,7	0,8	37,2	90,6	18,7	20,8	46,5	7,8	33,3	0,0	91,4	6,7	38,2	3,4	37,0	5,1	10,8	59,0	17,7	27,1	38,4	41,9	14,3	10,5	7,9	7,2	2,0	1,5	
46	9,7	6,7	2,5	3,4	2,4	5,5	1,4	0,4	3,4	4,9	12,8	0,0	1,1	0,4	17,5	33,5	11,3	6,7	18,2	5,7	17,3	12,6	37,0	4,3	13,1	2,4	16,1	2,9	7,0	22,2	18,0	4,3	27,5	4,7	6,5	6,8	4,3	4,5	0,5	0,6	
47	0,9	2,2	3,2	1,8	1,9	1,8	3,9	2,5	6,9	1,1	6,9	0,0	2,0	0,5	13,7	19,9	6,0	13,9	29,0	8,0	30,1	0,0	48,5	4,7	10,3	2,8	27,8	3,2	4,6	8,6	20,5	21,6	44,3	21,3	12,5	18,3	7,1	8,2	2,6	1,6	
48	7,2	8,1	4,7	3,6	2,1	3,8	5,3	0,6	5,8	8,1	21,1	0,0	4,7	0,3	44,4	125,1	15,3	18,8	45,6	10,7	46,8	0,0	72,0	7,0	45,0	1,6	43,5	15,0	16,1	77,6	15,4	30,4	52,5	43,7	18,3	18,0	17,3	7,5	2,5	1,6	
49	12,4	9,0	5,0	3,0	1,6	8,3	3,9	0,8	5,3	10,5	44,5	0,5	0,8	0,3	49,5	86,7	19,4	10,1	50,8	14,8	52,0	0,0	63,7	19,9	39,2	3,8	8,3	5,4	21,2	56,2	16,4	18,6	28,6	28,8	18,5	16,0	9,7	7,9	1,6	1,9	
50	11,1	7,9	6,2	4,9	2,3	3,6	6,2	0,4	2,8	6,0	20,6	0,1	0,7	0,4	36,6	101,1	16,5	10,4	55,5	13,7	60,2	0,0	97,3	24,0	41,7	1,9	20,4	11,0	14,3	96,3	13,6	20,4	31,4	42,0	22,5	32,0	0,0	8,6	0,0	2,8	
51	6,0	7,5	4,9	2,3	1,8	4,5	5,4	0,3	2,0	2,6	10,3	0,0	0,3	1,0	13,1	26,5	9,2	6,0	38,3	10,5	36,3	0,0	66,8	12,4	10,8	3,7	27,5	19,3	6,2	85,1	15,3	12,7	24,1	22,0	12,5	10,0	16,6	6,9	0,0	3,5	
52	13,1	7,5	4,4	3,1	1,7	4,4	4,9	0,5	3,3	2,6	29,3	0,0	0,7	1,1	29,3	60,9	15,8	8,0	53,8	12,1	51,4	0,0	62,4	12,9	28,4	2,0	8,7	10,5	13,7	64,3	11,5	13,5	22,1	29,9	15,9	42,0	10,1	6,9	2,2	1,9	
53	9,8	6,5	3,5	3,5	2,3	4,0	5,2	0,7	4,3	7,4	25,3	0,0	0,5	1,0	31,2	65,4	12,5	13,9	54,7	10,7	54,3	0,0	76,3	9,1	28,9	2,1	20,3	21,2	14,6	82,9	15,9	15,4	28,6	29,7	10,9	32,0	13,9	6,6	2,0	1,7	
54	3,2	2,9	2,6	3,6	1,0	4,8	1,9	0,7	6,7	7,8	19,0	0,0	0,4	1,0	16,4	26,3	9,5	5,9	25,7	9,2	15,3	0,0	20,8	10,9	14,8	2,0	15,6	23,2	8,1	59,1	13,2	8,4	27,1	12,5	9,2	15,0	2,9	2,6	1,6	1,1	
55	11,0	11,3	3,7	2,0	0,0	8,9	2,1	0,8	1,9	9,0	25,1	0,0	3,4	1,4	14,8	9,5	8,4	8,6	14,3	7,8	24,5	0,0	23,0	8,2	0,0	2,9	17,9	27,9	5,9	55,8	12,8	3,3	30,0	14,6	5,0	8,6	5,4	4,1	0,0	0,0	
56	7,1	14,0	2,8	2,7	1,3	7,1	2,8	0,9	3,2	2,4	15,7	0,0	0,7	1,0	11,7	17,5	8,5	7,6	16,0	8,3	16,3	0,0	30,4	15,5	9,0	2,4	17,6	20,2	5,6	76,0	14,8	8,4	23,7	17,8	10,6	8,0	6,6	5,2	1,3	2,0	
57	10,3	6,2	4,2	3,4	1,9	10,8	1,5	2,0	6,7	20,6	71,7	0,0	2,3	0,4	34,2	88,5	19,8	9,9	40,1	10,5	18,4	0,0	42,3	11,2	24,2	3,3	9,5	4,7	21,6	80,7	20,6	8,8	32,3	13,5	14,1	8,7	40,8	4,1	0,0	1,6	
58	2,5	4,9	4,0	5,1	3,0	6,4	4,0	1,2	3,7	10,5	18,5	0,0	2,1	0,7	59,7	136,5	16,6	28,9	63,2	10,4	61,3	0,0	110,8	9,5	43,8	3,9	32,8	5,3	12,8	101,3	23,5	34,9	43,9	50,3	29,5	25,5	11,5	7,6	2,8	1,6	
59	2,4	4,0	2,2	2,6	1,7	2,0	6,6	0,9	3,0	3,0	7,0	0,0	1,3	0,5	19,7	37,7	4,5	15,4	31,1	6,0	26,0	0,0	62,7	4,5	15,1	3,3	25,4	5,8	5,2	69,7	12,2	18,6	30,8	25,3	10,3	13,7	20,6	10,3	2,6	1,8	
60	2,0	4,1	8,0	4,0	2,4	6,8	3,3	0,7	2,5	9,4	17,6	0,0	0,6	0,8	49,5	166,5	15,2	20,7	57,0	10,9	41,2	0,0	89,0	9,9	56,6	5,1	36,5	5,7	13,4	75,3	19,9	26,0	36,6	40,8	27,1	18,9	8,8	8,4	3,3	2,8	
61	4,4	5,1	9,0	4,8	2,6	6,7	5,8	0,5	3,3	12,3	23,2	0,0	5,0	0,7	66,3	166,7	16,4	26,4	77,8	14,0	71,4	0,0	131,4	12,6	66,8	4,0	28,5	7,3	16,7	60,2	21,9	33,3	45,7	44,2	33,0	45,7	15,8	11,6	4,3	4,5	
62	2,1	2,2	5,7	2,5	1,7	2,9	5,6	0,8	1,7	5,1	12,0	0,0	0,6	1,2	23,0	49,9	10,6	11,7	36,6	11,7	26,2	0,0	47,0	3,6	18,2	4,8	20,4	9,0	7,9	23,8	15,4	11,3	22,3	16,9	16,1	7,2	12,0	6,1	1,9	1,0	
63	1,8	4,2	2,2	1,9	2,0	5,0	4,1	2,3	5,3	4,3	6,9	0,0	0,9	2,1	15,7	28,7	6,0	5,9	23,0	0,0	15,7	0,0	48,0	5,5	13,0	3,3	31,3	7,3	3,7	98,2	12,7	16,7	29,1	0,0	6,5	9,1	7,9	11,7	0,0	0,0	
64	2,6	4,0	2,5	2,1	1,3	4,9	3,2	0,7	3,1	6,4	9,0	0,0	1,6	1,9	16,6	35,2	8,8	4,2	28,6	7,9	21,5	0,0	45,0	6,4	14,5	4,1	12,5	4,1	4,8	48,8	14,6	12,8	23,2	17,7	8,5	11,5	8,9	9,4	2,5	2,3	
65	3,1	7,9	1,9	2,5	1,5	2,9	0,6	1,3	2,4	6,2	7,0	0,0	1,0	0,9	7,8	10,2	6,4	6,0	14,0	2,9	15,1	0,0	15,4	5,0	4,2	3,7	14,7	7,3	4,2	85,1	13,2	2,7	19,6	5,2	4,1	15,5	18,6	3,4	0,7	2,4	
66	2,8	6,5	1,9	2,0	1,4	3,4	1,3	0,5	2,7	6,0	10,5	0,0	0,6	1,4	12,7	18,5	10,2	7,9	24,7	7,8	12,4	7,7	26,8	6,4	9,1	4,2	34,4	6,7	5,5	78,4	17,3	7,0	20,3	7,8	5,9	7,6	17,5	4,2	0,6	1,4	
67	2,0	1,8	1,5	0,8	0,5	1,8	1,8	0,1	2,6	0,9	3,2	0,0	0,5	0,5	17,4	50,1	3,2	10,7	17,9	3,1	18,6	0,0	39,6	3,5																	

PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K DISERTAČNÍ PRÁCI

Milan Sýs, **Jitka Klikarová**, Lenka Česlová, and Karel Vytřas (2017). Catalytic Activity of Agaricus Bisporus Mushroom Tyrosinase to Acetaminophen in the Presence of L-Proline. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A*, 23, 85–97.

Amir Shaaban Farag, **Jitka Klikarová**, Lenka Česlová, Karel Vytřas, and Milan Sýs (2019). Voltammetric Determination of Taurine in Energy Drinks after o-Phthalaldehyde-Ethanethiol Derivatization. *Talanta*, 202, 486–493.

Jitka Klikarová, Archimede Rotondo, Francesco Cacciola, Lenka Česlová, Paola Dugo, Luigi Mondello, and Francesca Rigano (2019). The Phenolic Fraction of Italian Extra Virgin Olive Oils: Elucidation Through Combined Liquid Chromatography and NMR Approaches. *Food Analytical Methods*, 12(8), 1759–1770.

Jitka Klikarová, Jana Šebková, Jan Fischer, and Lenka Česlová (2019). Determination of Proline in Meads Using High-Performance Liquid Chromatography. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A*, 25, 15-26.

Jitka Klikarová, Lenka Česlová, Petra Kalendová, Paola Dugo, Luigi Mondello, and Francesco Cacciola (2020). Evaluation of Italian Extra Virgin Olive Oils Based on the Phenolic Compounds Composition Using Multivariate Statistical Methods. *European Food Research and Technology*, 246, 1241–1249.

Jitka Klikarová, Klára Jakubů, Lenka Česlová, and Jan Fischer (2020). Determination of Oleocanthal in Extra Virgin Olive Oils Using High-Performance Liquid Chromatography. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A*, 26. (ACCEPTED ARTICLE)

Jitka Klikarová, Lenka Česlová, and Jan Fischer. Rapid analysis of Phenylisothiocyanate Derivatives of Amino Acid Presented in Czech Mead. (SUBMITTED ARTICLE TO TALANTA)

PŘEDNÁŠKY

Jitka Klikarová, Lenka Česlová, Francesco Cacciola, Petra Šilarová, Paola Dugo, and Luigi Mondello. Stanovení Fenolických Látek v Italských Extra Panenských Olivových Olejích a Statistické Zhodnocení Jejich Geografického Původu. Monitorování cizorodých látek a hodnocení rizik v životním prostředí I., Kojetín, Czech Republic, 10–12.4.2019. Collection: pp. 75–86, ISBN 978-80-7560-234-3.

Amir Nawar, **Jitka Klikarová**, Milan Sýs, and Karel Vytřas. Analytical Method to Evaluate Taurine in Energy Drinks after o-phthalaldehyde-ethanethiol Derivatization Using Square Wave Voltammetry. XXXIX. moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, Czech Republic, 20–24.5.2019. Collection: pp. 57–60, ISBN 978-80-905221-7-6.

Jitka Klikarová, Jana Šebková, Lenka Česlová, and Jan Fischer. Stanovení Aminokyselin Obsažených v Medovinách s Využitím Kapalinové Chromatografie. Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XIX, Ovčárna pod Pradědem, Czech Republic, 19–21.4.2017. Collection: pp. 75–84, ISBN 978-80-7560-086-8.

Jitka Klikarová, Lenka Česlová, Soňa Řezková, and Jan Fischer. Stanovení Aminokyselin v Medovinách. Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVIII, Ovčárna pod Pradědem, Czech Republic, 30.3.–1.4.2016. Collection: pp. 57–66, ISBN 978-80-7560-005-9.

Jitka Klikarová, Miroslava Zelená, Soňa Řezková, and Lenka Česlová. Stanovení Vybraných Organických Kyselin v Medovinách s Využitím Spektrofotometrických Metod. Studentská vědecká odborná činnost 2014/2015. Pardubice: Univerzita Pardubice, Czech Republic, 2015. Collection: pp. 101–106, ISBN 978-80-7395-922-7.

POSTERY

Jitka Klikarová, Lenka Česlová, Petra Šilarová, Francesco Cacciola, Paola Dugo, and Luigi Mondello. Statistical Evaluation of the Italian Extra Virgin Olive Oils. 12th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, 11–13.9.2019. Collection: pp. 100, ISBN 978-615-5270-57-4.

Jitka Klikarová, Oriana Colletta, Francesco Cacciola, Paola Dugo, Lenka Česlová, and Luigi Mondello. Optimization and Validation of an HPLC-PDA/ESI-MS Method for the Determination of Polyphenols in Extra Virgin Olive Oils. 42nd International Symposium on Capillary Chromatography and 15th GCxGC Symposium, Riva del Garda, Italy, 13–18.5.2018. Collection: pp. 489, ISBN 978-88-941816-1-6.

Jitka Klikarová, Lenka Česlová, and Jan Fischer. HPLC Separation of Derivatized Amino Acids in Mead. HPLC 2017, Praha, Czech Republic, 18–22.6.2017. Collection: pp. 277, ISBN 0-8247-4710-0.

Jitka Klikarová, Jana Šebková, Lenka Česlová, and Jan Fischer. Optimization of HPLC Separation of Amino Acids Presented in Mead. 11th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, 6–8.9.2017. Collection: pp. 94, ISBN 978-615-5270-38-3.

ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Vývoj moderních analytických metod pro analýzu biologicky aktivních látek
Autor práce	Ing. Jitka Klikarová
Obor	Analytická chemie
Rok obhajoby	2020
Vedoucí práce	doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.
Anotace	Disertační práce se zabývá vývojem analytických metod pro stanovení vybraných biologicky aktivních látek ve třech rozdílných maticích. Pomocí kapalinové chromatografie byl objasněn fenolický profil v italských extra panenských olejích a aminokyselinový profil v českých medovinách. Posledním typem vzorků byly energetické nápoje, v nichž bylo sledováno množství diskutabilní β -aminokyseliny taurinu. Získané výsledky mohou sloužit k hodnocení kvality a autenticity daných produktů.
Klíčová slova	Fenolické látky Aminokyseliny Extra panenské olivové oleje Medoviny Energetické nápoje Kapalinová chromatografie