

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Oleokanthal v olivovém oleji

Bc. Klára Jakubů

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Jakubů**  
Osobní číslo: **C16606**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Oleokanthal v olivovém oleji**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V dostupné literatuře vyhledejte a rešeršně zpracujte tematiku oleokanthalu v olivovém oleji.
2. Navrhněte a experimentálně vyzkoušejte postup na extrakci a stanovení oleokanthalu v olivovém oleji.
3. Dosažené výsledky diskutujte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**  
Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

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., autorský zákon, 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 9. 5. 2018

Bc. Klára Jakubů

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé práce doc. Ing. Janu Fischerovi, CSc. a konzultantce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za jejich čas, ochotu, za poskytnutí materiálů a za cenné rady, které mi během zpracování daného tématu poskytli. V neposlední řadě také děkuji své rodině za podporu a trpělivost v průběhu mého studia.

V Pardubicích dne 9. 5. 2018

Bc. Klára Jakubů

## **ANOTACE**

*Tato práce se zabývá oleokantalem v extra panenském olivovém oleji. V teoretické části je charakterizován olivový olej a jsou uvedeny možnosti stanovení obsahu oleokantalu v extra panenském olivovém oleji. V experimentální části je popsán postup zpracování olivového oleje pomocí dvojnásobné extrakce a postup optimalizace podmínek analýzy extraktu kapalinovou chromatografií s UV detekcí. Optimalizovaným postupem bylo zpracováno a analyzováno celkem devatenáct vzorků extra panenského olivového oleje a jeden vzorek oleje z olivových pokrutin. Nalezený obsah oleokantalu byl v rozmezí 2,8 - 27,2 mg na 100 g olivového oleje. K identifikaci vznikajících hemiacetalů oleokantalu, které byly použity pro jeho kvantifikaci, byla použita metoda měření LC-MS.*

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Oleokantal, olivový olej, antioxidanty, kapalinová chromatografie*

## **TITLE**

*Oleocanthal in olive oil*

## **ANNOTATION**

*This thesis deals with oleocantal in extra virgin olive oil. In the theoretical part, there is a characterization of olive oil and the possibilities of determining oleocantal in extra virgin olive oil. The experimental part contains description of processing olive oil by double extraction and description of the procedure for optimizing the conditions of analysis of the extract by using liquid chromatography with UV detection. All nineteen samples of extra virgin olive oil and one olive oil from the cake were processed and analyzed in an optimized manner. The found content of oleocantal ranged from 2,8 to 27,2 mg per 100 g of olive oil. To identify and quantification the resulting oleocantal hemiacetals was used LC-MS technique.*

## **KEYWORDS**

*Oleocanthal, olive oil, antioxidants, liquid chromatography*

## Obsah

1	ÚVOD.....	- 12 -
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	- 13 -
2.1	Olivový olej.....	- 13 -
2.2	Extra panenský olivový olej.....	- 14 -
2.3	Vlastnosti EVOO.....	- 14 -
2.3.1	Fenolické látky.....	- 15 -
2.3.2	Antioxidační vlastnosti olivového oleje.....	- 16 -
2.4	Oleokantal.....	- 17 -
2.5	Účinky oleokantalu na lidský organismus.....	- 19 -
2.5.1	Protizánětlivé účinky.....	- 19 -
2.5.2	Vliv oleokantalu na Alzheimerovu chorobu.....	- 19 -
2.5.3	Další pozitivní účinky.....	- 20 -
2.6	Legislativa.....	- 21 -
2.7	Metody pro stanovení oleokantalu v olivovém oleji.....	- 21 -
2.8	Extrakce.....	- 22 -
2.8.1	Extrakce tuhou fází.....	- 22 -
2.8.2	Extrakce kapalina – kapalina.....	- 23 -
2.9	Kapalinová chromatografie.....	- 24 -
2.9.1	Spektrofotometrický detektor.....	- 26 -
2.10	Plynová chromatografie.....	- 26 -
2.11	Hmotnostní spektrometrie.....	- 27 -
2.12	Kapilární zónová elektroforéza.....	- 28 -
2.13	Nukleární magnetická resonance.....	- 28 -
2.14	Analýza oleokantalu v EVOO.....	- 28 -
2.14.1	Příklady separace a identifikace oleokantalu.....	- 30 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 34 -
3.1	Použité chemikálie.....	- 34 -
3.2	Standard.....	- 34 -
3.3	Použité reálné vzorky.....	- 34 -
3.4	Přístrojové vybavení.....	- 39 -
3.5	Pracovní postup.....	- 41 -
3.5.1	Příprava standardu oleokantalu.....	- 41 -

3.5.2	Extrakce oleokantalu ve vzorku oleje.....	- 41 -
3.5.3	Příprava kalibračních vzorků.....	- 41 -
3.5.4	Podmínky měření LC-UV.....	- 42 -
3.5.5	Podmínky měření LC-MS.....	- 42 -
3.5.6	Vyhodnocení dat.....	- 43 -
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	- 44 -
4.1	Optimalizace podmínek separace.....	- 44 -
4.2	Optimalizace elučních podmínek.....	- 45 -
4.2.1	Gradientová eluce s využitím izokratického kroku.....	- 45 -
4.2.2	Gradientová eluce bez izokratického kroku.....	- 46 -
4.3	Optimalizace extrakce oleokantalu.....	- 47 -
4.4	Identifikace oleokantalu pomocí LC-MS.....	- 50 -
4.5	Kvantifikace oleokantalu pomocí LC-UV.....	- 54 -
4.5.1	Tvorba kalibrační přímky.....	- 54 -
4.5.2	Analýza vzorků.....	- 56 -
5	ZÁVĚR.....	- 61 -
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	- 62 -
7	PŘÍLOHY.....	- 72 -

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Plody olivovníku evropského.....	- 13 -
Obrázek 2 Vzorec oleokantalu.....	- 18 -
Obrázek 3 Vzorec tyrosolu .....	- 18 -
Obrázek 4 Vzorec oleorupeinu ve formě glukosidu .....	- 18 -
Obrázek 5 Vliv oleokantalu na lidský organismus .....	- 20 -
Obrázek 6 Fázový diagram pro oxid uhličitý .....	- 24 -
Obrázek 7 Schéma kapalinové chromatografie .....	- 25 -
Obrázek 8 Spektrofotometrický detektor.....	- 26 -
Obrázek 9 Schéma plynového chromatografu.....	- 27 -
Obrázek 10 Schéma hmotnostního spektrometru s jedním analyzátozem .....	- 27 -
Obrázek 11 UV spektrum oleokantalu změřené v různých rozpouštědlech.....	- 44 -
Obrázek 12 Schéma vzniku hemiacetalů oleokantalu .....	- 45 -
Obrázek 13 kolona: Gradientová eluce s izokratickým krokem.....	- 46 -
Obrázek 14 Gradientová eluce bez izokratického kroku .....	- 47 -
Obrázek 15 Extrakce řepkového oleje s přidaným oleokantalem pomocí MeOH/H <sub>2</sub> O .....	- 48 -
Obrázek 16 Extrakce řepkového oleje s přidaným oleokantalem pomocí ACN .....	- 49 -
Obrázek 17 Extrakce EVOO s přidaným oleokantalem pomocí MeOH/ H <sub>2</sub> O.....	- 49 -
Obrázek 18 Extrakce EVOO s přidaným oleokantalem pomocí ACN.....	- 50 -
Obrázek 19 ESI-MS spektrum píků hemiacetalů oleokantalu.....	- 52 -
Obrázek 20 ESI-MS spektrum píků hemiacetalů oleokantalu.....	- 53 -
Obrázek 21 Kalibrační přímka.....	- 55 -
Obrázek 22 Chromatogram kalibrace .....	- 55 -
Obrázek 23 Vzorek č. 20 .....	- 59 -
Obrázek 24 Vzorek č. 4 .....	- 59 -
Obrázek 25 Vzorek č. 1 .....	- 60 -
Obrázek 26 Gradientová eluce s izokratickým krokem (eluce č. 6, tabulka č. 5) .....	- 73 -
Obrázek 27 Gradientová eluce s izokratickým krokem (eluce č. 10, tabulka č. 5) .....	- 73 -
Obrázek 28 Gradientová eluce (eluce č. 18, tabulka č. 5) .....	- 74 -
Obrázek 29 Gradientová eluce (eluce č. 19, tabulka č. 5) .....	- 74 -
Obrázek 30 Vzorek č. 1 se standární přídavkem .....	- 75 -
Obrázek 31 Vzorek č. 6 se standární přídavkem .....	- 75 -
Obrázek 32 Vzorek č. 8 se standární přídavkem .....	- 76 -

Obrázek 33 Vzorek č. 2 .....	- 76 -
Obrázek 34 Vzorek č. 3 .....	- 77 -
Obrázek 35 Vzorek č. 5 .....	- 77 -
Obrázek 36 Vzorek č. 7 .....	- 78 -
Obrázek 37 Vzorek č. 9 .....	- 78 -
Obrázek 38 Vzorek č. 10 .....	- 79 -
Obrázek 39 Vzorek č. 11 .....	- 79 -
Obrázek 40 Vzorek č. 12 .....	- 80 -
Obrázek 41 Vzorek č. 13 .....	- 80 -
Obrázek 42 Vzorek č. 14 .....	- 81 -
Obrázek 43 Vzorek č. 15 .....	- 81 -
Obrázek 44 Vzorek č. 16 .....	- 82 -
Obrázek 45 Vzorek č. 17 .....	- 82 -
Obrázek 46 Vzorek č. 18 .....	- 83 -
Obrázek 47 Vzorek č. 19 .....	- 83 -
Tabulka 1 Charakterizace oleokantalu.....	- 17 -
Tabulka 2 Seznam použitých vzorků.....	- 39 -
Tabulka 3 Gradient analýzy.....	- 42 -
Tabulka 4 Regresní parametry kalibrační závislosti oleokantalu .....	- 54 -
Tabulka 5 Statistické porovnání měření kalibrační přímkou a standardního přídatku .....	- 56 -
Tabulka 6 Porovnání množství oleokantalu ve vybraných EVOO.....	- 57 -
Tabulka 7 Výpis všech zkoušených elucí .....	- 84 -
Tabulka 8 Naměřené hodnoty pro kalibrační přímkou.....	- 85 -
Tabulka 9 Naměřené hodnoty ploch s vypočítanými koncentracemi pro st. přídatku.....	- 86 -
Tabulka 10 Naměřené hodnoty ploch vzorků EVOO.....	- 87 -
Tabulka 11 Vypočítané hodnoty koncentrací pro analyzované vzorky EVOO.....	- 88 -

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A $\beta$  –  $\beta$ -amyloidní protein

ACN – acetonitril

AD – Alzheimerova choroba

CE – kapilární elektroforéza

COX – cyklooxygenáza

DAD – detektor s diodovým polem

EU – Evropská Unie

EVOO – extra virgin olive oil

FID – plamenově ionizační detektor

GC – plynová chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

MAE – mikrovlnná extrakce

MS – hmotností spektrometrie

MeOH – methanol

NMR – nukleární magnetická rezonance

OCA – oleocanthal

QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe

SPE – extrakce tuhou fází

# 1 ÚVOD

Olivový olej je považován za jednu z charakteristických složek potravin, která je denně využívána k přípravě pokrmů. Extra panenské olivové oleje, jako důležité prvky středomořské stravy, jsou v současné době středem zájmu laické i odborné veřejnosti, protože obsahují polyfenolické deriváty, které představují vzrůstající potenciál pro ochranu zdraví. Nejdůležitějšími sloučeninami této skupiny derivátů v olivovém oleji jsou hydroxytyrosoly, tyrosoly a jejich deriváty. Jedním z nich je i oleokantal, což je ester tyrosolu. Tato látka má velmi pozitivní účinky na lidské zdraví, jako jsou například protizánětlivé nebo antikarcinogenní účinky a byl popsán také její pozitivní vliv proti Alzheimerově chorobě.

Obsah oleokantalu v olivovém oleji lze stanovit kapalinovou chromatografií. Pro analýzu kapalinovou chromatografií však rostlinné oleje představují značně složitou tukovou matici, proto je potřeba před vlastní analýzou vzorek vhodně upravit. Nejčastěji se používá jedno či dvojnásobná extrakce oleje vhodným polárním organickým rozpouštědlem, či jeho směsí s vodou. Vedle použití kapalinové chromatografie se spektrometrickou detekcí, která je vhodná pro rutinní analýzy, bylo využito pro analýzu olivového oleje také spojení kapalinového chromatografu s hmotnostním spektrometrem, které je výhodné zejména pro identifikaci rozseparovaných látek. Tímto způsobem byla potvrzena tvorba hemiacetalů oleokantalu v prostředí metanolu, který je použit při extrakci jako jedno z extrakčních rozpouštědel ve směsi s vodou. Takto identifikované hemiacetaly byly dále využity pro stanovení obsahu oleokantalu ve vzorcích extra panenského olivového oleje.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Olivový olej

Celý koloběh týkající se výroby olivového oleje, stejně jako jeho pěstování, probíhá zejména ve Středomoří. Právě v zemích okolo Středomoří je již po mnoho let prokázáno a všeobecně známo, že se zde vyskytuje nižší počet srdečních a nádorových onemocnění, než je evropský průměr. Odborníci tento jev přisuzují hlavně celoživotní konzumaci typické středomořské stravy, která zahrnuje například extra olivový olej, ovoce, zrniny, zeleninu a obiloviny [1-4].

Olivový olej je olej vyráběný z hospodářsky významné plodiny olivovníku evropského (*Olea europaea*) a největšími producenty jsou země v oblasti Středozemního moře, jako Španělsko a Itálie, které dodávají téměř 50 % celkové sklizně. Ukázka plodů olivovníku evropského je znázorněna na obrázku 1 [3,5].



Obrázek 1 Plody olivovníku evropského [6]

Dříve se olivový olej používal ke svícení, jako součást mastí a k vaření. Samozřejmě byl tisíce let hlavní složkou potravy pro obyvatele Středozeří, ale kvůli své výživové hodnotě, obsahu zdravých mononenasycených mastných kyselin a své jedinečné chuti a vůni se již rozšířil celosvětově [2,3].

Co se týká výroby olivového oleje, postupuje se tak, že se nejprve plody rostliny vypeckují a rozdrtí na kaši, ze které se lisováním získává šťáva. Tato šťáva je pak v odstředivce rozdělena na vodu a olej. Za studena lisovaný olivový olej obsahuje téměř 80 % nenasycených mastných kyselin – nejvýznamnější z nich je kyselina olejová. V oleji jsou také zastoupeny nasycené tuky a malé množství volných mastných kyselin, které jsou určujícím znakem kvality olivových olejů. V kvalitním olivovém oleji se najde také široké spektrum vitamínů, nejdůležitější jsou například vitamín E a A. Kvalitní olivový olej je schopen si udržet prakticky všechny své přirozené nutriční vlastnosti, protože se získává právě

lisováním za studena a na rozdíl od ostatních rostlinných olejů je použit v absolutně přírodní formě. Na druhou stranu se olivový olej lehce přepálí a následně uvolňuje volné radikály. Smažení ničí chuť oleje a také ho zbavuje většiny živin, proto k tomuto účelu není vhodný [2,7].

Olivový olej je podle mezinárodní organizace International Olive Oil Council rozdělen do pěti základní kategorií: [8]

- Extra panenský olivový olej – tento olej se vyznačuje dokonalou chutí a vůní, kdy jeho kyselost by měla být menší než 1 %.
- Panenský olivový olej – jedná se o olej, který má velice podobné vlastnosti jako olej předchozí, ovšem jeho kyselost je menší než 1,5 %.
- Obyčejný olivový olej – tento olej vzniká rafinací panenských olivových olejů a na vaření se používá nejčastěji.
- Lampantový olivový olej – jde o olej, který má nepříjemnou chuť i vůni, je po vylisování určený k dalším úpravám a lze ho využít pro technické účely.
- Olej z pokrutin – tento olej vzniká ze zbytků oliv a před přímou konzumací by se měl ještě tepelně upravit.

## 2.2 Extra panenský olivový olej

Extra panenský olivový olej (EVOO) je olej, který je vyráběn bez chemických úprav a jak již bylo zmíněno, obsah volných mastných kyselin u něj nesmí překročit 1 %. Pouze takový olej smí používat označení extra panenský. V poslední době se objevují pokusy o falšování EVOO, a to z důvodu, že pravý EVOO je považován za jeden z nejdražších, a tedy i ovlivňuje cenu ostatních rostlinných olejů na trhu. EVOO je uznáván právě pro mimořádný obsah tuku, který se skládá ze dvou frakcí, z frakcí glycerolové (zmýdelnitelné, cca 95 %) a nonglycerolové (nezmýdelnitelné, cca 5 %). O 75 % obsahu tuku glycerolové – zmýdelnitelné frakce, ve formě kyseliny olejové (mononenasyčené omega-9 mastné kyseliny) se uvádí, že zlepšuje kardiovaskulární funkce, snižuje cholesterol v krvi a krevní tlak. Nezmýdelnitelná frakce obsahuje fenolické sloučeniny, většina z nich jsou látky s antioxidačními účinky [2,7,9,10].

## 2.3 Vlastnosti EVOO

EVOO přitahuje zájem stále více odborníků, a to právě díky svým nutričním vlastnostem a díky zdravotním výhodám spojeným s jeho konzumací. Je již ověřena pozitivní zdravotní

vlastnost, že ideální kombinace mononenasyčených mastných kyselin obsažených v olivovém oleji snižuje riziko vzniku srdečních chorob a udržuje hladinu cholesterolu na uzdě. U žádného jiného oleje se v takové podobě nenachází [1,2,10-12].

Co se týká skladování a uchovávání, EVOO je citlivý na přítomnost kyslíku a slunečního záření. Z toho důvodu by měl být skladován v dobře uzavřené tmavé lahvi při teplotě mezi 10 °C až 16 °C. Při použití pro tepelnou úpravu pokrmů by neměla teplota překročit 180 °C [1,3,12-14].

Jemná chuť EVOO je spojena s přítomností velkého množství chemických sloučenin, jako jsou alifatické a aromatické uhlovodíky, alifatické a triterpenové alkoholy, aldehydy, ketony, estery, furan a deriváty thiofenu. K organoleptickým vlastnostem, které dělají EVOO tak výjimečným, přispívá víc než 100 různých sloučenin. Chuti a vůni se odvozují od sloučenin jako je například 1-hexanol, hexanal, trans-2-hexenal a 3-methyl-1-butanol, které jsou považovány za hlavní těkavé látky v olivovém oleji. Pokud se v průběhu výroby (mletí) překročí teplota 30 °C, může dojít k rozkladu některých těchto chuťových látek. Proto je důležité „lisování za studena“. Kvalita, totožnost a pravost olivového oleje jsou zaručeny mezinárodními normami a kontrolovány doporučenými analytickými metodami [2,3,13].

Pozitivní účinky středomořské stravy lze připsat nejen vysokému vztahu mezi nenasycenými a nasycenými mastnými kyselinami v olivovém oleji, ale také antioxidačním vlastnostem jeho fenolických sloučenin. Buničina oliv obsahuje tyto sloučeniny, které jsou hydrofilní a nacházejí se také v oleji. Fenolické sloučeniny zahrnují mnoho látek, jsou to jednoduché fenolické sloučeniny, jako jsou vanilová, galová, kumarová a kafetová kyselina, tyrosol a hydroxytyrosol a komplexnější sloučeniny, jako jsou secoiridoidy (oleuropein a ligstros) a lignany [7].

### **2.3.1 Fenolické látky**

Fenolické látky jsou obsaženy prakticky ve všech druzích potravin. Jedná se o heterogenní skupinu sloučenin, z nichž některé působí jako vonné látky, chuťové látky nebo přírodní barviva. Některé fenolické látky se vyznačují výraznými biologickými účinky a patří mezi přírodní antioxidanty, přirozené toxické složky potravin a také mezi ochranné látky rostlin. Fenolické látky vyskytující se v potravinách mohou představovat buď primární složky některých silic, nebo pak vznikají jako sekundární aromatické látky při zpracování potravin [15,16].

Polyfenoly ve své struktuře obsahují aromatické jádro, které nese jednu nebo více hydroxylových skupin, včetně jejich funkčních derivátů. Jsou zastoupeny v rostlinné říši více než 8000 látkami s velmi rozmanitými strukturami. Molekulové hmotnosti se pohybují od < 100 Da (fenolické kyseliny) do > 30 000 Da (polymerní sloučeniny). Ovlivňují aktivitu širokého spektra enzymů a buněčných receptorů. Hlavními zdroji polyfenolů jsou bobule, čokoláda, čaj, víno a čerstvé ovoce [17,18].

Obsah těchto hodnotných fytochemikálií v olivových olejích je silně ovlivňován různými faktory, jako je odrůda oliv, oblast pěstování, klimatické podmínky a environmentální faktory, stupeň dozrání a doba sklizně, stejně jako technologie zpracování. Je prokázáno, že stupeň zralosti oliv v době sklizně způsobuje nejvyšší variace obsahu fenolických sloučenin a má vliv na antioxidační vlastnosti a stabilitu oleje. Zrání plodů vede ke zvýšení měkkosti ovoce, ke změně a degradaci komponent buněčné stěny, což zajišťuje lepší extrakci fenolických látek z ovoce [19-21].

Antonia de Torres, Francisco Espínola a kol. se zabývali vlivem teploty a doby malaxace (mixování podrcených oliv) na obsah fenolických látek v EVOO. Oba dva faktory mají zásadní vliv na obsah studovaných fenolických látek v EVOO. Se vzrůstající teplotou zpracování obsah polyfenolických látek v EVOO vzrůstá, vliv doby malaxace není jednoznačný. Obsah flavonoidů klesá se vzrůstající teplotou zpracování a dobou malaxace. Dále se autoři zabývali vlivem způsobu zavlažování (listové/kořenové) a stupně zralosti oliv na obsah polyfenolických látek. [22]

### **2.3.2 Antioxidační vlastnosti olivového oleje**

Antioxidanty jsou látky, které jsou v organismu schopné snižovat negativní účinky probíhajících oxidačních procesů. Vedle polyfenolických látek mají antioxidační vlastnosti například také některé vitamíny, minerální látky a enzymy.

Antioxidanty jsou snadno oxidující se látky, které na sebe snadno váží volný kyslík a tímto způsobem mají možnost chránit ostatní látky před oxidací. Antioxidanty tak dokáží zamezit vzniku volných radikálů. Radikály jsou pak určité fragmenty molekul, které poškozují buňky těla, ničí oční a nervové buňky, mají genotoxický potenciál a podporují záněty. Na základě těchto nepříznivých vlastností se dnes dávají do souvislosti s předčasnými projevy stárnutí, s onemocněními srdce a krevního oběhu, poškozením kůže světlem, a především se vznikem mnoha druhů rakoviny. Těmto obtížím lze účinně předcházet a zamezit pomocí dostatečného zásobování těla právě antioxidačními látkami, které jsou hojně obsaženy

například v olivovém oleji. Ve velké míře se také vyskytují v ovoci a zelenině, které mají výrazné barvy. Jedná se například o pomeranče, červenou papriku, rajčata, špenát, dýně nebo mrkev. Důležité je, že antioxidanty se v mnohem větší míře vyskytují v potravinách konzumovaných v syrovém stavu. Tepelnou úpravou, pečením a dušením zeleniny se antioxidační vlastnosti ztrácí [4,9,12,23].

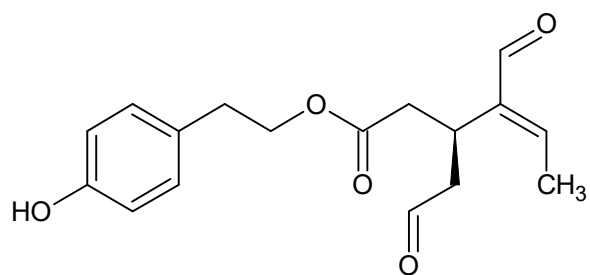
Právě mezi antioxidanty patří i sloučenina oleokantal, kterou se zabývá tato diplomová práce.

## 2.4 Oleokantal

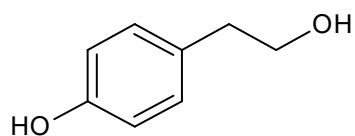
V olivových olejích bylo zjištěno přibližně čtyřicet fenolických sloučenin z hlavních tříd fenolických kyselin, alkoholů, lignanů a flavonoidů. Jednou z nejdůležitějších složek EVOO jsou polyfenolické deriváty, které mají vzrůstající potenciál pro ochranu zdraví. Klíčovými sloučeninami této skupiny jsou hydroxytyrosoly, tyrosoly a jejich deriváty, a to především oleocain, oleokantal, monoaldehydové formy aglykonu ligstrosidu a monoaldehydové formy aglykonu oleuropeinu. Oleokantal (obrázek 3) je ester tyrosolu (obrázek 4) a jeho chemická struktura je příbuzná oleuropeinu. Oleokantal jako takový pochází z demetylace oleuropeinu (obrázek 5). Charakteristika oleokantalu je uvedena v tabulce 1. Chemické složení vyrobených olivových olejů a množství oleokantalu v nich je ovlivněno odrůdou oliv, jejich skladováním, transportem a metodou zpracování. Z organoleptického hlediska je oleokantal zodpovědný za určitý pocit škrábání v krku, který člověk cítí, když konzumuje EVOO. Je také zdrojem pikantní chuti olejů [7,25-31].

<b>Systematický název</b>	<b>2-(4-hydroxyfenyl)ethyl(3S,4E)-4-formyl-3-(2-xoethyl)hex-4-enoát</b>
<b>Sumární vzorec</b>	<b>C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub></b>
<b>Molární hmotnost</b>	<b>304.34 g/mol</b>
<b>Procentuální zastoupení</b>	<b>C 67,09 %, H 6,62 %, O 26,28 %</b>
<b>CAS číslo</b>	<b>289030-99-5</b>

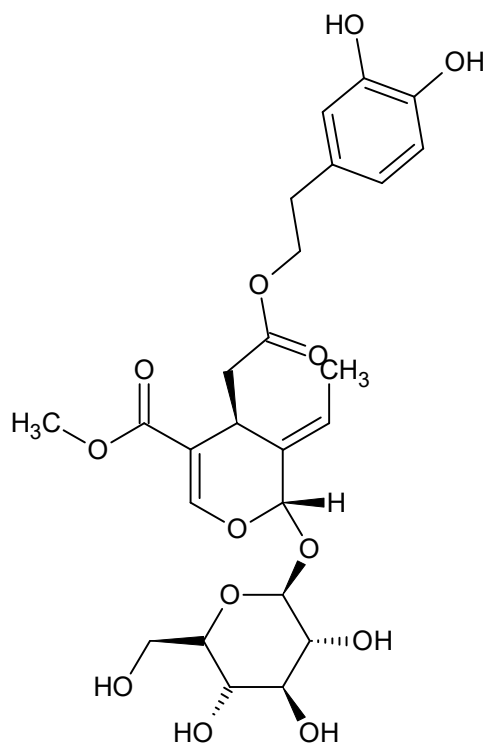
**Tabulka 1 Charakterizace oleokantalu**



**Obrázek 2 Vzorec oleokantalu**



**Obrázek 3 Vzorec tyrosolu**



**Obrázek 4 Vzorec oleuropeinu ve formě glukosidu**

## **2.5 Účinky oleokantalu na lidský organismus**

Výzkum kvality potravin má v naší společnosti vysoký význam nejen z pohledu základních živin a zjištění obsahu bioaktivních sloučenin s příznivými účinky na zdraví, které poskytují, ale také zjištění přítomnosti nežádoucích sloučenin (různých kontaminantů), které jsou často nebezpečné pro lidské zdraví, i když se vyskytují v nízkých hodnotách. Přestože spotřebitelské preference týkající se potravinových výrobků jsou často ovlivněny organoleptickými vlastnostmi (barva, chuť, vůně) a socioekonomickými faktory (ekonomická produkce), lidé se stále více zajímají spíše o přítomnost některých specifických sloučenin se zdravotně prospěšnými účinky [9,17,20].

V posledních letech se odborná veřejnost čím dál tím víc zajímá o středomořskou stravu, především tedy o olivové oleje a jejich pozitivní dopad na lidské zdraví. Olivový olej je totiž považován za jednu z nejdůležitějších složek středomořské stravy. Pozitivní účinky na lidské zdraví byly zaznamenány již v roce 1970 [20,26-28].

### **2.5.1 Protizánětlivé účinky**

Oleokantal, který je přítomný v EVOO, velice příznivě ovlivňuje zdravotní stav člověka. Žádné jiné olivové oleje nevykazují takovéto účinky. Především působí jako protizánětlivé činidlo a dokáže také tlumit různé bolesti. Je schopen inhibovat enzymy cyklooxygenázy a tím vyvíjet protizánětlivé účinky. Cyklooxygenáza se dělí do dvou forem: COX-1 a COX-2, kdy právě COX-2 podporuje rozvoj zánětu, bolesti a teploty [20,22,28,32,33].

Bylo zjištěno, že má stejné účinky jako lék proti bolesti ibuprofen nebo jiné nesteroidní protizánětlivé léky. Udává se, že 50 gramů extra panenského olivového oleje přijatého denně poskytne takové množství oleokantalu, jako je 10 % denní dávky ibuprofenu pro dospělého člověka. Toto je velmi důležitý aspekt a vědci usuzují, že právě oleokantal je tou hledanou látkou, která má na svědomí zdravější život v oblasti Středomoří [8,9,25,26,33,34].

### **2.5.2 Vliv oleokantalu na Alzheimerovu chorobu**

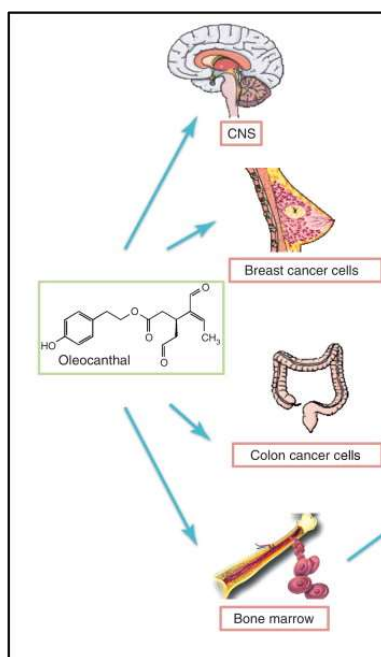
Alzheimerova choroba (AD) patří mezi nejčastější vyskytující se demence. Pojem demence označuje choroby, které jsou charakterizovány úpadkem určitých poznávacích funkcí (intelekt, paměť, pozornost), funkcí výkonných (motivace, plánování, vyhodnocení) a dalších psychických funkcí. Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění představující asi 50–60 % všech demencí [35-37].

Mezi hlavní hypotézu příčiny vzniku AD patří tvorba nerozpustných senilních plaků v důsledku akumulace extracelulárního  $\beta$ -amyloidního proteinu ( $A\beta$ ) v různých mozkových oblastech (převážně v hipokampu). A právě oleokantal má tu důležitou schopnost, že dokáže zabránit akumulaci  $A\beta$  proteinů. Dále je také schopen ovlivnit fibrilaci Tau proteinů, které se při AD tvoří. V tzv. amyloidních placích je v typickém případě jádro z  $A\beta$  obaleno právě neurofibrilárními vlákny z Tau proteinů. Společně tedy amyloid- $\beta$  a Tau představují dva základní biochemické příznaky Alzheimerovy choroby v mozku [25,28,38-40].

Pochopení mechanismů, kterými oleokantal jako malá přírodní molekula chrání organismus proti Alzheimerově chorobě, bude mít velký význam zejména kvůli dramatickému nárůstu Alzheimerovy choroby v posledních letech a nedostatečné možnosti jejího léčení [9,35].

### 2.5.3 Další pozitivní účinky

Mezi další projevy oleokantalu na lidský organismus patří například inhibice buněčné životaschopnosti a indukce apoptózy v buňkách rakoviny tlustého střeva. Některé účinky jsou uvedeny na obrázku 6. Je také inhibítorem množení a přemísťování buněk rakoviny prsu, prostaty a kůže. Oleokantal ničí lysozomy rakovinných buněk, ve kterých jsou obsaženy enzymy zabíjející buňky. U zdravých buněk způsobuje aplikace oleokantalu dočasné zastavení jejich životního cyklu, avšak po 24 hodinách se situace vrátí do normálu. Oleokantal je aktivní během 30–60 minut, zatímco apoptóza jako samotná trvá 16-24 hodin [25,28].



Obrázek 5 Vliv oleokantalu na lidský organismus [1]

Oleokantal snižuje riziko výskytu chronických onemocnění jako je například kardiovaskulární onemocnění a ateroskleróza. Působí jako terapeutické činidlo při zánětlivých onemocnění kloubů, jako je například osteoartritida a revmatoidní artritida. Dokonce je známo, že několik lžiček EVOO ráno může pomoci vyřešit problémy s chronickou zácpou [1,25,31].

Byla také prokázána antimikrobiální aktivita proti *Helicobacter pylori*, který je původcem vředů a některých typů rakoviny žaludku. V simulovaných podmínkách se zjistilo, že tyto látky mohou difundovat z oleje do žaludeční šťávy a být v tomto kyselém prostředí stabilní celé hodiny. In vitro vykazuje oleokantal ze všech fenolických látek obsažených v olivovém oleji nejsilnější baktericidní účinek v koncentraci již 1,3 µg/ml. Tyto výsledky otvírají možnost považovat panenský olivový olej za chemopreventivní činidlo [41,42].

## 2.6 Legislativa

Legislativa Evropské Unie nedávno přijala zdravotní tvrzení týkající se polyfenolů obsažených v olivových olejích a jejich příspěvek k ochraně lipidů v krvi před oxidační aktivitou. Jedná se o nařízení Komise EU č. 432/2012 ze dne 16. 5. 2012, kterým je stanoven seznam povolených zdravotních tvrzení podaných o těchto potravinách. Toto lze použít na olivové oleje obsahující nejméně 5 mg hydroxytyrosolů a jeho derivátů (komplexy oleuropeinu, tyrosolu) na 20 g olivového oleje a předpokládá se, že příznivý účinek se dosáhne denním příjmem 20 g olivového oleje [30,31].

## 2.7 Metody pro stanovení oleokantalu v olivovém oleji

Ke zjištění obsahu oleokantalu v EVOO se využívají různé druhy technik. Mezi nejdůležitější z nich patří jednoznačně vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), plynová chromatografie (Gas Chromatography, GC), a v neposlední řadě také hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry) a nukleární magnetická resonance (Nuclear magnetic resonance, NMR). Plynová chromatografie je použitelná pro identifikaci a kvantifikaci látek s nízkým bodem varu, což umožňuje jejich převedení do plynného stavu a separaci na chromatografické koloně. Kapalinová chromatografie se používá pro analýzu látek, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti znemožňují stanovení pomocí plynové chromatografie. Pro určení složení, struktury a množství látky je v neposlední řadě využívána NMR, jejíž princip spočívá v interakci atomových jader s magnetickým polem. Pro identifikaci a kvantifikaci oleokantalu jsou v současné době HPLC i GC nejčastěji používány ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Mass Spectrometry, MS), která přináší další výhody při detekci látek.

V dnešní době neexistuje oficiální metoda stanovení oleokantalu z důvodu známých technických problémů některých postupů. EVOO je velice bohatý na látky s antioxidačními účinky a je také známý pro svou biologickou aktivitu (tedy obsahuje například i steroly, tokoly, skvalan a fenoly). Při zpracování a analýze vzorku se nejdříve provádí extrakce polyfenolických sloučenin do vhodného rozpouštědla a tento extrakt je po přečištění analyzován vybranou analytickou technikou. K extrakci lze použít různé extrakční techniky, stejně tak jako pro vlastní analýzu (např. LC, GC, NMR) [1,26,30].

V následujícím textu je uveden stručný popis nejdůležitějších extrakčních a analytických metod, kterými lze oleokantal v extra panenském olivovém oleji stanovit.

## **2.8 Extrakce**

Extrakce je separační metoda, při které přechází složka ze směsi látek z tuhé nebo kapalné fáze do jiné kapalné fáze. Extrahovaná látka může přecházet do roztoku z kapalné fáze nebo z pevné fáze. Extrakce závisí na povaze matrice vzorku, stejně jako na chemických vlastnostech fenolů, včetně molekulární struktury, polaritě, koncentrace, počtu aromatických kruhů atd. Všeobecně platí, že jedna extrakce celým množstvím rozpouštědla je méně účinnější než opakovaná extrakce menšími dávkami rozpouštědla [43].

### **2.8.1 Extrakce tuhou fází**

Extrakce tuhou fází (SPE) je založena na rovnovážné distribuci analytu mezi tuhou a vodnou fází. Metoda je založena na tom, že dochází k selektivnímu zadržování určitých molekul látky na tuhém sorbentu, přes který vzorek protéká a který je umístěn ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce. Roztok analytu je převeden do kontaktu s tuhým aktivovaným sorbentem, který sorbuje analyt. Po výběru vhodného elučního činidla je poté elucí analyt uvolněn. Pro urychlení průtoku kapalin přes kolonu může být použito například vakuum. Výhodou je například práce s menšími objemy vzorků, rychlost a jednoduchost nebo snadná automatizace [43,44].

#### **2.8.1.1 QuEChERS**

Jako jednu z nových extrakčních metod lze použít metodu QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe). Jak lze přeložit z názvu, metoda je rychlá, snadná, levná, efektivní, robustní a bezpečná. Tato metoda se využívá především pro extrakci pesticidů [45].

Tato technika separace zahrnuje dva kroky, kde první z nich je extrakce kapalina-kapalina zhomogenizovaného vzorku a druhý zahrnuje frakcionaci pomocí organického rozpouštědla

a roztoků solí. Jako soli se používají chlorid sodný a síran hořečnatý. Existují různé modifikace této metody, ukázka postupů je uvedena na obrázku č. 5 [45,46].

## 2.8.2 Extrakce kapalina – kapalina

Je to metoda, která umožňuje oddělit velké množství rušivých látek nebo oddělovat stopové množství složky. Extrakce z kapaliny do kapaliny je založena na přechodu rozpuštěné látky z jedné kapalně fáze do druhé. Extrakce je tím selektivnější a účinnější, čím vhodnější se použije extrakční rozpouštědlo. V praxi bývá jedno rozpouštědlo voda (nebo vodný roztok), a druhé rozpouštědlo je organické, které se nemísí s vodou (hexan, diethylether, chloroform aj.). Látky mohou být ve vodné fázi rozpuštěny, suspendovány či emulgovány. Látka rozpuštěná v jedné fázi přechází přes fázové rozhraní obou kapalin do fáze druhé. Poměr koncentrací (aktivit) rozpuštěné látky v obou fázích je po ustanovení rovnováhy konstantní a je dán distribuční konstantou pro konkrétní systém. Její velikost závisí na typu rozpouštědel, rozpuštěné látce, teplotě a dalších podmínkách extrakce. Je dána vztahem:

$$K_D = \frac{c_{org}}{c_{vod}}$$

$K_D$  ... distribuční konstanta

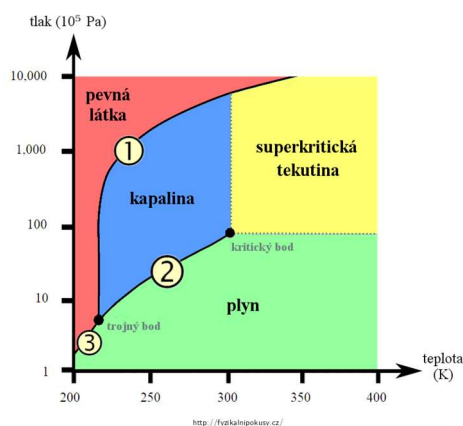
$c_{org}$  ... koncentrace rozpuštěné látky v organické fázi

$c_{vod}$  ... koncentrace rozpuštěné látky ve vodné fázi

### 2.8.2.1 Superkritická fluidní extrakce

V tomto případě se jedná o extrakci, kde se jako extrakční činidlo využívá tekutina v superkritickém stavu, tzv. superkritická (nadkritická) tekutina. Jde o jednu z alternativních metod přípravy vzorku, tato metoda je rychlá, snadno automatizovatelná, nevyužívají se při ní velká množství rozpouštědel ani laboratorního nádobí. Na druhou stranu vyžaduje poměrně dlouhou optimalizaci pro určité látky a v neposlední řadě nepatří mezi nejlevnější metody, co se týče pořizovacích nákladů [47,48].

Superkritická tekutina je taková tekutina, která se nachází ve stavu nad kritickou teplotou a kritickým tlakem, viz obrázek 6. V potravinářství se nejvíce využívá oxid uhličitý, který má kritickou teplotu 31 °C a tlak 73 bar. Fázový diagram oxidu uhličitého je uveden na obr. 7 [47,48].



Obrázek 6 Fázový diagram pro oxid uhličitý [49]

### 2.8.2.2 Mikrovlnná extrakce

Mikrovlnná extrakce (MAE – Microwave-Assisted Extraction) je metoda, která se používá ke zvýšení efektivity klasické extrakce, při které se používá rozpouštědlo. Tuto metodu extrakce lze využít pouze u termostabilních sloučenin, jelikož se zde využívá zvýšené teploty, kdy jsou vzorky míchány a ohřívány. Co se týká polaritý rozpouštědel, tak nepolární rozpouštědla nejsou mikrovlnami ovlivňována, proto se zde používají pouze polární rozpouštědla. Mikrovlnné záření proniká do materiálu a spolu s polárními molekulami rozpouštědla dochází k tvorbě tepla, celá směs je pak ohřívána stejnoměrně. Zvyšuje se tím migrační rychlost rozpuštěných iontů a tím penetruje rozpouštědlo do tuhé matrice, a to usnadňuje uvolnění cílových analytů [50,51].

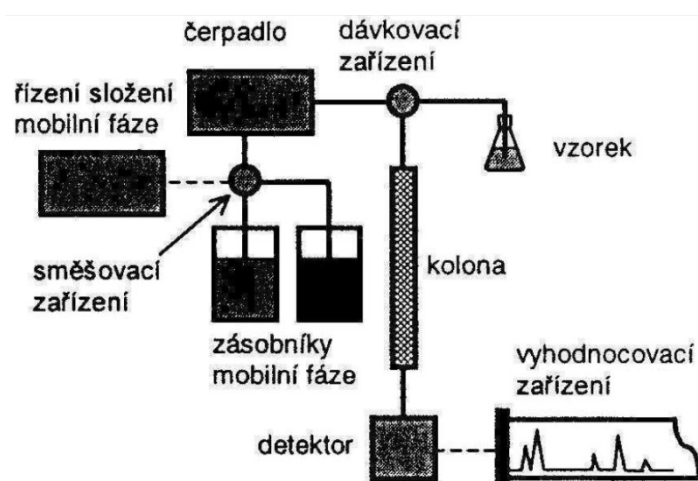
## 2.9 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je založena na využívání několikanásobného procesu distribuce látek mezi stacionární fází (sorbet, tuhá fáze) a mobilní fází (kapalinou). Podle uspořádání stacionární fáze se rozlišují metody v plošném uspořádání, mezi které patří tenkovrstvá a papírová chromatografie a metody v kolonovém uspořádání, které zahrnují klasickou sloupcovou chromatografii a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii [52-54].

V současnosti je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) jednou z nejpoužívanějších metod pro analýzu širokého spektra látek od jednoduchých molekul až po složité sloučeniny [55].

Schéma jednoduchého kapalinového chromatografu je znázorněno na obrázku 7. Skládá se z chromatografické kolony, která je naplněná vhodnou stacionární fází. Běžně používané

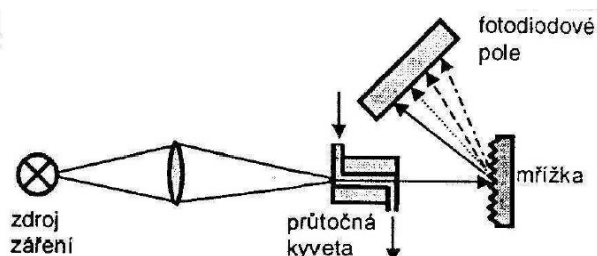
kolony pro analytickou HPLC mají délku 50–250 mm s vnitřním průměrem 2–4.6 mm a jsou plněny stacionárními fázemi s průměrem částic 2 – 5  $\mu\text{m}$ . Mobilní fáze protéká kolonou rychlostí 0.5 – 5 ml/min. Jako stacionární fáze se nejčastěji používají částice se silikagelovou maticí s chemicky vázanými stacionárními fázemi, z nichž nejpoužívanější je silikagel s chemicky navázaným oktadecylovým uhlovodíkovým zbytkem (oktadecylsilikagel). Jako mobilní fáze jsou v tomto případě použity směsi vody a polárního organického rozpouštědla (methanol, acetonitril, dioxan atd.) – v tomto případě se jedná o tzv. systém s obrácenými fázemi. Protože kolona naplněná takto malými částicemi stacionární fáze klade toku kapaliny vysoký odpor, je pro dosažených požadovaných průtoků nutno použít čerpadla, která jsou schopna čerpat mobilní fázi za tlaku 30–60 MPa, v případě použití kolon s částicemi pod 2  $\mu\text{m}$  mohou být pracovní tlaky až 1000 MPa (HPLC). S výhodou se využívá jednoho nebo více vysokotlakých čerpadel pro tvorbu nízkotlakého či vysokotlakého gradientu složení mobilní fáze během analýzy. Pro zavedení vzorku na kolonu je nedílnou součástí chromatografu dávkovací zařízení. Nejčastěji se využívá šesticestného dávkovacího ventilu, přičemž dávkování se provádí ručně nebo pomocí autosampleru. Další důležitou součástí chromatografu je detektor, který by měl být vysoce citlivý, s vysokou rychlostí odezvy a maximálně univerzální při zachování příznivé ceny. Běžné používané detektory pro HPLC jsou např. UV/VIS spektrofotometrické, fluorimetrické, refraktometrické, elektrochemické nebo vodivostní. A v současnosti hmotnostní spektrometr použitý jako detektor [52-54].



Obrázek 7 Schéma kapalinové chromatografie [53]

### 2.9.1 Spektrofotometrický detektor

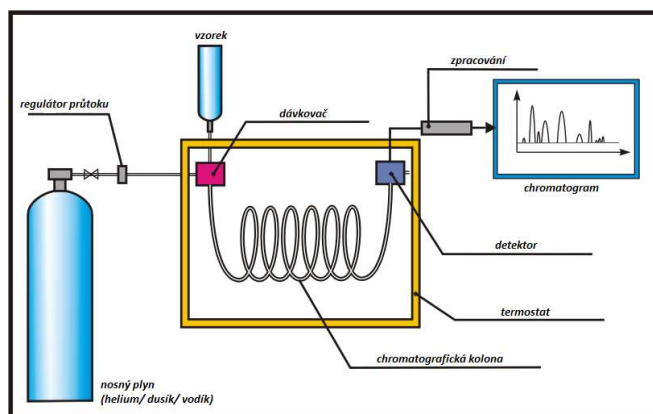
Spektrofotometrický detektor je jedním z nejpoužívanějších detektorů v technice HPLC. Tyto detektory jsou velice provozně spolehlivé a jednoduché a lze jejich pomocí detekovat velký počet látek. Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony v rozmezí vlnové délky 190-700 nm. Obecně se můžou tyto detektory rozdělit do dvou skupin. První zahrnuje detektory, které mohou měřit pouze při jedné vlnové délce, druhá skupina zahrnuje přístroje, u kterých lze vlnovou délku detekce nastavit v širokém rozmezí vlnových délek pomocí monochromátoru. Mezi nejlepší spektrofotometrické detektory patří detektory s diodovým polem (DAD), které vedle detekce látek umožňují i online získání jejich UV/VIS spekter, což může napomoci při identifikaci neznámých látek v eluátu z kolony. (obrázek 8) [53].



Obrázek 8 Spektrofotometrický detektor [53]

### 2.10 Plynová chromatografie

Vede nejčastěji používané kapalinové chromatografie pro analýzu oleokantalu použili autoři Mir Ali Farajzadeh, Adeleh Yadeghari, Leila Khoshmaramb a Houshang Ghorbanpour plynovou chromatografií. Plynová chromatografie patří mezi další velmi používané separační metody, která je opět založena na distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze. Schéma plynového chromatografu je na obrázku 9. V současnosti jsou k separaci látek plynovou chromatografií nejčastěji používány kapilární křemenné kolony malého průměru (0,2 - 0,5 mm) se stacionární fází zakotvenou na jejich vnitřním povrchu. Tyto kolony umožňují použití nízkých průtoků nosného plynu (vodík, helium, dusík), což umožňuje relativně jednoduché spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem. Vedle již zmíněného hmotnostně spektrometrického detektoru se k detekci analyzovaných látek používá plamenově-ionizační detektor, který má velice robustní a jednoduchou konstrukci a poskytuje široký lineárně dynamický rozsah odezvy [56-58].

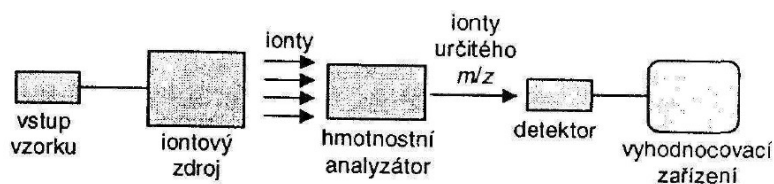


Obrázek 9 Schéma plynového chromatografu [59]

## 2.11 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda, která k identifikaci a stanovení látek využívá měření jejich hmotnostních spekter. V iontovém zdroji hmotnostního spektrometru dochází k ionizaci a případné fragmentaci analyzovaných látek. Vzniklé ionty procházejí analyzátozem pracujícím na různém principu, který dokáže rozlišit jednotlivé ionty podle jejich efektivní hmotnosti ( $m/z$ ). Rozseparované ionty jsou následně detekovány [53,58].

Schéma hmotnostního spektrometru je uvedeno na obrázku 10.



Obrázek 10 Schéma hmotnostního spektrometru s jedním analyzátozem [53]

Vedle využití hmotnostního detektoru pro přímou analýzu látek je jeho využití v současnosti i ve spojení se separačními technikami. V tomto případě je výstup z kolony kapalinového nebo plynového chromatografu zaveden přes vhodný převodník do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou používány nejčastěji ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (API), při kterých není na závalu přítomnost velkého nadbytku mobilní fáze a mobilní fáze se přímo účastní ionizačního procesu (elektrosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku). Spojení chromatografie a hmotností spektrometrie využívá výhod obou technik, tj. separace složité směsi pomocí

chromatografie a jejich následná identifikace, resp. stanovení jednotlivých složek hmotností spektrometrií [28,31,32].

## **2.12 Kapilární zónová elektroforéza**

Carrasco-Pancorbo A1, Gómez-Caravaca AM aspol. provedli výzkum fenolických látek, vedle nejčastěji používaných metod, také kapilární zónovou elektroforézou (CZE). Jedná se o metodu, která patří do skupiny elektroforetických metod. Elektroforetické metody separace slouží k oddělení látek na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Separace probíhá v kapiláře, která je naplněná roztokem elektrolytu. Jako elektrolyt se nejčastěji používá roztok pufru. CZE může být použita samostatně, ale také v kombinaci s hmotnostním detektorem (CZE/MS). Tato metoda nabízí výhodu několika aplikačních modů, čímž se stává velice flexibilním nástrojem pro široké pole aplikací [61,62].

## **2.13 Nukleární magnetická resonance**

Tato analytická metoda je založena na absorpci radiofrekvenčního elektromagnetického záření jádru některých atomů v molekulách analyzovaných látek, které jsou umístěny v magnetickém poli. Nejčastěji se provádí v  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{19}\text{F}$ -,  $^{31}\text{P}$ -NMR. Na základě NMR spektroskopie je možné určit složení a strukturu molekul zkoumané látky a také jejich množství. Touto metodou byly analyzovány i vzorky oleje a stanoven obsah oleokantalu v nich [30,62,63].

## **2.14 Analýza oleokantalu v EVOO**

V dnešní době neexistuje univerzální metoda, kterou by bylo možné rychle, jednoduše a přesně určit, zda se právě oleokantal nachází v EVOO a případně jaké se v něm vyskytuje jeho množství. Jedná se o poměrně novodobou záležitost, která se stává čím dál tím více populární. Vzhledem k již dříve popsáním pozitivním účinkům jako je protizánětlivost, redukce výskytu chronických onemocnění atd., se oleokantal stále více stává předmětem zájmu odborné i laické veřejnosti.

Zjednodušený princip stanovení oleokantalu v EVOO zahrnuje extrakci, kterou se izoluje čistý oleokantal a příbuzné látky, s jeho následující identifikaci a kvantifikaci. Jako nejčastější extrakční technika se jednoznačně využívá extrakce kapalina – kapalina a extrakce tuhým sorbentem. Mezi hlavní separační techniky, které se používají pro analýzu oleokantalu, se řadí kapalinová chromatografie a plynová chromatografie. Pro identifikaci látek

se nejčastěji používají obě tyto chromatografické techniky ve spojení s hmotnostním detektorem, nebo UV detektorem [26].

Pro extrakci kapalinou se využívají různá extrakční rozpouštědla, jako například methanol, ethanol, acetonitril, voda, ethylacetát a jejich kombinace. Výběr vhodných rozpouštědel má vliv na kvantitu extrakce a může zlepšit limity detekce. Nejúčinnější bývají smíšené systémy, protože fenolické sloučeniny jsou obecně více rozpustné v polárních rozpouštědlech než v čisté vodě. Jinak by mohly být koextrahovány i jiné látky, např. proteiny, peptidy anebo sacharidy [17,20].

V poslední době dochází k nárůstu vývoje nových, rychlých, ekonomických a ekologických způsobů extrakce fenolických sloučenin. Mezi tyto metody patří například superkritická fluidní extrakce nebo mikrovlnná extrakce [17].

Při extrakci kapalina – kapalina se vzorek EVOO nejdříve ředí vhodným lipofilním rozpouštědlem (hexan), čímž se sníží polarita takto připravené extrahované směsi, což má výhodu pro lepší přechod polárních fenolických sloučenin do extrakčního rozpouštědla (methanol, acetonitril, příp. jejich směsi s vodou). V některých případech odborníci, jako třeba John Impellizzeri a Jianming Lin, doporučují takto připravený extrakt ještě dále přečistit od zbývající tukové frakce odpařením extraktu do sucha jeho rozpuštěním v dalším podílu hexanu a v následné extrakci do methanolu, či acetonitrilu, resp. jejich směsi s vodou [17,31,34,64,65].

Ve snaze zredukovat práci s velkými objemy vzorků i organických rozpouštědel při klasické LLE bylo publikováno také využití mikroextrakce kapalina – kapalina (LLME) pro stanovení polyfenolických látek [66].

K úpravě vzorku před analýzou fenolických látek, resp. oleokantalu v olivovém oleji byla využita i technika extrakce tuhou fází s využitím sorbentů s navázanými různými funkčními skupinami (diolové, C8 a C18). Bylo vyzkoušeno také využití sorbentů s aminovou stacionární fází, avšak v tomto případě dochází k reakci mezi rozpouštědly a aminovou fází [31,67]. U tohoto typu extrakce je však prokázána nižší výtěžnost než u extrakce kapalina - kapalina [31].

Oleokantal v EVOO se nejčastěji analyzuje pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. K separaci se využívá systém s obrácenými fázemi s kolonami typu C18 a s gradientovou elucí mobilní fází voda/acetonitril, resp. methanol. K detekci lze využít spektrofotometrický

UV detektor, resp. detektor s diodovým polem. Vhodné vlnové délky pro detekci jsou 240, 278 a 340 nm [14,17,22,27-32,34].

Plynová chromatografie se používá ke stanovení jednoduchých i složitějších fenolických látek v olivových olejích. Nevýhodou této metody je však omezená těkavost mnoha fenolických látek a nutnost jejich derivatizace, což do jisté míry snižuje použitelnost této metody k jejich kvantifikaci. Derivatizace totiž často produkuje směsi částečně derivatizovaných fenolických sloučenin, což vede ke snížení citlivosti metody. Tímto způsobem byl analyzován slunečnicový, řepkový a extra panenský olivový olej [31,56,68].

Byla vyzkoušena také metoda vysoko účinné protiproudé chromatografie (HPCCC). Touto metodou byly analyzovány vybrané polyfenolické sloučeniny (tyrosol, hydroxytyrosol a další) [28].

V poslední době byla pro analýzu EVOO použita i technika kapilární zónové elektroforézy. Pro vzorky vysoce lipofilní je výhodné využít modifikaci této techniky – nevodnou kapilární zónovou elektroforézu (NACE), která probíhá v nevodném prostředí a z principu je vhodná pro látky s vysokou lipofilitou, nesnadno analyzovatelné klasickou kapilární zónovou elektroforézou. Bylo však popsáno, že tato metoda má nižší reprodukovatelnost a malou citlivost detekce a obtížně se kombinuje s detekcí hmotnostním spektrometrem [69].

Důležitou metodou pro analýzu oleokantalu a jiných fenolických sloučenin v EVOO je NMR. Touto metodou je možné identifikovat a určit strukturu mimo jiné takových sloučenin jejichž identifikace a určení struktury pomocí hmotnostní spektrometrie je obtížná až nemožná (např. izomerie). [28,30,65].

V následující kapitole je sepsáno několik nejdůležitějších a nejpoužívanějších postupů extrakce a identifikace pro stanovení oleokantalu.

#### **2.14.1 Příklady separace a identifikace oleokantalu**

Kulišic Bilušic T. a kol. analyzovali fenolické látky v olejích z Chorvatska. Extrahovali 5 g olivového oleje, který smíchali s 20 ml cyklohexanu a 25 ml acetonitrilu. Po homogenizaci byla směs odstředěna při 4000 otáčkách za 5 min. Z acetonitrilové fáze se odebralo a smíchalo s 1 ml 0,5 ml roztoku syringaldehydu v acetonitrilu a odpařilo se za sníženého tlaku za použití rotační odparky. Rezidua byla rozpuštěna v 750  $\mu$ l deuterovaného chloroformu a přesný objem (550  $\mu$ l) byl přenesen do 5 mm NMR zkumavek.  $^1\text{H-NMR}$  spektra se zaznamenávala při 600 a 400 MHz. Bylo zjištěno, že tyto Chorvatské

olivové oleje mají vysoký obsah fenolických látek. V této studii se také zabývaly oxidační stabilitou těchto olejů a došlo se k závěru, že EVOO s vysokým obsahem fenolických sloučenin mají velmi dlouhou oxidační stabilitu [70].

Stejným způsobem postupovali i Prokopios Magiatis a Eleni Melliou, kteří provedli extrakci EVOO velice podobně a k analýze také využili NMR [71].

Karel Hrnčíř a Sonja Fritche postupovali při analýze olivových olejů za použití 2,5 g vzorku oleje, 5 ml hexanu a 3,5 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40). Po homogenizaci se tato směs nechala 2 minuty odpařovat dusíkem a 15 minut heliem pro odpaření rozpuštěného kyslíku. Po odstředění při 3500 ot. /10 min proběhla reextrakce a metanolová fáze se následně použila pro HPLC analýzu. Použili systém s obrácenými fázemi, kolonu C18 (250 x 4 mm, 5 μm) za teploty 27 °C s konstantním průtokem 1 ml/min a gradientovou elucí. Mobilní fázi tvořila H<sub>2</sub>O a 0,5 % HCOOH (A) a MeOH/ACN (50:50) (B). Detekce probíhala při vlnové délce 278 nm [72].

Dalšími, kdo analyzovali oleokantal v EVOO, byl Stefano Fogli a kol. Pro samotný experiment se použilo 190 g EVOO, 760 ml n-hexanu a 950 ml acetonitrilu. Po homogenizaci a odstředění (4000 ot. /5 min.) se acetonitrilová fáze nechala odpařit za sníženého tlaku, čímž se získal surový zbytek, který se nechal přechistit kolonovou chromatografií. Frakce obsahující oleokantal byla čištěna preparativní tenkovrstvou chromatografií pomocí petrol eteru/etyl acetátu (3:7) jako mobilní fáze. Následovala extrakce ze stacionární fáze pomocí etyl acetátu, odpaření a poté analýza pomocí HPLC nebo NMR [32].

Leonardo Di Donna, Hicham Benabdelkamel a kol. využili pro analýzu oleokantalu postup s jeho derivatizováním. Tato výroba derivátu probíhala tak, že se využilo 100 mg olivového oleje, který se smíchal s 900 μl 1,5 M roztoku o-methylhydroxyl amonium chloridu. Směs byla promíchána při 55 °C po dobu 60 min, následovalo ochlazení a reakční směs se poté odstředila při 8000 ot. /1 min. 100 μl supernatanu bylo smícháno se 100 μl 10 mg/l vnitřního standardu rozpuštěného v CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (70/30). Tato směs byla následně zředěna na 1 ml s roztokem CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (70/30). Po homogenizaci a filtraci se tento derivát následně analyzoval pomocí kapalinové chromatografie s C18 se systémem s obrácenými fázemi (2,1 x 50 mm, 1,9 μm). Průtoková rychlost byla 0,4 ml/min a objem injekce 12 μl. Eluční gradient se skládá z mobilní fáze: (A) H<sub>2</sub>O (0,1 % TFA), (B) CH<sub>3</sub>OH. Byl použit prepínací ventil umístěný na MS k odklonu toku odpadu po dobu prvních 3 minut každé injekce pro ochranu MS před kontaminací. Použil se trojnásobný kvadrupólový hmotnostní

analyzátor s vyhřívanou elektrosprejovou ionizací, přičemž odpařovací a kapilární teplota činila 200 a 300 °C, kolizní plyn byl argon [27].

Hamid-Reza Adhami, Martin Zehl a kol. provedli extrakci s 45 ml EVOO smícháním se 45 ml hexanu, 75 ml MetOH po dobu 1 min. Po rozdělení fází pomocí odstředění při 3500 ot. /10 min. se metanolová fáze ještě dvakrát tímto samým způsobem přečistila pro dokonalé odstranění zbytků oleje. Čistá metanolová vrstva se poté použila pro analýzu. Pro HPLC analýzu se mobilní fáze sestávala z ACN (A) a H<sub>2</sub>O (B) při průtokové rychlosti 0,75 ml/min a teplotě 25 °C. Byla použita kolona C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm). Po isokratickém kroku při 25 % A po dobu 35 minut byla koncentrace rozpouštědla A zvýšena na 80 % během 1 minuty a udržována na této koncentraci po dobu 10 min. Eluce byla sledována při 278 nm [28].

John Impellizzeri a Jianming Lin také popsali extrakci oleokantalu, kde byla vyzkoušena čistá rozpouštědla smíchaná s vodou v různých poměrech (metanol, acetonitril, voda). K 1 g EVOO byly přidány 2 ml hexanu, po homogenizaci se přidalo 5 ml extrakčního roztoku a opět se 15 s se zkumavkami míchalo. Po odstředění při 4000 ot. /4 min. se vrstva s rozpouštědly odebrala a tento extrakční postup se opakoval ještě třikrát. Po provedení se směs nechala sušit pomocí N<sub>2</sub>, kdy došlo k odpaření rozpouštědel. 1 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) byl přidán do zkumavek pro rozpuštění reziduí a 3 ml hexanu se přidaly pro odstranění zbývajících oleje. Proběhlo další odstředění za stejných podmínek a poté se metanolová vrstva použila pro HPLC analýzu. Analýza se provedla pomocí UV detektoru při 278 nm, pomocí kolony C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) při 25 °C. Rychlost průtoku byla 1 ml/min a dávkovaný objem 20 µl. Použila se gradientová eluce [34].

Verónica Sánchez de Medina a další vydali pro časopis Talanta článek, kde stanovovali oleokantal a oleocin v panenském olivovém. Pro extrakci byl použit 1 g EVOO, ke kterému se přidal 1 ml hexanu a 1 ml acetonitrilu nebo 1 ml směsi 60:40 MeOH/H<sub>2</sub>O. Po homogenizaci se rozpouštědlová fáze odebrala a odstředila. Analýza probíhala kapalinovou chromatografií v systému s obrácenými fázemi s následnou elektrosprejovou ionizací a tandemovým uspořádáním hmotnostního spektrometru. Dávkovaný objem byl 5 µl při průtokové rychlosti 0,4 ml/min, kolona C18 (50 x 2.0 mm, 2.8 µm) a její teplota 30 °C. Mobilní fáze se skládala z (A) H<sub>2</sub>O a 0,1 % HCOOH a (B) MeOH a 0,1 % HCOOH. Celý eluát byl elektrosprejován a sledován pomocí MS/MS. Průtok a teplota sušícího

plynu ( $N_2$ ) činily 10 l/min a 300 °C. Tlak rozprašovače byl 344,7 kPa a kapilární napětí 3000 V [73].

Sara Cicerale, Xavier A. Conlan *aspol.* použili velmi podobný způsob extrakce pro získání oleokantalu z EVOO. Použili 10 g oleje zhomogenizovaného s 10 ml hexanu a 50 ml acetonitrilu. Po odstředění při 4000 ot. /5 min. se odebrala acetonitrilová fáze a nechala se odpařit při 45 °C a 200 mbar. K vysušenému extraktu byl přidán 1 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) a 1 ml hexanu pro rozpuštění reziduí extraktu a odstranění oleje. Po odstředění se fáze MeOH/H<sub>2</sub>O odebrala pro HPLC analýzu. Byl použit systém s obrácenými fázemi pro kolonu C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu$ ) při konstantní teplotě 25 °C. Dávkovaný objem činil 20  $\mu$ l, průtok 1 ml/min a jako detektor se využil detektor s diodovým polem nastaveným na 278 nm. Byla využita gradientová eluce s mobilní fází H<sub>2</sub>O (A), ACN (B). Oleokantal byl identifikován za použití hmotnostního spektrometru 6210 MS/TOF za následujících podmínek: sušící plyn, dusík (7 ml-1, 350 ° C); rozprašovací plyn, dusík (103,4 kPa); kapilární napětí 4,0 kV; teplota odpařovače, 350 ° C; a kuželové napětí 60 V [14].

Natasa P. Kalogiouri, Reza Aalizadeh a Nikolaos S. Thomaidis provedli analýzu fenolických látek, včetně oleokantalu, v EVOO za použití metody mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (LLME). Potřebovali 0,5 g vzorku, ke kterému se přidalo 1,3 mg syringaldehydu a 0,5 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20). Po homogenizaci a odstředění při 13400 ot. /5 min, se horní fáze použila pro následnou analýzu pomocí UHPLC propojenou s hmotnostním spektrometrem QTOF. Byl použit systém s obrácenými fázemi, kolona C18 (2,1 x 100 mm, 2,2  $\mu$ ) s teplotou 30 °C a dávkovalo se 5  $\mu$ l. Využila se gradientová eluce s mobilní fází (A) 90 % vody, 10 % MeOH a 5 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> a (B) 100 % MeOH a 5 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> [74].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité chemikálie



Methanol gradient grade	Sigma-Aldrich, Lyon, Francie
Acetonitril LC-MS Chromaslov	Sigma-Aldrich, Lyon, Francie
Hexan (95 %) pro HPLC	Sigma-Aldrich, Lyon, Francie
Čištěná voda systémem Mili – Q Reference	Milipore SAS, Molsheim, Francie

#### 3.2 Standard


Oleokantal, balení po 5 mg	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Německo
----------------------------	---

#### 3.3 Použité reálné vzorky

Popis vzorku	Ilustrace
Vzorek č. 1 EVLOGIMENO Země původu: Řecko	
Vzorek č. 2 LA ESPAÑOLA Země původu: Španělsko Zakoupeno: Kaufland Pardubice	

<p>Vzorek č. 3  <b>BORGES</b>  Země původu: Evropská směs  Zakoupeno: Tesco Kolín</p>	
<p>Vzorek č. 4  <b>ITALIAMO</b>  Země původu: Itálie  Zakoupeno: Lidl Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 5  <b>MONINI</b>  Země původu: Itálie  Zakoupeno: Tesco Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 6  <b>KAISER FRANZ JOSEF</b>  Země původu: Evropská směs  Zakoupeno: Tesco Pardubice</p>	

<p>Vzorek č. 7  TERRA DELYSSA  Země původu: Tunisko  Zakoupeno: Tesco Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 8  ONDOLIVA  Země původu: Španělsko  Zakoupeno: Tesco Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 9  COLAVITA  Země původu: Itálie</p>	
<p>Vzorek č. 10  ILIADA KALAMATA  Země původu: Řecko  Zakoupeno: Globus Pardubice</p>	

<p>Vzorek č. 11  <b>DEMETRA</b>  Země původu: Řecko  Zakoupeno: Globus Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 12  <b>CABALLERO</b>  Země původu: Evropská směs  Zakoupeno: Globus Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 13  <b>SEVILLE PREIMUM</b>  Země původu: Španělsko  Zakoupeno: BILLA Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 14  <b>BALLESTER</b>  Země původu: Španělsko  Zakoupeno: BILLA Pardubice</p>	

<p>Vzorek č. 15  <b>FILIPPO BERIO</b>  Země původu: Evropská směs  Zakoupeno: BILLA Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 16  <b>TERRA CRETA</b>  Země původu: Řecko  Zakoupeno: Kaufland Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 17  <b>ALNATURA</b>  Země původu: Tunisko  Zakoupeno: Kaufland Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 18  <b>BIO KAUF LAND</b>  Země původu: Španělsko  Zakoupeno: Kaufland Pardubice</p>	

<p>Vzorek č. 19  COSTA D'ORO  Země původu: Itálie  Zakoupeno: Kaufland Pardubice</p>	
<p>Vzorek č. 20  POMACE  Zakoupeno: Globus Pardubice</p>	
<p>Řepkový olej za studena lisovaný  - použitý jako matrice pro standard OCA  Zakoupeno: BIO Energo Komplex Kolín</p>	

**Tabulka 2 Seznam použitých vzorků**

### **3.4 Přístrojové vybavení**

Odstředivka Hettich Universal 320 R

Thermo Fischer Scientific, Waltram,  
MA, USA

Třepačka Heidolph

Fischer Scientific, Pardubice

Koncentrátor vzorku Digital Dry Bathh

Hangzhou Miu Instruments Co., Čína

### **Kapalinový chromatograf s UV/VIS detektorem**

Čerpadlo LC20ADXR s nízkotlakým gradientem	Shimadzu, Kyoto, Japonsko
UV/VIS detektor SPD-20A	Shimadzu, Kyoto, Japonsko
Termostat LCO 102 column oven	Ecom, Praha, ČR
Degasser DGU-20A	Shimadzu, Kyoto, Japonsko
Dávkovací ventil	Ecom, Praha, ČR

### **Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem**

2x Čerpadlo LC20ADXR s vysokotlakým gradientem	Shimadzu, Kyoto, Japonsko
Hmotnostní spektrometr QTRAP 4500	ABSCIEX, Framingham, MA, USA
Termostat LCO 102 single	Ecom, Praha, ČR
Degasser DGU-20A	Shimadzu, Kyoto, Japonsko
Autosampler SIL-20A	Shimadzu, Kyoto, Japonsko
UV/Vis detektor	Shimadzu, Kyoto, Japonsko

### **Kolona**

Agilent poroshell 120 EC-C18 (150 x 3 mm, 2,7 µm)	Supelco, Bellefonte, PA, USA
---	------------------------------

### **Spektrofotometrická analýza**

Spektrofotometr UV-2600	Shimadzu, Kyoto, Japonsko
-------------------------	---------------------------

### **Drobné pomůcky**

Hydrophobic PTFE Syringe Filter (0,22 µm)	Fischer Scientific, Pardubice
Skleněné vialky 2, 4 ml	Fischer Scientific, Pardubice
Centrifugační zkumavka 50 ml	Fischer Scientific, Pardubice
Mikrostríkačka Hamilton 1805	Hamilton, Bonaduz, Švýcarsko
Kyveta 1 ml	Fischer Scientific, Pardubice
Finnpipette 20–200 µl	Fischer Scientific, Pardubice
BioHIT 500–5000 µl	Fischer Scientific, Pardubice

## **3.5 Pracovní postup**

### **3.5.1 Příprava standardu oleokantalu**

Standard oleokantalu byl dodán ve formě přibližně 5 mg navážek ve 2 ml vialkách. Protože oleokantal je velice viskózní kapalina, bylo nutné nejdříve zajistit jeho kvantitativní převedení do přesně daného objemu rozpouštědla. Proto byla každá vialka s oleokantalem 5x vypláchnuta 1 ml acetonitrilu do 10 ml odměrné baňky, a nakonec byla odměrná baňka s oleokantalem doplněna čistým acetonitrem po rysku. Takto byl připraven základní standardní roztok oleokantalu s koncentrací maximálně se blížíci 5 mg/10 ml (přesná koncentrace závisela na konkrétní navážce zakoupeného standardu oleokantalu). Odměrná baňka s oleokantalem byla do jeho spotřebování skladována v temnu při 4 °C.

### **3.5.2 Extrakce oleokantalu ve vzorku oleje**

5 g extra panenského olivového oleje bylo naváženo do 50 ml centrifugační zkumavky. Olej byl naředěn 10 ml hexanu a dále bylo přidáno 25 ml extrakčního rozpouštědla (metanol, acetonitril). Tato směs byla 15 minut míchána na třepačce. Po promíchání byla centrifugační zkumavka vložena do odstředivky a probíhalo odstředování fází při 4000 otáčkách po dobu 5 minut. Po tomto kroku se odpipetovalo 25 ml rozpouštědlové fáze obsahující polyfenolické sloučeniny do nové centrifugační zkumavky a tento extrakt byl odpařen pod proudem dusíku při 35 °C do sucha. V dalším čistícím kroku byl odparek naředěn 10 ml hexanu a bylo přidáno 5 ml extrakčního (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1, ACN) a směs se nechala promíchávat 15 minut na třepačce. Dále byla směs odstředěna při stejných podmínkách jako v prvním kroku a spodní vodně-organická vrstva byla přenesena do 4 ml vialky. Pro analýzu kapalinovou chromatografií byl tento extrakt před samotnou analýzou přefiltrován přes stříkačkový filtr s velikostí póru 0,22 μm.

Tento postup byl využit pro všechny vzorky.

### **3.5.3 Příprava kalibračních vzorků**

#### **3.5.3.1 Kalibrace s využitím kalibrační přímky**

Vypočtený objem standardu oleokantalu o koncentraci 5 mg/10 ml byl přidán k 5 g řepkového oleje. Směs byla zhomogenizována a zpracována podle kapitoly 3.5.2.

### 3.5.3.2 Kalibrace s využitím standardního přídatku

Při tomto postupu byl nejdříve zanalyzován vzorek upravený postupem podle kapitoly 3.5.2. Další měření bylo provedeno s vhodně zvolenou velikostí standardního přídatku zásobního roztoku oleokantalu o koncentraci 5 mg/10 ml tak, aby předpokládaný daný poměr odezvy oleokantalu v původním vzorku a vzorku se standardním přídatkem byl dostatečně zřetelný. (1:1,5 až 1:3)

### 3.5.4 Podmínky měření LC-UV

K separaci byla použita kolona C18 (150 × 3 mm, 2,7 μm). Průtok mobilní fáze byl 0,5ml/min, teplota kolony 40 °C, dávkované množství 10 μl. Chromatogram byl zaznamenáván UV detektorem s nastavenou vlnovou délkou 275 nm. Při optimalizaci separace byly postupně vyzkoušeny jak isokratická, tak i gradientová eluce. Jako optimální podmínky separace byl vybrán gradient koncentrace acetonitrilu ve vodě uvedený v tabulce 3.

	A (voda, %)	B (ACN, %)
<b>0 minut</b>	73	27
<b>10 minut</b>	50	50
<b>11 minut</b>	73	27

Tabulka 3 Gradient analýzy

### 3.5.5 Podmínky měření LC-MS

K analýze LC-MS byla použita stejná kolona C18 (150 × 3 mm, 2,7 μm), teplota kolony 40 °C a dávkovaly se pouze 2 μl. Průtok byl 0,5 μl/min.

Pro analýzu ESI<sup>+</sup> se pracovalo za podmínek: curtain gas: 20, colision gas: medium, ion spray voltage: + 4500 V, teplota: + 450 °C, ion source gas 1: 40, ion source gas 2: 50, entrance potential: + 10 V, deklasterační potenciál: + 90 V.

Při ESI<sup>-</sup> analýze byly použity podmínky: curtain gas: 20, colision gas: medium, ion spray voltage: - 4500 V, teplota: - 450 °C, ion source gas 1: 40, ion source gas 2: 50, entrance potential: - 10 V, deklasterační potenciál: - 90 V.

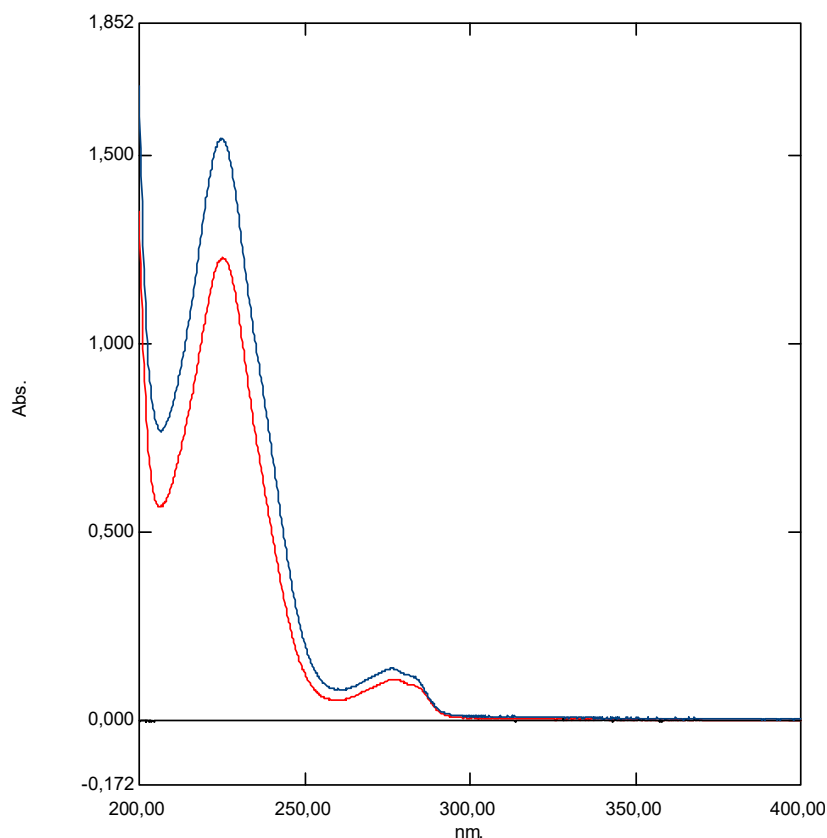
### **3.5.6 Vyhodnocení dat**

Chromatogramy byly zaznamenány a zpracovány programem Clarity Light (DataApex, Praha) a výsledky pomocí tabulkového editoru Excel. Ke statistickému hodnocení výsledků byl použit program QC. Expetr 2.9 (TriloByte, Pardubice)

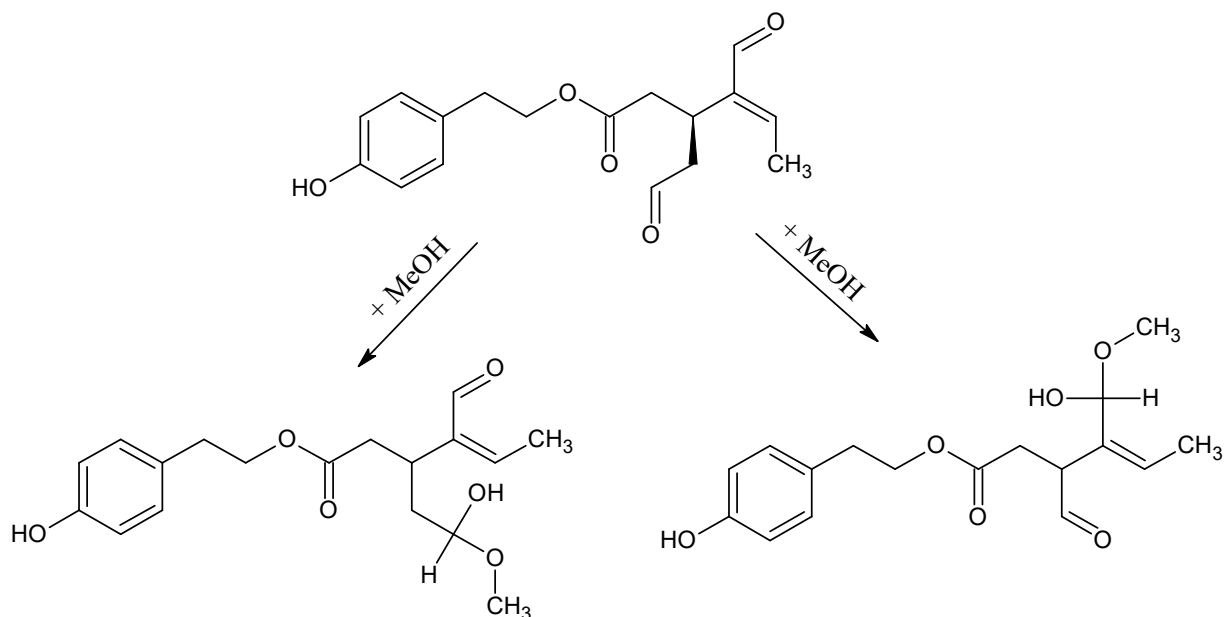
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace podmínek separace

Kapalinová chromatografie byla pro tuto metodu zvolena na základě mnoha úspěšných analýz již popsaných v literatuře, viz. kapitola 2.14.1. Pro detekci byl použit UV detektor pracující při vlnové délce 275 nm. Tato vlnová délka byla vybrána na základě změřených UV spekter (obrázek 11) oleokantalu ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), resp. ACN/H<sub>2</sub>O (1:1) a shoduje se s vlnovou délkou doporučovanou i jinými autory. Ačkoliv absorpce při této vlnové délce je relativně nízká ve srovnání s vlnovou délkou okolo 220 nm, byla tato délka zvolena na základě nižších interferencí vyskytujících se při analýze reálných vzorků. V některých literárních zdrojích je popsána tvorba hemiacetalů oleokantalu v přítomnosti metanolu, resp. směsi metanolu s vodou jako rozpouštědla [34]. Schéma vzniku těchto hemiacetalů je znázorněno na obrázku 12. Z toho důvodu byla změřena spektra oleokantalu jak v acetonitrilu s vodou, tak v metanolu s vodou, avšak jak vyplývá z obrázku 11, tvar spekter je totožný.



Obrázek 11 UV spektrum oleokantalu změřené v různých rozpouštědlech MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, modrá čára), ACN/H<sub>2</sub>O (1:1, červená čára)



Obrázek 12 Schéma vzniku hemiacetalů oleokantalu

Separace extraktů byly prováděny v systému s obrácenými fázemi s použitím kolony C18 (150 × 3 mm, 2,7 μm) s mobilní fází acetonitril – voda. Další podmínky analýzy jsou uvedeny v experimentální části v kapitole 3.5.4.

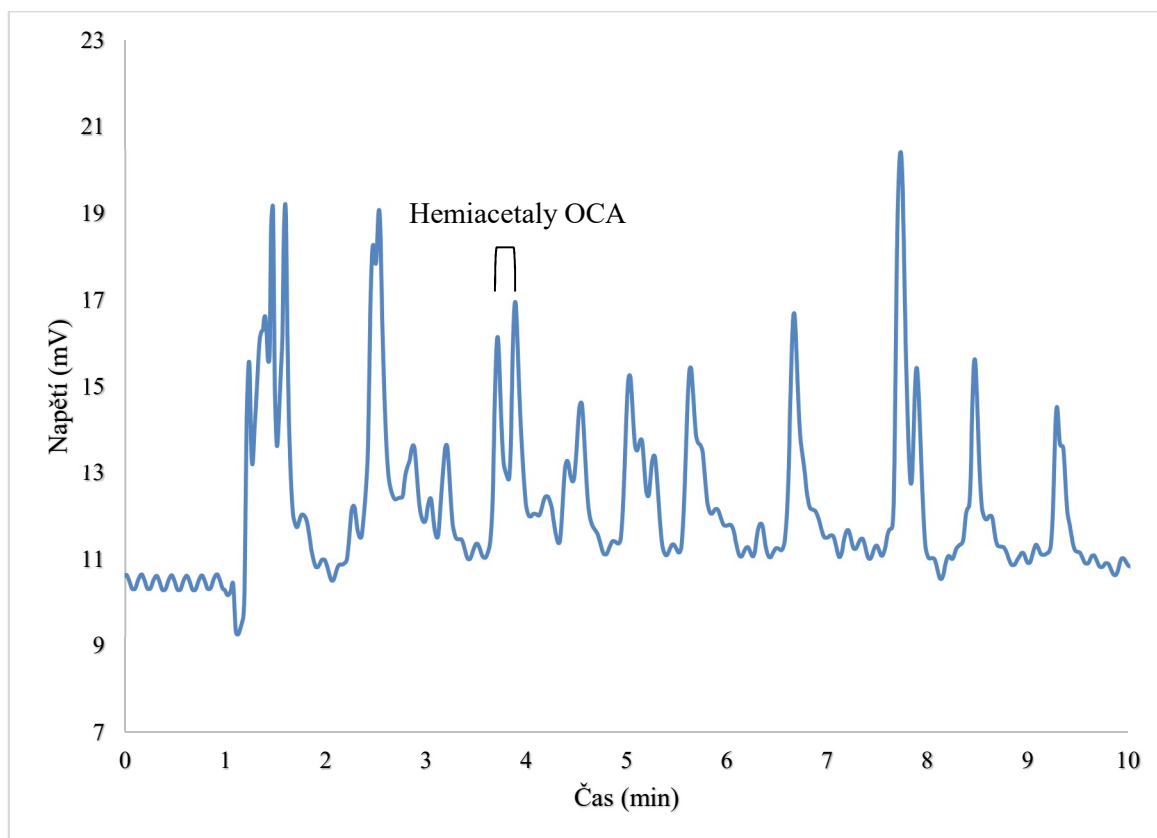
## 4.2 Optimalizace elučních podmínek

Vedle oleokantalu obsahuje olivový olej i další antioxidanty a jiné látky, které se koextrahují spolu s oleokantalem. Bylo proto zapotřebí vybrat správné složení mobilní fáze vhodné pro kvalitativní a kvantitativní analýzu oleokantalu v oleji. Vzhledem ke složitosti matrice byl k optimalizaci separačních podmínek použit extrakt z jednoho ze vzorků EVOO (Vzorek č. 1). Tímto postupem byly eliminovány možné potíže při analýzách reálného vzorku, které by se mohly vyskytnout, pokud by byl k optimalizaci separace použit pouze roztok standardu oleokantalu v příslušném rozpouštědle (metanol, acetonitril).

### 4.2.1 Gradientová eluce s využitím izokratického kroku

Na základě literárních pramenů byla pro počáteční experimenty použita eluce s využitím krátkého isokratického kroku na začátku a následným lineárním gradientem. Jako první byla vyzkoušena separace, kdy v 0. minutě se začínalo na 30 % ACN, následoval isokratický krok do 2. minuty a dále lineární gradient do 60 % ve 12. minutě s následným vymytím nečistot z kolony strmým zvýšením koncentrace ACN a finálním návratem na

počáteční podmínky. Ukázka separace je na obrázku 13. Protože nebylo dosaženo potřebné kvality separace, byly zkoušeny další gradienty s různou délkou a složením počátečního izokratického kroku, stejně tak jako s různou délkou a strmostí následného gradientového kroku, avšak žádný z uvedených postupů nevedl k vyhovující separaci oleokantalu, resp. jeho hemiacetalů, v extraktu EVOO. Přehled testovaných gradientů je uveden v příloze v tabulce 7. Další dva příklady separací jsou uvedeny v příloze na obr. 26 a 27.



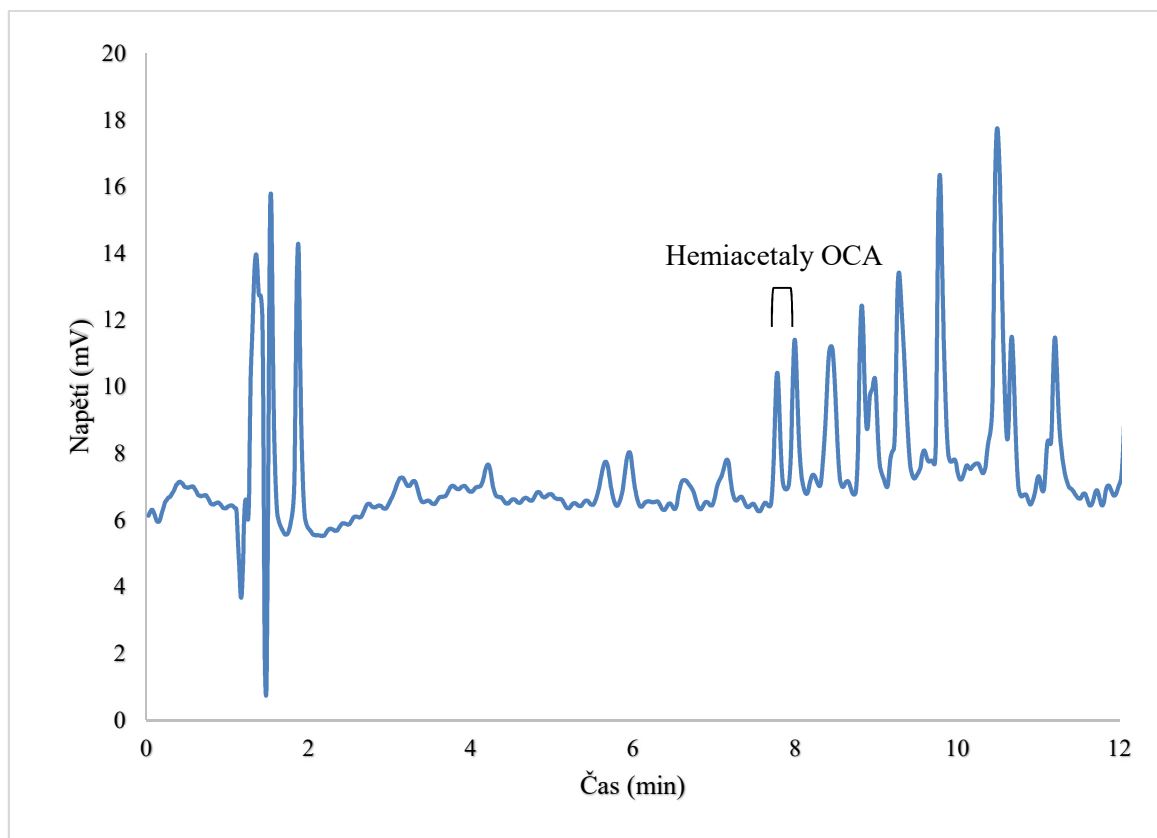
**Obrázek 13 kolona: Gradientová eluce s izokratickým krokem; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut, teplota: 40 °C, detekce: UV**

#### 4.2.2 Gradientová eluce bez izokratického kroku

Protože experimenty s využitím izokratického kroku během eluce nepřinesly dostačující výsledky, byl v následujících experimentech krok s lineární částí eluce vynechán. Tímto způsobem bylo zkoušeno celkem 10 různých gradientů, přičemž nejlepších podmínek pro separaci bylo dosaženo s gradientem s počátečním složením 27 % ACN ve vodě s lineárním nárůstem na 50 % ACN ve vodě v 10 minutě a s rychlým návratem na počáteční podmínky. Tyto optimalizované podmínky separace byly dále aplikovány při všech analýzách extraktů olejů. Bylo zjištěno, že se žádné látky po průběhu chromatogramem nezadržují na

koloně, tudíž nebylo nutné použít čistící krok s rychlým, resp. skokovým nárůstem koncentrace ACN pro eluci vysoce zadržovaných látek. Na obrázku 14 je uvedena nesprávně zvolená eluce č. 17 (tabulka 7), další dva nedostačující gradienty jsou uvedené jako příklad v přílohách (obrázky 23 a 24).

Za těchto optimalizovaných podmínek se provedla analýza oleokantalu v extraktech devatenácti vzorků EVOO a jednoho olivového oleje z pokrutin.



**Obrázek 14** Gradientová eluce bez izokratického kroku; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut, teplota: 40 °C, detekce: UV

### 4.3 Optimalizace extrakce oleokantalu

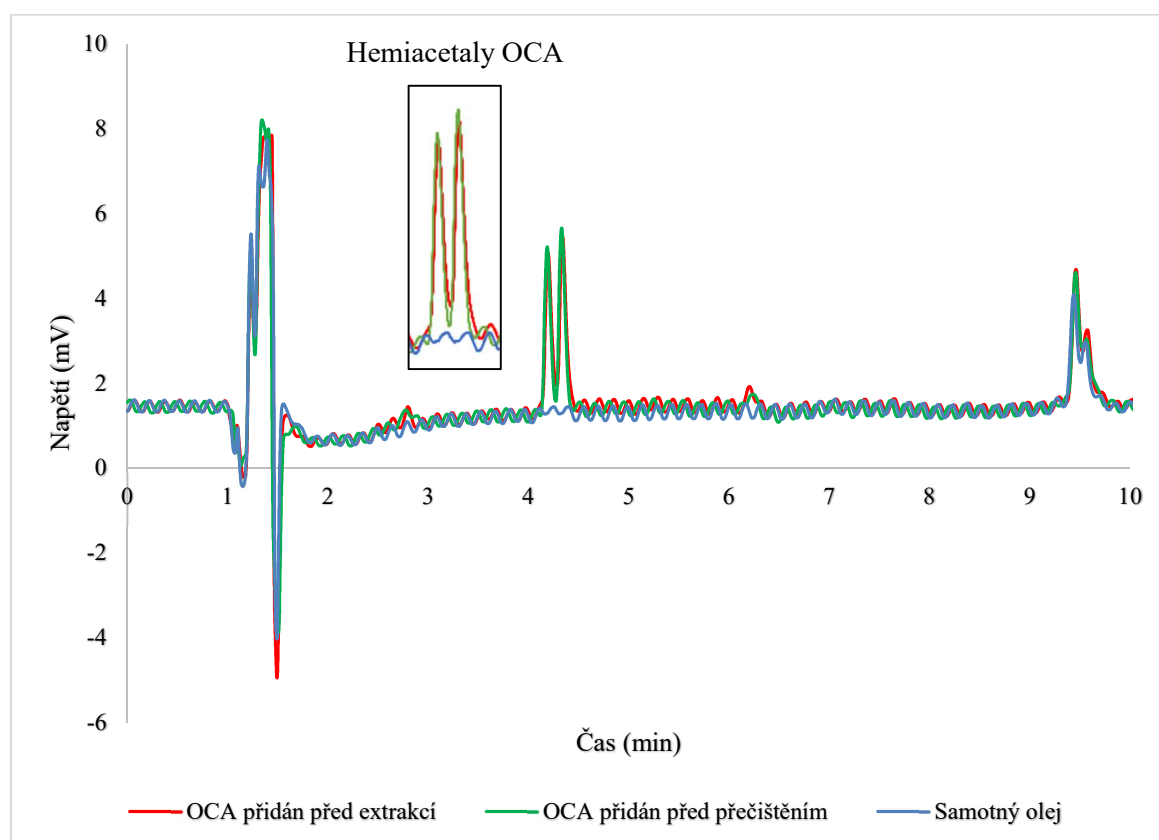
K úspěšnému stanovení oleokantalu v olivovém oleji je nutné vedle optimalizace separačních podmínek věnovat také náležitou péči nalezení vhodných podmínek zpracování olivového oleje pomocí extrakce.

V literatuře bylo popsáno více způsobů extrakce oleokantalu z olivového oleje [26,27,32,34]. V této diplomové práci byl zvolen postup extrakce uvedený v kapitole 3.5.2 s využitím dvoustupňového extrakčního kroku, kdy odparek po první extrakci acetonitrilem byl následně

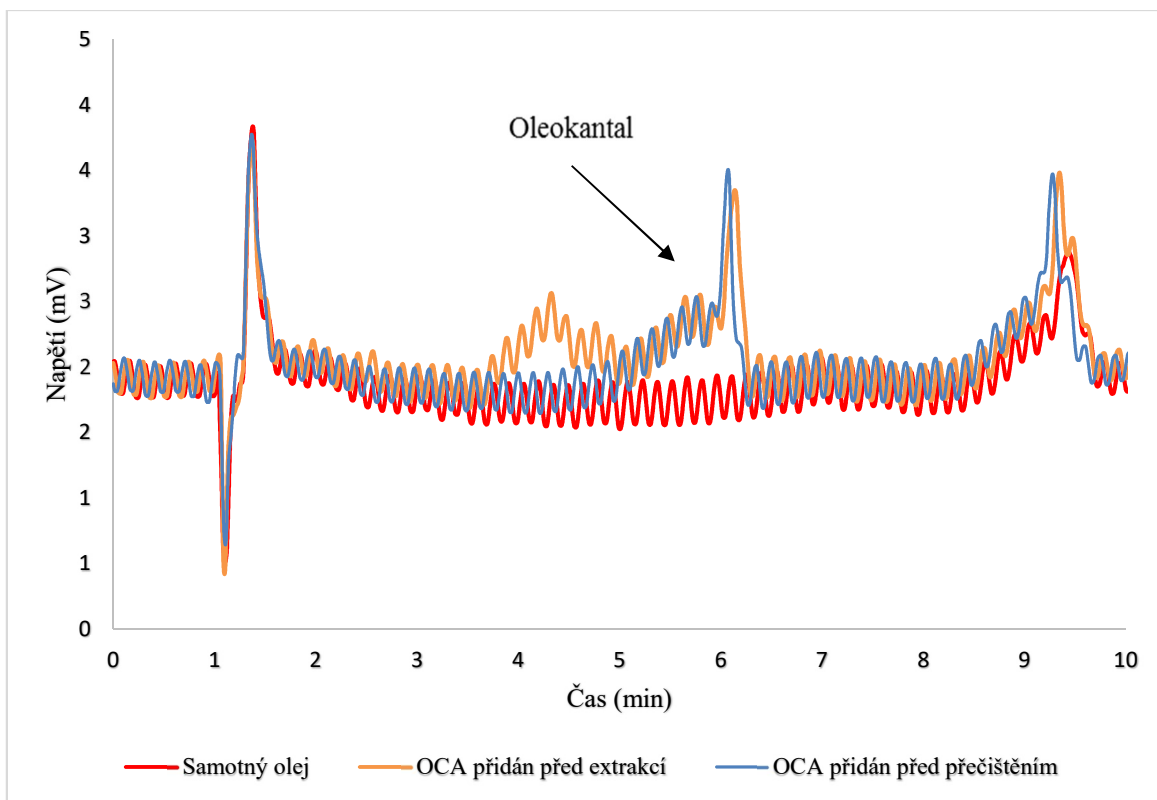
rozpuštěn v hexanu a extrahován acetonitrem nebo směsí MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1). V tomto druhém kroku se projevil vliv metanolu jako použitého extrakčního činidla na tvorbu hemiacetalů oleokantalu. Tento jev byl popsán již dříve některými autory [34], podle jiných autorů je vznik hemiacetalů na nízké úrovni [73].

Záznam analýzy extraktů z 5 g řepkového oleje (tuková matrice) s přidavkem 300  $\mu$ l standardu s využitím acetonitrilu, resp. směsí MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) v druhém stupni extrakce je uveden na obrázcích 15 a 16. Z těchto obrázků je patrný vliv metanolu na tvorbu hemiacetalů oleokantalu v druhém kroku extrakce, kdy je potlačen pík odpovídající samotnému oleokantalu (r.t. okolo 6,2 min) ve prospěch píků odpovídajících hemiacetalu oleokantalu (dvojice píků okolo r.t. 4,3 min, na obrázek 15).

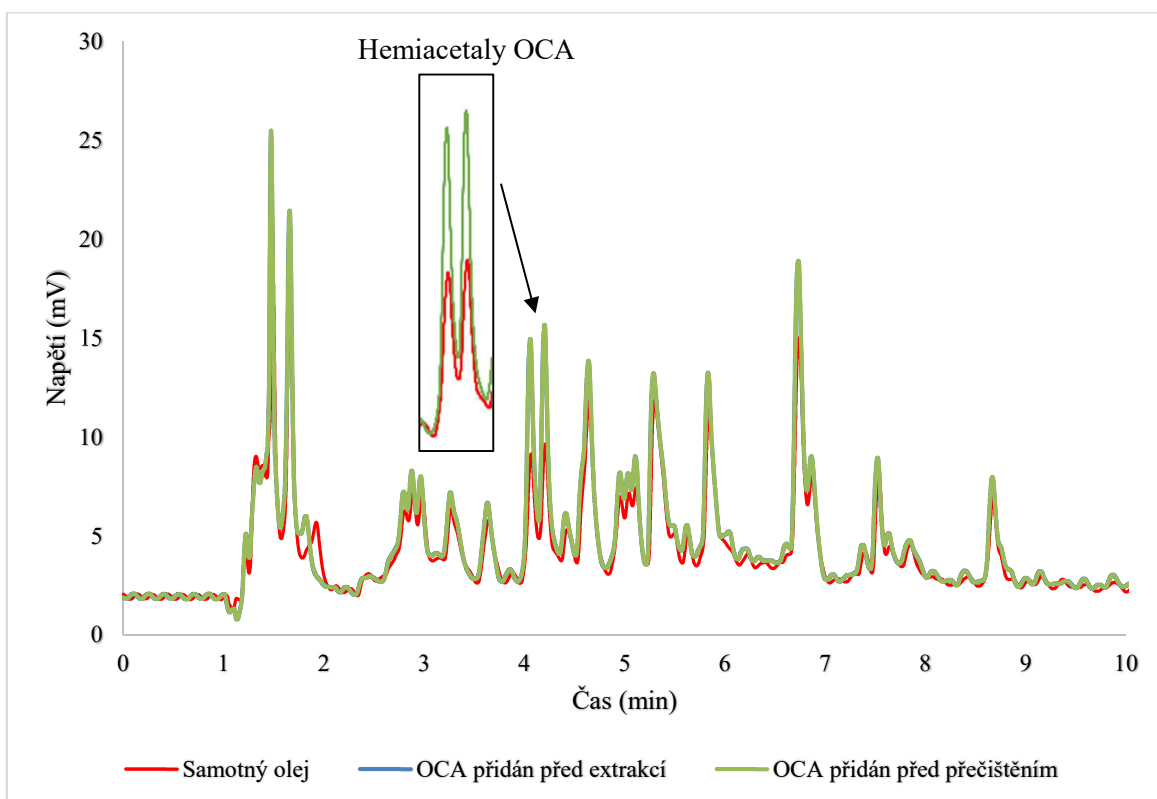
Stejný postup, tedy využití acetonitrilu a směsí MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) jako rozpouštědla v druhém extrakčním kroku a přidavek 300  $\mu$ l, byl použit i pro analýzu EVOO. Na obrázcích 17 a 18 je opět vidět vliv metanolu na tvorbu hemiacetalů oleokantalu, které vznikají v druhém stupni extrakce. Při použití acetonitrilu jako rozpouštědla dojde k určité deformaci píků a na záznamu (obrázek 18) je vidět neúplná separace oleokantalu.



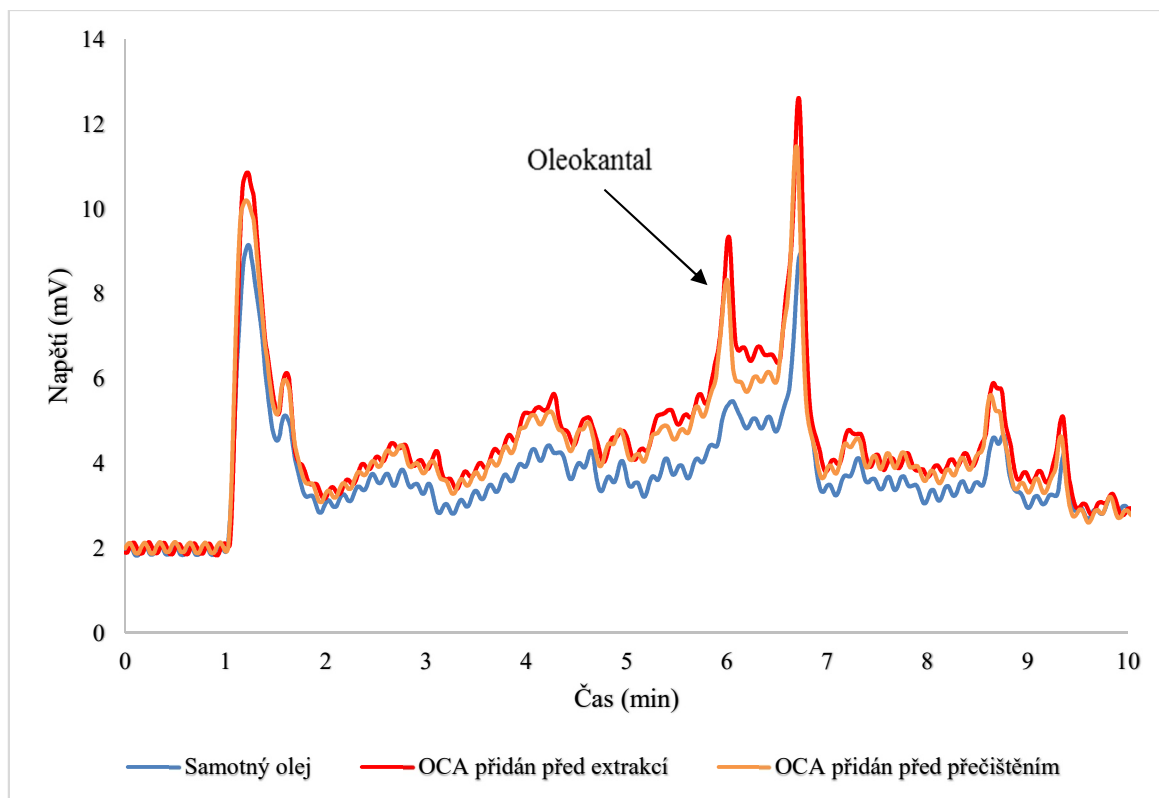
**Obrázek 15** Extrakce řepkového oleje s přidáním oleokantalu pomocí MeOH/ H<sub>2</sub>O; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l, F<sub>M</sub>: 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut, teplota: 40 °C, detekce: UV



**Obrazek 16** Extrakce řepkového oleje s přidáním oleokantale pomocí ACN; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7 µm), dávkování = 10 µl,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



**Obrazek 17** Extrakce EVOO s přidáním oleokantale pomocí MeOH/ H<sub>2</sub>O; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7 µm), dávkování = 10 µl,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



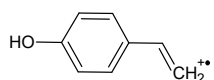
**Obrázek 18** Extrakce EVOO s přidaným oleokantalem pomocí ACN; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV

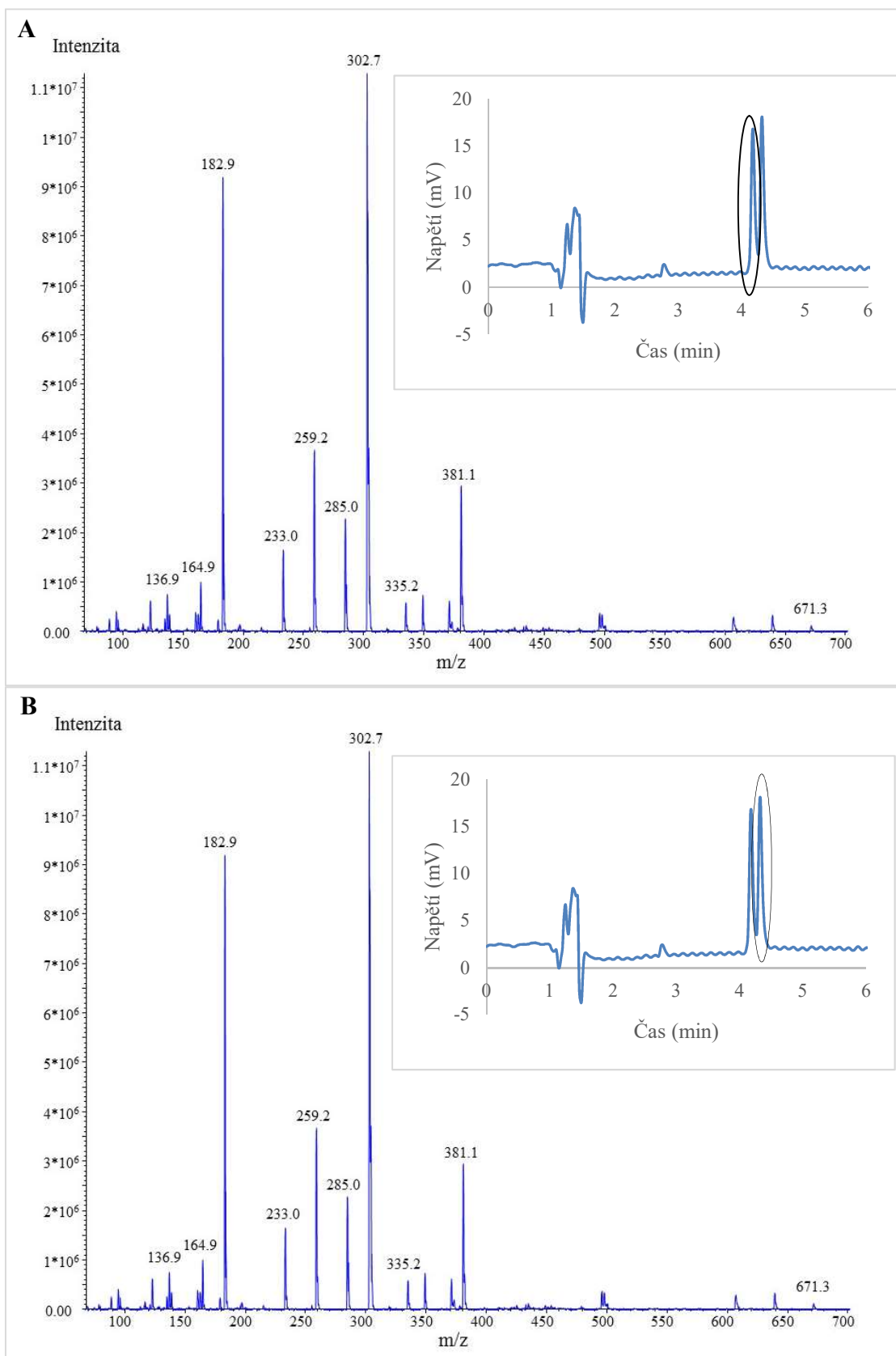
#### 4.4 Identifikace oleokantalu pomocí LC-MS

Pro potvrzení identity píků hemiacetalů oleokantalu, které jsou na záznamu chromatogramu se spektrofotometrickou detekcí v časech 4,2 a 4,35 minut, byla provedena LC-MS analýza zpracovaného vzorku standardu oleokantalu v řepkovém oleji i analýza zpracovaného vzorku EVOO. Pro kapalinovou chromatografii byly v tomto případě použity stejné podmínky jako pro analýzu LC-UV uvedené v kapitole 4.2.2, nastavení parametrů hmotnostního spektrometru je uvedeno v kapitole 3.5.5.

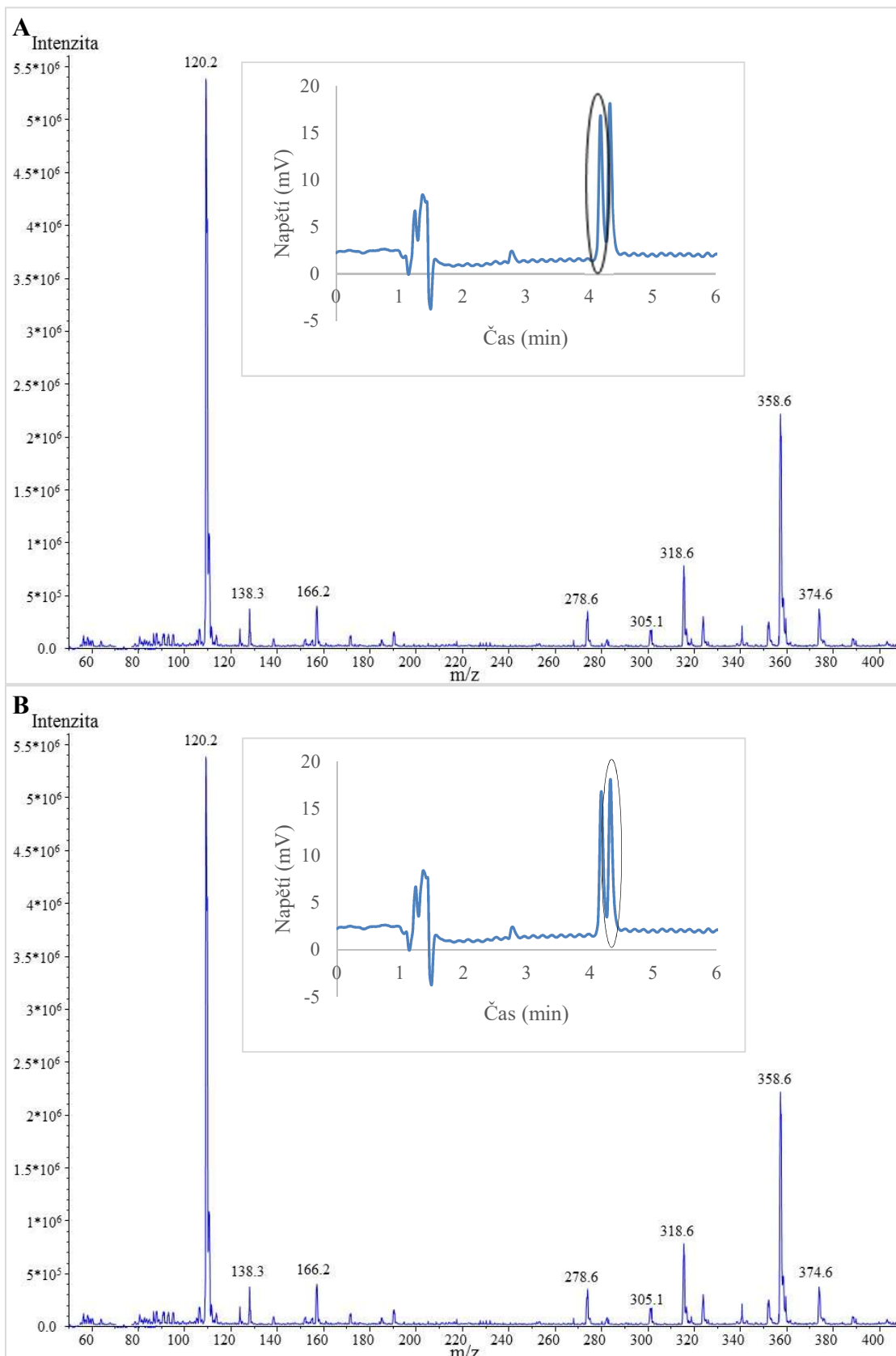
Na ESI-MS spektrech se záznamem záporných iontů (obrázek 19) byl identifikován hemiacetal oleokantalu s molekulovou hmotností  $M = 336$ . V ESI<sup>-</sup> módu byly nalezeny následující ionty:  $m/z = 303$ :  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}]^-$ ,  $m/z = 671$ :  $[2\text{M} - \text{H}]^-$ ,  $m/z = 335$ :  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ,  $m/z = 183$ :  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH} - \text{C}_8\text{H}_8\text{O} - \text{H}]^-$ ,  $m/z = 233$ :  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{-CH=CH-CHO} - \text{H}]^-$ ,  $m/z = 285$ :  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$ ,  $m/z = 259$ :  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CO}_2 - \text{H}]^-$

Na ESI-MS spektrech se záznamem kladných iontů (obrázek 20) byl identifikován hemiacetal oleokantalu s molekulovou hmotností  $M = 336$ . V ESI+ módu byly nalezeny následující ionty:  $m/z = 359$ :  $[M + Na]^+$ ,  $m/z = 375$ :  $[M + K]^+$ ,  $m/z = 695$ :  $[2M + Na]^+$ ,  $m/z = 319$ :

$[M - H_2O + H]^+$ ,  $m/z = 305$ :  $[M - CH_3OH + H]^+$ ,  $m/z = 120$ : 



**Obrázek 19 ESI-MS spektrum píků hemiacetalů oleokantalu**  
píky r. t. 4,2 (A) a r. t. 4,35 (B); záznam záporných iontů; separační podmínky viz. obrázek 15, MS podmínky viz. kapitola 3.5.5



**Obrázek 20** ESI-MS spektrum píků hemiacetalů oleokantalu píkы r. t. 4,2 (A) a r. t. 4,35 (B); záznam kladných iontů; separační podmínky viz. obrázek 15, MS podmínky viz. kapitola 3.5.5

## 4.5 Kvantifikace oleokantalu pomocí LC-UV

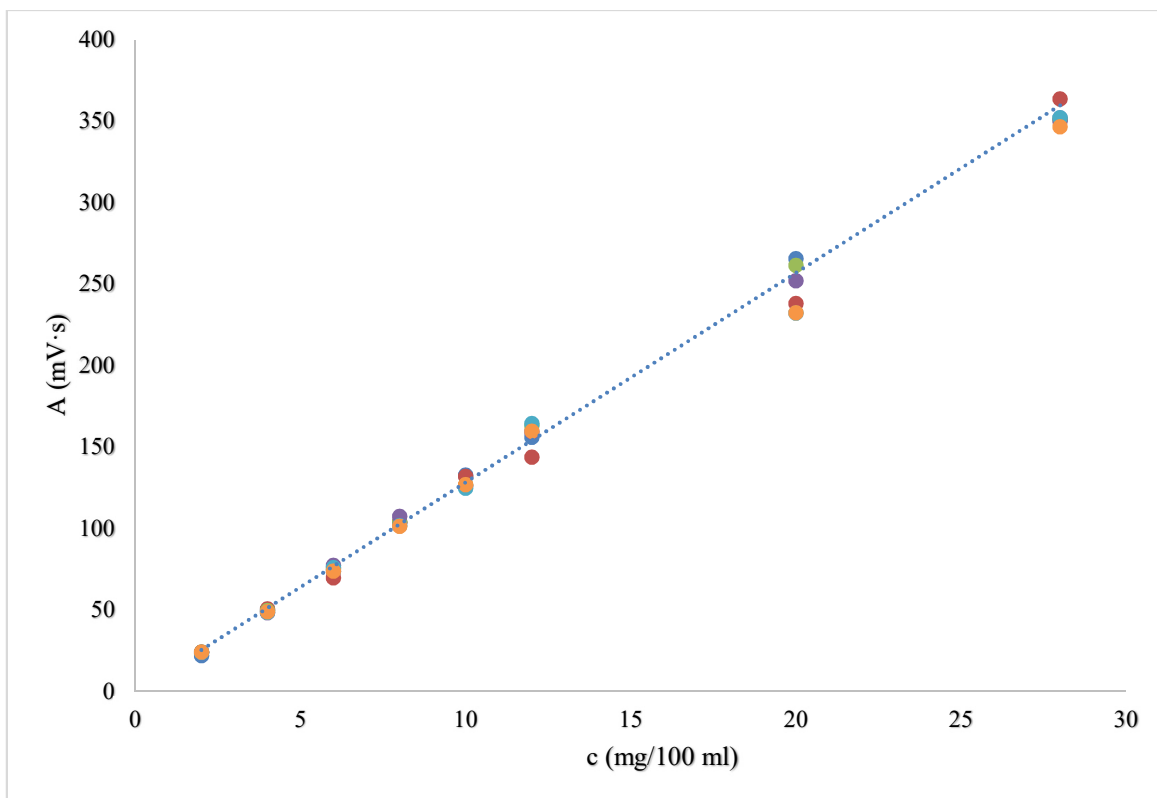
Pro stanovení obsahu oleokantalu v EVOO byla zvolena metoda kalibrační přímky a pro vybrané vzorky byla pro porovnání použita metoda standardního přídatku. Příprava kalibračních roztoků zahrnovala celý postup zpracování vzorku oleje popsáný v experimentální části, čímž se eliminovaly možné chyby a ztráty oleokantalu, které by mohly nastat, pokud by pro kalibraci byl použit pouze kalibrační roztok oleokantalu připravený ve finálním extrakčním rozpouštědle bez předchozích kroků zpracování vzorku. Obdobný postup byl uplatněn i při kvantifikaci metodou standardního přídatku.

### 4.5.1 Tvorba kalibrační přímky

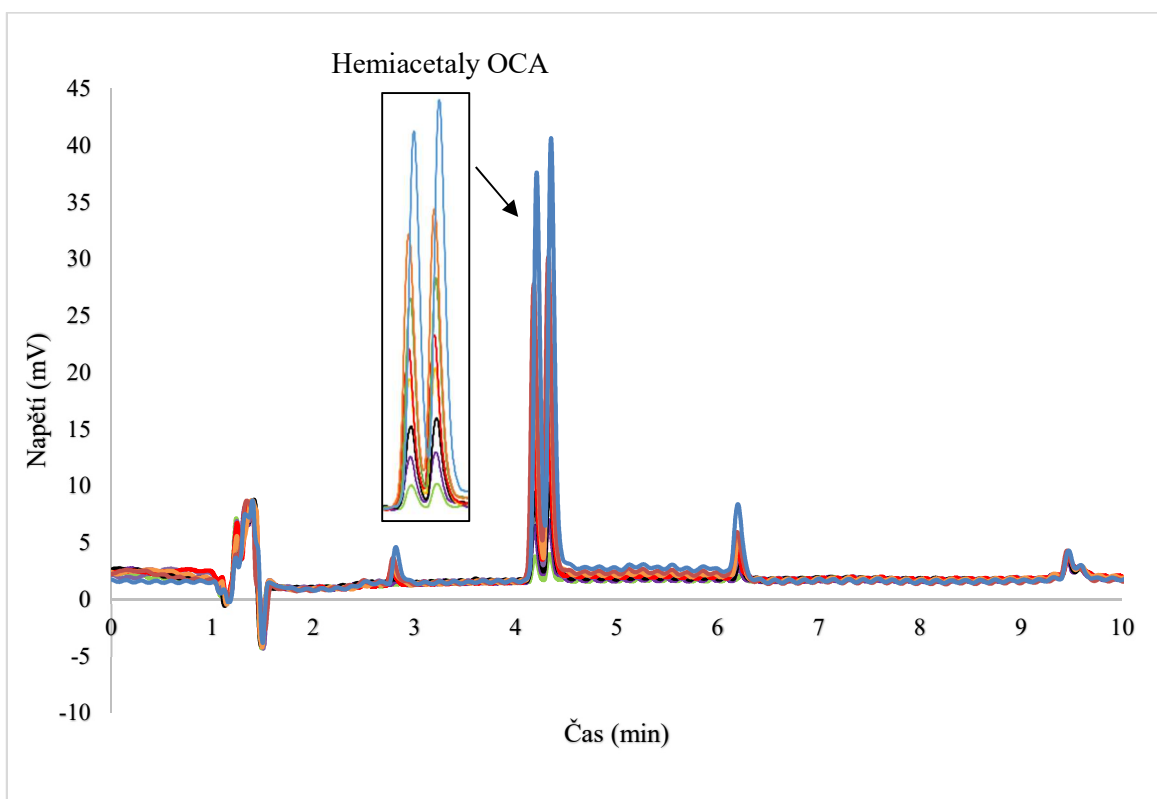
Pro přípravu kalibrační řady byl použit připravený standard oleokantalu o koncentraci 5 mg/ 10 ml ACN. Vypočítané množství standardu oleokantalu (200–2800  $\mu$ l) bylo přidáno k 5 g řepkového oleje jako tukové matrice a tento vzorek byl zpracován podle kapitoly 3.5.2. a analyzován kapalinovou chromatografií za optimalizovaných podmínek uvedených v kapitole 3.5.4. Pro každou kalibrační hladinu byly připraveny a zpracovány dva vzorky a každý byl následně třikrát analyzován. Tímto způsobem byla vytvořena kalibrační řada s koncentracemi 2; 4; 6; 8; 10; 12; 20 a 28 mg/100 g oleje. Do kalibrace byly brány sumy ploch obou hemiacetalů oleokantalu (příloha, tabulka 8). Kalibrační přímka je znázorněna na obrázku 21 a ukázka odpovídajících kalibračních chromatogramů je na obrázku 22. Odpovídající kalibrační data jsou uvedena v tabulce 4. Limit detekce a stanovitelnosti spočítaný na základě velikosti šumu nulové linie byl 0,57, resp. 1,9 mg/100 g oleje. Statistickou analýzou kalibračních dat bylo zjištěno, že hodnota úseku kalibrační závislosti je statisticky nevýznamná. Vypočítaná kalibrační závislost byla použita pro stanovení obsahu oleokantalu ve vzorcích olivového oleje pomocí metody kalibrační přímky.

Parametr	
Směrnice	12,857
Směrodatná odchylka	0,039
Úsek	-0,3278
Směrodatná odchylka	0,450
R <sup>2</sup>	0,9979
Pravděpodobnost	0,11
Statistická významnost úseku – nevýznamný	

Tabulka 4 Regresní parametry kalibrační závislosti oleokantalu



**Obrázek 21** Kalibrační přímka OCA; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



**Obrázek 22** Chromatogram kalibrace; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV

#### 4.5.2 Analýza vzorků

S využitím dříve popsané kalibrační závislosti byly vypočítány obsahy oleokantalu v celkem devatenácti vzorcích extra panenských olivových olejů a jednom oleji z olivových pokrutin. Všechny vzorky byly získány v běžné prodejní síti v ČR, případně zakoupeny v cizině. V analyzovaných vzorcích byly analyzovány čtyři vzorky z Řecka (vzorek č. 1, 10, 11 a 16), čtyři vzorky z Itálie (vzorek č. 4, 5, 9, 19), dva vzorky z Tunisu (vzorek č. 7 a 17), pět vzorků ze Španělska (vzorek č. 2, 8, 13, 14 a 18) a čtyři vzorky smíchané z Evropských zemí (vzorek č. 3, 6, 12 a 15).

Vedle metody stanovení oleokantalu v olejích pomocí kalibrační přímky byla pro srovnání u vybraných vzorků olejů použita i metoda standardního přídatku. Porovnání průměrných výsledků obsahu oleokantalu získaných oběma metodami je uvedeno v tabulce 5. V příloze v tabulce 9 jsou uvedeny detailní výsledky analýz všech tří vzorků EVOO pomocí standardního přídatku. Statistické porovnání významnosti naměřených výsledků získaných oběma metodami je uvedeno v tabulce 5.

	Vzorek č. 1		Vzorek č. 6		Vzorek č. 8	
	Kalibrace	Standardní přídavek	Kalibrace	Standardní přídavek	Kalibrace	Standardní přídavek
	c (mg/100 g)		c (mg/100 g)		c (mg/100 g)	
	3,0	3,3	8,8	10,2	9,4	7,9
	3,1	2,9	8,8	9,1	9,2	7,3
	2,9	2,7	8,6	8,3	9,0	8,3
	2,7	2,4	8,5	8,1	9,7	10,8
	2,8	3,0	8,4	7,3	9,8	10,4
	2,5	2,7	8,5	7,1	9,9	11,3
<b>Průměrná koncentrace</b>	2,8	2,8	8,6	8,4	9,5	9,3
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,2	0,2	0,1	0,9	0,3	1,5
<b>T-statistika</b>	0,004		0,674		0,400	
<b>Kritická hodnota</b>	2,571		2,571		2,571	
<b>Závěr</b>	Rozdíly jsou NEVÝZNAMNÉ		Rozdíly jsou NEVÝZNAMNÉ		Rozdíly jsou NEVÝZNAMNÉ	

Tabulka 5 Statistické porovnání měření kalibrační přímkou a standardního přídatku

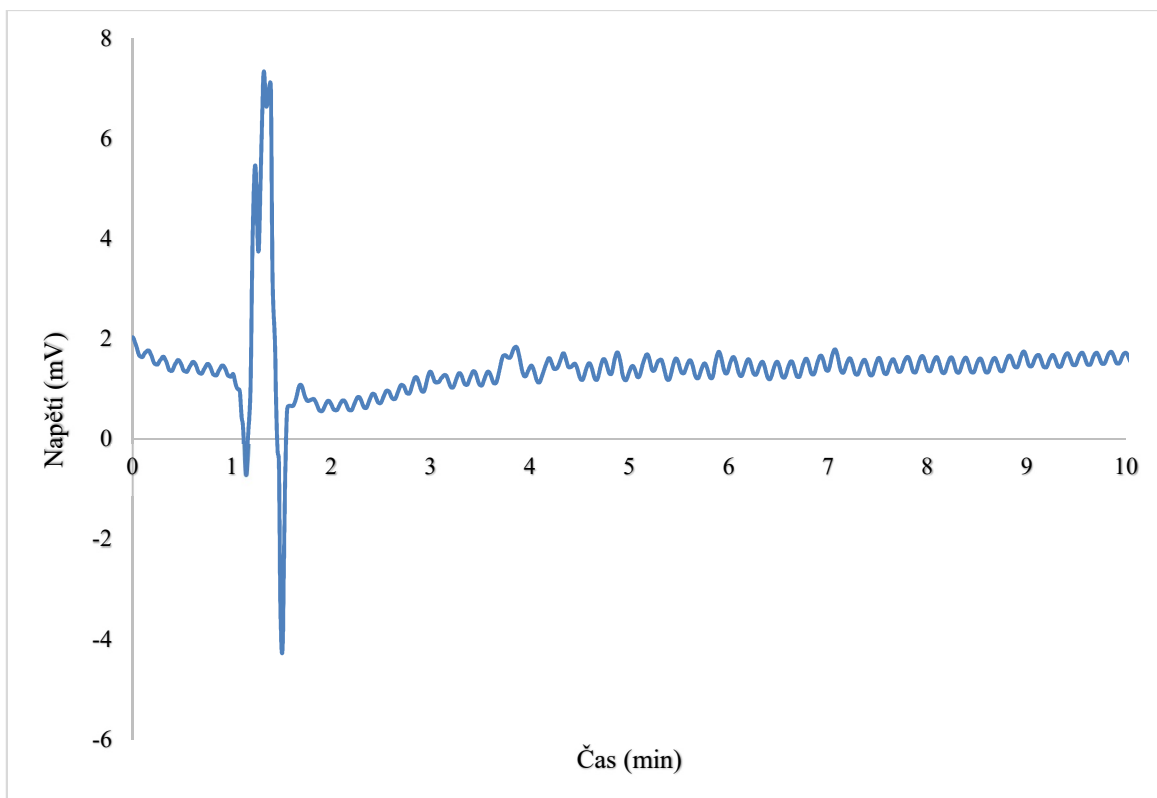
Tunis		Itálie		Řecko		Evropská směs		Španělsko	
Název vzorku	Množství OCA (mg/100 g)	Název vzorku	Množství OCA (mg/100 g)	Název vzorku	Množství OCA (mg/100 g)	Název vzorku	Množství OCA (mg/100 g)	Název vzorku	Množství OCA (mg/100 g)
Vzorek č. 7	4,8 ± 1	Vzorek č. 4	27,2 ± 1,2	Vzorek č. 1	2,8 ± 0,1	Vzorek č. 3	4,1 ± 0,5	Vzorek č. 2	8,5 ± 0,2
Vzorek č. 17	12,1 ± 0,8	Vzorek č. 5	7,2 ± 0,2	Vzorek č. 10	6 ± 0,4	Vzorek č. 6	8,6 ± 0,1	Vzorek č. 8	9,5 ± 0,3
		Vzorek č. 9	9,2 ± 0,3	Vzorek č. 11	6,6 ± 0,3	Vzorek č. 12	3,7 ± 0,1	Vzorek č. 13	6,5 ± 0,1
		Vzorek č. 19	6,8 ± 0,6	Vzorek č. 16	8 ± 0,7	Vzorek č. 15	11,6 ± 1,1	Vzorek č. 14	8,6 ± 0,5
								Vzorek č. 18	15,8 ± 0,7

Tabulka 6 Porovnání množství oleokantalu ve vybraných EVOO

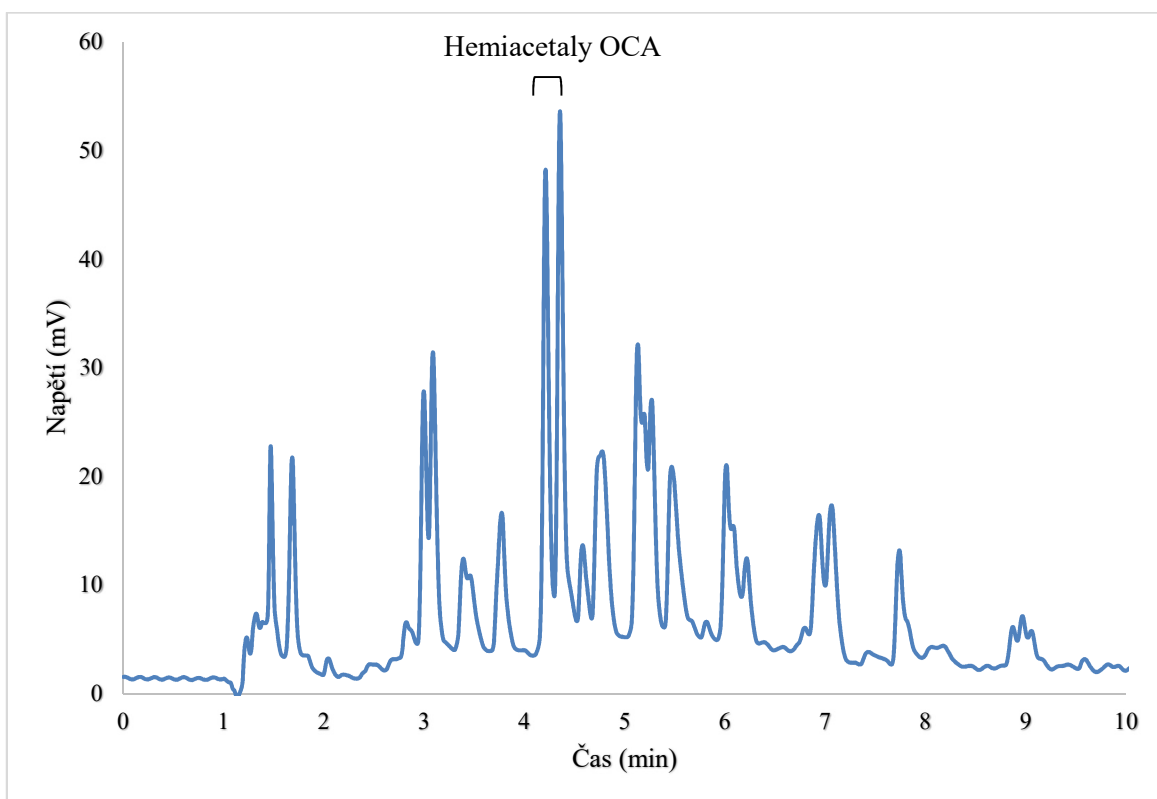
Přehledné výsledky analýz EVOO metodou kalibrační přímky jsou uvedeny v tabulce 6. V této tabulce jsou oleje rozděleny podle jednotlivých zemí původu. Podrobné výsledky ploch hemiacetalů oleokantalu a spočítaných hodnot jejich koncentrací jsou uvedeny v přílohách v tabulkách 10 a 11. Z dostupných informací ovšem nelze zjistit, zdali se jedná o oleje pocházející z jedné lokality, nebo se jedná o směs více olivových olejů pocházejících z dané země. Nejvyšší průměrný obsah oleokantalu byl nalezen v olejích z Itálie (průměr: 12,8 mg/100 g). Absolutně nejvyšší obsah oleokantalu byl ve vzorku č. 4 Italiano (27,2 mg/100 g). Průměrná hodnota obsahu oleokantalu v devatenácti vzorcích byla 8,7 mg/100 g (rozpětí 2,8 - 27,2 mg/100 g). Na základě zjištěných výsledků analýz devatenácti vzorků EVOO nelze učinit jednoznačné závěry o vztahu mezi zemí původu oleje a nalezeným obsahem oleokantalu. Obsah oleokantalu v EVOO může být ovlivněn vedle země původu i mnoha dalšími faktory, jako je například způsob závlahy, stupeň zralosti oliv [22], podnebné podmínky dané lokality, způsob zpracování oliv, dopravy atd. [19-21].

Ukázky analýzy EVOO s nejvyšším (vzorek č. 4) i s nejnižším (vzorek č. 1) obsahem oleokantalu je na obrázcích 24 a 25. Záznamy analýz všech ostatních EVOO jsou uvedeny v příloze na obrázcích 30 až 47.

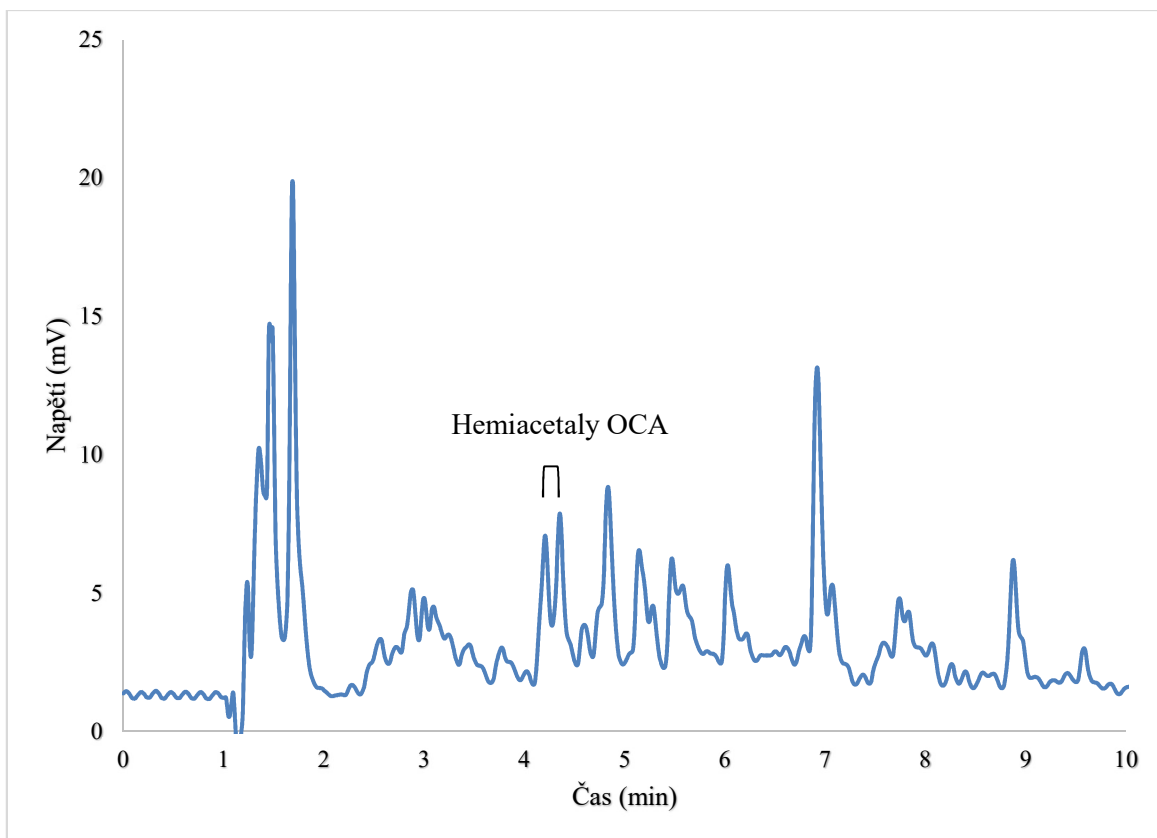
Pro srovnání byl stejným způsobem zpracován a analyzován též vzorek Pomace olivového oleje, který je získáván extrakcí organickým rozpouštědlem z pokrutin po prvním lisování olivového oleje. Protože tento olej nelze zařadit do kategorie extra panenských olivových olejů, není ani uveden v tabulkách s výsledky analýz olivových olejů. K extrakci zbytkového olivového oleje z pokrutin se využívají nepolární organická rozpouštědla (alifatické uhlovodíky), nelze v tomto typu oleje tedy očekávat významný obsah polyfenolických látek včetně oleokantalu z důvodu jejich polárního charakteru. Výsledek analýzy zobrazený na obrázku 23 potvrzuje naprosto zanedbatelné množství vyextrahovaných polyfenolických sloučenin z tohoto oleje, včetně množství oleokantalu nacházejícího se pod limitem detekce.



**Obrázek 23** Vzorek č. 20 (Pomace); kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



**Obrázek 24** Vzorek č. 4; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



**Obrázek 25** Vzorek č. 1; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV

## 5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat metodu pro stanovení množství oleokantalu v extra panenském olivovém oleji. V současnosti je obsahu oleokantalu v olivovém oleji věnována značná pozornost a samotnému oleokantalu jsou přisuzovány protizánětlivé, antikarcinogenní účinky a byl popsán jeho pozitivní vliv na Alzheimerovu chorobu.

Na základě literárních údajů byla navržena metoda využívající dvojnásobnou extrakci hexanem naředěného olivového oleje do acetonitrilu v prvním stupni, resp. směsi MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) ve druhém stupni extrakce s následnou analýzou pomocí kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Ve shodě s některými literárními prameny bylo potvrzeno, že v přítomnosti metanolu tvoří karbonylové skupiny oleokantalu ochotně hemiacetaly. Toto bylo potvrzeno porovnáním extrakčního postupu pouze s acetonitrem a extrakčního postupu s využitím směsi MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) ve druhém kroku extrakce. Identita hemiacetalů oleokantalu (polohové izomery) na obou karbonylových skupinách byla potvrzena pomocí LC-MS analýz standardu i jednoho ze vzorků. Vypracovaná metoda analýzy s využitím kalibrační přímky byla aplikována pro analýzu celkem devatenácti vzorků EVOO zakoupených v běžné komerční síti v ČR i v cizině. Nejvyšší zjištěný obsah oleokantalu byl zjištěn ve vzorku Italianno, a to 27,2 mg/100 g, nejnižší obsah byl nalezen v oleji Evlogimeno pocházející z Řecka. Protože počet vzorků z každé země není příliš vysoký, nelze tedy učinit jednoznačné závěry o vlivu země původu na obsah oleokantalu. Obsah oleokantalu v EVOO je pouze jedním z faktorů pro posouzení jeho kvality, vedle oleokantalu EVOO obsahuje též celou řadu dalších polyfenolických sloučenin s prokázanými antioxidačními účinky. Tímto extrakčním postupem lze vyextrahovat i další polární polyfenolické látky z olivového oleje; jejich identifikace a stanovení nebyla náplní této diplomové práce.

Vedle EVOO byl též zanalyzován vzorek Pomace olivového oleje získaného extrakcí nepolárním organickým rozpouštědlem ze zbytků po lisování EVOO. Podle předpokladu v tomto oleji nebyl zjištěn žádný obsah oleokantalu.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] SCOTECE, M., J. CONDE, V. ABELLA, et al. New drugs from ancient natural foods. Oleocanthal, the natural occurring spicy compound of olive oil: a brief history. *Drug Discovery Today* [online]. 2015, 20(4), 406-410 [cit. 2017-11-4]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135964461400422X>
- [2] BOSKOU, D. Olive Oil. SIMOPOULOS, A.P. a F. VISIOLI, ed. More on Mediterranean Diets [online]. Basel: KARGER, 2006, s. 180-210 [cit. 2017-11-4]. *World Review of Nutrition and Dietetics*. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/97916>
- [3] BOUAZIZ, M., I. FEKI, M. AYADI, H. JEMAI a S. SAYADI. Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2010, 112(8), 894-905 [cit. 2017-11-4]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200900166>
- [4] KECELI, T. a M. H. GORDON. The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2001, 81(14), 1391-1396 [cit. 2017-11-4]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.959>
- [5] SEFC, K. M., M. S. LOPES, D. MENDONÇA, M. R. D. SANTOS, M. L. Da Câmara MACHADO a A. Da Câmara MACHADO. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology*[online]. 2000, 9(8), 1171-1173 [cit. 2017-11-4]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-294x.2000.00954.x>
- [6] <http://www.magazinzahrada.cz/stromy-a-kere/vypestujte-si-olivovnik-je-to-snadne.html> [online]. [cit. 2017-11-4].
- [7] TRIPOLI, E., M. GIAMMANCO, G. TABACCHI, D. DI MAJO, S. GIAMMANCO a M. LA GUARDIA. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews* [online]. 2005, 18(01), 98- [cit. 2017-11-7]. Dostupné z: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0954422405000089](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0954422405000089)

- [8] FERRIGNO, U. a L. PICKFORD. *Oleje: používání olejů z ořechů, semen a plodů na vaření, dressingy a marinády*. Přeložil Sára LEBEDOVÁ. Praha: Dobrovský, 2017. Knihy Omega.
- [9] QOSA, H., Y. S. BATARSEH, M. M. MOHYELDIN, K. A. EL SAYED, J. N. KELLER a A. KADDOUMI. Oleocanthal Enhances Amyloid- $\beta$  Clearance from the Brains of TgSwDI Mice and in Vitro across a Human Blood-Brain Barrier Model. *ACS Chemical Neuroscience* [online]. 2015, 6(11), 1849-1859 [cit. 2017-11-7]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acchemneuro.5b00190>
- [10] BOSKOU, D. *Olive oil: chemistry and technology*. 2nd ed. Champaign, Ill.: AOCS Press, 2006. Thessaloniki, Greece
- [11] BOSKOU, D. *Olive oil: minor constituents and health*. Boca Raton: CRC Press, c2009.
- [12] FROHN, B. *Olivový olej a přírodní léčba: léčení nemocí a mírnění zdravotních potíží silou olivového oleje: receptář zdravé kuchyně*. Olomouc: Fontána, 2002.
- [13] EHRLICH, Y., L. REGEV, Z. KEREM a E. BOARETTO. Radiocarbon Dating of an Olive Tree Cross-Section: New Insights on Growth Patterns and Implications for Age Estimation of Olive Trees. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2017, 8, [cit. 2017-11-29]. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01918/full>
- [14] CICERALE, S., X. A. CONLAN, N. W. BARNETT, A. J. SINCLAIR a R. S. J. KEAST. Influence of Heat on Biological Activity and Concentration of Oleocanthal – a Natural Anti-inflammatory Agent in Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, 57(4), 1326-1330 [cit. 2017-12-1]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf803154w>
- [15] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999.
- [16] CIOFFI, G., M. S. PESCA, P. DE CAPRARIIS, A. BRACA, L. SEVERINO a N. DE TOMMASI. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry* [online]. 2010, 121(1), 105-111 [cit. 2017-12-15]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609014125>

- [17] LUCCHI, P., Javier SAURINA a O. NÚÑEZ. Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2017, 88, 1-24 [cit. 2017-12-15].  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615302053>
- [18] YU, J. a M. AHMEDNA. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2013, 48(2), 221-237 [cit. 2017-12-15].  
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>
- [19] BILUŠIĆ, T., M. ŽANETIĆ, I. LJUBENKOV, I. GENERALIĆ MEKINIĆ, S. ŠTAMBUK, V. BOJOVIĆ, B. SOLDÓ a P. MAGIATIS. Molecular characterization of Dalmatian cultivars and the influence of the olive fruit harvest period on chemical profile, sensory characteristics and oil oxidative stability. *European Food Research and Technology* [online]. 2018, 244(2), 281-289 [cit. 2017-12-15].  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-017-2954-7>
- [20] GOUVINHAS, I., R. DOMÍNGUEZ-PERLES, A. GIRONÉS-VILAPLANA, T. CARVALHO, N. MACHADO a A. BARROS. Kinetics of the Polyphenolic Content and Radical Scavenging Capacity in Olives through On-Tree Ripening. *Journal of Chemistry* [online]. 2017, 2017, 1-11 [cit. 2017-12-18].  
Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2017/5197613/>
- [21] STEFANOUDAKI, E., F. KOTSIFAKI and A. KOUTSAFTAKIS. Sensory and chemical profiles of three European olive varieties (*Olea europea* L); an approach for the characterisation and authentication of the extracted oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. [online]. 2000. 20 (3), 381-389 [cit. 2017-12-18].  
Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1097-0010%28200002%2980%3A3%3C381%3A%3AAID-JSFA535%3E3.0.CO%3B2-4>
- [22] DE TORRES, A., F. ESPÍNOLA, M. MOYA, S. ALCALÁ, A. M. VIDAL a E. CASTRO. Assessment of phenolic compounds in virgin olive oil by response surface methodology with particular focus on flavonoids and lignans. *LWT* [online]. 2018, 90, 22-30 [cit. 2017-12-18]. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643817308824>

- [23] PARNES B. R. “Antioxidants: What You Need to Know” 26 November 2002. [online]. [cit. 2017-12-18]. Dostupné z: <http://health.howstuffworks.com/wellness/food-nutrition/facts/antioxidant.htm>
- [24] <https://en.wikipedia.org/wiki/Oleocanthal> [online]. [cit. 2017-12-18].
- [25] <https://newatlas.com/olive-oil-ingredient-cancer-cell-death/36180> [online]. [cit. 2017-12-18].
- [26] MELLIU, E., P. MAGIATIS a K. B. KILLDAY. A New Ultra Rapid Screening Method for Olive Oil Health Claim Evaluation Using Selective Pulse NMR Spectroscopy. CAPOZZI, Francesco, Luca LAGHI a Peter S BELTON, ed. *Magnetic Resonance in Food Science* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015, s. 84-92 [cit. 2017-12-18]. Special Publications. Dostupné z: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781782622741-00084>
- [27] DI DONNA, L., H. BENABDELKAMEL, F. MAZZOTTI, A. NAPOLI, M. NARDI a G. SINDONA. High-Throughput Assay of Oleopentanedialdehydes in Extra Virgin Olive Oil by the UHPLC–ESI-MS/MS and Isotope Dilution Methods. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, 83(6), 1990-1995 [cit. 2017-12-18]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac200152r>
- [28] ADHAMI, H-R., M. ZEHL, Ch. DANGL, et al. Preparative isolation of oleocanthal, tyrosol, and hydroxytyrosol from olive oil by HPLC. *Food Chemistry* [online]. 2015, 170, 154-159 [cit. 2017-12-19]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461401303X>
- [29] MELLIU, E., J. A. ZWEIGENBAUM a A. E. MITCHELL. Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography Triple-Quadrupole Tandem Mass Spectrometry Quantitation of Polyphenols and Secoiridoids in California-Style Black Ripe Olives and Dry Salt-Cured Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015, 63(9), 2400-2405 [cit. 2017-12-19]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf506367e>

- [30] RUIZ-ARACAMA, A., E. GOICOECHEA a M. D. GUILLÉN. Direct study of minor extra-virgin olive oil components without any sample modification. <sup>1</sup> H NMR multisuppression experiment: A powerful tool. *Food Chemistry* [online]. 2017, 228, 301-314 [cit. 2017-12-19]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617301978>
- [31] TASIOULA-MARGARI, M. a E. TSABOLATIDOU. Extraction, Separation, and Identification of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants* [online]. 2015, 4(3), 548-562 [cit. 2017-12-19]. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2076-3921/4/3/548>
- [32] FOGLI, S., Ch. ARENA, S. CARPI, et al. Cytotoxic Activity of Oleocanthal Isolated from Virgin Olive Oil on Human Melanoma Cells. *Nutrition and Cancer* [online]. 2016, 68(5), 873-877 [cit. 2017-12-19]. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01635581.2016.1180407>
- [33] KAMAL-ELDIN, A. a R. MOREAU. *Gourmet and health-promoting specialty oils*. Urbana, IL: AOCS Press [online]. c2009. [cit. 2018-01-20]. ISBN 9781893997974. Dostupné z: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103240233>
- [34] IMPELLIZZERI, J. aj. LIN. A Simple High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Throat-Burning Oleocanthal with Probed Antiinflammatory Activity in Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, 54(9), 3204-3208 [cit. 2018-01-20]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf052870b>
- [35] FIŠAR, Z. *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie. 2.*, přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2009. Psyché (Grada).
- [36] KOUKOLÍK, F. a R. JIRÁK. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada, 1998.
- [37] HÖSCHL C., J. LIBIGER a J. ŠVESTKA. *Psychiatrie. 2.*, dopl. a opr. vyd. Praha: Tigis, 2004.
- [38] KEHOE, P. G., S. MINERS a S. LOVE. Angiotensins in Alzheimer's disease – friend or foe?. *Trends in Neurosciences* [online]. 2009, 32(12), 619-628 [cit. 2018-01-20]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223609001398>

- [39] PITT, J., W. ROTH, P. LACOR, et al. Alzheimer's-associated A $\beta$  oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2009, 240(2), 189-197 [cit. 2018-01-20]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X09002968>
- [40] DACCACHE, A., C. LION, N. SIBILLE, M. GERARD, Ch. SLOMIANNY, G. LIPPENS a P. COTELLE. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry International* [online]. 2011, 58(6), 700-707 [cit. 2018-01-20]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018611000702>
- [41] KIRITSAKIS, K., E. MELLIU, P. MAGIATIS a D. GERASOPOULOS. Enhancement of Bioactive Phenols and Quality Values of Olive Oil by Recycling Olive Mill Waste Water. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2017, 94(8), 1077-1085 [cit. 2018-01-20]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-017-3011-1>
- [42] ROMERO, C., E. MEDINA, J. VARGAS, M. BRENES a A. DE CASTRO. In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, 55(3), 680-686 [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0630217>
- [43] HUMBERT, L., G. HOIZEY a M. LHERMITTE. Drugs Involved in Drug-Facilitated Crimes (DFC). *Toxicological Aspects of Drug-Facilitated Crimes* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 159-180 [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124167483000074>
- [44] CAMEL, V. Extraction techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2002, 372(1), 39-40 [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-001-1157-y>
- [45] JAWAID, S., F. N. TALPUR, S. M. NIZAMANI, A. A. KHASKHELI a H. I. AFRIDI. Multipesticide residue levels in UHT and raw milk samples by GC- $\mu$ ECD after QuEChER extraction method. *Environmental Monitoring and Assessment* [online]. 2016, 188(4), [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10661-016-5222-6>

- [46] WILKOWSKA, A. a M. BIZIUK. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry* [online]. 2011, 125(3), 803-812 [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610012185>
- [47] DIAZ, M.S. a E.A. BRIGNOLE. Modeling and optimization of supercritical fluid processes. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2009, 47(3), 611-618 [cit. 2018-01-25]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844608003069>
- [48] DA SILVA, R., T. A.P. ROCHA-SANTOS a A. C. DUARTE. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, 76, 40-51 [cit. 2018-01-25]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615300625>
- [49] <http://fyzikalnipokusy.cz/1689/kriticky-stav-oxidu-uhliciteho> [online]. [cit. 2018-02-7].
- [50] RIDGWAY, K., S. P.D. LALLJIE a R. M. SMITH. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1153(1-2), 36-53 [cit. 2018-02-7]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730700218X>
- [51] WANG, L. a C. L. WELLER. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2006, 17(6), 300-312 [cit. 2018-03-7]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405003559>
- [52] VAŠÍČEK, O. Využití metod kapalinové chromatografie k separaci oligonukleotidů modifikovaných genotoxickými látkami. Brno, 2007, Bakalářská práce, Masarykova Univerzita v Brně.
- [53] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003.
- [54] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990.

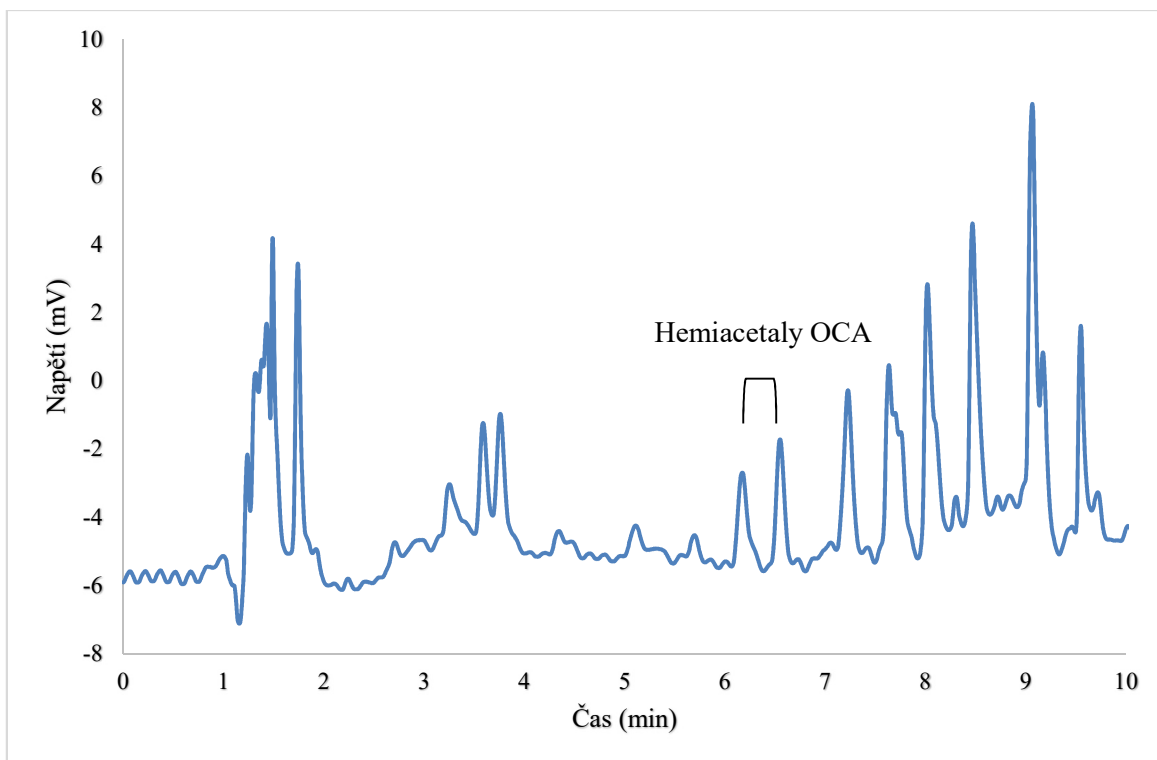
- [55] MOTONO, T., S. KITAGAWA a H. OHTANI. High Performance Liquid Chromatography at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . *Analytical Chemistry* [online]. 2016, 88(13), 6852-6858 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b01417>
- [56] FARAJZADEH, M. A., A. YADEGHARI, L. KHOSH MARAM a Houshang GHORBANPOUR. Development and validation of a rapid and sensitive gas chromatographic method for the analysis of some phenolic compounds in vegetable oils. *Analytical Methods* [online]. 2014, 6(14), 5314 [cit. 2018-02-7]. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c4ay00623b>
- [57] LACINA, P. *Využití plynové chromatografie pro stanovení reziduí léčiv ve vodách*. Brno, 2009, Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně
- [58] ROZMAN, T. *Plynová chromatografie pro stanovení aldehydů a ketonů*. Brno, 2013, Bakalářská práce, Masarykova Univerzita v Brně.
- [59] [https://sk.wikipedia.org/wiki/Plynov%C3%A1\\_chromatografia](https://sk.wikipedia.org/wiki/Plynov%C3%A1_chromatografia) [online]. [cit. 2018-02-7].
- [60] ROBLOVÁ, V. *Analýza biologicky aktivních látek ve vinohradském materiálu metodou kapilární elektroforézy*. Brno, 2011, Diplomová práce. Masarykova Univerzita v Brně.
- [61] TANAKA, Y. a S. TERABE. Recent advances in enantiomer separations by affinity capillary electrophoresis using proteins and peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2001, 48(2), 103-116 [cit. 2018-04-1]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165022X01001439>
- [62] ALBERT, K. Liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, 856(1-2), 199-211 [cit. 2018-01-29]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399008316>
- [63] NAHODILOVÁ, J. *Zpracování magneticko-resonančních spektroskopických dat pomocí LC modelu*. Brno, 2009, Diplomová práce. Masarykova Univerzita v Brně.

- [64] BRENES, M., A. GARCÍA, P. GARCÍA a A. GARRIDO. Rapid and Complete Extraction of Phenols from Olive Oil and Determination by Means of a Coulometric Electrode Array System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, 48(11), 5178-5183 [cit. 2018-03-21].  
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf000686e>
- [65] DIAMANTAKOS P., VELKOU A., KILLDAY K. B., GIMISIS T., MELLIOU E. and MAGIATIS P. Oleokoronal and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra virgin olive oil. *OLIVAE* [online]. 2015, 122, 22-33 [cit. 2018-03-21].  
Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/284898643\\_Oleokoronal\\_and\\_oleomissional\\_new\\_major\\_phenolic\\_ingredients\\_of\\_extra\\_virgin\\_olive\\_oil](https://www.researchgate.net/publication/284898643_Oleokoronal_and_oleomissional_new_major_phenolic_ingredients_of_extra_virgin_olive_oil)
- [66] DE LA TORRE-CARBOT, K., O. JAUREGUI, E. GIMENO, A. I. CASTELLOTE, R. M. LAMUELA-RAVENTÓS a M. C. LÓPEZ-SABATER. Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, 53(11), 4331-4340 [cit. 2018-03-21]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0501948>
- [67] BAKHOUCHEA A., LORENZO-SANCHEZ J., Alberto FERNANDEZ-GUIÉERREZ A., SEGURA-CARRETERO A. Trends in chemical characterization of virgin olive oil phenolic profile: an overview and new challenges. *OLIVAE* [online]. 2015, 122, 3-15 [cit. 2018-03-21]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/285009522\\_Trends\\_in\\_chemical\\_characterization\\_of\\_virgin\\_olive\\_oil\\_phenolic\\_profile\\_an\\_overview\\_and\\_new\\_challenges](https://www.researchgate.net/publication/285009522_Trends_in_chemical_characterization_of_virgin_olive_oil_phenolic_profile_an_overview_and_new_challenges)
- [68] PURCARO, G., R. CODONY, L. PIZZALE, C. MARIANI a L. CONTE. Evaluation of total hydroxytyrosol and tyrosol in extra virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2014 [cit. 2018-02-8]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201300420>
- [69] CARRASCO-PANCORBO, A., A. M. GÓMEZ-CARAVACA, L. CERRETANI, A. BENDINI, A. SEGURA-CARRETERO a A. FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra-virgin olive oil. *Journal of Separation*

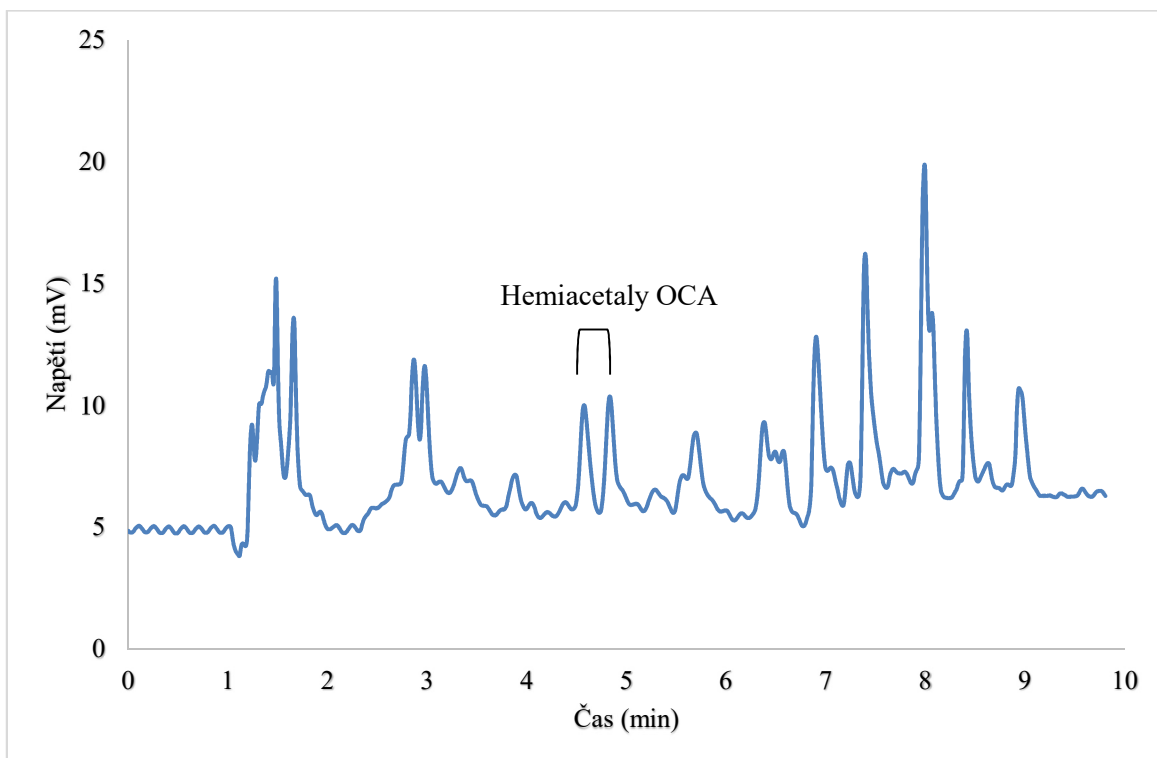
- Science* [online]. 2006, 29(14), 2221-2233 [cit. 2018-02-9]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200600132>
- [70] KULIŠIĆ BILUŠIĆ, T., E. MELLIOU, J. GIACOMETTI, A. ČAUŠEVIĆ, S. ČORBO, M. LANDEKA a P. MAGIATIS. Phenolics, fatty acids, and biological potential of selected Croatian EVOOs. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2017, 119(10), 1700108- [cit. 2018-02-9]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201700108>
- [71] KARKOULA, E., Angeliki SKANTZARI, E. MELLIOU a P. MAGIATIS. Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil by Quantitative 1 H NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, 60(47), 11696-11703 [cit. 2018-02-9]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf3032765>
- [72] HRNCIRIK, K. a S. FRITSCHÉ. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*[online]. 2004, 106(8), 540-549 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200400942>
- [73] SÁNCHEZ DE MEDINA, V., H. MIHO, Eleni MELLIOU, P. MAGIATIS, F. PRIEGO-CAPOTE a M. D. LUQUE DE CASTRO. Quantitative method for determination of oleocanthal and oleacein in virgin olive oils by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* [online]. 2017, 162, 24-31 [cit. 2018-04-9]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914016307263>
- [74] KALOGIOURI, N. P., R. AALIZADEH a N. S. THOMAIDIS. Investigating the organic and conventional production type of olive oil with target and suspect screening by LC-QTOF-MS, a novel semi-quantification method using chemical similarity and advanced chemometrics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2017, 409(23), 5413-5426 [cit. 2018-04-9]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-017-0395-6>

## **7 PŘÍLOHY**

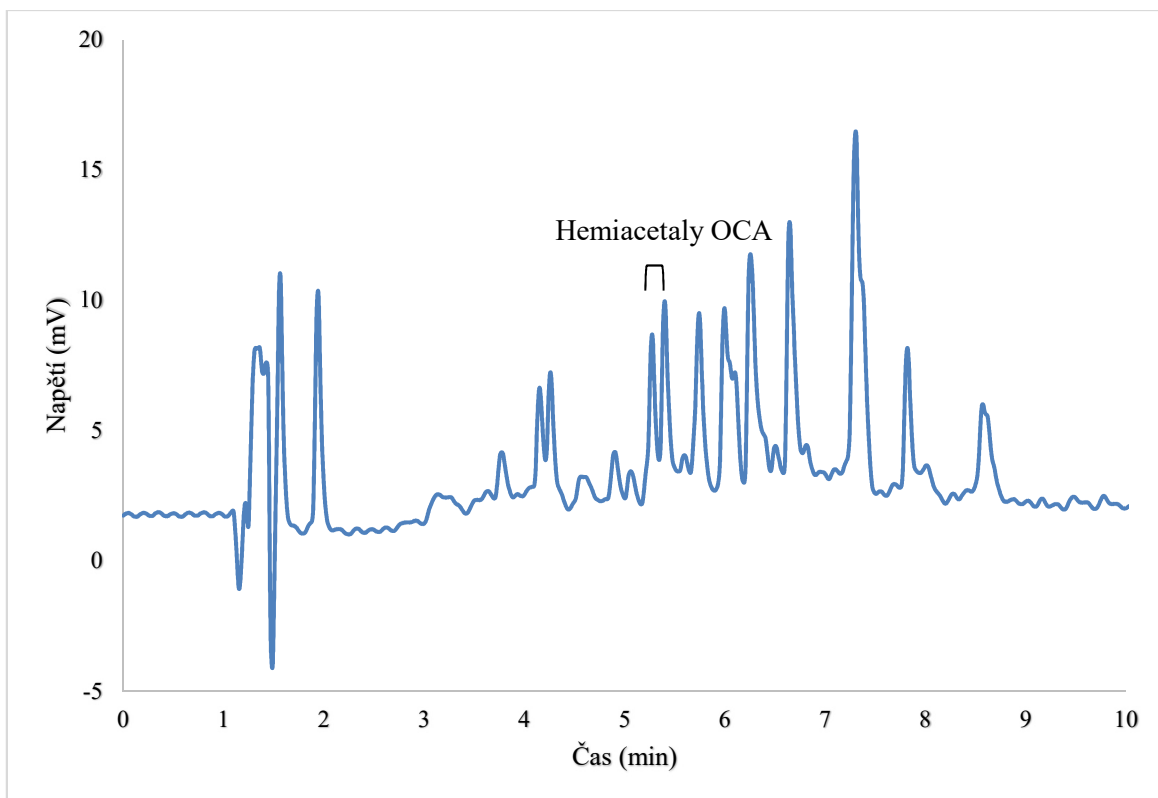
Obrázky a tabulky výsledků



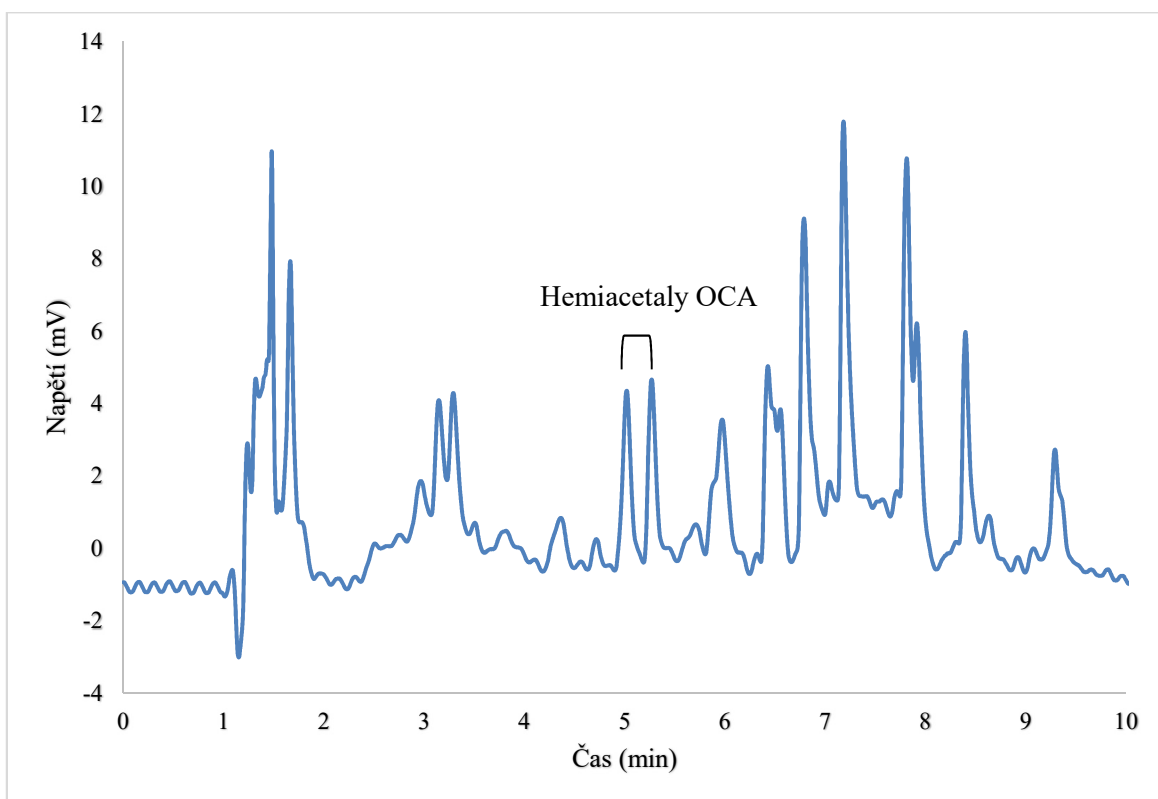
**Obrázek 26** Gradientová eluce s izokratickým krokem (eluce č. 6, tabulka č. 5); kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



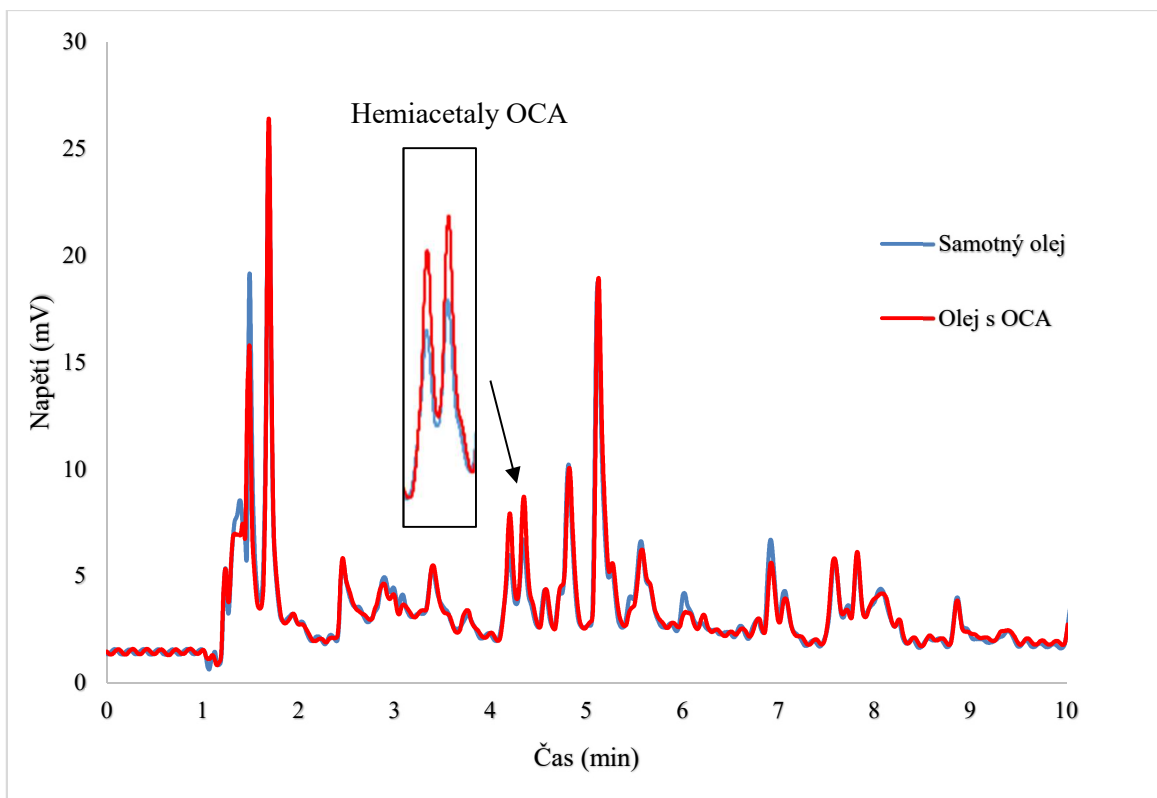
**Obrázek 27** Gradientová eluce s izokratickým krokem (eluce č. 10, tabulka č. 5); kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



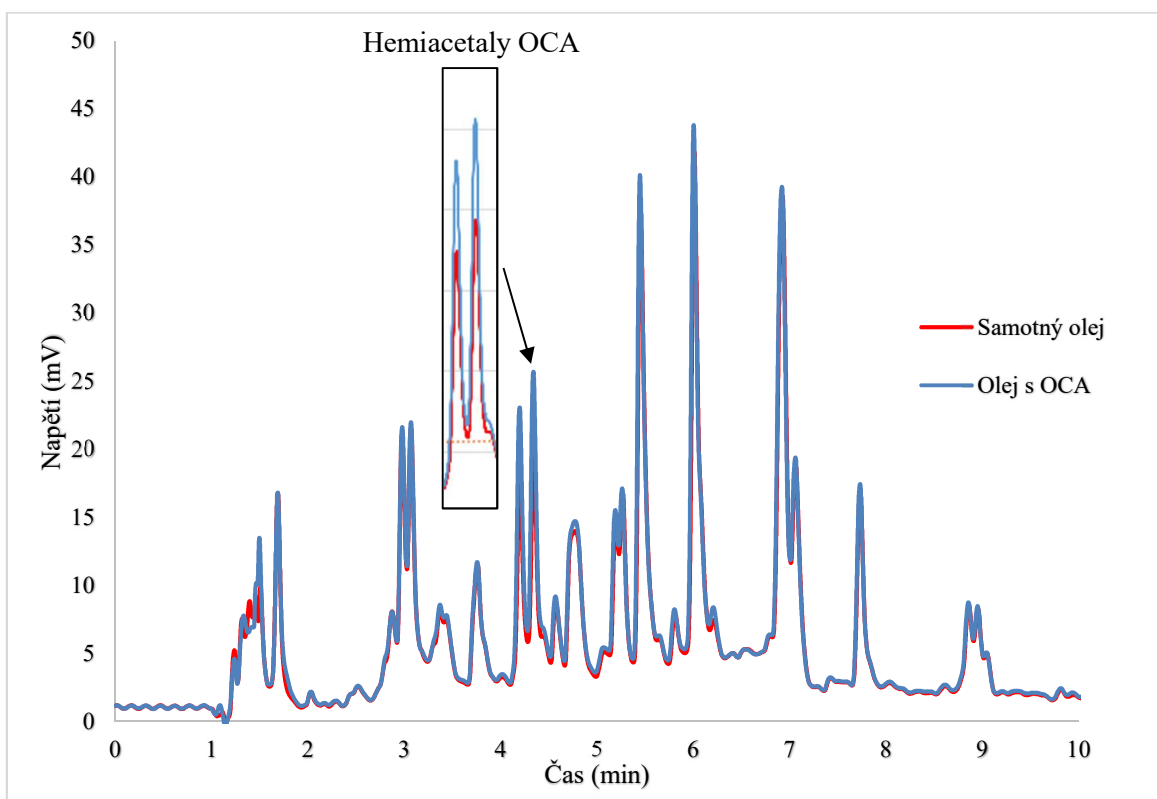
**Obrázek 28** Gradientová eluce (eluce č. 18, tabulka č. 5); kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ),  
 dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min,  $M_F$ : ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C,  
 detekce: UV



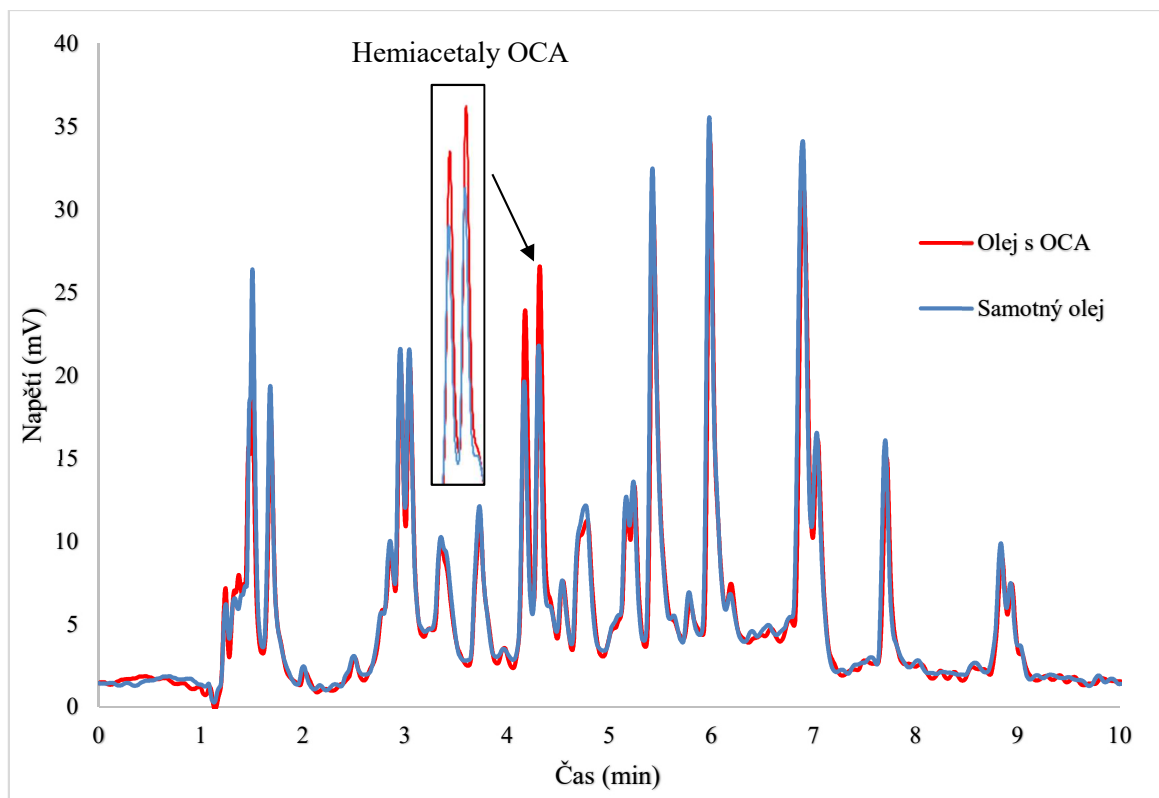
**Obrázek 29** Gradientová eluce (eluce č. 19, tabulka č. 5); kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ),  
 dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min,  $M_F$ : ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C,  
 detekce: UV



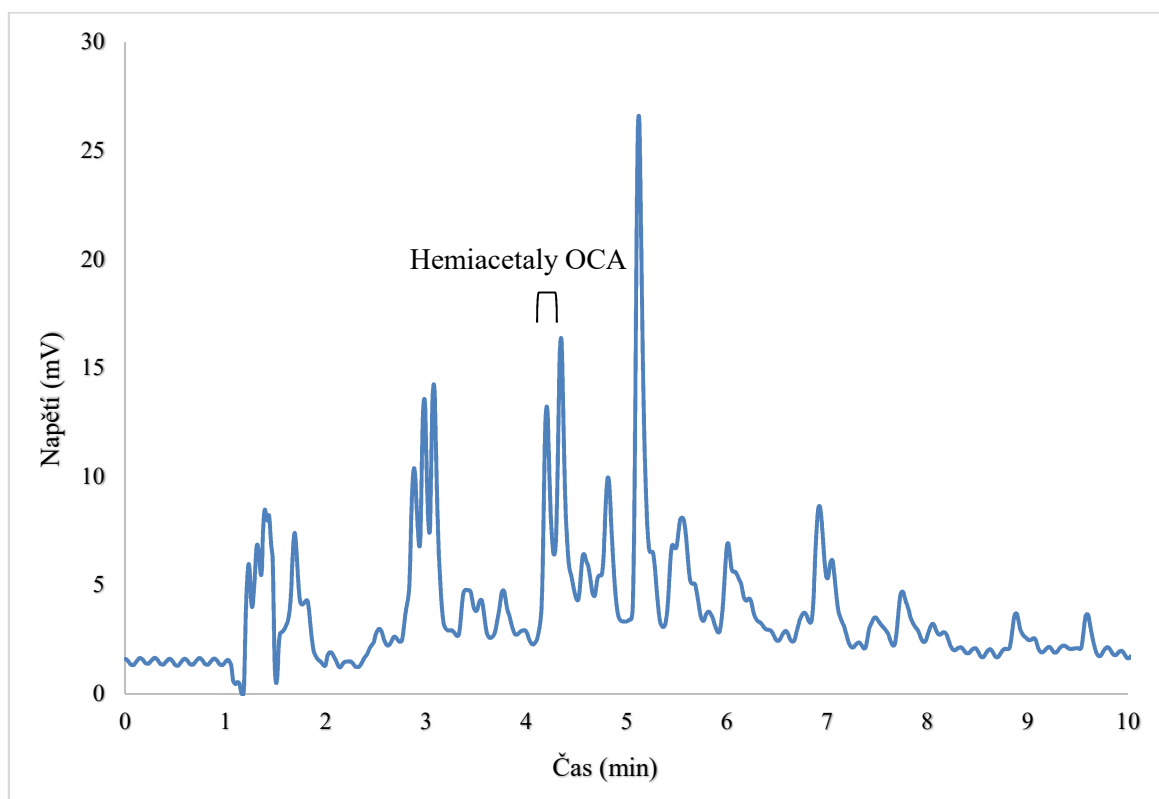
**Obrazek 30** Vzorek č. 1 se standartní přídávkem; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



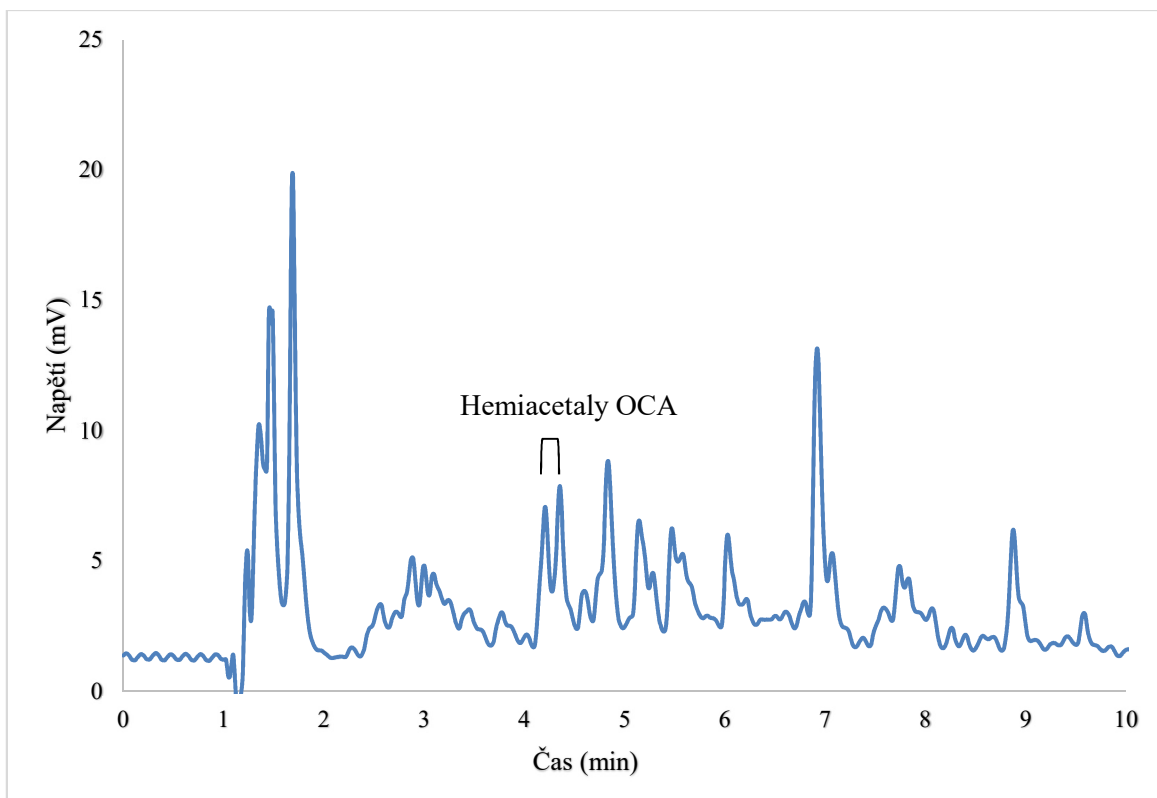
**Obrazek 31** Vzorek č. 6 se standartní přídávkem; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



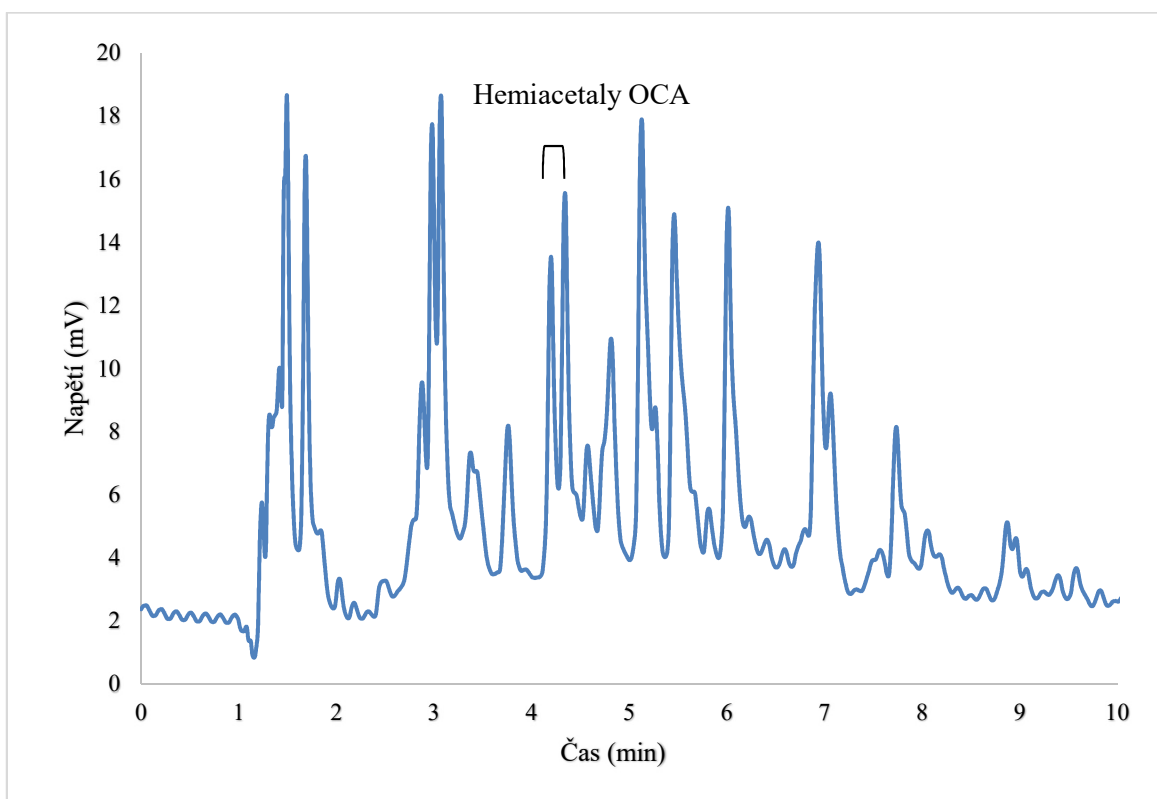
**Obrázek 32** Vzorek č. 8 se standartní přídavkem; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



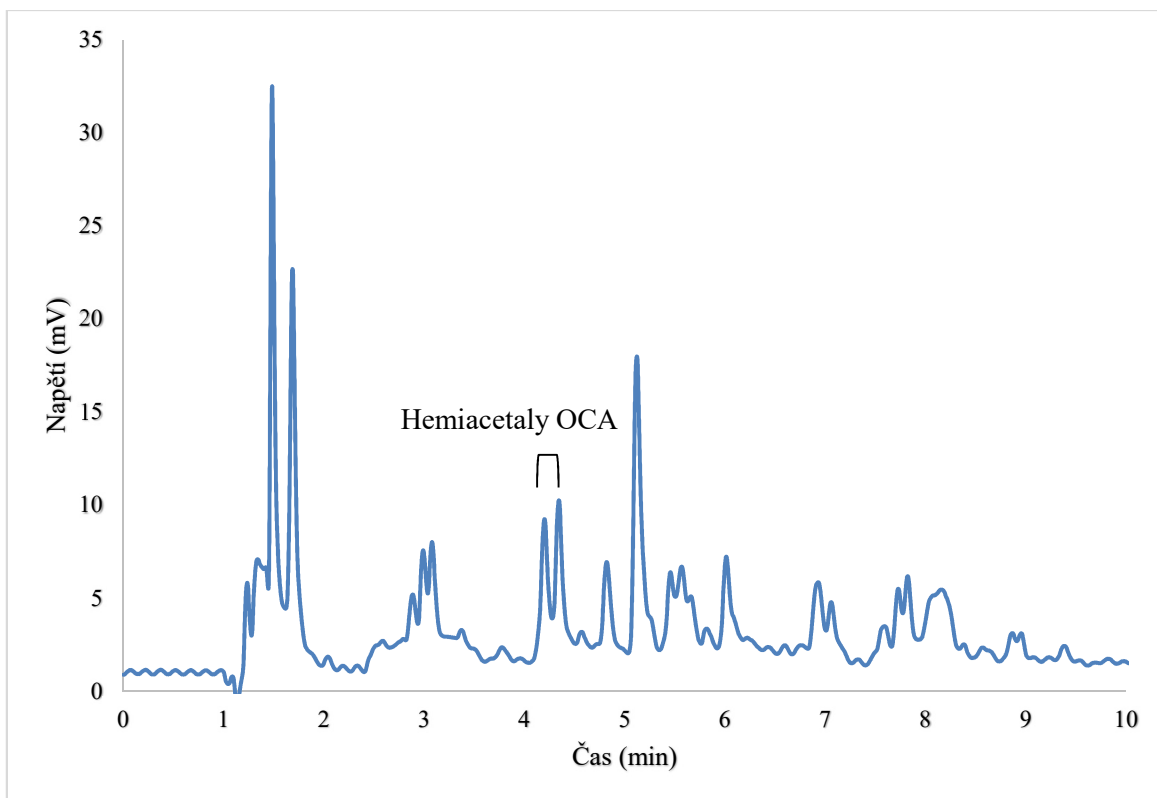
**Obrázek 33** Vzorek č. 2; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



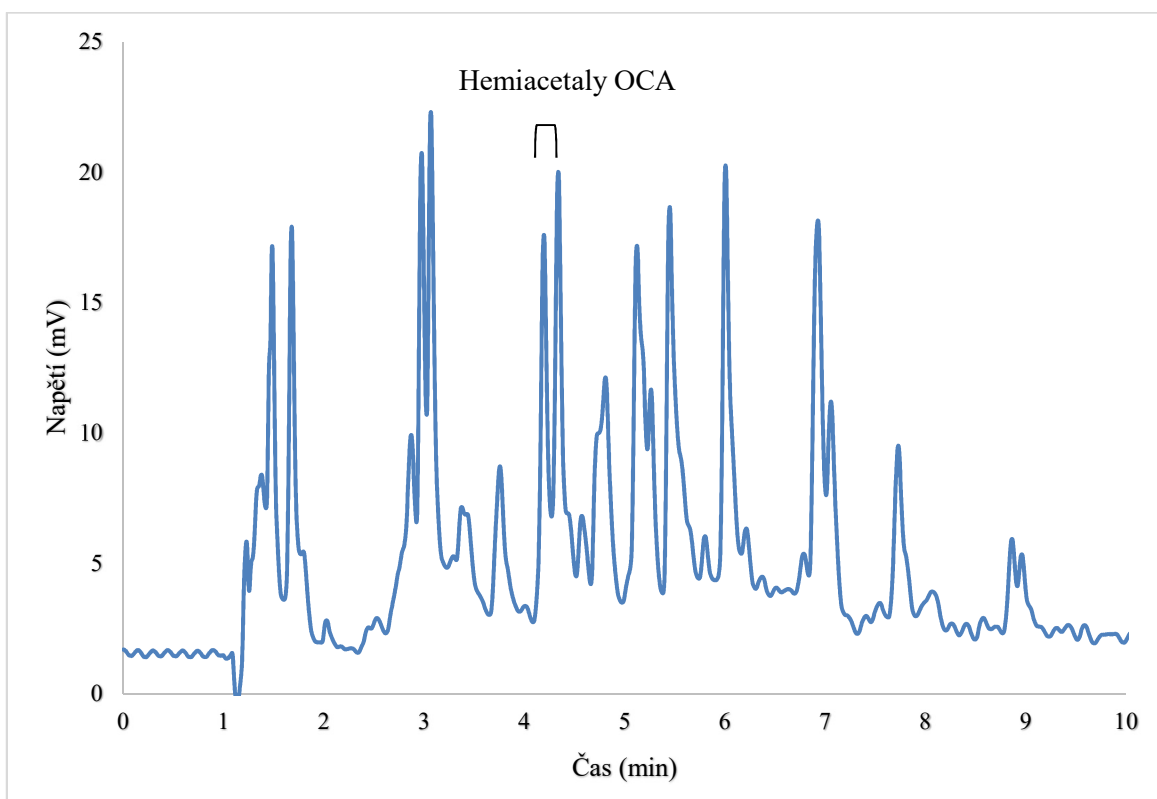
**Obrázek 34** Vzorek č. 3; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



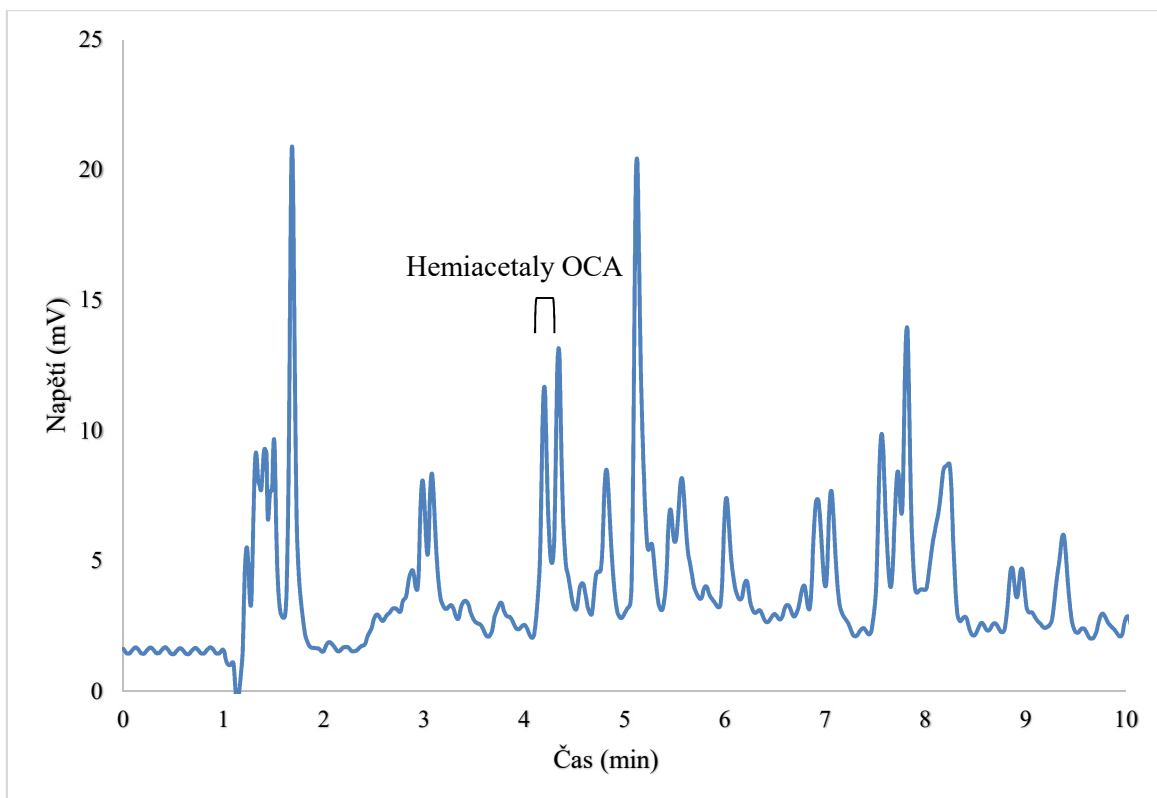
**Obrázek 35** Vzorek č. 5; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



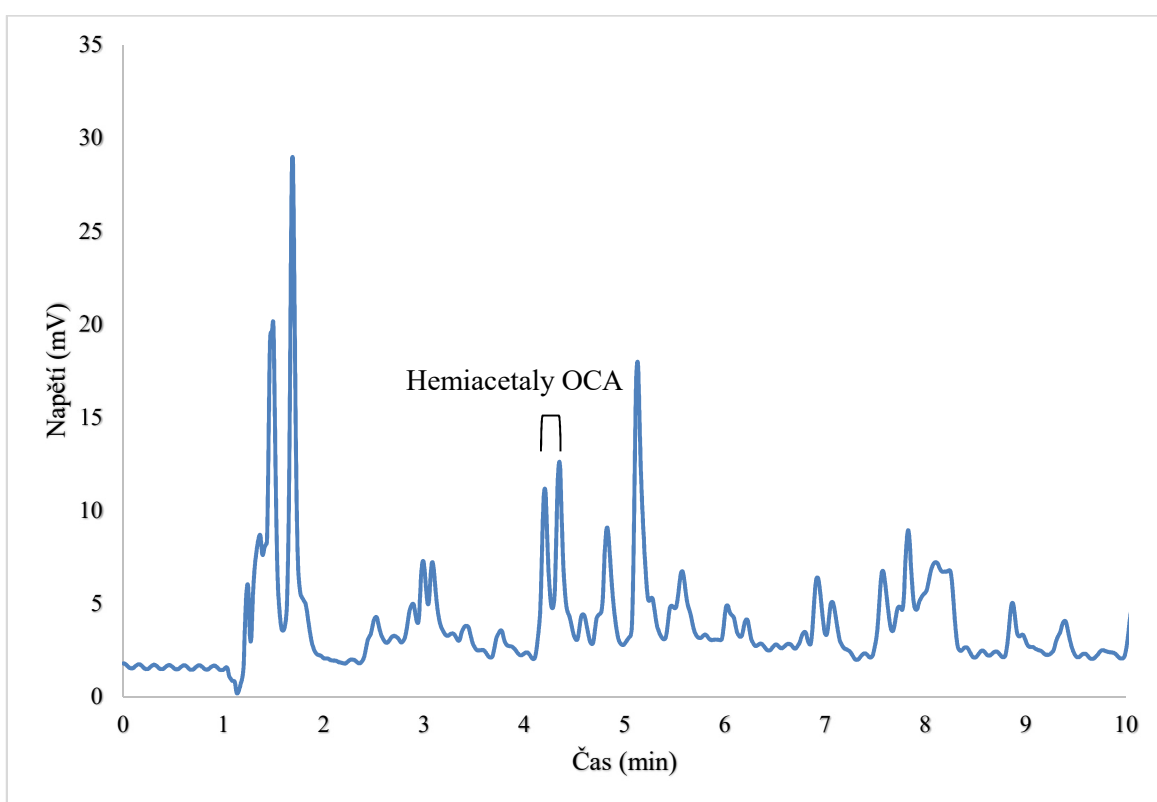
**Obrázek 36** Vzorek č. 7; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



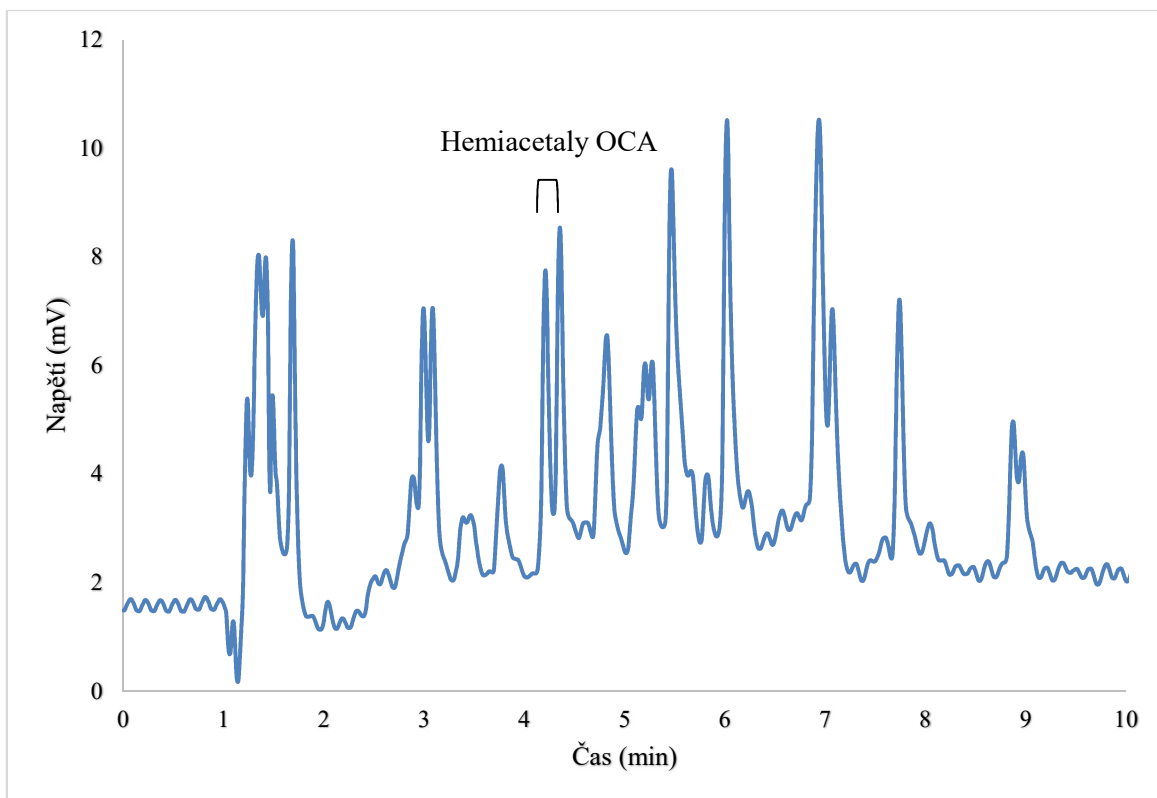
**Obrázek 37** Vzorek č. 9; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



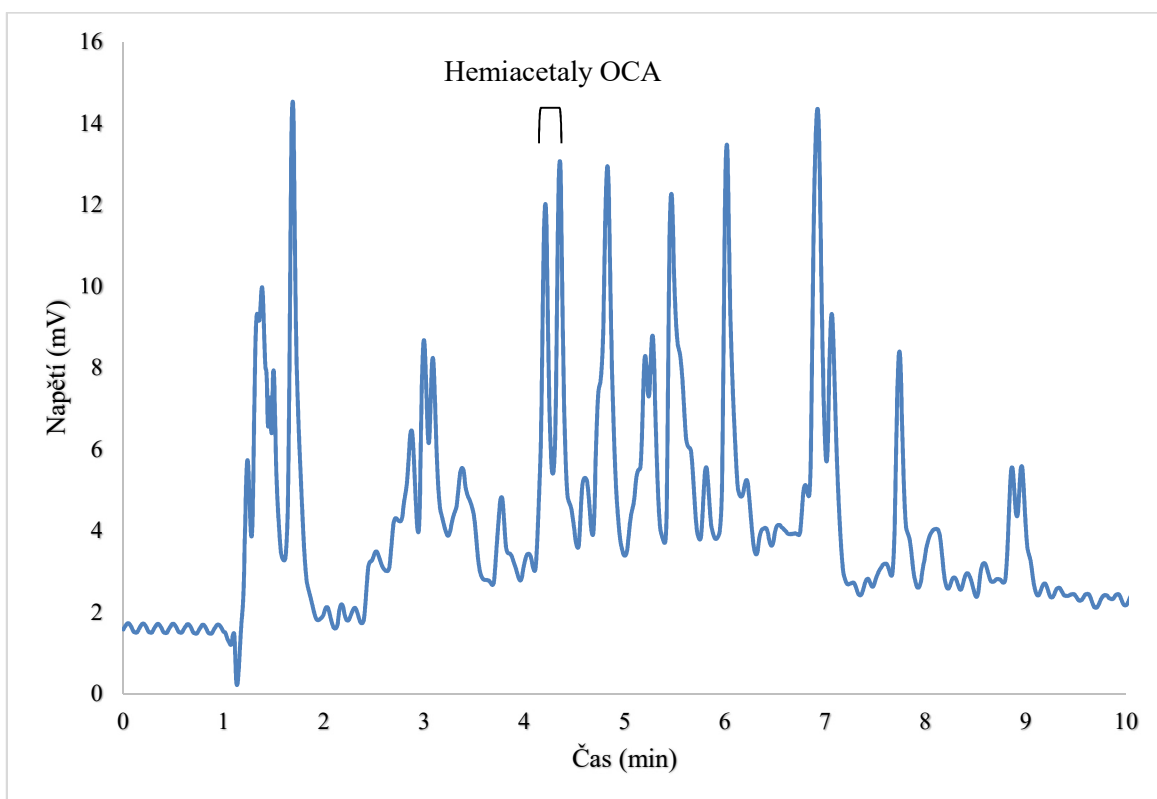
**Obrázek 38** Vzorek č. 10; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



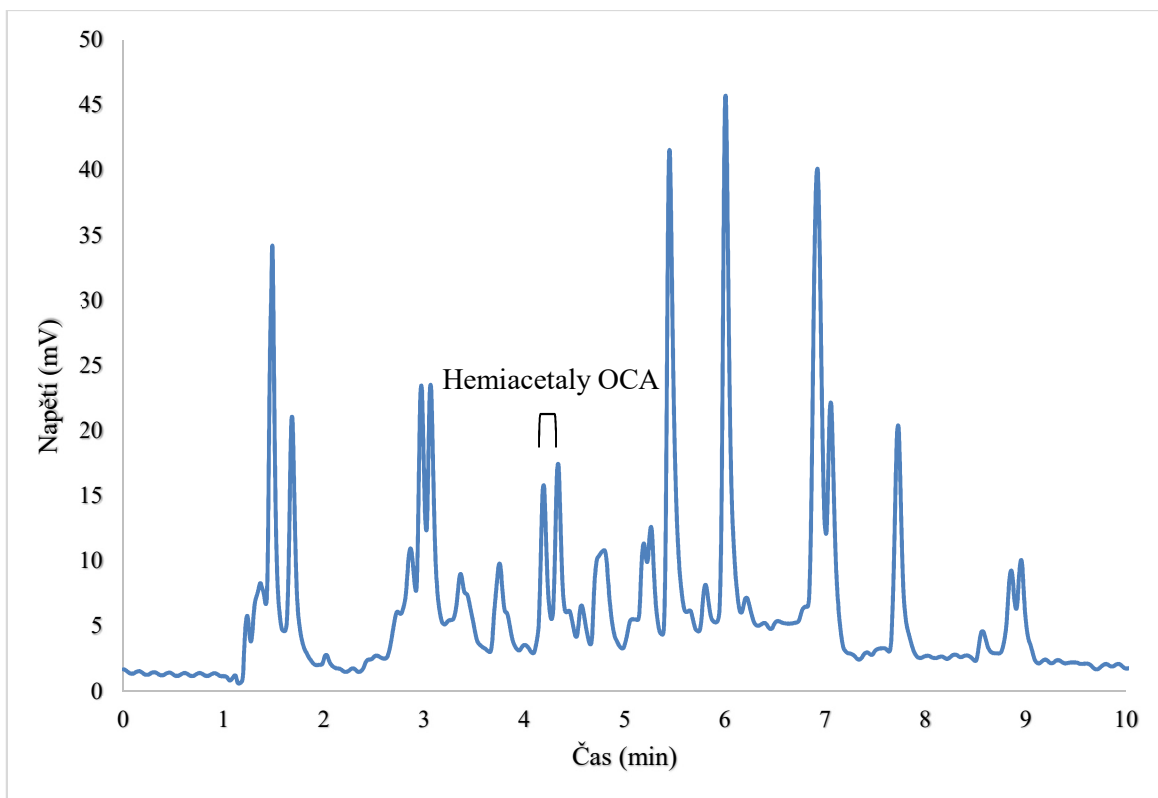
**Obrázek 39** Vzorek č. 11; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



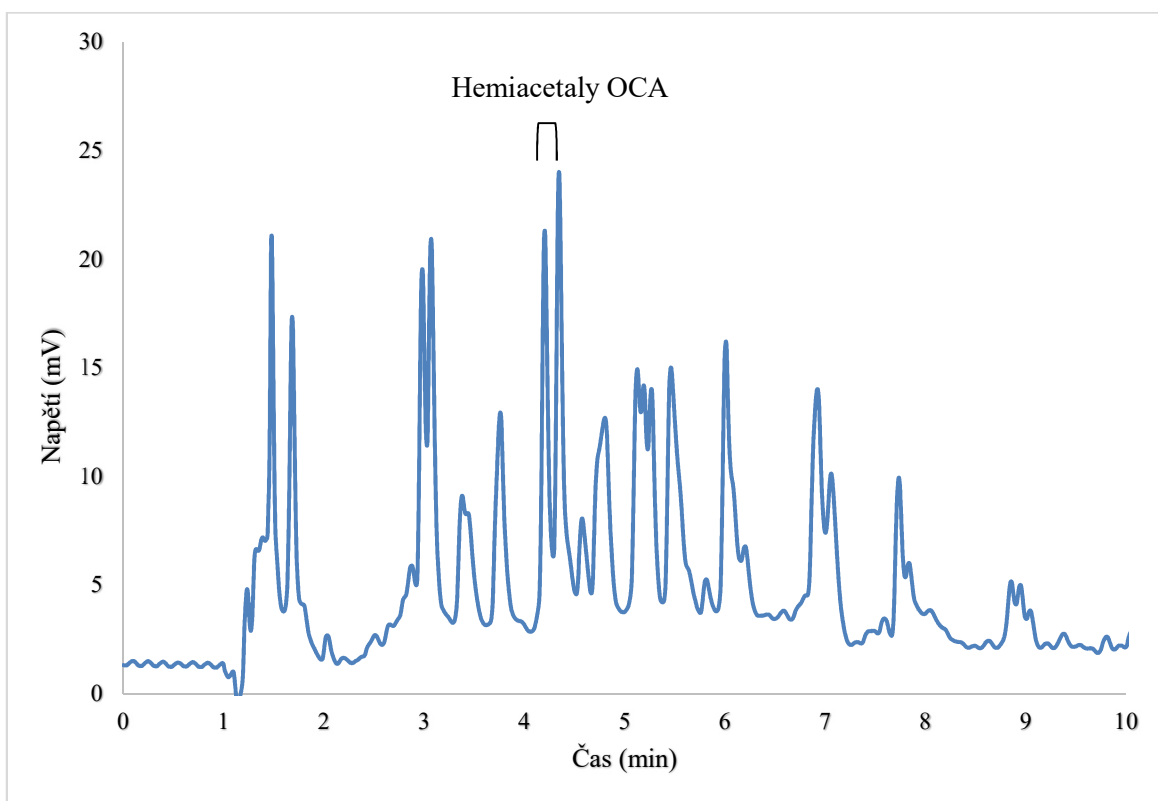
**Obrázek 40** Vzorek č. 12; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



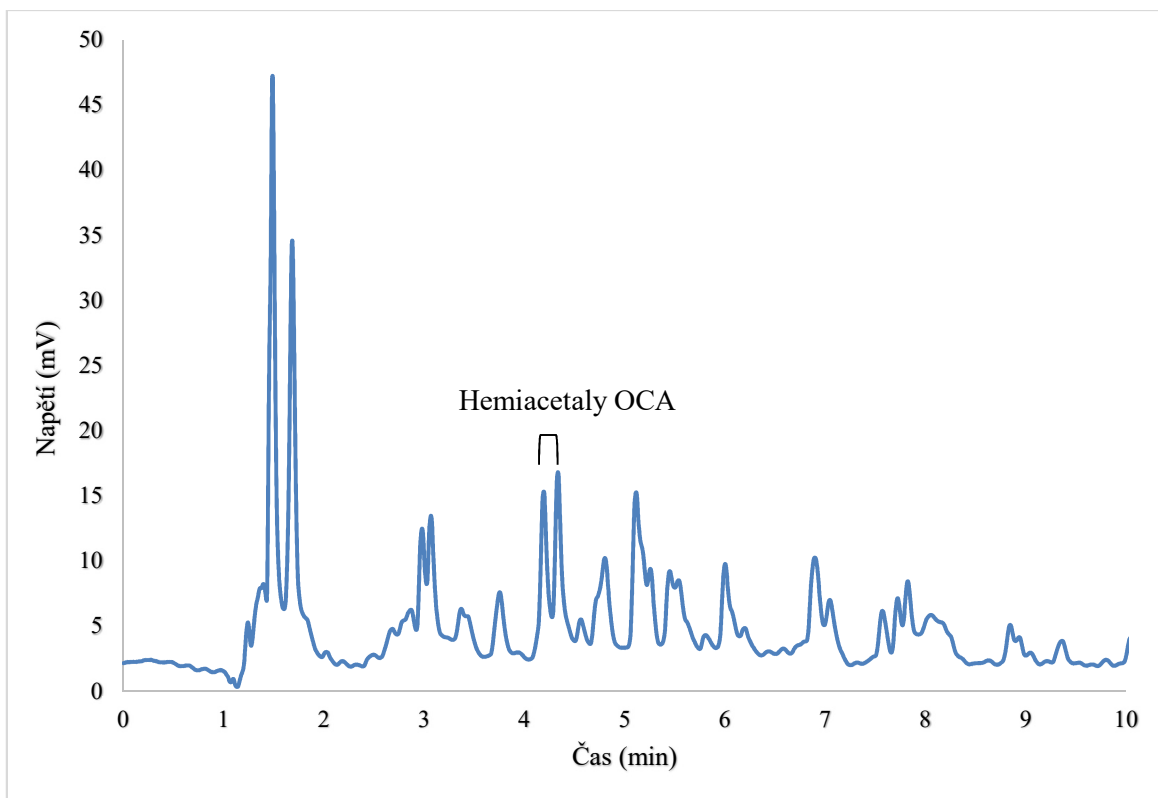
**Obrázek 41** Vzorek č. 13; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



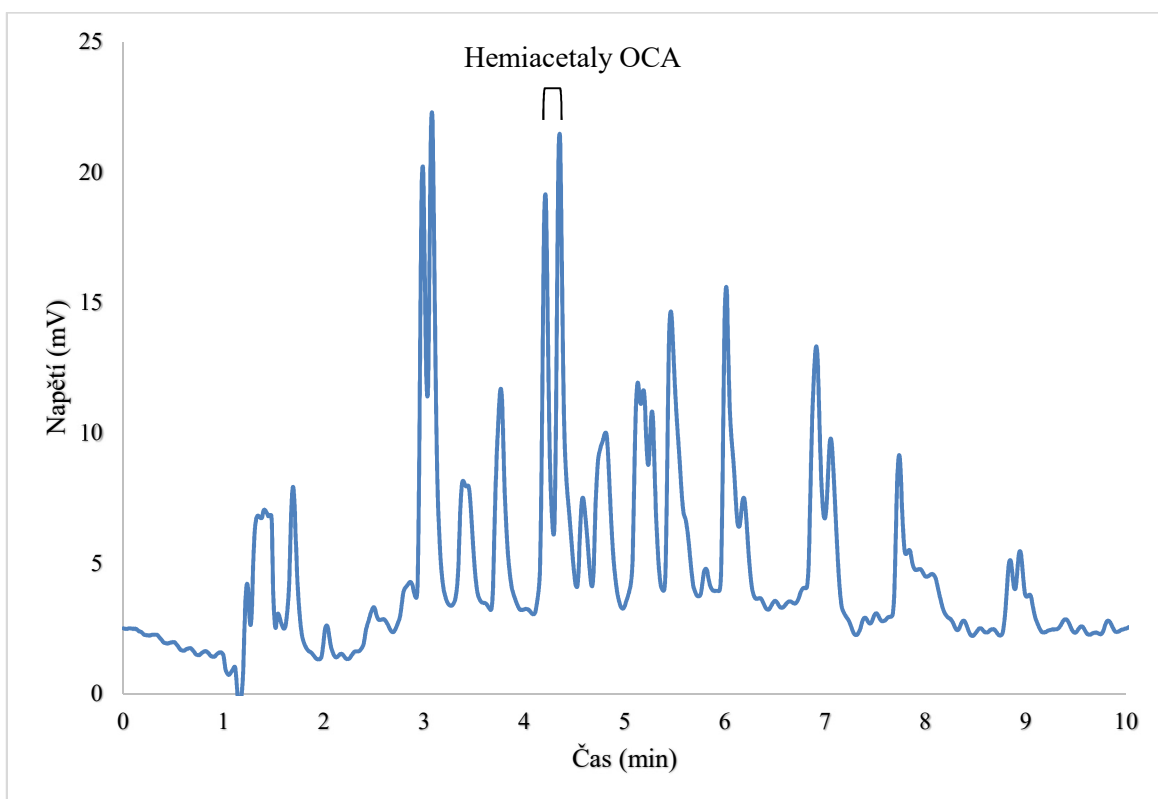
**Obrázek 42** Vzorek č. 14; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



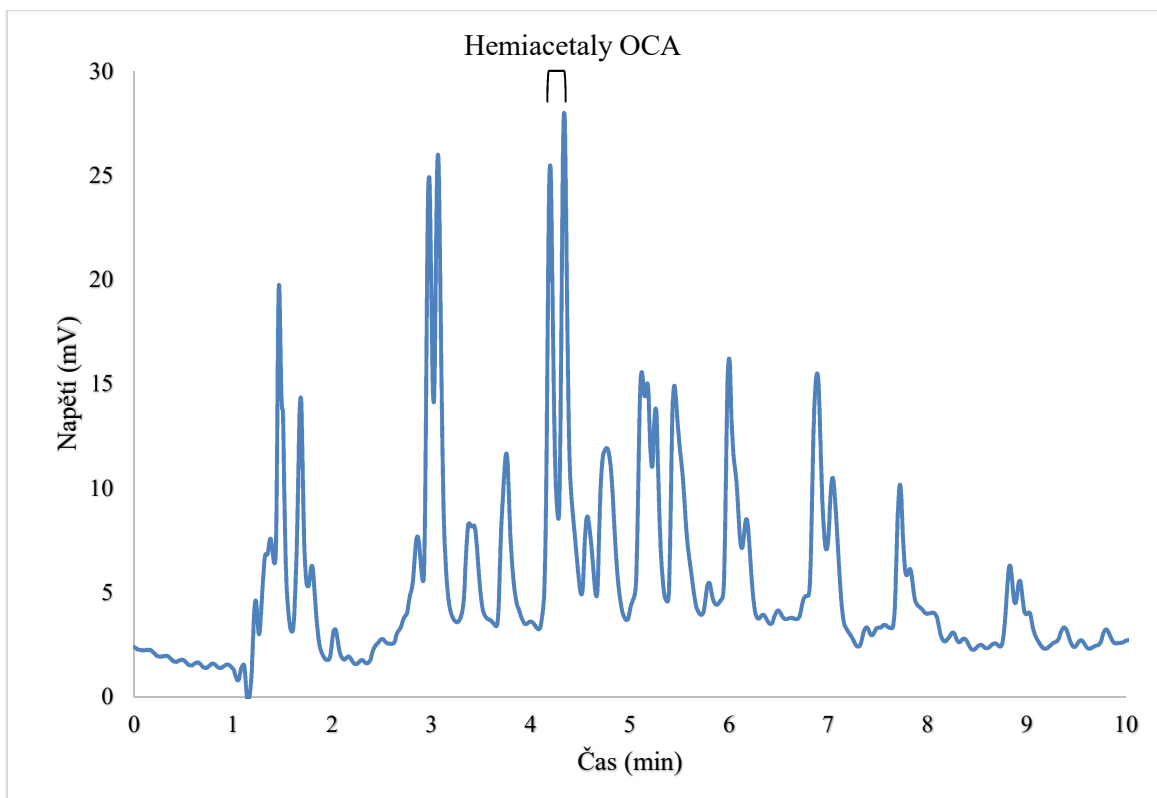
**Obrázek 43** Vzorek č. 15; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



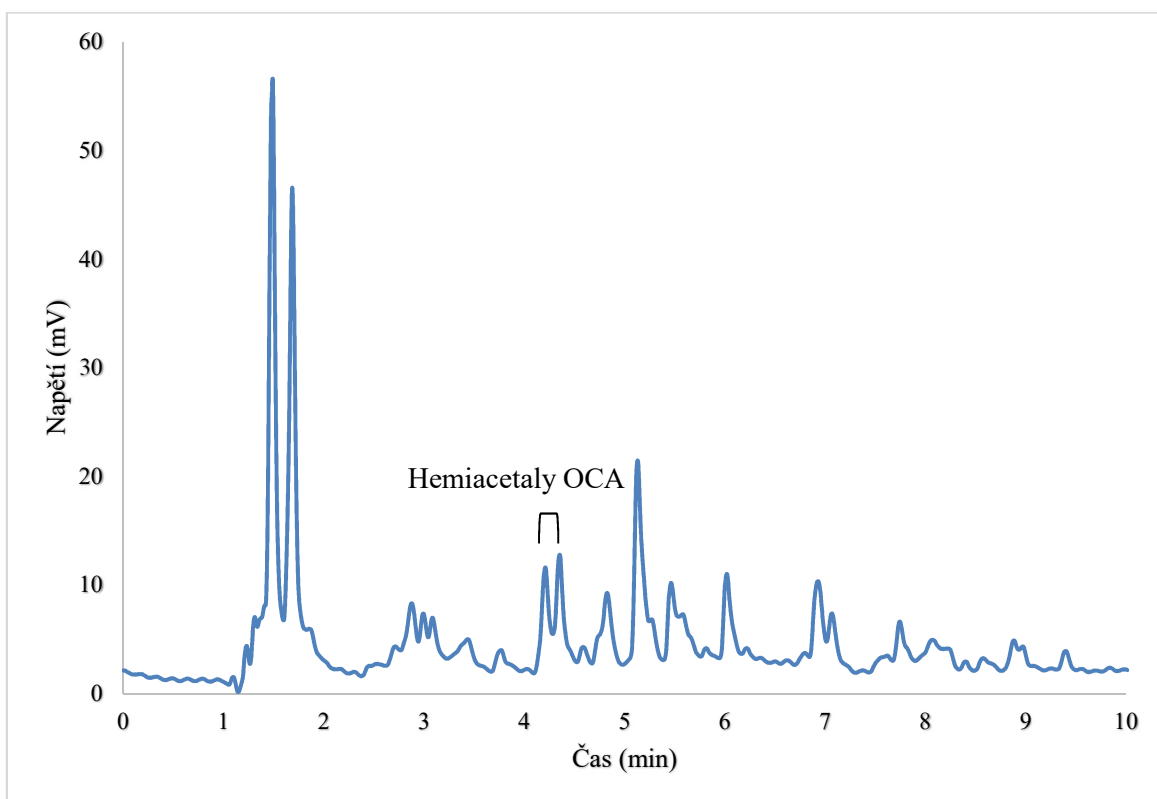
**Obrázek 44** Vzorek č. 16; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



**Obrázek 45** Vzorek č. 17; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m), dávkování = 10  $\mu$ l,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



**Obrázek 46** Vzorek č. 18; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV



**Obrázek 47** Vzorek č. 19; kolona: C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ), dávkování = 10  $\mu\text{l}$ ,  $F_M$ : 0,5 ml/min, MF: ACN : H<sub>2</sub>O, gradient: 27 – 50 % za 10 minut; teplota: 40 °C, detekce: UV

<b>Eluce č. 1.</b>	<b>Eluce č. 2.</b>	<b>Eluce č. 3.</b>	<b>Eluce č. 4.</b>	<b>Eluce č. 5.</b>	<b>Eluce č. 6.</b>	<b>Eluce č. 7.</b>	<b>Eluce č. 8.</b>	<b>Eluce č. 9.</b>
0 min...30 % 2 min...30 % 12 min...50 % 13 min...60 % 14 min...30 %	0 min...30 % 3 min...30 % 12 min...50 % 13 min...60 % 14 min...30 %	0 min...20 % 3 min...20 % 12 min...50 % 13 min...60 % 14 min...20 %	0 min...20 % 4 min...20 % 10 min...60 % 11 min...20 %	0 min...20 % 4 min...20 % 10 min...60 % 11 min...30 %	0 min...25 % 4 min...25 % 10 min...60 % 11 min...25 %	0 min...28 % 4 min...28 % 10 min...60 % 11 min...28 %	0 min...28 % 4 min...28 % 10 min...50 % 11 min...28 %	0 min...28 % 4 min...28 % 6 min...40 % 8 min...45 % 10 min...60 % 11 min...28 %
<b>Eluce č. 10.</b>	<b>Eluce č. 11.</b>	<b>Eluce č. 12.</b>	<b>Eluce č. 13.</b>	<b>Eluce č. 14.</b>	<b>Eluce č. 15.</b>	<b>Eluce č. 16.</b>	<b>Eluce č. 17.</b>	<b>Eluce č. 18.</b>
0 min...28 % 4 min...28 % 14 min...60 % 15 min...28 %	0 min...28 % 4 min...28 % 14 min...50 % 15 min...28 %	0 min...28 % 4 min...28 % 7 min...40 % 9 min...45 % 12 min...60 %	0 min...28 % 4 min...28 % 8 min...60 % 9 min...28 %	0 min 30 % 4 min...30 % 8 min...60 % 9 min...30 %	0 min...28 % 3 min...28 % 10 min...60 % 11 min...28 %	0 min...28 % 2 min...28 % 12 min...60 % 13 min...28 %	0 min...20 % 12 min...50 % 13 min...60 % 14 min...20 %	0 min...20 % 10 min...60 % 11 min...20 %
<b>Eluce č. 19.</b>	<b>Eluce č. 20.</b>	<b>Eluce č. 21.</b>	<b>Eluce č. 22.</b>	<b>Eluce č. 23.</b>	<b>Eluce č. 24.</b>	<b>Eluce č. 25.</b>	<b>Eluce č. 26.</b>	
0 min...25 % 4 min...30 % 5 min...40 % 10 min...50 % 11 min...60 % 12 min...25 %	0 min...30 % 10 min...50 % 11 min...30 %	0 min...30 % 8 min...40 % 10 min...50 % 11 min...60 % 12 min...30 %	0 min...30 % 10 min...60 % 11 min...30 %	0 min...20 % 10 min...60 % 11 min...20 %	0 min...15 % 10 min...60 % 11 min...15 %	0 min...28 % 10 min...50 % 11 min...28 %	0 min...27 % 10 min...50 % 11 min...27 %	

**Tabulka 7 Výpis všech zkoušených elucí**

Kalibrační řada s naměřenými plochami (mV.s)								
Extrakt č.	2 mg/100 g	4 mg/100 g	6 mg/100 g	8 mg/100 g	10 mg/100 g	12 mg/100 g	20 mg/100 g	28 mg/100 g
1.	21,9	49,7	73,5	103,4	132,7	155,8	265,5	351,5
	24,0	50,6	69,6	103,8	131,8	143,6	237,9	363,6
	23,9	49,6	75,1	104	126,5	162,9	261,3	350,9
2.	23,9	48,3	77,1	107,3	126	159,1	252	350
	23,7	48,4	75,8	101,6	124,5	164,3	232	352
	23,9	48,8	73,8	101,2	126,9	159,6	232,4	346,6

Tabulka 8 Naměřené hodnoty pro kalibrační přímku

		Vzorek č. 1				Vzorek č. 6				Vzorek č. 8			
Extrakt č.		Samotný EVOO	c mg/100 g	EVOO s přidaným OCA	c mg/100 g	Samotný EVOO	c mg/100 g	EVOO s přidaným OCA	c mg/100 g	Samotný EVOO	c mg/100 g	EVOO s přidaným OCA	c mg/100 g
1	a	18	3	38,2	3,3	57,5	8,8	73,1	10,2	57,9	9,4	81,4	7,9
		20		34,2		54,2		71,4		61,2		83,1	
	b	19,1	3	39,3	2,9	57,3	8,8	74,9	9,1	58	9,2	81	7,3
		20,6		41,8		53,9		72,9		57,9		82,3	
	c	16,3	2,9	35,5	2,7	56,6	8,6	75	8,3	56,3	9	79	8,3
		20,8		42,7		52,6		73,8		57,5		75,9	
2	a	16,7	2,7	38	2,4	55,8	8,5	74,7	8,1	61,1	9,7	79,1	10,8
		17,9		40,6		52		73,1		61,8		78	
	b	16,5	2,8	35,6	3	55,4	8,4	74	7,3	62,78	9,8	79,2	10,4
		19,1		35,7		50,8		75,7		60,8		79,9	
	c	16	2,5	30,5	2,7	55,8	8,5	77,1	7,1	62,5	9,9	79	11,3
		16,3		37,4		52,2		76,4		62,5		79,1	

Tabulka 9 Naměřené hodnoty ploch s vypočítanými koncentracemi pro st. přídavek

Eluce č.		Plocha píků hemiacetalů OCA (mV.s)															
		Vz. č. 2	Vz. č. 3	Vz. č. 4	Vz. č. 5	Vz. č. 7	Vz. č. 9	Vz. č. 10	Vz. č. 11	Vz. č. 12	Vz. č. 13	Vz. č. 14	Vz. č. 15	Vz. č. 16	Vz. č. 17	Vz. č. 18	Vz. č. 19
1	a	46,9	28,5	155,8	44,3	25,1	56,5	33,3	39,9	22,9	41,6	56,9	85,1	45,7	80,9	94,2	44,6
		65,3	30,7	169,8	45,5	22,1	67,2	36,3	43,2	22,9	41,8	60,2	96,2	44,8	81,9	107,1	44,3
	b	44,5	32,1	152,1	43,3	25,9	58,1	36,6	41,1	21,5	41,7	57,8	53	47,1	71	86,7	48,3
		64,5	33,1	179,1	46,5	23,1	67,4	40,8	46,1	23,9	44,8	58,5	60,6	45,4	75,4	102,8	53,2
	c	46,2	24,1	170,6	41,4	27,2	53,6	33,5	38,7	21,8	41,2	49,6	70	48,9	80,3	84,6	46,2
		70,6	28	198,3	45,8	24,4	55,2	36,9	40,9	25	42,7	54,7	78,8	51,9	98,6	107,9	47,6
2	a	47,4	22,1	174	47,1	36,9	57	39,4	42,5	23,2	40,5	52,2	72,3	53,6	62	102,6	41,5
		62,7	25,5	190,5	43,5	39,9	60	43,8	47,9	25	40,4	57,3	81,6	44,6	81,8	118,4	42,3
	b	46,8	24,1	171,2	48,2	35,6	58	41	41,5	23	40,5	48,9	67,9	55,9	71	100,9	35,2
		63,8	25,1	191,4	45,7	30,6	60,8	40,7	47,4	24,8	40,3	50,6	73,9	60	88,8	113	37,5
	c	44,4	22,1	161,1	48,9	37,8	58,3	41,2	39,5	25,8	41,9	54,5	71,8	55,6	66,4	97,6	40,5
		58,2	25	186,8	45,8	39,3	59,5	42,3	44,8	27,3	42,5	65,8	81,5	62,2	82,9	102,7	42

Tabulka 10 Naměřené hodnoty ploch vzorků EVOO

Extrakt č.		Vypočítané hodnoty koncentrací OCA (mg/100 g)															
		Vz. č. 2	Vz. č. 3	Vz. č. 4	Vz. č. 5	Vz. č. 7	Vz. č. 9	Vz. č. 10	Vz. č. 11	Vz. č. 12	Vz. č. 13	Vz. č. 14	Vz. č. 15	Vz. č. 16	Vz. č. 17	Vz. č. 18	Vz. č. 19
1	a	8,7	4,6	25,3	7,1	3,7	9,6	5,4	6,4	3,5	6,5	9,1	14,1	7	12,6	15,6	6,9
	b	8,5	5	25,7	7,1	3,9	9,7	6	6,8	3,5	6,7	9	8,8	7,2	11,4	14,7	7,9
	c	9,1	4	28,7	6,9	4	8,4	5,4	6,2	3,6	6,5	8,1	11,5	7,8	13,9	14,9	7,3
2	a	8,5	3,7	28,3	7,2	6,1	9,1	6,4	7	3,7	6,3	8,5	11,9	7,6	11,2	17,2	6,5
	b	8,6	3,8	28,2	7,4	5,2	9,2	6,3	6,9	3,7	6,3	7,7	11	9	12,4	16,6	5,6
	c	8	3,6	27	7,5	6,1	9,1	6,5	6,5	4,1	6,5	9,3	11,9	9,1	11,6	15,5	6,4

Tabulka 11 Vypočítané hodnoty koncentrací pro analyzované vzorky EVOO