

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Využití hydrodestilace a parní destilace při extrakci těkavých látek z rostlinného
materiálu

Bc. Kristýna Řebíčková

Diplomová práce

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Řebíčková**
Osobní číslo: **C16549**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Využití hydrodestilace a parní destilace při extrakci těkavých látek z rostlinného materiálu**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na využití hydrodestilace a parní destilace při získávání silic z rostlinného materiálu.
2. V experimentální části porovnejte vliv obou destilačních metod na chemické složení a antioxidační aktivitu silic získaných z levandule, bobkového listu, fenyklu a hřebíčku.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tisková**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Tomáš Bajer, 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. Karol Váňa, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

PROHLÁŠENÍ

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 7. května 2018

Bc. Kristýna Řebíčková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky, laskavý přístup, motivaci a v neposlední řadě za čas, který mi věnovala během zpracování této práce. Také velice děkuji Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D. za jeho čas, vstřícnost, cenné rady a připomínky, ochotu pomoci a poradit, kdykoliv jsem potřebovala.

Velké poděkování patří také celé mé rodině a nejbližším přátelům za velkou podporu a trpělivost při psaní této práce a během celého mého studia. Nejvíce děkuji mamince, která mi vždy věřila a poskytla mi nejlepší podmínky, abych mohla studovat. Také děkuji mému partnerovi Patrikovi za to, že to se mnou všechno vydržel a ve všem mě podpořil, i když ne vždy to bylo lehké.

ANOTACE

Předmětem diplomové práce jsou esenciální oleje. Teoretická část je zaměřena na chemické a biologické vlastnosti vybraných esenciálních olejů a jejich využití. Dále se práce zabývá izolací esenciálních olejů a jejich charakterizací plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS) a plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID). Experimentální část práce se zabývá zejména hydrodestilací a parní destilací v klasickém uspořádání a vlivem těchto extrakčních technik na složení esenciálních olejů. Esenciální oleje jsou analyzovány GC-MS a GC-FID. Dále práce sleduje antimikrobiální a antioxidační vlastnosti esenciálních olejů. Práce je zaměřena na 4 usušené matrice – květy levandule lékařské, listy vavřínu ušlechtilého, květy hřebíčkovce kořeného a semena fenyklu obecného. Antioxidační účinky esenciálních olejů byly hodnoceny metodou s difenylpikrylhydrazyllovým radikálem. Antimikrobiální účinky esenciálních olejů byly hodnoceny metodou diskového difúzního testu (DDT) ve srovnání s několika vybranými antibiotiky. V případě kvalitativní metody DDT se citlivost mikroorganismu projevuje inhibiční zónou růstu. Testy byly prováděny na čtyřech vybraných druzích mikroorganismů – *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida albicans*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Esenciální olej, levandule lékařská, vavřín ušlechtilý, hřebíčkovce kořený, fenykl obecný, hydrodestilace, parní destilace, chromatografie, antimikrobiální aktivita, antioxidační aktivita.

TITLE

Utilization of hydrodistillation and steam distillation in extraction of volatile compounds from plants.

ANNOTATION

The subject of the diploma thesis is essential oils. The theoretical part is focused on the chemical and biological properties of selected essential oils and their usage. In addition, the thesis deals with the isolation of essential oils and their characterization by gas chromatography with mass spectrometry detection (GC-MS) and gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). The experimental part deals mainly with hydrodistillation and steam distillation in a classical setup and the influence of these extraction techniques for the composition of essential oils. Essential oils are analyzed by GC-MS and GC-FID. Furthermore, the thesis follows the antimicrobial and antioxidant properties of essential oils. The work is focused on 4 dried matrices - lavender flowers, laurel leaves, clove flowers and fennel seeds. The antioxidant properties of essential oils were evaluated by diphenylpicrylhydrazyl radical method. The antimicrobial effects of essential oils were evaluated by a disk diffusion test (DDT) method compared to several selected antibiotics. In the case of the DDT qualitative method, the susceptibility of the microorganism to the growth inhibition zone is demonstrated. The tests were conducted on four selected microorganisms - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*.

KEYWORDS

Essential oil, lavender, laurel, clove, fennel, hydrodistillation, steam distillation, chromatography, antimicrobial activity, antioxidant activity.

OBSAH

Seznam tabulek	13
Seznam grafů	15
Seznam obrázků	16
Seznam příloh	17
Seznam zkratk	18
Úvod.....	20
I. Teoretická část	21
1 Esenciální oleje	21
1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti esenciálních olejů	21
1.2 Chemické složení esenciálních olejů	22
1.2.1 Hemiterpeny.....	23
1.2.2 Monoterpeny	23
1.2.3 Seskviterpeny.....	29
1.2.4 Diterpeny	29
1.2.5 Triterpeny.....	30
1.2.6 Tetraterpeny	30
1.2.7 Deriváty fenylpropenu	30
1.3 Biologické vlastnosti esenciálních olejů	30
1.3.1 Cytotoxické účinky	31
1.3.2 Antimutagenní účinky.....	32
1.3.3 Insekticidní účinky.....	32
1.3.4 Antimikrobiální aktivita.....	32
1.3.5 Antioxidační aktivita.....	33
1.4 Charakteristika a využití vybraných matric a jejich esenciálních olejů	34
1.4.1 Levandule lékařská	34
1.4.1.1 Využití levandule v kosmetice	34

1.4.1.2	Využití levandule v přírodní medicíně	34
1.4.2	Vavřín ušlechtilý	35
1.4.2.1	Využití vavřínu v kosmetice	35
1.4.2.2	Využití vavřínu v přírodní medicíně	35
1.4.3	Hřebíčkovce kořený	35
1.4.3.1	Využití hřebíčkovce v kosmetice	36
1.4.3.2	Využití hřebíčkovce v přírodní medicíně	36
1.4.4	Fenykl obecný	36
1.4.4.1	Využití fenyklu v kosmetice	37
1.4.4.2	Využití fenyklu v přírodní medicíně	37
1.5	Esenciální oleje v aromaterapii	37
2	Metody izolace, analýzy a stanovení biologických vlastností esenciálních olejů	38
2.1	Izolace esenciálních olejů	38
2.1.1	Lisování	38
2.1.2	Extrakční techniky	38
2.1.3	Destilační techniky	38
2.1.3.1	Hydrodestilace	40
2.1.3.2	Destilace vodní parou	40
2.1.3.3	Destilace podporovaná mikrovlnným ohřevem	41
2.1.3.4	Extrakce nadkritickou tekutinou	42
2.2	Mikroextrakce tuhou fází	42
2.3	Headspace analýza	43
2.4	Analýza esenciálních olejů	44
2.4.1	Plynová chromatografie	44
2.4.1.1	Instrumentace v plynové chromatografii	45
2.4.1.2	Detektory v plynové chromatografii	46
2.4.2	Hmotnostní spektrometrie	46

2.4.2.1	Způsoby ionizace	46
2.4.2.2	Hmotnostní analyzátory	47
2.4.2.3	Hmotnostní detektory	48
2.5	Stanovení antimikrobiální aktivity	48
2.5.1	Agarový diskový difúzní test	48
2.5.2	Diluční test	48
2.6	Stanovení antioxidační aktivity	49
2.6.1	Metoda s DPPH radikálem	49
2.6.2	Metoda analýzy aldehydů	50
2.6.3	Metoda TEAC	50
2.6.4	Metoda FRAP	51
II.	Experimentální část	52
3	Instrumentální analýza	53
3.1	Chemikálie	53
3.2	Vzorky	53
3.3	Přístroje a pomůcky	54
3.3.1	Přístroje	54
3.3.2	Pomůcky	54
3.3.3	Destilace vodní parou	54
3.3.3.1	Aparatura a podmínky destilace	54
3.3.4	Hydrodestilace	56
3.3.4.1	Aparatura a podmínky destilace	56
3.3.5	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí	57
3.3.5.1	Příprava vzorků k analýze	57
3.3.5.2	Podmínky analýzy	57
3.3.6	Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem	57
3.3.6.1	Příprava vzorků k analýze	57

3.3.6.2	Podmínky analýzy	58
3.4	Vyhodnocení měření a identifikace sloučenin	58
4	Stanovení biologických charakteristik.....	59
4.1	Antimikrobiální aktivita	59
4.1.1	Chemikálie	59
4.1.2	Vzorky	59
4.1.3	Přístroje a pomůcky	59
4.1.4	Příprava médií a fyziologického roztoku.....	60
4.1.4.1	Mueller-Hintonův agar	60
4.1.4.2	MALT agar	60
4.1.4.3	Fyziologický roztok.....	60
4.1.5	Modelové mikroorganismy.....	60
4.1.6	Agarový diskový difúzní test.....	61
4.2	Antioxidační aktivita.....	61
4.2.1	Chemikálie	61
4.2.2	Vzorky	61
4.2.3	Přístroje a pomůcky	61
4.2.4	DPPH test.....	62
4.2.4.1	Příprava DPPH radikálu	62
4.2.4.2	Příprava standardu a kalibrační řady	62
4.2.4.3	Příprava vzorků pro měření antioxidační aktivity	62
4.2.4.4	Měření antioxidační aktivity.....	62
5	Výsledky a diskuze	63
5.1	Vliv způsobu izolace esenciálních olejů z vybraných matric na výtěžnost	63
5.1.1	Porovnání výtěžnosti esenciálních olejů s dostupnou literaturou	64
5.2	Identifikace a kvantifikace esenciálních olejů z vybraných matric	66
5.2.1	Levandule lékařská	66

5.2.1.1	Porovnání chemického složení esenciálního oleje z levandule lékařské s dostupnou literaturou.....	68
5.2.2	Vavřín ušlechtilý.....	77
5.2.2.1	Porovnání chemického složení esenciálního oleje z vavřínu ušlechtilého s dostupnou literaturou.....	78
5.2.3	Hřebíčkovce kořený.....	88
5.2.3.1	Porovnání chemického složení esenciálního oleje z hřebíčkovce kořeného s dostupnou literaturou.....	88
5.2.4	Fenykl obecný.....	93
5.2.4.1	Porovnání chemického složení esenciálního oleje z fenyklu obecného s dostupnou literaturou.....	93
5.3	Vliv složení esenciálních olejů na jejich antimikrobiální aktivitu.....	98
5.3.1	Levandule lékařská.....	98
5.3.2	Vavřín ušlechtilý.....	99
5.3.3	Hřebíčkovce kořený.....	101
5.3.4	Fenykl obecný.....	102
5.4	Vliv složení esenciálních olejů na jejich antioxidační aktivitu.....	103
5.5	Celkové zhodnocení biologických vlastností esenciálních olejů získaných hydrodestilací a parní destilací.....	106
6	Závěr.....	107
7	Přílohy.....	109
8	Seznam použité literatury.....	117

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení monoterpenů do jednotlivých skupin a strukturní vzorce charakteristických sloučenin.....	25
Tabulka 2: Rozdělení seskviterpenů do jednotlivých skupin a strukturní vzorce charakteristických sloučenin.....	29
Tabulka 3: Strukturní vzorce charakteristických sloučeniny ze skupiny derivátů fenypropenu	30
Tabulka 4: Původ vzorků rostlinného materiálu.....	53
Tabulka 5: Podmínky destilace vodní parou.....	55
Tabulka 6: Podmínky hydrodestilace	57
Tabulka 7: Převod zastoupení jednotlivých identifikovaných složek na počet „+“; obsah jednotlivých složek byl vztažen na vnitřní standard n-nonan.....	63
Tabulka 8: Výsledky průměrné procentuální výtěžnosti esenciálních olejů se směrodatnou odchylkou z hydrodestilace a parní destilace	64
Tabulka 9: Identifikované sloučeniny v esenciálních olejích získaných parní destilací a hydrodestilací levandule lékařské a jejich procentuální zastoupení	71
Tabulka 10: Přehled porovnání extrakčních metod použitých v dostupné literatuře pro levanduli lékařskou.....	75
Tabulka 11: Identifikované sloučeniny v esenciálních olejích získaných parní destilací a hydrodestilací vavřínu ušlechtilého a jejich procentuální zastoupení	81
Tabulka 12: Přehled porovnání extrakčních metod použitých v dostupné literatuře pro vavřín ušlechtilý.....	86
Tabulka 13: Identifikované sloučeniny v esenciálních olejích získaných parní destilací a hydrodestilací hřebíčkovce kořeného a jejich procentuální zastoupení.....	90
Tabulka 14: Přehled porovnání extrakčních metod použitých v dostupné literatuře pro hřebíčkovce kořený.....	92
Tabulka 15: Identifikované sloučeniny v esenciálních olejích získaných parní destilací a hydrodestilací fenyklu obecného a jejich procentuální zastoupení	95
Tabulka 16: Přehled porovnání extrakčních metod použitých v dostupné literatuře pro fenykl obecný.....	97
Tabulka 17: Inhibiční zóny antibiotik testovaných mikroorganismů	98
Tabulka 18: Inhibiční zóny esenciálního oleje z levandule lékařské testovaných mikroorganismů.....	99

Tabulka 19: Inhibiční zóny esenciálního oleje z vavřínu ušlechtilého testovaných mikroorganismů.....	100
Tabulka 20: Inhibiční zóny esenciálního oleje z hřebíčkovce kořenného testovaných mikroorganismů.....	101
Tabulka 21: Inhibiční zóny esenciálního oleje z fenyklu obecného testovaných mikroorganismů	103
Tabulka 22: Naměřené absorbance a vypočítané inhibice radikálu standardem Troloxem ...	104
Tabulka 23: Naměřené absorbance a vypočítané inhibice DPPH radikálu a TEAC esenciálních olejů po započítání zředovacích faktorů.....	105

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Procentuální výtěžnost esenciálních olejů z rostlinného materiálu z hydrodestilace a parní destilace	64
Graf 2: Zastoupení jednotlivých tříd identifikovaných, respektive neidentifikovaných (GC-MS) a kvantifikovaných (GC-FID) sloučenin v esenciálním oleji z levandule lékařské	74
Graf 3: Zastoupení jednotlivých tříd identifikovaných, respektive neidentifikovaných (GC-MS) a kvantifikovaných (GC-FID) sloučenin v esenciálním oleji z vavřínu ušlechtilého	85
Graf 4: Zastoupení jednotlivých tříd identifikovaných, respektive neidentifikovaných (GC-MS) a kvantifikovaných (GC-FID) sloučenin v esenciálním oleji z hřebíčkovce kořeného	91
Graf 5: Zastoupení jednotlivých tříd identifikovaných, respektive neidentifikovaných (GC-MS) a kvantifikovaných (GC-FID) sloučenin esenciálním oleji z fenyklu obecného	96
Graf 6: Kalibrační graf antioxidační aktivity esenciálních olejů	105
Graf 7: Antioxidační aktivita esenciálních olejů – inhibice DPPH radikálu	105

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Biosyntéza terpenů (Převzato a upraveno z [9])	23
Obrázek 2: Postup při experimentální části diplomové práce	52
Obrázek 3: Aparatura pro parní destilaci	55
Obrázek 4: Aparatura pro hydrodestilaci	56
Obrázek 5: Diskový difúzní test levandule lékařské	99
Obrázek 6: Diskový difúzní test vavřínu ušlechtilého	100
Obrázek 7: Diskový difúzní test hřebíčkovce kořenného	102
Obrázek 8: Diskový difúzní test fenyklu obecného	103

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Chromatogram GC-MS levandule lékařská hydrodestilace.....	109
Příloha 2: Chromatogram GC-MS levandule lékařská parní destilace.....	110
Příloha 3: Chromatogram GC-MS vavřín ušlechtilý hydrodestilace.....	111
Příloha 4: Chromatogram GC-MS vavřín ušlechtilý parní destilace.....	112
Příloha 5: Chromatogram GC-MS hřebíčkovce kořený hydrodestilace.....	113
Příloha 6: Chromatogram GC-MS hřebíčkovce kořený parní destilace.....	114
Příloha 7: Chromatogram GC-MS fenykl obecný hydrodestilace.....	115
Příloha 8: Chromatogram GC-MS fenykl obecný parní destilace.....	116

SEZNAM ZKRATEK

ABTS⁺ 2,2'-anizobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát)

AOX Antioxidační

BHT 2,6-di-terc-butyl-4-metylfenol

CCM Česká sbírka mikroorganismů

DI-SPME Mikroextrakce tuhou fází s přímým vzorkováním (Z anglického Direct Immersing Solid Phase Microextraction)

DMAPP Dimethylallyl difosfát

DPPH Difenylpikrylhydrazyl

ECD Detektor elektronového záchytu (z anglického Electron Capture Detector)

EO Esenciální olej

Fe³⁺-TPTZ Fe³⁺-2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)

FFP Farnesyl fosfát

FID Plamenový ionizační detektor (z anglického Flame Ionization Detector)

FRAP Obnovení fluorescence po fotovybělení (z anglického Fluorescence recovery after photobleaching)

GC Plynová chromatografie (z anglického Gas Chromatography)

GC-MS Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

GC-FID Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem

GGPP Geranylgeranyldifosfát

GPP Geranylfosfát

HD Hydrodestilace (z anglického Hydrodistillation)

HPLC Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického High Pressure Liquid Chromatography)

HS Headspace

HS-SPME Mikroextrakce tuhou fází s headspace vzorkováním (z anglického Head-Space Solid Phase Microextraction)

IPP Isopenthyl difosfát

MASD Parní destilace podporovaná mikrovlnným ohřevem (z anglického Microwave accelerated steam distillation)

MASE Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (z anglického Microwave assisted solvent extraction)

MEP 2-methyl-erythriol-4-fosfát

MH agar Mueller-Hintonův agar

MIC Minimální inhibiční koncentrace (z anglického Minimal inhibitory concentration)

MS Hmotnostní spektrometr (z anglického Mass spectrometer)

MSD Mikrovlnná parní destilace (z anglického Microwave Steam Distillation)

MVA Mevalonátová kyselina (z anglického Mevalonate acid)

RI Retenční index

SD Parní destilace (z anglického Steam Distillation)

SFE Extrakce nadkritickou tekutinou (z anglického Supercritical Fluid Extraction)

TCD Tepelně vodivostní detektor (z anglického Thermal Conductivity Detector)

TEAC Trolox ekvivalentní antioxidační kapacita (z anglického Trolox equivalent antioxidant capacity)

TIC Celkový iontový proud (z anglického Total Ion Current)

ÚVOD

Esenciální oleje, jinak také silice, jsou směsi těkavých látek přirozeně se vyskytujících v rostlinách. Od pradávna mají tradiční využití v mnoha oborech. Tyto látky jsou z rostlin destilovány, nebo v případě citrusových plodů lisovány. Vytváří vysoce koncentrované oleje s rozmanitými účinky. Jsou známé zejména pro své hojivé, protizánětlivé, insekticidní, antimikrobiální a antioxidační účinky. V aromaterapii se využívají jako relaxační prostředek, ale také mají efektivní využití ve farmacii, potravinářství nebo kosmetice (součást parfémů a mýdel). V současnosti se diskutuje o využití esenciálních olejů při konzervaci potravin. Také je snahou nahradit syntetické pesticidy za stejně efektivní přírodní přípravky, obsahující esenciální oleje. Rovněž se uvažuje o možnosti využití přírodních esenciálních olejů, které mají mnohdy silné antimikrobiální účinky, k léčbě bakteriálních, kvasinkových či virových onemocnění. O těchto alternativách lze uvažovat díky rozmanitým vlastnostem esenciálních olejů, které již byly zmíněny.

Výroba esenciálního oleje je časově a energeticky náročný proces. Z velkého množství rostlinného materiálu se mnohdy získá pouze velmi malé množství oleje (většinou jednotky procent). Mezi nejpoužívanější metody pro získání esenciálního oleje jak v laboratorním, tak průmyslovém prostředí patří hydrodestilace a destilace vodní parou. Obě metody jsou zdoluhavé a výtěžnosti esenciálního oleje bývají velmi malé. Proto se dnes klade důraz na zefektivnění těchto metod, zejména zrychlení procesu, snížení energetické náročnosti a zvýšení výtěžnosti. Omezeně se pro získávání esenciálních olejů používají extrakce pomocí rozpouštědel. Zde je diskutovaným aspektem použití organických činidel při extrakci esenciálních olejů, kdy vzniká nežádoucí odpad, který je ekologicky nešetrný. Také z tohoto důvodu je dodnes destilace s vodou či vodní párou nejvhodnější a nejhojněji používaná k izolaci esenciálních olejů.

Cílem diplomové práce je porovnání vlivu dvou různých destilačních metod, konkrétně hydrodestilace a destilace vodní parou na chemické složení získaných esenciálních olejů z vybraných matric, včetně jejich antimikrobiálních a antioxidačních vlastností.

I. TEORETICKÁ ČÁST

V této části jsou popisovány chemické a biologické vlastnosti vybraných esenciálních olejů. Dále je popisováno jejich využití, zejména v rostlinné medicíně a kosmetickém průmyslu. V teoretické části je také popsána izolace esenciálních olejů a jejich charakterizace plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS) a plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID).

1 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Esenciální oleje, také definované jako esence, silice, těkavé oleje nebo éterické oleje, jsou složité směsi těkavých sloučenin, které jsou produkovány živými organismy a izolovány fyzikální (lisováním – citrusy a destilací) nebo chemickou cestou (extrakce rozpouštědlem) z rostliny nebo její části [1, 2]. V rostlinách se esenciální oleje vyskytují v olejových buňkách, sekrečních kanálech a dutinách nebo ve žláznatých trichomech [2]. Silice se v rostlinách tvoří v protoplazmě, rozpadem buněčných blan nebo hydrolyzou určitých glykosidů [3]. V některých případech jsou esenciální oleje vázané na sacharidy ve formě glykosidů, a proto je nutné provést před destilací enzymatickou hydrolyzu glykosidické vazby rostlinného materiálu [2]. Obsah esenciálních olejů v rostlinném materiálu je nízký, typicky 1-3 % hmotnosti rostliny, proto je i výtěžnost extrakce velmi nízká. Z toho důvodu jsou esenciální oleje poměrně drahé. Kvalita oleje získaného z určitého druhu rostlin je ovlivněna tím, kde se pěstuje a jak byl materiál zpracován. Správná sklizeň je velmi důležitá. Obsah esenciálního oleje v rostlině značně závisí na jejím růstovém stádiu a také na denní době sklizně. Pokud je rostlina sklizena v nesprávné době, výtěžek oleje nebo jeho kvalita může být značně snížena [4]. Výskyt esenciálních olejů a jejich funkce v přírodě je stále otázkou a předmětem probíhajícího výzkumu [1].

1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti esenciálních olejů

Esenciální oleje jsou příjemně vonící kapaliny olejovité konzistence [2, 5]. Jsou těkavé, rozpustné v lipidech či organických nepolárních rozpouštědlech (např. hexan), nerozpustné ve vodě. Většinou mají nižší hustotu než voda [2]. Zpravidla jsou bezbarvé, zvláště v čerstvém stavu, delším uchováváním snadno oxidují, pryskyřnatí a tmavnou. Přírodně žlutohnědé jsou silice obsahující karyofylen, zeleně nebo modře jsou zbarvené silice obsahující azulen, například oleje z heřmánku. Za normální teploty jsou kapalné, některé, například růžové a anýzové oleje, částečně tuhnou. Vyznačují se optickou aktivitou a vysokým indexem lomu

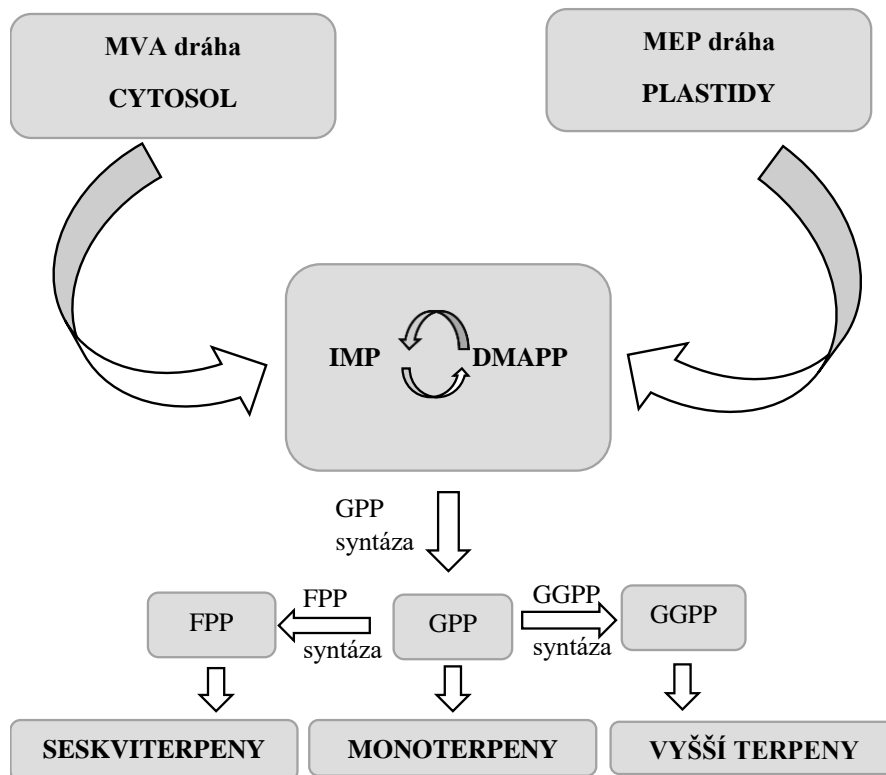
daným přítomností nenasycených látek s dvojnými a trojnými vazbami [3]. Body varu těkavých sloučenin jsou dostatečně nízké, aby bylo možné provést destilaci za atmosférického tlaku, molekulovou hmotnost mají nižší než 300 Da. Jsou hydrofobní, což umožňuje provádět destilace s použitím vody či vodní páry a snadno olej po ukončení destilace oddělit od vodné vrstvy [1]. Díky své tekutosti při pokojové teplotě jsou esenciální oleje charakterizovány z biochemického hlediska jako oleje [2].

1.2 Chemické složení esenciálních olejů

Esenciální oleje jsou velmi složité směsi, které mohou obsahovat desítky složek v poměrně odlišných koncentracích [6]. Jsou to vysoce koncentrované látky extrahované z květů, listů, stonků, plodů a kořenů rostlin [5]. Často jsou charakterizovány dvěma nebo třemi hlavními složkami v poměrně vysokých koncentracích (20-70 %) ve srovnání s ostatními složkami přítomnými v minoritním množství. Vzhledem ke způsobu extrakce, nejčastěji destilací z aromatických rostlin, obsahují esenciální oleje různé těkavé molekuly [6]. Jsou to směsi nasyčených a nenasycených uhlovodíků, alkoholů, aldehydů, esterů, etherů, ketonů, oxidů, fenolů a terpenů. Některé oleje mohou obsahovat také deriváty dusíku nebo síry – aminy, sulfidy [2]. Hlavní složkou esenciálních olejů jsou terpeny a jejich oxidovaná forma. Jsou to látky obvykle zodpovědné za charakteristickou vůni silic [5]. Terpeny jsou přírodní uhlovodíky, jejichž základní stavební jednotkou je isopren. Terpeny se dělí v závislosti na počtu uhlíků do šesti tříd. Dělí se na hemiterpeny (C₅), monoterpeny (C₁₀), seskviterpeny (C₁₅), diterpeny (C₂₀), triterpeny (C₃₀) a tetraterpeny (C₄₀). [7] Další složkou, avšak méně často se vyskytující, jsou aromatické sloučeniny odvozené od fenylypropenu [6].

Biosyntéza terpenů aromatických rostlin (Obrázek 1) probíhá dvěma cestami, které se od sebe liší způsobem vzniku základních prekurzorů terpenů – isopenthyldifosfátu (IPP) a jeho izomeru dimethylallyldifosfátu (DMAPP) [8]. První biosyntetická cesta (mevalonátová dráha) je odvozena od kyseliny mevalonátové (MVA) a dochází k ní v buněčném cytosolu. Druhá cesta je odvozena od 2-erythritol-4-fosfátu (MEP) a probíhá v plastidech buněk. Z těchto dvou cest vznikají již zmíněné prekurzory IPP a DMAPP, z nichž je dále syntetizován geranylfosfát (GPP) enzymem geranylfosfát syntázou. GPP je prekurzorem monoterpenů. Reakcí GPP s další molekulou IPP vzniká farnesylfosfát (FFP), jehož reakce je katalyzována enzymem farnesylfosfát syntázou. FFP je prekurzorem seskviterpenů. Další reakcí s IPP, katalyzovanou geranylgeranyldifosfát syntázou, vzniká prekurzor vyšších terpenů (diterpenů) geranylgeranyldifosfát (GGPP). V rostlinách tyto dvě cesty nemusí probíhat striktně odděleně,

ale mohou být i propojené [1, 5, 8, 9]. V esenciálních olejích existuje nespočet jednotlivých substancí a složení silic se velmi liší například v závislosti na stáří rostliny, klimatu, doby sklizně či na použité extrakční technice [1, 4].



Obrázek 1: Biosyntéza terpenů (Převzato a upraveno z [9])

1.2.1 Hemiterpeny


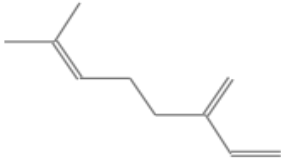
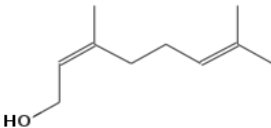
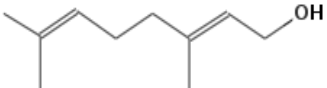
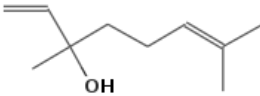
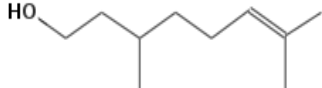
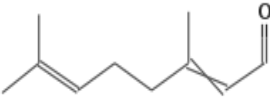
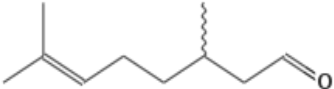
Základem hemiterpenů je jedna izoprenová jednotka obsahující 5 uhlíků. V přírodě se vyskytují zřídka. Tvoří prekurzory ostatních isoprenoidů – isopentylidifosfát a dimethylallyldifosfát. Jejich přítomnost byla prokázána v metabolizujících pletivech a buněčných extraktech [10].

1.2.2 Monoterpeny

Monoterpeny jsou složeny ze dvou izoprenových jednotek, mají 10 uhlíků. Mezi terpeny jsou nejvíce zastoupeny a jsou to lehké molekuly, které se rychle vypařují [6]. Vyskytují se ve formě acyklické, monocyklické a bicyklické jako uhlovodíky, alkoholy, fenoly, karbonyly nebo oxidy a peroxidy, jak je zobrazeno v Tabulce 1 [3]. Acyklické monoterpeny jsou relativně nestabilní a některé mají agresivní zápach díky jejich nenasycené struktuře. Cyklické monoterpeny se většinou v esenciálních olejích vyskytují ve velkém množství. Obecně přispívají poměrně málo k vůni, ale často slouží jako výchozí látky pro biologickou nebo chemickou syntézu aromatických sloučenin. Monoterpeny limonen a karvon se často používají jako přísada

do parfémů, mýdel a krémů. Oxidované deriváty monoterpenů jsou důležitější než terpenické uhlovodíky pro svůj aromatický zápach [4].

Tabulka 1: Rozdělení monoterpenů do jednotlivých skupin a strukturní vzorce charakteristických sloučenin

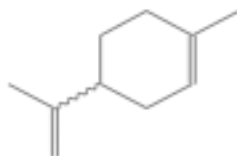
ACYKLICKÉ				
UHLOVODÍKY	 <p>Ocimen</p>		 <p>Myrcen</p>	
ALKOHOLY	 <p>Nerol</p>	 <p>Geraniol</p>	 <p>Linalool</p>	 <p>Citronellol</p>
ALDEHYDY	 <p>Citral</p>	 <p>Citronellal</p>		

MONOCYKLIKÉ

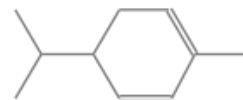
UHLOVODÍKY



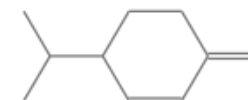
α -Terpinen



Limonen



α -Fellandren

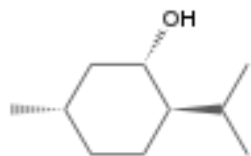


Fellandren

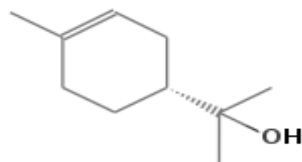


p-Cymen

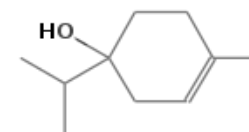
ALKOHOLY,
FENOLY



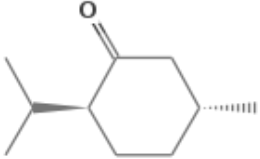
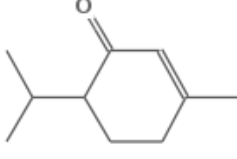
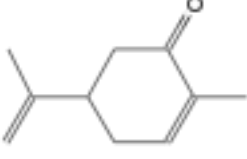
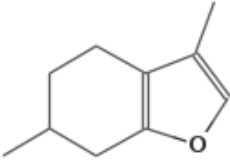
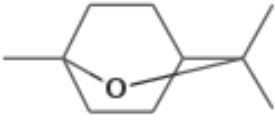
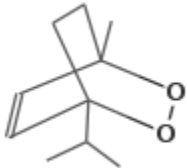
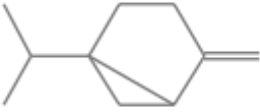
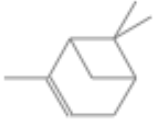

Menthol

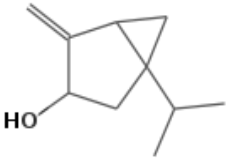
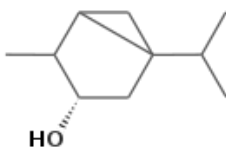
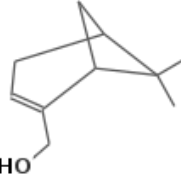
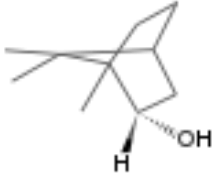
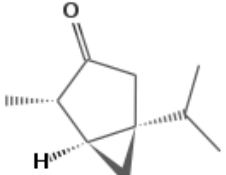
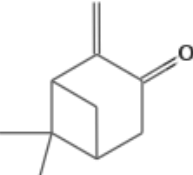
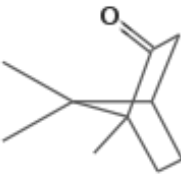
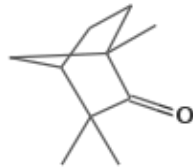


α -Terpineol



Terpinen-4-ol

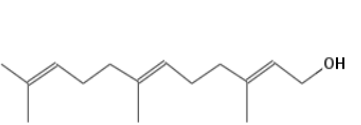
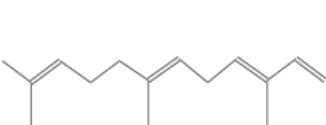
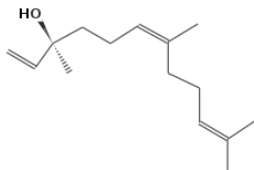
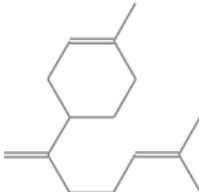
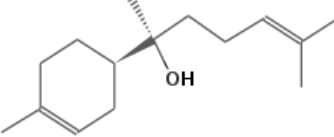


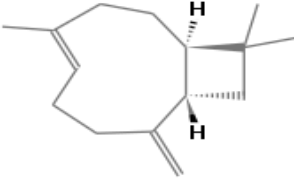
KETONY	 <p>Menthon</p>	 <p>Piperiton</p>	 <p>Karvon</p>
OXIDY, PEROXIDY	 <p>Menthofuran</p>	 <p>Eukalyptol</p>	 <p>Askaridol</p>
BICYKLICKÉ			
UHLOVODÍKY	 <p>Sabinen</p>	 <p>α-Pinen</p>	 <p>β-Pinen</p>

<p>ALKOHOLY</p>	 <p>Sabinol</p>	 <p>Thujol</p>	 <p>Myrtenol</p>	 <p>Borneol</p>
<p>KETONY</p>	 <p>Thujon</p>	 <p>Pinokarvon</p>	 <p>Kafr</p>	 <p>Fenchon</p>

1.2.3 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou složeny ze tří izoprenových jednotek a obsahují 15 uhlíků. Vzhledem k vyššímu počtu uhlíků mají v porovnání s monoterpeny vyšší bod varu. Přispívají méně k vůni, na rozdíl od monoterpenů [6]. Stejně jako monoterpeny se vyskytují ve formě acyklické, monocyklické, bi- a tricyklické, jak je zobrazeno v Tabulce 2 [3].

Tabulka 2: Rozdělení seskviterpenů do jednotlivých skupin a strukturální vzorce charakteristických sloučenin

ACYKLIKÉ		
 Farnesol	 Farnesen	 Nerolidol
MONOCYKLIKÉ		
 Bisabolen	 Bisabolol	 Humulen
BI- A TRICYKLIKÉ		
 Kopaen	 β -Karyofyllen	

1.2.4 Diterpeny

Diterpeny jsou složeny ze čtyř izoprenových jednotek a mají ve své molekule 20 uhlíků. Jejich prekurzorem je geranylgeranyoldifosfát [9]. Vyskytují se ve formě acyklické, monocyklické, bi-, tri- a tetracyklické. Acyklické diterpeny se v přírodě příliš nevyskytují. Patří sem například geranylinalol nebo fytol. Mezi bi-, tri- a tetracyklické diterpeny patří některé významné hořčiny a látky tvořící součást balzámů a silic, například kyselina pimarová [10]. V esenciálních olejích

se vyskytují výjimečně, a to pouze ve formě vedlejších produktů, nebo se nevyskytují vůbec [11].

1.2.5 Triterpeny

Triterpeny jsou látky složené z šesti izoprenových jednotek, mající 30 uhlíků ve své molekule. Částečným odbouráváním triterpenů vznikají steroidy [10]. V esenciálních olejích se vykytují minimálně. Příkladem je lanosterol [12].

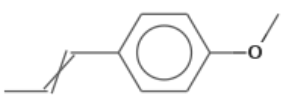
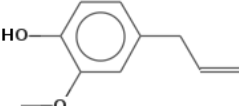
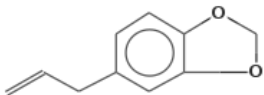
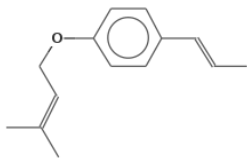
1.2.6 Tetraterpeny

Tetraterpeny jsou sloučeniny složené z osmi izoprenových jednotek, mající 40 uhlíků. Vznikají kondenzací dvou diterpenů. Nejdůležitějšími tetraterpeny jsou karotenoidy, například β -karoten. Stejně jako di – a triterpeny se vyskytují v esenciálních olejích výjimečně [10, 12].

1.2.7 Deriváty fenylpropenu

Do této skupiny se řadí aromatické sloučeniny odvozené od fenylpropenu. Tyto deriváty se vyskytují v esenciálních olejích méně oproti terpenům [6]. Jsou odvozeny od biosyntetické dráhy kyseliny šikimové [1]. Patří mezi ně například anetol, eugenol, safrol a foenikulin, které jsou zobrazeny v Tabulce 3 [3].

Tabulka 3: Strukturální vzorce charakteristických sloučeniny ze skupiny derivátů fenylpropenu

DERIVÁTY FENYLPROPENU			
 Anetol	 Eugenol	 Safrol	 Foenikulin

1.3 Biologické vlastnosti esenciálních olejů

Esenciální oleje mají rozmanité biologické vlastnosti. Jsou baktericidní, virucidní, fungicidní, antiparazitární, antioxidační a insekticidní [6, 13, 14]. Mají také vlastnosti antiseptické, analgetické, sedativní, antiflogistické, spasmolytické a lokálně i anestetické [6]. Některé silice obsahují sloučeniny dráždící kůži (zčervenání a pocit tepla). Jsou to esenciální oleje obsahující více karvakrolu, eukalyptolu, citronellalu, pinenu, limonenu a kafru. Například kafra je díky

těmto vlastnostem součástí mastí a liniment¹ proti revmatickým a neuralgickým bolestem. Jiné složky silic, například α -bisabolol, mají protizánětlivé účinky. Esenciální oleje lze také použít jako stomachika, které slabým podrážděním žaludeční sliznice zvyšují sekreci žaludečních šťáv a reflektoricky tak zvyšují chuť k jídlu a trávení. Patří sem aromatické esenciální oleje, které se rovněž používají jako dochucovadla, například oreganový či rozmarýnový olej. Antiseptické a desinfekční vlastnosti mají například eugenol, karvakrol či eukalyptol. Jako insekticid se používá kafr [3]. Do deodorantů se přidává například farnesol, který zabraňuje pocení [16]. V současnosti hrají silice několik důležitých rolí zejména v potravinovém průmyslu. Esenciální oleje jsou přirozenými antioxidanty, inhibitory potravinových patogenů, organoleptickými činidly a činidly snižujícími toxicitu potravin [6].

Je třeba mít na paměti, že esenciální oleje jsou komplexní směsi látek. Je otázkou, zda jsou jejich biologické účinky výsledkem synergického působení všech molekul, nebo odrážejí pouze vliv hlavních složek. Podle studie Ipek a kol. hlavní složky velmi dobře ukazují biofyzikální a biologické vlastnosti esenciálních olejů, ze kterých byly izolovány. Z čehož vyplývá, že účinnost esenciálního oleje závisí na koncentraci hlavních složek oleje. Synergické působení složek esenciálního oleje se zdá být sporné, je však možné, že aktivita majoritních složek je modulována minoritními složkami oleje. Je pravděpodobné, že některé složky esenciálních olejů hrají roli například při definování vůně, hustoty, struktury či barvy [6].

1.3.1 Cytotoxické účinky

Esenciální oleje, jako typické lipofilní látky, procházejí buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou, narušují strukturu různých vrstev polysacharidů, mastných kyselin a fosfolipidů a permeabilizují je. Cytotoxicita je tedy charakteristická právě takovým poškozením cytoplazmatické membrány. Většina esenciálních olejů je sice cytotoxická, avšak není mutagenní [6].

U bakterií je permeabilizace membrány spojena se ztrátou iontů a snížením membránového potenciálu, kolapsem protonové pumpy a deplecí zásobníku adenosintrifosfátu. Esenciální oleje mohou způsobit koagulaci cytoplazmy a poškodit lipidy a proteiny. Poškození buněčné stěny může vést k úniku makromolekul až k lýze buněk [6].

V eukaryotických buňkách mohou esenciální oleje vyvolat depolarizaci mitochondriální membrány snížením membránového potenciálu, ovlivněním iontového cyklu vápenatých iontů

¹ Linimentum je speciální přípravek určený k aplikaci na kůži, jinak také balzám. [15]

a dalších iontových kanálů a redukcí pH gradientu. Tento sled reakcí ovlivní protonovou pumpu a produkci adenosintrifosfátu. Membrány se stanou abnormálně propustné. Změna propustnosti membrány vede k úniku radikálů, cytochromu C, vápenatých iontů a bílkovin. Následuje oxidativní stres organismu a bioenergetické selhání. Poté nastává smrt buněk apoptózou nebo nekrózou. Tyto buněčné pochody lze pozorovat skenovací elektronovou mikroskopií [6].

1.3.2 Antimutagenní účinky

Terpenické a terpenické fenolové sloučeniny z aromatických rostlin pravděpodobně zasahují do oprav DNA pomocí intracelulárních prooxidačních reakcí, mají tedy antimutagenní účinky. Například α -bisabolol inhibuje mutagenезi vyvolanou aflatoxinem B1, 2-aminoantracénem, benzopyrenem a 2-aminofluorem. Esenciální oleje z levandule silně inhibují mutagenезi indukovanou 2-nitrofluorem. Mechanismus snížení mutagenity závisí na typu mutagenu, ne na typu esenciálního oleje [6].

1.3.3 Insekticidní účinky

Esenciální oleje se jeví jako možná náhrada za syntetické pesticidy, například při skladování sušeného ovoce, ořechů, fazolí atd. Některé plynné pesticidy, které se používají při skladování těchto potravin, například methylbromid, jsou od roku 2004 v mnoha zemích zakázány kvůli porušování ozonové vrstvy. Syntetické pesticidy jsou často toxické, avšak vysoce účinné a hospodárné. Je důležité najít vhodnou náhradu za tyto pesticidy, která by nebyla ekologicky závadná a byla stejně účinná. O mnoha bylinách a jejich extraktech je známo, že mají insekticidní vlastnosti. Bylinné látky používané jako insekticidy představovaly v roce 2007 pouze 1 % světového trhu s insekticidy. V posledních letech se ale zvýšil zájem o botanické insekticidy v důsledku obav o životní prostředí a hmyzu rezistentního na konvenční chemikálie. Esenciální oleje z různých rostlin mají ovicidní, larvicidní a repelentní vlastnosti proti různým druhům hmyzu a jsou považovány za ekologicky šetrné pesticidy. Ayvaz A. a kol. došli ve své studii insekticidních vlastností vybraných esenciálních olejů, které testovali na různých druzích hmyzu k závěru, že insekticidní účinky lze připsat hlavním složkám, jako jsou linalool, linalylacetát a eukalyptol. Dále konstatovali, že insekticidní účinnost esenciálních olejů se mění v závislosti na stádiu růstu hmyzu, jeho druhu a rostlinném původu esenciálního oleje [17].

1.3.4 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální látka se podle serveru MedicineNet.com definuje jako: „*Obecný termín pro léky, chemikálie nebo jiné látky, které buď zabíjejí nebo zpomalují růst mikrobu*“.

Mezi antimikrobiální látky patří antibakteriální léčiva, antivirotika, antifungální činidla a antiparazitika [18]. Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů z rostlin tvoří základ pro mnoho aplikací. Využívá se ke konzervaci syrových či zpracovaných potravin, léčiv a také se využívá v alternativní medicíně [19]. Jednou z nejzávažnějších hrozeb úspěšné léčby mikrobiálních onemocnění, je rozšiřování patogenů rezistentních vůči léčivům. Esenciální oleje jsou předmětem výzkumu pro jejich možné využití k alternativnímu léčebnému postupu mnoha infekčních onemocnění [20]. Bylo prokázáno, že sloučeniny obsažené v esenciálních olejích z rostlin mají specifickou i obecnou antibakteriální, antifungální a antivirotickou aktivitu a antibiotický potenciál [21, 22]. Obecně je antimikrobiální aktivita závislá na přítomnosti a množství jednotlivých složek v esenciálních olejích. Antimikrobiální aktivita je nejúčinnější u esenciálních olejů obsahujících látky fenolové povahy. Fenolické sloučeniny jsou aktivní proti širokému spektru mikroorganismů, na rozdíl od uhlovodíků, které mají antimikrobiální aktivitu nejmenší [23]. Fenolické sloučeniny, například eugenol, denaturují proteiny a reagují s fosfolipidy na buněčné membráně, kde mění jejich permeabilitu [24]. Antimikrobiální účinky se hodnotí diskovou difúzní nebo mikrodiluční metodou [25, 26].

1.3.5 Antioxidační aktivita

Esenciální oleje mají antioxidační vlastnosti [6, 27]. Některé studie však ukazují, že v eukaryotických buňkách mohou působit jako prooxidanty ovlivňující intracelulární membrány a organely, jako jsou mitochondrie. V závislosti na typu a koncentraci vykazují také cytotoxické účinky na živé buňky, ale jsou obvykle nemutagenní, jak bylo popsáno výše. V některých případech mohou esenciální oleje díky antimutagenním účinkům indukovat změny v intracelulárním redoxním potenciálu a mitochondriálních dysfunkcích. V souhrnu mají silice z části také prospěšné účinky v důsledku prooxidačních účinků na buněčné úrovni [6]. Antioxidační aktivita esenciálních olejů se jeví jako možné východisko k prevenci a zpomalení oxidace lipidů, která vede k rozvoji nežádoucí příchutě potravin. Zkracuje trvanlivost a přijatelnost potravin. Mimo jiné také snižuje bezpečnost a nutriční kvalitu potravin vytvářením potencionálně toxických produktů [28]. Některé syntetické antioxidanty, jako je například butyl hydroxyanisol nebo propylgalát, které se přidávají do potravin obsahující lipidy, jsou potencionálně zdraví nebezpečné. Mohou mít karcinogenní účinky. Toto zjištění vedlo k hledání přirozených antioxidantů vyskytujících se v rostlinách jako alternativa k syntetickým antioxidantům [28, 29]. Přírodní antioxidanty jsou stále rozšířenější v potravinách. Výhodné je použití koření a bylin, které slouží jako ochucovadlo a zároveň mají antioxidační a antiseptickou účinnost, například hřebíček nebo bobkový list. Antioxidační

esenciální oleje jsou rozšířeny také v preventivní medicíně, kde jsou jedním z důležitých zdrojů při léčbě onemocnění spojených s oxidačním poškozením [30].

1.4 Charakteristika a využití vybraných matric a jejich esenciálních olejů

1.4.1 Levandule lékařská

Levandule lékařská (*Lavandula officinalis* L.) je silně aromatický trvalý polokeř patřící do čeledi *Lamiaceae*. Dorůstá do výšky 60 cm [31]. Její květy jsou fialové a mají tradiční využití v mnoha odvětvích. Levandule je známá pro svou příjemnou vůni a léčivé a aromaterapeutické účinky. Je nedílnou součástí různých kosmetických produktů [32-35]. Levandule se pěstuje zejména v Bulharsku a Francii, v menším rozsahu v Maroku, bývalých oblastech Jugoslávie, Maďarsku, Itálii, Rusku, Ukrajině a Turecku [25]. Silice z levandulového oleje mají antimikrobiální a antioxidační účinky, jak prokázalo několik studií [36, 37]. O levandulovém esenciálním oleji se také hovoří jako o možném konzervačním prostředku potravin, díky jeho biologickým vlastnostem [32]. Esenciální olej získaný z levandule lékařské je bezbarvý a skládá se především z linalylacetátu, linalolu, eukalyptolu a dalších složek [25, 26, 35].

1.4.1.1 Využití levandule v kosmetice

Levandule se používá do koupelí jako vonná osvěžující přísada. Esenciální olej se používá jako parfémová přísada do mýdel, krémů a koupelových přísad. Hojně se uplatňuje při výrobě luxusních parfémů. Dále se přidává do bylinných masek na obličej, avšak pouze v malém množství, protože ve velkém množství dráždí pokožku [38]. Hydrolát získaný při destilaci z levandule lze použít jako pleťovou vodu nebo vodu po holení. Podporuje buněčnou regeneraci a přirozené funkce pleti, uklidňuje nervózní pleť a zmírňuje začervenání [16].

1.4.1.2 Využití levandule v přírodní medicíně

Levandule se používá v aromaterapii k léčbě nespavosti, úzkosti a psychosomatických onemocnění. Zklidňuje a harmonizuje činnost centrálního a autonomního nervového systému. Na rozdíl od léků na spaní navozuje přirozený, posilující spánek, po kterém se člověk cítí odpočatý. Dále zlepšuje trávení, protože má mírné karminativní a protikřečové účinky na střeva a používá se k léčbě zánětu tlustého střeva [39]. V rostlinné medicíně se dá také využít k léčbě deprese či jako sedativum. Používá se k léčbě kožních poruch, včetně ran, popálenin a vředů. Ve studii kolektivu Djemaa, F.G.B. zjistili, že léčba mastí z levandule lékařské významně

zvysuje míru kontrakce rány (98 %) a proteosyntézu. Z jejich výsledků je patrné, že masti z levandule lékařské je možné použít pro účinnou léčbu poraněné tkáně [32-35].

1.4.2 Vavřín ušlechtilý

Vavřín ušlechtilý (*Laurus nobilis*) je stálezelený strom nebo keř patřící do čeledi *Lauraceae*. Dorůstá do výšky až 12 m. Jeho listy jsou známé jako bobkový list, který se používá zejména jako koření a dochucovadlo v potravinářském průmyslu, ale má využití také v kosmetice. Vavřín pochází z oblasti jižní Evropy a Středomoří. Pěstuje se hlavně v Evropě a Spojených státech amerických jako ozdobná a léčivá rostlina [40]. Silice z bobkového listu mají antimikrobiální a antioxidační vlastnosti, jak prokázalo několik studií [41, 42]. Největší zastoupení v chemickém složení esenciálního oleje získaného z bobkového listu má eukalyptol, sabinen a linalool [40, 43].

1.4.2.1 Využití vavřínu v kosmetice

Vavřínové silice při zevním použití prokrvují pokožku, proto se přidává jako aromatická přísada do koupelí [38].

1.4.2.2 Využití vavřínu v přírodní medicíně

Vavřín se v rostlinné medicíně používá ke zlepšení trávení. Dále je mírně močopudný a stimuluje a upravuje menstruaci. Olej z vavřínu je velmi účinný při zevním použití na revmatickou bolest a má rovněž protizánětlivé účinky. Balzám z vavřínového oleje se používá k masírování ztuhlé šíje, bederního ústřelu, ischiasu, vymknutého kotníku a dalších bolestí svalů a kloubů [39]. V íránské lidové medicíně byly listy vavřínu používány k léčbě epilepsie, neuralgie a parkinsonismu. Listy a ovoce vavřínu mají aromatické, stimulační a narkotické vlastnosti. Orálně se používají k léčbě gastrointestinálních problémů (epigastrické nadýmání, plynatost) a navíc se dají použít také ke zmírnění hemeroidních bolestí [40].

1.4.3 Hřebíčkovce kořený

Hřebíček je sušený kalich s poupětem hřebíčkovce kořeného (*Syzygium aromaticum*) a patří do čeledi *Myrtaceae*. Tradičně se používá jako dochucovadlo, antimikrobiální aditivum do potravin nebo přísada do parfémů [24, 44]. Druh původem pochází z vulkanických ostrovů ve východní části Indonésie, která je vedle Madagaskaru a Zanzibaru jedním z největších producentů hřebíčku. Strom je středně velký, stálezelený, do výšky dosahuje až 20 m a průměr kmene dospělých rostlin může dosáhnout až 30 cm. Hlavními produkty hřebíčku jsou celé

nebo mleté pupeny a z nich získaný esenciální olej. Pupeny hřebíčku se sklízí ve chvíli, kdy dosáhnou své plné velikosti a zbarví se do červena. Po sklizni jsou pupeny odděleny od stonků ručně nebo strojem a ihned jsou vysušeny na slunci nebo v umělé sušičce. Pokud by byly pupeny špatně skladovány, mohlo by dojít ke ztrátě olejů, růstu plísní a vzniku zápachu. Pupeny hřebíčku obsahují 15-20 % esenciálního oleje z celkové hmotnosti [44]. Esenciální olej z hřebíčku má antibakteriální, antifungální, insekticidní a antioxidační vlastnosti. Má rovněž terapeutické účinky, včetně analgetických, antispasmodických a antiseptických [24, 45, 46]. Hřebíček má také fytotoxický potenciál, který lze použít u různých zemědělských rostlin. Principem fytotoxicity je inhibice růstu primárních meristémů rostlin poškozením plazmatické membrány. [45] Silice mají nažloutlou barvu, lehce dohněda [24]. V esenciálním oleji jsou nejvíce zastoupeny eugenol, eugenylacetát a karyofylen [24, 45].

1.4.3.1 Využití hřebíčkovce v kosmetice

Silice z hřebíčku se přidává do ústních vod, toaletních mýdel, olejů na vlasy a deodorantů. V kosmetice plní funkci voňavé látky a desinfekčního prostředku. Přidává se rovněž do parfémů [38].

1.4.3.2 Využití hřebíčkovce v přírodní medicíně

Silice z hřebíčku funguje jako ústní dezinfekce a analgetikum. Doporučuje se při zánětu sliznice dutiny ústní nebo zánětu dásní. Při bolesti zubů způsobené zubním kazem se aplikuje přímo na postižené místo, kde dočasně zmírňuje bolest. Esenciální olej z hřebíčku lze použít také jako povzbuzující prostředek, ale má mnohem mírnější účinky než kofein [39]. Funguje také proti zvracení nebo k posílení správné činnosti ledvin. Léčí se jím například houbové infekce kůže nebo hyperpigmentace [24, 45, 46]. V Koreji byl esenciální olej z hřebíčku úspěšně použit pro léčbu astma a alergií perorálním podáním [24].

1.4.4 Fenykl obecný

Fenykl (*Foeniculum vulgare*) je jednoletá, dvouletá nebo trvalá aromatická bylina patřící do čeledi *Apiaceae*. Používá se jako koření, ochucovadlo, aroma a přidává se do likérů, kosmetiky a léků [47]. Roste na kyprých, hlubokých půdách bohatých na živiny a s obsahem vápníku a dorůstá do výšky 1,5-2 m. Kvete v červenci až začátkem října a jeho semena se sbírají před začátkem mrazů, respektive než zhnědnou [16]. Pochází z jižní Evropy a oblasti Středomoří [47]. Fenykl je široce pěstován v mírných a subtropických oblastech světa. Hlavními producenty jsou Francie, Německo, Rusko, Itálie, Indie a Spojené státy americké

[48]. Pěstuje se také v Egyptě a roste divoce v mnoha oblastech Sahary. Stejně jako ostatní zmíněné esenciální oleje má antioxidační, antibakteriální, antifungální a insekticidní účinky. Hlavní složky esenciálního oleje jsou fenchon, limonen, anetol a pinen [47].

1.4.4.1 Využití fenyklu v kosmetice

Fenyklový nálev, připravený ze semen fenyklu a vody, se používá jako pleťová voda na mastnou pleť. Dále se fenyklový nálev doporučuje k umývání mastných vlasů a přidává se do posilujících koupelí prokrvujících pokožku těla. Esenciální olej, nebo pouze jeho složka anetol, se přidává do zubní pasty, ústní vody, mýdla a vody po holení [38]. V přírodní léčivé kosmetice se přidává do očních krémů, kde uklidňuje oční okolí, dále zmírňuje alergické reakce pleti, nebo se používá ve formě masážních olejů, které uvolňují křeče svalstva [16].

1.4.4.2 Využití fenyklu v přírodní medicíně

Fenykl se používá zejména ke zmírnění nadýmání, protože usnadňuje odchod plynů a stimuluje peristaltiku střev. Má mírně projímavé účinky. Zlepšuje trávení tím, že napomáhá vyprazdňování žaludku. Dále usnadňuje vykašlávání při zánětech průdušek a nachlazení [39, 49].

1.5 Esenciální oleje v aromaterapii

Už od pravěku je lidem známa léčivá síla rostlin, kterou využívá aromaterapie, což je jeden ze způsobů fytoterapie². Při léčbě inhalačním způsobem molekuly esenciálního oleje při vstupu do dýchacího ústrojí dráždí čichové buňky a následně putují do plic a krevního oběhu. Čichové buňky jsou neurony, které převádějí zprávu o vůni na elektrické impulzy, které jsou posílány do různých částí mozku – amygdaly a hippocampu ve spánkovém laloku (centrum čichové paměti), talamu (centrum emocí), a hypofýzy (regulační centrum produkce hormonů). Spojení čichového ústrojí s talamem, hypotalamem a hypofýzou vysvětluje, proč mají vůně tak výrazný harmonizační účinek na neurohormonální soustavu. Pro dosažení pozitivních výsledků v léčbě by měla aromaterapie esenciálními oleji probíhat alespoň po dobu tří týdnů. Oleje se aplikují difúzí nebo se užívají vnitřně. Dále je lze použít k aromatickým masáží či do koupele [39].

² Fytoterapie je léčba léky rostlinného původu.

2 METODY IZOLACE, ANALÝZY A STANOVENÍ BIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

Rostlinný materiál je před samotným procesem získávání esenciálního oleje často ještě upravován. Příprava materiálu se liší podle zpracovávané matrice. Některé materiály, zejména květiny, by měly být destilovány co nejrychleji po sběru. Mnoho bylin je před destilací sušeno, navíc usušená semena, kůry a kořeny lze skladovat několik měsíců před zpracováním. Při sušení je nutné věnovat pozornost teplotě, neboť při vyšších teplotách může docházet ke ztrátám esenciálních olejů obsažených v rostlinách. Například listy je dobré sušit v polostínu a neměly by být nahromaděny na sobě, protože by nemuselo docházet k sušení, naopak by mohlo být vyvolána nežádoucí fermentace. Z čehož vyplývá, že je rovněž důležité při sušení hlídat vlhkost [4].

2.1 Izolace esenciálních olejů

V současnosti existuje několik technik, které je možné použít pro izolaci esenciálních olejů z rostlin. Lze použít tradiční hydrodestilaci a destilaci vodní parou za normálního tlaku nebo zvýšeného tlaku, extrakci rozpouštědlem (hexan, dichlormethan [35]), extrakci nadkritickou tekutinou nebo hydrotermální extrakci. Dále lze pro citrusové plody použít lisování [43, 50].

2.1.1 Lisování

Lisování je jednou z nejstarších technik používaných k extrakci esenciálních olejů z citrusů. Na citrusovou kůru je aplikován tlak za normální teploty. Pod tlakem se mechanicky narušují olejové buňky rostlin a uvolňuje se esenciální olej, který se následně oddělí [51].

2.1.2 Extrakční techniky

Extrakce je separační technika založená na přechodu složky směsi dvou nemísitelných fází fázovým rozhraním z jedné fáze (plynné, kapalné nebo tuhé) do druhé fáze (kapalné nebo tuhé). Extrakce se provádí často nejen za účelem separace, ale také za účelem zakoncentrování analytu z relativně velkého objemu fáze analytu do malého objemu extrakčního činidla [52].

2.1.3 Destilační techniky

Hydrodestilace (HD) a destilace vodní parou (SD) jsou nejpoužívanější metody k získání esenciálních olejů z rostlin. Zjednodušeně řečeno je principem destilace s vodou nebo vodní

párou přeměna kapalně fáze za dané teploty varu vypařováním na plynnou fázi, přičemž v chladiči destilačního zařízení se pára ochladí a kondenzuje. Vodní pára funguje jako nosič esenciálního oleje [1].

Destilace je metoda oddělování kapalin v roztoku za použití rozdílů v bodech varu. Oddělení složek z kapalně směsi destilací závisí na rozdílech v bodech varu jednotlivých složek. Destilační proces závisí na tlaku par charakteristického pro každou látku. Tlak par čisté látky je tlak vyvíjený látkou proti vnějšímu tlaku, obvykle atmosférickému a je měřítkem tendence kondenzované látky uniknout z kondenzované fáze. Čím větší tlak par je, tím větší je tendence kondenzované látky k odpařování. Jakmile tlak par kapalně látky dosáhne vnějšího tlaku, dochází k varu látky. V rovnováze je proces odpařování kompenzován stejným množstvím kondenzace [4].

Destilace se skládá z několika kroků – dosažení bodu varu, sběr vzorku, čištění. Jak bylo zmíněno výše, teplota varu čisté kapaliny je definována, jako teplota, při níž se tlak par kapaliny vyrovná tlaku atmosférickému. Teplota varu směsi je funkcí tlaků par různých složek ve směsi. Nečistoty buď zvyšují nebo snižují pozorovanou teplotu varu vzorku v závislosti na interakci nečistot se sloučeninou, pro kterou se měří bod varu. Destilací směsi, která obsahuje dvě různé látky, se v podstatě zahřívá roztok na teplotu mezi dvěma teplotami varu. Více těkavá látka se stane plynem, zatímco méně těkavá látka zůstane kapalinou. Plyn těkavé látky je odváděn do chladiče, kde kondenzuje a kapalina je odváděna do separátoru. Destilace neprodukuje extrémně čisté složky, což mnohdy vyžaduje, aby se destilovaný produkt dále chemicky separoval [4].

Kvalita a výtěžky esenciálních olejů závisí jednak na typu izolační techniky, ale také na řadě agronomických faktorů. Závisí na podmínkách, ve kterých jsou rostliny pěstovány, zejména pak na klimatických podmínkách, typu půdy, vodním stresu, působení hmyzu a mikroorganismů, na procesu pěstitelství, době sklizně nebo způsobu skladování rostlinného materiálu. Rovněž závisí také na postupu zpracování vzorku před zpracováním [1, 53]. Například H. B. Sowbhagya a kol. upravili vzorek rostlinného materiálu enzymatickou hydrolýzou a následně použili konvenční destilační metodu (SD a HD), aby dosáhli lepší výtěžnosti a kvality esenciálního oleje. Předúprava vzorku enzymatickou hydrolýzou podle nich také zlepšuje aroma esenciálního oleje [54-56]. HD, SD nebo extrakce rozpouštědlem mají při získávání esenciálních olejů několik nevýhod, jako je tepelný rozklad extraktů, jejich kontaminace rozpouštědly nebo zbytky rozpouštědel. Znečištění rostlinného

materiálu rozpouštědlem může mít ekologický dopad na životní prostředí ve formě znečištění [47]. V průmyslové výrobě se klade důraz, vedle zlepšení kvality olejů a ekologických dopadů, také na zvýšení procentuální výtěžnosti, protože rostlinný materiál je poměrně drahý a výtěžky jsou malé [48].

2.1.3.1 Hydrodestilace

Hydrodestilace je nejjednodušší a nejlevnější metoda destilace [4]. Při hydrodestilaci je rostlinný materiál ponořený do vroucí vody. Rostlinný materiál při varu pohltí část vody. Následně podle principu osmózy esenciální olej, který je obsažený v olejových buňkách rostlin projde přes buněčnou stěnu zpět do vody v destilační baňce. Tato směs je varem odpařena a v chladiči páry směsi zkondenzují. V separační části aparatury se oddělí organická fáze (silice) od vodné (hydrolát) [1]. Separace esenciálního oleje od hydrolátu je důležitou fází, a to jak pro hydrodestilaci, tak všechny ostatní destilační techniky, neboť se jedná o velmi malá množství olejů a maximální efektivita je klíčem k ziskovosti. Většina éterických olejů je lehčí než voda, tudíž plave na jejím povrchu. Některé oleje jsou však hustší než voda a klesají dolů, například silice heřmánku. Po oddělení by měl být esenciální olej skladován v hnědých skleněných lahvích, těsně uzavřen bez přístupu kyslíku, který by mohl měnit jejich vonné vlastnosti [4].

Příkladem použití hydrodestilace je práce F. M. Hammouda a kol., kteří extrahovali esenciální olej z fenylku třemi metodami, a to hydrodestilací, extrakcí nadkritickým CO₂ a mikrovlnnou extrakcí. Při hydrodestilaci bylo předloženo 100 g fenylku do 1000 ml destilované vody v destilační aparatuře. Destilace trvala 3 hodiny. Vydestilovaný esenciální olej ze všech třech extrakčních metod byl poté uskladněn v tmavé nádobce při 4 °C, dokud nebyly vzorky analyzovány GC-MS. Výtěžnost esenciálního oleje získaného hydrodestilací byla 0,98 %, zatímco výtěžnost z SFE a mikrovlnné extrakce byla vyšší – přesahovala 2 %. Kvalitativní složení všech třech extraktů bylo stejné, ale kvantitativní složení bylo odlišné [47].

2.1.3.2 Destilace vodní parou

Parní destilace je metoda destilace sloučenin, která se upřednostňuje při destilaci termolabilních sloučenin. Typicky se jedná o aromatické sloučeniny [4]. Vodní pára vzniká v destilační baňce a prochází přes destilovaný materiál (rostlinný materiál), kde se obohatí o esenciální olej. Jak pára stoupá přes rostlinný materiál, způsobuje otevření olejových membrán a uvolnění esenciálních olejů. Jednotlivé složky oleje se odpařují a odvádí se do chladiče, kde pára nakonec

zkondenzuje a v separátoru poté dojde k oddělení organické fáze od vodné. Vydestilovaný olej se většinou drží na povrchu vodní fázi, proto jej lze lehce odebrat [1, 4].

Příkladem použití parní destilace je studie Zheljaskov a kol., kde zkoumali vliv doby destilace vodní parou na výtěžnost a chemické složení esenciálního oleje z levandule lékařské. Při parní destilaci bylo předloženo 250 g usušených květů levandule lékařské do 2000 ml destilované vody v destilační aparatuře. Destilace byly provedeny v rozmezí 1,5 – 240 minut a sledovala se výtěžnost a procentuální zastoupení jednotlivých složek esenciálního oleje. Hlavními identifikovanými složkami byli eukalyptol, fenchol, kafr a linalylacetát. Procentuální zastoupení složek se individuálně měnilo s dobou destilace. Výtěžnost esenciálního oleje byla v rozmezí 0,5 – 6,8 %. Maximální výtěžnosti bylo ve studii dosaženo při destilaci trvající 60 minut [57].

2.1.3.3 Destilace podporovaná mikrovlnným ohřevem

Destilace podporovaná mikrovlnným ohřevem (MASE), je modifikovaná SD či HD, kde je na vzorek s vodou aplikován mikrovlnný ohřev [43, 58]. Rozdíly mezi konvenčními destilacemi a MASE jsou zejména ve vynaložené energii potřebné k zisku EO, jak uvádí G. Flamini a kol. ve své publikaci. Vzorek usušeného bobkového listu byl nastříhán a vložen do 1000 ml baňky, která obsahovala 650 ml destilované vody a magnetické míchadlo. Byla emitována mikrovlnná energie do 800 W při 2450 MHz v pulsním vlnovém režimu a maximálním výkonu 8 kW a energie 300 W v kontinuálním režimu po dobu 1 h. Výtěžnost EO MASE v pulsním režimu činila 0,654 % a byla nižší v porovnání s klasickou HD, kde byla výtěžnost 0,784 %. Naopak u MASE v kontinuálním režimu byla výtěžnost nejvyšší 1,132 %. Z čehož vyplývá, že nejúčinnější se jeví MASE v kontinuálním režimu [43].

F. Chemat a kol. porovnávali výtěžnosti a složení EO z levandule vyextrahovaného parní destilací podporovanou mikrovlnným ohřevem (MASD) a klasickou SD. V obou případech bylo naváženo 50 g usušených levandulových květů, přidáno 200 ml destilované vody. MASD trvala 10 minut, zatímco SD 60 minut. Obě destilace byly provedeny za atmosférického tlaku při 100 °C. Výtěžnost obou extraktů byla téměř srovnatelná (MASD – 8,86 %, SD – 8,75 %) stejně jako složení a procentuální zastoupení složek oleje. Z tohoto zjištění vyplývá, že MASD značně ušetří čas a energii, na rozdíl od klasické SD [58].

2.1.3.4 Extrakce nadkritickou tekutinou

Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) je variantou extrakce tuhé látky kapalinou. Pokud má plyn vyšší teplotu, než je jeho kritická teplota a je na něj aplikován dostatečně vysoký tlak (MPa), pak přechází do stavu tzv. nadkritické tekutiny. Nadkritická tekutina neboli fluidum, má některé vlastnosti typické pro plyny (viskozita), jiné pro kapaliny (hustota). Je výhodná pro extrakci tuhých látek právě díky její nízké viskozitě, protože vzorkem dobře proniká. Nejčastěji se pro extrakci nadkritickou tekutinou používá oxid uhličitý, který je nepolární, proto je vhodný pro extrakci nepolárních látek [52]. Jeho hlavní výhodou je environmentální neškodnost a zachování organoleptických vlastností rostlinného materiálu [24]. Extrakce se provádí při mírné teplotě (nad 31 °C), díky tomu mohou být tepelně labilní sloučeniny získány bez rozkladu. Další výhodou je, že extrakt je absolutně zbaven rozpouštědla, protože CO₂ je při pokojové teplotě plynný [4].

F. M. Hammouda a kol. extrahovali fenykl při tlaku 20 MPa, teplotě 50 °C po dobu 15 minut ve statickém módu a následně 3 hodiny v dynamickém módu s průtokem CO₂ 1 l·min⁻¹. Získali 2,2 % výtěžnost EO, která byla vyšší než výtěžnost HD (0,98 %) a nižší než výtěžnost mikrovlnnou extrakcí (2,8 %), které byla použity pro porovnání [47].

Výzkumy poukazují na možnost náhrady konvenčních destilací extrakcí nadkritickou tekutinou, kdy jsou získávány čisté extrakty s přírodní vůní, bez chemické změny způsobené teplem a vodou. Oproti extrakcím rozpouštědly neobsahují zbytky rozpouštědla a nežádoucí sloučeniny jako jsou organické a anorganické soli, cukry, aminokyseliny a třísloviny [26].

2.2 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází je velmi jednoduchá a účinná metoda pro přípravu vzorku bez použití rozpouštědel, která má široké využití. SPME se rutinně používá ve spojení s plynovou chromatografií či vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Tato technika se často využívá pro analýzu silic v rostlinných materiálech. Slouží však pouze ke kvalitativním nebo semikvantitativním analýzám. Nevýhodou této metody je nemožnost průmyslového využití (nelze získat extrakt pro další využití, např. při výrobě kosmetických produktů) [59, 60].

Pro extrakci se používá tenké křemenné vlákno, které je potaženo vhodným sorbentem umístěným v duté ocelové jehle [59, 60]. Analyty ze vzorku se přímo extrahují a zakoncentrovávají na stacionární fázi (sorbent). Analyt se na vlákno buď adsorbuje nebo absorbuje, v závislosti na použitém sorbentu. Při SPME můžeme použít dva typy

vzorkování, a to přímé vzorkování nebo tzv. headspace vzorkování. Při přímé SPME, označované zkratkou DI-SPME, je vlákno přímo ponořeno do vzorku. Při headspace SPME, označované zkratkou HS-SPME, je vlákno přímo v kontaktu s plynem nad vzorkem umístěným v temperované nádobce. Headspace vzorkování se s výhodou používá u „špinavých“ matric jako jsou kaly či biologické tekutiny. Výhodou je, že při tomto uspořádání není chromatografický systém zanášen nečistotami. Po uplynutí požadované doby extrakce (od desítek minut po několik hodin) je vlákno zataženo do ocelové jehly a vpraveno do nástřikového prostoru chromatografu. Desorpce analytu z vlákna probíhá v případě GC tepelně. V případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie je analyt eluován mobilní fází. Typ sorbentu se volí podle polaritý a těkavosti analytu. Polární sorbenty se používají pro polární analyty a nepolární sorbenty se používají pro nepolární analyty, stejně jako stacionární fáze při plynové chromatografii [59]. Výhodou SPME je, že všechny kroky konvenční extrakce jsou integrovány do jednoho kroku a jednoho zařízení, což značně zjednodušuje a urychluje postup přípravy vzorku [60].

2.3 Headspace analýza

Headspace (HS) technika ve spojení s plynovou chromatografií je základní a velmi často používaná technika pro stanovení těkavých látek ve vzorku. Je založena na těkavosti stanovovaných látek, kdy dochází k rozdělení analytu mezi netěkavou kapalnou nebo tuhoun fází a parní fází nad kapalným nebo tuhým vzorkem. Headspace vzorkováním se zajistí selektivní extrakce silic bez dalších složek matrice, které by dále mohly ovlivňovat vlastní stanovení plynovou chromatografií a zatěžovat chromatografický systém [50, 61, 62]. Headspace analýza může být prováděna dvěma způsoby, a to staticky a dynamicky.

Při statické headspace technice je vzorek v nádobce temperován, dokud se nevytvoří rovnováha mezi kapalnou a plynnou fází. Poté je odebrán známý objem plynné fáze, který je převeden na chromatografickou kolonu. Důležitým aspektem pro přesnost tohoto uspořádání analýzy je využití automatických dávkovacích systémů, které výrazně zlepšují opakovatelnost metody. Při statické headspace je pro vytvoření rovnováhy mezi fázemi důležitá vhodná kombinace teploty a doby temperování vzorku [62].

Při dynamické headspace technice je do prostoru nad vzorkem přiváděn inertní plyn, na rozdíl od statické headspace. Vzorek je kontinuálně extrahován inertním plynem, který následně prochází sorpční trubicí, kde jsou zachycovány uvolněné těkavé látky. Poté je sorbent v sorpční

trubicí rychle zahřát a těkavé látky jsou uvolněny a převedeny na chromatografickou kolonu [61, 62].

2.4 Analýza esenciálních olejů

Pro charakterizaci EO je požadována vysoká citlivost a specifita použité analytické metody. Vzhledem k tomu, že složky esenciálních olejů jsou těkavé a nepolární, stala se nejpoužívanější metodou pro analýzu EO plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Pro stanovení procentuálního zastoupení složek esenciálního oleje se používá plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem [35, 63].

2.4.1 Plynová chromatografie

Podstatou plynové chromatografie je separace složek směsi mezi pohyblivou a nepohyblivou fází. Je vhodná pro analýzu těkavých látek, které je možné převést do plynného stavu. Principem je opakované ustavování rovnováhy analytu mezi dvěma fázemi, tzv. mobilní a stacionární fází [52]. Mobilní fází je v případě plynové chromatografie plyn, nejčastěji helium nebo dusík [35, 46, 53]. Stacionární fáze je zakotvena v koloně a rozlišujeme fáze polární a nepolární [52, 62]. Analyt je unášen mobilní fází kolonou, kde dochází k separaci. Při průchodu vzorku kolonou dochází k jeho opakované interakci se stacionární fází. Komponenty vzorku jsou touto opakovanou interakcí selektivně brzděny ve svém pohybu a míra brzdění je úměrná vazebné síle dané interakce [52, 64].

Vlastní analýza esenciálního oleje se provádí separací látek plynovou chromatografií a identifikací v hmotnostním detektoru [26, 58, 65]. Látky je možné identifikovat dvěma způsoby. První způsob identifikace je na základě porovnání hmotnostního spektra s dostupným standardem. Druhým způsobem je identifikace látek řízená programem pomocí dostupných knihoven spekter jednotlivých sloučenin. V knihovnách spekter jsou uvedena pouze ta spektra sloučenin, které byly v hmotnostním spektrometru ionizovány elektronovou ionizací při ionizační energii 70 eV. Používá se například knihovna spekter Národního institutu pro standardy a technologii (NIST'14 Mass Spectral Library) nebo Wiley knihovna (Wiley Registry™ of Mass Spectral Data, 11th Edition) [40, 57]. Pro potvrzení identity sloučeniny může sloužit tzv. retenční index. Výpočet retenčního indexu podle van den Doola a Kratze je uveden níže (1). Pro výpočet je nezbytné stanovit retenční časy homologické řady alkanů analyzované za stejných separačních podmínek jako vzorek. Vypočítaný retenční index dané

sloučeniny identifikované pomocí knihovny spekter se porovná s retenčním indexem dané sloučeniny dostupným z literatury [57].

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

RI je retenční index analyzované složky, t_x je retenční čas analyzované složky, t_n je retenční čas členu homologické řady s počtem uhlíků n , t_{n+1} je retenční čas členu homologické řady s počtem uhlíků $n+1$.

V případě stanovení relativního zastoupení jednotlivých složek esenciálního oleje se analýza provádí pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem [6]. Chromatograf s FID detektorem bývá vybaven a nastaven na stejný teplotní program jako v případě GC-MS analýzy. Pro spárování s identifikovanými sloučeninami z GC-MS analýzy se používají Van den Doolovy retenční indexy. Nebo lze píky v GC-FID chromatogramech identifikovat a kvantifikovat komerčně dostupnými standardy, které však bývají dostupné pouze pro malou část složek daného EO [46, 57].

2.4.1.1 Instrumentace v plynové chromatografii

Základními částmi plynového chromatografu jsou zásobník nosného plynu s regulátorem průtoku, prostor pro nástřik vzorku, dávkovač, chromatografická kolona umístěná v termostatu a detektor napojený na počítač s vyhodnocovacím programem. Termostat umožňuje individuální nastavení teplotního programu separace [52]. Vzorek v plynném i kapalném stavu je dávkován do chromatografu mikrostríkačkou přes silikonovou těsnicí gumu (septum), které uzavírá vnitřní prostor nástřikového bloku. Teplota v dávkovacím prostoru by měla přesahovat bod varu nejméně těkavé analyzované složky vzorku alespoň o 50 °C, aby nedocházelo ke kondenzaci vzorku. Nosný plyn, který je v plynové chromatografii mobilní fází, hraje důležitou roli. Musí být suchý, bez obsahu kyslíku, nehořlavý a chemicky inertní. Nejčastěji je používáno helium nebo dusík [66]. Na kolonu je možné převést jen velmi malé množství vzorku, řádově 0,01-0,1 μ l, podle zvoleného typu kolony. Z tohoto důvodu je často nutno v injektoru oddělit daný podíl vzorku mimo kolonu (tzv. split režim, splitovací poměr). Množství vzorku přivedeného na kolonu lze libovolně měnit v nastaveném poměru, čímž se omezuje přesycení kolony i detektoru. V plynové chromatografii se používají zejména kapilární separační kolony, nejčastěji vyrobeny z křemenné kapiláry o vnitřním průměru 50-350 μ m. Na vnitřní stěně kapilární kolony je nanesena stacionární fáze, kterou je zakotvená netěkavá kapalina. Součástí instrumentace je také počítač s programem, který umožňuje

zpracování signálu podle retenčních dat složek analytu. Výsledný záznam chromatografické analýzy se nazývá chromatogram [52].

2.4.1.2 Detektory v plynové chromatografii

Mezi nejpoužívanější detektory v plynové chromatografii patří plamenový ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD) a hmotnostní detektor (MS) [67]. Nejstarší používaný detektor je univerzální tepelně vodivostní detektor (TCD) [52]. Hmotnostnímu detektoru bude věnována samostatná kapitola.

2.4.1.2.1 Plamenový ionizační detektor

Vzorek obsahující organické látky se spaluje ve vodíkovém plameni se vzduchem, kde je ionizován. Ionizační mechanismus v plamínku FID je založen na termální emisi iontů, které vznikají během procesu spalování. Molekuly organických látek jsou v plamenu štěpeny na fragmenty iontového, nebo radikálového typu. Fragmenty se na první elektrodě nabíjí na určitý potenciál a přitahuje je druhá elektroda, kde odevzdají svůj náboj. Mezi elektrodami začne protékat měřený proud, který je přímo úměrný počtu iontů ve vzorku [52].

2.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Principem hmotnostní spektrometrie je interakce nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Hmotnostní spektrometry mají několik modifikací a vždy se skládají ze tří základních částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor. Tyto tři části jsou ve vysokém vakuu [68]. Molekuly vzorku jsou ionizovány a rozštěpeny na jednotlivé fragmenty, které se liší poměrem hmotnosti a náboje. Výsledkem detekce těchto fragmentů je hmotnostní spektrum neznámé látky. Hmotnostní spektra se zpravidla zobrazují v normované podobě, to znamená, že znázorňují poměrné zastoupení fragmentů v souboru vzhledem k nejpočetněji zastoupenému fragmentu. Vzhledem k tomu, že při ionizaci vznikají zpravidla fragmenty o jednotkovém náboji, lze z polohy jednotlivých fragmentů ve spektru odečíst jejich relativní molekulové hmotnosti a z polohy molekulového iontu relativní molekulovou hmotnost sloučeniny. Abychom mohli neznámou sloučeninu identifikovat, vyhodnotí se hmotnostní spektrum neznámé látky a porovná se s hmotnostním spektrem známých sloučenin [52].

2.4.2.1 Způsoby ionizace

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice v plynné fázi. Analyt vstupuje do iontového zdroje společně s maticí a vznikají z něj kladně nebo záporně

nabité ionty – molekulární, aduktové nebo v případě méně stabilních látek fragmenty ionizované molekuly. Ionizační techniky lze rozdělit podle dodané energie na měkké a tvrdé. Při tvrdé ionizaci, která se používá ve spojení GC-MS získá ionizovaná molekula nadbytek vnitřní energie a dojde k fragmentaci molekulového iontu na menší části. Řadí se mezi ně elektronová ionizace, která je založena na principu předávání energie letících elektronů molekulám analytu a je „nejtvrdší“ ionizační technikou. Měkké ionizační techniky jsou šetrnější a ionizovaná molekula získá mnohem menší energii oproti tvrdé ionizaci. V hmotnostním spektru jsou pak viditelné deprotonované nebo protonované molekuly a minimum fragmentovaných iontů. Příkladem měkké ionizační techniky je chemická ionizace. Volba ionizační techniky značně závisí na charakteru analytu [68, 69]. U esenciálních olejů se k ionizaci používá elektronové ionizace, která je vhodnější než chemická ionizace, protože umožňuje porovnání hmotnostních spekter látek s knihovny spekter [46, 63].

2.4.2.2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory jsou klíčovou součástí hmotnostního spektrometru a dochází v nich za vysokého vakua (10^{-3} až 10^{-11} Pa) k separaci iontů v plynné fázi na základě poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Analyzátory využívají k separaci statické nebo dynamické elektrické či magnetické pole nebo jejich kombinaci [68, 69]. Analyzátory se podle fyzikálního principu dělí do několika skupin [68, 69]:

- zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický a elektrický analyzátor),
- různá stabilita oscilací iontů ve dvoj-, nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól, iontová past),
- různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu),
- různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu,
- různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová rezonance).

Dále se iontové analyzátory mohou dělit podle způsobu dělení iontů [68, 69]:

- skenující,
- iontové pasti,
- průletové,
- analyzátory pohyblivosti iontů.

2.4.2.3 Hmotnostní detektory

Ionty jsou po separaci detekovány v hmotnostním detektoru. Jako detektory se používají elektronové fotonásobiče, fotonásobiče a Faradayova klec [68].

2.5 Stanovení antimikrobiální aktivity

Po kultivaci mikroorganismu, možného potenciálního patogenu, je důležité stanovit jeho specifickou citlivost na antibiotika, případně jiné látky s antimikrobiálním účinkem, pro výběr vhodné antimikrobiální terapie [70]. Metody určení antimikrobiální aktivity se dělí na kvalitativní – difúzní a metody kvantitativní – diluční. Hodnotí se schopnost růstu mikroorganismu za přítomnosti látky s antimikrobiálním účinkem. Kvalitativní difúzní metody slouží k semikvantitativnímu zjištění citlivosti bakterií na antimikrobiální látky. Principem těchto metod je difúze antimikrobiální látky ze zdroje do okolí, čímž vznikne klesající koncentrační gradient bránící růstu mikroorganismů do vzdálenosti inhibiční zóny. Kvantitativní difúzní metody slouží k určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotika, respektive zkoumané látky s antimikrobiálním účinkem [70, 71].

2.5.1 Agarový diskový difúzní test

Na inokulovanou Petriho misku se aplikují sterilní disky, které buď obsahují, nebo se naplní požadovaným množstvím antimikrobiální látky, v tomto případě esenciálním olejem. Následně se sleduje růst, respektive inhibice růstu mikroorganismu v okolí aplikovaného disku. Velikost inhibiční zóny růstu je závislá na koncentraci a rychlosti difúze EO v disku. Inhibiční zóna se změří a udává se v délkových jednotkách, nejčastěji milimetrech [70].

2.5.2 Diluční test

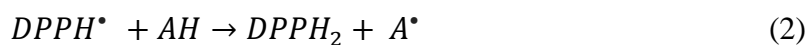
Kvantitativní diluční test se provádí ve zkumavkách, které obsahují kultivační médium s koncentrační řadou antimikrobiální látky. Takto připravené kultivační médium s EO se naočkuje testovaným mikroorganismem a po kultivaci se sleduje MIC, tj. nejmenší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismu. MIC je nejčastější vyjádření účinnosti antimikrobiální látky inhibovat růst mikroorganismu [70]. Vzhledem k nízké rozpustnosti EO ve vodném médiu může být toto stanovení MIC nesprávné [1].

2.6 Stanovení antioxidační aktivity

K měření antioxidační (AOX) aktivity lze použít několik analytických metod, které jsou založeny na různých principech a mají různé modifikace. Dělí se na metody založené na eliminaci radikálů (například metoda s difenylpicrylhydrazylem (DPPH test)) a metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek (metody chemické a elektrochemické). Výsledky AOX aktivity se nejčastěji srovnávají podle celkové antioxidační aktivity (TAA). Tento parametr kvantifikuje schopnost antioxidantů odbourávat radikály [72, 73].

2.6.1 Metoda s DPPH radikálem

Tato metoda s radikálem difenylpicrylhydrazylem (DPPH) je jednou ze základních analytických metod pro stanovení AOX aktivity čistých látek i směsných vzorků. Metoda je jednoduchá a časově nenáročná. Princip metody spočívá v reakci testované látky se stabilním DPPH radikálem, při níž je tento radikál redukován podle rovnic (2) a (3). Stabilní DPPH radikál je redukován podle rovnice (2) antioxidantem (AH) na bezbarvý komplex DPPH₂ a volný radikál antioxidantu (A^{*}). DPPH radikál může být redukován také radikálem (R^{*}) podle rovnice (3) a odbarví roztok za vzniku komplexu DPPHR.



Ve spektrofotometru se sleduje pokles absorbance při 517 nm a to buď po uplynutí stanoveného konstantního času, nebo se pracuje v kinetickém režimu [72]. Jako standardy se používají například α -tokoferol, Trolox nebo 2,6-di-terc-butyl-4-methylfenol (BHT) [26]. Celková AOX aktivita se vyjadřuje jako úbytek absorbance, nebo v ekvivalentech použitého standardu [72].

K určení antioxidační aktivity je možné použít také kombinaci DPPH radikálové metody s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Spektrofotometricky se detekuje pík DPPH radikálu v blanku a v roztoku s antioxidantem. Výhodné je použití kombinace DPPH radikálové metody s HPLC u silně zbarvených vzorků, kdy se na rozdíl od samotné spektrofotometrie zbarvení vzorku eliminuje [74].

L. T. Danh a kol. určovali pomocí DPPH metody antioxidační aktivitu levandulového esenciálního oleje získaného extrakcí nadkritickou tekutinou a hydrodestilací. Bylo smícháno 40 μ l esenciálního oleje z levandule s 0,4 ml 0,5 mM DPPH v absolutním ethanolu ve zkumavkách, které byly zakryty alobalem a doplněny na celkový objem 1,5 ml. Kontrola

byla připravena z 0,4 ml 0,5 mM DPPH v absolutním etanolu a byla doplněna na celkový objem 1,5 ml. Pro srovnání byly zvoleny dva standardy (α -tokoferol a BHT), které byly zpracovány stejným způsobem jako vzorky esenciálního oleje (40 μ g standardu). Všechny zkumavky byly protřepávány při pokojové teplotě po dobu 30 minut a poté byla změřena absorbance při 517 nm za použití UV-Vis spektrofotometru. Lepší AOX aktivitu vykazoval esenciální olej získaný SFE (60 – 70% inhibice radikálu DPPH), než EO získaný HD (40 – 50% inhibice radikálu DPPH). Standard α -tokoferol měl 70 – 80% inhibici radikálu DPPH. BHT standard měl o něco menší inhibiční vliv (60 – 70%) na DPPH radikál než α -tokoferol, ale srovnatelný s extraktem získaným SFE [26].

2.6.2 Metoda analýzy aldehydů

Metoda analýzy aldehydů, respektive karboxylové kyseliny je jednoduchá ve srovnání s typickými testy pro stanovení AOX aktivity látek či jejich směsí. Princip je založen na inhibičním účinku vzorku při oxidaci aldehydu na karboxylovou kyselinu. U těkavých látek, které jsou rozpustné v organických činidlech, lze snadno změřit jejich AOX potenciál. AOX aktivita aldehydu (hexanal) je sledována při tomto testu po dobu 40 dnů a srovnávají se píky vzorku a vnitřního standardu (undekanu) získané GC [28].

K. G. Lee a kol. stanovovali AOX aktivitu silic tymiánu a bazalky tímto testem a ke vzorku EO přidali 2 ml dichlormethanového roztoku hexanal o koncentraci 3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ obsahujícího 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ undekanu jako vnitřního standardu. Oxidace takto upraveného vzorku byla zahájena zahříváním při teplotě 60 °C po dobu 10 minut v uzavřené nádobě. Poté byla nádoba skladována při pokojové teplotě. Nádoba se vzorkem byla po dobu 10 dnů každých 24 hodin čištěna čistým vzduchem. Pokles hexanal byl sledován vždy po 5 dnech GC. Pro srovnání byly použity standardy BHT a tokoferol. Ze studie vyplynulo, že esenciální oleje z tymiánu a bazalky mají srovnatelnou AOX aktivitu jako použité standardy [28].

2.6.3 Metoda TEAC

Metoda používající kation-radikál ABTS⁺ (2,2'-anizobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát)) je jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové AOX aktivity. Princip je založen na testování schopnosti vzorku zhaset kation-radikál ABTS⁺. Tato metoda je označována také jako Trolox ekvivalentní antioxidační kapacita (TEAC), protože výsledná AOX aktivita vzorku se srovnává se standardem Troloxem. Antioxidanty

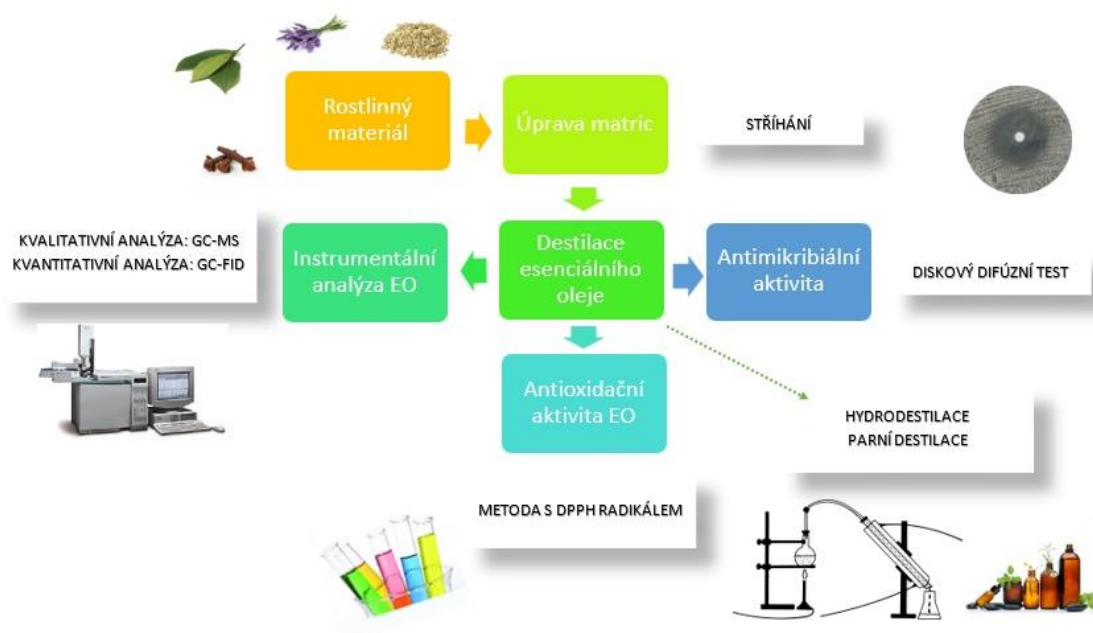
se chovají jako donory vodíku a zhášení kation-radikálu se sleduje spektrofotometricky při 734 nm [72].

2.6.4 Metoda FRAP

Jedná se o chemickou metodu stanovení AOX aktivity, která je založena na principu redoxní reakce. Při této metodě redukují antioxidanty obsažené ve vzorku komplex Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) (Fe^{3+} -TPTZ). Spektrofotometricky se měří nárůst absorpance při 593 nm, který odpovídá množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ vznikajícího reakcí s antioxidanty ve vzorku. Metoda sleduje pouze schopnost vzorku redukovat ion Fe^{3+} a nemusí být shodná s celkovou AOX aktivitou [72].

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této části diplomové práce bude popisován experimentální postup. Usušený rostlinný materiál byl upraven stříháním, případně ponechán v původním stavu a dále byl zpracován destilací vodní parou a hydrodestilací. Získaný esenciální olej byl analyzován za použití GC-MS a GC-FID. Ze získaných chromatogramů bylo na základě retenčních indexů a porovnání s knihovnamí spekter zjištěno kvalitativní složení EO (GC-MS). Z GC-FID chromatogramů bylo vypočítáno relativní zastoupení jednotlivých složek EO. Dále byla stanovena antioxidační aktivita esenciálních olejů metodou s DPPH radikálem a antimikrobiální aktivita olejů agarovou diskovou difúzní metodou na vybraných mikroorganismech. Výše uvedený postup experimentu je na obrázku 2.



Obrázek 2: Postup při experimentální části diplomové práce

3 INSTRUMENTÁLNÍ ANALÝZA

3.1 Chemikálie

- Demineralizovaná voda – čištěna systémem Mili-Q^R (Merck KGaA, Darmstadt, Německo),
- *n*-hexan CHROMASOLVTM, čistota ≥ 97 %, jako rozpouštědlo (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika),
- standard uhlovodíků C8-C40, rozpuštěny v *n*-hexanu (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika),
- vnitřní standard *n*-nonan, rozpuštěn v *n*-hexanu (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika).

3.2 Vzorky

Pro extrakci esenciálního oleje byly použity následující vzorky – květy levandule lékařské, listy vavřínu ušlechtilého, květy hřebíčkovce kořeného a semena fenyklu obecného. Český a latinský název vzorků rostlin, včetně jejich původu je uveden v tabulce 4. Vzorky byly uchovány v uzavíratelných pytlích do doby destilace. Květy levandule, květy hřebíčku a semena fenyklu byly k destilaci použity celé. Bobkové listy byly nastříhány na asi 0,5 cm velké kusy.

Tabulka 4: Původ vzorků rostlinného materiálu

Název rostliny	Latinský název	Čeleď	Původ	Firma
Levandule lékařská	<i>Lavandula officinalis L.</i>	<i>Lamiaceae</i>	Chorvatsko	Mediate, s.r.o. (Libchavy, ČR)
Vavřín ušlechtilý	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Lauraceae</i>	Brazílie	Kasia Vera, s.r.o. (Říčany, ČR)
Hřebíček kořený	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Myrtaceae</i>	Madagaskar	Kasia Vera, s.r.o. (Říčany, ČR)
Fenykl obecný	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Apiaceae</i>	Česká republika	Kasia Vera, s.r.o. (Říčany, ČR)

3.3 Přístroje a pomůcky

3.3.1 Přístroje

- Aparatura pro destilaci vodní parou,
- aparatura pro hydrodestilaci,
- topné hnízdo LTHS 2000 (Brněnská Drutěva, Brno, Česká republika),
- laboratorní váhy (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Německo),
- plynový chromatograf GC 2010 s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 Plus (obojí Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a autosamplerem pal-Combi (CTC Analytics AG, Zwingen, Švýcarsko),
- plynový chromatograf GC 2010 s plamenovým ionizačním detektorem a autosamplerem AOC-20i (obojí Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

3.3.2 Pomůcky

- Stříčka na demineralizovanou vodu,
- kádinky různých objemů,
- mikrostříkačka o objemu 25 μ l a 250 μ l,
- nádobky z tmavého skla s uzávěrem, nádobky pro analýzu,
- odměrný válec 500 ml.

3.3.3 Destilace vodní parou

3.3.3.1 Aparatura a podmínky destilace

K destilaci vodní parou byla použita aparatura podle obrázku 3 s destilační baňkou o objemu 2000 ml. Destilační baňka byla naplněna přibližně 1500 ml demineralizované vody, která byla během destilace doplňována a zahřívána topným hnízdem. Na destilační baňku navazoval destilační nástavec válcovitého tvaru opatřený sítkou, který obsahoval navážený vzorek. Vydestilované složky oleje s vodní parou odcházely do chladiče, kde byla směs ochlazená. Vzniklý destilát byl zachycen ve sběrném zařízení s vývodem na odtok hydrolátu, která ústila do sběrné kádinky o objemu 1000 ml. Extrakt v podobě esenciálního oleje byl po oddělení od vodné fáze převeden pomocí stříkačky do tmavé nádobky s víčkem a byl uskladněn v lednici při 4 °C, do doby analýzy.

Nástavec pro parní destilaci byl naplněn odpovídajícím množstvím rostlinného materiálu, viz tabulka 5. Množství vzorku bylo voleno podle objemu nádoby a každá destilace byla

provedena dvakrát. Destilace probíhala do té doby, dokud se destiloval esenciální olej. Čas destilace se pohyboval v rozmezí 260 – 345 minut a objem hydrolátu se pohyboval v rozmezí 1,7 – 2 l, rychlost destilace se pohybovala v rozmezí 5,3 – 6,7 ml·min⁻¹, vše shrnuto v tabulce 5.



Obrázek 3: Aparatura pro parní destilaci

Tabulka 5: Podmínky destilace vodní parou

Vzorek – experiment 1,2	Navážka (g)	Hydrolát (l)	Doba destilace (min)	Rychlost destilace (ml·min⁻¹)
Levandule lékařská 1	53,9	1,7	260	6,5
Levandule lékařská 2	56,4	1,7	260	6,5
Vavřín ušlechtilý 1	70,7	1,8	280	6,4
Vavřín ušlechtilý 2	70,5	1,8	340	5,3
Hřebíčkovce kořený 1	100,3	2,0	345	5,8
Hřebíčkovce kořený 2	100,3	2,0	315	6,3
Fenykl obecný 1	100,4	1,8	270	6,7
Fenykl obecný 2	100,6	1,8	270	6,7

3.3.4 Hydrodestilace

3.3.4.1 Aparatura a podmínky destilace

K hydrodestilaci byla použita aparatura podle obrázku 4 s destilační baňkou o objemu 2000 ml. Do destilační baňky byla předložena navážka vzorku a odpovídající množství demineralizované vody. Demineralizovaná voda byla během destilace doplňována a zahřívána společně s rostlinným materiálem topným hnízdem. Vydestilované složky esenciálního oleje s vodou putovaly do chladiče. Vzniklý kapalný destilát byl zachycen ve sběrném zařízení s vývodem na odtok hydrolátu, která ústila do sběrné kádinky o objemu 1000 ml. Extrakt (EO) byl oddělen od vodní fáze a uskladněn stejným způsobem jako v případě SD.

Množství vzorku pro hydrodestilaci (viz tabulka 6) bylo voleno podle navážky vzorku na parní destilaci (tak, aby bylo možné provést porovnání obou metod). Každá destilace byla provedena dvakrát. Destilace probíhala do té doby, dokud se destiloval esenciální olej. Čas destilace se pohyboval v rozmezí 220 – 310 minut a objem hydrolátu se pohyboval v rozmezí 1,7 – 2 l, průměrná rychlost destilace byla $6,9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, vše shrnuto v tabulce 6.



Obrázek 4: Aparatura pro hydrodestilaci

Tabulka 6: Podmínky hydrodestilace

Vzorek – experiment 1,2	Navážka (g)	Hydrolát (l)	Doba destilace (min)	Rychlost destilace (ml·min ⁻¹)
Levandule lékařská	53,8	1,7	220	7,7
Levandule lékařská 2	56,4	1,7	220	7,7
Vavřín ušlechtilý 1	70,6	1,8	270	6,7
Vavřín ušlechtilý 2	71,0	1,8	295	6,1
Hřebíčkovec kořený 1	100,2	2,0	270	7,4
Hřebíčkovec kořený 2	100,6	2,0	310	6,5
Fenykl obecný 1	101,7	1,8	270	6,7
Fenykl obecný 2	100,7	1,8	270	6,7

3.3.5 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

3.3.5.1 Příprava vzorků k analýze

Vzorky esenciálního oleje byly ředěny pro analýzu GC-MS následujícím způsobem: 5 µl esenciálního oleje bylo ředěno *n*-hexanem na objem 1 ml.

3.3.5.2 Podmínky analýzy

GC-MS analýza vzorků byla provedena na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem. Chromatograf byl vybaven kapilární kolonou ZB-5HT Inferno o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Jako nosný plyn bylo použito helium 5.0 (firma Linde, Praha, Česká republika). Separace látek probíhala při konstantní lineární rychlosti nosného plynu 30 cm·s⁻¹. Teplotní program byl nastaven na počátku na 40 °C po dobu 3 minut, poté byl termostat vyhříván na teplotu 250 °C rychlostí 2 °C·min⁻¹ a finální teplota byla udržována po dobu 10 minut. Teplota nástřiku a převodníku do detektoru byla nastavena na 200 °C. Dávkován byl vždy 1 µl vzorku se splitem 1:50. Hmotnostní spektrometr byl provozován v režimu elektronové ionizace, ionizační energie byla 70 eV a byly měřeny ionty v rozsahu *m/z* 33-500.

3.3.6 Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem

3.3.6.1 Příprava vzorků k analýze

K analýze GC-FID byl nejprve připraven vnitřní standard *n*-nonan (pro všechny vzorky stejný) odměřením 5 µl *n*-nonanu a doplnění *n*-hexanem na objem 1 ml. Z takto připraveného vnitřního

standardu bylo odměřeno 5 μ l, přidáno 5 μ l esenciálního oleje a opět doplněno *n*-hexanem na objem 1 ml.

3.3.6.2 Podmínky analýzy

GC-FID analýza vzorků byla provedena na plynovém chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem. Chromatografické podmínky byly totožné jako u GC-MS analýz. Teplota nástřiku byla nastavena na 200 °C a teplota detektoru na 260 °C. Dávkovaný objem vzorku byl 1 μ l při splitu 1:50.

3.4 Vyhodnocení měření a identifikace sloučenin

Identifikace těkavých složek esenciálního oleje byla provedena pomocí hmotnostních spekter, které byly porovnávány s knihovnou spekter Národního institutu pro standardy a technologie (NIST '14 Mass Spectral Library) a knihovnou FFNSC (Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds GC-MS library), verifikace byla provedena na základě porovnání retenčních indexů. V případě GC-FID byla identifikace složek esenciálního oleje provedena na základě vypočítaných retenčních indexů, pomocí vzorce 1 a výsledků identifikace sloučenin z MS analýzy. Kam se dosazovaly naměřená data retenčních časů složek esenciálních olejů, retenčních časů řady alkanů (C8-C40) a jejich známých retenčních indexů podle vzorce (1). Procentuální zastoupení jednotlivých sloučenin v esenciálním oleji bylo vypočteno z poměrů ploch příslušných píků a celkové plochy píků v chromatogramu. Semikvantitativní zastoupení jednotlivých identifikovaných složek v mg/1 ml esenciálního oleje bylo provedeno přepočtem na vnitřní standard (*n*-nonan).

4 STANOVENÍ BIOLOGICKÝCH CHARAKTERISTIK

4.1 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů byla stanovena agarovou diskovou difúzní metodou. Pro srovnání byla vyhodnocena také antimikrobiální aktivita několika běžně používaných antibiotik. Agarový diskový difúzní test se hodnotí podle velikosti inhibiční zóny růstu mikroorganismu (mm).

4.1.1 Chemikálie

- Mueller-Hintonův agar (MH agar) (HiMedia – CADERSKY-ENVITEK, Brno, Česká republika),
- MALT agar (HiMedia – CADERSKY-ENVITEK, Brno, Česká republika),
- chlorid sodný,
- demineralizovaná voda (autoklávována při 121 °C, 15 minut).

4.1.2 Vzorky

Vzorky vydestilovaných esenciálních olejů byly použity ke stanovení bez úpravy.

4.1.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy KERN 440-43 (Kern & SOHN GmbH, Balingen, Německo)
- Vortex Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo),
- McFarland denzitometr (Biosan, Riga, Lotyšsko),
- autokláv Sterilab (BMT, Praha, ČR),
- biologický termostat BT120M (Laboratorní přístroje Praha, ČR),
- plastové sterilní Petriho misky,
- běžné sterilní plastové pomůcky (jednorázové kličky, L hokejky, špičky pro automatické pipety),
- sterilní sěrové tampony,
- automatické pipety o objemu 10 µl, 100 µl a 10 ml (Eppendorf, Hamburk, Německo),
- běžné sterilní skleněné pomůcky (zkumavky, Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml),
- dávkovač sterilních disků (Oxoid, Basingstoke, UK)
- sterilní disky, sterilní disky s antibiotiky (Oxoid, Basingstoke, UK),
- pinzeta.

4.1.4 Příprava médií a fyziologického roztoku

4.1.4.1 Mueller-Hintonův agar

Pro kultivaci bakterií byla použita komplexní půda Mueller-Hintonův agar. Bylo naváženo 38 g práškové směsi na analytických digitálních vahách a smícháno s 1000 ml demineralizované vody. Tato směs byla důkladně promíchána a sterilizována v autoklávu 15 minut při 121 °C. Poté byl agar rozlit do sterilních plastových Petriho misek.

4.1.4.2 MALT agar

Pro kultivaci kvasinek byla použita specifická půda pro kvasinky MALT agar. Bylo naváženo 45 g práškové směsi na analytických digitálních vahách a smícháno s 1000 ml demineralizované vody. Směs byla důkladně promíchána a sterilizována v autoklávu 10 minut při 115 °C. Poté byl agar rozlit do sterilních Petriho misek.

4.1.4.3 Fyziologický roztok

K přípravě bakteriálních suspenzí bylo připraveno 500 ml fyziologického roztoku smícháním 4,3 g chloridu sodného a 500 ml demineralizované vody. Roztok byl důkladně promíchán a dále sterilizován v autoklávu 15 minut při 121 °C.

4.1.5 Modelové mikroorganismy

Pro hodnocení antimikrobiální aktivity esenciálních olejů bylo vybráno několik modelových mikroorganismů – grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie a kvasinky, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM) (Brno, Česká republika).

- Grampozitivní bakterie
 - *Staphylococcus aureus* CCM 3953
 - *Enterococcus faecalis* CCM 2541
- Gramnegativní bakterie
 - *Escherichia coli* CCM 3954
 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
- Kvasinky
 - *Candida albicans* CCM 8215

4.1.6 Agarový diskový difúzní test

Ke stanovení antimikrobiálních účinků esenciálního oleje byl použit Mueller-Hintonův (MH) agar pro bakterie (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*), MALT agar pro kvasinky (*Candida albicans*). Byla připravena bakteriální suspenze s turbiditou podle stupnice McFarlanda odpovídající stupni 0,5; tj. 10^8 CFU·ml⁻¹. Takto připravenou suspenzí byl agar inokulován daným mikroorganismem. Poté se na agar aplikoval sterilní disk, na který bylo pipetováno 8 µl esenciálního oleje. Bakterie byly inkubovány 24 h při 37 °C, kvasinky 48 h při 37 °C. Po inkubaci byla citlivost mikroorganismu na esenciální olej vyhodnocena podle průměru inhibiční zóny (mm). Přítomnost inhibiční zóny značí antimikrobiální aktivitu proti testovaným bakteriím a kvasinkám.

4.2 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita esenciálních olejů byla stanovena DPPH radikálovým testem. Spektrofotometricky byl sledován pokles absorbance při 517 nm po uplynutí konstantního času (15 minut). Jako standard byl použit Trolox.

4.2.1 Chemikálie

- DPPH radikál (Sigma-Aldrich, Praha, ČR),
- standard Trolox (Sigma-Aldrich, Praha, ČR),
- ethanol (Sigma-Aldrich, Praha, ČR),
- demineralizovaná voda.

4.2.2 Vzorky

Esenciální olej z květu hřebíčkovce kořeného byl zředěn pipetováním 10 µl EO a doplněním na objem 10 ml ethanolem. Ostatní esenciální oleje nebyly upravovány.

4.2.3 Přístroje a pomůcky

- Spektrofotometr Libra S22 (Biochrom, Cambridge, Spojené království),
- kyvety,
- mikrostříkačka Hamilton,
- automatická pipeta a špičky,
- tmavé nádobky s uzávěrem,

- skleněné baňky se zábrusovým uzávěrem o objemu 5 ml.

4.2.4 DPPH test

4.2.4.1 Příprava DPPH radikálu

DPPH radikál byl připraven odvážením 0,05 g tuhého DPPH radikálu a doplněním ethanolem na objem 250 ml.

4.2.4.2 Příprava standardu a kalibrační řady

Pro přípravu roztoku standardu Troloxu bylo odváženo na analytických vahách 0,025 g Troloxu a doplněno ethanolem na objem 25 ml. Takto připravený standard měl koncentraci 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Standard byl dále desetkrát zředěn odpipetováním 1 ml a doplněním ethanolem na objem 10 ml.

Kalibrační řada Troloxu byla připravena odpipetováním 300, 240, 180, 120, 60, 30 μl zředěného standardu (Tabulka 22), 1,5 ml zředěného DPPH radikálu a doplněna ethanolem na objem 10 ml. Reakční směs byla ponechána 15 minut na tmavém místě bez přístupu světla a poté měřena. Výsledky kalibrace jsou uvedeny v kapitole výsledky v tabulce 22 a grafu 6.

4.2.4.3 Příprava vzorků pro měření antioxidační aktivity

Bylo pipetováno 10 μl esenciálního oleje, 500 μl DPPH radikálu v absolutním ethanolu a doplněno 490 μl ethanolem na celkový objem 1 ml. Reakční směs byla uskladněna v uzavřené nádobce 15 minut na tmavém místě bez přístupu světla a poté měřena. Současně byl připraven slepý vzorek odpipetováním 500 μl DPPH radikálu v absolutním ethanolu a doplněný ethanolem na 1 ml.

4.2.4.4 Měření antioxidační aktivity

Absorbance připravených roztoků byla měřena na UV/Vis spektrofotometru Libra S 22 při vlnové délce 517 nm proti slepému vzorku. Test byl opakován vždy dvakrát pro každý vzorek. Inhibice radikálu (I %) byla vypočtena pomocí následujícího vzorce (4):

$$I (\%) = 100 \cdot \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} \quad (4)$$

A_0 je absorbance slepého vzorku a A_s je absorbance vzorku s esenciálním olejem. Celková AOX aktivita byla vyjádřena v ekvivalentech použitého standardu (Troloxu) a byla vypočítána z vypočítané procentuální inhibice a kalibrační rovnice standardu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této části diplomové práce jsou uvedeny výsledky výtěžnosti esenciálních olejů z parní destilace a hydrodestilace. Dále jsou zde shrnuty výsledky analýz esenciálních olejů levandule lékařské, vavřínu ušlechtilého, hřebíčkovce kořeného a fenyklu obecného pomocí GC-MS a GC-FID. Výsledky jsou uvedeny formou tabulek a aromaprofilů zobrazených pomocí bublinových grafů. V tabulkách s výsledky z chromatografické analýzy jsou uvedeny pouze látky, které byly identifikovány v knihovných spekter se shodou 80 % a více a ověřeny podle vypočítaných retenčních indexů a jsou rozděleny podle tříd terpenů. Pro lepší orientaci je v tabulkách obsah složek uveden v relativních procentech, dále byl obsah jednotlivých složek vztažen na vnitřní standard n-nonan a vypočten v mg/ml EO a tato hodnota byla vyjádřena ve formě „,+“, kde počet + odpovídá rozmezí zastoupení složky, jak je uvedeno v tabulce 7. Plochy kruhů v bublinových grafech odpovídají příslušným plochám píků chromatogramu, který zahrnuje součet intenzit všech měřených iontů ve spektru (TIC – Total Ion Current) a jsou v nich zobrazeny všechny nalezené sloučeniny, které jsou řazeny podle jejich experimentálně zjištěných retenčních indexů. Dále jsou v příloze uvedeny ukázkové chromatogramy z GC-MS analýz. Výsledky určení antimikrobiální a antioxidační aktivity uvedených esenciálních olejů jsou shrnuty ve formě tabulek. Výsledky agarového diskového difúzního testu jsou v práci uvedeny také ve formě fotografií.

Tabulka 7: Převod zastoupení jednotlivých identifikovaných složek na počet „,+“; obsah jednotlivých složek byl vztažen na vnitřní standard n-nonan

Počet „,+“	Obsah složky (mg/ml esenciálního oleje)
+	do 1
++	1-10
+++	10-100
++++	100-1000

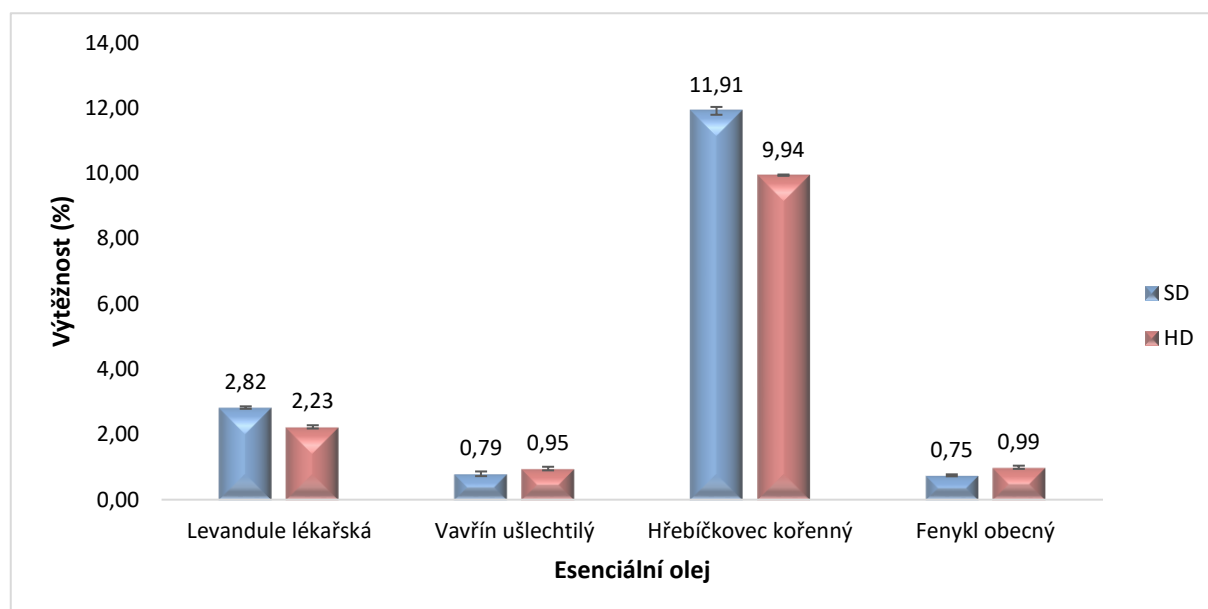
5.1 Vliv způsobu izolace esenciálních olejů z vybraných matric na výtěžnost

Hydrodestilace a parní destilace byla provedena vždy dvakrát do chvíle, kdy se již žádný esenciální olej nedestiloval. Z grafu 1 je patrné, že výtěžnost v obou použitých destilačních technikách je rozdílná, z čehož vyplývá, že použitá extrakční technika má vliv na výtěžek extrakce. Parní destilací bylo dosaženo v případě levandule (o 0,59 %) a hřebíčku (o 1,97 %) vyšší výtěžnosti než hydrodestilací. Naopak u fenyklu (o 0,24 %) a vavřínu (o 0,16 %) bylo

dosaženo vyšší výtěžnosti hydrodestilací. Značnou nevýhodou obou použitých destilačních technik je doba potřebná k zisku maximální výtěžnosti esenciálního oleje. SD probíhala po dobu 260 – 345 minut, HD po dobu 220 – 310 minut. Ačkoliv SD a HD jsou používány jako referenční metody k extrakci esenciálních olejů, vzhledem k úspoře času by bylo vhodnější použít k izolaci esenciálního oleje jinou extrakční metodu, kterou by šlo získat srovnatelné výtěžky v kratším časovém intervalu.

Tabulka 8: Výsledky průměrné procentuální výtěžnosti esenciálních olejů se směrodatnou odchylkou z hydrodestilace a parní destilace

Rostlinný materiál	SD (% m/m)	HD (% m/m)
Levandule lékařská	2,82±0,04	2,23±0,05
Vavřín ušlechtilý	0,79±0,07	0,95±0,06
Hřebíčkovec kořený	11,91±0,12	9,94±0,02
Fenykl obecný	0,75±0,03	0,99±0,05



Graf 1: Procentuální výtěžnost esenciálních olejů z rostlinného materiálu z hydrodestilace a parní destilace

5.1.1 Porovnání výtěžnosti esenciálních olejů s dostupnou literaturou

F. Chemat a kol. ve své studii porovnávají **mikrovlnnou parní destilaci (MSD)** a **parní destilaci** v klasickém uspořádání levandule lékařské. V této studii došli k závěru, že MSD po 10 minutách poskytuje srovnatelné výtěžky s výtěžky získanými SD po 90 minutách, což značně ušetří čas potřebný k extrakci [58]. **M. An a kol.** použili k extrakci esenciálního oleje z levandule **mikroextrakci tuhou fází (SPME)** a došli k závěru, že SPME je jednoduchou, časově úspornou a vysoce citlivou alternativou k tradičním extrakčním technikám používaným k analýze esenciálních olejů [75]. Nicméně jedná se pouze o techniku

screeningovou, která je také značně závislá na experimentálních podmínkách, především na teplotě extrakce. **D. V. Zheljazkov a kol.** zkoumali ve své studii vliv doby destilace levandule lékařské na výtěžnost a složení esenciálního oleje. Sušené květy levandule destilovali parní destilací po dobu 1,5; 3; 3,75; 7,5; 15; 30; 60; 90; 120; 150; 180 a 240 minut. Výtěžek destilace exponenciálně stoupal a maxima dosáhl při 60 minutách extrakce. Výtěžnost byla v rozmezí 0,5 – 6,8 %. V naší práci byla parní destilace levandule prováděna po dobu 260 minut a výtěžnost byla oproti maximu této studie podprůměrná (2,82 %), což může být způsobeno různými faktory, mezi které patří např. geografický původ materiálu nebo růstové podmínky. Ve studii je poukazováno také na vysokou výtěžnost oleje oproti jiným studiím, což přisuzují tomu, že byly destilovány pouze květy levandule bez zbytků stonků či listů. Z tohoto poznatku je možné usuzovat, že při námi provedené parní destilaci levandule byla získána menší výtěžnost, protože sušené květy levandule mohli obsahovat rezidua stonků a listů, ve kterých nejsou přítomny olejové buňky [57]. **C. Jianu a kol.** získali esenciální olej z květů levandule lékařské **parní destilací** a dosáhli cca poloviční výtěžnosti (1,13 %) oproti naší práci (2,82 %). Rozdíl ve výtěžnosti této práce, a i jiných prací a naší může být dán různým původem vzorku, rozdílnou sklizní, nebo například způsobem sušení esenciálního oleje [25].

G. Flamini a kol. studovali vliv použití mikrovlnné energie ve spojení s hydrodestilací pro extrakci esenciálního oleje z vavřínu ušlechtilého. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo při **hydrodestilaci** s 300 W mikrovlnným systémem (1,13 %). Hydrodestilací v klasickém uspořádání bylo dosaženo výtěžnosti 0,78 %. Námi získaná výtěžnost esenciálního oleje z hydrodestilace byla 0,99 %, což je výsledek podobný oběma výsledkům ve studii, avšak nejúčinnější by se jevila hydrodestilace podporovaná mikrovlnným ohřevem. Malý rozdíl ve výtěžnosti získané hydrodestilací v této studii a naší práci může být stejně jako v případě levandule způsoben rozdílným původem vzorků, dobou sklizně, nebo úpravou vzorku před destilací [43].

G. Wenqiang a kol. extrahovali esenciální olej z hřebíčku **extrakcí nadkritickým CO₂** a srovnávali výsledky s destilací vodní parou a hydrodestilací. Výtěžnost esenciálního oleje extrakcí nadkritickým CO₂ byla 19,56 %, což je oproti výtěžnosti získané SD a HD v této studii i naší práci téměř dvojnásobek. SFE poskytuje vyšší výtěžnost EO a také ušetří čas potřebný k extrakci EO oproti SD a HD, jak vyplývá z této práce. Dalším zjištěním v této studii byl vliv velikosti částic rostlinného materiálu při SFE na výtěžek extrakce. Výtěžnost se zvyšuje se snižujícím se rozměrem částic rozmělněného květu hřebíčku. Toto je způsobeno narušením olejových buněk květu hřebíčku, čímž se olej snadněji uvolní. Navíc kratší difúzní dráhy

v rozemletém rostlinném materiálu vedou k menší odolnosti vůči difúzi mezi částicemi. Z výše uvedeného vyplývá, že na výtěžnost má vliv použitá extrakční technika, ale také velikost částic [24]. V naší práci byly květy hřebíčku použity k destilaci SD a HD celé, což mohlo způsobit menší výtěžnost, než kdyby byly rozemleté. Pro příští studie, které se budou zaměřovat na výtěžnost esenciálních olejů by proto bylo lepší rostlinný materiál rozemlít, případně rozdrtit a dále pozorovat vliv narušení struktury rostliny a velikosti částic na výtěžnost EO.

F. M. Hammouda a kol. extrahovali esenciální olej z fenyklu obecného **hydrodestilací, mikrovlnnou hydrodestilací a extrakcí nadkritickým CO₂**. Hydrodestilací získali výtěžnost 0,98 %, což je téměř shodné s námi získanou výtěžností esenciálního oleje z fenyklu hydrodestilací (0,99 %). SFE (2,2 %) a mikrovlnná HD (2,8 %) poskytly větší výtěžnosti oproti konvenční hydrodestilaci. SFE a mikrovlnná HD se tedy jeví z hlediska výtěžnosti jako účinnější extrakční metoda esenciálních olejů oproti hydrodestilaci v klasickém uspořádání a mimo jiné také šetří čas, což potvrzuje také výše popsaná studie Wenqiang a kol. [47].

Při shrnutí poznatků z naší práce a literatury je zřejmé, že na výtěžnost esenciálního oleje má vliv mnoho faktorů. Jedná se o původ rostlinného materiálu, sklizeň, čistotu rostlinného materiálu, zda jsou přítomny pouze části rostliny obsahující olejové buňky, nebo zda jsou narušeny rostlinné buňky či nikoliv. Mimo jiné má značný vliv na výtěžnost extrakce esenciálního oleje z rostlinného materiálu použitá extrakční metoda. Nejvíce je používána tradiční parní destilace a hydrodestilace, avšak jsou zdlouhavé a například oproti extrakci nadkritickou tekutinou nebo spojení konvenčních destilací s mikrovlnnou energií také méně účinné. Jak se ukázalo ve studii Zheljzakov a kol. nemalý vliv na výtěžnost extrakce má rovněž doba extrakce. Všechny tyto faktory je třeba brát na zřetel při srovnávání výsledků naší práce s literaturou a v literatuře navzájem.

5.2 Identifikace a kvantifikace esenciálních olejů z vybraných matric

5.2.1 Levandule lékařská

V esenciálním oleji získaném parní destilací květů levandule lékařské bylo identifikováno 55 sloučenin (93,82 % plochy v TIC) z celkových 214 píků. V esenciálním oleji získaném hydrodestilací bylo identifikováno 50 sloučenin (92,02 % plochy v TIC) z celkových 244 píků. Složení esenciálních olejů z usušených květů *Lavandula angustifolia* Mill. získaných SD a HD je rozdílné jak v procentuálním zastoupení sloučenin, tak v přítomnosti jednotlivých sloučenin

v esenciálních olejích z obou destilačních technik. Celkově se esenciální oleje shodují v 50 sloučeninách. V esenciálním oleji získaném hydrodestilací nebyl nalezen jeden monoterpenoid (epoxy- α -terpenylacetát), 3 seskviterpeny (α -humulen, α -santalen, β -bourbonen) a jeden ester (hexylkaprylát). Ani v jednom oleji nebyl obsažen žádný derivát fenypropenu. Obecně lze říci, že esenciální olej z HD obsahuje o něco méně sloučenin než esenciální olej z SD, což může být způsobeno tím, že z fyzikálního hlediska je parní destilace šetrnější vůči rostlinnému materiálu, oproti hydrodestilaci [26].

Esenciální oleje se skládají zejména z terpenů a jejich oxidovaných složek – terpenoidů. Nejrozsáhlejší skupinou látek v obou vydestilovaných olejích jsou monoterpenoidy (SD – 80,73 %, HD – 77,18 %) viz Graf 2, z nichž největší zastoupení má linalool (SD – 39,75 %, HD – 47,76 %), linalylacetát (SD – 25,89 %, HD – 13,27 %) a eukalyptol (SD – 12,01 %, HD – 12,24 %). Tyto složky jsou přítomny v esenciálních olejích z HD i SD, ale jak je patrné, mají různé procentuální zastoupení (Tabulka 9). V procentuálním zastoupení jednotlivých sloučenin byl největší rozdíl zaznamenán u linaloolu, kde v esenciálním oleji z HD je linaloolu o 8,01 % více než v EO z SD, stejně tak geranylacetát má o 1,18 % vyšší zastoupení v oleji z HD. Další patrný rozdíl v obsahu je u linalylacetátu, kde naopak v oleji z SD je procentuální rozdíl v zastoupení větší o 12,62 % než v EO z HD, jak je patrné z grafu 2 a tabulky 9. Tento rozdíl je pravděpodobně dán delším působením vody v případě hydrodestilace, kdy při styku s vodou dochází k hydrolyze linalylacetátu za vzniku linaloolu. Také z tohoto důvodu je více linaloolu obsaženo v oleji z HD než v oleji z SD.

Pokud bychom hodnotili zastoupení jednotlivých složek podle počtu „+“, pak v oleji z HD bylo 17 sloučenin v rozmezí jednoho „+“, v oleji z SD 22 sloučenin. V rozmezí „++“ bylo v případě oleje z HD 24 sloučenin, v oleji z SD 27 sloučenin. Do rozmezí „+++“ spadaly z SD 4 sloučeniny, z HD 5 sloučenin. Z SD byly nejvíce zastoupeny a zařazeny do kategorie „++++“ 3 sloučeniny, a to linalool, linalyl acetát a eukalyptol. Zatímco v oleji z HD byly do této kategorie zařazeny pouze 2 sloučeniny (linalyl acetát a eukalyptol) a linalool byl na rozdíl od SD zařazen do kategorie „+++++“ s obsahem v rozmezí 500-1000 mg/ml EO. Nejpočetněji se v obou esenciálních olejích SD i HD vyskytovaly sloučeniny s obsahem v rozmezí 1-10 mg/ml EO. Zastoupení množství látek podle obsahu v jednotlivých skupinách bylo lehce rozdílné u obou destilačních metod.

5.2.1.1 Porovnání chemického složení esenciálního oleje z levandule lékařské s dostupnou literaturou

V článku **Filly A. a kol.** určovali chemické složení a procentuální zastoupení složek v esenciálním oleji získaném z usušených květů levandule, mimo jiných metod, také **parní destilací a hydrodestilací**. Levandule pocházela z jižní Francie a byla sklizena v červenci. Získaný esenciální olej byl vysušen bezvodým síranem sodným a následně podroben analýze GC-MS na koloně HP1-MS a GC-FID na koloně HP1. Celkem bylo identifikováno 44 sloučenin v oleji z HD a 43 sloučenin z oleji z SD, oproti tomu v naší práci bylo identifikováno více sloučenin (50 – HD a 55 – SD) Došli k závěrům, že v obou olejích byly nejvíce zastoupeny monoterpeny a jejich oxidované složky, stejně jako v našem experimentu. Konkrétně byl nejvíce zastoupen linalool (HD – 30,1 %, SD – 28,1 %), linalylacetát (HD – 13,7 %, SD – 21,8 %) a eukalyptol (HD – 3,8 %, SD – 4,5 %), stejně jako v této práci. Procentuální zastoupení se oproti našemu experimentu liší, avšak linalool je stejně jako v naší práci zastoupen více v esenciálním oleji z HD, a naopak linalylacetát je více zastoupen v EO z SD. Pravděpodobný důvod rozdílného zastoupení těchto dvou složek je popsán výše (kapitola 5.2.1). Navíc esenciální olej ve výše popsané studii obsahoval ve větším procentuálním zastoupení (nad 3 %) kafr, borneol, α -terpineol a levandulylacetát oproti naší práci, kde byly tyto složky obsaženy v množství menším než 1 % [76].

L.T. Danh a kol. extrahovali esenciální olej z usušených květů levandule lékařské třemi různými extrakčními metodami – **hydrodestilací, extrakcí nadkritickým CO₂ a extrakcí hexanem**. Levandule pocházela z Austrálie a před extrakcí byly její květy rozmělněny na menší kusy. Esenciální oleje byly po destilaci vysušeny bezvodým síranem sodným a následně analyzovány GC-MS na koloně HP5-MS, stejně jako v naší práci a GC-FID na koloně AT-5. Celkem identifikovaly 45 sloučenin, z toho 40 v oleji z HD. V našem oleji získaném HD bylo identifikováno 50 sloučenin, tj. o 5 sloučenin více. Dále identifikovali v extraktu získaném SFE 32 sloučenin a 31 sloučenin v esenciálním oleji získaném extrakcí hexanem. Hlavní složky ve všech třech extraktech tvořily linalool, kafr, borneol a linalylacetát. V esenciálním oleji z HD tyto čtyři složky tvořily 78,15 %. Zatímco v naší práci byly zastoupeny hlavně linalool, linalylacetát a eukalyptol a tyto hlavní složky tvořily 73,47 %. Borneol v našem oleji nebyl identifikován. Faktem je, že majoritně zastoupenou složkou je v obou případech esenciálních olejů získaných hydrodestilací linalool (52,6 % v práci L.T.Danh a 47,96 % v naší práci). Největší rozdíl je v naší práci v přítomnosti eukalyptolu (12,24 %), který je ve studii L. T. Danh

a kol. zastoupen pouze 1,51 % a nepřítomnosti borneolu v naší práci, který je v této studii zastoupen 7,5 % [26].

Ve studii **Zheljazkov a kol.** sledovali kromě vlivu doby extrakce (**parní destilace**) na výtěžnost také vliv na chemické složení esenciálního oleje z levandule. Ze studie vyplynulo, že doba extrakce měla kromě vlivu na výtěžnost, také vliv na složení získaného esenciálního oleje. Hlavní složky – eukalyptol, fenchol, kafr a linalylacetát měly v různých časech různé procentuální zastoupení. Zastoupení eukalyptolu (35 %) a fencholu (2,9 %) bylo největší při extrakci trvající 1,5 minuty a poté se snižovalo. V naší práci byl eukalyptol zastoupen 12,01 % po parní destilaci trvající 260 minut. Kafr byl nejvíce zastoupen v esenciálním oleji získaném extrakcí trvající 15 minut (9,2 %), v naší práci byl po 260minutové destilaci vodní parou zastoupen pouze 0,34 %. Koncentrace linalylacetátu byla největší v extraktu po 30 minutách (38 %), v naší práci po 260 minutách byl zastoupen pouze 25,89 %. Linalool, který byl v našem oleji získaném parní destilací zastoupen nejvíce, nebyl v esenciálním oleji z této práce vůbec obsažen. Z výše uvedeného vyplývá, že doba extrakce má značný vliv jak na výtěžnost, tak na chemické složení esenciálního oleje a je třeba ji brát na zřetel při srovnávání výsledků analýz s další literaturou [57].

C. Jianu a kol. provedli GC-MS analýzu esenciálního oleje z levandule lékařské získaného **parní destilací**. Usušené levandulové květy pocházely z Rumunska a byly sklizeny v červenci. Vydestilovaný esenciální olej byl sušen bezvodým síranem sodným. Celkem identifikovali 22 sloučenin, což je cca o polovinu méně než v naší práci. Největší zastoupení ze sloučenin měl karyofylen (24,12 %), β -felandren (16 %) a eukalyptol (15,69 %). Linalool a linalylacetát neobsahoval esenciální olej vůbec, nebo pouze ve stopovém množství. V naší práci byl karyofylen zastoupen pouze 2,3 %, β -felandren přítomen nebyl a eukalyptol byl zastoupen 12,24 %. Jediná společná hojně zastoupená složka v obou EO byl eukalyptol [25].

V práci **F. Chemat a kol.** srovnávali chemické složení esenciálního oleje získaného dvěma destilačními metodami – **parní destilací** a **parní destilací podporovanou mikrovlnným ohřevem**. Levandule byla sklizena v červnu v severní Itálii a následně byla usušena. Získaný EO byl sušen bezvodým síranem sodným a poté podroben analýze GC-MS na koloně SBP-5TM. Chemické složení esenciálních olejů z obou destilačních metod bylo velmi podobné. Nejvíce byly stejně jako v naší práci zastoupeny monoterpenoidy (F. Chemat – 78,3 % MASD, 75,1 % SD; naše práce – 82,7 % SD). Z nich byl nejvíce zastoupen stejně jako v naší práci linalool, eukalyptol a linalylacetát. Navíc obsahoval ve větším množství kafr, borneol

a terpinen-4-ol oproti našemu EO z SD. Ve studii je uvedeno, že MASD poskytuje oproti SD v klasickém uspořádání značnou výhodu v šetření energie a nákladů [58].

Šedesát sloučenin bylo identifikováno skupinou **C. Da Porto a kol.** v esenciálních olejích získaných mimo jiné **hydrodestilací** a **extrakcí nadkritickým CO₂**. Levandule pocházela ze severovýchodní Itálie, byla sklizena v červenci, následně usušena a dále byly použity celé květy. V esenciálním oleji analyzovaném GC-MS na koloně DB-5 byly nejvíce zastoupeny monoterpenoidy (74,91 %) podobně jako v práci Chemat a kol. Esenciální olej obsahoval hlavní složky linalool, linalylacetát, kafr, borneol a terpinen-4-ol stejně jako v práci F. Chemat a kol. a L. T. Danh a kol. S naším olejem získaným HD se procentuální zastoupení téměř shodovalo pouze u linaloolu a linalylacetátu. C. Da Porto také uvádí, že v extraktu z SFE bylo získáno více seskviterpenů než v extraktu z HD [77]. To bylo potvrzeno také v naší studii (seskviterpeny SD – 10 sloučenin, 5,66 %; HD – 7 sloučenin, 3,29 %).

L. Lesage-Meessen a kol. ve své rešerši uvádí, že esenciální olej z levandule je charakterizován přítomností linaloolu, linalylacetátu a eukalyptolu, které jsou nejvíce zodpovědné za jejich charakteristickou vůni a biologické vlastnosti. Toto tvrzení potvrzuje naše práce, kde byly tyto tři složky zastoupeny nejvíce [36]. Avšak z výše patrných odlišností ve složení esenciálních olejů, kde jsou některé složky v různých studiích zastoupeny více, jinde méně nebo vůbec, mohou být způsobeny různými vnějšími i vnitřními faktory, např. enviromentálními faktory (klimatickými, sezónními, geografickými), genetickými rozdíly rostlin či podmínkami extrakce nebo analýzy. Konkrétně může mít vliv na složení EO odrůda rostliny, podmínky růstu rostliny, doba sklizně a další [78]. Ve všech výše popsaných studiích byly nejvíce zastoupeny monoterpeny a jejich oxidované formy. Linalool a linalylacetát byl zastoupen ve většině prací nejvíce, stejně jako v naší práci, u ostatních složek esenciálních olejů byly patrné rozdíly. Podmínky extrakcí se často lišily, rostlinný materiál pocházel od různých dodavatelů, z různých klimatických podmínek, různé doby sklizně a byly různě zpracovány, chromatografická separace byla provedena na různých kolonách. Námi získané esenciální oleje nebyly na rozdíl od ostatních prací sušeny bezvodým síranem sodným, což mohlo mít také nějaký vliv na chemické složení EO.

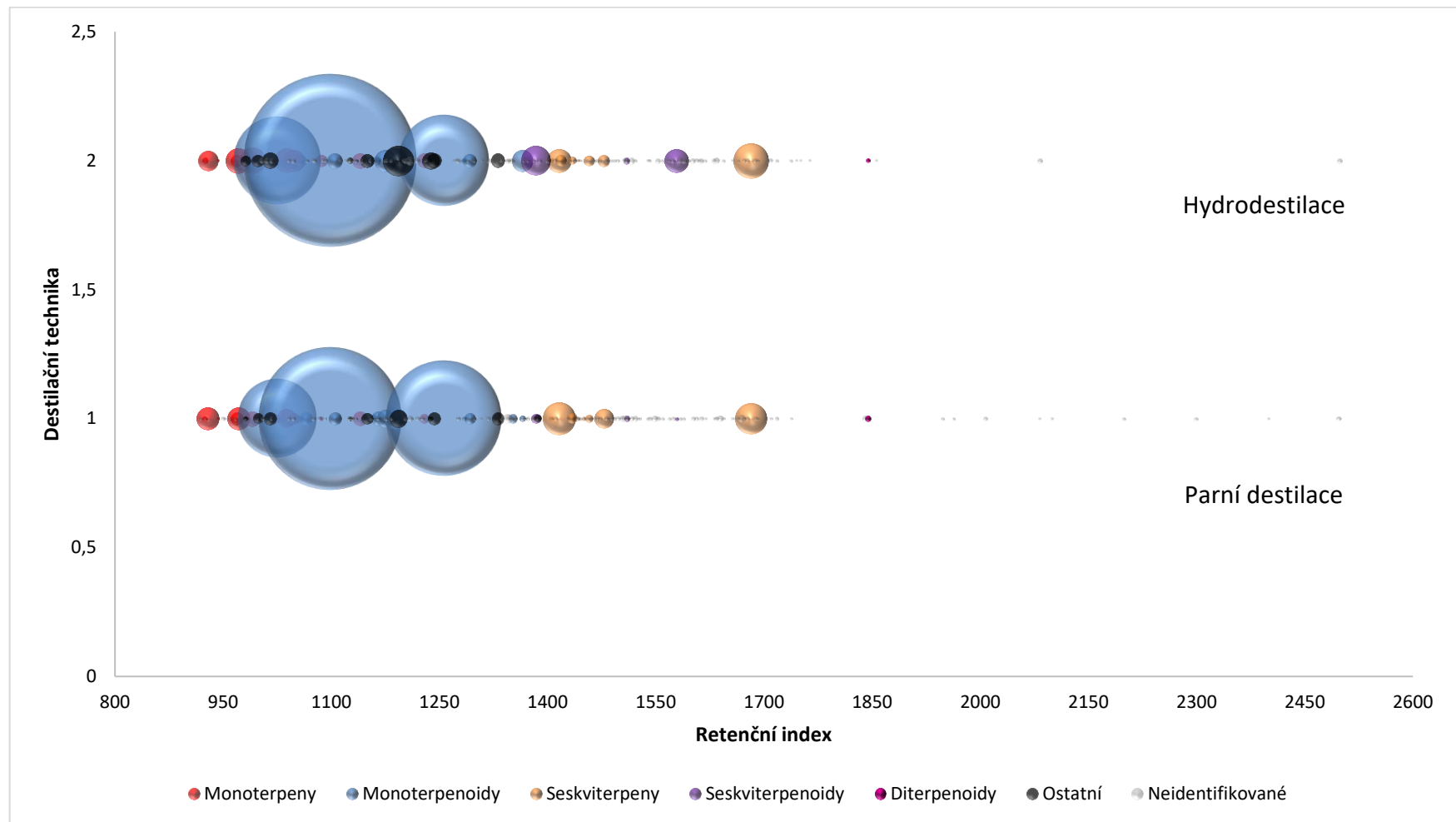
Tabulka 9: Identifikované sloučeniny v esenciálních olejích získaných parní destilací a hydrodestilací levandule lékařské a jejich procentuální zastoupení

Skupina látek	Látka	CAS číslo	RI	Relativní obsah složky (%)		Vyjádření koncentrace v mg/ml EO	
				SD	HD	SD	HD
ALKOHOLY, ESTERY	Vinyl amyl karbinol	3391-86-4	981	0,14	0,16	+	++
	2-ethylhexanol	589-98-0	998	0,18	0,21	++	++
	Hexylacetát	142-92-7	1015	0,27	0,39	++	++
	3-Oktylacetát	4864-61-3	1126	0,02	0,04	+	+
	Hexylisobutyrát	2349-07-7	1150	0,24	0,29	++	++
	Hexylbutyrát	2639-63-6	1193	0,54	1,43	++	+++
	Hexylisobutylkarbonát	10032-15-2	1238	0,04	0,44	+	++
	Hexylisovalerát	10032-13-0	1243	0,28	0,31	++	++
	Hexyltiglát	16930-96-4	1331	0,26	0,30	++	++
	Hexylkaprylát	1117-55-1	1386	0,08	-	+	-
MONOTERPENY	α -Thujen	2867-05-2	925	0,04	0,04	+	+
	α -Pinen	80-56-8	929	0,50	0,59	+++	++
	Kafren	79-92-5	943	0,58	0,01	+	+
	Sabinen	3387-41-5	969	0,26	0,21	++	++
	β -Pinen	127-91-3	971	0,96	1,02	+++	+++
	Myrcen	123-35-3	991	0,43	1,07	++	+++
	<i>o</i> -Cymen	527-84-4	1022	0,14	0,04	++	+
	α -Ocimen	3338-55-4	1038	0,65	0,91	++	++
	β -Ocimen	3779-61-1	1048	0,22	0,73	++	++
	γ -Terpinen	555-10-2	1057	0,07	0,21	+	++
	α -Terpinolen	586-62-9	1086	0,03	0,22	+	++
Kafr	76-22-2	1140	0,34	0,33	++	++	

Skupina látek	Látka	CAS číslo	RI	Relativní obsah složky (%)		Vyjádření koncentrace v mg/ml EO	
				SD	HD	SD	HD
MONOTERPENY	Verbenol	473-67-6	1143	0,01	0,03	+	+
	<i>trans</i> -Geraniol	9007-92-5	1229	0,04	0,31	++	++
MONOTERPENOIDY	Eukalyptol	470-82-6	1025	12,01	12,24	++++	++++
	<i>cis</i> -Sabinen hydrát	15537-55-0	1065	0,26	0,02	++	+
	Linalool	78-70-6	1099	39,75	47,96	++++	+++++
	Hotrienol	20053-88-7	1105	0,29	0,33	++	++
	<i>trans</i> -Pinocarveol	547-61-5	1135	0,01	0,01	+	+
	Nerol oxid	1786-08-9	1155	0,01	0,09	+	+
	Pinokarvon	30460-92-5	1159	0,09	0,31	++	+
	Isoborneol	10385-78-1	1163	0,04	0,10	+	++
	δ -Terpineol	7299-42-5	1165	0,36	0,05	++	+
	Terpinen-4-ol	562-74-3	1175	0,57	0,76	++	++
	Cryptone	500-02-7	1184	0,16	0,10	++	+
	α -Terpineol	98-55-5	1189	0,83	0,96	++	+++
	Linalylacetát	115-95-7	1256	25,89	13,27	++++	++++
	Bornylacetát	92618-89-8	1284	0,03	0,03	+	+
	Levandulylacetát	25905-14-0	1292	0,23	0,26	++	++
	Epoxy- α -terpenylacetát	80-26-2	1352	0,13	-	++	-
	Nerylacetát	141-12-8	1365	0,07	0,69	+	++
	Geranylacetát	105-87-3	1384	0,18	1,36	++	+++
	Levandulylbutyrát	17609-96-0	1510	0,05	0,05	+	+
SESKVITERPENY	β -Bourbonen	5208-59-3	1382	0,01	-	+	-
	Seskvithujen	58319-05-5	1405	0,03	0,02	+	+

Skupina látek	Látka	CAS číslo	RI	Relativní obsah složky (%)		Vyjádření koncentrace v mg/ml EO	
				SD	HD	SD	HD
SESKVITERPENY	<i>β</i> -Karyofylen	13877-93-5	1416	2,03	0,85	+++	++
	<i>α</i> -Santalen	512-61-8	1418	0,23	-	+	-
	<i>trans-α</i> -Bergamoten	13474-59-4	1434	0,18	0,08	++	+
	<i>β</i> -Seskvifelandren	20307-83-9	1442	0,02	0,01	+	+
	<i>α</i> -Humulen	6753-98-6	1450	0,02	-	+	-
	<i>cis-β</i> -Farnesen	18794-84-8	1457	0,57	0,17	++	++
	<i>epi-α</i> -Bisabolol	23178-88-3	1682	1,86	1,95	+++	+++
	<i>D</i> -Germakren	105453-16-5	1478	0,71	0,21	++	++
SESKVITERPENOIDY	Karyofylen oxid	1139-30-6	1579	0,82	0,90	+	++
DITERPENOIDY	Fyton	502-69-2	1844	0,06	0,02	+	+

Vysvětlivky vyjádření koncentrace sloučenin v mg/1 ml esenciálního oleje v „+“: „+“ do 1 mg/ml, „++“ 1-10 mg/ml, „+++“ 10-100 mg/ml, „++++“ 100-500 mg/ml, „+++++“ 500-1000 mg/ml
„-“ Sloučenina nebyla přítomna.



Graf 2: Zastoupení jednotlivých tříd identifikovaných, respektive neidentifikovaných (GC-MS) a kvantifikovaných (GC-FID) sloučenin v esenciálním oleji z levandule lékařské

Tabulka 10: Přehled porovnání extrakčních metod použitých v dostupné literatuře pro levanduli lékařskou

Původ vzorku	Úprava rostlinného materiálu	Extrakční metoda	Úprava esenciálního oleje	Analýza	Kolona	Počet id. sloučenin	Hlavní složky (%)	Literatura
Jižní Francie	Sušené celé květy	SD, HD	Sušení bezvodým síranem sodným	GC-MS, GC-FID	HP1-MS, HP1	SD-43 HD-44	Linalool (SD-28,1 %, HD-30,1 %), linalylacetát (SD-21,8 %, HD-13,7 %), eukalyptol (SD-3,8 %, HD-4,5 %)	[76]
Austrálie	Sušené rozmělněné květy	HD, (SFE, extrakce hexanem)	Sušení bezvodým síranem sodným	GC-MS, GC-FID	HP5-MS, AT-5	HD-40	Linalool (HD-52,6 %), linalylacetát (HD-9,27 %), kafr (HD-8,79 %), borneol (HD-7,5 %)	[26]
Kalifornie, USA	Sušené celé květy	SD – srovnání doby destilace	neuveдено	GC-FID	DB-5	neuveдено	Eukalyptol (1,5 min-35 %), fenchol (1,5 min-2,9 %), kafr (15 min-9,2 %), linalylacetát (30 min-38 %)	[57]
Rumunsko	Sušené celé květy	SD	Sušení bezvodým síranem sodným	GC-MS	Factor Four™ VF-35	22	Karyofylen (24,12%), β -felandren (16 %), eukalyptol (15,69 %)	[25]

Původ vzorku	Úprava rostlinného materiálu	Extrakční metoda	Úprava esenciálního oleje	Analýza	Kolona	Počet id. sloučenin	Hlavní složky (%)	Literatura
Severní Itálie	Sušené celé květy	SD, MASD	Sušení bezvodým síranem sodným	GC-MS	SBP5™	SD-35 MASD-35	Linalool (SD-46,85 %, MASD-47,82%), eukalyptol (SD-7,23 %, MASD – 7,29 %), linalylacetát (SD-11,9 %, MASD-10,74 %), kafr (SD-10,23 %, MASD-11,82%), borneol (SD-4,07 %, MASD-4,15 %), terpinen-4-ol (SD-5,54 %, MASD-5,94 %)	[58]
Severovýchodní Itálie	Sušené celé květy	HD, (SFE s CO ₂)	neuveďeno	GC-MS	DB-5	Celkem 60	linalool (HD-35,96 %), linalylacetát (HD-21,74 %), terpinen-4-ol (HD-6,57 %), kafr (HD-5,56 %), eukalyptol (HD-3,98 %), borneol (HD-2,71 %)	[77]

5.2.2 Vavřín ušlechtilý

V esenciálním oleji získaném parní destilací listů vavřínu ušlechtilého bylo identifikováno 74 sloučenin (83,64 % ploch v TIC) z celkových 218 píků. V esenciálním oleji získaném hydrodestilací bylo identifikováno 54 sloučenin (87,9 % ploch v TIC) z celkových 263 píků. V obou esenciálních olejích bylo identifikováno 49 stejných sloučenin s různým relativním procentuálním zastoupením. 34 sloučenin bylo obsaženo pouze v jednom z olejů. Složení esenciálních olejů z vavřínu získaných SD a HD je rozdílné jak v procentuálním zastoupení látek, tak v přítomnosti jednotlivých sloučenin v esenciálních olejích z obou destilačních technik. Nejrozsáhlejší skupinou látek v obou vydestilovaných olejích jsou monoterpeny (SD – 30,18 % plochy v TIC, HD – 26,52 % plochy v TIC) a jejich oxidované formy (SD – 48,92 % plochy v TIC, HD – 57,78 % plochy v TIC) (Graf 3). Dále oba oleje obsahovaly seskviterpeny, seskviterpenoidy, diterpenoidy, deriváty fenypropenu a ostatní (alkoholy, karbonyly a estery).

Konkrétně byl nejvíce zastoupen α -pinen (SD – 10,92 %, HD – 8,92 %), sabinen (SD – 13,72 %, HD – 10,41 %), eukalyptol (SD – 26,99 %, HD – 37,29 %) a α -terpinylacetát (SD – 17,46 %, HD – 15,33 %). Tyto hlavní složky vavřínového esenciálního oleje jsou přítomny v esenciálních olejích z HD i SD, ale mají různé procentuální zastoupení (Tabulka 11). V procentuálním zastoupení jednotlivých sloučenin byl největší rozdíl zaznamenán u eukalyptolu, kde v esenciálním oleji z HD bylo o 10,3 % více než v EO z SD. Další patrný rozdíl v obsahu byl u α -pinenu (o 2 %), sabinenu (o 3,31 %) a α -terpinylacetátu (o 2,13 %), kde naopak v oleji z SD bylo větší relativní procentuální zastoupení než v oleji z HD (Graf 3, Tabulka 11).

Pokud bychom hodnotili zastoupení jednotlivých složek podle počtu „+“, pak v esenciálním oleji z SD bylo 39 sloučenin v rozmezí „+“, zatímco v oleji z HD bylo 22 sloučenin. V rozmezí „++“ bylo v případě oleje z HD 23 sloučenin, v oleji z SD bylo 27 sloučenin. Do rozmezí „+++“ spadaly z SD 4 sloučeniny, z HD 5 sloučenin. Z SD i HD byly zařazeny do kategorie „++++“ 4 stejné sloučeniny a to α -pinen, sabinen, eukalyptol a α -terpinylacetát. Tyto 4 sloučeniny zaujímaly největší obsah v obou esenciálních olejích, z SD i HD, a to v rozmezí 100-500 mg/ml esenciálního oleje. Do kategorie „+++++“ nebyla ani z jednoho EO zařazena žádná sloučenina. Zastoupení množství látek podle obsahu v jednotlivých skupinách bylo rozdílné u obou destilačních metod. U parní destilace byla nejpočetnější skupina „+“ v rozmezí do 1 mg/ml EO, zatímco u hydrodestilace to byla skupina „++“ v rozmezí 1-10 mg/ml EO.

5.2.2.1 Porovnání chemického složení esenciálního oleje z vavřínu ušlechtilého s dostupnou literaturou

Pro srovnání, v diskuzi kolektivu autorů **Flamini G. a kol.** získali **hydrodestilací** listů vavřínu ušlechtilého sklizeného v dubnu esenciální olej, který byl podroben analýze GC-MS na kapilární koloně HP-5. Listy vavřínu ušlechtilého pocházely z Itálie. V esenciálním oleji byly nejvíce zastoupeny monoterpeny (17,37 % plochy v TIC) a jejich oxidované formy (60,43 % plochy v TIC) jako v této práci. Z jednotlivých složek byl nejvíce zastoupen eukalyptol (35,7 %), α -terpinylacetát (9,3 %), sabinen (6,5 %) a α -pinen (3,2 %) stejně jako v této práci. Esenciální olej kolektivu Flamini G. obsahoval navíc ve větším množství *trans*-sabinenhydrát (9,7 %), methyleugenol (6,8 %) a eugenol (4,8 %). Navíc i výtěžnost esenciálního oleje z hydrodestilace byla podobná (méně než 1 %) [43].

Ve studii **M.C. Diaz-Maroto a kol.** provedli **headspace mikroextrakci tuhou fází** spojenou s GC-MS. Jako kolona byla použita SPB-1. Vzorek bobkového listu byl usušen a homogenizován. V extraktu bylo identifikováno 23 sloučenin, což je oproti našemu extraktu z SD (76) a HD (56) o dost méně. Nejvíce byl zastoupen eukalyptol (19,2 %), linalool (10,8 %), terpinylacetát (12,3 %) a methyleugenol (5,9 %). Ve srovnání s naší prací se shoduje velké zastoupení pouze u eukalyptolu (SD – 26,99 %, HD – 37,29 %), avšak i ten je v našem experimentu zastoupen více než v této studii. Nelze ovšem takto přímo hodnotit zcela různé extrakční metody jako je HS-SPME a SD nebo HD. Autoři studie uvádějí, že HS-SPME ve spojení s GC-MS je rychlá a jednoduchá metoda umožňující extrakci a identifikaci těkavých sloučenin z různých druhů rostlin, dále konstatují, že přidání vnitřního standardu do vzorků umožňuje zlepšení opakovatelnosti výsledků [79].

I. H. Sellami a kol. zkoumali změny v chemickém složení esenciálního oleje z vavřínu ušlechtilého v závislosti na použité sušící metodě rostlin. Celkem bylo ve studii použito 6 různých sušících metod. Esenciální oleje z čerstvých a sušených vzorků vavřínu byly izolovány **hydrodestilací** a analyzovány GC-MS na kapilární koloně HP5-MS. Kolona s ekvivalentní stacionární fází byla použita i při našem experimentu. Výsledky ukázaly, že při sušení rostlinného vzorku vzduchem při teplotě okolí a sušení infračerveným zářením při teplotě 45 °C významně vzrostl obsah esenciálního oleje. Hlavní složky eukalyptol, methyleugenol, terpinen-4-ol, linalool a eugenol vykazovaly významné odchylky při různých sušících metodách. Koncentrace těchto sloučenin významně vzrostla v případě sušení vzduchem při teplotě okolí. V naší práci byl nejvíce zastoupen eukalyptol (HD – 37,29 %), α -terpinylacetát

(HD – 15,33 %), α -pinen (HD – 8,92 %) a sabinen (HD – 10,41 %). Oproti tomu v této studii byl α -pinen zastoupen v setinách procenta, sabinen byl zastoupen oproti našemu oleji cca polovičně, naopak eukalyptolu bylo v naší práci téměř o polovinu méně než v této studii a terpinylacetát byl zastoupen pouze v desetínách procenta oproti naší práci. Jak autoři uvádí na složení EO má značný vliv sušení vzorku, a i proto se nejspíše náš EO získaný HD liší od jejich olejů [80].

Kolektiv autorů **E. Derwich** provedli **hydrodestilaci** vavřínových listů pocházejících ze severního Maroka a sklizených v měsíci dubnu. Hydrodestilace probíhala 2,5 hodiny. Získaný esenciální olej byl poté analyzován GC-MS a GC-FID na koloně HP5-MS, stejně jako v našem experimentu. Celkem bylo identifikováno 26 sloučenin, což je o 30 sloučenin méně než v našem esenciálním oleji získaném hydrodestilací. Hlavní složky v získaném esenciálním oleji byly – eukalyptol (52,43 %), α -terpinylacetát (8,96 %), sabinen (6,13 %) a α -pinen (3,72 %) stejně jako v naší práci. Relativní procentuální obsah složek v oleji se lišil od naší práce, avšak oba oleje obsahovaly jako dominantní složku eukalyptol. Jak autoři uvádí, eukalyptol je zodpovědný za charakteristickou příchut' tohoto koření. Proto by se dalo očekávat, že náš bobkový list by byl při používání v kuchyni nejspíše chuťově méně výrazný, protože v oleji získaném hydrodestilací bylo méně eukalyptolu, konkrétně 37,29 %. V této studii také porovnávali z hlediska chemického složení esenciální oleje získané z vavřínových listů pocházejících z různých geografických oblastí (Turecka, Číny, Tuniska, Chorvatska, Itálie, Nizozemí a Argentiny). Dominantní složkou byl ve všech zmíněných oblastech eukalyptol a chemické složení bylo velmi podobné, avšak se lišilo v procentuálním zastoupení jednotlivých složek [81].

M. K. Sangun a kol. použili k extrakci esenciálního oleje sušené vavřínové listy pocházející ze třech různých oblastí Turecka. Listy byly sklizeny v průběhu června. K získání EO byla vybrána **hydrodestilace**. EO byl vysušen pod bezvodým chloridem vápenatým a následně byl analyzován GC-MS na koloně HP-5. Celkem bylo identifikováno 25 sloučenin, což je podobné množství jako v ostatních studiích, avšak značně méně oproti naší práci. Hlavní složkou byl v olejích ze všech třech oblastí eukalyptol, a to v koncentraci cca 50 %, což je více než v našem oleji získaném HD i SD. Dále byl v esenciálním oleji obsažen ve velké míře sabinen a α -terpinylacetát, ale v malé míře oproti našemu experimentu α -pinen. Dále autoři uvádějí, že esenciální oleje získané z listů pocházejících z různých oblastí Turecka byly rozdílné jak z kvalitativního, tak z kvantitativního hlediska [82].

V článku **O. Politeo a kol.** prováděli **hydrodestilaci** vavřínových listů z Chorvatska po dobu 3 hodin. Získaný esenciální olej byl usušen bezvodým síranem sodným a analyzován v systému GC-MS na koloně HP-101 a HP-20M. Celkem bylo identifikováno 25 chemických sloučenin v esenciálním oleji, což je stejně jako v ostatních studiích o polovinu méně než v námi získaném esenciálním oleji z HD a dvě třetiny méně než v námi získaném esenciálním oleji z SD. Hlavní složkou byl opět eukalyptol (45,5 %) ve větším množství než v našem EO z obou destilací. Další majoritně zastoupené složky se také shodovaly s ostatními studii i naší prací, avšak v lehce rozdílných koncentracích [83].

Ve všech výše zmíněných studiích bylo identifikováno méně sloučenin než v naší studii. Tento fakt může souviset s dobou destilace, protože v těchto studiích byla doba destilace v rozmezí 2-3 h, na rozdíl od našich destilací, které probíhaly cca po dobu 5 hodin. Dále je možné, že z tohoto důvodu měly naše esenciální oleje získané z SD a HD menší obsah eukalyptolu, a naopak vyšší obsah jiných sloučenin (sabinen, α -pinen), protože je možné, že se eukalyptol destiluje dříve než tyto sloučeniny, které jsou v naší práci zastoupeny ve větším procentu než v ostatních studiích. Dále je pravděpodobné, že nižší procento eukalyptolu oproti jiným studiím v našich esenciálních olejích je způsobeno tím, že naše oleje obsahují více sloučenin, proto i relativní zastoupení eukalyptolu klesá.

Tabulka 11: Identifikované sloučeniny v esenciálních olejích získaných parní destilací a hydrodestilací vavřínu ušlechtilého a jejich procentuální zastoupení

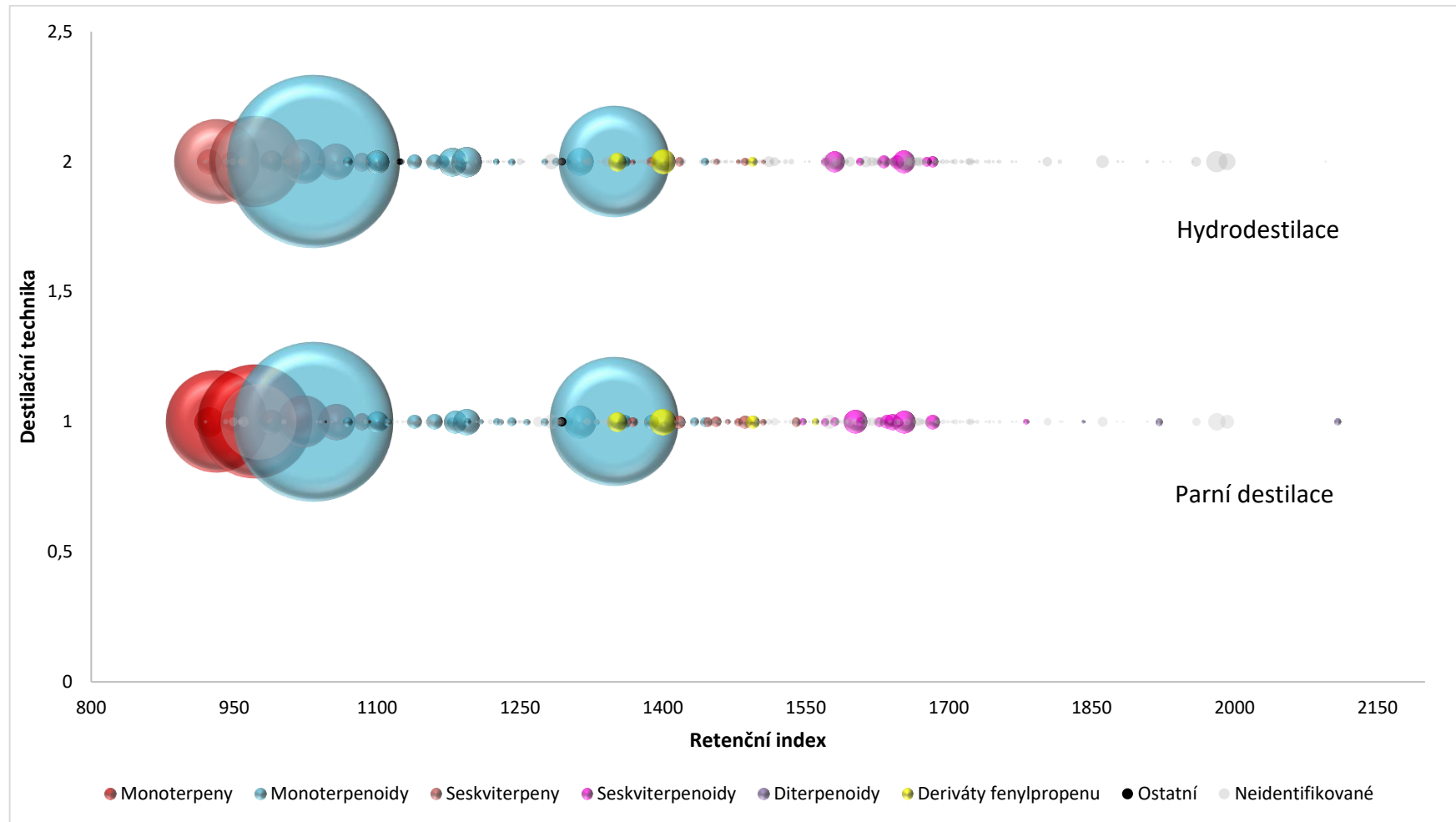
Skupina látek	Látka	CAS číslo	RI	Relativní obsah složky (%)		Vyjádření relativního obsahu v „+“	
				SD	HD	SD	HD
ALKOHOLY, KARBONYLY, ESTERY	2-Heptylacetát	5921-82-4	1046	0,01	-	+	-
	Heptylmethyl keton	821-55-6	1092	0,01	-	+	-
	2-Cyklohexen-1-ol	29803-82-5	1124	-	0,05	-	+
	Undekan-2-on	112-12-9	1294	0,09	0,08	++	+
MONOTERPENY	α -Thujen	2867--05-2	924	0,86	0,69	+++	++
	α-Pinen	80-56-8	932	10,92	8,91	++++	++++
	Kamfen	79-97-5	946	0,51	0,44	++	++
	Sabinen	3387-41-5	972	13,72	10,41	++++	++++
	Myrcen	123-35-3	989	0,61	0,58	++	++
	α -Felandren	99-83-2	1004	0,17	0,14	++	++
	Karen	13466-78-9	1007	-	0,06	-	+
	α -Terpinen	99-85-5	1015	0,73	0,85	++	++
	<i>o</i> -Cymen	527-84-4	1023	0,98	2,45	+++	+++
	γ -Terpinen	99-85-4	1057	1,40	1,59	+++	+++
	Terpinolen	586-62-9	1084	0,28	0,39	++	++
	1,3,8- <i>p</i> -Menthatriene	18368-95-1	1111	0,01	-	+	-
MONOTERPENOIDY	Eukalyptol	470-82-6	1033	26,99	37,29	++++	++++
	<i>trans</i> -Sabinenhydrát	17699-16-0	1069	0,09	0,10	++	++
	Linalol	78-70-6	1100	0,46	0,66	++	++
	α -Kamfolenal	4501-58-0	1125	-	0,04	-	+
	<i>trans</i> -Pinokarveol	5947-36-4	1139	0,18	0,25	++	++
	Menth-2-en-1-ol	29803-82-5	1111	0,05	-	+	-
	Pinokarvon	30460-92-5	1160	0,23	0,28	++	++

Skupina látek	Látka	CAS číslo	RI	Relativní obsah složky (%)		Vyjádření relativního obsahu v „+“	
				SD	HD	SD	HD
MONOTERPENOIDY	γ -Terpineol	7299-42-5	1169	-	0,18	-	++
	Terpinen-4-ol	562-74-3	1179	0,09	1,01	++	+++
	α -Thujenal	57129-54-1	1182	0,55	0,08	++	+
	<i>trans</i> -Isocarveol	21391-84-4	1187	-	0,09	-	++
	Myrtenal	564-94-3	1194	0,70	1,09	++	+++
	α -Terpineol	98-55-5	1195	0,04	-	+	-
	Piperitol	491-04-3	1209	0,02	-	+	-
	Metha-1(7),8-dien-2-ol	22626-43-3	1225	0,04	0,05	+	+
	Nerol	106-25-2	1229	0,03	-	+	-
	Cuminaldehyd	122-03-2	1241	0,06	0,05	+	+
	Karvon	99-49-0	1243	0,02	-	+	-
	Linalylacetát	115-95-7	1257	0,03	-	+	-
	Bornylacetát	92618-89-8	1276	0,05	0,03	+	+
	Sabinylacetát	139757-62-3	1288	0,08	0,07	+	+
	Pinokarvylacetát	1686-15-3	1299	0,02	0,03	+	+
	Thymol	89-83-8	1301	0,06	0,03	+	+
	δ -Terpineolacetát	93836-50-1	1313	1,07	0,91	+++	+++
	Mentha-1,4-dien-7-ol	22539-72-6	1330	0,03	-	+	-
	α-Terpinylacetát	80-26-2	1349	17,46	15,33	++++	++++
	Karvylacetát	1205-42-1	1364	0,02	-	+	-
Nerylacetát	141-12-8	1359	0,18	0,15	++	++	
Gerany acetát	105-87-3	1388	0,22	-	++	-	
Perillylacetát	15111-96-3	1433	0,06	-	+	-	
Cinamylacetát	21040-45-9	1444	0,08	0,06	+	+	

Skupina látek	Látka	CAS číslo	RI	Relativní obsah složky (%)		Vyjádření relativního obsahu v „+“	
				SD	HD	SD	HD
SESKVITERPENY	α -Copaen	138874-68-7	1368	0,10	0,03	++	+
	β -Elemen		1388	-	0,11	-	++
	Karyofylen	13877-93-5	1417	0,16	0,09	++	+
	α -Humulen	6753-98-6	1447	0,08	-	+	-
	Isogermakren D	317819-80-0	1456	0,10	0,04	++	+
	Spirolepechin	246243-00-5	1468	0,02	-	+	-
	Germakren D	105453-16-5	1479	0,05	0,02	+	+
	Selinen	17066-67-0	1486	0,16	0,07	++	+
	Valencen	473--13-2	1491	0,04	-	+	-
	Germakren A	28387-44-2	1505	0,04	0,02	+	+
	α -Kalakoren	38599-17-6	1544	0,01	-	+	-
α -Bisabolen	25532-79-0	1540	0,07	-	+	-	
SESKVITERPENOIDY	α -Elemol	639-99-6	1547	0,04	-	+	-
	Spatulenol	72203-24-8	1570	0,06	0,05	+	+
	Karyofylen oxid	1139-30-6	1580	0,57	0,50	+	++
	Viridiflorol	552-02-3	1602	0,06	-	++	-
	Humulen epoxid	19888-34-7	1607	0,07	0,06	+	+
	Junenol	472-07-1	1627	0,03	0,02	+	+
	Eremoligenol	10219-71-3	1632	0,18	0,17	+	++
	Karyofyla-4(12),8(13)-dien5-beta-ol	19431-80-2	1635	0,29	-	++	-
	Eudesm-7(11)-en-4-ol	473-04-1	1641	0,06	0,06	++	+
	β -Eudesmol	473-15-4	1646	0,08	0,22	+	++
	Agarospirrol	1460-73-7	1648	0,05	-	+	-
	Aromadendren epoxid	85760-81-2	1653	0,52	0,59	++	++
Germakra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	81968-62-9	1683	0,19	0,15	++	++	

Skupina látek	Látka	CAS číslo	RI	Relativní obsah složky (%)		Vyjádření relativního obsahu v „+“	
				SD	HD	SD	HD
SESKVITERPENOIDY	14-hydroxy-9-epi-Karyofylen	79768-25-5	-	-	0,10	-	++
	α -Eudesmolacetát	67996-62-7	1781	0,03	-	+	-
DITERPENOIDY	Fyton	502-69-2	1841	0,01	-	+	-
	Farnesyl aceton	1117-52-8	1921	0,05	-	+	-
	Fytol	150-86-7	2108	0,04	-	+	-
DERIVÁTY FENYLPROPENU	Eugenol	97-53-0	1352	0,39	0,39	++	++
	Methyleugenol	93-15-2	1400	0,72	0,71	++	++
	Methylisoeugenol	93-16-3	1494	0,17	0,10	++	++
	Elemicin	487-11-6	1560	0,05	-	+	-

Vysvětlivky vyjádření koncentrace sloučenin v mg/1 ml esenciálního oleje v „+“: „+“ do 1 mg/ml, „++“ 1-10 mg/ml, „+++“ 10-100 mg/ml, „++++“ 100-500 mg/ml, „+++++“ 500-1000 mg/ml
 „-“ Sloučenina nebyla přítomna.



Graf 3: Zastoupení jednotlivých tříd identifikovaných, respektive neidentifikovaných (GC-MS) a kvantifikovaných (GC-FID) sloučenin v esenciálním oleji z vavřínu ušlechtilého

Tabulka 12: Přehled porovnání extrakčních metod použitých v dostupné literatuře pro vavřín ušlechtilý

Původ vzorku	Úprava rostlinného materiálu	Extrakční metoda	Úprava esenciálního oleje	Analýza	Kolona	Počet id. sloučenin	Hlavní složky (%)	Literatura
Itálie	Sušené celé listy	HD	neuveveno	GC-MS	HP-5	38	Eukalyptol (35,7 %), α -terpinylacetát (9,3 %), <i>trans</i> -sabinenhydrát (9,7 %), methyleugenol (6,8 %), sabinen (6,5 %), eugenol (4,8 %) α -pinen (3,2 %)	[43]
Neuveveno	Sušené celé listy	HS-SPME	neuveveno	GC-MS	SPB-1	23	Eukalyptol (19,2 %), linalool (10,8 %), terpinylacetát (12,3 %), methyleugenol (5,9 %)	[79]
Tunis	Sušené celé listy – 6 různých sušících metod	HD	Sušení bezvodým síranem sodným	GC-MS	HP5-MS	47	Eukalyptol, methyleugenol, terpinen-4-ol, linalool, eugenol (různé zastoupení dle zvolené sušící metody)	[80]
Turecko	Sušené celé listy	HD	Sušení bezvodým síranem sodným	GC-MS	HP5-MS	26	Eukalyptol (52,43 %), α -terpinylacetát (8,96 %), sabinen (6,13 %) a α -pinen (3,72 %)	[81]

Původ vzorku	Úprava rostlinného materiálu	Extrakční metoda	Úprava esenciálního oleje	Analýza	Kolona	Počet id. sloučenin	Hlavní složky (%)	Literatura
Turecko – tři různé oblasti	Sušené celé listy	HD	Sušení bezvodým chloridem vápenatým	GC-MS	HP-5	25	Eukalyptol (50 %), sabinen (7-14 %), α -terpinylacetát (11-25 %)	[82]
Chorvatsko	Sušené celé listy	HD	Sušení bezvodým síranem sodným	GC-MS	HP-101 a HP-20M	25	Eukalyptol (45,5 %), methyleugenol (10 %), α -terpinylacetát (9,1 %), linalool (8,5 %)	[83]

5.2.3 Hřebíčkovce kořený

V esenciálním oleji získaném parní destilací květů hřebíčkovce kořeného bylo identifikováno 7 sloučenin (98,21 % ploch v TIC) z celkových 51 píků. V esenciálním oleji získaném hydrodestilací bylo identifikováno 7 sloučenin (98,76 % ploch v TIC) z celkových 48 píků. V obou esenciálních olejích bylo identifikováno 7 stejných sloučenin s velmi podobným relativním procentuálním zastoupením. Nejzrůslehlejší skupinou látek v obou vydestilovaných olejích jsou deriváty fenypropenu (SD – 96,47 % plochy v TIC, HD – 97,35 % plochy v TIC) (Graf 4). Dále oba získané esenciální oleje obsahovaly tři seskviterpeny. Neobsahovaly žádné oxidované formy terpenů, ani monoterpeny a diterpeny.

Esenciální olej získaný HD i SD obsahoval nejvíce eugenolu (SD – 76,83 %, HD – 76,71 %) a eugenylacetátu (SD – 19,47 %, HD – 20,44 %). V procentuálním zastoupení jednotlivých sloučenin byl rozdíl mezi SD a HD velmi nepatrný, jak je zřejmé z grafu 4 a tabulky 13.

Pokud bychom hodnotili zastoupení jednotlivých složek podle počtu „+“, respektive v mg/ml esenciálního oleje, pak v oleji z HD byly v rozmezí „+“ dvě sloučeniny, zatímco v oleji z SD byla pouze jedna sloučenina. V rozmezí „++“ byly v případě SD tři sloučeniny, v případě HD pouze dvě sloučeniny. Do rozmezí „+++“ patřila z SD i HD pouze jedna sloučenina. Z SD a HD byla zařazena do kategorie „++++“ 1 stejná sloučenina, a to eugenylacetát. Nejvíce byl obsažen v esenciálním oleji z hřebíčkovce eugenol a byl tak zařazen do kategorie „++++“ v oleji z SD i HD. Jeho obsah odpovídal rozmezí 500-1000 mg/ml esenciálního oleje. Toto hodnocení potvrzuje, že nejvíce byl zastoupen eugenol a eugenylacetát a rozdíl v zastoupení mezi SD a HD byl minimální.

5.2.3.1 Porovnání chemického složení esenciálního oleje z hřebíčkovce kořeného s dostupnou literaturou

Pro srovnání, v diskuzi kolektivu autorů **Wenqiang G. a kol.** získali **hydrodestilací** a **parní destilací** hřebíčku pocházejícího z Číny esenciální olej, ve kterém bylo identifikováno 13 sloučenin (SD) a 12 sloučenin (HD). V naší práci bylo identifikováno v obou olejích (SD i HD) pouze 7 sloučenin. Analýza GC-MS byla provedena na koloně DB-5. Nejvíce byly zastoupeny deriváty fenypropenu (SD – 72,04 %, HD – 52,79 %) – eugenol a eugenylacetát, stejně jako v této práci. Navíc jejich oleje obsahovaly značné množství seskviterpenu karyofylenu (SD – 20,59 %, HD – 36,94 %), který byl v našem esenciálním oleji zastoupen v případě SD 1,39 % a v případě HD 1,25 %. Kromě hydrodestilace a parní destilace autoři provedli také

extrakci nadkritickým CO₂ a testovali vliv třech parametrů (tlak, teplota a velikost částic) na výtěžnost a chemické složení získaného esenciálního oleje. Velikost částic měla největší vliv na výtěžnost, teplota měla největší vliv na procentuální zastoupení hlavní složky oleje eugenolu. Dále uvádějí, že výtěžnost esenciálního oleje získaného SFE byla přibližně dvakrát vyšší než u HD a SD. Chemické složení bylo u všech třech extraktů podobné, ale lišily se z kvantitativního hlediska [24].

Hřebíčkový esenciální olej pocházející z Číny podrobila skupina **X. Huang a kol.** GC-MS analýze na stejné koloně jako byla naše HP5-MS. Celkem bylo identifikováno 10 sloučenin v esenciálním oleji, což je o 3 sloučeniny méně než v našich olejích získaných SD a HD. Nejvíce byl zastoupen eugenol a to 76,8 %, což je téměř shodné s naším obsahem eugenolu v obou extraktech. Dále jejich esenciální olej obsahoval 9,5 % eugenylacetátu, což je téměř o polovinu méně než v našich EO a 6,0 % β -karyofylenu, kterého bylo v našich olejích cca šestkrát méně [46].

Skupina **M. Santana de Oliveira a kol.** extrahovala esenciální olej z hřebíčku metodou SFE s CO₂ a získaný esenciální olej podrobila analýze GC-MS na koloně kapilární RTX-5MS. Hřebíčkovce kořený pocházel z Brazílie a byl sklizen v červnu. Celkem bylo identifikováno 21 sloučenin, což je třikrát více než v našem esenciálním oleji. Nejvíce byl zastoupen eugenol cca 60 %, což je méně než v našich olejích získaných SD a HD. Dále jejich esenciální olej obsahoval cca 16 % β -Karyofylenu, což je šestnáctkrát více než v našich olejích a cca 20 % eugenylacetátu, který byl v našich olejích zastoupen v podobném množství. Dále byl v tomto článku zkoumán vliv tlaku a teploty při extrakci na výtěžnost EO a ukázalo se, že nejlepší výtěžnost byla dosažena při teplotě 50 °C a tlaku 30 MPa [45].

K. Chaieb a kol. extrahovali esenciální olej z usušených hřebíčkových květů pocházejících z Tuniska **hydrodestilací**. Hydrodestilace byla prováděna po dobu 3 hodin a získaný esenciální olej byl poté vysušen bezvodým sulfidem sodným. EO byl podroben analýze GC-MS na koloně HP-20. Celkem bylo identifikováno 36 sloučenin, což je téměř pětkrát více sloučenin než v našich olejích z SD a HD. Nejvíce byl obsažen eugenol (88,6 %), který byl v našem oleji obsažen méně, dále eugenylacetát (5,6 %), který byl v našem oleji zastoupen čtyřikrát více. Námí získaný olej HD, ale i SD obsahoval tyto dvě složky také nejvíce [84].

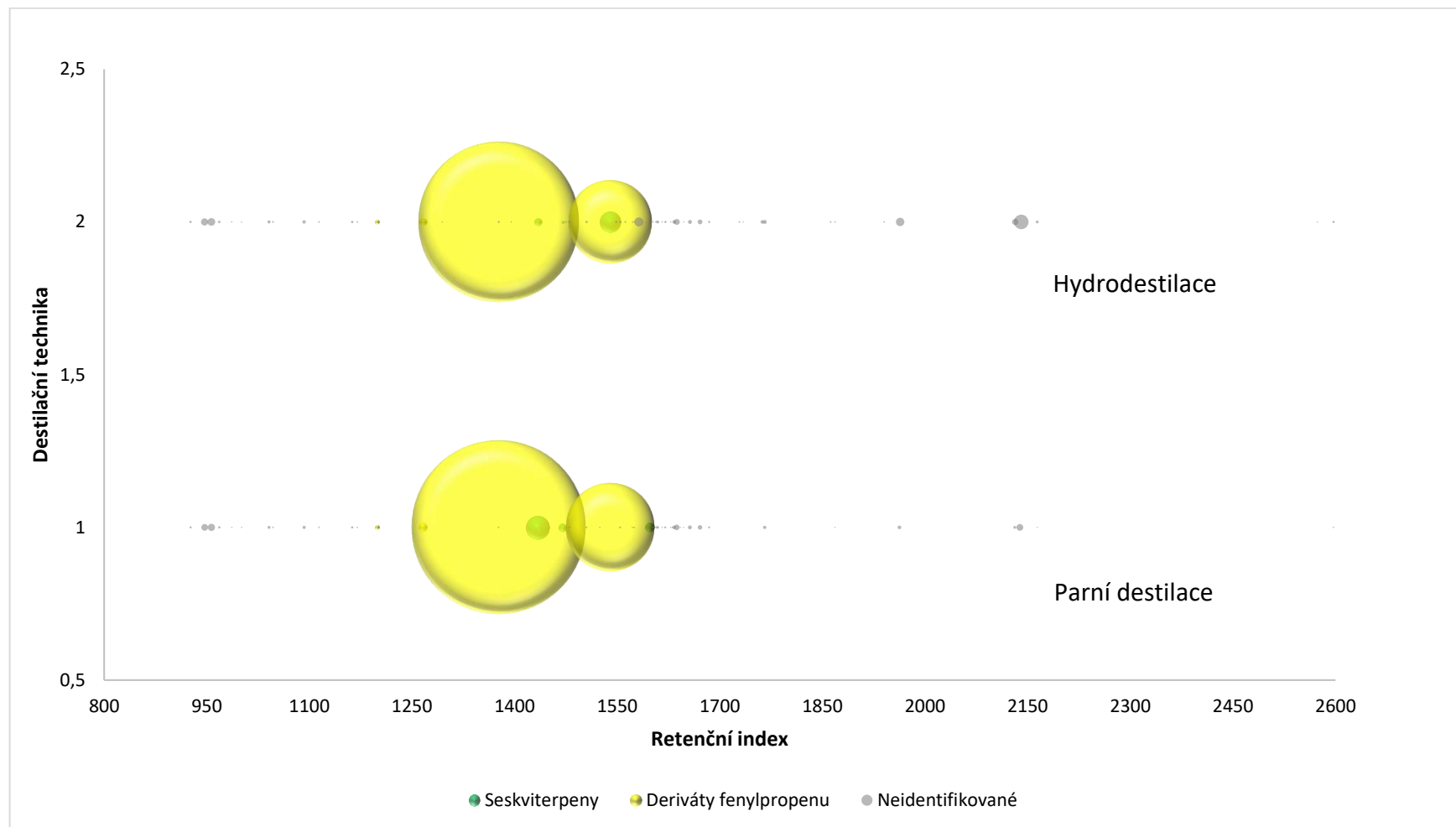
Tabulka 13: Identifikované sloučeniny v esenciálních olejích získaných parní destilací a hydrodestilací hřebíčkovce kořeného a jejich procentuální zastoupení

Skupina látek	Látka	CAS číslo	RI	Relativní obsah složky (%)		Vyjádření relativního obsahu v „+“	
				SD	HD	SD	HD
DERIVÁTY FENYLPROPENU	Chavikol	1745-81-9	1199	0,04	0,05	+	+
	Anetol	4180-23-8	1266	0,18	0,15	++	++
	Eugenol	97-53-0	1377	76,78	76,71	+++++	+++++
	Eugenylacetát	93-28-7	1540	19,47	20,44	++++	++++
SESKVITERPENY	β -Karyofylen	13877-93-5	1434	1,40	1,25	+++	+++
	α -Humulen	6753-98-6	1470	0,15	0,15	++	++
	Karyofylen oxid	1139-30-6	1598	0,19	0,01	++	+

Vysvětlivky vyjádření koncentrace sloučenin v mg/1 ml esenciálního oleje v „+“: „+“ do 1 mg/ml, „++“ 1-10 mg/ml, „+++“ 10-100 mg/ml,

„++++“ 100-500 mg/ml, „+++++“ 500-1000 mg/ml

„-“ Sloučenina nebyla přítomna.



Graf 4: Zastoupení jednotlivých tříd identifikovaných, respektive neidentifikovaných (GC-MS) a kvantifikovaných (GC-FID) sloučenin v esenciálním oleji z hřebíčkovce kořeného

Tabulka 14: Přehled porovnání extrakčních metod použitých v dostupné literatuře pro hřebíčkovce kořený

Původ vzorku	Úprava rostlinného materiálu	Extrakční metoda	Úprava esenciálního oleje	Analýza	Kolona	Počet id. sloučenin	Hlavní složky (%)	Literatura
Čína	Drcené sušené květy	SD, HD	neuveďeno	GC-MS	DB-5	SD-13 HD-12	Eugenol (SD-58,2 %, HD-48,82 %), eugenylacetát (SD-13,84 %, HD-3,89 %), β -karyofylen (SD – 20,59 %, HD – 36,94 %)	[24]
Čína	Sušené celé květy	Komerčně koupený (neuveďeno)	neuveďeno	GC-MS	HP5-MS	10	Eugenol (76,8 %), eugenylacetát (9,5 %), β -karyofylen (6,0 %)	[46]
Brazílie	Sušené celé květy	SFE s CO ₂	neuveďeno	GC-MS	RTX-5MS	21	Eugenol (60 %), β -karyofylen (16 %), eugenylacetát (20 %)	[45]
Tunisko	Sušené celé květy	HD	Sušení bezvodým síranem sodným	GC-MS	HP-20	36	Eugenol (88,6 %), eugenylacetát (5,6 %)	[84]

5.2.4 Fenykl obecný

V esenciálním oleji získaném parní destilací fenyklu obecného bylo identifikováno 13 sloučenin (97,66 % ploch v TIC) z celkových 59 píků. V esenciálním oleji získaném hydrodestilací bylo identifikováno 11 sloučenin (97,54 % ploch v TIC) z celkových 48 píků. V obou esenciálních olejích bylo identifikováno 11 stejných sloučenin s velmi podobným relativním procentuálním zastoupením. Esenciální olej získaný HD neobsahoval karvon a isoeugenol. Nejzrůsáhlejší skupinou látek v obou vydestilovaných olejích jsou monoterpeny (SD – 12,08 % ploch v TIC, HD – 12,23 % ploch v TIC) a jejich oxidované formy (SD – 85,81 % ploch v TIC, HD – 85,26 % ploch v TIC) (Graf 5). Oba získané esenciální oleje z fenyklu neobsahovaly žádné seskviterpeny, diterpeny ani jejich oxidované formy.

Esenciální olej získaný HD i SD obsahoval nejvíce estragolu (SD – 83,76 %, HD – 85,26 %) a limonenu (SD – 10,87 %, HD – 11,11 %). V procentuálním zastoupení jednotlivých sloučenin byl rozdíl mezi SD a HD velmi nepatrný, jak je zřejmé z grafu 5 a tabulky 15.

Pokud bychom hodnotili zastoupení jednotlivých složek podle počtu „+“, respektive v mg/ml esenciálního oleje, pak v oleji z HD byly v rozmezí „+“ 3 sloučeniny a v oleji z SD 4 sloučeniny. V rozmezí „++“ bylo v případě SD i HD 6 sloučenin. Do rozmezí „+++“ patřila z SD 1 sloučenina a to fenchon, z HD žádná sloučenina. Z SD a HD byla zařazena do kategorie „++++“ 1 stejná sloučenina, a to limonen. Do kategorie s největším obsahem látky v rozmezí 500-1000 mg/ml esenciálního oleje („+++++“) z SD i HD patřil estragol. Toto hodnocení potvrzuje, že nejvíce byl zastoupen estragol a poté limonen a zastoupení složek SD a HD bylo velmi podobné.

5.2.4.1 Porovnání chemického složení esenciálního oleje z fenyklu obecného s dostupnou literaturou

Pro srovnání, v diskuzi kolektivu autorů **F. M. Hammouda a kol.** získali **hydrodestilací** fenyklu pocházejícího ze Středomoří esenciální olej, ve kterém byly nejvíce zastoupeny monoterpeny a jejich oxidované formy – limonen (3,5 %), anetol (65 %), fenchon (22 %) a pinen (3 %). Analýza GC-MS esenciálního oleje byla provedena na koloně MDN-5S. Námi získaný olej z hydrodestilace obsahoval ve větším množství pouze limonen (11,11 %) a ostatní zmíněné látky obsahoval v množství menším než 1 %. Navíc oproti výzkumu Hammouda a kol. obsahoval náš olej estragol a to ve značném procentuálním zastoupení [47].

K. Ch. Baby a kol. použili k extrakci esenciálního oleje z fenyklu **parní destilací**, které předcházela **enzymatická úprava** vzorku. Kvalitativní analýza byla provedena pomocí GC-MS na koloně HP-1. Celkem bylo identifikováno 5 sloučenin, což je méně než v obou našich olejích. Nejvíce byl obsažen anetol (78,45 %), který byl v našem experimentu zastoupen v obou olejích méně než 1 %. Dále byl v EO identifikován limonen (10,55 %) v přibližně stejném množství jako v naší práci v obou olejích. Estragol, který byl v naší práci zastoupen nejvíce a to přes 80 % v obou olejích (SD a HD), byl v této studii zastoupen pouze 2,09 %. Dále jejich EO obsahoval fenchon, a α -pinen, stejně jako naše oba oleje. Z pohledu výtěžku esenciálního oleje se enzymatická úprava vzorku před parní destilací jeví jako velmi účinná, protože výtěžnost oproti parní destilaci v klasickém uspořádání ve studii vzrostl. Na druhou stranu, jak je patrné z porovnání s naší prací, se výrazně změnilo procentuální složení jednotlivých složek esenciálního oleje. Ve studii je dále uvedeno, že enzymatická úprava zlepšila příchut' esenciálního oleje [48].

W. R. Diao a kol. extrahovali esenciální olej z fenyklu **parní destilací** a následně ho charakterizovali GC-MS a GC-FID na kapilární koloně DB-5. Fenyklová semena pocházela z Číny. Celkem bylo identifikováno 28 sloučenin, což je více než dvojnásobek oproti našemu esenciálnímu oleji z parní destilace. Nejvíce byl zastoupen anetol (68,53 %), estragol (10,42 %) a limonen (6,24 %). Oproti tomu v naší práci bylo v EO z SD více estragolu (83,91 %) a limonenu (10,87 %), ale anetolu značně méně (0,6 %) [85].

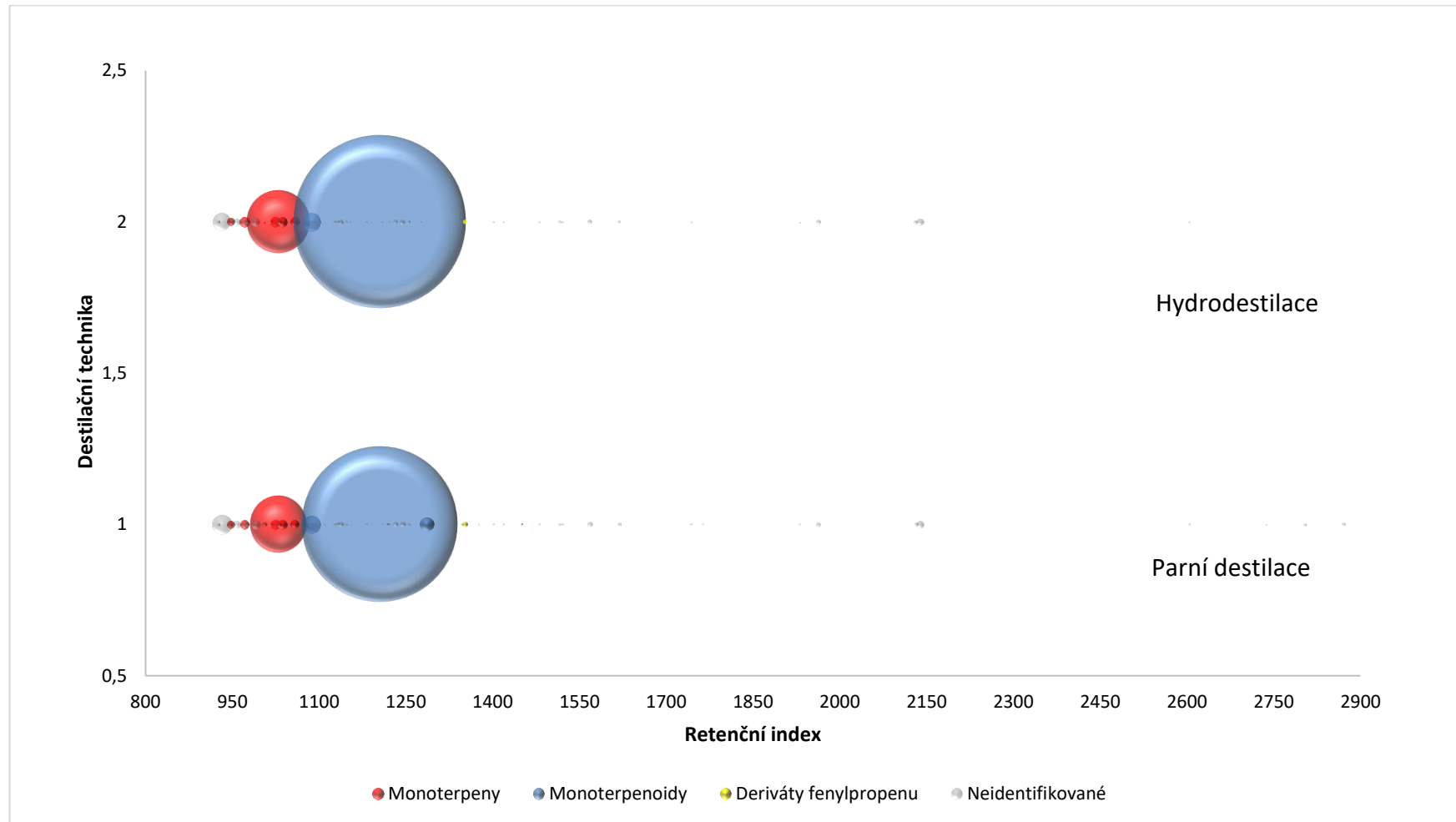
Tabulka 15: Identifikované sloučeniny v esenciálních olejích získaných parní destilací a hydrodestilací fenyklu obecného a jejich procentuální zastoupení

Skupina látek	Látka	CAS číslo	RI	Relativní obsah složky (%)		Vyjádření relativního obsahu v „+“	
				SD	HD	SD	HD
MONOTERPENY	α -Pinen	80-56-8	947	0,17	0,14	++	++
	Sabinen	3387-41-5	971	0,24	0,24	++	++
	Myrcen	123-35-3	1005	0,06	0,003	+	+
	Cimen	99-87-6	1024	0,28	0,28	++	++
	Limonen	138-86-3	1030	10,87	11,11	++++	++++
	β -Ocimen	3779-61-1	1037	0,24	0,23	++	++
	γ -Terpinen	99-85-4	1058	0,22	0,23	++	++
MONOTERPENOIDY	Fenchon	1195-79-5	1087	0,99	0,89	+++	++
	Estragol	140-67-0	1205	83,91	83,76	+++++	+++++
	Karvon	2244-16-8	1218	0,01	-	+	-
	Anetol	4180-23-8	1286	0,60	0,62	++	+
DERIVÁTY FENYLPROPENU	Eugenol	97-53-0	1352	0,06	0,05	+	+
	Isoeugenol	5912-86-7	1449	0,01	-	+	-

Vysvětlivky vyjádření koncentrace sloučenin v mg/1 ml esenciálního oleje v „+“: „+“ do 1 mg/ml, „++“ 1-10 mg/ml, „+++“

10-100 mg/ml, „++++“ 100-500 mg/ml, „+++++“ 500-1000 mg/ml

„-“ Sloučenina nebyla přítomna.



Graf 5: Zastoupení jednotlivých tříd identifikovaných, respektive neidentifikovaných (GC-MS) a kvantifikovaných (GC-FID) sloučenin esenciálním oleji z fenyklu obecného

Tabulka 16: Přehled porovnání extrakčních metod použitých v dostupné literatuře pro fenykl obecný

Původ vzorku	Úprava rostlinného materiálu	Extrakční metoda	Úprava esenciálního oleje	Analýza	Kolona	Počet id. sloučenin	Hlavní složky (%)	Literatura
Středomoří	Sušená celá semena	HD	neuveďeno	GC-MS	MDN-5S	neuveďeno	Anetol (65 %), fenchon (22 %), limonen (3,5 %), α -pinen (3 %)	[47]
Indie	Sušená celá semena, enzymatická úprava (narušení buněk)	SD	neuveďeno	GC-MS	HP-1	5	Anetol (78,45 %), limonen (10,55 %), fenchon (5,85 %), estragol (2,09 %), α -pinen (3,05 %)	[48]
Čína	Sušená celá semena	SD	neuveďeno	GC-MS, GC-FID	DB-5	28	Anetol (68,53 %), limonen (6,24 %), fenchon (5,45 %) estragol (10,42 %)	[85]

5.3 Vliv složení esenciálních olejů na jejich antimikrobiální aktivitu

Antimikrobiální účinky esenciálních olejů byly určovány agarovou diskovou difúzní metodou a pro každý esenciální olej je uvedena vlastní tabulka s výsledky inhibičních zón. Pro porovnání byly změřeny inhibiční zóny vybraných antibiotik (tetracyklin, ciprofloxacin, ampicilin a fluconazol) na testované mikroorganismy, které jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 17: Inhibiční zóny antibiotik testovaných mikroorganismů

<i>Antibiotikum</i>	Šířka inhibiční zóny [mm]			
Testovaný mikroorganismus	Tetracyklin	Ciprofloxacin	Ampicilin	Fluconazol
<i>Escherichia coli</i>	-	36	7	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	34	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	36	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	27	21	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	18

5.3.1 Levandule lékařská

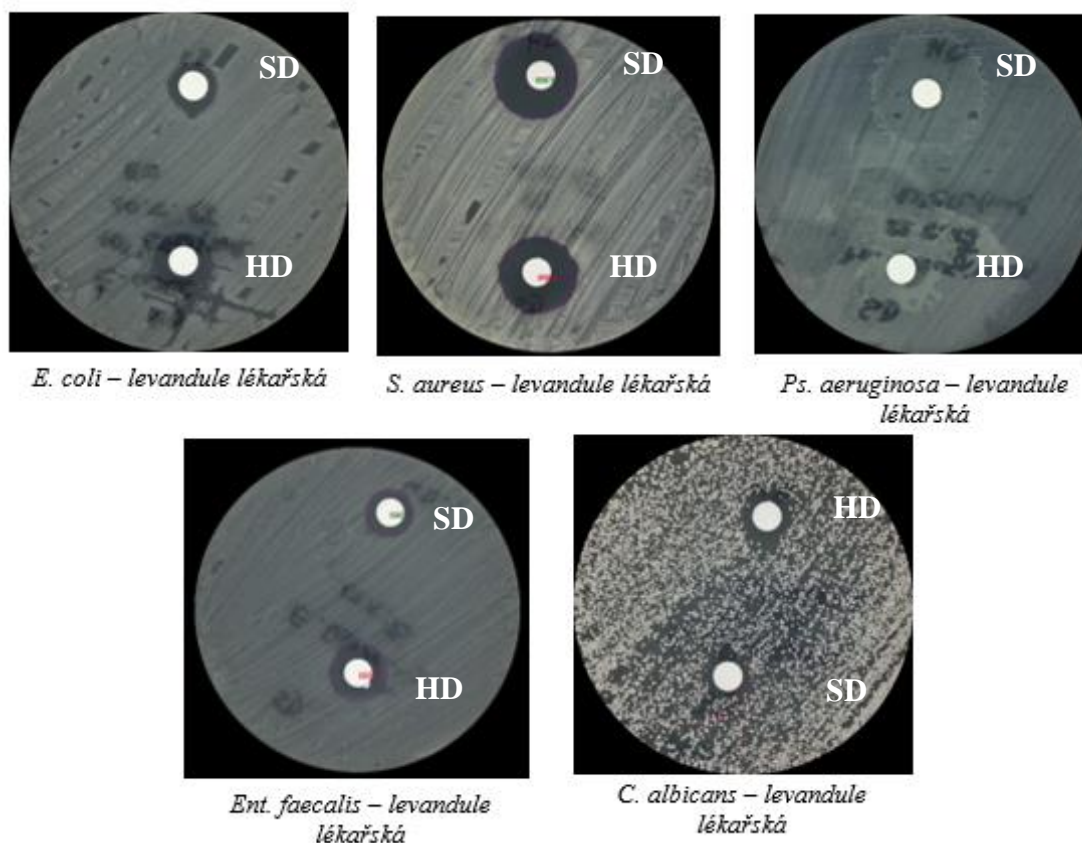
Výsledky antimikrobiálních účinků esenciálního oleje získaného z levandule lékařské stanovených diskovou difúzní metodou jsou uvedeny v tabulce 18 a obrázku 5. Esenciální oleje získané z obou destilačních metod inhibovaly všechny testované mikroorganismy v různé míře, kromě *Pseudomonas aeruginosa*, která nebyla inhibována žádným z levandulových olejů. Esenciální olej získaný HD měl větší inhibiční účinnost než esenciální olej získaný SD. V případě *Enterococcus faecalis* a *Candida albicans* byla senzitivita bakterie a kvasinky pro oba vzorky (SD a HD) identická. Nejcitlivější zkoumaný mikroorganismus byl *Staphylococcus aureus*. Navíc esenciální olej získaný HD měl na *Staphylococcus aureus* hodně podobný účinek, jako má antibiotikum tetracyklin (Tabulka 17, 18).

Stanojević a kol. použili ve své studii k extrakci esenciálního oleje z levandule dvě různé hydrodestilační metody a jejich vzorek vykazoval antimikrobiální účinky také proti *Pseudomonas aeruginosa*, na rozdíl od námi získaného oleje. Způsobeno to může být tím, že antimikrobiální aktivita esenciálního oleje z levandule je mimo jiných sloučenin důsledkem působení eukalyptolu, kafru a borneolu, které byly v jejich oleji obsaženy v mnohem vyšší míře než v našem esenciálním oleji [78]. Ve studii **A. Herman a kol.** je zkoumán aditivní antimikrobiální charakter linaloolu, přidaného do esenciálního oleje. Linalool měl v našem oleji největší zastoupení. Výzkum ukázal, že přidaný linalool významně zvyšuje antimikrobiální účinnost esenciálního oleje [86]. Z toho plyne, že linalool má vysokou antimikrobiální aktivitu a při porovnání s námi získaným esenciálním olejem hydrodestilací a parní destilací vysvětluje,

proč oleje měly rozdílné antimikrobiální účinky na většinu testovaných mikroorganismů a také vysvětluje větší inhibiční účinek esenciálního oleje získaného HD, kde je procento linaloolu vyšší.

Tabulka 18: Inhibiční zóny esenciálního oleje z levandule lékařské testovaných mikroorganismů

Levandule lékařská	Šířka inhibiční zóny [mm]					
	SD			HD		
	exp. 1	exp. 2	průměr	exp. 1	exp. 2	Průměr
<i>Escherichia coli</i>	11	11	11	15	18	16,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	17	16	19	20	19,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	10	11	11	11	11
<i>Candida albicans</i>	11	10	10,5	11	11	11



Obrázek 5: Diskový difúzní test levandule lékařské

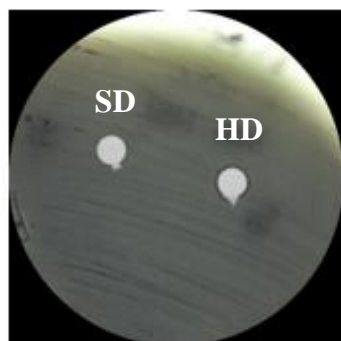
5.3.2 Vavřín ušlechtilý

Výsledky antimikrobiálních účinků esenciálního oleje získaného z vavřínu ušlechtilého stanovených diskovou difúzní metodou jsou uvedeny v tabulce 19 a obrázku 6. Esenciální oleje získané z obou destilačních metod inhibovaly všechny testované mikroorganismy v různé míře,

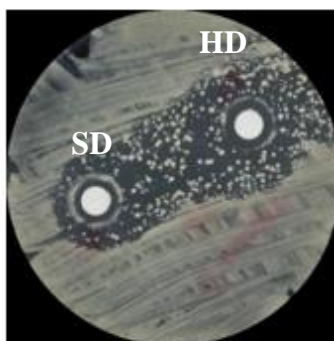
kromě *Escherichia coli*, která nebyla inhibována žádným z olejů. Esenciální olej získaný SD měl větší inhibiční účinnost než esenciální olej získaný SD na *Enterococcus faecalis* a *Candida albicans*. Na *Staphylococcus aureus* měl větší inhibiční účinky olej získaný z HD. V případě *Pseudomonas aeruginosa* byla senzitivita bakterie k oběma vzorkům (SD a HD) identická. Nejcitlivější zkoumaný mikroorganismus byl *Enterococcus faecalis*. Navíc esenciální olej získaný SD měl na *Enterococcus faecalis* hodně podobný účinek, jako mělo antibiotikum ampicilin (Tabulka 17). Různé antimikrobiální účinky olejů získaných z SD a HD budou nejspíše způsobeny odlišným procentuálním zastoupením hlavních složek obou olejů.

Tabulka 19: Inhibiční zóny esenciálního oleje z vavřínu ušlechtilého testovaných mikroorganismů

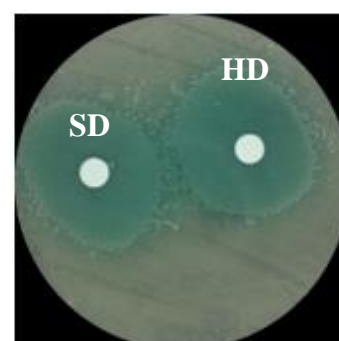
Vavřín ušlechtilý	Šířka inhibiční zóny [mm]					
	SD			HD		
	exp. 1	exp. 2	průměr	exp. 1	exp. 2	průměr
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	8	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	11	11,5	16	13	14,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	7	6,5	6	7	6,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	20	20	15	14	14,5
<i>Candida albicans</i>	17	19	18	14	16	15



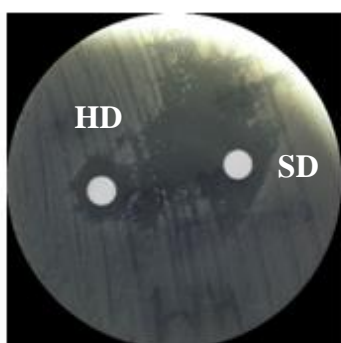
E. coli – vavřín ušlechtilý



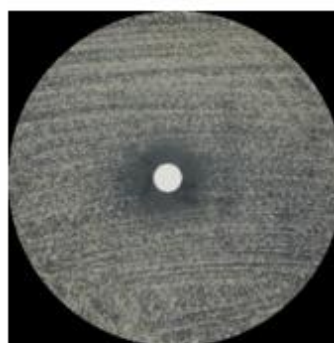
S. aureus – vavřín ušlechtilý



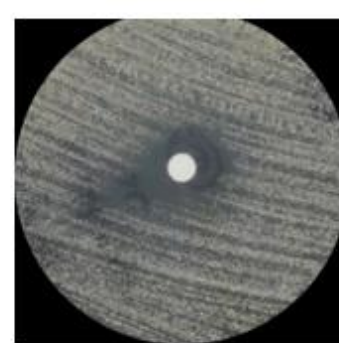
Ps. aeruginosa – vavřín ušlechtilý



Ent. faecalis – vavřín ušlechtilý



C. albicans – vavřín ušlechtilý HD



C. albicans – vavřín ušlechtilý SD

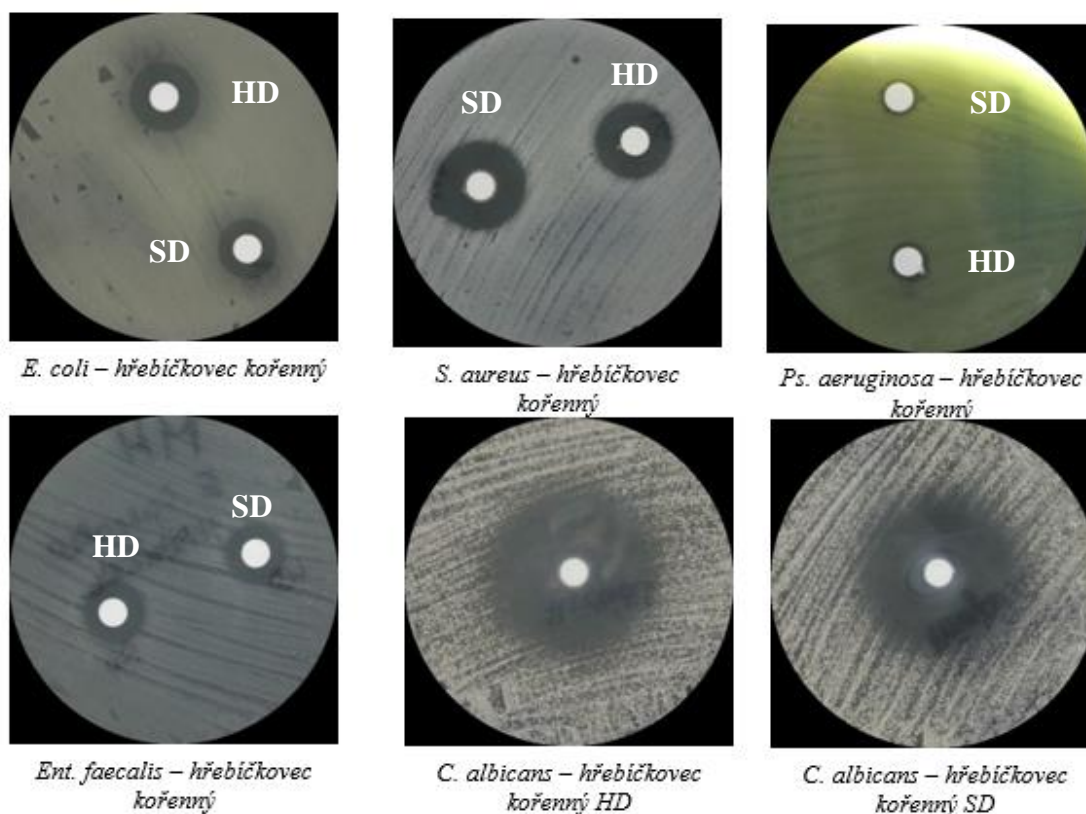
Obrázek 6: Diskový difúzní test vavřínu ušlechtilého

5.3.3 Hřebíčkovce kořený

Výsledky antimikrobiálních účinků esenciálního oleje získaného z hřebíčkovce kořeného stanovených agarovou diskovou difúzní metodou jsou uvedeny v tabulce 20 a obrázku 7. Esenciální oleje získané z obou destilačních metod inhibovaly všechny testované mikroorganismy přibližně ve stejné míře. Esenciální oleje z hřebíčku nejvíce inhibovaly *Candida albicans*, a to dvojnásobně více než standardně používané antifungitikum fluconazol. *Staphylococcus aureus* inhibovaly oleje ve stejné míře jako oleje získané z levandule lékařské a výsledky byly podobné jako inhibiční zóny růstu bakterie při použití antibiotika tetracyklin. Inhibiční účinky esenciálních olejů na růst *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis* nebyly tolik významné. Podobné inhibiční vlastnosti esenciálních olejů získaných z SD a HD na růst mikroorganismů budou nejspíše způsobeny podobným procentuálním složením hlavních složek olejů, které by se pravděpodobně mohli podílet na antimikrobiální aktivitě EO. Esenciální oleje získané z hřebíčku se ze všech esenciálních olejů jeví jako nejsilnější přírodní antibiotikum. Hřebíček je jedna z nejbohatších rostlin na fenolické látky jako je eugenol a eugenylacetát, které mají silné biologické vlastnosti, respektive antimikrobiální vlastnosti. V námi získaných olejích, SD a HD, byly tyto dvě látky obsaženy v procentuálním zastoupení cca 90 %, což vysvětluje a potvrzuje velice silné antimikrobiální vlastnosti hřebíčkového oleje.

Tabulka 20: Inhibiční zóny esenciálního oleje z hřebíčkovce kořeného testovaných mikroorganismů

<i>Hřebíčkovce kořený</i>	Šířka inhibiční zóny [mm]					
	SD			HD		
<i>Testovaný mikroorganismus</i>	exp. 1	exp. 2	průměr	exp. 1	exp. 2	průměr
<i>Escherichia coli</i>	13	14	13,5	16	15	15,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	20	20	20	19	19,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	8	8	9	9	9
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	12	12	13	14	13,5
<i>Candida albicans</i>	35	36	35,5	35	36	35,5



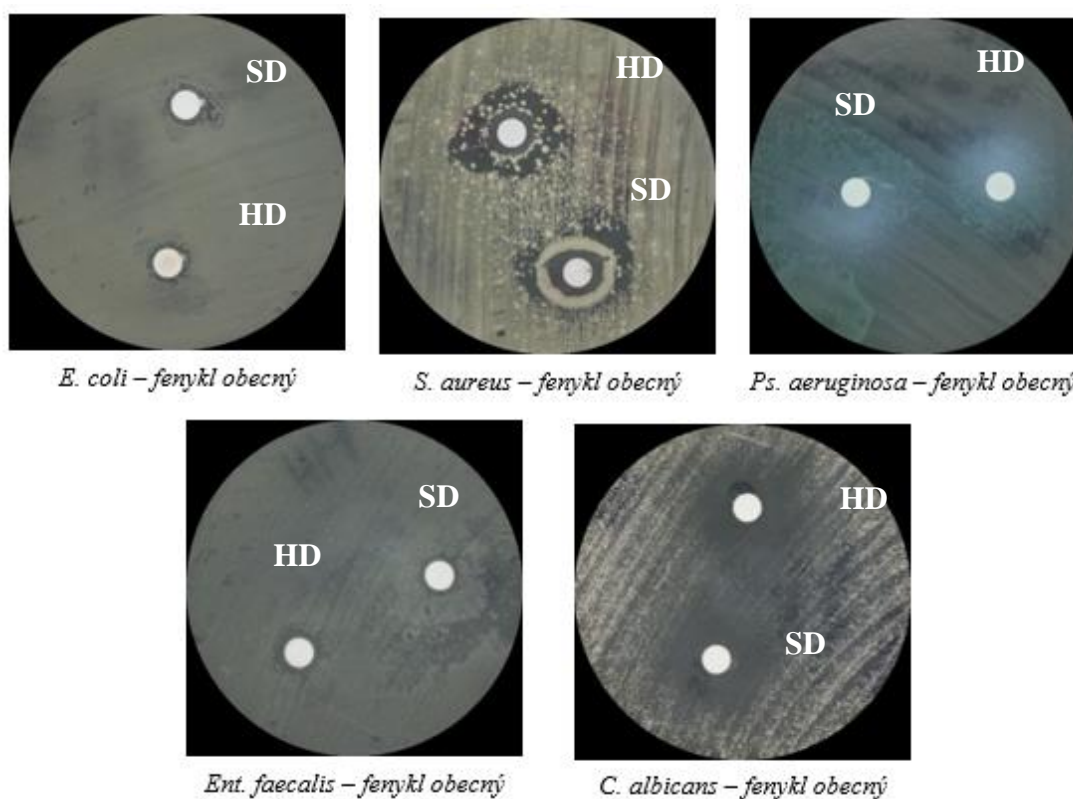
Obrázek 7: Diskový difúzní test hřebíčkovce kořeného

5.3.4 Fenykl obecný

Výsledky antimikrobiálních účinků esenciálního oleje získaného z fenyklu obecného stanovených diskovou difúzní metodou jsou uvedeny v tabulce 21 a obrázku 8. Inhibice růstu mikroorganismu byla v případě SD i HD velmi podobná u všech testovaných mikroorganismů. Fenyklový olej měl nejsilnější účinek na *Candida albicans* ze všech testovaných mikroorganismů. Tento účinek na *Candida albicans* byl srovnatelný s účinkem antibiotika fluconazol. Podobné inhibiční vlastnosti esenciálních olejů získaných z SD a HD na růst mikroorganismů, stejně jako v případě hřebíčku, budou nejspíše způsobeny podobným procentuálním složením hlavních složek olejů, které by se pravděpodobně mohli podílet na antimikrobiální aktivitě EO.

Tabulka 21: Inhibiční zóny esenciálního oleje z fenyklu obecného testovaných mikroorganismů

Fenykl obecný Testovaný mikroorganismus	Šířka inhibiční zóny [mm]					
	SD			HD		
	exp. 1	exp. 2	průměr	exp. 1	exp. 2	průměr
<i>Escherichia coli</i>	9	9	9	9	9	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	12	12,5	11	11	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	7	7	7	7	7
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	10	10	10	11	10,5
<i>Candida albicans</i>	23	24	23,5	20	22	21



Obrázek 8: Diskový difúzní test fenyklu obecného

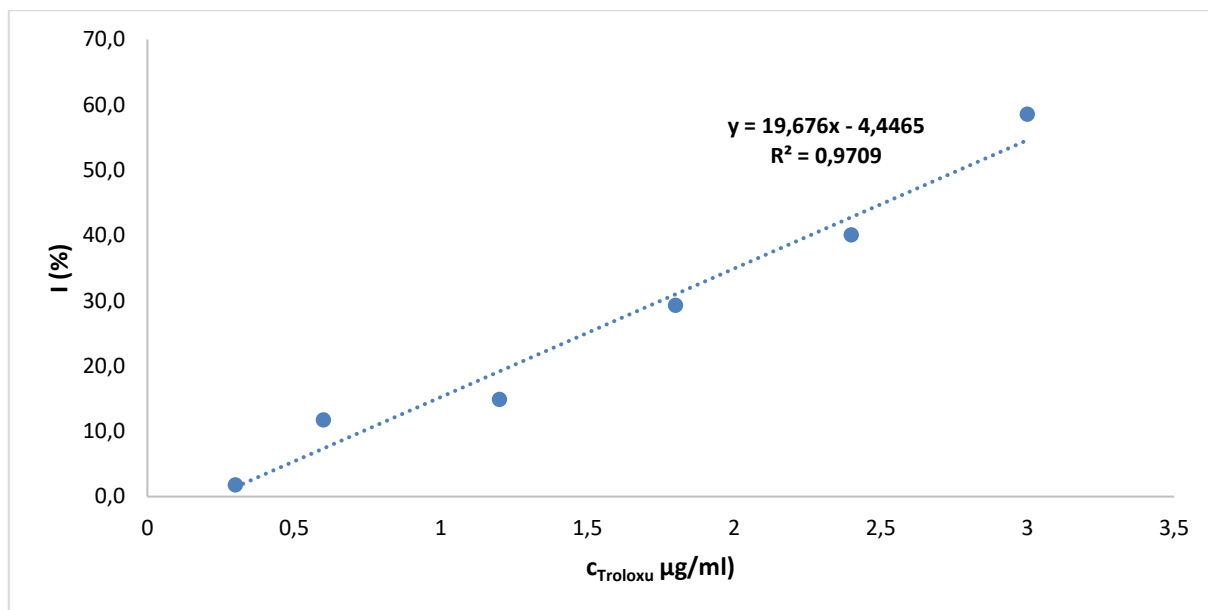
5.4 Vliv složení esenciálních olejů na jejich antioxidační aktivitu

Účinky esenciálních olejů na volný DPPH radikál jsou uvedeny v tabulce 23 a výsledky kalibrační řady jsou uvedeny v tabulce 22. Pro vyhodnocení výsledků ve formě ekvivalentu standardu bylo nutné sestavit kalibrační řadu, jejíž graf 6 a rovnice lineární regrese byla použita pro výpočet TEAC. Jak je patrné ze sloupcového grafu 7, až na levandulový olej měly oleje získané parní destilací větší antioxidační aktivitu než oleje získané hydrodestilací. Silnější AOX účinnost olejů získaných parní destilací bude pravděpodobně způsobena tím, že je parní destilace z fyzikálního hlediska šetrnější k rostlinnému materiálu, který není jako v případě HD

ponořen do vroucí vody, ale pouze přes něj prochází pára a složky se extrahují do ní. Toto tvrzení potvrzuje i studie **Danh L.T. a kol.**, kde zjistili, že SFE extrakty měly větší AOX účinnost než extrakty získané hydrodestilací. Toto zjištění bylo přisouzeno právě větší fyzikální šetrnosti SFE k rostlinnému materiálu, protože při SFE nedochází vzhledem k nižším teplotám extrakce k teplotní degradaci aktivních složek esenciálního oleje [26]. Největší antioxidační účinnost měl olej z hřebíčku, který musel být oproti ostatním olejům 1000x zředěn. Poté měl nejsilnější AOX účinnost vavřík, avšak téměř 1000x menší než hřebíčkový olej. Levandulové a fenyklové oleje měly oproti vavříku AOX aktivitu cca o polovinu menší a jejich aktivity byly podobné. Velmi silné antioxidační účinky hřebíčkového oleje jsou pravděpodobně způsobeny velkým obsahem fenolických látek, jako je eugenol (76,78 %) a eugenylacetát (19,47 %), které způsobují AOX aktivitu látek. V esenciálních olejích fenyklu a vavříku jsou deriváty fenylpropenu obsaženy pouze ve velmi malém množství (méně než 1 %) a v levanduli nejsou obsaženy žádné. Antioxidační aktivita esenciálních olejů bude tedy způsobena především látkami fenolické povahy, přesněji deriváty fenylpropenu a méně dalšími těkavými sloučeninami.

Tabulka 22: Naměřené absorbance a vypočítané inhibice radikálu standardem Troloxem

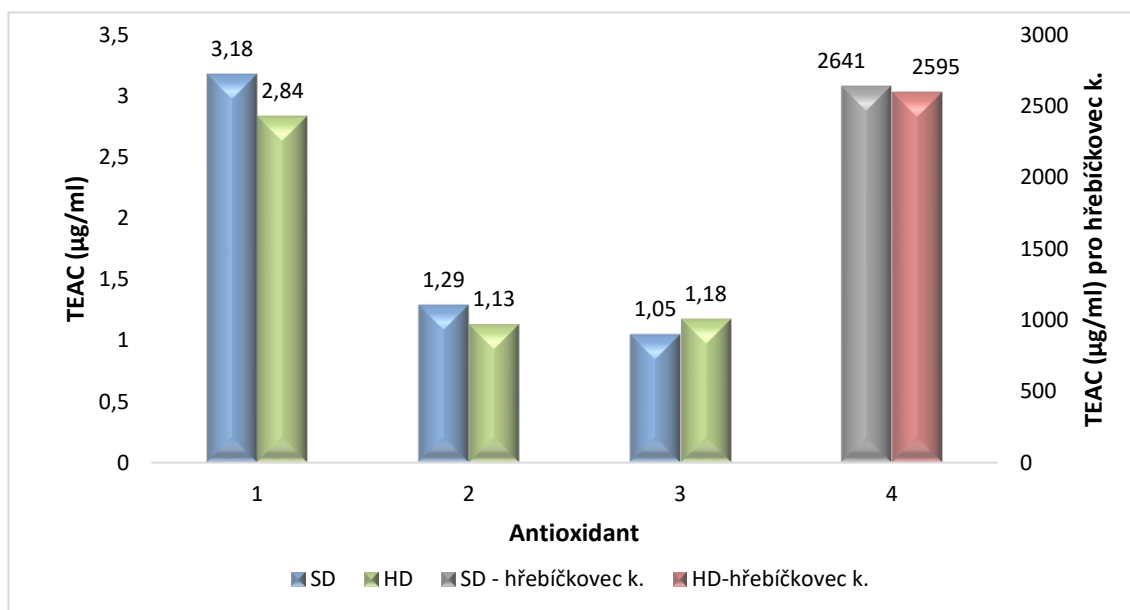
Kalibrace Troloxu		
c_{Troloxu} (µg/ml)	Absorbance (517 nm)	I (%)
3,0	0,092	58,6
2,4	0,133	40,1
1,8	0,157	29,3
1,2	0,189	14,9
0,6	0,196	11,7
0,3	0,218	1,8



Graf 6: Kalibrační graf antioxidantní aktivity esenciálních olejů

Tabulka 23: Naměřené absorbance a vypočítané inhibice DPPH radikálu a TEAC esenciálních olejů po započítání zředovacích faktorů

Vzorky		Absorbance		I (%)		TEAC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	
		AbSSD prům.	AbSHD prům.	SD	HD	SD	HD
1	Vavřín ušlechtilý	0,093	0,108	58,1	51,3	3,18	2,84
2	Fenykl obecný	0,176	0,183	20,9	17,8	1,29	1,13
3	Levandule lékařská	0,186	0,181	16,2	18,7	1,05	1,18
4	Hřebíček kořený	0,117	0,119	47,5	46,6	2641	2595



Graf 7: Antioxidantní aktivita esenciálních olejů – inhibice DPPH radikálu

(1-vavřín ušlechtilý, 2-fenykl obecný, 3-levandule lékařská, 4-hřebíček kořený)

5.5 Celkové zhodnocení biologických vlastností esenciálních olejů získaných hydrodestilací a parní destilací

Z hlediska biologických vlastností (antimikrobiálních i antioxidačních) všech získaných esenciálních olejů byl nejsilnější EO získaný z hřebíčku. Toto zjištění potvrzuje předpoklad, že za biologické vlastnosti esenciálních olejů mohou zejména látky fenolické povahy, které byly v hřebíčkovém oleji obsaženy přes 90 %. Pravděpodobně by bylo možné použít tento esenciální olej jako silný antioxidant vedle komerčně dostupných syntetických sloučenin. Hřebíčkový esenciální olej vykazoval velmi silné antimikrobiální účinky na kvasinku *Candida albicans*, a to dokonce dvojnásobně vyšší než antifungitikum fluconazol, které se běžně používá na kvasinková a jiná plísňová onemocnění. Vavřínový olej měl také velmi silné antioxidační účinky, avšak nižší než hřebíčkový olej, zřejmě protože neobsahoval takové množství fenolických látek. Nejsilněji ze všech esenciálních olejů působil na *Enterococcus faecalis*. Na *Staphylococcus aureus* měl nejsilnější účinky olej získaný z hřebíčku a levandule, a to podobný jako antibiotikum tetracyklin. Levandulový olej neobsahoval žádné fenolické látky, ale obsahoval velké procento linaloolu, který má velmi silné antimikrobiální vlastnosti. *Pseudomonas aeruginosa* je velmi odolná gramnegativní bakterie, na kterou nejvíce působil esenciální olej z fenyklu, hřebíčku a vavřínu, avšak inhibice byla oproti používanému antibiotiku tetracyklin a ciprofloxacin velmi nízká. Nejsilnější inhibiční účinek na růst *Escherichia coli* měl esenciální olej z levandule a hřebíčku.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo porovnat parní destilaci a hydrodestilaci z hlediska výtěžnosti esenciálního oleje, jeho složení a biologických charakteristik. Vzhledem k tomu, že existuje velmi málo studií, které by se věnovaly srovnání SD a HD mezi sebou, přinesla naše práce zajímavé poznatky. Navíc esenciální olej z fenyklu obecného a hřebíčkovce kořeného byl prozatím relativně málo prozkoumán jak z chemického, tak z biologického hlediska. Nejvíce byla ve studiích k extrakci esenciálního oleje z rostlinného materiálu používána hydrodestilace [26, 43, 47, 77, 80-84]. Méně byla používána parní destilace [25, 48, 57, 58, 85]. Pouze ve dvou studiích byly porovnávány tyto dvě extrakční techniky (HD, SD) a jejich vliv na výtěžnost a chemické složení, ale nebyla hodnocena antioxidační a antimikrobiální aktivita esenciálních olejů [24, 76].

Z práce vyplynulo, že výtěžnost esenciálního oleje závisí na typu zvolené extrakční metody. Vyšší výtěžek esenciálního oleje z levandule a hřebíčku byl získán parní destilací. Naopak většího výtěžku esenciálního oleje z fenyklu a vavřínu bylo dosaženo hydrodestilací. Pokud bychom chtěli hodnotit, jestli je pro výtěžnost z hlediska destilační metody lepší hydrodestilace nebo parní destilace, nelze jednoznačně říci, že to byla jedna nebo druhá metoda, protože výsledky se u každé matrice lišily. Proto by bylo nejlepší pro maximální výtěžnost esenciálního oleje z rostlinné matrice zvolit destilační metodu podle charakteru izolované látky, dané rostliny, či její části. Nejbohatší na esenciální oleje byl hřebíček, poté levandule, a nakonec byl na stejné úrovni fenykl a vavřín. V literatuře se uvádí, že na výtěžnost esenciálního oleje má také značný vliv doba destilace [57], či úprava rostlinného materiálu například drcením, kdy se naruší olejové buňky [24]. Tyto dva parametry by bylo vhodné zkoumat v dalších pracích, neboť v souvislosti s esenciálními oleji se jimi zabývá velmi málo studií a nejsou do hloubky prozkoumány.

Obecně je možné říci, že esenciální oleje získané parní destilací obsahují více sloučenin než esenciální oleje získané hydrodestilací. Tento poznatek může být způsoben tepelným rozkladem některých složek esenciálního oleje při přímém kontaktu s vroucí vodou při hydrodestilaci. Z tohoto důvodu je parní destilace z fyzikálního hlediska k rostlinnému materiálu šetrnější. Esenciální olej získaný z levandule, vavřínu a fenyklu obsahoval nejvíce monoterpenů a jejich oxidovaných forem. Jediný esenciální olej z hřebíčku obsahoval největší množství derivátů fenypropenu. Nelze jednoznačně říci, jestli hydrodestilace nebo parní destilace poskytuje látky s vyšším procentuálním obsahem složek v oleji, protože u levandule

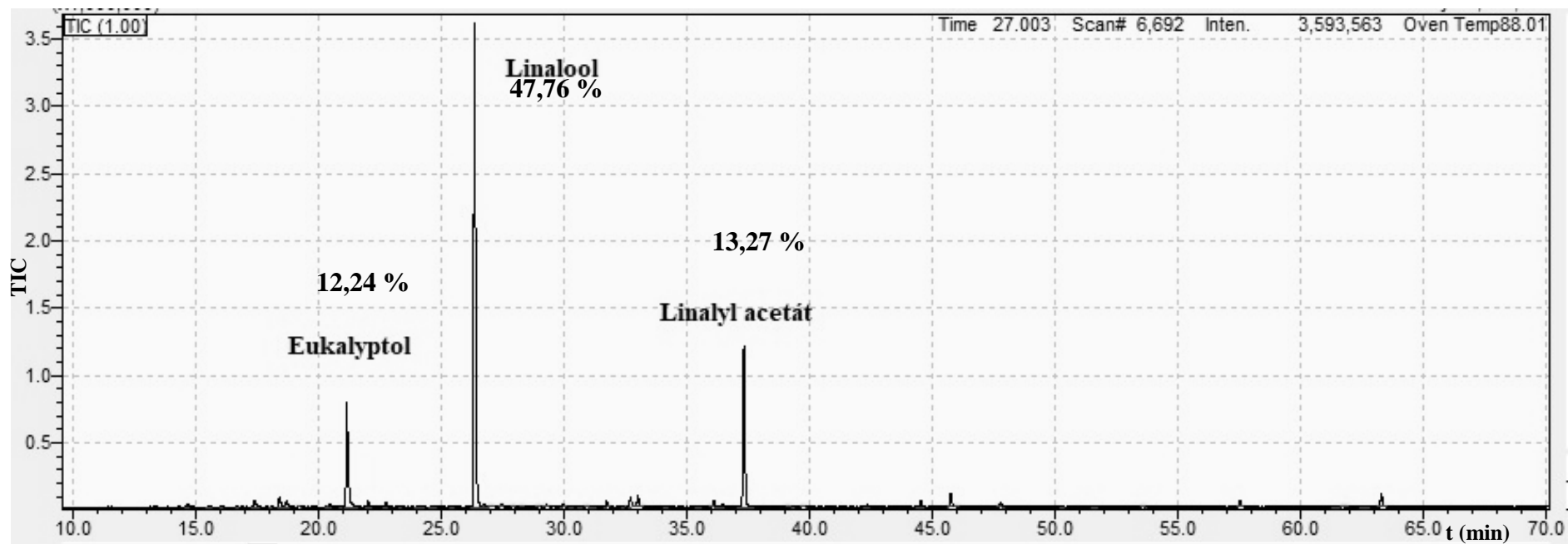
a vavřínu byly složky v olejích různě procentuálně zastoupeny. V esenciálním oleji získaném SD i HD hřebíčku a fenyklu byly složky velmi podobně procentuálně zastoupeny. Rozdílné složení námi získaných esenciálních olejů a olejů z literatury může být ovlivněno agronomickými faktory, jako je původ vzorků, doba sklizně či uskladnění sklizeného materiálu. Dále by mohlo mít vliv na složení esenciálního oleje zpracování rostlinného materiálu před destilací (sušení, drcení, stříhání, mletí aj.), délka trvání destilace (obsah některých složek v různých časech destilace kolísá) a další faktory. Na množství identifikovaných sloučenin mohou mít vliv i parametry analýzy (např. použitá kolona, teplotní program aj.)

Nejsilnější antiooxidační účinky měl esenciální olej získaný z hřebíčku. Toto zjištění potvrzuje předpoklad, že za biologické vlastnosti esenciálních olejů mohou zejména látky fenolické povahy, které byly v hřebíčkovém oleji obsaženy přes 90 %. Pravděpodobně by bylo možné použít tento esenciální olej jako silný antioxidant vedle komerčně dostupných syntetických sloučenin. Obecně na gramnegativní bakterie působily více esenciální oleje získané hydrodestilací. Na grampozitivní bakterie většinou působily esenciální oleje z hydrodestilace i parní destilace stejně, nebo výjimečně z HD o trochu více. Na kvasinky působily nejčastěji oba esenciální oleje z hydrodestilace a parní destilace buď stejně, nebo z SD více. Pokud tyto skutečnosti zobecníme, je možné vyvodit, že proti bakteriím by mohly být lepší esenciální oleje získané hydrodestilací, naopak proti kvasinkám esenciální oleje získané parní destilací. Esenciální oleje obsahující látky fenolové povahy mají nejsilnější biologické vlastnosti, oproti uhlovodíkům. I přesto mohou být silnými antioxidanty a antimikrobiálními látkami i esenciální oleje, které neobsahují žádné látky fenolické povahy, protože biologické vlastnosti nejsou způsobeny působením pouze těchto látek, ale několika dalších z řady monoterpenů a jejich oxidovaných forem (například linalool). Předpokládá se, že vybrané látky v esenciálních olejích mají synergické účinky a zvyšují tak účinnost méně účinných sloučenin, které by samy o sobě neměly tak silné biologické vlastnosti.

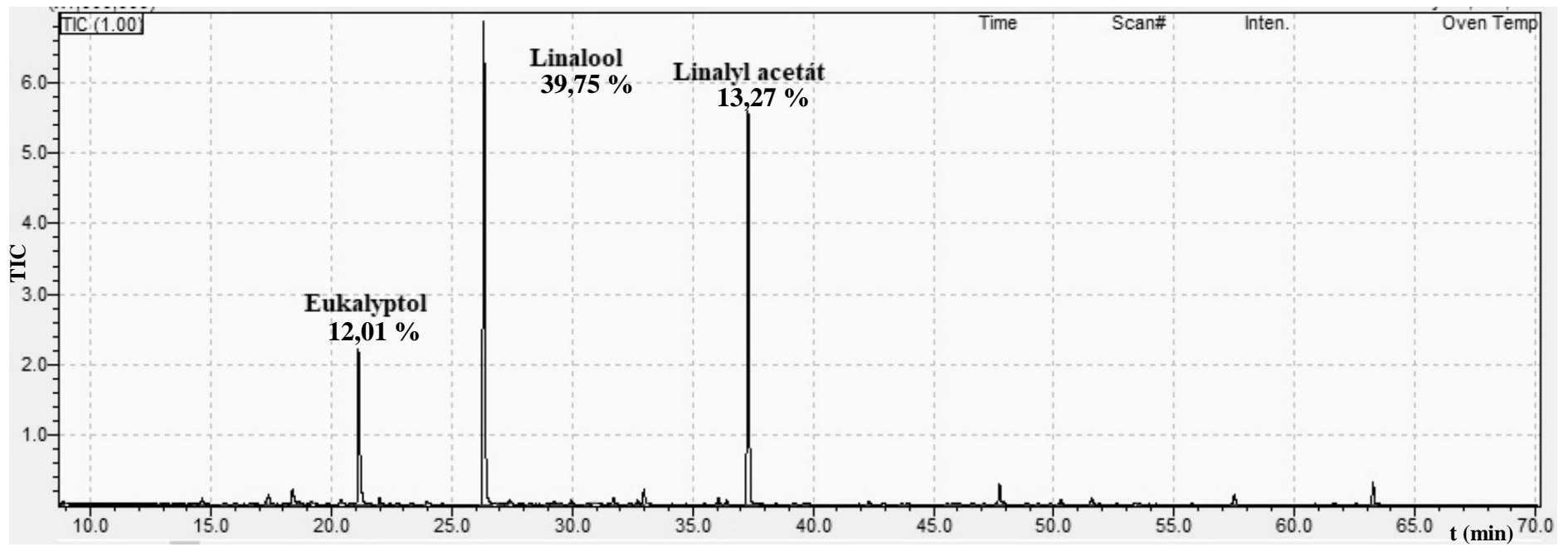
Závěrem není možné jednoznačně s jistotou říct, jestli je hydrodestilace či parní destilace lepší, protože každá z nich poskytla různé výsledky ve výtěžnosti, chemickém složení i biologických vlastnostech esenciálních olejů. Při výběru extrakční metody je pro extrakci esenciálních olejů nutné brát v potaz za jakým účelem bude esenciální olej používán, jestli preferujeme větší výtěžnost, vyšší procentuální zastoupení některé ze složek, nebo dobré antiooxidační a antimikrobiální vlastnosti. Dále je při výběru extrakční metody potřeba zvážit, kterou matici budeme destilovat (čerstvá vs. sušená, celá rostlina vs. části rostliny), z jaké geografické oblasti je sklizena a jakým způsobem je dále upravována.

7 PŘÍLOHY

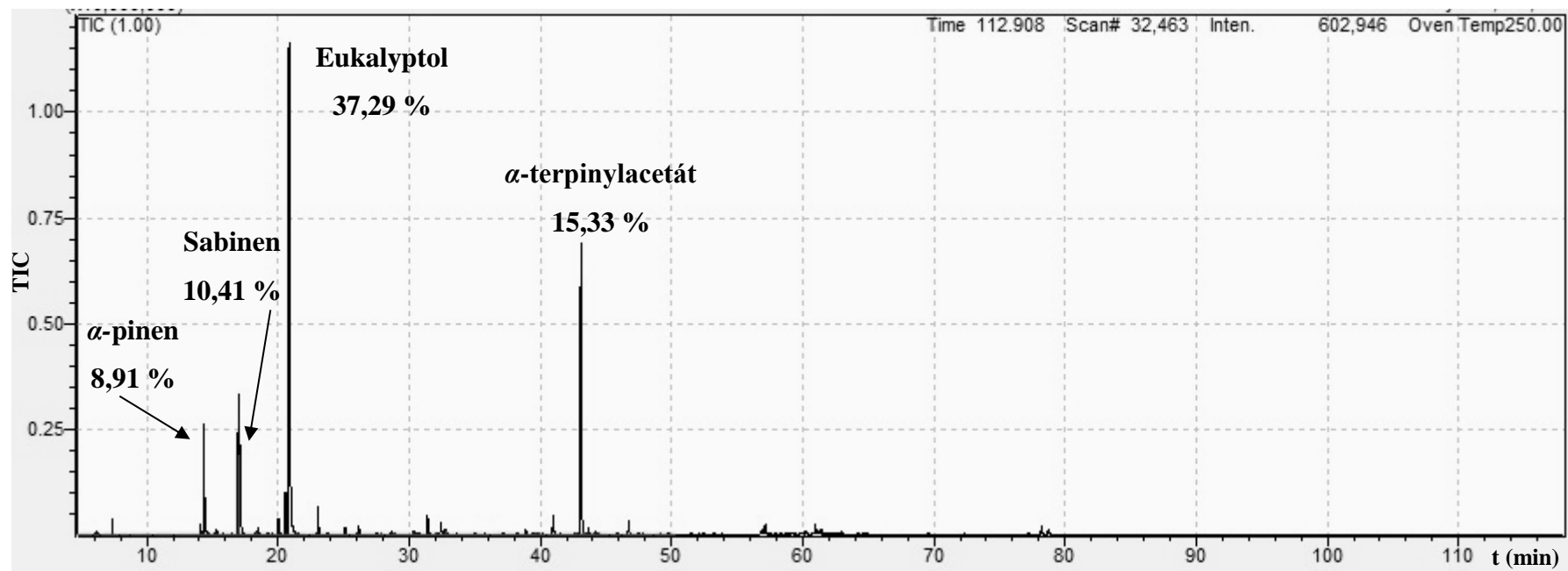
601



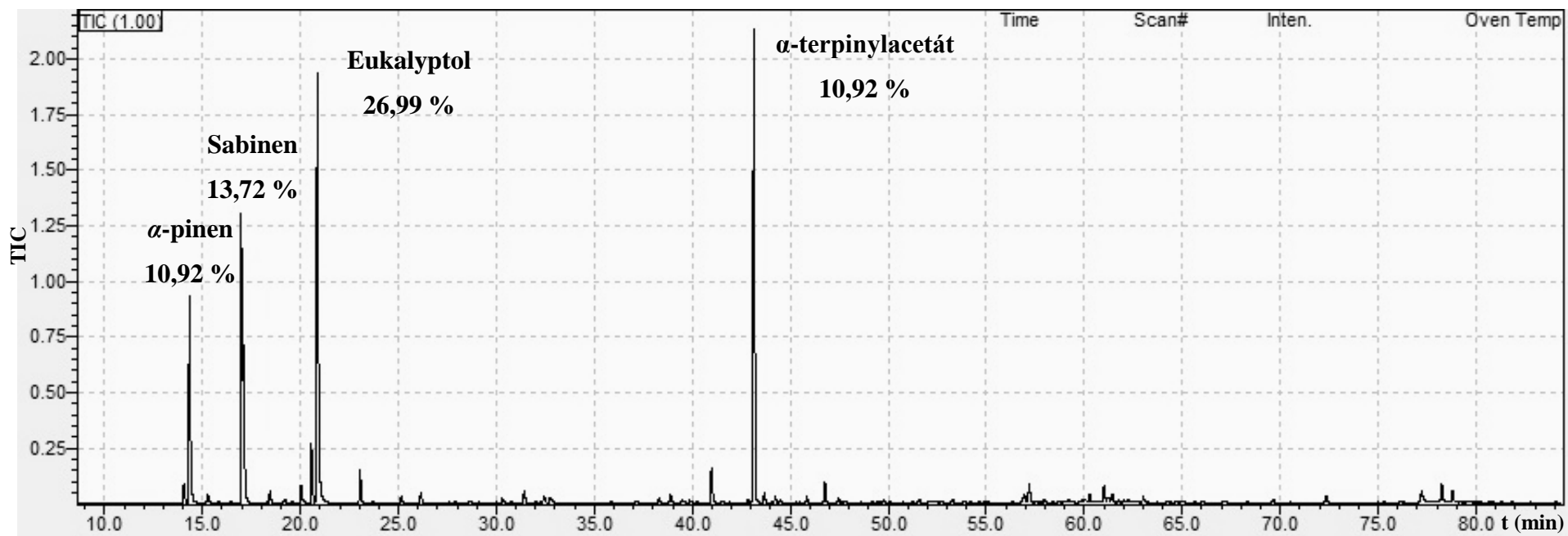
Příloha 1: Chromatogram GC-MS levandule lékařská hydrodestilace



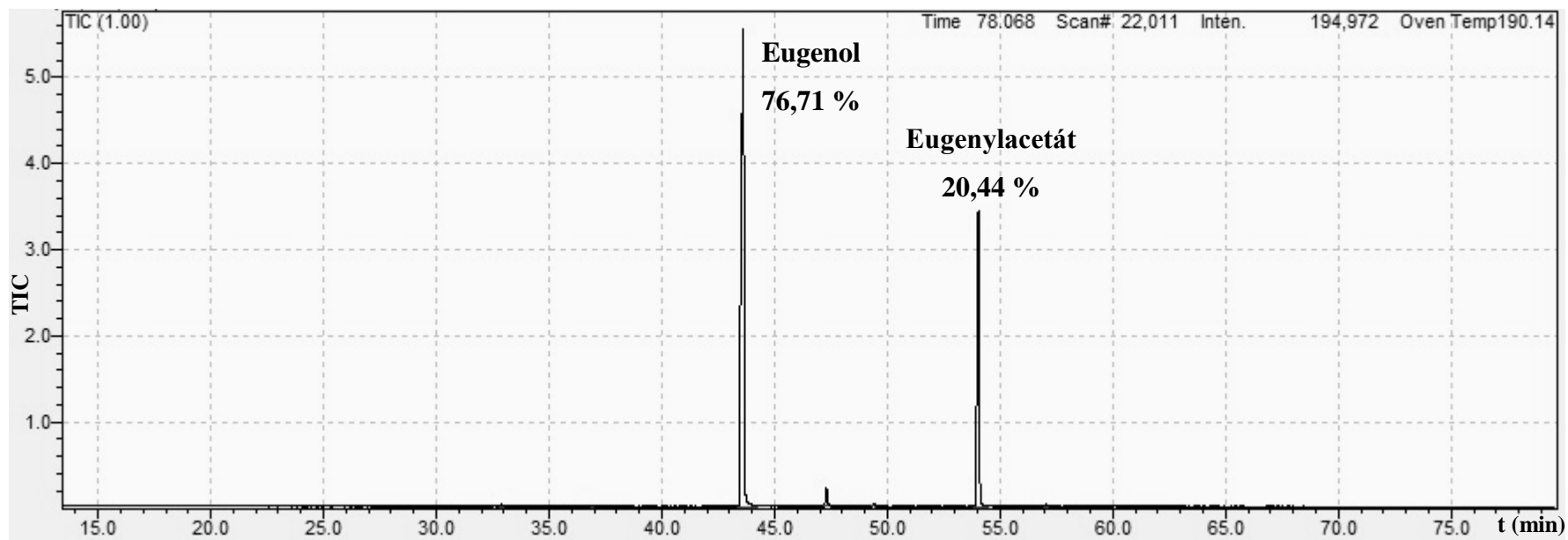
Příloha 2: Chromatogram GC-MS levandule lékařská parní destilace



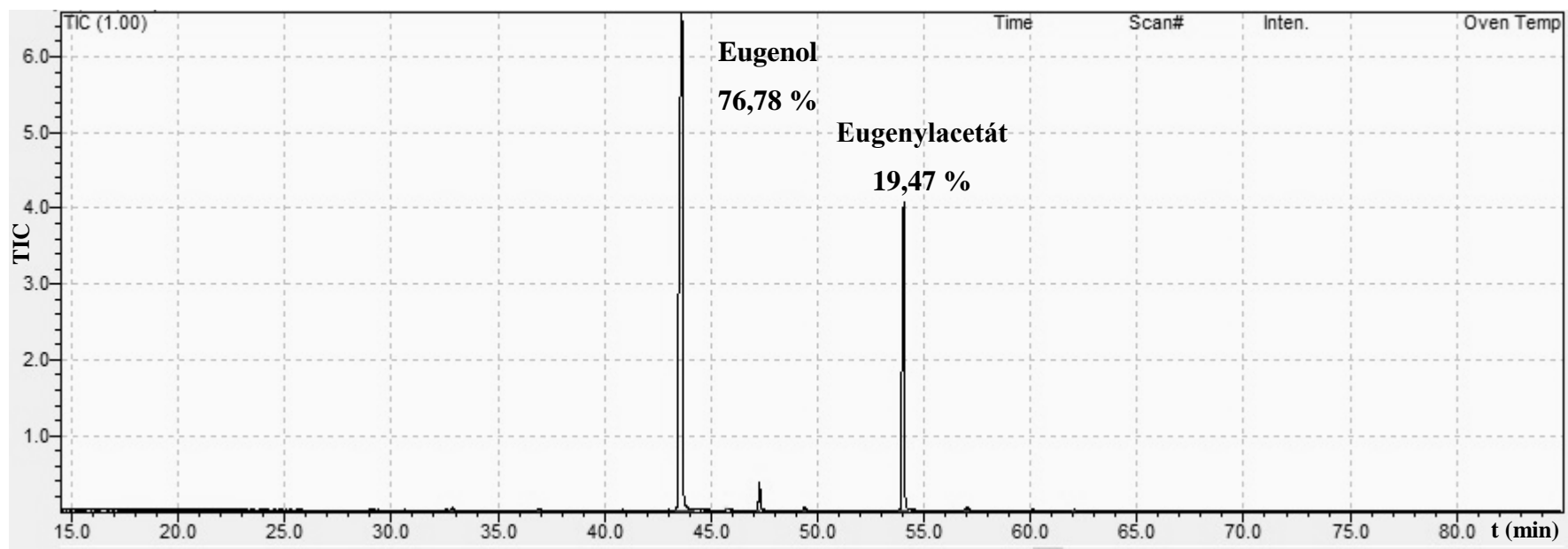
Příloha 3: Chromatogram GC-MS vavřín ušlechtilý hydrodestilace



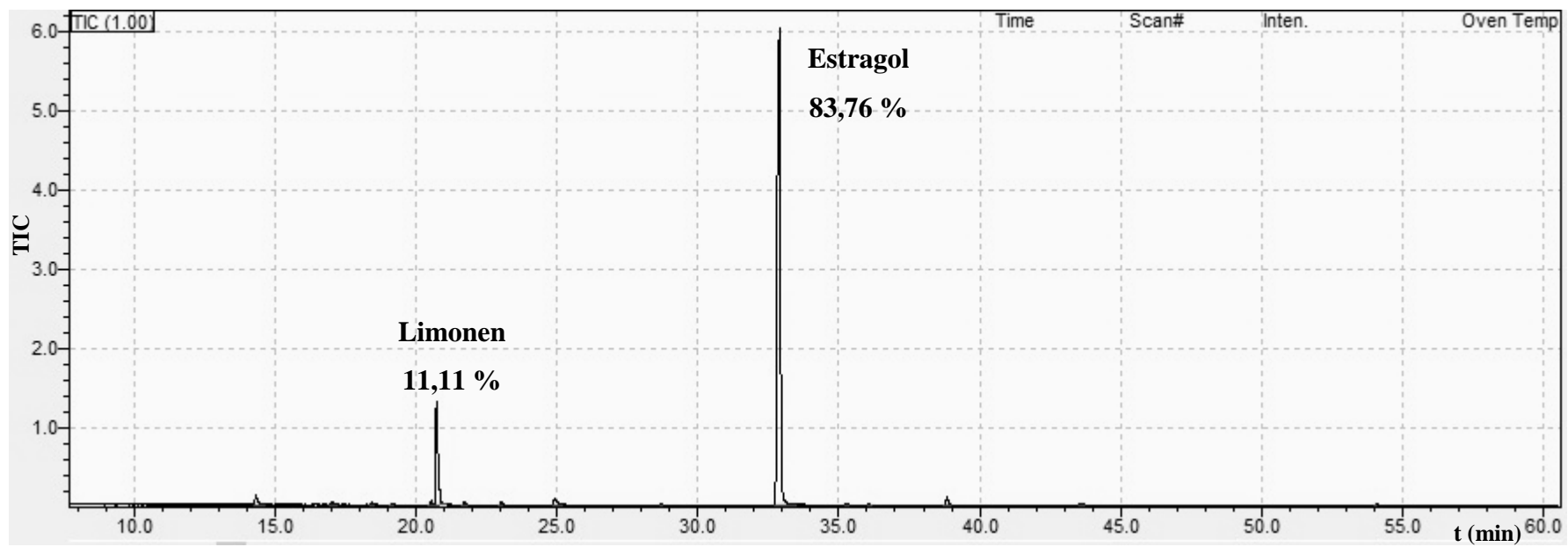
Příloha 4: Chromatogram GC-MS vavřín ušlechtilý parní destilace



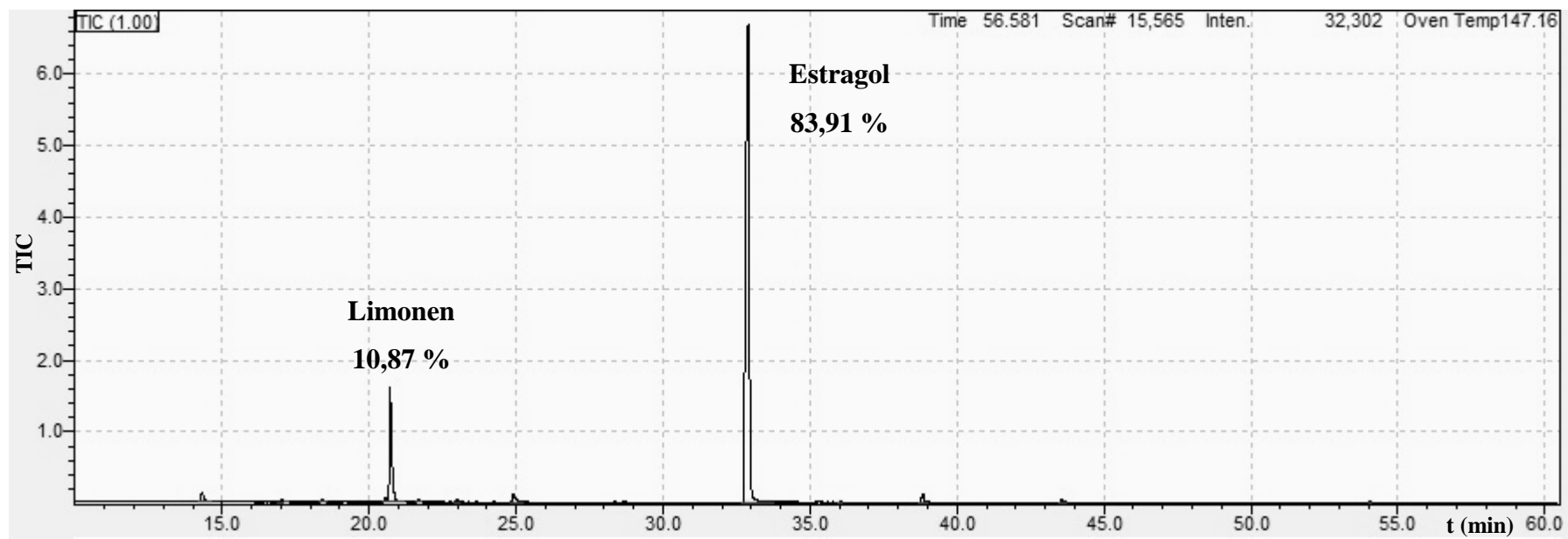
Příloha 5: Chromatogram GC-MS hřebíčkovce kořený hydrodestilace



Příloha 6: Chromatogram GC-MS hřebíčkovce kořenný parní destilace



Příloha 7: Chromatogram GC-MS fenykl obecný hydrodestilace



Příloha 8: Chromatogram GC-MS fenykl obecný parní destilace

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Baser, K.H.C. and G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications* 2015: CRC Press.
2. Hüsnü, K., C. Başer, and F. Demirci, *Chemistry of Essential Oils*, in *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, R.G. Berger, Editor 2007, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 43-86.
3. Hubík, J., et al., *Obecná farmakognosie II. Sekundární látky*, 1989. **3**: p. 31-33.
4. Rakersh Kumar, Y.C.T., *Training manual on extraction technology of natural dye and aroma therapy and cultivation value addition of medicinal plants*, F.R. Institute, Editor 2011: Dehradun. p. 200.
5. Ali, B., et al., *Essential oils used in aromatherapy: A systemic review*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2015. **5**(8): p. 601-611.
6. Bakkali, F., et al., *Biological effects of essential oils—a review*. Food and chemical toxicology, 2008. **46**(2): p. 446-475.
7. Adorjan, B. and G. Buchbauer, *Biological properties of essential oils: an updated review*. Flavour and Fragrance Journal, 2010. **25**(6): p. 407-426.
8. Dvořáková, M., I. Valterová, and T. Vaněk, *Monoterpeny v rostlinách*. Chem. Listy, 2011. **105**: p. 839-845.
9. Aprotosoae, A.C., et al., *Essential oils of Lavandula genus: a systematic review of their chemistry*. Phytochemistry Reviews, 2017. **16**(4): p. 761-799.
10. Wikiknihy. *Přírodní látky/Chemie přírodních látek/Přehled přírodních látek/Isoprenoidy*. 2017; Available from: https://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%AD_1%C3%A1tky/Chemie_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_1%C3%A1tek/P%C5%99ehled_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_1%C3%A1tek/Isoprenoidy.
11. Koul, O., S. Walia, and G. Dhaliwal, *Essential oils as green pesticides: potential and constraints*. Biopestic Int, 2008. **4**(1): p. 63-84.
12. Marriott, P.J., R. Shellie, and C. Cornwell, *Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils*. Journal of Chromatography A, 2001. **936**(1-2): p. 1-22.
13. Can Baser, K., *Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils*. Current pharmaceutical design, 2008. **14**(29): p. 3106-3119.
14. Kanat, M. and M.H. Alma, *Insecticidal effects of essential oils from various plants against larvae of pine processionary moth (Thaumetopoea pityocampa Schiff)(Lepidoptera: Thaumetopoeidae)*. Pest management science, 2004. **60**(2): p. 173-177.
15. Wikipedia. *Liniment*. 2018; Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Liniment>.
16. Veit, M., *Léčivá kosmetika z přírody* 2015, Praha: Grada Publishing s.r.o. 200
17. Ayvaz, A., et al., *Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects*. Journal of Insect Science, 2010. **10**(21): p. 1-13.
18. MedicineNet, I. *Antimicrobial agent*. 2017; Available from: <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=10204>.
19. Hammer, K.A., C. Carson, and T. Riley, *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. Journal of applied microbiology, 1999. **86**(6): p. 985-990.
20. Prabuseenivasan, S., M. Jayakumar, and S. Ignacimuthu, *In vitro antibacterial activity of some plant essential oils*. BMC complementary and alternative medicine, 2006. **6**(1): p. 39.

21. Tepe, B., et al., *In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of Thymus eigii M. Zohary et PH Davis*. Journal of agricultural and food chemistry, 2004. **52**(5): p. 1132-1137.
22. Darokar, M., et al., *Detection of antibacterial activity in the floral petals of some higher plants*. Current Science, 1998. **75**(3): p. 187-189.
23. Koroch, A.R., H.R. Juliani, and J.A. Zygadlo, *Bioactivity of essential oils and their components*, in *Flavours and fragrances 2007*, Springer. p. 87-115.
24. Guan, W., et al., *Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods*. Food Chemistry, 2007. **101**(4): p. 1558-1564.
25. Jianu, C., et al., *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x intermedia*) grown in Western Romania*. Int. J. Agric. Biol, 2013. **15**: p. 772-776.
26. Danh, L.T., et al., *Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils extracted by supercritical CO₂, hexane and hydrodistillation*. Food and Bioprocess Technology, 2013. **6**(12): p. 3481-3489.
27. Jenjittikul, T., *Comparison of chemical compositions and in vitro antioxidant activities of essential oils obtained by steam distillation and water distillation from curcuma *angustifolia* roxb. Roots and Rhizomes from Thailand*. 2017.
28. Lee, K.-G. and T. Shibamoto, *Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(17): p. 4947-4952.
29. Patel, S., *Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products: a review*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2015. **32**(7): p. 1049-1064.
30. Halliwell, B., J.M. Gutteridge, and C.E. Cross, *Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?* The Journal of laboratory and clinical medicine, 1992. **119**(6): p. 598-620.
31. Korbelař, J., Z. Endris, and J. Krejča, *Naše rostliny v lékařství 1974*: Avicenum.
32. Djemaa, F.G.B., et al., *Antioxidant and wound healing activity of *Lavandula aspic* L. ointment*. Journal of Tissue Viability, 2016. **25**(4): p. 193-200.
33. Mori, H.-M., et al., *Wound healing potential of lavender oil by acceleration of granulation and wound contraction through induction of TGF- β in a rat model*. BMC complementary and alternative medicine, 2016. **16**(1): p. 144.
34. Franco, L., et al., *Both lavender fleur oil and unscented oil aromatherapy reduce preoperative anxiety in breast surgery patients: a randomized trial*. Journal of Clinical Anesthesia, 2016. **33**: p. 243-249.
35. Kim, N.-S. and D.-S. Lee, *Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography a, 2002. **982**(1): p. 31-47.
36. Lesage-Meessen, L., et al., *Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology*. Applied microbiology and biotechnology, 2015. **99**(8): p. 3375-3385.
37. Raut, J.S. and S.M. Karuppayil, *A status review on the medicinal properties of essential oils*. Industrial Crops and Products, 2014. **62**: p. 250-264.
38. Hlava, B., F. Stary, and F. Powpisil, *Rastliny v kozmetike*. 1983.
39. Pamplona-Roger, G.D., *Encyclopedia of medicinal plants*. 2005.
40. Caputo, L., et al., *Laurus nobilis: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities*. Molecules, 2017. **22**(6).

41. Santoyo, S., et al., *Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from Laurus nobilis L. Chemical and functional characterization*. European Food Research and Technology, 2006. **222**(5-6): p. 565.
42. Ozcan, B., et al., *Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of Laurus nobilis seed oil*. 2010.
43. Flamini, G., et al., *Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of Laurus nobilis L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven*. Journal of Chromatography A, 2007. **1143**(1): p. 36-40.
44. Peter, K., *Handbook of herbs and spices*. Vol. 3. 2006: Woodhead publishing.
45. de Oliveira, M.S., et al., *Chemical composition and phytotoxic activity of clove (Syzygium aromaticum) essential oil obtained with supercritical CO₂*. Journal of Supercritical Fluids, 2016. **118**: p. 185-193.
46. Huang, X.W., et al., *Chemical composition, antioxidant and the possible use as skin-care ingredient of clove oil (Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry) and citronella oil (Cymbopogon goeringii) from China*. Journal of Essential Oil Research, 2013. **25**(4): p. 315-323.
47. Hammouda, F.M., et al., *Evaluation Of The Essential Oil Of Foeniculum Vulgare Mill (Fennel) Fruits Extracted By Three Different Extraction Methods By Gc/MS*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2014. **11**(2): p. 277-279.
48. Baby, K.C. and T.V. Ranganathan, *Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of fennel (Foeniculum vulgare) volatile oil*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2016. **8**: p. 248-256.
49. Macku, J. and J.I. Krejča, *Atlas liečivých rastlín*. 1965.
50. Dobiáš, P., et al. *Aplikace mikroextrakce tuhou fázi pro analýzu bylinných silic*. Chem. Listy, 2010. **104**: p. 166-171.
51. Hatab, S., et al., *Survival and Reduction of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in a Fresh Cold-Pressed Juice Treated with Antimicrobial Plant Extracts*. Journal of Food Science, 2016. **81**(8): p. M1987-M1995.
52. Opekar, F., et al., *Základní analytická chemie*. UK, Karolinum, Praha 2010. 203 str.
53. Cassel, E., et al., *Steam distillation modeling for essential oil extraction process*. Industrial crops and products, 2009. **29**(1): p. 171-176.
54. Sowbhagya, H. and V. Chitra, *Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials*. Critical reviews in food science and nutrition, 2010. **50**(2): p. 146-161.
55. Sowbhagya, H., et al., *Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil*. Food Chemistry, 2009. **113**(4): p. 1234-1238.
56. Sowbhagya, H., et al., *Enzyme-assisted extraction of volatiles from cumin (Cuminum cyminum L.) seeds*. Food chemistry, 2011. **127**(4): p. 1856-1861.
57. Zheljaskov, V.D., et al., *Distillation time effect on lavender essential oil yield and composition*. Journal of oleo science, 2013. **62**(4): p. 195-199.
58. Chemat, F., et al., *Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach*. Analytica Chimica Acta, 2006. **555**(1): p. 157-160.
59. Mills, G.A. and V. Walker, *Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials*. Journal of Chromatography A, 2000. **902**(1): p. 267-287.

60. Vas, G. and K. Vekey, *Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*. Journal of mass spectrometry, 2004. **39**(3): p. 233-254.
61. Horák, T., et al., *Head-space analysis in brewing analytics*. Kvasny Prumysl (Czech Republic), 2012.
62. Jurkova, M., et al., *New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials. Part 3. Comparison of HPLC and UHPLC determination of alpha-and beta-acids*. Kvasny Prumysl (Czech Republic), 2012.
63. Pallado, P., et al., *Gas chromatography/mass spectrometry in aroma chemistry: a comparison of essential oils and flavours extracted by classical and supercritical techniques*. Rapid communications in mass spectrometry, 1997. **11**(12): p. 1335-1341.
64. Ševčík, J.G., *Plynová chromatografie a její aplikace v organické analýze*. Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu, 2002. **1**: p. 103-150.
65. Méndez-Tovar, I., et al., *By-product of Lavandula latifolia essential oil distillation as source of antioxidants*. journal of food and drug analysis, 2015. **23**(2): p. 225-233.
66. LibreTexts. *Gas Chromatography*. 2015; Available from: https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography.
67. is.mendelu.cz. *Detektory v plynové chromatografii*. Available from: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52965.
68. Friedecký, D. and K. Lemr, *Úvod do hmotnostní spektrometrie*. Klin. Biochem. Metab, 2012. **20**(41): p. 152-157.
69. Holčápek, M., *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*. Sborník přednášek kurzu HPLC/MS. **1**.
70. Fisher, B., R.P. Harvey, and P.C. Champe, *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology (Lippincott's Illustrated Reviews Series)*. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-7817-8215-5, 2007.
71. Votava, M., et al., *Lékařská mikrobiologie: Vyšetřovací metody 2010*: Neptun.
72. Paulová, H. and Bochořeková, H., *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro*. Chem. listy, 2004. **98**: p. 174-179.
73. Antolovich, M., et al., *Methods for testing antioxidant activity*. Analyst, 2002. **127**(1): p. 183-198.
74. Yamaguchi, T., et al., *HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1998. **62**(6): p. 1201-1204.
75. An, M., T. Haig, and P. Hatfield, *On-site field sampling and analysis of fragrance from living lavender (Lavandula angustifolia L.) flowers by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography and ion-trap mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2001. **917**(1): p. 245-250.
76. Filly, A., et al., *Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers*. Comptes Rendus Chimie, 2016. **19**(6): p. 707-717.
77. Da Porto, C., D. Decorti, and I. Kikic, *Flavour compounds of Lavandula angustifolia L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods*. Food Chemistry, 2009. **112**(4): p. 1072-1078.
78. Stanojević, L., et al., *The effect of hydrodistillation techniques on yield, kinetics, composition and antimicrobial activity of essential oils from flowers of Lavandula officinalis L.* Hemijska industrija, 2011. **65**(4): p. 455-463.

79. Diaz-Maroto, M., M.S. Pérez-Coello, and M. Cabezudo, *Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile components of spices*. *Chromatographia*, 2002. **55**(11-12): p. 723-728.
80. Sellami, I.H., et al., *Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods*. *Food Chemistry*, 2011. **126**(2): p. 691-697.
81. Derwich, E., Z. Benziane, and A. Boukir, *Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2009. **3**(4): p. 3818-3824.
82. Sangun, M.K., et al., *Comparison of chemical composition of the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves and fruits from different regions of Hatay, Turkey*. *Journal of Environmental Biology*, 2007. **28**(4): p. 731-733.
83. Politeo, O., M. Jukić, and M. Miloš, *Chemical composition and antioxidant activity of free volatile aglycones from laurel (*Laurus nobilis* L.) compared to its essential oil*. *Croatica chemica acta*, 2007. **80**(1): p. 121-126.
84. Chaieb, K., et al., *Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species*. *Mycoses*, 2007. **50**(5): p. 403-406.
85. Diao, W.-R., et al., *Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.)*. *Food Control*, 2014. **35**(1): p. 109-116.
86. Herman, A., K. Tambor, and A. Herman, *Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils*. *Current microbiology*, 2016. **72**(2): p. 165-172.