

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Katedra analytické chemie

Využití extrakce nadkritickou tekutinou a GC-MS při analýze růží

Bc. Pavla Kašparová

Diplomová práce

2017

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology
Department of Analytical Chemistry

Use supercritical fluid extraction and GC-MS for analysis of roses

Bc. Pavla Kašparová

Thesis

2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavla Kašparová**
Osobní číslo: **C15582**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Využití extrakce nadkritickou tekutinou a GC-MS při analýze růží**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na analýzu růží pomocí plynové chromatografie. Zaměřte se analýzu těkavých látek charakterizujících růže.
2. V experimentální části optimalizujte metodu pro extrakci pomocí nadkritického oxidu uhličitého. Naleznete vhodné podmínky pro analýzu růžových extraktů pomocí GC-MS. Vypracovanou metodu ověřte na reálných vzorcích.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Aleš Eisner, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Ostatní konzultanti:

Ing. Silvie Surmová

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

12. května 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 12. 5. 2017

Bc. Pavla Kašparová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Aleši Eisnerovi Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce. Dále bych také chtěla poděkovat doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. a Ing. Tomáši Bajerovi Ph.D. za pomoc a rady. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a trpělivost.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá využitím extrakce nadkritickou tekutinou a GC-MS při analýze růží. V teoretické části se zaměřuje na analýzu růží (složení). V experimentální části je popsána optimalizace extrakce a analýza reálných vzorků růží. Analýza byla provedena pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií.

KLÍČOVÁ SLOVA

Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE), analýza růží, esenciální oleje, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

ANNOTATION

This thesis deals with use supercritical fluid extraction and GC-MS for analysis of roses. In the first part is analysis of rose. Next part is about optimization of extraction and analysis of real rose samples. Analysis was performed using gas chromatography with mass spectrometry

KEYWORDS

Super fluid extraction (SFE), analysis of roses, essential oil, gas chromatography, mass spectrometry

Obsah

1.1	Růže.....	14
1.2	Silice.....	14
1.2.1	Esenciální olej z růží.....	14
1.2.2	Izolace Silic.....	15
1.3	Analýza růží	16
1.3.1	Hydrodestilace	17
1.3.2	Mikroextrakce tuhou fází (SPME).....	19
1.3.3	Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE)	20
1.4	Extrakce nadkritickou tekutinou	23
1.4.1	Oxid uhličitý	24
1.4.2	Instrumentace SFE.....	25
1.4.3	Záchyt extrahovaných analytů.	25
1.4.4	Vliv parametrů na SFE	26
1.4.5	Použití modifikátoru	26
1.4.6	Doba extrakce a průtok	26
1.4.7	Použití SFE pro extrakci esenciálního oleju	26
1.4.8	SFE v porovnání s ostatními extrakčními technikami	27
1.5	Instrumentální metody	29
1.5.1	Plynová chromatografie.....	29
1.5.2	Hmotnostní spektrometrie.....	30
1.5.3	Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie	30
1.5.4	Kvalitativní analýza	30
2	Experimentální část	32
2.1	Použité přístroje a chemikálie	32
2.1.1	Přístroje.....	32
2.1.2	Chemikálie a plyny	32
2.2	Úprava vzorku.....	32
2.3	Extrakce nadkritickou tekutinou	33
2.3.1	Postup SFE.....	33
2.3.2	Optimalizace extrakce.....	34
2.4	GC-FID	35
2.5	Analýza reálných vzorků.....	36

3	VÝSLEDKY.....	37
3.1	Statistické zpracování dat.....	37
3.2	<i>Rosa incredible</i>	42
3.3	<i>Rosa margo</i>	43
3.4	<i>Rosa rhodos</i>	45
3.5	<i>Rosa tacazzi</i>	46
3.6	<i>Rosa tara</i>	48
3.7	<i>Rosa moonwalk</i>	49
3.7.1	Čerstvá růže	49
3.7.2	Usušená růže	51
3.8	Porovnání výsledků.....	52
	ZÁVĚR	55
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Vzorce vybraných látek, které jsou obsažené v růžích (7).....	15
Obrázek 2 Stádium květu 1-8 (10).....	17
Obrázek 4 Schéma SFE (19).....	22
Obrázek 5 Fázový diagram oxidu uhličitého (21)	24
Obrázek 6 Schéma SFE extraktoru Se-1 (SEKO s.r.o. Brno) (26).....	25
Obrázek 7 Schéma plynového chromatografu.....	29
Obrázek 8 Přístroj Se-1 (SEKO s.r.o. Brno) pro SFE.....	33
Obrázek 9 Graf předpověď vs. pozorované.....	38
Obrázek 10 Profily a předpovědi pro vhodnost.....	38
Obrázek 11 3D graf vhodnostního povrchu/vrstevnice se zobrazenými body	39
Obrázek 12 Barvy roztoků z extrakce. Vlevo při teplotě 70 °C a tlaku 11 MPa, 25 MPa a 38 MPa. Vpravo při tlaku 25 MPa a teplotě 36 °C, 70 °C a 103 °C.....	40
Obrázek 13 Graf závislosti objemu CO ₂ na celkové ploše píků	40
Obrázek 14 Chromatogram extraktu ze vzorku Rosa incredible, analýza GC-MS	42
Obrázek 15 Chromatogram extraktu ze vzorku Rosa margo, analýza GC-MS.....	44
Obrázek 16 Chromatogram extraktu ze vzorku Rosa rhodos, analýza GC-MS	45
Obrázek 17 Chromatogram extraktu ze vzorku Rosa tacazzi, analýza GC-MS.....	47
Obrázek 18 Chromatogram extraktu ze vzorku Rosa tara, analýza GC-MS	48
Obrázek 19 Chromatogram extraktu ze vzorku čerstvé Rosa moonwalk, analýza GC-MS	50
Obrázek 20 Chromatogram extraktu ze vzorku usušené Rosa moonwalk, analýza GC-MS ...	51
Obrázek 21 Porovnání chromatogramů čerstvé Rosa moonwalk (černá) a usušené Rosa moonwalk (růžová)	53
Tabulka 1 Procentuální zastoupení jednotlivých hlavní komponent v růžových olejích (11)..	17
Tabulka 2 Látky identifikované v jednotlivých extraktech (SFE, SD, extrakce do alkoholu)(18)	21
Tabulka 3 Vlastnosti plynu, superkritické tekutiny a kapaliny (25).....	24
Tabulka 4 Podmínky SFE u vybraných rostlinných materiálů	28
Tabulka 5 Extrakční podmínky pro optimalizaci z programu Statistica 12 (centrální kompozitní, nefaktoriální experimenty)	35
Tabulka 6 Teplotní program pro GC-FID.....	36
Tabulka 7 Teplotní program pro GC-MS	36
Tabulka 8 Tabulka ANOVA pro celkovou plochu píků po odečtení velkých píků	37
Tabulka 9 Retenční časy řady alkanů C9-C35.....	41
Tabulka 10 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku Rosa incredible.....	42
Tabulka 11 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku Rosa margo	44
Tabulka 12 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku Rosa rhodos.....	46
Tabulka 13 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku Rosa tacazzi	47
Tabulka 14 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku Rosa tara.....	48
Tabulka 15 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku čerstvé Rosa moonwalk	50
Tabulka 16 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku usušené Rosa moonwalk ..	51
Tabulka 17 Látky identifikované v extraktech a jejich procentuální zastoupení	53

SEZNAM ZKRATEK

ANOVA – analýza rozptylu dat (analysis of variance)

CAS – registrační číslo látky (Chemical Abstract Service)

CG – plynová chromatografie (gas chromatography)

CG/MS – spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (gas chromatography – mass spectrometry)

ČR – Česká republika

ČSN – označení českých technických norem

ECD – detektor elektronového záchytu (electron capture detector)

FID – plamenově ionizační detektor (flame ionization detector)

HD – hydrodestilace (hydrodistillation)

HS-SPME – headspace mikroextrakce tuhou fází (headspace solid phase microextraction)

ISO – Mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organization for Standardization)

MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

RI – retenční index

SD – destilace s vodní parou (steam distillation)

SFE – extrakce nadkritickou tekutinou (super fluid extraction)

SPME – mikroextrakce tuhou fází (solid phase microextraction)

TCD – tepelně vodivostní detektor (thermal conductivity detector)

ÚVOD

Růže je už od nepaměti považována za královnu květin. Lidé jí vnímají jako symbol lásky, krásy, smyslnosti, křehkosti, ale také pomíjivosti života, protože i přes svou krásu rychle uvadá. Tato diplomová práce je zaměřena především na vonné těkavé složky, které růže obsahují, na jejich izolaci a následnou analýzu.

Tématem této práce je využití extrakce nadkritickou tekutinou a GC-MS při analýze růží. Nejprve je v teoretické části zaměřena na chemické složení těkavých látek obsažených v růžích. Poté jsou zde uvedeny metody izolace silic a to pomocí hydrodestilace, destilace s vodní parou a extrakci nadkritickou tekutinou. Získané extrakty z těchto operací jsou nejčastěji analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

V experimentální části je nejprve uveden postup přípravy vzorku, použité chemikálie a přístroje, dále také provedení extrakce nadkritickou tekutinou. Dále je zde popsána optimalizace extrakce. Ta byla prováděna pomocí 17 extrakcí, u kterých byly různé varianty extrakčních podmínek. Získané extrakty byly poté analyzovány pomocí plynové chromatografie s tepelně vodivostním detektorem. Výsledky byly zpracovány ve statistickém programu Statistica 12 a poté byly učeny optimální podmínky, pro extrakci reálných vzorků (*Rosa incredible*, *Rosa margo*, *Rosa moonwalk*, *Rosa rhodos*, *Rosa tacazzi*, *Rosa tara*). Tyto extrakce byly následně provedeny a extrakty analyzovány pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií.

1 Teoretická část

1.1 Růže

Růže je už od nepaměti považována za královnu květin. U růží je popsáno 100 až 300 samostatných druhů. Existuje několik tříd, do kterých se růže dělí (velkokvěté, čajové hybridy, mnohokvěté, sadové, pnoucí a další). Jedny z nejoblíbenějších jsou tzv. velkokvěté čajové hybridní růže (čajohybridy), které se běžně prodávají v květinářství. Tyto růže jsou pěstovány především pro svůj velký a plný květ a také pro širokou barevnou škálu.(1),(2)

Pro tuto diplomovou práci byly vybrány růže *Rosa Incredible*, *Rosa Margo*, *Rosa Moonwalk*, *Rosa Rhodos*, *Rosa Tara*, *Rosa Tacazzi* a růže u které nebyla známá její odrůda. Všechny tyto uvedené růže patří do skupiny čajohybridů.

1.2 Silice

Silice neboli esenciální oleje jsou těkavé ve vodě nerozpustné vonné látky. Jedná se o složité směsi látek, které jsou obsažené v rostlinných materiálech a dávají rostlině její aroma. Silice jsou většinou bezbarvé, kapalné a olejovité. Silice nejčastěji tvoří tři hlavní skupiny a to terpeny, sloučeniny obsahující kyslík (alkoholy, aldehydy a karboxylové kyseliny) a sloučeniny obsahující síru a dusík. Největší zastoupení mají terpenové uhlovodíky.(3)

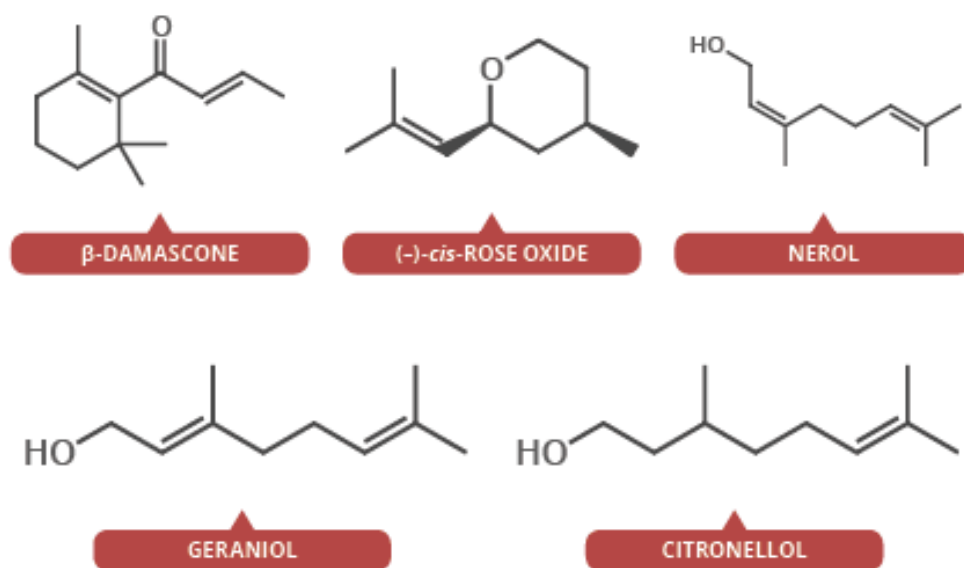
Esenciální olej získaný z různých částí stejné rostliny může mít odlišné složení. Množství silic v rostlinách také kolísá vzhledem k ročnímu období, denní době a místu výskytu. Využití esenciálních olejů je široké. Byly prokázány jeho aromaterapeutické, antioxidační a léčivé účinky. Proto jsou využívány v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. (4)

1.2.1 Esenciální olej z růží

Získání esenciálního oleje z růží je velmi finančně náročné, protože na 1 litr esenciálního oleje je potřeba přibližně 5 000 kg okvětních lístků. Proto patří mezi jedny z nejdražších olejů na trhu. Pro výrobu růžového oleje je nejčastěji využívána damažská růže (*Rosa damascena*). *Rosa damascena* patří do čeledi růžovité (*rosaceae*) je pěstována v různých zemích v Evropě, Asii i Severní Americe. Pro produkci esenciálního oleje bohatého na vonné látky jsou třeba mírné teploty při pěstování a dostatečná vlhkost vzduchu. Největším výrobcem růžového oleje je Bulharsko. V Bulharsku se vyrobí nejvíce růžového oleje na světě a to kolem 70 %

celosvětové produkce. Čistý esenciální olej se většinou neprodává, kvůli jeho vysoké ceně. Nejčastěji se růžový olej prodává naředěný jiným olejem nebo alkoholem. (5)

V současné době bylo identifikováno více než 400 těkavých látek, které obsahuje esenciální olej z růží. Mezi tyto látky patří citronellol, nerol, fenylethylalkohol, geraniol, heptadekan, nonadekan, heneikosan, linalool, β -damascone, rose oxid (růžový oxid), methyl eugenol, eikosan, eugenol, heptakosan, trikosan, geranyl acetát a další. Na obrázku 1 jsou zobrazeny vybrané sloučeniny (6),(7)



Obrázek 1 Vzorce vybraných látek, které jsou obsažené v růžích (7)

1.2.2 Izolace Silic

Silice se nejčastěji z rostlinného materiálu získávají pomocí hydrodestilace, destilace s vodní parou, lisováním, extrakcí rozpouštědlem nebo extrakcí nadkritickou tekutinou. Tato extrakce bude v další části podrobněji popsána. Získávání silic pomocí lisování se provádí především u kůry z citrusových plodů.

Hydrodestilace a destilace vodní parou patří mezi nejběžnější metody pro izolaci těkavých látek z rostlinného materiálu. Tyto metody jsou standardizovány normou ČSN ISO 6571. Princip destilace s vodní parou (SD) je založen na procházení páry přes vzorek a tím dochází k extrakci. Pára je generována ve varné baňce. Poté prochází přes vzorek a dochází k vyextrahování látek. Pára, které je obohacena o aromatické složky poté kondenzuje v chladiči. Dále je olej odseparován od vody. U hydrodestilace (HD) je vzorek s vodou zahříván

ve varné baňce. Při zahřívání vznikající pára extrahuje látky ze vzorku a unáší je dál do chladiče, kde dochází ke kondenzaci. (8)

Destilační proces obou metod probíhá po dobu několika hodin v tzv. Clevengerově aparatuře. Získaný olej se po odseparování od vody se suší bezvodým síranem sodným. Do analýzy se uchovává v tmavých vzduchotěsných nádobách při teplotách 5 – 8 °C. Podmínkou těchto technik je, že těkavé látky jsou nemísitelné s vodou.(8)

Extrakce rozpouštědlem má výhodu oproti hydrodestilaci a destilaci s vodní parou, že může probíhat i za laboratorní teploty a tím se mohou extrahovat i látky, které jsou tepelně nestálé. Provádí se také extrakce v tzv. Soxhletově extraktoru. Při této extrakci je tuhý vzorek navážen do patrony, která je umístěna v aparatuře. Do patrony neustále kondenzuje rozpouštědlo a extrahuje rozpustné komponenty z tuhé matrice vzorku. Rozpouštědlo, které obsahuje rozpuštěné analyzované látky, potom přetéká zpět do varné baňky. Tento proces je neustále opakován. Vzorek je vždy extrahován čistým rozpouštědlem, zatímco ve varné baňce jsou koncentrovány netěkavé složky vyextrahované ze vzorku. Izolované látky tedy musí být stabilní při teplotě varu použitého extrakčního rozpouštědla. Hlavní nevýhoda této techniky je velká spotřeba rozpouštědla a časová náročnost.(9)

1.3 Analýza růží

Složení esenciálního oleje růží je závislé na mnoha faktorech. Mezi ně patří například druh růže, vývojové stádium květu, denní doba, roční období a místo výskytu. V roce 2011 byl v časopise Food Chemistry zveřejněn článek, který se zabýval složením těkavých látek růží při různých stádiích květu a doby sběru. Květy damašské růže (*Rosa damascena*) byly sbírány v osmi stádiích květu a šesti denních dobách. Stádia květu jsou zobrazena na obrázku 2. Byla provedena extrakce rozpouštědlem (hexan) a dále potom analýza pomocí plynové chromatografie spojené s hmotností spektrometrií. Výsledky studie podporují tradiční postupy sběru růží. A to stádium květu 5-7 a denní doba sklizně od 6 do 12 hodin. Dále také je uvedeno, že 62 těkavých látek z celkových 103 je ovlivněno časem sběru květin a 80 látek je ovlivněno vývojovou fází květu. Jako hlavní sledované sloučeniny, u kterých byla pozorována změna vzhledem k denní době sběru a fázi květu byly β -citronellol, trans-geraniol, fenylethyl alkohol, heneikosan, nonandekan, heptadekan a nerol. (10)



Obrázek 2 Stádium květu 1-8 (10)

V roce 2013 byl v Bulgarian Journal of Agricultural Science zveřejněn článek který se zabýval chemickým složením různých genotypů růží. Ve studii byly porovnávány růže *Rosa damascena* Mill., *Rosa alba* L. a *Rosa* № 836/61. Lístky vybraných růží byly ihned po sběru podrobeny dvouapůlhodinové hydrodestilaci. Získaný růžový olej byl poté analyzován pomocí plynové chromatografie. Celkem bylo v olejích identifikováno 60 sloučenin. Kvalita jednotlivých olejů byla téměř stejná, lišily se od sebe kvantitou. Jako hlavní komponenty olejů byly identifikovány látky citronellol, geraniol, nonadekan a nerol. U růže *Rosa damascena* bylo z celkového množství látek 70% kyslíkatých monoterpenů a 12% nasycených uhlovodíků. U růže *Rosa alba* L. bylo kyslíkatých monoterpenů méně a to 48%, ale 24% nasycených uhlovodíků. U růže *Rosa* № 836/61 to bylo 51% kyslíkatých monoterpenů a 31% nasycených uhlovodíků. V tabulce 1 jsou uvedeny vybrané látky, které jsou typické pro růžové oleje. Jejich množství je vyjádřeno jako plocha píku v procentech. (11)

Tabulka 1 Procentuální zastoupení jednotlivých hlavní komponent v růžových olejích (11)

	<i>Rosa damascena</i> (%)	<i>Rosa alba</i> L. (%)	<i>Rosa</i> № 836/61 (%)
citronellol	48,24	30,94	8,12
geraniol	13,06	8,76	23,23
nonadekan	7,78	11,83	18,84
nerol	4,19	4,96	12,09

1.3.1 Hydrodestilace

1.3.1.1 *Rosa persica*

V roce 2016 byl v Bulgarian Chemical Communications zveřejněn článek, který se zabýval složením íránské růže (*Rosa persica*). V této studii byl vzorek růže nejprve vysušen a poté 100g

takto upravené růže bylo podrobena čtyřhodinové hydrodestilaci v Clevengerově aparatuře. Získaný olej byl uchováván v tmavých skleněných nádobách v lednici. Získaný extrakt byl dále analyzován pomocí GC-FID a GC-MS. Jednotlivé složky extraktu byly rozděleny na koloně HP-5MS, 50 m x 0,25 mm x 0,25 µm tloušťka filmu. Celkem bylo v extraktu identifikováno 56 látek. Mezi detekované látky patřil linalool, geraniol, oktadekan, nonadekan, geranyl acetát, heptadekan, trikosan, pentakosan a heptakosan. (12)

1.3.1.2 *Rosa damascena*

V roce 2012 byl v Journal of Medicinal Plants Research zveřejněn článek, který se zabýval složením *Rosa damascena*, která pocházela z devíti různých oblastí Íránu. V této studii bylo 400 g čerstvých lístků růže podrobena v Clevengerově aparatuře tříhodinové hydrodestilaci. Získaný extrakt byl dále analyzován pomocí GC-MS. Jednotlivé složky byly rozděleny na koloně DB5 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm tloušťka filmu. Celkem bylo z extraktů, které pocházely z devíti různých oblastí, identifikováno 24 látek. Mezi detekované látky patřil citronellool, geraniol, neral, linalool a nonadekan, tyto látky byly hlavní složkou téměř ve všech extraktech. (13)

Další článek, který se zabýval esenciálním složením této odrůdy růže, byl zveřejněn v Revista de Chimie z roku 2015. Pro hydrodestilaci v Clevengerově aparatuře, která trvala pět hodin, bylo použito 250 g čerstvých lístků růže *Rosa damascena* a 1,5 litru vody. Získaný extrakt vysušen síranem sodným a uchováván v tmavé skleněné nádobě při teplotě 4°C. Poté bylo 30 µl oleje smícháno s 1 ml hexanu. Takto připravená a zhomogenizovaná směs byla analyzována pomocí GC-MS. Jednotlivé složky byly rozděleny na kapilární koloně DB5-MS 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm tloušťka filmu. Látky identifikovány v extraktu byly rozděleny do 4 skupin (monoterpeny, seskviterpeny, alifatické uhlovodíky a ostatní látky). Alifatické uhlovodíky, tvořili 85,7 % z celkového počtu identifikovaných látek. Patřil sem heneikosan, nonadekan, trikosan, eikosan a octacosane. Monoterpeny představovaly pouze malou část z identifikovaných látek (6,5%). β-pinen, cis-ocimen, sylvestrene, trans-ocimen mezi kyslíkaté monoterpeny patřil nerol a β-citronellool.(14)

1.3.1.3 *Rosa brunonii*

V roce 1999 byl ve Flavour and Fragrance Journal uveden článek, který se zabýval těkavými složkami esenciálního oleje získaného z himalájské růže (*Rosa brunonii*). Čerstvé lístky růže byly podrobena hydrodestilaci v Clevengerově aparatuře po dobu tří hodin. Získaný čirý esenciální olej byl analyzován pomocí GC-MS. Celkem bylo v oleji identifikováno 35

látek. Největší procentuální zastoupení měly látky jako eugenol (30,07%), terpien-4-ol (13,72%) a geraniol (10,53%). Mezi další identifikované látky patřily α -terpineol, citronelol, geranyl acetát, eikosan, nonadekan a další.(15)

1.3.2 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

V roce 2004 byl ve Flavour and Fragrance Journal uveden článek, který se zabýval složením esenciálního oleje damažské růže (*Rosa Damascena*). Nejprve byly čerstvé lístky podrobeny hydrodestilací a z ní získaný esenciální olej byl poté analyzován. Esenciální olej (1ml) byl uložen v tmavých zábrusových lahvích s 5 ml vody. Z této lahve byla provedena headspace mikroextrakce tuhou fází na vlákno s polydimethylsiloxanem po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Ihned po dokončení mikroextrakce bylo vlákno vloženo do nástříkového prostoru GC-MS a látky desorbovány při teplotě 250 °C. Byla také provedena analýza těkavých složek esenciálního oleje, který byl aplikován na lidskou kůži. Každou hodinu po aplikaci 100 μ l esenciálního oleje na pokožku byla provedena SPME a dále analýza GC-MS pro identifikaci látek. Pomocí HS-SPME bylo identifikováno celkem 90 látek. Látky s největším zastoupením byly citronelol, nonadekan, geraniol, nerol, heneikosan a 9-eikosen. U analýzy těkavých látek z lidské pokožky byly jako cílové složky, které mohou za dlouhotrvající vůni označeny citronelol geraniol, nerol, geranial a 2-fenylethylalkohol. Tyto látky byly i po pěti hodinách od aplikace na pokožku, zastoupeny ve velké koncentraci. (16)

V roce 2015 byla v Acta Scientiarum Polonorum uveden článek, který byl zaměřen především na stanovení účinků skladování a sušení na množství těkavých látek v růžích. Nejprve byly pomocí HS-SPME z čerstvých lístků růží vyextrahovány těkavé látky, které byly poté analyzovány pomocí GC-MS. Celkem bylo v čerstvých lístcích identifikováno 20 látek. Teploty skladování byly 4°C a 25 °C a teploty sušení byly 40, 50 a 60 °C. Po skladování a sušení bylo z původních 20 látek identifikováno pouze 5 – 6 látek. Typické látky, které obsahují růže (citronellool, geraniol, eugenol, růžový oxid) buď nebyly po skladování a sušení detekovány, nebo byly přítomné ve velmi malém množství. Tabulka z této studie, ve které jsou uvedeny látky a jejich koncentrace z jednotlivých měření je k dispozici v příloze A. Z této studie tedy vyplývá, že při usušení lístků růží dochází ke ztrátám těkavých látek, které jsou typické pro růže. (17)

1.3.3 Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE)

1.3.3.1 *Rosa damascena*

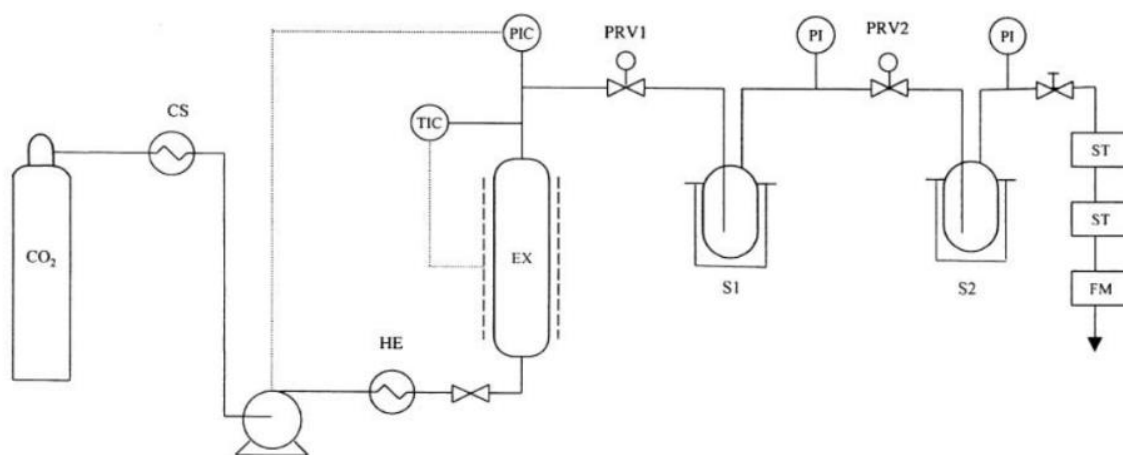
V roce 1997 byl v *Flavour and Fragrance Journal* zveřejněn článek, který se složením extraktu získaného pomocí SFE z růže (*Rosa Damascena*). V této studii byly porovnány s SFE dvě další metody získání extraktu (parní destilace a extrakce do alkoholu). Podmínky SFE byly tlak 80 bar, teplota 40 °C, doba extrakce 480 min při průtoku 1,5 kg CO₂ za hodinu. Množství vloženého vzorku bylo 20 g. Parní destilace byla prováděna po dobu tří hodin. Extrakt získaný alkoholem byl připraven tak, že byl smíchán vzorek s ethylalkoholem, při teplotě 54 °C. Homogenní směs byla poté po dobu 20 hodin chlazená na teplotu -30 °C a potom za vakua zfiltrována, takto vzniklý extrakt byl poté analyzován. Všechny extrakty byly analyzovány na GC-MS, jednotlivé složky extraktu byly rozděleny na koloně DB5 (J&W Scienti@c, Folsom, CA), 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm tloušťka filmu. Látky, které byly v extraktu v nejvyšších koncentracích byly 2-fenylethanol, citronellol, 2-fenylethyl acetát, nonadekan, trikosan a heptakosan. Procentuální zastoupení citronellolu v SFE extraktu bylo 11,4%, v extraktu z parní destilace 26,1% a v extraktu z alkoholu 3,8%. Další látka, u které se procentuální zastoupení v jednotlivých extrakcích radikálně lišilo byla 2-fenylethanol. Jeho procentuální zastoupení v SFE extraktu bylo 50,0% v parní destilace 10,4% a extraktu z alkoholu 28,3%. Celkem bylo ve všech extraktech identifikováno 54 látek. SFE extrakce může být hodnocena jako lepší metoda, protože výtěžek 2-fenylethanolu byl značně vyšší než u parní destilace. Na druhou stranu množství citronellolu v SFE extraktu bylo o polovinu nižší než z parní destilace. U ostatních látek nebyl rozdíl tak značný jako u těchto. Také SFE extrakt obsahoval méně nežádoucích sloučenin než ostatní metody, proto studie upřednostňuje extrakci nadkritickou tekutinou před parní destilací a extrakcí do alkoholu. V tabulce 2 jsou uvedeny identifikované látky z extrakcí a jejich procentuální zastoupení. (18)

Tabulka 2 Látky identifikované v jednotlivých extraktech (SFE, SD, extrakce do alkoholu)(18)

Látka	Kovatsův index	SFE (plocha %)	SD (plocha %)	Extrakce do alkoholu (plocha%)
Hepta-1-ol	911	0,1	0,1	-
α -Pinen	912	0,2	0,1	0,4
Benzaldehyd	958	0,6	0,1	0,5
β -Pinen	968	0,1	< 0,1	0,1
Oktan-3-ol	967	0,1	0,7	1,9
β -Myrcen	988	0,5	0,8	0,7
o-Cymen	1019	0,1	0,1	0,1
Limonen	1028	0,2	0,6	1,3
o-Kresol	1015	0,6	0,1	0,2
p-Ocimen	1046	0,2	0,3	0,3
γ -Terpinen	1056	0,1	0,1	0,1
Oktan-1-ol	1011	0,1	0,1	0,2
Terpinolen	1059	0,1	-	< 0,1
Terpinyl acetát	1080	0,2	0,1	0,1
Linalol	1092	0,1	0,2	0,1
2-fenylethylalkohol	1038	50,0	10,4	28,3
Růžový oxid	1112	0,1	-	< 0,1
Menthon	1129	0,1	0,5	0,2
Isomenthon	1141	0,1	1,1	3,0
Methylfenyl acetát	1064	0,2	0,2	0,1
Verbenon	1175	2,8	5,6	0,9
Citronellol	1176	11,4	26,1	3,8
Myrtenyl acetát	1233	0,2	0,5	0,5
2-Fenylehtyl acetát	1190	7,5	14,8	2,4
Citral	1197	0,3	0,7	0,1
Citronellyl formiát	1249	0,1	-	0,1
Menthyl acetát	1287	0,1	-	1,6
Eugenol	1236	2,9	3,5	0,4
Geranyl acetát	1362	0,3	0,6	-
Methyl eugenol	1337	1,2	2,0	0,4
Cyryofyllen	1400	0,3	0,8	0,4
α -Guaien	1424	0,2	0,5	0,1
β -Selinen	1440	0,2	0,4	0,1
Valencen	1474	0,3	1,0	0,1
n-Pentadekan	1500	0,4	1,0	-
Methyl tetradekan	1509	0,2	-	< 0,1
Tetradekan-1-ol	1652	0,1	0,4	-
n-Heptadekan	1700	1,6	3,5	1,5
Hexadekan-1-ol	1841	2,6	3,3	3,5
n-Nonadekan	1900	7,8	10,0	15,2
n-Eikosan	2000	0,6	0,5	1,5
n-Heneikosan	2100	3,4	1,7	12,0
n-Dokosan	2200	0,1	0,3	0,5
n-Triakosan	2300	0,9	1,1	7,0
n-Tetrakosan	2400	0,1	1,5	0,4
Methyl tetrakosan	2490	-	1,4	-
n-Pentakosan	2500	0,1	1,5	4,3
n-Hexakosan	2600	-	0,5	0,2
n-Heptakosan	2700	-	0,8	2,7
n-Nonakosan	2900	-	-	1,0

1.3.3.2 Horská růže (*Cistus ladanifer* L.)

V roce 2000 byl v Separation Science and Technology zveřejněn článek, který se zabýval izolací éterického oleje z horské růže (*Cistus ladanifer* L.) pomocí SFE. V této studii bylo pro extrakci použito 500 g materiálu. Optimální podmínky pro extrakci byly zvoleny tlak 9 MPa, teplota 40°C a průtok CO₂ 0,7 kg za hodinu. SFE obsahoval dva separátory a na konci zachytnou trubičku naplněnou aktivním uhlím. Po extrakci nebylo v těchto sorpčních trubičkách zjištěno žádné množství esenciálního oleje. Schéma SFE je zobrazeno na obrázku 4.



Obrázek 3 Schéma SFE, CS – chladič systém; HE – tepelný výměník; EX – Extraktor, PRV – Regulace tlaku; S1, S2 – separátor, FM – průtokoměr; ST – sorpční trubička naplněná aktivním uhlím (19)

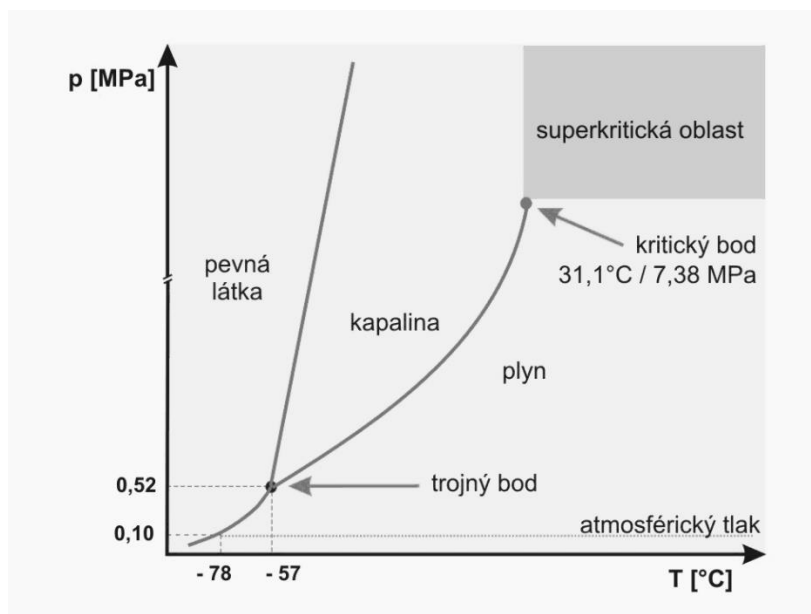
V prvním separátoru byla oddělena tzv. vosková frakce a ve druhém byla zachycena frakce obsahující esenciální olej. Obě tyto frakce byly poté analyzovány pomocí GC-MS. První frakce (vosk) byla analyzována na koloně HP-1 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm tloušťka filmu a druhá frakce (olej) na koloně HP-5 50 m x 0,32 mm x 0,17 μm tloušťka filmu. V esenciálním oleji bylo pomocí GC-MS identifikováno 41 látek. Identifikované látky byly rozděleny na monoterpeny (38,1%), kyslíkaté monoterpeny (60,7%) a seskviterpeny (1,2%). Látky s nejvyšším zastoupením byly například linalool, camphor, 1,4-cineol, p-cymen, γ-terpineolnerol a nerol. Ve voskové frakci bylo pomocí GC-MS identifikováno 13 látek. Látky s nejvyšším zastoupením byly například trikosan, pentakosan, heptakosan, hexakosan a nonakosan. (19)

1.3.3.3 Pelargonie vonná

V roce 2007 byl v *Journal of Supercritical Fluids* zveřejněn článek, který se zabýval aplikací SFE jako technologie pro získání esenciálního oleje z Portugalské pelargonie vonné (*Pelargonium sp.*). V tomto článku byla SFE porovnávána s dalšími extrakčními technikami, a to s hydrodestilací a s extrakcí organickým rozpouštědlem (hexan). Pro jednu SFE bylo použito 122,5 g rostliny. Optimální podmínky pro SFE byly teplota 40°C, tlak 90 – 100 barů doba extrakce 15 – 30 minut. Pro hydrodestilaci bylo použito 20 g lístků s 600 ml vody. Hydrodestilace probíhala po dobu dvou hodin v Clevengerově aparatuře. Všechny extrakty byly analyzované pomocí GC-MS na koloně CP-WAX 52 CB 50 m x 0,25 mm x 0,20 μm tloušťka filmu. Mezi identifikované látky v extraktu patřil např. linalool, citronellol, geraniol a další. Procentuální zastoupení linaloolu v extraktu z hydrodestilace bylo 4,4%, z SFE 0,1% a z hexanu 0%. Další látky, jako například geraniol byl extraktu z hydrodestilace zastoupen 8,4%, v SFE 8,5% a v hexanu 10,8%. Procentuální zastoupení citronellolu bylo ve všech extraktech přibližně stejné a to ±24%. SFE byla vyhodnocena jako nejlepší extrakční technika pro získání esenciálního oleje. Získaný extrakt měl vynikající organoleptické vlastnosti, velmi svěží přírodní květinové-ovocný charakter světle žluté barvy a byl vyhodnocen jako nejvhodnější pro použití v parfumerii. (20)

1.4 Extrakce nadkritickou tekutinou

Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) je moderní analytická technika, která je používána k extrakci látek z přírodních matric. SFE je prováděna pomocí tekutiny, která se nachází v nadkritickém (superkritickém) stavu. Tohoto stavu lze dosáhnout, pokud látka přesáhne svůj kritický bod, který je definován pomocí kritické teploty a kritického tlaku. Obrázek 4 zobrazuje fázový diagram pro oxid uhličitý, kde je zobrazen kritický bod.



Obrázek 4 Fázový diagram oxidu uhličitého (21)

Nadkritická tekutina má některé vlastnosti jako kapalina jiné jako plyn. Je stlačitelná, její hustotu lze měnit a je velmi podobná hustotě kapaliny, viskozita je až o dva řády vyšší než viskozita kapalin, má vysokou difuzivitu a nemá povrchové napětí. Pro SFE se využívá oxid uhličitý, voda, methan, ethan, propan, methanol, aceton a další. Nejčastěji se ovšem používá oxid uhličitý. V tabulce 2 jsou uvedeny vlastnosti plynů, nadkritických tekutin a kapalin. (22),(23)

Tabulka 3 Vlastnosti plynu, superkritické tekutiny a kapaliny (25)

Tekutina	Hustota (g/mol)	Viskozita (g/cm·s)	Difuzivita (cm ² ·s ⁻¹)
Plyn	0,6-2,0 · 10 ⁻³	0,5-3,5 · 10 ⁻⁴	0,01-0,1
Nadkritická tekutina	0,2-1,0	2,0-9,9 · 10 ⁻⁴	0,5-3,3 · 10 ⁻⁴
Kapaliny	0,8-1,0	0,3-2,4 · 10 ⁻²	0,5-2,0 · 10 ⁻⁵

Mezi látky, které je možné pomocí SFE vyextrahovat patří esenciální oleje, triglyceridy, terpeny, alkaloidy, lipidy, steroidy a oligomery. (22),(23)

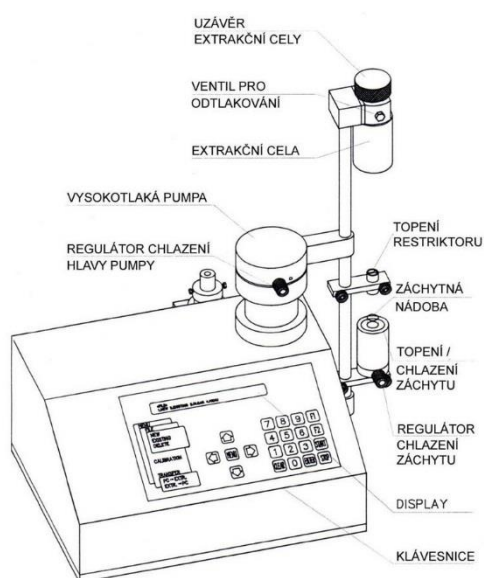
1.4.1 Oxid uhličitý

Pro SFE se často používá superkritický oxid uhličitý. Jeho kritická teplota je 304,1 K a kritický tlak 7,38 MPa tyto hodnoty jsou poměrně nízké a instrumentálně snadno dosažitelné, což je jedna z výhod pro jeho použití pro SFE. Mezi další výhody patří netoxičita, nehořlavost a dostupnost v požadované čistotě. Hustota CO₂ v nadkritickém stavu je podobná kapalině, naopak jeho viskozita a difuzivita je podobná plynu. Nevýhoda je, že je CO₂

nepolární. Pro zvýšení polaroty se používají modifikátory (methanol, acetonitril, toluen a další). V nadkritickém oxidu uhličitém jsou velmi dobře rozpustné vonné látky a esenciální. (23),(24)

1.4.2 Instrumentace SFE

Extrakci nadkritickou tekutinou můžeme z hlediska provedení rozdělit na statickou a dynamickou. Při statické extrakci je extrakční cela naplněna vzorkem a nadkritickou tekutinou. Systém je ponechán v klidu do ustanovení rovnováhy. Poté je extrakt vypuštěn do sběrné nádoby a celý postup je opakován. Při dynamické extrakci je extrakční cela naplněna vzorkem a nadkritická tekutina je kontinuálně čerpána skrz celu. Výhodou dynamické extrakce je, že vzorek je neustále v kontaktu s čistou tekutinou, proto se také používá častěji než statická SFE. Na obrázku 5 je zobrazeno schéma extraktoru Se-1 (SEKO s.r.o. Brno) pro dynamickou extrakci (24),(25)



Obrázek 5 Schéma SFE extraktoru Se-1 (SEKO s.r.o. Brno) (26)

1.4.3 Záchyt extrahovaných analytů.

Z hlediska provedení je možný off-line nebo on-line způsob záchytu extrahovaných analytů. Při on-line provedení je SFE spojená s analytickou jednotkou (např. plynová chromatografie). Odpadá manipulace se vzorkem, je dosahováno vyšší citlivosti, ale provedení je přístrojově náročnější. Při off-line provedení je záchyt extrahované látky proveden do kapalného rozpouštědla, na inertní materiál, na tuhý sorbent nebo do předehřátých par rozpouštědla.

V této diplomové práci byla prováděna off-line extrakce se záchytem do kapalného rozpouštědla. Záchyt do kapalného rozpouštědla je jednoduchá a nejčastěji využívaná metoda.

Konec restriktoru je ponořen do nádoby s rozpouštědlem, ve kterém jsou analyty zachycovány. Účinnost záchytu závisí na těkavosti extrahovaných látek, na množství i výšce sloupce rozpouštědla a teplotě záchytu. Nižší teplota snižuje těkavost rozpouštědla a jeho úbytek během záchytu. Objem rozpouštědla, které se používá je obvykle 2 – 10 ml. (25),(27)

1.4.4 Vliv parametrů na SFE

1.4.4.1 Vliv tlaku a teploty

Čím vyšší je extrakční tlak, tím méně je potřeba objemu oxidu uhličitého pro danou extrakci. Na druhou stranu ale, vysoký tlak není vždy žádaný, např. pro složitou matici. Při konstantním tlaku a zvyšující se teplotou se zvyšuje hustota. Teplota ovlivňuje množství rozpuštěné látky, účinek teploty je těžké předvídat, závisí na povaze vzorku. (27),(28)

1.4.5 Použití modifikátoru

Jak bylo již uvedeno nadkritický CO₂ se využívá převážně při extrakci nepolárních látek. Pro zvýšení polaritu se používají modifikátory. Modifikátor se používá v nízkých koncentracích a jeho přidáním dochází ke změně kritického bodu směsi. Modifikátor nemusí pouze zvyšovat polaritu nadkritické tekutiny, ale může se také vázat na aktivní centra matrice silněji než analyt a tím analyt z matrice vytěšňovat. V praxi se jako modifikátory používají látky jako acetonitril, methanol, ethanol, toluen, hexan a další polární rozpouštědla.(28)

1.4.6 Doba extrakce a průtok

Doba extrakce je dána převážně rychlostí průtoku nadkritické tekutiny. Rychlost protékající tekutiny má velký vliv na efektivitu extrakce. Pokud je desorpce analytu a difúzní proces rychlý a účinný, tak vyšším průtokem tekutiny zvýšíme rychlost extrakce. Na druhou stranu, ale může vysoký průtok způsobit pokles výtěžků extrakce, protože nedochází k dostatečnému proniknutí tekutiny do vzorku a může docházet i ke ztrátám analytu při záchytu do rozpouštědla. Při pomalejším průtoku tekutiny, dochází k lepšímu proniknutí do matrice vzorku a dochází k většímu výtěžku extrakce, na druhou stranu se ale prodlužuje doba extrakce.(28)

1.4.7 Použití SFE pro extrakci esenciálního oleje

V roce 1997 byl v Journal of Supercritical Fluids zveřejněn článek, který se zabýval využitím SFE pro získání esenciálních olejů z přírodních materiálů. Tato studie shrnovala

informace z prováděných extrakcí z jiných studií. Byla zde uvedena tabulka rozpustností látek jako například. α -Pinen, eugenol, 1-hexadekanol, Oktakosan, kyselina laurová, kyselina palmitová, kyselina stearová a další. Znalost rozpustnosti těchto látek při určitém tlaku a teplotě může být využito při získání esenciálního oleje. Pokud tyto složky jsou v konečném produktu nežádoucí nebo naopak, můžou být díky znalosti rozpustnosti extrakční podmínky upraveny tak, aby docházelo nebo nedocházelo k jejich vyextrahování. Dále jsou ve studii uvedeny informace o chemických a organoleptických vlastnostech vybraných extraktů (jedle kanadská, andělíka lékařská, heřmánek pravý a další). (29)

1.4.8 SFE v porovnání s ostatními extrakčními technikami

V roce 1992 ve Flavour a Fragrance Journal byl zveřejněn článek, který se zabýval porovnáním esenciálního oleje rozmarýnu získaného z SFE a hydrodestilace. SFE byla prováděna při teplotě 40 °C a tlaku 100 barů. Bylo extrahováno 200 g rozmarýnu. Hydrodestilace byla prováděna po dobu 2 hodin v Clevengerově aparatuře. Získané extrakty byly poté analyzovány pomocí GC-MS na koloně DB-5 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m tloušťka filmu. Celkem bylo v extraktu identifikováno 48 látek. Látky byly pro porovnání rozděleny do pěti skupin (monoterpeny, kyslíkaté monoterpeny, seskviterpeny, kyslíkaté seskviterpeny a ostatní). U SFE extraktu bylo procentuální zastoupení monoterpenů 15,5 % u hydrodestilace 36,5 %. Kyslíkatých monoterpenů bylo v SFE extraktu 73,7 % a v HD extraktu 59,4 %. Seskviterpenů bylo v SFE extraktu 6,6 % a v HD extraktu 2,2 %. Kyslíkaté seskviterpeny byly v SFE extraktu 0,8 % a v HD extraktu 0,9 %. Ostatní látky byly v SFE extraktu 1,3 % a v HD extraktu 0,7 %. Esenciální olej získaný z SFE byl vyhodnocen jako lepší, protože měl silnější aroma a lepší organoleptické vlastnosti než olej získaný pomocí hydrodestilace. (30)

V roce 2004 byl ve Flavour and Fragrance Journal zveřejněn článek, který se zabýval porovnáním extrakce nadkritickou tekutinou s hydrodestilací jalovcových lístků (*Juniperus communis L.*). Podmínky pro SFE byly tlak 200 – 350 atmosfér, teplota 45 – 55 °C, doba extrakce 20 – 30 minut a přídavek modifikátoru (methanol). Extrakty byly analyzovány pomocí GC-MS. Nejvíce látek bylo vyextrahováno pomocí SFE při tlaku 350 atmosfér, teplotě 55 °C, extrakční době 30 minut a přídavku modifikátoru. Na druhou stranu při nižším tlaku a teplotě (200 atmosfér, 45°C, 30 minut, bez modifikátoru) byla SFE selektivnější pro těkavé složky extraktu (α -thoujon, limonen). SFE byla vyhodnocena jako lepší extrakční technika, protože extrakt obsahoval více látek (celkem 22). Extrakt, který byl získán pomocí hydrodestilace

obsahoval pouze 11 látek, ale obsahoval např. β -felandren, který nebyl nalezen u SFE extraktu. (31)

Jako další technika se používá destilace s vodní parou. V roce 2017 byl v Journal of Food Engineering zveřejněn článek, který porovnával získání esenciálního oleje rozmarýnu (*Rosmarinus Officinalis*) pomocí extrakce nadkritickou tekutinou, hydrodestilace a parní destilace. Extrakce byly prováděny z 25 g a 50 g rozmarýnu. Optimální podmínky pro SFE byly, teplota 40°C, tlak 10,34 MPa a průtok 126,24 ± 20,82 ml CO₂ za minutu. Získané extrakty byly analyzovány pomocí GC-MS. U jednotlivých extraktů byla také vypočítána jejich antioxidační aktivita. Antioxidační aktivita extraktu z SFE byla čtrnáctkrát vyšší než u ostatních technik. Vyšší výtěžky silice byly pozorovány u SFE extraktu, následovala parní destilace a hydrodestilace. (32)

V tabulce 4 jsou shrnuty podmínky pro extrakci nadkritickou tekutinou u vybraných rostlinných materiálů.

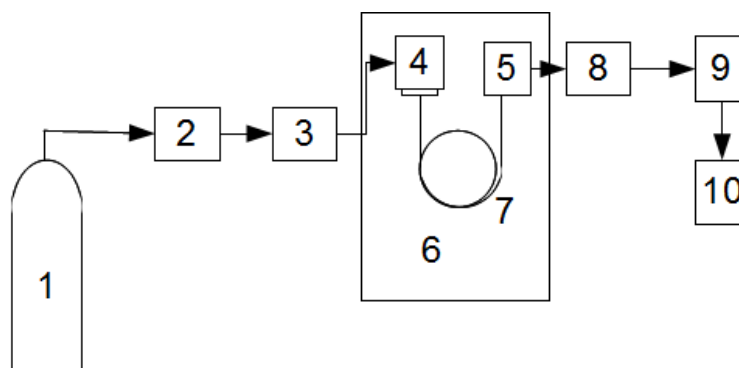
Tabulka 4 Podmínky SFE u vybraných rostlinných materiálů

	navážka	teplota	tlak	poznámky
<i>Rosa damascena</i> (18)	20 g	40 °C,	80 bar	480 min, průtok 1,5 kg/hod. CO ₂
<i>Cistus ladanifer</i> L.(19)	500 g	40 °C	90 bar	průtok 0,7 kg/hod. CO ₂
<i>Pelargonium</i> sp.(20)	122,5 g	40 °C	90 – 100 bar	15 – 30 minut
<i>Rosmarinus officinalis</i> (30)	200 g	40°C	100 bar	
<i>Juniperus communis</i> L (31)	2,5 g	40 – 55°C	202,65 – 354,63 bar	20 – 30 minut, methanol
<i>Rosmarinus officinalis</i> (32)	25 g	40°C	172,4 bar	126,24 ± 20,82 ml/min CO ₂

1.5 Instrumentální metody

1.5.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) patří do separačních analytických metod. GC je využívána převážně pro identifikaci a stanovení středně těkavých a těkavých látek. Kolonou neustále prochází nosný plyn. Jako nosný plyn se používá nejčastěji helium, ale a i další plyny jako je dusík, argon nebo vodík. Vzorek se pomocí mikrostříkačky vsune do vyhřívaného injektoru, kde se vzorek odpaří a jeho páry jsou unášeny pomocí nosného plynu kolonou, kde dochází k separaci jednotlivých složek směsi až k detektoru. Detektory pro GC se používají plamenově ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD), tepelně vodivostní detektor (TCD), hmotnostní spektrometr (MS) a další. Na obrázku 7 je zobrazeno schéma plynového chromatografu. (33)



1 – tlaková láhev s nosným plynem, 2,3 – regulátory tlaku a průtoku, 4 – injektor, 5 – detektor, 6 – termostat, 7 – kolona, 8 – zesilovač, 9,10 – data, monitor

Obrázek 6 Schéma plynového chromatografu

V této diplomové práci byl použit plamenově ionizační detektor (FID) a hmotnostní spektrometr (MS). U plamenově ionizačního detektoru molekuly organických látek vstupují do plamene, kde se spalují za tvorby štěpných fragmentů iontové nebo radikálové povahy, které umožňují průchod proudu mezi elektrodami. Na elektrody je vloženo tzv. ionizační napětí. Proud, který mezi elektrodami proteče, je úměrný počtu prošlých fragmentů. Tento proud je po zesílení registrován. Rozdíl signálů dává přesnou informaci o vzorku, protože proud je přímo úměrný ionizaci, která závisí na složení vzorku. FID je pro organické látky téměř univerzální, má velkou citlivost, proto se používá pro stopovou analýzu. (34),(35)

1.5.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, u které dochází k převedení molekul na ionty. Ionty se od sebe rozlišují podle poměru efektivní hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Záznam z MS se nazývá hmotnostní spektrum. Mezi výhody hmotnostní spektrometrie patří vysoká citlivost, minimální spotřeba vzorku, určení molekulové hmotnosti a dalších strukturních informací. Jako nevýhodu metody můžeme vnímat, že se jedná o destruktivní metodu a vysoké pořizovací náklady. (36)

1.5.3 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie kombinuje výhody obou technik, u GC je to separace látek a u MS identifikace. Lze identifikovat velmi složité směsi látek. Nosný plyn s analyzovanými látkami se zavádí přímo do iontového zdroje ve vakuu, kde vakuový systém odstraní přebytečný nosný plyn. Použití elektronové ionizace umožňuje přímé softwarové porovnání naměřených spekter s knihovny spekter v databázích. V současné době je GC-MS rutinní. (37)

1.5.4 Kvalitativní analýza

U plynové chromatografie se kvalitativní analýza určuje z retenčního času. Aby mohla být látka označena, jako přítomna ve vzorku musí být překonána tzv. mez detekce. Mez detekce představuje překonání trojnásobku šumu. Pro identifikaci látky se používají retenční indexy např. tzv. Kovatsův index. Tento index je vztažen na rozsáhlou skupinu referenčních látek (n-alkanů). Identifikace neznámé látky se poté provádí pomocí srovnání vypočítaného indexu s indexy známých látek. Rovnice pro výpočet retenčního (Kovatsova indexu) je uveden v rovnici 1. (38)

$$I_x = 100n + 100 \frac{\log t_x - \log t_z}{\log t_{z+1} - \log t_z} \quad (1)$$

n = počet atomu uhlíku v nejbližším nižším n-alkanu

t_z = retenční čas nejbližšího nižšího n-alkanu

t_{z+1} = retenční čas nejbližšího vyššího n-alkanu

t_x = retenční čas píku neznámé látky

U hmotnostní spektrometrie je kvalitativní analýza určena pomocí shody hmotnostních spekter neznámé látky s hmotnostními spektry v knihovnách. Shoda je poté uváděna v procentech. Pokud má neznámá látka shodu spektra s více látkami rozhoduje o identifikaci látky vypočítaný Kovatsův index. (38)

2 Experimentální část

2.1 Použité přístroje a chemikálie

2.1.1 Přístroje

SPEX SamplerPREP 5100 MIXER MILL

Přístroj pro SFE: Se-1 (SEKO s.r.o. Brno)

Průtokoměr FMA 4000 Omega

GC 2010 (Shimadzu, Japonsko), detektor FID

Autosampler AOC – 20i (Shimadzu, Japonsko)

GC 2010 s hmotnostním detektorem QP2010 plus (obojí Shimadzu, Japonsko)

Autosampler COMCI PAL (CTC ANALYTICS, Švýcarsko).

2.1.2 Chemikálie a plyny

Toluen pro organickou stopovou analýzu (Merck spol. s r.o., ČR)

Řada alkanů C9 – C35 (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Oxid uhličitý 99,5% (Linde Gas a.s., ČR)

Oxid uhličitý potravinářský (Linde Gas a.s., ČR)

Dusík 4.0 (Linde Gas a.s., ČR)

Helium 4.6 (Linde Gas a.s., ČR)

Vodík 3.0 (Linde Gas a.s., ČR)

Vzduch

Dusík

2.2 Úprava vzorku

Vzorky růží byly nejprve dlouhodobě sušeny na vzdušném a suchém místě na filtračním papíru při teplotách 20 – 25°C. Takto usušené lístky růží byly rozemlety pomocí přístroje SPEX SamplerPREP 5100 MIXER MILL. Do nádoby bylo vloženo malé množství usušené růže a tři skleněné mlecí kuličky, potom byla nádoba zazátkována a vložena do přístroje. Mletí trvalo přibližně 10 minut. Vzniklý jemný prášek byl zvážen a převeden do zábrusové láhve. Použité odrůdy růží pro mletí byly *Rosa incredible*, *Rosa margo*, *Rosa moonwalk*, *Rosa rhodos*, *Rosa tara*, *Rosa tacazzi* a neznámá odrůda růže. Pro optimalizaci extrakce byla zvolena růže, u které nebyla známá odrůda, protože jí bylo k dispozici největší množství.

2.3 Extrakce nadkritickou tekutinou

Extrakce byla prováděna na přístroji Se-1 (SEKO s.r.o. Brno). Dále byl k přístroji Se-1 připojen průtokoměr FMA 4000 Omega. Do přístroje byly vedeny 3 plyny, CO₂ vysoké čistoty pro SFE extrakci, CO₂ potravinářský pro ochlazování a N₂. Extrakční přístroj se skládal z více částí. Jako jedna z hlavních částí je tlaková nádoba s posuvným pístem, kam byl přiváděn CO₂ vysoké čistoty. Zde byl zkapalněn a ochlazen pomocí potravinářského CO₂ a N₂. Odtud byl CO₂ v nadkritickém stavu veden do vyhřívané extrakční nádoby, kde probíhala extrakce. Oxid uhličitý obohacený o vyextrahované látky byl dále veden kapilárou (restriktoem) do záchytné zkumavky, ve které bylo záchytné rozpouštědlo (toluen). Průměr kapiláry (restriktoru) byl 50 µm. Za zkumavkou byl připojen průtokoměr, díky kterému bylo možné zjistit objem použitého oxidu uhličitého při extrakci. Na obrázku 8 je vyobrazen přístroj Se-1 (SEKO s.r.o. Brno) a průtokoměr FMA 4000 Omega.



Obrázek 7 Přístroj Se-1 (SEKO s.r.o. Brno) pro SFE

2.3.1 Postup SFE

Na lodičku bylo naváženo požadované množství usušené a rozmlévané růže. Poté byla navážka smíchána se sklářským pískem. Takto připravená směs byla převedena do extrakční nádoby. Extrakční nádoba byla uzavřena a vložena do extrakčního přístroje. Na přístroji byly poté nastaveny požadované parametry (teplota, tlak). Do záchytné nádoby byly napipetovány 2 ml záchytného rozpouštědla (toluen). Na zkumavce byla vyznačena hladina rozpouštědla. To bylo prováděno z důvodu odpařování rozpouštědla během záchytu. V průběhu extrakce bylo rozpouštědlo na požadovanou rychlost doplňováno, aby množství rozpouštědla bylo ve všech

extraktech stejné. Při samotné extrakci byl neustále sledován na průtokoměru průtok oxidu uhličitého, jeho hodnota se pohybovala mezi 80 – 120 ml CO₂ za minutu. Po ukončení extrakce byl extrakt uchováván v lednici, aby nedocházelo k odpařování rozpouštědla a extrahovaných látek. Potom byl extrakt analyzován pomocí GC-FID.

2.3.2 Optimalizace extrakce

Pro optimalizaci metody byly zvoleny celkem tři parametry (teplota, tlak, množství oxidu uhličitého). Teplota byla nastavena v rozsahu od 36 do 103 °C, tlak byl zvolen v rozsahu od 11 do 38 MPa a množství oxidu uhličitého bylo od 990 ml do 6000 ml. Optimalizace byla provedena na sušených a rozemletých lístcích růže neznámé odrůdy. Neznámé růže bylo k dispozici největší množství (přibližně 22 g), proto byla použita. Navážka pro extrakci byla 400 mg.

Pro extrakci bylo také nutné zvolit vhodné záchytné rozpouštědlo. Mezi testovaná záchytná rozpouštědla patřil methanol, hexan a toluen. Při použití methanolu jako záchytného rozpouštědla se při extrakci vytvořila bílá sraženina. Při použití hexanu se vytvořili dvě fáze. Jako nejvhodnější rozpouštědlo byl tedy zvolen toluen (žádná sraženina ani dvě fáze). Pro optimalizaci metody bylo celkem provedeno 17 extrakcí. V tabulce 5 jsou uvedeny všechny extrakce a jejich podmínky, které byly provedeny.

Tabulka 5 Extrakční podmínky pro optimalizaci z programu Statistica 12 (centrální kompozitní, nefaktoriální experimenty)

Číslo	Tlak (MPa)	Teplota (°C)	Objem CO ₂ (ml)
8	33	50	2000
15	25	70	990
10	25	70	3500
16	25	70	6000
13	25	36	3500
2	17	90	5000
4	33	90	2000
7	17	90	2000
6	17	50	5000
11	11,6	70	3500
5	25	70	3500
3	33	50	5000
12	38,4	70	3500
1	17	50	2000
14	25	103	3500
17	25	70	3500
9	33	90	5000

2.4 GC-FID

Extrakty pro optimalizaci SFE byly proměřeny na plynovém chromatografu GC 2010 (Shimadzu, Japonsko). Jako detektor byl použit plamenově ionizační detektor (FID). Jednotlivé složky směsi byly rozděleny na kapilární koloně SLB-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm tloušťka filmu. V tabulce 6 je uveden teplotní program, který byl použit pro tuto analýzu. Doba jednoho měření byla 33 minut. Jako nosný plyn pro GC bylo použito helium 4.6 (Linde Gas a.s., ČR). Lineární rychlost byla 30 cm/s. Teplota nástřiku na plynovém chromatografu byla 250 °C a teplota na FID detektoru 305 °C. Extrakt byl dávkován na kolonu v módu split (1 : 100). Pro lepší opakovatelnost měření byl použit autosampler AOC – 20i (Shimadzu, Japonsko).

Tabulka 6 Teplotní program pro GC-FID

Teplotní nárůst (°C)	Konečná teplota (°C)	Čas udržení konstantní teploty (min)
-	40	5
20	300	15

Výsledné chromatogramy byly poté vyhodnoceny v programu GC Postrun Analysis.

2.5 Analýza reálných vzorků

Pro analýzu reálných vzorků bylo vybráno celkem 6 růží a to byly *Rosa incredible*, *Rosa margo*, *Rosa moonwalk*, *Rosa rhodos*, *Rosa tara*, *Rosa tacazzi*. Všechny tyto růže se řadí mezi tzv. čajohybridy. Extrakce těchto reálných vzorků probíhaly za podmínek z optimalizace, a to tedy teplota 70 °C, tlak 18,3 MPa, objem použitého CO₂ 6000 ml, navážka 0,4g a objem zachytného rozpouštědla 2 ml (toluen). Pro srovnání byla také provedena extrakce čerstvé růže (*Rosa moonwalk*) a i usušené této růže za stejných podmínek i navážky.

Extrakt reálných vzorků, byly proměřeny na plynovém chromatogramu GC 2010, který byl spojen s hmotnostním spektrometrem QP2010 plus (obojí Shimadzu, Japonsko). Hmotnostní spektrometr QP2010 zaznamenával látky v režimu SCAN v rozsahu efektivních hmotností (m/z) od 45 do 500. Jednotlivé složky směsi byly rozděleny na kapilární koloně Zebron ZB-5HT- INFERNO, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm tloušťka filmu od firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA). V tabulce 7 je uveden teplotní program, který byl použit pro analýzu reálných vzorků (stejný jako u FID). Doba jednoho měření byla 33 minut. Jako nosný plyn pro plynovou chromatografii bylo použito helium 4.6 (Linde Gas a.s., ČR). Teplota nástřiku na GC byla 250 °C a teplota převodníku do hmotnostního spektrometru 200 °C. Extrakt byl dávkován na kolonu v módu split (1 : 100). Pro lepší opakovatelnost měření byl použit autosampler COMCI PAL (CTC ANALYTICS, Švýcarsko).

Tabulka 7 Teplotní program pro GC-MS

Teplotní nárůst (°C)	Konečná teplota (°C)	Čas udržení konstantní teploty (min)
-	40	5
20	300	15

Výsledné chromatogramy byly poté vyhodnoceny v programu GS/MS Postrun Analysis.

3 VÝSLEDKY

3.1 Statistické zpracování dat

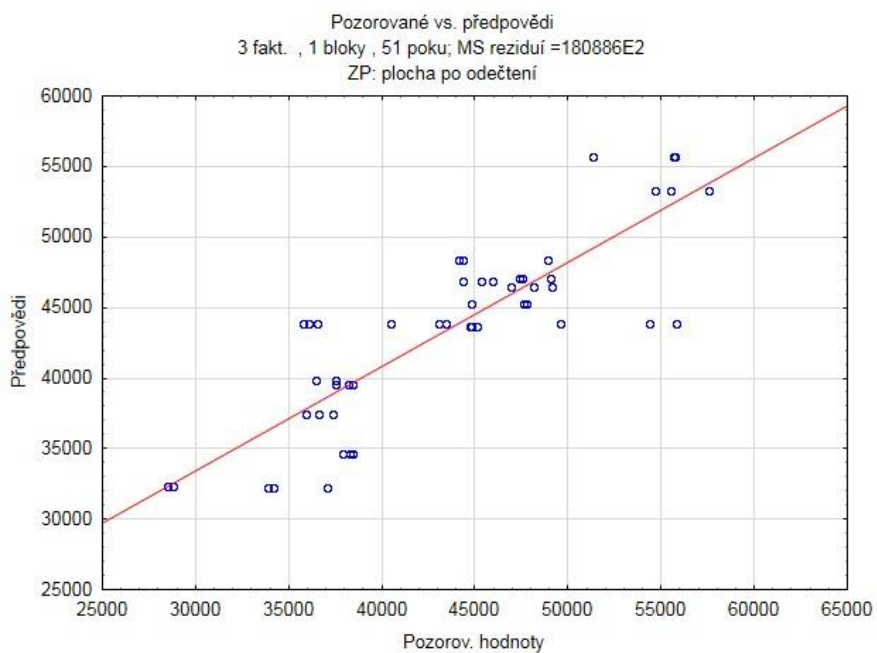
Data z analyzovaných extraktů byla vyhodnocena ve statistickém programu Statistica 12. V programu Statistica 12 byl použit program centrální kompozitní, nefaktoriální experimenty. Použitá data pro tento program byla počet píků, celková plocha píků, celková výška píků a celková plocha píků po odečtení vysokých (plocha vyšší než 3 000).

Optimální podmínky byly zvoleny z hodnot ploch píků po odečtení píků jejichž plocha byla větší než 3000. Hodnota R kvadrátového rozdělení byla nejvyšší a jeho hodnota byla 0,73794. Tabulka 8 obrazuje tabulku ANOVA s hodnotou R kvadrátového rozdělení. V příloze B jsou uvedeny ostatní ANOVA tabulky, které byly vyhodnoceny jako nevyhovující kvůli nižšímu R-kv.

Tabulka 8 Tabulka ANOVA pro celkovou plochu píků po odečtení velkých píků

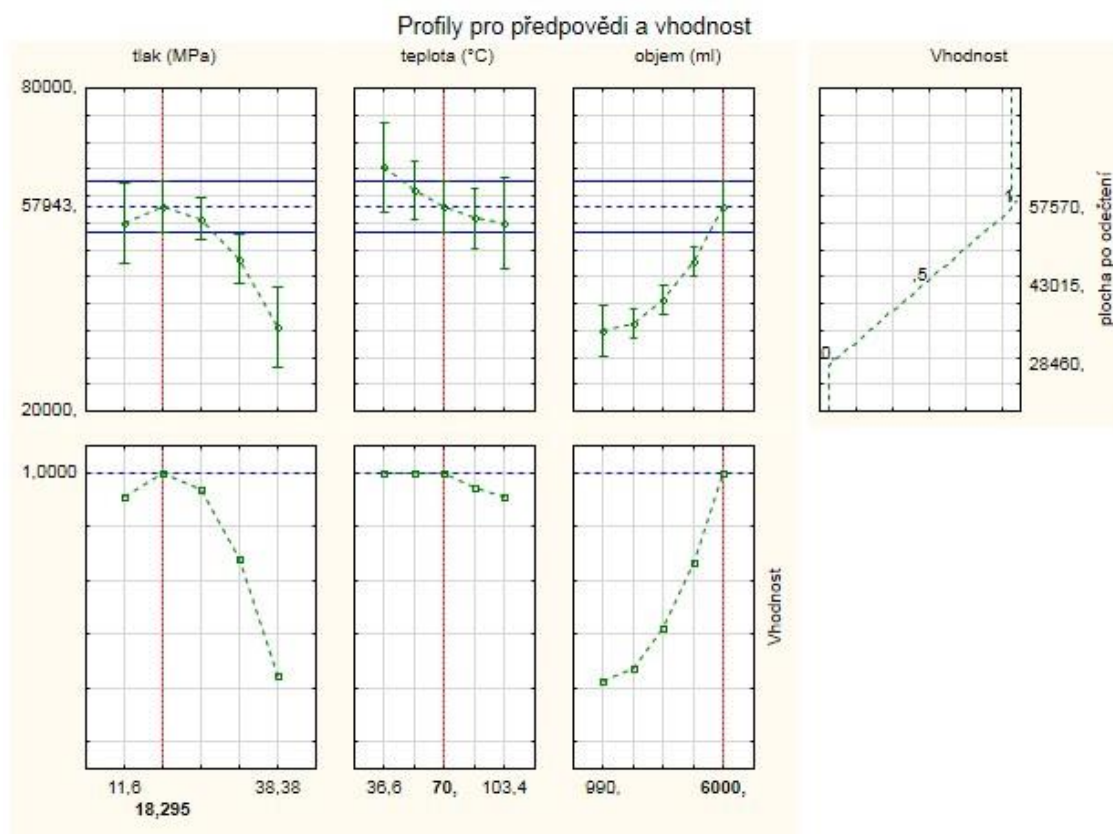
Faktor	ANOVA; Prom:plocha po odečtení; R-kv.=,73794; Upr:,68041 3 fakt. , 1 bloky , 51 poku; MS reziduí =180886E2 ZP: plocha po odečtení				
	SS	df	MS	F	p
(1)tlak (MPa)(L)	1,904408E+07	1	19044080	1,05282	
tlak (MPa)(K)	4,585291E+08	1	458529102	25,34912	
(2)teplota (°C)(L)	9,586962E+06	1	9586962	0,53000	
teplota (°C)(K)	1,979042E+07	1	19790420	1,09408	
(3)objem (ml)(L)	5,365678E+08	1	536567850	29,66338	
objem (ml)(K)	1,420476E+08	1	142047577	7,85290	
1L * 2L	2,936067E+08	1	293606732	16,23163	
1L * 3L	3,616487E+08	1	361648673	19,99323	
2L * 3L	3,795808E+06	1	3795808	0,20985	
Chyba	7,416310E+08	41	18088560		
Celk. SS	2,829975E+09	50			

Také graf pozorovaných hodnot vs. předpovědí byl ze všech nejvhodnější. Tento graf je na obrázku 9. V příloze C jsou uvedeny ostatní grafy pozorovaných hodnot vs. předpovědí.



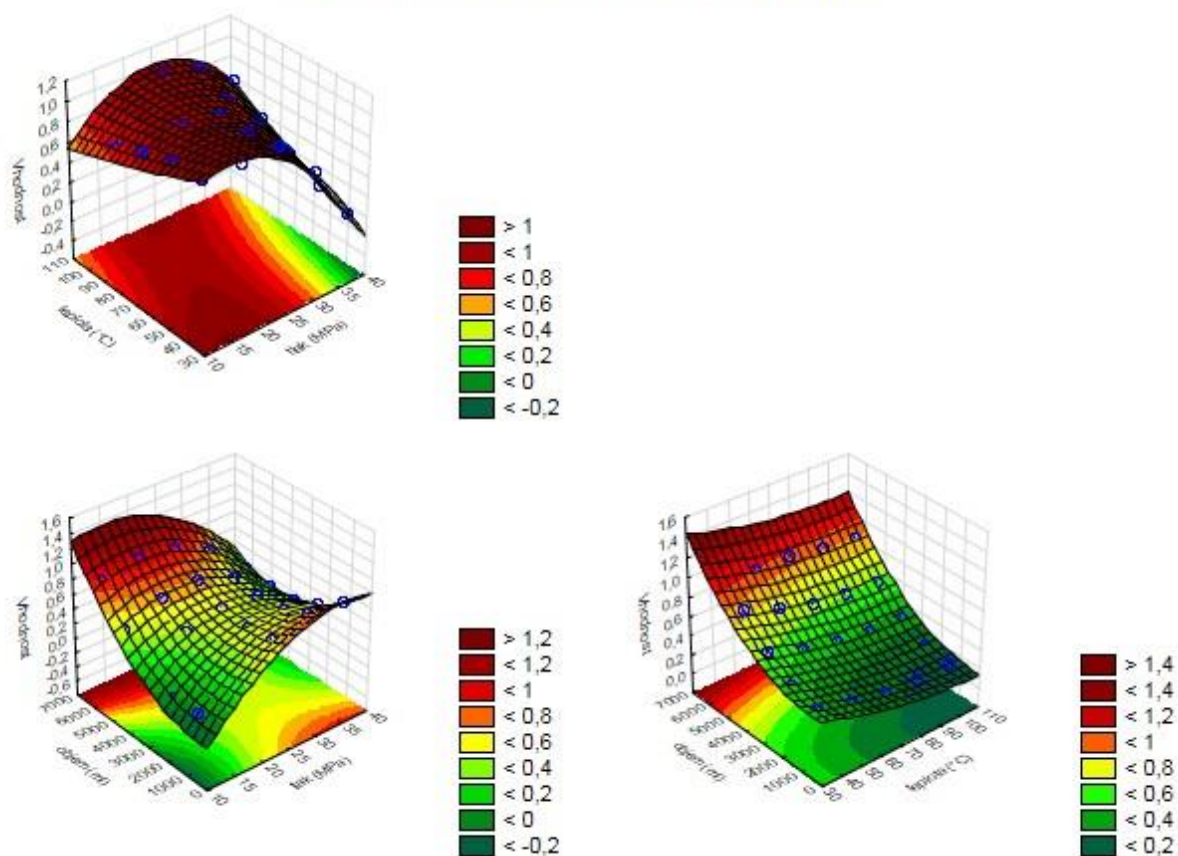
Obrázek 8 Graf předpověď vs. pozorované

Ze statistického programu byly určeny optimální podmínky pro SFE extrakci a to tlak 18,3 MPa, teplota 70 °C a objem CO₂ 6000 ml. Na obrázku 10 jsou profily pro předpovědi a vhodnost. Na obrázku 11 je zobrazen 3D graf vhodnostního povrchu/vrstevnice i se zobrazenými body.



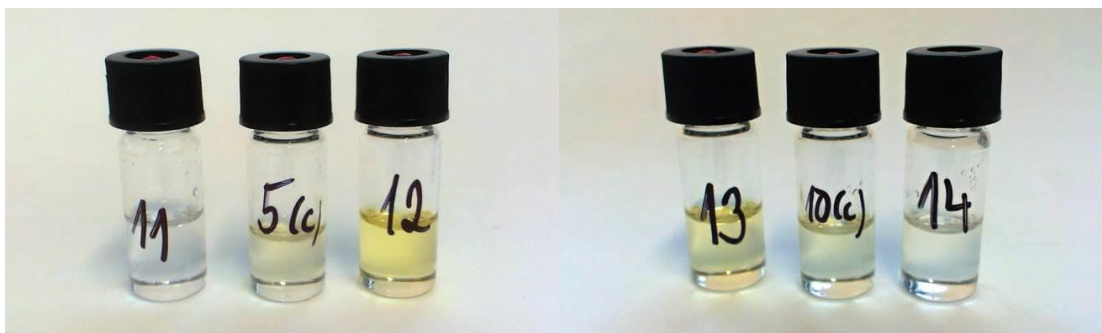
Obrázek 9 Profily a předpovědi pro vhodnost

Vhodnostní povrch/vrstevnice; Metoda: Kvadratická



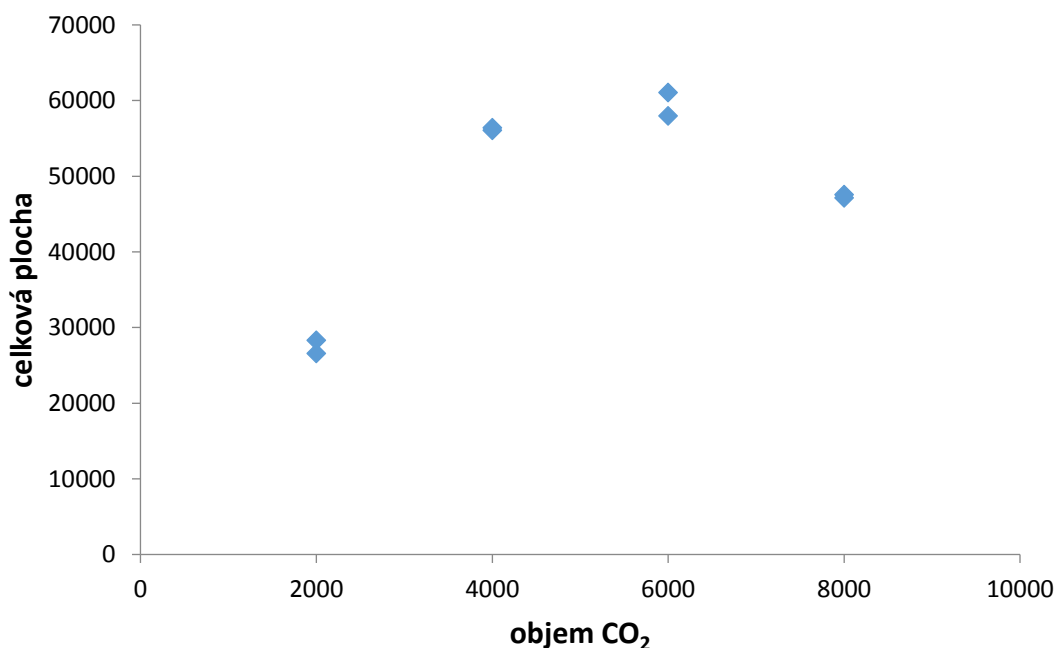
Obrázek 10 3D graf vhodnostního povrchu/vrstevnice se zobrazenými body

Jednotlivé extrakty se od sebe lišily svojí barvou. Některé roztoky byly bezbarvé a jiné žluté. Na barvu roztoku měla vliv teplota a tlak při extrakci. Na obrázku 12 můžeme pozorovat změny barev jednotlivých roztoků. Vlevo jsou roztoky při stejné teplotě (70 °C) a různém tlaku (11 MPa, 25 MPa, 38 MPa). Vpravo jsou roztoky při stejném tlaku (25 MPa) a různé teplotě (36 °C, 70 °C, 103 °C). Výsledná barva neměla vliv na množství vyextrahovaných látek (s rostoucí intenzitou zbarvení, nerostl počet píků). Například u extraktů při stejné teplotě a různém tlaku (obrázek vlevo) bylo na chromatogramu (GC-FID) u prvního extraktu celkem 47 píků, u druhého extraktu to bylo 76 píků a u třetího to bylo 68 píků. U extraktů při stejném tlaku, ale různé teplotě (obrázek vpravo) to bylo v prvním extraktu 60 píků u druhého 77 píků a u třetího 68 píků.



Obrázek 11 Barvy roztoků z extrakce. Vlevo při teplotě 70 °C a tlaku 11 MPa, 25 MPa a 38 MPa. Vpravo při tlaku 25 MPa a teplotě 36 °C, 70 °C a 103 °C.

Jako optimální objem oxidu uhličitého pro extrakci bylo ze statistického programu určeno 6000 ml. Ovšem z obrázku 4 (optimální podmínky pro extrakci) je patrné, že křivka objemu má stoupající nelineární průběh. Pro ověření správnosti této hodnoty byly provedeny extrakce se stejnými podmínkami tlaku a teploty, ale s různými objemy. Podmínky byly tedy teplota 70 °C a tlak 18,3 MPa, objemy použitého CO₂ byly 2000 ml, 4000 ml, 6000 ml a 8000 ml. Tyto extrakty byly analyzovány stejně jako extrakty z optimalizace, a to pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Výsledky byly zaneseny do grafu, který je vyobrazen na obrázku 13.



Obrázek 12 Graf závislosti objemu CO₂ na celkové ploše píků

Graf potvrzuje hodnotu 6000 ml CO₂ pro extrakci. Při použití nižšího nebo vyššího objemu by docházelo k nižším výtěžkům.

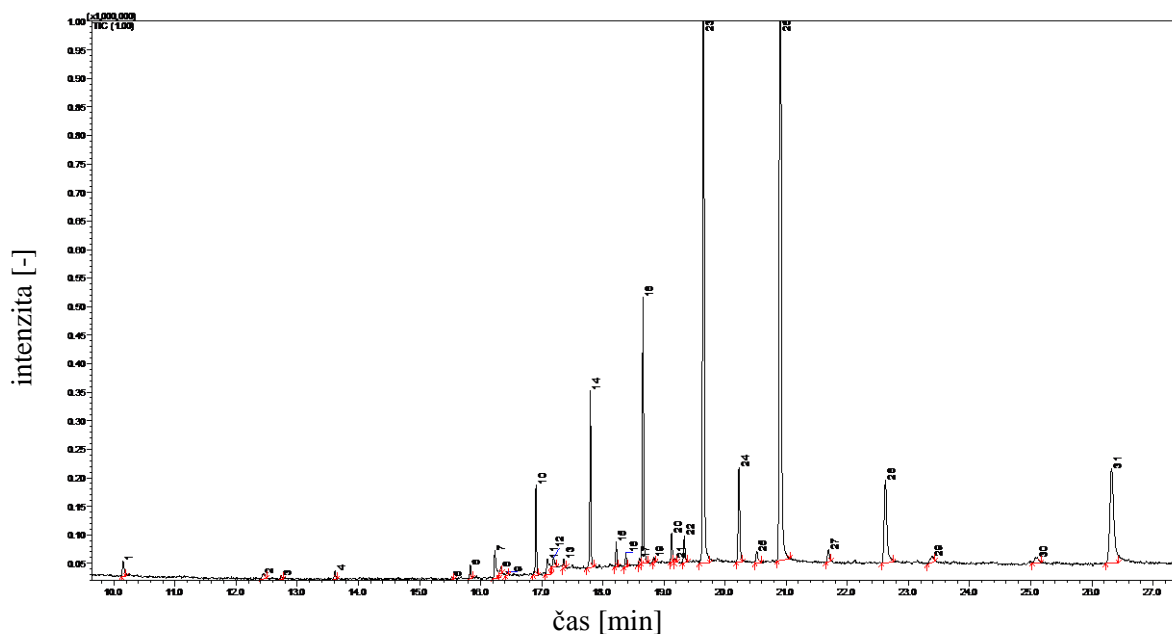
Záznam dat byl proveden v programu GC-MS Real Time Analysis. Data byla vyhodnocena v programu GC-MS Postrun Analysis. Pro porovnání naměřených spekter byly použity knihovny spekter NIST 14, NIST 14s, Wiley 229 (Wiley Registry) a FFNSC 2. Pro všechny látky byly vypočítány retenční indexy (tzv. Kovatsův index). Pro výpočet retenčních indexů látek v extraktu, byl nejdříve proměřen standart n-alkanů. Tento standard se skládal z řady alkanů C9 – C35. Retenční časy řady alkanů jsou uvedeny v tabulce 9. Z těchto časů byl vypočítán retenční (Kovatsův) index piků, které byly nalezeny v extraktech analyzovaných vzorků.

Tabulka 9 Retenční časy řady alkanů C9-C35

Alkan	Retenční čas	Kovatsův index	Alkan	Retenční čas	Kovatsův index
C9	8,485	900	C23	17,791	2300
C10	9,731	1000	C24	18,212	2400
C11	10,719	1100	C25	18,651	2500
C12	11,565	1200	C26	19,118	2600
C13	12,320	1300	C27	19,633	2700
C14	13,016	1400	C28	20,216	2800
C15	13,668	1500	C29	20,887	2900
C16	14,280	1600	C30	21,676	3000
C17	14,900	1700	C31	22,608	3100
C18	15,470	1800	C32	23,712	3200
C19	15,932	1900	C33	25,062	3300
C20	16,429	2000	C34	26,682	3400
C21	16,902	2100	C35	28,652	3500
C22	17,355	2200			

3.2 *Rosa incredible*

Rosa incredible je růže, která má intenzivně červený květ. Získaný extrakt z SFE byl čistý. Na obrázku 14 je vyobrazen chromatogram extraktu. Celkem bylo z 31 píků identifikováno 22 látek. Látky, které poskytovaly intenzivní pík, byly například kyselina palmitová, heneikosan, trikosan, pentakosan, heptakosan, nonakosan a hentriakontan. V tabulce 10 jsou uvedeny názvy, CAS čísla, retenční index a retenční časy všech látek, které byly identifikovány v extraktu.



Obrázek 13 Chromatogram extraktu ze vzorku *Rosa incredible*, analýza GC-MS

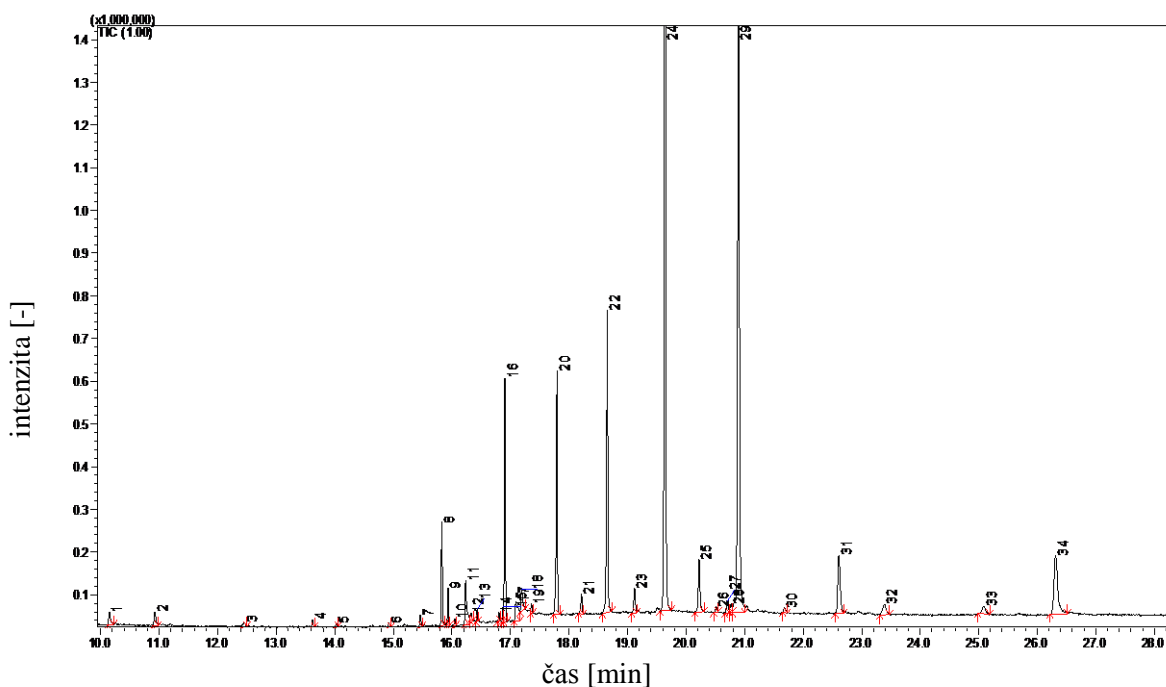
Tabulka 10 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku *Rosa incredible*

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
100-51-6	10,150	94	1042	Benzyl alkohol
334-48-5	12,737	75	1360	Kyselina kaprinová
36653-82-4	15,831	91	1878	Hexadekanol
57-10-3	16,233	93	1961	Kyselina palmitová
84-74-2	16,329	80	1980	Dibutyl ftalát
112-95-8	16,433	76	2001	Eikosan
629-94-7	16,908	96	2101	Heneikosan
544-35-4	17,092	90	2183	Ethyl linoleát
57-11-4	17,199	87	2166	Kyselina stearová
629-97-0	17,360	87	2201	Dokosan

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
638-67-5	17,793	95	2301	Trikosan
646-31-1	18,219	94	2402	Tetrakosan
57402-36-5	18,376	90	2437	Dokosanal
629-99-2	18,656	95	2501	Pentakosan
630-04-3	19,124	94	2601	Hexakosan
57866-08-7	19,331	93	2641	Tetrakosanal
593-49-7	19,645	94	2702	Heptakosan
630-02-4	20,228	94	2802	Oktakosan
630-03-5	20,899	93	2901	Nonakosan
638-68-6	21,692	89	3002	Triakontan
630-04-6	22,624	94	3101	Hentriakontan
630-05-7	25,108	80	3303	Triakontan

3.3 *Rosa margo*

Rosa margo je růže, která má zbarvení květu malinové barvy. Získaný extrakt z SFE byl čirý. Na obrázku 15 je vyobrazen chromatogram extraktu. Celkem bylo z 34 píků identifikováno 25 látek. Látky, které poskytovaly intenzivní pík, byly například hexadekanol, kyselina palmitová, heneikosan, trikosan, pentakosan, heptakosan, nonakosan a hentriakontan. V tabulce 11 jsou uvedeny názvy, CAS čísla, retenční index a retenční časy všech látek, které byly identifikovány v extraktu.



Obrázek 14 Chromatogram extraktu ze vzorku *Rosa margo*, analýza GC-MS

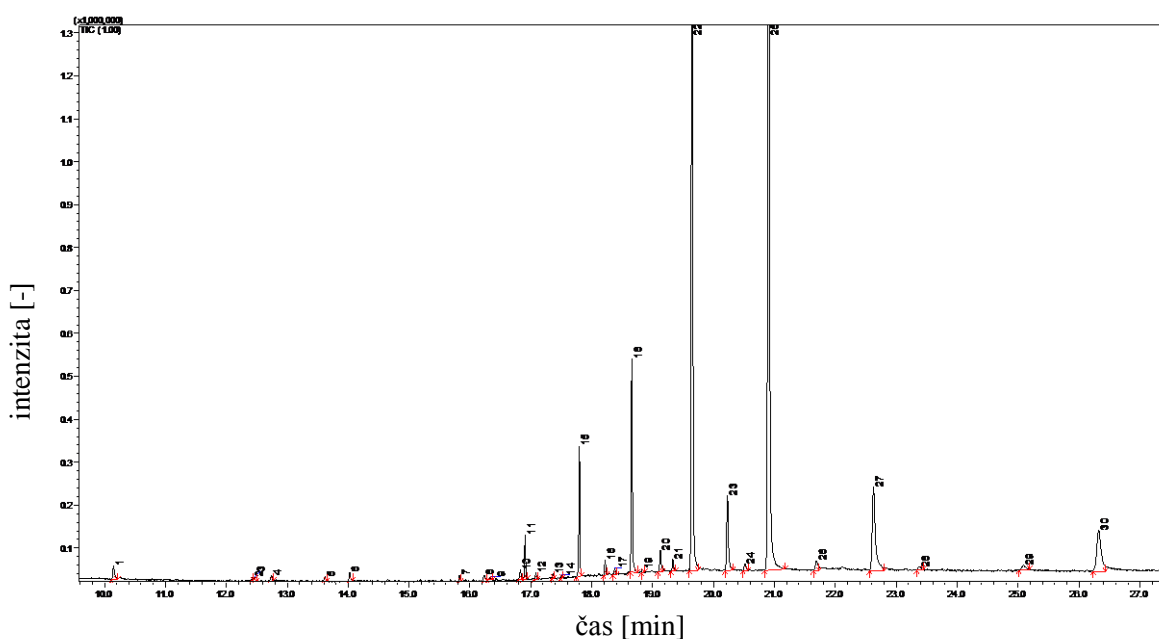
Tabulka 11 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku *Rosa margo*

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
100-51-6	10,150	92	1042	Benzyl alkohol
60-12-8	10,924	95	1124	Fenylethyl alkohol
143-07-7	14,025	84	1558	Kyselina laurová
5989-02-6	15,463	89	1799	Loliolid
36653-82-4	15,827	94	1877	Hexadekanol
629-92-5	15,934	96	1900	Nonadekan
123-69-3	16,049	85	1924	Ambrettolide
57-10-3	16,233	95	1961	Kyselina palmitová
112-95-8	16,429	92	2000	Eikosan
112-92-5	16,805	90	2079	1-Okadekanol
629-94-7	16,904	96	2100	Heneikosan
60-33-3	17,092	91	2142	Kyselina linolová
57-11-4	17,192	90	2164	Kyselina stearová
629-97-0	17,360	90	2201	Dokosan
638-67-5	17,793	94	2301	Trikosan
646-31-1	18,215	92	2401	Tetrakosan

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
629-99-2	18,652	93	2500	Pentakosan
630-01-3	19,120	92	2600	Hexakosan
593-49-7	19,637	94	2702	Heptakosan
630-02-4	20,220	94	2802	Oktakosan
506-52-5	20,707	90	2870	1-Hexakosanol
630-03-5	20,895	90	2904	Nonakosan
638-68-6	21,680	80	3002	triakontan
630-04-6	22,608	89	3100	Hentriakontan
59-02-9	23,390	81	3171	Vitamin E

3.4 *Rosa rhodos*

Rosa rhodos je růže, která má zbarvení květu červené barvy. Získaný extrakt z SFE byl čirý. Na obrázku 16 je vyobrazen chromatogram extraktu. Celkem bylo z 30 píků identifikováno 19 látek. Látky, které poskytovaly intenzivní pík, byly například heneikosan, trikosan, pentakosan, heptakosan, oktakosan, nonakosan a hentriakontan. V tabulce 12 jsou uvedeny názvy, CAS čísla, retenční index a retenční časy všech látek, které byly identifikovány v extraktu.



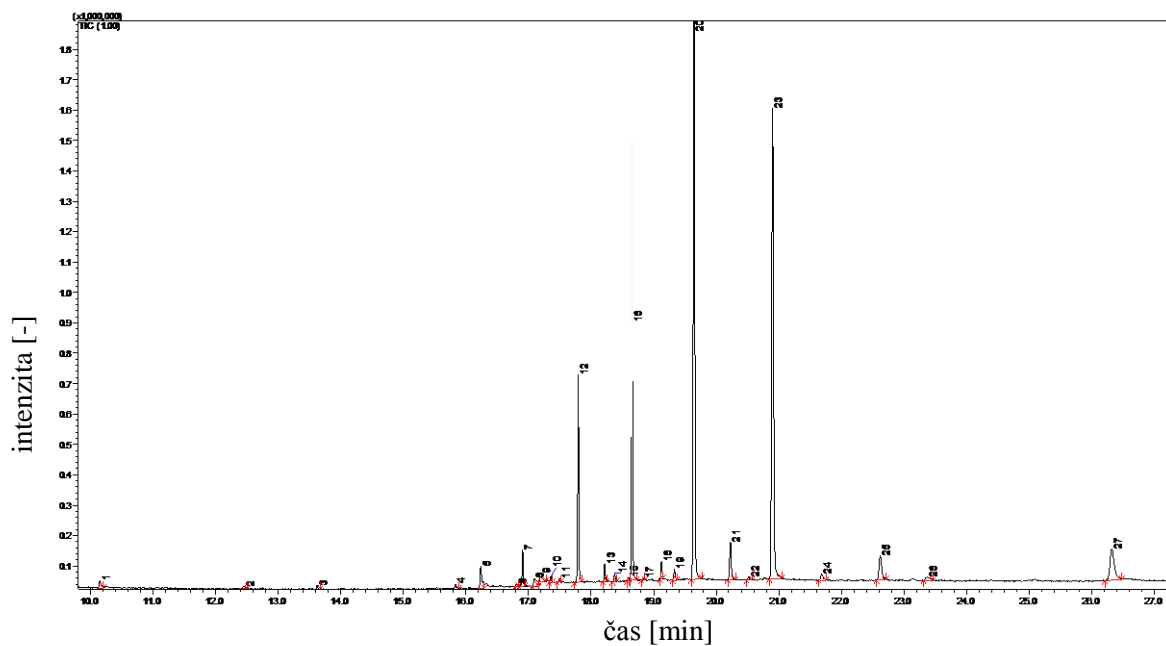
Obrázek 15 Chromatogram extraktu ze vzorku *Rosa rhodos*, analýza GC-MS

Tabulka 12 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku *Rosa rhodos*

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
100-51-6	10,150	94	1042	Benzyl alkohol
334-48-5	12,737	86	1360	Kyselina kaprinová
143-07-7	14,022	93	1558	Kyselina laurová
36653-82-4	15,827	89	1877	Hexadekanol
57-10-3	16,233	86	1961	Kyselina palmitová
629-94-7	16,904	96	2100	Heneikosan
630-07-9	17,360	85	2201	Dokosan
638-67-5	17,793	95	2301	Trikosan
646-31-1	18,219	93	2402	Tetrakosane
57402-36-5	18,376	89	2437	Dokosanal
629-99-2	18,656	96	2501	Pentakosan
630-01-3	19,124	94	2601	Hexakosan
57866-08-7	19,331	91	2641	Tetrakosanal
593-46-7	19,645	95	2702	Heptakosan
630-02-4	20,228	95	2802	Oktakosan
630-03-5	20,902	94	2904	Nonakosan
638-68-6	21,684	89	3001	triakontan
630-04-6	22,624	94	3101	Hentriakontan
630-05-7	25,088	83	3302	Tritriakontan

3.5 *Rosa tacazzi*

Rosa tacazzi je růže, která má zbarvení květu malinové barvy. Získaný extrakt z SFE byl čirý. Na obrázku 17 je vyobrazen chromatogram extraktu. Celkem bylo z 27 píků identifikováno 20 látek. Látky, které poskytovaly intenzivní pík, byly například kyselina palmitová, heneikosan, kyselina linolová, trikosan, pentakosan, heptakosan, oktakosan, nonakosan a hentriakontan. V tabulce 13 jsou uvedeny názvy, CAS čísla, retenční index a retenční časy všech látek, které byly identifikovány v extraktu.



Obrázek 16 Chromatogram extraktu ze vzorku *Rosa tacazzi*, analýza GC-MS

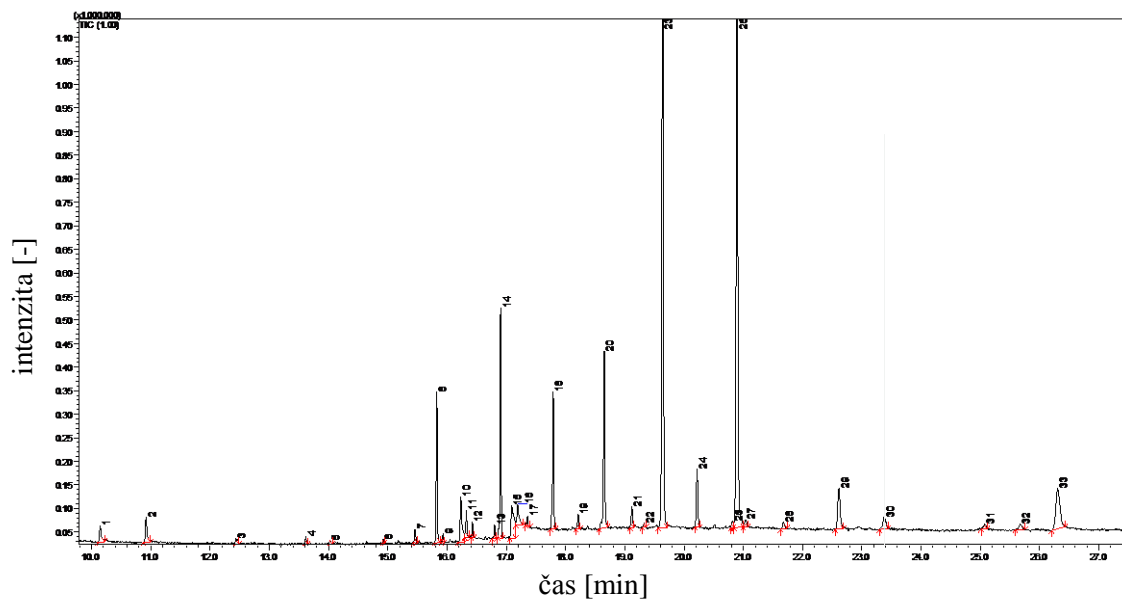
Tabulka 13 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku *Rosa tacazzi*

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
100-51-6	10,154	92	1043	Benzyl alcohol
36653-82-4	15,831	89	1878	Hexadekanol
57-10-3	16,237	93	1961	Kyselina palmitová
112-92-5	16,805	81	2079	1-oktadekanol
629-94-7	16,908	96	2101	Heneikosan
60-33-3	17,092	89	2142	Kyselina linolová
54-11-4	17,192	91	2164	Kyselina stearová
112-95-8	17,360	90	2201	Dokosan
2400-66	17,502	85	2234	Eikosanal
638-67-5	17,793	96	2301	Hexadekanal
646-31-1	18,219	95	2402	Tetrakosan
57866-08-7	18,376	91	2437	Tetrakosanal
629-99-2	18,656	94	2501	Pentakosan
630-01-3	19,128	95	2602	Hexakosan
57866-08-7	19,331	93	2641	Tetrakosanal
593-49-7	19,645	94	2702	Heptakosan
630-02-4	20,228	95	2802	Oktakosan

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
630-03-5	20,899	93	2901	Nonakosane
638-68-6	21,684	85	3001	triakontan
630-04-6	22,620	93	3101	Hentriakontan

3.6 *Rosa tara*

Rosa Tara je růže, která má zbarvení květu žluté barvy. Získaný extrakt z SFE byl světle žlutý. Na obrázku 18 je vyobrazen chromatogram extraktu. Celkem bylo z 33 píků identifikováno 22 látek. Látky, které poskytovaly intenzivní pík, byly například hexadekanol, kyselina palmitová, heneikosan, kyselina linolová, trikosan, pentakosan, heptakosan, nonakosan a hentriakontan. V tabulce 14 jsou uvedeny názvy, CAS čísla, retenční index a retenční časy všech látek, které byly identifikovány v extraktu.



Obrázek 17 Chromatogram extraktu ze vzorku *Rosa tara*, analýza GC-MS

Tabulka 14 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku *Rosa tara*

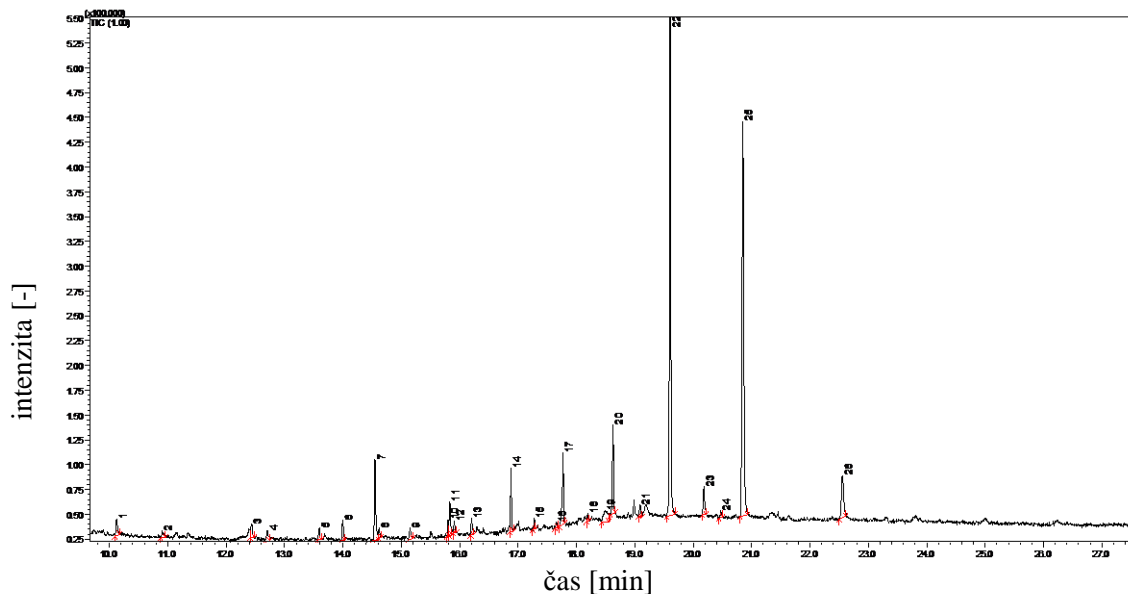
CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
60-12-8	10,920	96	1124	Fenethyl alkohol
143-07-7	14,025	75	1558	Kyselina laurová
5989-02-6	15,463	91	1799	Loliolid
36653-82-4	15,827	94	1877	Hexadekanol
544-85-4	15,931	91	1900	Nonadekan

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
57-10-3	16,229	94	1960	Kyselina palmitová
630-04-6	16,429	94	2000	Eikosan
112-92-5	16,805	91	2079	1-Oktadekanol
629-94-7	16,904	96	2100	Heneikosan
60-33-3	17,088	92	2141	Kyselina linolová
57-11-4	17,192	91	2164	Kyselina stearová
629-97-0	17,357	90	2200	Dokosan
638-67-5	17,790	92	2300	Trikosan
646-31-1	18,211	89	2400	Tetrakosan
629-99-2	18,652	94	2500	Pentakosan
630-01-3	19,120	91	2600	Hexakosan
593-49-7	19,637	94	2701	Heptakosan
630-02-4	20,220	91	2801	Oktakosan
630-03-5	20,891	92	2904	Nonakosan
638-68-6	21,677	83	3000	Triakontan
630-04-6	22,612	91	3100	Hentriakontan
59-02-9	23,379	79	3170	Vitamin E

3.7 *Rosa moonwalk*

3.7.1 Čerstvá růže

Rosa moonwalk je růže, která má zbarvení květu žluté barvy. U této růže byla provedena extrakce čerstvé i usušené růže. U obou extrakcí byla použita stejná navážka a to 0,4 g. Získaný extrakt čerstvé růže z SFE byl čirý. Na obrázku 19 je vyobrazen chromatogram extraktu. Celkem bylo z 26 píků identifikováno 19 látek. Látky, které poskytovaly intenzivní pík, byly například trikosan, pentakosan, heptakosan, nonakosan a hentriakontan. V tabulce 15 jsou uvedeny názvy, CAS čísla, retenční index a retenční časy všech látek, které byly identifikovány v extraktu.



Obrázek 18 Chromatogram extraktu ze vzorku čerstvé Rosa moonwalk, analýza GC-MS

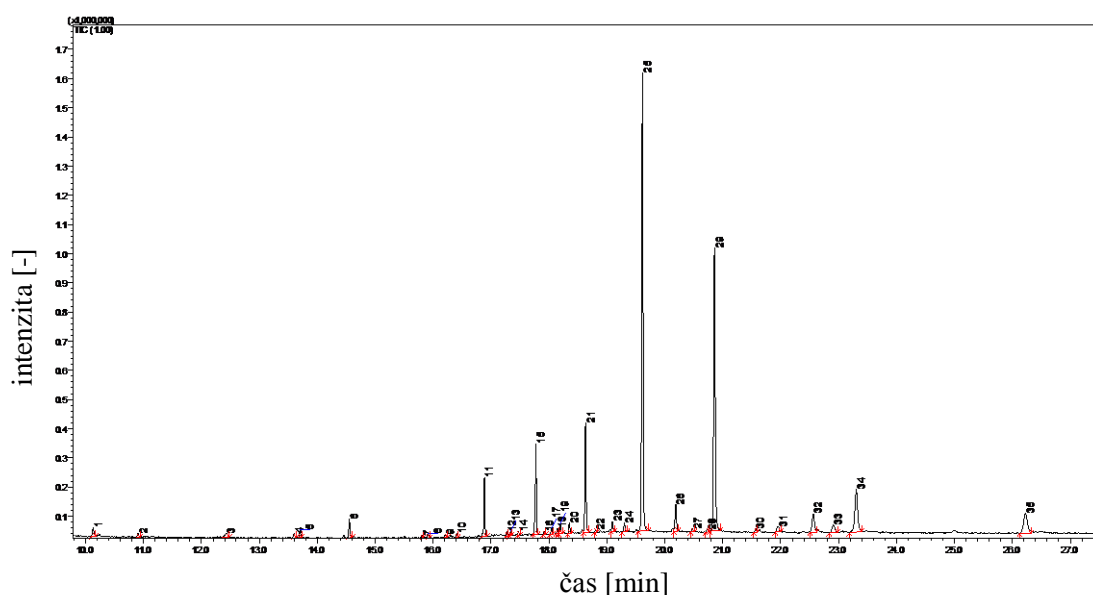
Tabulka 15 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku čerstvé Rosa moonwalk

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
100-51-6	10,123	88	1040	Benzyl alkohol
60-12-8	10,901	76	1122	Fenethyl alkohol
334-48-5	12,707	84	1356	Kyselina kaprinová
143-07-7	13,995	91	1553	Kyselina laurová
126-73-8	14,547	94	1643	Tributyl fosfát
544-63-8	15,149	81	1744	Kyselina myristová
36653-82-4	15,800	88	1871	Hexadekanol
629-92-5	15,908	81	1895	Nonadekan
57-10-3	16,203	88	1954	Kyselina palmitová
629-94-7	16,877	95	2095	Heneikosan
111-06-8	17,276	78	2183	Butyl palmitát
638-67-5	17,771	93	2295	Trikosan
646-31-1	18,192	76	2395	Tetrakosan
629-99-2	18,625	93	2494	Pentakosan
630-01-3	19,089	80	2594	Hexakosan
593-49-7	19,603	93	2694	Heptakosan
630-02-4	20,186	91	2795	Octakosan
630-03-5	20,849	93	2894	Nonakosan

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
630-04-6	22,555	92	3094	Hentriakontan

3.7.2 Usušená růže

Získaný extrakt usušené růže *Rosa moonwalk* z SFE byl světle žlutý. Na obrázku 20 je vyobrazen chromatogram extraktu. Celkem bylo z 35 píků identifikováno 20 látek. Látky, které poskytovaly intenzivní pík, byly například heneikosan, trikosan, pentakosan, heptakosan, nonakosan a hentriakontan. V tabulce 16 jsou uvedeny názvy, CAS čísla, retenční indexy a retenční časy všech látek, které byly identifikovány v extraktu.



Obrázek 19 Chromatogram extraktu ze vzorku usušené *Rosa moonwalk*, analýza GC-MS

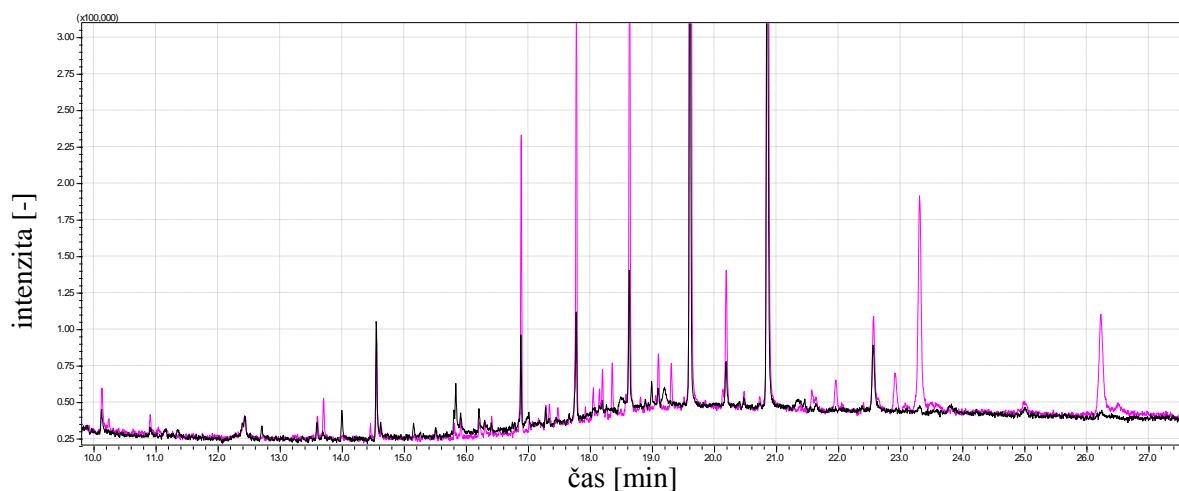
Tabulka 16 Tabulka identifikovaných látek v extraktu ze vzorku usušené *Rosa moonwalk*

CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	RI vypočítaný	Název látky
100-51-6	10,127	87	1040	Benzyl alkohol
60-12-8	10,905	88	1122	Fenethyl alkohol
126-73-8	14,554	94	1644	Tributyl phosphate
36653-82-4	15,808	83	1873	Hexadekanol
629-92-5	15,911	88	1896	Nonadekan
57-10-3	16,210	83	1956	Kyselina palmitová
630-04-6	16,410	83	1996	Eikosan
629-94-7	16,885	96	2096	Heneikosan

111-06-8	17,280	82	2183	Butyl palmitát
629-97-0	17,337	86	2196	Dokosan
2400-66-0	17,475	79	2228	Eikosanal
638-67-5	17,774	95	2296	Trikosan
123-95-5	18,146	82	2384	Butyl stearát
646-31-1	18,192	92	2395	Tetrakosan
629-99-2	18,629	95	2495	Pentakosan
630-01-3	19,093	93	2595	Hexakosan
593-49-7	19,611	91	2696	Heptakosan
630-02-4	20,189	93	2795	Octakosan
630-03-5	20,856	94	2895	Nonakosan
630-04-6	22,562	92	3095	Hentriakontan

3.8 Porovnání výsledků

Látky identifikované v reálných vzorcích byly popsány v teoretické části jako vyskytující se v extraktech růží. Látky typické pro růže jako je například geraniol, linalool, citronellol, růžový oxid nebo nerol nebyly v analyzovaných extraktech detekovány. Příčinou může být mnoho aspektů. Například nevyextrahování látek pomocí CO₂, nízká koncentrace v růžích, nebo také vypaření těchto látek při sušení. Ostatní látky, které byly uvedeny v teoretické části a byly v extraktech detekovány jsou například fenylethyl alkohol, hexadekanol, ethyl linoleát, nonadekan, eikosan, heneikosan, trikosan, hentriakontan. Dále kyseliny, které byly uvedeny ve studii z roku 1997 Ernesto Reverchon - (29) to byla například kyseliny palmitová, kyselina linoleová, kyselina stearová. Na obrázku 21 jsou zobrazeny chromatogramy extraktů z čerstvé růže *Rosa moonwalk* (černý záznam) a usušené růže *Rosa moonwalk* (růžový záznam).



Obrázek 20 Porovnání chromatogramů čerstvé Rosa moonwalk (černá) a usušené Rosa moonwalk (růžová)

Z obrázku je patrné, že extrakt získaný z usušené růže obsahoval více látek než extrakt získaný z čerstvé růže. Celkem bylo identifikováno v extraktu z čerstvé růže 19 látek ze 26 a v extraktu z usušené růže 20 látek z 35. Z obrázku je také možné sledovat intenzitu jednotlivých píků. Intenzita je větší z extraktu z usušené růže než u extraktu z čerstvé růže.

V tabulce 17 jsou uvedené látky, které byly společné pro extrakty. Jejich množství je vyjádřeno procentuálním zastoupením v extraktu.

Tabulka 17 Látky identifikované v extraktech a jejich procentuální zastoupení

Látka	Rosa tacazzi (%)	Rosa rhodos (%)	Rosa incerable (%)	Rosa margo (%)	Rosa Tara (%)	Rosa moonwalk čerstvá (%)	Rosa moonwalk usušená (%)
Benzyl alkohol	0,51	0,72	0,59	0,51	0,8	1,17	0,82
Fenylethyl alkohol	-	-	-	0,61	1,12	0,56	0,35
Hexadekanol	0,28	0,21	0,36	2,42	4,27	0,71	0,17
Kyselina palmitová	1,46	0,31	1,21	1,78	2,33	1,3	0,23
Heneikosan	1,39	1,2	2,2	5,53	6,38	2,85	3,41
Kyselina linolová	0,92	-	-	1,35	2,82	1,2	-
Kyselina stearová	0,61	-	0,36	0,81	1,14	-	-
Trikosan	-	3,59	3,99	6,4	4,34	4,23	5,3

Látka	Rosa tacazzi (%)	Rosa rhodos (%)	Rosa incerable (%)	Rosa margo (%)	Rosa Tara (%)	Rosa moonwalk čerstvá (%)	Rosa moonwalk usušená (%)
Pentakosan	10,44	6,56	6,7	9,19	6,14	4,95	7,1
Heptakosan	33,8	29,53	27,76	29,62	27,71	30,54	32,31
Oktakosan	2,5	3,32	3,16	1,99	2,34	1,84	2,14
Nonakosane	29,48	37,03	33,99	25,6	25,44	30,54	24,48
Hentriakontan	2,12	7,6	4,74	3,9	2,74	4,19	2,4

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provést literární rešerši zaměřenou na analýzu růží pomocí plynové chromatografie, zejména na analýzu těkavých látek charakterizující růže. Dále provést optimalizaci metody pro extrakci nadkritickou tekutinou a nalézt vhodné podmínky pro analýzu získaných extraktů pomocí GC-MS a metodu ověřit na reálných vzorcích.

Teoretická část práce byla zaměřena na růže jejich analýzu a těkavé složky, které růže obsahují. V experimentální části byla provedena optimalizace extrakce na přístroji Se-1 (SEKO s.r.o. Brno). Optimální podmínky, které byly vyhodnoceny z programu Statistica 12 pro SFE byly tlak 18,3 MPa, teplota 70 °C a objem prošlého oxidu uhličitého 6000 ml. Za těchto podmínek byly provedeny extrakce reálných vzorků, a to růží *Rosa incredible*, *Rosa margo*, *Rosa moonwalk*, *Rosa rhodos*, *Rosa tacazzi* a *Rosa tara*. Nejvíce látek bylo identifikováno v extraktu ze vzorku *Rosa margo* a to 25. V extraktu z *Rosa incredible* bylo identifikováno celkem 22 látek, v extraktu čerstvé *Rosa moonwalk* 19 látek, v extraktu usušené *Rosa moonwalk* 20 látek, v extraktu z *Rosa rhodos* 19 látek, v extraktu z *Rosa tacazzi* 20 látek a z extraktu z *Rosa tara* 22 látek. Počet identifikovaných látek z extraktu čerstvé *Rosa moonwalk* a usušené se moc nelišil. Ovšem jednotlivé chromatogramy se od sebe lišily intenzitou píků a jejich celkovým počtem.

Látky, které jsou typické pro růže (geraniol, linalool, citronellol, růžový oxid, nerol), ale nebyly v extraktu identifikovány. Tyto látky nemusely být v růžích přítomny v dostatečné koncentraci, aby mohlo dojít k jejich extrakci, protože se jednalo o růže z čeledi čajohybrid. Růžový olej se většinou získává z odrůd *Rosa Damascena* a jejich genotypů. Jako další důvod proč nebyly v extraktu analyzovány tyto látky je použití malé navážky (0,4g). V teoretické části byly uvedeny extrakce, kde byly extrakty prováděny se stonásobně větší navázkou, u hydrodestilací i tisícinásobně. Například u SFE extrakce, kterou prováděli v roce 1997 E. Revechon, G. Della Porta a D. Gorgoglione také nebyly v extraktu analyzovány látky jako geraniol, nerol a růžový oxid. Látky uvedené v teoretické části, které byly identifikovány v extraktech byly například fenylethylalkohol, hexadekanol, ethyl linoleát, nonadekan, eikosan, heneikosan, trikosan, hentriakontan.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Rose. *Encyclopædia Britannica, inc.* [online]. 2016 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/plant/rose-plant>
- (2) SUS, Josef, Jiří ŽLEBČÍK a Jaroslav ROD. *Svět růží*. Olomouc: Agriprint, 2013. ISBN 978-80-87091-45-6.
- (3) Essential oil. *Encyclopædia Britannica, inc.* [online]. 2016 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/topic/essential-oil>
- (4) VEIT, Myriam. *Léčivá kosmetika z přírody: jak si vyrobit hojivé masti, oleje a esence*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4586-2.
- (5) Esenciální olej růže - účinky a využití. *Bioaroma kosmetika* [online]. 2014 [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <https://www.bioaromakosmetika.cz/magazin/esencialni-oleje/esenciani-olej-ruze-rosa-damascena>
- (6) PAL, Probir Kumar. Evaluation, Genetic Diversity, Recent Development of Distillation Method, Challenges and Opportunities of Rosa damascena: A Review. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* [online]. 2013, **16**(1), 1-10 [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1080/0972060X.2013.764176. ISSN 0972-060x. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2013.764176>
- (7) BRUNNING, Andy. Aroma of Rose. In: *Compoundchem* [online]. Cambridge, UK: Compound Interest, 2017 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.compoundchem.com/wp-content/uploads/2017/02/The-Chemistry-of-Roses.png>
- (8) KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- (9) Extrakční techniky. *MENDELU* [online]. Brno [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968
- (10) RUSANOV, Krasimir, KOVACHEVA Natasha, RUSANOVA Mila a ATANASSOV Ivan. Traditional Rosa damascena flower harvesting practices evaluated through GC-MS metabolite profiling of flower volatiles. *Food Chemistry* [online]. 2011, **129**(4), 1851–1859 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011004377>

- (11) DOBREVA, A, A VELCHEVA a V BARDAROV. Chemical composition of different genotypes oil-bearing roses. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* [online]. 2013, **19**(6), 1213-1218 [cit. 2017-05-18]. Dostupné z: <http://www.agrojournal.org/19/06-07.pdf>
- (12) M. AMINI, M. K. RINEH, M. YAZDANI. Study of the chemical compositions of Iranian rose flower essence oil (*Rosa persica*). *BULGARIAN CHEMICAL COMMUNICATIONS* [online]. 2016, **2016**(Special Edition D), 26-27 [cit. 2017-03-07]. ISSN 0324-1130. Dostupné z: http://bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_48_Special_D_2016/BCC-48-D-2016-4-Amini-27-29.pdf
- (13) A. KARAMIL, P. ZANDI, M. KHOSH-KHUIL, H. SALEH and M. SAHARKHIZ. Analysis of essential oil from nine distinct genotypes of Iranian Damask rose (*Rosa damascena* Mill). *Journal of Medicinal Plants Research* [online]. 2012, **6**(42), 5495-5498 [cit. 2017-03-07]. DOI: 10.5897/JMPR12.318. ISSN 1996-0875 ©2012 Academic Journals. Dostupné z: http://www.academicjournals.org/article/article1380708755_Karami%20et%20al.pdf
- (14) BERECHET, M.D., I. CALINESCU, M.D STELESCU, E. MANAILA a . Composition of the Essential Oil of *Rosa Damascena* Cultivated in Romania. *REVISTA DE CHIMIE*. 2015, **66**(12), 1986-1991.
- (15) KAUL, V.K., Rajeer K. GUJRAL a Bikram SINGH. Volatile constituents of the essential oil of flowers of *Rosa brunonii* Lindl. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 1999, **14**(1), - [cit. 2017-05-02]. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(199901/02)14:1<9::AID-FFJ761>3.0.CO;2-C. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199901/02\)14:1%3C9::AID-FFJ761%3E3.0.CO;2-C/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-1026(199901/02)14:1%3C9::AID-FFJ761%3E3.0.CO;2-C/epdf)
- (16) JIROVETZ, Leopold, Gerhard BUCHBAUER, Albena STOYANOVA, Anastasia BALINOVA, Zhang GUANGJIUN a Ma XIHAN. Solid phase microextraction/gas chromatographic and olfactory analysis of the scent and ?xative properties of the essential oil of *Rosa damascena* L. from China. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 2005, **20**(1), 7 [cit. 2017

- (17) KOKSALL, N., H. ASLANCAN, S. SADİGHAZADİ a E. KAFKAS. Chemical investigation on Rose damascena Mill. volatiles; Effects of storage and drying conditions. *Acta Scientiarum Polonorum* [online]. 2015, **14**(1), 105-114 [cit. 2017-03-27]. ISSN 1644-0692. Dostupné z: http://wydawnictwo.up.lublin.pl/acta/hortorum_cultus/2015/1/08.pdf
- (18) REVERCHON, Ernesto; DELLA PORTA, Giovanna; GORGOGNONE, Domenico. Supercritical CO₂ extraction of volatile oil from rose concrete. *Flavour and fragrance journal*, 1997, 12.1: 37-41.
- (19) RINCÓN, J., A. DE LUCAS a I. GRACIA. Isolation of Rock Rose Essential Oil Using Supercritical CO₂ Extraction. *Separation Science and Technology*. 2000, **35**(16), 2745-2763. DOI: 10.1081/SS-100102366.
- (20) GOMES, Paula B., Vera G. MATA a Alírio E. RODRIGUES. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2007, **41**(1), 50-60. ISSN 0896-8446.
- (21) Superkritická tekutina. In: *Ústav chemických procesů AV ČR* [online]. 2016 [cit. 2017-05-3]. Dostupné z: <http://www.icpf.cas.cz/cs/superkriticka-tekutina>
- (22) Metoda superkritické extrakce. *Flavekotrada s.r.o.* [online]. Pardubice, 2010 [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://www.flavekotrada.cz/flavekotrada/metoda-superkriticke-extrakce.htm>
- (23) Superkritická fluidní extrakce [online]. In: . [cit. 2016-05- 29]. Dostupné z: http://sch.vscht.cz/materialy/stud_mgr/sfe_web_2014.pdf
- (24) SOVOVÁ, Helena a Roumiana P. STATEVA. Supercritical fluid extraction from vegetable materials.Reviews in Chemical Engineering [online]. 2011, 27(3/4), 79-156 [cit. 2016-03- 31]. DOI: 10.1515/REVCE.2011.002. ISSN 01678299.
- (25) VENTURA, Karel. *Licenční studium: Příprava vzorku ve stopové analýze organických látek Extrakce kapalinou, plynem, sorbentem, superkritická fluidní extrakce a chromatografie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1995.

- (26) Schéma SFE extraktorů Se-1 (SEKO s.r.o. Brno). In: *MENDELU* [online]. Brno [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: http://docplayer.cz/docs-images/42/2653698/images/page_6.jpg
- (27) LAGENFELD, J.J., M.D. BURFORD, S.B. HAWTHORNE a D.J. MILLER. Effects of collection solvent parameters and extraction cell geometry on supercritical fluid extraction efficiencies. *Journal of Chromatography A*. 1992, **594**(1-2), 297-307.
- (28) POURMORTAZAV, S. M. a S. S. HAJIMIRSADEGHI. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1163**(1-2), 2-24 [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307010229>
- (29) REVERCHON, Ernesto. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 1997, **10**(1), 1-37 [cit. 2017-05-19]. DOI: 10.1016/S0896-8446(97)00014-4. ISSN 08968446. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844697000144>
- (30) REVERCHON, E. a F. SENATORE. Isolation of rosemary oil: Comparison between hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 1992, **7**(4), 227-230 [cit. 2017-05-19]. DOI: 10.1002/ffj.2730070411. ISSN 08825734. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.2730070411>
- (31) POURMORTAZAVI, Seied Mahdi, Parvin BAGHAEI a Mohammad Ali MIRHOSSEINI. Extraction of volatile compounds from *Juniperus communis* L. leaves with supercritical: comparison with hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 2004, **19**(5), 417-420 [cit. 2017-03-27]. DOI: 10.1002/ffj.1327. ISBN 10.1002/ffj.1327. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1327>
- (32) CONDE-HERNÁNDEZ, Lilia A., José R. ESPINOSA-VICTORIA, Arturo TREJO a José Á. GUERRERO-BELTRÁN. CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Food Engineering* [online]. 2017, (200), 81-86 [cit. 2017-03-27]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022. ISBN 10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877416304721>

- (33) CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- (34) Linde gas: Plamenoionizační detektor. In: *Linde gas* [online]. Praha, 2009 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/PlamenoizolacniDetektor_INNA_22_4_200979_15731.pdf?v=2.0
- (35) SMOLKOVÁ, Eva. *Analýza látek v plynném stavu*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1991, 478 s. ISBN 80-030-0604-X.
- (36) HOLČAPEK, Michal. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze*. University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, 2017. Dostupné také z: http://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf
- (37) HOLČAPEK, Michal. *Spojení MS a separačních technik*. University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, 2017. Dostupné také z: http://holcapek.upce.cz/teaching/06_Spojeni_MS_separace.pdf
- (38) Kvalitativní analýza v plynové chromatografii. *Mendelova univerzita v Brně* [online]. Brno [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52966

Příloha A – Tabulka identifikovaných látek v růži *Rosa Damascena* pomocí SPME (čerstvé lístky, skladování při 4°C, 25°C a sušení při 40°C, 50°C a 60°C) (17)

Table 1. The percentage of volatile composition of *R. damascena* Mill. flowers stored at cold and room conditions and dried for four days

Compounds	RT	Fresh petal	Storage condition			Convective drying		
			4°C	25°C	40°C	50°C	60°C	
2-Amino-propionic acid	2.29	2.55 ±0.37	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α-Pinene	6.27	2.05 ±0.30	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α-Limonene	6.59	0.30 ±0.04	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β-myrcene	7.67	0.75 ±0.11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Trans rose oxide	11.07	0.94 ±0.14	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Phenylethyl alcohol	11.43	25.06 ±3.61	68.54 ±10.85	63.76 ±7.63	81.09 ±17.75	79.32 ±11.37	77.29 ±21.16	
Citronellol	14.62	21.09 ±3.04	21.00 ±3.33	14.55 ±1.74	8.94 ±1.96	8.40 ±1.20	10.69 ±2.93	
Geraniol	15.38	0.21 ±0.03	1.79 ±0.28	10.38 ±1.24	nd	nd	nd	
Citronellyl acetate	18.03	0.90 ±0.13	nd	nd	nd	nd	nd	
Geranyl acetate	18.88	0.69 ±0.10	1.24 ±0.20	3.79 ±0.45	2.26 ±0.49	2.33 ±0.33	2.18 ±0.60	
Eugenol	18.40	0.82 ±0.12	nd	nd	nd	nd	nd	
Methyl eugenol	19.58	1.98 ±0.28	2.24 ±0.35	nd	1.28 ±0.28	0.98 ±0.14	nd	
α-Phenyl cinnamic acid	21.76	nd	nd	nd	nd	1.65 ±0.24	2.87 ±0.79	
Dimethyl-lauramine	22.04	0.43 ±0.06	nd	nd	nd	nd	nd	
2-Trifluoromethyl	25.65	2.66 ±0.38	nd	nd	nd	nd	nd	
N-butyl-2-decanamine	26.37	5.80 ±0.83	nd	nd	nd	nd	nd	
4-Amino-furazan	31.28	23.45 ±3.37	nd	nd	nd	nd	nd	
Nonadecane	31.37	3.58 ±0.52	5.19 ±0.82	7.52 ±0.90	6.43 ±1.41	7.32 ±1.05	6.97 ±1.91	
N,n-dimethyl	31.58	1.81 ±0.26	nd	nd	nd	nd	nd	
Undecanoic acid	37.04	4.93 ±0.71	nd	nd	nd	nd	nd	

2-Trifluoromethyl – 2-Trifluoromethylbenzoic acid, 2-octyl ester

4-Amino-furazan – 4-Amino-furazan-3-carboxylic acid (3-morpholin-4-yl-propyl)-amide

N,n-dimethyl – N,n-dimethyl-1-hexadecanamine

Undecanoic acid – undecanoic acid isopropyl ester

RT – retention time

nd – correct isomer not determined

The data are corresponding standard deviation (±) of the three reading

Příloha B – Tabulky ANOVA pro celkovou plochu, počet piků a celkovou výšku piků

ANOVA; Prom:celková plocha; R-kv.=,64143; Upr.:56272 (Tabulka1) 3 fakt. , 1 bloky , 51 poku; MS reziduí =273143E4 ZP: celková plocha					
Faktor	SS	df	MS	F	p
(1)tlak (MPa)(L)	5,856423E+09	1	5,856423E+09	2,14409	0,150746
tlak (MPa)(K)	5,418301E+10	1	5,418301E+10	19,83686	0,000064
(2)teplota (°C)(L)	3,158186E+08	1	3,158186E+08	0,11562	0,735566
teplota (°C)(K)	3,309410E+06	1	3,309410E+06	0,00121	0,972402
(3)objem (ml)(L)	6,803669E+10	1	6,803669E+10	24,90881	0,000012
objem (ml)(K)	9,573014E+08	1	9,573014E+08	0,35048	0,557094
1L * 2L	2,607599E+10	1	2,607599E+10	9,54664	0,003591
1L * 3L	2,574299E+10	1	2,574299E+10	9,42473	0,003789
2L * 3L	7,473903E+09	1	7,473903E+09	2,73626	0,105731
Chyba	1,119887E+11	41	2,731431E+09		
Celk. SS	3,123237E+11	50			

ANOVA; Prom:počet piků; R-kv.=,67755; Upr.:60677 (Tabulka1) 3 fakt. , 1 bloky , 51 poku; MS reziduí =21,47064 ZP: počet piků					
Faktor	SS	df	MS	F	p
(1)tlak (MPa)(L)	629,478	1	629,4776	29,31806	0,000003
tlak (MPa)(K)	503,050	1	503,0503	23,42968	0,000019
(2)teplota (°C)(L)	62,089	1	62,0887	2,89180	0,096606
teplota (°C)(K)	4,071	1	4,0711	0,18961	0,665524
(3)objem (ml)(L)	59,358	1	59,3584	2,76463	0,103996
objem (ml)(K)	57,087	1	57,0867	2,65883	0,110636
1L * 2L	54,000	1	54,0000	2,51506	0,120447
1L * 3L	204,167	1	204,1667	9,50911	0,003650
2L * 3L	88,167	1	88,1667	4,10638	0,049260
Chyba	880,296	41	21,4706		
Celk. SS	2730,039	50			

ANOVA; Prom:výška; R-kv.=,60055; Upr.:51286 (Tabulka1) 3 fakt. , 1 bloky , 51 poku; MS reziduí =679366E3 ZP: celková výška piků					
Faktor	SS	df	MS	F	p
(1)tlak (MPa)(L)	9,452281E+08	1	9,452281E+08	1,39134	0,244978
tlak (MPa)(K)	1,056741E+10	1	1,056741E+10	15,55481	0,000306
(2)teplota (°C)(L)	4,921570E+08	1	4,921570E+08	0,72444	0,399637
teplota (°C)(K)	2,891293E+07	1	2,891293E+07	0,04256	0,837579
(3)objem (ml)(L)	1,505528E+10	1	1,505528E+10	22,16079	0,000029
objem (ml)(K)	4,445818E+08	1	4,445818E+08	0,65441	0,423211
1L * 2L	6,388944E+09	1	6,388944E+09	9,40428	0,003823
1L * 3L	3,982792E+09	1	3,982792E+09	5,86252	0,019978
2L * 3L	1,000617E+09	1	1,000617E+09	1,47287	0,231839
Chyba	2,785400E+10	41	6,793658E+08		
Celk. SS	6,973049E+10	50			

Příloha C – grafy pozorovaných vs. Předpovědi pro celkovou plochu, počet piků a výšku piků

