UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017 Klára Krejčíková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Extrakce a analýza esenciálních olejů

Klára Krejčíková

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2016/2017**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Klára Krejčíková**
Osobní číslo:	**C13025**
Studijní program:	**B2802 Chemie a technická chemie**
Studijní obor:	**Chemie a technická chemie**
Název tématu:	**Extrakce a analýza esenciálních olejů**
Zadávající katedra:	**Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na esenciální oleje, jejich chemické složení, vlastnosti a využití. Dále se věnujte možnostem extrakce esenciálních olejů z rostlinného materiálu. Následně se zaměřte na kvalitativní a kvantitativní analýzu jednotlivých složek.

2. V experimentální části proveďte hydrodestilaci a destilaci vodní parou tymiánu, extrakty analyzujte na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí, vyhodnoťte a porovnejte složení získaných esenciálních olejů.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

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

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. února 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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 20. 2. 2017

Klára Krejčíková

Poděkování:

Děkuji vedoucí této bakalářské práce doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za trpělivost, ochotu, a odborné vedení. Také děkuji Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D. za laskavost, cenné rady a připomínky v průběhu celé práce, které mi usnadnily její vypracování.

ANOTACE

Předmětem této bakalářské práce je studium esenciálních olejů, z hlediska jejich chemického složení, vlastností a využití. Dále se práce v teoretické části zaměřuje na metody izolace z rostlinných materiálů a způsoby analýzy esenciálních olejů. Experimentální část je věnována hydrodestilaci a destilaci vodní parou tymiánu, následné analýze tymiánového oleje pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Esenciální oleje, hydrodestilace, destilace vodní parou, tymián, plynová chromatografie s hmotnostní detekcí.

TITLE

Extraction and analysis of essential oils

ANNOTATION

The aim of this bachelor thesis is study of essential oils, in terms of their chemical composition, properties, use and application. Furthermore, the theoretical part is focused on isolation methods out of plants and analysis of essential oils. The experimental part is concerned with hydrodistillation and steam distillation of thyme. Finally, thyme oil is analysed using gas chromatography with mass spectrometry detection.

KEYWORDS

Essential oils, hydrodistillation, steam distillation, thyme, gas chromatography-mass spectrometry.

OBSAH

0 ÚVOD 13

1 TEORETICKÁ ČÁST 14

1.1 Historie použití esenciálních olejů 14

1.2 Výskyt esenciálních olejů 15

1.3 Využití esenciálních olejů 15

1.4 Složení esenciálních olejů 16

1.4.1 Uhlovodíky – terpeny 17

1.4.2 Alkoholy 18

1.4.3 Fenoly 18

1.4.4 Fenolické ethery 18

1.4.5 Aldehydy 19

1.4.6 Ketony 19

1.5 Účinné látky silic a jejich přírodní zdroje 19

1.5.1 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia* L.) 20

1.5.2 Růže šípková (*Rosa canina* L.) 20

1.5.3 Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis* L.) 21

1.5.4 Tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.) 22

1.5.5 Máta peprná (*Mentha piperita* L.) 23

1.5.6 Dobromysl obecná (*Origanum vulgare L.*) 23

1.6 Izolace esenciálních olejů 24

1.6.1 Destilace vodní parou 25

1.6.2 Hydrodestilace 26

1.6.3 Loužení za studena – macerace 27

1.6.4 Lisování za studena 28

1.6.5 Extrakce nadkritickou tekutinou 28

1.7 Analýza esenciálních olejů 29

1.7.1 Headspace analýza – extrakce plynnou fází 29
1.7.2 Mikroextrakce tuhou fází 30
1.7.3 Plynová chromatografie 31
1.7.4 Hmotnostní spektrometrie 31
1.7.4.1 Instrumentace 31
1.7.4.2 Způsoby ionizace vzorku 32
1.7.5 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie 32
1.7.5.1 Identifikace složek na chromatogramu 32
1.7.5.2 Knihovny hmotnostních spekter 33
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 34
2.1 Vzorky a chemikálie 34
2.1.1 Příprava vzorků 34
2.1.2 Chemikálie 34
2.2 Použité přístroje a metody 34
2.2.1 Podmínky a použití hydrodestilace 34
2.2.2 Podmínky a použití destilace vodní parou 34
2.2.3 Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem 34
2.2.3.1 Podmínky plynového chromatografu 35
2.2.3.2 Podmínky hmotnostního detektoru 35
2.3 Vyhodnocení měření 35
2.3.1 Identifikace látek 35
3 VÝSLEDKY A DISKUSE 37
3.1 Srovnání způsobů izolace esenciálního oleje 37
3.2 Diskuse a porovnání destilačních metod z hlediska složení 46
3.2.1 Hydrodestilace 46
3.2.2 Destilace vodní parou 46
3.2.3 Porovnání všech analýz 46

3.2.4 Porovnání analýzy tymiánového oleje s literaturou 47

3.3 Porovnání metod z hlediska výtěžků oleje 49

4 ZÁVĚR 50

5 POUŽITÁ LITERATURA 52

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Struktura isoprenu, neboli 2-metyl-buta-1,3-dienu. 17
Obrázek 2: Struktury monocyklických monoterpenů, zleva: limonen, α-terpinen, α-felandren. 17
Obrázek 3: Struktury bicyklických a acyklických monoterpenů, zleva: pinen, ocimen, myrcen. 17
Obrázek 4: Struktury alkoholů, zleva: geraniol, linalool, menthol. 18
Obrázek 5: Struktury fenolů, zleva: karvakrol, tymol. 18
Obrázek 6: Struktury fenolických etherů, zleva: anethol, safrol, myristicin. 19
Obrázek 7: Struktury ketonů, zleva: menthon, karvon, piperiton, diosfenol, thujon, kafr. 19
Obrázek 8: Schéma aparatury pro destilaci vodní parou (převzato z [23]). 25
Obrázek 9: Schéma aparatury pro hydrodestilaci (převzato z [23]). 27
Obrázek 10: Chromatogram EO z destilace vodní parou - experiment 2. 42
Obrázek 11: Chromatogram EO z hydrodestilace - experiment 2. 43
Obrázek 12: Porovnání efektivity destilačních metod. 44
Obrázek 13: Porovnání složení extraktů získaných rozdílnými destilačními metodami. 45

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Retenční časy a indexy *n*-alkanů pro výpočet retenčních indexů separovaných látek. 36
Tabulka 2: Souhrnná tabulka těkavých složek tymiánového oleje a jejich procentuálního zastoupení. 38
Tabulka 3: Celkové zastoupení a počet látek v extraktech. 47
Tabulka 4: Dominantní látky tymiánové silice a porovnání jejich obsahu. 47

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

EO	esenciální oleje
MEP	methyl-D-erytritol-4-fosfát
SD	destilace vodní parou
HD	hydrodestilace
MAHD	hydrodestilace s mikrovlnným ohřevem
SFE	superkritická fluidní extrakce
HS	headspace analýza
SPME	mikroextrakce tuhou fází
PDMS	polydimethylsiloxan
GC	plynová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	efektivní hmotnost ionizované částice; poměr hmotnosti a náboje
MS	hmotnostní spektrometrie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
EI	elektronová ionizace
CI	chemická ionizace
RI	retenční index
CAS	Chemical Abstracts Service, identifikační číslo látky
TIC	celkový iontový proud

0 ÚVOD

Léčebné účinky rostlin byly známy už od pradávna. Jejich listy, květy nebo plody se používaly k různým účelům, kvůli svému specifickému aroma a chuti. Ve 13. století se esenciální oleje, díky terapeutickým vlastnostem, začaly využívat ve farmaceutickém průmyslu. Rostlinné silice se dodnes využívají k farmakologickým účelům nebo jako vonné látky navozující klid a dobrou náladu. Nyní se diskutuje jejich multifunkční použití v různých odvětvích jako např. v kosmetickém a potravinářském průmyslu. Snahou je také nahradit jimi některé syntetické přísady v potravinách nebo vyrábět pesticidní přípravky s obsahem esenciálních olejů (EO), které by byly šetrnější k životnímu prostředí.

Esenciální oleje jsou složité směsi látek. Jejich složení závisí jak na druhu rostliny, tak i na její části používané k izolaci. Je dokázáno, že EO stejné rostliny získaný z květů a kořenů má různé složení. Na složení může mít vliv způsob a místo pěstování, čas sběru, ale i následné zpracování rostlinného materiálu (sušení za světla, tmy, teplota, aj.).

Izolace, identifikace a zároveň stanovení látek v esenciálním oleji je náročný proces. Nejznámějšími a nejhojněji využívanými metodami pro získání silic z rostlinného materiálu jsou hydrodestilace a destilace vodní parou. Oba typy destilace jsou jak časově, tak i energeticky velmi náročné. Dnes se při izolaci EO klade důraz na snižování energetické náročnosti a omezování použití organických rozpouštědel tak, aby jejich výroba byla šetrnější k životnímu prostředí.

Cílem této práce bylo porovnat dvě metody izolace esenciálních olejů s následným vyhodnocením pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Vlastní experiment se zaměřuje na analýzu tymiánového oleje získaného metodou parní destilace a hydrodestilace. U získaných extraktů jsou porovnávány kvalitativní resp. kvantitativní parametry.

1 TEORETICKÁ ČÁST

Esenciální oleje (EO) neboli silice jsou aromatické těkavé kapaliny olejovitého charakteru získané z rostlinného materiálu (stonky, květy, semena, dřevo, plody nebo kořeny) [1]. Obecně jsou špatně rozpustné ve vodě, mají příjemnou vůni a mnohdy i výraznou chuť [2].

Esenciální oleje jsou důležitou třídou sekundárních metabolitů aromatických rostlin, získávány jsou většinou metodou parní destilace. Tyto metabolity se skládají z mnoha chemických sloučenin, zahrnující některé terpeny, fenoly a alkoholy. V poslední době EO přitahovaly pozornost, díky jejich odlišné biologické a antimikrobiální aktivitě, jako insekticidy, repelenty a antifeedanty[1]. Většina z nich jsou těkavé, na světle nestálé, tepelně nestabilní a snadno rozložitelné látky [3].

1.1 Historie použití esenciálních olejů

Již ve starověku se většina druhů EO používala zejména kvůli své specifické chuti, kořeněnému nádechu a konzervačním vlastnostem. Podle řeckých a římských historiků byl jako první zmíněn terpentýnový olej. Před více než 2000 lety na dálném východě (Egypt, Persie a Indie) byla poprvé použita destilace, jako metoda pro výrobu EO. Ke zdokonalení metod jejich získání přispěli Arabové v 9. století. První autentický záznam o destilaci silic je připisován španělskému katalánskému lékaři, Arnaldu de Villanova (1235–1311). Od 13. století začaly lékárny a farmaceutický průmysl vyrábět EO a objasňovat jejich farmaceutický účinek v lékopisech. I přesto se jejich používání nerozšířilo do celé Evropy. Dva Štrasburští lékaři, Brunschwig a Reiff, publikovali o destilaci a použití EO, ve svých spisech zmínili terpentýnový olej a dále oleje z jalovcového dřeva, růže, rozmarýnu, levandule, hřebíčku, muškátového květu a oříšku, anýzu a skořice. Podle francouzského lékaře Josepha du Chesne (1544–1609) byla v 17. století příprava olejů velmi známá a lékárny byly standardně zásobeny 15–20 různými olejovými preparáty. Použití tea tree oleje pro medicinální účely bylo dokumentováno od kolonizace Austrálie koncem 18. století, i když je pravděpodobné, že byl použit již před tím, domorodými Australany. Roku 1881 De la Croix poprvé experimentálně dokázal stanovit a popsat baktericidní vlastnosti par esenciálních olejů. V průběhu 19. a 20. století zaznamenala problematika použití EO v medicíně vzestup, a jejich využití pouze pro chuť a aroma se stalo druhořadým [1].

[1] Antifeedanty jsou různé sloučeniny produkované rostlinami, sloužící k ochraně rostliny před napadením škůdci [3].

1.2 Výskyt esenciálních olejů

Esenciální oleje jsou produkovány více než 17 500 rostlinnými druhy. Z typických čeledí rostlin obsahující silice můžeme jmenovat například hluchavkovité (*Lamiaceae*), routovité (*Rutaceae*), myrtovité (*Myrtaceae*) nebo zázvorovníkovité (*Zingiberaceae*). Silice jsou tvořeny v protoplazmě, rozkladem buněčných blan nebo hydrolýzou určitých glykosidů. Mohou prostupovat všemi pletivy nebo jsou koncentrovány v určitých orgánech, například v žlaznatých trichomech[2] máty, v oplodí a květech citroníku apod. V přírodě EO zastupují mnoho různých funkcí – chrání rostliny před nadměrným teplem i chladem, získávají opylovače a užitečný hmyz, či brání před nebezpečnými mikroorganismy a škůdci. Obsah silic v rostlině kolísá, nejen během jejího vývinu, ale i během 24 hodin, což dokazuje jejich aktivní zapojení do látkové výměny [4, 5].

1.3 Využití esenciálních olejů

Použití esenciálních olejů má dlouhou historii, lidé jej používali v běžném životě, ať už z rituálního či praktického důvodu. Rostlinné produkty byly hlavním zdrojem farmaceuticky účinných látek, používaných v tradiční medicíně. Některé léčivé rostliny jsou bohaté na látky s antimikrobiálním účinkem, jiné mají insekticidní, antimykotické, protizánětlivé, či antioxidační účinky [6]. Díky těmto účinkům nachází široké uplatnění v medicíně a farmaceutickém průmyslu, kde se využívají kromě olejů i jejich jednotlivé izolované složky. Příkladem může být menthol z máty peprné [7].

Díky své specifické chuti a vůni nachází EO využití v oblasti drogerie, kosmetiky, ať už jako parfémy, přípravky do koupele, o tělo pečující séra, nebo masážní oleje. Nezaostávají ani v potravinářském průmyslu, kde jsou funkčními látkami pro dochucování nápojů a potravin, nebo slouží jako konzervační látky [4, 6, 8, 9].

V medicíně existuje mnoho využití drog obsahující silice, při léčbě zažívacích potíží, nevolnosti, bronchitidy, onemocnění jater [7]. Některé další silice prokazují též hypoglykemické, protizánětlivé, dokonce i antitrombotické účinky, vedoucí ke snížení srážlivosti krve [10].

Bylo prokázáno, že mnoho vonných látek má vliv na náladu lidí, navozují u nich příjemné pocity, generují šťastné vzpomínky a vyvolávají pozitivní pocit klidu. U některých jedinců můžou esenciální oleje působit i na snížení vysokého krevního tlaku (muškátový oříšek),

[2] Trichomy neboli chlupy jsou pokožkové výrůstky, které vytvářejí nesmáčitelný povrch rostliny [4].

nebo při zevní aplikaci k redukci akné (Tea tree). Tohoto využívá terapeutická technika zvaná aromaterapie [11].

Ve skutečnosti však esenciální oleje a jejich komponenty získávají daleko větší pozornosti ze strany spotřebitelů, a to z důvodu zvyšujícího se zájmu o nahrazení potenciálně škodlivých syntetických přísad ve výrobcích. Mnozí autoři informují o jejich relativní bezpečnosti a multifunkčním účelném využití [4, 8].

Dnešní vědecká komunita se snaží nasměrovat pozornost i k rozvoji pesticidů s obsahem EO, které jsou šetrnější k životnímu prostředí [4].

1.4 Složení esenciálních olejů

Esenciální oleje jsou velmi složité směsi přírodních látek o různých koncentracích, nejčastěji v rozmezí 20−60 %. Vždy je charakterizují dvě až tři hlavní komponenty v poměrně vysokých koncentracích (20−70 %), které jsou typické pro danou rostlinu. V porovnání s nimi, jsou ostatní složky přítomny mnohdy ve stopovém množství. Právě tyto majoritní složky vykazují biologické a farmaceutické účinky [4].

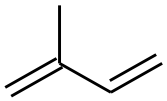
Složení získaného oleje závisí na tom, z jaké části rostliny zkoumaný materiál pochází: květy, zelené části (listy, stonky), kůra, dřevo, celé ovoce, oplodí, nebo kořeny. Kuropka, Neugebauer a Glombitza (1991) prokázali, že obsah monoterpenů nalezených v kořenu a zelených částech řebříčku bertrámu (*Achillea ptarmica* L.) byl velmi malý, zatímco květ obsahoval vysoký obsah monoterpenů. Také deficit vody při pěstování rostliny může vést ke změnám složení [2].

Hlavní skupinou komponent zastoupených v silicích jsou terpeny a terpenoidy [4, 12]. Terpenoidy představují oxidované uhlovodíkové deriváty původních terpenů. Mohou vycházet jak z monoterpenů, tak i seskviterpenů [13]. Do druhé skupiny se řadí ostatní aromatické a alifatické sloučeniny, z nichž můžeme jmenovat alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny, estery, ethery a další. Všechny tyto látky jsou charakterizovány nízkou molekulovou hmotností. EO jsou syntetizovány v cytoplazmě a plastidech rostlinných buněk pomocí kyseliny malonové[3], kyseliny mevalonové[4] a methyl-D-erytritol-4-fosfátu (MEP) [4, 12].

[3] Kyselina malonová systematicky kyselina propandiová [12].
[4] Kyselina mevalonová systematicky 3,5-dihydroxy-3-methylpentanová kyselina [12].

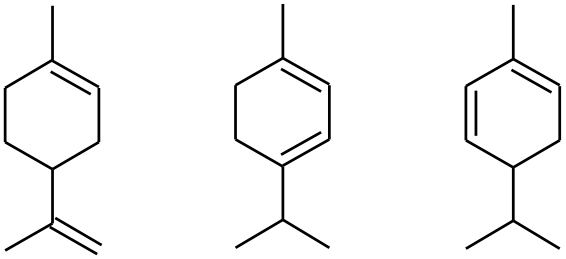
1.4.1 Uhlovodíky – terpeny

Terpeny jsou uhlovodíky, skládající se z několika isoprenových jednotek, jež jsou zastoupeny ve všech silicích. **Monoterpeny** se skládají ze dvou isoprenových jednotek (C10). Tato jednotka je zobrazena na obrázku 1. Monoterpeny mají největší zastoupení ve složení EO, představují asi 90 % z celkového množství. Existuje mnoho strukturních variant – acyklické (s otevřeným řetězcem), monocyklické a bicyklické [4].



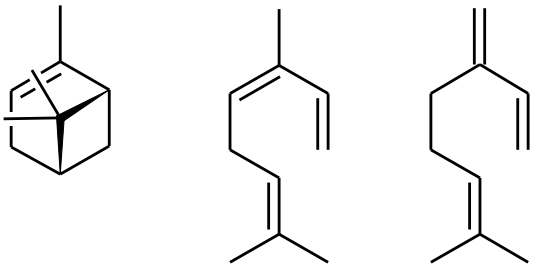
Obrázek 1: Struktura isoprenu, neboli 2-metyl-buta-1,3-dienu.

Do monocyklických monoterpenů patří *limonen*, vyskytující se v citrusových silicích; *α-terpinen* obsažený v koriandru; nebo *α-felandren* přítomný v eukalyptu nebo fenyklu. Struktury těchto látek jsou zobrazeny na obrázku 2 [12].



Obrázek 2: Struktury monocyklických monoterpenů, zleva: limonen, α-terpinen, α-felandren.

Do bicyklických monoterpenů řadíme *pinen*, obsažený v silicích jehličnatých rostlin. Acyklické monoterpeny se vyskytují vzácně. Příkladem může být *ocimen* nebo *myrcen*. Jejich strukturní vzorce jsou zobrazeny na obrázku 3 [12].



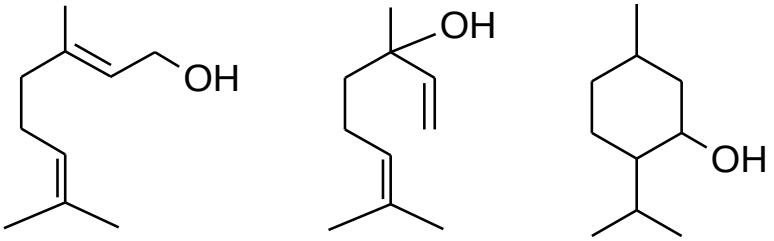
Obrázek 3: Struktury bicyklických a acyklických monoterpenů, zleva: pinen, ocimen, myrcen.

Některé terpeny se používají jako účinné léky proti rakovině, malárii a onemocnění srdce. Dále vykazují i insekticidní vlastnosti [13].

Seskviterpeny jsou tvořeny třemi isoprenovými jednotkami (C15). Prodloužením řetězce se zvyšuje počet cyklizací, což vede k různým strukturám. Mezi hlavní rostlinné zdroje těchto sloučenin patří celer, máta, pomeranč, rozmarýn nebo šalvěj [4].

1.4.2 Alkoholy

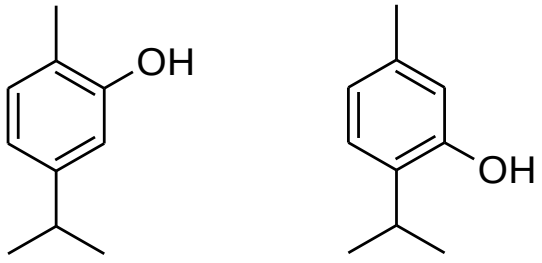
Vyskytují se jako oxidované monoterpeny a seskviterpeny. K acyklickým alkoholům patří *geraniol, linalool*; k monocyklickým *menthol* z mátové silice; mezi bicyklické alkoholy řadíme *borneol*. Zázvorová silice pak obsahuje seskviterpenický *gingerol*. Strukturní vzorce některých alkoholů jsou zobrazeny na obrázku 4. Přítomny jsou i alifatické alkoholy, které díky své rozpustnosti ve vodě přecházejí při destilaci do vodné fáze [12].



Obrázek 4: Struktury alkoholů, zleva: geraniol, linalool, menthol.

1.4.3 Fenoly

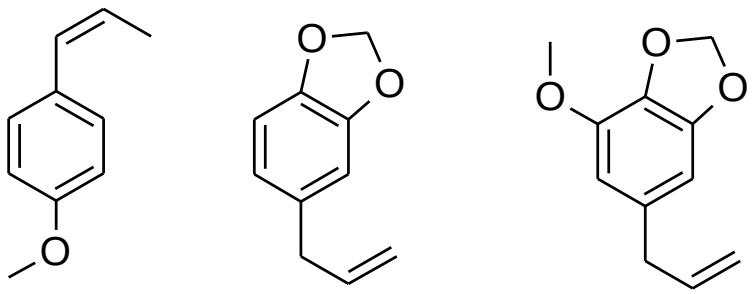
Výskyt fenolů v silicích je buď přirozený, nebo se tvoří destruktivní destilací. K nejdůležitějším přírodním fenolům patří *eugenol*, *tymol*, *karvakrol* , jejichž struktury jsou zobrazeny na obrázku 5 [12].



Obrázek 5: Struktury fenolů, zleva: karvakrol, tymol.

1.4.4 Fenolické ethery

Mezi fenolické ethery patří *anethol* (anýz, fenykl), *safrol* (japonský hvězdicový anýz) a jeho deriváty, jako je například *myristicin* (=methoxysafrol). Obrázek 6 zobrazuje jejich komplikované struktury [12].



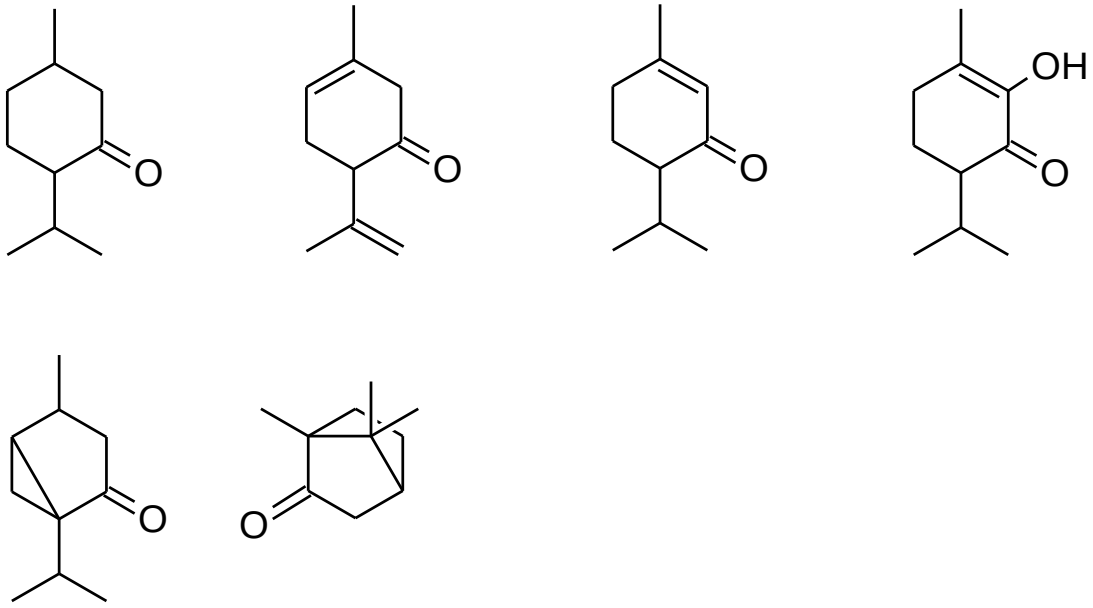
Obrázek 6: Struktury fenolických etherů, zleva: anethol, safrol, myristicin.

1.4.5 Aldehydy

Mezi acyklické aldehydy patří monoterpen *citral*, někdy nazývaný *geranial*, který strukturně odpovídá alkoholu *geraniolu*. Do aromatických cyklických aldehydů pak můžeme zařadit *benzaldehyd, skořicový aldehyd* nebo *vanilín* [12].

1.4.6 Ketony

Ketony tvoří zejména monocyklické monoterpeny – *menthon* (máta peprná), *karvon* (kmín), *piperiton* (eukalyptus); nebo bicyklické – *kafr, thujon*. Strukturní vzorce ketonů jsou uvedeny na obrázku 7 [12].



Obrázek 7: Struktury ketonů, zleva: menthon, karvon, piperiton, diosfenol, thujon, kafr.

1.5 Účinné látky silic a jejich přírodní zdroje

Léčivé rostliny, respektive jejich sbírané a usušené části neboli drogy jsou surovinou pro průmyslovou izolaci účinných, chemicky čistých látek nebo jejich směsí. Dále se z drog

mohou připravovat různé extrakty (dle extrahovadla vodné, lihové, etherové) nebo tinktury. Z čerstvých rostlin se pak lisováním a následným zahuštěním připravují šťávy [14].

1.5.1 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia* L.)

Levandule pochází původně ze západního Středomoří. Dnes se pěstuje v různých zemích (Indie, Maroko, Bulharsko a Francie), rovněž i u nás, kde místy zplaňuje [15, 16, 17].

Droga[5] má silně kořenitou, nasládlou, bylinnou vůni a chutná hořce [15, 17].

Levandule lékařská je asi 60 cm vysoký polokeř nebo keř s kůlovým kořenem. Listy přisedlé, čárkovité až úzce kopinaté, dolní běloplstnaté, horní šedozelené. Koruna je fialová [16]. Plody jsou čtyři drobné tvrdky. Sbírá se květ a nať, ještě před úplným rozvitím [17].

Dnes je pěstována pro silici (1–3%), ukládající se ve žlaznatých chlupech kalichu, jež obsahuje estery linaloolu (až 60 %), především linalylacetát a dále terpineol, borneol, cineol, geraniol a další složky [14, 16, 17]. V droze byly zjištěny také glykosidické sloučeniny, jako kumarin a umbeliferon [14]. Kromě silice obsahují květy ještě 12 % třísloviny[6] [17].

Zevně se užívá olej na podporu regenerace a prokrvení buněk, hojení ran a jizev. Hydrolát[7] je používán jako pleťová voda, i jako obklad pro začervenalé oči. Jako vůně mírní svalové napětí a revmatické potíže. Uklidňuje příliš namáhanou mysl, bušení srdce, konejší negativní emoce, pomáhá při migrénách a nespavosti. Nálevy se používají při žaludečních potížích, průjmech a jako mírná diuretika[8] [15, 17].

1.5.2 Růže šípková (*Rosa canina* L.)

Je rozšířená po celé Evropě, u nás roste na stráních, mezích, křovinách od nížin do podhůří a jen ojediněle v horách [17]. Méně hojně roste v západní Asii, izolovaně v severozápadní Africe [14].

Vůně je vzdušná, příjemná, teplá. Chuť je nakyslá a mírně svíravá [14, 15].

Roste na slunných až polostinných polohách s hlubokou půdou, ve venkovských zahradách a na okrajích cest a lesů. Výška keře dosahuje 3 m. Od druhého roku má převislé větve a ostře zubaté listy ve střídavém postavení, trny jsou srpkovitého tvaru. Je charakteristická bílými

[5] Droga je sušená rostlinná surovina, např. listy, stonky, květy apod. [17].
[6] Třísloviny představují přírodní bezdusíkaté látky se schopností tvořit s bílkovinami obsaženými v kůži nerozpustné sloučeniny [14].
[7] Hydrolát někdy nazývaný jako květová voda, představuje aromatickou vodu, která vzniká při destilaci siličnatých rostlin [18].
[8] Diuretikum je prostředek podporující vylučování moči [17].

až narůžovělými květy a tvorbou červeného dužnatého šípku vejčitého tvaru. Sbírají se květy a semena šípků. Doba sběru květů je od června do září a semen v šípcích od září do listopadu [15].

Šípek obsahuje hlavně vitamín C, za čerstva asi 0,5–0,7 %, kdežto suché asi 10–20 %. Dále je zdrojem vitamínu B_1 a B_2, provitamínu A a karotenoidů (lykopin, karoten, rubixantin, zeaxantin, xantofyl a taraxantin). Doprovodnými účinnými látkami jsou třísloviny, kyselina citronová, jablečná a nikotinová, cukry (30 %) a slizové látky [14, 17]. Nažky obsahují olej a vitamín E [16].

Reguluje a vyživuje přirozenou funkci kůže, používá se vnitřně jako čajový extrakt, zevně jako základový olej[9] nebo jako hydrolát. Jako olejová lázeň uklidňuje, hydratuje a pečuje o pokožku. Hydroláty se používají v ústních vodách, díky protizánětlivým účinkům. Dále zklidňuje a ošetřuje problematickou pleť, působí proti akné, neurodermatitidě nebo kuperóze [15]. Dále se používá jako roborans[10], posilující lék, který zároveň zvyšuje srážlivost krve. Je též účinný při zánětlivých onemocněních horních a dolních cest močových a jako diuretikum [17].

1.5.3 Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis* L.)

Divoce roste ve Středomoří, u nás se často pěstuje v zahradách i v květináčích [17].

Droga má kafrovitě kořeněný, trpký pach a hořce aromatickou chuť [15, 17].

Roste na teplých, slunných, humózních a písčitých půdách. Je to vytrvalý, stálezelený keř dosahující výšky až 50 cm. Jeho sytě zelené listy jsou úzké, srolované dolů, rozložené ve vstřícném postavení. Pyskaté květy najdeme na horních koncích větviček, vyznačují se modrými až bílými vyčnívajícími tyčinkami. Kvete od března do května, zřídka ještě podruhé na podzim. Koncentrace olejů závisí na stanovišti – čím slunnější stanoviště, tím větší je koncentrace olejů. Sbírají se listy, a to těsně před kvetením [15].

Aktivními složkami listů jsou flavonoidy, diterpeny, hydroxytriterpeny, rozmaricin, a tanin [18]. Silice obsahují pinen, cineol, kamfen, borneol a jeho ester. Významný je také obsah kyseliny rozmarýnové, představující ester kyseliny kávové a kyseliny hydroxydihydrokávové, která je významným antioxidačním činidlem [15]. Jakost silice závisí

[9] Základový olej je nosný rostlinný olej, který se používá k výrobě macerátu, tedy pro extrakci čerstvé rostliny do oleje. Nejčastěji se používá rakytníkový, slunečnicový, olivový nebo jojobový [15].
[10] Roborans je termín používaný pro posilující lék [17].

na ročním období a složení kolísá podle původu a sběru. Jarní silice ukazují proti podzimním opačnou optickou otáčivost [17].

Jeho účinků, podporujících prokrvení a mírnících bolesti, využívají lidé už po tisíciletí. V oleji, krému nebo mýdle působí protizánětlivě. Podporuje prokrvení pokožky hlavy a v šamponu pomáhá proti lupům. Rozdrcený s moučkou z řas se používá jako tělový zábal a pomáhá proti celulitidě [15]. Vnitřně se užívá jako spasmolytikum[11] a choleretikum[12]. Častěji než droga se užívá silice hlavně proti revmatismu [17].

1.5.4 Tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.)

Je původem ze Středozemí. Dnes se pěstuje v různých zemích Evropy i Asie. Je rozšířenou rostlinou na neobdělaných suchých půdách. U nás se pěstuje v zahradách a polních kulturách. Ojediněle zplaňuje [17].

Siličná droga má kořenitou vůni a příjemnou aromatickou chuť [17].

Silně aromatické nízké keříky tymiánu jsou pěstovány buď jako jednoleté, nebo i vytrvalé byliny. Drobné listy jsou řapíkaté nebo přisedlé, čárkovité až okrouhle vejčité, s přisedlými žlázkami. Narůžovělé květy jsou oboupohlavní a narůstají do vidlanovitých svazků. Nať se sbírá před květem v květnu a v červnu za suchého počasí [15, 17].

Nať obsahuje silici (1,7–2,6 %) s hlavními obsahovými složkami karvakrolem, geraniolem, cymolem a nejpodstatnějším tymolem. Dalšími složkami, jež obsahují esenciální oleje, jsou tymol methylether, cymen, α-pinen, borneol a jeho ester [19]. Kromě toho tymián obsahuje asi 10 % třísloviny, flavonů a hydroxyterpenových kyselin [17]. Z drogy jsou izolovány také aromatické a triterpenické kyseliny, jako například kyselina kávová, chlorogenová, ursolová nebo oleanolová [14]. Obsah aromatických sloučenin je nejvyšší, když se bylina suší při teplotě 60 °C [19].

Vnitřně se používá jako sekretolytikum[13] a spasmolytikum při chronickém zánětu průdušek, bronchiálním astmatu, chronických žaludečních křečích a poruchách trávení. Zevně se tymián používá do kloktadel k dezinfekci dutiny ústní a hrtanu, rovněž do koupelí a obkladů při léčbě hnisavých ran [17].

[11] Spasmolytikum je prostředek uvolňující křečovité stažení hladkého svalstva [17].
[12] Choleretikum je látka zvyšující tvorbu a vylučování žluče [17].
[13] Sekretolytikum je prostředek, který zřeďuje a zkapalňuje hustý hlen nahromaděný v dýchacích cestách [17].

1.5.5 Máta peprná (*Mentha piperita* L.)

Máta pochází z Asie, především z Číny a Severní Ameriky [15]. Je to druh pěstovaný v různých zemích v četných odrůdách. U nás se pěstuje také a je šlechtěná [17].

Droga má slabý charakteristický pach a palčivě kořenitou chuť s příjemně chladivou pachutí [17]. Vůně je svěží až mentholová [15].

Roste na vlhkých, slunných a polostinných stanovištích s vlhkou humózní půdou. Dosahuje výšky 50 cm. Tato sytě zelená rostlina s hranatým stonkem má oválné, vstřícné, řapíkaté listy a světle fialové květy pyskatého tvaru. Květy jsou uskupeny v nepravých trsech. Kvete od července do září. Sběr listů probíhá na začátku květu a znovu vždy po obražení. Teplota sušení sbíraných listů nesmí překročit 35 °C [14, 15, 17].

Listy obsahují silici (1–2,5 %) s hlavními složkami mentholem (50–60 %), menthonem a menthofuranem. Silice se v rostlině tvoří jen přes den. Obsah tříslovin kolísá mezi 5–6 % [17]. Dalšími složkami je menthon, cineol, limonen, pulegon, viridiflorol a karvon [14].

Máta peprná se používá jako cholagogum[14], karminativum[15] a spasmolytikum, vnitřně v nálevu při bolestivých křečích trávicího traktu a nadýmání, při nemocech žaludku nervového původu, kolikách, při nedostatečném vylučování žluče a povzbuzení chuti k jídlu. Příznivě působí také inhalace při rýmě, zánětu hrtanu a průdušek. Zevně, jako anestetikum se může máta užít v koupelích při revmatismu a kožních vyrážkách [17]. Podle druhu použití a dávkování může působit umrtvujícím způsobem na nervová zakončení a mírnit bolest. Díky mentholu má silně chladivý, projasňující a čistící účinek, čehož se využívá v zubních pastách a ústních vodách. Jako masážní olej chladí a uvolňuje bolesti hlavy, krku a bolesti z napětí. Dokáže také mírnit revmatické obtíže [15].

1.5.6 Dobromysl obecná (*Origanum vulgare L.*)

Dobromysl, známá jako oregáno je rozšířená v Evropě a Asii. U nás se často vyskytuje na slunných stráních, pasekách, ve světlých lesích a v křovinách [17].

Droga má příjemnou aromatickou vůni s poněkud nahořklou kořeněnou chutí [17].

[14] Cholagogum je prostředek podporující tvorbu žluče a její vylučování ze žlučníku přes žlučovod do dvanáctníku [17].
[15] Karminativum jsou prostředky proti nadýmání [17].

Vytrvalá bylina je příbuzná majoránu. Bývá 60 cm vysoká, má načervenalou chlupatou lodyhu a dřevnatý výběžkatý oddenek. Kvítky vyrůstají v paždích oválných, na špičce fialových listenů. Kalich je trubkovitě zvonkovitý. Plody jsou tvrdky. Kvete v červenci a srpnu. Sbírá se nať [17].

Nať obsahuje až 0,4 % silice, jejíž hlavní složkou je tymol (skoro 50 %), dále asi 8 % třísloviny a hořčin [17]. Významné jsou látky fenolické povahy, především tymol a karvakrol, jejichž množství se v silici mění podle původu drogy. Kromě toho je v silici směs mono- a sekviterpenických uhlovodíků a kyslíkatých látek. Dále silice obsahuje karyofylen, α-bisabolen, dipenten, *p*-cymol, linalool, terpineol a terpinyl- nebo bornylacetát a ještě další terpenické látky [14].

Vnitřně se používá jako stomachikum[16], spasmolytikum a choleretikum při úporném a černém kašli a při onemocněních dýchacího ústrojí. Je regulátorem stolice, zvlášť při průjmech. Zevně se upotřebuje k přípravě koupelí, kloktadel užívaných při onemocnění dýchacích cest a k přípravě obkladů při zánětlivém zduření žláz. Při kašli a rýmě příznivě působí inhalované páry [17].

1.6 Izolace esenciálních olejů

I když se esenciální oleje izolují různými speciálními metodami, jako je extrakce rozpouštědlem nebo extrakce nadkritickou tekutinou, většina z nich se stále získává destilací vodní parou [20]. Asi 93 % esenciálních olejů se izoluje destilací vodní parou, zbývajících 7 % ostatními metodami [21].

Destilát obsahuje oddělenou olejovou a vodní fázi. V případě destilace citrusových plodů je esenciální olej nahoře a pod ním je takzvaný hydrolát. Například při destilaci levandule, skořice nebo máty je to ale opačně, protože je takovýto olej těžší jak voda, zůstává dole [18]. V obou fázích je obsaženo mnoho aktivních účinných rostlinných látek, které lze velmi dobře použít pro přípravu léčivé kosmetiky. Hydrolát, někdy nazývaný jako květová voda, je zdrojem bioaktivních, ve vodě rozpustných látek. Hydroláty se v léčivé kosmetice používají jako kvalitní vodní báze pro krémy a mléka, a kromě toho samy o sobě jako pleťové vody a vody po holení. S oblibou se využívají také v kuchyni nebo v lékařství [15].

Esenciální oleje mohou být získávány z rostlinného materiálu také extrakčními metodami. Extrakce, jako termín používaný ve farmacii, zahrnuje separace léčivých částí rostlin

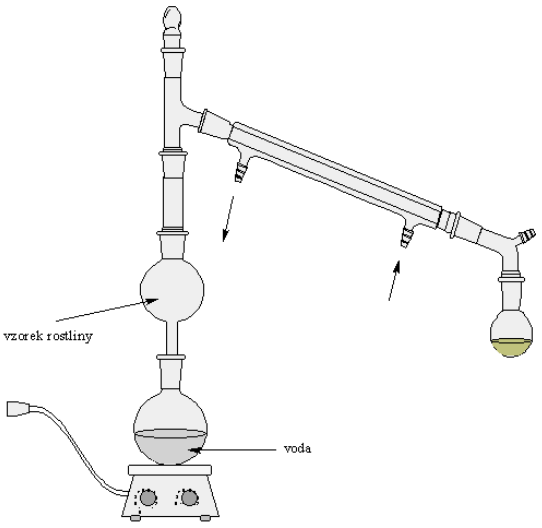
[16] Stomachikum jsou léky upravující činnost žaludku a podporující trávení [17].

z inaktivních nebo inertních komponent s použitím selektivního rozpouštědla. Produkty získané takovouto separací z rostlin jsou relativně nečisté kapaliny nebo tuhé látky, používané zejména pro vnitřní a zevní užití. Účelem extrakcí surové drogy je získání látky s požadovaným terapeutickým účinkem, nebo odstranění nadbytečného inertního materiálu. Získaný extrakt může být používán jako léčivý prostředek ve formě tinktury, tekutého extraktu nebo může být dále upraven do formy kapslí a tablet [22].

Zkoumání nových technologií v posledních desetiletích vede ke zkvalitnění extrakčního procesu, zkrácení doby extrakce, snížení spotřeby energií, zvýšení výtěžku a zdokonalení kvality esenciálního oleje [13].

1.6.1 Destilace vodní parou

Jak již název napovídá, jedná se o přímou destilaci vodní parou (SD). Zkratka SD je odvozena z anglického názvu "steam distillation". Pára je generována v oddělené nádobě zvané generátor páry. Materiál je umístěn na perforovaném patře v baňce nad přívodem páry, což je znázorněno na obrázku 8. Výhodou je, že množství generované páry může být snadno kontrolováno. Protože pára je generována odděleně ve vyvíječi páry, teplota ohřevu rostlinného materiálu nepřesáhne 100 °C, a tudíž nepodléhá tepelné degradaci. Destilace vodní parou je nejrozšířenější metoda pro výrobu esenciálních olejů ve velkém měřítku. Zřejmou nevýhodou této metody jsou vysoké výdaje potřebné na výstavbu zařízení [22].



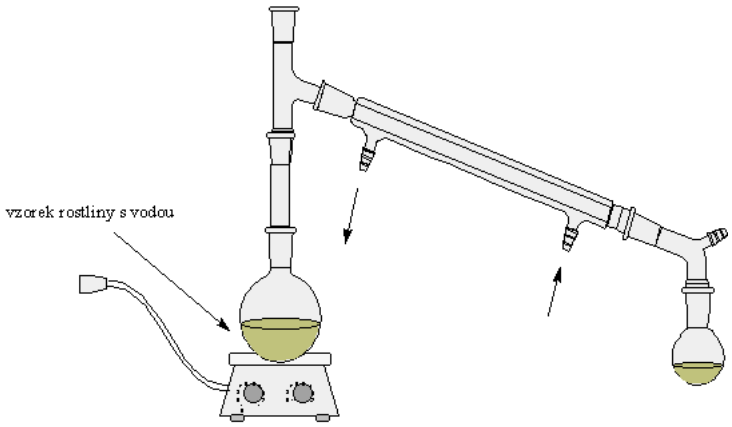
Obrázek 8: Schéma aparatury pro destilaci vodní parou (převzato z [23]).

V severním Wyomingu, v USA, byl pomocí parní destilace získán a analyzován olej z máty klasnaté (*Mentha spicata* L.), tymiánu obecného (*Thymus vulgaris* L.), dobromysli obecné (*Origanum vulgare* L.) a rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis* L.). Analýzou

mátového oleje byla zjištěna přítomnost karvonu, limonenu a menthonu. V esenciálním oleji z oregána dominoval karvakrol, *p*-cymen a γ-terpinen [24]. Tato metoda se osvědčila i pro destilaci levandulového oleje (*Lavendula angustifolia* L.) a oleje z pelyňku ročního (*Artemisia annua* L.). V levandulovém oleji byl jako majoritní složka identifikován linalool a v pelyňkovém oleji byl nejvíce zastoupen kafr [25]. V jiné studii byla SD použita pro destilaci oleje ze tří druhů levandulí (*Lavendula angustifolia* L., *Lavendula latifolia* L. a *Lavendula hybrida* L.) a dvou druhů tymiánu (*Thymus hyemalis* L., *Thymus zygis* L.) [26]. V neposlední řadě byla parní destilace použita pro izolaci oleje z rozmarýnu obecného [27] nebo z čistce vlnatého (*Stachys byzantina* L.) a čistce lesního (*Stachys persica* L.) [28].

1.6.2 Hydrodestilace

Hlavní charakteristikou hydrodestilace (HD, hydrodistillation) je přímý kontakt vařící vody a rostlinného materiálu. K ohřevu dochází buď pomocí plamenového hořáku, nebo topného hnízda, v němž je umístěna destilační baňka obsahující vodu a rostlinný materiál [22]. Na baňku je napojen chladič, na jehož konci je uchycena sběrná nádoba pro destilát. Schéma aparatury pro hydrodestilaci je zobrazeno na obrázku 9. Princip je stejný jako u azeotropické destilace při atmosférickém tlaku, kdy molekuly vody a esenciálního oleje tvoří heterogenní směs. Ta má nižší teplotu varu než 100 °C, zatímco složky esenciální oleje mají teplotu varu daleko vyšší. Výhodou je to, že voda je nemísitelná s většinou terpenických složek esenciálního oleje a proto je lze po kondenzaci oddělit. Tato metoda je vhodná pro extrakci lístků a květů, protože předchází shlukování a zhutnění materiálu v průběhu procesu [13]. Jakýkoliv jiný rostlinný materiál musí být rozdrcený, aby nedocházelo k usazení na dně destilační baňky a tím k tepelné degradaci materiálu [22]. Hydrodestilace má ale i řadu nevýhod, mezi ně patří dlouhá doba extrakce (3–6 hodin, například okvětní lístky růže i 24 hodin), nebo přehřátí a ztráta některých polárních molekul ve vodném výluhu. Po chemické stránce může docházet ke strukturním změnám terpenických molekul po delším kontaktu s vodou, a to zejména k hydrolýzám nebo cyklizačním reakcím. V průmyslovém měřítku se tato metoda využívá neustále, a to hned z několika důvodů, kterými jsou jednoduchost zařízení, snadnost provedení a jeho selektivita [13].



Obrázek 9: Schéma aparatury pro hydrodestilaci (převzato z [23]).

Hojně se hydrodestilace využívá pro izolaci rozmarýnového oleje z různých druhů rozmarýnu (*Rosmarinus eriocalyx* L. [29] a *Rosmarinus officinalis* L. [27]). Stejně jako destilace vodní parou byla tato technika využita pro čistec vlnatý (*Stachys byzantina* L.) a čistec lesní (*Stachys persica* L.) [28]. Malajsijská universita publikovala o klasické hydrodestilaci a hydrodestilaci s mikrovlnným ohřevem (MAHD) skořice čínské (*Cinnamomum cassia* L.) [30]. Dále byla tato metoda použita pro získání citronelového oleje z *Cymbopogon winterianus Jowitt* [31], mateřídoušky vejčité (*Thymus pulegioides* L.) [32] a jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata* L.) [33]. Přítomnost karvakrolu byla ověřena pomocí GC/MS analýzy takto získaného oleje z různých druhů dobromysli [34]. Esenciální olej byl HD získán i z koriandru setého (*Coriandrum sativum* L.) a z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* L.) [35].

1.6.3 Loužení za studena – macerace

V tomto procesu se celá nebo hrubě nadrcená surová droga umístí do uzavíratelné nádoby s rozpouštědlem a nechá se stát při pokojové teplotě po dobu alespoň 3 dnů [22]. Mezi nejčastěji používaná rozpouštědla patří methanol [36], ethanol [37] nebo kyselina mravenční [38] smíchaná ve vhodném poměru s vodou. Dále se pro maceraci používá aceton, acetonitril, nebo ethylacetát [38, 39]. Po tuto dobu je se směsí často mícháno, dokud se rozpustné složky nevylouží do rozpouštědla. Po uplynutí této doby se vlhká droga stlačí a vzniklá kapalina se oddělí filtrací nebo dekantací [22]. Extrakt se pak zakoncentruje pomocí odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku. Při této metodě nedochází k chemickým změnám olejových složek jako u hydrodestilace. V průběhu hydrodestilace vroucí voda způsobí rozpuštění některých vonných složek, a tím snížení pH na hodnotu 4−7. Původní extrahované

složky jsou podrobeny účinku tepla a kyseliny a podléhají proto chemickým modifikacím [13].

Macerací se v potravinářství velmi často vyrábí bylinné likéry. Analýzou alkoholového macerátu heřmánku pravého (*Matricaria recutita* L.) byla zjištěna přítomnost bisabololu oxidu A. Macerát z koriandru (*Coriander sativum* L.) nejvíce obsahoval linalool. Eukalyptol byl získán z macerátu eukalyptu (*Eucalyptus globulus* Labill.) [40]. Macerát muškátovníku vonného (*Myristica fragrans* Houtt.) byl získán pomocí absolutního ethanolu [41]. K maceraci se využívá i plamatka zelná (*Acmella oleracea* L.), známá jako jambú, která je zdrojem spilantholu [42].

1.6.4 Lisování za studena

Lisování za studena je tradiční způsob extrakce EO z kůry citrusových plodů. Během extrakce dochází k prasknutí olejových váčků na spodní straně mezokarpu (dužniny) a uvolnění těkavého oleje. Tento olej je oddělen mechanicky, lisováním za studena, čímž se získá vodná emulze. Následně je olej získán centrifugací. V tomto případě získáme citrusovou esenci, která se používá v potravinářském nebo kosmetickém průmyslu, jako příchuť nebo vůně [13].

1.6.5 Extrakce nadkritickou tekutinou

Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE, supercritical fluid extraction) představuje alternativní způsob získání EO, s obecným cílem redukovat použití organického činidla. Tato metoda má mnohé výhody, jako například použití CO_2 jako extrakčního činidla, který vykazuje příznivé fyzikální vlastnosti, je poměrně levný, bezpečný a dostupný. Omezující je polarita rozpouštědla, a to v případě, že extrahujeme polární látky a pokud dochází k silným interakcím analytu s matricí. Často jsou proto přidávány k oxidu uhličitému organická rozpouštědla. Kromě CO_2 je možné využít i argon. Hlavní výhodou této extrakční techniky je nízká teplota, při níž nedochází k poškození extrahované látky v důsledku tepla a organických rozpouštědel [22].

Kolumbijská univerzita využívala SFE k získání citronelového oleje (*Cymbopogon winteriana* L.) a oleje z voňatky citronové (*Cymbopogon citrus* L.), známá jako citronová tráva [43]. Jiná studie popisuje SFE tahitské limety (*Citrus latifolia* L.) a dobromysli obecné (*Origanum vulgare* L.) [44]. Extrakce nadkritickou tekutinou byla použita i pro získání EO z koriandru setého (*Coriandrum sativum* L.) [45], šťovíku kyselého (*Rumex acetosa* L.) [46], zázvoru lékařského (*Zingiber officinale*) [47] nebo hřebíčku

(*Syzygium aromaticum*) [48]. Srbská univerzita využívala tuto metodu k extrakci EO z třapatky nachové (*Echinacea purpurea* L.) [49].

1.7 Analýza esenciálních olejů

1.7.1 Headspace analýza – extrakce plynnou fází

Vzorkování headspace (HS), tedy z prostoru nad vzorkem, je další možností, jak analyzovat silice ze vzorku [50]. Headspace metoda ve spojení s plynovou chromatografií představuje postup pro stanovení těkavých látek. Je založena na rozdělení sledovaných analytů mezi netěkavou kapalnou, popřípadě pevnou fází a parní fází, nacházející se nad kapalným či pevným vzorkem [51]. Plynná fáze je zpravidla v rovnováze s analyzovanou kapalnou fází. Také proto se používá jako nepřímá metoda pro určení obsahu dané složky v kapalném vzorku na základě analýzy plynné fáze [52]. Tímto šetrným postupem se zajistí selektivní extrakce silic bez dalších složek matrice [50]. Což výrazně potlačuje zatížení chromatografického systému nežádoucími interferujícími nebo kontaminujícími látkami a výrazně prodlužuje životnost kapilární kolony. Klíčovým faktorem ovlivňujícím účinnost headspace postupu je distribuční konstanta analytu mezi plynnou a kapalnou fází. Čím více je rovnováha posunuta k plynné fázi, tím s větší citlivostí bude látka stanovena. Headspace analýza může být prováděna dvěma způsoby. Pokud je vzorek v rovnovážném stavu s plynnou fází v uzavřeném prostoru, potom se tato metoda nazývá statická headspace. Pokud nosný plyn proudí nad hladinou vzorku nebo probublává vzorkem a extrahované těkavé látky se zachytávají na sorbent [51].

Při **statické headspace** se ustanovuje rovnováha mezi těkavými látkami obsaženými ve vzorku a v parní fázi nad vzorkem v plynotěsné uzavřené nádobce. Po ustanovení rovnováhy je plynná fáze odebrána a nastříknuta na chromatografickou kolonu. K podpoře vytěsnění látek z kapalného vzorku do parního prostoru, je možno použít zvýšenou teplotu nebo zvýšit iontovou sílu vzorku pomocí vysolení. Což je míněno hlavně pro látky s nízkou hodnotou distribuční konstanty, které z větší části zůstávají v kapalné fázi. Statické headspace systémy jsou dvojího typu – buď k dávkování používají plynotěsnou stříkačku, nebo ventilový systém s dávkovací smyčkou [51].

Při **dynamické headspace** technice je kapalná fáze kontinuálně extrahována proudem inertního plynu a stanovuje se obsah komponent uvolněných z extrahovaného materiálu [52]. Dochází zde k probublávání inertního plynu vzorkem a vytěsněné těkavé látky se zachytávají

na sorbentu. Poté je sorbent rychle zahřát a těkavé látky jsou tak uvolněny nebo desorbovány a naneseny na kolonu plynového chromatografu. V další fázi je sorbent vyhřát na ještě vyšší teplotu, než při které došlo k uvolnění sledovaných analytů, čímž se odstraní rezidua látek, vlhkost a systém je připraven pro další analýzu [51]. I když systém je vlivem stripování neustále vychylován z rovnováhy, předpokládá se, že i za těchto nestandardních podmínek lze získat kvantitativní výsledky [52]. Tato technika je obecně citlivější než statická headspace, protože probubláváním se podaří vytěsnit z matrice vzorku podstatně více analytů než u statického provedení [51].

Headspace analýza se často používá ve spojení s mikroextrakcí tuhou fází a plynovou chromatografií. S využitím této kombinace technik byly analyzovány extrakty z citrusů [53]. Stejnou technikou byla provedena analýza extraktů růží, následujících druhů *Rosa pimpinellifolia* L., *Rosa villosa* L., *Rosa canina* L., a *Rosa dumalis* L. V růžovém extraktu bylo zkoumáno zastoupení mastných kyselin, ve všech druzích dominují kyselina olejová a kyselina linolová [54]. Profil těkavých látek byl takto identifikován i v mangu [55].

1.7.2 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (SPME, solid phase mikroextraction) je velmi jednoduchý, efektivní způsob přípravy vzorku bez použití rozpouštědla. Používá křemenné vlákno, na kterém je z vnější strany nanesena vrstva stacionární fáze a analyty ze vzorku jsou přímo extrahovány do tohoto povlaku. Běžně používané křemenné vlákno je potaženo tenkou polymerní fólií, tvořenou nejčastěji polydimethylsiloxanem (PDMS). Polymerní povlak představuje jakousi houbu, do níž jsou koncentrovány analyty pomocí absorpčních nebo adsorpčních procesů. Kinetika extrakce tuhou fází závisí na tloušťce filmu a promíchávání vzorku. Po odběru vzorku je vlákno zataženo do kovové jehly, která tvoří mechanickou ochranu. Dalším krokem je převod analytu z vlákna do chromatografu. V případě plynové chromatografie dochází k tepelné desorpci analytu v horkém injektoru. Existují dvě techniky provedení této metody, a to buď headspace SPME nebo přímé vzorkování, kdy se vlákno ponoří přímo do kapaliny. Výběr sorbentu závisí na polaritě a těkavosti analytu [56].

Výhodou SPME je, že zkracuje čas potřebný pro přípravu vzorku, snižuje pořizovací náklady a náklady na likvidaci rozpouštědel. Ve spojení s vhodnou detekční metodou dosahuje i vysoké citlivosti a selektivity [50, 56].

SPME metoda byla použita pro analýzu esenciálního oleje z tymiánu (*Thymus vulgaris* L.) a mateřídoušky úzkolisté (*Thymus serpyllum* L.) [57]. SPME analýzou těkavých látek

v tabáku virginském (*Nicotiana tabacum* L.) bylo zjištěno, že typickou látkou obsaženou v tabáku je neofytadien a nikotin [58].

1.7.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC, gas chromatography) je separační metoda, která k separaci plynů a par využívá dvě heterogenní fáze. Mobilní fáze je plynná, zpravidla inertní plyn a také separované složky jsou v plynném stavu. Nosný plyn je stlačitelný a málo viskózní [52]. Stacionární fáze může být tuhá látka nebo častěji kapalina zakotvená na inertním nosiči. Ta působí selektivně na jednotlivé separované látky a na základě vzájemných interakcí dochází k jejich rozdělení v koloně, a tudíž k jejich rozdílné eluci. Rozdělené složky jsou unášeny nosným plynem a jejich množství je zaznamenáno detektorem, jako funkce času nebo objemu proteklého nosného plynu [59].

1.7.4 Hmotnostní spektrometrie

Podstatou hmotnostní spektrometrie (MS, mass spectrometry) je separace molekulových iontů a fragmentů analyzované látky, které vznikly ionizací molekul nevratným odštěpením valenčních elektronů v magnetickém poli. Pro separaci je rozhodující veličinou tzv. efektivní hmotnost ionizované částice (*m/z*); kde *m* je hmotnost iontu, *z* je číslo elementárního náboje. Analyzovaný (plynný) vzorek je vystaven vlivu iontového zdroje, v němž vzniknou molekulové ionty a fragmenty. Jejich proud se vlivem silného elektrického pole urychlí a je dále veden jako tenký svazek letících částic do homogenního magnetického pole. V něm se rozlišují jednotlivé částice podle svých efektivních hmotností – dochází k zakřivení jejich drah podle *m/z*. Částice stejných efektivních hmotností vychází z magnetického pole jako svazky zaostřené na stejné místo detektoru. Intenzita signálu je úměrná počtu dopadlých částic. V záznamu, tzv. hmotnostním spektru, jsou registrovány jednotlivé signály v závislosti na hodnotách *m/z* [59].

1.7.4.1 Instrumentace

Mezi základní části hmotnostního spektrometru patří iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabité částice (tzv. ionizace). Existují různé konstrukce iontových zdrojů, které se liší podle použité ionizační techniky. Hmotnostní analyzátory slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (*m/z*). Detektor slouží k detekci iontů po jejich rozdělení dle *m/z* a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů. Další důležitou

součástí přístroje je vakuový systém, iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů a počítač pro ovládání přístroje, sběr a zpracování dat [60].

1.7.4.2 Způsoby ionizace vzorku

V technice GC/MS přicházejí do úvahy dva způsoby ionizace vzorku – elektronová ionizace a chemická ionizace. První, nejvýznamnější způsob ionizace vzorku je nárazem elektronů, nazýváme jej jako **elektronová ionizace (EI, electron ionization)**. Molekuly se dostávají do proudu elektronů mezi anodou a žhavenou katodou, kde dochází k jejich ionizaci. Vzniklé kladné ionty jsou vytlačovány elektrodou a po urychlení vysokým kladným potenciálem na elektrodách přecházejí do separátoru. Celý proces probíhá za sníženého tlaku (asi 10^{-4} až 10^{-5} Pa), kdy v iontovém zdroji nedochází ke srážkám částic a ionty vznikají pouze monomolekulovými rozpady. **Chemická ionizace (CI, chemical ionization)** je druhý způsob, jehož konstrukční uspořádání iontového zdroje je shodné se zdrojem pro elektronovou ionizaci. Zde se do iontového zdroje přivádí kromě vzorku pomocný plyn, zpravidla methan nebo isobutan. Tlak tohoto plynu dosahuje asi 100 Pa, zatímco tlak par vzorku 10^{-4} Pa. Za těchto podmínek jsou výhradně ionizovány molekuly pomocného plynu, jejichž ionty pak reagují s molekulami vzorku [52].

1.7.5 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Významnou aplikací je spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, kdy se hmotnostní spektrometrie využívá jako analytická koncovka pro identifikaci látek rozdělených plynovou chromatografií. Oddělená látka přichází z plynového chromatografu do iontového zdroje hmotnostního spektrometru [59].

Propojení mezi plynovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem se nazývá chromatografický vstup. Přímé zavedení výstupu z chromatografické kolony do iontové komůrky není zpravidla možné, neboť velké množství plynu by porušilo režim evakuovaného prostoru v hmotnostním spektrometru. Nejjednodušší spojení představuje dělič umístěný na výstupu z kolony, který dělí proud nosného plynu do dvou větví. Jedna vstupuje do běžného detektoru chromatografu a druhá odvádí nosný plyn a eluující složky do iontové komůrky. Možnost současného chromatografického záznamu a záznamu hmotnostních spekter je výhodná jak pro interpretaci, tak i pro kvantitativní vyhodnocení analýzy [52].

1.7.5.1 Identifikace složek na chromatogramu

Jedním ze způsobů pro identifikaci složek na chromatogramu je určování retenčních indexů. Tento systém byl poprvé zaveden Kovatsem a uplatnil se při kolonových i plošných

chromatografických technikách. Při určování retenčních indexů je nutno nejprve zvolit vhodnou homologickou řadu sloučenin, která vytvoří stupnici, do níž jsou vynášena retenční data identifikovaných komponent. Eluční indexy jsou tabelovány a na základě srovnání získaných hodnot s tabelovanými lze identifikovat separované látky. V plynové chromatografii byla jako standardní zvolena homologická řada nerozvětvených alkanů. Každému atomu uhlíku pak byla přiřazena hodnota 100, a tak eluční index například methanu RI = 100 a propanu RI = 300. Eluční (retenční) index libovolné složky se vypočítá podle vztahu (1).

$$RI = 100 \cdot \frac{\log t'_x - \log t'_z}{\log t'_{z+1} - \log t'_z} + 100 \cdot z \qquad (1)$$

Kde t'_x, t'_z, t'_{z+1}je redukovaný retenční čas neznámé látky, *n*-alkanu se *z* uhlíky a *n*-alkanu se *z+1* uhlíky. Při stanovení retenčního indexu musí platit, že za standardní alkany je potřeba zvolit dvojici, mezi níž eluuje analyzovaná látka [59].

Vzhledem k tomu, že Kovatsovy indexy se používají pouze pro izotermální měření, byly zavedeny retenční indexy i pro teplotně programovaná měření. Pro neizotermální průběh měření byly retenční indexy zavedeny van Den Doolem a Kratzem. Představují analogii Kovatsových RI, pouze pro jejich výpočet slouží vztah (2) [61].

$$RI = 100 \cdot \frac{t'_x - t'_z}{t'_{z+1} - t'_z} + 100 \cdot z \qquad (2)$$

Pro následující experimenty byly použity právě van Den Doolovy a Kratzovy indexy, neboť teplota při chromatografickém měření neustále rostla.

1.7.5.2 Knihovny hmotnostních spekter

Knihovny hmotnostních spekter umožňují přímé softwarové porovnání s naměřenými spektry. Výsledkem porovnání neznámého spektra s knihovnou jsou nejpravděpodobnější možnosti seřazené podle klesající podobnosti spekter. Ke každé možnosti jsou přiřazeny ještě koeficienty shody, vyjádřené v procentech. Vysoký koeficient shody však není důkazem správnosti identifikace, protože i v takové situaci mohou být spektra více či méně odlišná [60].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Vzorky a chemikálie

2.1.1 Příprava vzorků

Pro analýzu byl použit tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.), vypěstovaný na zahradě v obci Staré Čívice (GPS souřadnice 50.01968N 15.70002E). Sběr byl proveden 14. září 2016. Shromážděna byla čerstvá nadzemní část rostliny. Celá, včetně listů a stonků byla použita pro destilaci. Stonky byly nastříhány na drobnější kusy. Vzorek byl dále uchováván v lednici při 5 °C, neboť všechny destilace nemohly být provedeny zároveň ve stejný den.

2.1.2 Chemikálie

n-Hexan a standardy *n*-alkanů C8–C40 byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Demineralizovaná voda byla purifikovaná s použitím systému Mili-Q® od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

2.2 Použité přístroje a metody

2.2.1 Podmínky a použití hydrodestilace

K hydrodestilaci byla použita 2l destilační baňka, do níž bylo předloženo 75 g vzorku tymiánu obecného s přibližně 1500 ml demineralizované vody a zahříváno topným hnízdem. Během destilace byla demineralizovaná voda do baňky průběžně doplňována. Celý proces byl zastaven asi po 5 hodinách, kdy již nedocházelo k destilaci esenciálního oleje.

2.2.2 Podmínky a použití destilace vodní parou

K destilaci vodní parou bylo zapotřebí 2 varných baněk o objemu 2 l. Do jedné, která je označována jako generátor páry, byla předložena demineralizovaná voda, do druhé rostlinný materiál. Generovaná pára prochází do baňky s předloženým tymiánem a strhává tymiánové silice, které po průchodu chladičem kondenzují. K destilaci vodní parou bylo předloženo 75 g vzorku tymiánu, stejně tak jako v případě hydrodestilace. Destilace byla ukončena v době, kdy již nedocházelo k získávání esenciálního oleje.

2.2.3 Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Pro separaci těkavých složek esenciálního oleje bylo použito plynového chromatografu GC2010 spojeného s hmotnostním spektrometrem GCMS-QP2010 Plus od firmy Shimadzu

(Kyoto, Japonsko). Vzorky byly dávkovány pomocí autosampleru Combi PAL (CTC Analysis AG, Zwingen, Švýcarsko). Vydestilovaný esenciální olej byl ředěn *n*-hexanem tak, že k 10 µl esenciálního oleje byl přidán 1 ml *n*-hexanu. Naředěné extrakty esenciálního oleje získané hydrodestilací i destilací vodní parou byly analyzovány pomocí GC/MS.

2.2.3.1 Podmínky plynového chromatografu

Pro analýzu tymiánového oleje byla použita chromatografická kolona ZB-5HT INFERNO od firmy Phenomenex (Torrance, Kalifornie, USA) o délce 30 m, průměru 0,25 mm a s tloušťkou filmu 0,25 µm. Nosným plynem bylo helium 5.0, Linde gas a.s. (Praha, Česká republika) s lineární rychlostí 30 cm/sec. Teplota nástřikového prostoru byla 200 °C. Teplotní program byl nastaven tak, aby došlo k co nejlepšímu rozdělení složek silice, a to 40 °C (3 min), 2 °C/min → 300 °C (30 min) tj. celkem 163 min.

2.2.3.2 Podmínky hmotnostního detektoru

Teplota iontového zdroje byla 200 °C. Měřeny byly ionty v rozsahu *m/z* 33 až 500. Měření bylo spuštěno až po 4,5 min., kvůli ochraně detektoru. Nastaven byl režim SCAN, kdy detektor snímá odezvu všech iontů.

2.3 Vyhodnocení měření

Vyhodnocení získaných chromatogramů bylo provedeno v programu GCMS Solution 4.20 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

2.3.1 Identifikace látek

Pro identifikaci látek v esenciálním oleji byla proměřena řadu *n*-alkanů C8-C40 za stejných podmínek jako vzorky, pro korelaci hmotnostního spektra a retenčního indexu látky. Retenční indexy a časy jednotlivých *n*-alkanů jsou shrnuty v tabulce 1. Hmotnostní spektra a naměřené hodnoty retenčních indexů jednotlivých píků byly porovnávány s knihovnami spekter FFNSC, NIST 14, NIST 14s a WILEY 229.

Retenční indexy, uvedené v tabulce 1, jsou vypočteny pomocí van Den Doolova vztahu (viz vzorec 2), který se používá pro výpočty RI u chromatografických analýz s teplotním programem.

Tabulka 1: Retenční časy a indexy *n*-alkanů pro výpočet retenčních indexů separovaných látek.

Název alkanu	Počet uhlíků	Retenční čas [min]	Retenční index RI
n-oktan	8	7,473	800
n-nonan	9	12,671	900
n-dekan	10	19,301	1000
n-undekan	11	26,453	1100
n-dodekan	12	33,565	1200
n-tridekan	13	40,388	1300
n-tetradekan	14	46,867	1400
n-pentadekan	15	53,009	1500
n-hexadekan	16	58,832	1600
n-heptadekan	17	64,373	1700
n-oktadekan	18	69,627	1800
n-nonadekan	19	74,644	1900
n-ikosan	20	79,429	2000
n-henkosan	21	84,006	2100
n-dokosan	22	88,376	2200
n-trikosan	23	92,591	2300
n-tetrakosan	24	96,624	2400
n-pentakosan	25	100,510	2500
n-hexakosan	26	104,255	2600
n-heptakosan	27	107,858	2700
n-oktakosan	28	111,343	2800
n-nonakosan	29	114,703	2900
n-triakontan	30	117,963	3000
n-hentriakontan	31	121,111	3100
n-dotriakontan	32	124,178	3200
n-tritriakontan	33	127,153	3300
n-tetratriakontan	34	130,021	3400
n-pentatriakontan	35	132,836	3500
n-hexatriakontan	36	135,802	3600
n-heptatriakontan	37	139,252	3700
n-oktatriakontan	38	143,330	3800
n-nonatriakontan	39	148,242	3900
n-tetrakontan	40	154,108	4000

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

V této sekci jsou shrnuty výsledky analýz tymiánového oleje pomocí GC/MS formou tabulek a aromaprofilů zobrazených pomocí bublinových grafů. Dále jsou zde umístěny ilustrační chromatogramy z měření.

3.1 Srovnání způsobů izolace esenciálního oleje

Cílem bylo porovnání dvou metod izolace esenciálního oleje, a to hydrodestilací a destilací vodní parou. Extrakce EO byla provedena dvakrát metodou hydrodestilace a dvakrát metodou destilace vodní parou. Očekávaným výsledkem bylo rozdílné složení takto získaných olejů. Výsledky poskytla analýza pomocí plynového chromatografu s hmotnostní detekcí.

Tabulka 2 souhrnně uvádí jednotlivé složky extraktů, získaných oběma destilačními metodami. Analyzované složky jsou uspořádány do skupin látek dle svého charakteru. Ke každé složce je navíc uvedeno identifikační CAS číslo. CAS číslo je jednoznačný chemický identifikátor látek, zavedený službou Chemical Abstracts Service (CAS). Tyto čísla jsou v podstatě pořadová čísla, přiřazovaná identifikovaným látkám z databáze, která nevypovídají nic o struktuře [62]. Dále je u každé látky uveden experimentálně získaný retenční index a relativní zastoupení složky v extraktu. Relativní obsah složek odpovídá ploše píků v TIC, což znamená, že plocha jednoho píku je vztažená k celkové ploše píků v chromatogramu. TIC režim, převzato z angličtiny jako "total ion current", tedy celkový iontový proud, jinými slovy představuje součet intenzit všech měřených iontů ve spektru, včetně šumu.

Tabulka 2: Souhrnná tabulka těkavých složek tymiánového oleje a jejich procentuálního zastoupení.

Skupina látek	Číslo píku	Látka	CAS číslo	RI	Relativní obsah složky [%]					
					HYDRODESTILACE			DESTILACE VODNÍ PAROU		
					experiment 1	experiment 2	průměrná hodnota	experiment 1	experiment 2	průměrná hodnota
MONOTERPENY	1	α-Thujen	2867-05-2	922	0,35	0,37	0,36	1,82	1,68	1,75
	2	α-Pinen	80-56-8	927	0,25	0,28	0,27	1,06	0,97	1,02
	3	α-Fenchen	471-84-1	941	0,20	0,21	0,21	0,70	0,67	0,69
	-	Sabinen	3387-41-5	968	0,05	0,05	0,05	0,09	0,08	0,09
	-	β-Pinen	127-91-3	969	0,12	0,13	0,13	0,32	0,27	0,29
	4	β-Myrcen	123-35-3	988	1,16	1,13	1,14	2,86	2,67	2,76
	-	α-Felandren	99-83-2	1000	0,07	0,09	0,08	0,18	0,22	0,20
	5	α-Terpinen	99-86-5	1011	0,94	0,93	0,93	2,26	2,19	2,23
	6	*o*-Cymen	527-84-4	1018	7,96	7,82	7,89	13,03	13,01	13,02
	-	Limonen	5989-54-8	1023	0,59	0,57	0,58	0,83	0,82	0,82
	-	α- Ocimen	502-99-8	1046	0,03	0,05	0,04	-	-	-
	-	(E)-β-Ocimen	3779-61-1	1045	-	-	-	0,05	0,06	0,05
	7	γ-Terpinen	99-85-4	1053	16,36	16,22	16,29	25,94	26,55	26,25
	-	Terpinolen	586-62-9	1083	0,04	0,04	0,04	-	-	-
SESKVITERPENY	-	β-Bourbonen	5208-59-3	1378	0,06	0,05	0,06	-	0,03	0,03
	12	(E)-β-Karyofylen	87-44-5	1411	6,82	6,61	6,71	3,43	3,67	3,55
	-	β-Ylangen	20479-06-5	1422	0,03	-	0,03	-	-	-
	-	α-Karyofylen	6753-98-6	1446	0,26	0,24	0,25	0,06	0,10	0,08
	13	Germacren D	23986-74-5	1474	1,01	1,01	1,01	0,44	0,54	0,49
	-	Valencen	4630-07-3	1488	0,25	0,26	0,25	-	-	-
	-	α-Muurolen	10208-80-7	1494	0,06	0,07	0,06	-	-	-
	-	β-Bisabolen	495-61-4	1503	0,23	0,20	0,22	0,05	0,08	0,07
	-	δ-Kadinen	483-76-1	1517	0,53	0,51	0,52	0,10	0,14	0,12

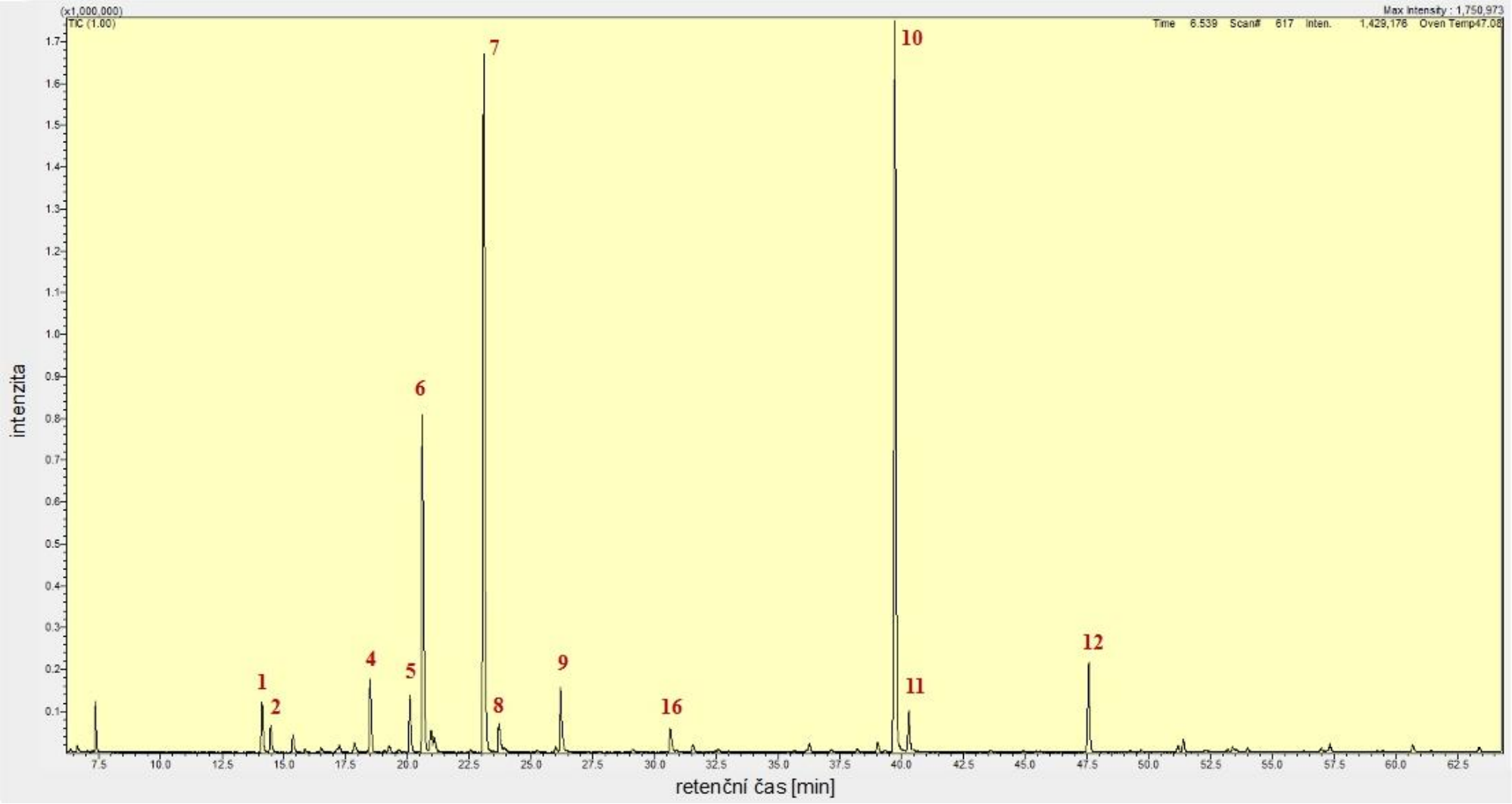
OXIDOVANÉ MONOTERPENY	-	1,8-Cineol	470-82-6	1024	1,06	1,08	1,07	0,52	0,69	0,60
	8	(Z)-Sabinen hydrát	546-79-2	1061	1,28	1,24	1,26	1,30	1,29	1,30
	-	trans-Sabinen hydrát	17699-16-0	1094	0,16	0,19	0,18	-	-	-
	9	Linalool	78-70-6	1096	3,26	3,13	3,19	2,68	2,66	2,67
	-	Kafr	76-22-2	1137	0,24	0,24	0,24	0,12	0,12	0,12
	-	4-Terpineol	562-74-3	1171	0,50	0,50	0,50	0,27	0,31	0,29
	-	α-Terpineol	98-55-5	1186	0,14	0,17	0,16	0,10	0,13	0,11
	-	Citronellol	106-22-9	1227	0,06	0,06	0,06	-	-	-
	-	Tymol methylether	1076-56-8	1231	0,11	0,14	0,12	0,02	0,04	0,03
	-	Neral	106-26-3	1237	0,26	0,25	0,26	-	-	-
	-	Citral	5392-40-5	1238	-	-	-	0,04	0,05	0,05
	-	Karvakrol metylether	6379-73-3	1239	0,94	0,98	0,96	0,26	0,32	0,29
	-	Geraniol	106-24-1	1252	0,43	0,48	0,45	0,05	0,10	0,07
	-	Geranial	141-27-5	1267	0,49	0,50	0,49	0,12	0,14	0,13
	10	Tymol	89-83-8	1291	33,95	33,55	33,75	28,18	32,31	30,25
	11	Karvakrol	499-75-2	1299	1,91	1,87	1,89	1,47	1,77	1,62
OXIDOVANÉ SESKVITERPENY	14	Karyofylen oxid	1139-30-6	1574	2,36	2,30	2,33	0,21	0,32	0,27
	15	α-Muurolol	19435-97-3	1633	1,89	1,83	1,86	0,18	0,28	0,23
	-	τ-Muurolol	19912-62-0	1647	0,47	0,49	0,48	-	0,03	0,03
ALDEHYDY A KETONY	-	3-Oktanon	106-68-3	986	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03
PEROXIDY	-	1-Methylpentylhydroperoxid	24254-55-5	957	0,10	0,10	0,10	0,18	0,15	0,16

ALKOHOLY	-	1-Okten-3-ol	3391-86-4	979	0,12	0,23	0,18	0,46	0,47	0,46
	-	3-Oktanol	589-98-0	996	0,02	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04
	16	Isoborneol	124-76-5	1159	0,89	0,90	0,89	0,93	1,07	1,00
	-	1-Dekanol	112-30-1	1271	0,06	0,07	0,06	-	-	-
	-	*p*-Cymen-7-ol	536-60-7	1285	0,08	0,11	0,09	0,03	0,05	0,04
	-	Germakren-D-4-ol	198991-79-6	1568	1,07	1,09	1,08	0,07	0,17	0,12
	-	Guaiol	489-86-1	1611	0,34	0,33	0,33	-	0,04	0,04
	17	Shyobunol	35727-45-8	1682	1,66	1,66	1,66	-	-	-
ESTERY	-	Hex-3-(Z)-enyl acetát	3681-71-8	1008	0,05	0,05	0,05	-	-	-
	-	cis-3-Hexenyl-isobutyrát	41519-23-7	1142	0,07	0,11	0,09	0,03	0,02	0,02
	-	(Z)-3-Hexenylbutyrát	16491-36-4	1184	0,16	0,16	0,16	0,03	0,04	0,04
	18	Bornyl acetát	76-49-3	1280	1,60	1,60	1,60	0,31	0,38	0,35
	-	Geranyl acetát	105-87-3	1380	0,11	0,10	0,11	-	-	-
	-	Fenylethylisobutyrát	103-48-0	1390	0,03	0,05	0,04	-	-	-
	19	Geranyl propionát	105-90-8	1470	1,21	1,19	1,20	-	-	-
	-	Geranyl isobutyrát	2345-26-8	1509	0,54	0,53	0,53	0,06	0,07	0,07
	-	Geranyl butyrát	106-29-6	1556	0,25	0,29	0,27	-	0,04	0,04

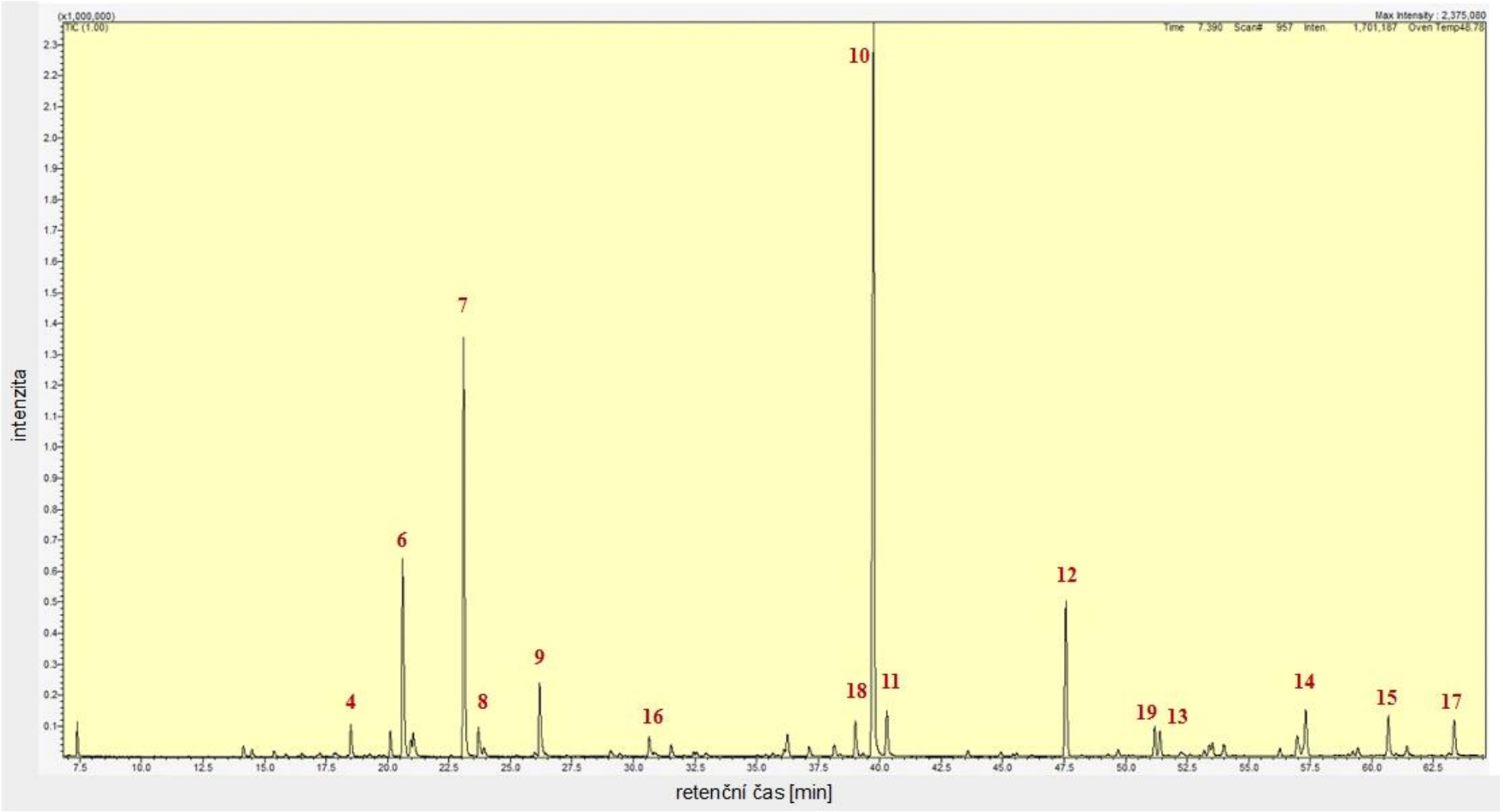
Ke složkám s nejvyšší odezvou v chromatografickém záznamu jsou přiřazena čísla pro snadnější orientaci v uvedených chromatogramech.

Pro ilustraci následují chromatogramy, jeden z analýzy EO získaného destilací vodní parou (viz obrázek 10) a jeden z analýzy EO z hydrodestilace (viz obrázek 11). Chromatografický záznam představuje závislost intenzity signálu (odezvy detektoru) na retenčním čase.

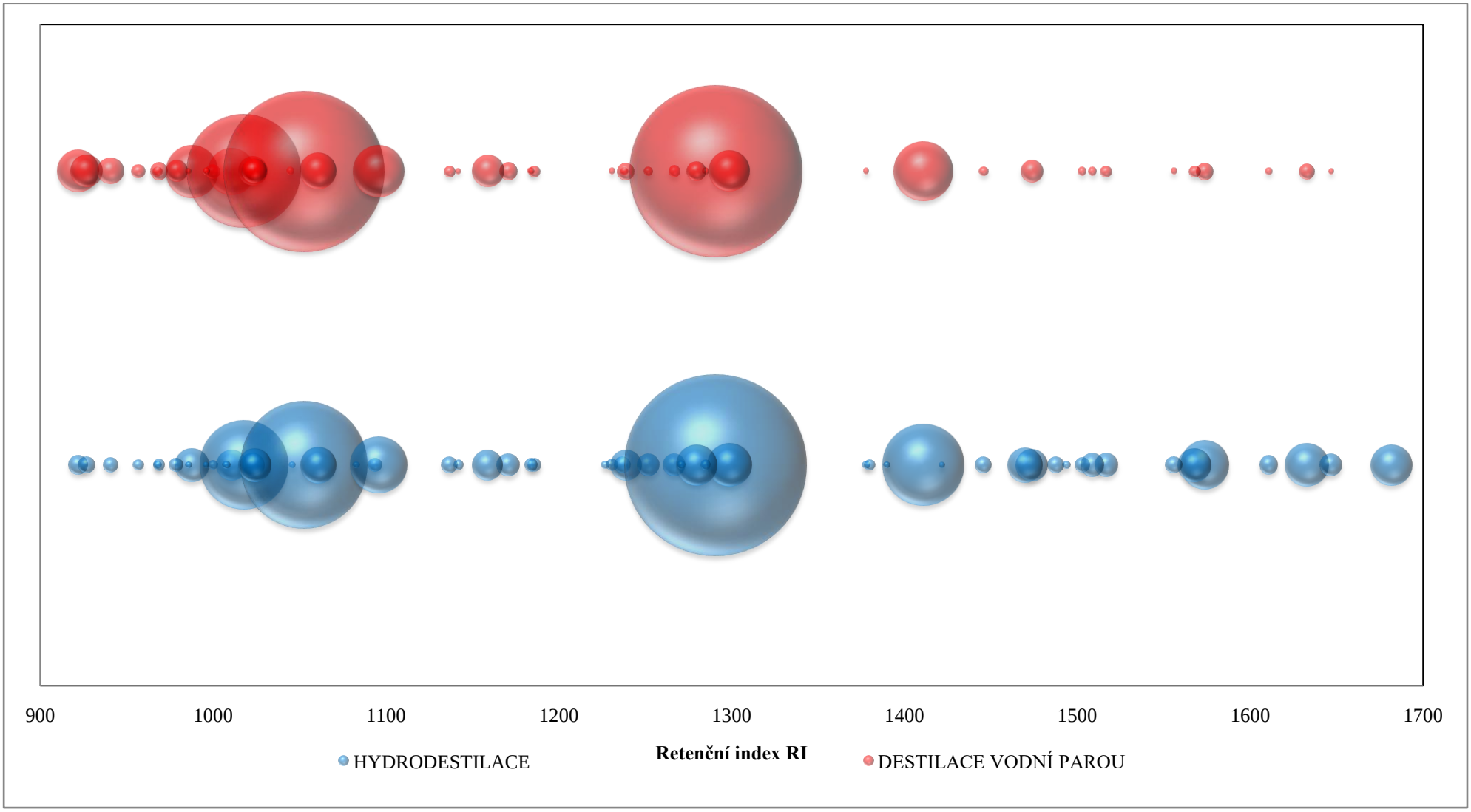
K detailnější představě o složení jednotlivých extraktů slouží tzv. aromaprofily, které jsou pouze jiným (názornějším) zobrazením chromatogramů a jsou zobrazeny pomocí bublinových grafů. Všechny nalezené sloučeniny jsou seřazeny podle experimentálně zjištěných retenčních indexů RI. Plocha kruhů v bublinových grafech odpovídá plochám píku v TIC. Tyto bublinové grafy jsou zobrazeny na obrázku 12 a obrázku 13.



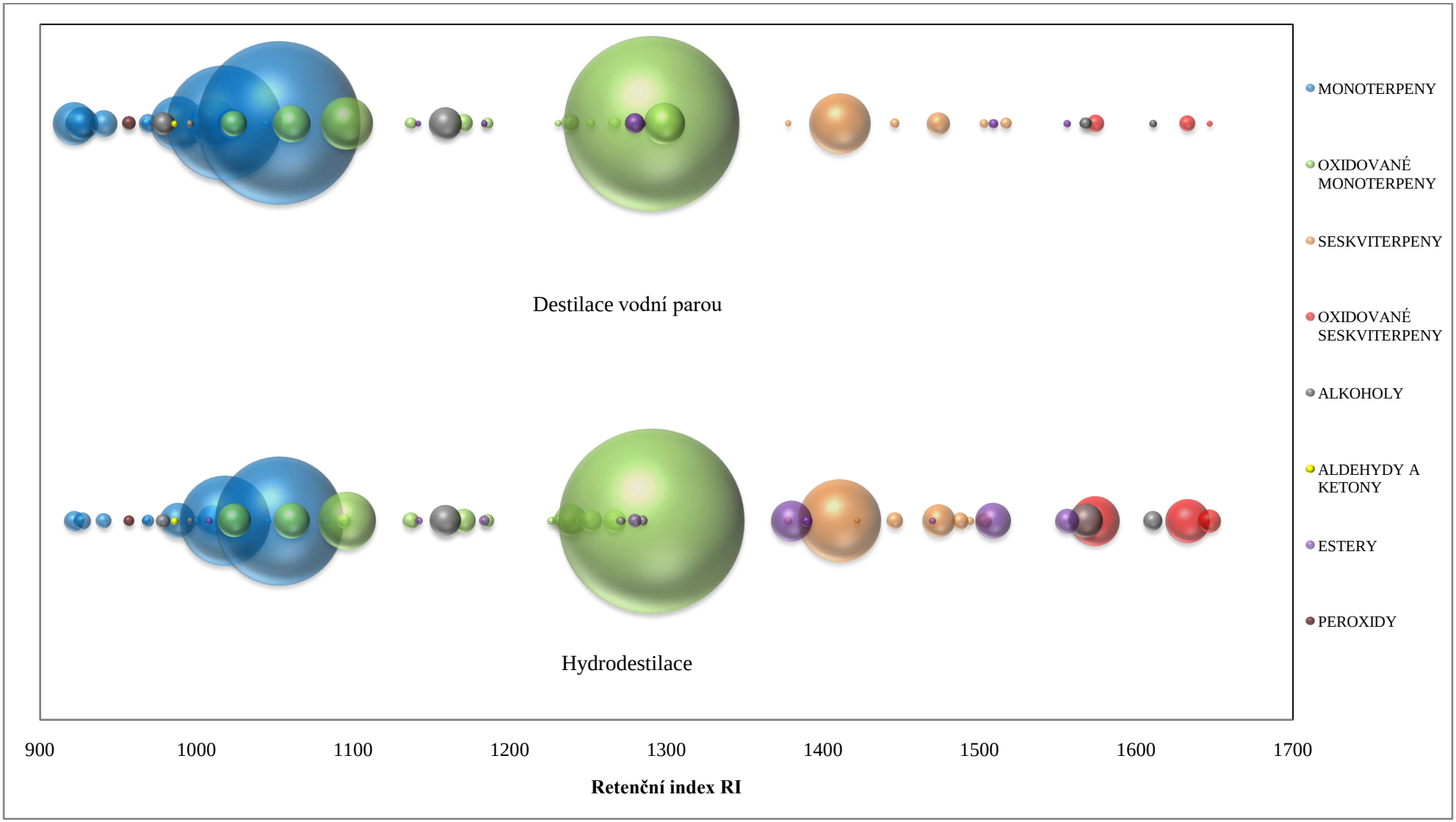
Obrázek 10: Chromatogram EO z destilace vodní parou - experiment 2.



Obrázek 11: Chromatogram EO z hydrodestilace - experiment 2.



Obrázek 12: Porovnání efektivity destilačních metod.



Obrázek 13: Porovnání složení extraktů získaných rozdílnými destilačními metodami.

3.2 Diskuse a porovnání destilačních metod z hlediska složení

3.2.1 Hydrodestilace

Ze vzorku čerstvého tymiánu byl hydrodestilací získán olej, který byl analyzován s využitím GC/MS. V obou experimentech bylo identifikováno 59 píků, což odpovídá asi 95 % celkové plochy chromatogramu v TIC v obou případech. Pro ilustraci je chromatografický záznam této analýzy uveden na obrázku 11.

3.2.2 Destilace vodní parou

Pomocí GC/MS bylo analyzováno a následně vyhodnoceno kvalitativní a kvantitativní složení tymiánového oleje získaného destilací vodní parou. Identifikováno bylo 45 sloučenin, což odpovídá 94 % průměrné celkové plochy píků v chromatogramu. Chromatogram z této analýzy je zobrazen na obrázku 10.

3.2.3 Porovnání všech analýz

Všechny identifikované sloučeniny uvádí tabulka 2. Jak již bylo uvedeno v předchozí části, výsledky experimentů včetně analýzy jsou podobné. Z hlediska celkové efektivity procesu, dosahují obě destilace podobných výsledků, což můžeme vidět z obrázku 12. Celkové množství identifikovaných složek v extraktu, dosahuje v průměru u hydrodestilace 95 % plochy píků v TIC a u destilace vodní parou 94 % plochy píků v TIC. Zřejmý rozdíl ve složení extraktů je patrný při porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých druhů látek. To je zobrazeno na obrázku 13. Destilací vodní parou se vydestilovalo zhruba dvakrát více látek s nižším bodem varu, tj. monoterpenů. Množství oxidovaných monoterpenů, aldehydů, ketonů a peroxidů je podobné v obou extraktech. Avšak při porovnání množství ostatních identifikovaných látek byla hydrodestilace efektivnější. Hydrodestilací se získalo čtyřnásobně více oxidovaných seskviterpenů, alkoholů a esterů, a dvojnásobně více seskviterpenů. Některé komponenty, jež byly nalezeny v EO z hydrodestilace, nebyly nalezeny v EO z parní destilace. Tuto skutečnost dokládá tabulka 3. Rostlinný materiál byl sbírán najednou, na stejném místě a vlastní zpracování vzorku před destilací probíhalo za stejných podmínek, rozdíl ve složení EO je tedy dán způsobem izolace.

Tabulka 3: Celkové zastoupení a počet látek v extraktech.

Skupina látek	Počet složek		Relativní zastoupení [%]	
	HD	**SD**	**HD**	**SD**
monoterpeny	13	11	28,01	49,16
oxidované monoterpeny	15	12	44,57	37,53
seskviterpepeny	9	6	9,11	4,34
oxidované seskviterpeny	3	3	4,68	0,53
alkoholy	8	6	4,35	1,70
aldehydy a ketony	1	1	0,04	0,03
estery	9	5	4,06	0,51
peroxidy	1	1	0,10	0,16
celkem	**59**	**45**	**94,91**	**93,96**

Hlavní složkou tymiánové silice je bezpochyby oxidovaný monoterpen tymol, tvořený v chloroplastech. Jeho zastoupení tvoří 33,75 % plochy TIC v EO z hydrodestilace a 30,25 % v EO z parní destilace. Dalšími významnými složkami monoterpenického charakteru jsou γ-terpinen, *o*-cymen, E-(β)-karyofylen a linalool. Parní destilací bylo získáno o 10 % plochy v TIC více γ-terpinenu a o 5 % plochy v TIC více *o*-cymenu. Naopak v extraktu z hydrodestilace bylo zjištěno méně oxidovaného seskviterpenu karyofylen oxidu, a to 2,33 %. Naproti tomu v extraktu z parní destilace bylo nalezeno 2,67 % β-myrcenu. Seskviterpenického E-(β)-karyofylenu bylo nalezeno v extraktu z hydrodestilace přibližně o 3 % plochy v TIC více, než v extraktu z parní destilace. Což souhrnně dokazuje tabulka 4.

Tabulka 4: Dominantní látky tymiánové silice a porovnání jejich obsahu.

Pořadí	Dominantní složky EO a jejich relativní zastoupení (%)	
	HD	**SD**
1	Tymol (33,75 %)	Tymol (30,25 %)
2	γ-Terpinen (16,29 %)	γ-Terpinen (26,25 %)
3	*o*-Cymen (7,89 %)	*o*-Cymen (13,02 %)
4	E-(β)-Karyofylen (6,71 %)	E-(β)-Karyofylen (3,55 %)
5	Linalool (3,19 %)	β-Myrcen (2,76 %)
6	Karyofylen oxid (2,33 %)	Linalool (2,67 %)

3.2.4 Porovnání analýzy tymiánového oleje s literaturou

Ve studii **Anety Wesolowske (2014)** [63] bylo provedeno porovnání složení tymiánového oleje získaného parní destilací a hydrodestilací sušeného tymiánu obecného (*Thymus vulgaris* L.). Díky tomuto mohla být experimentální data porovnána s daty z tohoto článku. Tymián byl pěstován a sbírán v zahradě, v oblasti severního Polska. Vzorek tymiánu byl sušen při pokojové teplotě. K chromatografické analýze byla použita kolona typu HP-5MS. Výtěžek se pohybuje kolem 1,03 % u HD a 1,08 % u SD. Uvedená procenta

zastoupení látky v esenciálním oleji odpovídají taktéž plochám v TIC. Více tymolu bylo získáno parní destilací (57,14 % plochy v TIC). Hydrodestilací se získalo pouze 41,34 % tymolu. V našem experimentu bylo získáno více tymolu hydrodestilací. Druhou nejvíce zastoupenou látkou byl karvakrol, jehož zastoupení bylo 13,49 % plochy v TIC u SD a 15,97 % u HD. V námi získaných extraktech nebyl tento oxidovaný monoterpen výrazně zastoupen, jeho obsah se pohyboval mezi 1,6 až 1,8 % plochy v TIC. Extraktu z parní destilace dále dominoval *p*-cymen, s obsahem 12,12 % a γ-terpinen s obsahem 10,12 % plochy v TIC. Extrakt z hydrodestilace obsahoval 6,06 % plochy v TIC *p*-cymenu a 2,61 % γ-terpinenu. Naše extrakty však obsahovaly *o*-cymen. Obsah linaloolu byl porovnatelný s našimi extrakty, v rozmezí 2,4–3,4 % plochy v TIC. Z pohledu zastoupení monoterpenů jako celku si náš hydrodestilát vede podobně jako hydrodestilát v literatuře, ve kterém bylo 26,55 % plochy v TIC. Obsah monoterpenů v extraktu z parní destilace byl ale pětkrát nižší (9,5 % plochy v TIC), než v našem měření. Autorka uvádí, že obsah oxidovaných monoterpenů v hydrodestilátu byl 67,3 % plochy v TIC a v případě destilace vodní parou byl 81,16 % plochy v TIC. Oproti námi naměřeným hodnotám jsou tyto dvojnásobné. Naopak, v našich EO byl stanoven dvojnásobný obsah seskviterpenů, neboť literatura uvádí 2,93 % plochy v TIC v extraktu z destilace vodní parou a 4,68 % plochy v TIC v extraktu z hydrodestilace. Obě parní destilace dosahují podobného výsledku při porovnání obsahu oxidovaných seskviterpenů. V případě hydrodestilace je námi analyzované množství oxidovaných seskviterpenů čtyřnásobně vyšší.

Behnaz Tohidi (2016) [64] taktéž publikoval data o tymiánovém oleji, získaném pouze hydrodestilací sušeného tymiánu obecného (*Thymus vulgaris* L.). Tymián byl sbírán v různých regionech Íránu. Vzorek tymiánu byl sušen 7 dní při pokojové teplotě. K analýze pomocí GC/MS byla použita chromatografická kolona HP-5MS.Výtěžek hydrodestilace byl 1,73 % plochy v TIC. Nejvíce zastoupenou složkou byl tymol (39,5 % plochy v TIC), což přibližně odpovídá i obsahu tymolu v našem extraktu. Dále byl identifikován *p*-cymen (12,8 %), γ-terpinen (10,9 % plochy v TIC). Náš extrakt obsahoval 7,89 % plochy v TIC *o*-cymen a naopak více γ-terpinenu (16,29 % plochy v TIC). Dále bylo analyzováno 4,2 % karvakrolu a 2,67 % linaloolu. Obsah karvakrolu v našem extraktu byl zanedbatelný, naopak obsah linaloolu byl vyšší, a to 3,19 % plochy v TIC.

Při porovnání experimentálních dat s údaji z literatury je patrné, že naše tymiánové oleje získané HD i SD obsahují rozdílné množství identifikovaných látek. Stejně tak dosahuje destilační proces i odlišné výtěžnosti. Důvodů pro tyto rozdíly může být několik. Chemické

složení esenciálních olejů je totiž ovlivněno mnoha vnějšími faktory, včetně klimatu. Některé sloučeniny se v rostlině hromadí v určitém období, odpovídajícímu životnímu cyklu a enviromentálním změnám. Dále může být složení ovlivněno podnebím, hnojením, charakterem půdy, v níž je rostlina pěstována a obdobím sklizně. Klíčová je také úprava rostliny před izolací esenciálního oleje. Sušením rostliny může dojít ke změnám složení oleje i k ovlivnění jeho výtěžnosti. Vyšší výtěžnosti dosahují destilace sušených rostlin než čerstvých, protože se počítá s hmotností sušené rostliny, zbavené vody. Tyto faktory ovlivňují obsah i jednotlivých látek, zastoupených v esenciálním oleji.

3.3 Porovnání metod z hlediska výtěžků oleje

Z navážky 75 g čerstvého tymiánu bylo destilací vodní parou získáno 0,23 g EO, což odpovídá 0,305 % výtěžku. Při totožné navážce vzorku bylo hydrodestilací získáno 0,21 g oleje, s výtěžkem 0,283 %. Výtěžky esenciálního oleje byly počítány dle vztahu (3).

$$výtěžek\ EO\ (\%) = \frac{hmotnost\ \ získaného\ EO\ (g)}{hmotnost\ \ rostlinného\ materiálu\ (g)} \cdot 100 \qquad (3)$$

Z hlediska výtěžků si stojí obě destilační metody podobně. Mírně vyššího výtěžku však dosahuje destilace vodní parou, což potvrzuje i literatura. Důvodem může být nižší teplotní zatížení silic.

4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše, týkající se problematiky esenciálních olejů. V teoretické části bylo charakterizováno jejich chemické složení a vlastnosti. Rostliny jsou zdrojem stovky látek. Z nejvýznamnějších jsou to silice, které se dají získat ve formě esenciálního oleje nebo hydrolátu. Esenciální oleje jsou těkavé kapaliny s mnohdy aromatickou vůní. Jejich použití má dlouholetou tradici. Díky svým blahodárným vlastnostem se využívají ve farmacii, medicíně, kosmetice i v potravinářském průmyslu.

Dále se práce zaměřuje na metody izolace esenciálních olejů a způsoby jejich analýzy. Způsobů jak izolovat takovýto olej z rostlinného materiálu existuje celá řada. Nejčastěji se ale setkáváme s destilačními technikami, popřípadě s mnohem sofistikovanějšími extrakcemi. Po separaci olejové fáze z destilátu následuje analýza pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Ta nám umožní zjistit, jaké těkavé látky obsahuje daný esenciální olej.

Volba metody izolace závisí na charakteru izolované látky a na druhu rostliny. Destilace vodní parou je velmi rozšířená, rychlá a nenáročná na zařízení. Hydrodestilace se daleko častěji používá v průmyslovém měřítku, avšak její nevýhodou je dlouhá doba destilace a fakt, že může dojít k tepelné a chemické degradaci vzorku.

V experimentální části práce bylo provedeno srovnání dvou metod izolace esenciálního oleje z tymiánu obecného (*Thymus vulgaris* L.), a to hydrodestilace a destilace vodní parou. Posuzovány byly kvalitativní a kvantitativní parametry extraktů. Extrahované oleje byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Práce se dále zaměřuje na srovnání složení silic získaných z tymiánu obecného (*Thymus vulgaris* L.) s literaturou.

Analýzou oleje získaného hydrodestilací a parní destilací vzorku tymiánu obecného a porovnáním naměřených dat byly zjištěny rozdíly ve složení. Co se týká počtu identifikovaných látek, hydrodestilace poskytovala větší počet složek, hlavně oxidovaných a neoxidovaných monoterpenů, seskviterpenů, alkoholů a esterů. Porovnáním ploch píků v chromatogramech bylo zjištěno, že parní destilací se získaly silice s vyšším obsahem monoterpenických sloučenin, zatímco silice získané hydrodestilací byly bohatší na oxidované monoterpeny. Hydrodestilát obsahoval čtyřnásobně více oxidovaných seskviterpenů, alkoholů a esterů a dvojnásobně více seskviterpenů, při porovnání ploch píků v TIC. Z čehož vyplývá, že hydrodestilací získáme více kyslíkatých složek. Tento rozdíl nelze jednoznačně objasnit,

protože tymián byl pěstován a sbírán za stejných podmínek pro obě destilační metody. Taktéž úprava rostliny před destilacemi byla stejná, tudíž nemůže hrát roli například sušení rostliny. To by mohlo znamenat, že při hydrodestilaci dochází k hydrolýzám terpenických sloučenin vlivem styku rostlinného materiálu s vodou. Dále může docházet k různým samovolným enzymatickým pochodům uvnitř rostliny, které způsobí vznik oxidovaných látek u HD. Získání většího množství látek s vyšším bodem varu pomocí hydrodestilace, které se z rostlinného materiálu dostávají až při teplotě nad 70 °C, se zdá být výhodou. Dále byly porovnávány výtěžky EO z obou destilací. Byl potvrzen fakt, že výtěžnost EO získaného hydrodestilací je mírně nižší než výtěžnost při destilaci vodní parou.

Při porovnání výsledků analýzy získaných esenciálních olejů s literaturou byly zjištěny odlišnosti jak ve složení esenciálního oleje, tak i ve výtěžnosti celého procesu. Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišnou úpravou vzorku tymiánu před destilací. Lišilo se i místo pěstování a doba sběru rostliny, což také mohlo vést k rozdílnému složení získaného esenciálního oleje. Složení a množství látek, obsažených v rostlině, totiž kolísá jak v době vývinu rostliny, tak i v průběhu 24 hodin.

5 POUŽITÁ LITERATURA

[1] BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, (94), 223– 253.

[2] CALO, J. R., P. G. CRANDALL, C. A. O'BRYAN a S. C. RICKE. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*. 2015, (54), 111-119.

[3] HUANGYONG, L., Ch. CHANGSHUI a C. XIUFANG. Essential oils-oriented chiral esters as potential pesticides: Asymmetric syntheses, characterization and bio-evaluation. *Industrial Crops and Products*. 2015, (76), 432-436.

[4] PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*. 2015, (76), 174-187.

[5] BACÍLKOVÁ, B. a H. PAULUSOVÁ. *Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál*. Národní archiv, Praha, 2012.

[6] LIN, P., J. J. LEE a I. CHANG. Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against Escherichia coli. *Journal of food and drug analysis*. 2016, (24), 464-470.

[7] BARROS, A., P. A. T. FERREIRA, A. A. CRAVEIRO a J. E. S. MENEZES. Chemical composition and functional properties of essential oils from Mentha species. *Industrial Crops and Products*. 2015, (76), 174-187.

[8] SACCHETTI, G., S. MAIETTI, M. MUZZOLI, M. SCAGLIANTI, S. MANFREDINI, M. RADICE a R. BRUNI. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 2005, (91), 621-632.

[9] BUSTAMANTE, J., S. STEMPVOORT, M. GARCÍA-GALLARRETA, J. A. HOUGHTON, H. K. BRIERS, V. L. BUDARIN, A. S. MATHARU a J. H. CLARK. Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. *Journal of Cleaner Production*. 2016, (137), 598-632.

[10] FENGLI, Ch., D. XINQI, Z. YUANGANG a L. YANG. A new approach for preparation of essential oil, followed bychlorogenic acid and hyperoside with microwave-assistedsimultaneous distillation and dual extraction (MSDDE) fromVaccinium uliginosum leaves. *Industrial Crops and Products*. 2015, (77), 809-826.

[11] BAŞER, K. H. C. a G. BUCHBAUER. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Spojené státy americké: CRC Press, 2010, 1112 s. ISBN 978-1-4200-6315-8.

[12] HUBÍK, J.*Obecná farmakognosie: 2. díl - sekundární látky*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1978, 275 s.

[13] ASBAHANI, A. E., K. MILADI, W. BADRI, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, (483), 220-243.

[14] JIRÁSEK, V. a F. STARÝ. *Atlas léčivých rostlin*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986, 368 s.

[15] VEIT, M. Léčivá kosmetika z přírody: jak si vyrobit hojivé masti, oleje a esence. Praha: Grada, 2014,200 s. ISBN 978-80-247-4586-2.

[16] JAHODÁŘ, L. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 2., upr. a dopl. Praha: Karolinum, 2009, 280 s. ISBN 978-80-246-1791-6.

[17] KORBELÁŘ, J. a Z. ENDRIS. *Naše rostliny v lékařství*. 4. rozšířené a zcela přepracované vydání. Praha: Avicenum, 1974, 496 s.

[18] ZRUBECKÁ, A. a I. AŠENBRENEROVÁ. *Aromaterapie v životě ženy*. Praha: Mladá fronta, 2008. Maminka (Mladá fronta). ISBN 978-80-204-1938-5.

[19] HUI, Y. H. *Handbook of fruit and vegetable flavors*. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2010, 1095 s. ISBN 978-0-470-22721-3.

[20] REVERCHON, E., F. SENATORE. Isolation of Rosemary oil: comparison between hydrodistillation and supercritical CO_2 extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 1992, (7), 227-230.

[21] MASANGO, P. *Towards understanding steam distillation of essential oils by differential quantification of principa lcomponents using capillary gas chromatography*. PhD thesis, University of Surrey; 2001.

[22] HANDA, S. S., S. P. S. KHANUJA, G. LONGO a D. D. RAKESH. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: International centre for science and high technology, 2008, 260 s.

[23] JANDA, V. *Využití hydrodestilace pro extrakci těkavých látek z bylin*. Pardubice, 2015. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.

[24] SHIWAKOTI, S., V. D. ZHELJAZKOV, V. SCHLEGEL a Ch. L. CANTRELL. Growing spearmint, thyme, oregano, and rosemary in NorthernWyoming using plastic tunnels. *Industrial Crops and Products*. 2016, (94), 251-258.

[25] MASANGO, P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*. 2005, (13), 833-839.

[26] CARRASCO, A., V. TOMAS, J. TUDELA a M. G. MIGUEL. Comparative study of GC-MS characterization, antioxidant activity and hyaluronidase inhibition of different species of Lavandula and Thymus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 2016, **31**(1), 57-69. DOI: 10.1002/ffj.3283. ISSN 08825734. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.3283

[27] BOUTEKEDJIRET, C., F. BENTAHAR, R. BELABBES a J. M. BESSIERE. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*. 2003, **18**(6), 481-484. DOI: 10.1002/ffj.1226. ISSN 0882-5734. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1226

[28] KHANAVIA, M., A. HADJIAKHOONDI, G. AMIN, Y. AMANZADEH, A. RUSTAIYAN a A. SHAFIEEB. Comparison of the Volatile Composition of Stachys persica Gmel. and Stachys byzantina C. Koch. Oils Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation. *Z. Naturforsch*. 2004, (59), 463-467.

[29] BENDIF, H., M. BOUDJENIBA, M. Djamel. MIARA, et al. Rosmarinus eriocalyx: An alternative to Rosmarinus officinalis as a source of antioxidant compounds. *Food Chemistry*. 2017, (218), 78-88.

[30] JEYARATNAM, N., A. H. NOUR, R. KANTHASAMY, A. H. NOUR, A.R. YUVARAJ a J. O. AKINDOYOA. Essential oil from Cinnamomum cassia bark through hydrodistillationand advanced microwave assisted hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*. 2016, (92), 57-66.

[31] TIMUNG, R., Ch. R. BARIK, S. PUROHIT a V. V. GOUD. Composition and anti-bacterial activity analysis of citronella oilobtained by hydrodistillation: Process optimization study. *Industrial Crops and Products*. 2016, (94), 178-188.

[32] VAIČIULYTE, V., K. LOŽIENE, R. TARAŠKEVIČIUS a R. BUTKIENE. Variation of essential oil composition of Thymus pulegioides in relationto soil chemistry. *Industrial Crops and Products*. 2017, (95), 422-433.

[33] BAJER, T., V. JANDA, P. BAJEROVÁ, D. KREMR, A. EISNER a K. VENTURA. Chemical composition of essential oils from plantago lanceolata L. leaves extracted by hydrodistillation. *Journal of Food Science and Technology*. 2016, **53**(3), 1576-1584. DOI: 10.1007/s13197-015-2083-x. ISSN 0022-1155. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s13197-015-2083-x

[34] AL HAFI, M., M. EL BEYROUTHY, N. OUAINI, D. STIEN, D. RUTLEDGE a S. CHAILLOU. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Origanum libanoticum , Origanum ehrenbergii , and Origanum syriacum Growing Wild in Lebanon. *Chemistry*. 2016, **13**(5), 555-560. DOI: 10.1002/cbdv.201500178. ISSN 16121872. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/cbdv.201500178

[35] CAPUTO, L., L. SOUZA, S. ALLOISIO, L. CORNARA a V. DE FEO. Coriandrum sativum and Lavandula angustifolia Essential Oils: Chemical Composition and Activity on Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, **17**(12), 1999-. DOI: 10.3390/ijms17121999. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: http://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/1999

[36] DENG, J., Z. XU, Ch. XIANG, J. LIU, L. ZHOU, T. LI, Z. YANG a Ch. DING. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017, **37**, 328-334. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2017.01.023. ISSN 13504177. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417717300330

[37] ALBUQUERQUE, B. R., M.A. PRIETO, M. F. BARREIRO, A. RODRIGUES, T. P. CURRAN, L. BARROS a I. C.F.R. FERREIRA. Catechin-based extract optimization obtained from Arbutus unedo L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Industrial Crops and Products*. 2017, **95**, 404-415. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.10.050. ISSN 09266690. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901630735X

[38] LUKIĆ, I., I. BUDIĆ-LETO, M. BUBOLA, K. DAMIJANIĆ a M. STAVER. Pre-fermentative cold maceration, saignée, and various thermal treatments as options for modulating volatile aroma and phenol profiles of red wine. *Food Chemistry*. 2017, **224**, 251-261. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.12.077. ISSN 03088146. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616320982

[39] SAFDAR, M. N., T. KAUSAR, S. JABBAR, A. MUMTAZ, K. AHAD a A. A. SADDOZAI. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (Citrus reticulate L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016, , 1-13. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.07.010. ISSN 10219498. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949816301272

[40] RODRÍGUEZ-SOLANA, R., L. VÁZQUEZ-ARAÚJO, J. M. SALGADO, J.M. DOMÍNGUEZ a S. CORTÉS-DIÉGUEZ. Optimization of the process of aromatic and medicinal plant maceration in grape marc distillates to obtain herbal liqueurs and spirits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016, **96**(14), 4760-4771. DOI: 10.1002/jsfa.7822. ISSN 00225142. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.7822

[41] MORSY, N. F. S. A comparative study of nutmeg (Myristica fragrans Houtt.) oleoresins obtained by conventional and green extraction techniques. *Journal of Food Science and Technology*. 2016, **53**(10), 3770-3777. DOI: 10.1007/s13197-016-2363-0. ISSN 0022-1155. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s13197-016-2363-0

[42] FRANCA, J. V., M. S. Ramos QUEIROZ, B. P. DO AMARAL, N. K. SIMAS, N. C. B. DA SILVA a I. C. R. LEAL. Distinct growth and extractive methods of Acmellaoleracea (L.) R.K. Jansen rising different concentrations of spilanthol: An important bioactive compound in human dietary. *Food Research International*. 2016, **89**, 781-789. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.09.018. ISSN 09639969. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996916304094

[43] MONCADA, J., J. A. TAMAYO a C. A. CARDONA. Techno-economic and environmental assessment of essential oil extraction from Citronella (Cymbopogon winteriana) and Lemongrass (Cymbopogon citrus): A Colombian case to evaluate different extraction technologies. *Industrial Crops and Products*. 2014, **54**, 175-184. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.01.035. ISSN 09266690. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669014000429

[44] GARCÍA-PÉREZ, J. S., F. ROBLEDO-PADILLA, S. P. CUELLAR-BERMUDEZ, A. ARÉVALO-GALLEGOS, R. PARRA-SALDIVAR, R. ZAVALA-YOE, R. A. RAMIREZ-MENDOZA a H. M.N. IQBAL. Thermodynamics and statistical correlation between supercritical-CO2 fluid extraction and bioactivity profile of locally available Mexican plants extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017, **122**, 27-34. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.12.002. ISSN 08968446.Dostupnétakéz: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844616305277

[45] ZEKOVIĆ, Z., O. BERA, S. ĐUROVIĆ a B. PAVLIĆ. Supercritical fluid extraction of coriander seeds: Kinetics modelling and ANN optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017, **125**, 88-95. DOI: 10.1016/j.supflu.2017.02.006. ISSN 08968446. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844616303382

[46] SANTOS, Ê. R.M., H. N.M. OLIVEIRA, E. J. OLIVEIRA, S. H.G. AZEVEDO, A. A. JESUS, A. M. MEDEIROS, C. DARIVA a E. M.B.D. SOUSA. Supercritical fluid extraction of Rumex Acetosa L. roots: Yield, composition, kinetics, bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017, **122**, 1-9. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.11.019. ISSN 08968446. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844616303734

[47] SALEA, R., B. VERIANSYAH a R. R. TJANDRAWINATA. Optimization and scale-up process for supercritical fluids extraction of ginger oil from Zingiber officinale var. Amarum. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017, **120**, 285-294. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.05.035. ISSN 08968446. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844616301504

[48] DE OLIVEIRA, M. S., W. A. DA COSTA, D. S. PEREIRA, et al. Chemical composition and phytotoxic activity of clove (Syzygium aromaticum) essential oil obtained with supercritical CO2. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2016, **118**, 185-193. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.08.010. ISSN 08968446. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844616302534

[49] LEPOJEVIĆ, I., Ž. LEPOJEVIĆ, B. PAVLIĆ, M. RISTIĆ, Z. ZEKOVIĆ a S. VIDOVIĆ. Solid-liquid and high-pressure (liquid and supercritical carbon dioxide) extraction of Echinacea purpurea L. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2017, **119**, 159-168. DOI: 10.1016/j.supflu.2016.09.002. ISSN 08968446. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844616302820

[50] MLEJOVÁ, V., P. PAVLÍKOVÁ, P. DOBIÁŠ, M. ADAM a K. VENTURA. Aplikace mikroextrakce tuhou fází pro analýzu bylinných silic. *Chemické listy*. 2010, (104), 166-171.

[51] HORÁK, T., Jiří Č., M. JURKOVÁ, P. ČEJKA, V. KELLNER, J. DVOŘÁK a D. HAŠKOVÁ. *Head-space Analysis in Brewing Analytics*. In: *ResearchGate* [online]. 2012 [cit. 2017-03-08]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/236839183_Head-space_analysis_in_brewing_analytics

[52] CHURÁČEK, J.. *Analytická separace látek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990.

[53] SIMAS, D. L.R., S. H.B.M. DE AMORIM, F. R.V. GOULART, C. S. ALVIANO, D. S. ALVIANO a A. J. R. DA SILVA. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. *Industrial Crops and Products*. 2017, **98**, 108-115. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.01.026. ISSN 09266690. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669017300262

[54] MURATHAN, Z. T., M. ZARIFIKHOSROSHAHI a N. E. KAFKAS. Determination of fatty acids and volatile compounds in fruits of rosehip(Rosa L.) species by HS-SPME/GC-MS and Im-SPME/GC-MS techniques. *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY*. 2016, **40**, 269-279. DOI: 10.3906/tar-1506-50. ISSN:1300011x. Dostupné také z:http://online.journals.tubitak.gov.tr/openDoiPdf.htm ?mKodu=tar-1506-50

[55] SAN, A. T., D. C. JOYCE, P. J. HOFMAN, et al. Stable isotope dilution assay (SIDA) and HS-SPME-GCMS quantification of key aroma volatiles for fruit and sap of Australian mango cultivars. *Food Chemistry*. 2017, **221**, 613-619. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.130. ISSN 03088146. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616319793

[56] VAS, G., a K. VÉKEY. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*. 2004, (39), 233-254.

[57] ASADOLLAHI-BABOLI, M., A. AGHAKHANI a V. BIKDELOO. Application of Polyamide Nanofibers, SPME/GC-MS, and Chemometrics for Comprehensive Analysis of Volatiles in Thymus vulgaris L. and Thymus serpyllum L. *Food Analytical Methods*. 2016, **9**(2), 528-536. DOI: 10.1007/s12161-015-0224-5. ISSN 1936-9751. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s12161-015-0224-5

[58] NIE, J., G. YU, Z. SONG, X. WANG, Z. L., Y. SHE a M. LEE. Microwave-assisted deep eutectic solvent extraction coupled with headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS for the analysis of volatile compounds from tobacco. *Anal. Methods*. 2017, **9**(5), 856-863. DOI: 10.1039/C6AY03076A. ISSN 1759-9660. Dostupné také z: http://xlink.rsc.org/?DOI=C6AY03076A

[59] HOLZBECHER, J. CHURÁČEK a kolektiv. *Analytická chemie*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1987, 664 s.

[60] HOLČAPEK, M. a M. LÍZA. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze: přednášky 2017* [online]. Pardubice, 2017 [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php

[61] HU, Ch., Y. LIANG, F. GUO, X. LI a W. WANG. Determination of Essential Oil Composition from Osmanthus fragrans Tea by GC-MS Combined with a Chemometric Resolution Method. *Molecules*. 2010, **15**(5), 3683-3693. DOI: 10.3390/molecules15053683. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: http://www.mdpi.com/1420-3049/15/5/3683/

[62] HORKÝ, J., B. BOČEK a L. ŠERÁ. Registrační čísla chemical abstracts překonávají další mezník. *CHEMagazín*. 2009, **19**(5), 20.

[63] WESOLOWSKA, A., M. GRZESZCZUK a D. JADCZAK. Comparison of the Chemical Composition of Essential Oils Isolated by Water-steam Distillation and Hydrodistillation from Garden Thyme (Thymus vulgaris L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2016, **19**(4), 832-842. DOI: 10.1080/0972060X.2015.1025296. ISSN 0972-060x. Dostupné také z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0972060X.2015.1025296

[64] TOHIDI, B., M. RAHIMMALEK a A. ARZANI. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*. 2017, **220**, 153-161. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.203. ISSN 03088146. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461631603X