

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Využití SFE a analýza růží

Lucie Parezová

Bakalářská práce

2018

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Parezová**
Osobní číslo: **C14088**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **Využití SFE a analýza růží**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

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

1. Proveďte literární rešerši zabývající využitím extrakce nadkritickou tekutinou.
2. Zaměřte se na analýzu růží a esenciálních olejů z nich získaných.
3. V experimentální části nalezněte vhodné podmínky pro extrakci látek obsažených v okvětních plátcích růží pomocí nadkritického oxidu uhličitého a podmínky pro GC-MS analýzu těchto extraktů.
4. Naměřené výsledky porovnejte s údaji dostupnými v odborné literatuře.
5. Sepište závěrečnou zprávu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedláček, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

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

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 6. 2018

Lucie Parezová

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Aleši Eisnerovi, Ph. D. za rady při zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Pavle Kašparové za velkou pomoc při práci a vedení během experimentální části. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu.

ANOTACE

Práce je věnována extrakci růží nadkritickou kapalinou a následné analýze pomocí GC-MS. Teoretická část je zaměřena na extrakci nadkritickou tekutinou a její možné využití. Experimentální část se zabývá extrakcí a následnou analýzou reálných vzorků růží.

KLÍČOVÁ SLOVA

extrakce nadkritickou kapalinou (SFE), růže, esenciální oleje, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

TITLE

The using of SFE and analysis of roses

ANNOTATION

The work deals with extracting roses by using supercritical fluid extraction and analyzing by GC-MS. The theoretical part is focused on extraction with supercritical fluid and its use. The experimental part is about extraction and following analysis of real rose samples.

KEYWORDS

supercritical fluid extraction, roses, essential oil, gas chromatography, mass spectrometry

OBSAH

ÚVOD.....	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 Separační procesy.....	12
1.1.1 Extrakce.....	12
1.2 Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE).....	12
1.2.1 Historie	12
1.2.2 Nadkritická tekutina	13
1.2.3 Extrakce nadkritickou tekutinou.....	16
1.2.4 Instrumentace extrakce nadkritickou tekutinou.....	17
1.2.5 Extrakce esenciálních olejů pomocí nadkritické tekutiny	17
1.2.6 Porovnání extrakce nadkritickou tekutinou s konvenčními technikami.....	18
1.3 Plynová chromatografie	22
1.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)	23
1.5 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)	23
1.6 Kvalitativní analýza	23
1.7 Růže.....	23
1.8 Esenciální oleje	24
1.8.1 Esenciální oleje z růží.....	24
1.8.2 Izolace silic	24
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
2.1 Použité přístroje a chemikálie	27
2.1.1 Přístroje.....	27
2.1.2 Chemikálie.....	27
2.2 Příprava vzorku	27
2.3 Extrakce.....	28
2.3.1 Optimalizace extrakce	28
2.3.2 Postup extrakce.....	30
2.4 Analýza vzorků	30
2.5 Výsledky analýzy	30
2.5.1 Rosa Deep Purple	31
2.5.2 Rosa Malibu.....	32
2.5.3 Rosa Mariyo	33

2.6	Vyhodnocení výsledků.....	34
3	ZÁVĚR.....	36

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Fázový diagram CO ₂	14
Obrázek 2 Difúzní chování oxidu uhličitého	15
Obrázek 3 Diagram SFE systému	17
Obrázek 4 Schéma plynového chromatografu	22
Obrázek 5 Schéma hmotnostního spektrometru	23
Obrázek 6 Clevengerova aparatura pro hydrodestilaci	25
Obrázek 7 Schéma SFE extraktoru Se-1 (SEKO s.r.o. Brno).....	28
Obrázek 8 Chromatogram extraktu z růže <i>Rosa Deep Purple</i>	31
Obrázek 9 Chromatogram extraktu růže <i>Rosa Malibu</i>	32
Obrázek 10 Chromatogram extraktu z růže <i>Rosa Maryio</i>	33
Tabulka 1 Láty a jejich kritické (T _c a p _c) parametry.....	15
Tabulka 2 Látky identifikované v extraktech z SFE, parní destilace (SD) a extrakce do alkoholu	20
Tabulka 3 Extrakční podmínky optimalizace	29
Tabulka 4 Teplotní program pro analýzu pomocí GC-MS.....	30
Tabulka 5 Identifikované látky z extraktu <i>Rosa Deep Purple</i>	31
Tabulka 6 Identifikované látky v chromatogramu extraktu z <i>Rosa Malibu</i>	32
Tabulka 7 Identifikované látky z chromatogramu extraktu z <i>Rosa Mariyo</i>	33
Tabulka 8 Látky identifikované v extraktech a jejich procentuální zastoupení	34

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

AED – atomový emisní detektor (atomic emission detector)

ECD – detektor elektronového záchytu (electron capture detector)

FID – plamenový ionizační detektor (flame ionization detector)

GC – plynová chromatografie (gas chromatography)

GC-FID – plynová chromatografie spojená s plamenovým ionizačním detektorem

GC-MS – plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem (gas chromatography-mass spectrometry)

MS – hmotnostní spektrometr (mass spectrometry)

PID – fotoionizační detektor (photoionization detector)

SFE – extrakce nadkritickou kapalinou (super fluid extraction)

SFC – nadkritická kapalinová chromatografie (super fluid chromatography)

SP – parní destilace (steam distillation)

T_c , p_c – kritická teplota a kritický tlak

TCD – tepelně-vodivostní detektor (thermal conductivity detector)

ÚVOD

Extrakce nadkritickou tekutinou je technologie, která má potenciál nabídnout nové možnosti v průmyslu. Vzhledem k narůstajícím požadavkům na čistotu látek má SFE velký potenciál například v potravinářství, farmacii či kosmetice. Tato práce je zaměřena na těkavé látky obsažené v růžích (*Rosa Deep Purple*, *Rosa Malibu*, *Rosa Mariyo*) a jejich extrakci nadkritickým oxidem uhličitým s následnou analýzu.

V úvodu experimentální části práce je popis separačních metod, zaměřených na extrakci nadkritickou tekutinou. Především se zabývá samotným pojmem nadkritická tekutina, vývojem metody SFE z hlediska historie, instrumentace této metody a následné využití při extrakci esenciálních olejů a její porovnání s konvenčními metodami příprav. Tyto extrakty jsou poté analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Závěrečná část je věnována esenciálním olejům z růže a izolaci látek v nich obsažených.

Experimentální část se zabývá přípravě reálných vzorků, jejich extrakci a následné analýze. Nejprve jsou uvedeny přístroje a chemikálie, které byli během celého pokusu použity. Následuje příprava vzorků, tedy sušení plátků růže a jejich mletí. Nejvíce je ovšem tato část práce věnována samotné extrakci a analýze vzorků. U extrakce je uvedena optimalizace celé metody a poté postup, kterým byly látky extrahovány. Analýza vzorků byla provedena pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Závěrem jsou uvedeny výsledky reálných vzorků a jejich porovnání s údaji dostupnými v odborné literatuře.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Separační procesy

Většina běžných separačních metod používaných v chemickém průmyslu využívá poznatku: pokud se vícesložkovému dvoufázovému systému dá dostatečný čas, dosáhne stacionárního stavu zvaného rovnováha – složení jedné fáze je odlišné od složení fáze druhé. Je to přírodní zákon, který umožňuje oddělování tekutých směsí destilací, extrakcí či dalšími difúzními operacemi.

Příklady separačních metod:

Destilace – metoda separace založená na rozdílném složení kapalně směsi a z ní vytvořené páry. Rozdíl ve složení je způsoben různými tlaky par nad kapalinou.

Absorpce – přenos jedné nebo více složek plynné fáze do fáze kapalně, ve které je plynná složka rozpustná¹.

1.1.1 Extrakce

Extrakce (lat. extrahere = vytáhnout něco ven) je definována jako separační metoda, kde je požadovaná sloučenina rozpuštěna v nemísitelném extrakčním činidle (plynu či kapalině). Složka je selektivně odstraněna chemickými nebo fyzikálními prostředky, jako například lisování semen k oddělení olejů. Extrakční metody se dělí podle zúčastněných frakcí na extrakci kapalinou kapalinou (dělicí nálevka, kontinuální extraktory) a extrakci kapalinou pevnou látkou (Soxhletův extraktor, extrakce na tuhé fázi, mikroextrakce tuhou fází)^{2, 3, 4}.

1.2 Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE)

Během uplynulých 20 let se kapaliny v nadkritickém stavu používaly v analytických postupech jako mobilní fáze v chromatografii, což umožnilo vznik nadkritické chromatografie (SFC). Pro selektivní extrakci analytů z různých surovin fungují jako rozpouštědla. Nadkritické tekutiny, zejména nadkritický oxid uhličitý, se objevují jako alternativa k organickým rozpouštědlům v laboratoři a v průmyslu. V důsledku toho se v posledních letech významně posunul vývoj procesů a zařízení využívající nadkritickou technologii. Vysoký výkon rozpouštědla, schopnost získat extrakty bez rozpouštědel a odolnost procesů s nadkritickými tekutinami jsou hlavními výhodami při využití SFE extrakce⁵.

1.2.1 Historie

Extrakce rozpouštědlem je jednou z nejstarších metod separace. Již v roce 1822 Cagniard de la Tour dokázal existenci kritické teploty pro každou čistou látku, nad níž

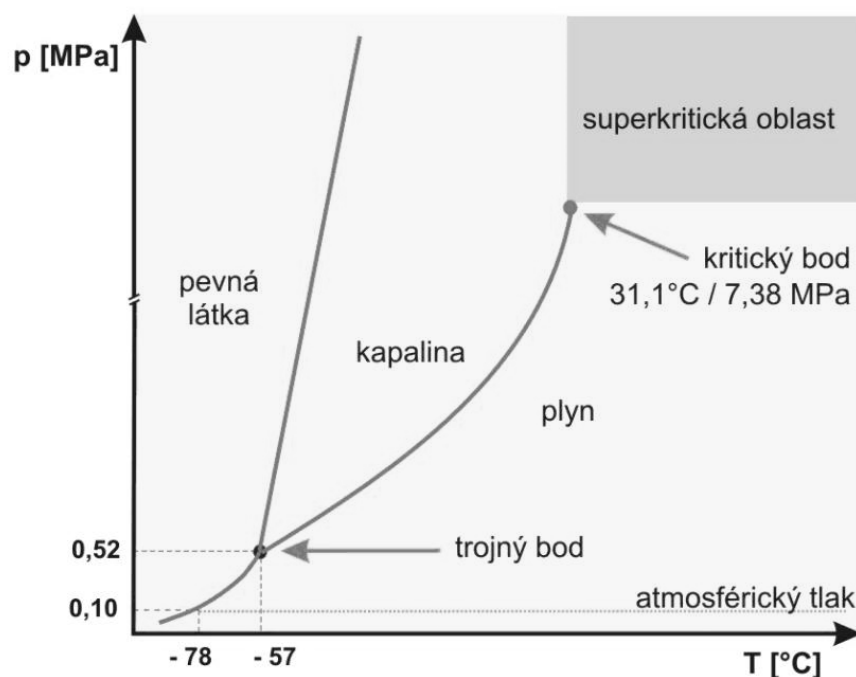
se může vyskytovat pouze jako tekutina. Ve skutečnosti byl mnoho let kritický bod označován jako Cagniard de la Tour bod. Nadkritickému oxidu uhličitému se věnoval již roku 1869 v časopise *Philosophical Transactions of the Royal Society* Dr. Thomas Andrews, viceprezident Queen's College. Ten zpracoval rozsáhlou studii o fázovém chování oxidu uhličitého a vytvořil také pojem „kritický bod“. Popisuje experimentální aparaturu a své pozorování kritických vlastností oxidu uhličitého. Hodnoty Dr. Andrewse pro kritický bod oxidu uhličitého, 30,92 °C a 74,0 bar, jsou velmi blízko k dnes naměřeným hodnotám, 31,1 °C a 73,8 bar^{5,6}.

Roku 1879 byl v časopise *Royal Society of London* poprvé ohlášena Hannayem a Hogarthem schopnost nadkritické tekutiny rozpustit relativně netěkavé látky. Hannay a Hogarth popsali své experimenty, prováděné v modifikované aparatuře Dr. Andrewse. Pozorovali, že změny tlaků způsobují rozpuštění nebo naopak sražení halogenidů kovů (např. chlorid kobaltnatý, jodid draselný či bromid draselný) v ethanolu při teplotách vyšších, než je kritická teplota ethanolu (nad 234 °C). Zvýšení tlaku způsobovalo rozpouštění a snižováním tlaku vznikala sraženina⁷.

Řada raných studií se zaměřovala na fázové chování a charakter rozpouštědla téměř kritického oxidu uhličitého. Nejstarší publikovaná práce o kapalném CO₂ jako rozpouštědle je Goreho (1861). Ten objevil rozpustnost naftalenu a kafru v kapalném CO₂, ale vyhodnotil, že je oxid uhličitý „velmi slabé rozpouštědlo pro látky obecně.“ K tomuto závěru došel poté, co otestoval pouze malý počet organických sloučenin, z nichž některé mají velmi nízkou rozpustnost^{8,9}.

1.2.2 Nadkritická tekutina

Nadkritickou tekutinu lze definovat jako stav hmoty, ve které je kapalná a plynná fáze nerozlišitelná. Nadkritický stav čisté složky je dosažen při teplotách a tlacích vyšších, než jsou jeho kritické hodnoty (T_c a p_c). Na obrázku 1 je fázový diagram CO₂, který znázorňuje rovnovážné křivky oddělující pevnou, kapalnou a plynnou oblast. Křivka rovnováhy kapaliny a plynu končí kritickým bodem. Za tímto bodem již neexistuje rovnovážná křivka oddělující kapalnou a plynnou oblast. Tato část diagramu se nazývá oblast nadkritických tekutin. Některé vlastnosti nadkritických tekutin mají lepší schopnost extrakce ve srovnání s kapalinami. Přestože má hustotou podobnou kapalině, viskozita a difuzní koeficient se podobají spíše plynu. Kromě toho velmi nízké povrchové napětí umožňuje nadkritickým tekutinám snadné proniknutí do mikroporézního materiálu^{5,9}.



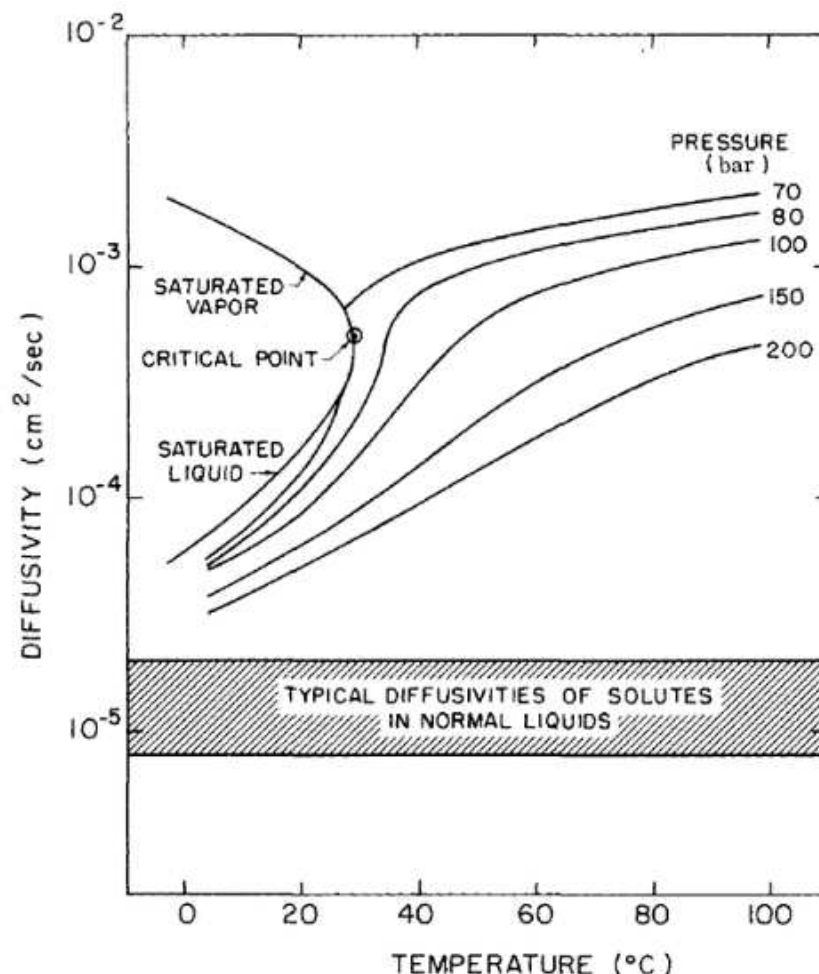
Obrázek 1 Fázový diagram CO_2 ¹⁰

Síla solvatace látky závisí na její hustotě, respektive na její teplotě a tlaku. Hustota nadkritických tekutin úzce souvisí se selektivitou procesu SFE, který lze řídit úpravou pracovních podmínek (teplotou a tlakem), tedy změnou hustoty. U extrakce polárních látek platí, že za izotermických podmínek vede zvýšení tlaku k vyšším výtěžkům extrakce. Tento účinek je přičítán nárůstu hustoty CO_2 a následně i zvýšení jeho rozpouštěcí síly, to však může způsobit nižší selektivitu. Ovšem účinek teploty za isobarických podmínek je složitější vzhledem ke kombinaci dvou dominantních efektů, kterými jsou hustota a tlak par. Hustota se s rostoucí teplotou snižuje – snižuje se rozpustnost, zatímco tlak par rozpuštěné látky se zvyšuje s teplotou – zvyšuje rozpustnost. Dominantní efekt závisí na velikosti obou efektů individuálně. Výsledkem je, že tyto dvě proměnné působí inverzně a ovlivňují výtěžek extrakce⁵.

Nadkritické tekutiny vykazují díky své viskozitě příznivější hydrodynamické vlastnosti pro extrakce než kapaliny. Viskozity nadkritických tekutin jsou závislé na teplotě a tlaku a jsou mezi kapalinami a plyny. Tato vlastnost je zodpovědná za vysokou účinnost SFE. Nízké viskozitní hodnoty a střední hodnoty difuzivity poskytují vysokou penetrační sílu v porézních maticích⁵.

Difúzní koeficient v nadkritických tekutinách je vyšší, než v kapalinách, díky čemuž je přenos hmoty zpravidla zesílen. Obecně se tento koeficient zvyšuje s teplotou a snižuje se s rostoucím tlakem, zejména v blízkosti kritického bodu. Na obrázku 2 je zobrazena difuzivita

oxidu uhličitého v širokém rozmezí teplota-tlak. Pro porovnání je ve spodní části grafu zobrazena běžná difuzivita v organických kapalinách. Koeficient pro oxid uhličitý je přibližně o jeden až dva řády vyšší než difuzivita rozpuštěných látek v kapalinách^{5,9}.



Obrázek 2 Difúzní chování oxidu uhličitého⁹

Poslední vlastností, která ovšem nejvíce ovlivňuje rozpustnost rozpuštěných látek v nadkritických tekutinách, je polarita. Nepochopitelně a málo polární rozpouštědla se středními kritickými teplotami mají omezenou rozpustnost v látkách s vysokou polaritou nebo vysokou molekulovou hmotností. Nadkritický amoniak (NH_3) by byl vhodný jako polární rozpouštědlo, ale je příliš reaktivní. Nadkritický methanol je také vynikající polární rozpouštědlo, ale má vysokou kritickou teplotu⁵.

Tabulka 1 Látky a jejich kritické (T_c a p_c) parametry⁵

Látka	Kritická teplota (K)	Kritický tlak (MPa)
Ethylen	282,55	5,04
Oxid uhličitý	304,25	7,38
Ethan	305,55	4,88

Látka	Kritická teplota (K)	Kritický tlak (MPa)
Propylen	365,05	4,60
Amoniak	405,65	11,35
Methanol	513,38	8,22
Toluen	591,95	4,10
Voda	647,45	22,12

Další možností pro překonání problémů spojených s polárními rozpouštědly, je přidání malých částí jiných rozpouštědel, obvykle nazývané modifikátory, do málo polárních rozpouštědel (např. CO₂), aby se zvýšila jejich rozpouštěcí síla⁵.

CO₂ je nejčastěji používanou kapalinou v nadkritických procesech, protože je levný a nehořlavý. Jednou z hlavních výhod využití CO₂ je to, že je při laboratorní teplotě a tlaku plynný, což zjednodušuje oddělení rozpuštěných látek od rozpouštědla jednoduchým snížením tlaku. Stanovovaná látka bez rozpouštědla lze tedy snadno získat. Nadkritická voda, která má kritickou teplotu 374,2 °C, se testuje na detoxikaci nebezpečných odpadů a reformování uhlovodíků⁹.

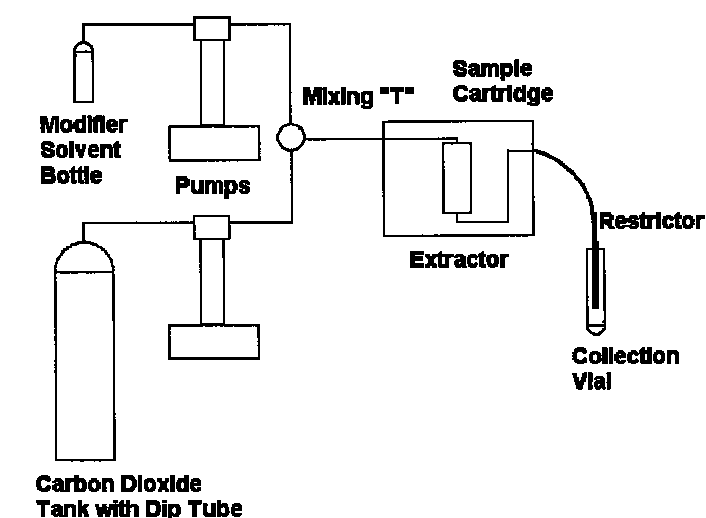
Nadkritický CO₂ má také vysokou difuzitu a mírný kritický tlak a teplotu. Tyto kritické hodnoty činí CO₂ ideální pro extrakci potravin a přírodních produktů. Kvůli nízké polaritě ovšem není schopen rozpouštět polární látky. V takových případech je nutné přidání pomocného rozpouštědla⁵.

1.2.3 Extrakce nadkritickou tekutinou

Při SFE procesu se látky převedou z matrice do nadkritické tekutiny, která je přenesena do extrakční nádoby se záchytnou kapalinou. Nadkritická tekutina se po dekompresi oddělí jako plyn. Účinnost SFE je ovlivňována řadou proměnných. Nejvýznamnější se týkají vlastností tekutiny (polarita, hustota, tlak, teplota, přítomnost modifikátoru a koncentrace modifikátoru), rozpuštěné látky (těkavost, polarita, molekulová hmotnost a koncentrace) a pevné látky (hmotnost vzorku, velikost částic, charakter matrice, přítomnost dalších extrahovatelných látek a stavu vzorku). Dalšími proměnnými jsou dynamické a geometrické faktory (průtok rozpouštědla a doba extrakce), zpracování vzorku (přídavek kapalin, rozpouštědel, derivatizačních činidel a přídavek pevných látek) a typ sbírání analytu (bublání rozpouštědla, sorpce, kryogenní zachytávání a online vazba na detektor nebo chromatograf). Z pohledu vývoje extrakčních procesů s nadkritickými kapalinami je jedním z hlavních hledisek optimalizace provozních podmínek. Optimalizace procesu SFE může být velmi komplexním úkolem kvůli velkému počtu proměnných⁵.

1.2.4 Instrumentace extrakce nadkritickou tekutinou

Typický SFE systém znázorňuje obrázek 3. Proces začíná čistým zdrojem tekutiny, ve většině případech tlakovou nádobou s CO₂. Čerpadlo slouží ke zvýšení tlaku tekutiny na kritický tlak. Extrakční tlak je určen hustotou potřebnou pro rozpuštění cílových látek ze vzorku. Vzorek je uložen v extrakční nádobě, která se ohřeje na extrakční teplotu, která je nad kritickým bodem. Stlačená tekutina se přenesse do extrakční nádoby a nechá se proudit matricí vzorku. Poté jsou extrahované látky převedeny do záchytného systému a CO₂ se po dekompresi uvolní jako plyn¹¹.



Obrázek 3 Diagram SFE systému¹¹

1.2.5 Extrakce esenciálních olejů pomocí nadkritické tekutiny

Použitím různých extrakčních technik lze získat různé produkty. „Concrete“ a „oleoresin“ jsou extrakty získané za použití organických rozpouštědel (jako je hexan) na čerstvé či sušené rostlinné vzorky. Tyto extrakty jsou viskózní a velice barevné. Takto připravený extrakt typicky obsahuje všechny lipofilní sloučeniny, které tvoří rostlinu. „Absolute“ je kapalný produkt získaný zpracováním „concrete“ s ethanolem a následným odstraněním rozpouštědla. Z extraktu jsou takto odstraněny látky rozpustné v alkoholu (vosky, oleje, tuky atd.). Je považován za nejkoncentrovanější formu vonného materiálu. „Těkavý olej“ je kapalný produkt získaný zpracováním „concrete“ parní destilací. „Esenciální olej“ může být definován jako těkavá látka přítomná v rostlinách^{12, 13}.

V Journal of Supercritical Fluids byl roku 1997 uveden článek, který se věnoval využití SFE k extrakci esenciálních olejů a příbuzných produktů z rostlinné hmoty. Uvedl, že extrakce nadkritickým CO₂ esenciálních olejů je jednou z nejrozšířenějších aplikací SFE a shrnul informace z extrakcí z dřívějších studií. V této studii byli uvedeny vhodné parametry pro extrakci esenciálních olejů pomocí SFE a zároveň tabulka rozpustností pro konkrétní

látky. V této tabulce se objevoval např. α -pinen, limonen, oktakosan, kyselina laurová, kyselina palmitová, kyselina stearová, eugenol, 1-hexadekanol. Díky znalosti rozpustnosti můžeme danou látku vyextrahovat či se její extrakci naopak vyhnout¹².

1.2.6 Porovnání extrakce nadkritickou tekutinou s konvenčními technikami

Roku 1992 byl v časopise *Flavour and Fragrance Journal* zveřejněn článek, informující o porovnání esenciálního oleje z rozmarýnu získaného pomocí SFE a hydrodestilace. Bylo extrahováno 200 g rozmarýnu. U SFE byla extrakce prováděna při teplotě 40 °C a tlaku 100 barů. U hydrodestilace trvala extrakce 2 hodiny v Clevengerově aparatuře. Oba extrakty rozmarýnového oleje byly poté analyzovány pomocí GC-MS. Chemická analýza ukázala, že byly shromážděny zhruba tytéž sloučeniny, ale oba oleje měli velmi rozdílné procentuální složení látek. U SFE bylo procentuální zastoupení 15,5 % monoterpenů, 73,7 % kyslíkatých monoterpenů, 6,6 % seskviterpenů, 0,8 % kyslíkatých seskviterpenů a 1,3 % ostatních látek. U hydrodestilace byly tyto skupiny zastoupeny v procentech 36,5 % monoterpenů, 59,4 % kyslíkatých monoterpenů, 2,2 % seskviterpenů, 0,9 % kyslíkatých seskviterpenů a 0,7 % ostatních látek. Kvalitativní test nakonec vyhodnotil esenciální olej získaný pomocí SFE jako lepší, protože měl aroma, které lépe připomínalo vůni listů rozmarýnu používaných k izolaci oleje¹⁴.

Další využívanou technikou pro získání esenciálních olejů je destilace vodní parou. V roce 2017 vyšel v *Journal of Food Engineering* článek, ve kterém byl také porovnán esenciální olej rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*) získaný pomocí extrakce nadkritickou kapalinou, hydrodestilací a destilací s vodní parou. Bylo hodnoceno množství oleje, antioxidační aktivity a chemické složení esenciálních olejů. Použity byly vysušené listy rozmarýnu. Do SFE bylo použito 25 g vzorku při teplotě 40 °C, tlaku 10,34 MPa a průtoku $126,24 \pm 20,82$ ml CO₂ za minutu. Doba extrakce byla 270 min. Antioxidační aktivita byla analyzována pomocí ABTS metody (2,2'-azanis(3-ethylbenzothiazolino-6-sulfonová kyselina). Tato aktivita byla u SFE přibližně čtrnáctkrát vyšší než u ostatních technik. Všechny extrakty byly analyzovány pomocí GC-MS. Vyšší výtěžky byly pozorovány v rozmarýnovém oleji získaném SFE extrakcí. O něco menší výtěžek byl získán destilací s vodní parou a nakonec hydrodestilací. Primárními sloučeninami byl kafr a eukalyptol. V oleji získaném pomocí SFE a hydrodestilací bylo identifikováno 17 sloučenin a v oleji získaném z destilace s vodní parou 19 sloučenin. Extrakt z SFE byl však bohatší na kafr¹⁵.

V časopise *Food Research International* byl v roce 2004 vydán článek, který se zabýval chemickým složením a antimikrobiálními vlastnostmi extraktů majoránky zahradní

(*Origanum majorana*) získaných pomocí SFE, hydrodestilací a extrakcí do ethylalkoholu. Všechny extrakty byly stanoveny pomocí GC-FID a GC-MS. 1000 g sušené a jemně namleté majoránky byl extrahováno pomocí SFE při tlaku 450 barů, teplotě 50 °C, 245 minut při průtoku 7 kg CO₂ za hodinu. Na extrakci do ethylalkoholu byla využita Soxhletova aparatura. Analýza plynovou chromatografií probíhala na chromatografu Shimadzu GC-14A na koloně typu SE30 25 m x 0,25 mm x 0,25 μm s FID detektorem. Vzorky z hydrodestilace a SFE byly analyzovány na GC-MS Hewlett-Packard 5890 na koloně typu Supelcowax 10 60 m x 0,25 mm, 0,25 μm tloušťka filmu. Hlavní nalezenou složkou byl terpinen-4-ol, který byl získán téměř ve stejném množství hydrodestilací a SFE. Plochy píků v procentuálním zastoupení byly 30,3 % hydrodestilace, 16,6 % extrakce do ethylalkoholu a 30,6 % SFE. Další identifikované látky byli například γ-terpinen, linalool, β-karyofylen a další. Dále byly zkoumány antimikrobiální vlastnosti pomocí mikrobiologických testů proti houbám a bakteriím přenášeným potravinami. Extrakty získané z SFE vykazovaly významně silnější antimikrobiální vlastnosti a podporují myšlenku, že tyto výtažky mohou být využívány jako ochucovadla, přírodní barviva či konzervační látky v potravinářském a kosmetickém průmyslu¹⁶.

V časopise Flavour and Fragrance Journal z roku 1997 byl extrahován pomocí nadkritického CO₂ „concrete“ získaný z růže *Rosa damascena*. Extrakce probíhala při tlaku 80 bar a teplotě 40 °C, doba extrakce byla 480 min a průtok CO₂ byl 1,5 kg CO₂ za hodinu. Množství růžového „concrete“ bylo 20 g. Tato metoda extrakce byla porovnána se dvěma dalšími metodami (parní destilace a extrakce do alkoholu)¹⁷. Parní destilace probíhala 3 hodiny podle standardních postupů popsaných v Evropském lékopisu¹⁸. Izolace „absolute“ byla provedena vmícháním růžového „concrete“ do dvakrát větší hmotnosti ethylalkoholu při teplotě 54 °C a tato směs pak byla chlazená na teplotu – 20 °C po dobu 20 hodin a poté zfiltrována za sníženého tlaku a zbavena tak vosků. Takto připravené extrakty (SFE, parní destilace a extrakce do ethylalkoholu) byly analyzovány pomocí GC-MS (Varian, San Fernando, CA), vybavený kolonou DB-5 (J & W Scientific, Folsom, CA) 30 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm. Hlavními detekovanými látkami byly 2-fenylethanol, citronellol a 2-fenylethyl acetát. Další hojně vyskytující se látky, byly n-nonadekan, n-heneikosan a n-heptakosan. Identifikovány byly také alifatické alkoholy s dlouhým řetězcem jako tetradekan-1-ol a hexadekan-1-ol. V tabulce 2 jsou uvedeny všechny identifikované látky získané analýzou všech extraktů pomocí GC-MS. Výrazný rozdíl byl v obsahu 2-fenylethanolu. Extrakt z SFE obsahoval 50,0 %, zatímco extrakt z parní destilace pouze 10,4 %. To bylo způsobeno rozpustností 2-fenylethanolu ve vodě. V extraktu z alkoholu byl obsah této látky

28,3 %. Hodnoty citronellolu byly 26,1 % z parní destilace a 11,4 % z SFE. Extrakce nadkritickým CO₂ poskytla lepší růžový olej ve srovnání s parní destilací a destilací z alkoholu. Navíc SFE produkt obsahoval nižší procento nežádoucích sloučenin¹⁷.

Tabulka 2 Látky identifikované v extraktech z SFE, parní destilace (SD) a extrakce do alkoholu¹⁷

Látka	Kovatsův index DB-5 (30 m)	SFE (plocha %)	SD (plocha %)	Extrakce do alkoholu (plocha %)
Heptan-1-ol	911	0,1	0,1	-
α -Pinen	912	0,2	0,1	0,4
Benzaldehyd	958	0,6	0,1	0,5
β -Pinen	968	0,1	<0,1	0,1
Oktan-3-ol	967	0,1	0,7	1,9
β -Myrcen	988	0,5	0,8	0,7
<i>o</i> -Cymen	1019	0,1	0,1	0,1
Limonen	1028	0,2	0,6	1,3
<i>o</i> -Kresol	1015	0,6	0,1	0,2
<i>p</i> -Ocimen	1046	0,2	0,3	0,3
γ -Terpinen	1056	0,1	0,1	0,1
Oktan-1-ol	1011	0,1	0,1	0,2
Terpinolen	1059	0,1	-	<0,1
Terpinyl acetát	1080	0,2	0,1	0,1
Linalool	1092	0,1	0,2	0,1
Nonan-2-ol	1076	0,1	0,1	0,1
2-Fenylethanol	1038	50,0	10,4	28,3
Růžový oxid	1112	0,1	-	<0,1
Menthon	1129	0,1	0,5	1,2
Pulegol	1131	0,1	0,1	<0,1
Isomenthon	1133	0,1	0,1	0,2
Menthol	1134	0,2	0,1	0,4
Isomenthol	1141	0,1	1,1	3,0
Methylfenyl acetát	1064	0,2	0,2	0,1
Verbenon	1075	2,8	5,6	0,9
Citronellol	1176	11,4	26,1	3,8

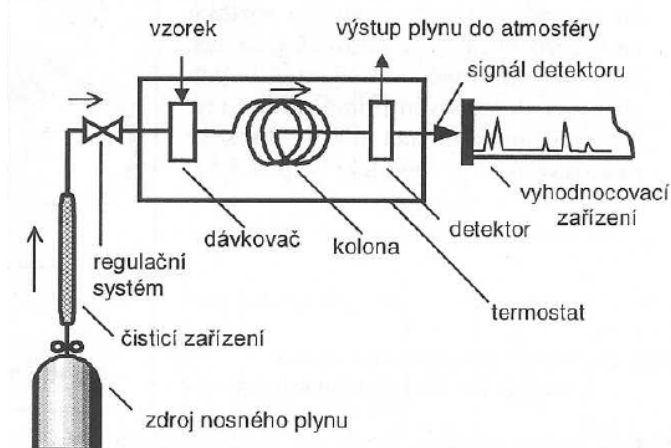
Látka	Kovatsův index DB-5 (30 m)	SFE (plocha %)	SD (plocha %)	Extrakce do alkoholu (plocha %)
Myrtenyl acetát	1233	0,2	0,5	0,5
2-Fenylethyl acetát	1190	7,5	14,8	2,4
Citral	1197	0,3	0,7	0,1
Citronellyl formiát	1249	0,1	-	0,1
Menthyl acetát	1287	0,1	-	1,6
Eugenol	1236	2,9	3,5	0,4
Geranyl acetát	1362	0,3	0,6	-
Methyl eugenol	1337	1,2	2,0	0,4
Karyofylen	1400	0,3	0,8	0,4
α -Guaien	1424	0,2	0,5	0,1
β -Selinen	1440	0,2	0,4	0,1
Valencen	1474	0,3	1,0	0,1
<i>n</i> -Pentadekan	1500	0,4	1,0	-
Methyl tetradekan	1509	0,2	-	<0,1
Tetradekan-1-ol	1652	0,1	0,4	-
<i>n</i> -Heptadekan	1700	1,6	3,5	1,5
Hexadekan-1-ol	1841	2,6	3,3	3,5
<i>n</i>-Nonadekan	1900	7,8	10,0	15,2
<i>n</i> -Eikosan	2000	0,6	0,5	1,5
<i>n</i>-Heneikosan	2100	3,4	1,7	12,0
<i>n</i> -Dokosan	2200	0,1	1,5	0,4
<i>n</i>-Trikosan	2300	0,9	1,1	7,0
<i>n</i> -Tetrakosan	2400	0,1	1,5	0,4
Methyl tetrakosan	2490	-	1,4	-
<i>n</i> -Pentakosan	2500	0,1	1,5	4,3
<i>n</i> -Hexakosan	2600	0,1	1,5	4,3
<i>n</i>-Heptakosan	2700	-	0,8	2,7
<i>n</i> -Nonakosan	2900	-	-	1,0

Roku 2007 vyšel v The Journal of Supercritical Fluids článek, ve kterém byly porovnány extrakty listů Portugalské pelargonie vonné (*Pelargonium graveolens*) získané

nadkritickou tekutinou a konvenčně využívaných metod (hydrodestilace a extrakce do hexanu). Pro SFE extrakci bylo v laboratoři na University of Porto vyrobeno nové zařízení, na kterém byla následně studována účinnost provozních parametrů (doba extrakce, tlak, teplota, příprava vzorku a volba dynamického či statického režimu) na výtěžnost extrakce a složení extraktu. Pro SFE byly zvoleny jako nejlepší podmínky teplota 40 °C, tlak 90-100 barů, doba extrakce 15 – 30 min a navážka rostliny 122,5 g na jednu extrakci. Pro hydrodestilaci bylo použito 20 g čerstvé zelené rostliny s 600 ml deionizované vody. Doba extrakce byla 2 hodiny v Clevengerově aparatuře. Analýza pomocí GC-MS byla provedena na koloně CP-Wax 52 CB 50 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,2 μm. Identifikované látky v extraktech byly například růžový oxid, isomenthon, linaloon, citronellool, geraniol a další. Procentuální zastoupení linaloolu bylo 4,4 % hydrodestilace, 0 % extrakce do hexanu a 0,1 % SFE, geraniolu 8,4 % hydrodestilace, 10,8 % extrakce do hexanu a 8,5 % SFE. Celkově se výtěžek látek získaných z SFE pohyboval mezi 0,019 % a 0,22 % a jeho extrakt měl vynikající organoleptické vlastnosti, velmi čerstvou přírodní květinově-ovocnou vůni a světle žlutou barvu. Tento typ extrakce byl vyhodnocen jako nejvhodnější pro použití v parfumerii¹⁹.

1.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie patří mezi separační metody. Vzorek je dávkován do proudu plynu a sám je uveden do plynného stavu. Směs sloučenin prochází chemicky potaženou kolonou. Sloučeniny se selektivně se oddělují na základě fyzikálních či chemických vlastností a jsou identifikovány pomocí specifického detektoru. Mobilní fáze se nazývá nosný plyn a je to zpravidla inertní plyn, nejčastěji helium, ale využívá se i vodík, dusík či argon. Vyhodnocení výsledků kvantitativního zastoupení složek a jejich druh určuje časový průběh a intenzita signálu. Detektorem v plynové chromatografii může být tepelně-vodivostní detektor (TCD), plamenový ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD),

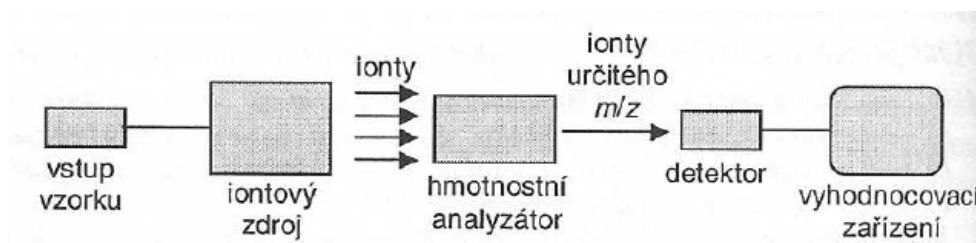


Obrázek 4 Schéma plynového chromatografu²²

fotoionizační detektor (PID), hmotnostní spektrometr (MS), atomový emisní detektor (AED) a další^{20, 21, 22}.

1.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) zvanému efektivní hmotnost a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul stanovované látky na nabitě částice. Hmotnostní analyzátor rozděluje ionty v plynné fázi za vysokého vakua podle efektivní hmotnosti. Detektor detekuje ionty po jejich rozdělení podle m/z a určuje relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů²³.



Obrázek 5 Schéma hmotnostního spektrometru²²

1.5 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

V minulosti se pro spojení plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru (GC/MS) s náplňovými kolonami s vyššími průtoky nosného plynu používaly různé separátory, jejichž cílem bylo odstranění nadbytku nosného plynu před vstupem do iontového zdroje a analyzátoru. V současnosti se používá ve spojení s kapilárními kolonami a nosný plyn se stanovovanou látkou se zavádí přímo do iontového zdroje ve vakuu. Vakuový systém odstraní přebytečný nosný plyn²³.

1.6 Kvalitativní analýza

Identifikace látek u hmotnostní spektrometrie probíhá pomocí databáze hmotnostních spekter. Výsledkem porovnání měřeného spektra s databází bývá několik spekter. O kvalitě těchto nálezů vypovídá shoda spekter. Ovšem vysoká shoda spekter nemusí vyjadřovat správný výsledek, neboť některé velmi odlišné látky mohou mít velmi podobná spektra²⁴.

1.7 Růže

Rod Rosa je jedním z nejdůležitějších rodů okrasných rostlin, pokud jde o ekonomii a kulturní dějiny lidstva. Tento rod má přibližně 200 druhů. Původem jsou z oblastí severní

polokoule. Existuje několik hlavních tříd zahradních růží, nejznámější a nejoblíbenější třídou jsou hybridní čajové růže (čajohybridy), které tvoří většinu růží pěstovaných ve sklenicích a zahradách²⁵. Tato třída růží byla zvolena i pro tuto práci. Konkrétně *Rosa Deep Purple*, *Rosa Naliba* a *Rosa Maryo*.

1.8 Esenciální oleje

Esenciální oleje, nebo také silice, jsou aromatické olejovité kapaliny získané z rostlinného materiálu. Existuje 3000 známých esenciálních olejů, z nichž asi 300 je komerčně významných. Využívají se pro jejich chuť a vůni. Nejdominantnější složkou silic jsou terpeny, nachází se v nich ale i sloučeniny obsahující kyslík (alkoholy, aldehydy a karboxylové kyseliny)²⁶.

V přírodě hrají důležitou roli v ochraně rostlin jako antibakteriální a antifungální látky. Dále fungují jako antivirotika, insekticidy a také proti býložravcům, a to snížením chuti k takovým rostlinám. Mohou také lákat určitý hmyz, který podporuje rozptýlení pylů a semen. Esenciální oleje nebo některé z jejich složek se používají v parfémtech, kosmetice, mýdlech, zemědělství, ve stomatologii, jako potravinářské konzervanty a přísady. Například d-limonen, geranylacetát nebo d-karvon se používají v parfémtech, krémech či mýdlech. Některé esenciální oleje vykazují léčebné vlastnosti²⁷.

1.8.1 Esenciální oleje z růží

Růžový olej či růžová esence je voňavý, bezbarvý nebo světle žlutý kapalný esenciální olej získaný nejčastěji pomocí destilace z okvětních lístků *Rosa damascena* a *Rosa gallica* a dalších růží z rodu *Rosaceae*. Jsou cennou složkou parfémů a likérů. Největším výrobcem růžového oleje je Bulharsko. Kromě aromatického a potravinářského průmyslu se objevili antibakteriální a antioxidační vlastnosti damašského růžového oleje²⁸.

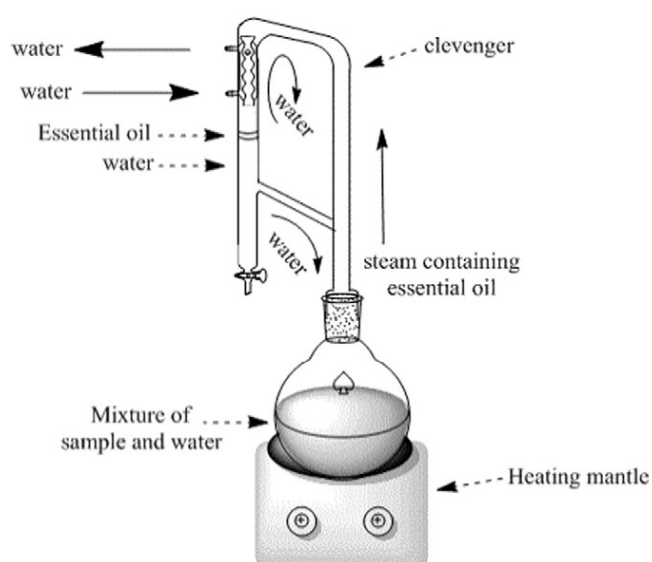
Hlavními komponenty v růžovém oleji jsou geraniol, citronellol, nerol, fenethyl alkohol, kyselina geranová a eugenol, které tvoří 55 – 75 % celkového objemu oleje. Další složky zahrnují terpenové uhlovodíky (především α - a β -pineny, myrceny a další), estery, C₁₄ až C₂₃ n-parafiny které tvoří takzvané stearopteny (tvořící 15 až 23 %), růžový oxid, tetrahydrofuran, estery, heptadekan, nonadekan, heneikosan, linalool, β -damascone, methyl eugenon, trikosan, geranyl acetát a další²⁹.

1.8.2 Izolace silic

V roce 2014 byl v časopise *Phytochemistry Letters* zveřejněn článek, který se zabýval hydrodestilací esenciálního oleje z růží rodu *Rosa rugosa*. 100 g sušených okvětních lístků

bylo ponořeno do 2500 ml destilované vody a destilováno za použití Clevengerovy aparatury. Proces trval 90 min. Esenciální olej byl zachycen do diethyletheru. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno Tento extrakt byl analyzován na GC/FID a GC/MS. Bylo nalezeno 63 sloučenin. Kvantitativně největší skupinou sloučenin byly alifatické uhlovodíky s dlouhým řetězcem (stearopteny). Tyto látky představovaly více než 40 % celkového oleje. Hlavními složkami této skupiny byly trikosan (22,1 %) a pentakosan (22,2 %). Nejvýznamnějšími vonnými složkami byly monoterpeny jako citronellol (13,7 %), geraniol (9,0 %) a linalool (1,0 %) ³⁰.

Na obrázku 6 je laboratorní přístroj, využívaný na destilaci, který se nazývá Clevengerův aparát. Vysušené listy se ponoří do vody v baňce s kulatým dnem, pod kterým je topné hnízdo. Esenciální olej je extrahován při teplotě varu vody při atmosférickém tlaku. Pára s látkami prochází přes chladič a kondenzuje se ve sběrné nádobě ³¹.



Obrázek 6 Clevengerova aparatura pro hydrodestilaci ³¹

Při destilaci s vodní parou je pára generována odděleně od rostlinného materiálu. Ten je v tomto případě nad vroucí vodou na perforované mřížce. Tato destilace je ovšem u olejů s vysokou teplotou varu velmi zdloouvá, a to kvůli nízkému tlaku stoupající páry ³¹.

Roku 2003 byl v časopise *Flavour and Fragrance Journal* zveřejněn článek, popisující různé druhy destilace pelargonie vonné (*Pelargonium*). Byly použity destilace v Clevengerově aparatuře, destilace vodou, destilace vodní parou a destilace parou. Listy pelargonie vonné byly 12 hodin sušeny. V první destilaci byly použity 2 kg vzorku se 4 l vody. Doba destilace byla 3 hodiny. Na druhou destilaci bylo použito 40 kg rostliny. Vzorek byl ponořen do vody a přímo ohříván. Destilát se shromažďoval ve sběrném systému. Na třetí destilaci bylo 40 kg materiálu položeno na perforovanou mřížku a destilační aparatura byla naplněna 50 l vody tak, aby byla hladina vody udržována 50 mm pod mřížkou. Destilační

nádoba byla ohřívána palivovým dřevem a uhlím po dobu 7 hodin. Při poslední destilaci bylo položeno 50 kg vzorku opět na perforovanou mřížku. Pára byla generována v kotli a přiváděna do nádrže po dobu 7 hodin. Všechny extrakty byly vysušeny bezvodým síranem sodným a analyzovány pomocí GC-FID a GC-MS. Olej destilovaný vodní parou obsahoval větší množství monoterpenových uhlovodíků (1,7 %). Extrakt z destilace parou měl vyšší podíl esterů (21,1 %). U extraktu z Clevengerovy aparatury byl nalezen vysoký obsah alkoholů (72,8 %) ³².

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité přístroje a chemikálie

2.1.1 Přístroje

SPEX SamplerPREP 5100 MIXER MILL,
přístroj pro SFE: Se-1 (SEKO s.r.o. Brno),
průtokoměr FMA 4000 Omega,
autosampler AOC – 20i (Shimadzu, Japonsko),
GC 2010 s hmotnostním detektorem QP2010 plus (obojí Shimadzu, Japonsko),
autosampler COMCI PAL (CTC ANALYTICS, Švýcarsko).

2.1.2 Chemikálie

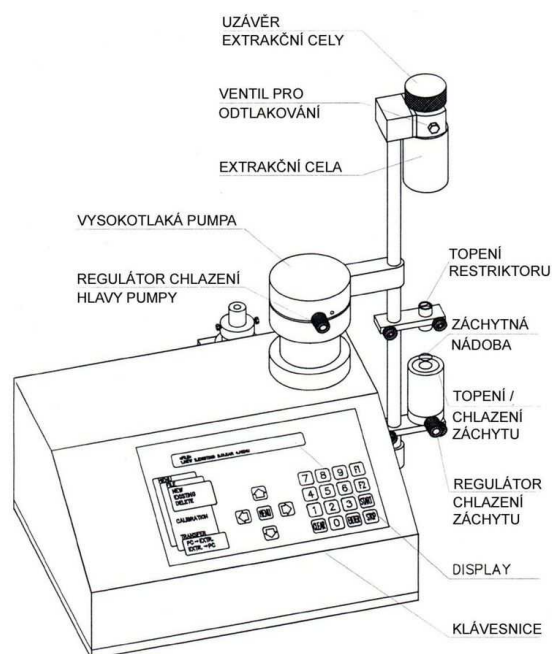
Toluen pro organickou stopovou analýzu (Merck spol. s r.o., ČR),
oxid uhličitý 99,5 % (Linde Gas a.s., ČR),
oxid uhličitý potravinářský (Linde Gas a.s., ČR),
dusík 4.0 (Linde Gas a.s., ČR),
helium 4.6 (Linde Gas a.s., ČR),
vodík 3.0 (Linde Gas a.s., ČR),
dusík

2.2 Příprava vzorku

Plátky růží odrůdy *Rosa Deep Purple*, *Rosa Malibu* a *Rosa Mariyo* byly sušeny na suchém místě na filtračních papírech při teplotě 20 – 25 °C a poté byly rozemlety pomocí SPEX SamplerPREP 5100 MIXER MILL. Malé množství usušené růže bylo vloženo do nádoby spolu se třemi skleněnými mlecími kuličkami. Zazátkovaná nádoba byla vložena do přístroje a mleta přibližně 10 minut, dokud nevznikl jemný prášek. Ten byl následně zvážěn a převeden do zábrusové láhve.

2.3 Extrakce

K extrakci byla využita extrakce nadkritickou kapalinou, přesněji přístroj Se-1 (SEKO s.r.o. Brno) zobrazený na obrázku 7, který byl připojen na průtokoměr FMA 4000 Omega. Do přístroje byly zavedeny 3 plynové bomby: CO₂ vysoké čistoty pro extrakci SFE, CO₂ potravinářský pro chlazení a dusík. CO₂ vysoké čistoty byl přiváděn do extraktoru, do tlakové nádoby s posuvným pístem, ve které byl zkapalněn a ochlazen pomocí CO₂ a N₂. Takto upravený CO₂ byl odváděn do vyhřívané extrakční nádoby, ve které proběhla extrakce. O vyextrahované látky obohacený oxid uhličitý byl kapilárou o průměru 50 μm veden do zkumavky se záchytným rozpouštědlem, jímž byl toluen. Do zkumavky byl připojen průtokoměr, kterým byl zjišťován objem proteklého oxidu uhličitého.



Obrázek 7 Schéma SFE extraktoru Se-1 (SEKO s.r.o. Brno)³³

2.3.1 Optimalizace extrakce

Na optimalizace této metody byly využity hodnoty z diplomové práce z roku 2017, kde byla použita odrůda neznámé růže. Bylo provedeno 17 extrakcí s třemi proměnnými parametry: teplota, tlak a objem proteklého oxidu uhličitého. Přesné podmínky těchto extrakcí jsou uvedeny v tabulce 3, ale hodnoty se pohybovali v rozmezí: teplota 36 – 103 °C, tlak 11 – 38 MPa a objem oxidu uhličitého 990 – 6000 ml. Výsledky těchto extrakcí byly vyhodnoceny ve statistickém programu Statistica 12 a optimálními podmínkami pro extrakci byly určeny hodnoty tlak 18,3 MPa, teplota 70 °C a objem oxidu uhličitého 6000 ml.

Tabulka 3 Extrakční podmínky optimalizace³⁴

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

Navážka sušené růže neznámé odrůdy byla 400 mg. Jako záchytné rozpouštědlo byly testovány methanol, hexan a toluen. Po vzniku sraženiny u methanolu a dvou fází u hexanu, byl zvolen jako nejvhodnější rozpouštědlo toluen, který nevytvářel ani dvě fáze, ani sraženinu. Tyto extrakty byly měřeny na plynovém chromatografu GC 2010 (Shimadzu, Japonsko) a jako detektor byl použit plamenově ionizační detektor (FID). Jako nosný plyn bylo využito helium 4.6 (Linde Gas a.s., ČR). Teplota nástřiku činila 250 °C a teplota detektoru 305 °C. Extrakt byl dávkován v režimu split (1:100) pomocí autosampler AOC-20i (Shimadzu, Japonsko). Výsledky byly vyhodnoceny v programu GC Postun Analysis³⁴.

Statistická data byla vyhodnocována v softwaru Statistica 12. Data pro tento program byla počet píků, celková plocha píků, celková výška píků a celková plocha píků po odečtení vysokých (plocha vyšší než 3000). Optimální podmínky byly určeny z hodnot ploch píků po odečtení vysokých píků. Pomocí tohoto programu byli určeny hodnoty tlak 18,3 MPa, teplota 70 °C a objem proteklého CO₂ 6000 ml³⁴.

2.3.2 Postup extrakce

Pro analýzu byly zvoleny tři vzorky usušených a rozemletých růží: *Rosa Deep Purple*, *Rosa Malibu* a *Rosa Mariyo*. Na lodičku bylo naváženo 400 mg růže. Tato navážka byla smíchána se sklářským pískem a převedena do extrakční nádoby, která byla uzavřena a vožena do SFE přístroje. Na přístroji byly nastaveny údaje plynoucí z optimalizace: teplota 70 °C a tlak 18,3 MPa. Do záchytné nádoby byly napipetovány 2 ml toluenu (záchytné rozpouštědlo) a na zkumavce byla vyznačena ryska hladiny rozpouštědla pro doplnění odpařeného toluenu během extrakce. Při extrakci byl průtok oxidu uhličitého pomocí průtokoměru udržován na hodnotách 80 – 120 ml CO₂ za minutu. Extrakt byl uchováván v lednici a později analyzován na GC-MS. Tato extrakce byla provedena pro každý vzorek růže dvakrát.

2.4 Analýza vzorků

Extrakty byly proměřeny v plynovém chromatografu GC 2010 (Shimadzu, Japonsko) spojeném s hmotnostním spektrometrem QP2010 plus (Shimadzu, Japonsko). Látky byly zaznamenány v režimu SCAN v rozsahu efektivních hmotností (m/z) od 45 do 500. Byla použita kapilární kolona 30m x 0,25 mm x 0,25 µm tloušťka filmu Zebron ZB-5HT-INFERNO. Nosným plynem pro plynovou chromatografii bylo helium 4.6 (Linde Gas a.s., ČR). Doba měření jednoho vzorku byla 33 minut a teplotní program, který byl pro tuto analýzu využit je vypsán v tabulce 4. Teplota nástřiku do plynového chromatografu byla 250 °C, do kolony byl dávkován v režimu split (1:100) a byl použit autosampler COMCI PAL (CTC ANALYTICS, Švýcarsko). Teplota děliče do hmotnostního spektrometru byla 200 °C. Výsledné chromatogramy byly vyhodnocovány pomocí programu GC/MS Postrun Analysis.

Tabulka 4 Teplotní program pro analýzu pomocí GC-MS

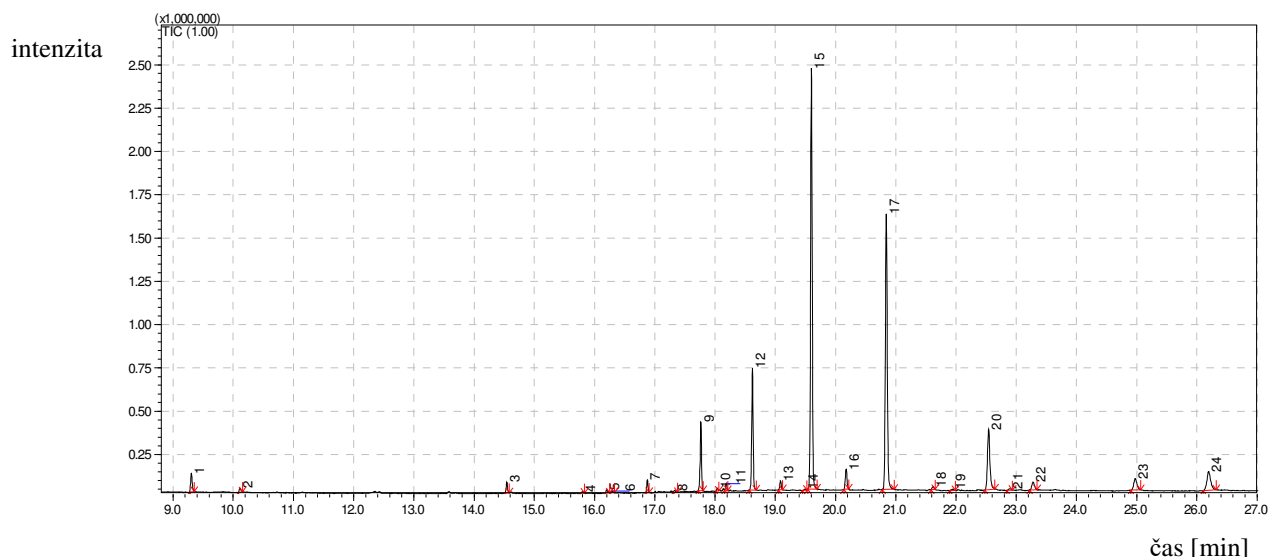
Teplotní nárůst (°C)	Konečná teplota (°C)	Čas udržení konstantní teploty (min)
-	40	5
20	300	15

2.5 Výsledky analýzy

Záznam výsledků analýzy pomocí GC-MS byl prováděn v programu GC-MS Real Time Analysis a vyhodnocování těchto dat proběhlo v GC-MS Postrun Analysis. Pro porovnání výsledných spekter byly využity knihovny NIST 14, NIST 14s, Wiley 229 (Wiley Registry) a FFNSC 2.

2.5.1 Rosa Deep Purple

Rosa Deep Purple je růže s velkým květem růžové a lila barvy. Extrakt růže byl čirý. Na obrázku 8 je zobrazen chromatogram extraktu, který obsahuje 24 píků, z nichž 15 identifikovaných látek. V tabulce 5 jsou uvedeny názvy, čísla píků, CAS čísla, retenční časy látek a procentuální shoda MS spektra všech látek nalezených v extraktu.



Obrázek 8 Chromatogram extraktu z růže *Rosa Deep Purple*

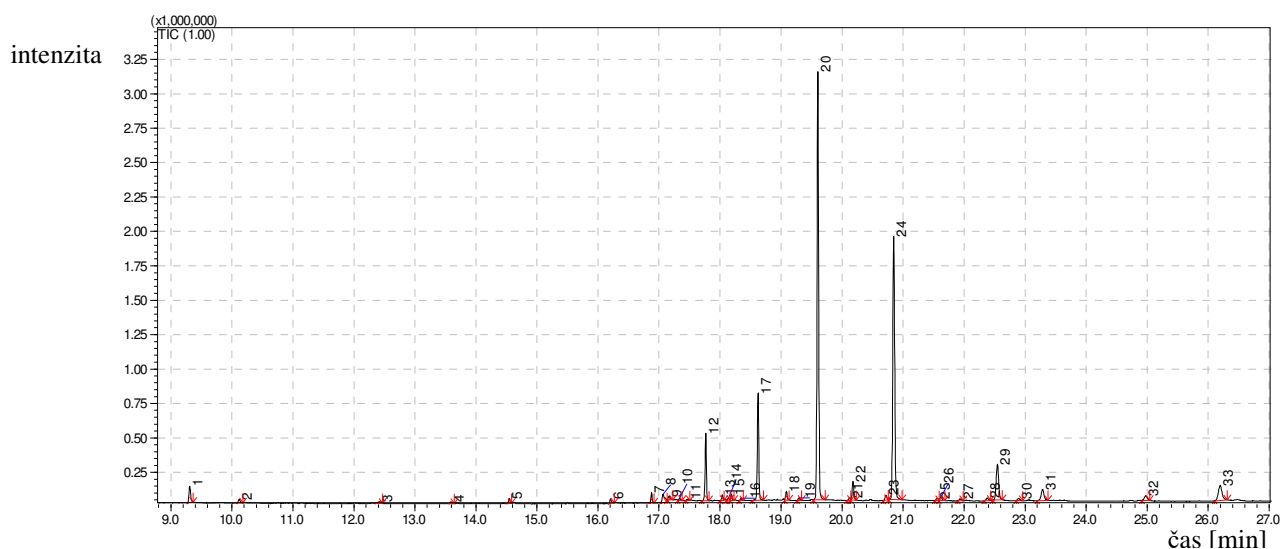
Tabulka 5 Identifikované látky z extraktu *Rosa Deep Purple*

Číslo píku	CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	Název látky
1	100-52-7	9,304	93	Benzaldehyd
2	100-51-6	10,113	90	Benzyl alkohol
3	126-73-8	14,512	95	Tributyl fosfát
4	36653-82-4	15,798	88	Hexadekanol
5	57-10-3	16,201	91	Kyselina palmitová
7	629-94-7	16,876	95	Heneikosan
9	112-95-8	17,764	96	Eikosan
11	646-31-1	18,185	95	Tetrakosan
12	629-99-2	18,621	94	Pentakosan
13	630-04-3	19,086	94	Hexakosan
15	593-49-7	19,599	93	Heptakosan
16	630-02-4	20,176	94	Oktakosan
17	630-03-5	20,843	92	Nonakosan
18	638-68-6	21,620	92	Triakontan

Číslo píku	CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	Název látky
20	630-04-6	22,542	92	Hentriakontan

2.5.2 Rosa Malibu

Rosa Malibu je růže s třešňově zbarveným květem. Extrakt této růže byl čirý. Na obrázku 9 je zobrazen chromatogram extraktu s 33 píky. Bylo identifikováno 15 látek. V tabulce 6 jsou uvedeny jejich čísla píků, CAS čísla, retenční časy, shody MS spektra a názvy identifikovaných látek.



Obrázek 9 Chromatogram extraktu růže *Rosa Malibu*

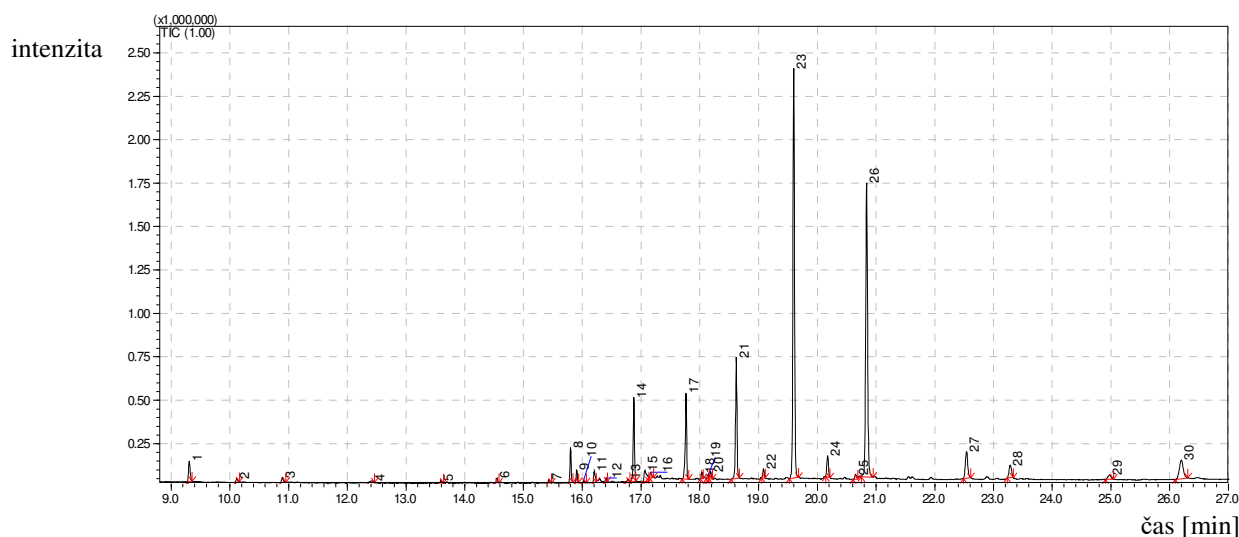
Tabulka 6 Identifikované látky v chromatogramu extraktu z *Rosa Malibu*

Číslo píku	CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	Název látky
1	100-52-7	9,308	94	Benzaldehyd
2	100-51-6	10,118	91	Benzyl alkohol
5	126-73-8	14,546	94	Tributyl fosfát
6	57-10-3	16,204	92	Kyselina palmitová
7	629-94-7	16,878	96	Heneikosan
8	60-33-3	17,065	95	Kyselina linolová
9	54-11-4	17,163	92	Kyselina stearová
12	112-95-8	17,766	95	Dokosan
15	646-31-1	18,187	95	Tetrakosan
17	629-99-2	18,623	94	Pentakosan
18	630-04-3	19,087	95	Hexakosan

Číslo píku	CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	Název látky
20	593-49-7	19,603	94	Heptakosan
22	630-02-4	20,179	95	Oktakosan
24	630-03-5	20,846	93	Nonakosan
29	630-04-6	22,546	91	Heptatriakontan

2.5.3 Rosa Mariyo

Rosa Mariyo má oranžově zbarvený květ se zajímavou skladbou. Srdce květu se skládá ze špičatých okvětních plátků. Extrakt růže byl nažloutlý. Na obrázku 10 je zobrazen chromatogram extraktu s 30 píky. Bylo identifikováno 18 látek a v tabulce 7 jsou k těmto látkám uvedeny jejich názvy, čísla píků, CAS čísla, retenční časy a shody s MS spektrem.



Obrázek 10 Chromatogram extraktu z růže *Rosa Mariyo*

Tabulka 7 Identifikované látky z chromatogramu extraktu z *Rosa Mariyo*

Číslo píku	CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	Název látky
1	100-52-7	9,309	93	Benzaldehyd
2	100-51-6	10,119	92	Benzyl alkohol
3	60-12-8	10,894	95	Fenylethyl alkohol
6	126-73-8	14,546	93	Tributyl fosfát
8	36653-82-4	15,799	94	Hexadekol
9	544-85-4	15,906	96	Nonadekan
11	57-10-3	16,205	92	Kyselina palmitová
14	629-94-7	16,877	96	Heneikosan

Číslo píku	CAS číslo	Retenční čas (min)	Shoda MS spektra (%)	Název látky
15	60-33-3	17,065	93	Kyselina linolová
16	54-11-4	17,164	92	Kyselina stearová
17	638-67-5	17,765	94	Trikosan
20	646-31-1	18,185	96	Tetrakosan
21	629-99-2	18,622	93	Pentakosan
22	630-04-3	19,084	93	Hexakosan
23	593-49-7	19,600	93	Heptakosan
24	630-02-4	20,176	93	Oktakosan
26	630-03-5	20,840	91	Nonakosan
27	630-04-6	22,542	91	Hentriakontan

2.6 Vyhodnocení výsledků

V reálných vzorcích byly identifikovány látky, které byly popsány v teoretické části této práce jako vyskytující se v extraktech růží. Ovšem typické látky jako linalool, geraniol, citronellol, nerol nebo růžový oxid v extraktech analyzovány nebyly. Příčinou může být příliš nízká koncentrace těchto látek ve vzorcích růže, jejich vypaření při sušení či jejich nevyextrahování při extrakci nadkritickým CO₂. Látky, které byly uvedeny ve studii Ernesta Reverchon z roku 1997¹⁷ jako fenylethyl alkohol, benzaldehyd, hexadekanol, nonadekan, eikosan, heneikosan, dokosan, trikosan, tetrakosan, pentakosan, hexakosan a heptakosan nebo kyselina palmitová, stearová a linolová nalezeny byly. V tabulce 8 je uvedeno procentuální zastoupení ploch píků látek nalezených v extraktech. Nejintenzivnější píky poskytovaly u všech vzorků heptakosan a nonakosan. Dále pak pentakosan a u vzorku růže Rosa Mariyo i heneikosan.

Tabulka 8 Látky identifikované v extraktech a jejich procentuální zastoupení

Látka	Rosa Deep Purple (%)	Rosa Malibu (%)	Rosa Mariyo (%)
Benzaldehyd	1,57	1,5	1,62
Benzyl alkohol	0,35	0,37	0,27
Fenylethyl alkohol	-	-	0,4
Tributyl fosfát	0,82	0,39	0,31
Hexadekanol	0,12	-	2,04

Látka	Rosa Deep Purple (%)	Rosa Malibu (%)	Rosa Mariyo (%)
Nonadekan	-	-	0,73
Kyselina palmitová	0,28	0,39	0,86
Heneikosan	0,8	0,68	5,12
Kyselina linolová	-	1,31	1,58
Kyselina stearová	-	0,38	0,39
Eikosan	4,91	-	-
Dokosan	-	4,81	-
Trikosan	-	-	5,94
Tetrakosan	0,42	0,43	0,52
Pentakosan	9,11	8,58	8,69
Hexakosan	0,68	0,69	0,64
Heptakosan	36,51	36,87	31,52
Oktakosan	1,7	1,74	1,67
Nonakosan	27,2	27,63	26,62
Tetrakontan	0,28		
Hentriakontan	7,65	4,78	3,05

3 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo provést literární rešerši zabývající se využitím extrakce nadkritickou tekutinou, zaměřenou na analýzu růží a esenciálních olejů z nich získaných. Experimentální část byla cílena na nalezení vhodných podmínek pro extrakci látek z okvětních plátků růže pomocí nadkritického oxidu uhličitého a následnou analýzu reálných vzorků pomocí GC-MS.

Teoretická část práce byla zaměřena na extrakci pomocí nadkritické tekutiny, především pak na její využití při extrahování esenciálních olejů. Byly stanoveny optimální podmínky pro extrakci na přístroji Se-1 (SEKO s.r.o. Brno): tlak 18,3 MPa, teplota 70 °C a objem oxidu uhličitého 6000 ml. Při těchto podmínkách proběhly extrakce reálných vzorků růží *Rosa Deep Purple*, *Rosa Malibu* a *Rosa Maryio*. Všechny extrakty byly analyzovány pomocí GC-MS. Nejvíce látek bylo identifikováno v extraktu z *Rosa Maryio* a to 18. V extraktu z *Rosa Deep Purple* a *Rosa Malibu* bylo identifikováno 15 látek. Nejintenzivnější pík poskytoval u všech extraktů heptakosan, nejvíce ho však bylo naměřeno u extraktu z *Rosa Malibu*. Plocha tohoto píku v procentech byla 36,87 %.

Látky, které byly v literárních rešerších uvedeny jako typické pro extrakty z růží (geraniol, růžový oxid, linalool, nerol, kyselina geranová), identifikovány nebyly. Pravděpodobně se tyto látky ve vzorcích čajohybridů, které byly extrahovány, nevyskytovaly v dostatečné koncentraci. Ve studii E. Reverchon z roku 1997¹⁷, kde byly tyto látky identifikovány, byla extrahována odrůda růže *Rosa Damascena*. Ovšem látky v této studii také uvedené, jako nonadekan, fenylethyl alkohol, eikosan či heneikosan identifikovány byly. Ve studii A. Maciąg z roku 2014²⁹ kde byla využita extrakce pomocí hydrodestilace, byly trikosan a pentakosan vyhodnoceny jako hlavní složky alifatických uhlovodíků s dlouhým řetězcem. Tyto látky byly také identifikovány. Další možností, proč některé látky nebyly identifikovány, může být použití malé navážky vzorku. Ve studii z roku 2007 z časopisu *The Journal of Supercritical Fluids*, v které byly nalezeny složky jako růžový oxid či linaloon, bylo na SFE extrakci využito 122,5 g vzorku pelargonie vonné¹⁹. V této práci bylo použito pouze 400 mg vzorku růže.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ROUSSEAU, Ronald W. *Handbook of separation process technology* [online]. New York: J. Wiley, 1987 [cit. 2018-03-20]. ISBN 978-0-471-89558-9. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpHSPT0006/handbook-separation-process/handbook-separation-process>
2. ARESTA, Michele, Angela DIBENEDETTO a Franck DUMEIGNIL. *Biorefineries: an introduction* [online]. Boston: De Gruyter, 2015 [cit. 2018-03-13]. ISBN 978-3-11-033153-0. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBAI00005/biorefineries-an-introduction/biorefineries-an-introduction>
3. SCHASCHKE, Carl. *Dictionary of chemical engineering* [online]. Oxford: Oxford University Press, 2014 [cit. 2018-03-13]. ISBN 978-0-19-965145-0. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpDCE00021/dictionary-chemical-engineering/dictionary-chemical-engineering>
4. BICKING, Merlin K.L. Extraction: Analytical Extractions. In: REEDIJK, Jan, editor. *Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering* [online]. Oxford: Elsevier, 2013, 1371 - 1382 [cit. 2018-03-26]. ISBN 9780124095472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/02271-7>
5. MARTÍNEZ, Julian a Ana Carolina DE AGUIAR. Analytical Supercritical Fluid Extraction. In: ANDERSON, Jared L., Alain BERTHOD, Verónica Pino ESTÉVEZ a Apryll M. STALCUP, ed. *Analytical Separation Science* [online]. Germany, Weinheim: John Wiley, 2015, 1659 - 1679 [cit. 2018-03-27]. ISBN 978-3-527-33374-5. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpASSVS003/analytical-separation/analytical-separation>
6. ANDREWS, Thomas. The Bakerian Lecture: On the Continuity of the Gaseous and Liquid States of Matter. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* [online]. 1869, **159**, 575-590 [cit. 2018-06-14]. DOI: 10.1098/rstl.1869.0021. ISSN 0261-0523. Dostupné z: <http://rstl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstl.1869.0021>
7. HANNAY, J. B. a J. HOGARTH. On the Solubility of Solids in Gases. *Proceedings of the Royal Society of London* [online]. 1879, **29**(196-199), 324-326 [cit. 2018-06-14]. DOI: 10.1098/rspl.1879.0054. ISSN 0370-1662. Dostupné z: <http://rspl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspl.1879.0054>
8. GORE, G. On the Properties of Liquid Carbonic Acid. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* [online]. 1861, **151**, 83-87 [cit. 2018-06-14]. DOI:

- 10.1098/rstl.1861.0007. ISSN 0261-0523. Dostupné z:
<http://rstl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstl.1861.0007>
9. MCHUGH, Mark A. a Val J. KRUKONIS. *Supercritical fluid extraction: principles and practice* [online]. 2nd edition. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994 [cit. 2018-03-27]. ISBN 978-0-7506-9244-1. Dostupné z:
<https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpSFEE0001/supercritical-fluid-extraction/supercritical-fluid-extraction>
10. Superkritická tekutina. In: *Ústav chemických procesů AV ČR* [online]. 2016 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <http://www.icpf.cas.cz/cs/superkriticka-tekutina>
11. DOANE-WEIDEMAN, T. a P.B. LIESCHESKI. Analytical supercritical fluid extraction for food applications. *Oil extraction and analysis: critical issues and comparative studies* [online]. Champaign, Ill.: AOCS Press, 2004, 69 - 99 [cit. 2018-06-15]. ISBN 1-893997-78-2. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/266482163_Analytical_Supercritical_Fluid_Extraction_for_Food_Applications
12. REVERCHON, Ernesto. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 1997, **10**(1), 1-37 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/S0896-8446(97)00014-4. ISSN 08968446. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844697000144>
13. What Is an Essential Oil, a Concrete, a Resinoid, and an Absolute? In: *Global Essence* [online]. Hamilton Township [cit. 2018-06-04]. Dostupné z:
<https://globalessence.com/essential-oil-concrete-resinoid-absolute/>
14. REVERCHON, E. a F. SENATORE. Isolation of rosemary oil: Comparison between hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 1992, **7**(4), 227-230 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1002/ffj.2730070411. ISSN 08825734. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.2730070411>
15. CONDE-HERNÁNDEZ, Lilia A., José R. ESPINOSA-VICTORIA, Arturo TREJO a José Á. GUERRERO-BELTRÁN. CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Food Engineering*. 2017, **200**, 81-86. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022. ISSN 02608774. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877416304721>
16. VÁGI, E., B. SIMÁNDI, Á. SUHAJDA a É. HÉTHELYI. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International* [online]. 2005, **38**(1), 51-57

- [cit. 2018-06-05]. DOI: 10.1016/j.foodres.2004.07.006. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996904001681>
17. REVERCHON, Ernesto, Giovana DELLA PORTA a Domenico GORGOGLIONE. Supercritical CO₂ Extraction of Volatile Oil from Rose Concrete. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. Italy: John Wiley, 1997, **12**(1), 37-41 [cit. 2018-06-04]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199701\)12:1<37::AID-FFJ605>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199701)12:1<37::AID-FFJ605>3.0.CO;2-V)
 18. *European pharmacopoeia*. Sainte-Ruffine, France: Maisonneuve, 1975.
 19. GOMES, Paula B., Vera G. MATA a Alírio E. RODRIGUES. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2007, **41**(1), 50-60 [cit. 2018-06-05]. DOI: 10.1016/j.supflu.2006.08.018. ISSN 08968446. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844606002324>
 20. YAM, Kit L. *The Wiley encyclopedia of packaging technology* [online]. 3rd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2009 [cit. 2018-06-16]. ISBN 978-0-470-08704-6. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpWEPTTE002/wiley-encyclopedia-packaging/wiley-encyclopedia-packaging>
 21. CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické* [online]. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990 [cit. 2018-05-07]. ISBN 80-030-0569-8.
 22. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
 23. HOLČAPEK, Michal a Miroslav LÍSA. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze* [online prezentace]. 2017 [cit. 2018-06-16]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>
 24. CHUDOBA, Josef. *Hmotnostní spektrometrie (2). Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem* [online]. Ústí nad Labem [cit. 2018-05-08].
 25. MIKANAGI, Yuki, Masato YOKOI, Yoshihiro UEDA a Norio SAITO. Flower flavonol and anthocyanin distribution in subgenus *Rosa*. *Biochemical Systematics and Ecology* [online]. 1995, **23**(2), 183-200 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1016/0305-1978(95)93849-X. ISSN 03051978. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030519789593849X>
 26. BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, **94**(3), 223-

- 253 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160504001680>
27. BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK a M. IDAOMAR. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, **46**(2), 446-475 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004541>
28. PAL, Probir Kumar. Evaluation, Genetic Diversity, Recent Development of Distillation Method, Challenges and Opportunities of *Rosa damascena*: A Review. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* [online]. 2013, **16**(1), 1-10 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1080/0972060X.2013.764176. ISSN 0972-060X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2013.764176>
29. KHAN, I. A. a Ehab A. ABOURASHED. *Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs, and cosmetics* [online]. 3rd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2010 [cit. 2018-05-07]. ISBN 978-0-471-46743-4. Dostupné z: <http://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/leungs-encyclopedia-of-common-natural-ingredients-3rd-edition.pdf>
30. MACIĄG, A. a D. KALEMBA. Composition of rugosa rose (*Rosa rugosa* thunb.) hydrolate according to the time of distillation. *Phytochemistry Letters* [online]. Lublin, 2015, **11**, 373-377 [cit. 2018-06-17]. DOI: 10.1016/j.phytol.2014.10.024. ISSN 18743900. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390014002006KAŠPAROVÁ>,
31. SAMADI, Mahtab, Zurina Zainal ABIDIN, Robiah YUNUS, Dayang Radiah AWANG BIAK, Hiroyuki YOSHIDA a Eng Hai LOK. Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil. *Chinese Journal of Chemical Engineering* [online]. 2017, **25**(2), 216-222 [cit. 2018-06-16]. DOI: 10.1016/j.cjche.2016.09.006. ISSN 10049541. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1004954116302208>
32. BABU, Kiran G. D. a V. K. KAUL. Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) distilled by different distillation techniques. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 2005, **20**(2), 222-231 [cit. 2018-06-17]. DOI: 10.1002/ffj.1414. ISSN 0882-5734. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1414>
33. Schéma SFE extraktoru Se-1 (SEKO s.r.o. Brno). In: *MENDELU* [online]. Brno [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: http://docplayer.cz/docs-images/42/2653698/images/page_6.jpg

34. Bc. Pavla. *Využití extrakce nadkritickou tekutinou a GC-MS při analýze růží*. Pardubice, 2017 [cit. 2018-04-16]. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Aleš Eisner, Ph. D.