

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vavřínový esenciální olej

Monika Vokálová

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Monika Vokálová**
Osobní číslo: **C16386**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Vavřínový esenciální olej**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Proveďte literární rešerši zabývající se vavřínem ušlechtilým (*Laurus nobilis* L.). Zaměřte se na možnosti získávání esenciálního oleje z vavřínu, metody analýzy vavřínového oleje, jeho chemické složení a vlastnosti.
2. Závěry kriticky zhodnoťte

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

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 3. 7. 2019

.....

Monika Vokálová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Tomášovi Bajerovi, Ph.D. za zadání zajímavého tématu, cenné rady a srdečný přístup při vypracovávání práce. Zároveň bych ráda poděkovala celé mé rodině za podporu a trpělivost, kterou mi poskytovala v průběhu celého studia.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá Vavřínem ušlechtilým, popisuje jeho vlastnosti, chemické složení a využití. Největší pozornost je věnována listům této rostliny, ze kterých se získává vavřínový esenciální olej nejčastěji. V práci jsou zmiňovány techniky pro získání esenciálních olejů, zejména typy destilací. Dále je pozornost zaměřena na samotnou analýzu esenciálních olejů. V druhé části práce je popisováno složení jednotlivých vavřínových esenciálních olejů z dostupných zdrojů.

Klíčová slova

vavřín ušlechtilý, esenciální olej, vavřínový olej, plynová chromatografie, destilace

Title

Laurus nobilis essential oil

Annotation

This bachelor thesis deals with bay laurel, describes its properties, chemical composition and utilization. The greatest attention is paid to the leaves of this plant, from which laurel essential oil is obtained most often. Techniques for obtaining essential oils, especially types of distillation, are mentioned. Furthermore, the focus is on the analysis of essential oils themselves. The second part describes the composition of individual laurel essential oils from available resources.

Keywords

bay laurel, essential oil, bay laurel essential oil, gas chromatography, distillation

OBSAH

ÚVOD	11
1 POPIS ROSTLINY	12
1.1 Výskyt	12
1.2 Historie	13
1.3 Využití	13
1.4 Toxicita	14
1.5 Chemické složení	14
2 ESENCIÁLNÍ OLEJE	16
2.1 Chemické složení	16
2.1.1 Isoprenoidy	16
2.1.2 Terpeny	17
2.1.3 Alkoholy	19
2.1.4 Karbonylové sloučeniny	20
2.1.5 Fenoly	21
2.2 Využití esenciálních olejů	21
2.3 Získávání rostlinných silic	22
2.3.1 Hydrodestilace	22
2.3.2 Destilace vodní parou	23
2.3.3 Mikrovlnná destilace	24
2.3.4 Macerace	24
2.3.5 Extrakce tuhé látky kapalinou	25
2.3.6 Extrakce nadkritickou tekutinou	26
2.3.7 Mikroextrakce tuhou fází	26
2.4 Analýza oleje	27
2.4.1 Plynová chromatografie	27
2.4.2 Hmotnostní spektrometrie	30
2.4.3 GC-MS metoda	31
2.5 Stanovení antioxidační aktivity	31
2.5.1 Metody založené na eliminaci radikálů	31
2.5.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek	32
2.6 Stanovení antimikrobiální aktivity	33
3 VAVŘÍNOVÝ OLEJ	35

3.1	Využití.....	35
3.2	Získ a složení.....	35
3.2.1	Porovnání chemického složení esenciálního oleje z vavřínu ušlechtilého z dostupných zdrojů.....	36
3.3	Testování antimikrobiální aktivity.....	45
4	ZÁVĚR.....	48
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1	Strukturní vzorce vybraných monoterpenů	18
Obrázek 2	Strukturní vzorec cyklického β -elemenu.....	18
Obrázek 3	Strukturní vzorce vybraných terpenických alkoholů	19
Obrázek 4	Strukturní vzorec citralu	20
Obrázek 5	Strukturní vzorce některých terpenických ketonů.....	20
Obrázek 6	Strukturní vzorce některých terpenických fenolů	21
Obrázek 7	Aparatura typu Clevenger – využívaná pro hydrodestilaci	23
Obrázek 8	Aparatura pro destilaci vodní parou	24
Obrázek 9	Soxhletův extraktor	25
Obrázek 10	Schéma aparatury pro extrakci nadkritickou tekutinou	26
Obrázek 11	Schéma plynového chromatografu	28
Obrázek 12	Schéma plynového chromatogramu	30
Obrázek 13	Provedení diskové difúzní metody	33
Obrázek 14	Schéma Etestu	34
Obrázek 15	Strukturní vzorce hlavních složek vavřínového oleje	36
Tabulka 1	Přehled porovnání extrakčních metod a různých metod sušení z dostupných literatu	44
Tabulka 2	Minimální inhibiční koncentrace vavřínového oleje a čistého 1,8-cineolu	46
Tabulka 3	Minimální inhibiční koncentrace vavřínového extraktu	47

SEZNAM ZKRATEK

MAHD	mikrovlnná hydrodestilace
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou
GC	plynový chromatograf
FID	plamenový ionizační detektor
WCOT	Wall Coated Open Tubular
SCOT	Support Coated Open Tubular
PLOT	Porous Layer Open Tubular
TAA	celková antioxidační aktivita
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
DPPH	difenylpicrylhydrazyl
DPPH-H	difenylpicrylhydrazin
HPLC	kapalinová chromatografie
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
β -PE	β -fykoerytrin
FRAP	ferric reducing antioxidant potential
Fe ³⁺ -TPTZ	Fe ³⁺ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)
ATB	antibiotika
HD	hydrodestilace
HSD	parní hydrodestilace
MS	hmotnostní spektrometr
MIC	minimální inhibiční koncentrace
FID	plamenový ionizační detektor
CFU	colony forming units
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

ÚVOD

Aromatické rostliny významně přispívají k flóře a vegetaci středozevního životního prostředí. Stovky druhů těchto rostlin přirozeně rostou v oblasti Středozevní. Obsahují esenciální oleje, mají schopnost syntetizovat, hromadit a uvolňovat těkavé látky. Tyto těkavé látky mohou působit jako molekuly chuti a vůně pro interakci s živými organismy. Aromatické rostliny produkují těkavé organické sloučeniny, které jsou rozptýlovány do atmosféry a půdy. Listy těchto rostlin jsou zdrojem alespoň dvou třetin celkové produkce těkavých organických sloučenin.¹

Jednou z těchto rostlin je také *Laurus nobilis* L., neboli vavřín ušlechtilý.

1 POPIS ROSTLINY

Laurus nobilis L. patří do čeledi *Lauraceae*, neboli vavřínovitých.² Čeleď zahrnuje 32 rodů a asi 2000-2500 druhů.³ Vavřínovité jsou stromy nebo keře. Nalezneme je v tropických a mírně teplých klimatech, nejhojněji se ale vyskytují v oblastech s vlhkým podnebím.⁴ Rostliny z této čeledi mají obvykle listy jednoduché střídavé kožovité, bez palistů. V čepeli mají listy většinou 3 až 5 hlavních nervů. V pletivech jsou siličné buňky. Drobné nenápadné květy vyrůstají v hroznovitých květenstvích. Pestík má jednopouzdrý semeník s jediným vajíčkem. Plodem je bobule nebo peckovice obalená dužnatou kupulou. Češule s okvětím a tyčinkami po odkvětu opadáva.⁵ Většina druhů má aromatické kořeny, stonky a plody. Kromě vavřínu pocházejí z této čeledi i další oblíbené potraviny, které jsou ekonomicky významné. Jmenovitě se jedná např. o skořici, kafr, či avokádo.⁶

Laurus nobilis L., známý především jako vavřín ušlechtilý, turecký vavřín, římský vavřín nebo pravý vavřín, je stálezelený dvoudomý keř, méně často i strom dorůstající výšky 15 – 20 m.^{6 7} Je jediným zástupcem vavřínovitých v Evropě.³ Kůra je hladká. Může být olivově zelená nebo načervenalá.⁶ Listy jsou střídavé nebo zdánlivě vstřícné, tuhé a podlouhlé, na vrcholu špičaté nebo zašpičatělé. Na okrajích jsou listy zvlňžené.^{8 5} Bývají 5 – 8 cm dlouhé a 3 – 4 cm široké. Na líci jsou listy lesklé a hladké, zbarvené do olivově zelené až hnědé barvy. Spodní strana je matná s nápadným žebrováním a žilnatinou.⁶ Květy jsou dvoudomé, ve svazečcích podepřených dvěma páry vstřícných listenů, okvětní lístky ve dvou dvoučetných kruzích.⁵ Samčí i samičí květy se tvoří na jaře, každý na jiné rostlině.⁹ Květy jsou malé, zbarvené do žluta. Většina samčích květů má 10 až 12 tyčinek.⁷ Samičí mají jeden semeník dozrávající v bobuli.⁵ Plodem jsou šťavnaté, vejcovité bobule.⁶ Mají nazelenalou barvu, která po dozrání přechází v purpurovou až černou barvu.⁷ Obsahují jediné semeno s volným jádrem.⁶ V průměru mají 1 – 1,5 centimetrů. Dužina tvoří 28 % hmotnosti plodu a semeno 72 %.⁷ Rostlina se množí semeny, ale i v teplém podnebí může trvat několik měsíců až rok, než začne klíčit.⁹

1.1 Výskyt

Domovinou vavřínu je Malá Asie a Balkánský poloostrov. V době starověku se rostlina rozšířila do celé oblasti středomoří.⁷ Roste spontánně v Evropě a Kalifornii.⁹

Vavřín se pěstuje v subtropích celého světa, např. ve východní Asii, Severní a Střední Americe.⁸ Do Íránu byl tento druh přinesen za vlády Kádžovské dynastie (1794-1921) a nyní je hojně pěstován na jihu, ve středu i na severu Íránu jako okrasná rostlina.² Pěstuje se komerčně pro své aromatické listy a plody v Turecku, Alžírsku, Maroku, Portugalsku, Španělsku, Itálii, Francii nebo v Mexiku.¹⁰ Turecko je největším producentem bobkového listu na světě.¹¹

1.2 Historie

Vavřín ušlechtilý má symbolický význam v mnoha náboženstvích a kulturách.⁹ Chuťové vlastnosti vavřínu ušlechtilého byly známy již od dob antiky. V biblickém čase byl vavřín symbolem bohatství a špatnosti. Ve starověké řecké a římské mytologii byly listy vavřínu symbolem nesmrtelnosti, milosti, vítězství, míru, prosperity, zásluhy, šlechty a slávy. Hrdinové a mudrci byli v dávných dobách odměňováni věnci, které byly vyrobeny z listů a větví vavřínu. Vítězové Pýthických her byli oceňováni vavřínovými věnci na počest boha Apolla. V antickém světě byli hrdinové a vítězové zdobeni vavřínovými věnci, což se dochovalo v některých sportovních odvětvích dodnes.⁶ Ve středověku se listy vavřínu začaly využívat také v medicíně.¹²

1.3 Využití

Kromě toho, že je velmi známý jako kulinářská bylina, jsou listy a plody vavřínu ušlechtilého využívány v medicíně po celém světě. Infuze nebo odvary zvyšují pocení a působí jako lék proti nadýmání. Vavřínový olej získaný z plodů je podstatná ingredience laurinové masti, oblíbeného léku proti revmatismu a dně. Využit se dá také pro léčbu chorob sleziny a jater.⁶ V turecké lidové medicíně se listy využívají jako desinfekce a také pro léčbu bolesti žaludku. V potravinářském průmyslu se ale nevyužívá jen jako kulinářská bylina, díky svým antimikrobiálním účinkům je využíván také jako konzervační látka. Plody obsahující velké množství mastných kyselin jsou využívány pro výrobu mýdel a svíček.¹³

Listy vavřínu ušlechtilého se po otrhání a vysušení ve stínu využívají jako koření v různých kulinářských přípravách, především ve francouzské, italské, řecké a turecké kuchyni.^{6 7} Listy obsahují esenciální olej, který má aromatickou kořeněnou vůni a lze ho izolovat parní destilací. Olej je cenný pomocník při kořenění všech druhů pokrmů, především masa.⁶ Listy vavřínu jsou obsaženy také v čajích a lécích určených pro léčbu cukrovky.¹⁴ Používány byly také k léčbě epilepsie, neuralgie a parkinsonismu.¹⁵

Sušené listy jsou ve Středomořských zemích přidávány do olivového oleje, aby olej získal aromatickou vůni a zvýšil chuť k jídlu.⁷

Vavřínové bobule obsahují asi 1 % aromatického těkavého oleje a 25 – 30 % tuku. Oddělený tuk je nazýván Oleum lauri. Čistý tuk je zrnitý, má kalnou zelenou barvu a aromatickou vůni. Oleum lauri se využívá ve veterinářství.⁶

Důležitým produktem získávaným z vavřínu je vavřínový esenciální olej. Jeho využití a složení je věnována samostatná kapitola 3.

1.4 Toxicita

Zdá se, že listy vavřínu ušlechtilého nevykazují žádnou významnou toxicitu. Bylo však dokázáno, že vavřínové listy mohou způsobit alergickou kontaktní dermatitidu, která je pravděpodobně způsobena jedním nebo více seskviterpenovými laktony.⁶ Seskviterpenové laktony charakterizuje přítomnost γ -butyrolaktonového kruhu s exocyklicky vázanou α -methylovou skupinou.¹⁶ Byla také izolována řada cytotoxických sloučenin z listů vavřínu ušlechtilého (např. safrol, reynosin nebo santamarin).^{6 17}

1.5 Chemické složení

Sušené listy vavřínu obsahují esenciální oleje, třísloviny, pryskyřice a rostlinný sliz. Čerstvé listy obsahují přibližně 50 % vlhkosti a sušené listy mají obsah vlhkosti 5 až 10 %. Kromě listů může být zdrojem esenciálního oleje i kůra nebo bobule vavřínu. Hlavními složkami oleje získaného z kůry jsou α -terpinylacetát, methyleugenol a α -copaene.⁷ Hlavní složky oleje získaného z bobulí vavřínu jsou potom β -ocimen, 1,8-cineol, α -pinen, lineolacetát, β -pinen a α -terpinylacetát.¹⁸ Zkoumání této rostliny vedlo k izolaci několika tříd sekundárních metabolitů, jako jsou mono a seskviterpeny, alkaloidy, glykosylované flavonoidy, megastigmatické a fenolové složky.¹⁹

Pěstované i volně rostoucí listy vykazují odlišné složení, což dokazuje studie, kterou provedl Maria Ins Dias a kolektiv.²⁰ U vzorků z volně rostoucí a z pěstované rostliny provedli stanovení cukru a celkového obsahu cukru, sacharidů, tuku a popela. Celkový obsah cukru ve vzorcích z volně rostoucích listů byl výrazně vyšší než obsah ze vzorků pěstovaných listů. Volně rostoucí listy obsahovaly vyšší obsah sacharózy a glukózy, zatímco hlavní volný cukr u vzorku z pěstovaných listů byla fruktóza.²⁰ Oba vzorky obsahovaly téměř stejné množství sacharidů, tuku, popela a energetických hodnot, zatímco vzorek listů z volně rostoucí rostliny

měl vyšší obsah bílkovin. Vzorek listů z volně rostoucí rostliny také odhalil vyšší obsah organických kyselin. V obou vzorcích byla také nalezena kyselina šťavelová a jablečná, zatímco kyselina askorbová byla izolována pouze z volně rostoucích listů.²⁰ V obou vzorcích bylo celkem nalezeno až 25 mastných kyselin. Ve vzorku pěstovaných listů byla hlavní mastnou kyselinou kyselina palmitová, doprovázená kyselinou linolenovou, zatímco ve vzorku z volně rostoucí rostliny tomu bylo přesně naopak.²⁰

2 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Stejně jako u všech organismů i u rostlin jsou základními cíli růst a množení. Proto většina metabolitů, které rostliny produkují, jsou polysacharidy a bílkoviny, které jim dávají strukturu a funkci. Vedle primárních metabolitů produkují také velmi malé množství sekundárních metabolitů, což jsou sloučeniny, které nejsou přímo spojeny s růstem a množením. Mnohé z těchto sekundárních metabolitů jsou součástí tzv. esenciálních olejů a jsou komerčně velmi cenné.²¹ Jsou rozpustné v alkoholu, etheru a v hustých olejích, ale nerozpustné ve vodě. Obecně jsou tekuté a bezbarvé při pokojové teplotě. Mají charakteristickou vůni, index lomu a velmi vysokou optickou aktivitu. Esenciální oleje obsažené v bylinkách jsou zodpovědné za jejich vůně.²²

2.1 Chemické složení

Esenciální oleje jsou velmi složité přírodní směsi, které mohou obsahovat desítky až stovky složek v naprosto odlišných koncentracích. Obvykle jsou charakterizovány dvěma nebo třemi hlavními složkami v poměrně vysokých koncentracích (20 – 70 %) v porovnání s ostatními složkami, které jsou přítomny většinou pouze ve stopovém množství. Obecně platí, že tyto hlavní složky určují biologické vlastnosti esenciálních olejů.²³

Esenciální oleje jsou soubory hydrofobních sekundárních metabolitů, které mohou být z rostliny extrahovány.²¹ Nacházejí se v různých částech rostlin. Můžeme je nalézt například v květech, kořenech, listech, plodech, semenech a kůře.¹¹ Skládají se z organických těkavých sloučenin, které mají obecně molekulovou hmotnost nižší než 300.²² Oleje mohou obsahovat terpenické uhlovodíky a jejich kyslíkaté deriváty, organické alkoholy, fenoly, aldehydy, ketony a řadu dalších sloučenin. V případě aromatických bylin bývají hlavními složkami nejčastěji mono nebo seskviterpeny a jejich deriváty.¹¹

2.1.1 Isoprenoidy

Isoprenoidy tvoří největší a nejpestřejší skupinu látek. Strukturní základ těchto látek tvoří molekula isoprenu, který se uvolňuje při tepelném rozkladu isoprenoidů. Do této skupiny látek řadíme terpeny a steroidy. Tyto látky mohou tvořit součást silic, balzámů nebo pryskyřic. Mohou být ale také strukturním základem mnoha jiných sloučenin, jako např. vitamínů, hormonů, či alkaloidů.

2.1.2 Terpeny

Podle počtu isoprenových jednotek rozlišujeme látky na hemiterpeny, monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny.

Hemiterpeny jsou složeny pouze z jediné isoprenoidní jednotky, v přírodě se vyskytují jen zřídka.

Diterpeny vznikají spojením čtyř isoprenoidních jednotek – obsahují 20 uhlíků. V přírodě se vyskytují více ve formě cyklických diterpenů. Mezi nejznámější a nejdůležitější cyklické diterpeny patří vitamín A₁ (retinol) a vitamín A₂ (3- dehydroretinol).

Triterpeny jsou látky složené ze šesti isoprenoidních jednotek – obsahují tedy 30 uhlíků. Vyskytují se často ve vyšších rostlinách ve formě alkoholů, aldehydů nebo ketonů. S cukry tvoří glykosidy a s kyselinami estery. Částečným odbouráváním triterpenů vznikají steroly.

Tetraterpeny jsou sloučeniny, které obsahují osm isoprenoidních jednotek – obsahují tedy 40 uhlíků. Nejdůležitějšími tetraterpenickými látkami jsou karotenoidy. Karotenoidy způsobují zbarvení např. mrkve nebo rajčat.

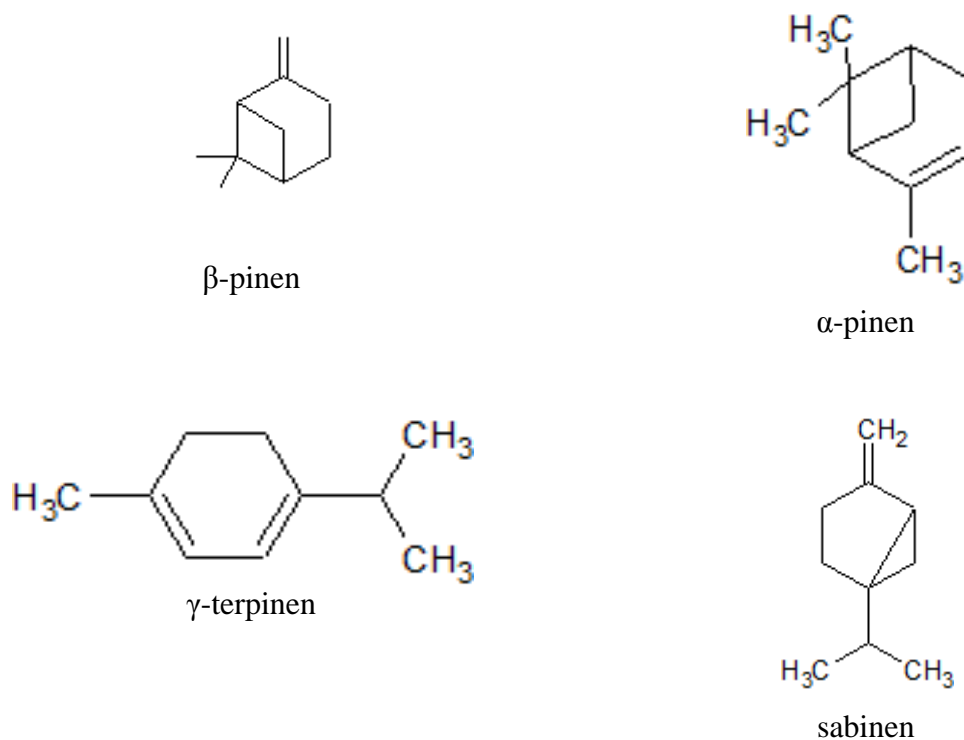
Polyterpeny vznikají polymerací několika tisíců isoprenových jednotek. Typickým zástupcem je kaučuk.²⁴

Z hlediska esenciálních olejů nás nejvíce zajímají mono a seskviterpeny a jejich kyslíkaté deriváty, které bývají nejčastějšími složkami esenciálních olejů.²³

Monoterpeny jsou tvořeny spojením dvou isoprenových jednotek.²³ Jejich kyslíkaté deriváty se nazývají monoterpenoidy. V rostlinách jsou syntetizovány v parenchymatických buňkách a následně uloženy ve vakuolách, v buněčné stěně nebo ve speciálních extrakčních pletivech jako tzv. pryskyřičné buňky. V rostlinných tkáních se monoterpeny vyskytují jak volně, tak i vázané ve formě glykosidů. Jedná se o velmi těžké látky, které jsou snadno identifikovatelné a navíc snadno získatelné destilací s vodní parou jako tzv. rostlinné silice.²⁵ Podle struktury je můžeme rozdělit na acyklické (např. levanduol, ocimene), monocyklické (např. menthones, terpinenes) a bicyklické (např. borneol, camphene). Pokud je molekula opticky aktivní, pak každý enantiomer je většinou přítomen v jiné rostlině.²³

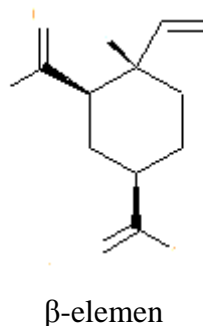
Monoterpeny jsou významné především tím, že zprostředkovávají interakce mezi rostlinou a prostředím, zajišťují komunikaci mezi rostlinami, chrání rostlinu před vysycháním, napadením škůdci nebo lákají opylující hmyz. Řada monoterpenů má také pozitivní vliv

na lidské zdraví, ale některé mohou být pro organismus naopak toxické. Pouze několik monoterpenů je pro člověka velmi toxických, řada jich ale způsobuje kožní vyrážky. Většina toxických monoterpenů jsou ketony, např. hepatotoxin pulegon obsažený v mátě, dříve používané k vyvolávání potratů. Jedovaté jsou i thujon a kafr. Neurotoxicita thujonu se může projevit halucinacemi nebo hyperaktivitou.²⁵



Obrázek 1 Strukturální vzorce vybraných monoterpenů

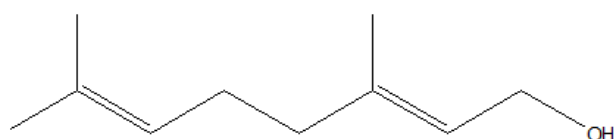
Seskviterpeny tvoří často jednu z hlavních složek silic. Základní skelet seskviterpenů obsahuje obvykle 15 uhlíkových atomů. Podle typu skeletu rozlišujeme acyklické a cyklické, které mohou být ještě monocyklické, bicyklické a tricyklické. Mezi nejvýznamnější acyklické seskviterpeny patří farnezol a nerolidol.²⁴



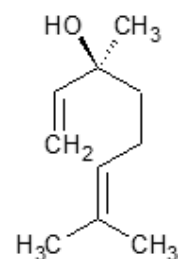
Obrázek 2 Strukturální vzorec cyklického β-elemenu

2.1.3 Alkoholy

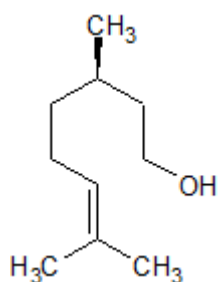
Vyskytují se jako monoterpeny a seskviterpeny. Strukturně mohou být acyklické, monocyklické nebo bicyklické. Do acyklických alkoholů patří monoterpeny geraniol, linalool a citronellol, do monocyklických mentol a mezi bicyklické řadíme borneol. Alkoholy jsou obsaženy také ve formě alifatických alkoholů, které jsou rozpustné ve vodě a při destilaci tedy přecházejí do vodné fáze.²⁶



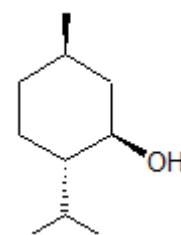
geraniol



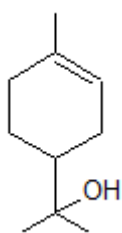
linalool



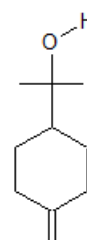
citronellol



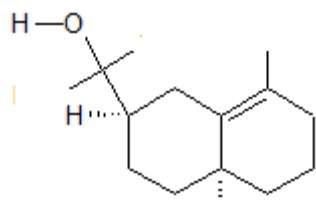
mentol



α -terpineol



δ -terpineol

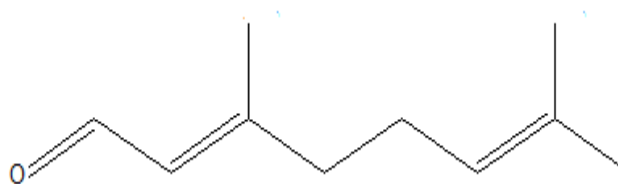


epi-10- γ -eudesmol

Obrázek 3 Strukturní vzorce vybraných terpenických alkoholů

2.1.4 Karbonylové sloučeniny

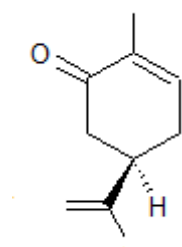
Aldehydy jsou v esenciálních olejích obsaženy jako acyklické nebo cyklické. K acyklickým patří monoterpeny citral a geraniol.²⁶



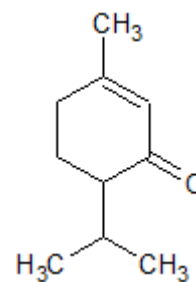
citral

Obrázek 4 Strukturní vzorec citralu

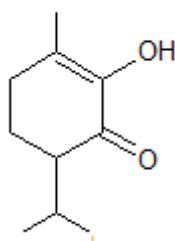
Ketony se vyskytují buď jako monocyklické monoterpeny – menthon (spojován s mátovou vůní), karvon, piperiton, diosfenol nebo jako bicyklické – kafr, thujon. Esenciální oleje mohou také obsahovat neterpenické ketony, jako je např. iron.²⁶



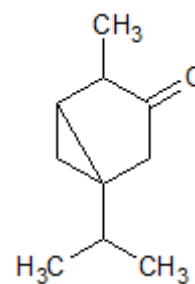
karvon



piperiton



diosphenol

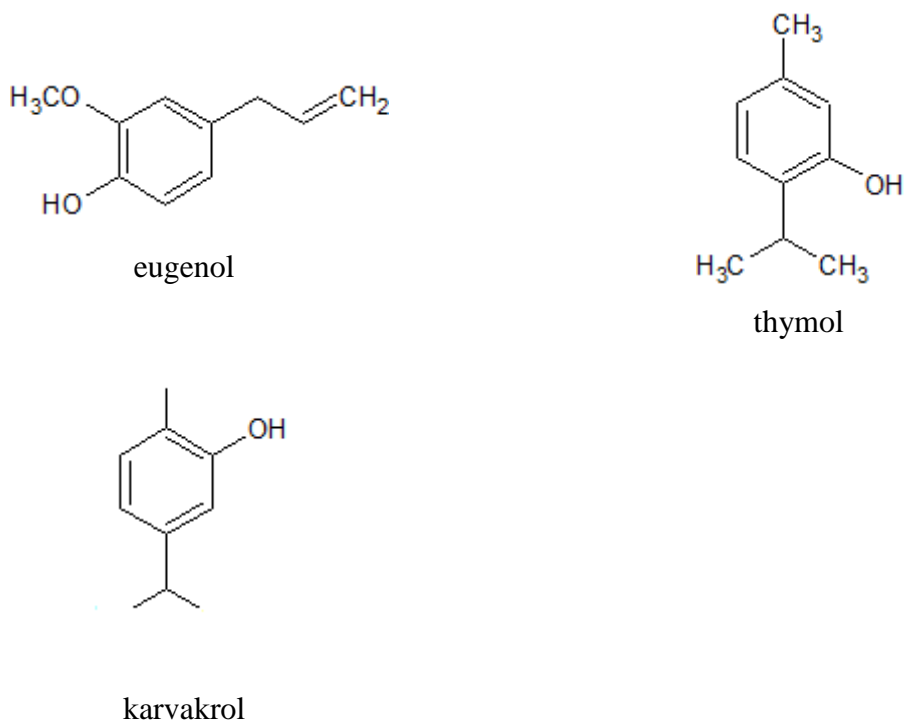


thujon

Obrázek 5 Strukturní vzorce některých terpenických ketonů

2.1.5 Fenoly

Esenciální oleje mohou fenoly přirozeně obsahovat, nebo se fenoly tvoří při destruktivní destilaci z esterů (např. eugenol acetát). Eugenol, thymol a karvakrol patří mezi nejdůležitější přírodní fenoly.²⁶



Obrázek 6 Strukturální vzorce některých terpenických fenolů

2.2 Využití esenciálních olejů

Využití esenciálních olejů má dlouhou historii. Rostlinné látky byly hlavními zdroji farmaceuticky účinných látek, které měly využití v tradiční medicíně. Již starověcí Egypťané využívali esenciální oleje jako konzervační látku.²⁷ Ve skutečnosti v celé historii mnoho civilizací používalo esenciální oleje pro různé účely, včetně náboženských rituálů, parfémů a léků proti infekčním chorobám. Během renesančního období bylo použití esenciálních olejů v parfumerii a kosmetických výrobcích rozšířeno do světa.¹¹ Esenciální oleje mají i dnes spoustu užití pro různé účely. Jsou využívány při vaření pro zlepšení chuti, ale také pro výrobu parfémů a kosmetických produktů.¹¹ Využití nacházejí ale také v alternativní medicíně při aromaterapii nebo se využívají např. i jako insekticidy.^{27 21}

Bylo prokázáno, že esenciální oleje mají také antimikrobiální, antifungální a antioxidační vlastnosti. Pro dosažení dostatečné mikrobiální aktivity je však někdy zapotřebí vysoké

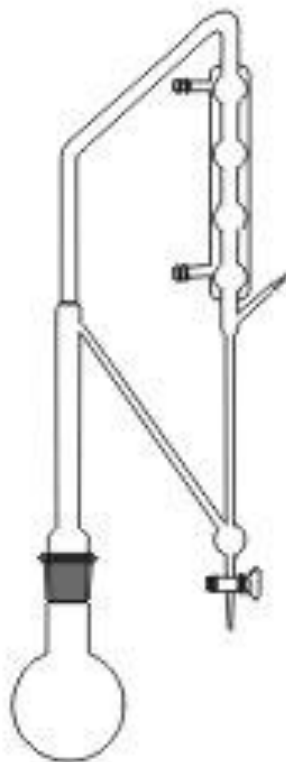
koncentrace esenciálního oleje, což by ve spojení s výraznými aromatickými vlastnostmi většiny esenciálních olejů mohlo mít negativní vliv na organoleptické vlastnosti potravin.²⁸

2.3 Získávání rostlinných silic

Nejpoužívanější metody pro získání esenciálního oleje jsou hydrodestilace nebo destilace vodní parou. Část rostliny, ze které chceme olej získat, by měla být čerstvá, částečně nebo úplně vysušená.¹¹ Pro získávání esenciálních olejů z rostlin se ale také využívá mnoho extrakčních metod. Metody můžeme rozdělit do dvou kategorií – klasické a inovativní. Mezi klasické můžeme zařadit např. hydrodestilaci nebo destilaci vodní parou. Za inovativní metodu bychom mohli považovat mikrovlnou destilaci nebo extrakci nadkritickou tekutinou. Zkoumání nových technologií vedlo v posledních desetiletích ke zkvalitnění extrakčních procesů. Došlo například ke zkrácení extrakční doby, snížení spotřeby energie, zvýšení kvality esenciálních olejů a také ke zvýšení výtěžku extrakce.²⁹

2.3.1 Hydrodestilace

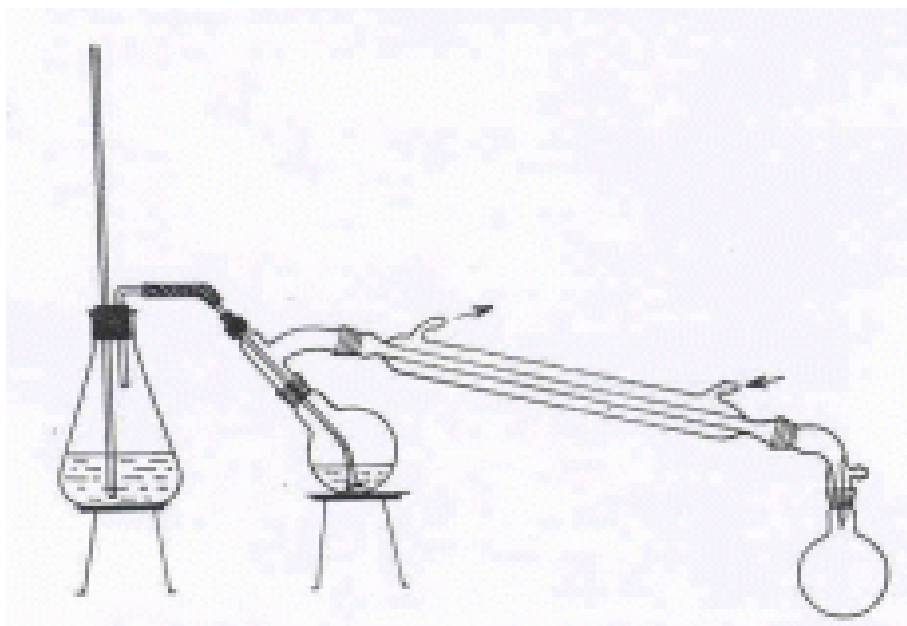
Tato metoda je běžně využívaná metoda pro extrakci esenciálních olejů.²⁹ Materiál, který chceme destilovat, přichází do přímého kontaktu s vroucí vodou. Princip extrakce je založen na principu azeotropické destilace. Při atmosférickém tlaku molekuly vody a esenciálního oleje tvoří heterogenní směs. Tato směs má teplotu varu kolem 100 °C, zatímco samotné složky esenciálního oleje mají teplotu varu mnohem vyšší. Výhodou vody je, že je nemísitelná s většinou terpenických složek esenciálního oleje, a tak se po kondenzaci dá voda snadno oddělit od esenciálních olejů prostou dekantací. Nevýhodou této metody jsou dlouhá doba extrakce (3 – 6 hodin), nebo chemické změny terpenických molekul při dlouhotrvajícím kontaktu s vroucí vodou. Může také dojít k přehřátí a tím ke ztrátě některých polárních molekul ve vodné fázi.²⁹



Obrázek 7 Aparatura typu Clevenger – využívaná pro hydrodestilaci ³⁰

2.3.2 Destilace vodní parou

Při této metodě dochází k přímé destilaci rostlinného materiálu pomocí vodní páry. ³¹ Na rozdíl od hydrodestilace není rostlinný materiál v kontaktu s vroucí vodou, ale pouze s vodní párou, což umožňuje šetrnější předestilování látek s podstatně vyšší teplotou varu, než má voda. Využívá se toho, že při teplotě varu vody má izolovaná látka určitou tenzi par a jí odpovídá obsah této látky v párách nad kapalinou. Pokud jsou páry této složky odstraňovány proudem plynu, např. proudem vodní páry, dojde k urychlení vypařování složky, kterou chceme izolovat. Vodní pára projde chladičem a kondenzuje a spolu s ní také izolovaná složka. Je-li tato kapalina velmi málo rozpustná ve vodě, pak dojde k jejímu oddělení v kondenzátu. Výhodou této metody je, že množství páry může být snadno kontrolováno. Pára je vyvíjena odděleně ve vyvíječi par. Při zahřívání materiálu tedy teplota není vyšší než 100 °C a nemělo by docházet k tepelné degradaci. ³¹



Obrázek 8 Aparatura pro destilaci vodní parou ³²

2.3.3 Mikrovlnná destilace

Pro získávání esenciálních olejů lze také využít schopnosti mikrovlnného záření účinně zahřívat pevný materiál. Rostlina je umístěna v mikrovlnné dutině a ozářena pomocí mikrovln. Studie ukazují, že tato metoda je vhodnější pro extrakci složek, které mají vysoký bod varu. ³¹

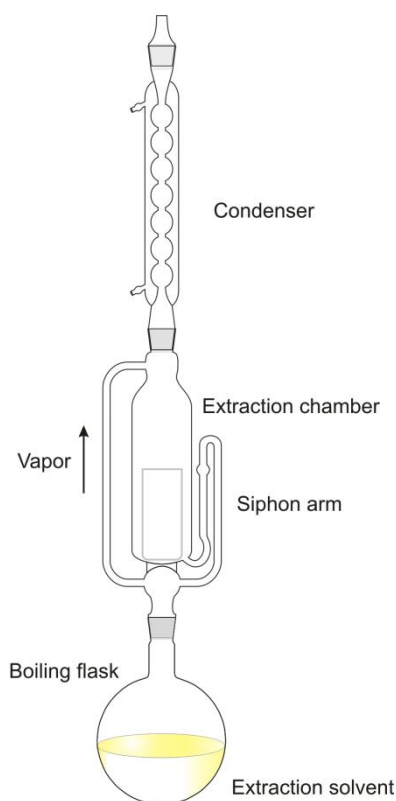
Účinnost MAHD (mikrovlnné hydrodestilace) je silně závislá na dielektrické konstantě vody a matrice. MAHD způsobuje rychlé dodání energie k celkovému objemu rozpouštědla/vzorku, což vede k rychlému nárůstu teploty. Teplo je vyvolané prostřednictvím molekulových pohybů uvnitř polárních nebo iontových komponent. Pokud tlak uvnitř žláz překročí určitou hodnotu, vnější buněčné stěny se naruší a dochází k uvolnění esenciálního oleje. ³³

2.3.4 Macerace

Při tomto procesu je celá nebo nahrubo nadrcená droga umístěna do uzavřené nádoby s rozpouštědlem. Proces probíhá při pokojové teplotě. Drogu v rozpouštědle necháme loužit, dokud nedojde k vyloužení rozpustných složek do rozpouštědla, nejméně však 3 dny. Po tuto dobu směs často mícháme. ³¹

2.3.5 Extrakce tuhé látky kapalinou

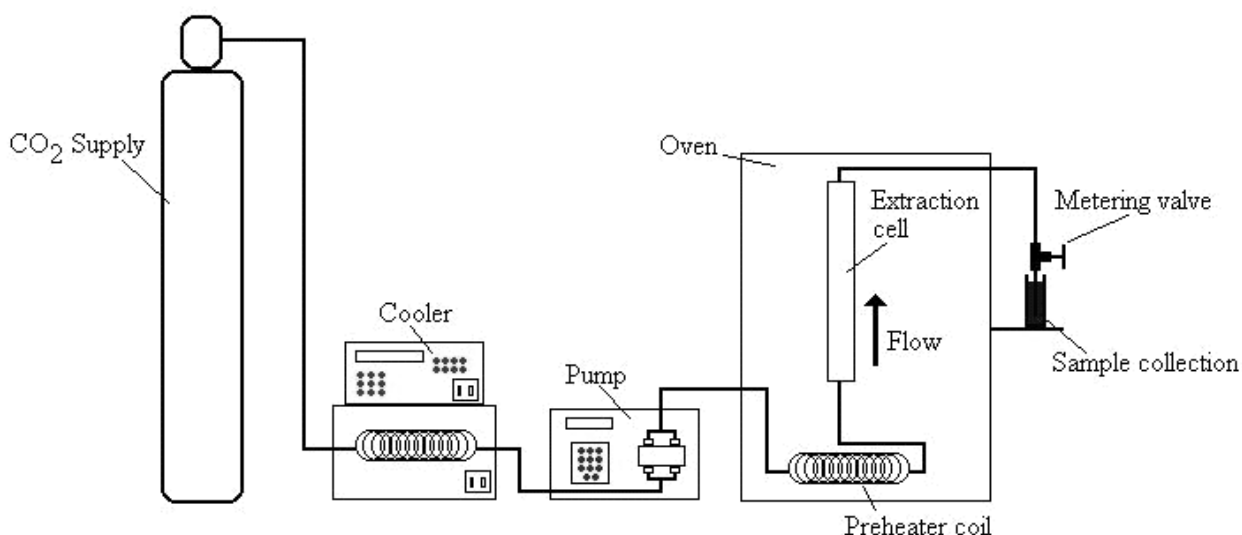
Často je pro extrakci používán také Soxhletův extraktor. Využití pro extrakci esenciálních olejů ale není moc vhodné, při oddestilování rozpouštědla by totiž mohlo dojít ke ztrátám silic. Vzorek plníme do extrakční patrony, kterou vkládáme do střední části přístroje. Před převedením do patrony vzorek upravíme na co nejmenší velikost částic. Extraktor plníme vhodným rozpouštědlem, ve kterém je extrahovaná složka dobře rozpustná. Na extraktor je nasazena destilační baňka. Baňku je nutné zahřát na teplotu varu rozpouštědla. Páry rozpouštědla stoupají postranní trubičkou do chladiče, kde kondenzují. Rozpouštědlo kape na vzorek v extrakční patroně. Střední část extraktoru se postupně plní zkondenzovaným rozpouštědlem. Pokud stoupne hladina až k nejvyšší části přepadové trubičky, přeteče roztok do destilační baňky. Z destilační baňky se těkávé rozpouštědlo znovu destiluje. Na konci extrakce získáme v destilační baňce roztok jedné nebo více složek. Rozpouštědlo po ukončení extrakce vydestilujeme a v baňce zůstane jen izolovaná složka.³⁴



Obrázek 9 Soxhletův extraktor³⁵

2.3.6 Extrakce nadkritickou tekutinou

Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) je účinná metoda pro získání cenných rostlinných složek. Je to proces, při kterém dochází k oddělení jedné složky od ostatních použitím superkritické kapaliny (kapaliny v nadkritickém stavu) jako extrakčního rozpouštědla. Superkritická kapalina je jakákoli látka ve stavu nad svým kritickým tlakem a teplotou. Nejčastěji se jako extrakční rozpouštědlo využívá oxid uhličitý, který je zároveň vhodný pro extrakci rostlinných složek. Podmínky extrakce pro superkritický CO₂ jsou nad kritickou teplotou 31 °C a kritickým tlakem 74 bar. Mezi další využívaná rozpouštědla patří například voda, metanol, etanol nebo aceton.³⁶



Obrázek 10 Schéma aparatury pro extrakci nadkritickou tekutinou³⁶

2.3.7 Mikroextrakce tuhými fázemi

Tato technika byla poprvé představena Pawliszynem a spol.³⁷ Jedná se o screeningovou metodu, při které je analyzován celý extrakt, tedy že z jednoho extraktu je možné provést pouze jednu analýzu. Redukuje použití toxických organických rozpouštědel, podstatně zkracuje dobu extrakce a umožňuje automatizaci přípravy vzorku. Významnými znaky této metody jsou jednoduchost, nízké pořizovací a provozní náklady, rychlost a také selektivita a citlivost ve spojení s vhodnou detekční metodou.³⁸ Nevýhodou této techniky může být křehkost vlákna, dále také omezený teplotní rozsah vlákna. Extrakce může probíhat v parním prostoru vialky nebo může být vlákno přímo ponořeno do roztoku vzorku. Extrakce může

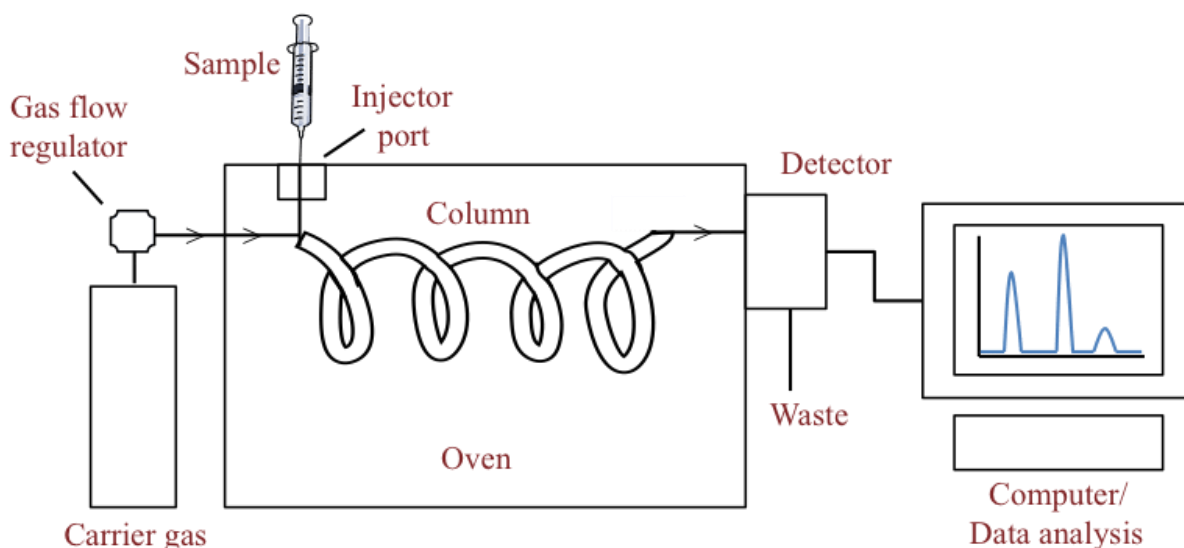
probíhat v rozmezí od pokojové teploty až do 250 °C, po dobu od jednotek minut až do 30 minut, ve speciálních případech až v řádu hodin.³⁹

2.4 Analýza oleje

V současnosti jsou složky esenciálních olejů identifikovány především pomocí plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) nebo pomocí plynového chromatografu vybaveného plamenovým ionizačním detektorem (FID) a kapilární kolonou.¹¹

2.4.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je metoda, která se využívá k separaci těkavých sloučenin a umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu. Přístroj se nazývá plynový chromatograf (obrázek č. 11) a využívá se k analýze kapalných a plynných vzorků. Aby byla možná analýza kapalných vzorků, musí se ihned po nadávkování přeměnit na plyn. Dochází k rozdělování analyzované látky mezi stacionární a mobilní fázi. Mobilní fáze je vždy plynná, nazývá se také jako nosný plyn (umožňuje transport látek kolonou). Nosný plyn je odebírán z tlakové láhve a chromatografem se pohybuje za konstantního průtoku. Nejčastěji se jako nosný plyn využívá dusík, vodík nebo helium. Hojně využívaný vodík má však určité nevýhody, je expozivní, hořlavý a také může způsobit hydrogenaci některých látek, které jsou pak detekovány navíc. Stacionární fáze může být buď kapalina zakotvená na povrchu inertního nosiče, nebo tuhá látka. Dávkování vzorku se provádí injekčními stříkačkami, pro plynové vzorky se využívají stříkačky plynotěsné. Nadávkovaná látka je unášena v proudu nosného plynu kolonou, která je naplněna stacionární fází. Při průchodu kolonou se směs dělí na jednotlivé složky na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Na konci kolony je připojen vhodný detektor, který umožňuje detekci vycházejících látek. Výsledkem analýzy je nejčastěji kontinuální záznam (chromatogram), na kterém se přítomnost analyzované látky projeví analytickým signálem (tzv. „píkem“).^{40 41}



Obrázek 11 Schéma plynového chromatografu ⁴²

2.4.1.1 Chromatografické kolony

V plynové chromatografii se využívají dva typy kolon – náplňové nebo kapilární. Náplňové kolony jsou plněné buď sorbentem (silikagel, oxid hlinitý nebo molekulová síta – hlinitokřemičitany) nebo nosičem, který je pokrytý vhodnou kapalnou fází (např. polyethylenglykol). Rozpustnost plynu v kapalinách je velmi nízká, proto se k separaci plyných látek využívá spíše pevná fáze. Vyrábějí se z oceli nebo skla, vnitřní průměr je 2 až 3 mm a délka 1 až 3 metry. Tyto kolony bývají v poslední době nahrazovány kolonami kapilárními, které mají mnohem vyšší separační účinnost. Kapilární kolony jsou využívány ve třech formách podle uložení mobilní fáze: WCOT (Wall Coated Open Tubular) kolona, SCOT (Support Coated Open Tubular) a PLOT (Porous Layer Open Tubular). WCOT je kolona s kapalnou stacionární fází, která tvoří tenký film, kolony musí být úzké, aby byl zajištěn dostatečný styk mobilní a stacionární fáze. Kolony SCOT mají na vnitřní straně vrstvu nosiče, na kterém je zakotvena kapalina a PLOT kolony obsahují tenkou vrstvičku pórovitého materiálu jako absorbentu (např. aluminu). Podle délky tyto kolony rozdělujeme na krátké (5 – 15 m), střední (20 – 30 m) a dlouhé (50 – 100 m), přičemž pro většinu analýz je nejžádanější kolona o délce 30 m. Kapilární kolony se vyrábějí z křemenného skla a jsou potaženy filmem polyamidu, který jim dodává pevnost. Běžně používané kolony mají průměr v desetinách mm, délka může být několik desítek metrů. Stacionární fáze je rozprostřena na vnitřních stěnách kapiláry. ^{41 43 44}

2.4.1.2 Detektory

Detekční systém rozlišuje molekuly analyzované látky v mobilní fázi. Odezva detektoru je založena na měření určité fyzikální vlastnosti látek (např. iontový proud, tepelná vodivost nebo elektronový záchyt). Signál by měl být přímo úměrný prošlému množství analyzované látky. Důležité je, aby detektor byl vysoce selektivní pro stanovované látky. Používá se několik typů detektorů: ^{41 43 44}

Plamenový ionizační detektor

Plamenový ionizační detektor je tvořen tryskou, která je zapojena jako katoda. U ústí této trysky hoří vodíkový plamínek, ve kterém dochází k ionizaci látek vycházejících z kolony. Pokud detektorem prochází pouze nosný plyn je ionizace poměrně malá. Přítomnost analyzované složky v nosném plynu zvýší ionizaci až o několik řádů. Nad plamenem je umístěna sběrná elektroda, které slouží jako anoda. Na elektrody je vloženo stejnosměrné napětí. Ionty, které vzniknou v plameni, jsou přitahovány vždy k opačně nabitě elektrodě, dochází ke vzniku ionizačního proudu, který je po zesílení registrován v závislosti na čase. ⁴⁰ Detektor se vyznačuje velmi širokým dynamickým rozsahem a vysokou citlivostí, s výjimkou několika nízkomolekulárních látek detekuje všechny látky s uhlíkem. Nejvhodnějším nosným plynem je v tomto případě dusík. ^{41 45}

Tepelně vodivostní detektor

Detektor obsahuje vlákno žhavené stálým elektrickým proudem, které je protékajícím nosným plynem ochlazováno na určitou teplotu. Průchod látky detektorem se projeví změnou tepelné vodivosti v prostředí kolem vlákna, tím dojde i ke změně jeho teploty a elektrického odporu. Tento typ detektoru je oblíbený pro svou univerzalitu. V praxi se vedle sebe zapojují dva tyto detektory, kdy přes jedno vlákno proudí pouze čistý nosný plyn a přes druhé plyn vycházející z kolony. ^{41 43}

Detektor elektronového záchytu

Jedná se o selektivní ionizační detektor citlivý na elektronegativní atomy, zejména na halogeny. Nosný plyn je vlivem β záření v detektoru ionizován a tím dochází ke vzniku konstantního proudu. Elektronegativní atomy zachytávají pomalé elektrony, čímž dochází ke snížení ionizačního proudu. Detektor je velmi vhodný pro stopovou analýzu pesticidů v životním prostředí. ^{43 45}

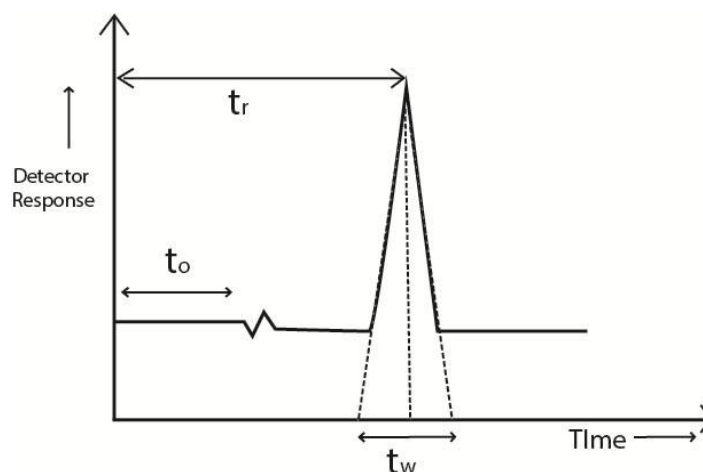
Záznam chromatogramu

Výsledkem plynové chromatografie je grafický záznam, nazývaný také chromatogram, který udává závislost napěťové odezvy detektoru na čase. Ze získaných chromatogramů můžeme vyhodnotit např. retenční parametry jednotlivých signálů, plochy a výšky píků.⁴³

Retenční čas t_r – celkový čas, který příslušná molekula složky stráví v separační koloně.

Mrtvý objem kolony V_M – objem elučního činidla, který musí projít separační kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.

Mrtvý čas kolony t_M – retenční čas analytu, který není v koloně zadržován (analytu, který se kolonou pohybuje stejnou rychlostí jako mobilní fáze).^{41 43}



Obrázek 12 Schéma plynového chromatogramu⁴⁶

2.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda, při které dochází k separaci iontů a fragmentů analyzované látky v magnetickém poli. Ionty a fragmenty vznikají ionizací molekul nevratným odštěpením valenčních elektronů v iontovém zdroji. Vlivem silného elektrického pole se jejich proud urychlí a je veden jako tenký svazek letících částic do homogenního magnetického pole, ve kterém dojde k rozlišení jednotlivých částic podle jejich efektivních hmotností. Částice, které mají stejné efektivní hmotnosti, vychází z magnetického pole jako svazky zaostřené na stejné místo detektoru. Intenzita signálu je úměrná počtu dopadlých částic. Výsledkem je záznam, tzv. hmotnostní spektrum, na kterém jsou registrovány jednotlivé signály v závislosti na efektivní hmotnosti.³⁴

2.4.3 GC-MS metoda

Jedná se o metodu, která spojuje plynovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii. Hmotnostní spektrometrie je v tomto případě využívána jako analytická koncovka, která slouží k identifikaci látek rozdělených plynovou chromatografií.

Z plynového chromatografu přichází oddělená látka do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. V okamžiku, kdy v iontovém zdroji koncentrace látky dosáhne maxima, které odpovídá maximu chromatografického píku, zaznamená se hmotnostní spektrum.³⁴

2.5 Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovování antioxidační aktivity látek se nejčastěji využívá přímá reakce s radikály nebo reakce s přechodnými kovy. Obecně mohou být postupy rozděleny do dvou skupin: (a) metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a (b) metody posuzující redoxní vlastnosti látek.⁴⁷

2.5.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Při těchto metodách se hodnotí schopnost vzorku vyladit volné radikály, které mohou být v reakční směsi generovány nebo jsou do ní přidávány. Z chemického hlediska je jedná o radikály kyslíkové (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické (DPPH, ABTS⁺, galvinoxyl).⁴⁷

2.5.1.1 Metoda používající ABTS

Jedná se o metodu, při které je stanovována celková antioxidační kapacita (TAA) na základě schopnosti vzorku či látek zhaset kation-radikál ABTS. Bývá také označována jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), protože výsledná antiradikálová aktivita je srovnávána s aktivitou syntetické látky Troloxu. Zhasení radikálu ABTS antioxidanty se sleduje spektrofotometricky, nejčastěji je měřena absorbance při 734 nm. Tato metoda je jednoduchá, rychlá a má široké uplatnění (umožňuje stanovování TAA i pro směsné vzorky).^{47 48}

2.5.1.2 Metoda používající DPPH

Při této metodě dochází k reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem-DPPH. Při reakci je radikál redukován za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). I tato reakce bývá nejčastěji sledována spektrofotometricky, kdy se měří pokles absorbance při 517 nm. Ke sledování je ale také možno využít metodu kapalinové

chromatografie (HPLC), která je výhodná především pro barevné vzorky. Test je možné provádět i na mikrotitračních destičkách. Je možné stanovení i radikálové aktivity směsných vzorků, u kterých se někdy vyjadřuje i v ekvivalentech kyseliny askorbové nebo v jednotkách standardu Troloxu.⁴⁷

2.5.1.3 Metoda používající galvinoxyl

Při této metodě dochází stejně jako při testu DPPH k redukci stabilního radikálu – v tomto případě galvinoxylu. Reakce se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm.⁴⁷

2.5.1.4 Metoda ORAC

Jedná se o fluorescenční metodu. Při použití ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se v testovaném systému generují kyslíkaté radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Jako detekce se využívá sledování úbytku fluorescence β -fykoerytrinu (β -PE) po ataku radikály.^{47 48}

2.5.1.5 Metody založené na vychytávání OH-radikálů

Při této metodě jsou OH-radikály generovány různými postupy (např. UV fotolýzou peroxidu vodíku) a detekce je založena na vychytávání radikálů látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající OH radikály tvorbu těchto produktů snižují. Jedním z možných postupů je vychytávání radikálů salicylovou kyselinou, kdy vznikají hydroxylované produkty této kyseliny a jejich detekce se provádí pomocí HPLC s UV detekcí.⁴⁷

2.5.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

2.5.2.1 Metoda FRAP

Při metodě FRAP (ferric reducing antioxidant potential) redukují antioxidanty ze vzorku železité komplexy jako je například TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) nebo ferrikyanid. Stanovuje se nárůst absorbance při 563 nm odpovídající množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ, který je mírou antioxidační aktivity stanovovaného vzorku.^{47 48}

2.5.2.2 Cyklická voltametrie

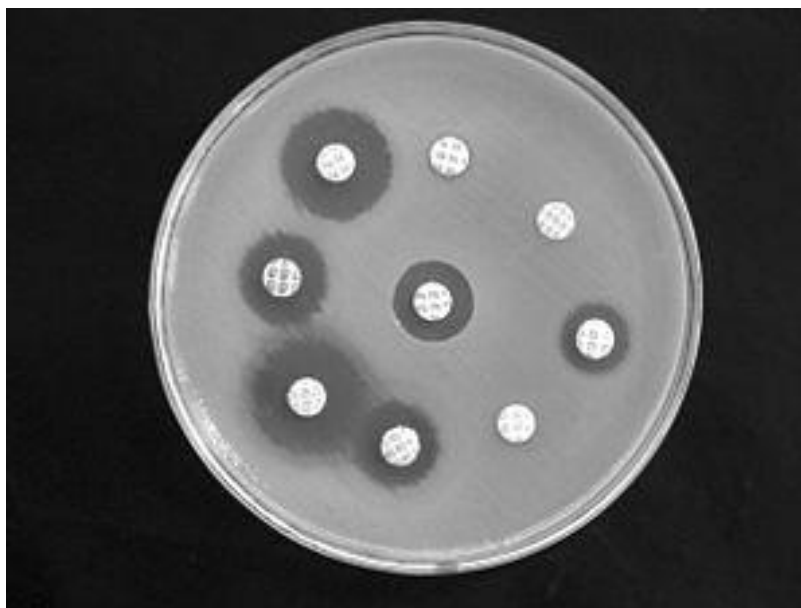
Jedná se o metodu, která indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony. Na pracovní elektrodu se vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně jsou sledovány proudové odezvy v roztoku sledované látky. Výsledným záznamem je křivka – tzv. cyklický

voltamogram. Redukční schopnost látek se poté vyhodnocuje z potenciálu anodického oxidačního píku a jeho anodického proudu.^{47 48}

2.6 Stanovení antimikrobiální aktivity

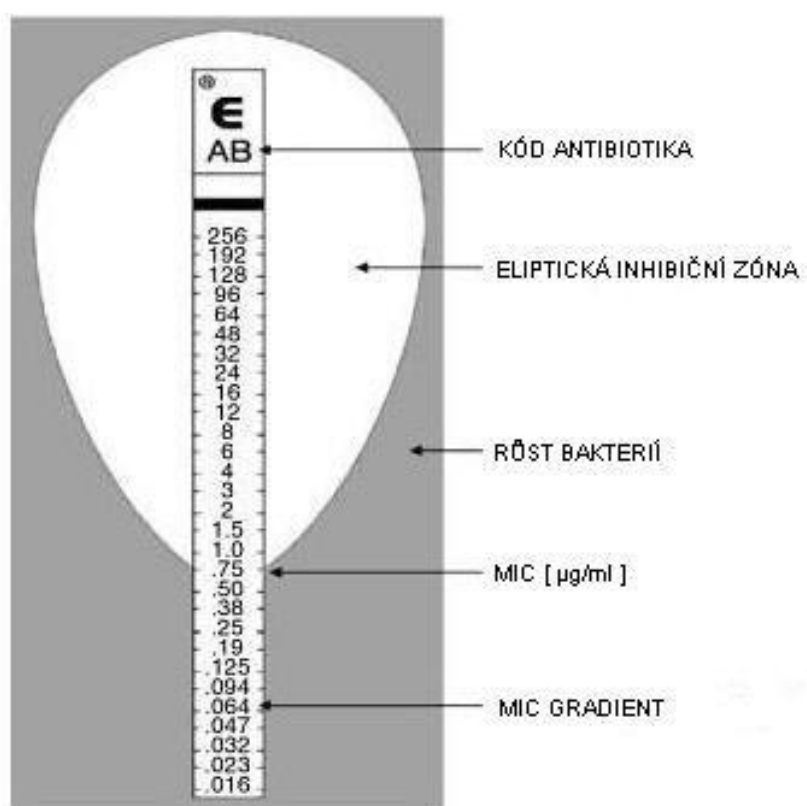
Nejčastější metodou pro stanovení antimikrobiální aktivity je disková difúzní metoda. Metoda určuje, zda je daný mikroorganismus na testované antibiotikum citlivý nebo rezistentní. Test se provádí tak, že z kolonie mikroorganismu se připraví suspenze, která odpovídá zákalu 0,5 na McFarlandově stupnici. Suspenzi naočkujeme na agar pomocí vatového tampónku nebo pipetou. Poté se pomocí speciálního dávkovače na agar přikladou ATB disky. Celé necháme inkubovat (nejčastěji při 37 °C 24 hodin). Po inkubaci měříme průměry inhibičních zón a výsledek porovnáme se standardními hodnotami a podle toho určíme, zda je daný mikroorganismus citlivý nebo rezistentní.^{49 50}

Další metodou pro stanovení antimikrobiální aktivity je agarová diluční metoda, při které se stanovuje minimální inhibiční koncentrace (MIC) – nejnižší testovaná koncentrace daného antibiotika, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů. Jako živné médium používá Mueller-Hinton agar obohacený o testovanou antimikrobiální látku vždy v požadované koncentraci. Na povrch předsušeného agaru na Petriho misce se aplikuje inokulum vyšetřované bakterie formou spotů speciálním vzorkovačem. Na jedné misce můžeme testovat až 20 různých kmenů bakterií. Vyšetřované kmeny naočkujeme na všechny připravené koncentrace testovaného antibiotika a po inkubaci odečteme hodnotu MIC.⁵¹



Obrázek 13 Provedení diskové difúzní metody⁵²

V dnešní době se využívá i moderní metoda, která kombinuje principy diskové difúzní a agarové diluční metody. Tato metoda se nazývá Etest a k vlastnímu provedení se využívá plastový proužek, na spodní straně je imobilizovaný předdefinovaný koncentrační gradient daného antibiotika ve vysušeném stavu. Koncentrační gradient je kalibrován jako odpovídající hodnoty MIC, jedná se o stupnici nejméně 15 dvojnásobných ředění, která je umístěna na horní straně Etestu. Test se provádí na Petriho misce s agarem, na jehož povrch je aplikována suspenze vyšetřovaného mikroorganismu. Po umístění na povrch plotny dojde k uvolňování antibiotika do agraru a inkubační době se odečte hodnota MIC v místě křížení eliptické inhibiční zóny se stupnicí gradientu.⁵¹



Obrázek 14 Schéma Etestu⁵¹

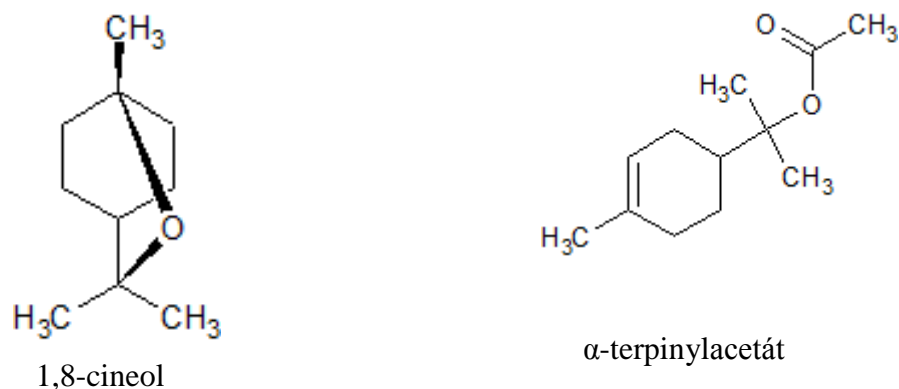
3 VAVŘÍNOVÝ OLEJ

3.1 Využití

Vavřínoý olej se využívá v kosmetice na výrobu krémů, parfémů a mýdel² ale také na výrobu šampónu, který se využívá na léčbu lupénky a proti lupům.¹¹ V zemědělském sektoru se olej využívá jako přírodní pesticid při ochraně plodin po sklizni. Používá se také pro léčebné účely, jako je léčba revmatické bolesti, nataženého svalu nebo zažívacích potíží. Navíc má antibakteriální,² protizánětlivé, antifungální a antivirové účinky.¹¹ Byly zjištěny také pozitivní účinky vavřínového esenciálního oleje proti bakteriím, které způsobují onemocnění trávicí soustavy, jmenovitě *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexnerii* a *Salmonella typhi*. Extrakty z listů vavřínu ušlechtilého působí hypoglykemicky. Listy vavřínu umocňují činnost insulínu při metabolismu glukosy a omezují její transport. Experimentálně byla prokázána pozitivní účinnost semen vavřínu ušlechtilého na vyvolané žaludeční vředy u potkanů.⁶ V důsledku takto hojného využití se poptávka po vavřínovém esenciálním oleji na trhu pozoruhodně zvýšila. Zvýšení poptávky vyvolalo hledání nejlepší extrakční metody, která by zlepšila jak výtěžek, tak kvalitu vavřínového esenciálního oleje.²

3.2 Zisk a složení

Esenciální oleje získané z listů, plodů i větviček vavřínu mají jemnou, květinovou, kořeněnou a aromatickou vůni.⁷ Chemickým složením vavřínového esenciálního oleje se zabývalo mnoho studií. Ve většině případů byly hlavními složkami vavřínového esenciálního oleje 1,8-cineol (eukalyptol) a α -terpinylacetát.² Přítomnost 1,8-cineolu ve vysokém množství dělá olej získaný z listů vavřínu ušlechtilého důležitou položkou v parfumerii.⁶ Pro získávání vavřínového esenciálního oleje se využívá nejčastěji hydrodestilace v aparatuře typu Clevenger. Objevují se ale také inovativní techniky jako je SFE nebo MAHD, které zkracují dobu extrakce a jsou v dnešní době také poměrně často využívané. Destilace s vodní parou nebývá pro získávání tohoto oleje příliš využívána, protože hlavní složky oleje – monoterpeny jsou náchylné k chemickým přeměnám při provedení této metody.^{2 38} Zvolená extrakční² Vliv na složení esenciálního oleje má destinace růstu samotné rostliny, zvolená extrakční metoda pro získání oleje i způsob úpravy vzorku, jak je popsáno v následujícím oddíle. Hlavní složky jsou většinou podobné, ovšem v různém zastoupení. Složení vavřínového oleje má vliv na antimikrobiální aktivitu



Obrázek 15 Strukturní vzorce hlavních složek vavřínového oleje

3.2.1 Porovnání chemického složení esenciálního oleje z vavřínu ušlechtilého z dostupných zdrojů

A. Taban a kolektiv² extrahovali esenciální oleje z listů pocházejících z Íránu. Listy byly sušeny po dobu jednoho týdne ve stínu v laboratoři při teplotě 20 – 25 °C. Byly zabaleny v polyethylenových pytlích s vysokou hustotou a poté byly opatrně namlety a prosety přes síť s póry o průměru 0,5 mm, s cílem získat homogenní materiál. Extrakce esenciálního oleje byla provedena třemi různými metodami. Využité metody byly **hydrodestilace** (HD) provedená v aparátu British Pharmacopeia Clevenger, **parní hydrodestilace** (HSD) provedená v přístroji typu Kaiser a Lang a **mikrovlnná hydro-destilace** (MAHD), která byla provedena pomocí mikrovlnné trouby, která měla nastavený výkon na 400 W po dobu 45 minut. Při každé metodě bylo pro extrakci použito stejné množství vzorku (50 g). Získané esenciální oleje byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) a plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID). Jako mobilní fáze byl použitý dusík a jeho průtok byl 1 mililitr za minutu. V článku je popisován vliv extrakční metody na barvu, kvalitu a složení získaného esenciálního oleje. Uvádějí, že esenciální oleje získané HD a HSD byly bezbarvé kapaliny, zatímco olej získaný MAHD měl barvu světle žlutou. Dále uvádějí, že nejkvalitnější esenciální olej byl ten získaný HD a naopak nejméně kvalitní olej poskytla HSD metoda. Složení bylo u všech tří extraktů podobné, ale lišilo se z hlediska kvantitativního. Hlavními složkami byly eukalyptol (34,37 – 50,07 %), α -terpinylacetát (14,93 – 18,78 %), terpinen-4-ol (4,72 – 6,02 %) a sabinen (4,95 – 5,93 %). Všechny esenciální oleje obsahovaly také velké množství kyslíkatých monoterpenů (eukalyptol, α -terpinylacetát).²

Skupina **L. Caputo a kol.**⁵³ extrahovala esenciální olej z listů vavřínu ušlechtilého pocházejících z Itálie **hydrodestilací**. K samotné analýze bylo použito 100 g rozmělněných

sušených listů. Extrahovaný žlutý esenciální olej byl analyzován pomocí (GC-FID). K separaci byla využita HP-5MS kapilární kolona. Analýza byla provedena také pomocí GC-MS metody. V tomto případě byla použita kapilární kolona DB-5. Jako mobilní fáze bylo použito helium a jeho průtok byl 1 mililitr za minutu.⁵³ V esenciálním oleji bylo celkem analyzováno 55 složek. Největší podíl (48,6 %) tvořily kyslíkaté monoterpeny. Mezi hlavními byly 1,8-cineol (31,9 %), sabinene (12,2 %) a linalool (10,2 %). Dalšími sloučeninami byly α -terpinylacetát (5,9 %), α -pinen (5,8 %), α -terpineol (3,3 %), methyl-eugenol (3,3 %), neoiso-isopulegon (2,5 %), eugenol (1,6 %), β -pinen (1,4 %) a γ -terpinen (1,0 %). Seskviterpeny tvořily 3,4 %, uhlovodíky 3,2 % a kyslíkaté sloučeniny 0,2 % oleje.⁵³

Kolektiv autorů **G. Flamini a kol.**⁵⁴ získal vavřínový esenciální olej z listů **hydrodestilací** provedenou v Clevengerově destilačním zařízení, hydrodestilací s přidaným mikrovlnným systémem nastaveným na 300 W, hydrodestilací s přidaným mikrovlnným systémem nastaveným na 200 W a hydrodestilací s impulsovým mikrovlnným systémem. Před samotnou destilací byly listy vysušeny do konstantní hmotnosti. Získaný esenciální olej byl analyzován pomocí plynového chromatografu s kapilární kolonou HP-5 a HP-WAX. Jako nosný plyn byl využit dusík. Chromatograf byl vybaven plamenovým ionizačním detektorem. Identifikace jednotlivých složek byla provedena porovnáním jejich retenčních časů s časy standardů. V esenciálních olejích bylo celkem identifikováno 40 složek v různém poměru. Některé těkavé složky jako například β -elemen, spathulenol a epi-10- γ -eudesmol byly identifikovány pouze v oleji, který byl získaný klasickou hydrodestilací. Naproti tomu δ -terpineol a borneol byly identifikovány pouze v esenciálních olejích získaných metodami s mikrovlnným systémem.⁵⁴

Jelnar Z. a kol.⁵⁵ extrahovali esenciální olej z listů vavřínu ušlechtilého **hydrodestilací**. Listy využitě k extrakci byly sesbírány na jaře 2007 v Jordánsku. Esenciální olej byl získaný ze 100 g sušených listů v aparatuře typu Clevenger. Jednotlivé složky esenciálního oleje byly analyzovány plynovým chromatografem s hmotnostním spektrometrem (GC-MS). K analýze byla použita DP-5MS kolona a jako nosný plyn bylo využito helium. Hlavní složkou esenciálního oleje získaného z listů vavřínu ušlechtilého byl 1,8-cineol, který tvořil 40,91 %. Dalšími identifikovanými monoterpeny byly α -pinen (5,82 %), β -pinen (4,55 %), sabinen (6,92 %), limonen (2,10 %), linalool (1,29 %) a α -terpinylacetát (5,86 %).⁵⁵

Skupina autorů **Jouda Mediouni Ben Jemaa a kol.**⁵⁶ ve svém článku dokazuje, že na složení esenciálního oleje má také vliv lokalita růstu samotné rostliny. V článku popisují složení

esenciálních olejů extrahovaných z listů pocházejících z Tuniska, Alžírsko a z Maroka **hydrodestilací**. Listy vavřínu byly sklizeny v únoru 2010 a před samotnou destilací byly sušeny při pokojové teplotě (20 – 25 °C) po dobu jednoho týdne a poté byly uloženy v látkových sáčcích. Esenciální oleje byly získány ze 100 g sušených listů a analýza byla provedena plynovým chromatografem s plamenovým ionizačním detektorem. K analýze byla použita HP-5MS kapilární kolona. Nosným plynem bylo helium. V esenciálních olejích bylo identifikováno 51, 55 a 40 složek, které tvořily 87,84 %, 96,9 % a 89,75 % celkového obsahu. U všech tří esenciálních olejů byly jako hlavní složky identifikovány 1,8-cineol, linalool a isovaleraldehyd. Některé složky byly ale nalezeny vždy pouze v jednom oleji. Pouze v marockém esenciálním oleji byly nalezeny 2-carene (5,62 %), 4-terpienol (1,52 %) a 1-bornylacetát (0,52 %). Pentan (2,14 %), fenol (1,73 %) a terpinen (0,92 %) byly ve vysoké míře identifikovány pouze v alžírském oleji. Pro tuniský esenciální olej byly charakteristické složeniny: kafr (2,66 %), ternion-1-ol (1,47 %), 2-norbornanon (1,20 %) a eremophilen (0,67 %).⁵⁶

Ibtissem Hamrouni Sellami a kol.⁵⁷ ve svém článku popisují, že na složení esenciálního vavřínového oleje má vliv i zvolená metoda sušení listů. Popisují složení esenciálních olejů, které byly získány **hydrodestilací** z listů pocházejících z Tuniska (a) sušených ve stínu při pokojové (22 °C), (b) sušených v horkovzdušné sušárně při 45 °C, (c) sušených v horkovzdušné sušárně při 65 °C, (d) sušených v mikrovlnné troubě při 500 W, (e) sušených v analyzátoru vlhkosti při 45 °C, (f) sušených v analyzátoru vlhkosti při 65 °C. K hydrodestilaci bylo vždy použito 30 g sušených listů. Esenciální oleje byly analyzovány pomocí (GC-FID). Byla využita HP-Innowax kapilární kolona a jako nosný plyn byl použit dusík. Analýza byla provedena také metodou GC-MS s HP-5MS kapilární kolonou. Identifikace aromatických látek byla založena na výpočtu retenčních indexů (RI) vztažených k *n*-alkanům (C8 – C22), které byly následně porovnány s údaji uvedenými v bibliografických datech. Identifikace byla také provedena porovnáním retenčních časů vavřínových sloučenin s komerčně dostupnými standardy, které byly analyzovány za stejných podmínek. Celkem bylo v získaných olejích identifikováno 46 složek, které tvořily 94,14 – 98,26 % celkových těkavých látek. Esenciální oleje byly složeny především z kyslíkatých monoterpenů (78,24 – 89,68 %). Hlavní složkou byl 1,8-cineol (51,63 – 63,19%) a další kyslíkaté monoterpeny přítomné ve větším množství byly: borneol (5,88 – 12,80 %), methyl eugenol (6,20 – 9,58 %), eugenol (0,08 – 5,19 %), terpinen-4-ol (3,62 – 4,56%), linalool (2,44 – 3,08%) a thymol (0,16 – 3,05 %). Druhou hlavní skupinu přítomných látek tvořily

monoterpenové uhlovodíky (0,54 – 9,15 %), z nichž hlavními složkami byly sabinen (1,00 – 4,46 %), α -terpinen (4,12 % - pouze v esenciálním oleji získaným z listů sušených vzduchem) a α -phellandrene (2,50 % - pouze v oleji získaným z listů sušených v sušárně při 45 °C). Seskviterpenové uhlovodíky byly detekovány zejména v esenciálním oleji získaném z listů sušených vzduchem (0,25 – 11,45 %), zatímco kyslíkaté seskviterpeny byly detekovány především v oleji získaném z čerstvých listů (0,08 – 0,43 %).⁵⁷

Hanen Marzouki a kol.¹⁸ se ve svém článku věnují analýze vavřínového esenciálního oleje, který byl izolován ze sušených plodů. Plody pocházely z Tuniska a esenciální olej z nich byl získán metodou **SFE s CO₂**. Podmínky extrakce byly: teplota 40 °C a tlak 90 a 250 bar. Analýza získaného oleje byla provedena pomocí GC-MS na koloně HP5 a jako mobilní fáze bylo použito helium. Při analýze oleje, který byl získán při tlaku 90 bar, byly objeveny především těžké složky jako: (E)- β -ocimen (20,9 %), 1,8-cineol (8,8 %), α -pinen (8,0 %), β -longipinen (7,1 %), linaloolacetát (4,5 %), β -pinen (4,2 %) a α -terpenilacetát (3,8 %). Výtěžek oleje v tomto kroku byl 0,9 % hmotnostních. Extrakce při tlaku 250 bar poskytla kapalnou frakci bez zápachu, ve které bylo zjištěno velmi malé procento vonných látek. Dominantní byly triacylglyceroly. Výtěžek tohoto kroku byl 15 % hmotnostních. Mezi nejvíce zastoupené mastné kyseliny v oleji z plodů patřily: kyselina laurová (27,6 %), olejová (27,1 %), linolová (21,4 %) a palmitová (17,1 %).¹⁸

Skupina **Omer Elkiran a kol.**⁵⁸ se ve svém článku věnuje analýze esenciálních vavřínových olejů, které byly získány ze semen a z listů vavřínu. Vzorky semen i listů pocházely z Turecka. Oleje byly z vysušených vzorků získány **hydrodestilací** v aparatuře typu Clevenger. K analýze byl využit plynový chromatograf s FID detektorem a HP-5 MS kapilární kolonou. Dohromady bylo v obou olejích identifikováno 107 složek, ale pouze 38 z nich byly pro oba společné. V esenciálním oleji z listů bylo izolováno 76 složek, které tvořily 95,8 % oleje. Mezi hlavní patřily především: 1,8-cineol (18,0 %), α -terpenylacetát (13,1 %), sabinen (7,8 %), a α -pinen (4,5 %). Zatímco v oleji ze semen bylo izolováno 69 složek, které tvořily 86,7 % oleje. Nejvíce zastoupenou složkou byl 1,8-cineol (17,2 %). Dalšími složkami byly např. α -terpenylacetát (9,0 %) nebo methyleugenol (4,2 %). Hlavními složkami identifikovanými v oleji z listů tedy byly monoterpeny. U oleje ze semen se vyskytovaly jak monoterpeny, tak i seskviterpeny.⁵⁸

Rana Abu-Dahab a kol.⁵⁹ popisují složení vavřínových esenciálních olejů získaných z plodů a listů vavřínu, které byly ze vzorků získány **hydrodestilací** v aparatuře typu Clevenger.

Získané oleje byly analyzovány GC-MS metodou. V oleji z plodů bylo analyzováno celkem 45 složek, které tvořily 99,7 % oleje. Mezi hlavní z nich patřily monoterpeny 1,8-cineol (29,8 %), α -terpenylacetát (5,6 %), α -terpineol (1,2 %) a γ -terpineol (1,5 %). Seskviterpeny byly izolovány pouze v nízkých koncentracích. Analýzou oleje z listů bylo získáno 37 složek, tvořících 93,7 % oleje. Hlavními složkami byly opět monoterpeny 1,8-cineol (36,8 %), α -terpenylacetát (14,6 %) a 4-terpineol (6,4 %).⁵⁹

Původ vzorku	Úprava rostlinného materiálu	Extrakční metoda	Analýza	Kolona	Počet id. sloučenin	Hlavní složky (%)	Literatura
Írán	namleté sušené listy	hydrodestilace	GC-MS	HP-5	25	eukalyptol (37,53 %), α -terpenylacetát (18,65 %), terpenen-4-ol (4,72 %), sabinen (5,93 %)	2
Írán	namleté sušené listy	parní destilace	GC-MS	HP-5	30	eukalyptol (34,37 %), α -terpenylacetát (18,78 %), terpenen-4-ol (5,59 %), sabinen (4,95 %)	2
Írán	namleté sušené listy	mikrovlnná hydrodestilace	GC-MS	HP-5	18	eukalyptol (49,73 %), α -terpenylacetát (16,92 %), terpenen-4-ol (5,96 %), sabinen (5,25 %)	2
Itálie	rozmělněné sušené listy	hydrodestilace	GC-MS	DB-5	55	eukalyptol (31,9 %), sabinen (12,2 %), linalool (10,2 %)	53
Jordánsko	sušené rozmělněné listy	hydrodestilace	GC-MS	DP-5MS	neuvedeno	eukalyptol (40,91 %), α -pinen (5,82 %), β -pinen (4,55 %), sabinen (6,92 %), α -terpenylacetát (5,86 %)	55
Tunisko	sušené listy	hydrodestilace	GC	HP-5MS	51	eukalyptol (24,55 %), linalool (17,67 %), 3-methylbutanal (9,65 %), kafr (2,66 %)	56

Alžírsko	sušené listy	hydrodestilace	GC	HP-5MS	55	eukalyptol (34,62 %), linalool (12,57 %), 3-methylbutanal (8,82 %), pentan (2,14 %)	56
Maroko	sušené listy	hydrodestilace	GC-FID	HP-5MS	40	eukalyptol (38,86 %), linalool (9,54 %), 3-methylbutanal (10,47 %), 2-carene (5,62 %), 4-terpienol (1,52 %), 1-bornylacetát (0,52 %)	56
Tunisko	sušené listy (22°C)	hydrodestilace	GC-MS	HP-5MS		eukalyptol (56,31 %), borneol (11,04 %), methyleugenol (7,89 %), eugenol (0,08 %) α -terpinen (4,12 %)	57
Tunisko	sušené listy v horkovzdušné sušárně (45°C)	hydrodestilace	GC-MS	HP-5MS	neuveđeno	eukalyptol (62,14 %), borneol (8,10 %), methyleugenol (6,20 %), eugenol (0,09 %), sabinen (1,00 %), α -phellandrene (2,50 %)	57
Tunisko	sušené listy v horkovzdušné sušárně (65°C)	hydrodestilace	GC-MS	HP-5MS	neuveđeno	eukalyptol (55,82 %), borneol (10,52 %), methyleugenol (8,00 %), eugenol (0,31 %)	57
Tunisko	sušené listy v mikrovlnné troubě (500 W)	hydrodestilace	GC-MS	HP-5MS	neuveđeno	eukalyptol (56,78 %), borneol (9,64 %), methyl eugenol (8,61 %), eugenol (4,45 %), sabinen (3,12 %)	57

Tunisko	sušené listy v analyzátoru vlhkosti (45°C)	hydrodestilace	GC-MS	HP-5MS	neuvedeno	eukalyptol (63,19 %), borneol (5,88 %), methyleugenol (7,19 %), eugenol (3,25 %), sabinen (3,43 %)	57
Tunisko	sušené listy v analyzátoru vlhkosti (65°C)	hydrodestilace	GC-MS	HP-5MS	neuvedeno	eukalyptol (51,63 %), borneol (12,80 %), methyleugenol (7,24 %), eugenol (3,67 %), sabinen (4,46 %)	57
Tunisko	sušené plody	SFE s CO ₂	GC-MS	HP-5	neuvedeno	(E)-β-ocimen (20,9 %), eukalyptol (8,8 %), α-pinen (8,0 %), β-longipinen (7,1 %), linalool acetát (4,5 %), β-pinen (4,2 %), α-terpenylacetát (3,8 %)	18
Turecko	sušené listy	hydrodestilace	GC-FID	HP-5MS	76	eukalyptol (18,0 %), α-terpenylacetát (13,1 %), sabinen (7,8 %), α-pinen (4,5 %)	58
Turecko	sušená semena	hydrodestilace	GC-FID	HP-5MS	69	eukalyptol (17,2 %), α-terpenylacetát (9,0 %), methyleugenol (4,2 %).	58
Jordánsko	sušené listy	hydrodestilace	GC-MS	DP-5	37	eukalyptol (29,8 %), α-terpenylacetát (5,6 %), α-terpineol (1,2 %), γ-terpineol (1,5 %)	59

Jordáns ko	sušené plody	hydrodestilace	GC-MS	DP-5	45	eukalyptol (36,8 %), α -terpenylacetát (14,6 %), 4-terpineol (6,4 %)	59
---------------	--------------	----------------	-------	------	----	---	----

Tabulka 1 Přehled porovnání extrakčních metod a různých metod sušení z dostupných literatu

3.3 Testování antimikrobiální aktivity

Hafize Fidan a kol.⁴⁷ se zaměřili ve své publikaci na esenciální oleje získané z listů, plodů a větviček vavřínu, které pocházely z Bulharska. Kromě analýzy složení se zaměřili také na stanovení antimikrobiální aktivity. Oleje byly získány ze sušených vzorků **hydrodestilací** a jejich analýza byla provedena GC-MS metodou. V oleji z plodů byly hlavními složkami 1,8-cineol (33,3 %), α -terpinylacetát (10,3 %), α -pinen (11,0 %), β -elemen (7,5 %) a sabinen (6,3 %). V oleji z větviček to byly 1,8-cineol (48,5 %), α -terpenylacetát (13,1 %), methyleugenol (6,6 %), β -linalool (3,8 %), β -pinen (3,4 %) a sabinen (3,3 %). V oleji z listů byly hlavní analyzované složky 1,8-cineol (41,0 %), α -terpinylacetát (14,4 %), sabinen (8,8 %), methyleugenol (6,0 %), β -linalool (4,9 %) a α -terpineol (3,1 %). Antimikrobiální aktivita byla testována na G+ (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila*), G- bakteriích (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony*), na kvasinkách (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) i na plísních (*Aspergillus brasiliensis*). Pro stanovení byl využit diskový difúzní test. Pro bakterie byl využit TSA (Tryptic soy agar) a pro kvasinky a plísně SDA (Sabourand-Dextrose-Agar) agar. Z kultivovaných bakterií, plísní a kvasinek byly připraveny suspenze s hustotou 10^7 CFU (colony forming units), což odpovídá zákalu 0,5 na McFarlandově stupnici. Takto připravená suspenze byla nanášena na Petriho misku a přelita agarem a po ztuhnutí bylo nadávkováno 50 μ l oleje a pomocí speciálního dávkovače přikladeny ATB disky. Následovala kultivace při 37 °C/ 28 °C po dobu 24/72 hodin podle druhu mikroorganismu. Po kultivaci byl změřen průměr inhibičních zón. Bylo zjištěno, že olej získaný z plodů má nízkou inhibiční aktivitu vůči bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila*, *Salmonella abony*, kvasince *Saccharomyces cerevisiae* a plísní *Aspergillus brasiliensis*. A vůči bakteriím *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* neprojevil inhibiční aktivitu vůbec. Olej z listů měl nízkou inhibiční schopnost k bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus subtilis* a *Salmonella abony* a k plísní *Aspergillus brasiliensis*. Nejvyšší inhibiční schopnost prokázal vůči kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. Naopak bakterie *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* byly vůči tomuto oleji rezistentní. Olej z větviček pak prokázal inhibiční schopnost pouze proti bakterii *Staphylococcus aureus*.⁵⁰

Antimikrobiální aktivitu ve své studii poposují také **L. Caputo a kol.**,⁵⁰ kteří analyzovali vavřínový esenciální olej získaný z listů, jehož složení již bylo zmiňováno. Antimikrobiální aktivita byla testována na pěti různých kmenech bakterií. Z grampozitivních bakterií se jednalo o *Bacillus cereus* 4313, *Bacillus cereus* 4384 a o *Staphylococcus aureus*.

Z gramnegativních byly využity *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Pro každou bakterii byla připravena suspenze, která odpovídala zákalu 0,5 na McFarlandově stupnici a následně nanášena na živný agar. Sterilní filtrační kotouče byly impregnovány 2,1 a 0,4 µL esenciálního oleje a umístěny na plotny s agarem. Po inkubaci při 37 °C byly změřeny průměry čirých zón. Esenciální olej vykazoval antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným bakteriím již v nejnižším testovaném množství (0,4 µl). Jako nejcitlivější organismus se ukázal *Bacillus cereus*. Ve studii je také popisována antimikrobiální aktivita čistého 1,8-cineolu, který byl proti *E. coli* neúčinný (s výjimkou koncentrace 2 µl), proti *P. aeruginosa* a *S. aureus* byl neúčinný v koncentraci 0,4 µl.⁵³

Bakterie	MIC (µl/ml)	
	vavřínový olej	1,8-cineol
<i>Bacillus cereus</i> 4313	0,2	0,2
<i>Bacillus cereus</i> 4384	0,2	0,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,4	1
<i>Escherichia coli</i>	0,8	1,5
a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,4	1

Tabulka 2 Minimální inhibiční koncentrace vavřínového oleje a čistého 1,8-cineolu⁵³

Jezila El Malti a Hamid Amarouch¹⁵ ve své studii popisují antimikrobiální aktivitu ethanovolého extraktu, který byl získán macerací sušených listů pocházejících z Maroka. Antimikrobiální aktivita byla testována proti G+ bakteriím *Lactobacillus delbrueckii*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i proti G- bakteriím *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mitterleuthneri*, *Proteus penneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*. Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace byla využita agarová diluční metoda na Petriho misce. Jako živné médium byl využit Mueller-Hinton agar obohacený vždy o požadovanou koncentraci extraktu. Na povrch destiček byly naočkovány suspenze bakterií, které odpovídali zákalu 0,5 na McFarlandově stupnici. Inkubace probíhala 24 hodin při 37 °C a poté byly vyhodnoceny minimální inhibiční koncentrace. Vavřínový extrakt byl velmi účinný při inhibici růstu všech testovaných kmenů, MIC se pohybovaly v rozmezí 4,7 – 9,4 mg/ml, s výjimkou *E. coli* a *S. enteritidis*, které vyrazovali vysokou citlivost na extrakt (MIC < 2,34 mg/ml).¹⁵

Bakterie	MIC (mg/ml)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	4,7
<i>Bacillus cereus</i>	9,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,7
<i>Listeria monocytogenes</i>	<2,34
<i>Enterobacter cloacea</i>	<2,34
<i>Citrobacter freundii</i>	4,7
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4,7
<i>Proteus penneri</i>	<2,34
<i>Proteus mettegeri</i>	9,4
<i>Escherichia coli</i>	<2,34
<i>Shigella sonnei</i>	9,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9,4
<i>Salmonella enteritidis</i>	<2,34
<i>Morganella morganii</i>	4,7
<i>Proteus vulgaricus</i>	4,7
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	4,7

Tabulka 3 Minimální inhibiční koncentrace vavřínového extraktu ¹⁵

4 ZÁVĚR

Tato práce je zaměřena na složení, využití a získávání vavřínového esenciálního oleje. Je popisována také samotná rostlina, především listy, ze kterých se esenciální olej získává nejčastěji. Dále je popisováno využívání různých technik při získávání esenciálních olejů obecně. Z dostupných zdrojů je patrné, že pro získávání vavřínového oleje se v dnešní době nejvíce využívá hydrodestilace v aparatuře typu Clevenger a k následné analýze plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Porovnáním olejů z různých částí rostlin a různých destinací bylo zjištěno, že oba tyto parametry mají vliv spíše na kvantitativní složení. Ve všech vzorních s výjimkou jediného oleje, získaného z plodů vavřínu pomocí SFE, byl hlavní sloučeninou eukalyptol, ovšem v různém zastoupení.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. HASSIOTIS, Christos N. a Evanthia I. DINA. The effects of lurel (*Laurus nobilis* L.) on development of two mycorrhizal fungi. 2011, 628-634. DOI: 10.1016/j.ibiod.2011.03.006.
2. TABAN, Azin, Mahammad Jamal SAHARKHIZ a Mehrdad NIAKOUSARI. Sweet bay (*Laurus nobilis* L.) essential oil and its chemical composition, antioxidant activity and leaf micromorphology under different extraction methods. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* [online]. 2018, (9), 12-18 [cit. 2019-02-26]. DOI: doi.org/10.1016/j.scp.2018.05.001. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352554118300202?via%3Dihub>
3. BARLA, A, B TOPCU, S OKSUZ, G TUMEN a DGI KINGSTON. Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. *FOOD CHEMISTRY* [online]. 2007, 104(4), 1478-1484 [cit. 2018-05-20]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.02.019. Dostupné z: https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=E4HQWRdkIRwISnksuXP&page=1&doc=1
4. SAMPSON, F. Bruce a Paul E. BERRY. Laurales. *Britannica.com* [online]. [cit. 2019-06-26]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/plant/Laurales#ref996936>
5. Baloun, J., Beneš, K. & Minařík, J. *Farmaceutická Botanika*. (Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., Praha 1, Malostranské náměstí 28, 1978)
6. KUMAR, Sushil. Bay leaves. *Handbook of herbs and spices* [online]. 1. America: Woodbear Publishing Limited, 2001, s. 52-59 [cit. 2019-01-26]. ISBN 8493-1217-5. Dostupné z: http://literacias.net/bibliodigital/download/375/Handbook%20of%20Herbs%20and%20Spices_%20-%20K.%20V.%20Peter.pdf..
7. AMBROSE, Dawn C. P., ed. *Leafy Medicinal Herbs: Botany, Chemistry, Postharvest Technology and Uses* [online]. UK: CAB International, 2016 [cit. 2018-06-26]. ISBN 978 1 78064 559 9. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?hl=en&lr=&id=wwLpDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&dq=Ambrose,+D.+Leafy+Medicinal+Herbs:+Botany,+Chemistry,+Postharvest+Techn>

ology+and+Uses.&ots=9P2i_FvYKz&sig=9i7JioVq0pF14mmTDNQgud1xDv8&redir_esc=y#v=onepage&q=laurus&f=false

8. GRULICH, Vít. LAURUS NOBILIS L. - vavřín vznešený. Botany.cz [online]. 2011 [cit. 2018-08-16]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/laurus-nobilis/>
9. MARQUES, António, Bárbara TEIXEIRA a Maria Leonor NUNES. Bay Laurel (Laurus nobilis) Oils. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety [online]. 2016, 2016, , 239-245 [cit. 2019-06-26]. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00026-2. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124166417000262>
10. DOYMAZ, Ibrahim. Thin-Layer Drying of Bay Laurel Leaves (Laurus nobilis L.). Journal of Food Processing and Preservation [online]. 2014, 38(1), 449-456 [cit. 2019-02-17]. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2012.00793.x. ISSN 1745-4549. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4549.2012.00793.x>.
11. KIVRAK, Seyda, Tolga GOKTURK a Ibrahim KIVRAK. Assessment of Volatile Oil Composition, Phenolic and Antioxidant Activity of Bay (Laurus nobilis) Leaf and Usage in Cosmetic Applications. International Journal of Secondary Metabolite [online]. 2017, 4(2), 148-161 [cit. 2018-10-24]. ISSN 2148-6905. Dostupné z: <http://ijsm.ijate.net/download/article-file/318288>
12. Bay leaf. Britannica ACADEMIC [online]. [cit. 2019-06-27]. Dostupné z: [https://academic.eb.com/levels/collegiate/article/bay-leaf/13848.%20\(Accessed:%2022nd%20October%202018](https://academic.eb.com/levels/collegiate/article/bay-leaf/13848.%20(Accessed:%2022nd%20October%202018)
13. KILIC, Ayben, Harzemsah HAFIZOGLU, Hubert KOLLMANNNSBERGER a Siegfried NITZ. Volatile Constituents and Key Odorants in Leaves, Buds, Flowers, and Fruits of Laurus nobilis L. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY [online]. 2004, 52(6), 1601-1606 [cit. 2018-10-22]. DOI: 10.1021/jf0306237. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf0306237>
14. NASUKHOVA, N. M., L. A. LOGVINENKO a A. L. KHARCHENKO. BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF THE LAURUS NOBILIS LEAVES. Pharmacy & Pharmacology [online]. 2017, 5(3), 200-221 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.19163/2307-9266-2017-5-3-200-221. Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/319298280_BIOLOGICALLY_ACTIVE_SUBSTANCES_OF_THE_LAURUS_NOBILIS_LEAVES

15. MALTI, Jazila El a Hamid AMAROUCH. ANTIBACTERIAL EFFECT, HISTOLOGICAL IMPACT AND OXIDATIVE STRESS STUDIES FROM LAURUS NOBILIS EXTRACT. *Journal of Food Quality* [online]. 2009, 32(2), 190-208 [cit. 2018-12-04]. DOI: 10.1111/j.1745-4557.2009.00245.x. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1745-4557.2009.00245.x>.
16. BRÁS, Susana, Pedro MENDES-BASTON, Cristina AMARO a Jorge CARDOSO. Allergic contact dermatitis caused by laurel leaf oil. *Contact Dermatitis* [online]. 2015, 72(6), 417-419 [cit. 2018-11-05]. DOI: 10.1111/cod.12377. Dostupné z: <https://core.ac.uk/download/pdf/83113642.pdf>
17. FANG, Fang, Shengmin SANG, Kuang Y. CHEN, Alexander GOSSLAU, Chi-Tang HO a Robert T. ROSEN. Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf (*Laurus nobilis*). *FOOD CHEMISTRY* [online]. 2005, 93(3), 497-501 [cit. 2018-09-24]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.029. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604007708>
18. MARZOUKI, Hannen, Alessandra PIRAS, Bruno MARONGIU, Antonella ROSA a M. Assunta DESSI. Extraction and Separation of Volatile and Fixed Oils from Berries of *Laurus nobilis* L. by Supercritical CO₂. *Molecules* [online]. 2008, 13(8), 1702-1711 [cit. 2018-09-28]. DOI: 10.3390/molecules13081702. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6245310/>
19. JULIANTI, Elin, Kyoung Hwa JANG, Sooryun LEE, Dongha LEE, Woongchon MAR, Ki-Bong OH a Jongheon SHIN. Sesquiterpenes from the leaves of *Laurus nobilis* L. *Phytochemistry* [online]. 2012, 80, 70-76 [cit. 2019-02-12]. DOI: doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.05.013. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942212002130>
20. DIAS, Maria Ines, Lilian BARROS, Montserrat DUENAS, Rita C. ALVES, M. Beatriz P.P. OLIVEIRA, Celestino SANTOS-BUELGA a Isabel C.F.R. FERREIRA. Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: Would be more suitable a wild or a cultivated sample?. *FOOD CHEMISTRY* [online]. 2014, 156(1), 339-346 [cit. 2018-08-12]. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.122. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614001666>

21. *Essential Oils from Steam Distillation. In: Engineering.iastate.edu [online]. 2011 [cit. 2018-10-26]. Dostupné z:*
http://www.engineering.iastate.edu/brl/files/2011/10/brl_essentialoils.pdf
22. DHIFI, Wissal, Sana BELLILI, Sabrine JAZI, Nada BAHLOUL a Wissem MNIF. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines [online]. 2016, 3, 1-16 [cit. 2019-03-17]. DOI: 10.3390/medicines3040025. Dostupné z:*
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5456241/>
23. 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. 2018-10-28]. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106. Dostupné z:*
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>
24. Přírodní látky/Chemie přírodních látek/Přehled přírodních látek/Isoprenoidy. Wikibooks.org [online]. [cit. 2018-12-20]. Dostupné z:
https://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%AD_1%C3%A1tky/Chemie_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_1%C3%A1tek/P%C5%99ehled_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_1%C3%A1tek/Isoprenoidy
25. DVOŘÁKOVÁ, Marcela, Irena VALTEROVÁ a Tomáš VANĚK. MONOTERPENY V ROSTLINÁCH. *Chemické Listy [online]. 2011, (105), 839-845 [cit. 2018-12-26]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_11_839-845.pdf*
26. HUBÍK, Josef. *Obecká Farmakognosie: Díl 2 Sekundární látky*. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1978.
27. LIN, Po-Chen, Jason Jwo LEE a I-Jy CHANG. Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Journal of Food and Drug Analysis [online]. 2016, 24(3), 464-470 [cit. 2019-03-04]. Dostupné z:*
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816300370>
28. CHERRAT, Lamia, Laura ESPINA, Mohammed BAKKALI, Diego GARCIA-GONZALO, Rafael PAGÁN a Amin LAGLAOUI. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from

- Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2014, 94(6), 1197-1204 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1002/jsfa.6397. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/330114526_Chemical_composition_and_anti_oxidant_properties_of_Laurus_nobilis_L_and_Myrtus_communis_L_essential_oils_from_Morocco_and_evaluation_of_their_antimicrobial_activity_acting_alone_or_in_combined_process
29. ASBAHANI, A. EL, K. MILADI, W. BADRI, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, 483(1-2), 220-243 [cit. 2019-04-26]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.069. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517314009661>.
 30. Essential Oil Determination Apparatus (Clevenger Type). In: *Chemscience.com* [online]. 2017 [cit. 2019-05-28]. Dostupné z: https://www.chemscience.com/category-products.html?cat_id=263.
 31. *HANDA, Sukhdev Swami, Sumar Preet Singht KHANUJA, Gennaro LONGO a Dev Dutt RAKESH, ed. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* [online]. Itálie: INTERNATIONAL CENTRE FOR SCIENCE AND HIGH TECHNOLOGY, 2008 [cit. 2019-05-30]. Dostupné z: https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf
 32. CHEMIE: SEPARAČNÍ METODY. *Kralupy.cz* [online]. [cit. 2019-06-03]. Dostupné z: <http://www.kralupy.cz/dg/www2/stranky/chemie/destilace.htm>
 33. REZVANPANA, Shila, Karamatollah REZAEI, Seyyed Hadi RAZAVI a Sohrab MOINI. Use of Microwave-assisted Hydrodistillation to Extract the Essential Oils from *Satureja hortensis* and *Satureja montana*. *Food Science and Technology Research* [online]. 2008, 14(3), 311-314 [cit. 2019-06-06]. DOI: 10.3136/fstr.14.311. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/fstr/14/3/14_3_311/_article/-char/en
 34. HOLZBECHER, Závěš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. 1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987.

35. CHEMISTRY IMAGE GALLERY. In: Periodni.com [online]. [cit. 2019-06-09].
Dostupné z:
https://www.periodni.com/gallery/download_image.php?name=soxhlet_extractor.png
36. SAPKALE, G.N., S.M. PATIL, U.S. SURWASE a P.K. BHATBHAGE.
SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION - A REVIEW. International Journal of
Chemical Science [online]. 2010, 8(2), 729-743 [cit. 2019-06-12]. Dostupné z:
<https://www.tsijournals.com/articles/supercritical-fluid-extraction--a-review.pdf>
37. ARTHUR, Catherine L. a Janusz PAWLISZYN. Solid phase microextraction with
thermal desorption using fused silica optical fibers. Analytical chemistry [online].
1990, (62), 2145-2148 [cit. 2019-06-20]. Dostupné z:
<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac00218a019>
38. MLEJOVÁ, Veronika, Petra PAVLÍKOVÁ, Petr DOBIÁŠ, Martin ADAM a Karel
VENTURA. APLIKACE MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ PRO ANALÝZU
BYLINNÝCH SILIC. Chemické Listy [online]. 2010, , 166-171 [cit. 2019-06-11].
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_03_166-171.pdf
39. MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Modern Sample Preparation
for Chromatography*. 1. Elsevier, 2014. ISBN 9780444543196.
40. VONDRÁK, Dalibor a Jaroslav VULTERIN. Analytická chemie. 1. Praha: Státní
nakladatelství technické literatury, 1985.
41. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 1996. ISBN
9788090215504
42. TORRES, Jessica. Carrying You Through Gas Chromatography. In: Bitesizebio.com
[online]. [cit. 2019-06-13]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/28687/carrying-gas-chromatography/>
43. 06. Plynová chromatografie (GC). In: Is.muni.cz [online]. [cit. 2019-06-17]. Dostupné
z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2009/C6390/7480488/uvod.pdf>
44. GUO, Xinghua, ed. *Advances in Gas Chromatography*. Ave4EvA, 2014. ISBN
9789535112273.
45. HORÁK, Tomáš, Jiří ČULÍK, Marie JURKOVÁ, Pavel ČEJKA, Vladimír KELLNER,

- Josef DVOŘÁK a Danuša HAŠKOVÁ. Základní detektory v plynové chromatografii používané v pivovarské analytice. *Kvasný průmysl* [online]. 2011, 57(6), 138-142 [cit. 2019-06-15]. DOI: 10.18832/kp2011011. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/41f9/cdd3e5c2e0add8d3755de05e24903626d65a.pdf>
46. BHANOT, Deepak. How to Read a Chromatogram?. *Lab-training.com* [online]. 2013 [cit. 2019-06-15]. Dostupné z: <http://lab-training.com/2013/12/27/how-to-read-a-chromatogram/>
47. PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. *Chemické Listy* [online]. 2004, , 174-179 [cit. 2019-06-16]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
48. ZLOCH, Z., J. ČELAKOVSKÝ a A. AUJEZDNÁ. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu [online]. 2004 [cit. 2019-06-26]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Zdenk_Zloch/publication/268049143_Stanoveni_obsahu_polyfenolu_a_celkove_antioxidacni_kapacity_v_potravinach_rostlinneho_puvodu/links/551bc570cf2fe6cbf75e6ae.pdf
49. JIANG, L., F. WANG, F. HAN, W. PRINYAWIWATKUL, H.K. NO a B. GE. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of water-soluble chitosan derivatives. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2013, 114(4), 956-963 [cit. 2019-06-16]. DOI: 10.1111/jam.12111. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.12111>
50. FIDAN, Hafize, Galina STEFANOVA, Iliana KOSTOVA, Stanko STANKOV, Stanka DAMYANOVA, Albena STOYANOVA a Valtcho D ZHELJAZKOV. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria. *Molecules* [online]. 2019, 24(4), 1-10 [cit. 2019-06-16]. DOI: 10.3390/molecules24040804. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/4/804>
51. BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. MIKROBIOLOGICKÉ LABORATORNÍ METODY [online]. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, , 1-80 [cit. 2019-06-19]. ISSN 978-80-7305-676-6. Dostupné z: <https://fvhe.vfu.cz/files/cela-skripta-bursova-a->

kol_mlm-elektronicka-verze_upraveny-logolink.pdf

52. Testování citlivosti na antibiotika. In: Wikiskripta.eu [online]. [cit. 2019-06-19].
Dostupné z:
https://www.wikiskripta.eu/w/Testov%C3%A1n%C3%AD_citlivosti_na_antibiotika#/media/File:Antibiotic_disk_diffusion.jpg
53. CAPUTO, Lucia, Filomena NAZZARO, Lucéia Fatima SOUZA, Luigi ALIBERTI, Laura De MARTINO, Florinda FRATIANNI, Raffaele COPPOLA a Vincenzo De FEO. Laurus nobilis: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities. *Molecules* [online]. 2017, 22(6), 1-11 [cit. 2019-06-20]. DOI: 10.3390/molecules22060930. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/6/930>
54. FLAMINI, Guido, Marianna TEBANO, Pier Luigi CIONI, Lucia CECCARINI, Andrea Simone RICCI a Iginio LONGO. Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1143(1-2), 36-40 [cit. 2019-06-20]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.031. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307000763>
55. AL-KALALDEH, Jelmar Z., Rana ABU-DAHAB a Fatma U. AFIFI. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutrition Research* [online]. 2010, 30(4), 271-278 [cit. 2019-06-20]. DOI: 10.1016/j.nutres.2010.04.001. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027153171000045X>
56. JEMAA, Jouda Mediouni Ben, Nesrine TERSIM, Karima Taleb TOUDERT a Mohamed Larbi KHOUJA. Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research* [online]. 2012, 48, 97-104 [cit. 2019-06-20]. DOI: 10.1016/j.jspr.2011.10.003. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022474X1100110X>
57. SELLAMI, Ibtissem Hamrouni, Wissem Aidi WANNES, Iness BETTAIEB, Sarra BERRIMA, Thouraya CHAHED, Brahim MARZOUK a Ferid LIMAM. Qualitative

and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. *FOOD CHEMISTRY* [online]. 2011, 126(2), 691-697 [cit. 2019-06-20]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.022. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610014299>

58. ELKIRAN, Omer, Emel AKBABA a Eyup BAGCI. CONSTITUENTS OF ESSENTIAL OILS FROM LEAVES AND SEEDS OF LAURUS NOBILIS L.: A CHEMOTAXONOMIC APPROACH. *Bangladesh Journal of Botany* [online]. 2018, 47(4), 893-901 [cit. 2019-06-22]. Dostupné z: http://www.bdbotsociety.org/journal/journal_issue/2018%20December/10.pdf
59. ABU-DAHAB, Rana, Violet KASABRI a Fatma Ulku AFIFI. Evaluation of the Volatile Oil Composition and Antiproliferative Activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) on Breast Cancer Cell Line Models. *Records of Natural Products* [online]. 2014, 8(2), 136-147 [cit. 2019-06-26]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/4d90/594e1fc74611c112fb047bf6a833db4f1f9b.pdf>