

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Vliv pH vody na kvalitu levandulového oleje získaného hydrodestilací  
Bc. Monika Vokálová

Diplomová práce  
2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Vokálová**  
Osobní číslo: **C19490**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Vliv pH vody na kvalitu levandulového oleje získaného hydrodestilací**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na výrobu a vlastnosti esenciálních olejů a dále na využití extrakčních technik a plynové chromatografie pro analýzu těkavých látek v esenciálních olejích.
2. V experimentální části proveďte vliv pH vody při hydrodestilaci levandulového oleje na kvalitu výsledného produktu.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem **Vliv pH vody na kvalitu levandulového oleje získaného hydrodestilací** 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 7. 7. 2021

Bc. Monika Vokálová v.r.

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D., za zadání zajímavého tématu, cenné rady, srdečný přístup a trpělivost během zpracování této práce a také za ochotu kdykoliv se vším pomoci a poradit. Děkuji také Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D., a Ing. Kristýně Moučkové za jejich čas, vstřícnost a cenné rady při spolupráci na mé diplomové práci. Velké poděkování patří také celé mé rodině a nejbližším přátelům za podporu a trpělivost, kterou mi poskytovali v průběhu celého studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá levandulovým esenciálním olejem. První část teoretické části je věnována samotné rostlině, je zde popsán především její výskyt, vzhled a vlastnosti. Další část je zaměřena obecně na esenciální oleje. Jsou zde uvedeny vlastnosti olejů a také metody, kterými se esenciální oleje nejčastěji získávají. Dále se tato část zabývá chemickým složením esenciálních olejů, kde je popsána především hlavní skupina látek, ze kterých se esenciální oleje skládají. Touto hlavní skupinou jsou terpeny. Obvykle bývají hlavní dvě nebo tři složky zastoupeny v poměrně vysokých koncentracích (20–70 %) ve srovnání s ostatními složkami, které jsou přítomny pouze ve stopových množstvích. Poslední kapitola teoretické části je věnována analýze esenciálních olejů. Identifikace jednotlivých složek esenciálních olejů a stanovení jejich relativního zastoupení se obvykle provádí pomocí plynové chromatografie. Nejčastěji ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) a pomocí plynového chromatografu vybaveného plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID). Dále jsou v této kapitole uvedeny metody pro stanovení biologických vlastností esenciálních olejů, konkrétně se jedná o stanovení antimikrobiální a antioxidační aktivity. V experimentální části práce je zkoumán vliv pH vody na kvalitu esenciálních olejů získaných hydrodestilací. Tato část je také zaměřena na stanovení antimikrobiální aktivity vydestilovaných esenciálních olejů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

esenciální oleje, levandule, hydrodestilace, plynová chromatografie, terpeny, antimikrobiální aktivita

## **TITLE**

Effect of water pH on the quality of lavender oil obtained by hydrodistillation

## **ANNOTATION**

This diploma thesis deals with lavender essential oil. The first part of the theoretical part is focused on the plant itself. It describes mainly its occurrence, appearance and properties. The next part is focused on essential oils in general. The properties of the oils are given here, as well as the methods by which the essential oils are gradually obtained. Furthermore, this part deals with the chemical composition of essential oils. The main group of substances of which essential oils are composed is described here. Terpenes are the main group. Usually, the main two or three components are present in different high concentrations (20–70%) compared to other components, which are present only in trace amounts. The last chapter of the theoretical part is devoted to the analysis of essential oils. The identification of the individual components of the essential oils and the determination of their relative proportions are usually carried out by gas chromatography. Most often in conjunction with a mass spectrometer (GC-MS) and a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID). Furthermore, this chapter presents methods for determining the biological properties of essential oils, specifically the determination of antimicrobial and antioxidant activity. The experimental part of the work investigates the effect of water pH on the quality of essential oils obtained by hydrodistillation. This part is also focused on determining the antimicrobial activity of distilled essential oils.

## **KEYWORDS**

essential oils, lavender, hydrodistillation, gas chromatography, terpenes, antimicrobial activity

## **OBSAH**

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	12
SEZNAM TABULEK .....	13
SEZNAM PŘÍLOH.....	14
SEZNAM ZKRATEK .....	15
ÚVOD.....	17
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>18</b>
1 LEVANDULE .....	18
1.1 Výskyt a pěstování rostliny .....	18
1.2 Popis rostliny .....	18
1.3 Využití levandule.....	19
1.4 Levandulový esenciální olej .....	19
2 <b>ESENCIÁLNÍ OLEJE .....</b>	<b>21</b>
2.1 Vlastnosti esenciálních olejů .....	21
2.2 Získávání esenciálních olejů.....	21
2.2.1 Metody využívané pro získávání esenciálního oleje .....	22
2.2.1.1 Hydrodestilace .....	23
2.2.1.2 Destilace vodní parou .....	27
2.2.1.3 Mikrovlnná asistovaná hydrodestilace .....	28
2.2.1.4 Macerace.....	29
2.2.1.5 Extrakce nadkritickou tekutinou.....	29
2.2.1.6 Extrakce tuhou fází.....	30
2.2.1.7 Mikroextrakce tuhou fází .....	30
2.3 Využití esenciálních olejů .....	31
2.3.1 Využití levandulového esenciálního oleje .....	31
2.3.1.1 Antimikrobiální vlastnosti .....	32
2.3.1.2 Využití v zemědělství .....	32



2.4	Chemické složení.....	32
2.4.1	Terpeny .....	33
2.4.1.1	Monoterpeny.....	34
2.4.1.1.1	Monoterpeny a člověk .....	35
2.4.1.1.2	Toxicita monoterpenů.....	35
2.4.1.2	Seskviterpeny .....	38
2.4.1.3	Fenylpropanové deriváty .....	39
2.5	Chemické složení levandulového esenciálního oleje .....	40
3	<b>ANALÝZA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ</b> .....	42
3.1	Plynová chromatografie.....	42
3.1.1	Chromatografické kolony .....	43
3.1.2	Detektory.....	44
3.1.2.1	Plamenový ionizační detektor .....	44
3.1.2.2	Tepelně vodivostní detektor .....	45
3.1.2.3	Detektor elektronového záchytu.....	45
3.2	Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.....	46
3.3	Stanovení antimikrobiální aktivity .....	46
3.3.1	Agarové metody .....	47
3.3.1.1	Disková difúzní metoda.....	47
3.3.1.2	Agarová diluční metoda .....	48
3.3.1.3	Metoda antimikrobiálního gradientu .....	48
3.3.2	Testování citlivosti na antimikrobiální látky pomocí průtokové cytometrie .....	49
3.4	Stanovení antioxidační aktivity .....	49
3.4.1	Metoda FRAP .....	50
3.4.2	Metoda Folin-Ciocalteu .....	51
3.4.3	Metoda používající DPPH .....	51
3.4.4	Metoda ORAC .....	52

3.4.5	Metoda TEAC .....	52
II	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	53
4	<b>INSTRUMENTÁLNÍ ANALÝZA</b> .....	53
4.1	Chemikálie.....	53
4.2	Přístroje.....	53
4.3	Pomůcky .....	53
4.4	Rostlinný materiál .....	54
4.4.1	Podmínky a postup hydrodestilace .....	54
4.4.2	Analýza pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.....	55
4.4.3	Analýza plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem.....	56
4.4.4	Vyhodnocení naměřených dat.....	56
5	<b>HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ</b> .....	58
5.1	Chemikálie.....	58
5.2	Pomůcky .....	58
5.3	Přístroje.....	58
5.4	Postup stanovení antimikrobiální aktivity levandulových olejů .....	59
5.4.1	Příprava pufru .....	59
5.4.2	Příprava agaru a bujonu .....	59
5.4.3	Příprava bakteriální suspenze .....	59
5.4.4	Vzorky.....	59
5.4.5	Antibiotikum .....	60
5.4.6	Barvivo MTT .....	60
5.4.7	Postup zaočkování mikrotitračních destiček.....	60
5.4.8	Vyhodnocení výsledků.....	61
6	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	63
6.1	Složení vydestilovaných levandulových esenciálních olejů.....	63

6.2	Porovnání chemického složení získaných levandulových olejů s dostupnou literaturou .....	79
6.3	Antimikrobiální aktivita vydestilovaných levandulových olejů.....	85
6.3.1	Antimikrobiální aktivita vůči gramnegativním bakteriím .....	85
6.3.2	Antimikrobiální aktivita vůči grampozitivním bakteriím .....	85
6.4	Porovnání antimikrobiálních vlastností získaných esenciálních olejů s dostupnou literaturou .....	87
7	<b>ZÁVĚR</b> .....	91
8	<b>CITOVANÁ LITERATURA</b> .....	93
9	<b>PŘÍLOHY</b> .....	105

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b> Keřík levandule lékařské.....	19
<b>Obrázek 2</b> Laboratorní destilační aparatura typu Clevenger [15] .....	24
<b>Obrázek 3</b> Schéma hydrolýzy linalyl acetátu [16] .....	25
<b>Obrázek 4</b> Schéma hydrolýzy linalyl acetátu [16] .....	25
<b>Obrázek 5</b> Přesmyk linalyl acetátu během destilace [16].....	26
<b>Obrázek 6</b> Termální degradace linalyl acetátu [16] .....	26
<b>Obrázek 7</b> Laboratorní aparatura pro destilaci vodní parou [17] .....	27
<b>Obrázek 8</b> Aparatura pro destilaci vodní parou využívaná v průmyslu [18] .....	28
<b>Obrázek 9</b> Schéma aparatury využívané pro extrakci nadkritickou tekutinou [20] .....	30
<b>Obrázek 10</b> Schéma plynového chromatografu [45].....	43
<b>Obrázek 11</b> Příklad provedení Etestu [65] .....	49
<b>Obrázek 12</b> Aparatura využitá pro získání esenciálních olejů .....	55
<b>Obrázek 13</b> Mikrotitrační destičky využívané při stanovování antimikrobiální aktivity olejů .....	62
<b>Obrázek 14</b> Zastoupení jednotlivých tříd identifikovaných v olejích získaných hydrodestilací při různých hodnotách pH vody.....	70
<b>Obrázek 15</b> Sloučeniny lišící se relativním zastoupením v jednotlivých olejích .....	71
<b>Obrázek 16</b> Relativní zastoupení terpenů podle počtu isoprenových jednotek v jednotlivých olejích.....	75
<b>Obrázek 17</b> Relativní zastoupení jednotlivých funkčních tříd monoterpenoidů v jednotlivých olejích.....	76
<b>Obrázek 18</b> Relativní zastoupení monoterpenoidů podle struktury v jednotlivých olejích ....	77
<b>Obrázek 19</b> Relativní zastoupení monoterpenů podle struktury v jednotlivých olejích .....	78

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1</b> Rozdělení monoterpenů do jednotlivých skupin podle struktury a funkčních skupin.....	36
<b>Tabulka 2</b> Rozdělení seskviterpenů do jednotlivých skupin podle struktury.....	39
<b>Tabulka 3</b> Rozdělení fenyylpropanových derivátů do jednotlivých skupin podle funkčních skupin.....	40
<b>Tabulka 4</b> Schéma zaočkování mikrotitrační destičky .....	61
<b>Tabulka 5</b> Procentuální výtěžnosti jednotlivých esenciálních olejů při různých hodnotách pH vody .....	63
<b>Tabulka 6</b> Identifikované sloučeniny v olejích získaných hydrodestilací při různých hodnotách pH vody a jejich relativní zastoupení.....	65
<b>Tabulka 7</b> Relativní zastoupení produktů přeměny linalyl acetátu během hydrodestilace v jednotlivých olejích.....	72
<b>Tabulka 8</b> Relativní zastoupení terpenů podle počtu isoprenových jednotek v jednotlivých olejích.....	75
<b>Tabulka 9</b> Relativní zastoupení jednotlivých funkčních tříd monoterpenoidů v jednotlivých olejích.....	76
<b>Tabulka 10</b> Relativní zastoupení monoterpenoidů podle struktury v jednotlivých olejích.....	77
<b>Tabulka 11</b> Relativní zastoupení monoterpenů podle struktury v jednotlivých olejích.....	78
<b>Tabulka 12</b> Porovnání chemického složení získaných levandulových olejů s dostupnou literaturou.....	82
<b>Tabulka 13</b> Minimální inhibiční koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ] jednotlivých esenciálních olejů a antibiotika ampicilinu v plynné a kapalně fázi .....	86
<b>Tabulka 14</b> Shrnutí hodnot MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ] pro oleje z jednotlivých studií vůči vybraným testovaným bakteriím.....	89

## **SEZNAM PŘÍLOH**

<b>Příloha 1</b> Chromatogram GC-MS pro esenciální levandulový olej EO5 s uvedenými příklady identifikovaných látek.....	105
<b>Příloha 2</b> Chromatogram GC-MS pro esenciální levandulový olej EO4 s uvedenými příklady identifikovaných látek.....	106
<b>Příloha 3</b> Chromatogram GC-MS pro esenciální levandulový olej EO3 s uvedenými příklady identifikovaných látek.....	107
<b>Příloha 4</b> Chromatogram GC-MS pro esenciální levandulový olej EO2 s uvedenými příklady identifikovaných látek.....	108
<b>Příloha 5</b> Chromatogram GC-MS pro esenciální levandulový olej EO1 s uvedenými příklady identifikovaných látek.....	109

## SEZNAM ZKRATEK

AAPH	2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid
ATB	antibiotikum
ATCC	Americká sbírka tkáňových a buněčných kultur (American Type Culture Collection)
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	kolonie tvořící jednotky (colony-forming unit)
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPH	difenylpikrylhydrazyl
DPPH-H	difenylpikrylhydrazin
ECD	detektor elektronového záchytu (electron capture detector)
EO	esenciální olej
FC	průtoková cytometrie (flow cytometry)
Fe <sup>2+</sup> -TPTZ	tripyridyltriazinželeznatý
Fe <sup>3+</sup> -TPTZ	tripyridyltriazinželezitý
FID	plamenový ionizační detektor (flame ionization detector)
GC-FID	plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (gas chromatography – flame ionization detection)
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (gas chromatography – mass spectrometry)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organization for Standardization)
MAHD	mikrovlnná asistovaná hydrodestilace (microwave assisted hydrodistillation)
MH	Mueller-Hinton
MIC	minimální inhibiční koncentrace (minimum inhibitory concentration)
MTT	methyl-triazolyl-tetrazolium bromid
NPK	Nemocnice Pardubického kraje
ORAC	absorpční kapacita kyslíkových radikálů (the oxygen radical absorbance capacity)
PLOT	Porous Layer Open Tubular

SCOT	Support Coated Open Tubular
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou (supercritical fluid extraction)
SPE	extrakce tuhou fází (solid-phase extraction)
SPME	mikroextrakce tuhou fází (solid-phase microextraction)
SPME-GC-MS	mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním detektorem
TAC	celková antioxidační kapacita (total antioxidant capacity)
TEAC	metoda stanovení ekvivalentní antioxidační kapacity Troloxu (trolox equivalent antioxidant capacity)
TPTZ	tripyridyltriazin
WCOT	Wall Coated Open Tubular
$\beta$ -PE	$\beta$ -fykoerytrin



## ÚVOD

Levandule je silně aromatický polokeř, který patří do čeledi *Lamiaceae* a nachází využití v mnoha odvětvích. Tradičně se levandule využívá v bylinné medicíně pro léčbu různých kožních poruch, včetně ran, popálenin a vředů. V dnešní době bývá levandule pěstována především za účelem získávání esenciálního oleje. Esenciální oleje jsou směsi přírodních těkavých sloučenin, mají charakteristickou vůni a jsou klasifikovány jako sekundární metabolity rostlin. Tyto oleje je možné extrahovat z různých částí rostlinného materiálu (květy, pupeny, semena, listy, větvičky, kůra, dřevo, plody nebo kořeny). Esenciální oleje získané z levandule vykazují silné protizánětlivé, antibakteriální a antioxidační vlastnosti. Dále se využívají v kosmetickém průmyslu, při výrobě parfémů a své uplatnění nachází také v aromaterapii nebo při masážích. Díky rychlému pokroku v molekulární biologii a přírodních vědách se znalosti o esenciálních olejích, jejich syntéze a extrakci stále zvyšují. Roste také zájem o využívání přírodních rostlinných sloučenin, včetně esenciálních olejů v alternativní medicíně, klinické a lékařské mikrobiologii, fytopatologii, aromaterapii, farmacii a farmakologii. Stejně tak se zvyšuje zájem o využívání těchto olejů pro konzervaci potravin a kosmetických přípravků. Kvalita oleje získaného z konkrétního druhu rostliny je ovlivněna především tím, kde byla rostlina pěstována a jakým způsobem byla zpracována. Nejpoužívanější metody pro získávání esenciálních olejů jsou hydrodestilace a destilace vodní parou.

Tato diplomová práce se zabývá levandulovými esenciálními oleji získanými hydrodestilací při různých hodnotách pH vody. Jejím cílem je pozorování vlivu pH vody na kvalitu získaných olejů. Identifikace jednotlivých složek olejů je provedena plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostním spektrometrem a ke stanovení relativního zastoupení identifikovaných sloučenin je použita plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. U vydestilovaných esenciálních olejů je testována antimikrobiální aktivita vůči gramnegativním a grampozitivním bakteriím.

# I TEORETICKÁ ČÁST

## 1 LEVANDULE

Levandule je cenná léčivá a aromatická rostlina. Jméno levandule pochází z latinského slovesa *lavo*, *lavare* a znamená umýt nebo čistit. Rod *Lavandula* zahrnuje 39 druhů a patří do čeledi *Lamiaceae* neboli hluchavkovité. Nejdůležitějšími z nich jsou levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) a levandule prostřední (*Lavanda x intermedia*). Oba druhy se pěstují primárně za účelem zisku esenciálního oleje. [1–4]

### 1.1 Výskyt a pěstování rostliny

Levandule je polokeř, který je svým výskytem typický pro podnebí Středozevního moře. Hojně se tedy vyskytuje například ve Francii, Španělsku nebo v Itálii. Roste ale také v mnoha dalších zemích po celém světě, včetně Polska. Mezi největší producenty levandule patří Bulharsko a Francie. Mezi další významné producenty patří Maroko, Maďarsko, Itálie, Rusko, Rumunsko, Ukrajina a Turecko. Nejlépe roste na plném slunci s ochranou proti větru. Při pěstování je důležité dbát na to, aby nedošlo k okyselení půdy nebo k výskytu nadměrného množství dusíku, protože to způsobí nadměrný přírůstek v zelených částech rostliny a současně dojde ke snížení tvorby květenství. Jednotlivé rostlinky levandule mohou být množeny generativně ze semen, vegetativně z řízků měkkého i tvrdého dřeva nebo také prostřednictvím tkáňové kultury. Pravidelné stříhání keřů levandule napomáhá stimulování růstu rostlin a podporuje tvorbu květenství. [2]

### 1.2 Popis rostliny

Levandule dorůstá do výšky 40–60 cm a tvoří kompaktní, pravidelné shluky. Spodní část stonku je dřevitá, zatímco horní část je zelená. Levandule má přímé nebo kopinaté listy se zvlněnými okraji. Listy mají stříbrozelenou barvu a jsou pokryty ochlupením, které je chrání před silným slunečním zářením, větrem a nadměrnými ztrátami vody. Květy levandule rostou v klasech, uspořádaných do kruhů (3–5 květů na kruh), v horní části stonku. Typicky mají světle fialovou barvu, ačkoli byly vyšlechtěny také odrůdy s bílými a růžovými květy. Období květu trvá od července do srpna. Sklizeň by měla být prováděna v suchých, slunečných dnech. Květy by měly být sbírány před otevřením, sušeny ve svazcích na stinných a dobře větraných místech. Levandule obsahuje esenciální olej, antokyany, fytoosteroly, cukry, minerály, kyselinu kumarovou, kyselinu glykolovou, kyselinu valerovou, kyselinu ursolovou, heparin, kumarin a taniny. [2; 5] Keřík levandule je k vidění na **Obrázku 1**.



**Obrázek 1** Keřík levandule lékařské

### **1.3 Využití levandule**

Levandule je jednou z nejužitečnějších aromatických bylinných rostlin používaných k léčebným účelům. Použití levandule je známé již od starověku. Římané používali rostlinu levanduli jako přísadu do koupele a ve středověku to byla jedna z nejcennějších aromatických rostlin využívaná při výrobě parfémů nebo mýdel. Byla také využívána jako přísada do potravin nebo jako projímadlo. Levandule bývá velmi často pěstována za účelem získávání esenciálního oleje. [1; 2; 6]

### **1.4 Levandulový esenciální olej**

Rostlina je zvláště ceněna pro své esenciální oleje. Esenciální olej je v levanduli uložen ve žlázových chloupkách, které jsou rozloženy v nadzemních částech rostlin, zejména v květech. Olej se ze žlázových chloupků snadno uvolňuje během destilace. [6; 7]

Vedle levandule lékařské se k získávání esenciálních olejů využívá také levandule prostřední neboli lavandin. Lavandin je hybrid, který vznikl křížením levandule lékařské a levandule širokolisté (*Lavandula latifolia*). Tato aromatická a léčivá rostlina patří taktéž do čeledi *Lamiaceae*. Esenciální olej z lavandinu lze využít jako vůni levandule pro kosmetiku, jemné parfémy, šampony nebo např. jako přídavek do čisticích prostředků. Dále lze esenciální olej z lavandinu využít ve fytoterapii a aromaterapii, kde jsou využívány jeho hojivé a protizánětlivé vlastnosti. [8]

Ačkoli odrůdy lavandinu produkují více esenciálního oleje než odrůdy levandule, má levandulový esenciální olej vyšší cenu a vyšší kvalitu. Kritéria pro stanovení kvality těchto olejů jsou množství kafru, linaloolu a linalyl acetátu. Linalyl acetát bývá obvykle zastoupen ve větší míře právě v levandulovém esenciálním oleji. Pro levanduli lékařskou musí být obsah kafru nižší než 0,5 %. Oleje, u kterých je linalyl acetát zastoupen ve vyšším množství než linalool, jsou považovány za oleje nejvyšší kvality. Lavandinového oleje se však ve světě vyrábí více než oleje levandulového (asi 1000 tun ročně) a to především díky jeho vysoké hodnotě výtěžnosti při získávání esenciálního oleje. Lavandinový esenciální olej se běžně mísí s levandulovým nebo jinými komerčními esenciálními oleji, aby došlo k vytvoření příjemné vůně. V esenciálních olejích získaných z levandule a lavandinu bývají identifikovány stejné sloučeniny, ale v různých poměrech. [6; 7]

## 2 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Přírodní esenciální oleje jsou těkavé vonné oleje, které se získávají z rostlin. Nacházejí se ve speciálních buňkách, žlázách nebo kanálcích v různých částech rostlin, jako jsou listy, kůra, kořeny, květy nebo plody. Esenciální oleje se mohou nacházet pouze v jedné nebo i v několika částech rostliny. Většinou jsou přítomny v malém množství a tvoří jen nepatrnou část celého rostlinného materiálu. Obsah esenciálního oleje obvykle tvoří 1–3 % hmotnosti rostliny. Oleje se v rostlině tvoří během určitých metabolických procesů a jsou vylučovány jako vedlejší produkty. V živých rostlinách mohou být esenciální oleje přítomny jako volné, ale mohou se vyskytovat i jako sloučeniny, které nemají žádnou vůni. Tyto sloučeniny se nazývají glykosidy. Při maceraci rostlinné tkáně ve vodě nastane enzymatická reakce, která způsobí, že glykosidy podstoupí chemickou změnu. Tato akce uvolní charakteristický esenciální olej. Právě esenciální oleje obsažené v bylinkách jsou zodpovědné za jejich charakteristické vůně. [9; 10]

Esenciální oleje lze rozdělit do dvou hlavních kategorií:

- Velkoobjemové oleje, které se obvykle získávají destilací z listového materiálu, jako je citronová tráva, citronella nebo skořicové listy. Dále se ve velkých množstvích získávají také citronové, limetové a pomerančové oleje.
- Oleje malého objemu, které se nejčastěji získávají z plodů, semen, pupenů a v menší míře z květů. Mezi tyto oleje patří například esenciální olej z hřebíčku, muškátového oříšku a koriandru nebo také květinové oleje. [9]

### 2.1 Vlastnosti esenciálních olejů

Esenciální oleje jsou obecně rozpustné v organických rozpouštědlech, které mají nižší hustotu než voda – např. v alkoholu nebo etheru a hustých olejích. Ve vodě jsou téměř nerozpustné. Ve většině případů bývají esenciální oleje tekuté a při pokojové teplotě bezbarvé. Každý olej má svou charakteristickou vůni. V přírodě hrají esenciální oleje důležitou roli v ochraně rostlin. Působí jako antivirotika, antimykotika, insekticidy, chrání proti bakteriím a také rostliny ochraňují před býložravci. Dále mohou přilákat hmyz, který podpoří rozptýlení pylu a semen. [9–11]

### 2.2 Získávání esenciálních olejů

Jedním z velmi důležitých kroků při získávání esenciálních olejů je sklizeň rostlinného materiálu. Obsah esenciálního oleje se během vývoje rostliny, a dokonce i během dne značně

liší. Pokud je rostlina sklizena ve špatnou dobu, může být výtěžek oleje nebo jeho kvalita výrazně snížena. Esenciální oleje jsou obvykle obsaženy v olejových žlázách nebo žilkách, které jsou křehké. Špatná manipulace může tyto struktury narušit a tím dojde k uvolnění esenciálního oleje, tudíž ke ztrátám na výtěžnosti. [9]

Pro získávání esenciálního oleje z rostlinného materiálu se využívají různé části rostlin, které bývají čerstvé, nebo úplně (případně částečně) vysušené:

- květy – z květů se získává například levandulový nebo růžový esenciální olej,
- listy – mezi oleje získávané z listů patří esenciální olej z eukalyptu, máty, tymiánu, bobkového listu nebo z šalvěže,
- oddenky – esenciální olej získaný ze zázvoru nebo puškvorce obecného,
- semena – koriandrový se kmínový esenciální olej,
- plody – fenyklový, anýzový esenciální olej a esenciální oleje z citrusů,
- dřevo a kůra – oleje ze skořice, santalového nebo růžového dřeva. [11]

Některé materiály, zejména květiny, by měly být destilovány co nejdříve po sklizni. Mnoho bylin se před zpracováním nechává vadnout nebo se suší těsně před zpracováním. Další materiály, jako je kůra, semena a kořeny, lze sušit a skladovat několik měsíců před samotným procesem získávání esenciálního oleje. Sušením ale může docházet ke ztrátě oleje, proto je nutné během procesu dodržovat určité pokyny, mezi které lze zařadit používání nízkých teplot sušení. Například pokud necháme listy rostliny sušit ve stínu nebo alespoň v částečném stínu, bude ztráta oleje nižší, než když necháme listy sušit na přímém slunci. Při sušení by nikdy neměl být rostlinný materiál hromaděn v silných vrstvách, protože by sušení neprobíhalo správným způsobem a navíc by mohlo dojít k podpoření procesu fermentace. Dále je důležité, aby byl materiál vysušen na dostatečně nízký obsah vlhkosti, aby došlo k zabránění růstu plísní. [9; 12–14]

### **2.2.1 Metody využívané pro získávání esenciálního oleje**

Metody využívané pro získání esenciálních olejů lze rozdělit do dvou kategorií – tradiční a inovativní. Tradiční metody zahrnují např. hydrodestilaci nebo destilaci vodní parou. Tyto dvě techniky patří zároveň k nejčastěji používaným metodám pro získávání esenciálních olejů. Nejstarší záznamy o destilaci za účelem získávání esenciálních olejů pocházejí z oblasti Egypta a Indie a jsou datovány do doby před více než 2000 lety. Mezi inovativní metody je možné zařadit mikrovlnnou destilaci a extrakci nadkritickou tekutinou. Výzkum nových

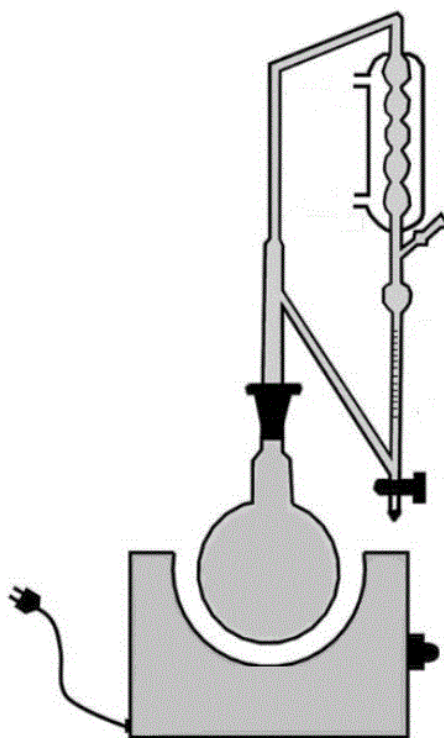
technologií vedl ke vzniku efektivnějších extrakčních procesů, při kterých došlo ke zkrácení doby extrakce, ke snížení spotřeby energie, zlepšení kvality esenciálních olejů a také ke zvýšení výtěžku extrakce. Pro získávání esenciálních olejů v komerčním měřítku se ale stále nejvíce využívají tradiční metody výroby, a to hlavně z důvodu použití jednoduchých a nenákladných zařízení. Inovativní metody nebývají široce používány pro komerční výrobu esenciálních olejů, ale v určitých situacích jsou považovány za velmi cenné. Mezi tyto situace se řadí například extrakce esenciálních olejů pro mikroanalýzu. [6; 9; 12; 14]

Důležitým krokem při destilaci esenciálních olejů je také oddělení samotného esenciálního oleje od tzv. hydrolátu, což je vodná fáze oddělující se v separátoru bezprostředně po destilaci. Toto je velmi důležitý proces, protože dochází ke zpracování velmi malého množství olejů, které mají vysoké hodnoty. Většina získaných esenciálních olejů je lehčí než voda, a tudíž plavou na jejím povrchu. Některé oleje však mají vyšší hustotu než voda a klesají ke dnu. Pokud je voda po oddělení zakalená, měla by být vrácena do destilační jednotky a znovu destilována. Získaný olej by měl být skladován v nádobách z hnědého skla, které budou těsně uzavřené, a nad hladinou oleje by měl být pouze minimální prostor, aby se zamezilo reakci se vzdušným kyslíkem a následné změně vonných vlastností olejů. [9]

### 2.2.1.1 Hydrodestilace

Hydrodestilace je nejjednodušší a nejstarší metoda, která se využívá pro získávání esenciálních olejů. Pro hydrodestilaci se v laboratorním měřítku obvykle využívá aparatura typu Clevenger, která je zobrazena na **Obrázku 2**. Do destilační baňky se vkládá rostlinný materiál, který chceme destilovat, a také voda a celek se přivede k varu. Materiál, ze kterého destilujeme esenciální olej, tedy přichází do přímého kontaktu s vroucí vodou. Princip extrakce je při hydrodestilaci založen na principu azeotropické destilace. Při atmosférickém tlaku a během procesu extrakce (při zahřívání) tvoří molekuly vody a esenciálního oleje heterogenní směs, která má teplotu varu kolem 100 °C. Samotné složky esenciálního oleje mají teplotu varu mnohem vyšší. Směs esenciálního oleje a vody se destiluje současně, jako by se jednalo o jednu sloučeninu. Toto se označuje jako kódestilace v přítomnosti vodních par. Voda je s většinou terpenových složek esenciálního oleje nemísitelná, což je velkou výhodou, protože ji lze po kondenzaci snadno od esenciálního oleje oddělit prostou dekantací. Tato metoda je vhodná pro získávání esenciálních olejů z okvětních lístků a květů. Hydrodestilace má však i několik nevýhod. Mezi ty se řadí dlouhá doba extrakce (3–6 hodin, pro lístky růží i 24 hodin) nebo chemické změny některých látek, ke kterým může dojít při dlouhotrvajícím kontaktu s vroucí vodou (např. hydrolýza). I přes jisté nevýhody se tato

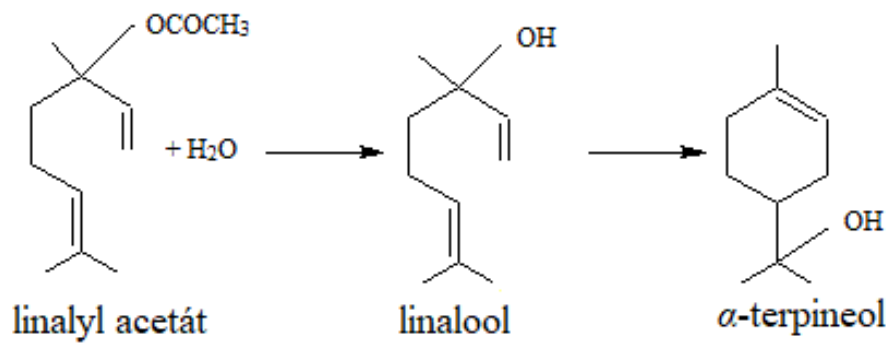
metoda stále používá i v průmyslovém měřítku, protože není potřeba žádného drahého zařízení a také díky její selektivitě. [12]



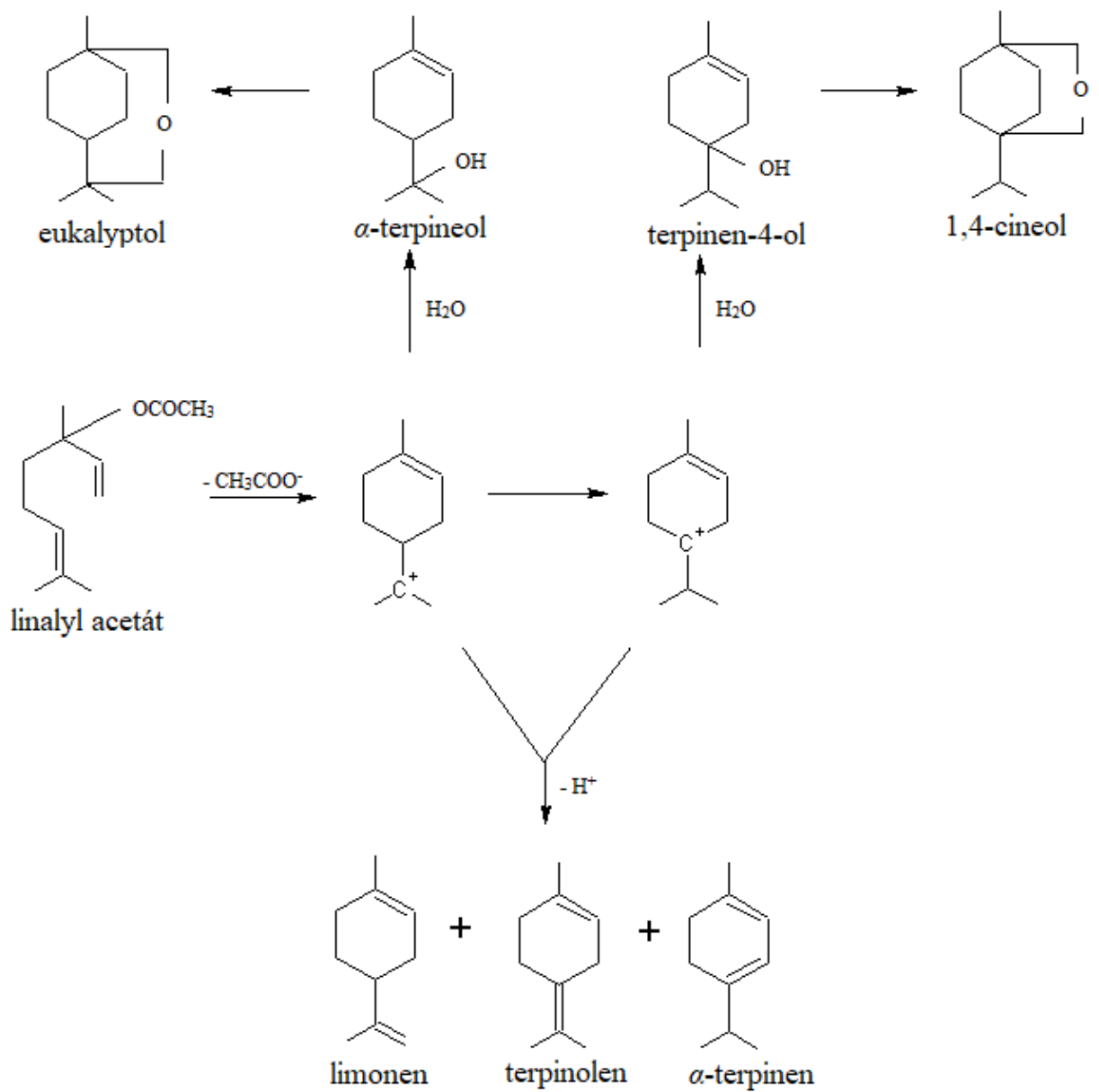
**Obrázek 2** Laboratorní destilační aparatura typu Clevenger [15]

**Kiran Babu** a **Bikram Singh** [16] popisují nedostatky hydrodestilace při získávání esenciálních olejů. Hydrodestilace způsobuje degradaci termolabilních sloučenin a hydrolyzu sloučenin citlivých na vodu. Během hydrodestilace se estery přítomné v esenciálním oleji obecně hydrolyzují uvolňováním  $H^+$  iontů z vody. V přítomnosti vody, přibližně při jejím bodu varu, estery hydrolyzují na odpovídající kyseliny a alkoholy. Linalyl acetát tedy hydrolyzuje za vzniku linaloolu, který se při hydrodestilaci transformuje na  $\alpha$ -terpineol (**Obrázek 3**). Linalyl acetát může také během destilace hydrolyzovat za vzniku terpinolenu prostřednictvím  $\alpha$ -terpinylového a terpinen-4-ylového kationtu. Následně mohou hydratací vznikat  $\alpha$ -terpineol a eukalyptol, jak je naznačeno na **Obrázku 4**. Během hydrodestilace kyselé podmínky (pH 5,5–6,5) podporují rozklad linalyl acetátu a linaloolu. Linalyl acetát může být také přeměněn allylovým přesmykem na geranyl acetát a neryl acetát a eliminací na acyklické monoterpenové uhlovodíky, jako jsou myrcen, *cis*- a *trans*-ocimen. Schéma tohoto přesmyku je zobrazeno na **Obrázku 5**. Na **Obrázku 6** je ukázáno schéma pro termální degradaci linalyl acetátu během které dochází ke vzniku geraniolu, nerolu a linaloolu. [16]

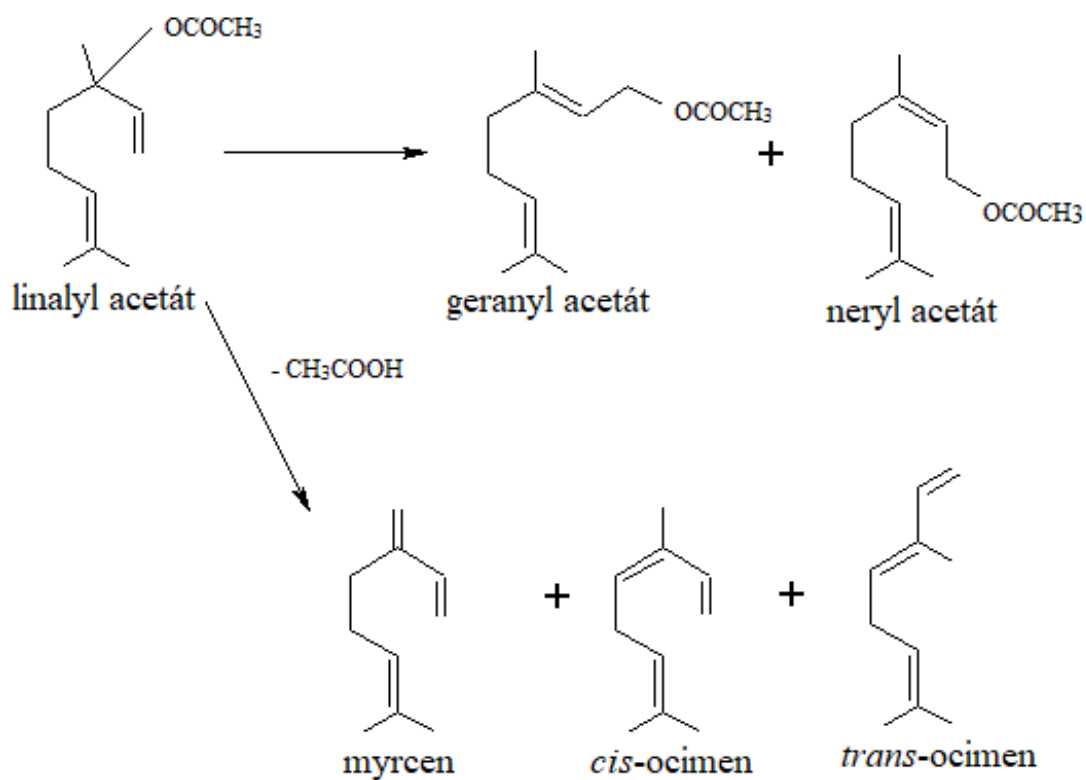




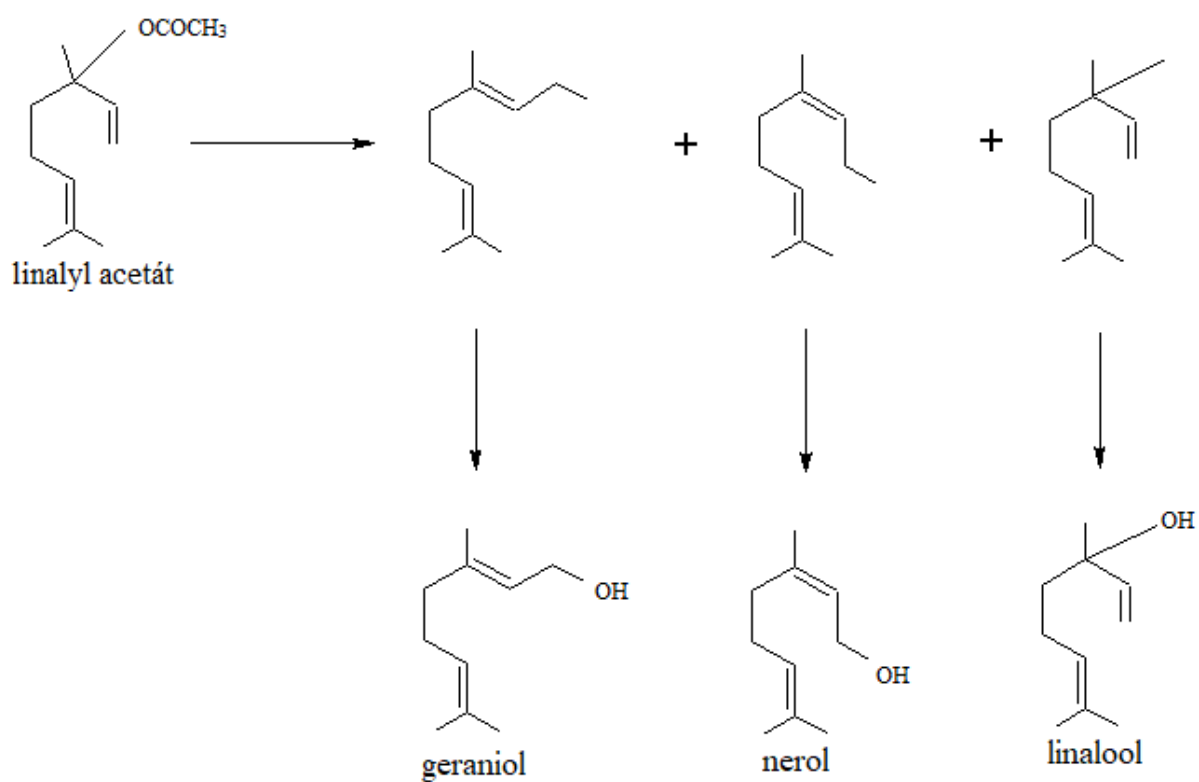
Obrázek 3 Schéma hydrolyzy linalyl acetátu [16]



Obrázek 4 Schéma hydrolyzy linalyl acetátu [16]



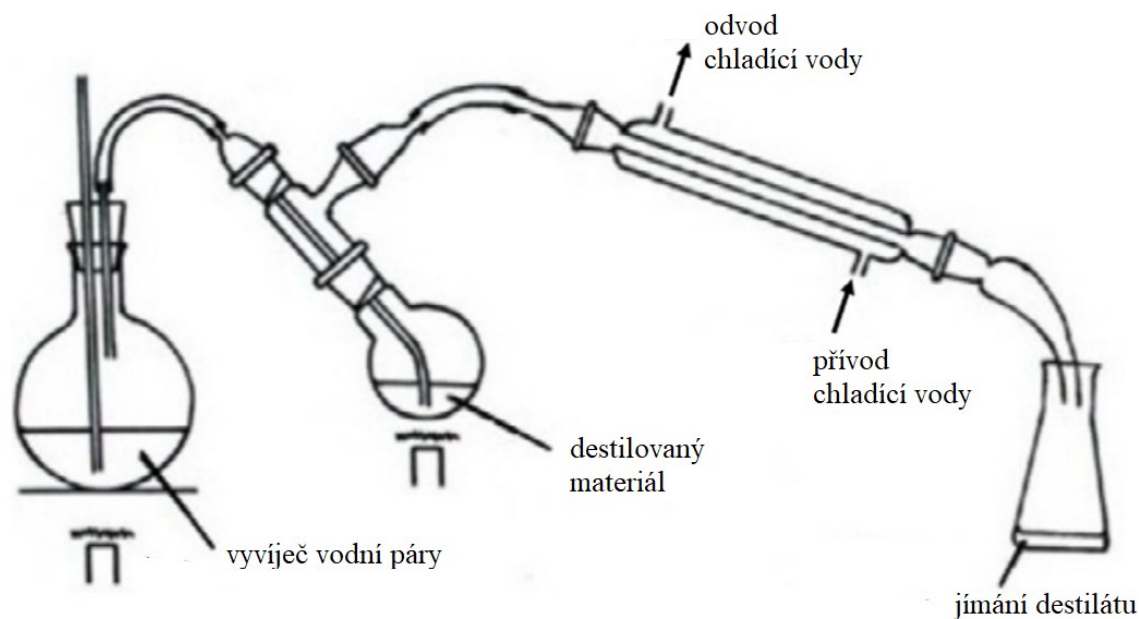
Obrázek 5 Přesmyk linalyl acetátu během destilace [16]



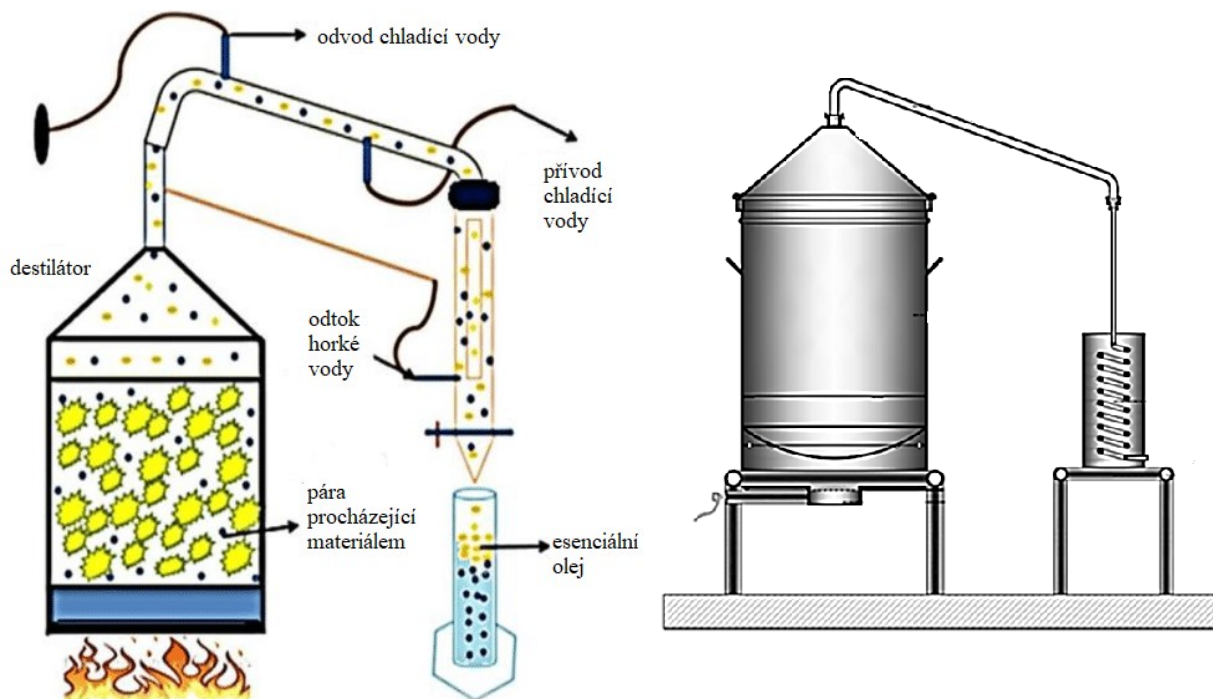
Obrázek 6 Termální degradace linalyl acetátu [16]

### 2.2.1.2 Destilace vodní parou

Destilace vodní parou je metoda destilace, která je vhodná především pro destilaci sloučenin, které jsou citlivé na teplo. Mnoho organických sloučenin má tendenci se rozkládat při stálých vysokých teplotách. Oddělení takovýchto látek hydrodestilací by mohlo vést k jejich ztrátám, proto se využívá destilace vodní parou. Při tomto typu destilace tedy přichází materiál do kontaktu pouze s vodní parou, nikoliv přímo s vroucí vodou, jak je tomu při hydrodestilaci. Pára je generována odděleně mimo destilační zařízení. Výhodou je, že množství páry lze snadno regulovat, a také to, že při generování páry mimo destilační zařízení se rostlinný materiál nezahřívá na teplotu vyšší než 100 °C, v důsledku čehož by neměl podléhat tepelné degradaci. Tato metoda využívá toho, že látka, kterou chceme izolovat, má při teplotě varu vody určitou tenzi par. Té odpovídá také obsah izolované látky v parách nad kapalinou. Páry této složky jsou odstraňovány proudem vodní páry, čímž dojde k urychlení vypařování složky, kterou izolujeme. Směs par se ochladí při průchodu chladičem a dojde ke kondenzaci. [9; 14] Aparatura využívaná pro destilaci vodní parou v laboratořích je zobrazena na **Obrázku 7** a na **Obrázku 8** je k vidění aparatura využívaná v průmyslu.



**Obrázek 7** Laboratorní aparatura pro destilaci vodní parou [17]



**Obrázek 8** Aparatura pro destilaci vodní parou využívaná v průmyslu [18]

### 2.2.1.3 Mikrovlnná asistovaná hydrodestilace

Při mikrovlnné asistované hydrodestilaci (MAHD) je k získávání esenciálních olejů využívána schopnost mikrovlnného záření účinně zahřívát pevný materiál. Rostlinný materiál je ozařován pomocí mikrovln. Účinnost mikrovlnné asistované hydrodestilace je silně závislá na dielektrické konstantě vody a matrice. Mikrovlnný ohřev způsobuje rychlé dodání energie k celkovému objemu rozpouštědla/vzorku, což vede k rychlému nárůstu teploty. Teplo vzniká molekulárními pohyby uvnitř polárních nebo iontových komponent. Jakmile tlak uvnitř žlázy přesáhne určitou hodnotu, dojde k narušení vnějších buněčných stěn a v důsledku toho se esenciální oleje uvolní do prostředí. Od tohoto okamžiku jsou esenciální oleje odváděny vodní parou, dochází ke zkapalnění v kondenzátoru a následně ke shromažďování v jímací baňce. Díky rozdílné hustotě a také díky vzájemné nemísitelnosti lze vodu a esenciální olej od sebe snadno oddělit. Tímto procesem se získávají esenciální oleje, které ve srovnání s hydrodestilací obsahují relativně málo těkavých složek. Například v koriandrovém oleji, získaném pomocí MAHD, vzrostlo procento kyseliny myristové a kyseliny palmitové, zatímco množství linaloolu pokleslo ve srovnání s olejem získaným pomocí hydrodestilace. Tato změna byla pravděpodobně způsobena špatnou stabilitou linaloolu. Koprový olej získaný touto metodou ve srovnání s olejem získaným hydrodestilací obsahoval větší množství sloučenin s vyššími teplotami varu a menší množství sloučenin s nižší stabilitou. Tyto informace naznačují, že mikrovlnná asistovaná hydrodestilace je vhodná pro extrakci

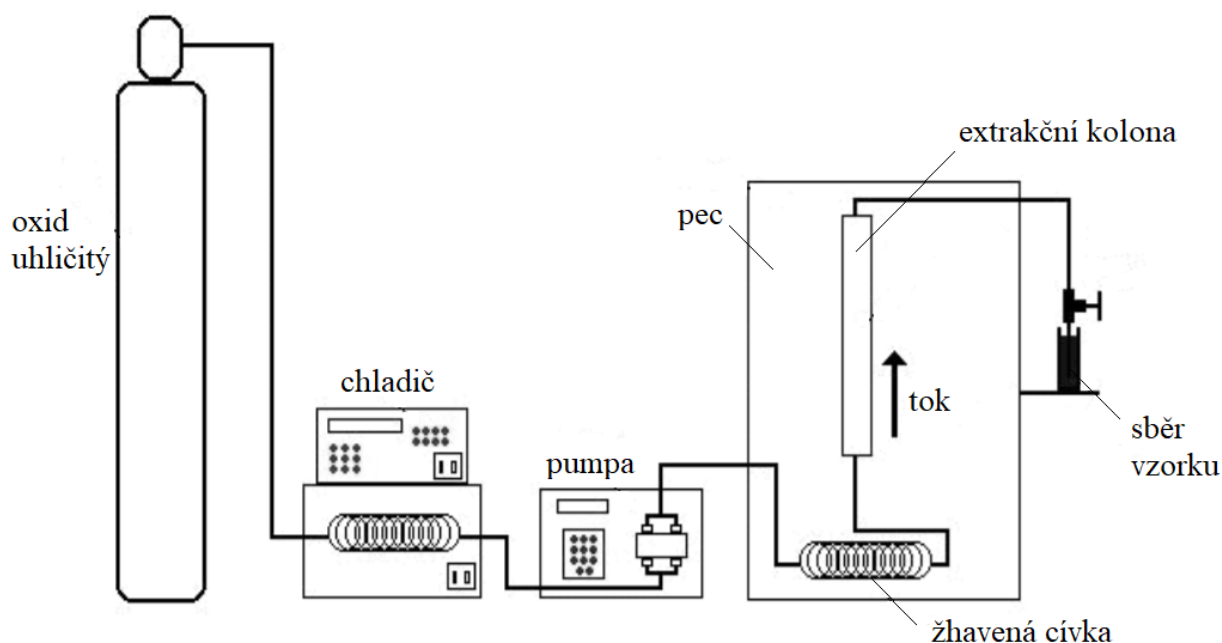
stabilních složek s vysokou teplotou varu, zatímco není příliš vhodná pro nestabilní sloučeniny. [14; 19]

#### **2.2.1.4 Macerace**

Obecný proces macerace spočívá v umístění vhodně upraveného rostlinného materiálu do uzavřené nádoby a přidání vybraného rozpouštědla. Uzavřená nádoba se využívá k zabránění odpařování rozpouštědla během procesu extrakce. Proces probíhá při pokojové teplotě. Rostlinný materiál se nechá v daném rozpouštědle loužit tak dlouho, dokud nedojde k vyloužení rozpustných složek do rozpouštědla. Doba macerace je dlouhá, obvykle trvá několik dní a lze ji výrazně urychlit mícháním. Systém je až na občasné míchání statický, extrakce tedy funguje na principu molekulární difúze, která je velmi pomalá. Příležitostné protřepání napomáhá difúzi a také zajišťuje rozptýlení koncentrovaného roztoku akumulujícího se kolem povrchu částic, čímž se dostává čerstvé rozpouštědlo k povrchu částic pro další extrakci. [14]

#### **2.2.1.5 Extrakce nadkritickou tekutinou**

Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) je proces, při kterém dochází k oddělování jedné složky (extraktant) od ostatních (matrice) za použití superkritických kapalin jako extrakčního rozpouštědla. Superkritická tekutina je jakákoliv látka při teplotě a tlaku nad její kritickou hodnotu. Takováto tekutina může difundovat pevnými látkami jako plyn a rozpouštět materiály jako kapalina. Tento typ extrakce se obvykle využívá pro extrakci z pevné matrice. Může být ale použita i pro kapaliny. Nejčastěji se jako extrakční rozpouštědlo využívá oxid uhličitý – CO<sub>2</sub>, který je vhodný pro extrakci rostlinných složek, protože nezanechává žádné toxické zbytky. Oxid uhličitý působí jako nepolární rozpouštědlo, je také možné ho modifikovat přidávkem různých rozpouštědel – např. přidávkem etanolu, čímž dochází k úpravě solvatačních vlastností. CO<sub>2</sub> je navíc nehořlavý, bez zápachu, dále je inertní a levný. Podmínky extrakce pro oxid uhličitý jsou nad kritickou teplotou 31 °C a kritickým tlakem 74 bar. Mezi další extrakční rozpouštědla patří například voda, metanol, etanol nebo aceton. [20] Schéma aparatury využívané pro tento typ extrakce je zobrazeno na **Obrázku 9**.



**Obrázek 9** Schéma aparatury využívané pro extrakci nadkritickou tekutinou [20]

#### 2.2.1.6 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (SPE) je založena na rozdělování analytu mezi pevnou fází, kterou je obvykle sorbent umístěný v extrakční kolonce, a kapalnou fází, kterou je matrice vzorku nebo rozpouštědlo s analyty. V důsledku adsorpce nebo penetrace molekul se nastaví rovnováha a analyty ulpívají na sorbentu. Desorpce sloučenin zachycených na sorbentu se provádí proudem vhodného kapalného rozpouštědla nebo jinými pokročilejšími technikami, jako je např. proud nadkritické tekutiny. Tato technika se používá jak k zakoncentrování cílových sloučenin, tak i přečištění vzorků od nežádoucích příměsí, přičemž obojí se dá kombinovat v jednom extrakčním kroku. [21]

#### 2.2.1.7 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) byla poprvé představena Pawliszynem a spol. Jedná se o modifikaci SPE. Zahrnuje vstřebávání analytu ze vzorku na modifikovaný pevný podklad. Analyt se poté desorbuje působením tepla nebo použitím vhodného rozpouštědla. Mezi výhody této techniky se řadí to, že redukuje použití čistých organických rozpouštědel, čímž se sníží laboratorní náklady. Také podstatně zkracuje dobu extrakce a umožňuje automatizaci postupu při přípravě vzorku. Významnými znaky této metody jsou jednoduchost, relativně nízké pořizovací a provozní náklady, dále rychlost a také selektivita a citlivost ve spojení s vhodnou detekční technikou. Tato technika má i své nevýhody, mezi které se řadí například křehkost vlákna. Samotná extrakce může probíhat buď v parním prostoru vialky, nebo může být vlákno přímo ponořeno do roztoku vzorku, může probíhat ve velkém teplotním rozmezí –

od pokojové teploty až po cca 250 °C (záleží na vlastnostech použitého sorbentu) po dobu od jednotek minut až do několika desítek minut. Ve speciálních případech může extrakce probíhat až v řádu hodin. [22–24]

## **2.3 Využití esenciálních olejů**

O těkavé oleje byl historicky vždy velký zájem. Mnoho civilizací používalo těkavé oleje a vonné látky k mnoha různým účelům, ale některé z původních použití esenciálních olejů již v průběhu času vymizely. Starověcí Egypťané využívali esenciální oleje v parfumerii, medicíně, a dokonce při přípravě těl a orgánů na mumifikaci. Dále také využívali esenciální oleje jako konzervanty potravin. Během období renesance se používání esenciálních olejů v parfémových a kosmetických výrobcích rozšířilo do světa. Bylo také prokázáno, že esenciální oleje mají antimikrobiální, antioxidační a antifungální vlastnosti. Jejich současné použití v potravinách je však omezené, protože k dosažení dostatečné antimikrobiální aktivity je potřeba vysokých koncentrací, které by ale negativně ovlivnily organoleptické vlastnosti potravin. V moderní společnosti jsou pro použití jako insekticidy, konzervanty potravin a antibakteriální činidla vyvíjeny čisté chemikálie. Tyto praktické funkce esenciálních olejů byly tedy v průběhu času zcela nahrazeny průmyslovými výrobky. [13; 25; 26]

Esenciální oleje jsou také využívány v aromaterapii. Aromaterapie je formou doplňkové a alternativní medicíny, která využívá rostlinné esenciální oleje ovlivňující náladu nebo zdraví pacienta. K úlevě od deprese a úzkosti se využívají různé esenciální oleje – např. růžový, šalvějový, heřmánkový nebo levandulový, což je jeden z klíčových olejů využívaných při aromaterapii. Využívá se při aromaterapeutické léčbě úzkosti, kolísavých stavů nálady a pocitů emoční nestability. Bylo prokázáno, že zlepšuje náladu, snižuje úzkost a depresi. Dále bylo zjištěno, že levandulová aromaterapie má nejen relaxační účinky, ale také snižuje hladinu kortizolu v krevním séru a zlepšuje rychlost koronárního toku. [27]

### **2.3.1 Využití levandulového esenciálního oleje**

Esenciální olej získaný z levandule je v dnešní době stále stejně populární, jak tomu bylo před staletími. Důkazy o využívání esenciálního levandulového oleje sahají až ke starým Řekům a Římanům, kteří ho využívali jako terapeutické činidlo. Je potvrzeno, že aromatické rostliny obsahují značné množství bioaktivních složek (terpenické látky, polyfenoly a kumariny). Bylo prokázáno, že tyto složky levandulového esenciálního oleje mají užitečné biologické a farmakologické vlastnosti, jako je cytotoxicita, antiseptické, protizánětlivé a analgetické vlastnosti. Hojně se levandulový esenciální olej využívá především v kosmetickém

a parfémovém průmyslu. Vzhledem k rozsáhlému farmaceutickému a kosmetickému využití rostlin rodu *Lavandula* dosáhla celosvětová produkce levandulového esenciálního oleje 200 tun ročně. Levandulový esenciální olej se využívá také v potravinářském průmyslu za účelem aromatizace nápojů, zmrzliny, sladkostí, pečiva a žvýkaček. Má také inhibiční účinky na mikroorganismy a zabraňují kažení potravin. Dále olej získaný z levandule vykazuje silné antioxidační vlastnosti, lze ho tedy využít jako účinnou antioxidační sloučeninu. [2; 6; 28]

### **2.3.1.1 Antimikrobiální vlastnosti**

Bylo prokázáno, že levandulový esenciální olej je aktivní proti mnoha druhům bakterií, včetně těch rezistentních na antibiotika, jako je methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* a na vankomycin rezistentní *Enterococcus*. Dále byla také dokázána dobrá antibakteriální aktivita proti dalším bakteriím včetně *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* a *Propionibacterium acnes*. [29]

### **2.3.1.2 Využití v zemědělství**

Levandulový esenciální olej může být také široce používán v zemědělství. Olej se používá za účelem likvidace rostlinných patogenů, jako jsou *Botrytis cinerea* (plíseň šedá) nebo *Rhizopus stolonifer*. Vedle toho má olej také herbicidní vlastnosti a esenciální olej z levandule lékařské nabízí alternativu k syntetickému herbicidu, protože inhibuje klíčení *Xanthium strumarium* L. (řepeň durkoman), *Avena sterilis* L. (oves jalový) a *Phalaris brachystachys* L. (chrastice rákosovitá). [6]

## **2.4 Chemické složení**

Esenciální oleje jsou velmi složité přírodní směsi, které mohou obsahovat až několik desítek složek. Jednotlivé složky bývají v olejích zastoupeny ve zcela odlišných koncentracích. Obvykle bývají hlavní dvě nebo tři složky zastoupeny v poměrně vysokých koncentracích (20–70 %) ve srovnání s ostatními složkami, které jsou přítomny pouze ve stopových množstvích. Například carvacrol (30 %) a thymol (27 %) jsou hlavní složky oleje získaného z bylinky dobromysl obecná, linalol (68 %) je hlavní složka esenciálního oleje z koriandru setého a menthol (59 %) a menthon (19 %) jsou hlavní složky zastoupené v oleji máty peprné. Obecně platí, že hlavní složky, které jsou v oleji v nejvyšším zastoupení, určují jeho biologické vlastnosti. Hlavní skupinu látek, ze kterých se esenciální oleje skládají, tvoří terpeny a další aromatické a alifatické sloučeniny vyznačující se nízkou molekulovou hmotností. [10; 11]



Zatímco jedna sloučenina sama o sobě může mít nepříjemný zápach, většina esenciálních olejů má příjemnou vůni charakteristickou pro danou konkrétní rostlinu, která je tvořena kombinací až stovek sloučenin. Například methylbutyrát je spojován s ovocnou vůní jablek a ananasu. Benzaldehyd je spojen s mandlemi. Cinnamaldehyd, jak již název napovídá, je spojen s vůní skořice. Menton je jednou z několika sloučenin, které jsou spojeny s mátovou vůní. Ovocné aromatické tóny způsobuje nerolidol, květinové linalool, citrusové limonen a bylinné selenen. [11; 30]

### 2.4.1 Terpeny

Terpeny tvoří strukturně a funkčně odlišné třídy. Strukturní základ těchto látek je tvořený molekulou isoprenu (C<sub>5</sub>). Hlavními terpeny jsou monoterpeny (C<sub>10</sub>) a seskviterpeny (C<sub>15</sub>). Existují ale také hemiterpeny (C<sub>5</sub>), diterpeny (C<sub>20</sub>), triterpeny (C<sub>30</sub>) a tetraterpeny (C<sub>40</sub>). Terpeny se vyskytují také ve formě kyslíkatých derivátů, mezi které lze zařadit např. alkoholy, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny, estery a glykosidy. [10; 31; 32] V teoretické části této práce je termín terpen využíván pro označení uhlovodíků i jejich kyslíkatých derivátů, stejně tak je tomu i v případě monoterpenů a seskviterpenů.

V rostlinných materiálech se terpeny vyskytují jak volně, tak i ve vázané formě. Volné terpeny jsou velmi těkavé látky, které jsou snadno identifikovatelné a snadno se získávají z rostlinného materiálu destilací jako tzv. rostlinné silice. Aromatické látky, které se v materiálu nacházejí ve vázané formě, není možné sensoricky identifikovat, protože nejsou sensoricky aktivní. Vyskytují se v podobě nearomatických prekurzorů. Výskyt aromatických látek ve vázané formě je typický např. pro bobule vinné révy, ve kterých se nejčastěji vyskytují ve formě glykosidů – látek vázaných na cukr (terpeny, norisoprenoidy), sloučenin s aminokyselinami cysteinu a glutationu (vonné thioly) nebo ve formě karotenoidů. Jestliže se molekula, na kterou je aromatická látka vázána, odštěpí, aromatická látka se uvolní, a tím se stane sensoricky aktivní. K odštěpování dochází např. při hydrolýze v kyselém prostředí nebo enzymatickou hydrolýzou. [10; 33–35]

V případě kyselé hydrolýzy se na vzorek působí pomocí anorganické kyseliny. Ve většině případů se využívá kyselina chlorovodíková nebo kyselina sírová. Vzorek je zahříván pod zpětným chladičem při teplotě varu anorganické kyseliny nebo může kyselá hydrolýza také probíhat ve vodní lázni. Časy hydrolýzy se pohybují od 30 minut do 1 hodiny. Enzymatická hydrolýza je méně rozšířenou technikou. Z enzymů se nejčastěji využívají pektinázy, celulózy a amylázy. [36; 37]

**M. Dziadas a H. H. Jelén** [38] ve své práci popisují využití kyselá a enzymatické hydrolýzy pro uvolnění vázaných aromatických látek v hroznové šťávě, která byla získána lisováním hroznů. Ke každé hydrolýze bylo využito 100 ml šťávy, ke které byl před hydrolýzou přidán vnitřní standard (geranyl- $\beta$ -D-glukopyranosid). Kyselá hydrolýza byla prováděna po dobu 1 hodiny při 100 °C a enzymatická po dobu 21 hodin při 40 °C. Při enzymatické hydrolýze byl hlavní detekovanou sloučeninou geraniol. Při kyselá hydrolýze byla dominantní sloučeninou  $\alpha$ -terpineol následovaný linalolem. Po kyselá hydrolýze bylo detekováno celkem 1761  $\mu$ g terpenů ve srovnání s 672  $\mu$ g po enzymatické hydrolýze. [38]

**Yu Yang a kol.** [39] se ve svém článku věnují extrakci vázaných terpenových sloučenin z hroznů a vína. Při extrakci aromatických glykosidů z hroznů byly využity hroznové bobule, ze kterých byly odstraněny slupky. Slupky byly následně extrahovány v methanolu, získaný extrakt byl poté přečištěn pomocí SPE. Vzniklý roztok byl enzymaticky hydrolyzován na vodní lázni při 40 °C po dobu 16 hodin a poté analyzován pomocí SPME-GC-MS. Celkem bylo v hroznech a vínech zjištěno 17 terpenových glykosidů, jejich obsah se pohyboval od 804 do 836  $\mu$ g/kg v hroznech a od 155 do 192  $\mu$ g/l ve víně. Sloučeninou detekovanou v nejvyšším množství byl linalool, následovaný hotrienolem a geranylacetonem. [39]

#### **2.4.1.1 Monoterpeny**

Monoterpeny jsou tvořeny spojením dvou izoprenových jednotek. Jedná se o nejrepresentativnější molekuly, které tvoří až 90 % esenciálních olejů. Vyskytují se ve formě acyklické, monocyklické a bicyklické jako uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, estery, ethery, peroxidy a fenoly, jak je ukázáno v **Tabulce 1**. [10] Jsou to přírodní produkty charakteristické vůně, které mají své uplatnění v regulaci růstu, reprodukčním cyklu nebo v obranných mechanismech. Vyskytují se ve všech organismech, ale syntetizovat je dokážou pouze rostliny, bakterie a některé druhy hmyzu. Do vyšších organismů se dostávají potravním řetězcem. Jsou považovány za sekundární metabolity rostlin, což znamená, že se jedná o látky, které se neuplatňují v základních rostlinných procesech – rostlina je produkuje, aniž je využije jako zdroj energie nebo jako zásobní látky. Monoterpeny jsou významné především tím, že zprostředkovávají interakce mezi rostlinou a prostředím. Slouží ke komunikaci mezi rostlinami, chrání rostlinu před vysycháním nebo napadením škůdci. Pro rostliny jsou užitečné také tím, že lákají opylující hmyz. V rostlinách jsou syntetizovány v parenchymatických buňkách a poté uloženy ve vakuolách, v buněčné stěně nebo ve speciálních extrakčních pletivech jako tzv. pryskyřičné buňky. Monoterpeny se v rostlinných tkáních vyskytují převážně ve volné formě, pouze malou část je možné nalézt ve formě

glykosidů. Jedná se o těkavé sloučeniny, což způsobuje, že jsou snadno identifikovatelné a lze je snadno získat destilací jako rostlinné silice. [10; 40]

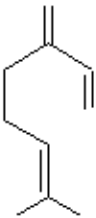
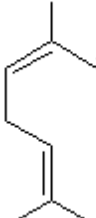
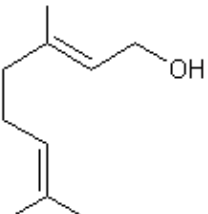
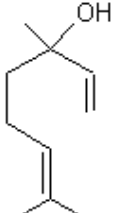
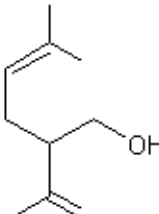
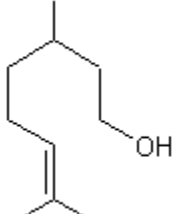
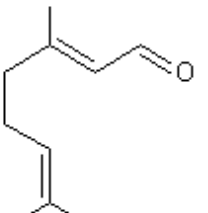
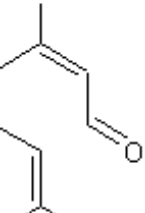
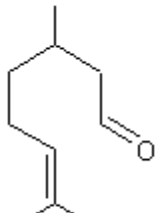
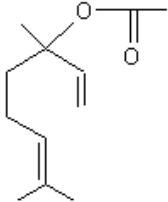
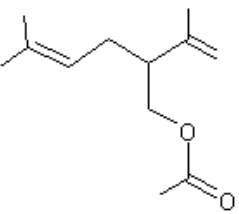
#### **2.4.1.1.1 Monoterpeny a člověk**

Velké množství monoterpenů má pozitivní vliv na lidské zdraví. Mezi zdroje monoterpenů se řadí bylinky, koření, víno, esenciální oleje (silice) a olivový olej. Silice získané z rostlinných materiálů jsou žádaným zdrojem monoterpenů pro potravinářství a parfumerii. Silice, ale i jednotlivé monoterpeny nacházejí uplatnění při léčení fyzických i psychických nemocí a poruch – v aromaterapii. Využívají se také jako preventivní prostředky proti nachlazení či chřipce. Působí proti srdečním chorobám, předcházejí osteoporóze a vykazují protiplísňové a antibakteriální účinky. K nejvýznamnějším monoterpenům můžeme zařadit mentol, který působí proti nachlazení, uvolňuje dýchací cesty a tlumí kašel. Právě díky svým farmakologickým účinkům a výraznému aromatu se používá jako přísada do drogistických výrobků. Mátová silice nebo čaj působí proti nadýmání. Velké množství monoterpenů vykazuje protinádorovou aktivitu – vzniku rakoviny buď předcházejí, nebo inhibují její rozvoj. Mezi takovéto monoterpeny se řadí např. limonen, karvon, eraniol, karveol, mentol a sobrerol. [40]

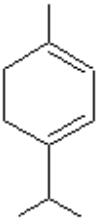
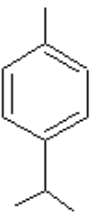
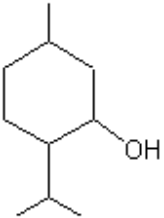
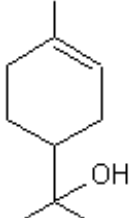
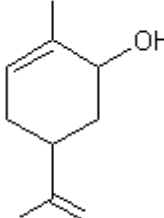
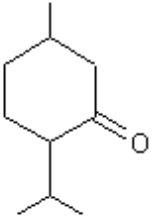
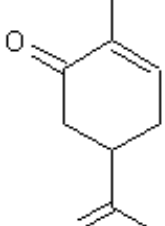
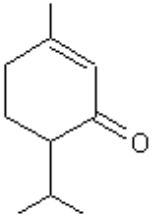
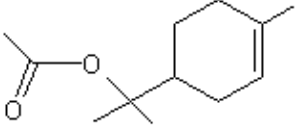
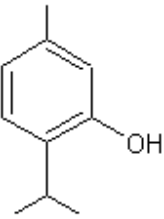
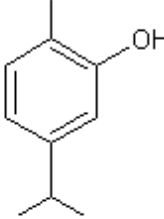
#### **2.4.1.1.2 Toxicita monoterpenů**

Pouze několik monoterpenů je pro člověka velmi toxických, řada z nich ale může způsobit podráždění kůže, což se projeví kožní vyrážkou. Výraznými kožními alergeny jsou některé monoterpenické alkeny, které se izolují z jehličnanů – pineny a kareny. Toxické monoterpeny jsou většinou ketony – např. hepatotoxin pulegon, který je obsažen v mátě. Tento keton byl v minulosti používán k vyvolání potratů. Mezi další jedovaté se řadí thujon nebo kafr. Thujon je neurotoxický, což se může projevit halucinacemi nebo hyperaktivitou. Kafr je toxický pro nenarozený plod, který nemá enzymy nutné k jeho odbourání, tudíž může kafr způsobit potrat. K vyvolávání potratů byla využívána řada rostlin i jejich odvarů. Proměnlivý obsah aktivních složek vedl ale k problematickému dávkování a tím často k selhání organismu i smrti. [40]

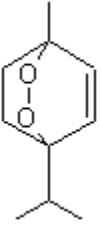
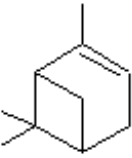
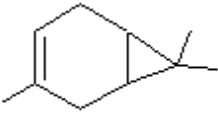
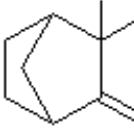
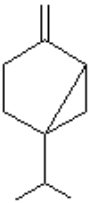
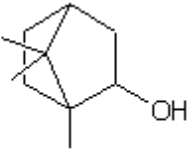
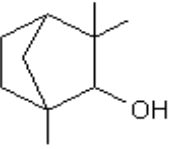
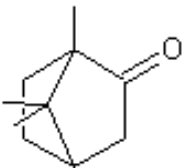
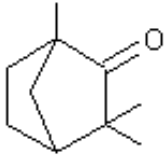
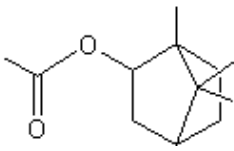
**Tabulka 1** Rozdělení monoterpenů do jednotlivých skupin podle struktury a funkčních skupin

acyklické	
uhlovodíky	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>myrcen</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><i>cis</i>-ocimen</p>  </div> </div>
alkoholy	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>geraniol</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>linalool</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>lavandulol</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>citroellol</p>  </div> </div>
aldehdy	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>geranial</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>neral</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>citronellal</p>  </div> </div>
estery	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>linalyl acetát</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>lavandulyl acetát</p>  </div> </div>

**Tabulka 1** Rozdělení monoterpenů do jednotlivých skupin podle struktury a funkčních skupin – pokračování

<b>monocyklické</b>	
uhlovodíky	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p><math>\alpha</math>-terpinen</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><i>p</i>-cymenten</p>  </div> </div>
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>menthol</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><math>\alpha</math>-terpineol</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>karveol</p>  </div> </div>
ketony	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>menthon</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>karvon</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>piperiton</p>  </div> </div>
	<div style="text-align: center;"> <p><math>\alpha</math>-terpinyl acetát</p>  </div>
fenoly	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>thymol</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>karvakrol</p>  </div> </div>

**Tabulka 1** Rozdělení monoterpenů do jednotlivých skupin podle struktury a funkčních skupin – pokračování

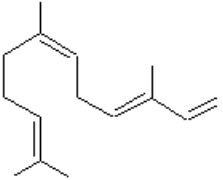
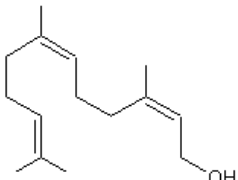
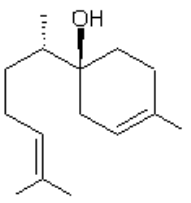
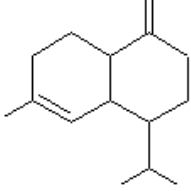
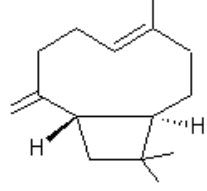
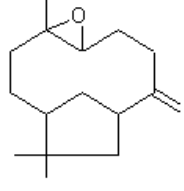
peroxydy	askaridol 			
<b>bicyklické</b>				
uhlovodíky	pinen 	3-karen 	kamfen 	sabinen 
alkoholy	borneol 	fenchol 		
ketony	kafr 	fenchon 		
estery	isobornyl acetát 			

#### 2.4.1.2 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou tvořeny spojením tří izoprenových jednotek – obsahují tedy patnáct uhlíků (C<sub>15</sub>). Prodloužení řetězce zvyšuje počet cyklizací a také vede k velké rozmanitosti struktur. Funkce seskviterpenů v rostlině jsou podobné funkcím monoterpenů. Hlavními zdroji těchto

sloučenin jsou mezi rostlinami např. celer, máta, rozmarýn nebo šalvěj. [31] Rozdělení seskviterpenů do jednotlivých struktur je zobrazeno v **Tabulce 2**. [10]

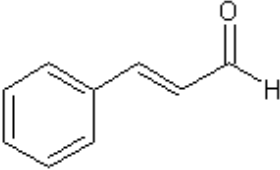
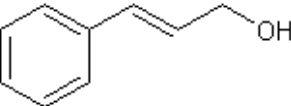
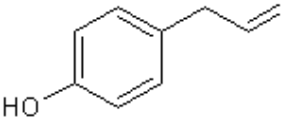
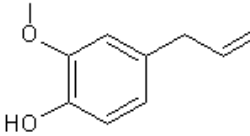
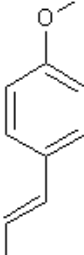
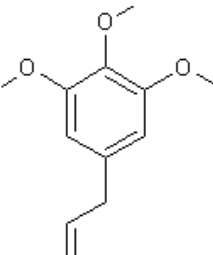
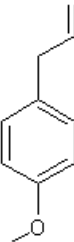
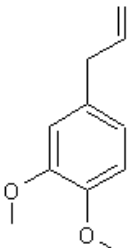
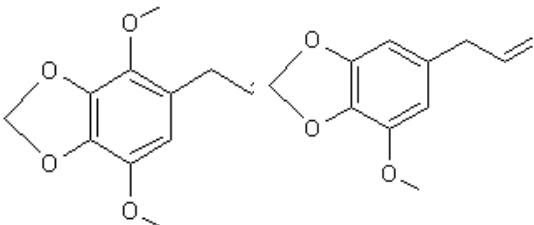
**Tabulka 2** Rozdělení seskviterpenů do jednotlivých skupin podle struktury

acyklické		
farnesen	farnesol	
		
monocyklické		
bisabol		
		
bi, tricyklické		
$\gamma$ -kadinen	$\beta$ -karyofylen	karyofylen oxid
		

### 2.4.1.3 Fenylpropanové deriváty

Fenylpropanové deriváty jsou další skupinou látek, ze kterých se esenciální oleje skládají. Jedná se o sloučeniny odvozené od fenylpropanu a vyskytují se méně často než terpeny. Biosyntetické dráhy, ve kterých se terpeny a fenylpropanové deriváty tvoří, bývají v rostlinách obvykle odděleny. V některých rostlinách ale mohou existovat vedle sebe, přičemž převládá jedna hlavní cesta. Funkce fenylpropanových derivátů v rostlině jsou podobné funkcím monoterpenů a/nebo seskviterpenů. Fenylpropanové deriváty zahrnují například aldehydy, alkoholy, fenoly, methoxy-deriváty a methylenedioxy sloučeniny. Rostliny bohaté na tyto látky jsou například anýz, skořice, hřebíček nebo fenykl. [31] Rozdělení fenylpropanových derivátů do jednotlivých skupin podle funkčních skupin je ukázáno v **Tabulce 3**. [10]

**Tabulka 3** Rozdělení fenylypropanových derivátů do jednotlivých skupin podle funkčních skupin

aldehydy	skořicový aldehyd			
				
alkoholy	skořicový alkohol			
				
fenoly	chavikol	eugenol		
				
methoxy-deriváty	anetol	elemicin	estragol	methyl eugenol
				
methylenedioxy sloučeniny	apiol myristicin			
				

## 2.5 Chemické složení levandulového esenciálního oleje

Levandulový esenciální olej se skládá především z terpenů a jejich kyslíkatých derivátů. Mezi hlavní složky esenciálního oleje z levandule lékařské obvykle patří linalool a linalyl acetát,



zatímco u levandule prostřední (lavandinu) se objevují i některé další monoterpeny (eukalyptol, kafr a isoborneol) ve vyšších koncentracích. Obecně platí, že levandule lékařská produkuje esenciální olej vyšší kvality. Má se za to, že esenciální olej z levandule prostřední je těžavější a má nižší kvalitu kvůli vyššímu obsahu kafru a nižšímu procentu linalyl acetátu. Složení esenciálního oleje je primárně určené genotypem rostliny. Dále může také být ovlivněno prostředím ontogenetických faktorů nebo morfogenetickými rysy. Množství a kvalitu získaného esenciálního oleje ovlivňuje i samotné místo růstu rostliny a doba sklizně. Důležitou roli hrají také úpravy rostlinného materiálu po sklizni, které mohou snížit obsah esenciálního oleje nebo změnit jeho složení (např. vysoké teploty sušení). V neposlední řadě může kvalitu oleje ovlivnit metoda extrakce nebo doba destilace. [4]

Charakteristická levandulová vůně esenciálního oleje se připisuje monoterpenům. Esenciální oleje získané z levandule lékařské charakterizované vysokou koncentrací linaloolu a linalyl acetátu a nízkým obsahem kafru jsou považovány za oleje s nejkrásnější vůní a jsou nejžádanějšími oleji používanými v aromaterapeutickém a kosmetickém průmyslu. Oleje získané z jiných druhů levandule obsahují vysoké koncentrace dalších terpenů, včetně vysokého obsahu kafru, což vede k méně příjemné vůni. [6]

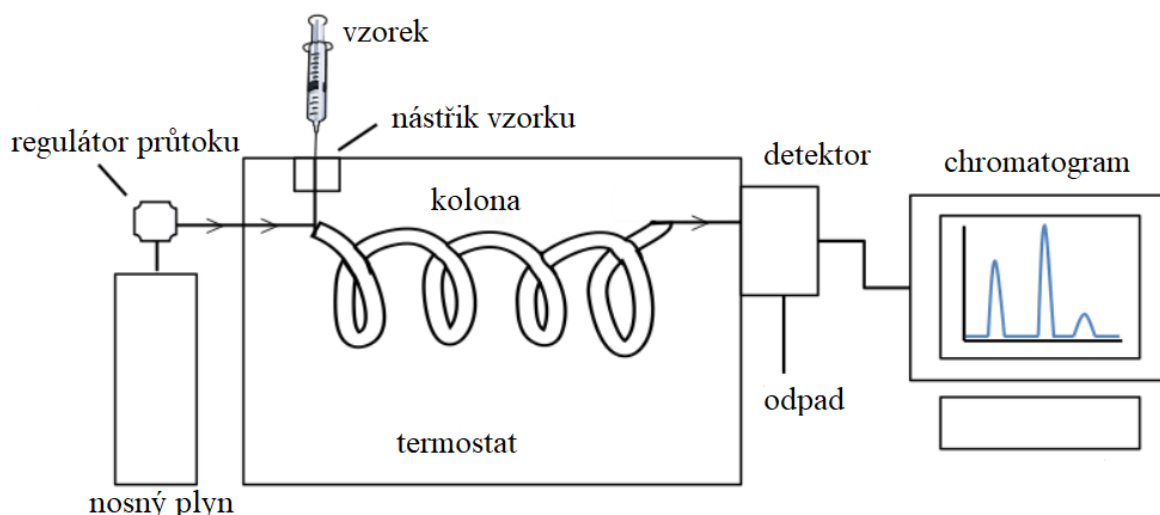
### 3 ANALÝZA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

K analýze a kontrole esenciálních olejů byly využívány různé metody. V současné době se však identifikace jednotlivých složek esenciálních olejů obvykle provádí pomocí plynové chromatografie. Nejčastěji ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) nebo pomocí plynového chromatografu vybaveného plamenovým ionizačním detektorem. [13; 41]

#### 3.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační metoda, která se využívá k separaci těkavých sloučenin. Má velmi široké pole aplikací. Umožňuje analýzu především plyných vzorků. Analýza kapalných vzorků je možná, pouze pokud se vzorek ihned po nadávkování přemění na plyn. Je široce používána pro kvantitativní i kvalitativní analýzu vícesložkových směsí, jako jsou esenciální oleje, uhlovodíky a rozpouštědla. Při plynové chromatografii lze využít různé teplotní programy, aby byly získané hodnoty přesnější – např. k rozlišení látek, které se během procesu plynové chromatografie chovají podobně. Použitím plamenového ionizačního detektoru nebo detektoru elektronového záchytu (které mají vysokou citlivost) můžeme pomocí plynové chromatografie kvantitativně stanovit látky přítomné ve velmi nízkých koncentracích. Přístroj, pomocí kterého se separace provádí, se nazývá plynový chromatograf a jeho schéma je ukázáno na **Obrázku 10**. K separaci dochází mezi dvěma heterogenními fázemi. Analyzované látky se rozdělují mezi stacionární a mobilní fázi. Mobilní fáze, která se označuje také jako nosný plyn, je vždy plyná a umožňuje transport látek kolonou. Mobilní fáze je zpravidla inertní, stlačitelný a málo viskózní plyn. Nosný plyn je odebírán z tlakové láhve a chromatografem se pohybuje za konstantního průtoku. Nejčastěji se využívá helium, dusík nebo vodík. Vodík, který je hojně využíván, má však určité nevýhody – je explozivní, hořlavý, a navíc může způsobit hydrogenaci některých látek. [42–44]

Plynová chromatografie – konkrétně chromatografie plyn-kapalina – zahrnuje odpaření vzorku a nástřik na hlavu chromatografické kolony. Vzorek je transportován kolonou proudem inertní plyné mobilní fáze. Samotná kolona obsahuje kapalnou stacionární fázi, která je nanese na povrchu inertní pevné látky. Principem plynové chromatografie je adsorpce a rozdělování. Jednotlivé složky vzorku se na koloně zdržují různou dobu a na základě toho se původní směs na chromatografické koloně dělí. Jednotlivé složky následně putují do vhodně zvoleného detektoru, který umožňuje jejich detekci. [42]



**Obrázek 10** Schéma plynového chromatografu [45]

### 3.1.1 Chromatografické kolony

Kolonu pro plynovou chromatografii lze považovat za hlavní část plynového chromatografu. Od začátku 70. let se podstatně změnila povaha a design kolon. Ty dříve používané obsahovaly buď pevný adsorbent, nebo kapalinu nanesenou na povrchu inertního nosiče – takovéto kolony se označují jako náplňové. Pro výrobu těchto kolon se nejčastěji využívají měď, hliník, sklo nebo nerezová ocel a jejich vnitřní průměr je 2 až 3 mm a délka 1 až 3 metry. Tyto kolony v dnešní době nahrazují ty, které obsahují imobilizovanou nebo zesíťovanou stacionární fázi vázanou na vnitřním povrchu kolony a nazývají se kapilární. U náplňových kolon se jako materiál pro pevné adsorbenty používají silikagel nebo oxid hlinitý, které byly u kolon kapilárních nahrazeny porézními polymerními adsorbenty. Kapilární kolony mají v současné době obvykle délku 10–60 m, vnitřní průměr 0,20–0,53 mm a nejčastěji bývají vyrobeny z taveného křemene. V současné době se většina aplikací provádí na kapilárních kolonách kvůli rychlé a efektivní separaci, kterou poskytují. [44; 46; 47]

Používané kapilární kolony se rozdělují do tří skupin:

- PLOT (Porous Layer Open Tubular) – obsahují tenkou porézní vrstvu pevného adsorbentu, jako je oxid hlinitý nebo molekulární síta. Využívají se především pro analýzu hustých plynů a jiných těkavých sloučenin.
- WCOT (Wall Coated Open Tubular) – u těchto kolon je stěna přímo pokryta vrstvou kapalné stacionární fáze, která tvoří tenký film o tloušťce 0,05–3  $\mu\text{m}$ .

- SCOT (Support Coated Open Tubular) – tento typ kolon obsahuje velmi tenkou vrstvu pevného podkladu, který je potažený kapalnou stacionární fází. SCOT kolony pojmu více kapalnou fázi a mají vyšší kapacitu pro vzorek než WCOT kolony. [48]

Optimalizace separace v plynové chromatografii vyžaduje jemné doladění řady proměnných a jejich interakcí. Proces separace ovlivňují jak fyzikální (teplota a rychlost proudění), tak parametrické (vnitřní průměr, délka a stacionární fáze) proměnné kolony. Mnoho kapilárních kolon má vnitřní průměry 250–320  $\mu\text{m}$ . Tyto vnitřní průměry představují kompromis mezi rozlišením, rychlostí, kapacitou vzorku a snadnou obsluhou. Čím delší je kolona, tím více má teoretických pater a umožňuje lepší separaci. [48]

### 3.1.2 Detektory

Úlohou detektorů v plynové chromatografii je produkovat měřitelný signál v reakci na jednotlivé složky eluované z chromatografické kolony. Některé detektory jsou citlivé pouze na konkrétní typy chemických sloučenin, zatímco jiné jsou považovány za univerzální, protože jsou schopné detekovat téměř všechny sloučeniny. Detektory se také liší v mezích detekce. Obecně platí, že čím selektivnější je detektor, tím větší je jeho citlivost. Pro aplikaci v plynové chromatografii je k dispozici celá řada detektorů. [49]

#### 3.1.2.1 Plamenový ionizační detektor

Plamenový ionizační detektor (FID) je jedním z nejpoužívanějších detektorů pro plynovou chromatografii. Poskytuje téměř univerzální odezvu na organické sloučeniny, nízké detekční limity, dlouhodobou stabilitu, jednoduchost ovládání, rychlou odezvu a široký lineární rozsah odezvy. Sloučeniny obsahující jediný atom uhlíku vázaný na kyslík nebo síru (např.  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CS}_2$ ,  $\text{COS}$ ), anorganické plyny (např.  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SO}_2$ ), formamid a kyselina mravenčí poskytují slabou nebo nevýznamnou detekční reakci. Látky, které nelze spálit, není možné tímto typem detektoru detekovat, jedná se např. o vodu nebo vzácné plyny. Jako nosný plyn lze využít například helium, argon, vodík nebo dusík. Sloučeniny, které se eluují z chromatografické kolony, vstupují do detektoru, kde jsou spáleny vodíkovým plamínkem a při jejich spalování vznikají ionty. Ty putují do prostoru, kde jsou umístěny dvě elektrody, na které je vloženo stejnosměrné napětí. Jak ionty pronikají do prostoru mezi dvěma elektrodami, je vytvořen a detekován proud. Pokud z kolony nevychází žádné složky, neměly by se tvořit žádné ionty, a tedy ani proud. Nepatrné nečistoty v nosném plynu mohou však mít za následek velmi nízkou hodnotu proudu i v případě, že procházející nosný plyn neobsahuje žádnou eluovanou složku. Při spalování dochází k produkci vodní páry, proto musí být teplota FID nastavena

dostatečně vysoko, aby nedocházelo ke kondenzaci. Obvykle se využívá teplota 250 °C a vyšší. [49; 50]

### **3.1.2.2 Tepelně vodivostní detektor**

Tepelně vodivostní detektor je univerzální a nedestruktivní detekční systém. Detektor obsahuje vlákno, které je žhavené stálým elektrickým proudem. Vlákno je protékajícím nosným plynem ochlazováno na určitou teplotu. Detektor reaguje na určité rozdíly v tepelné vodivosti nosného plynu, které jsou způsobené přítomností eluované složky. V praxi bývají vedle sebe zapojovány dva tyto detektory, kdy přes jedno vlákno proudí pouze čistý nosný plyn a přes druhé prochází plyn vycházející z kolony. S rozvojem ionizačních detekčních systémů, které nabízejí zejména lepší detekovatelnost pro použití s kapilárními kolonami, byl tepelně vodivostní detektor z velké části nahrazen ionizačními detektory. Tento detektor ale stále zůstává jako nejpohodlnější a nejlevnější pro méně náročné analýzy. [44; 51; 52]

### **3.1.2.3 Detektor elektronového záchytu**

Detektor elektronového záchytu (ECD) je selektivní ionizační detektor, který je citlivý na elektronegativní atomy. Sloučeniny obsahující atomy halogenu nebo nitroskupiny, některé organokovové sloučeniny a určité konjugované sloučeniny mají silnou detekční odezvu a v příznivých případech je lze detekovat při stopové koncentraci. Na druhé straně sloučeniny s nízkou afinitou k elektronům, například uhlovodíky, alkoholy, fenoly, aminy, alifatické aldehydy, ketony, ethery a estery, sotva registrují odezvu při normálních koncentracích. Detektor elektronového záchytu je druhým nejčastěji používaným ionizačním detektorem v plynové chromatografii. Za svou popularitu vděčí své citlivosti na širokou škálu ekologicky důležitých a biologicky aktivních sloučenin. Mezi běžné aplikace patří stanovení pesticidů v životním prostředí nebo také stanovení léčiv a hormonů v biologických kapalinách. Detektor se skládá z malé komory se dvěma rovnoběžnými elektrodami a radioaktivního zdroje, obvykle  $^{63}\text{Ni}$ , který je umístěn blízko katody, aby ionizoval nosný plyn (dusík, argon), a tím dochází ke vzniku konstantního proudu. Obsahuje-li nosný plyn složku s velkou elektronovou afinitou, dochází k pohlcení některých energeticky chudých elektronů. Nově vzniklé záporně nabitě částice mají ve srovnání s volnými elektrony nižší pohyblivost, a je tedy vyšší pravděpodobnost jejich srážky s kladně nabitými částicemi. Rekombinací dojde ke snížení celkového počtu negativních částic, a tím i ke snížení hodnoty ionizačního proudu. [50; 53; 54]

### 3.2 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je klíčovou technikou pro kvalitativní chemickou analýzu. Mezi důvody, díky kterým je právě hmotnostní spektrometrie natolik využívaná, patří citlivost, selektivita, možnost charakterizace sloučenin na základě jejich molekulové hmotnosti a také možnost kombinace hmotnostní spektrometrie s chromatografií. Plynové nebo kapalinové chromatografy slouží pro rozdělení složitých směsí chemických sloučenin, které jsou následně detekovány a rozpoznávány pomocí hmotnostního spektrometru. Jednotlivé oddělené složky z původní směsi unášené proudem nosného plynu jsou přiváděny do iontového zdroje. Úkolem iontového zdroje je poskytnutí potřebné energie k ionizaci molekul analytu, přičemž je nutné udržovat dostatečně vysokou teplotu, aby se zabránilo kondenzaci analytu. Běžně se využívají především dva typy ionizace, a to elektronová a chemická. Odpařené analyty jsou tedy ionizovány za vzniku molekulárních a/nebo fragmentových iontů, které jsou na základě poměru  $m/z$  rozděleny pomocí hmotnostního analyzátoru a detekovány. Mezi využívané hmotnostní analyzátory patří například kvadrupólový a magnetický analyzátor, iontová past nebo analyzátor doby letu. Detektory používané v hmotnostní spektrometrii musí mít rychlou odezvu, využívá se například fotonásobič. Výsledné hmotnostní spektrum je zobrazeno jako graf relativní intenzity těchto iontů proti jejich poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). [55–57]

Pro hmotnostní spektrometrii mají z vlastností sloučenin největší hodnotu těkavost, polarita molekuly a molekulová hmotnost.

- plyny, těkavé a částečně těkavé sloučeniny – u těchto sloučenin se využívá spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, elektronová ionizace a kvadrupólový hmotnostní analyzátor. Ve většině případů je identifikace těkavých sloučenin spolehlivá, hlavně díky využití elektronové ionizace, která umožňuje porovnávání získaných hmotnostních spekter s rozsáhlými knihovny spekter.
- netěkavé nízkomolekulární látky – v této třídě sloučenin lze některé polární analyty derivatizovat na odpovídající těkavé analyty, které je možné analyzovat pomocí GC-MS metody. [57]

### 3.3 Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivitu u rostlinných materiálů ovlivňuje hlavně jejich složení, které je více či méně ovlivněno místem růstu rostliny, dobou sklizně, úpravou rostlinného materiálu nebo metodou extrakce. Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů závisí především na obsahu

terpenoidů, mezi kterými mají silnou antimikrobiální aktivitu např. thymol nebo karvakrol. Terpenové alkoholy (např. geraniol, citronellol a linalool) a estery (např. linalyl acetát) vykazují slabší antimikrobiální aktivitu. Existuje několik různých metod pro testování antimikrobiální aktivity rostlin a jejich jednotlivých složek. V současné době se k hodnocení antimikrobiální aktivity přírodních sloučenin běžně používají agarové difúzní metody, např. disková difúzní metoda a difúzní jamková metoda. Disková difúzní metoda však není kvantitativní, což znamená, že neposkytuje data o minimální inhibiční koncentraci (MIC), což je nejnižší koncentrace dané složky, která zcela inhibuje růst bakterií. [58; 59]

Dále byla týmem prof. Kokošky a kol. navržena nová metoda pro jednoduché a současně rychlé stanovení antibakteriálního potenciálu rostlinných těkavých látek současně v kapalně a plynné fázi v několika různých koncentracích. Jedná se o bujonovou mikrodiluční volatilizační metodu, která se provádí ve standardní 96jamkové mikrotitrační destičce. Do každé jamky se napipetuje příslušné množství bujonu a následně se přidá určité množství upraveného vzorku a bakteriální suspenze. Vzorky těkavých sloučenin jsou rozpuštěny v 1% dimethylsulfoxidu a zředěny pomocí vhodného média. Pro jednotlivé vzorky sloučenin se udělá 7 dvojkově zředěných koncentrací. Na destičku se také připravují pozitivní a negativní kontroly (naočkovaný a nenačkovaný bujon). Destičky se nechávají inkubovat 24 hodin při teplotě 37 °C a po uplynutí doby inkubace se minimální inhibiční koncentrace hodnotí vizuálně podle změny zbarvení MTT barviva (methyl-triazolyl-tetrazolium bromid) ze žluté na fialovou. [60]

### **3.3.1 Agarové metody**

#### **3.3.1.1 Disková difúzní metoda**

Disková difúzní metoda slouží k určení, zda je daný mikroorganismus na testované antibiotikum citlivý, nebo rezistentní. Prvním krokem je příprava bakteriální suspenze s hustotou přibližně  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml, což odpovídá zákalu 0,5 na McFarlandově stupnici. Následně připravenou suspenzi naočkujeme na agar na Petriho misce pomocí vatového tampónku nebo pipetou. Pomocí speciálního sterilního dávkovače na agar přiklademe disky napuštěné testovanou antimikrobiální látkou. Jako kontrola se využívají ATB disky – disky napuštěné daným antibiotikem. Celé Petriho misky necháme inkubovat. Inkubace se provádí nejčastěji při 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí doby inkubace se změří průměry inhibičních zón a výsledek se porovná se standardními hodnotami. Porovnáním určíme, zda je mikroorganismus na daný rostlinný materiál méně či více citlivý v porovnání se standardními

antibiotiky. Obdobou je také difúzní jamková metoda. Rozdíl je v tom, že u této metody se nevyužívají disky. Média naočkovaná testovanými mikroorganismy se rozdělí do Petriho misek. Následně jsou do agarů na Petriho miskách asepticky pomocí sterilního korkového vrtáku proraženy otvory. Do vzniklé jamky je následně zaveden definovaný objem antimikrobiálního činidla. Po kultivaci se opět změří znatelná zóna inhibice růstu kolem jednotlivých jamek. [58; 61; 62]

### **3.3.1.2 Agarová diluční metoda**

Mezi agarové metody patří také agarová diluční metoda, při které se stanovuje minimální inhibiční koncentrace. Obvykle se využívá Mueller-Hinton agar, který je obohacený o sériová ředění testované antimikrobiální látky. Připravený agar se rozdělí do Petriho misek a nechá se předsušit. Následně se na povrch předsušeného agaru aplikuje inokulum vyšetřované bakterie formou spotů pomocí speciálního vzorkovače. Výhodou této metody je, že na jedné Petriho misce můžeme naráz testovat až 20 různých kmenů bakterií. Vyšetřované kmeny bakterií naočkujeme vždy na všechny připravené koncentrace testované antimikrobiální látky. Jednotlivé misky necháme kultivovat a poté odečteme hodnotu minimální inhibiční koncentrace – nejnižší testovanou koncentraci dané antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů. [63; 64]

### **3.3.1.3 Metoda antimikrobiálního gradientu**

Metoda difúze antimikrobiálního gradientu využívá princip stanovení antimikrobiálního koncentračního gradientu v agarovém médiu jako prostředek pro stanovení citlivosti. Mezi tyto metody se řadí Etest, jehož provedení je naznačené na **Obrázku 11**. Při tomto testu se využívají tenké plastové testovací proužky. Ty jsou na spodní straně impregnovány suchým koncentračním gradientem antimikrobiálního činidla a na horní ploše je stupnice koncentrace. Na povrch vhodně velké agarové destičky (15 cm), která byla naočkovaná suspenzí vyšetřovaného mikroorganismu, může být umístěno radiálně až 5 nebo 6 proužků. Po jejich přiložení na agarovou plotnu dochází k aktivaci antimikrobiálního činidla a jeho uvolňování do agaru. Po inkubaci se testy odečtou pozorováním proužků z horní části destičky. Minimální inhibiční koncentrace je stanovena jako průsečík eliptické inhibiční zóny s testovacím proužkem. [65; 66]





**Obrázek 11** Příklad provedení Etestu [65]

### **3.3.2 Testování citlivosti na antimikrobiální látky pomocí průtokové cytometrie**

Průtoková cytometrie (FC) umožňuje sledovat morfologii, fyziologickou a metabolickou aktivitu a také životaschopnost mikroorganismů po jejich vystavení antimikrobiálním látkám. Měří optické a fluorescenční charakteristiky jednotlivých buněk. Tato metoda je založena na detekci fluorescenčního signálu. Pro sledování požadovaného znaku se využívají fluorescenčně značené protilátky. Označené buňky procházejí zdrojem světla a fluorescenční molekuly jsou vybudeny do vyšších energetických stavů. Po návratu do základní energetické hladiny fluorochromy emitují světelnou energii. [67; 68]

### **3.4 Stanovení antioxidační aktivity**

Některé potraviny rostlinného původu mají vedle své nutriční a energetické hodnoty také důležitou roli jako zdroj antioxidantů. K přírodním látkám s antioxidačními účinky jsou řazeny antioxidační vitamíny C, E a karotenoidy. Stále mnohem větší význam je však přikládán dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám, mezi které patří např. flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína a aromatické a léčivé rostliny. Bylo také prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitamínů. [69] V dostupných studiích jsou popisovány také antioxidační vlastnosti esenciálních olejů

získaných z různých rostlinných materiálů – např. z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*), máty peprné (*Mentha piperita*), rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) nebo z černuchy seté (*Nigella sativa*). [70–72]

Stanovení antioxidační aktivity esenciálních olejů z levandule lékařské, kajeputu střídavolistého, bergamotu a máty peprné popisují ve své studii **Mariia Kokina** a kol. [72]. Antioxidační aktivita byla stanovena za použití DPPH a ABTS<sup>•+</sup> radikálů, u kterých dochází k redukci v přítomnosti antioxidantu. Redukce radikálu vede k následnému poklesu absorbance. Jako standard byl využit Trolox a výsledky jsou vyjádřeny v mmol ekvivalentu Troloxu na litr esenciálního oleje. Všechny zkoumané esenciální oleje byly schopny redukovat volné DPPH a ABTS<sup>•+</sup> radikály před i po skladování. Porovnáním hodnot stanovených testem DPPH bylo zjištěno, že největší antioxidační aktivitu z čerstvých olejů vykazoval olej z máty peprné (23,3 mmol/l), následoval levandulový olej (18,9 mmol/l), bergamotový olej (17,0 mmol/l) a nejnižší aktivitu vykazoval kajeputový olej (7,6 mmol/l). Největší antioxidační aktivitu vůči kation-radikálu ABTS<sup>•+</sup> vykazoval opět mátový olej, následně kajeputový, bergamotový a nejnižší aktivitu vůči tomuto radikálu vykazoval levandulový esenciální olej. Esenciální olej z kajeputu byl tedy mnohem účinnější při neutralizaci kation-radikálu ABTS<sup>•+</sup>. Bylo pozorováno kolísání dat antioxidační aktivity esenciálních olejů v závislosti na použitém testu, což může být způsobeno specifickými interakcemi složek oleje s volnými radikály. V této studii je také uvedeno, že rozdíly v antioxidační síle vyplývají z přítomnosti sloučenin s konjugovanými dvojnými vazbami a také jejich celkového obsahu v esenciálních olejích. Antioxidační aktivita je tedy velmi závislá na složení esenciálního oleje. [72]

Při stanovení antioxidační aktivity se využívá řada antioxidantů, které slouží jako reference. Syntetická látka Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2karboxylová kyselina), ve vodě rozpustný analog vitamínu E, získal jednoznačné postavení jako reference při testování antioxidační aktivity. Využívá se především kvůli jeho účinnosti v lipofilních i hydrofilních systémech. [73]

### 3.4.1 Metoda FRAP

Tato metoda je založena na principu redoxní reakce. Čerstvě připravené činidlo FRAP (ferric reducing antioxidant potential) se smíchá s testovaným vzorkem nebo methanolem, který se využívá pro slepý pokus. Pracovní roztoky testovaných sloučenin se připravují v methanolovém prostředí. Činidlo FRAP se skládá z roztoku TPTZ (tripirydyltriazin) v HCl,

roztoku  $\text{FeCl}_3$  a z acetátového pufru, pH celého roztoku je 3,6. Při této metodě látky s antioxidačními účinky redukují z vyšetřovaného vzorku komplex  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (tripirydyltriazinželezitý). Probíhající reakce je sledována pomocí spektrofotometru při absorpčním maximu – 593 nm. Nárůst absorbance, který odpovídá množství komplexu  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (tripirydyltriazinželeznatý), je mírou antioxidační aktivity vzorku. Ze získaných hodnot se vytvoří kalibrační závislost, ze které se určí příslušná hodnota FRAP. [69; 73; 74]

### 3.4.2 Metoda Folin-Ciocalteu

Tato metoda se využívá k určení celkového obsahu polyfenolických sloučenin. Stanovení je založeno na reakci s činidlem dle Folin-Ciocalteua, které má žluté zbarvení (kyselý roztok fosforečnanu molybdenového a wolframového). Ze zásobního roztoku kyseliny gallové, která se při této metodě využívá jako standard, se připraví kalibrační řada roztoků o různých koncentracích. Do zkumavek se následně pipetuje definovaný objem vzorku, kalibračního roztoku nebo slepého pokusu. Dále se přidá etanol, destilovaná voda a činidlo dle Folin-Ciocalteua a zkumavky se nechají určitou dobu odstát. Následuje přidání uhličitanu sodného a zkumavky se nechají opět určitý čas odstát. Po uplynutí doby reakce se proměří absorbance roztoků při 765 nm proti slepému pokusu. Získané výsledky se vyjadřují jako ekvivalent kyseliny gallové. [73]

### 3.4.3 Metoda používají DPPH

Tato metoda je považována za jednu ze základních metod pro posouzení antioxidační aktivity látek. Dochází při ní k reakci mezi testovanou látkou a stabilním radikálem DPPH (difenylpikrylhydrazyl), který je redukován za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Pokles koncentrace DPPH radikálu, který má za následek pokles absorbance, je monitorována při 516 nm. Tuto metodu je možné provádět také na mikrotitračních destičkách. Probíhající reakci je možné sledovat i metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – HPLC. Použití detekce HPLC, při které je hodnocen pík radikálu DPPH, je vhodné především u barevných vzorků. V tomto případě se na rozdíl od spektrofotometrie zbarvení vzorku eliminuje. Metoda používající DPPH radikál se nemusí využívat pouze pro hodnocení antioxidační aktivity čistých látek, lze ji také využít pro různé směsné vzorky, u kterých se antioxidační aktivita někdy vyjadřuje v ekvivalentech kyseliny askorbové nebo v jednotkách standardu Troloxu. Podobnou modifikací je kombinace testu se separací látek ze směsi metodou HPLC. V tomto případě látky rozdělené na koloně reagují kontinuálně s DPPH a spektrofotometricky se detekuje pík radikálu. [69; 73]

#### 3.4.4 Metoda ORAC

Při této metodě dochází k reakci stanovované antioxidační látky s roztokem fluoresceinu nebo se také využívá  $\beta$ -fykoerytrin ( $\beta$ -PE). Jedná se o fluorescenční metodu. V testovaném systému se generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo úplně zastavit radikálovou reakci. Pro generaci peroxylových radikálů se používá AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid). Provádí se také slepý pokus, při kterém se k roztoku fluoresceinu přidává pouze fosfátový pufr pro kontrolní odečet. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence  $\beta$ -PE po kontaktu s radikály. [69; 73]

#### 3.4.5 Metoda TEAC

Metoda stanovení ekvivalentní antioxidační kapacity Troloxu (TEAC) byla vyvinuta jako jednoduchá a pohodlná metoda pro stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC). Při stanovení se měří schopnost antioxidantů zachytit stabilní radikální kation, modrozelený chromofor s maximální absorpcí při 734 nm, který snižuje svoji intenzitu v přítomnosti antioxidantů. Antioxidanty mohou neutralizovat radikálový kationt generovaný z ABTS buď přímou redukcí prostřednictvím darování elektronů, nebo prostřednictvím darování atomu vodíku. Rovnováha těchto dvou mechanismů je obecně určena antioxidační strukturou a pH média. Rozsah zabarvení modrozelené barvy, kvantifikovaný jako pokles absorbance při 734 nm, závisí na délce reakce, vnitřní antioxidační aktivitě a také na koncentraci ve vzorku. Dříve se při TEAC testu využíval methemoglobin a peroxid vodíku ke generování přechodného radikálu ferrylmyoglobinu, který poté reagoval s ABTS za vzniku kation-radikálu  $ABTS^{\cdot+}$ . Oxidační činidlo bylo později nahrazeno peroxidem nebo persíranem. Persíran draselný je nejčastěji používaným oxidačním činidlem pro generování kation-radikálu  $ABTS^{\cdot+}$ . Výsledky získané tímto testem se uvádějí jako ekvivalenty syntetické látky Troloxu. [75]

## II EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4 INSTRUMENTÁLNÍ ANALÝZA

#### 4.1 Chemikálie

- destilovaná voda
- *n*-hexan od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- standard uhlovodíků C8-C40 od firmy Restek (Bellefonte, PA, USA)
- koncentrovaná kyselina sírová H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96% od firmy PENTA (Chrudim, Česká republika)
- bezvodý síran sodný od firmy PENTA (Chrudim, Česká republika)

#### 4.2 Přístroje

- aparatura pro hydrodestilaci – aparatura typu Clevenger od firmy Kavalierglass (Praha, Česká republika)
- pH metr 420A od firmy ORION (Montreal, Kanada), dodavatel Fisher Scientific, spol. s r.o. (Pardubice, Česká republika)
- magnetická míchačka s ohřevem od firmy IKA (Staufen, Německo), model RCT basic
- topné hnízdo LTHS 2000 od firmy Brněnská Drutěva (Brno, Česká republika)
- laboratorní váhy od firmy KERN & SOHN GmbH (Balingen, Německo)
- analytické laboratorní váhy HR-120 od firmy ADInstruments Ltd (Dunedin, Nový Zéland)
- autosampler COMBI PAL od firmy CTC ANALYTICS GmbH (Zwingen, Švýcarsko)
- plynový chromatograf GC-2010 s hmotnostním detektorem MS-QP2010 od firmy Shimadzu (Kjóto, Japonsko)
- plynový chromatograf GC-2010 s plamenově ionizačním detektorem od firmy Shimadzu (Kjóto, Japonsko)

#### 4.3 Pomůcky

- stříčka s destilovanou vodou
- magnetické míchadélko
- laboratorní kádinky různých objemů
- násypka
- varné kamínky

- uzavíratelné vialky z hnědého skla pro skladování oleje
- pipety
- mikrostříkačka
- odměrný válec 500 ml
- vialky pro analýzu oleje, víčka se septem

## 4.4 Rostlinný materiál

Pro získání esenciálního oleje v této práci byly využity sušené květy levandule, dodané firmou MEDIAN s.r.o. (Dolní Libchavy, Česká republika), šarže 251119/12, které nebyly před extrakcí žádným způsobem upravované. Květy pocházely z levandule pěstované v Polsku.

### 4.4.1 Podmínky a postup hydrodestilace

Pro získávání esenciálního oleje z levandulových květů byla využita hydrodestilace. Aparatura byla sestavena tak, jak je ukázáno na **Obrázku 12**. Do destilační baňky o objemu 2000 ml bylo naváženo cca 50 g rostlinného materiálu a přidáno 500 ml destilované vody a varné kamínky. Směs rostlinného materiálu a vody byla zahřívána pomocí topného hnízda a těkavé složky spolu s vodní parou přecházely přes chladič, kde docházelo k jejich kondenzaci. Dále postupovaly do sběrného místa aparatury, kde se usazoval esenciální olej spolu s vodou. V této části docházelo i k oddělení samotného esenciálního oleje od vody – esenciální olej zůstával na povrchu. Destilace probíhala do té doby, dokud přibýval esenciální olej (cca 4 hodiny). Po ukončení destilace byl esenciální olej oddělen od vodné fáze, převeden do skleněné vialky, zvážen a následně byla stopová vlhkost odstraněna bezvodým síranem sodným. Poté byl olej skladován v lednici při 4 °C do doby následné analýzy. Při dalších destilacích bylo pomocí 96% kyseliny sírové upraveno pH destilované vody na hodnoty 4,58; 3,63; 2,59 a 1,64 a byl opakován celý výše popsáný postup. Pro každou hodnotu pH byla destilace provedena dvakrát.



**Obrázek 12** Aparatura využitá pro získání esenciálních olejů

Před samotnou analýzou byly získané vzorky esenciálních olejů ředěny pomocí *n*-hexanu, a to tak, že 10  $\mu$ l esenciálního oleje bylo naředěno 1 ml *n*-hexanu. Vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem (GC-MS) a plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID).

#### **4.4.2 Analýza pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí**

Analýza GC-MS metodou byla provedena pro stanovení kvalitativních znaků vzorků esenciálních olejů. Jako nosný plyn bylo při analýze využito helium, jehož lineární rychlost byla po celou dobu analýzy konstantní – 30 cm/s. V chromatografu byla umístěna kapilární kolona SLB-5MS od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA) o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce vnitřního filmu 0,25  $\mu$ m. Pro separaci látek byl využit teplotní program. Teplota na počátku byla nastavena na 40  $^{\circ}$ C po dobu 3 minut, poté se zvyšovala na 250  $^{\circ}$ C rychlostí 2  $^{\circ}$ C za minutu a tato teplota byla udržována po dobu 10 minut. Jedna analýza tedy trvala 118 minut. Teplota nástřiku byla nastavena na hodnotu 200  $^{\circ}$ C a splitovací poměr na 1:50. Pomocí autosampleru byl dávkován vždy 1  $\mu$ l příslušného vzorku. Teplota interface (převodníku do MS) byla 200  $^{\circ}$ C a stejně tak i teplota iontového zdroje. V hmotnostním detektoru byla ionizace provedena elektronovou ionizací s ionizační energií 70 eV. Dále byl nastaven SCAN mód a snímány byly všechny ionty v rozmezí 33–450 m/z. Solvent cut time

byl nastaven na 7 min. od samotného nadávkování vzorku, což znamená, že detekce iontů začala až od 7. minuty.

#### 4.4.3 Analýza plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem

Analýza GC-FID metodou byla provedena pro stanovení kvantitativních znaků získaných esenciálních olejů. Při analýze byly na plynovém chromatografu využity stejné podmínky i stejná kolona (SLB-5MS) jako při metodě GC-MS. Teplota nástřiku byla 200 °C, dávkován byl opět 1 µl příslušného vzorku pomocí autosampleru a splitovací poměr byl 1:50. Na detektoru byla nastavena teplota na 270 °C. Nosným plynem bylo v tomto případě také helium.

#### 4.4.4 Vyhodnocení naměřených dat

Na obou metodách GC-MS a GC-FID byla nejprve proměřena směs *n*-alkanů. Ta byla analyzována za stejných podmínek, při kterých probíhala následná analýza získaných esenciálních olejů. Tato směs byla proměřena kvůli výpočtům retenčních indexů jednotlivých látek, které se vypočítávají na základně retenčních časů *n*-alkanů. Při měření byl využit teplotní program, tudíž se retenční indexy separovaných látek počítaly podle vztahu van den Doola a Kratze (**Rovnice 1**). Pro výpočet byly využity naměřené retenční časy *n*-alkanů a jednotlivých separovaných látek.

**Rovnice 1** Výpočet retenčního indexu analyzované složky podle vztahu van den Doola a Kratze

$$RI_x = 100 \cdot n + 100(t_x - t_n)/(t_{n+1} - t_n)$$

- RI<sub>x</sub>    retenční index analyzované složky
- n        počet atomů uhlíku v nejbližším nižším *n*-alkanu
- t<sub>x</sub>      retenční čas analyzované složky
- t<sub>n</sub>      retenční čas nejbližšího nižšího *n*-alkanu
- t<sub>n+1</sub>    retenční čas nejbližšího vyššího *n*-alkanu

Kvalitativní složení získaných esenciálních olejů bylo určeno na základě vyhodnocení jednotlivých GC-MS chromatogramů. Naměřená hmotnostní spektra byla porovnána s knihovnými hmotnostními spektry a podle tohoto srovnání a zároveň porovnáním vypočteného retenčního indexu látky s publikovanými daty byla provedena identifikace



jednotlivých složek. Pro porovnání hmotnostních spekter byly využity konkrétně knihovny FFNSC (Mass Spectra of Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds), NIST11 a NIST11s (National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Database).

Kvantitativní složení vzorků bylo určeno vyhodnocením jednotlivých GC-FID chromatografů. Podle vztahu van den Doola a Kratze byly vypočteny retenční indexy jednotlivých sloučenin. Porovnáním těchto retenčních indexů a retenčních indexů z metody GC-MS byly k jednotlivým identifikovaným sloučeninám přiřazeny odpovídající plochy píků. Následně bylo vypočteno relativní zastoupení jednotlivých složek esenciálního oleje jako procento celkové plochy píků v chromatogramu.

## 5 HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ

### 5.1 Chemikálie

- Mueller-Hinton (MH) bujon od firmy HiMedia (Bombaj, Indie), dodavatel CADERSKY-ENVITEK (Brno, Česká republika)
- Mueller-Hinton (MH) agar od firmy HiMedia (Bombaj, Indie), dodavatel CADERSKY-ENVITEK (Brno, Česká republika)
- Dimethylsulfoxid od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Tris báze od firmy HiMedia (Bombaj, Indie), dodavatel CADERSKY-ENVITEK (Brno, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková 35% od firmy PENTA (Chrudim, Česká republika)
- NaCl, KCl od firmy PENTA (Chrudim, Česká republika)
- barvivo MTT 98% od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- antibiotikum ampilicin od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)

### 5.2 Pomůcky

- sterilní mikrotitrační destičky typ č. 31396 + víčka
- svorky
- dřevěné destičky
- automatické pipety, vícekanálová pipeta
- sterilní Petriho misky
- sterilní pomůcky – jednorázové očkovací kličky, špičky
- skleněné zkumavky
- eppendorf zkumavky
- laboratorní láhve se šroubovacím uzávěrem 250 ml, 100 ml

### 5.3 Přístroje

- laboratorní váhy od firmy KERN & SOHN GmbH (Balingen, Německo)
- analytické laboratorní váhy HR-120 od firmy ADInstruments Ltd (Dunedin, Nový Zéland)
- vortex Vornado™ mini od firmy Benchmark Scientific (Edison, USA)
- McFarland denzitometr od firmy Biosan (Riga, Lotyšsko)
- autokláv Sterilab od firmy BMT (Praha, Česká republika)
- laboratorní termostat od firmy POL-EKO APARATURA (Wodzisław Śląski, Polsko)

## **5.4 Postup stanovení antimikrobiální aktivity levandulových olejů**

### **5.4.1 Příprava pufru**

Pufr byl při stanovení antimikrobiální aktivity esenciálních olejů využit pro zajištění stabilních podmínek. Při přípravě bylo naváženo 8 g NaCl, 0,2 g KCl a 6,1 g Tris báze, odměřeno 1000 ml destilované vody a všechny tyto komponenty byly smíchány. Následně bylo pomocí 35% kyseliny chlorovodíkové upraveno pH tohoto roztoku na konečnou hodnotu 7,6 a roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C 15 minut.

### **5.4.2 Příprava agarů a bujonů**

Jako kultivační a testovací médium byl využit Mueller-Hinton agar a bujon. Agar i bujon byly připraveny podle příslušných návodů. U MH agarů bylo naváženo 3,8 g práškové směsi a smícháno se 100 ml destilované vody. Při přípravě MH bujonů bylo naváženo 5,25 g a smícháno s 250 ml destilované vody a 5,25 g bylo smícháno s 250 ml připraveného pufru. Všechny tyto směsi byly důkladně promíchány a sterilizovány v autoklávu 15 minut při 121 °C.

### **5.4.3 Příprava bakteriální suspenze**

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly vybrány 4 gramnegativní a 4 grampozitivní bakterie. Z gramnegativních byly zvoleny následující bakterie – *Escherichia coli* CCM 2024, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961, *Klebsiella pneumoniae* NPK12 a *Serratia marcescens* CCM 303. Z grampozitivních byly zvoleny *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Streptococcus pyogenes* NPK01 a *Bacillus subtilis* CCM 2215. Všechny standardní kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM), Brno, Česká republika. U ostatních bakterií se jedná o klinický izolát. Bakterie byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně byly připraveny bakteriální suspenze s hustotou přibližně  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml, což odpovídá zákalu 0,5 na McFarlandově stupnici.

### **5.4.4 Vzorky**

Jako vzorky byly využity vydestilované levandulové esenciální oleje, které byly upraveny následujícím způsobem: z olejů destilovaných při stejných hodnotách pH vody byl připraven pro tento experiment vždy 1 průměrný vzorek, z každého vzorku byly naváženy cca 2  $\mu$ l a poté bylo přidáno odpovídající množství 1% DMSO (dimethylsulfoxid) a následně byly vzorky zředěny pomocí pufrovaného MH bujonu na požadovanou počáteční koncentraci 1024  $\mu$ g/ml.

#### 5.4.5 Antibiotikum

Jako srovnávací antibiotikum byl zvolen ampicilin. Byl připraven zásobní roztok tohoto antibiotika o koncentraci 400 µg/ml, který byl následně pomocí pufrovaného MH bujonu zředěn na požadovanou počáteční koncentraci 4 µg/ml.

#### 5.4.6 Barvivo MTT

Barvivo MTT bylo použito k určení hodnot MIC u jednotlivých olejů. Zásobní roztok barviva o koncentraci 600 µg/ml byl připraven rozpuštěním sypké směsi v odpovídajícím množství sterilní destilované vody.

#### 5.4.7 Postup zaočkování mikrotitračních destiček

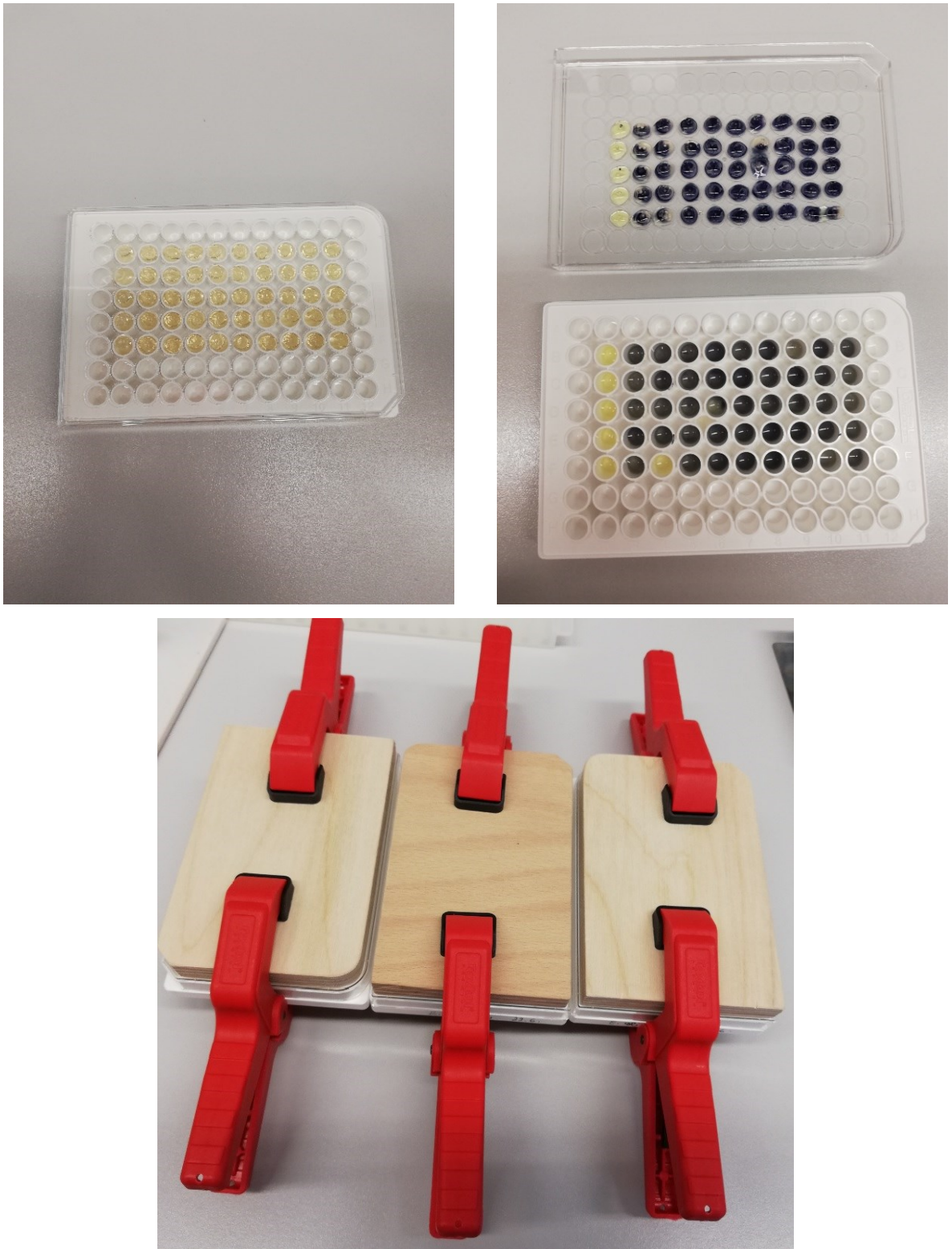
Pro stanovení antimikrobiální aktivity v plynné a kapalně fázi esenciálních olejů byla využita bujonová mikrodiluční volatilizační metoda. Stanovení bylo provedeno v 96jamkových mikrotitračních destičkách, které lze využít pro testování až 6 vzorků. Objem každé jamky je 400 µl. V našem případě bylo testováno 5 vzorků na každé destičce. Okrajové jamky byly ponechány prázdné, aby se zabránilo okrajovému efektu. V první části experimentu bylo připraveno testování parní fáze esenciálních olejů. Na víčko destičky do každého terčíku bylo napipetováno 5 µl připravené bakteriální suspenze a následně 30 µl MH agaru. Dále bylo připraveno testování kapalně fáze olejů, podle schématu uvedeného v **Tabulce 4**. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl pufrovaného bujonu, s výjimkou sloupečku pro nejvyšší koncentraci vzorků a jamky pro nejvyšší koncentraci antibiotika. Do těchto jamek bylo napipetováno 200 µl příslušného vzorku, respektive antibiotika. Pro každý esenciální olej bylo připraveno v řadě 7 dvojkově zředěných koncentrací počínaje od koncentrace 1024 µg/ml. Současně byly připraveny kontroly čistoty (pouze pufrovaný bujon) a růstu (pufrovaný bujon a bakteriální suspenze) do prvních dvou sloupečků. V posledním sloupečku bylo připraveno 6 dvojkově zředěných koncentrací srovnávacího antibiotika. Následně byly všechny jamky, s výjimkou sloupečku pro kontrolu čistoty, naočkovány 10 µl bakteriální suspenze. Po zaočkování byla mikrotitrační destička přikryta víčkem a utěsněna pomocí dřevěných destiček a 2 svorek. Destičky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Pro každou bakterii byl opakován tento postup ve třech provedeních. Na **Obrázku 13** je k vidění zaočkováná mikrotitrační destička; destička po kultivaci a po přidání MTT barviva a také destičky s dřevěnými deskami a svorkami připravené ke kultivaci.

### 5.4.8 Vyhodnocení výsledků

Po inkubaci bylo přidáno barvivo MTT a bakteriální růst byl zhodnocen vizuálně. Do každé jamky a na každý terčík víčka bylo napipetováno 25  $\mu\text{l}$  barviva, které barví modro-fialově pouze živé buňky. Žlutě zbarvené jamky tedy obsahovaly usmrčené buňky a modré jamky buňky živé. Minimální inhibiční koncentrace byly stanoveny jako nejnižší koncentrace, které inhibovaly viditelný růst bakterií (tedy koncentrace poslední žlutě zbarvené jamky/agaru), a vyjádřeny v  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tabulka 4** Schéma zaočkování mikrotitrační destičky

	kontrola čistoty	kontrola růstu	EO5 1024 $\mu\text{g/ml}$	EO5 512 $\mu\text{g/ml}$	EO5 256 $\mu\text{g/ml}$	EO5 128 $\mu\text{g/ml}$	EO5 64 $\mu\text{g/ml}$	EO5 32 $\mu\text{g/ml}$	EO5 16 $\mu\text{g/ml}$	ATB 4 $\mu\text{g/ml}$	
	kontrola čistoty	kontrola růstu	EO4 1024 $\mu\text{g/ml}$	EO4 512 $\mu\text{g/ml}$	EO4 256 $\mu\text{g/ml}$	EO4 128 $\mu\text{g/ml}$	EO4 64 $\mu\text{g/ml}$	EO4 32 $\mu\text{g/ml}$	EO4 16 $\mu\text{g/ml}$	ATB 2 $\mu\text{g/ml}$	
	kontrola čistoty	kontrola růstu	EO3 1024 $\mu\text{g/ml}$	EO3 512 $\mu\text{g/ml}$	EO3 256 $\mu\text{g/ml}$	EO3 128 $\mu\text{g/ml}$	EO3 64 $\mu\text{g/ml}$	EO3 32 $\mu\text{g/ml}$	EO3 16 $\mu\text{g/ml}$	ATB 1 $\mu\text{g/ml}$	
	kontrola čistoty	kontrola růstu	EO2 1024 $\mu\text{g/ml}$	EO2 512 $\mu\text{g/ml}$	EO2 256 $\mu\text{g/ml}$	EO2 128 $\mu\text{g/ml}$	EO2 64 $\mu\text{g/ml}$	EO2 32 $\mu\text{g/ml}$	EO2 16 $\mu\text{g/ml}$	ATB 0,5 $\mu\text{g/ml}$	
	kontrola čistoty	kontrola růstu	EO1 1024 $\mu\text{g/ml}$	EO1 512 $\mu\text{g/ml}$	EO1 256 $\mu\text{g/ml}$	EO1 128 $\mu\text{g/ml}$	EO1 64 $\mu\text{g/ml}$	EO1 32 $\mu\text{g/ml}$	EO1 16 $\mu\text{g/ml}$	ATB 0,25 $\mu\text{g/ml}$	



**Obrázek 13** Mikrotitrační destičky využívané při stanovování antimikrobiální aktivity olejů: vlevo nahoře je zobrazena zaočkovaná mikrotitrační destička; vpravo nahoře destička po kultivaci a po přidání MTT barviva a dole jsou destičky s dřevěnými deskami a svorkami připravené ke kultivaci

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 6.1 Složení vydestilovaných levandulových esenciálních olejů

U oleje získaného při pH destilované vody (EO5) byla výtěžnost 0,348 g/50 g vzorku, tj. 0,69 %; výtěžnost oleje při pH vody 4,58 (EO4) byla 0,410 g/50 g vzorku, tj. 0,81 %; výtěžnost oleje při pH vody 3,63 (EO3) byla 0,375 g/50 g vzorku, tj. 0,75 %; výtěžnost oleje při pH vody 2,59 (EO2) byla 0,390 g/50 g vzorku, tj. 0,78 % a výtěžnost oleje při pH vody 1,64 (EO1) byla 0,393 g/50 g vzorku, tj. 0,78 %. Procentuální výtěžnosti jednotlivých olejů jsou shrnuty v **Tabulce 5**. Ze získaných výsledků je viditelné, že při pH destilované vody byla výtěžnost získaného esenciálního oleje nejnižší a snížením hodnot pH se výtěžnost zvýšila. Nejvyšší výtěžnost byla u oleje získaného při hodnotě pH vody 4,58. Snížením pH vody se výtěžnost zvýšila o 9–17 %.

**Tabulka 5** Procentuální výtěžnosti jednotlivých esenciálních olejů při různých hodnotách pH vody

	výtěžnost [%]	pH vody
<b>EO5</b>	0,69 %	5,6
<b>EO4</b>	0,81 %	4,58
<b>EO3</b>	0,75 %	3,63
<b>EO2</b>	0,78 %	2,59
<b>EO1</b>	0,78 %	1,64

V získaných levandulových olejích bylo identifikováno celkem 70 sloučenin, což odpovídá 95,29; 95,68; 96,48; 95,99, respektive 94,98 % celkové plochy. Identifikované sloučeniny a jejich relativní zastoupení v jednotlivých olejích je uvedeno v **Tabulce 6**, ke které se váže **Obrázek 14**. Podstatnou část olejů tvoří terpeny (monoterpeny, seskviterpeny) a jejich kyslíkaté deriváty terpenoidy (monoterpenoidy, seskviterpenoidy).

Hlavní složky esenciálního oleje EO5 byly linalool (38,55 %), linalyl acetát (6,60 %),  $\alpha$ -terpineol (6,31 %), borneol (4,77 %), *cis*-linalool oxid (4,18 %), lavandulyl acetát (3,13 %), eukalyptol (2,82 %), terpinen-4-ol (2,81 %), *trans*-linalool oxid (2,50 %) a karyofylen oxid (1,85 %).

Hlavní složky esenciálního oleje EO4 byly linalool (41,28 %), linalyl acetát (5,98 %), borneol (5,05 %),  $\alpha$ -terpineol (4,47 %), *cis*-linalool oxid (4,00 %), terpinen-4-ol (3,04 %), lavandulyl acetát (2,92 %), eukalyptol (2,88 %), karyofylen oxid (2,68 %) a *trans*-linalool oxid (2,63 %).

Hlavní složky esenciálního oleje EO3 byly linalool (42,26 %), linalyl acetát (6,57 %),  $\alpha$ -terpineol (4,59 %), borneol (5,08 %), *cis*-linalool oxid (3,44 %), lavandulyl acetát (3,04 %), eukalyptol (3,01 %), terpinen-4-ol (2,89 %), karyofylen oxid (2,60 %), *trans*-linalool oxid (2,54 %).

Hlavní složky esenciálního oleje EO2 byly linalool (41,54 %), linalyl acetát (6,43 %),  $\alpha$ -terpineol (5,00 %), borneol (4,99 %), *cis*-linalool oxid (3,67 %), lavandulyl acetát (3,01 %), eukalyptol (2,90 %), terpinen-4-ol (2,87 %), karyofylen oxid (2,43 %) a *trans*-linalool oxid (2,28 %).

Hlavní složky esenciálního oleje EO1 byly linalool (37,30 %),  $\alpha$ -terpineol (8,08 %), linalyl acetát (6,00 %), borneol (4,76 %), *cis*-linalool oxid (4,24 %), lavandulyl acetát (2,97 %), eukalyptol (2,89 %), terpinen-4-ol (2,82%), *trans*-linalool oxid (2,48 %) a krypton (1,61 %).



**Tabulka 6** Identifikované sloučeniny v olejích získaných hydrodestilací při různých hodnotách pH vody a jejich relativní zastoupení

název sloučeniny	zařazení terpenových sloučenin dle struktury	CAS číslo	retenční index	zastoupení složky [%] pH 5,6	zastoupení složky [%] pH 4,58	zastoupení složky [%] pH 3,63	zastoupení složky [%] pH 2,59	zastoupení složky [%] pH 1,64
<b>MONOTERPENY</b>								
tricyclen	tricyklický	508-32-7	919	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
$\alpha$ -thujen	bicyklický	2867-05-2	923	0,03	0,04	0,03	0,03	0,01
$\alpha$ -pinen	bicyklický	80-56-8	930	0,31	0,31	0,31	0,31	0,30
kamfen	bicyklický	79-92-5	945	0,46	0,47	0,48	0,47	0,46
2,4(10)-thujadien	bicyklický	36262-09-6	950	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
$\beta$ -pinen	bicyklický	127-91-3	973	0,23	0,28	0,29	0,28	0,16
$\beta$ -myrcen	alifatický	123-35-3	988	0,97	0,80	0,83	0,85	1,10
$\delta$ -3-karen	bicyklický	13466-78-9	1006	0,04	0,04	0,04	0,04	0,06
<i>m</i> -cymen	monocyklický	99-87-6	1017	0,13	0,12	0,13	0,13	0,13
<i>p</i> -cymen	monocyklický	99-87-6	1022	0,63	0,52	0,52	0,52	0,75
limonen	monocyklický	138-86-3	1027	0,67	0,55	0,58	0,58	0,76
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimen	alifatický	3779-61-1	1035	0,49	0,46	0,44	0,46	0,54
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimen	alifatický	3779-61-1	1046	0,63	0,53	0,55	0,57	0,67
$\gamma$ -terpinen	monocyklický	99-85-4	1056	0,18	0,13	0,13	0,14	0,21
terpinolen	monocyklický	586-62-9	1083	0,26	0,13	0,01	0,15	0,34
<i>p</i> -cymenen	monocyklický	1195-32-0	1088	0,20	0,05	0,05	0,07	0,33
1,3,8- <i>p</i> -menthatrien	monocyklický	18368-95-1	1128	0,20	0,10	0,10	0,10	0,26

**Tabulka 6** Identifikované sloučeniny v olejích získaných hydrodestilací při různých hodnotách pH vody a jejich relativní zastoupení – pokračování

název sloučeniny	zařazení terpenových sloučenin dle struktury	CAS číslo	retenční index	zastoupení složky [%] pH 5,6	zastoupení složky [%] pH 4,58	zastoupení složky [%] pH 3,63	zastoupení složky [%] pH 2,59	zastoupení složky [%] pH 1,64
<b>MONOTERPENOIDY</b>								
<i>cis</i> -dehydroxylinalool oxid	alifatický	54750-69-5	1004	0,28	0,13	0,13	0,15	0,43
eukalyptol	bicyklický	470-82-6	1029	2,82	2,88	3,01	2,90	2,89
<i>cis</i> -linalool oxid	alifatický	5989-33-3	1069	4,18	4,00	3,44	3,67	4,24
<i>trans</i> -linalool oxid	alifatický	34995-77-2	1085	2,50	2,63	2,54	2,28	2,48
<b>linalool</b>	<b>alifatický</b>	<b>78-70-6</b>	<b>1100</b>	<b>38,55</b>	<b>41,28</b>	<b>42,26</b>	<b>41,54</b>	<b>37,30</b>
<i>cis</i> - <i>p</i> -menth-2-en-1-ol	monocyklický	29803-82-5	1122	0,07	0,11	0,11	0,10	0,04
$\alpha$ -kampholenal	monocyklický	4501-58-0	1124	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02
nopinon	bicyklický	24903-95-5	1136	0,07	0,09	0,09	0,08	0,06
<i>trans</i> -pinokarveol	bicyklický	547-61-5	1138	0,26	0,28	0,29	0,28	0,25
kafr	bicyklický	76-22-2	1143	0,97	1,02	1,06	1,00	0,94
nerol oxid	alifatický	1786-08-9	1151	0,50	0,37	0,36	0,38	0,63
pinokarvon	bicyklický	30460-92-5	1159	0,10	0,10	0,11	0,10	0,10
lavandulol	alifatický	58461-27-1	1164	0,97	1,19	1,02	1,00	1,03
borneol	bicyklický	507-70-0	1169	4,77	5,05	5,08	4,99	4,76
isogeranial	alifatický	41720-62-1	1174	0,11	0,14	0,10	0,11	0,11
terpinen-4-ol	monocyklický	562-74-3	1178	2,81	3,04	2,89	2,87	2,82

**Tabulka 6** Identifikované sloučeniny v olejích získaných hydrodestilací při různých hodnotách pH vody a jejich relativní zastoupení – pokračování

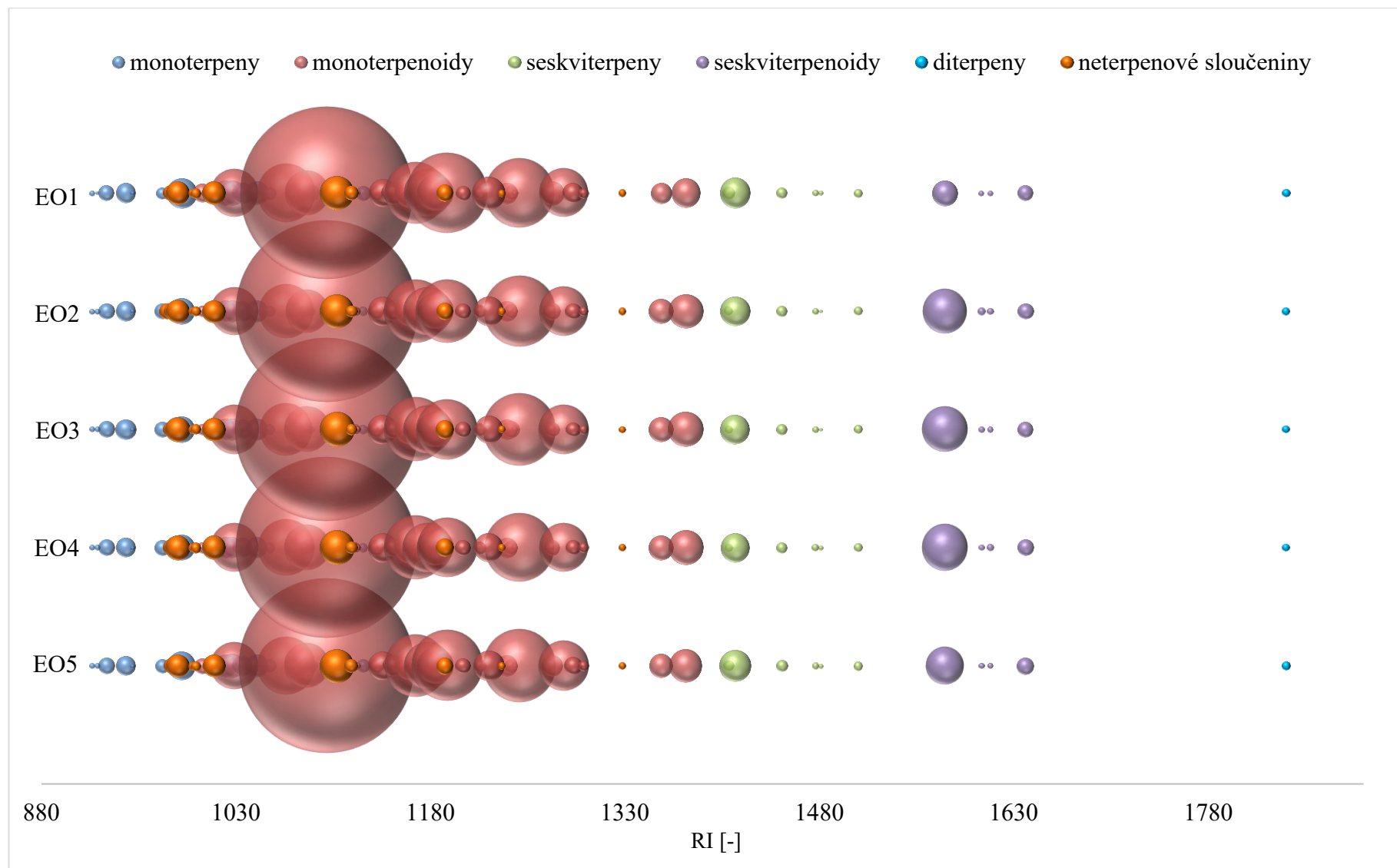
název sloučeniny	zařazení terpenových sloučenin dle struktury	CAS číslo	retenční index	zastoupení složky [%] pH 5,6	zastoupení složky [%] pH 4,58	zastoupení složky [%] pH 3,63	zastoupení složky [%] pH 2,59	zastoupení složky [%] pH 1,64
krypton	monocyklický	500-02-7	1184	1,63	1,66	1,61	1,66	1,61
<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	<b>monocyklický</b>	<b>98-55-5</b>	<b>1193</b>	<b>6,31</b>	<b>4,47</b>	<b>4,59</b>	<b>5,00</b>	<b>8,08</b>
verbenon	bicyklický	80-57-9	1205	0,27	0,30	0,29	0,28	0,25
<i>trans</i> -karveol	monocyklický	1197-07-5	1218	0,18	0,19	0,18	0,19	0,18
nerol	alifatický	106-25-2	1225	1,15	1,01	0,93	1,05	1,34
kuminaldehyd	monocyklický	122-03-2	1239	0,51	0,50	0,50	0,50	0,52
karvon	monocyklický	99-49-0	1242	0,23	0,23	0,37	0,23	0,24
kar-3-en-2-on	bicyklický	53585-45-8	1245	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
<b>linalyl acetát</b>	<b>alifatický</b>	<b>115-95-7</b>	<b>1249</b>	<b>6,60</b>	<b>5,98</b>	<b>6,57</b>	<b>6,43</b>	<b>6,00</b>
phellandral	monocyklický	21391-98-0	1274	0,51	0,27	0,25	0,34	0,70
lavandulyl acetát	alifatický	25905-14-0	1283	3,13	2,92	3,04	3,01	2,97
<i>p</i> -cymen-7-ol	monocyklický	536-60-7	1290	0,38	0,26	0,25	0,29	0,48
karvakrol	monocyklický	499-75-2	1298	0,12	0,12	0,10	0,11	0,12
neryl acetát	alifatický	141-12-8	1358	0,66	0,73	0,75	0,74	0,52
geranyl acetát	alifatický	105-87-3	1377	1,32	1,47	1,50	1,48	1,02
<b>SESKVITERPENY</b>								
<i>cis</i> - $\alpha$ -bergamoten	bicyklický	18252-46-5	1410	0,13	0,07	0,07	0,08	0,17
<i>cis</i> -karyofylen	bicyklický	13877-93-5	1415	1,22	1,03	1,05	1,09	1,12

**Tabulka 6** Identifikované sloučeniny v olejích získaných hydrodestilací při různých hodnotách pH vody a jejich relativní zastoupení – pokračování

název sloučeniny	zařazení terpenových sloučenin dle struktury	CAS číslo	retenční index	zastoupení složky [%] pH 5,6	zastoupení složky [%] pH 4,58	zastoupení složky [%] pH 3,63	zastoupení složky [%] pH 2,59	zastoupení složky [%] pH 1,64
<i>trans</i> - $\beta$ -farnesen	alifatický	18794-84-8	1451	0,15	0,13	0,13	0,13	0,14
germakren D	alifatický	23986-74-5	1477	0,05	0,06	0,05	0,05	0,04
<i>trans</i> - $\beta$ -bergamoten	bicyklický	15438-94-5	1481	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02
$\gamma$ -kadinen	bicyklický	39029-41-9	1510	0,10	0,08	0,09	0,08	0,08
<b>SESKVITERPENOIDY</b>								
karyofylen oxid	bicyklický	1139-30-6	1577	1,85	2,68	2,60	2,43	0,80
humulen epoxid II	bicyklický	19888-34-7	1605	0,04	0,04	0,04	0,06	0,03
di-epi-1,10-kubenol	bicyklický	73365-77-2	1612	0,04	0,05	0,04	0,05	0,03
epi- $\alpha$ -cadinol	bicyklický	5937-11-1	1639	0,33	0,31	0,29	0,31	0,28
<b>DITERPENY</b>								
fyton	alifatický	68607-88-5	1840	0,09	0,06	0,06	0,06	0,07
<b>NETERPENOVÉ SLOUČENINY</b>								
1-octen-3-on		4312-99-6	977	0,03	0,04	0,04	0,28	0,03
1-octen-3-ol		3391-86-4	980	0,25	0,31	0,30	0,29	0,30
3-octanon		106-68-3	985	0,64	0,74	0,72	0,66	0,68
butylbutyrát		109-21-7	996	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
3-octanol		589-98-0	999	0,10	0,13	0,12	0,12	0,12

**Tabulka 6** Identifikované sloučeniny v olejích získaných hydrodestilací při různých hodnotách pH vody a jejich relativní zastoupení – pokračování

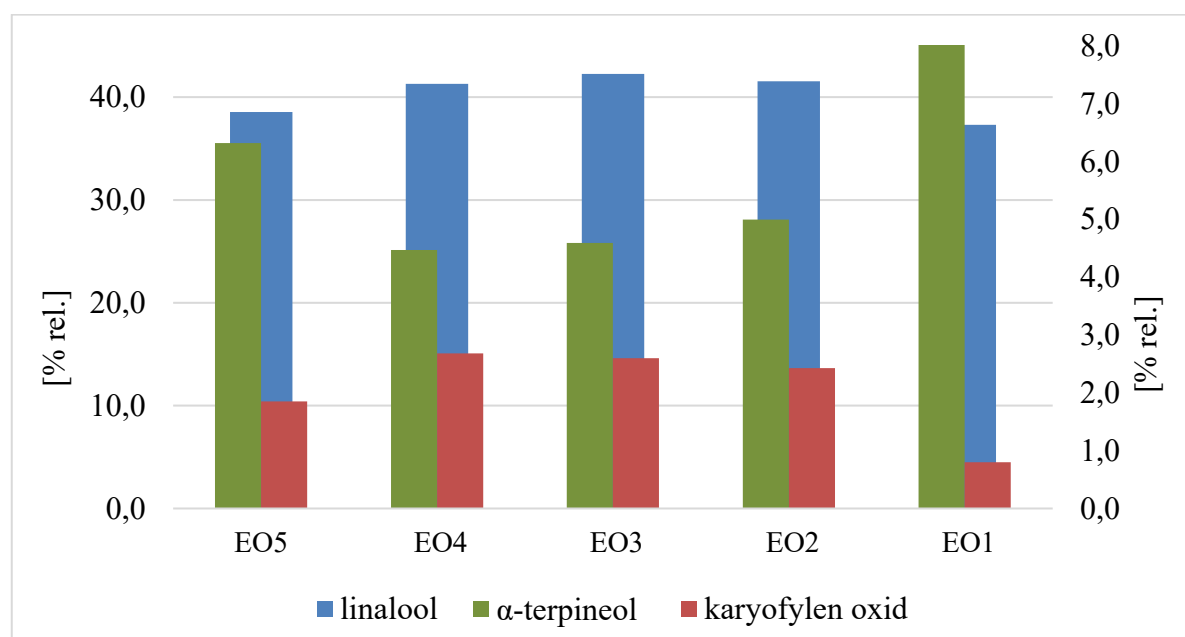
název sloučeniny	zařazení terpenových sloučenin dle struktury	CAS číslo	retenční index	zastoupení	zastoupení	zastoupení	zastoupení	zastoupení
				složky [%] pH 5,6	složky [%] pH 4,58	složky [%] pH 3,63	složky [%] pH 2,59	složky [%] pH 1,64
hexyl acetát		142-92-7	1013	0,61	0,67	0,66	0,62	0,65
1-octen-3-yl acetát		2442-10-6	1108	1,42	1,48	1,48	1,43	1,40
3-octanol acetát		4864-61-3	1119	0,20	0,16	0,15	0,16	0,24
<i>n</i> -hexyl butyrát		2639-63-6	1191	0,34	0,37	0,38	0,34	0,34
hexyl isovalerát		10032-13-0	1235	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05
hexyl tiglate		16930-96-4	1328	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06



**Obrázek 14** Zastoupení jednotlivých tříd identifikovaných v olejích získaných hydrodestilací při různých hodnotách pH vody

Sloučeniny lišící se nejvýrazněji relativním zastoupením v jednotlivých olejích jsou  $\alpha$ -terpineol (4,47–8,1 %), linalool (37,3–42,3 %) a karyofylen oxid (0,8–2,7 %), jejichž relativní zastoupení v jednotlivých olejích je ukázáno na **Obrázku 15**. Zastoupení linaloolu a  $\alpha$ -terpineolu má mezi sebou jistou souvislost. Linalyl acetát během hydrodestilace podléhá hydrolyze a dochází ke vzniku odpovídající kyseliny a alkoholu – linaloolu. Linalool se při hydrodestilaci transformuje na  $\alpha$ -terpineol (**Obrázek 3**). Ten dále přechází na eukalyptol, jak je naznačeno na schématu na **Obrázku 4**. V zastoupení eukalyptolu se jednotlivé oleje mezi sebou na první pohled nijak významně neliší. Při sečtení relativního zastoupení těchto 3 zmíněných složek (linalool,  $\alpha$ -terpineol a eukalyptol) bylo zjištěno, že u olejů EO1–EO4 jsou výsledná čísla o 1–2 % vyšší, než je suma u oleje EO5. Může se tedy jednat o sloučeniny pocházející buď z linalyl acetátu (linalyl acetát-linalool- $\alpha$ -terpineol-eukalyptol), nebo z linaloolu uvolněného právě kyselou hydrolyzou, případně kombinace obou těchto možností. Relativní zastoupení těchto složek naznačuje, že by se mohlo jednat právě o kombinaci těchto dvou možností, protože úbytek linalyl acetátu v olejích EO1–EO4 nepokryje v součtu nárůst linaloolu,  $\alpha$ -terpineolu a eukalyptolu.

Další sloučeninou lišící se obsahem v jednotlivých olejích je seskviterpenoid karyofylen oxid. Nejvyšší množství této složky bylo nalezeno v oleji EO4 (2,68 %) a nejnižší v oleji EO1 (0,80 %). Je tedy pravděpodobné, že u karyofylen oxidu při hydrodestilaci může docházet k jistým transformacím, které nejvíce podpořilo nejnižší z testovaných hodnot pH vody.



**Obrázek 15** Sloučeniny lišící se relativním zastoupením v jednotlivých olejích. Relativnímu zastoupení linaloolu odpovídá hlavní osa, ostatní řady grafu jsou přiřazeny k ose vedlejší.

Dále během destilace může být linalyl acetát přeměněn allylovým přesmykem na geranyl acetát a neryl acetát a eliminací na acyklické monoterpenové uhlovodíky, jako jsou myrcen, *cis*- a *trans*-ocimen, jak ve své studii popisují **Kiran Babu** a **Bikram Singh** [16], ale také **Emma Jakab** a kol. [76]. Schéma popsané reakce je ukázáno na **Obrázku 5**. Všechny tyto sloučeniny byly nalezeny ve všech našich olejích. Při sečtení relativního zastoupení zmíněných acyklických monoterpenových uhlovodíků v jednotlivých olejích bylo zjištěno, že jejich suma je nejvyšší v oleji EO1 (2,31 %) a od oleje s nejnižším zastoupením těchto složek, což je EO4 (1,79 %), se tato hodnota liší o 0,52 %. Nejvyšší zastoupení geranyl acetátu a neryl acetátu bylo zjištěno v oleji EO3 (2,25 %) a naopak nejnižší v oleji EO1 (1,54 %). Tyto dvě sloučeniny se řadí mezi estery, které při destilaci podléhají hydrolyze, během které vznikají odpovídající alkoholy a kyseliny. Je tedy pravděpodobné, že nízká hodnota pH vody při destilaci EO1 podpořila hydrolyzu těchto esterů. V oleji EO1 bylo tedy nalezeno nejvyšší množství monoterpenových uhlovodíků ( $\beta$ -myrcen, *cis*- $\beta$ - a *trans*- $\beta$ -ocimen) a nejnižší množství geranyl a neryl acetátu ze všech našich olejů, jak je ukázáno v **Tabulce 7**. Suma produktů přeměny linalyl acetátu se v jednotlivých olejích nijak výrazně neliší, je tedy pravděpodobné, že změna pH vody má vliv spíše na různé transformace než na celkové relativní zastoupení těchto produktů.

Při přesmyku linalyl acetátu na neryl acetát je zapotřebí nerol. Schéma vzniku nerolu z linalyl acetátu je ukázáno na **Obrázku 6**. Pokud je v jednom oleji nerolu méně než dalších olejích, znamená to, že byl pravděpodobně spotřebován právě na vznik neryl acetátu, který je naopak v oleji přítomen ve větší míře než v olejích ostatních. Toto tvrzení bylo prokázáno i v našich olejích. V oleji, ve kterém bylo zjištěno nejvyšší množství neryl acetátu (EO3), je také zároveň nejnižší množství nerolu ze všech vzorků, protože právě nerol byl spotřebován na vznik neryl acetátu. Naopak u oleje s nejnižším obsahem neryl acetátu (EO1) je nerol zastoupen v nejvyšším množství ze všech olejů.

**Tabulka 7** Relativní zastoupení produktů přeměny linalyl acetátu během hydrodestilace v jednotlivých olejích

zastoupení produktů přeměny linalyl acetátu během hydrodestilace [% rel.]					
	EO5	EO4	EO3	EO2	EO1
<b><i><math>\beta</math>-myrcen, <i>cis</i>-<math>\beta</math>- a <i>trans</i>-<math>\beta</math>-ocimen</i></b>	2,09	1,79	1,82	1,88	2,31
<b>geranyl acetát, neryl acetát</b>	1,98	2,20	2,25	2,22	1,54
<b>suma</b>	4,07	3,99	4,07	4,10	3,85



Identifikované terpenové sloučeniny byly rozřazeny do jednotlivých tříd podle počtu isoprenových jednotek (**Tabulka 8, Obrázek 16**). Tím bylo zjištěno, že hlavní skupinu látek v olejích tvoří monoterpenoidy, a to konkrétně u EO5 82,04 %, EO4 82,21 %, EO3 83,47 %, EO2 82,80 %, respektive u EO1 82,13 %, z čehož vyplývá, že v zastoupení monoterpenoidů není mezi jednotlivými oleji žádný významný rozdíl. Z monoterpenoidů byly nejvíce zastoupeny alkoholy EO5 58,12 %, EO4 56,73 %, EO3 57,70 %, EO2 57,41 % a EO1 56,38 %, které byly následovány estery 11,72 %, 11,10 %, 11,86 %, 11,66 % a 10,51 % (**Tabulka 9, Obrázek 17**). Rozřazením monoterpenoidů podle dalšího kritéria, konkrétně podle struktury na alifatické, monocyklické a bi, tricyklické (**Tabulka 10, Obrázek 18**), bylo zjištěno, že u všech olejů se v nejvyšší míře vyskytují alifatické monoterpenoidy, následují monocyklické a nejmenší část tvoří bi, tricyklické monoterpenoidy.

Druhou nejvíce zastoupenou terpenovou třídou byly monoterpeny, v zastoupení EO5 5,46 %, EO4 4,75 %, EO3 4,55 %, EO2 4,74 % a EO1 6,14 % (**Tabulka 8, Obrázek 16**). Z této třídy u olejů EO5 a EO1 byly nejvíce zastoupeny monocyklické, zatímco u EO4, EO3 a EO2 alifatické monoterpeny. V zastoupení bi, tricyklických monoterpenů nebyly u olejů pozorovány prakticky žádné rozdíly (**Tabulka 11, Obrázek 19**).

U další třídy – seskviterpenů – nebyly mezi oleji žádné významné odlišnosti v relativním zastoupení. Na druhou stranu u zastoupení seskviterpenoidů byly nalezeny odchylky v zastoupení u EO5, který obsahoval pouze 1,13 % v porovnání s dalšími oleji, které obsahovaly alespoň 2 % (**Tabulka 8, Obrázek 16**).

Kvalita levandulových esenciálních olejů bývá určována podle obsahu linaloolu, linalyl acetátu a kafru. Uvádí se, že u pravé levandule musí být obsah kafru nižší než 0,5 %, což nesplňuje žádný námi získaný olej. Dále u olejů nejvyšší kvality má být obsah linalyl acetátu vyšší než obsah linaloolu, takovéto oleje jsou považovány za oleje s nejkrásnější vůní a jsou nejžádanějšími v aromaterapeutickém a kosmetickém průmyslu, ale ani toto žádný získaný olej nesplňuje. V olejích bylo nalezeno podstatně menší množství linalyl acetátu (6,0–6,6 %) oproti linaloolu (37,3–42,3 %). Takto nízké zastoupení linalyl acetátu může být způsobeno zvolenou metodou destilace. Uvádí se, že destilace vodní parou je obecně šetrnější pro získávání esenciálních olejů, a proto oleje získané touto metodou mohou mít vyšší obsah linalyl acetátu než oleje získané hydrodestilací. Další možnou příčinou je stáří rostlinného materiálu, který byl před samotnou destilací skladován cca 1 rok v temnu a suchu při

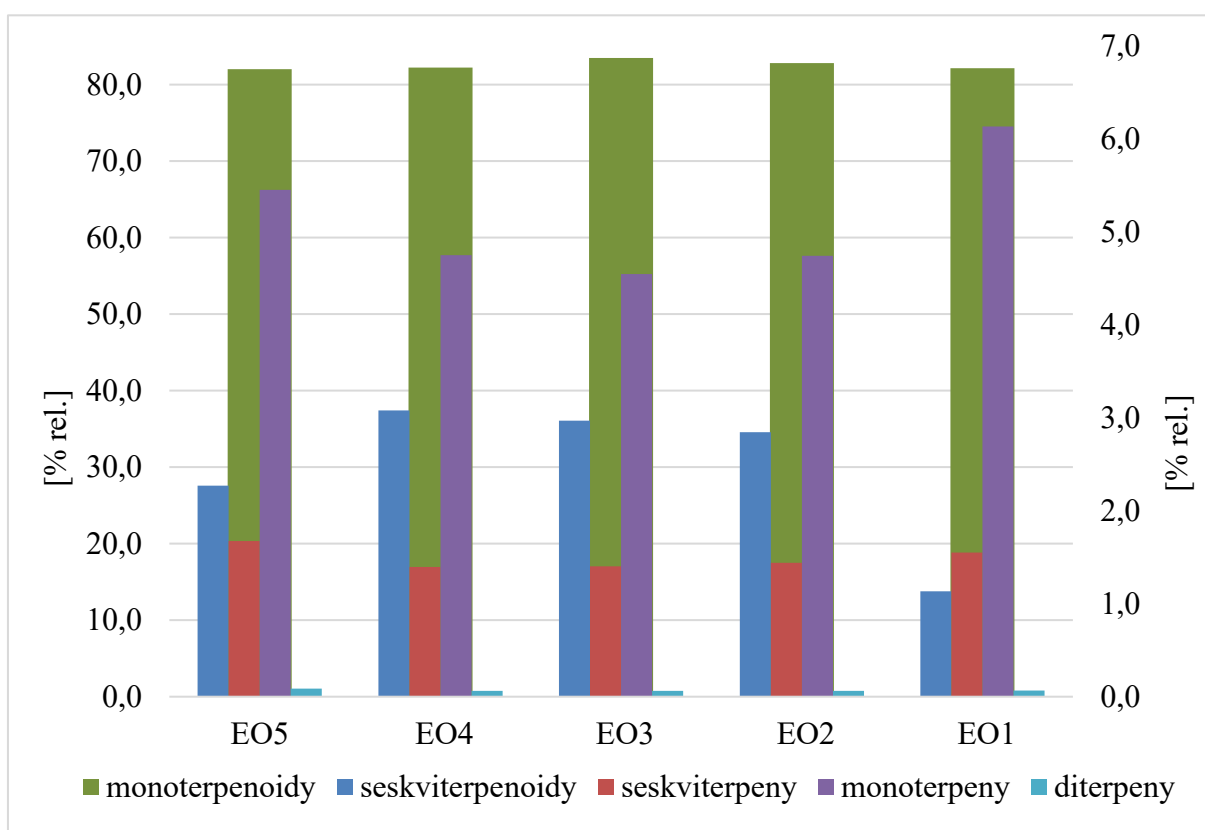
laboratorní teplotě, ale obecně bývá snaha, aby rostlinné materiály byly destilovány co nejdříve po sklizni právě kvůli riziku možných ztrát.

Z hlediska obsahu těchto sloučenin (linalool, linalyl acetát, kafr) nelze jednoznačně říct, který z našich olejů má nejvyšší kvalitu. V oleji, ve kterém bylo zjištěno nejvyšší množství linaloolu, bylo zároveň také nejvyšší množství kafru (EO3). V esenciálním oleji (EO1), ve kterém bylo kafru nejméně, byl také linalool zastoupen v nejnižším množství ze všech vzorků. Dále, jak již bylo zmíněno, nebyl v žádném z našich olejů obsah linalyl acetátu vyšší než obsah linaloolu a množství kafru nebylo nižší než 0,5 %. Získané oleje tedy z tohoto hlediska nelze řadit k esenciálním olejům nejvyšší kvality.

ISO norma 3515:2002 pro levandulové esenciální oleje, která byla vydaná Mezinárodní organizací pro normalizaci (ISO), stanovuje, jaké sloučeniny a také v jakém množství by měly být nalezeny v esenciálních olejích získaných z čerstvých květů levandule lékařské, které byly z rostlinného materiálu získány destilací vodní parou. Konkrétně se jedná o následující sloučeniny: limonen (max. 1 %), eukalyptol (max. 3 %),  $\beta$ -phellandren (max. 1 %), *cis*- $\beta$ -ocimen (1–10 %), *trans*- $\beta$ -ocimen (0,5–6 %), 3-octanon (max. 3 %), kafr (max. 1,5 %), linalool (20–43 %), linalyl acetát (25–45 %), lavandulol (max. 3 %), terpinen-4-ol (max. 8 %), lavandulyl acetát (max. 8 %) a  $\alpha$ -terpineol (max. 2 %). [77] Všechny tyto složky, kromě  $\beta$ -phellandrenu, byly nalezeny ve všech získaných olejích. Všechny EO splňují obsah následujících složek – limonen, 3-octanon, kafr, linalool, lavandulol, terpinen-4-ol, lavandulyl acetát a *trans*- $\beta$ -ocimen. Zastoupení linalyl acetátu, *cis*- $\beta$ -ocimenu a  $\alpha$ -terpineolu nezapadá ani v jenom EO do stanoveného rozmezí. EO3 jako jediný těsně nesplňuje relativní zastoupení eukalyptolu. Žádný z esenciálních olejů tedy nesplňuje požadavky ISO normy 3515:2002 pro levandulové esenciální oleje, a to především kvůli velmi nízkému obsahu linalyl acetátu a vysokému obsahu  $\alpha$ -terpineolu. Odlišnosti v obsahu těchto složek mohou být způsobeny typem destilační metody a také tím, že naše oleje nebyly destilovány z čerstvého rostlinného materiálu, nýbrž ze sušeného.

**Tabulka 8** Relativní zastoupení terpenů podle počtu isoprenových jednotek v jednotlivých olejích

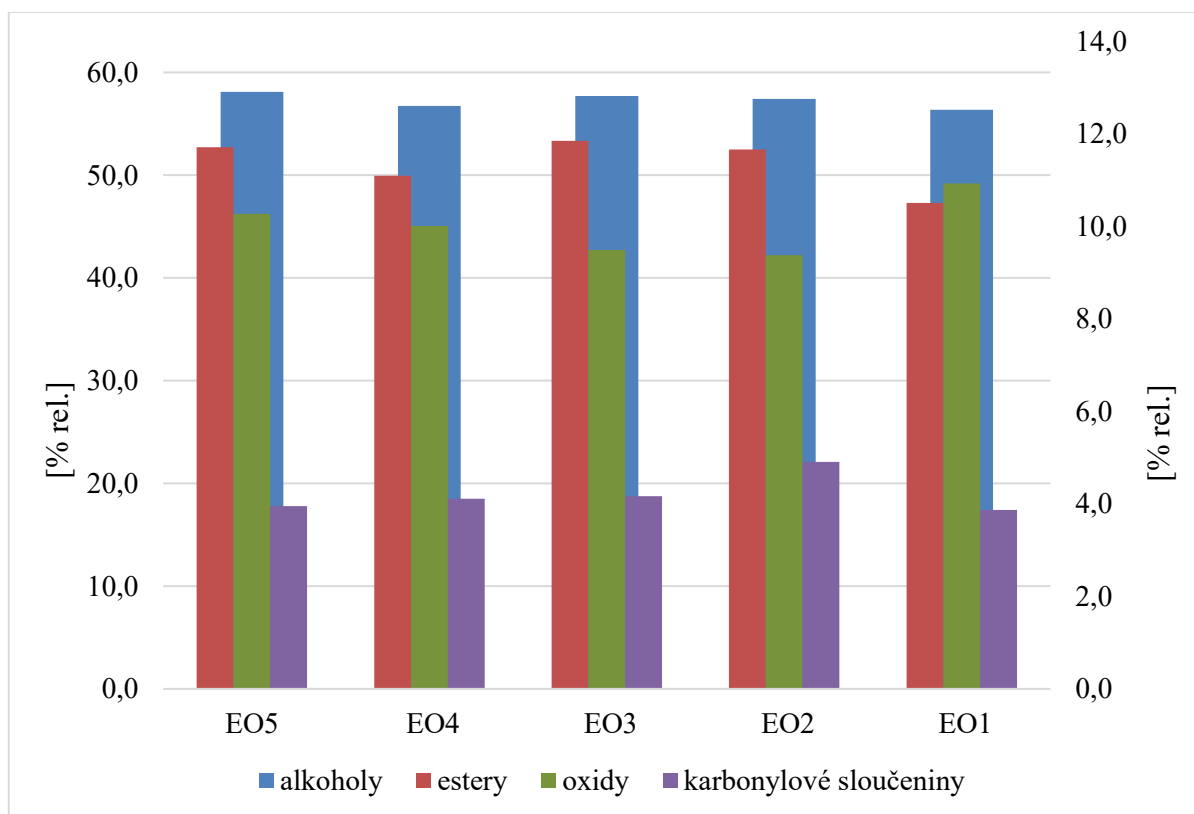
zastoupení terpenů podle počtu isoprenových jednotek [% rel.]					
	EO5	EO4	EO3	EO2	EO1
<b>monoterpeny</b>	5,46	4,75	4,55	4,74	6,14
<b>monoterpenoidy</b>	82,04	82,48	83,47	82,80	82,13
<b>sekviterpeny</b>	1,67	1,40	1,40	1,46	1,57
<b>seskviterpenoidy</b>	2,27	3,08	2,97	2,85	1,13
<b>diterpeny</b>	0,09	0,06	0,06	0,06	0,07



**Obrázek 16** Relativní zastoupení terpenů podle počtu isoprenových jednotek v jednotlivých olejích. Relativnímu zastoupení monoterpenoidů odpovídá hlavní osa, ostatní řady grafu jsou přiřazeny k ose vedlejší.

**Tabulka 9** Relativní zastoupení jednotlivých funkčních tříd monoterpenoidů v jednotlivých olejích

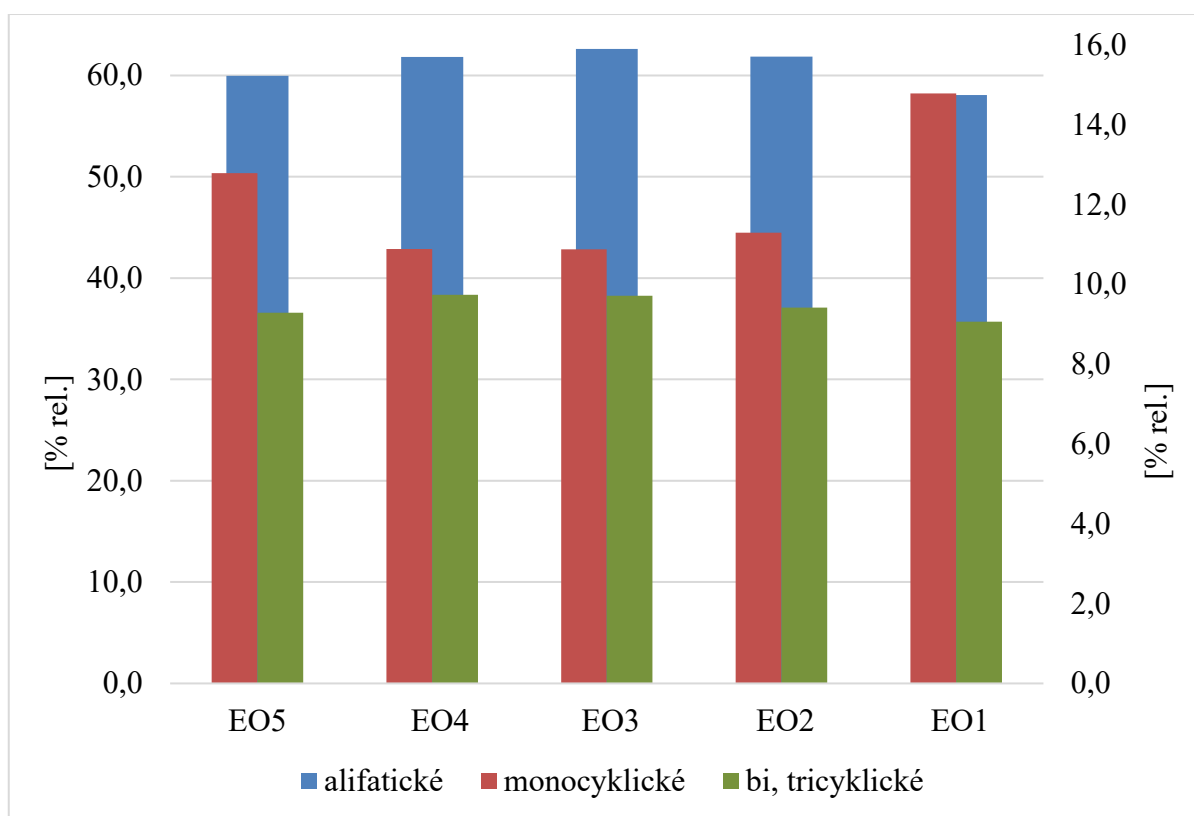
zastoupení jednotlivých funkčních tříd monoterpenoidů [% rel.]					
	EO5	EO4	EO3	EO2	EO1
<b>alkoholy</b>	58,12	56,73	57,70	57,41	56,38
<b>estery</b>	11,72	11,10	11,86	11,66	10,51
<b>oxidy</b>	10,28	10,01	9,49	9,38	10,68
<b>karbonylové sloučeniny</b>	3,77	4,09	4,02	4,08	3,94



**Obrázek 17** Relativní zastoupení jednotlivých funkčních tříd monoterpenoidů v jednotlivých olejích. Relativnímu zastoupení alkoholů odpovídá hlavní osa, ostatní řady grafu jsou přiřazeny k ose vedlejší.

**Tabulka 10** Relativní zastoupení monoterpenoidů podle struktury v jednotlivých olejích

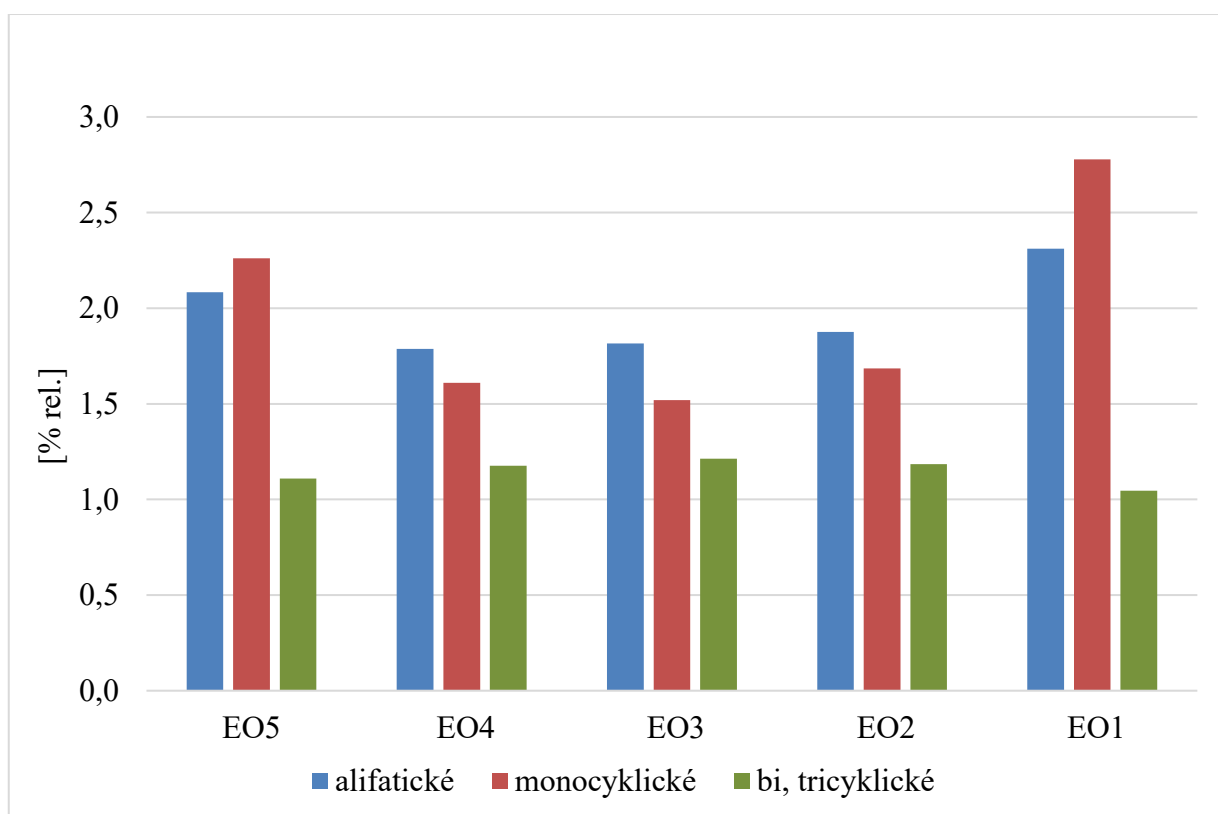
zastoupení monoterpenoidů podle struktury [% rel.]					
	EO5	EO4	EO3	EO2	EO1
<b>alifatické</b>	59,96	61,85	62,63	61,85	58,06
<b>monocyklické</b>	12,79	10,89	10,88	11,30	14,79
<b>bi, tricyklické</b>	9,29	9,74	9,71	9,42	9,07



**Obrázek 18** Relativní zastoupení monoterpenoidů podle struktury v jednotlivých olejích. Relativnímu zastoupení alifatických monoterpenoidů odpovídá hlavní osa, ostatní řady grafu jsou přiřazeny k ose vedlejší.

**Tabulka 11** Relativní zastoupení monoterpenů podle struktury v jednotlivých olejích

zastoupení monoterpenů podle struktury [% rel.]					
	EO1	EO2	EO3	EO4	EO5
<b>alifatické</b>	2,08	1,79	1,82	1,88	2,31
<b>monocyklické</b>	2,26	1,61	1,52	1,68	2,78
<b>bi, tricyklické</b>	1,11	1,18	1,21	1,18	1,05



**Obrázek 19** Relativní zastoupení monoterpenů podle struktury v jednotlivých olejích

## 6.2 Porovnání chemického složení získaných levandulových olejů s dostupnou literaturou

**B. Śmigielski** a kol. [78] ve své studii popisují složení esenciálního oleje z levandule lékařské (*L. angustifolia* Mill.), který byl získán ze sušených květů pomocí hydrodestilace. Pro tu bylo využito 60 g sušených květů a přibližně 1200 ml destilované vody a samotná destilace trvala 4 hodiny. V esenciálním oleji bylo identifikováno celkem 47 sloučenin, které odpovídaly 94,9 % celkové plochy. Výťažnost vzorku byla 1,21 g EO na 100 g sušeného materiálu. Mezi hlavní složky oleje patřily linalool (24,6 %), linalyl acetát (18,0 %), borneol (6,3 %),  $\alpha$ -terpineol (3,1 %), lavandulyl acetát (3,8 %), karyofylen oxid (5,0 %), *cis*-linalool oxid (2,5 %), *trans*-linalool oxid (1,6 %), krypton (2,3 %) a terpinen-4-ol (2,5 %). Hlavní skupinu látek tvořily kyslíkaté deriváty monoterpenů – monoterpenoidy, a to celkem 74,3 %, přičemž největší zastoupení z této skupiny měly monoterpenické alkoholy – 40,5 %. V našich olejích (EO5, EO4, EO3, EO2 a EO1) bylo identifikováno celkem 73 sloučenin. Hlavní skupinu látek tvořily také monoterpenoidy (v rozmezí 82,04–83,47 %) a stejně tak největší zastoupení z této skupiny měly monoterpenické alkoholy (56,73–58,12 %). Hlavní složkou námi získaných olejů byl stejně jako v této studii linalool, který ale byl zastoupen ve všech olejích ve větší míře. Relativní zastoupení u dalších hlavních složek bylo obdobné s výjimkou linalyl acetátu, kterého bylo v našich olejích nalezeno podstatně méně. [78]

**Mustafa Abdullah Yilmaz** [79] se ve svém článku věnuje složení esenciálních olejů získaných z různých částí rostliny *Lavandula x intermedia*, která pocházela z Turecka. Vzhledem k našemu vzorku se budeme věnovat esenciálnímu oleji získanému z čerstvých květů pomocí hydrodestilace. Pro tu byla využita aparatura typu Clevenger a samotná destilace trvala 2 hodiny. Následně byl esenciální olej vysušen bezvodým síranem sodným a uchován při 4 °C do doby analýzy. Mezi hlavní identifikované složky patřil linalool (43,86 %), linalyl acetát (9,37 %), eukalyptol (18,47 %), kafr (8,72 %), endo-borneol (0,68 %) a  $\alpha$ -terpineol (1,28 %). Ve srovnání s tímto olejem obsahují námi získané esenciální oleje podobné množství linaloolu. Linalyl acetátu bylo nalezeno přibližně o 3 procenta méně a podstatně méně bylo také nalezeno eukalyptolu a kafru. Vzhledem k tomu, že v této studii byla destilace prováděna pouze 2 hodiny, zatímco naše vzorky byly destilovány po dobu 4 hodin, může právě doba destilace být důvodem, proč jsou tyto složky zastoupeny v našich olejích v nižší koncentraci. Mnoho organických sloučenin má totiž tendenci se rozkládat při stálých vysokých teplotách. Další možnou příčinou je odlišný druh levandule. Relativní zastoupení eukalyptolu a kafru v našich olejích naznačuje, že se pravděpodobně jedná o oleje

získané z levandule lékařské, zatímco v této studii je popisován olej získaný z levandule prostřední neboli lavandinu. Na druhou stranu borneol a  $\alpha$ -terpineol měly ve všech našich vzorcích vyšší zastoupení. [79]

V následující studii se **Ram S. Verma** a kol. [80] věnují složení esenciálního oleje získaného z květenství levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* Mill.), která byla pěstována v Indii. Vzorek před extrakcí nebyl nijak upravován, jako extrakční metoda byla zvolena hydrodestilace v aparatuře typu Clevenger a destilace trvala 3 hodiny. Esenciální olej byl vysušen bezvodým síranem sodným a uchován při 5 °C do následné analýzy. Výtěžnost vzorku byla stanovena na 2,8 %. Hlavní složky získaného levandulového oleje byly linalyl acetát (47,56 %), linalool (28,06 %), lavandulyl acetát (4,34 %),  $\alpha$ -terpineol (3,75 %), geranyl acetát (1,94 %), karyofylen oxid (1,38 %) a eukalyptol (1,14 %). Všechny tyto složky byly nalezeny i v našich esenciálních olejích. Největší rozdíl ve složení představuje množství linalyl acetátu, kterého jsme v našich olejích identifikovali podstatně méně, a linaloolu, kterého naše oleje obsahovaly téměř o 10 % více. Dále karyofylen oxid byl v olejích EO1–EO4 přítomen ve větší míře, zatímco u oleje EO5 byl obsah oproti této studii nižší. U dalších složek nebyl rozdíl v relativním zastoupení tak výrazný. [80]

**Luu Thai Danh** a kol. [81] se ve své práci také věnují složení esenciálního levandulového oleje, který byl získaný z mletých sušených květů levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* Mill.) hydrodestilací. Pro hydrodestilaci byla využita aparatura typu Clevenger, naváženo bylo 40 g vzorku a odměřeno 500 ml deionizované vody. Získaný EO byl vysušen bezvodým síranem sodným. Nejvíce zastoupenou složkou byl linalool (52,59 %). Další sloučeniny zastoupené ve větší míře byly linalyl acetát (9,27 %), kafr (8,79 %), borneol (7,50 %), terpinen-4-ol (2,45 %),  $\beta$ -farnesen (1,83 %), lavandulyl acetát (1,32 %), neryl acetát (1,21 %) a bornyl acetát (1,11 %). Všechny tyto složky byly identifikovány v našich esenciálních olejích, s výjimkou bornyl acetátu. Množství linalyl acetátu je stejně jako v našem případě poměrně nízké v porovnání s ostatními oleji levandule lékařské. Výrazně se tento olej liší také v obsahu kafru, který je naopak v tomto oleji oproti ostatním studiím zabývajícími se esenciálními oleji z levandule lékařské i v porovnání s našimi oleji zastoupen ve větší míře. [81]

V následující studii **Giacinto Salvatore Germinara** a kol. [82] popisují esenciální olej získaný z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* Mill.), která byla vypěstovaná v Itálii. Esenciální olej byl získaný z květenství pomocí hydrodestilace v aparatuře typu Clevenger.



K destilaci bylo využito 500 g rostlinného materiálu a doba destilace byla 3 hodiny. Získaný esenciální olej byl skladován při teplotě 4 °C do následné analýzy. V oleji bylo identifikováno celkem 53 sloučenin, což odpovídá 98,3 % celkové plochy píků. Hlavní identifikovanou sloučeninou byl stejně jako v našich olejích linalool (23,8 %), kterého ale olej z této studie obsahuje přibližně o 14 % méně než náš olej EO1, který měl z našich vzorků nejnižší zastoupení této sloučeniny. Další sloučeniny zastoupené ve větší míře byly eukalyptol (12,0 %), borneol (10,7 %), terpinen-4-ol (10,0 %), linalyl acetát (6,9 %), *trans*- $\beta$ -ocimen (6,2 %), *trans*- $\beta$ -farnesen (3,5 %) a kafr (2,8 %). Všechny tyto sloučeniny byly nalezeny i v našich vzorcích, většina ale ve velmi odlišném relativním zastoupení. Podstatně méně naše vzorky obsahují eukalyptolu (2,82–3,01 %), *trans*- $\beta$ -ocimenu (0,53–0,67 %) a *trans*- $\beta$ -farnesenu (0,13–0,15 %), také terpinen-4-ol se v relativním zastoupení více odlišuje – v našich olejích pouze 2,81–3,04 %. Dále naše vzorky obsahují téměř o polovinu méně borneolu a kafru. Linalyl acetát se zastoupením neliší příliš výrazně. V porovnání s dalšími studii, které popisují složení esenciálních olejů z levandule lékařské, obsahuje ale olej z této studie i naše vzorky linalyl acetátu podstatně méně. [82]

Z uvedených studií bylo zjištěno, že ve všech esenciálních olejích z levandule se vyskytují téměř stejné sloučeniny, které se ale v každém liší relativním zastoupením. Hlavní sloučeninou byl ve všech případech linalool následovaný linalyl acetátem a stejně tak tomu bylo i ve všech našich olejích. Výjimkou je vzorek pěstovaný v Indii (studie **Ram S. Verma** a kol. [80]), u kterého měl nejvyšší zastoupení linalyl acetát. Znatelné odlišnosti vykazují jednotlivé oleje v obsahu eukalyptolu. Nejvyšší zastoupení této sloučeniny bylo objeveno v oleji z lavandinu (studie **Mustafa Abdullah Yilmaz** [79]). Rostlinné materiály pocházely pokaždé z různých klimatických podmínek a také doby jejich sklizně se lišily. Některé materiály byly před destilací sušeny, zatímco jiné byly použity v čerstvém stavu. U všech olejů byla pro získání zvolena hydrodestilace, která ale trvala různě dlouhou dobu (2–4 hodiny). Všechny tyto faktory mohou mít vliv na složení esenciálního oleje, stejně jako může mít vliv druh rostliny. Například u lavandinu bylo prokázáno vysoké zastoupení kafru oproti většině olejů z levandule lékařské. Porovnání námi vydestilovaných esenciálních olejů s dostupnou literaturou je shrnuto v **Tabulce 12**.

**Tabulka 12** Porovnání chemického složení získaných levandulových olejů s dostupnou literaturou

původ vzorku	typ vzorku	extrakční metoda	úprava EO	analýza	kolona	hlavní složky	literatura
Polsko	sušené květy <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	hydrodestilace	–	GC-MS, GC-FID	RTX-1MS	linalool (24,6 %), linalyl acetát (18,0 %), borneol (6,3 %), $\alpha$ -terpineol (3,1 %), lavandulyl acetát (3,8 %), karyofylen oxid (5,0 %), <i>cis</i> -linalool oxid (2,5 %), <i>trans</i> -linalool oxid (1,6 %), krypton (2,3 %) a terpinen-4-ol (2,5 %)	[78]
Turecko	čerstvé květy <i>Lavandula x intermedia</i>	hydrodestilace	sušení bezvodým síranem sodným	GC-MS	HP-5MS	linalool (43,86 %), linalyl acetát (9,37 %), eukalyptol (18,47 %), kafr (8,72 %), endo-borneol (0,68 %) a $\alpha$ -terpineol (1,28 %)	[79]
Indie	čerstvé květenství <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	hydrodestilace	sušení bezvodým síranem sodným	GC-FID, GC-MS	PE-5, BP-20, Equipty-5	linalyl acetát (47,56 %), linalool (28,06 %), lavandulyl acetát (4,34 %), $\alpha$ -terpineol (3,75 %), geranyl acetát (1,94 %), karyofylen oxid (1,38 %) a eukalyptol (1,14 %)	[80]
Austrálie	mleté sušené květy <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	hydrodestilace	sušení bezvodým síranem sodným	GC-FID, GC-MS	HP-5MS	linalool (52,59 %), linalyl acetát (9,27 %), kafr (8,79 %), borneol (7,50 %), terpinen-4-ol (2,45 %), $\beta$ -farnesen (1,83 %), lavandulyl acetát (1,32 %), neryl acetát (1,21 %) a bornyl acetát (1,11 %)	[81]

**Tabulka 12** Porovnání chemického složení získaných levandulových olejů s dostupnou literaturou – pokračování

původ vzorku	typ vzorku	extrakční metoda	úprava EO	analýza	kolona	hlavní složky	literatura
Itálie	sušení květenství <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	hydrodestilace	–	GC-MS	HP-INNOWAX	linalool (23,8 %), eukalyptol (12,0 %), borneol (10,7 %), terpinen-4-ol (10,0 %), linalyl acetát (6,9 %), <i>trans</i> - $\beta$ -ocimen (6,2 %), <i>trans</i> - $\beta$ -farnesen (3,5 %) a kafr (2,8 %)	[82]
Polsko	sušené květy levandule	hydrodestilace destilovaná voda	sušení bezvodým síranem sodným	GC-FID, GC-MS	SLB-5MS	linalool (38,6 %), linalyl acetát (6,6 %), $\alpha$ -terpineol (6,3 %), borneol (4,8 %), <i>cis</i> -linalool oxid (4,2 %), lavandulyl acetát (3,1 %), eukalyptol (2,8 %), terpinen-4-ol (2,8 %), <i>trans</i> -linalool oxid (2,5 %),	
Polsko	sušené květy levandule	hydrodestilace pH 4,58	sušení bezvodým síranem sodným	GC-FID, GC-MS	SLB-5MS	linalool (41,3 %), linalyl acetát (6,0 %), borneol (5,1 %), $\alpha$ -terpineol (4,5 %), <i>cis</i> -linalool oxid (4,0 %), terpinen-4-ol (3,0 %), lavandulyl acetát (2,9 %), eukalyptol (2,9 %), karyofylen oxid (2,7 %), <i>trans</i> -linalool oxid (2,6 %),	

**Tabulka 12** Porovnání chemického složení získaných levandulových olejů s dostupnou literaturou – pokračování

původ vzorku	typ vzorku	extrakční metoda	úprava EO	analýza	kolona	hlavní složky	literatura
Polsko	sušené květy levandule	hydrodestilace pH 3,63	sušení bezvodým síranem sodným	GC-FID, GC-MS	SLB-5MS	linalool (42,3 %), linalyl acetát (6,6 %), $\alpha$ -terpineol (4,6 %), borneol (5,1 %), <i>cis</i> -linalool oxid (3,4 %), lavandulyl acetát (3,0 %), eukalyptol (3,0 %), terpinen-4-ol (2,9 %), karyofylen oxid (2,6 %), <i>trans</i> -linalool oxid (2,5 %),	
Polsko	sušené květy levandule	hydrodestilace pH 2,59	sušení bezvodým síranem sodným	GC-FID, GC-MS	SLB-5MS	linalool (41,5 %), linalyl acetát (6,4 %), $\alpha$ -terpineol (5,0 %), borneol (5,0 %), <i>cis</i> -linalool oxid (3,7 %), lavandulyl acetát (3,0 %), eukalyptol (2,9 %), terpinen-4-ol (2,9 %), karyofylen oxid (2,4 %), <i>trans</i> -linalool oxid (2,3 %),	
Polsko	sušené květy levandule	hydrodestilace pH 1,64	sušení bezvodým síranem sodným	GC-FID, GC-MS	SLB-5MS	linalool (37,3 %), $\alpha$ -terpineol (8,1 %), linalyl acetát (6,0 %), borneol (4,8 %), <i>cis</i> -linalool oxid (4,2 %), lavandulyl acetát (3,0 %), eukalyptol (2,9 %), terpinen-4-ol (2,8 %), <i>trans</i> -linalool oxid (2,5 %)	

## 6.3 Antimikrobiální aktivita vydestilovaných levandulových olejů

### 6.3.1 Antimikrobiální aktivita vůči gramnegativním bakteriím

Při stanovením antimikrobiální aktivity vydestilovaných esenciálních olejů bylo prokázáno, že u gramnegativních bakterií vždy alespoň jeden z olejů inhibuje jejich růst. Jako nejúčinnější se vůči gramnegativním bakteriím projevil olej EO5, který inhiboval růst bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens* v kapalně fázi při nejvyšší testované koncentraci (1024 µg/ml). Druhým nejúčinnějším olej byl olej EO3, který inhiboval růst dvou testovaných G<sup>-</sup> bakterií při nejvyšší koncentraci v kapalně fázi. Konkrétně se jednalo o bakterie *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Esenciální oleje EO4 a EO1 inhibovaly každý pouze jedinou bakterii. EO4 inhiboval růst bakterie *Pseudomonas aeruginosa* při nejvyšší koncentraci v kapalně fázi a EO1 inhiboval bakterii *Klebsiella pneumoniae* také při nejvyšší koncentraci v kapalně fázi. Pokud tedy u oleje byla prokázána jistá antimikrobiální aktivita, tak vždy pouze v nejvyšší koncentraci 1024 µg/ml. Jediným olejem, který nevykázal žádnou antimikrobiální aktivitu byl esenciální olej EO2. U žádného z testovaných olejů nebyla prokázána antimikrobiální aktivita v parní fázi.

### 6.3.2 Antimikrobiální aktivita vůči grampozitivním bakteriím

U grampozitivních bakterií žádný z testovaných olejů neinhiboval růst bakterie *Bacillus subtilis*, bakterie byla tedy rezistentní vůči testovaným vzorkům. Nejúčinnějšími oleji z hlediska počtu inhibovaných bakterií byly oleje EO5 a EO3, které oba inhibovaly růst 3 grampozitivních bakterií (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*). Oba oleje u bakterie *Streptococcus pyogenes* prokázaly inhibici při koncentraci 1024 µg/ml. Rozdíl mezi těmito oleji se prokázal u bakterií *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Olej EO5 inhiboval růst těchto bakterií v nejvyšší testované koncentraci 1024 µg/ml, zatímco u oleje EO3 postačila k inhibici poloviční koncentrace 512 µg/ml. Vzorky EO2 a EO1 nedokázaly inhibovat růst žádné z testovaných grampozitivních bakterií. Všechny zmíněné inhibice byly pouze v kapalně fázi. Stejně jako u gramnegativních bakterií neprokázal žádný z testovaných vzorků antimikrobiální aktivitu v parní fázi.

Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací pro jednotlivé oleje a srovnávací antibiotikum ampicilin v parní a kapalně fázi jsou shrnuty v **Tabulce 13**. Antibiotikum ampicilin prokázalo inhibici v různých koncentracích vůči testovaným bakteriím také pouze v kapalně fázi., což je způsobeno tím, že antibiotikum není těkavá látka, proto nemohlo inhibovat růst žádné bakterie v parní fázi.

**Tabulka 13** Minimální inhibiční koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ] jednotlivých esenciálních olejů a antibiotika ampicilinu v plynné a kapalně fázi

bakterie	MIC jednotlivých vzorků a ampicilinu v plynné a kapalně fázi [ $\mu\text{g/ml}$ ]												
	EO5		EO4		EO3		EO2		EO1		ampicilin		
	agar	bujon	agar	bujon	agar	bujon	agar	bujon	agar	bujon	agar	bujon	
<b>gramnegativní</b>													
<i>Escherichia coli</i>	>1024	<b>1024</b>	>1024	>1024	>1024	<b>1024</b>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>4	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1024	<b>1024</b>	>1024	<b>1024</b>	>1024	<b>1024</b>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>4	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	<b>1024</b>	>4	>4
<i>Serratia marcescens</i>	>1024	<b>1024</b>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>4	4
<b>grampozitivní</b>													
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1024	<b>1024</b>	>1024	>1024	>1024	<b>512</b>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>4	0,25
<i>Enterococcus faecalis</i>	>1024	<b>1024</b>	>1024	<b>1024</b>	>1024	<b>512</b>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>4	0,25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	>1024	<b>1024</b>	>1024	>1024	>1024	<b>1024</b>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>4	1
<i>Bacillus subtilis</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>4	0,25

## 6.4 Porovnání antimikrobiálních vlastností získaných esenciálních olejů s dostupnou literaturou

Svetlana Perovic a kol. [83] ve své práci stanovují antimikrobiální aktivitu levandulového esenciálního oleje bujonovou diluční metodou. Olej byl získaný ze sušených květů levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* Mill.) pomocí hydrodestilace, následně byl vysušen bezvodým síranem sodným a uchován při 4 °C do další analýzy. Nejvíce zastoupené složky byly linalool (24,84 %), linalyl acetát (22,39 %), eukalyptol (18,13 %) a kafr (12,88 %). Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly vybrány následující patogenní bakterie: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 a kvasinka *Candida albicans* ATCC 10231. Pro bakterie byl využit Mueller-Hinton bujon, pro kvasinku Sabouraud Dextrose bujon. Esenciální olej byl testovaný v koncentracích 71, 35, 14, 7; 3,5 a 1,4 µg/ml. Mikrobiální nárůst byl odečten po 24hodinové kultivaci při 37 °C pro bakterie a pro *C. albicans* po 48 hodinách při 26 °C. Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena jako nejnižší koncentrace oleje, při které nebyl viditelný žádný nárůst. U většiny mikroorganismů byl růst inhibován při koncentraci 1,4 µg/ml (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis* a *Salmonella enteritidis*). Pro inhibici mikroorganismů *Enterococcus faecalis* a *Candida albicans* byla potřeba koncentrace 14 µg/ml. Nejvyšší testovaná koncentrace byla potřeba na inhibici růstu *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas aeruginosa*. U našich olejů byla inhibice růstu testována na 5 shodných bakteriích s touto studií (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis*). Zatímco levandulový olej z této studie inhiboval u *E. coli* růst již při nejnižší testované koncentraci, u našich vzorků, které vykazovaly inhibici vůči této bakterii (EO5 a EO3) byla zapotřebí nejvyšší testovaná koncentrace. Nejvyšší testovaná koncentrace v případě obou experimentů inhibovala růst bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, v našem experimentu byla ale hodnota nejvyšší testované koncentrace výrazně vyšší. Bakterie *Bacillus subtilis* byla odolná vůči všem našim vzorkům, zatímco olej popsáný v této studii prokázal inhibici vůči této bakterii v nejvyšší koncentraci. *Staphylococcus aureus* byl inhibován olejem z této studie při koncentraci 1,4 µg/ml, naše oleje (EO5 a EO3) vykazovaly také jistou inhibici vůči této bakterii, ovšem opět ve vyšší koncentraci (1024 µg/ml respektive 512 µg/ml). I u bakterie *Enterococcus faecalis* byly hodnoty MIC dosti výrazné. Naše oleje EO5 a EO4 inhibovaly růst této bakterie při

koncentraci 1024 µg/ml, respektive olej EO3 při koncentraci 512 µg/ml, zatímco u oleje testovaného v této studii stačila k inhibici koncentrace 14 µg/ml. [83]

Testování antimikrobiální aktivity levandulového oleje zaznamenali ve svém článku **Dallas Rohraff** a **Rodericko Morgan** [84], kteří testovali antimikrobiální aktivitu agarovou diskovou difuzní metodou na bakteriích *E. coli* a *S. aureus*. Pro testování byl sterilní papírový disk napuštěn 5 µl oleje a kultivace probíhala při 37 °C 18–24 hodin. Po kultivaci byly změřeny zóny značící antimikrobiální aktivitu – pro *S. aureus* 13 mm a *E. coli* 8 mm. [84] Obě tyto bakterie byly využity i v našem experimentu, disková difuzní metoda je ale pouze metoda screeningová, tudíž výsledky nelze porovnat se získanými hodnotami MIC.

**Miloš Nikolić** a kol. [85] se ve své studii také věnují stanovení antimikrobiální aktivity esenciálního oleje z levandule lékařské. Hlavní sloučeniny testovaného oleje byly linalool (40,3 %), borneol (13,1 %) a linalyl acetát (11,4 %). Stanovení bylo provedeno bujonovou mikrodiluční metodou v mikrotitračních destičkách a k testování byly zvolena následující gramnegativní a grampozitivní bakterie – *Streptococcus pyogenes* IBR S004, *Streptococcus mutans* IBR S001, *Lactobacillus acidophilus* IBR L001, *Streptococcus salivarius* IBR S006, *Streptococcus sanguinis* IBR S002, *Enterococcus faecalis* IBR E001, *Pseudomonas aeruginosa* IBR P001 a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Testovaný levandulový olej vykazoval antimikrobiální aktivitu vůči všem testovaným mikroorganismům, ale u každého byl růst bakterií inhibován při jiné koncentraci. Nejvyšší koncentrace (2333,33 µg/ml) byla potřeba pro inhibici růstu bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, a naopak nejnižší (160,00 µg/ml) pro bakterii *Streptococcus sanguinis*. Při našem testování antimikrobiální aktivity byly využity 4 bakterie shodné s touto studií (*Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*). Inhibice růstu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byla v našem experimentu prokázána u 3 olejů (EO4, EO4 a EO3) v kapalně fázi v nejvyšší koncentraci (1024 µg/ml) a stejně tak v této studii byl růst této bakterie inhibován při nejvyšší testované koncentraci (2333,33 µg/ml). Hodnoty nejvyšších testovaných koncentrací se ale v každém experimentu lišily, v případě našich olejů stačila k inhibici růstu nižší koncentrace. Nižší hodnota MIC byla stanovena u našich olejů EO5 a EO3 pro bakterii *Staphylococcus aureus*. V této studii byla k inhibici potřeba koncentrace 1150 µg/ml a naše oleje inhibovaly růst této bakterie při koncentracích 1024 µg/ml, respektive 512 µg/ml. U bakterie *Streptococcus pyogenes* došlo k inhibici testovaným olejem při koncentraci 1208,33 µg/ml, naše oleje EO5 a EO3 prokázaly inhibici při koncentraci 1024 µg/ml, rozdíl v hodnotách MIC tedy není u této bakterie tak výrazný. V této studii byla k inhibici bakterie



*Enterococcus faecalis* potřeba koncentrace testovaného oleje 608,33 µg/ml, která se příliš neliší od koncentrace, při které růst této bakterie inhiboval náš olej EO3 (512 µg/ml). [85]

Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací olejů popisovaných ve zmíněných studiích a také námi vydestilovaných esenciálních olejů jsou pro lepší přehlednost shrnuty v **Tabulce 14**.

**Tabulka 14** Shrnutí hodnot MIC [µg/ml] pro oleje z jednotlivých studií vůči vybraným testovaným bakteriím

<b>bakterie</b>	<b>MIC1 [µg/ml]</b> [83]	<b>MIC2 [µg/ml]</b> [85]	<b>MIC3 [µg/ml]</b> naše vzorky
<i>Escherichia coli</i>	1,4	–	1024
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,4	1150	1024 (EO5), 512 (EO3)
<i>Bacillus subtilis</i>	71	–	>1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71	2333,33	1024
<i>Enterococcus faecalis</i>	14	608,33	1024 (EO5, EO4), 512 (EO3)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	1208,33	1024

Eukalyptol a kafr patří mezi sloučeniny, u kterých jsou popisovány výrazné antimikrobiální aktivity. Dále byla také prokázána antimikrobiální aktivita borneolu. Antimikrobiální aktivita levandulového esenciálního oleje je důsledkem synergických účinků těchto sloučenin s dalšími komponenty v oleji. [86] Esenciální olej popsáný v první zmíněné studii (**Svetlana Perovic** a kol. [83]) má podstatně vyšší zastoupení eukalyptolu a kafru než námi vydestilované oleje. Ve studii, kterou provedl **Miloš Nikolić** a kol. [85], je popisován olej s výrazně vyšším zastoupením borneolu, v porovnání s našimi levandulovými oleji. Právě rozdílné relativní zastoupení těchto sloučenin může být jedním z důvodů, proč oleje vykazovaly proti stejným bakteriím inhibiční účinky při různých koncentracích. **Anna Herman** a kol. [87] ve své studii stanovují antimikrobiální účinky čistých esenciálních olejů a následně stejných olejů po přidavku linaloolu. Testované oleje měly po přidavku linaloolu vyšší antimikrobiální aktivitu, z čehož lze usoudit, že i linalool má významné antimikrobiální účinky. Linalool byl nejvíce zastoupenou sloučeninou ve všech našich olejích i v olejích z obou zmíněných studií. V další studii se **Domenico Trombetta** a kol. [88] zaměřili na testování antimikrobiální aktivity 3 monoterpenoidů, konkrétně se jednalo o linalyl acetát, menthol a thymol. Z těchto sloučenin naše oleje obsahovaly pouze linalyl acetát. V obsahu

linalyl acetátu se oleje popisované ve zmíněných studiích (**Svetlana Perovic** a kol. [83], **Miloš Nikolić** a kol. [85]) a naše vzorky také poměrně výrazně lišily. Nejvyšší zastoupení linalyl acetátu bylo prokázáno v oleji z první zmíněné studie (**Svetlana Perovic** a kol. [83]) a tento olej zároveň inhiboval růst všech testovaných bakterií v nejnižších koncentracích. Z této skutečnosti je možné usoudit, že také linalyl acetát má jistý vliv na antimikrobiální aktivitu esenciálních olejů.

Faktory ovlivňující antimikrobiální aktivitu esenciálních olejů jsou především složení daného esenciálního oleje, funkční skupiny přítomné v aktivních složkách a jejich synergické interakce. Mechanismus antimikrobiálního účinku se liší podle typu esenciálního oleje a také podle kmene zvoleného mikroorganismu. Je známo, že grampozitivní bakterie jsou citlivější na účinky esenciálních olejů než bakterie gramnegativní. Toto může být přičítáno skutečnosti, že gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu, která má pevnou strukturu a je bohatá na lipopolysacharidy a celkově složitější než u bakterií grampozitivních, čímž omezuje difúzi hydrofobních sloučenin. Buněčná stěna je navíc u gramnegativních bakterií překryta vnější membránou. Tato membrána u grampozitivních bakterií chybí, u těchto bakterií je buněčná stěna tvořena silnou stěnou peptidoglykanu, která není dostatečně hustá na to, aby odolávala malým antimikrobiálním molekulám. [89] Toto tvrzení potvrdil i námi provedený experiment. U gramnegativních bakterií dokázaly testované vzorky inhibovat růst bakterií pouze v nejvyšší testované koncentraci (1024  $\mu\text{g/ml}$ ), zatímco u grampozitivních bakterií 2 testované vzorky prokázaly inhibici při poloviční koncentraci 512  $\mu\text{g/ml}$ . Dále lze toto tvrzení potvrdit také podle účinků srovnávacího antibiotika vůči testovaným bakteriím, které u grampozitivních bakterií inhibovalo jejich růst v nižších koncentracích než u bakterií gramnegativních.

Je obtížné porovnávat získané údaje s literárními zdroji, protože v každé studii pochází rostlinný materiál z jiných klimatických podmínek a pro izolaci olejů mohou být zvoleny různé metody. Oba tyto faktory mají vliv na složení získaného esenciálního oleje a tím i na jeho antimikrobiální aktivitu. Dále pro testování antimikrobiální aktivity je možné využít různé metody a také různé kmeny bakterií.

## 7 ZÁVĚR

Náplní této práce bylo provést v teoretické části literární rešerši zaměřenou na výrobu a vlastnosti esenciálních olejů, dále na využití extrakčních technik a plynové chromatografie pro analýzu těkavých látek v esenciálních olejích. V experimentální části bylo cílem prověřit vliv pH vody při hydrodestilaci levandulového oleje na kvalitu výsledného produktu. Celkem bylo zkoumáno 5 levandulových olejů získaných hydrodestilací při různých hodnotách pH vody. Ve všech olejích byly nejvíce zastoupenou skupinou látek monoterpenoidy. Z této skupiny největší část tvořily alkoholy, které byly následovány estery. Hodnota pH vody neměla vliv na počet identifikovaných sloučenin v jednotlivých olejích, ve všech olejích jich bylo identifikováno celkem 70. Hodnota pH měla vliv na relativní zastoupení složek. U některých sloučenin byly rozdíly v relativním zastoupení v jednotlivých olejích méně znatelné, zatímco u některých byl rozdíl výraznější. Konkrétní sloučeniny, které se svými obsahy výrazněji lišily v jednotlivých esenciálních olejích, byly linalool,  $\alpha$ -terpineol a karyofylen oxid. Linalool a karyofylen oxid měly nejnižší zastoupení v oleji destilovaném při nejnižší hodnotě pH vody, zatímco  $\alpha$ -terpineolu bylo právě v tomto oleji největší množství. Je tedy pravděpodobné, že u karyofylen oxidu při hydrodestilaci může docházet k jistým transformacím, které nejvíce podpořilo právě nejnižší z testovaných hodnot pH vody. Obsah linaloolu a  $\alpha$ -terpineolu má mezi sebou jistou souvislost. Linalool se při hydrodestilaci transformuje na  $\alpha$ -terpineol. V oleji, ve kterém bylo zjištěno největší relativní zastoupení linaloolu, bylo tedy zároveň nejnižší množství  $\alpha$ -terpineolu, a naopak olej s nejnižším obsahem linaloolu měl nejvyšší zastoupení  $\alpha$ -terpineolu ze všech získaných olejů. Nejnižší množství linaloolu a nejvyšší množství  $\alpha$ -terpineolu bylo zjištěno v oleji destilovaném při nejnižším pH vody.

Při porovnání chemického složení získaných esenciálních olejů s literárními zdroji bylo zjištěno, že oleje obsahují převážně stejné sloučeniny, které se ale v jednotlivých olejích liší relativním zastoupením. Veškeré porovnávané oleje byly získány hydrodestilací, která ale v každém případě trvala jinak dlouhou dobu. Vzorky pocházely z různých klimatických podmínek, doby jejich sklizně byly rozdílné a vzorky byly také před destilací upravovány různými způsoby. Všechny tyto faktory mohou mít vliv právě na složení získaného esenciálního oleje.

V další části diplomové práce byla testována antimikrobiální aktivita vydestilovaných esenciálních olejů. Pro testování byla zvolena bujonová mikrodiluční volatilizační metoda

a testování bylo provedeno na gramnegativních – *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* i grampozitivních bakteriích – *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* a *Bacillus subtilis*. Všechny testované oleje dokázaly inhibovat růst alespoň jedné gramnegativní bakterie, s výjimkou oleje EO2, který na testovaných koncentracích neinhiboval růst žádné z testovaných bakterií. Nejúčinnějším olejem vůči G<sup>-</sup> bakteriím byl olej EO5, který inhiboval růst 3 bakterií (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens*). Druhým nejúčinnějším olej byl olej EO3, který inhiboval růst dvou testovaných G<sup>-</sup> bakterií (*Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*). Esenciální oleje EO1 a EO4 prokázaly antimikrobiální aktivitu každý vůči jedné bakterii. EO1 inhibovat růst bakterie *Klebsiella pneumoniae* a olej EO4 *Pseudomonas aeruginosa*. Všechny zmíněné inhibice byly v kapalně fázi při nejvyšší testované koncentraci. V parní fázi žádný z olejů nevykazoval vůči G<sup>-</sup> bakteriím antimikrobiální aktivitu.

U grampozitivních bakterií projevily antimikrobiální aktivitu pouze 3 testované oleje (EO5, EO4 a EO3). Žádný z testovaných olejů nedokázala inhibovat růst bakterie *Bacillus subtilis*. Esenciální olej EO4 inhiboval růst pouze bakterie *Enterococcus faecalis* a to při nejvyšší testované koncentraci. Oleje EO5 a EO3 prokázaly oba inhibici vůči 3 grampozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Streptococcus pyogenes*). U bakterie *Streptococcus pyogenes* inhibovaly oba vzorky růst při stejné koncentraci. Rozdíl mezi těmito oleji se projevil u bakterií *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*. Olej EO5 inhiboval růst obou těchto bakterií při nejvyšší testované koncentraci, zatímco olej EO3 při koncentraci poloviční. Všechny inhibice byly i u grampozitivních bakterií pouze v kapalně fázi, žádný ze vzorků neprojevil antimikrobiální aktivitu v parní fázi.

## 8 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] CAVANAGH, Heather a Jenny WILKINSON. Biological Activities of Lavender Essential Oil. *Phytotherapy Research*. 2002, 4(16), 301–308, doi:10.1002/ptr.1103
- [2] PRUSINOWSKA, Renata a Krzysztof SMIGIELSKI. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) - A review. *Herba Polonica*. 2014, 2(60), 56–66, doi:10.2478/hepo-2014-0010
- [3] DJEMAA, Ferdaous, Khaled BELLASSOUED, Sami ZOUARI, Abdelfatteh FEKI a Emna AMMAR. Antioxidant and wound healing activity of *Lavandula aspic* L. ointment. *Journal of Tissue Viability*. Elsevier, 2016, 4(25), 193–200, doi:10.1016/j.jtv.2016.10.002
- [4] DÉTÁR, Enikő, Éva ZÁMBORINÉ NÉMETH, Beáta GOSZTOLA, Ildikó DEMJÁN a Zsuzsanna PLUHÁR. Effects of variety and growth year on the essential oil properties of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) and lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2020, 1(90), 1–7, doi:10.1016/j.bse.2020.104020
- [5] ZHELJAZKOV, Valtcho, Charles CANTRELL, Tess ASTATKIE a Ekaterina JELIAZKOVA. Distillation Time Effect on Lavender Essential Oil Yield and Composition. *Journal of Oleo Science*. 2013, 4(62), 195–199, doi:10.5650/jos.62.195
- [6] ANDRYS, Dominika a Danuta KULPA. *Lavandula* spp. essential oils-its use, composition and genetic basic of production. *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis*. 2016, 3(39), 7–22, doi:10.21005/AAPZ2016.39.3.01
- [7] BAYDAR, Hasan a Süleyman KINECI. Scent Composition of Essential Oil, Concrete, Absolute and Hydrosol from Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.). *Journal of essential oil-bearing plants*. 2013, 2(12), 131–136, doi:10.1080/0972060X.2009.10643702
- [8] PÉRINO-ISSARTIER, Sandrine, Christian GINIES, Giancarlo CRAVOTTO a Farid CHEMAT. A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and

- hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*. 2013, (1305), 41–47, doi:10.1016/j.chroma.2013.07.024
- [9] KUMAR, Rakesh a Yogesh TRIPATHI. Getting Fragrance from Plants. KUMAR, Rakesh a Yogesh TRIPATHI. Training Manual on Extraction Technology of Natural Dyes & Aroma Therapy and Cultivation Value Addition of Medicinal Plants. 1. Dehradun (India): Forest Research Institute, 2011, s. 77–102, doi: 10.13140/2.1.3886.4161
- [10] BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK a M. IDAOMAR. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 2(46), 446–475, doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- [11] 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*. 2016, 3(4), 1–16, doi:10.3390/medicines3040025
- [12] ASBAHANI, Abdelhafed, Karim MILADI, Waisudin BADRI et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, 1–2(483), 220–243, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069
- [13] KIVRAK, Şeyda, Tolga GÖKTÜRK 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*. 2017, 2(4), 148–161. ISSN 2148-6905, doi:10.21448/ijsm.323800
- [14] HANDA, Sukhdev, Sumar KHANUJA, Gennaro LONGO a Dev RAKESH. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Itálie: International Centre for Science and High Technology, 2008. Dostupné z: [www.unido.org/sites/default/files/200910/Extraction\\_technologies\\_for\\_medicinal\\_and\\_aromatic\\_plants\\_0.pdf](http://www.unido.org/sites/default/files/200910/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf)
- [15] ISMAIEL, Omnia, Essam ABDELGHANI, Heba MOUSA a Samih ELDAHMY. Determination of Estragole in Pharmaceutical Products, Herbal Teas and Herbal Extracts Using GC-FID. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016, 6(12), 144–

150, doi:10.7324/JAPS.2016.601220

- [16] BABU, Kiran a Bikram SINGH. Characteristics Variation of Lavender Oil Produced by Different Hydrodistillation Techniques. *Comprehensive Bioactive Natural Products-Quality Control & Standardization*. 8, 122–136. Dostupné z: [www.researchgate.net/publication/232957741\\_Characteristics\\_Variation\\_of\\_Lavender\\_Oil\\_Produced\\_by\\_Different\\_Hydrodistillation\\_Techniques](http://www.researchgate.net/publication/232957741_Characteristics_Variation_of_Lavender_Oil_Produced_by_Different_Hydrodistillation_Techniques)
- [17] KUSUMA, Heri, AFP PUTRA a Mahfud MAHFUD. Comparison of Two Isolation Methods for Essential Oils from Orange Peel (*Citrus auranticum* L) as a Growth Promoter for Fish: Microwave Steam Distillation and Conventional Steam Distillation. *Journal of Aquaculture Research and Development*. 2016, 2(7), 1–5, doi:10.4172/2155-9546.1000409
- [18] LEÓN, César, Edison JORDÁN, Karina SALAZAR, Esteban CASTELLANOS a Franklin SALAZAR. Extraction system for the industrial use of essential oil of the subtle lemon (*citrus aurantifolia*). *Journal of Physics: Conference Series*. 2020, 1(1432), 1–11, doi:10.1088/1742-6596/1432/1/012044
- [19] REZVANPANAHA, Shila, Karamatollah REZAEI, Seyyed 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*. 2008, 3(14), 311–314, doi:10.3136/fstr.14.311
- [20] SAPKALE, Gajanan, Sharanagouda PATIL, U. SURWASE a P. BHATBHAGE. Supercritical Fluid Extraction: A Review. *International Journal of Chemical Science*. 2010, 2(8), 729–743. Dostupné z: [www.tsijournals.com/articles/supercritical-fluid-extraction--a-review.pdf](http://www.tsijournals.com/articles/supercritical-fluid-extraction--a-review.pdf)
- [21] ÖTLES, Semih a Canan KARTAL. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2016, 1(15), 5–15, doi:10.17306/J.AFS.2016.1.1
- [22] MLEJOVÁ, Veronika, Petra PAVLÍKOVÁ, Petr DOBIÁŠ, Martin ADAM a Karel VENTURA. Aplikace mikroextrakce tuhou fází pro analýzu bylinných silic. *Chemické Listy*. 2010, (104), 166–171. Dostupné z: [www.chemicke-](http://www.chemicke-)

listy.cz/docs/full/2010\_03\_166-171.pdf

- [23] ARTHUR, Catherine a Janusz PAWLISZYN. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical chemistry*. 1990, (62), 2145–2148, doi: 10.1021/ac00218a019
- [24] MOLDOVEANU, Serban a Victor DAVID. *Modern Sample Preparation for Chromatography*. 1. Elsevier, 2015. ISBN 9780444543196, doi: 10.1016/C2011-0-00093-5
- [25] LIN, Po-Chen, Jason LEE a I-Jy CHANG. Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016, 3(24), 464–470, doi:10.1016/j.jfda.2015.12.006
- [26] 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*. 2014, 6(94), 1197–1204, doi:10.1002/jsfa.6397
- [27] SETZER, William N. *Essential Oils and Anxiolytic Aromatherapy*. *Natural Product Communications*. 2009, 4(9), 1305–1316, doi:10.1177/1934578X0900400928
- [28] OUESLATI, Mohamed, Nael ABUTAHA, Faraj AL-GHAMDI, Imeddine NEHDI, Fahd NASR, Lamjed MANSOUR, Mohammed AL-ZHARANI a Abdel HARRATH. Analysis of the chemical composition and in vitro cytotoxic activities of the essential oil of the aerial parts of *Lavandula atriplicifolia* Benth. *Journal of King Saud University - Science*. 2020, 2(32), 1476–1481, doi:10.1016/j.jksus.2019.11.045
- [29] PÉRINO-ISSARTIER, Sandrine, Christian GINIES, Giancarlo CRAVOTTO a Farid CHEMAT. A comparison of essential oils obtained from lavender via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 2013, (1305), 41–47, doi:10.1016/j.chroma.2013.07.024



- [30] Essential Oils from Steam Distillation. In: Engineering.iastate.edu. 2011. Dostupné z: [www.engineering.iastate.edu/brl/files/2011/10/brl\\_essentialoils.pdf](http://www.engineering.iastate.edu/brl/files/2011/10/brl_essentialoils.pdf)
- [31] PAVELA, Roman. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*. Elsevier, 2015, (76), 174–187, doi:10.1016/j.indcrop.2015.06.050
- [32] GUIMARÃES, Aline, Leandra MEIRELES, Mayara LEMOS, Marco CUNEGUNDES GUIMARÃES, Denise ENDRINGER, Marcio FRONZA a Rodrigo SCHERER. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*. 2019, 13(24), 1–12, doi:10.3390/molecules24132471
- [33] BUREŠOVÁ, Pavla a Pavel PAVLOUŠEK. Vše, co byste měli vědět o víně. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2014, ISBN 978-80-2474-351-6
- [34] PAVLOUŠEK, Pavel. Bio odrůdy révy vinné. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2016, ISBN 978-80-247-4330-1
- [35] PAVLOUŠEK, Pavel. Pěstování révy vinné: Moderní vinohradnictví. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, ISBN 978-80-247-7070-3
- [36] VERARDO, Vito, David ARRÁEZ-ROMÁN, Antonio SEGURA-CARRETERO, Emanuele MARCONI, Alberto FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ a Maria CABONI. Determination of Free and Bound Phenolic Compounds in Buckwheat Spaghetti by RP-HPLC-ESI-TOF-MS: Effect of Thermal Processing from Farm to Fork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 14(59), 7700–7707, doi:10.1021/jf201069k
- [37] STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 2007, 18(30), 3268–3295, doi:10.1002/jssc.200700261
- [38] DZIADAS, Mariusz a Henryk JELEŃ. Comparison of enzymatic and acid hydrolysis of bound flavor compounds in model system and grapes. *Food Chemistry*. 2016, (190), 412–418, doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.089
- [39] YANG, Yu, Guo-JieJina JIN, Xing-Jie WANG, Cai-Lin KONG, JiBin LIU a Yong-Sheng TAO. Chemical profiles and aroma contribution of terpene compounds in Meili

- (*Vitis vinifera* L.) grape and wine. *Food Chemistry*. 2019, (284), 155–161, doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.106
- [40] DVOŘÁKOVÁ, Marcela, Irena VALTEROVÁ a Tomáš VANĚK. Monoterpeny v rostlinách. *Chemické Listy*. 2011, (105), 839–845. Dostupné z: [www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_11\\_839-845.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_11_839-845.pdf)
- [41] TABAN, Azin, Mahammad 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*. 2018, (9), 12–18, doi:10.1016/j.scp.2018.05.001
- [42] AL-RUBAYE, Abeer, Imad HAMEED a Mohanad KADHIM. A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 2017, 1(9), 81–85, doi:10.25258/ijtpr.v9i01.9042
- [43] VONDRÁK, Dalibor a Jaroslav VULTERIN. *Analytická chemie*. 1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985.
- [44] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 1996. ISBN 9788090215504.
- [45] TORRES, Jessica. Carrying You Through Gas Chromatography. In: [Bitesizebio.com](http://Bitesizebio.com). Dostupné z: [www.bitesizebio.com/28687/carrying-gas-chromatography/](http://www.bitesizebio.com/28687/carrying-gas-chromatography/)
- [46] BARRY, EUGENE F. Columns: Packed and Capillary; Column Selection in Gas Chromatography. GROB, Robert a Eugene BARRY. *Modern Practice of Gas Chromatography, Fourth Edition*. 1. John Wiley & Sons, 2004, s. 65–190. ISBN 9780471651147, doi: 10.1002/0471651141.ch3
- [47] GUO, Xinghua. *Advances in Gas Chromatography*. IntechOpen, 2014. ISBN 9789535112273.
- [48] RAHMAN, Musfiqur, Abd EL-ATY, Jeong-Heui CHOI, Ho-Chul SHIN, Sung SHIN a Jae-Han SHIM. Chapter 3 Basic Overview on Gas Chromatography Columns. *Analytical Separation Science*. 1. 2015, s. 823–834. ISBN 9783527678129, doi:

10.1002/9783527678129.assep024

- [49] STAUFFER, Eric, Julia DOLAN a Reta NEWMAN. CHAPTER 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. Fire Debris Analysis. Elsevier, 2008, s. 235–293. ISBN 978-0-12-663971-1, doi: 10.1016/B978-012663971-1.50012-9
- [50] POOLE, Colin F. Ionization-based detectors for gas chromatography. Journal of Chromatography A. Elsevier, 2015, (1421), 137–153, doi:10.1016/j.chroma.2015.02.061
- [51] 06. Plynová chromatografie (GC). In: Is.muni.cz. Dostupné z: [www.is.muni.cz/el/1431/jaro2009/C6390/7480488/uvod.pdf](http://www.is.muni.cz/el/1431/jaro2009/C6390/7480488/uvod.pdf)
- [52] GROB, Robert a Eugene BARRY. Modern Practice of Gas Chromatography. 4. John Wiley & Sons, 2004. ISBN 9780471651147, doi: 10.1002/0471651141
- [53] SHELLIE, R.A. Gas Chromatography. Encyclopedia of Forensic Sciences. 2. Elsevier, 2013, s. 579–585. ISBN 978-0-12-382166-9, doi: 10.1016/B978-0-12-382165-2.00245-2
- [54] 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. 2011, 6(57), 138–142, doi:10.18832/kp2011011
- [55] HOLZBECHER, Závěš a Jaroslav CHURÁČEK. Analytická chemie. 1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987.
- [56] MASUCCI, John a Gary CALDWELL. Techniques for Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. GROB, Robert a Eugene BARRY. Modern Practice of Gas Chromatography. 4. John Wiley & Sons, 2004, s. 339–401. ISBN 9780471651147, doi: 10.1002/0471651141.ch7
- [57] MILMAN, Boris L. General principles of identification by mass spectrometry. Trends in Analytical Chemistry. Elsevier, 2015, (69), 24–33, doi:10.1016/j.trac.2014.12.009

- [58] FIDAN, Hafize, Galina STEFANOVA, Iliana KOSTOVA, Stanko STANKOV, Stanka DAMYANOVA, Albena STOYANOVA a Valtcho ZHELJAZKOV. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria. *Molecules*. 2019, 4(24), 1–10, doi:10.3390/molecules24040804
- [59] KWIATKOWSKI, Paweł, Łukasz ŁOPUSIEWICZ, Mateusz MATEUSZ KOSTEK et al. The Antibacterial Activity of Lavender Essential Oil Alone and In Combination with Octenidine Dihydrochloride against MRSA Strains. *Molecules*. 2020, 1(25), 1–15, doi:10.3390/molecules25010095
- [60] HOUDKOVA, Marketa, Johana RONDEVALDOVA, Ivo DOSKOCIL a Ladislav KOKOSKA. Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. *Fitoterapia*. Elsevier, 2017, (118), 56–62, doi:10.1016/j.fitote.2017.02.008
- [61] JIANG, Lin, Fei WANG, Feifei HAN, Witoon PRINYAWIWATKUL, Hong NO a Beilei GE. Evaluation of Diffusion and Dilution Methods to Determine the Antimicrobial Activity of Water-Soluble Chitosan Derivatives. *Journal of Applied Microbiology*. 2013, 4(114), 956–963, doi:10.1111/jam.12111
- [62] ELGAYYAR, Mohammed, Frances DRAUGHON, David GOLDEN a John MOUNT. Antimicrobial Activity of Essential Oils from Plants against Selected Pathogenic and Saprophytic Microorganisms. *Journal of Food Protection*. 2001, 7(64), 1019–1024, doi:10.4315/0362-028X-64.7.1019
- [63] LUANGTONGKUM, Taradon, Teresa MORISHITA, Amna EL-TAYEB, Aaron ISON a Qijing ZHANG. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Testing of *Campylobacter* spp. by the Agar Dilution and the Agar Disk Diffusion Methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, 2(45), 590–594, doi: 10.1128/JCM.00986-06
- [64] NAGAYAMA, Ariaki, Keizo YAMAGUCHI, Kunitomo WATANABE, Masatoshi TANAKA, Intetsu KOBAYASHI a Zenzo NAGASAWA. Final report from the Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Japanese Society of Chemotherapy, on the agar dilution method. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2008, 5(14), 383–392, doi: 10.1007/s10156-008-0634-Z

- [65] RELLER, Barth, Melvin WEINSTEIN, James JORGENSEN a Mary FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, 11(49), 1749–1755, doi:10.1086/647952
- [66] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad KORAICHIIBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, 2(6), 71–79, doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- [67] VAN BELKUM, Alex a William DUNNE. Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, 7(51), 2018–2024, doi:10.1128/JCM.00313-13
- [68] BROWN, Michael a Carl WITTEWER. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*. 2000, 8(46), 1221–1229, doi:10.1093/clinchem/46.8.1221
- [69] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*. 2004, (98), 174–179. Dostupné z: [www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_04\\_03.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf)
- [70] RAŠKOVIĆ, Aleksandar, Isidora MILANOVIĆ, Nebojša PAVLOVIĆ, Tatjana ČEBOVIĆ, Saša VUKMIROVIĆ a Momir MIKOV. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014, 1(14), 1–9, doi:10.1186/1472-6882-14-225
- [71] BURITS, M. a Franz BUCAR. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 2000, 5(14), 323–328, doi:10.1002/1099-1573(200008)14:5%3C323::AID-PTR621%3E3.0.CO;2-Q
- [72] KOKINA, Mariia, Ana SALEVIĆ, Ana KALUŠEVIĆ et al. Characterization, Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Encapsulation into Biodegradable Material Followed by Freeze Drying. *Food Technology and Biotechnology*. 2019, 2(57), 282–289, doi:10.17113/ftb.57.02.19.5957

- [73] NENADIS, Nikolaos, Olga LAZARIDOU a Maria TSIMIDOU. Use of Reference Compounds in Antioxidant Activity Assessment. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007, 14(55), 54525460, doi: 10.1021/jf070473q
- [74] ZLOCH, Zdeněk, Jan ČELAKOVSKÝ a Anna AUJEZDNÁ. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. Plzeň, 2004, 1–35. Dostupné z: [www.researchgate.net/publication/268049143\\_Stanoveni\\_obsahu\\_polyfenolu\\_a\\_celkove\\_antioxidacni\\_kapacity\\_v\\_potravinach\\_rostlinneho\\_puvodu](http://www.researchgate.net/publication/268049143_Stanoveni_obsahu_polyfenolu_a_celkove_antioxidacni_kapacity_v_potravinach_rostlinneho_puvodu)
- [75] ZHONG, Yu a Fereidoon SHAHIDI. 12 - Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. 1. Woodhead Publishing Series in Food Science, 2015, s. 287–333, doi: 10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9
- [76] JAKAB, Emma, Marianne BLAZSO, Eszter BARTA-RAJNAI, Bence BABINSZKI, Zoltán SEBESTYÉN, Zsuzsanna CZÉGÉNY, Jamie NICOL a Kevin MCADAM. Thermo-oxidative decomposition of lime, bergamot and cardamom essential oils. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2018, (134), 552–561, doi:10.1016/j.jaap.2018.08.003
- [77] ISO STANDARD ISO 3515: Oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.). 3rd edition. ISO, 2002.
- [78] ŚMIGIELSKI, Krzysztof, Renata PRUSINOWSKA, Krzysztof KROSOWIAK a Magdalena SIKORA. Comparison of qualitative and quantitative chemical composition of hydrolate and essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*). *Journal of Essential Oil Research*. 2013, 4(25), 291–299, doi:10.1080/10412905.2013.775080
- [79] YILMAZ, Mustafa Abdullah. Essential Oil Composition of Lavandin (*Lavandula x intermedia*) cultivated in Bismil-Turkey. *Academic Perspective Procedia*. 2018, 1(1), 1120–1125, doi:10.33793/acperpro.01.01.179
- [80] VERMA, Ram, Laiq RAHMAN, Chandan CHANOTIYA, Rajesh VERMA, Amit CHAUHAN, Anju YADAV, Anand SINGH a Ajai YADAV. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *Journal*

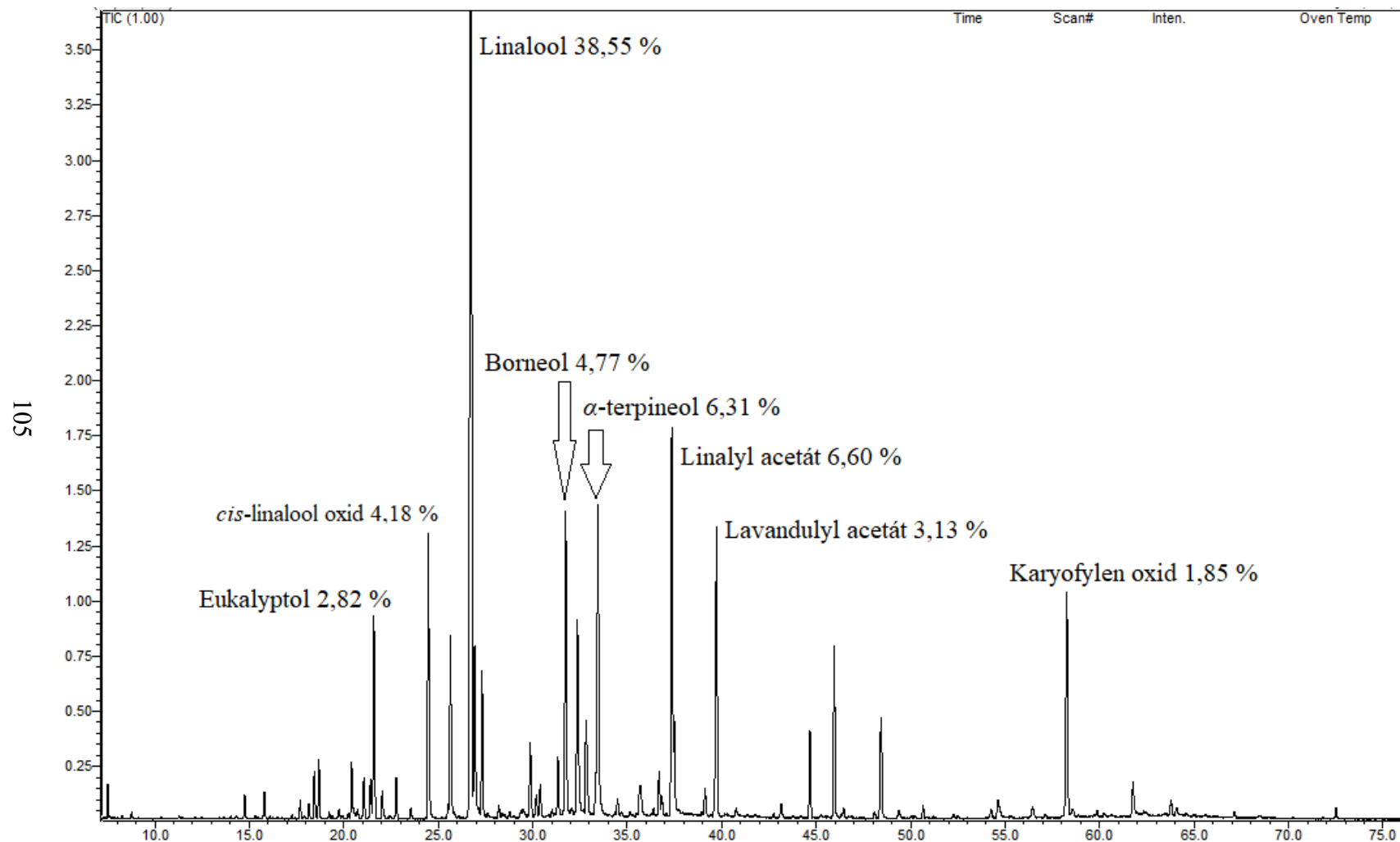
- of the Serbian Chemistry Society. 2010, 3(75), 343–348, doi:10.2298/JSC090616015V
- [81] DANH, Luu, Le HAN, Ngo TRIET, Jian ZHAO, Raffaella MAMMUCARI a Neil FOSTER. Comparison of Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) Essential Oils Extracted by Supercritical CO<sub>2</sub>, Hexane and Hydrodistillation. *Food and Bioprocess Technology*. 2013, 6(12), 3481–3489, doi:10.1007/s11947-012-1026-z
- [82] GERMINARA, Giacinto, Maria DI STEFANO, Laura DE ACUTIS, Sandra PATI, Sebastiano DELFINE, Antonio DE CRISTOFARO a Giuseppe ROTUNDO. Bioactivities of *Lavandula angustifolia* essential oil against the stored grain pest *Sitophilus granarius*. *Bulletin of Insectology*. 2017, 1(70), 129–138. ISSN 1721-8861. Dostupné z: [www.researchgate.net/publication/317025893\\_Bioactivities\\_of\\_Lavandula\\_angustifolia\\_essential\\_oil\\_against\\_the\\_stored\\_grain\\_pest\\_Sitophilus\\_granarius](http://www.researchgate.net/publication/317025893_Bioactivities_of_Lavandula_angustifolia_essential_oil_against_the_stored_grain_pest_Sitophilus_granarius)
- [83] PEROVIC, Svetlana, Snezana PANTOVIC, Valentina SCEPANOVIC, Andrej PEROVIC, Vladimir ZIVKOVIC a Biljana DAMJANOVIC-VRATNICA. Evaluation of antimicrobial activity and activity on the autonomic nervous system of the lavender essential oils from Montenegro. *Progress in Nutrition*. 2019, 3(21), 584–590, doi:10.23751/pn.v21i3.8385
- [84] ROHRAF, Dallas a Roderick MORGAN. The Evaluation of Essential Oils for Antimicrobial Activity, 1–8. Dostupné z: [www.scholarworks.gvsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1127&context=sss](http://www.scholarworks.gvsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1127&context=sss)
- [85] NIKOLIĆ, Miloš, Katarina JOVANOVIĆ, Tatjana MARKOVIĆ, Dejan MARKOVIĆ, Nevenka GLIGORIJEVIĆ, Siniša RADULOVIĆ a Marina SOKOVIĆ. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products*. Elsevier, 2014, (61), 225–232, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.07.011
- [86] STANOJEVIĆ, Ljiljana, Mihajlo STANKOVIĆ, Milorad CAKIĆ, Vesna NIKOLIĆ, Ljubiša NIKOLIĆ, Dušica ILIĆ a Niko RADULOVIĆ. The effect of hydrodistillation techniques on yield, kinetics, composition and antimicrobial activity of essential oils

from flowers of *Lavandula officinalis* L. *Hemijska Industrija*. 2011, 4(65), 455–463, doi:10.2298/HEMIND110129047S

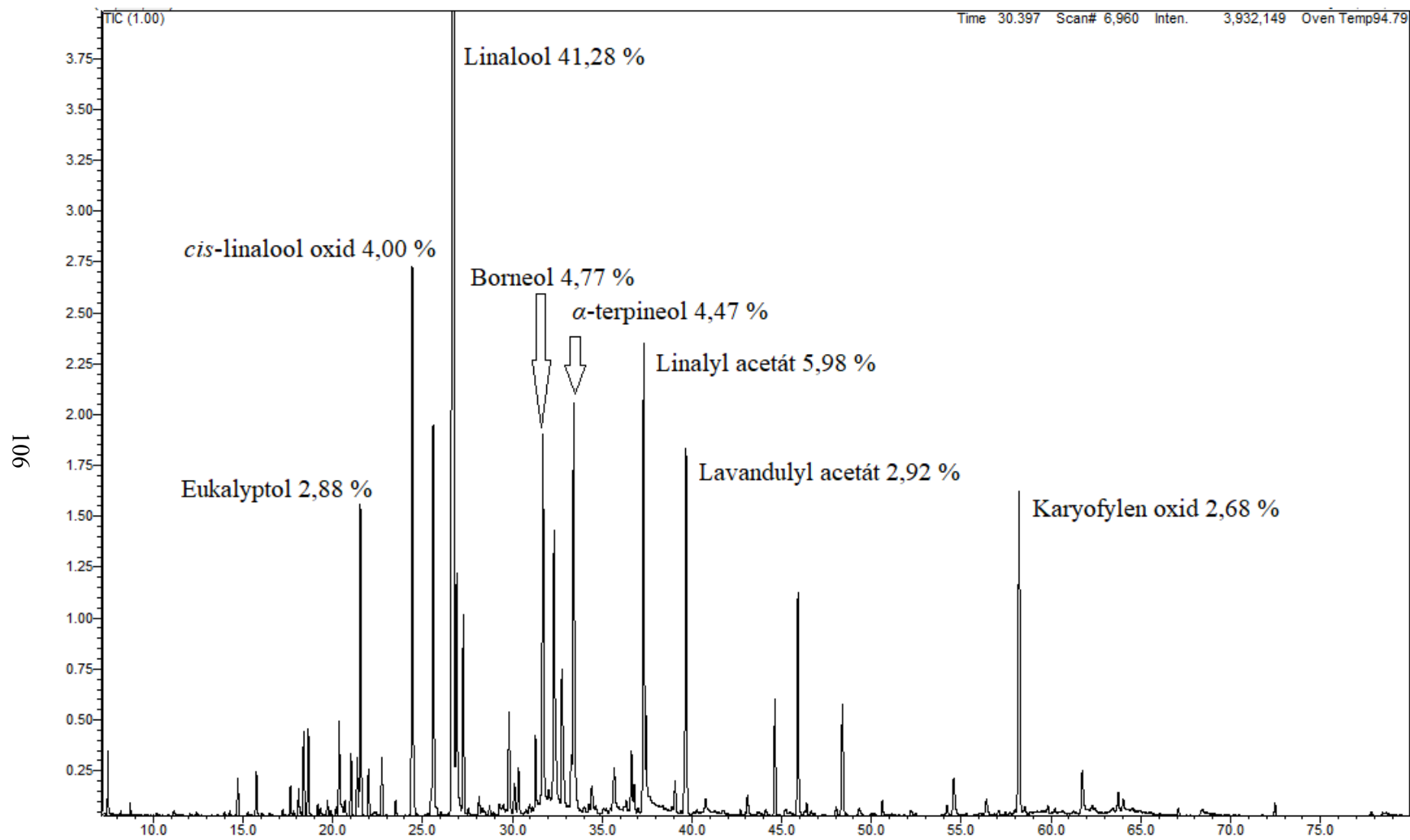
- [87] HERMAN, Anna, Krzysztof TAMBOR a Andrzej HERMAN. Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. *Curr Microbiol*. 2016, (72), 165–172, doi:10.1007/s00284-015-0933-4
- [88] TROMBETTA, Domenico, Francesco CASTELLI, Maria SARPIETRO et al. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005, 6(49), 2474–2478, doi: 10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005
- [89] CHOUHAN, Sonam, Kanika SHARMA a Sanjay GULERIA. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*. 2017, 3(4), 1–21, doi:10.3390/medicines4030058



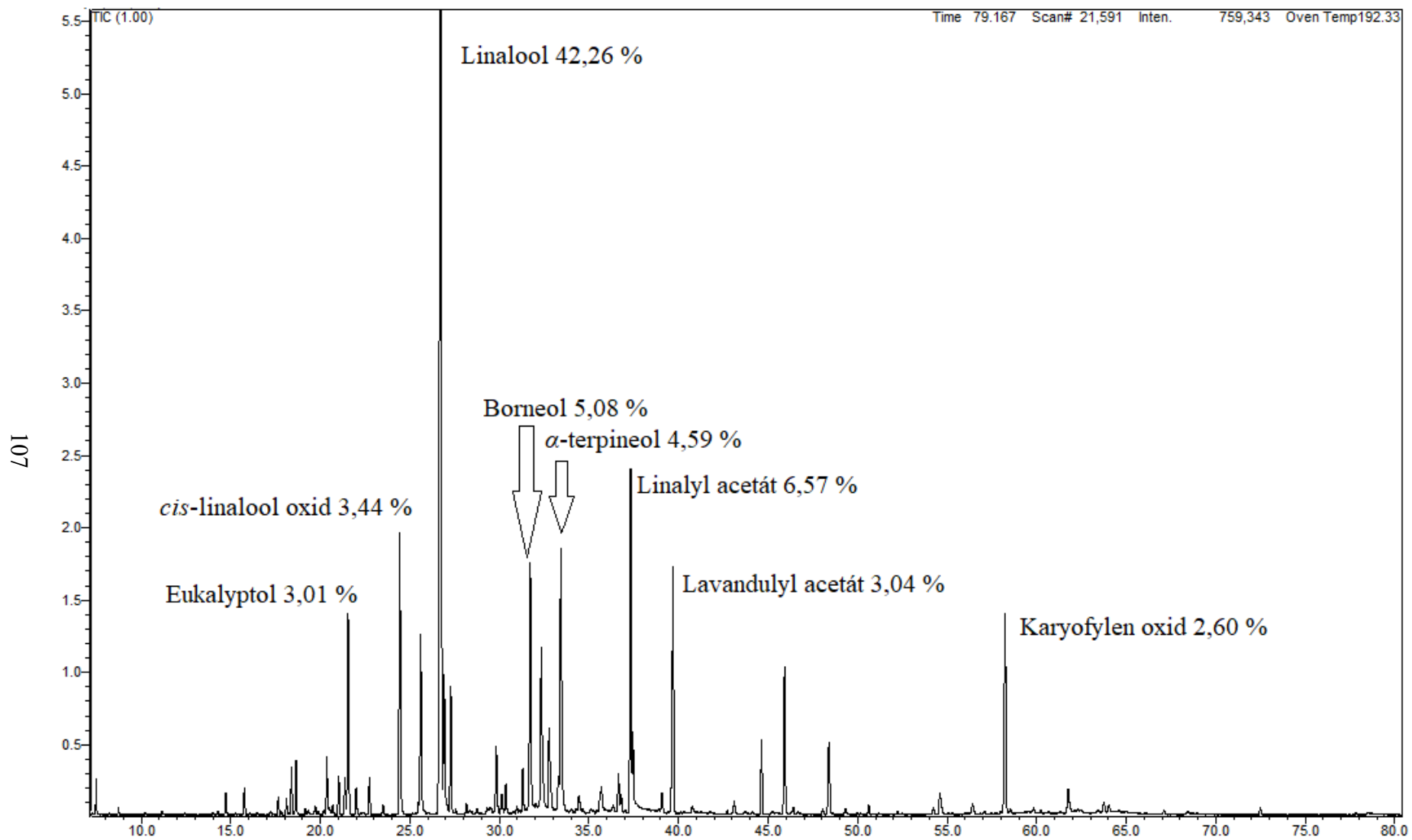
## 9 PŘÍLOHY



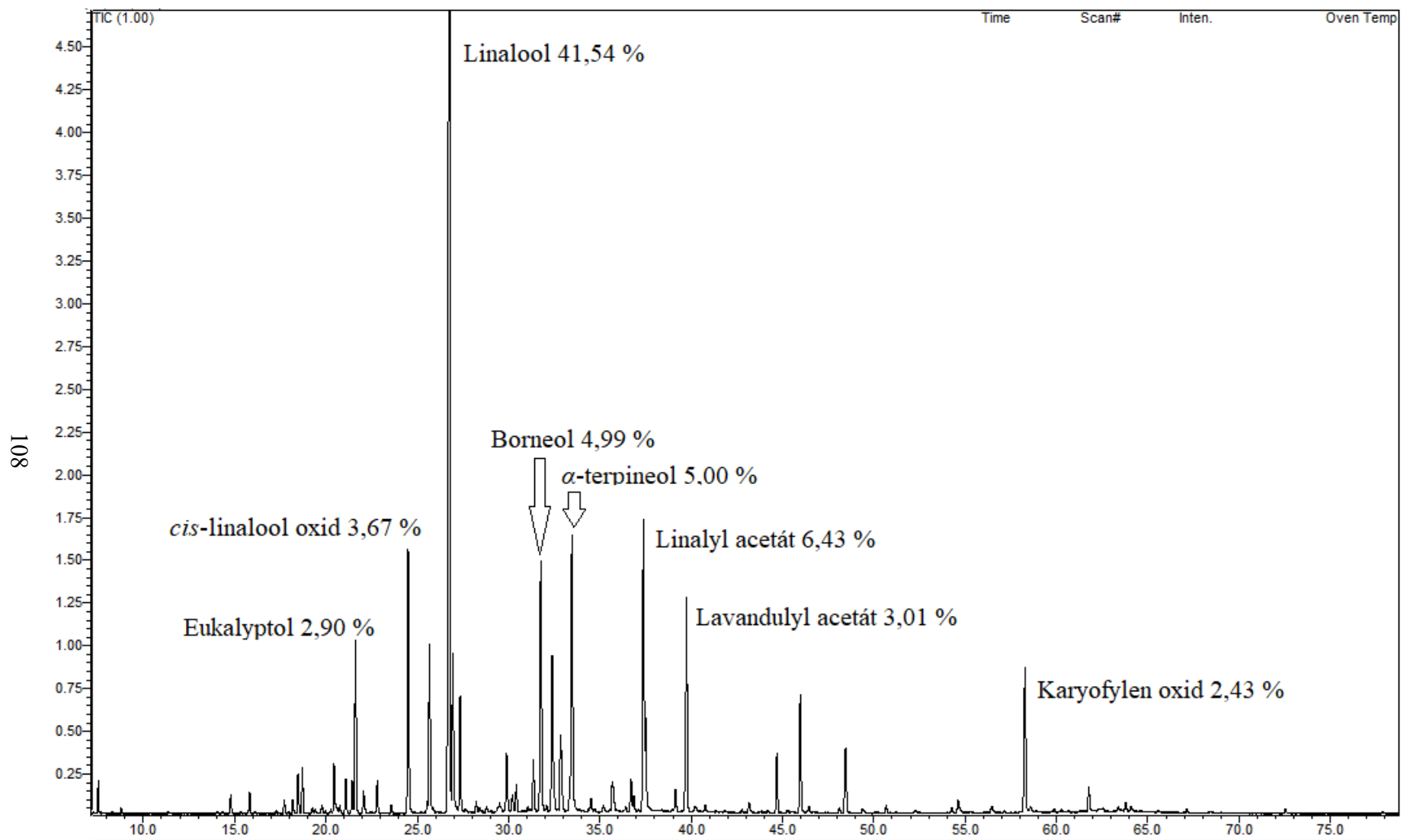
**Příloha 1** Chromatogram GC-MS pro esenciální levandulový olej EO5 s uvedenými příklady identifikovaných látek



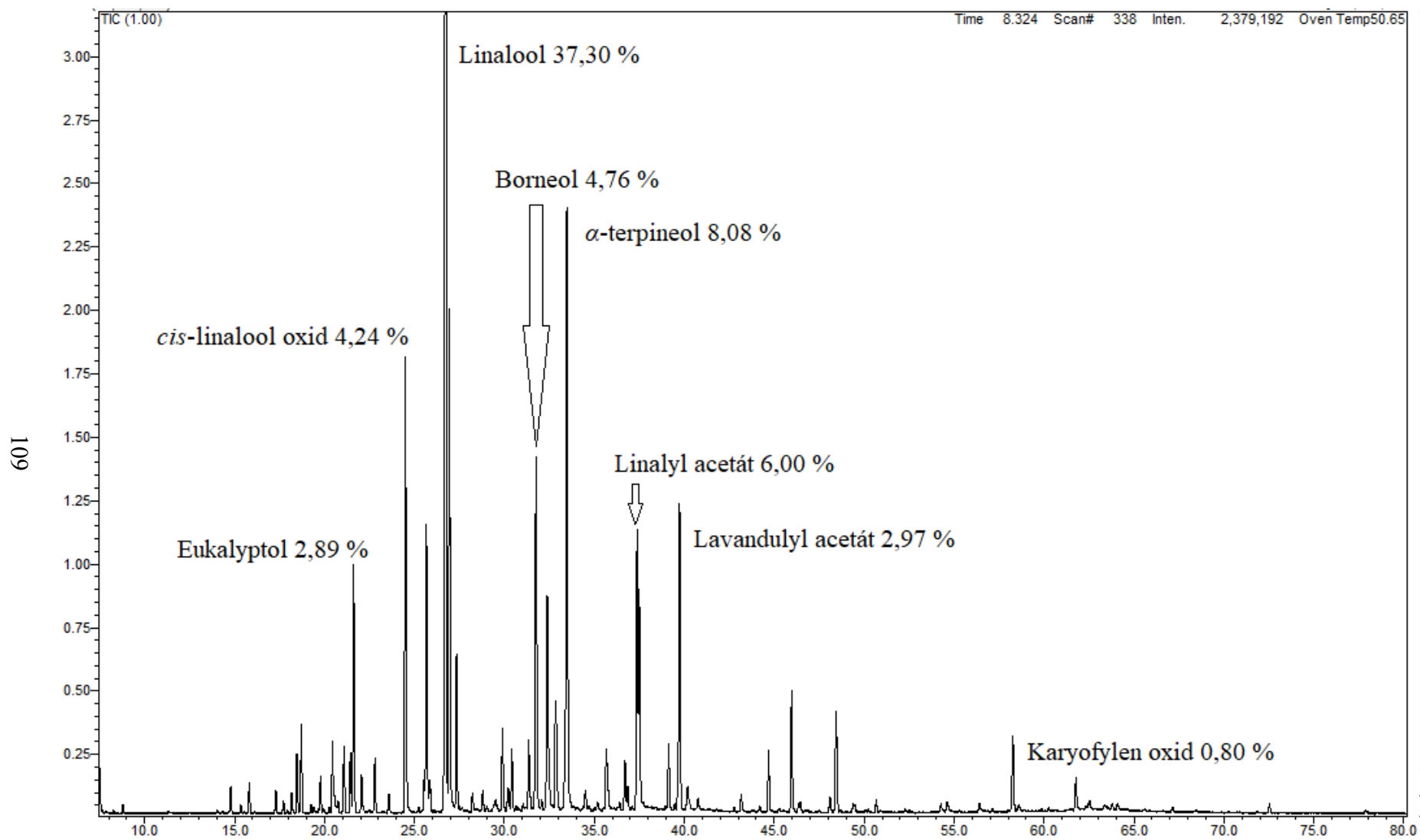
**Příloha 2** Chromatogram GC-MS pro esenciální levandulový olej EO4 s uvedenými příklady identifikovaných látek



**Příloha 3** Chromatogram GC-MS pro esenciální levandulový olej EO3 s uvedenými příklady identifikovaných látek



**Příloha 4** Chromatogram GC-MS pro esenciální levandulový olej EO2 s uvedenými příklady identifikovaných látek



**Příloha 5** Chromatogram GC-MS pro esenciální levandulový olej EO1 s uvedenými příklady identifikovaných látek