

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

*Využití extrakčních metod pro analýzu bioaktivních sloučenin
v rostlinných a potravinářských produktech*

Habilitační práce

Obor: Analytická chemie

2022

Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.

Poděkování

Na tomto místě bych rád vyjádřil své poděkování těm, kteří ovlivnili mou vědeckou a akademickou činnost:

- prof. Karlu Venturovi za příležitost začlenit se mezi vědecké a později i akademické pracovníky,
- kolegům z Katedry analytické chemie za praktické rady, drobné či větší pomoci a příjemné pracovní prostředí.

Největší poděkování ale patří mým rodičům, skvělé manželce Petře a dceři Viktorii, kteří pro mě byli hlavním motivačním prvkem a bez jejichž podpory by k sepsání této práce nedošlo.

Prohlašuji:

Práci s názvem *Využití extrakčních metod pro analýzu bioaktivních sloučenin v rostlinných a potravinářských produktech* jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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 2. 5. 2022

Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.

Obsah

Seznam zkratk

1	Úvod.....	8
2	Využití extrakčních postupů pro analýzu fenolických látek	10
2.1	Extrakce tuhá látka – kapalina.....	10
2.2	Soxhletova extrakce	11
2.3	Extrakce s využitím ultrazvuku.....	11
2.4	Extrakce s využitím mikrovln	12
2.5	Vysokotlaká extrakce kapalinou	12
2.5.1	Extrakce podkritickou vodou	13
2.6	Extrakce nadkritickou tekutinou	13
2.7	Extrakce tuhou fází.....	14
2.7.1	Disperze matrice na tuhé fázi	14
2.8	Nové trendy v extrakčních rozpouštědlech	15
2.8.1	Iontové kapaliny	15
2.8.2	Hluboce eutektická rozpouštědla.....	15
2.9	Praktické aplikace extrakce fenolických sloučenin z rostlinného materiálu.....	15
2.9.1	Extrakce fytoestrogenů a antioxidantů.....	17
2.9.2	Extrakce kapsaicinoidů	17
2.9.3	Analýza fenolických látek v octech	19
2.9.4	Seznam komentovaných publikací pro kapitulu 2	20
3	Využití extrakčních postupů pro analýzu těkavých látek	21
3.1	Lisování.....	21
3.2	Destilační metody.....	22
3.2.1	Vedlejší produkt destilace	23
3.3	Extrakce rozpouštědlem	23
3.3.1	Extrakce nadkritickým CO ₂	24
3.4	Enfleuráž	24

3.5	Extrakce tuhou fází.....	24
3.5.1	Mikroextrakce tuhou fází	24
3.6	Praktické aplikace extrakce těkavých sloučenin z rostlinného materiálu	25
3.6.1	Jakon.....	26
3.6.2	Jitrocel kopinatý	27
3.6.3	Vrbovka malokvětá	27
3.6.4	Bez černý.....	28
3.6.5	Touleň srdčitá, rdesno vonné.....	29
3.6.6	Pimentovník pravý	30
3.6.7	Vavříň ušlechtilý	30
3.6.8	Hydroláty.....	31
3.6.9	Silovoň obecný.....	32
3.6.10	Betelové ořechy.....	33
3.6.11	Rostliny čeledí Alliaceae a Brassicaceae	33
3.6.12	Ovocné destiláty	34
3.6.13	Dřevo	35
3.6.14	Seznam komentovaných publikací pro kapitolu 3	36
4	Ostatní publikované práce.....	38
4.1	Seznam komentovaných publikací pro kapitolu 4	39
5	Přílohy	40
	Kopie publikovaných prací v impaktovaných časopisech	

Seznam zkratk

AOX	antioxidanty
CAP	kapsaicin
DES	hluboce eutektická rozpouštědla
DHC	dihydrokapsaicin
DVB/CAR/PDMS	směsný sorbent divinylbenzen/karboxen/polydimethylsiloxan
EO	esenciální olej
FID	plamenově-ionizační detektor
FS	fenolické sloučeniny
FYT	fytoestrogeny
GC	plynová chromatografie
HD	hydrodestilace
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HS-SPME	mikroextrakce tuhou fází z plynné fáze nad vzorkem
IL	iontové kapaliny
MAE	extrakce s využitím mikrovln
MASE	destilace podporovaná mikrovlnným ohřevem
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie/spektrometr
MSPD	disperze matrice na tuhé fázi
OPLS	ortogonální projekce do latentních struktur
PDMS	polydimethylsiloxan
PHWE	extrakce podkritickou vodou
PLE	vysokotlaká extrakce kapalinou
SD	parní destilace
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou
SHDE	simultánní hydrodestilace-extrakce
SLE	extrakce tuhá látka – kapalina
SOX	soxhletova extrakce
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
UAE	extrakce s využitím ultrazvuku
VOC	těkavé organické sloučeniny

1 Úvod

Bioaktivní sloučeniny přírodního původu patří do velké skupiny chemicky odlišných molekul produkovaných mikroorganismy, plísněmi, houbami, sinicemi, rostlinami a živočichy. Vlastnostmi se jedná o těkavé či netěkavé chemické látky s různými biologickými vlastnostmi. Mezi bioaktivní látky, na které je soustředěna pozornost vědců po celém světě, patří mimo jiné esenciální oleje (EO) a fenolické látky (těkavé i netěkavé).

EO jsou těkavé uhlovodíky a jejich deriváty, známé též jako silice. Jsou téměř nemísitelné s vodou a jsou bohatě zastoupeny zejména v aromatických rostlinách. Vyskytují se buď v celé rostlině, nebo v jejích jednotlivých částech (květy, listy, plody atd.). Jsou to produkty metabolismu rostlin, které mohou vznikat dvěma cestami. Tzv. mevalonátovou cestou vznikají látky terpenické, které zahrnují hlavně monoterpeny (uhlovodíkové a kyslíkaté monoterpeny) a seskviterpeny (uhlovodíkové a kyslíkaté seskviterpeny). Tzv. šikimátovou cestou se tvoří např. kumariny či fenolické sloučeniny. EO jsou tedy komplexní směsi těkavých sloučenin. Díky svému chemickému složení mají silice četné biologické účinky (antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální atd.), které jsou velmi zajímavé pro potravinářský průmysl (použití jako antibakteriální nebo antioxidační látky (Dhifi et al. 2016)) i pro oblast lidského zdraví (výrobky pro každodenní hygienu, aromaterapie). Pro kosmetický průmysl jsou zase významné díky svým vonným vlastnostem.

Fenolické látky jsou běžně obsaženy v potravinách rostlinného původu, kde jsou součástí různorodých skupin sloučenin. Chemicky jsou to látky obsahující aromatický kruh, na kterém je navázána jedna nebo více hydroxylových skupin. Jsou známy především jako antioxidanty, ale mohou plnit i funkci vonných či chuťových látek nebo barviv. Studie ukazují na různé přínosy antioxidačních sloučenin v prevenci celé řady chorobných stavů, čímž se zkoumání fenolických sloučenin z rostlin stalo významnou oblastí výzkumných studií souvisejících se zdravím a medicínou.

V posledních několika desetiletích bylo téměř 65 % (Newman a Cragg 2020) nově schválených léků z oblasti protinádorových a protiinfekčních látek přírodního původu (původní přírodní produkty, produkty odvozené z přírodních produktů nebo syntetické produkty založené na modelech přírodních produktů). To je jeden z rozhodujících faktorů při vývoji nových léků (např. ve formě odvarů, nálevů, tekutých extraktů, tinktur, polotuhých nebo práškových extraktů). V tomto smyslu představuje oblast extrakce bioaktivních sloučenin a identifikace

jejich vlastností jeden ze základních kamenů nejen farmaceutického průmyslu, ale i jiných odvětví výroby, zejména potravinářského a parfumerského průmyslu.

Před izolací, případně purifikací bioaktivních sloučenin je důležité zvolit vhodnou metodu extrakce, což představuje nejdůležitější krok jak při analýze bioaktivních látek, tak při přípravě extraktů jakožto meziproduktů využívaných dále v průmyslové výrobě. Vzhledem ke složitosti rostlinných matric a různým fyzikálně-chemickým vlastnostem bioaktivních látek (např. těkavost, tepelná stabilita a fotostabilita, rozpustnost ve vodě, lipofilní charakter) může být extrakce z rostlinného materiálu obtížným úkolem. Proto je nezbytné identifikovat a optimalizovat důležité parametry extrakce, které ovlivňují kvalitu získaného extraktu.

Tato habilitační práce je rozdělena do tří hlavních kapitol. První kapitola popisuje možnosti analýz vybraných netěkavých fenolických sloučenin v rostlinném materiálu a částečně navazuje na autorovu disertační práci. Druhá kapitola je věnována silicím, jsou zde popsány možnosti jejich získávání jak v komerčním měřítku, tak v laboratorním. V obou kapitolách jsou komentovány vědecké výstupy, na kterých se autor významně podílel, související s danou tématikou, a které byly publikovány v mezinárodních žurnálech. Ve třetí kapitole jsou komentovány publikované práce, které jsou zaměřené na jiná témata, než jsou fenolické látky a silice, ale dokreslují oblast témat řešených autorem. Seznamy komentovaných publikací, seřazených vzestupně podle roku vydání, jsou na koncích hlavních kapitol. Kopie publikovaných prací jsou přiloženy v Přílohách.

2 Využití extrakčních postupů pro analýzu fenolických látek

Fenolické sloučeniny (FS) jsou rozsáhlou skupinou rostlinných sekundárních metabolitů, které jsou široce rozšířeny v rostlinách a následně i potravinách. Obecně se jedná o látky s benzenovým jádrem, na kterém je navázána alespoň jedna hydroxylová skupina. Zástupce FS můžeme najít jak mezi těkavými složkami rostlin, tak i mezi těmi netěkavými. Možnostmi extrakce a analýzy těkavých FS se obecně zabývá kapitola 3, kdežto další text v této kapitole bude věnován netěkavým FS.

Ve skupině fenolických sloučenin bylo zaznamenáno více než 8000 molekul a jejich seznam se stále rozšiřuje. FS se podle chemické struktury dělí především na flavonoidy, třísloviny, fenolové kyseliny, lignany a stilbeny. Existuje mnoho studií, které poukazují na pozitivní účinky fenolických sloučenin, jako jsou antioxidační, antimikrobiální, antikarcinogenní, protizánětlivé účinky, prevence kardiovaskulárních onemocnění, diabetu a nemocí spojených s oxidačním stresem (Alu'datt et al. 2017; Zhang et al. 2022). Před použitím těchto látek ve specifických aplikacích, jako je potravinářský, farmaceutický a kosmetický průmysl, je třeba tyto sloučeniny získávat z přírodních matric, poté analyzovat a charakterizovat. Vývoj účinného postupu pro extrakci, správnou analýzu a charakterizaci FS z různých zdrojů je náročný úkol vzhledem k jejich strukturní rozmanitosti a složitým matricím. V tomto světle se následující přehled zabývá různými metodami extrakce fenolických sloučenin. Jako separační metoda pro analýzu získaných extraktů je používána kapalinová chromatografie, jako detektory obvykle slouží hmotnostní spektrometr a UV či elektrochemický detektor.

2.1 Extrakce tuhá látka – kapalina

Vzhledem k ceně a jednoduchosti provedení je extrakce tuhá látka – kapalina (SLE) nejpoužívanějším typem extrakce FS. Obecně SLE spočívá v přímé extrakci rostlinného materiálu různými organickými rozpouštědly (např. methanol, aceton, ethylacetát, hexan), jejich vzájemnými směsmi či směsmi s vodou. Nelze jednoduše říct, které rozpouštědlo je pro extrakci FS nejvhodnější, nicméně obecně se má za to, že rozpouštědla s vyšší polaritou dosahují lepších výsledků, pokud jde o extrakci FS, a to z důvodu lepší rozpustnosti FS v těchto rozpouštědlech. Klasická SLE obvykle vyžaduje více extrakčních kroků. Není dostatečně selektivní a většinou následuje další proces, např. extrakce tuhou fází, k odstranění nežádoucích látek přítomných v prvotním extraktu. Mnoho dalších typů extrakce vychází z principu SLE, přičemž jsou vhodně modifikovány (např. ultrazvukem, zvýšeným tlakem, teplotou, použitím

mikrovln, případně kombinací těchto faktorů), většinou s cílem zvýšit účinnost extrakce či zkrátit extrakční čas.

2.2 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce (SOX) patří mezi tradiční extrakční metody. Je jednou z nejoblíbenějších technik extrakce analytů z pevných materiálů. Od svého objevu v roce 1879 (Soxhlet 1879) se standardní Soxhletova technika rutinně používá v analytických laboratořích. Hlavní výhodou SOX je velmi jednoduchá obsluha a nízké pořizovací náklady. Extrakční rozpouštědlo je ve varné baňce zahříváno k bodu varu, po odpaření prochází do chladiče, kde kondenzuje a skapává na vzorek, který je umístěn v extrakční patroně. Složky vzorku rozpustné v použitém rozpouštědle jsou uvolňovány, vzniklý extrakt je přepadem vrácen zpět do varné baňky a celý proces se periodicky opakuje po zvolenou dobu. Vzorek je tedy vždy extrahován čistým rozpouštědlem a ve varné baňce jsou koncentrovány složky uvolněné ze vzorku. Nevýhodou je časová náročnost celého procesu (obvykle v řádech hodin až desítek hodin), vysoká spotřeba rozpouštědel a omezené použití směsí rozpouštědel. Vzhledem k nevýhodám tedy byly jednak vyvíjeny jiné extrakční postupy (např. extrakce s využitím ultrazvuku či mikrovln, extrakce kapalinou za vysokého tlaku, extrakce nadkritickou tekutinou), jednak byl tradiční postup SOX modifikován (automatizovaná SOX, SOX s využitím mikrovln či ultrazvuku, vysokotlaká Soxhletova extrakce). Dodnes ale zůstává Soxhletova extrakce standardní metodou, s níž se porovnává výkonnost moderních extrakčních technik.

2.3 Extrakce s využitím ultrazvuku

Úprava vzorků před analýzou pomocí ultrazvuku je jedním z mnoha extrakčních postupů používaných v analytické chemii. V případě extrakce fenolických látek z rostlinného materiálu se jedná o klasickou extrakci SLE podpořenou ultrazvukem, který zvyšuje účinnost extrakce z rostlinných vzorků destrukcí buněčných stěn rostlin. Při použití ultrazvuku se využívá tzv. kavitace, což je jev, při kterém vlivem lokálního poklesu tlaku během cyklického stlačování a zředování kapaliny vznikají v kapalině plynové dutiny, naplněné parami kapaliny. Po vzniku kavitace může kavitační bublina projít dvěma různými druhy radiálních oscilací. Buď může kmitat nelineárně během mnoha cyklů akustické vlny (tzv. stabilní kavitace) nebo může rychle růst a prudce se zhroutit neboli implodovat (tzv. přechodná kavitace). Během imploze bubliny okolní kapalina rychle proudí, aby vyplnila prázdňé místo vytvořené kolabující bublinou. Výsledkem tohoto proudění je intenzivní rázová vlna, která je vhodná např. pro čištění povrchů (při nižší kavitační energii) nebo např. pro destrukci rostlinných tkání (při vyšší kavitační

energii). Při implozi bubliny může být také v závislosti na kavitační energii dosaženo vysokého tlaku a teploty. Dva z faktorů, které ovlivňují velikost kavitačních bublin a odpovídající kavitační energii, jsou frekvence ultrazvukové vlny a její amplituda. Konkrétně při vyšších vlnových frekvencích je kratší doba pro růst bublin, výsledkem jsou menší bubliny a odpovídající snížení kavitační energie. Vyšší amplituda vlny způsobuje větší kavitační bubliny a větší kavitační energii (Azar 2009).

Časová náročnost extrakcí s využitím ultrazvuku (UAE) je ve srovnání s klasickou SLE nižší a klesá také počet potřebných extrakčních kroků. V principu existují dvě možnosti, jak ultrazvuk zavádět do vzorku. První možností je systém využívající ultrazvukovou sondu k přenosu ultrazvuku přímo do rozpouštědla se vzorkem. Druhou možností je ultrazvuková lázeň, kde ultrazvuk obvykle prochází přes pracovní lázeň a stěny nádoby, ve které je vzorek s extrakčním rozpouštědlem. Výsledky UAE závisí, kromě parametrů důležitých pro SLE, nejen na parametrech ultrazvuku, ale také na použitém ultrazvukovém systému. To vše může ovlivnit celkové výtěžky extrakce, zejména v případě pevných vzorků. Proto může být volba ultrazvukového systému, vhodné frekvence a výkonu ultrazvuku klíčovým bodem celého analytického procesu.

2.4 Extrakce s využitím mikrovln

Extrakce s využitím mikrovln (MAE) využívá přímého účinku mikrovlnného záření na kinetiku extrakce, kdy dochází k rychlému zahřívání extrakčního činidla pomocí mikrovlnného záření. Mezi hlavní parametry důležité pro MAE patří nejen mikrovlnný výkon, doba extrakce, rozpustnost extrahovaných sloučenin v extrakčním činidle, ale např. i dielektrická konstanta extrakčního činidla. Při vývoji metod pro extrakci fenolických látek rostlinného původu je tak potřeba optimalizovat několik parametrů MAE, včetně polaritu a objemu extrakčního činidla či množství vzorku. MAE nabízí, podobně jako UAE, mnoho výhod, jako je zkrácení doby extrakce, snížení spotřeby rozpouštědla, možnost současné extrakce více vzorků. Ve spojení s UAE představuje atraktivní alternativu ke konvenčním přístupům k extrakci fenolických látek. (Eskilsson a Bjorklund 2000)

2.5 Vysokotlaká extrakce kapalinou

Technika vysokotlaké extrakce kapalinou (PLE, také označována jako PFE nebo ASE) byla představena v roce 1995 (Richter et al. 1995) a s nástupem automatických extraktorů (Richter et al. 1996) je komerčně využívána od roku 1996. Při PLE je vzorek umístěn v extrakční cele. Extrakce probíhá při teplotách přesahujících teplotu varu extrakčního rozpouštědla, což vede

k nutnosti použití dostatečně vysokého tlaku, aby se rozpouštědlo udrželo v kapalném stavu. Zvyšováním teploty roste rozpouštěcí kapacita solventu vůči extrahovaným látkám, zvyšuje se difúzní rychlost, snižuje se viskozita a povrchové napětí rozpouštědla, čímž se zlepšuje kontakt mezi extrahovanými látkami a extrakčním činidlem (Giergielewicz-Mozajska et al. 2001). Nevýhodou PLE je instrumentální náročnost. Při PLE je možné používat rozpouštědla běžná pro extrakci kapalinami, dokonce je možné za vhodných teplot a tlaků používat vodu, která zde má jedinečné postavení díky své ekologické šetrnosti.

2.5.1 Extrakce podkritickou vodou

Extrakcí podkritickou vodou (PHWE) se rozumí extrakce vodou o vysoké teplotě a vysokém tlaku, ale zároveň pod kritickým bodem (374 °C, 22,1 MPa). Užitečnou vlastností podkritické vody je, že její polarita se s rostoucí teplotou významně snižuje (Archer a Wang 1990). Podkritická voda se proto v závislosti na teplotě a tlaku může chovat podobně jako rozpouštědla používaná při extrakci kapalinami. Tato „laditelná“ vlastnost umožňuje provádět skupinově selektivní extrakce, jako je extrakce polárních sloučenin při nižších teplotách a méně polárních složek při vyšších teplotách. Například při teplotě 200 °C a tlaku 20 MPa má voda relativní permitivitu srovnatelnou s methanolem při laboratorní teplotě, přičemž methanol je jedno z běžně používaných rozpouštědel pro extrakci fenolických látek z rostlinného materiálu. Díky tomu je podkritická voda velmi vhodnou a zároveň ekologickou extrakční kapalinou pro extrakci fenolických sloučenin. Nevýhodou při provádění extrakce podkritickou vodou je náročná instrumentace a také potenciální degradace organických látek za vysokých teplot.

2.6 Extrakce nadkritickou tekutinou

Při extrakci nadkritickou tekutinou (SFE) se jako extrakční činidla používají látky v nadkritickém stavu. Dá se použít např. oxid uhličitý, ethan, butan, pentan, oxid dusný, amoniak. Díky svým vlastnostem je ale používán v podstatě pouze CO₂, jelikož má nízký kritický tlak (7,4 MPa) i teplotu (31 °C), je nepolární, netoxický, nehořlavý, levný. Některé vlastnosti nadkritického CO₂ se blíží kapalinám (hustota) a jiné se blíží plynům (viskozita). Hustota nadkritického CO₂ je vyšší než plynného CO₂, což zvyšuje jeho solvatační sílu. V porovnání s kapalinami má nízkou viskozitu, vyšší difúzní koeficient a nulové povrchové napětí, což umožňuje rychlejší přestup hmoty než u běžných extrakčních kapalin. Jelikož se v případě extrakce bioaktivních látek jedná převážně o extrakce z tuhých materiálů, nulové povrchové napětí může výrazně urychlit penetraci rozpouštědla do matrice. Rozpustnost látky v nadkritickém CO₂ závisí nejen na tlaku a teplotě, ale může být ovlivněna přídavkem

tzv. modifikátoru. Jedná se o organické látky (např. methanol, ethanol, aceton,...), které se přidávají k nadkritickému CO₂ obvykle v množství do 5% a tím se mění polarita extrakčního činidla. Toho se využívá např. při extrakci fenolických sloučenin, kdy je přídavek polárního modifikátoru do nadkritického CO₂ nutností. Záchyt extraktu se realizuje při atmosférickém tlaku, kdy se veškerý CO₂ odpaří a zůstanou pouze vyextrahované látky. V případě nutnosti se záchyt extrahovaných látek provádí do malého množství rozpouštědla či na sorbent. Velkou výhodou SFE je žádná nebo jen minimální spotřeba organických činidel (modifikátor, záchyt extraktu). Nedostatkem SFE metody je obtížná extrakce polárních sloučenin a také náročná instrumentace.

2.7 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (SPE) je metoda zakoncentrovávání cílových sloučenin z kapalných, případně plyných vzorků. V řadě případů se také používá k přečištění vzorků či extraktů od nežádoucích příměsí, přičemž obojí se dá kombinovat v jednom extrakčním kroku. SPE se případně dá použít také pro změnu rozpouštědla vzorku.

Po výběru vhodného sorbentu nastává fáze smočení, kdy je sorbent solvatací předepsaným rozpouštědlem připraven na interakci se složkami vzorku. Při samotné SPE je v prvním kroku vzorek prosáván přes sorbent, kde dochází k zachycení cílových sloučenin, případně i nežádoucích příměsí. Příměsí jsou poté vymyty pomocí vhodně zvoleného rozpouštědla. V posledním kroku jsou cílové sloučeniny desorbovány elučním rozpouštědlem. V praxi se obvykle používají tzv. SPE kolonky (plastová stříkačka bez pístu, zčásti naplněná sorbentem) nebo SPE patronky. Vzhledem ke složitosti rostlinných matic je SPE běžně používána k přečištění a odstranění koextrahovaných složek z extraktů získaných jinými extrakčními technikami.

Výhodami SPE jsou jednoduché provedení, variabilita stacionární fáze (sorbentů), velká propustnost vzorků a také možnost skladování, případně transportu, vzorků pomocí SPE kolonek.

2.7.1 Disperze matrice na tuhé fázi

Disperze matrice na tuhé fázi (MSPD) je metoda přípravy vzorků, kterou lze přímo použít pro polotuhé, tuhé a viskózní vzorky. MSPD poprvé představil Barker a kol. v roce 1989 (Barker et al. 1989). Na rozdíl od SPE, před níž je nutná extrakce cílových sloučenin z tuhého vzorku rozpouštědlem, lze při použití MSPD vzorky přímo smíchat se sorbenty (např. třením v třecí misce) tak, aby se získala homogenní směs. Ta se převede do prázdné SPE kolonky či patronky,

promyje se a poté jsou cílové sloučeniny eluovány kapalnými rozpouštědly. MSPD také eliminuje kroky předběžné úpravy extraktu, jako je odstředování a filtrace.

2.8 Nové trendy v extrakčních rozpouštědlech

V poslední době je v oblasti extrakčních metod patrný jasný trend směřující k vývoji nových extrakčních rozpouštědel jako alternativy nahrazující organická rozpouštědla, která jsou vyrobená z ropy a jsou těkavá, hořlavá a označována jako nebezpečná. Dalším motivem je zefektivnění celého extrakčního procesu, tzn. zvýšení výtěžků a snížení nákladů. To vše s co nejnižšími dopady na životní prostředí. Taková rozpouštědla se začínají uplatňovat i v extrakci fenolických sloučenin.

2.8.1 Iontové kapaliny

Iontové kapaliny (IL) byly navrženy jako slibná média pro extrakci a separaci bioaktivních látek nejrůznějšího původu. Jsou to soli v kapalném skupenství s bodem tání nižším než 100 °C, jež jsou tvořeny kombinací organických kationtů a organických či anorganických aniontů. Největší předností těchto látek je to, že jsou to tzv. designová rozpouštědla. Vhodným výběrem iontových součástí a začleněním funkčních skupin do jejich struktury lze cíleně připravit IL, které mají specifické fyzikálně-chemické vlastnosti, jako jsou viskozita či schopnost interakce s jinými chemickými látkami (Ventura et al. 2017).

2.8.2 Hluboce eutektická rozpouštědla

Hluboce eutektická rozpouštědla (DES) jsou při laboratorní teplotě kapalná rozpouštědla vzniklá ze dvou tuhých materiálů s vyšší teplotou tání. Typickým příkladem je směs močoviny (bod tání 133 °C) a cholin chloridu (bod tání 302 °C). Poprvé byla DES představena v práci Abbotta a kol. (Abbott et al. 2003). Tyto látky mají některé vlastnosti podobné IL, zároveň bývá vyzdvihována jejich snadná příprava, možnost cíleného ladění specifických vlastností výsledného rozpouštědla a také to, že jsou založené na obnovitelných surovinách s nízkou toxicitou a velmi dobrou biologickou rozložitelností (Farias et al. 2017). Minimálně poslední tvrzení ale bývá v některých případech zpochybňováno.

2.9 Praktické aplikace extrakce fenolických sloučenin z rostlinného materiálu

V této kapitole jsou shrnuty výsledky výzkumu zaměřeného na extrakci fenolických sloučenin (viz Tabulka 1) z různých rostlinných matric a publikovaného v odborných časopisech.

Tabulka 1 Základní informace o rostlinných vzorcích, cílových analytech a použitých extrakčních metodách, kterými se autor zabýval v rámci publikovaných prací o analýze fenolických sloučenin

Cílové analyty	Stav a forma vzorku	Použité extrakční metody	Zdroj
Apigenin, Biochanin A, Daidzein, Genistein, Kaempferol, Kumestrol, Kumarin, Eskuletin, Umbelliferon, Bergapten, Kvercetin, Rutin, Skopoletin, Xantotoxin	Sušené listy bylin: <i>Matricaria recutita</i> L., <i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Foeniculum vulgare</i> Mill., <i>Agrimonia eupatoria</i> L., <i>Medicago sativa</i> L., <i>Calendula officinalis</i> L., <i>Hyssopus officinalis</i> L., <i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Ononis spinosa</i> L., <i>Rhaponticum carthamoides</i> L., <i>Valeriana officinalis</i> L. <i>Melissa officinalis</i> L., <i>Symphytum officinale</i> L., <i>Tropaeolum majus</i> L., <i>Verbena officinalis</i> L., <i>Helianthus tuberosus</i> L., <i>Betonica officinalis</i> L., <i>Tanacetum vulgare</i> L., <i>Levisticum officinale</i> L., <i>Genista tinctoria</i> L.	MSPD PLE SFE SPE UAE SOX	Příloha 1,2
Kapsaicin Dihydrokapsaicin Nordihydrokapsaicin Nonivamid	Chili papriky čerstvé, sušené, chili koření: <i>Capsicum chinense</i> Jacq., <i>Capsicum frutescens</i> L., <i>Capsicum annum</i> L.	PHWE SOX UAE	Příloha 3,4
tyrosol, tryptofol, homovanilalkohol, 4-methylcatechol, pyrogallol, resveratrol, koniferol, eugenol, 2,6-dimethoxyfenol, 4-vinylguaiakol, 4-vinylfenol, 4-ethylguaiakol, salicylaldehyd, protokatechualdehyd, syringaldehyd, 4-hydroxybenzaldehyd, 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyd, ethylvanilát, ethylgalát, ethyl 3,4-dihydroxycinnamát, katechin, epikatechin, rutin, skopoletin, vanilin, 4-hydroxy-3-methoxyfenylaceton, kyselina p-kumarová, kyselina kávová, kyselina syringová, kyselina gallová, kyselina salicylová, kyselina protokatechová	Balzamikové octy s různou deklarovanou kvalitou a původem	-	Příloha 5

2.9.1 Extrakce fytoestrogenů a antioxidantů (Příloha 1,2)

Fytoestrogeny (FYT) jsou velká skupina substituovaných rostlinných fenolických sloučenin, které jsou strukturně nebo funkčně podobné estrogenům savců, zejména 17 β -estradiolu, a mají estrogení a/nebo antiestrogení účinky. Tyto účinky jsou zprostředkovány vazbou na estrogenové receptory a změnou koncentrací endogenních estrogenů. Klasifikace fytoestrogenů je kontroverzní, jedním z klasifikačních systémů je rozdělení fytoestrogenů do čtyř hlavních tříd: flavonoidy (flavony a isoflavony), lignany, kumenstany a stilbeny (Bacciottini et al. 2007). FYT se nacházejí v celé řadě potravin, zejména v sóji. Často se jim přisuzuje řada zdravotních výhod, včetně nižšího rizika osteoporózy, srdečních onemocnění, rakoviny prsu a menopauzálních symptomů, ale mnohé z nich jsou také považovány za endokrinní disruptory, což znamená, že mají potenciál způsobovat také nepříznivé zdravotní účinky. Odpověď na otázku, zda jsou fytoestrogeny pro lidské zdraví prospěšné, nebo škodlivé, je tedy složitá a může záviset na věku, zdravotním stavu a dokonce i na přítomnosti či nepřítomnosti specifické střevní mikroflóry (Patisaul a Jefferson 2010).

Antioxidanty (AOX) jsou přírodní nebo syntetické látky, které mohou chránit biomolekuly před působením volných radikálů. Nejvýznamnější skupinou přírodních antioxidantů jsou tokoferoly (vitamin E), flavonoidy a kumariny (Cherng et al. 2008). Zdrojem přírodních antioxidantů jsou rostliny, kde se tyto sloučeniny vyskytují ve všech částech rostliny. Významnými zdroji jsou např. ovoce a zelenina. Bylo zjištěno, že strava bohatá na zeleninu a ovoce může být jednou z příčin nižšího rizika výskytu některých onemocnění, např. rakoviny, srdečních chorob a mrtvice (Gilgun-Sherki et al. 2002; Chen a Chen 2013).

Pro stanovení fytoestrogenů a antioxidantů v sušených listech vybraných bylin byly použity různé extrakční metody (viz Tabulka 1). Extrakční parametry jednotlivých metod byly optimalizovány a vzniklé extrakty byly podle potřeby přečištěny pomocí SPE (kromě extraktu získaného metodou MSPD). Byl zjištěn zásadní vliv druhu sorbentu na výtěžnost SPE, osvědčil se směsný sorbent, kopolymer *N*-vinylpyrrolidonu a divinylbenzenu. Naopak u nepolárních sorbentů byl zjištěn nízký výtěžek testovaných sloučenin. Celkové výsledky stanovení fytoestrogenů a antioxidantů ukázaly, že vhodnými metodami extrakce jsou pro tento účel Soxhletova extrakce a extrakce ultrazvukem, a to konkrétně při použití sondy, kdy byl ultrazvuk o frekvenci 20 kHz a výkonu 90 W zaváděn přímo do rozpouštědla se vzorkem.

2.9.2 Extrakce kapsaicinoidů (Příloha 3,4)

Kapsaicinoidy jsou rostlinné alkaloidy zodpovědné za pálivou chuť chilli paprik. Pro savce včetně člověka je dráždivý a vyvolává pocit pálení v tkáni, se kterou přijde do styku. Jsou to

sekundární metabolity rostlin, které nalezneme pouze u rodu *Capsicum*, tedy u paprik. Jedná se dokonce o jedny z nejvyužívanějších rostlinných metabolitů na celém světě vzhledem ke skutečnosti, že asi jedna čtvrtina lidí denně konzumuje chilli. Obecně se v chilli papričkách vyskytují dva hlavní kapsaicinoidy, a to kapsaicin a dihydrokapsaicin, které představují přibližně 77-98 % celkového obsahu kapsaicinoidů v papričkách (Barbero et al. 2014). Kromě těchto dvou hlavních kapsaicinoidů se v pálivých paprikách vyskytují i další méně významné kapsaicinoidy, jako jsou nordihydrokapsaicin, norkapsaicin, homokapsaicin, homodihydrokapsaicin, nornorkapsaicin, nornornorkapsaicin a nonivamid (Barbero et al. 2006). Pálivost chilli papriček se popisuje pomocí tzv. Scovilleho jednotek pálivosti. Hlavní charakteristickou vlastností kapsaicinoidů je vazba na receptory bolesti a tepla. Bezprostředně po kontaktu s kůží může způsobit silnou bolest díky přímému působení na sensorická nervová vlákna. Kapsaicin má antimutagenní (Huynh a Teel 2005) a antikarcinogenní (Anandakumar et al. 2013) vlastnosti a má analgetické a protizánětlivé účinky (Surh et al. 1998; Ercan et al. 2013; Martini et al. 2013).

Kapsaicinoidy byly extrahovány různými rozpouštědly s využitím ultrazvuku a podkritickou vodou, výsledky obou metod byly porovnány se Soxhletovou extrakcí methanolem jako se standardní metodou. Jak ultrazvukové extrakce, tak extrakce podkritickou vodou byly ve srovnání se Soxhletovou extrakcí účinnější z pohledu výtěžnosti kapsaicinoidů. U ultrazvukových metod byl jasně patrný vliv polarit rozpuštědla na výtěžnost extrakce, která klesala následovně: methanol – aceton – ethylacetát – hexan, tedy se snižující se polaritou rozpouštědla. Použití ultrazvukové sondy se, stejně jako v případě fytoestrogenů a antioxidantů, ukázalo vhodnější než použití ultrazvukové lázně. Výsledky ukazují, že jak frekvence ultrazvuku, tak i jeho amplituda (výkon) mají vliv na výtěžnost extrakce. Nižší frekvence a vyšší amplituda ultrazvuku měly za následek vyšší výtěžnost extrakce, přičemž vliv amplitudy vlny byl výraznější. Pro extrakce kapsaicinoidů pomocí ultrazvuku je tedy vhodné použít vyšší kavitační energii, aby došlo k lepšímu rozrušení rostlinné matrice a uvolnění kapsaicinoidů do extrakčního rozpouštědla. U extrakce podkritickou vodou byl pozorován zajímavý jev. Poměr dvou majoritních kapsaicinoidů, kapsaicinu (CAP) ku dihydrokapsaicinu (DHC), byl prokazatelně závislý na teplotě extrakce. Ač si jsou tyto dvě sloučeniny strukturně velmi podobné, tak se zvyšující se teplotou se v extraktech poměr CAP/DHC snižoval. Bližší zkoumání ukázalo, že s teplotou extrakce se sice postupně zvyšoval obsah obou kapsaicinoidů, ale u DHC byl vliv teploty významnější.

2.9.3 Analýza fenolických látek v octech (Příloha 5)

Balzamikový ocet je jedním z nejznámějších a nejoblíbenějších druhů octa a je bohatým zdrojem polyfenolických látek. Kvalita balzamikového octa i obsah fenolických látek se liší v závislosti na způsobu výroby. Tradice a historie jeho výroby jsou úzce spjaty s italskými provinciemi Modena a Reggio Emilia. Proto v roce 2000 získal chráněné označení původu, které umožňuje vyrábět produkty s názvem "tradiční balzamikový ocet z Modeny" (TBVM) nebo "z Reggio Emilia" (TBVRE) a "balzamikové octy z Modeny" (BVM) nebo "z Reggio Emilia" (BVRE) pouze v těchto italských provinciích a za použití stanovených postupů. Ostatní výrobky označované jako "balzamikový ocet" mohou být vyráběny kdekoli ve zbytku světa (Rada Evropské unie, 2000).

V této práci byla vyvinuta metoda pro komplexní charakterizaci obsahu fenolických látek v balzamikových octech založená na kombinaci plynové chromatografie (GC) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí v jednoduchém režimu (MS) a tandemovém režimu (MS/MS). Celkem bylo analyzováno 14 vzorků různých typů balzamikového octa. Separační podmínky a detekční parametry HPLC-MS/MS byly optimalizovány a použity pro stanovení 29 fenolických sloučenin a 6 fenolických kyselin. Profil fenolických sloučenin byl doplněn semikvantitativní analýzou těkavých organických látek pomocí GC-MS po optimalizované mikroextrakci tuhou fází z parního prostoru (HS-SPME, více o technice extrakce v kapitole 3.5.1). Jako hlavní fenolické sloučeniny v balzamikových octech byly identifikovány kyselina gallová, kyselina protokatechová, kyselina kávová a kyselina *p*-kumarová. Mezi jednotlivými druhy balzamikových octů byly zjištěny významné rozdíly v celkovém obsahu fenolických sloučenin. Pro identifikaci těkavých fenolických sloučenin byla použita metoda HS-SPME-GC-MS a pro semikvantitativní analýzu metoda HS-SPME-GC-FID. Porovnáním výsledků analýz získaných použitými metodami bylo dosaženo komplexní charakterizace vzorků, kterou lze využít pro kategorizaci balzamikových octů. Dále bylo zjištěno, že některé fenolické sloučeniny mohou být potenciálními ukazateli kvality balzamikových octů.

2.9.4 Seznam komentovaných publikací pro kapitulu 2

Seznam publikací komentovaných v kapitole 2, řazeno vzestupně podle data vydání. Kopie prací viz přílohy.

Bajer, T., Adam, M., Galla, L., Ventura, K.: *Comparison of various extraction techniques for isolation and determination of isoflavonoids in plants*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(1): 122-127.

Bajerová, P., Adam, M., **Bajer, T.**, a Ventura, K.: *Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants*. Journal of Separation Science, 2014. **37**(7): 835-844.

Bajer, T., Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A., Ventura, K.: *Central composite design of pressurised hot water extraction process for extracting capsaicinoids from chili peppers*. Journal of Food Composition and Analysis, 2015. **40**(0): 32-38.

Bajer, T., Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A., Adam, M., Ventura, K.: *Comparison of Two Ultrasonic Systems with Different Settings for Extraction of Capsaicinoids from Chili Peppers*. International Journal of Food Engineering, 2016. **12**(6): 567-576.

Kašpar, M., **Bajer, T.**, Bajerová, P., Česla, P.: *Comparison of Phenolic Profile of Balsamic Vinegars Determined Using Liquid and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry*. Molecules, 2022. **27**: 1356.

3 Využití extrakčních postupů pro analýzu těkavých látek

Silice lze získat z různých částí rostlin různými extrakčními metodami (viz Tabulka 2). Výběr metody obvykle závisí na použitém botanickém materiálu (např. druh rostliny), dalším zvažovaným parametrem je stav (čerstvý, sušený) a forma (listy, kořeny, semena, květy, atd.) materiálu. Metoda extrakce je jedním z hlavních faktorů, které určují kvalitu extraktu. Nevhodný postup extrakce může vést ke změně chemických znaků výsledného produktu, což může mít za následek např. ztrátu bioaktivity a přírodních vlastností.

Kromě postupů uvedených v Tabulce 2 existuje řada dalších extrakčních metod, které ale nemají komerční využití a používají se zejména v laboratorním měřítku pro kontrolu kvality a chemickou analýzu silic. Mezi tyto metody patří např. hydrodestilace v Clevengerově aparatuře, headspace extrakce či mikroextrakce tuhou fází.

Jako separační metoda pro analýzu produktů destilace či extrakce silic je používána zejména plynová chromatografie, jako detektory jsou využívány hmotnostní spektrometr a plamenově-ionizační detektor (FID).

Tabulka 2 Komerčně využívané metody získávání silic

Metoda extrakce	Rostlinný materiál	
Lisování	Citrusové plody	
Destilace	Hydrodestilace	Různý rostlinný materiál
	Parní destilace	Rostlinný materiál s vyšším obsahem látek náchylných na hydrolýzu či tepelnou degradaci
Extrakce rozpouštědlem	Květy s nízkým obsahem silic	
Extrakce nadkritickým CO ₂	Různý rostlinný materiál	
Enfleuráž – extrakce tukem	Jasmín, bělokvět hlíznatý	

3.1 Lisování

Mechanické lisování je pro svou jednoduchost komerčně používané pro produkci EO z citrusových plodů. EO se u citrusů nacházejí v olejových váčcích ve slupce, kterou stačí zmáčknout, olejové váčky prasknou a esenciální olej volně vytéká ven. Výsledkem tohoto procesu je vodnatá emulze, která se následně odstředí, aby se oddělil esenciální olej. Důvodem pro extrakci silic z citrusových slupek mechanickými metodami je tepelná nestabilita

přítomných aldehydů. Esenciální oleje z jiných než citrusových plodů se touto metodou obvykle nezískávají. (Pybus a Sell 1999; Preedy 2016)

3.2 Destilační metody

Nejčastěji používanou metodou získávání EO z rostlin je destilace. Destilačních zařízení různého provedení je po celém světě mnoho, od primitivních, které jsou typické pro rozvojové země, po technologicky vyspělejší a počítačově podporovaná zařízení v průmyslově vyspělých zemích. Fungují na principu kódestilace jednotlivých složek silic s vodní párou.

Nejjednodušším typem destilace EO je hydrodestilace (HD), při které je extrahovaný materiál ponořen do vroucí vody. Rostlinný materiál během varu nasákne vodou a olej obsažený v olejových buňkách difunduje přes buněčné stěny pomocí osmózy. Jakmile olej difunduje z olejových buněk, vypaří se a je odváděn spolu s vodní párou do chladiče, vznikající kondenzát je potom veden do separátoru, kde dochází k oddělení EO od vodné fáze. Rychlost odpařování jednotlivých složek nezávisí na jejich těkavosti, ale závisí na stupni jejich rozpustnosti ve vodě. Výsledkem je, že složky rozpustnější ve vodě se destilují dříve než ty těkavější, ale zároveň méně rozpustné ve vodě. Určitá nevýhoda hydrodestilace nastává u nestabilních sloučenin, kdy delší doba kontaktu extrahovaného materiálu s vroucí vodou může způsobit jejich degradaci. Během hydrodestilace může docházet např. k hydrolyze esterů na alkoholy a kyseliny. To může mít v případě olejů bohatých na estery závažné důsledky, které se mohou projevit změnou vlastností EO. Typickými příklady jsou levandulový nebo lavandinový olej bohatý na linalylacetát a kardamomový olej bohatý na α -terpinylacetát. Ne vždy je ale rozklad některých sloučenin během hydrodestilace na škodu, příkladem je růžový olej. Hlavní složky růžového oleje, citronellol, geraniol a nerol, jsou produkty fermentace glykosidů, která probíhá během procesu hydrodestilace (Baser a Buchbauer 2016). Při destilaci sloučenin náchylných k degradačním změnám se často upřednostňuje parní destilace (SD), při které je kontakt rostlinného materiálu s horkou vodou významně redukován. Vodní pára vzniká odděleně v destilační baňce a poté prochází přes rostlinný materiál, kde je obohacena o esenciální olej. Dále pokračuje stejně jako při hydrodestilaci do chladiče a separátoru.

Metoda hydrodifuze je typem parní destilace a liší se způsobem, jakým se pára dostává do nádoby destilačního přístroje. Při hydrodifuzi se pára na rostlinný materiál přivádí shora, zatímco při parní destilaci se pára přivádí zdola. Tímto způsobem může pára nasytit rostlinný materiál rovnoměrněji a za kratší dobu než při parní destilaci. Ke kondenzaci směsi páry obsahující silice dochází pod místem, kde se nachází rostlinný materiál. Hlavní výhodou této

metody oproti parní destilaci je, že se spotřebuje méně páry a výrazně se zkrátí doba zpracování (Clarke 2008; Tongnuanchan a Benjakul 2014).

Destilace podporovaná mikrovlnným ohřevem (MASE), je modifikovaná SD či HD, kde je na vzorek s vodou aplikován mikrovlnný ohřev. Rozdíly mezi konvenčními destilacemi a MASE jsou zejména ve vynaložené energii potřebné k získání EO (Flamini et al. 2007).

V laboratorním měřítku se pro izolaci EO využívá hlavně hydrodestilace v Clevengerově aparatuře (metoda uznaná a zapsaná v Evropském lékopisu), což je cirkulační destilační přístroj, který umožňuje recyklaci vodné fáze vznikající v separátoru. Tím je umožněna nepřerušovaná destilace silic bez nutnosti doplňování vody do systému. V případě, že obsah silic v rostlinném materiálu je velmi nízký a esenciální olej se v separátoru neodděluje, lze pro účely analýzy chemického složení silic využít kombinaci hydrodestilace a extrakce rozpouštědlem, metodu tzv. simultánní hydrodestilace-extrakce (SHDE). Při této modifikaci kondenzát vznikající v chladiči protéká do separátoru přes vrstvu rozpouštědla nemísitelného s vodní fází (např. hexan). Při průchodu kondenzátu přes rozpouštědlo jsou složky silic extrahovány do organické vrstvy, která je pak analyzována.

3.2.1 Vedlejší produkt destilace

Během destilace esenciálních olejů vzniká vedlejší produkt, tzv. hydrolát či hydrosol. Je to vodná fáze, která se odděluje v separátoru od esenciálního oleje. Hydroláty mají obecně výrazné aroma a obsahují mnoho bioaktivních hydrofilních sloučenin. Vzhledem k tomu, že se jedná o vedlejší (a mnohdy odpadní) produkt, jsou v literatuře jejich složení a vlastnosti, ve srovnání s EO, popisovány pouze okrajově. Od esenciálních olejů se liší jak kvalitativním, tak především kvantitativním zastoupením bioaktivních látek, tudíž se nabízí jejich potenciální využití v lékařství, kosmetice nebo také jako konzervační prostředek v potravinářství.

3.3 Extrakce rozpouštědlem

Extrakce rozpouštědlem je metoda levná a relativně rychlá a využívána hlavně pro citlivý rostlinný materiál, který obsahuje málo silic (typicky některé květy). Používají se rozpouštědla jako petrolether, aceton, hexan, ethylacetát, případně jejich kombinace, další potenciálně vhodná rozpouštědla nejsou využívána např. z hlediska vysoké toxicity (benzen). Vzniká tzv. „konkret“, který kromě silic obsahuje i spoustu balastních látek, jako jsou vosky a barviva. Konkret je poté smíchán s ethanolem a za nízkých teplot filtrován, ze získaného filtrátu je ethanol oddestilován a vzniká tzv. „absolute“, což je velmi čistá a koncentrovaná forma esenciálního oleje. Od esenciálních olejů získaných destilací se liší tím, že neobsahuje všechny

těkavé sloučeniny, ale jen ty rozpustné v ethanolu. Některé takto izolované vonné látky mohou obsahovat zbytky balastních látek nebo použitých rozpouštědel, a pokud jako extrakční rozpouštědlo nebyl použit ethanol, pak je použití vzniklého produktu nevhodné např. v potravinářství či aromaterapii. Hlavní výhodou extrakce rozpouštědlem oproti destilaci (kromě nákladů) je to, že se při ní používá nižší teplota, čímž se snižuje riziko chemických změn způsobených vysokými teplotami, které se používají při destilaci. Z tohoto důvodu je tato metoda používána hlavně v parfumérském průmyslu. S rozvojem „zelené“ chemie a nástupem nadkritických tekutin se částečně od tradičních rozpouštědel upustilo a zájem byl soustředěn na využití oxidu uhličitého v nadkritickém stavu (Pybus a Sell 1999; Clarke 2008; Tongnuanchan a Benjakul 2014).

3.3.1 Extrakce nadkritickým CO₂

Konvenční metoda extrakce rozpouštědly má určité nedostatky, jako je časová náročnost a velká spotřeba organických rozpouštědel. Kromě toho může docházet ke ztrátám některých těkavých sloučenin, nízké účinnosti extrakce, či vzniku toxických zbytků rozpouštědel v extraktu. Proto se o nadkritických tekutinách uvažuje jako o alternativním médiu pro extrakci esenciálních olejů. Více o SFE v kapitole 2.6

3.4 Enfleuráž

Enfleuráž je technika extrakce velmi vzácných silic z květů, které jsou náchylné na zahřátí či mechanické poškození. Stejně jako extrakce klasickým rozpouštědlem je to metoda zastaralá a velmi pracná a časově náročná, nicméně vzhledem k ceně výsledných produktů je stále ještě občas využívána. Jedná se o extrakci živočišným tukem, který byl předem zbaven pachu. Meziprodukt se nazývá „pomáda“ a je stejně jako konkret extrahován ethanolem a destilován za vzniku „absolute“ (Pybus a Sell 1999; Baser a Buchbauer 2016).

3.5 Extrakce tuhou fází

SPE není primárně používanou technikou pro získávání silic z rostlinného materiálu. Se zvyšujícím se zájmem o vedlejší produkty destilace silic, hydroláty, se ovšem tato metoda extrakce nabízí jako vhodná obohacovací technika pro další zpracování hydrolátů. Více o SPE v kapitole 2.7

3.5.1 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) je modifikovaná technika SPE. Výhodou je, že ji lze využít pro všechna skupenství vzorků. Principem je transport a sorpce analytů ze vzorku

na tzv. sorpční vlákno, což je křemenné vlákno potažené stacionární fází s různými sorpčními vlastnostmi. Křemenné vlákno je chráněno kovovým pouzdem, podobným injekční stříkačce, přizpůsobeného jak pro snadnou manipulaci (a pro vysouvání vlákna při extrakci), tak pro dávkování extraktu do chromatografu. Existují dvě možnosti vzorkování sloučenin, a to přímé vzorkování ponořením aktivní části vlákna do kapalného vzorku a extrakce látek z plynné fáze nad kapalným či tuhým vzorkem, který se nachází v uzavřené nádobce (HS-SPME). Ponořením vlákna do vzorku dochází k přenosu hmoty a ustavení rovnováhy mezi analyty ve vzorku a stacionární fází na vlákne. Při HS-SPME se ustavují dvě rovnováhy, vzorek – parní fáze a parní fáze – sorpční vlákno. Dnes se SPME rutinně spojuje s plynovou chromatografií. Sloučeniny sorbované na vlákne jsou pak tepelně desorbovány v nástřikovém bloku plynového chromatografu. Extrakce sloučenin ze vzorku je ovlivňována řadou faktorů jako např. druh sorbentu, extrakční teplota, doba sorpce, iontová síla a pH roztoku.

Významnými znaky této metody jsou jednoduchost, relativně nízké pořizovací a provozní náklady, možnost automatizace, selektivita a citlivost ve spojení s vhodnou detekční technikou. Tato technika má i své nevýhody, mezi něž se řadí například křehkost vlákna. Získaný extrakt je analýzou spotřebován, v případě extrakce silic se tedy jedná pouze o laboratorní využití pro analýzu profilu těkavých sloučenin v daném rostlinném materiálu.

3.6 Praktické aplikace extrakce těkavých sloučenin z rostlinného materiálu

V dalším textu jsou komentovány práce publikované v odborných časopisech, které souvisí s využitím většiny výše popsaných metod pro izolaci a analýzu těkavých sloučenin.

Z různých typů rostlinného materiálu a rostlinných produktů (viz Tabulka 3) byly s použitím zakoncentrovávacích metod připraveny esenciální oleje či extrakty obsahující silice za účelem dalších analýz, jako jsou analýza chemického složení, identifikace látek a kvantifikace látek, stanovení antimikrobiálních vlastností či klasifikace vzorků.

Tabulka 3 Základní informace o analyzovaných materiálech a použitých postupech izolace těkavých sloučenin publikovaných v mezinárodních žurnálech

Rostlinný materiál/Typ vzorku	Stav a forma vzorku	Země původu	Typ zakoncentrování	Zdroj
Jakon (<i>Smallanthus sonchifolius</i> (Poepp.) H. Rob.)	Sušené listy	Ekvádor	HS-SPME	Příloha 6
Jitrocel kopinatý <i>Plantago lanceolata</i> L.	Sušené listy	ČR	HD – Clevenger	Příloha 7
Vrbovka malokvětá <i>Epilobium parviflorum</i> Schreb.	Sušené stonky a listy	ČR	HD – Clevenger, HS-SPME	Příloha 8
Bez černý <i>Sambucus nigra</i> L.	Čerstvé a sušené květy	ČR	SHDE, HS-SPME	Příloha 9
Touleň srdčitá <i>Houttuynia cordata</i> Thunb. Rdesno vonné <i>Persicaria odorata</i> (Lour.) Soják	Sušené stonky a listy	-	HD – Clevenger	Příloha 10
Pimentovník pravý <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	Sušené plody	Mexiko	HD – Clevenger, HS-SPME	Příloha 11
Vavřík vznešený <i>Laurus nobilis</i> L.	Sušené listy	Brazílie	HD, SD	Příloha 12
Levandule lékařská (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.)	Sušené květy	Chorvatsko	SD, HD, SPE	Příloha 13
Hřebíčkovce kořený (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	Sušené květy	Madagaskar		
Fenykl obecný (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	Semena	ČR		
Vavřík vznešený (<i>Laurus nobilis</i> L.)	Sušené listy	Brazílie		
Silivoň obecný <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd.	Fermentovaná semena	Jižní Amerika	SHDE, SFE, HS-SPME	Příloha 14
Areka obecná <i>Areca catechu</i> L.	Plody	Indie	SHDE, HS-SPME	Příloha 15
Česnekovité (<i>Alliaceae</i>) Brukvovité (<i>Brassicaceae</i>)	Čerstvé stonky, listy, kořeny	ČR	HS-SPME	Příloha 16, 17
Ovocné destiláty	Kapalina	ČR	HS-SPME	Příloha 18, 19
Dřeviny	Části kmene	ČR, Rusko	HS-SPME	Příloha 20, 21

3.6.1 Jakon (Příloha 6)

Jakon (*Smallanthus sonchifolius*) je hlíznatá plodina původně pěstovaná v Jižní Americe na Andské vysočině. Pro místní obyvatelstvo je potravinou i uznávanou léčivou rostlinou. Pěstování této plodiny bylo zavedeno v Japonsku, Novém Zélandu, USA a Evropě (především v České republice, kde byl v letech 2001-2005 na různých odrůdách jakonu sledován vliv meteorologických podmínek na produkci biomasy) (Fernandez et al. 2006). Antioxidační

a antidiabetické vlastnosti (Serra-Barcellona et al. 2014; Russo et al. 2015) jsou přisuzovány listům jakonu, které se suší a používají při přípravě čaje.

Pro extrakci těkavých sloučenin z listů různých odrůd jakonu byla zvolena metoda HS-SPME. Byly sledovány různé parametry ovlivňující extrakci (typ sorbentu, teplota sorpce, doba sorpce a desorpce, hmotnost vzorku) s cílem optimalizovat podmínky extrakce. Jako hlavní silice byly identifikovány tři sloučeniny β -pinen, karyofylen a γ -kadinen. Jejich relativní obsah se ukázal jako důležitý faktor pro specifikaci odrůd jakonu.

3.6.2 Jitrocel kopinatý (Příloha 7)

Jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata*) má řadu uváděných farmakologických vlastností, jako např. protizánětlivé (Beara et al. 2010) a protikřečové (Fleer a Verspohl 2007) účinky, či antioxidační (Beara et al. 2012) a protinádorovou (Herbert et al. 1991) aktivitu. Mimoto se ale také používá v lidovém léčitelství při léčbě poruch dýchacích cest (Fons et al. 2008), což naznačuje potenciálně pozitivní účinky silic na lidský organismus. Esenciální olej jitrocele kopinatého byl vydestilován ze tří různých rostlinných vzorků pomocí hydrodestilace v Clevengerově aparatuře a analyzován plynovou chromatografií. Ukázalo se, že takto připravený esenciální olej je směs obrovského množství látek (v jednotlivých chromatogramech se nacházelo až 236 píků), přičemž identifikováno bylo 154 sloučenin.

3.6.3 Vrbovka malokvětá (Příloha 8)

Druhy rodu *Epilobium* se tradičně používají jako léčivé rostliny, např. přípravky připravené z *E. angustifolium* (vrbovka úzkolistá) mají protizánětlivé účinky a výtažky z *E. parviflorum* (vrbovka malokvětá) zmírňují potíže spojené s benigní hyperplazií prostaty u mužů středního a staršího věku (Remmel et al. 2012). Publikované studie se rovněž zmiňují o antioxidačních (Kiss et al. 2011; Cando et al. 2014), protizánětlivých (Juan et al. 1988; Hiermann et al. 1991) a antimikrobiálních (Battinelli et al. 2001; Bartfay et al. 2012; Kosalec et al. 2013; Eghmazi et al. 2015) vlastnostech extraktů z rostlin druhu *Epilobium*. Čtyři vzorky vrbovky malokvěté ve formě sušených listů a stonků byly podrobeny hydrodestilaci v Clevengerově aparatuře, získaný esenciální olej byl, společně s hydrolátem jakožto vedlejším produktem hydrodestilace, analyzován pomocí plynové chromatografie. Získané esenciální oleje, stejně jako hydrolát, byly bohaté na počet složek (až 301 píků v chromatogramech jednotlivých EO a dokonce 322 píků v chromatogramech hydrolátu). Antimikrobiální aktivita EO a hydrolátu získaného z *Epilobium parviflorum* byla testována proti pěti mikroorganismům. Tři z testovaných mikroorganismů jsou bakterie uznávané jako původci bakteriální prostatitidy (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), jeden je potenciální kandidát (*Staphylococcus*

aureus) (Pavone-Macaluso 2007). O antimikrobiálních účincích silic *Epilobium parviflorum* bylo v literatuře dostupné jen omezené množství informací. Antimikrobiální účinky etanolických extraktů z rostlin *Epilobium* spp. popisuje např. studie (Battinelli et al. 2001), která uvádí výsledky minimálních inhibičních koncentrací (MIC) v rozmezí 81 až 650 µg/ml. Jedna z předchozích studií (Eghmazi et al. 2015) se zabývala antibakteriálním účinkem silice z *Epilobium hirsutum* (vrbovka chlupatá), i tato studie popisuje významnou antibakteriální aktivitu vůči grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Silice získaná destilací vrbovky malokvěté měla vyšší antimikrobiální účinek (MIC 5-60 µg/ml) než etanolické extrakty ve studii Batinelliho, i než silice izolované z *E. hirsutum* ve studii Eghmaziho. Dále bylo zjištěno, že i hydrolát v koncentracích 70-90 % ve vodě (V/V) inhiboval všechny testované bakterie a kvasinky. Výsledky nasvědčují tomu, že silice z vrbovky malokvěté mohou mít výrazné léčivé účinky na bakteriální prostatitidu.

3.6.4 Bez černý (Příloha 9)

Bez černý (*Sambucus nigra*) se již po staletí úspěšně používá k léčebným účelům, k přípravě čajů, vín a likérů. Tradiční lidová medicína používá nálev ze sušených květů kvůli jeho močopudným účinkům, snižování horečky, podpoře pocení a mírnění kašle. Výtažky z černého bezu se podílejí na komerčních produktech používaných jako imunitní stimulanty nebo k léčbě příznaků chřipky, nachlazení, virových infekcí či nervových zánětů (Ulbricht et al. 2014). Těkavé látky uvolňované květy černého bezu v různých stádiích (přímo na keři a v různých fázích po sklizni) byly analyzovány s cílem zjistit změny ve složení profilů těkavých látek vyvolané jednak sběrem květů (pomocí zakoncentrování HS-SPME) a také sušením květů (pomocí destilace silic metodou SHDE). Odběr vzorků těkavých látek v terénu (pomocí HS-SPME) s následnou chromatografickou analýzou poskytl zajímavé informace, 55 % až 79 % celkové plochy píků v chromatogramech tvořily látky, které působí jako hmyzí feromony. V profilech těkavých látek stanovených před a po sklizni (časový úsek cca 3 hodiny) byly pozorovány významné změny, např. pokles relativního obsahu hmyzích feromonů. Některé sloučeniny zcela vymizely, ale bylo identifikováno 34 nových sloučenin, zejména terpenických látek, což může být důsledek indukované reakce rostliny na biotický stres (poškození rostliny). Poškození rostlinných pletiv způsobuje širokou škálu reakcí rostlin a může také způsobit zvýšení obsahu sekundárních metabolitů (Karban a Myers 1989). Pomocí SHDE byly připraveny extrakty z květů 3 hodiny po sběru a z květů sušených dvěma postupy (na denním světle při laboratorní teplotě a za tmy v sušárně při 45 °C) s cílem určit změny ve složení silic. Složení aromatických látek sklizených květů černého bezu bylo silně ovlivněno

postupem sušení. Obecně se celková plocha píků v chromatogramech extraktů získaných ze sušených květů ve srovnání s extrakty z čerstvých květů snížila (o 15 % při sušení při laboratorní teplotě a o 45 % při sušení na 45 °C). To však neznamená, že se obsah jednotlivých těkavých látek pouze snížil. Celkový profil těkavých látek je směsí tříd látek a jejich obsah se během sušení mění v důsledku probíhajících fyzikálně-chemických procesů. Obsah některých těkavých látek se tedy snížil pod detekční limit metody, ale některé látky se naopak vyskytly až v průběhu sušení. Je zřejmé, že jak proces sklizně, tak i způsob sušení má vliv na chemické složení silic ve výsledných produktech.

3.6.5 Touleň srdčitá, rdesno vonné (Příloha 10)

Vzhledem k rostoucí poptávce po přírodních produktech a s ohledem na převahu léčiv, antioxidantů nebo potravinářských aditiv v procesu konzervace potravin se v posledních letech řada výzkumníků zaměřila na hledání nových antimikrobiálních látek, které by se mohly uplatnit jako prostředky odolné vůči více druhům mikroorganismů. Hlavním zdrojem takových přírodních látek jsou léčivé byliny a produkty z nich, jako jsou esenciální oleje. Používají se již od dob nepaměti jako nejdostupnější prostředky k léčbě nemocí. Jak bylo několikrát prokázáno, EO mají rozmanité biologické vlastnosti a v této oblasti je jim věnována značná pozornost.

Cílem této studie bylo vyhledat byliny používané v kuchyni i v přírodní medicíně a určit složení jejich EO a zejména jejich antimikrobiální účinnost v parní i kapalně fázi. Pro tuto studii byly vybrány dvě byliny pocházející z jihovýchodní Asie, a to touleň srdčitá (*Houttuynia cordata*) a rdesno vonné (*Persicaria odorata*), které se používají především v tradiční čínské medicíně a jako koření v asijské kuchyni. Známé zdravotní účinky těchto rostlin z čínské medicíny a nedostatek vědecké literatury o antimikrobiálních účincích EO z *Houttuynia cordata* a *Persicaria odorata* vedly k podrobnějšímu zkoumání jejich účinků na vybrané mikroorganismy.

Esenciální oleje byly připraveny metodou hydrodestilace v Clevengerově aparatuře, antimikrobiální vlastnosti EO byly testovány bujónovou mikrodiluční volatilizační metodou (Houdkova et al. 2017). Jedná se o jednoduché a rychlé simultánní stanovení antibakteriálního potenciálu rostlinných těkavých látek v kapalně a parní fázi v různých koncentracích.

Výsledky ukazují nové zajímavé poznatky. Chemické složení EO odpovídá předchozím studiím s drobnými odchylkami, které mohou být způsobeny agronomickými faktory, skladováním nebo přípravou vzorků aj. Oba EO vykazovaly antimikrobiální aktivitu v různých koncentracích vůči testovaným bakteriím. Vzhledem k velké antibakteriální aktivitě EO je

velký potenciál pro budoucí využití těchto silic, například jako přírodních antimikrobiálních látek nebo konzervačních látek v potravinách.

3.6.6 Pimentovník pravý (Příloha 11)

Monoterpeny a seskviterpeny jsou těkavé organické sloučeniny rozšířené v rostlinách. Tyto látky hrají důležitou roli v potravinářské chemii, protože jsou zodpovědné za aroma mnoha druhů koření, které je jedním ze základních parametrů při hodnocení kvality koření. Jedním z koření, ve kterém jsou tyto charakteristické látky přítomny, jsou sušené plody tropických stromů botanické skupiny *Pimenta* Lindl., známé jako nové koření. Druhy rodu *Pimenta* Lindl., které se celosvětově nejčastěji používají k ochucování potravin, jsou *Pimenta dioica* a *Pimenta racemosa*. Hydrodestilací byl připraven esenciální olej, který byl dále analyzován. Pro porovnání byly provedeny analýzy profilu těkavých látek také pomocí HS-SPME, kdy byla testována různá extrakční vlákna a studován vliv absorpce a adsorpce na složení výsledných extraktů. Obecně lze říci, že pozorování provedená pro dané extrakční teploty ukazují, že pro extrakci seskviterpenů bylo vhodné vlákno se sorbentem PDMS a pro extrakci monoterpenů vlákno se sorbentem DVB/CAR/PDMS. Zvýšení teploty extrakce vedlo podle očekávání k vyšším výtěžkům seskviterpenů na úkor monoterpenů. Byl také studován vliv přídavku vody ke vzorku na výsledek HS-SPME, který se ukázal jako nevýznamný.

3.6.7 Vavřín ušlechtilý (Příloha 12)

Hydrodestilace a destilace vodní parou jsou nejvíce využívané techniky pro výrobu esenciálních olejů. Používají se různě, v závislosti na experimentálních zkušenostech u konkrétní rostliny či daného výrobce. Pomocí těchto dvou destilačních technik byly připraveny esenciální oleje z vavřínu ušlechtilého (*Laurus nobilis*). Bylo zkoumáno a porovnávalo jejich složení a antioxidační a antimikrobiální aktivity.

Studie potvrdila, že výtěžek silice, složení a biologické vlastnosti závisí na použité destilační metodě. Většího výtěžku silice bylo dosaženo hydrodestilací, ale na počet sloučenin byl bohatší esenciální olej získaný parní destilací. To může naznačovat (už dříve zmíněnou) nevýhodu hydrodestilace spočívající v tepelné modifikaci nebo degradaci některých sloučenin vlivem dlouhého tepelného namáhání v porovnání s parní destilací, což se ukázalo např. na poklesu relativního obsahu terpenických esterů. Z tohoto důvodu je parní destilace šetrnější k vavřínovému oleji a mohla by poskytnout kvalitnější olej z hlediska obsahu terpenických esterů. Získané výsledky také ukázaly, že silice z vavřínových listů mají výrazný antimikrobiální a antioxidační účinek. Zdá se, že silice získaná hydrodestilací je účinnější antimikrobiální látkou než silice získaná parní destilací, což je pravděpodobně (mimo jiné)

důsledek obsahu eukalyptolu, který má výrazné antimikrobiální účinky (Millezi et al. 2012; Damasceno et al. 2019; Saraiva et al. 2021). Jeho obsah byl cca o 30% vyšší v oleji získaném hydrodestilací. Naopak, EO získaný parní destilací se projevil jako silnější antioxidant. Závěrem lze konstatovat, že při volbě destilační metody je třeba zvážit účel použití vavřínového oleje, zda preferujeme vyšší obsah některé ze sloučenin nebo dobré antioxidační či antimikrobiální vlastnosti.

3.6.8 Hydroláty (Příloha 13)

Vzhledem k rostoucí rezistenci mikroorganismů je vhodné věnovat pozornost antimikrobiálním účinkům přírodních látek, a to i v synergické kombinaci s některými antibiotiky. Hlavním problémem je rezistence mikroorganismu s patogenním potenciálem. Mezi takové mikroorganismy patří mimo jiné bakterie podobné arcobakteru. Spojitost arcobakteru s lidskými onemocněními byla prokázána u druhů *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. thereius* (Collado et al. 2009; Van den Abeele et al. 2014). Pro tyto bakterie je zásadní přežívání ve formě planktonních buněk nebo v biofilmu, protože tak mohou lépe kolonizovat hostitele nebo kontaminovat prostředí potravinářských závodů.

Cílem této studie bylo rozšířit současné znalosti o chemickém složení a antimikrobiální aktivitě hydrolátů získaných z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*), hřebíčkovce kořeného (*Syzygium aromaticum*), fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare*) a vavřínu ušlechtilého (*Laurus nobilis*) na vybrané mikroorganismy. Všechny tyto přírodní matrice jsou široce dostupné, ale doposud se studie nezabývaly testováním hydrolátů získaných z těchto matric.

Hydroláty získané hydrodestilací a parní destilací byly zakoncentrovány pomocí extrakce tuhou fází a analyzovány plynovou chromatografií. Antimikrobiální aktivita hydrolátů byla stanovena metodou diskové difuze a minimální inhibiční/baktericidní koncentrace byla vyhodnocena mikrodiluční metodou. Tvorba biofilmu mikroorganismů v přítomnosti testovaných hydrolátů byla sledována modifikovanou Christensenovou metodou.

Byla zaznamenána významná antimikrobiální aktivita výše uvedených hydrolátů vůči testovaným mikroorganismům, a to zejména po jejich zakoncentrování pomocí SPE. Koncentrované hydroláty měly rovněž inhibiční účinky na tvorbu mikrobiálního biofilmu, navíc nevykazovaly žádný cytotoxický účinek vůči lidským buňkám A549. Lze tedy konstatovat, že existuje potenciální použití jako např. přírodní antimikrobiální látky nebo konzervační látky v potravinách.

3.6.9 Silovoň obecný (Příloha 14)

Silovoň obecný (*Dipteryx odorata*) je zástupce rodu *Dipteryx* pocházející z tropických deštných lesů Střední a severní Jižní Ameriky. *D. odorata*, především semena, květy a kůra, byl studován pro své fytochemické vlastnosti. Existují práce zabývající se izolací isoflavonů (Januario et al. 2005), mastných kyselin (Oliveros-Bastidas et al. 2013) a diterpenoidů (Godoy et al. 1989). Semena *D. odorata* byla dále zkoumána na obsah extraktu rozpustného v ethylacetátu jako potenciální chemopreventivní látky proti rakovině (Jang et al. 2003). Fermentovaná semena silovoně obecného, známé také jako „tonkové boby“, mají výrazné aromatické vlastnosti. Kromě toho také obsahují poměrně vysoké množství kumarinu, obvykle v rozmezí 1-3 % (Ehlers et al. 1995; Ehlers et al. 1996; Oliveros-Bastidas et al. 2013). Vzhledem k tomu, že četné studie prokázaly toxické vlastnosti kumarinu, bylo jeho používání v potravinách (nikoli však v tabákových výrobcích) v roce 1954 v USA a řadě Evropských zemích zakázáno či omezeno (Givel 2003). Výtažky z tonkových bobů byly vzhledem ke svým výrazným aromatickým vlastnostem dále využívány jako přísady do aromatických tabáků, cigaret, doutníků a také do parfémů (Sullivan 1982). Přestože jsou extrakty z tonkových bobů široce využívány, především v parfumérském průmyslu, výzkumné studie o těkavých sloučeninách tonkových bobů jsou sporadické. Může to být důsledkem zaměření výzkumníků na hlavní sloučeninu kumarin, která je v popředí zájmu díky svým toxikologickým vlastnostem.

Tato studie představuje výsledky analýzy těkavých látek získaných z tonkových bobů pomocí různých extrakčních metod, její výsledky mohou poskytnout zásadní informace pro použití různých způsobů zpracování tonkových bobů.

Pomocí extrakčních metod HS-SPME, SHDE a SFE s následnou chromatografickou separací bylo identifikováno celkem 191 sloučenin. Z výsledků je patrné, že v případě extrakce těkavých látek z tonkových bobů je zvolení vhodné metody zásadním krokem k zisku kvalitních extraktů bohatých na aromatické sloučeniny. Rozdíl mezi SFE a SHDE byl pozorován hlavně u terpenických sloučenin. V extraktech z SHDE zaujímaly identifikované terpeny cca 12 % celkové plochy všech píků v chromatogramu, potvrdilo se, že destilační metody jsou vhodné pro extrakci EO, jejichž základ tvoří terpenické sloučeniny. S využitím metody HS-SPME bylo identifikováno celkem 155 sloučenin, z toho 100 látek bylo zaznamenáno pouze v chromatogramech získaných s využitím HS-SPME. Nicméně, na rozdíl od SHDE a SFE ji nelze využít ke komerční produkci extraktů, ale např. ke kontrole kvality tonkových bobů.

3.6.10 Betelové ořechy (Příloha 15)

Betelový ořech (nebo arekový ořech) je semeno plodu palmy *Areca catechu*. Tato palma je rozšířena v jižní a jihovýchodní Asii, včetně Číny, Indie, Indonésie, Malajsie, Filipín a Nové Guineje. Tradičním zvykem v těchto zemích je žvýkat tzv. „betel quid“, který obsahuje betelový list, arekový ořech a hašené vápno, případně může obsahovat tabák. Kromě toho se podle místních preferencí přidávají další látky, zejména koření, jako je kardamom, šafrán, hřebíček, anýz, kurkuma, hořčice nebo sladidla. Účinky žvýkání jsou srovnatelné s užíváním nikotinu, včetně možné závislosti a abstinčních příznaků. Je odhadováno, že betel quid žvýká více než 400 milionů lidí, což z něj činí čtvrtou nejpoužívanější drogu po alkoholu, nikotinu a kofeinu (Peng et al. 2015). Některé studie dokonce indikují potenciální toxicitu či karcinogenitu spojenou se žvýkáním betelových ořechů. Kromě negativních účinků na zdraví byla ale také zjištěna řada účinků pozitivních, mimo jiné že žvýkání betelového ořechu zlepšuje ústní hygienu. Byly popsány souvislosti nižšího výskytu zubního kazu ve srovnání s populací, která betel quid neužívá (Möller et al. 1977; Schamschula et al. 1977).

Přestože je arekový ořech široce známou drogou a rostlinou, neexistuje dostatek zpráv zabývajících se těkavými sloučeninami této matrice. Cílem této studie tedy bylo stanovit těkavé látky arekového ořechu a antimikrobiální aktivitu extraktu připraveného pomocí metody SHDE. Ukázalo se, že takto připravený extrakt byl bohatý na mastné kyseliny, což se projevilo i na antimikrobiálních vlastnostech, extrakt měl na některé z testovaných mikroorganismů vyšší antimikrobiální účinky než srovnávací antibiotika.

3.6.11 Rostliny čeledí Alliaceae a Brassicaceae (Příloha 16, 17)

Aroma potravin je ovlivněno různými druhy složek, mezi nimiž jsou významnou skupinou sloučeniny obsahující síru, a to díky jejich hojnému výskytu a aromatickému účinku. Síra je esenciální prvek vyskytující se zejména ve dvou aminokyselinách - cysteinu a methioninu. Produkty rozkladu těchto organických molekul jsou těkavé složky, jako jsou např. thioly nebo sulfidy (disulfidy, trisulfidy atd.). I ve stopovém množství mohou být tyto sloučeniny zodpovědné za specifické aroma.

Rostliny patřící do čeledí *Alliaceae* a *Brassicaceae* jsou často jedlé, a proto se obvykle používají v kuchyni po celém světě, zejména na severní polokouli. Mnoho z nich je také známé pro své antimikrobiální nebo protinádorové účinky a často mají využití jak v lidovém léčitelství, tak ve farmaceutickém průmyslu (Lanzotti 2006; Yabuki et al. 2010).

Metodou HS-SPME s následnou chromatografickou separací byly zkoumány profily těkavých sloučenin u deseti druhů rostlinných vzorků, které jsou hojně využívány v kuchyni.

Výsledky prezentované v těchto studiích ukazují, že obě čeledi Alliaceae a Brassicaceae obsahují poměrně širokou škálu aromatických látek, přičemž u poloviny vzorků tvořily těkavé sirné látky více než 50 % celkového profilu těkavých sloučenin. Zda se profil sirných sloučenin mění v čase po rozrušení rostlinné tkáně, bylo sledováno u cibule kuchyňské. Bylo zjištěno, že některé sloučeniny mizí z aromaprofilu záhy po rozrušení cibule, např. thiopropanal S-oxid, tzv. slzný faktor cibule, měl vrchol zastoupení v aromaprofilu ihned po rozkrojení cibule, poté postupně klesal a už po 2 minutách byl na cca 15 % množství stanoveného ihned po rozkrojení. Některé látky, typicky sulfidy, se naopak postupně uvolňovaly pravděpodobně i vlivem degradace jiných sirných sloučenin.

Součástí studie bylo i stanovení antimikrobiální aktivity cibulové šťávy pomocí jamkové difuzní metody. Výsledky potvrdily antimikrobiální aktivitu, nejvýraznější inhibiční zóny byly pozorované u kvasinky *Candida albicans*.

3.6.12 Ovocné destiláty (Příloha 18, 19)

Výroba ovocných destilátů má dlouhou tradici v zemích střední Evropy a mnoho národů je má jako tradiční alkoholický nápoj. Lze je vyrábět z ovoce s vysokým obsahem cukru, např. z třešní, jablek, hrušek, meruněk, švestek, broskví, mirabelek nebo malin. Ovoce (rozdrcené nebo nakrájené) nebo ovocná šťáva se vystaví alkoholovému kvašení, následuje dvojitá destilace a úprava konečného destilátu (ředění, filtrace atd.). Ovocné destiláty jsou obvykle bezbarvé (s výjimkou lihovin skladovaných v dřevěných sudech) se specifickou ovocnou vůní. Pro charakterizaci profilu těkavých látek byla využita metoda HS-SPME s následnou analýzou plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií pro identifikaci jednotlivých těkavých látek. Další data, naměřená pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí (GC-FID), byla použita pro identifikaci druhu destilátu pomocí tzv. „fingerprint“ analýzy s využitím ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS).

Na základě hmotnostních spekter a retenčních charakteristik bylo ve 24 vzorcích ovocných destilátů identifikováno 271 těkavých sloučenin s hlavním podílem ethylesterů mastných kyselin (celkem 116 esterů s podílem 54-88 % rel. v daném profilu těkavých sloučenin). Byla rovněž identifikována sloučenina (*E,E*)- α -farnesen, která se nacházela pouze v destilátech vyrobených z hrušek a jablek (tedy jádřincové ovoce).

Dále bylo analyzováno 63 vzorků různých druhů ovocných destilátů (52 vzorků destilátů z jablek, hrušek, švestek, meruněk a mirabelek a 11 vzorků jiných druhů) pomocí HS-SPME a GC-FID. Vzorky byly rozděleny na kalibrační set (47 vzorků) a validační set (16 vzorků). Naměřené chromatogramy byly převedeny na matici dat a analyzovány pomocí metody OPLS.

Základním výsledkem statistické analýzy bylo vytvoření OPLS modelu pro rozlišení lihovin do skupin podle druhu ovoce. Selekcce bylo dosaženo se specificitou 1,000 a senzitivitou 1,000 pro každý z pěti testovaných druhů lihoviny. Statistický model byl ověřen externí validací pomocí naměřených dat jak z kalibračního, tak z validačního setu. Výsledné rozdělení všech testovaných vzorků přesně odpovídalo buď jednomu z pěti typů destilátů, nebo jako nezařazený. Hierarchická shluková analýza ukázala podobnost těkavých profilů pálenek z jádřincového ovoce (jablečné a hruškové pálenky) a pálenek z peckovin (mirabelkovice, slivovice, meruňkovice).

3.6.13 Dřevo (Příloha 20, 21)

Těkavé organické sloučeniny (VOC) patří mezi extraktivní látky, které se ve dřevě vyskytují v množství 0,5 až 5 % (w/w) a mohou se nacházet v jádrovém dřevě (mrtvá a nefunkční část dřeva), v pryskyřičných kanálech jehličnatých dřevin nebo jako rezervní látky v běli (živá část dřeva podílející se na vzlínání mízy). Extraktivní látky z některých druhů dřeva se běžně používají v mnoha lékařských přípravcích a také v parfumerském průmyslu. (Sjostrom 2013; Sandak et al. 2016). VOC jsou zodpovědné za příjemnou vůni většiny dřevin, některé z nich mají odpovědnost za odolnost dřeva proti hnilobě, poškození hmyzem a bakteriálním infekcím (Martin et al. 2002). Množství a typ těkavých organických látek se liší mezi jednotlivými druhy dřeva a dokonce i v rámci jednoho vzorku dřeva v závislosti na tom, zda se analyzuje běl nebo jádro. Chemické složení dřeva však není ovlivněno pouze druhem, ale i dalšími faktory, jako je umístění buněk v rámci stromu a na konečné chemické složení (a potažmo i vlastnosti) dřeva mají vliv i podmínky růstu a prostředí (Wajs et al. 2006). Příkladem může být modřín. Jeho dřevo je hojně využíváno k výrobě nábytku, obkladům stěn či jako stavební dříví. Modřín sibiřský obsahuje více extraktivních látek než modřín opadavý, vyskytující se ve střední Evropě (Forsthuber et al. 2017). Proto je modřín sibiřský vhodnější a cennější pro venkovní použití. To způsobuje, že sibiřský modřín má ve srovnání s evropským modřínem vyšší cenu, což někdy motivuje prodejce dřeva k podvodnému prohlašování evropského modřínu za sibiřský. V jiném případě bylo poukázáno na opačný problém, kdy se dovozci sibiřského modřínu snaží vyhnout nákladným rostlinolékařským kontrolám (Horacek et al. 2009). Za tímto účelem se někteří dovozci snaží deklarovat sibiřský modřín jako modřín evropský. Dovoz mimoevropského dřeva bez rostlinolékařského osvědčení na území Evropské unie je zákonem zakázán.

Byla vyvinuta metoda pro stanovení VOC ve vzorcích různých druhů dřeva založená na HS-SPME. Tato metoda byla aplikována na 82 vzorků dřeva z evropských a sibiřských modřínů. Naměřená chromatografická data byla konvertována do číselných matic

a analyzována metodou OPLS. Před statistickou analýzou byly vzorky rozděleny na pracovní soubor (70 vzorků) a validační soubor (12 vzorků). Model OPLS byl vytvořen z chromatografických údajů pracovního souboru a jeho externí validace byla provedena pomocí chromatografických údajů validačního souboru. Předložená práce ukazuje vývoj nového přístupu k rozlišování původu modřínového dřeva pocházejícího z různých zeměpisných oblastí na základě měření profilů některých extraktivních látek a jejich statistického vyhodnocení. OPLS model pro rozlišení jednotlivých vzorků dřeva se ukázal jako vhodný nástroj, neboť dokázal určit místo původu u všech 70 vzorků modřínového dřeva z pracovního souboru, stejně jako u 12 vzorků ze souboru určeného pro ověření prediktivity vytvořeného modelu. Bylo také identifikováno 17 z 20 nejvýznamnějších sloučenin zodpovědných za diskriminaci jednotlivých vzorků. Klíčovými těkavými organickými látkami pro přiřazení vzorků k evropským modřínům byly seskviterpeny, seskviterpenoidy a diterpenoidy, zatímco u sibiřských modřínů byly klíčovými těkavými organickými látkami především alifatické karbonylové sloučeniny s nižšími body varu.

3.6.14 Seznam komentovaných publikací pro kapitulu 3

Seznam publikací komentovaných v kapitole 3, řazeno vzestupně podle data vydání. Kopie prací viz přílohy.

Adam, M., Juklová, M., **Bajer, T.**, Eisner, A., Ventura, K.: *Comparison of three different solid-phase microextraction fibres for analysis of essential oils in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves.* Journal of Chromatography A, 2005. **1084**(1-2): 2-6.

Kremr, D., Bajerová, P., **Bajer, T.**, Eisner, A., Adam, M., Ventura, K.: *Using headspace solid-phase microextraction for comparison of volatile sulphur compounds of fresh plants belonging to families Alliaceae and Brassicaceae.* Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2015. **52**(9): 5727-5735.

Bajer, T., Janda, V., Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A., Ventura, K.: *Chemical composition of essential oils from plantago lanceolata L. leaves extracted by hydrodistillation.* Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2016. **53**(3): 1576-1584.

Bajer, T., Ligor, M., Ligor, T., Buszewski, B.: *Design of the extraction process for terpenes and other volatiles from allspice by solid-phase microextraction and hydrodistillation.* Journal of Separation Science, 2016. **39**(4): 769-775.

Bajer, T., Šilha, D., Ventura, K., Bajerová, P.: *Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb.* Industrial Crops and Products, 2017. **100**: 95-105.

Bajer, T., Bajerová, P., Ventura, K.: *Effect of Harvest and Drying on Composition of Volatile Profile of Elderflowers (*Sambucus nigra*) from Wild.* Natural Product Communications, 2017. **12**(12): 1937-1942.

- Bajer, T.,** Bajerová, P., Surmová, S., Kremr, D., Ventura, K., Eisner, A.: *Chemical profiling of volatile compounds of various home-made fruit spirits using headspace solid-phase microextraction.* Journal of the Institute of Brewing, 2017. **123**(1): 105-112.
- Bajer, T.,** Surmová, S., Eisner, A., Ventura, K., Bajerová, P.: *Use of simultaneous distillation-extraction, supercritical fluid extraction and solid-phase microextraction for characterisation of the volatile profile of Dipteryx odorata (Aubl.) Willd.* Industrial Crops and Products, 2018. **119**: 313-321.
- Bajer, T.,** Šulc, J., Ventura, K., Bajerová, P.: *Design of the Extraction Process for Characterization of Volatile Profile of Stem Wood by Solid-Phase Microextraction.* Natural Product Communications, 2019. **14**(5).
- Machová, M., **Bajer, T.,** Šilha, D., Ventura, K., Bajerová, P.: *Release of volatile compounds from sliced onion analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry and its antimicrobial activity.* Journal of Food and Nutrition Research, 2019. **58**(4): 393-400.
- Řebíčková, K., **Bajer, T.,** Šilha, D., Houdková, M., Ventura, K., Bajerová, P.: *Chemical Composition and Determination of the Antibacterial Activity of Essential Oils in Liquid and Vapor Phases Extracted from Two Different Southeast Asian Herbs-Houttuynia cordata (Saururaceae) and Persicaria odorata (Polygonaceae).* Molecules, 2020. **25**(10).
- Řebíčková, K., **Bajer, T.,** Šilha, D., Ventura, K., Bajerová, P.: *Comparison of Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation of Laurus nobilis L.* Plant Foods for Human Nutrition, 2020. **75**(4): 495-504.
- Šilha, D., Švarcová, K., **Bajer, T.,** Královec, K., Tesařová, E., Moučková, K., Pejchalová, M., Bajerová, P.: *Chemical Composition of Natural Hydrolates and Their Antimicrobial Activity on Arcobacter-Like Cells in Comparison with Other Microorganisms.* Molecules, 2020. **25**(23).
- Bajer, T.,** Hill, M., Ventura, K., Bajerová, P.: *Authentication of fruit spirits using HS-SPME/GC-FID and OPLS methods.* Scientific Reports, 2020. **10**(1).
- Bajer, T.,** Šulc, J., Ventura, K., Bajerová, P.: *Volatile compounds fingerprinting of larch tree samples for Siberian and European larch distinction.* European Journal of Wood and Wood Products, 2020. **78**(2): 393-402.
- Machová, M., **Bajer, T.,** Šilha, D., Ventura, K., Bajerová, P.: *Volatiles Composition and Antimicrobial Activities of Areca Nut Extracts Obtained by Simultaneous Distillation-Extraction and Headspace Solid-Phase Microextraction.* Molecules, 2021. **26**(24): 7422.

4 Ostatní publikované práce

V této části habilitační práce jsou uvedeny publikace v odborných časopisech, na kterých se autor podílel, ale které primárně nesouvisí s předchozími diskutovanými publikacemi. Jedná se o tři publikace, z nichž jedna je z oblasti petrochemie, druhá publikace pojednává o extrakci syntetických barviv z potravin a třetí pak navazuje na problematiku fenolických sloučenin.

Práce zabývající se stanovením 2-ethylhexylnitrátu v naftě (Příloha 22) pomocí infračervené spektrometrie navazuje na autorovo odborné zaměření z doby, kdy se pohyboval přes sedm let v soukromém sektoru v oblasti petrochemie a zahrnuje vývoj a validaci analytické metody pro stanovení aditiva pro zvýšení cetanového čísla v motorové naftě obsahující biosložku a ve směsné motorové naftě.

Ve studii pojednávající o extrakci a stanovení syntetických potravinářských barviv v cukrovinkách modifikovanou metodou QuEChERS (Příloha 23) byla vyvinuta rychlá, snadná a účinná metoda pro extrakci syntetických potravinářských barviv jako alternativa k do té doby běžně používané metodě založené na extrakci barviv pomocí vlněných vláken. Metoda QuEChERS (odvozeno z anglického „quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe“, tj. „rychlý, snadný, levný, účinný, odolný a bezpečný“) byla původně vyvinuta pro stanovení pesticidů v potravinách (Lehotay et al. 2010).

Poslední diskutovaná práce (Příloha 24) je přehledový článek vzniklý jako reakce na nejasné názvosloví některých sloučenin ze skupiny chlorogenových kyselin, a to konkrétně v případě kyseliny 5-kafeoylchinové a 3-kafeoylchinové. Tyto nejasnosti se objevily při studiu informací o fenolických sloučeninách, kam také obě kyseliny patří. Příčinou zmíněných nejasností je skutečnost, že pro kyselinu 5-kafeoylchinovou a kyselinu 3-kafeoylchinovou jsou používány triviální názvy, a to kyselina chlorogenová a neochlorogenová. Před rokem 1976, kdy byla vydána nová pravidla pro názvosloví, byla kyselina 3-kafeoylchinová triviálně označována jako kyselina chlorogenová. Po zavedení nového názvosloví se ale číslování změnilo, tzn. z kyseliny 3-kafeoylchinové se rázem stala kyselina 5-kafeoylchinová a opačně. Jinými slovy, kyselina chlorogenová dostala jiný systematický název a od roku 1976 se kyselina 5-kafeoylchinová má správně triviálně nazývat kyselina chlorogenová. Mnozí výzkumníci a také dodavatelé chemikálií však nadále (a nesprávně) používají pro kyselinu 3-kafeoylchinovou triviální název kyselina chlorogenová, přičemž ve skutečnosti tento název je určen pro kyselinu 5-kafeoylchinovou. Kyselina 3-kafeoylchinová má triviální název kyselina neochlorogenová.

4.1 Seznam komentovaných publikací pro kapitulu 4

Seznam publikací komentovaných v kapitole 4, řazeno vzestupně podle data vydání. Kopie prací viz přílohy.

Bajerová, P., **Bajer, T.**, Adam, M., Eisner, A., Ventura, K.: *Fast determination of 2-ethylhexyl nitrate in diesel oils by infrared spectrometry*. Fuel, 2014. **117**: 911-916.

Kremr, D., **Bajer, T.**, Bajerová, P., Surmová, S., Ventura, K.: *UNREMITTING PROBLEMS WITH CHLOROGENIC ACID NOMENCLATURE: A REVIEW*. Quimica Nova, 2016. **39**(4): 530-533.

Adam, M., **Bajer, T.**, Bajerová, P., Ventura, K.: *Modified QuEChERS Approach for Analysis of Synthetic Food Dyes in Jellies and Smarties*. Food Analytical Methods, 2018. **11**(6): 1619-1626.

5 Přílohy

Kopie publikovaných prací v impaktovaných časopisech (seřazeny podle výskytu v textu):

- 1 **Bajer, T.**, Adam, M., Galla, L. a Ventura, K., *Comparison of various extraction techniques for isolation and determination of isoflavonoids in plants*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(1): 122-127.
- 2 Bajerová, P., Adam, M., **Bajer, T.** a Ventura, K., *Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants*. Journal of Separation Science, 2014. **37**(7): 835-844.
- 3 **Bajer, T.**, Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A., Adam, M. a Ventura, K., *Comparison of Two Ultrasonic Systems with Different Settings for Extraction of Capsaicinoids from Chili Peppers*. International Journal of Food Engineering, 2016. **12**(6): 567-576.
- 4 **Bajer, T.**, Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A. a Ventura, K., *Central composite design of pressurised hot water extraction process for extracting capsaicinoids from chili peppers*. Journal of Food Composition and Analysis, 2015. **40**(0): 32-38.
- 5 Kašpar, M., **Bajer, T.**, Bajerová, P. a Česla, P., *Comparison of Phenolic Profile of Balsamic Vinegars Determined Using Liquid and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry*. Molecules, 2022. **27**: 1356.
- 6 Adam, M., Juklová, M., **Bajer, T.**, Eisner, A. a Ventura, K., *Comparison of three different solid-phase microextraction fibres for analysis of essential oils in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves*. Journal of Chromatography A, 2005. **1084**(1-2): 2-6.
- 7 **Bajer, T.**, Janda, V., Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A. a Ventura, K., *Chemical composition of essential oils from plantago lanceolata L. leaves extracted by hydrodistillation*. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2016. **53**(3): 1576-1584.
- 8 **Bajer, T.**, Šilha, D., Ventura, K. a Bajerová, P., *Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb.* Industrial Crops and Products, 2017. **100**: 95-105.
- 9 **Bajer, T.**, Bajerová, P. a Ventura, K., *Effect of Harvest and Drying on Composition of Volatile Profile of Elderflowers (*Sambucus nigra*) from Wild*. Natural Product Communications, 2017. **12**(12): 1937-1942.
- 10 Řebíčková, K., **Bajer, T.**, Šilha, D., Houdková, M., Ventura, K. a Bajerová, P., *Chemical Composition and Determination of the Antibacterial Activity of Essential Oils in Liquid and Vapor Phases Extracted from Two Different Southeast Asian Herbs-*Houttuynia cordata* (Saururaceae) and *Persicaria odorata* (Polygonaceae)*. Molecules, 2020. **25**(10).
- 11 **Bajer, T.**, Ligor, M., Ligor, T. a Buszewski, B., *Design of the extraction process for terpenes and other volatiles from allspice by solid-phase microextraction and hydrodistillation*. Journal of Separation Science, 2016. **39**(4): 769-775.
- 12 Řebíčková, K., **Bajer, T.**, Šilha, D., Ventura, K. a Bajerová, P., *Comparison of Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation of *Laurus nobilis* L.* Plant Foods for Human Nutrition, 2020. **75**(4): 495-504.

- 13 Šilha, D., Švarcová, K., **Bajer, T.**, Královec, K., Tesařová, E., Moučková, K., Pejchalová, M. a Bajerová, P., *Chemical Composition of Natural Hydrolates and Their Antimicrobial Activity on Arcobacter-Like Cells in Comparison with Other Microorganisms*. *Molecules*, 2020. **25**(23).
- 14 **Bajer, T.**, Surmová, S., Eisner, A., Ventura, K. a Bajerová, P., *Use of simultaneous distillation-extraction, supercritical fluid extraction and solid-phase microextraction for characterisation of the volatile profile of *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.* *Industrial Crops and Products*, 2018. **119**: 313-321.
- 15 Machová, M., **Bajer, T.**, Šilha, D., Ventura, K. a Bajerová, P., *Volatiles Composition and Antimicrobial Activities of Areca Nut Extracts Obtained by Simultaneous Distillation-Extraction and Headspace Solid-Phase Microextraction*. *Molecules*, 2021. **26**(24): 7422.
- 16 Kremr, D., Bajerová, P., **Bajer, T.**, Eisner, A., Adam, M. a Ventura, K., *Using headspace solid-phase microextraction for comparison of volatile sulphur compounds of fresh plants belonging to families Alliaceae and Brassicaceae*. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 2015. **52**(9): 5727-5735.
- 17 Machová, M., **Bajer, T.**, Šilha, D., Ventura, K. a Bajerová, P., *Release of volatile compounds from sliced onion analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry and its antimicrobial activity*. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2019. **58**(4): 393-400.
- 18 **Bajer, T.**, Bajerová, P., Surmová, S., Kremr, D., Ventura, K. a Eisner, A., *Chemical profiling of volatile compounds of various home-made fruit spirits using headspace solid-phase microextraction*. *Journal of the Institute of Brewing*, 2017. **123**(1): 105-112.
- 19 **Bajer, T.**, Hill, M., Ventura, K. a Bajerová, P., *Authentication of fruit spirits using HS-SPME/GC-FID and OPLS methods*. *Scientific Reports*, 2020. **10**(1).
- 20 **Bajer, T.**, Šulc, J., Ventura, K. a Bajerová, P., *Design of the Extraction Process for Characterization of Volatile Profile of Stem Wood by Solid-Phase Microextraction*. *Natural Product Communications*, 2019. **14**(5).
- 21 **Bajer, T.**, Šulc, J., Ventura, K. a Bajerová, P., *Volatile compounds fingerprinting of larch tree samples for Siberian and European larch distinction*. *European Journal of Wood and Wood Products*, 2020. **78**(2): 393-402.
- 22 Bajerová, P., **Bajer, T.**, Adam, M., Eisner, A. a Ventura, K., *Fast determination of 2-ethylhexyl nitrate in diesel oils by infrared spectrometry*. *Fuel*, 2014. **117**: 911-916.
- 23 Adam, M., **Bajer, T.**, Bajerová, P. a Ventura, K., *Modified QuEChERS Approach for Analysis of Synthetic Food Dyes in Jellies and Smarties*. *Food Analytical Methods*, 2018. **11**(6): 1619-1626.
- 24 Kremr, D., **Bajer, T.**, Bajerová, P., Surmová, S. a Ventura, K., *UNREMITTING PROBLEMS WITH CHLOROGENIC ACID NOMENCLATURE: A REVIEW*. *Quimica Nova*, 2016. **39**(4): 530-533.