



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**ANALÝZA SENZORICKY AKTIVNÍCH LÁTEK  
OBSAŽENÝCH V BYLINNÝCH EXTRAKTECH**

ANALYSIS OF SENSORIALLY ACTIVE SUBSTANCES CONTAINED HERBAL EXTRACTS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Markéta Koloničná**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.**

**BRNO 2017**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1042/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Markéta Koloničná**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Analýza sensoricky aktivních látek obsažených v bylinných extraktech

### Zadání diplomové práce:

- 1) Zpracování literární rešerše na téma:
  - a) Přehled silic ve vybraných bylinách (máta, meduňka, heřmánek, šalvěj a kozlík)
  - b) Přehled extrakčních metod pro získání bylinných extraktů
  - c) Možnosti stanovení sensoricky aktivních látek v bylinných extraktech
- 2) Experimentální část:
  - a) Optimalizace metody GC-MS pro stanovení sensoricky aktivních látek v bylinných extraktech
  - b) Stanovení a vyhodnocení obsahu sensoricky aktivních látek v bylinných extraktech

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Markéta Koloničná  
student(ka)

-----  
RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Máta peprná (*Mentha piperita*), šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*), heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*) a kozlík lékařský (*Valeriana officinalis*) jsou byliny s léčivými vlastnostmi. Jejich ethanolové extrakty se využívají k fortifikaci potravin či v kosmetice. V této práci byly analyzovány obsahové látky v extraktech vybraných bylin, které byly připraveny macerací a následně analyzovány plynovým chromatografem s hmotnostním detektorem. Cílem práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení sensoricky aktivních látek, ty poté stanovit a vyhodnotit.

## **ABSTRACT**

The peppermint (*Mentha piperita*), the salvia (*Salvia officinalis*), the lemon balm (*Melissa officinalis*), the camomile (*Matricaria chamomilla*) and the valerian (*Valeriana officinalis*) are herbs with healing effects. Their ethanol extracts are used for food fortification or in a cosmetic industry. Substances contained in herbal extracts were analyzed in this thesis. The extracts were prepared by maceration. Next, they were analyzed by using a gas chromatography and a mass spectrometry. The aim of this thesis was an optimalization of the method used for the analysis of sensorially active substances. Then, herbal extracts were analyzed and concentration of sensorially active substances was determined.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

máta, šalvěj, meduňka, heřmánek, kozlík, silice, extrakt, SPME, GC-MS

## **KEY WORDS**

peppermint, salvia, lemon balm, camomile, valerian, essential oils, extract, SPME, GC-MS

KOLONIČNÁ, M. *Analýza senzoricky aktivních látek obsažených v bylinných extraktech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 58 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Renata Mikulíková, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studentky

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji paní RNDr. Renatě Mikulíkové, Ph.D. za vstřícnost, trpělivost a odborné vedení při realizaci této diplomové práce. Dále děkuji panu Ing. Zdeňku Svobodovi za odborné vedení praktické části diplomové práce a kolektivu v laboratoři Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně.

Diplomová práce byla vypracována v rámci projektu TAČR TE02000177 „Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Vybrané byliny .....	9
2.1.1	Máta peprná ( <i>Mentha piperita</i> ) .....	9
2.1.2	Šalvěj lékařská ( <i>Salvia officinalis</i> ).....	10
2.1.3	Meduňka lékařská ( <i>Melissa officinalis</i> ) .....	11
2.1.4	Heřmánek pravý ( <i>Matricaria chamomilla</i> ) .....	13
2.1.5	Kozlík lékařský ( <i>Valeriana officinalis</i> ).....	14
2.2	Chemické složení silic .....	15
2.2.1	Fenylpropanoidy.....	15
2.2.2	Terpenoidy, terpenové uhlovodíky .....	15
2.2.2.1	Monoterpeny .....	16
2.2.2.2	Iridoidy.....	16
2.2.2.3	Seskviterpeny.....	16
2.2.2.4	Diterpeny.....	16
2.2.2.5	Triterpeny.....	16
2.2.2.6	Tetraterpeny .....	16
2.2.2.7	Terpenové alkoholy .....	16
2.2.2.8	Terpenové ethery .....	17
2.2.2.9	Terpenové aldehydy.....	17
2.2.2.10	Terpenové ketony.....	17
2.3	Extrakční metody pro získání bylinných extraktů.....	18
2.3.1	Destilace s vodní parou .....	18
2.3.2	Extrakce rozpouštědlem .....	18
2.3.3	Extrakce na fluidním loži .....	19
2.3.4	Macerace .....	19
2.4	Analýza sensoricky aktivních látek v bylinných extraktech .....	19
2.4.1	Plynová chromatografie .....	19
2.4.1.1	Zásobník plynné fáze .....	20
2.4.1.2	Zařízení k regulaci tlaku .....	20
2.4.1.3	Dávkovací zařízení.....	20
2.4.1.4	Kolona.....	21

2.4.1.5	Termostat .....	21
2.4.1.6	Detektor.....	21
2.4.1.7	Chromatografický záznam.....	22
2.4.2	Kapalinová chromatografie .....	22
2.4.2.1	Čerpadla .....	23
2.4.2.2	Dávkovací zařízení.....	23
2.4.2.3	Kolony.....	23
2.4.2.4	Detektory.....	23
2.4.3	Mikroextrakce tuhou fází – SPME.....	24
2.4.4	Dynamická extrakce vzorků na pevné fázi – SPDE.....	25
2.4.5	Headspace techniky.....	25
2.4.5.1	Statická headspace .....	25
2.4.5.2	Dynamická headspace.....	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	26
3.1	Materiál.....	26
3.2	Použité laboratorní vybavení .....	26
3.3	Chemikálie.....	26
3.4	Pracovní postup .....	27
3.4.1	Příprava vzorků bylinných extraktů pro analýzu .....	27
3.4.2	Příprava standardních roztoků.....	27
3.4.2.1	Standard pro analýzu mátového extraktu.....	27
3.4.2.2	Standard pro analýzu šalvějového extraktu .....	27
3.4.2.3	Standard pro analýzu meduňkového extraktu.....	28
3.4.2.4	Standard pro analýzu heřmánkového extraktu.....	28
3.4.2.5	Standard pro analýzu kozlíkového extraktu.....	28
3.4.3	Optimalizace HS-SPME.....	29
3.4.3.1	Optimalizace doby headspace extrakce .....	29
3.4.3.2	Optimalizace teploty headspace extrakce .....	29
3.4.4	Analýza bylinných extraktů .....	30
3.4.4.1	GC-MS .....	30
3.5	Validace metody .....	30
3.5.1	Aritmetický průměr .....	30
3.5.2	Směrodatná odchylka .....	30

3.5.3	Relativní směrodatná odchylka .....	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	32
4.1	Optimalizace HS-SPME .....	32
4.2	Plynová chromatografie GC-MS .....	32
4.2.1	Máta peprná.....	32
4.2.2	Šalvěj lékařská.....	36
4.2.3	Meduňka lékařská .....	38
4.2.4	Heřmánek pravý .....	40
4.2.5	Kozlík lékařský .....	42
5	ZÁVĚR.....	45
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	46
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	50
8	SEZNAM PŘÍLOH .....	51
9	PŘÍLOHY .....	51

# 1 ÚVOD

Pojem sensoricky aktivní látka znamená, že její chuťové a čichové vlastnosti dokážeme vnímat smysly. Do této skupiny patří veškeré vonné látky v přírodě, které produkují živé organismy, především rostliny. Většina z nich jsou látky těkavé a rostliny je vytvářejí biogenetickým (mevalonátovým) či fenyylpropanovým (šikimátovým) procesem.

Zjednodušeně je mevalonátový proces popsán jako kondenzace izoprenových jednotek za přítomnosti specifického enzymu. Jako meziproduct se zde tvoří kyselina mevalonová a podle ní byl proces pojmenován. Následuje vznik terpenických látek, které se vyskytují v silicích [1].

Vonné látky, které obsahují aromatické jádro, vznikají procesem šikimátovým a výchozí látkou zde bývá glukosa. Jedním z meziproductů je kyselina šikimátová, nakonec však vzniká kyselina skořicová. Z ní dále biosyntetickými procesy vznikají aromatické sloučeniny, kumariny a jejich deriváty, a látky fenolické [1].

Silice obsahují uhlovodíky, kyslíkaté látky, alifatické a aromatické sloučeniny. Skládají se z izoprenových jednotek, řadí se mezi terpeny. Vonné a chuťové vlastnosti silic mají za příčinu většinou molekuly obsahující kyslík. Většinou jde o látky kapalné, nerozpustné ve vodě a rozpustné v ethanolu a jiných organických rozpouštědlech [1].

Silice se získávají z různých částí rostlin, například z květů (růže, jasmín, aj.), ze stonků, popřípadě z kvetoucích stonků (meduňka, máta, aj.), z plodů a semen (kmín, jalovec, aj.), ze dřeva, z kořenů a oddenků, z listů nebo z pryskyřic produkovaných rostlinami. Z přibližně 100 000 v současnosti popsáných druhů rostlin, necelé 2 000 obsahují silice a v praxi je užitečných zhruba jen 200 [1].

Z rostlin lze získat také bylinné extrakty různými způsoby. Nejčastěji se využívá procesu zvaného macerace, tedy extrakce rozpouštědlem (ethanol) za studena [24].

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Vybrané byliny

#### 2.1.1 Máta peprná (*Mentha piperita*)

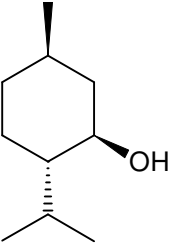
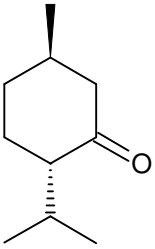
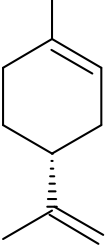
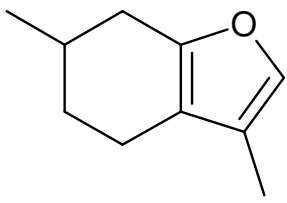
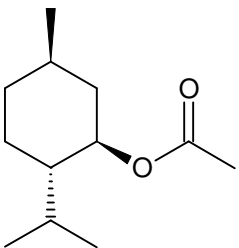
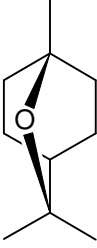
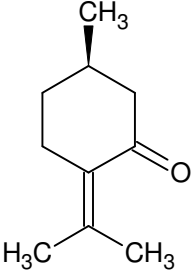
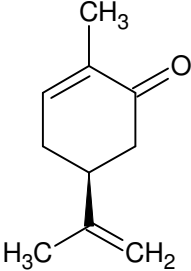
Máta peprná je léčivá bylina z čeledi hluchavkovitých. Je 30 až 90 cm vysoká s přímou lodyhou, která se nahoře větví. Květy jsou růžové až nafialovělé barvy. Máta roste volně v přírodě, převážně v mírném pásu celého světa. Již po staletí Římané mátou dochucovali omáčky a víno. Nejlépe se jí daří na vlhkých, vápenitých půdách v polostínu. Listová silice, která obsahuje převážně menthol (30–55 %), má chladivé účinky, tedy zmírňuje pocity svědění, a pomáhá při silném nachlazení, chřipce a bolestech svalů [6], [7], [11], [14], [20].



Obrázek 1: Máta peprná [19]

Mátová silice obsahuje kromě mentholu v největší míře také menthon (14–32 %). Mezi další aktivní látky přítomny v mátě patří: limonen, cineol, menthofuran, menthyl-acetát, isomenthon, pulegon a karvon [2], [5], [8], [9], [20]. Jejich chemické struktury jsou uvedeny v tabulce (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Chemické struktury látek mátové silice

menthol	menthon	limonen	menthofuran
			
menthyl-acetát	cineol	pulegon	karvon
			

### 2.1.2 Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*)

Šalvěj lékařská je silně aromatická rostlina rovněž z čeledi hluchavkovitých. Roste do výšky 30 až 70 cm a na její přímé lodyze se větví květenství o 4 až 10 fialových květech. O léčivých účincích šalvěje věděli už ve starověkém Egyptě, kdy se droga využívala proti nadýmání a průjemovým onemocněním. Její hojné využití se pohybuje také v kosmetickém průmyslu, kdy se šalvějové výtažky používají například jako přísady do ústních vod a zubních past či pleťových vod. Pro svůj růst šalvěj potřebuje propustnou půdu a slunné prostředí [2], [6], [7], [12], [13].

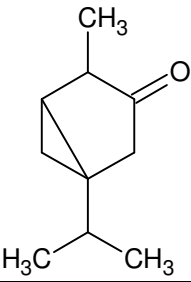
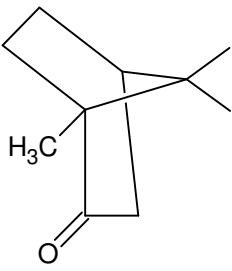
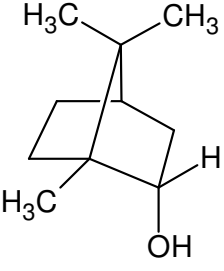
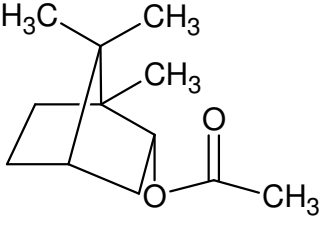
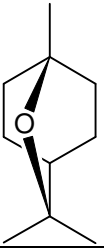


Obrázek 2: Šalvěj lékařská [10]

Hlavní látkou, kterou šalvěj obsahuje, je thujon. Ten působí na naše tělo ve vysokých dávkách omamně a předávkování může být doprovázeno zimnicí, třesem, zvracením až ztrátou vědomí [12], [15].

Mezi další aktivní látky, jež se v šalvěji vyskytují, patří ve větší míře také cineol, kafr, borneol a bornyl-acetát. Jejich chemické vzorce jsou uvedeny v tabulce (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Chemické struktury látek silice šalvěje lékařské

thujon	kafr	borneol	bornyl-acetát
			
cineol			
			

### 2.1.3 Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*)

Meduňka lékařská je léčivá rostlina, která se také řadí do čeledi hluchavkovitých. Charakteristická je pro ni citronová vůně a tu má na svědomí směs látek, jako jsou citral, citronellal a citronellol. Meduňka dorůstá výšky až 100 cm a na její lodyze rostou dva typy listů. Spodní dlouze řapíkaté a vrchní srdčité s krátkým řapíkem. Květy meduňky jsou drobné, bílé.

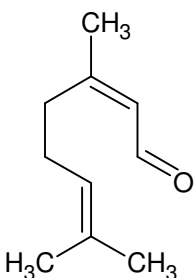
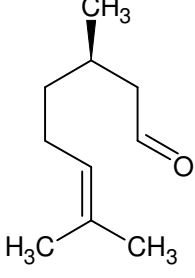
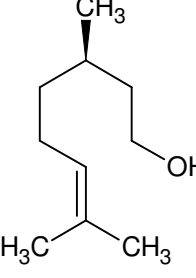
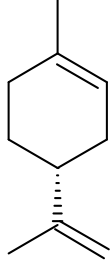
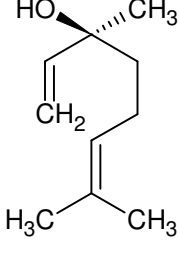
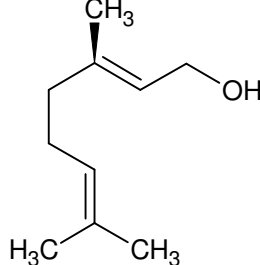
Léčivé účinky meduňky lékařské jsou známé především jako uklidňující prostředky, nejvíce v oblasti trávicího traktu a srdce, také mírně snižuje krevní tlak. Meduňka je vytrvalá bylina, která pro svůj růst vyžaduje lehké půdy bohaté na vápník [1], [2], [3], [7], [23].



Obrázek 3: Meduňka lékařská [16]

Mezi hlavní účinné látky meduňky patří silice, které je v rostlině kolem 0,15 % a obsahuje látky jako citral, citronellol, citronellal, geraniol, limonen a linalool. Jejich chemické vzorce jsou uvedeny v tabulce (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Chemické struktury látek silice meduňky lékařské

citral	citronellal	citronellol
		
limonen	linalool	geraniol
		

#### 2.1.4 Heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*)

Heřmánek pravý, též heřmánek lékařský, je léčivá rostlina z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). Jednoletá vonná bylina dorůstá výšky 15 až 50 cm. Bílé okvětní lístky jsou válcovitého tvaru okolo uprostřed uloženého žlutého květního lůžka. Heřmánek pravý má mírně sedativní účinky, celkově zklidňuje a usnadňuje usínání. Účinkuje zevně na kožní vyrážky a záněty, proto se užívá i v řadě kosmetických produktů. Často jej můžeme spatřit růst jako plevel v obilí [2], [6], [7], [22].



Obrázek 4: Heřmánek pravý [17]

Aktivními látkami heřmánku jsou především silice (obsah 1 až 3 %), které obsahují ve značné míře  $\alpha$ -bisabolol, farnesen, azulen, *p*-cymen, limonen a bisabolol oxid A. Jejich chemické struktury jsou uvedeny v tabulce (viz Tabulka 4).

Tabulka 4: Chemické struktury látek silice heřmánku pravého

$\alpha$ -bisabolol	farnesen	azulen
bisabolol oxid A	limonen	<i>p</i> -cymen

### 2.1.5 Kozlík lékařský (*Valeriana officinalis*)

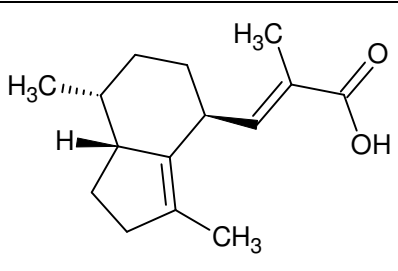
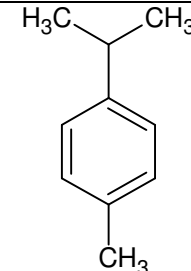
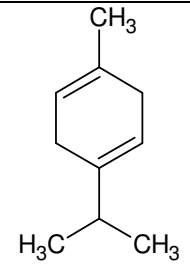
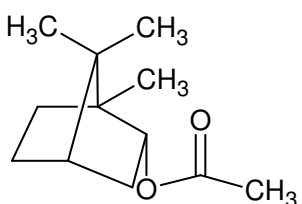
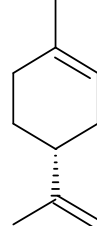
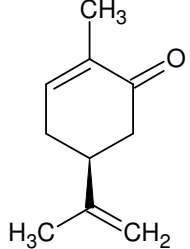
Kozlík lékařský je vytrvalá bylina a řadí se mezi rostliny z čeledi kozlíkovitých. Dorůstá výšky až 200 cm a z přímé, duté lodyhy se větví květenství s malými bílými až růžovými květy. U nás v České republice roste velmi hojně zejména v nižších polohách a charakteristicky zapáchá. Už ve středověku se kozlík používal k léčivým účelům při nespavosti, slabosti, nervozitě či křečím. Hojně se vyskytuje ve vlhkém prostředí lesních cest a luk na hlinitých půdách [2], [6], [7], [18], [21].



Obrázek 5: Kozlík lékařský [18]

Hlavními aktivními látkami kozlíku lékařského jsou kyselina valerenová, bornyl-acetát, limonen, *p*-cymen, terpinen a karvon. Chemické struktury těchto látek jsou uvedeny v tabulce (viz Tabulka 5)

Tabulka 5: Chemické vzorce látek v silici kozlíku lékařského

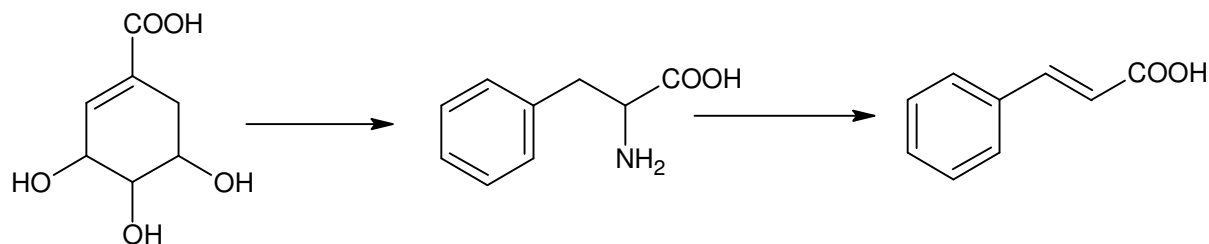
kyselina valerénová	<i>p</i> -cymen	$\gamma$ -terpínen
		
bornyl-acetát	limonen	karvon
		

## 2.2 Chemické složení silic

Silice jsou složité směsi těkavých látek obsažené v přírodních rostlinných materiálech. Silice se dříve nazývaly také éterické oleje. Nejčastěji jsou tvořeny terpeny a terpenovými deriváty, alkoholy, aldehydy, ketony a karboxylovými kyselinami. Lze je rozdělit do dvou základních skupin podle jejich chemické struktury na terpenoidy a fenylypropanoidy [24], [44].

### 2.2.1 Fenylypropanoidy

Fenylypropanoidy ve své struktuře obsahují aromatické jádro, na němž je navázán další uhlíkatý zbytek. Biogeneticky se vychází z kyseliny šikimové a přes fenylyalanin se získává kyselina skořicová (strukтуры viz Obrázek 6). Ta dále podléhá redukčním reakcím za účelem tvorby fenylypropenu [24], [44].

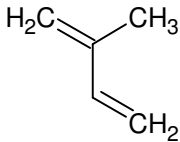
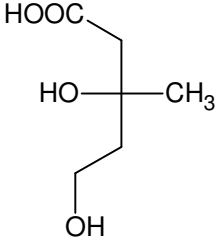


Obrázek 6: Kyselina šikimová (vlevo), fenylyalanin (uprostřed), kyselina skořicová (vpravo)

### 2.2.2 Terpenoidy, terpenové uhlovodíky

Terpenové uhlovodíky se jinak nazývají také terpenoidy nebo izoprenoidy a jejich základní jednotkou je izopren. Prekursorem terpenoidů je kyselina mevalonová (struktura je uvedena v tabulce viz Tabulka 6). Terpenové uhlovodíky lze dělit podle počtu uhlíků, dle struktury na cyklické a nocyklické a dle funkčních skupin na alkoholy, aldehydy, ketony, estery, apod. [24], [44].

Tabulka 6: Chemické struktury

izopren	kyselina mevalonová
	

### 2.2.2.1 Monoterpeny

Jde o desetiuhlíkaté sloučeniny, které tvoří dvě izoprenové jednotky. Jsou hlavní složkou těkavých silic, jsou cyklické i necyklické, v přírodě se často vyskytují jako kyslíkaté deriváty, tedy alkoholy, aldehydy a ketony. Patří sem například linalool, menthol, thymol, aj [1], [24], [25], [44].

### 2.2.2.2 Iridoidy

Iridoidy mají monoterpenový základ, ale jejich vlastnosti se od monoterpenů zcela liší. V přírodě se vyskytují ve formě glykosidů. Jde převážně o deriváty cyklopentanu [1], [24].

### 2.2.2.3 Seskviterpeny

Základní skelet obvykle obsahuje 15 uhlíků, čili 3 izoprenové jednotky. Rozlišujeme seskviterpeny cyklické a necyklické. Tvoří jednu z hlavních složek silic, např. azuleny [24], [44].

### 2.2.2.4 Diterpeny

Diterpeny jsou sloučeniny tvořící 20 uhlíků, tedy 4 izoprenové jednotky. Necyklické diterpeny jsou velmi vzácné a mají snahu se zacyklit, tedy zaujmout co nejmenší prostor. Patří zde například retinol, dehydroretinol, aj. [1], [24].

### 2.2.2.5 Triterpeny

Triterpeny jsou sloučeniny tvořící 6 izoprenových jednotek, čili 30 uhlíků. Jde o skupinu přírodních látek steroidní povahy (steroidy, hormony, aj.) a triterpenoidy (saponiny, aj.) [24], [44].

### 2.2.2.6 Tetraterpeny

Základní skelet se skládá z osmi izoprenových jednotek, tedy z čtyřiceti uhlíků. Jejich deriváty se nazývají karotenoidy, obsahují je barviva lipofilní povahy (žlutá a červená), například  $\beta$ -karoten [1], [24].

### 2.2.2.7 Terpenové alkoholy

Alkoholy, především monoterpenové, jsou nositeli sladké, květinové vůně. Nejvýznamnějším takovým alkoholem je linalool, který obsahuje např. levandule. Patří sem také ale citronellal, graniol, nerol aj. [1], [24].

#### **2.2.2.8 Terpenové ethery**

Ethery jsou složkami vyskytujícími se v různých druzích koření. Např. anetol obsahuje silice fenyklová a anýzová a methyleugenol silice hřebíčková. Dalším příkladem je myristicin, což je látka, kterou obsahuje silice muškátového oříšku. Ve velkém množství však vykazuje halucinogenní vlastnosti [1], [24].

#### **2.2.2.9 Terpenové aldehydy**

Nejčastěji vyskytujícím se aldehydem je citral, který je jednou z hlavních složek silice citronové a zázvorové. Dalším významným aldehydem je aromatický benzaldehyd, který voní po hořkých mandlích, a je tudíž složkou mandlové silice. Nejvýznamnějším hydroxyderivátem aromatických aldehydů je vanilin, který je základní složkou silice vanilkové [1], [24].

#### **2.2.2.10 Terpenové ketony**

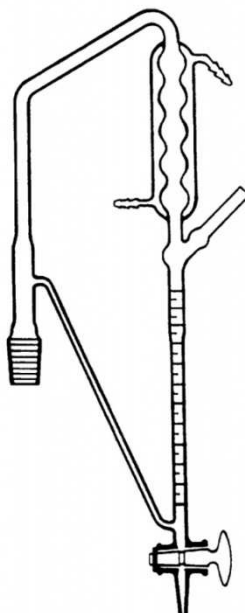
Mezi ketony patří např. 2-pentanon, který je složkou skořicové silice a mnoha silic různých květin. Nejznámější jsou monoterpenové ketony k nimž patří třeba menthon, vyskytující se právě v mátové silici. Patří zde také pulegon, kafr, aj. [1], [24].

## 2.3 Extrakční metody pro získání bylinných extraktů

Silice mohou být obsaženy v celé rostlině, nebo je jejich výskyt omezen na určitou část rostliny – květ, list, lodyha nebo plod. Získání silic je ve většině případů náročným postupem. K jejich extrakci jsou používány především metody destilace s vodní parou, extrakce rozpouštědlem, extrakce na fluidním loži či macerace.

### 2.3.1 Destilace s vodní parou

Nejčastěji používanou metodou pro získání silic je destilace s vodní parou. Destilací s vodní parou se dělí látky málo rozpustné ve vodě. Rostlinný materiál je umístěn v proudu páry. Destilace se provádí na speciálním nástavci (viz Obrázek 7), kde dojde k oddestilování silic a stanoví se jejich obsah ve vzorku. Je-li silice těžší než voda, používá se pro destilaci směs vody a glycerolu. Vzhledem k užití zvýšené teploty může dojít k tepelné degradaci vonných látek. Kvůli nízké selektivitě destilace se někdy provádí také dodatečná purifikace extraktu použitím extrakce pevnou fází (SPE). Destilace s vodní parou se užívá pro izolaci prchavých látek. Izolované látky jsou následně analyzovány headspace technikou [26].



Obrázek 7: Speciální nástavec pro destilaci silic [33]

### 2.3.2 Extrakce rozpouštědlem

Extrakce je metoda, která je založena na distribuci složky mezi dvě fáze, tuhou a kapalnou nebo dvě kapalné nemísitelné fáze. Přímá extrakce rozpouštědlem je nejjednodušší a nejvíce užívaná extrakční metoda.

Extrakce kapalina – kapalina umožňuje mnoho rychlých dělení různých látek v širokém rozmezí koncentrací. Vonné látky lze obvykle přímo extrahovat do vhodného rozpouštědla.

Výhodou přímé extrakce je, že veškeré látky jsou izolované v jediné operaci. Nutný je správný výběr rozpouštědla. Důležité je, aby mělo vhodnou polaritu, teplotu varu, viskozitu, polaritu a zdravotní nezávadnost. Nejčastěji se užívají organické látky s nízkou teplotou varu, například ethanol, methanol, aceton, chloroform, ether, aj [24], [26], [45].

### 2.3.3 Extrakce na fluidním loži

Vzorek je u této metody dávkován do extrakční patrony a extrahován vhodným rozpouštědlem. Rozpouštědlo se zahřívá až k bodu varu a jeho páry pronikají přes filtr do extrakční trubice. V chladiči pak páry kondenzují a rozpouštědlo kape na vzorek v extrakční patroně. Jde o velice efektivní extrakční metodu. Výhodou je, že může být extrahováno více vzorků současně a vše kontroluje počítač [39].

### 2.3.4 Macerace

Macerace, jinými slovy, výluh drogy za studena, je metoda, jíž se vyrábí bylinné tinktury či likéry. Jejím princip spočívá ve vyluhování čerstvých nebo sušených, nadrcených bylin ve vodě či různě koncentrovaných roztocích ethanolu. Macerace v lihu byla využívána již starými arabskými alchymisty, od kterých pak metodu převzali obyvatelé Evropy.

Prakticky se macerace provádí tak, že se připravené byliny vloží do nádoby, zalijí se roztokem ethanolu v koncentraci nejčastěji od 40 do 90 % a nechají se nějaký čas vyluhovat. Obvykle luhování trvá, za občasného promíchání, přibližně 14 dní. Záleží ale velmi na složení macerované směsi. Obecně platí zásada, že čím silnější je ethanol, tím kratší je doba macerace a naopak [27], [28].

## 2.4 Analýza senzoričky aktivních látek v bylinných extraktech

K analýze senzoričky aktivních látek se využívají chromatografické metody. Jsou to metody separační, při kterých dochází k rozdělení jednotlivých složek obsažených ve vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě fáze – mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Mobilní fáze vzorek unáší po stacionární fázi, na které se složky zachycují. Z hlediska geometrického uspořádání stacionární fáze se rozlišuje chromatografie kolonová a plošná (planární). Nejčastěji se využívá plynová a kapalinová chromatografie [24], [34], [46].

Někdy se může použít k zakoncentrování vzorku před analýzou mikroextrakce tuhou fází ve spojení s headspace technikou.

### 2.4.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography) patří mezi nejužívanější separační metody, je vhodná pro analýzu těkavých látek, které je možno převést do plynného stavu. Používá se především pro separaci organických látek, které mají bod varu nižší než 400 °C. Mobilní fází je inertní plyn, který je málo viskózní a stlačitelný [24], [34], [46].

Základní části plynového chromatografu jsou:

- zásobník plynné fáze,
- zařízení k regulaci tlaku,
- dávkovací zařízení,
- kolona,
- termostat,
- detektor,
- zařízení ke zpracování signálu a jeho záznam,
- vyhodnocovací zařízení.



Obrázek 8: Plynový chromatograf ve spojení s hmotnostním detektorem

#### **2.4.1.1 Zásobník plynné fáze**

Nosný plyn bývá umístěn v tlakových lahvích. Jedním z rozhodujících faktorů při jeho výběru je typ použitého detektoru a kolony. Je nutné, aby plyn byl inertní vůči složkám vzorku a nebyl toxický. V praxi se nejčastěji využívá dusík, vodík, helium a argon. Z fyzikálních vlastností plynů se zde uplatňuje hustota a viskozita, kvůli ovlivňování průtoku plynu kolonou [24], [34], [46].

#### **2.4.1.2 Zařízení k regulaci tlaku**

Udržování správného průtoku plynu kolonou je velice důležité. Průtok nosného plynu ovlivňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu. Vytvořením tlakového spádu před kolonou můžeme nejlépe regulovat průtok, změny tlaku v koloně jsou pak zanedbatelné [24].

#### **2.4.1.3 Dávkovací zařízení**

Dávkovače (injektory) slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Účinnost kolony a přesnost výsledků závisí na způsobu dávkování. Vzorek je nutno v co nejkratší době vpravit do kolony, přičemž se nesmí změnit tlakové podmínky v koloně a dávkování musí být reprodukovatelné. Plyny se dávkuje nejčastěji injekčními stříkačkami přes pryžové septum, dříve se používaly také obtokové dávkovací kohouty. Dávkování vzorků se liší v závislosti na typu kolony. Do kapilárních kolon je nutno dávkovat vzorky ve velmi malém množství. V náplňových kolonách je větší množství stacionární fáze a kolona se nezahltí, ani když

se nadávkuje větší množství vzorku. Nástřiky plynné fáze mohou být prováděny také pomocí statických nebo dynamických headspace systémů [24], [34], [46].

#### **2.4.1.4 Kolona**

Kolony se v plynové chromatografii užívají náplňové nebo kapilární. Klasické náplňové kolony se vyrábějí z nerezové oceli, hliníku, skla, polyetylenu a teflonu. Délka kolony bývá většinou 30 až 400 cm. Kapilární kolony se nejčastěji zhotovují z taveného křemene a nerezové oceli. Jejich vnitřní stěny jsou potaženy stacionární fází. Délka kolony se volí v rozmezí 10 až 200 m s vnitřním průměrem 0,1 – 0,6 mm. Obecně platí, že čím je větší tloušťka stacionární fáze, tím dochází k větší zadržci a tím i k lepší separaci [24], [34], [35].

#### **2.4.1.5 Termostat**

Termostaty regulují příkon tepla v prostoru, ve kterém je umístěna chromatografická kolona. Umožňuje udržet její konstantní teplotu. Zvýšení teploty kolony vede ke zvýšení tlaku par složky vzorku a k snížení retenčního času. V současnosti se využívají nejčastěji termostaty teplovzdušné. Vzduch bývá po zahřátí vháněn přes ventilátor do prostoru, kde jsou umístěny kolony. Termostat zajišťuje, aby byl vzorek udržován v plynném stavu [24], [34].

#### **2.4.1.6 Detektor**

Detektory mají za úkol detekovat složky, které vycházejí ven z kolony. Reagují na změny složení protékající mobilní fáze, které převádí na měřitelné veličiny. Mezi základní posuzované vlastnosti detektorů patří citlivost, šum signálu, odezva a hmotnostní průtok. Nutná je rychlá odezva a velká citlivost. Důležitá je také dobrá stabilita signálu a nízký šum [24], [34], [46].

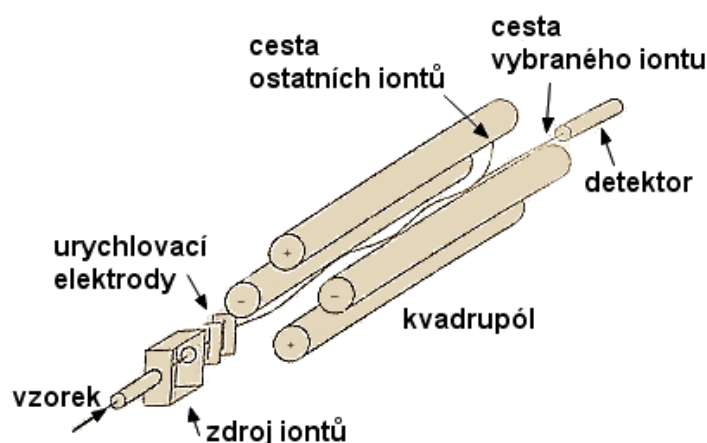
Nejuniverzálnější detektor je **tepelně-vodivostní (TCD)**. Nosný plyn zde proudí přes žhavené vlákno elektrickým proudem a ochladí je na určitou teplotu. Přítomnost složky změní tepelnou vodivost prostředí kolem žhaveného vlákna, tím i jeho teplotu a odpor. Obvykle se pracuje se dvěma žhavenými vlákny. Přes jedno proudí čistý nosný plyn a přes druhé plyn z kolony. Citlivost tepelně-vodivostního detektoru lze zvýšit zvětšením žhavicího proudu nebo použitím nosného plynu s velkou tepelnou vodivostí [24], [34].

Ionizační detektory jsou založeny na vedení elektřiny v plynech. Plyny jsou za normálních podmínek elektricky nevodivé. Jejich vodivost lze zvýšit přítomností elektricky nabitých částic. Nositel ionizační energie je nejčastěji plamen v plamenovém ionizačním detektoru nebo radioaktivní záření v detektoru elektronového záchytu. Nejpoužívanější je detektor **plamenový ionizační (FID)**. Analyt, který je unášen nosným plynem z kolony se spaluje v plazmě kyslíkovodíkového plamene, který hoří mezi dvěma elektrodami. Anoda je kovová část hořáku a katoda je kovová síťka nebo trubička, která je umístěna nad plamenem. Organické látky se teplem štěpí na radikály  $\cdot\text{CH}$  a ty se pak oxidují za vzniku iontů  $\text{CHO}^+$  a elektronů, což je rozhodující pro odezvu detektoru. Výhodou je dobrá stabilita signálu a rychlá odezva. Detektor **elektronového záchytu (ECD)** pracuje na principu zachycování elektronů elektronegativními atomy, funkčními skupinami nebo molekulami. Účinkem radioaktivního záření  $\beta$  se ionizuje nosný plyn a dochází ke vzniku kationtů a elektronů. ECD

je vysoce selektivní k látkám obsahujícím atomy halogenů, síry, olova, fosforu, k nitrosloučeninám a k aromátům [24], [34], [35], [46].

Velký význam má také spojení plynového chromatografu s **hmotnostním spektrometrem (MS)** viz Obrázek 8. Hmotnostní spektrometrie (MS – Mass Spectrometry) je instrumentální technika, která vzorek převádí na ionizovanou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje. Ionizace převážně nastává nárazem prudce letících elektronů. Jako hmotnostní analyzátor bývá používán kvadrupól nebo kvadrupólová iontová past [34], [36], [37].

Kvadrupól je magnetický analyzátor (viz Obrázek 9), u kterého dochází k separaci iontů průchodem mezi čtyřmi kovovými tyčemi, na něž je vloženo stejnosměrné napětí. Aby ionty pronikly polem, musí se podrobit oscilaci, která se udržuje konstantní. Stabilita iontů závisí na hodnotě podílu hmotnosti a náboje. Částice s rozdílnou hodnotou jsou z elektrického pole vyneseny ven a zadrženy elektrodami [34], [37].



Obrázek 9: Kvadrupól [40]

#### 2.4.1.7 Chromatografický záznam

Signál detektoru je zaznamenán na chromatogramu, který znázorňuje, v jakém sledu separované složky opustily chromatografickou kolonu. K identifikaci látky slouží umístění maxima píku v chromatogramu. Z chromatogramu lze vyčíst retenční čas  $t_R$ . Je to doba, kterou molekula složky stráví v chromatografické koloně. Retenční čas se dále dělí na dobu, kterou molekula stráví v mobilní fázi (mrtvý retenční čas  $t_M$ ) [26], [34].

#### 2.4.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se užívá k separaci směsí látek, které nejsou těkavé a jsou termicky labilní. Mobilní fázi zde tvoří kapalina a stacionární fázi sorbent, který je umístěn plošně nebo v koloně. V kolonovém uspořádání jde o chromatografii klasickou sloupcovou nebo nejčastěji využívanou **vysokoučinnou kapalinovou chromatografii – HPLC**. Separace látek se provádí na kolonách se stacionární fází o velikosti částic 3 – 10  $\mu\text{m}$ . Vzorek vstupující do kolony je unášen a zároveň rozdělován tokem mobilní fáze [34], [35], [46].

Kapalinový chromatograf se skládá ze:

- zásobníku mobilní fáze,
- čerpadla,
- směšovacího zařízení,
- dávkovacího zařízení,
- kolony,
- detektoru,
- vyhodnocovacího zařízení.

#### **2.4.2.1 Čerpadla**

Mobilní fáze se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Základním požadavkem na čerpadlo je dlouhodobá konstantnost průtoku a pracovní tlak minimálně 10 MPa. Materiál čerpadla nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky [34].

#### **2.4.2.2 Dávkovací zařízení**

Konstrukce dávkovače může ovlivnit účinnost separace. Při nedokonalém dávkování může docházet k rozšiřování elučních zón. Dávkování probíhá přímým nástřikem vzorku injekční stříkačkou na vrstvu sorbentu v koloně přes septum nebo pomocí dávkovací smyčky [24], [34].

#### **2.4.2.3 Kolony**

Kolony pro HPLC jsou rovné trubice s hladkým vnitřním povrchem z materiálu, který musí být odolný vůči vysokým pracovním tlakům (až 60 MPa) a chemickému působení mobilních fází. Nejčastěji se vyrábí z antikorozi oceli nebo z borosilikátového skla. Jako ochrana před nečistotami hlavní kolony se používá předkolona, která je umístěna mezi čerpadlem a dávkovacím zařízením [24].

#### **2.4.2.4 Detektory**

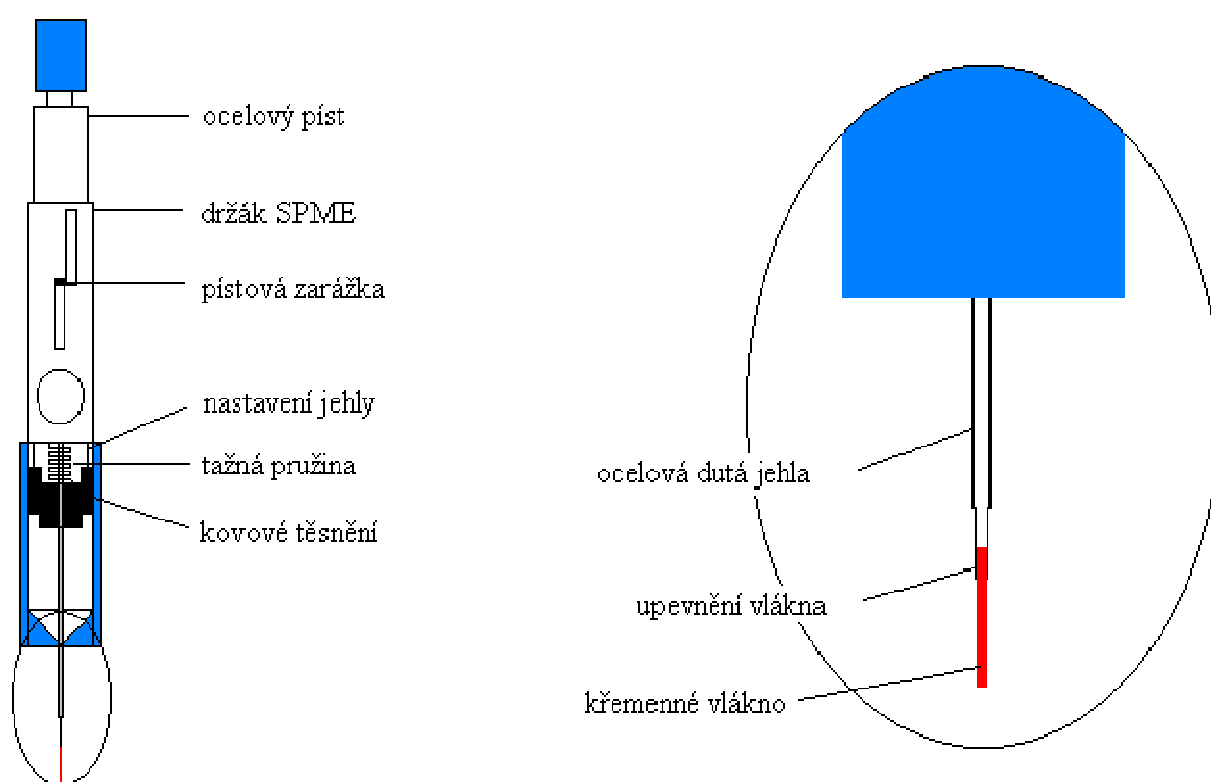
Detektory pro kapalinovou chromatografii by měly mít okamžitou odezvu, vysokou citlivost, nízký šum a minimální vliv změny tlaku a teploty. **Spektrofotometrické (UV-VIS)** detektory patří k nejpoužívanějším. Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Existuje několik konstrukčních typů. Vysoce selektivní a citlivý je detektor **fluorimetrický**. Používá se k detekci látek, které vykazují fluorescenci. **Refraktometrický** detektor umožňuje detekci téměř všech látek. Jeho odezva závisí na teplotě. Měří změnu indexu lomu mobilní fáze. **Vodivostní** detektory se používají k detekci iontů v iontově výměnné chromatografii. Sleduje se změna vodivosti mobilní fáze mezi dvěma elektrodami s vloženým střídavým napětím. Stejně tak, jako u plynové chromatografie, se i u kapalinové chromatografie používá **hmotnostní** detektor [24], [34], [35], [46].

### 2.4.3 Mikroextrakce tuhou fází – SPME

Jde o velice účinnou, moderní techniku zkoncentrování analytu, při které nejsou potřeba žádná další rozpouštědla ani složité aparatury. Metoda SPME se užívá ve spojení s plynovou a kapalinovou chromatografií [29]. Vlákno SPME je popsáno na obrázku (viz Obrázek 10).

Nejdůležitější částí zařízení je křemenné vlákno pokryté stacionární fází, které je ve spojení s ocelovým pístem umístěným v duté jehle. Stacionární fáze je polymerní materiál. Jehla se zde užívá jako ochrana před mechanickým poškozením [29], [30].

Proces je rozdělen do dvou fází. Nejprve se analyt extrahuje na křemenné vlákno a pak se zpět desorbuje v chromatografickém přístroji. Jehla s vláknem se zasune do vzorku, po dosažení sorpční rovnováhy se vlákno zatáhne zpět do jehly a vloží se do nástříkového prostoru chromatografu [38], [50].



Obrázek 10: SPME, detail na vlákno

Výsledky vysoce ovlivňuje tloušťka a polarita stacionární fáze, pH, způsob vzorkování, teplota roztoku a iontová síla roztoku. Silnější vrstva stacionární fáze umožňuje vyextrahování většího množství analytu než vrstva tenká, proto se vlákno se silnější vrstvou používá při analýze těkavých látek [31], [38].

Metoda SPME umožňuje provádět dva způsoby extrakce:

- přímá SPME (DI-SPME), při které dochází k ponoření vlákna přímo do vzorku,
- headspace SPME (HS-SPME), kdy jde o extrakci analytu z prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě, užívá se pro extrakci těkavých látek [30].

SPME se užívá zejména v oblasti životního prostředí, ve farmaceutickém průmyslu, v potravinářské chemii a v toxikologii.

Existuje několik typů vláken vhodných pro extrakci těkavých látek. Afinita vlákna vůči analytu závisí na polaritě stacionární fáze a na vlastnostech daného analytu. Například nepolární polydimethylsiloxanové (PDMS) vlákno je preferováno pro extrakci nepolárních analytů, kterými jsou i některé těkavé aromatické látky. Více polární polyakrylátové vlákno (PA) je vhodnější pro více polární látky, jako jsou fenoly nebo alkoholy. Kombinovaná vlákna, obsahující divinylbenzen (DVB) nebo Carboxen (CAR), zvyšují retenční kapacitu [51], [52].

Pro analýzu těkavých aromatických látek mohou být použita následující vlákna [51], [52]:

- 100 $\mu$ m PDMS
- 65  $\mu$ m PDMS/DVB
- 75 $\mu$ m CAR/PDMS
- 65  $\mu$ m CW/PDMS

#### 2.4.4 Dynamická extrakce vzorků na pevné fázi – SPDE

Další moderní technologie je SPDE, která pracuje obdobně jako SPME s tím rozdílem, že sorbent je nanesen uvnitř jehly plynotěsné stříkačky. Opakovaným nabíráním kapalně nebo plynné fáze vzorku dochází k jeho zakoncentrování uvnitř jehly. Desorpce vyextrahovaných látek se provádí tepelně přímo do nástřiku. Umožňuje dynamickou extrakci vzorků, protože je zde větší plocha povrchu a větší množství extrakční fáze. Průměrná životnost jehly SPDE je 1 500 nástřiků [41].

#### 2.4.5 Headspace techniky

Analýza headspace (HS) je extrakční technika těkavých látek, obsažených v plynné fázi, která je ve styku s analyzovanou kondenzovanou fází. Princip spočívá v jímání těkavých složek, které unikají z kapaliny, do plynné fáze. Metodou headspace lze analyzovat homogenní i nehomogenní materiály [24].

##### 2.4.5.1 Statická headspace

Headspace je plynná fáze nad pevnou fází nebo kapalinou ve vialce uzavřené septem. Těkavé složky se rozptýlí v plynné fázi v koncentracích, které odpovídají jejich tlaku par. Koncentrace sloučenin v headspace závisí na těkavosti, koncentraci v původním vzorku, rozpustnosti a teplotě [42], [43].

##### 2.4.5.2 Dynamická headspace

Rovnovážný stav mezi plynnou fází a vzorkem způsobuje relativně nízkou citlivost statické headspace. U dynamické headspace plyn probublává kapalným vzorkem a strhává s sebou těkavé látky, čímž se zvyšuje výtěžek materiálu k další analýze. Desorpce probíhá nejčastěji tepelně [42], [43].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

Vzorky etanolových extraktů vybraných bylin použitých pro analýzu (máta peprná, šalvěj lékařská, meduňka lékařská, heřmánek pravý, kozlík lékařský) byly vyrobeny macerací ve firmě První jílovská a.s. Bylinné extrakty byly připraveny v etanolovém roztoku o různých koncentracích. Extrakty byly připraveny z bylin ze sklizně z let 2015 a 2016.

### 3.2 Použité laboratorní vybavení

- analytické váhy (Sartorius)
- běžné laboratorní sklo
- vialky, mikropipety
- plynový chromatograf Trace Ultra (Thermo Scientific, USA)
- hmotnostní spektrometr Trace DSQ (Thermo Scientific, USA)
- kapilární kolona SLB-5MS (60m x 0,25 mm x 0,25 μm)
- autosampler CombiPal (CTC Analytics AG, Švýcarsko)
- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS

### 3.3 Chemikálie

- nosný plyn helium
- hexan (CAS: 110-54-3, SIGMA-ALDRICH)
- methanol (CAS: 67-56-1, SIGMA-ALDRICH)
- deionizovaná voda
- standardy:
  - menthol (CAS: 89-78-1, SIGMA-ALDRICH)
  - limonen (CAS: 5989-54-8, SIGMA-ALDRICH)
  - cineol (CAS: 470-67-7, SIGMA-ALDRICH)
  - menthon (CAS: 10458-14-7, SIGMA-ALDRICH)
  - menthofuran (CAS: 17957-94-7, SIGMA-ALDRICH)
  - menthyl-acetát (CAS: 2623-23-6, SIGMA-ALDRICH)
  - isopulegol (CAS: 89-79-2, SIGMA-ALDRICH)
  - pulegon (CAS: 89-82-7, SIGMA-ALDRICH)
  - karvon (CAS: 2244-16-8, SIGMA-ALDRICH)
  - kafr (CAS: 464-48-2, SIGMA-ALDRICH)
  - borneol (CAS: 464-43-7, SIGMA-ALDRICH)
  - thujon (CAS: 546-80-5, SIGMA-ALDRICH)
  - bornyl-acetát (CAS: 76-49-3, SIGMA-ALDRICH)
  - citronellol (CAS: 106-22-9, SIGMA-ALDRICH)
  - nerol (CAS: 106-25-2, SIGMA-ALDRICH)
  - citral (CAS: 5392-40-5, SIGMA-ALDRICH)
  - citronellal (CAS: 106-23-0, SIGMA-ALDRICH)
  - geraniol (CAS: 106-24-1, SIGMA-ALDRICH)
  - *p*-cymen (CAS: 99-87-6, SIGMA-ALDRICH)
  - farnesen (CAS: 28973-97-9, SIGMA-ALDRICH)

- bisabolol oxid A (CAS: 22567-36-8, SIGMA-ALDRICH)
- $\alpha$ -bisabolol (CAS: 515-69-5, SIGMA-ALDRICH)
- $\gamma$ -terpinen (CAS: 99-85-4, SIGMA-ALDRICH)
- kyselina valerenová (CAS: 3569-10-6, SIGMA-ALDRICH)

### 3.4 Pracovní postup

#### 3.4.1 Příprava vzorků bylinných extraktů pro analýzu

Vzorky etanolových extraktů byly pro analýzu vhodně ředěny vodou do 20 ml vialky. Konečný objem vzorku ve vialce byl vždy 5 ml. Poté byly vialky byly uzavřeny víčkem se septem. Takto připravené vzorky byly analyzovány optimalizovanou HS-SPME/GC-MS.

#### 3.4.2 Příprava standardních roztoků

Jednotlivé standardy byly naředěny do 25 ml methanolu na koncentraci asi 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Přesné koncentrace zásobních roztoků standardů jsou uvedeny v následujících tabulkách. Z těchto zásobních roztoků byly ředěny pracovní roztoky standardů pro analýzu jednotlivých bylinných extraktů. Koncentrace jednotlivých analytů v pracovních roztocích byly zvoleny podle jejich zastoupení v analyzovaných bylinách na základě literární rešerše.

##### 3.4.2.1 Standard pro analýzu mátového extraktu

Do 10 ml odměrné baňky byly mikropipetami odměřeny standardy ze zásobních roztoků (viz Tabulka 7) a baňka byla methanolem doplněna po rysku. Takto připravený pracovní roztok standardů byl vhodně naředěn a použit k chromatografické analýze.

Tabulka 7: Pipetované objemy standardů pro analýzu mátového extraktu

Analyt	Koncentrace standardu [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
limonen	336,8	600
cineol	567,2	1 800
isopulegol	517,2	40
menthon	591,2	1 400
menthofuran	598,0	40
menthol	466,0	2 100
pulegon	570,8	40
karvon	636,0	30
menthyl-acetát	681,6	600

##### 3.4.2.2 Standard pro analýzu šalvějového extraktu

Do 5 ml odměrné baňky byly mikropipetami odměřeny standardy ze zásobních roztoků (viz Tabulka 8) a baňka byla methanolem doplněna po rysku. Takto připravený pracovní roztok standardů byl vhodně naředěn a použit k chromatografické analýze.

Tabulka 8: Pipetované objemy standardů pro analýzu šalvějového extraktu

Analyt	Koncentrace standardu [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
cineol	567,2	2
thujon	690,8	10
kafr	561,6	10
borneol	421,6	2
bornyl-acetát	444,8	1

#### 3.4.2.3 Standard pro analýzu meduňkového extraktu

Do 5 ml odměrné baňky byly mikropipetami odměřeny standardy ze zásobních roztoků (viz Tabulka 9) a baňka byla methanolem doplněna po rysku. Takto připravený pracovní roztok standardů byl vhodně naředěn a použit k chromatografické analýze.

Tabulka 9: Pipetované objemy standardů pro analýzu meduňkového extraktu

Analyt	Koncentrace standardu [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
citronellol	342,0	10
limonen	336,8	10
nerol	350,4	10
citral	355,2	10
citronellal	342,8	10
geraniol	351,6	10

#### 3.4.2.4 Standard pro analýzu heřmánkového extraktu

Do 5 ml odměrné baňky byly mikropipetami odměřeny standardy ze zásobních roztoků (viz Tabulka 10) a baňka byla methanolem doplněna po rysku. Takto připravený pracovní roztok standardů byl vhodně naředěn a použit k chromatografické analýze.

Tabulka 10: Pipetované objemy standardů pro analýzu heřmánkového extraktu

Analyt	Koncentrace standardu [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
<i>p</i> -cymen	344,0	5
limonen	336,8	10
farnesen	613,6	25
bisabolol oxid A	0,1	50
$\alpha$ -bisabolol	2 361,0	125

#### 3.4.2.5 Standard pro analýzu kozlíkového extraktu

Do 10 ml odměrné baňky byly mikropipetami odměřeny standardy ze zásobních roztoků (viz Tabulka 11) a baňka byla methanolem doplněna po rysku. Takto připravený pracovní roztok standardů byl vhodně naředěn a použit k chromatografické analýze.

Tabulka 11: Pipetované objemy standardů pro analýzu kozlíkového extraktu

Analyt	Koncentrace standardu [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
<i>p</i> -cymen	344,0	10
limonen	336,8	10
$\gamma$ -terpinen	514,4	10
karvon	636,0	50
bornyl-acetát	444,8	20
kyselina valerénová	40 000	100

### 3.4.3 Optimalizace HS-SPME

Pro stanovení obsahu analyzovaných látek byla využita metoda HS-SPME. Pro extrakci bylo použito vlákno s fází DVB/CAR/PDMS, které je vhodné pro analýzu těkavých látek o molární hmotnosti 40 až  $275\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . U použitého vlákna byla optimalizovaná doba a teplota headspace extrakce.

#### 3.4.3.1 Optimalizace doby headspace extrakce

Při optimalizaci doby headspace extrakce analytů na vlákno s fází DVB/CAR/PDMS z analyzovaného vzorku byly výtěžnosti extrakce testovány v čase 10 až 50 minut v desetiminutových intervalech. Testovací teplota byla zvolena  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Z grafické závislosti (viz Příloha 1) je patrné, že do 20 min dochází k prudkému nárůstu výtěžnosti, v době od 20 do 30 min nastává pozvolná klesání výtěžnosti extrakce. Od 30 min pak dochází k ustálení extrakce. Ze závislosti vyplývá, že neoptimálnější doba extrakce je 20 min.

Pro optimalizaci metody HS ve spojení s plynovou chromatografií s MS detektorem byl použit vzorek extraktu šalvěže lékařské.

#### 3.4.3.2 Optimalizace teploty headspace extrakce

Při optimalizaci teploty headspace extrakce analytů na vlákno s fází DVB/CAR/PDMS z analyzovaného vzorku byly výtěžnosti extrakce testovány při teplotách 30 až  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v desetistupňových intervalech při optimalizované době extrakce (20 min).

Z grafické závislosti (viz Příloha 2) je patrné, že byl detekován strmý nárůst výtěžnosti mezi  $30$  a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Při teplotách do  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  docházelo stále k mírnému vzrůstu výtěžnosti a mezi  $60$  a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  už bylo zaznamenáno ustálení. Nejvyšší výtěžnost HS extrakce byla při  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  a tato teplota byla zvolena jako optimální.

Pro optimalizaci metody HS ve spojení s plynovou chromatografií s MS detektorem byl použit vzorek extraktu šalvěže lékařské.

### 3.4.4 Analýza bylinných extraktů

#### 3.4.4.1 GC-MS

Pro analýzu vzorků bylinných extraktů byl použit plynový chromatograf Trace Ultra s hmotnostním detektorem Trace DSQ na kapilární koloně SLB-5MS. Podmínky chromatografické analýzy jsou uvedeny v tabulce (viz Tabulka 12). Každý vzorek byl analyzován dvakrát.

HS-SPME: Přípravené vzorky ve vialkách byly umístěny do autosampleru CombiPal. Kondicionace vzorku probíhala 10 min při 60 °C, doba extrakce byla 20 min při 60 °C. Desorpce z vlákna probíhala 3 min v PTV injektoru a kondicionace vlákna byla nastavena na 5 min při 260 °C.

Tabulka 12: Podmínky chromatografické analýzy

Plynový chromatograf:	Trace Ultra – Thermo Scientific
Kolona:	kapilární kolona SLB-5MS (60m x 0,25 mm x 0,25 μm)
Nosný plyn:	helium – 1,5 ml/min
Teplotní program:	50°C (3 min), nárůst 3°C/min. do 150°C (15 min), nárůst 10°C/min. do 200°C (5 min)
Teplota PTV injektoru:	250°C, splitless: 3 min
Objem vzorku pro HS-SPME:	5 ml ve 20ml vialce,
Detektor MS:	Trace DSQ – Thermo Scientific
Teplota iontového zdroje	200°C
Ionizační energie:	70 eV
Full sken m/z:	20 – 450

### 3.5 Validace metody

Validace je proces, při kterém se dokazuje, zda analytický proces nebo jeho část probíhá standardním způsobem tak, že odchylky splňují požadovaná kritéria [47].

#### 3.5.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je definován vztahem [49]:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i.$$

#### 3.5.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka byla vypočítána z opakovatelnosti analýzy a je mírou přesnosti série paralelních výsledků a je definována vztahem [49]:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}.$$

### 3.5.3 Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka se uvádí v procentech a udává rozptýlení od aritmetického průměru [49]:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 [\%].$$

Relativní směrodatné odchylky všech analyzovaných látek jsou uvedeny v tabulce (viz Tabulka 46).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Byla provedena analýza různě koncentrovaných etanolových extraktů bylin máty peprné, šalvěže lékařské, meduňky lékařské, heřmánku pravého a kozlíku lékařského. Extrakty byly vyrobeny a dodány firmou První jílovská a.s. U různě koncentrovaných extraktů bylin byla sledována optimální koncentrace etanolového roztoku tak, aby byla co nejvýhodnější pro použití při fortifikaci potravin.

### 4.1 Optimalizace HS-SPME

Nejprve byly optimalizovány podmínky tak, aby bylo dosaženo co největšího extrakčního výtěžku při použití DVB/CAR/PDMS vlákna. V současné době existuje spousta různých typů SPME vláken vhodných k použití extrakce těkavých, vonných látek. Dle doporučení literatury a firmy SIGMA-ALDRICH bylo k extrakci vybraných bylin použito vlákno DVB/CAR/PDMS, jež je dle příbalového letáku vhodné k analýzám těkavých látek molární hmotnosti 40 až 275 g·mol<sup>-1</sup>.

Optimální doba extrakce byla 20 min při optimální teplotě 60 °C (viz Příloha 1 a Příloha 2).

### 4.2 Plynová chromatografie GC-MS

Metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí byly zjištěny obsahy vybraných sensoricky aktivních látek v různě koncentrovaných etanolových extraktech pěti vybraných bylin, kterými byly máta peprná, šalvěž lékařská, meduňka lékařská, heřmánek pravý a kozlík lékařský.

#### 4.2.1 Máta peprná

Chromatogram extraktu máty peprné je uveden v příloze (viz Příloha 3).

Tabulka 13: Výsledky - Máta 2015, LP 21 % [80/2767]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	N	N	N
Cineol	174,14	192,47	<b>183,31</b>
Isopulegol	N	N	N
Menthon	412,72	444,60	<b>428,66</b>
Menthofuran	N	N	N
Menthol	N	N	N
Pulegon	17,95	18,26	<b>18,11</b>
Karvon	N	N	N
Mentyl-acetát	2,52	3,09	<b>2,81</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 14: Výsledky: Máta 2015, LP 41 % [80/2768]

Analyt	Analyza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analyza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	N	N	N
Cineol	163,4	173,7	<b>168,57</b>
Isopulegol	N	N	N
Menthon	771,5	970,7	<b>871,10</b>
Menthofuran	N	N	N
Menthol	N	N	N
Pulegon	N	N	N
Karvon	N	N	N
Mentyl-acetát	45,3	52,1	<b>48,68</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 15: Výsledky: Máta 2015, LP 61,8 % [80/2769]

Analyt	Analyza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analyza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	97,6	117,7	<b>107,64</b>
Cineol	221,77	277,7	<b>249,71</b>
Isopulegol	N	N	N
Menthon	1 693,9	1 877,4	<b>1 785,65</b>
Menthofuran	N	N	N
Menthol	N	N	N
Pulegon	5,8	7,8	<b>6,83</b>
Karvon	N	N	N
Mentyl-acetát	160,5	179,1	<b>169,77</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 16: Výsledky: Máta 2016, LP 21 % [80/2788]

Analyt	Analyza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analyza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	N	N	N
Cineol	123,5	169,1	<b>146,33</b>
Isopulegol	N	N	N
Menthon	349,2	390,5	<b>369,83</b>
Menthofuran	N	N	N
Menthol	N	N	N
Pulegon	14,8	21,5	<b>18,12</b>
Karvon	N	N	N
Mentyl-acetát	4,2	3,4	<b>3,80</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 17: Výsledky: Máta 2016, LP 41 % [80/2789]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	N	N	N
Cineol	198,0	205,2	<b>201,61</b>
Isopulegol	N	N	N
Menthon	953,4	993,9	<b>973,65</b>
Menthofuran	N	N	N
Menthol	N	N	N
Pulegon	N	N	N
Karvon	N	N	N
Mentyl-acetát	46,0	56,0	<b>51,02</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 18: Výsledky: Máta 2016, LP 61,8 % [80/2790]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	146,4	157,9	<b>152,16</b>
Cineol	304,8	332,2	<b>318,53</b>
Isopulegol	N	N	N
Menthon	1 991,8	2 033,1	<b>2 012,47</b>
Menthofuran	N	N	N
Menthol	N	N	N
Pulegon	7,1	10,6	<b>8,86</b>
Karvon	N	N	N
Mentyl-acetát	136,8	125,9	<b>131,37</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 19: Výsledky: Máta 2016, 20 % [80/2257]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	N	N	N
Cineol	11,20	11,53	<b>11,37</b>
Isopulegol	N	N	N
Menthon	88,00	92,47	<b>90,24</b>
Menthofuran	N	N	N
Menthol	N	N	N
Pulegon	N	N	N
Karvon	N	N	N
Mentyl-acetát	0,52	0,26	<b>0,39</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 20: Výsledky: Máta 2016, 40 % [80/2258]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	N	N	N
Cineol	115,4	137,3	<b>126,32</b>
Isopulegol	N	N	N
Menthon	957,4	1 084,2	<b>1 020,77</b>
Menthofuran	N	N	N
Menthol	N	N	N
Pulegon	N	N	N
Karvon	N	N	N
Mentyl-acetát	97,8	119,6	<b>108,71</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 21: Výsledky: Máta 2016, 60 % [80/2259]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	N	N	N
Cineol	95,1	127,7	<b>111,40</b>
Isopulegol	N	N	N
Menthon	1 370,3	1 420,1	<b>1 395,21</b>
Menthofuran	N	N	N
Menthol	N	N	N
Pulegon	N	N	N
Karvon	N	N	N
Mentyl-acetát	611,7	624,9	<b>618,29</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Z výsledků je patrné, že ve všech vzorcích extraktů máty peprné bylo detekováno největší množství menthonu, a to v minimálním množství 90,24 mg·dm<sup>-3</sup> ve vzorku 20% etanolového extraktu z roku 2016 a v největším množství až 2 012,47 mg·dm<sup>-3</sup> ve vzorku 61,8% etanolového extraktu z roku 2016. Nejvyšší množství detekovaných látek vyplývá z analýz vzorků extraktů máty 61,8% z roku 2015 a 2016. V těchto vzorcích byly detekovány analyty, jež jsou uvedeny v tabulkách (viz Tabulka 15 a Tabulka 18).

Rozdílné způsoby přípravy bylinných extraktů v různě koncentrovaných roztocích ethanolu měly zásadní vliv na konečný výskyt jednotlivých analytů. Jako nejvhodnější pro fortifikaci potravin vyplývají z tabulek právě vzorky extraktů máty, kde bylo detekováno nejvíce analytů, a to vzorky 61,8% z let 2015 a 2016. Zde byly detekovány: limonen, cineol, menthon, pulegon a mentyl-acetát.

Máta peprná obecně dle literatury obsahuje největší množství mentholu, a to až z 50 % [11]. V analyzovaných etanolových extraktech však menthol detekován nebyl. Mohlo to být zapříčiněno původem byliny či podmínkami při pěstování. Český lékopis uvádí také v mátové silici procentuální zastoupení všech devíti látek uvedených v tabulkách. V etanolových extraktech máty však bylo detekováno analytů maximálně pět.

#### 4.2.2 Šalvěj lékařská

Vzorový chromatogram extraktu šalvěje lékařské je uveden (viz Příloha 4).

Tabulka 22: Výsledky: Šalvěj 2015, 20 % [80/3423]

<b>Analyt</b>	<b>Analýza 1</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Analýza 2</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Průměr</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Cineol	5,2	5,2	<b>5,2</b>
Thujon	11,6	11,7	<b>11,6</b>
Kafr	37,7	38,4	<b>38,1</b>
Borneol	6,7	6,7	<b>6,7</b>
Bornyl-acetát	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 23: Výsledky: Šalvěj 2015, 40 % [80/3424]

<b>Analyt</b>	<b>Analýza 1</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Analýza 2</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Průměr</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Cineol	13,9	14,0	<b>13,9</b>
Thujon	54,7	55,2	<b>54,9</b>
Kafr	81,9	83,5	<b>82,7</b>
Borneol	16,7	16,9	<b>16,8</b>
Bornyl-acetát	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 24: Výsledky: Šalvěj 2015, 60 % [80/3425]

<b>Analyt</b>	<b>Analýza 1</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Analýza 2</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Průměr</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Cineol	19,9	20,0	<b>20,0</b>
Thujon	87,6	88,5	<b>88,0</b>
Kafr	115,9	118,2	<b>117,1</b>
Borneol	16,5	16,7	<b>16,6</b>
Bornyl-acetát	4,2	4,2	<b>4,2</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 25: Výsledky: Šalvěj 2016, 20 % [80/2251]

<b>Analyt</b>	<b>Analýza 1</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Analýza 2</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Průměr</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Cineol	2,1	2,4	<b>2,2</b>
Thujon	5,1	6,4	<b>5,7</b>
Kafr	48,9	48,9	<b>48,9</b>
Borneol	N	N	N
Bornyl-acetát	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 26: Výsledky: Šalvěj 2016, 40 % [80/2252]

	<b>Analýza 1</b>	<b>Analýza 2</b>	<b>Průměr</b>
<b>Analyt</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>
Cineol	5,9	6,5	<b>6,2</b>
Thujon	44,9	44,6	<b>44,8</b>
Kafr	79,7	85,8	<b>82,7</b>
Borneol	N	N	<b>N</b>
Bornyl-acetát	N	N	<b>N</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 27: Výsledky: Šalvěj 2016, 60 % [80/2253]

	<b>Analýza 1</b>	<b>Analýza 2</b>	<b>Průměr</b>
<b>Analyt</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>
Cineol	8,8	7,8	<b>8,3</b>
Thujon	66,7	73,3	<b>70,0</b>
Kafr	86,9	91,1	<b>89,0</b>
Borneol	N	N	<b>N</b>
Bornyl-acetát	0,7	0,9	<b>0,8</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Z výsledků je patrné, že ve všech vzorcích extraktů šalvěje lékařské bylo detekováno největší množství kafru, a to v minimálním množství 38,1 mg·dm<sup>-3</sup> ve vzorku 20% etanolového extraktu z roku 2015 a v největším množství až 117,1 mg·dm<sup>-3</sup> ve vzorku 60% etanolového extraktu z roku 2015. Nejvyšší množství detekovaných látek vyplývá z analýzy vzorku extraktu šalvěje 60% z roku 2015. V tomto vzorku byly detekovány analyty, jež jsou uvedeny v tabulce (viz Tabulka 24).

Rozdílné způsoby přípravy bylinných extraktů v různě koncentrovaných roztocích ethanolu měly zásadní vliv na konečný výskyt jednotlivých analytů. Jako nejvhodnější pro fortifikaci potravin vyplývá z tabulek právě vzorek extraktu šalvěje, kde bylo detekováno nejvíce analytů, a to vzorek 60% z roku 2015. Zde byly detekovány: cineol, thujon, kafr, borneol a bornyl-acetát.

Český lékopis uvádí v šalvějové silici ve větší míře výskyt thujonu a cineolu, což bylo prokázáno i v etanolových extraktech. Chemické složení šalvějové silice se však liší dle podmínek provedené extrakce, dle podmínek sušení byliny a především na základě původu a podmínek pěstování.

#### 4.2.3 Meduňka lékařská

Vzorový chromatogram extraktu meduňky lékařské je uveden (viz Příloha 5).

Tabulka 28: Výsledky: Meduňka 2015, 20 % [80/2770]

<b>Analyt</b>	<b>Analýza 1</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Analýza 2</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Průměr</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	N	N	N
Linalool	0,097 2	0,095 7	<b>0,096 4</b>
Citronellal	N	N	N
Citral	N	N	N
Nerol	N	N	N
Geraniol	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 29: Výsledky: Meduňka 2015, 40 % [80/2771]

<b>Analyt</b>	<b>Analýza 1</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Analýza 2</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Průměr</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	0,004 1	0,003 9	<b>0,004 0</b>
Linalool	0,156 9	0,152 7	<b>0,154 8</b>
Citronellal	0,085 0	0,083 2	<b>0,084 1</b>
Citral	0,022 2	0,027 7	<b>0,024 9</b>
Nerol	N	N	N
Geraniol	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 30: Výsledky: Meduňka 2015, 60 % [80/2772]

<b>Analyt</b>	<b>Analýza 1</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Analýza 2</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]	<b>Průměr</b> [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	0,130 9	0,129 8	<b>0,130 4</b>
Linalool	0,191 9	0,186 3	<b>0,189 1</b>
Citronellal	0,500 4	0,485 4	<b>0,492 9</b>
Citral	0,426 0	0,027 7	<b>0,226 8</b>
Nerol	N	N	N
Geraniol	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 31: Výsledky: Meduňka 2016, 20 % [80/2791]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	N	N	N
Linalool	0,098 4	0,097 6	<b>0,098 0</b>
Citronellal	N	N	N
Citral	N	N	N
Nerol	N	N	N
Geraniol	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 32: Výsledky: Meduňka 2016, 40 % [80/2792]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	0,002 6	0,002 7	<b>0,002 7</b>
Linalool	0,166 1	0,159 9	<b>0,163 0</b>
Citronellal	0,088 9	0,089 1	<b>0,089 0</b>
Citral	0,027 6	0,026 8	<b>0,027 2</b>
Nerol	N	N	N
Geraniol	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 33: Výsledky: Meduňka 2016, 60 % [80/2793]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
Limonen	0,169 2	0,167 6	<b>0,168 4</b>
Linalool	0,188 6	0,185 4	<b>0,187 0</b>
Citronellal	0,441 8	0,434 9	<b>0,438 4</b>
Citral	0,459 9	0,448 8	<b>0,454 3</b>
Nerol	N	N	N
Geraniol	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Z výsledků je patrné, že pro fortifikaci potravinářských výrobků jsou vhodné vzorky etanolových extraktů meduňky lékařské, které jsou uvedené v tabulkách (viz Tabulka 29, Tabulka 30, Tabulka 32 a Tabulka 33). Zde byly detekovány celkově čtyři analyty, a to limonen, linalool, citronellal a citral.

Dle Českého lékopisu silice meduňky lékařské obsahují charakteristické látky citronellal a citral, které bylině dávají charakteristickou citronovou vůni. Tyto látky byly v etanolových extraktech detekovány v zásadním množství, a to především v 60% etanolových extraktech z roku 2015 a 2016. Obsah silic meduňky lékařské se mění s podmínkami klimatu a původem byliny.

#### 4.2.4 Heřmánek pravý

Vzorový chromatogram extraktu heřmánku pravého je uveden (viz Příloha 6).

Tabulka 34: Výsledky: Heřmánek 2015, 20 % [80/3432]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
<i>p</i> -cymen	N	N	N
Limonen	N	N	N
Farnesen	N	N	N
$\alpha$ - bisabolol	0,106 2	0,535 7	<b>0,321 0</b>
Bisabolol oxid A	0,000 01	0,000 03	<b>0,000 02</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 35: Výsledky: Heřmánek 2015, 40 % [80/3433]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
<i>p</i> -cymen	N	N	N
Limonen	N	N	N
Farnesen	N	N	N
$\alpha$ - bisabolol	62,5	68,0	<b>65,2</b>
Bisabolol oxid A	0,000 09	0,000 09	<b>0,000 09</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 36: Výsledky: Heřmánek 2015, 60 % [80/3434]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
<i>p</i> -cymen	0,137 9	0,221 2	<b>0,179 6</b>
Limonen	0,071 7	0,116 7	<b>0,094 2</b>
Farnesen	1,636 7	1,693 4	<b>1,665 0</b>
$\alpha$ - bisabolol	264,4	283,0	<b>273,7</b>
Bisabolol oxid A	0,000 2	0,000 1	<b>0,000 2</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 37: Výsledky: Heřmánek 2016, 20 % [80/2260]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
<i>p</i> -cymen	N	N	N
Limonen	N	N	N
Farnesen	N	N	N
$\alpha$ - bisabolol	1,154 7	1,110 6	<b>1,132 7</b>
Bisabolol oxid A	0,000 03	0,000 03	<b>0,000 03</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 38: Výsledky: Heřmánek 2016, 40 % [80/2261]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
<i>p</i> -cymen	N	N	N
Limonen	N	N	N
Farnesen	N	N	N
$\alpha$ - bisabolol	51,1	51,6	<b>51,3</b>
Bisabolol oxid A	0,000 1	0,000 1	<b>0,000 1</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 39: Výsledky: Heřmánek 2016, 60 % [80/2262]

Analyt	Analýza 1 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Analýza 2 [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Průměr [mg·dm <sup>-3</sup> ]
<i>p</i> -cymen	0,132 5	0,146 2	<b>0,139 3</b>
Limonen	0,091 4	0,079 6	<b>0,085 5</b>
Farnesen	0,441 4	0,408 1	<b>0,424 7</b>
$\alpha$ - bisabolol	213,9	230,6	<b>222,3</b>
Bisabolol oxid A	0,000 1	0,000 1	<b>0,000 1</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Z výsledků je patrné, že téměř ve všech vzorcích extraktů heřmánku pravého byl detekován  $\alpha$ -bisabolol, a to v minimálním množství 0,321 0 mg·dm<sup>-3</sup> ve vzorku 20% etanolového extraktu z roku 2015 a v největším množství až 273,7 mg·dm<sup>-3</sup> ve vzorku 60% etanolového extraktu z roku 2015. Nejvyšší množství detekovaných látek vyplývá z analýz vzorků extraktů heřmánku 60% z roku 2015 a 2016. V těchto vzorcích byly detekovány analyty, jež jsou uvedeny v tabulkách (viz Tabulka 36 a Tabulka 39).

Rozdílné způsoby přípravy bylinných extraktů v různě koncentrovaných roztocích ethanolu měly zásadní vliv na konečný výskyt jednotlivých analytů. Jako nejvhodnější pro fortifikaci potravin vyplývá z tabulek právě vzorek extraktu heřmánku, kde bylo detekováno nejvíce analytů, a to vzorek 60% z roku 2015 a 2016. Zde byly detekovány: *p*-cymen, limonen, farnesen,  $\alpha$ -bisabolol a bisabolol oxid A.

Dle literatury a Českého lékopisu silice heřmánku pravého obsahují především  $\alpha$  – bisabolol, farnesen, bisabolol oxid A a chamazulen. Chamazulen nebyl v etanolových extraktech detekován vůbec.  $\alpha$  – bisabolol obsahovaly v největší míře 60% etanolové extrakty, tyto by tudíž mohly při fortifikaci potravin využít jeho protizánětlivých účinků.

#### 4.2.5 Kozlík lékařský

Vzorový chromatogram extraktu kozlíku lékařského je uveden (viz Příloha 7).

Tabulka 40: Výsledky: Kozlík 2015, 20 % [80/3438]

	<b>Analýza 1</b>	<b>Analýza 2</b>	<b>Průměr</b>
<b>Analyt</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>
<i>p</i> -cymen	N	N	N
Limonen	N	N	N
γ-terpinen	N	N	N
Karvon	0,099 63	0,084 92	<b>0,092 28</b>
Bornyl-acetát	0,023 18	0,028 10	<b>0,025 64</b>
Kyselina valerénová	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 41: Výsledky: Kozlík 2015, 40 % [80/3439]

	<b>Analýza 1</b>	<b>Analýza 2</b>	<b>Průměr</b>
<b>Analyt</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>
<i>p</i> -cymen	0,002 56	0,004 75	<b>0,003 65</b>
Limonen	0,004 21	0,008 89	<b>0,006 55</b>
γ-terpinen	N	N	N
Karvon	0,193 28	0,221 60	<b>0,207 44</b>
Bornyl-acetát	2,072 48	2,114 11	<b>2,093 30</b>
Kyselina valerénová	9,492 07	0,064 76	<b>4,778 42</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 42: Výsledky: Kozlík 2015, 60 % [80/3440]

	<b>Analýza 1</b>	<b>Analýza 2</b>	<b>Průměr</b>
<b>Analyt</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>
<i>p</i> -cymen	0,563 35	0,578 83	<b>0,571 09</b>
Limonen	0,214 17	0,221 57	<b>0,217 87</b>
γ-terpinen	0,093 37	0,094 08	<b>0,093 72</b>
Karvon	0,267 21	0,264 58	<b>0,265 89</b>
Bornyl-acetát	5,516 64	5,594 62	<b>5,555 63</b>
Kyselina valerénová	123,801 97	100,033 79	<b>111,917 88</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 43: Výsledky: Kozlík 2016, 20 % [80/2266]

	<b>Analýza 1</b>	<b>Analýza 2</b>	<b>Průměr</b>
<b>Analyt</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>
<i>p</i> -cymen	N	N	N
Limonen	0,000 92	0,000 31	<b>0,000 61</b>
$\gamma$ -terpinen	N	N	N
Karvon	0,367 35	0,476 14	<b>0,421 75</b>
Bornyl-acetát	0,246 24	0,050 58	<b>0,148 41</b>
Kyselina valerénová	N	N	N

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 44: Výsledky: Kozlík 2016, 40 % [80/2267]

	<b>Analýza 1</b>	<b>Analýza 2</b>	<b>Průměr</b>
<b>Analyt</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>
<i>p</i> -cymen	N	N	N
Limonen	0,012 03	0,011 97	<b>0,012 00</b>
$\gamma$ -terpinen	N	N	N
Karvon	0,498 76	0,402 48	<b>0,450 62</b>
Bornyl-acetát	2,470 71	2,302 48	<b>2,386 59</b>
Kyselina valerénová	6,280 62	8,421 51	<b>7,351 06</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Tabulka 45: Výsledky: Kozlík 2016, 60% [80/2268]

	<b>Analýza 1</b>	<b>Analýza 2</b>	<b>Průměr</b>
<b>Analyt</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>	<b>[mg·dm<sup>-3</sup>]</b>
<i>p</i> -cymen	0,323 71	0,324 52	<b>0,324 11</b>
Limonen	0,213 19	0,215 38	<b>0,214 28</b>
$\gamma$ -terpinen	0,047 12	0,048 20	<b>0,047 66</b>
Karvon	0,537 01	0,610 74	<b>0,573 88</b>
Bornyl-acetát	4,361 48	4,764 28	<b>4,562 88</b>
Kyselina valerénová	99,823 03	112,653 55	<b>106,238 29</b>

Poznámka: N – nedetekováno

Z výsledků je patrné, že téměř ve všech vzorcích extraktů kozlíku lékařského byl detekován bornyl-acetát, a to v minimálním množství 0,025 64 mg·dm<sup>-3</sup> ve vzorku 20% etanolového extraktu kozlíku z roku 2015 a v největším množství až 5,555 63 mg·dm<sup>-3</sup> ve vzorku 60% etanolového extraktu z roku 2015. Nejvyšší množství detekovaných látek vyplývá z analýz vzorků extraktů kozlíku 60% z roku 2015 a 2016. V těchto vzorcích byly detekovány analyty, jež jsou uvedeny v tabulkách (viz Tabulka 42 a Tabulka 45).

Rozdílné způsoby přípravy bylinných extraktů v různě koncentrovaných roztocích ethanolu měly zásadní vliv na konečný výskyt jednotlivých analytů. Jako nejvhodnější pro fortifikaci potravin vyplývá z tabulek právě vzorek extraktu kozlíku, kde bylo detekováno nejvíce

analytů, a to vzorek 60% z roku 2015 a 2016. Zde byly detekovány: *p*-cymen, limonen,  $\gamma$ -terpinen, karvon, bornyl-acetát a kyselina valerénová.

Charakteristicky zapáchající látkou kozlíku lékařského je kyselina valerénová a její deriváty. Ve vzorcích 20% etanolových extraktů však nebyla detekována. Obsah silice kozlíku lékařského se mění s původem byliny a podmínkami při pěstování, především klimatu.

Tabulka 46: Relativní směrodatné odchylky všech analyzovaných látek

Analyt	RSD [%]
menthol	9
limonen	7
cineol	12
menthon	8
menthofuran	6
menthyl-acetát	10
isopulegol	14
pulegon	14
karvon	10
kafr	13
borneol	15
thujon	10
bornyl-acetát	12
citronellol	8
nerol	6
citral	7
citronellal	9
geraniol	11
<i>p</i> -cymen	10
farnesen	6
bisabolol oxid A	7
$\alpha$ -bisabolol	9
$\gamma$ -terpinen	12
kyselina valerénová	10

## 5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá analýzou senzoricky aktivních látek obsažených v bylinných extraktech. Jedná se o mátu peprnou, šalvěj lékařskou, meduňku lékařskou, heřmánek pravý a kozlík lékařský.

Ethanolové extrakty vybraných bylin byly vyrobeny firmou První jílovská a.s. a následně zanalyzovány plynovou chromatografií v kombinaci s hmotnostním detektorem. Bylo zjišťováno, které látky různě koncentrované extrakty obsahují a v jakém množství.

V extraktech máty peprné bylo detekováno maximálně 5 analytů, a to limonen, cineol, menthon, pulegon a mentyl-acetát. Nejvyšší množství těchto látek bylo stanoveno ve vzorcích 61,8% etanolových extraktů máty z roku 2015 a 2016.

V extraktech šalvěje lékařské bylo detekováno také 5 analytů, a to cineol, thujon, kafr, borneol a bornyl-acetát. V největší míře byly zastoupeny v 60% etanolovém extraktu šalvěje z roku 2015.

Meduňka lékařská obsahovala v etanolových extraktech 4 analyty, a to limonen, linalool, citronellal a citral. Pro fortifikaci potravinářských výrobků tak byly nejvhodnější extrakty 40 a 60% z roku 2015 a 2016.

V extraktech heřmánku pravého bylo detekováno 5 analytů, a to *p*-cymen, limonen, farnesen,  $\alpha$ -bisabolol a bisabolol oxid A. V největší míře byly analyzovány v 60% extraktech z roku 2015 a 2016.

Extrakty kozlíku lékařského obsahovaly *p*-cymen, limonen,  $\gamma$ -terpinen, karvon, bornyl-acetát a kyselinu valerianovou. K fortifikaci potravinářských výrobků byly jako nejvhodnější určeny 60% etanolové extrakty z roku 2015 a 2016.

Na základě naměřených obsahů vybraných látek analyzovaných různě koncentrovaných etanolových extraktů bylin jsou celkově pro fortifikaci potravin nejvhodnější 60% etanolové extrakty z roku 2015 a 2016.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VONÁŠEK, F., TREPKOVÁ, E., NOVOTNÝ, L.: *Látky vonné a chuťové*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987. 437 s.
- [2] BREMNESS, Lesley. *Bylinář: zdraví, krása a radost*. 1. vyd. Překlad Václav Větvička. Ilustrace Jill Dow, Lorraine Harrison. Praha: Fortuna Print, 1994, 286 s. ISBN 80-858-7300-1.
- [3] WENZEL, Melanie. *Léčivé rostliny: nejlepší využití pro zdraví celé rodiny*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-5155-9.
- [4] NIKOLIĆ, Miloš, Katarina K. 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* [online]. 2014, vol. 61, č. 112, s. 225-232 [cit.2015-04-28]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.07.011. Dostupné z :<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669014004300>
- [5] ROHLOFF, Jens. Monoterpene Composition of Essential Oil from Peppermint (*Mentha × piperita* L.) with Regard to Leaf Position Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, vol. 47, no. 9, s. 3782-3786. DOI: 10.1021/jf981310s. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf981310s>
- [6] ZELENÝ, Václav. *Rostliny Středozeří*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2005, 401 s. Campanula. ISBN 80-200-1224-9.
- [7] PAMPLONA ROGER, Jorge D. *Encyklopedie léčivých rostlin*. Vyd. 1. Praha: Advent-Orion, 2008, 385 s. Zdraví pro třetí tisíciletí, 3. ISBN 978-807-1721-192.
- [8] MCKAY, Diane L. a Jeffrey B. BLUMBERG. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*. 2006, vol. 20, no. 8, s. 619-633. DOI: 10.1002/ptr.1936. ISSN 0951418x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1936>
- [9] Aries & Peppermint essential oil. In: North Tahoe Business Association [online]. Kings Beach: McCallum, 2015 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://www.northtahoebusiness.org/2015/07/02/aires-peppermint-essential-oil/>
- [10] Ideální bylinky na gril - Kouzelné tvoření. In: Kouzelné tvoření [online]. Česká republika: Kouzelné tvoření, 2017 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://kouzelnetvoreni.cz/idealni-bylinky-na-gril/>
- [11] ALANKAR, Shrivastava. A review on peppermint oil. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. India: Innovare Academic Sciences Pvt, 2009, vol. 2, no. 2, s. 27-33. ISSN 0974-2441. Dostupné také z: <http://www.ajpcr.com/Vol2Issue2/187.pdf>
- [12] Šalvěj lékařská /*Salvia officinalis*/. In: Spektrum zdraví [online]. Brno: Spektrum zdraví, 2012 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://www.spektrumzdravi.cz/salvej-lekarska-salvia-officinalis>
- [13] DZIURZYNSKI, Tomasz, Agnieszka LUDWICZUK a Kazimierz GLOWNIAK. Biological activities of *Salvia* L species. *Current Issues in Pharmacy and Medical*

- Sciences. 2013, vol. 26, no. 3, s. 326-330. DOI: 10.12923/j.2084-980X/26.3/a.19. ISSN 2084980x. Dostupné také z: <http://www.curipms.umlub.pl/issues/volume26/no3/a19/>
- [14] FERREIRA, Helena Pinto a Anna Paula MARTINS. Assessment report on *Mentha x piperita* L., folium. In: European Medicines Agency [online]. London: European Medicines Agency, 2008, s. 14 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-\\_HMPC\\_assessment\\_report/2010/01/WC500059394.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2010/01/WC500059394.pdf)
- [15] GRDIŠA, M., M. JUG-DUJAKOVIĆ, M. LONČARIĆ, K. CAROVIĆ-STANKO, T. NINČEVIĆ, Z. LIBER, I. RADOSAVLJEVIĆ a Z. ŠATOVIĆ. Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): A review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2015, vol. 80, no. 2, s. 69-78. ISSN 13317768.
- [16] Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*). In: Dary od přírody [online]. Česká republika: Dary od přírody, 2015 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://daryodprirody.cz/medunka-lekarska-melissa-officinalis/>
- [17] *Matricaria chamomilla*, Herbology Manchester. In: Herbology Manchester [online]. Manchester: Herbology Manchester, 2015 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <https://herbologymanchester.wordpress.com/tag/matricaria-chamomilla/>
- [18] Kozlík lékařský /*Valeriana officinalis*/. In: Spektrum zdraví [online]. Brno: Spektrum zdraví, 2012 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <http://www.spektrumzdravi.cz/kozlik-lekarsky-valeriana-officinalis>
- [19] Máta peprná /*Mentha piperita*/. In: Spektrum zdraví [online]. Brno: Spektrum zdraví, 2012 [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: <http://www.spektrumzdravi.cz/mata-peprna-mentha-piperita>
- [20] Lékopis - *Menthae piperitae etheroleum*. *Český lékopis 1997* [online]. 1997 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://lekopis.cz/>
- [21] HUYNH, Loi, Thomas PACHER, Hung TRAN a Johannes NOVAK. Comparative analysis of the essential oils of *Valeriana hardwickii* Wall. from Vietnam and *Valeriana officinalis* L. from Austria. *Journal of Essential Oil Research*. 2013, 25(5), 409-414. DOI: 10.1080/10412905.2013.828325. ISSN 1041-2905. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2013.828325>
- [22] KHEDER, Fethi Bel Hadj, Mohamed Ali MAHJOUR, Fatma ZAGHROUNI, Sadok KWAJA, Ahmed Noureddine HELAL a Zine MIGHRI. Chemical Composition Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Matricaria aurea* Loeffl. Growing in Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2014, 17(3), 493-505. DOI: 10.1080/0972060X.2014.884777. ISSN 0972-060x. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2014.884777>
- [23] COULADIS, Maria a Aikaterini KOUTSAVITI. Chemical composition of the essential oils of *Salvia officinalis*, *S. fruticosa*, *Melissa officinalis*, and their infusions. *Ratarstvo i povrtarstvo*. 2017, 54(1), 36-41. DOI: 10.5937/ratpov54-12365. ISSN 1821-3944. Dostupné také z: <http://scindeks.ceon.rs/Article.aspx?artid=1821-39441701036C>
- [24] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin* 2. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 304 s. ISBN 80-902-3912-9.

- [25] DVOŘÁKOVÁ, Marcela, Irena VALTEROVÁ a Tomáš VANĚK. Monoterpeny v rostlinách. *Chemické listy*. 2011, vol. 105, no. 11, s. 839-845. ISSN 1213-7103. Dostupné také z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_11\\_839-845.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_11_839-845.pdf)
- [26] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- [27] KINCL, Lubomír, Miloslav KINCL a Jana JAKRLOVÁ. *Biologie rostlin: pro 1. ročník gymnázií*. 4., přeprac. vyd. Praha: Fortuna, 2006. ISBN 80-716-8947-5.
- [28] SAFDAR, Muhammad N., Tusneem KAUSAR, Saqib JABBAR, Amer MUMTAZ, Karam AHAD a Ambreen A. SADDOZAI. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016, -.DOI: 10.1016/j.jfda.2016.07.010. ISSN 10219498. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949816301272>
- [29] CUYPER, Marcel de a Jeff W BULTE. *Physics and chemistry basis of biotechnology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, c2001, 334 p. ISBN 07-923-7091-0.
- [30] CHIN, Sung-Tong, Graham T. EYRES a Philip J. MARRIOTT. Cumulative solid phase microextraction sampling for gas chromatography-olfactometry of Shiraz wine. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, vol. 1255, s. 221-227 [cit. 2015-04-28]. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.084. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967312005134>
- [31] PAWLISZYN, Janusz. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. New York: Wiley-VCH, 1997, 247 s. ISBN 04-711-9034-9.
- [32] √ Piante Aromatiche, Coltivare Aromatiche, Piante Officinali | Le Piante Aromatiche.it. In: [13] √ *Piante aromatiche da giardino: ecco le più ricercate* | *Le Piante Aromatiche.it*. In: [online]. 2013 [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: <http://www.lepiantearomatiche.it/piante-aromatiche/piante-aromatiche->
- [33] Přístroj na stanovení silic v drogách | Kavalierglass a.s. In: *Domácenské a technické sklo* [online]. 2010 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.kavalier.cz/cz/laboratorni-pristroje-sklenene-pristroj-na-stanoveni-silic-v-drogach-technicke-sklo-laboratorni-sklo.html>
- [34] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. V Brně: Vutium, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [35] CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993, 387 s. ISBN 80-200-0010-0.
- [36] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 1999, 348 s. ISBN 80-902-4329-0.
- [37] BOEHM, Stanislav. *Strukturní analýza organických sloučenin*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 152 s. ISBN 80-708-0235-9.
- [38] PAWLISZYN, Edited by Janusz. *Handbook of solid phase microextraction*. Beijing: Chemical Industry Press, 2009. ISBN 978-712-2047-014.
- [39] Extrakce za zvýšené teploty - Labicom - laboratorní přístroje a příslušenství, poradenská a servisní činnost. *Labicom - laboratorní přístroje a příslušenství*,

- poradenská a servisní činnost* [online]. 1999 [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: <http://www.labicom.cz/extrakce-za-zvysene-teploty-283/>
- [40] Chemické nástroje detektivů – Seriál o detektivní chemii – KSICHT. 1999. *O KSICHTu* [online]. [cit. 2015-05-06]. Dostupné z: <http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/detektivni-chemie/2>
- [41] SPDE - Labicom - laboratorní přístroje a příslušenství, poradenská a servisní činnost. 2015. *Labicom - laboratorní přístroje a příslušenství, poradenská a servisní činnost* [online]. [cit. 2015-05-06]. Dostupné z: <http://www.labicom.cz/spde-86/>
- [42] CUYPER, Marcel de a Jeff W BULTE. 2001. *Physics and chemistry basis of biotechnology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 334 p. ISBN 07-923-7091-0.
- [43] TAYLOR, A. 2002. *Food flavour technology*. Boca Raton, FL: Blackwell Publishing, xiv, 302 p. ISBN 18-412-7224-8.
- [44] HÁLKOVÁ, Jana. 2001. *Analýza potravin: treaties and international agreements registered or filed and recorded with the Secretariat of the United Nations*. 2. vyd. Újezd u Brna: Ivan Straka, 94 s. ISBN 80-864-9402-0.
- [45] KADLEC, Pavel. 2002. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 236 s. ISBN 80-708-0510-2.
- [46] ŠTULÍK, Karel. Analytické separační metody. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [47] Validace výrobních procesů | Laboratorní technika LAB-MET. 2010. *Laboratorní přístroje, laboratorní vybavení | Laboratorní technika LAB-MET* [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://www.labmet.cz/validace-proces%C5%AF>
- [48] MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI V HPLC. 1997. *|HPLC|High Performance Liquid Chromatography|* [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Tip/lod\\_loq.htm](http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm)
- [49] HENDL, Jan. 2004. *Přehled statistických metod zpracování dat: analýza a metaanalýza dat*. 1. vyd. Praha: Portál, 583 s. ISBN 80-717-8820-1.
- [50] JANUSZ PAWLISZYN. Handbook of solid phase microextraction. 1st ed. Chennai: Elsevier, 2011. ISBN 978-012-4160-170.
- [51] Pawliszyn, J.: Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 880, p. 35-62. ISSN 0021-9673
- [52] Pawliszyn, J.: Solid phase Microextraction: theory and practice. New York: 1997 Wiley - VCH , Inc. ISBN 0-471-19034-9

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

SPE	Extrakce tuhou fází (Solid-phase extraction)
SPME	Mikroextrakce tuhou fází (Solid-phase microextraction)
DI-SPME	Přímá SPME (Direct immersing SPME)
HS-SPME	Headspace SPME
SPDE	Dynamická extrakce tuhou fází (Solid-phase dynamic extraction)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
TCD	Tepelně-vodivostní detektor (Thermal conductivity detector)
FID	Plamenový-ionizační detektor (Flame ionization detector)
ECD	Detektor elektronového záchytu (Electron capture detector)
HPLC	Vysokoučinná k. chromatografie (High-performance liquid chromatography)
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie (Ultraviolet-visible spectroscopy)
PA	Polyakrylát (Polyacrylate)
PDMS	Polydimethylsiloxan (Polydimethylsiloxane)
DVB	Divinylbenzen (Divinylbenzene)
CAR	Carboxen

## **8 SEZNAM PŘÍLOH**

**Příloha 1:** Optimalizace doby headspace extrakce

**Příloha 2:** Optimalizace teploty headspace extrakce

**Příloha 3:** Chromatogram extraktu máty peprné

**Příloha 4:** Chromatogram extraktu šalvěje lékařské

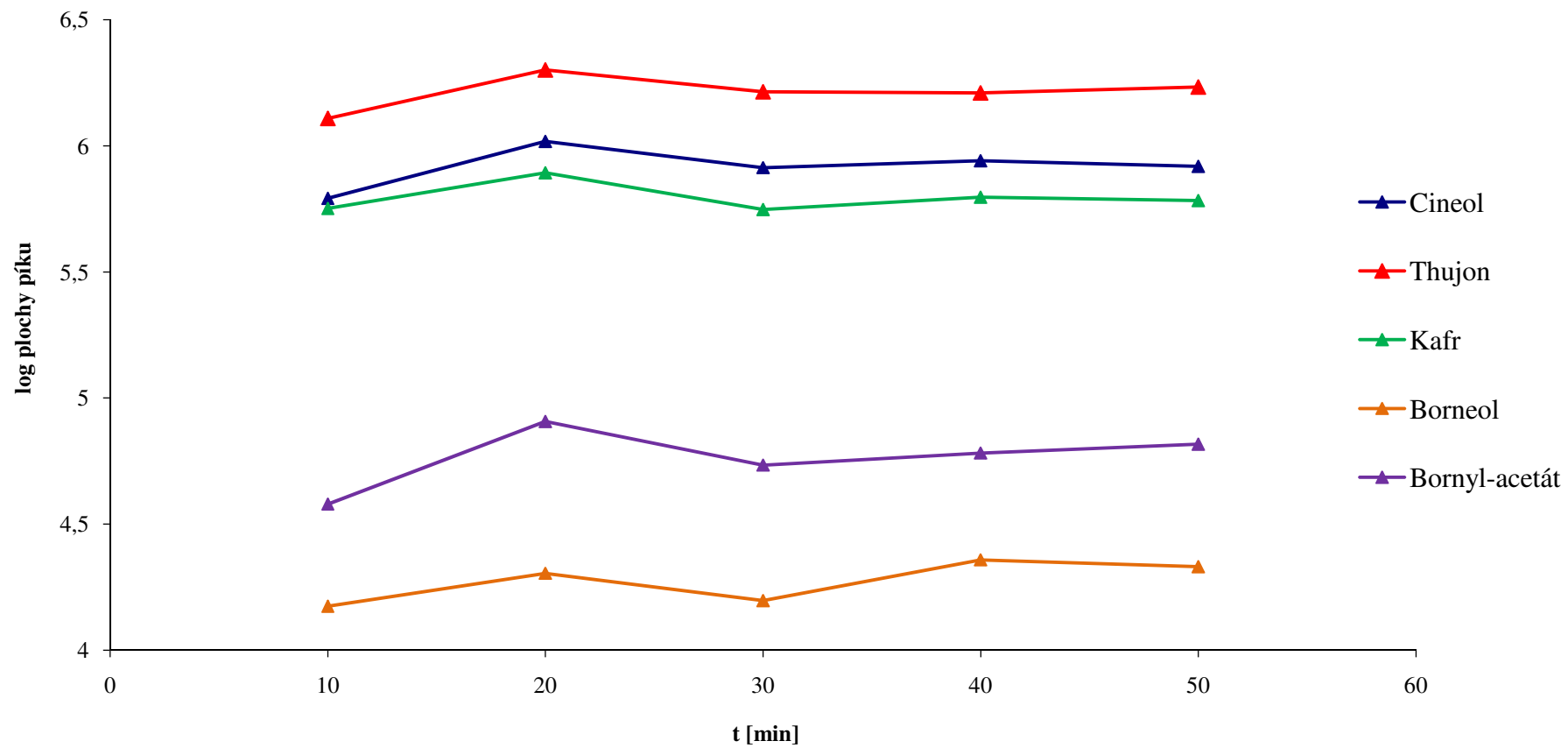
**Příloha 5:** Chromatogram extraktu meduňky lékařské

**Příloha 6:** Chromatogram extraktu heřmánku pravého

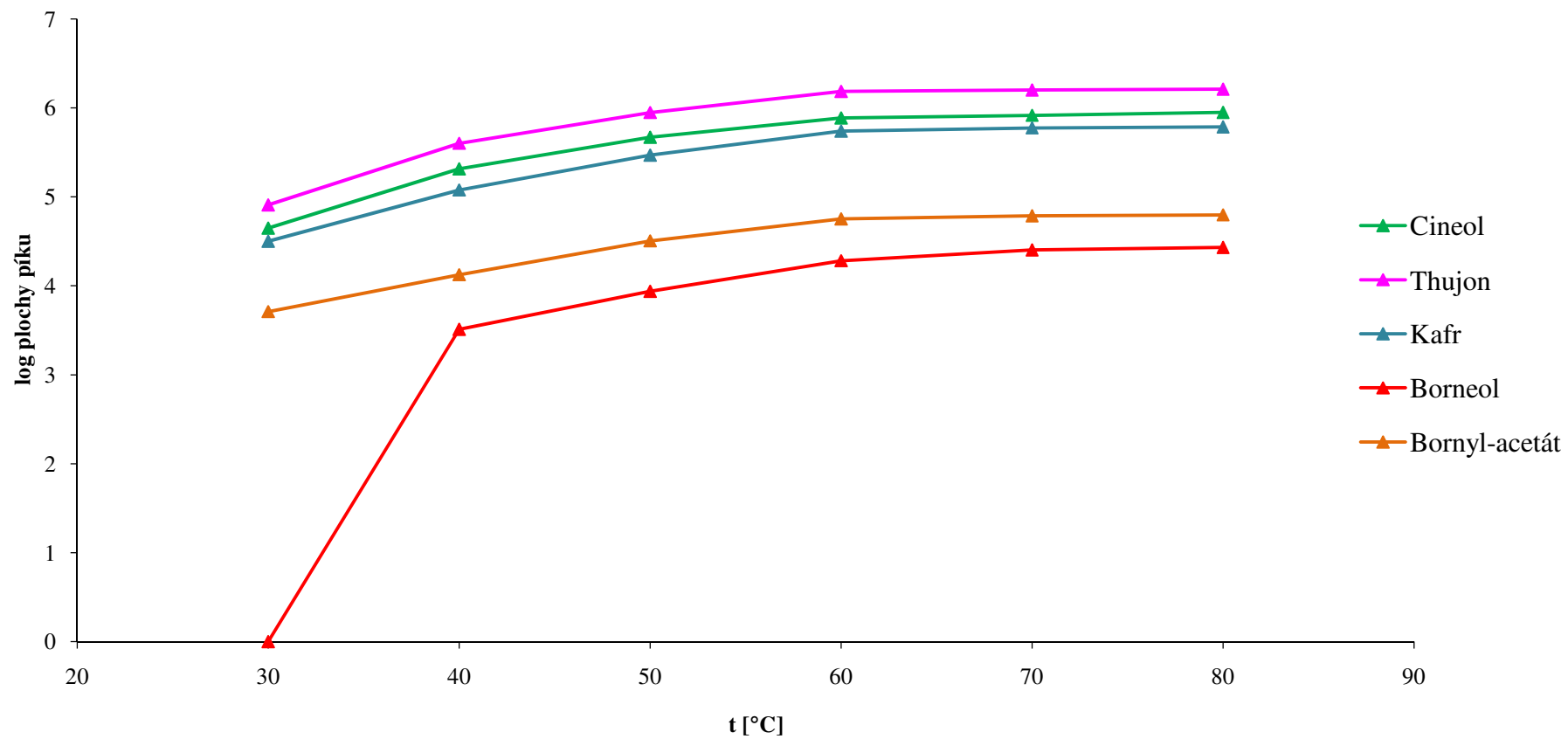
**Příloha 7:** Chromatogram extraktu kozlíku lékařského

## **9 PŘÍLOHY**

### Příloha 1: Optimalizace doby headspace extrakce



## Příloha 2: Optimalizace teploty headspace extrakce



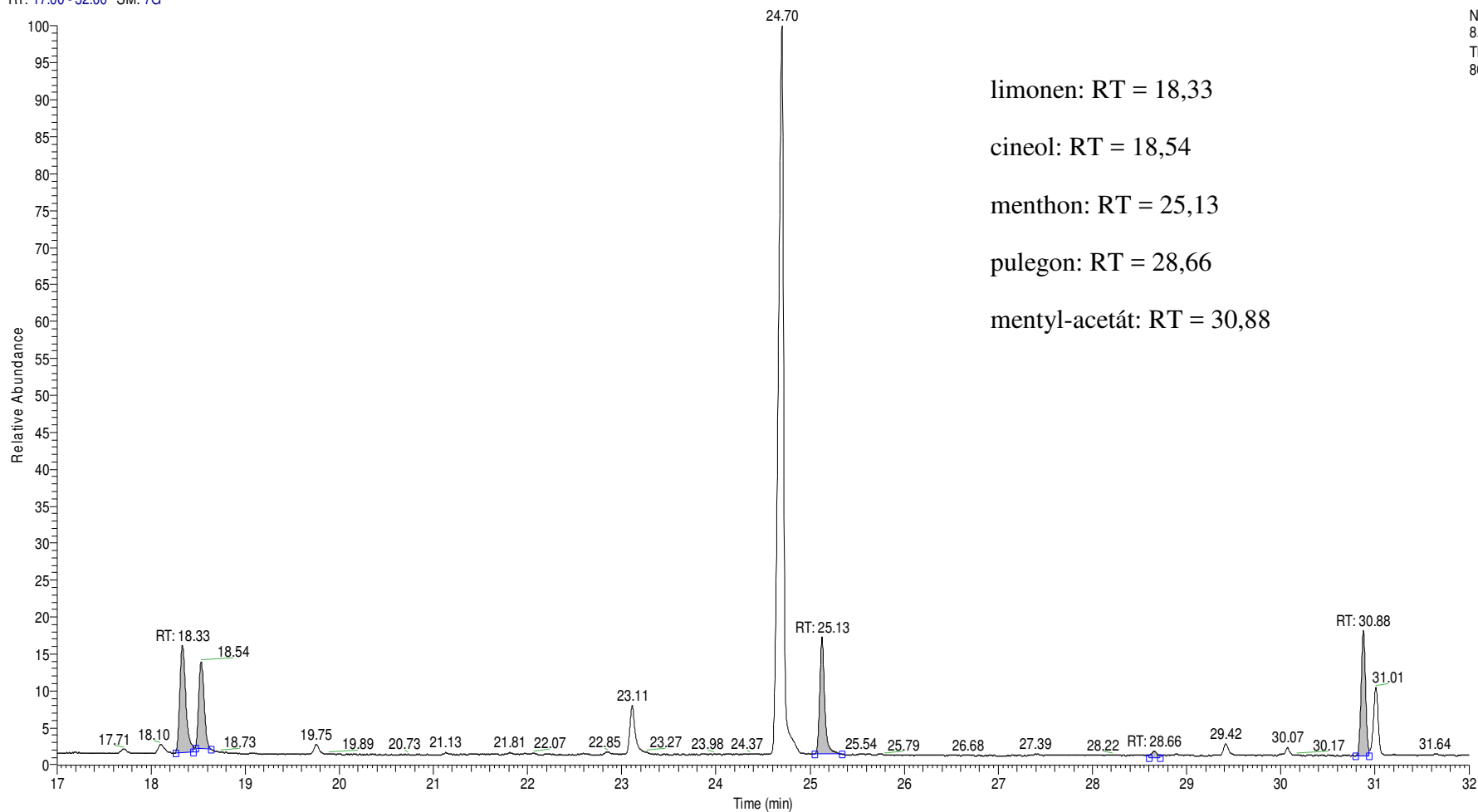
### Příloha 3: Chromatogram extraktu máty peprné

C:\Renata\...2017\06\_03\_2017\80\_2769\_B  
Mata 2015 61.8% B

3/8/2017 5:53:46 PM

RT: 17.00 - 32.00 SM: 7G

NL:  
8.00E7  
TIC F: MS  
80\_2769\_B



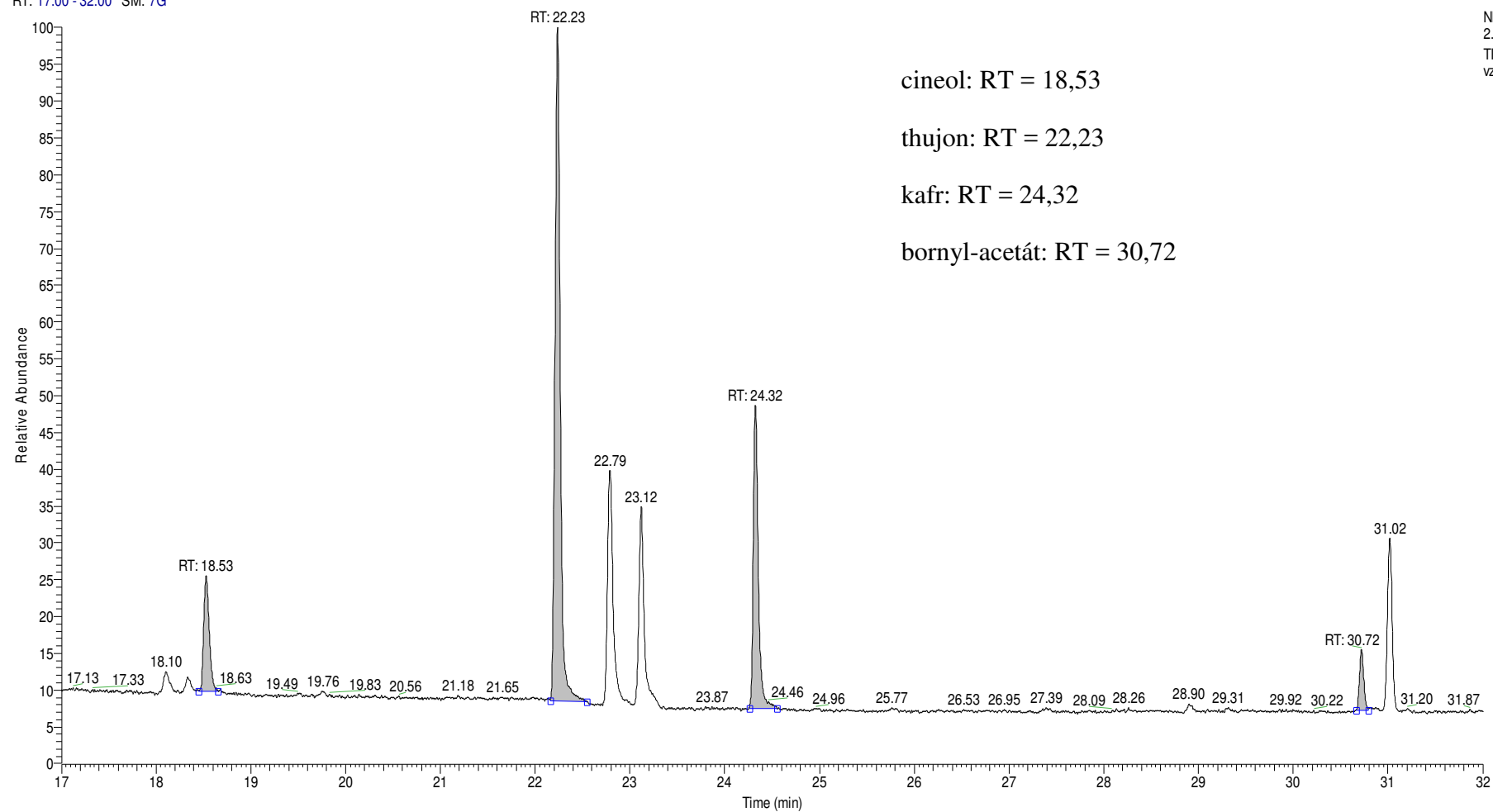
## Příloha 4: Chromatogram extraktu šalvěje lékařské

C:\Renata\...Salvej 2016\viz\_3\_A  
salvej 2016\60%\_A

2/24/2017 7:16:49 AM

RT: 17.00 - 32.00 SM: 7G

NL:  
2.70E7  
TIC F: MS  
vz\_3\_A

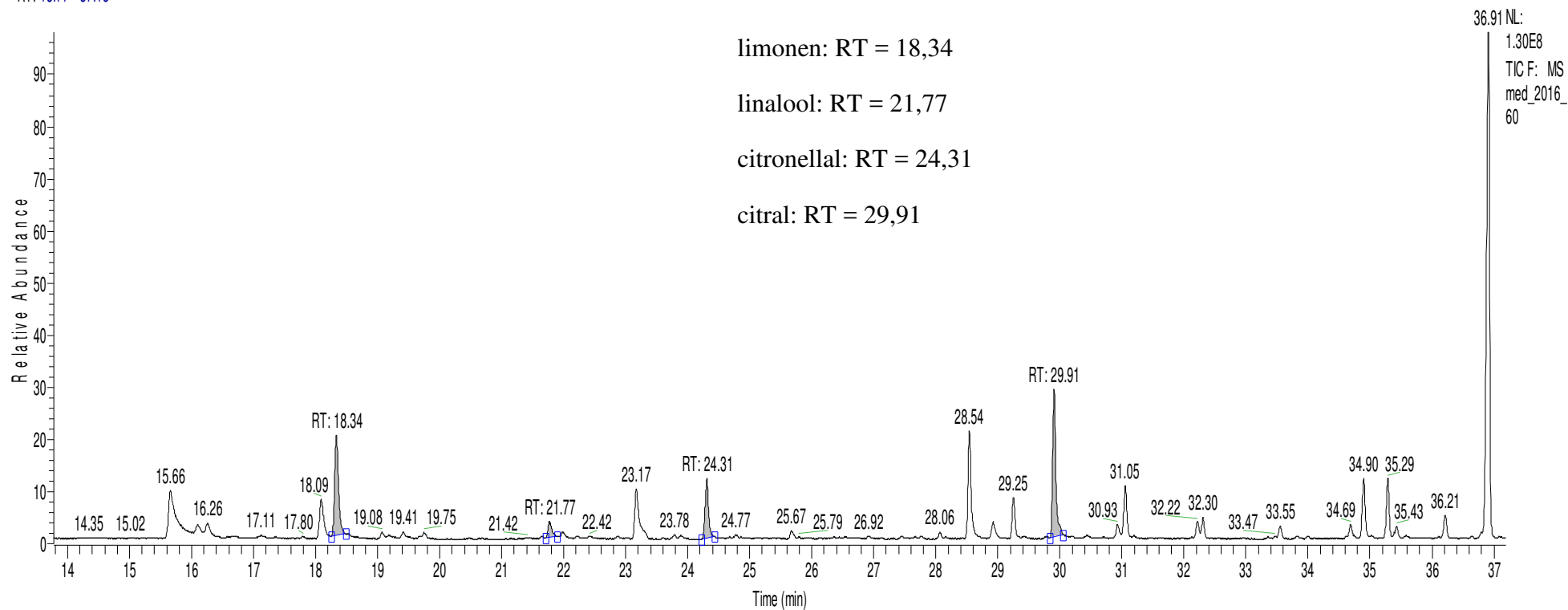


## Příloha 5: Chromatogram extraktu meduňky lékařské

C:\Renata...4\_4\_2017\med\_2016\_60  
medunka\_2016\_60%\_100ul

4/11/2017 3:17:48 AM

RT: 13.77 - 37.18



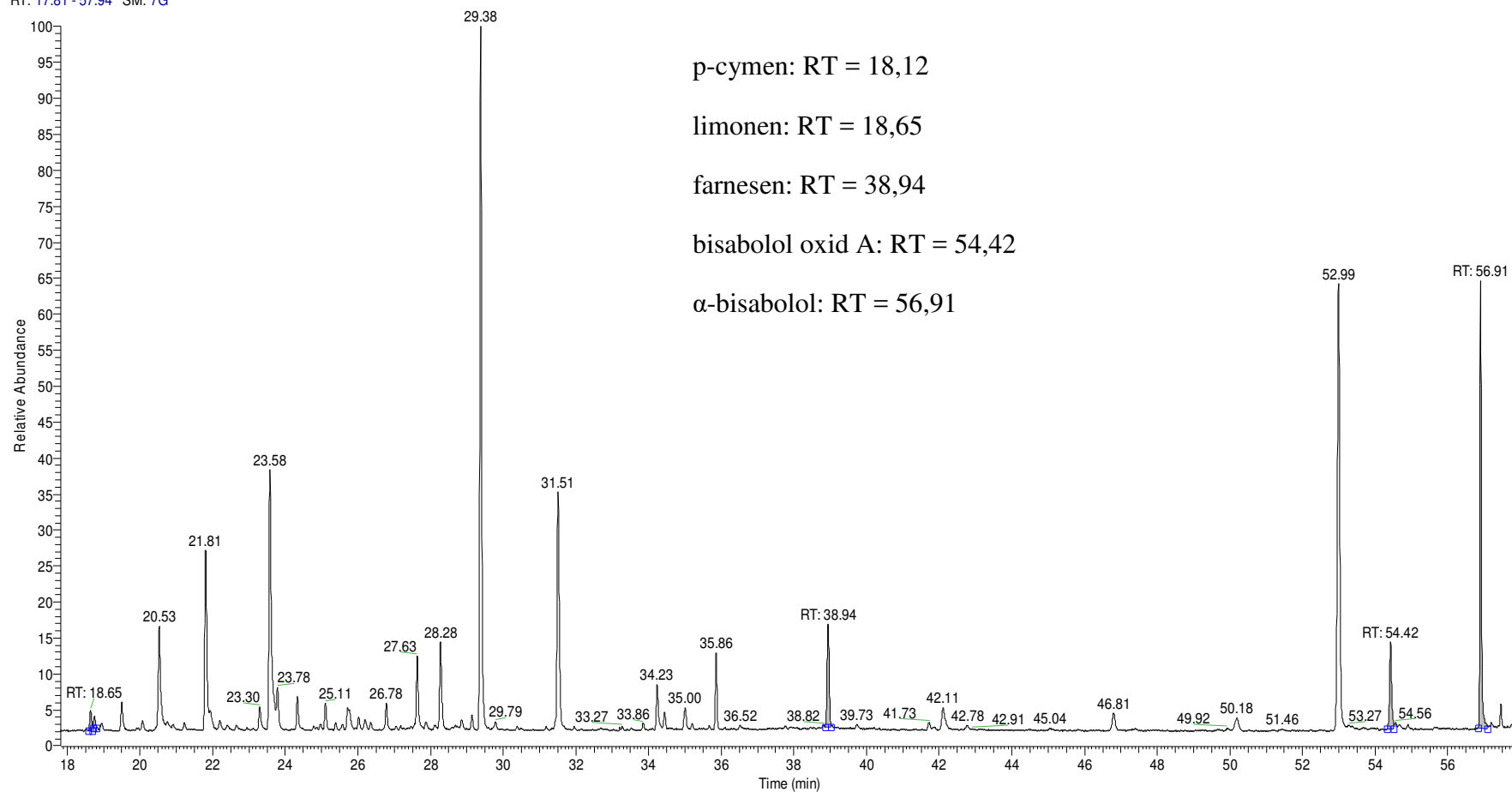
## Příloha 6: Chromatogram extraktu heřmánku pravého

c:\renata\...6\_12\_2016vz\_h\_2014\_a  
vz H2014 100ul / 5 ml

12/6/2016 4:13:26 PM

RT: 17.81 - 57.94 SM: 7G

NL:  
2.55E7  
TIC F: MS  
vz\_h\_2014  
\_a

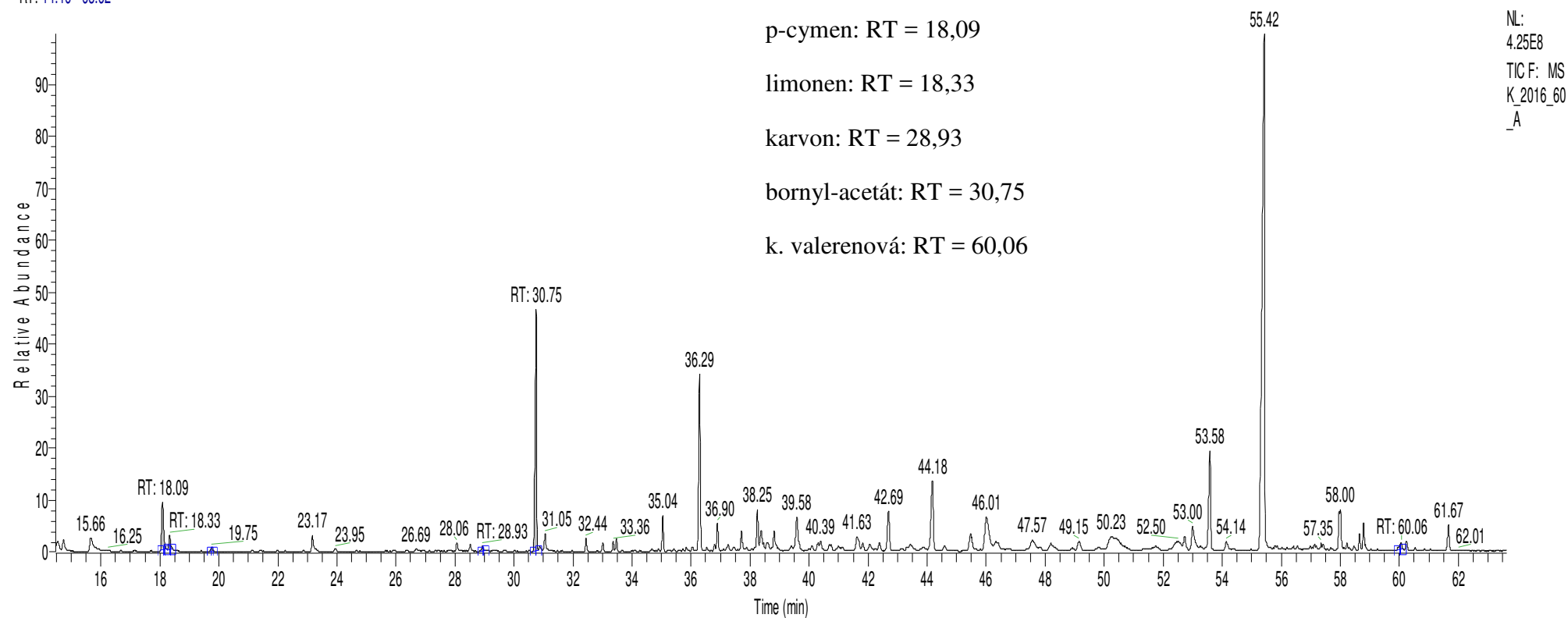


## Příloha 7: Chromatogram extraktu kozlíku lékařského

C:\Renata...\2017\KozlikK\_2016\_60\_A  
Kozlik 2016\_60% 100ul/5ml

4/20/2017 6:31:17 PM

RT: 14.46 - 63.62



NL:  
4.25E8  
TIC F: MS  
K\_2016\_60  
\_A