

POROVNÁNÍ CHEMICKÉHO SLOŽENÍ A ANTIBAKTERIÁLNÍCH VLASTNOSTÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ ZÍSKANÝCH HYDRODESTILACÍ A PARNÍ DESTILACÍ LEVANDULE LÉKAŘSKÉ

ŘEBÍČKOVÁ KRISTÝNA^a, BAJER TOMÁŠ^a, BAJEROVÁ PETRA^a, ŠILHA DAVID^b a VENTURA KAREL^{a,*}

^a *Katedra analytické chemie*

^b *Katedra biologických a biochemických věd*

* *Garant*

ÚVOD

Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia* Mill.) je aromatický polokeř z rodu *Lamiaceae* a má tradiční využití v mnoha odvětvích. Je známá pro své hojivé a antimikrobiální účinky v rostlinné medicíně. V aromaterapii se využívá jako relaxační prostředek, ale také tvoří nedílnou součást parfémů, mýdel nebo pokrmů v kuchyni ¹⁻⁴. Obecný analytický postup pro esenciální oleje se skládá ze dvou kroků – extrakce a vlastní instrumentální analýzy. Zatímco instrumentální analýza trvá pár desítek minut, extrakce může trvat až několik hodin ⁵.

Extrakce

Tradičně se esenciální olej z levandule extrahuje parní destilací (SD), nebo hydrodestilací (HD) ^{4,6,7}. Existují také další alternativní a moderní techniky extrakce, které lze použít pro izolaci esenciálního oleje. A. Filly a kol. použili ve své studii celkem deset alternativních extrakčních technik k porovnání složení extrahovaných silic z levandule: tradiční SD a HD, turbo hydrodestilaci (THD), hydrodestilaci s chloridem sodným (NaCl-HD), enzymatickou hydrodestilaci (Enzyme-HD), micelární hydrodestilaci (Micelle-HD), ultrazvukovou hydrodestilaci (US-HD), subkritickou hydrodestilaci (SW-HD), mikrovlnnou extrakci bez rozpouštědel (SFME) a mikrovlnnou parní destilaci (MSD) ⁷. Zvolená extrakční technika může mít značný vliv na výtěžnost, složení esenciálního oleje a jeho antimikrobiální a antioxidační účinnost ⁸. Esenciální olej izolovaný z levandule obsahuje cca 150 různých látek, z nichž největší podíl tvoří linalool, linalyl acetát a eukalyptol ⁴. Americká Společnost pro esenciální oleje (The Essential Oil Company) udává procentuální výtěžky esenciálního oleje z levandule v rozmezí 0,5 – 1 % ⁹.

Chromatografická analýza

Vlastní analýza esenciálního oleje získaného extrakcí se provádí plynovou chromatografií (separace látek) s hmotnostní detekcí (identifikace látek) ^{5,8,10,11}. Identifikace jednotlivých sloučenin se provádí porovnáním hmotnostních spekter získaných měřeními se spektry z knihoven. K potvrzení identity sloučeniny se využívají retenční indexy. Kvantitativní analýza látek v esenciálním oleji se provádí plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID) ⁶.

Antimikrobiální účinky

V současnosti se o esenciálních olejích z levandule, ale i z jiných rostlin, hovoří jako o možném konzervačním prostředku potravin, který by prodloužil údržnost potravin a zamezil gastrointestinálním potížím způsobeným množícími se mikroorganismy v potravinách. Esenciální olej z levandule je díky svým antimikrobiálním účinkům efektivní proti několika mikroorganismům, jako jsou zejména *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*. K určení antimikrobiální aktivity se používá agarová disková difúzní metoda. Sterilní disky napuštěné danou antimikrobiální látkou, v tomto případě esenciálním olejem, jsou dávkovány na inokulovanou Petriho misku. Po inkubaci se odečítá inhibiční zóna v mm^{8,12}.

Cíl Práce

Cílem této práce bylo prozkoumat vliv dvou různých extrakčních metod, konkrétně hydrodestilace a destilace vodní parou na chemické složení získaného esenciálního oleje z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* Mill.), včetně antimikrobiálních vlastností.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Identifikace chemických sloučenin v silicích z *Lavandula angustifolia* Mill.

Rostlinný materiál

Sušené květy levandule lékařské byly zakoupeny u firmy Mediate, s.r.o. (Libchavy, ČR), zemí původu je Chorvatsko.

Hydrodestilace

Navážka cca 55 g usušených květů levandule lékařské byla vložena do 2000 ml destilační baňky obsahující destilovanou vodu. HD probíhala po dobu 220 minut do předestilování 1700 ml hydrolátu, kdy se objem esenciálního oleje už nezvyšoval. Extrakt v podobě esenciálního oleje byl po oddělení od vodné fáze převeden pomocí stříkačky do tmavé vialky a uskladněn v lednici při 4 °C, dokud nebyl analyzován.

Destilace vodní parou

Navážka cca 55 g usušených květů levandule lékařské byla vložena do oválného nástavce opatřeného sítkem proti propadávání vzorku, který byl upevněn nad 2000 ml destilační baňku obsahující destilovanou vodu. Vodní pára vznikající v destilační baňce procházela přes rostlinný materiál a kondenzovala v chladiči, v separátoru poté docházelo k oddělení esenciálního oleje od vodné fáze. SD probíhala po dobu 260 minut za stejných podmínek jako HD. Extrakt byl uskladněn stejným způsobem, jako v případě HD.

Esenciální olej

K analýze GC-MS bylo vzato 5 µl esenciálního oleje a doplněno na objem 1 ml *n*-hexanem. K analýze GC-FID byl nejprve připraven vnitřní standard odměřením 5 µl *n*-nonanu

a doplněním *n*-hexanem na objem 1 ml. Z takto připraveného vnitřního standardu bylo odměřeno 5 μ l k 5 μ l esenciálního oleje a opět doplněno *n*-hexanem na objem 1 ml.

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)

GC-MS analýza vzorků byla provedena na plynovém chromatografu GC 2010 s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 Plus (obojí Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a autosamplerem PAL-Combi (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Chromatograf byl vybaven kapilární kolonou ZB-5HT Inferno o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μ m (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Jako nosný plyn bylo použito helium. Separace látek probíhala při konstantní lineární rychlosti nosného plynu 30 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Teplotní program byl nastaven na počátku na 40 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minut, poté byl termostat zahříván na 250 $^{\circ}\text{C}$ rychlostí 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ a finální teplota byla udržena po dobu 10 minut. Teplota nástřiku a převodníku do detektoru byla nastavena na 200 $^{\circ}\text{C}$. Dávkován byl vždy 1 μ l vzorku se splitem 1:50. Hmotnostní spektrometr byl provozován v režimu elektronové ionizace, ionizační energie byla 70 eV a skenovány byly ionty v rozsahu m/z 33-500. Identifikace chemických složek esenciálního oleje byla provedena pomocí hmotnostních spekter, které byly porovnávány s knihovnou spekter Národního institutu pro standardy a technologii (NIST '14 Mass Spectral Library), knihovnou Wiley (Wiley Registry™ of Mass Spectral Data, 11th Edition) a knihovnou FFNSC 2 (Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds GC/MS library), verifikace byla provedena na základě porovnání retenčních indexů.

Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID)

GC-FID analýza vzorků byla provedena na plynovém chromatografu GC 2010 s plamenovým ionizačním detektorem a autosamplerem AOC-20i (obojí Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Chromatografické podmínky byly totožné jako u GC-MS analýz. Teplota nástřiku byla nastavena na 200 $^{\circ}\text{C}$ a teplota detektoru na 260 $^{\circ}\text{C}$. Dávkovaný objem vzorku byl 1 μ l při splitu 1:50. Identifikace složek esenciálního oleje byla provedena na základě vypočítaných retenčních indexů a výsledků identifikace látek z MS analýzy. Procentuální zastoupení jednotlivých látek v esenciálním oleji bylo vypočteno z poměrů ploch příslušných píků a vnitřního standardu.

Antimikrobiální účinky

Disková difúzní metoda

Ke stanovení antimikrobiálních účinků esenciálního oleje z levandule byl použit Mueller-Hintonův (MH) agar pro bakterie (*Escherichia coli* CCM 3954, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955), MALT agar pro kvasinky (*Candida albicans* CCM 8215). Byla připravena bakteriální suspenze s turbiditou podle stupnice McFarlanda odpovídající stupni 0,5; tj. 10^8 CFU $\cdot\text{ml}^{-1}$. Takto připravenou suspenzí byl agar inokulován daným mikroorganismem. Poté se na agar aplikoval sterilní disk, na který bylo pipetováno 8 μ l esenciálního oleje. Bakterie byly inkubovány 24 h při 37 $^{\circ}\text{C}$, kvasinky 48 h při

37 °C. Po inkubaci byla citlivost mikroorganismu na esenciální olej vyhodnocena podle průměru inhibiční zóny (mm). Přítomnost inhibiční zóny značí antimikrobiální aktivitu proti testovaným bakteriím a kvasinkám.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Izolace silic z *Lavandula angustifolia* Mill.

Hydrodestilace a parní destilace byla provedena vždy dvakrát do chvíle, kdy se již žádný esenciální olej nedestiloval, tzn. do odměření cca 1700 ml hydrolátu. Průměrná rychlost destilace byla cca 6,5-7,5 ml·min⁻¹. Z výsledků je patrné, že výtěžnost v obou použitých destilačních technikách je rozdílná (tabulka 1), z čehož vyplývá, že použitá extrakční technika má vliv na výtěžek extrakce. Parní destilací bylo dosaženo vyšší výtěžnosti než hydrodestilací. Značnou nevýhodou obou použitých destilačních technik je doba potřebná k získu maximální výtěžnosti esenciálního oleje. SD probíhala po dobu 220 minut, HD po dobu 260 minut. Ačkoliv SD a HD jsou používány jako referenční metody k extrakci esenciálních olejů, vzhledem k úspoře času by bylo vhodnější použít k izolaci esenciálního oleje jinou extrakční metodu, kterou by šlo získat srovnatelné výtěžky v kratším časovém intervalu. F. Chemat a kol. ve své studii porovnávají MSD a SD, přičemž došli k závěru, že MSD po 10 minutách poskytuje srovnatelné výtěžky s výtěžky získanými SD po 90 minutách¹⁰. M. An a kol. použili k extrakci esenciálního oleje z levandule mikroextrakci tuhou fází (SPME) a došli k závěru, že SPME je jednoduchou, časově úspornou a vysoce citlivou alternativou k tradičním extrakčním technikám používaným k analýze esenciálních olejů¹³. Nicméně jedná se pouze o techniku screeningovou.

Tabulka 1: Výsledky výtěžnosti extraktu *Lavandula angustifolia* Mill. z SD a HD

SD/HD	Navážka [g]	Vyvážka [g]	Výtěžnost [%]	Hydrolát [l]
SD	53,86	1,54	2,86	1,7
SD	56,39	1,57	2,78	1,7
HD	53,84	1,18	2,19	1,7
HD	56,44	1,28	2,27	1,7

Identifikace a kvantifikace silic z *Lavandula angustifolia* Mill.

Složení esenciálních olejů z usušených květů *Lavandula angustifolia* Mill. získané SD a HD je rozdílné jak v procentuálním zastoupení látek, tak v přítomnosti jednotlivých látek v esenciálních olejích z obou destilačních technik. Esenciální oleje se majoritně skládají z terpenů a jejich oxidovaných složek – terpenoidů. Nejrozsáhlejší skupinou látek v obou vydestilovaných olejích jsou monoterpenoidy (Graf 1), z nichž největší zastoupení má linalool, linalyl acetát a eukalyptol. Hlavní složky esenciálního oleje jako je linalool, linalyl acetát, eukalyptol, hexyl butyrát, oktan-3-on, karyofylen atd. jsou přítomny v esenciálních olejích z HD i SD, ale mají různé procentuální zastoupení (tabulka 2). Celkově se extrakty shodují v 53 sloučeninách. Zbylé látky jsou obsaženy pouze v esenciálním oleji z SD, například α -humulen.

V esenciálním oleji z SD bylo identifikováno 56 látek, v esenciálním oleji z HD bylo identifikováno 52 látek (tabulka 2). Obecně lze tedy říci, že esenciální olej z HD obsahuje o něco méně látek než esenciální olej z SD.

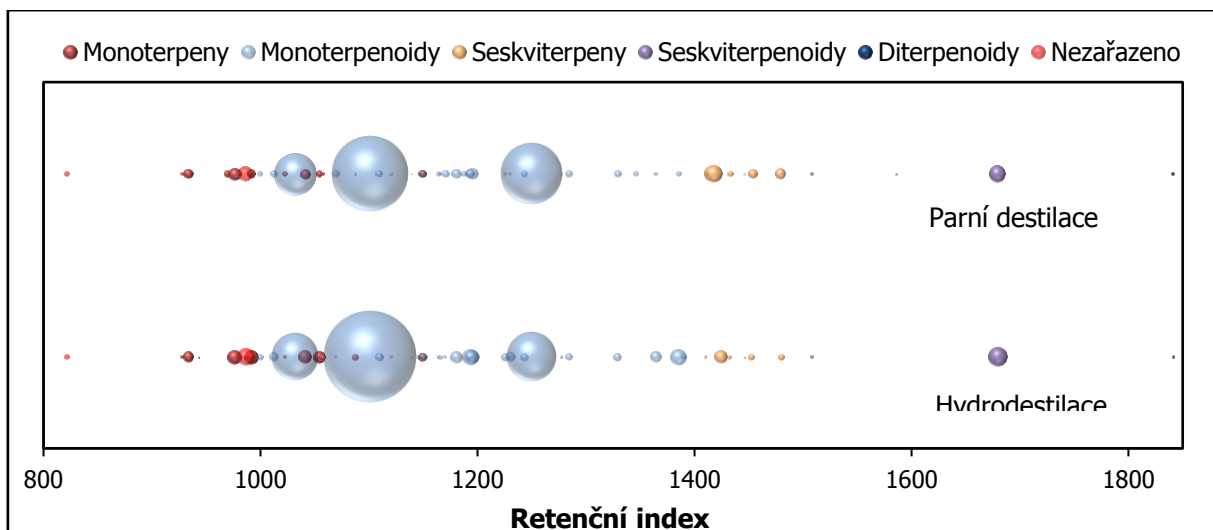
Tabulka 2: Identifikované sloučeniny v extraktech získaných parní destilací a hydrodestilací *Lavandula angustifolia* Mill. a jejich procentuální zastoupení

RI _{vyp.}	RI	Sloučenina	Plocha [%]	
			SD	HD
800	800	<i>n</i> -oktan	0,71	0,52
826	821	1-methoxy hexan	0,16	0,16
925	927	α -thujen	0,04	0,04
929	933	α -pinen	0,50	0,59
943	943	kafren	0,58	0,01
969	976	sabinen	0,26	0,21
971	978	β -pinen	0,96	1,02
981	980	vinyl amyl karbinol	0,14	0,16
986	986	oktan-3-on	1,40	1,54
991	991	myrcen	0,43	1,07
998	999	oktan-3-ol	0,18	0,21
1015	1012	hexyl acetát	0,27	0,39
1022	1022	<i>o</i> -cymen	0,14	0,04
1025	1032	eukalyptol	12,01	12,24
1038	1041	α -ocimen	0,65	0,91
1048	1054	β -ocimen	0,22	0,73
1057	1057	γ -terpinen	0,07	0,21
1065	1069	(Z)-sabinen hydrát	0,26	0,02
1086	1087	α -terpinolen	0,03	0,22
1099	1101	linalool	39,75	47,96
1105	1109	hotrienol	0,29	0,33
1126	1120	3-oktyl acetát	0,02	0,04
1135	1139	(E)-pinokarveol	0,01	0,01
1140	1149	kafr	0,34	0,33
1143	1145	verbenol	0,01	0,03
1150	1150	hexyl isobutyrate	0,24	0,29
1155	1151	nerol oxid	0,01	0,09
1159	1164	pinokarvon	0,09	0,31
1163	1165	borneol	0,04	0,10

Tabulka 3: Identifikované sloučeniny v extraktech získaných parní destilací a hydrodestilací *Lavandula angustifolia* Mill. a jejich procentuální zastoupení - pokračování

RI _{vyp.}	RI	Sloučenina	Plocha [%]	
			SD	HD
1165	1170	δ-terpineol	0,36	0,05
1175	1180	terpinen-4-ol	0,57	0,76
1184	1187	crypton	0,16	0,10
1189	1195	α-terpineol	0,83	0,96
1193	1193	hexyl butyrát	0,54	1,43
1229	1225	Nerol	0,04	0,31
1238	1230	hexyl isobutyl karbonát	0,04	0,44
1243	1243	hexyl isovalerát	0,28	0,31
1256	1250	linalyl acetát	25,89	13,27
1284	1277	bornyl acetát	0,03	0,03
1292	1284	levandulyl acetát	0,23	0,26
1331	1329	hexyl-tiglát	0,26	0,30
1365	1364	neryl acetát	0,07	0,69
1381	1382	β-bourbonen	0,01	-
1384	1385	geranyl acetát	0,18	1,36
1386	1390	hexyl kaproát	0,08	-
1405	1410	seskvithujen	0,03	0,02
1416	1424	(E)-karyofylen	2,03	0,85
1418	1418	α-santalen	0,23	-
1434	1432	(E)-α-bergamoten	0,18	0,08
1450	1454	α-humulen	0,02	-
1457	1452	(E)-β-farnesen	0,57	0,17
1478	1480	germakren D	0,71	0,21
1510	1508	levandulyl 2-methylbutyrát	0,05	0,05
1579	1586	karyofylen oxid	0,82	0,90
1682	1679	α-bisabolol	1,86	1,95
1844	1841	fyton	0,06	0,02

Co se týká procentuálního zastoupení jednotlivých látek, tak největší rozdíl je u linaloolu, kde v esenciálním oleji z HD je 47,76 %, zatímco v esenciálním oleji z SD je pouze 39,75 %, stejně tak geranyl acetát má vyšší zastoupení v extraktu z HD. Další patrný rozdíl v obsahu je u linalyl acetátu a seskviterpenů, kde naopak v extraktu z SD je větší procentuální zastoupení než v extraktu z HD (obrázek 1, tabulka 2).



Obrázek 1: Zastoupení skupin identifikovaných (GC-MS) a kvantifikovaných látek (GC-FID) v extraktu z *Lavandula angustifolia* Mill.

Antibakteriální účinky

Výsledky antimikrobiálních účinků stanovených diskovou difúzní metodou jsou uvedeny v tabulce 3. Esenciální oleje získané z obou destilačních technik inhibovaly všechny testované mikroorganismy v různé míře, kromě *Pseudomonas aeruginosa*, která nebyla inhibována žádným z olejů. Esenciální olej získaný HD měl větší inhibiční účinnost než esenciální olej získaný SD.

Tabulka 3: Velikosti inhibičních zón u testovaných mikroorganismů vlivem esenciálního oleje (SD a HD) a vlivem některých antibiotik (převzato ze ¹⁴)

Testovaný mikroorganismus	Průměr inhibiční zóny [mm]					
	SD	HD	Penicilin	Amoxicilin	Cefalexin	Nystatin
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	11,0	16,5	0	23,0	21,0	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	17,5	28,0	37,0	32,0	28,0	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	11	23,0	28,0	0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	0	0	0	0	0	-
<i>Candida albicans</i> CCM 8215	11	11	-	-	-	17,0

V případě *Enterococcus faecalis* a *Candida albicans* byla senzitivita bakterie a kvasinky oběma vzorkům identická. Nejcitlivější zkoumaný mikroorganismus byl *Staphylococcus aureus*. Navíc esenciální olej získaný HD měl na *Staphylococcus aureus* srovnatelný vliv, jako má antibiotikum cefalexin ¹⁴ (tabulka 3). Stanojević a kol. použili ve své studii k extrakci esenciálního oleje z levandule dvě různé hydrodestilační techniky a jejich vzorek vykazoval antimikrobiální účinky také proti *Pseudomonas aeruginosa*, na rozdíl od námi získaného oleje. Způsobeno to může být tím, že antimikrobiální aktivita esenciálního oleje z levandule je mimo jiných látek důsledkem působení 1,8-cineolu, kafru a borneolu, které byly v jejich oleji obsaženy v mnohem vyšší míře než v našem esenciálním oleji ¹⁴. Ve studii A. Herman a kol. je

zkoumán aditivní antimikrobiální charakter linaloolu, který měl v našem oleji největší zastoupení, přidaného do esenciálního oleje. Výzkum ukázal, že přidaný linalool významně zvyšuje antimikrobiální účinnost esenciálního oleje¹⁵. Z toho plyne, že linalool má v silicích z levandule vysokou antimikrobiální aktivitu a při porovnání námi získaného esenciálního oleje SD a HD vysvětluje, proč oleje měly rozdílné antimikrobiální účinky na většinu testovaných mikroorganismů a také vysvětluje větší inhibiční účinek esenciálního oleje získaného HD, kde je procento linaloolu vyšší.

ZÁVĚR

Výtěžnost esenciálního oleje závisí na typu zvolené destilační techniky. Vyšší výtěžek esenciálního oleje z levandule byl získán parní destilací. Současně je na zvolené destilační technice závislé i složení esenciálního oleje. Více látek bylo identifikováno v esenciálním oleji z parní destilace. Vyšší antimikrobiální aktivitu proti testovaným bakteriím a kvasince obecně vykazoval esenciální olej získaný hydrodestilací. Ani jeden esenciální olej nepůsobil na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* a na *Enterococcus faecalis* a *Candida albicans* působily oba esenciální oleje identicky. Nejvíce senzitivní byl *Staphylococcus aureus*. Závěrem lze říci, že pravděpodobně by pro extrakci esenciálního oleje z hlediska antimikrobiální aktivity byla vhodnější hydrodestilace, neboť poskytla lepší výsledky. Naopak z hlediska výtěžnosti a počtu identifikovaných látek v esenciálním oleji z levandule by byla o něco vhodnější parní destilace.

LITERATURA

1. Djemaa F.G.B., Bellassoued K., Zouari S., El Feki A., Ammar E.: J. Tissue Viability 25, 193 (2016).
2. Mori H.-M., Kawanami H., Kawahata H., Aoki M.: BMC Complem. Altern. M. 16, 144 (2016).
3. Franco L., Blanck T.J.J., Dugan K., Kline R., Shanmugam G., Galotti A., Granell A.V., Wajda M.: J. Clin. Anesth. 33, 243 (2016).
4. Kim N.-S., Lee D.-S.: J. Chromatogr. A 982, 31 (2002).
5. Méndez-Tovar I., Herrero B., Pérez-Magariño S., Pereira J.A., Asensio-S-Manzanera M.C.: J. Food Drug Anal. 23, 225 (2015).
6. Zheljaskov V.D., Cantrell C.L., Astatkie T., Jeliaskova E.: J. Oleo Sci. 62, 195 (2013).
7. Filly A., Fabiano-Tixier A.S., Louis C., Fernandez X., Chemat F.: C. R. Chim. 19, 707 (2016).
8. Danh L.T., Triet N.D.A., Zhao J., Mammucari R., Foster N.: Food Bioprocess Tech. 6, 3481 (2013).
9. *Percent Yield Guide For Essential Oil Distillation*.
Dostupné z: <https://www.essentialoil.com/pages/percentage-yield>.
10. Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G., Visinoni F.: Anal. Chim. Acta 555, 157 (2006).
11. Jianu C., Pop G., Gruia A.T., Horhat F.G.: Int. J. Agric. Biol 15, 772 (2013).
12. Patel S.: Food Addit. Contam. A 32, 1049 (2015).
13. An M., Haig T., Hatfield P.: J. Chromatogr. A 917, 245 (2001).
14. Stanojević L., Stanković M., Cakić M., Nikolić V., Nikolić L., Ilić D., Radulović N.: Hem. Ind. 65, 455 (2011).
15. Herman A., Tambor K., Herman A.: Curr. Microbiol. 72, 165 (2016).