

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza silic kořene chrpovníku lopuchového
Diplomová práce

2020

Tereza Příbylová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Příbylová**
Osobní číslo: **C18557**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Téma práce: **Analýza silic kořene chrpovníku lopuchového**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na chrpovník lopuchový, zaměřte se hlavně na jeho vlastnosti, využití a obsahové látky.
2. V experimentální části proveďte pomocí vhodné metody izolaci těkavých látek, které poté analyzujte pomocí plynové chromatografie. Pokuste se o identifikaci co největšího počtu složek.
3. Dosažené výsledky zhodnoťte.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2020

Tereza Příbylová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D., za pomoc, vstřícnost a věcné připomínky, které mi poskytoval v průběhu práce. Poděkování patří také mojí rodině za podporu během celého studia.

ANOTACE

Náplní diplomové práce je analýza silic kořene chrpovníku lopuchového. Teoretická část je zaměřena na chrpovník lopuchový, zejména na jeho výskyt, vlastnosti, využití a chemické složení. Další část práce je věnována kapitolám o esenciálních olejích a metodách izolace a analýzy těkavých složek.

V experimentální části diplomové práce byla provedena izolace těkavých látek z kořene chrpovníku lopuchového pomocí vybraných metod, konkrétně se jednalo o hydrodestilaci a mikroextrakci tuhou fází. Vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS) a plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC/FID). Na základě výsledků měření analýz byla provedena identifikace a stanovení relativního zastoupení jednotlivých složek.

KLÍČOVÁ SLOVA

Chrpovník lopuchový, hydrodestilace, mikroextrakce tuhou fází, esenciální olej, plynová chromatografie.

TITLE

Analysis of volatile compounds of *Saussurea costus*

ANNOTATION

The content of the thesis is the analysis of volatile compounds of *Saussurea costus*. The theoretical part is focused on *Saussurea costus*, especially on its occurrence, properties, use, and chemical composition. The next section of the theoretical part is devoted to chapters not only about essential oils but also about the methods of isolation and the analysis of volatile compounds.

In the experimental part of the thesis, the isolation of volatile compounds from the root of *Saussurea costus* was conducted. The volatile compounds were isolated by selected methods, specifically by hydrodistillation and solid-phase microextraction. The samples were analysed by gas chromatography with mass spectrometry detection (GC/MS), and by gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID). Based on the results of measurement, the identification was accomplished and the relative amounts of the individual components were determined.

KEYWORDS

Saussurea costus, hydrodistillation, solid-phase microextraction, essential oil, gas chromatography.

OBSAH

OBSAH.....	8
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	11
SEZNAM TABULEK A PŘÍLOH.....	12
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	13
ÚVOD.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1.1 CHRPOVNÍK LOPUCHOVÝ.....	16
1.1.1 Výskyt.....	16
1.1.2 Vlastnosti.....	17
1.1.3 Tradiční využití.....	18
1.1.4 Chemické složení.....	18
1.1.5 Farmakologické účinky.....	19
1.1.5.1 Antibakteriální účinky.....	20
1.1.5.2 Protizánětlivé účinky.....	20
1.1.5.3 Protirakovinné účinky.....	21
1.1.5.4 Účinky proti vředům.....	21
1.2 ESENCIÁLNÍ OLEJE.....	22
1.2.1 Využití esenciálních olejů.....	22
1.2.2 Chemické složení esenciálních olejů.....	23
1.2.2.1 Terpeny.....	23
1.2.2.2 Aromatické sloučeniny.....	26
1.2.3 Změny ve složení esenciálních olejů.....	26
1.3 METODY IZOLACE TĚKAVÝCH LÁTEK.....	28
1.3.1 Destilační metody.....	28
1.3.1.1 Hydrodestilace.....	29
1.3.1.2 Destilace s vodní parou.....	30
1.3.1.3 Hydrodestilace s mikrovlnným ohřevem.....	30
1.3.2 Extrakční metody.....	31
1.3.2.1 Extrakce nadkritickou tekutinou.....	31
1.3.2.2 Mikroextrakce tuhou fází.....	33
1.3.2.2.1 Průběh mikroextrakce tuhou fází.....	33
1.3.2.2.2 Výhody, nevýhody a využití mikroextrakce tuhou fází.....	34
1.3.2.2.3 Faktory ovlivňující mikroextrakci tuhou fází.....	34
1.3.2.3 Headspace analýza.....	35

1.4 METODY ANALÝZY TĚKAVÝCH LÁTEK	36
1.4.1 Plynová chromatografie	36
1.4.1.1 Hlavní části plynového chromatografu	36
1.4.1.2 Způsoby detekce u plynového chromatografu	37
1.4.2 Hmotnostní spektrometrie.....	38
1.4.2.1 Hlavní části hmotnostního spektrometru.....	38
1.4.2.2 Způsoby ionizace vzorku u hmotnostní spektrometrie.....	39
1.4.3 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie	39
1.4.3.1 Identifikace sloučenin.....	39
1.4.3.1.1 Retenční indexy	40
1.4.3.1.2 Knihovny hmotnostních spekter	40
1.4.4 Návrh a analýza experimentu	41
1.4.4.1 Metoda odezvové plochy.....	41
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
2.1 Vzorek a jeho příprava k analýze	44
2.2 Použité chemikálie.....	44
2.3 Použité přístroje a pomůcky	44
2.4 Postup a podmínky provedení hydrodestilace	45
2.5 Mikroextrakce tuhou fází.....	46
2.6 Plynová chromatografie.....	46
2.6.1 Příprava vzorků k analýze	46
2.6.2 Podmínky analýzy plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.....	46
2.6.3 Podmínky analýzy plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem	47
2.7 Vyhodnocení dat z chromatogramů.....	47
3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	49
3.1 Mikroextrakce tuhou fází.....	49
3.1.1 Výběr vhodného SPME vlákna	49
3.1.2 Experimentální optimalizace podmínek HS-SPME	50
3.2 Analýza vzorku	52
3.2.1 Analýza esenciálního oleje	52
3.2.2 Analýza těkavých složek po mikroextrakci tuhou fází.....	53
3.3 Porovnání výsledků analýz	56
3.3.1 Porovnání majoritních složek z obou způsobů úpravy vzorku.....	56
3.3.2 Porovnání zastoupení složek z hlediska skupin látek.....	57

3.3.3 Porovnání naměřených výsledků s literaturou	58
ZÁVĚR	60
POUŽITÁ LITERATURA	62
PŘÍLOHY	68

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Mapa Indie s nejhojnějším výskytem chrpovníku lopuchového	16
Obrázek 2: Chrpovník lopuchový	17
Obrázek 3: Kořen chrpovníku lopuchového	17
Obrázek 4: Struktura izoprenu	23
Obrázek 5: Monocyklické monoterpeny: limonen, α -terpinen, thymol	24
Obrázek 6: Bicyklické monoterpeny: α -thujon, α -pinen a β -pinen.....	24
Obrázek 7: Acyklické monoterpeny: myrcen, linalool a citronellal	24
Obrázek 8: Seskviterpeny: nerolidol a α -humulen.....	25
Obrázek 9: Seskviterpenové laktony: costunolid a dehydrocostus lakton	25
Obrázek 10: Aromatická sloučenina: estragol	26
Obrázek 11: Schéma hydrodestilace	30
Obrázek 12: Schéma hydrodestilace s mikrovlnným ohřevem.....	31
Obrázek 13: Schéma extrakce nadkritickou tekutinou.....	32
Obrázek 14: Schéma mikroextrakce tuhou fází.....	34
Obrázek 15: Centrálně kompozitní plán.....	41
Obrázek 16: Metoda odezvové plochy–příklad grafického znázornění modelu polynomu druhého stupně.....	42
Obrázek 17: Aparatura pro hydrodestilaci	45
Obrázek 18: Závislost počtu píků na čase a teplotě HS-SPME	52

SEZNAM TABULEK A PŘÍLOH

Tabulka 1: Příklady stacionárních fází SPME a jejich použití.....	33
Tabulka 2: Retenční časy n-alkanů a jejich retenční indexy	48
Tabulka 3: Výsledky analýz při testování tří vláken pro SPME	50
Tabulka 4: Návrh optimalizace a její výsledky v podobě počtu píků a plochy celkového signálu chromatogramu při použití vlákna 50/30 μm DVB/CAR/PDMS.....	50
Tabulka 5: Předpokládaný počet píků na základě výpočtu při teplotě 85 $^{\circ}\text{C}$	51
Tabulka 6: Identifikované sloučeniny v kořeni chrpovníku lopuchového po úpravě hydrodestilací (HD) a mikroextrakcí tuhou fází z parního prostoru (HS-SPME) a jejich relativní procentuální zastoupení (n=2)	54
Tabulka 7: Porovnání nejvíce zastoupených složek v závislosti na použité metodě úpravy vzorku před analýzou, HD...hydrodestilace, HS-SPME...mikroextrakce tuhou fází z parního prostoru	57
Tabulka 8: Porovnání skupin látek ve vzorku po hydrodestilaci (HD) a po mikroextrakci tuhou fází z parního prostoru (HS-SPME).....	58
Příloha 1: Chromatogram z GC/FID esenciálního oleje chrpovníku lopuchového po provedení hydrodestilace	68
Příloha 2: Chromatogram z GC/FID esenciálního oleje chrpovníku lopuchového po provedení hydrodestilace s přiblížením oblasti retenčního času 46–60 minut	68
Příloha 3: Chromatogram z GC/FID chrpovníku lopuchového po provedení mikroextrakce tuhou fází z parního prostoru	69
Příloha 4: Chromatogram z GC/FID chrpovníku lopuchového po provedení mikroextrakce tuhou fází z parního prostoru s přiblížením oblasti retenčního času 46–60 minut.....	69

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CAR	Carboxen
CAS	Registrační číslo látky (z angl. Chemical Abstracts Service)
CCD	Centrálně kompozitní plánování (z angl. Central Composite Design)
CI	Chemická ionizace (z angl. Chemical Ionization)
DI-SPME	Mikroextrakci tuhou fází s přímým ponořením vlákna (z angl. Direct Immersion Solid-Phase Microextraction)
DMAPP	Dimethylallyldifosfát (z angl. Dimethylallyl Diphosphate)
DVB	Divinylbenzen
ECD	Detektor elektronového záchytu (z angl. Electron Capture Detector)
EI	Elektronová ionizace (z angl. Electron Ionization)
EO	Esenciální olej
FID	Plamenový ionizační detektor (z angl. Flame Ionization Detector)
GC	Plynová chromatografie (z angl. Gas Chromatography)
GC/FID	Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (z angl. Gas Chromatography/ Flame Ionization Detector)
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (z angl. Gas Chromatography/Mass Spectrometry)
HD	Hydrodestilace (z angl. Hydrodistillation)
HS	Headspace
HS-SPME	Mikroextrakce tuhou fází v headspace provedení (z angl. Headspace Solid-Phase Microextraction)
IL-8	Interleukin 8
IPP	Isopentenylidifostát (z angl. Isopentenyl Diphosphate)
IUCN	Mezinárodní svaz ochrany přírody (z angl. International Union for Conservation of Nature)

MAHD	Hydrodestilace s mikrovlnným ohřevem (z angl. Microwave-Assisted Hydrodistillation)
MEP	Methylerythritolfosfát (z angl. Methylerythritol Phosphate)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace (z angl. Minimal Inhibitory Concentration)
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
MVA	Kyselina mevalonová (z angl. Mevalonic Acid)
m/z	Poměr hmotnosti a náboje
NIST	Národní institut standardů a technologie (z angl. National Institute of Standards and Technology)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PP	Počet píků
RI	Retenční index
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
RSM	Metoda odezvové plochy (z angl. Response Surface Methodology)
SD	Parní destilace (z angl. Steam Distillation)
SFE	Extrakce nadkritickou tekutinou (z angl. Supercritical Fluid Extraction)
SPME	Mikroextrakce tuhou fází (z angl. Solid-Phase Microextraction)
TCD	Tepelně vodivostní detektor (z angl. Thermal Conductivity Detector)
TČM	Tradiční čínská medicína
TIC	Celkový iontový proud (z angl. Total Ion Current)
TNF- α	Faktor nádorové nekrózy α (z angl. Tumor Necrosis Factor α)

ÚVOD

Chrpovník lopuchový je léčivá rostlina původem z vysokohorských oblastí Indie a Pákistánu, která se již od pradávna používá v tradičních systémech léčení v různých zemích Asie, zejména v Indii a Číně. Nachází zde uplatnění díky svým antibakteriálním a protizánětlivým účinkům, a to např. při kašli, astmatu a jiných plicních obtížích, potížích s trávením a nechutenstvím. Nejdůležitější částí této rostliny je kořen hnědé barvy s typickou silnou aromatickou vůní. Kořen chrpovníku lopuchového se velmi často zpracovává za vzniku esenciálního oleje. Esenciální oleje jsou těkavé aromatické složky přirozeně produkované téměř všemi částmi rostlinného materiálu, jako jsou květy, plody, listy, kořeny, kůra atd. Bývají využívány v mnoha odvětvích, např. při léčebných účelech, aromaterapii, aromatizaci potravin a nápojů nebo v kosmetice jako přísada do parfémů, mýdel apod. Z rostlinného materiálu jsou esenciální oleje nejčastěji získávány pomocí destilačních metod, případně lisováním u citrusových plodů. Vzniká tak velmi koncentrovaný, většinou malý objem esenciálního oleje. Při výrobě esenciálních olejů je kladen důraz zejména na jejich kvalitu a výnosnost.

Těkavé sloučeniny jsou z rostlinného materiálu izolovány obvykle pomocí destilačních nebo extrakčních technik. Nejvíce využívané metody izolace jsou hydrodestilace a destilace vodní parou, a to jak v laboratorních podmínkách, tak v průmyslu. Jedná se o levné, ale časově náročné metody izolace, při kterých vzniká esenciální olej. Využívá se při nich vroucí voda nebo vodní pára, a může tedy docházet k hydrolýze a dalším nežádoucím reakcím. Dalšími možnostmi extrakce těkavých sloučenin z rostlinného materiálu jsou např. mikroextrakce tuhou fází a extrakce nadkritickou tekutinou. Mikroextrakce tuhou fází je jednoduchá metoda, při které se používá pouze malé množství vzorku a minimální nebo žádné množství rozpouštědel.

Cílem diplomové práce byla identifikace co největšího počtu těkavých složek z kořene chrpovníku lopuchového a stanovení jejich relativního zastoupení. Izolace byla provedena s použitím vhodných metod, konkrétně pomocí hydrodestilace, při které vznikal esenciální olej, a mikroextrakce tuhou fází z parního prostoru. K analýze vzorku kořene chrpovníku lopuchového byla použita plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 CHRPOVNÍK LOPUCHOVÝ

1.1.1 Výskyt

Chrpovník lopuchový (*Saussurea costus*) je rostlina z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). Běžně se lze setkat s jeho označením jako *Saussurea lappa*, v Indii bývá také známý pod různými lidovými názvy, nejčastěji jako Kuth, Kustha, Kot či Kostum. Mezi zástupce této čeledi se řadí přibližně 1 000 rodů a přes 30 000 druhů, které jsou rozšířené téměř po celém světě. Do rodu *Saussurea* náleží asi 300 druhů, z nichž značná část se vyskytuje v Indii. Uvádí se, že chrpovník lopuchový se vyskytuje pouze v určitých oblastech Indie, a to ve vysokohorských položených státech Džammú a Kašmír, Himáčalpradéš a Uttarákhand (Obrázek 1). Na těchto územích se nadmořská výška pohybuje v rozmezí 3 200–3 800 m n. m. (leží v oblasti pohoří Himaláje) a chrpovník zde roste na vlhkých svazích vysokohorských lesů a pastvin [1].

Kromě svého přirozeného výskytu v severozápadní Indii a severovýchodním Pákistánu je chrpovník lopuchový hojně pěstován také v Číně a Nepálu. Jelikož se z něj využívají zejména kořeny, je během sběru celá rostlina vykořeněna. Vzhledem k vysoké poptávce pro různé komerční i léčivé účely a nešetrné sklizni nedochází k jeho přirozené regeneraci a velmi rychle klesá výskyt v jeho přirozeném prostředí [2]. Dle Mezinárodního svazu ochrany přírody, (IUCN, z angl. International Union for Conservation of Nature) [3] je od roku 2014 chrpovník lopuchový zařazen mezi kriticky ohrožené druhy.



Obrázek 1: Mapa Indie s nejhojnějším výskytem chrpovníku lopuchového: 1. Džammú a Kašmír, 2. Himáčalpradéš, 3. Uttarákhand [1]

1.1.2 Vlastnosti

Chrpovník lopuchový (Obrázek 2) je vytrvalá, robustní bylina s pevnou a vzpřímenou lodyhou dorůstající se výšky 1–2 m. Listy jsou laločnaté, poměrně tenké, nepravidelného tvaru, na vrcholu špičaté. Spodní listy mají větší velikost, která se směrem vzhůru zmenšuje. Na konci lodyhy vyrůstají buď samostatně nebo často v uskupeních po 2–5 kulovité květy. Jejich průměr je zhruba 2,5–4 cm a mají modrofialovou, tmavě fialovou nebo až téměř černou barvu [1], [4].



Obrázek 2: Chrpovník lopuchový [3]

Z hlediska využití je nejdůležitější částí rostliny její kořen, který je znázorněný na Obrázku 3. Kořen se může dorůstat délky až 40 cm, průměrně je dlouhý 8–12 cm, jeho šířka je zhruba 1–3 cm. Je poměrně tvrdý, má šedou, nahnědlou nebo až tmavě hnědou barvu. Jeho charakteristickým znakem je specifické silné aroma [4], [5].



Obrázek 3: Kořen chrpovníku lopuchového [6]

Kořen chrpovníku lopuchového je využíván k získávání esenciálního oleje, který má stejně jako kořen velmi výraznou, specifickou vůni. Tento olej má obvykle světle či sytě žlutou, někdy až nahnědlou barvu a je využíván např. k přípravě vlasových olejů nebo jako přísada při výrobě kvalitních parfémů [7].

1.1.3 Tradiční využití

Chrpovník lopuchový je léčivá rostlina, která tradičně nachází své využití zejména v domorodých léčitelstvích v Indii, Číně, Tibetu a Koreji [1]. V těchto tradičních systémech jsou jeho účinky známy a využívány již asi 2 500 let [8].

V systémech indické medicíny (tzv. Ájurvéda, Siddha a Unani) se využívají jeho kořeny, a to buď samostatně nebo v kombinaci s jinými léčivy. Použití zde nachází hlavně jako lék proti křečím u astmatu a kašle, dále také při léčbě cholery, revmatismu a chronických kožních onemocnění [9]. Kromě již výše zmíněného se uvádí tradiční využití v Indii jako afrodiziakum, antiseptikum, stimulační diuretikum a přídavek do parfémů [10].

Tradiční čínská medicína (TČM) léčebná metoda, která se vyvíjela po tisíce let a využívá se při ní různých metod k řešení zdravotních komplikací. Mezi tyto metody se řadí např. akupunktura, cvičení tai chi nebo právě již zmíněné využívání různých bylinných produktů [11]. Chrpovník lopuchový je obsažen v mnoha přípravcích TČM. Má v nich své využití např. při plicních obtížích, nepravidelné menstruaci, potížích s polykáním a při pocitu plnosti břicha [10].

1.1.4 Chemické složení

V kořenu chrpovníku lopuchového se vyskytuje celá řada těkavých sloučenin, mnohé z nich jsou významné pro své biologicky aktivní účinky. Z velké části bývá stanovení těchto látek prováděno po úpravě vzorku na esenciální olej. Je také možné analyzovat např. hexanový extrakt nebo přímo čerstvý kořen bez předchozí úpravy [4].

V následujícím textu jsou shrnuty informace z několika publikací zabývajících se analýzou chemického složení EO z chrpovníku, ze kterých je patrné, že převážná část složení je tvořena látkami ze skupin alkoholů, uhlovodíků, aldehydů a ketonů [12], [13].

Studie [12] zkoumala těkavé aromatické složky v esenciálním oleji získaném z kořene chrpovníku lopuchového. Jednalo se o dva vzorky, jeden byl původem z Koreje a druhý z Číny. Usušené kořeny byly zpracovány 3 hodiny trvající hydrodestilací a získaný EO byl analyzován pomocí plynové chromatografie s detekcí hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Ve vzorku z Koreje bylo stanoveno celkově 63 sloučenin tvořících 87,5 % celkové plochy chromatogramu. Tento olej obsahoval 26 uhlovodíků (zejména se jednalo o seskviterpeny a monoterpeny), 13 alkoholů, 11 ketonů, 4 aldehydy, 3 estery, 1 oxid a 1 karboxylovou kyselinu. Nejvíce zastoupenou těkavou sloučeninou byl cis,cis,cis-hexadeka-7,10,13-trienal (21,2 %), olej dále obsahoval dehydrocostus lakton (10,3 %), valerenol (5,3 %), vulgarol B (5,1 %), β -eudesmol (4,6 %) a β -elemen (4,1 %).

U vzorku původem v Číně bylo ve stejné studii [12] stanoveno celkem 46 složek, které tvořily 65,7 % celkové plochy chromatogramu. Jednalo se o 24 uhlovodíků, 7 alkoholů, 10 ketonů, 1 aldehyd, 2 estery, 1 oxid a 1 karboxylovou kyselinu. Ve vzorku EO opět dominovalo množství aldehydu cis,cis,cis-hexadeka-7,10,13-trienalu (23,3 %). Vzorek dále významně obsahoval dehydrocostus lakton (11 %), α -curcumen (4,9 %), β -elemen (4,7 %) a valerenol (4,2 %).

Studie [13] se zabývá těkavými složkami z kořene chrpovníku lopuchového, jehož původ je v Indii. Kořen byl usušen na vzduchu, rozemlet na prášek a zpracován hydrodestilací, která trvala 6 hodin. Následně byl esenciální olej vzniklý hydrodestilací analyzován pomocí GC/MS. Bylo identifikováno celkem 41 sloučenin (z toho 6 ve stopových koncentracích), které tvořily přibližně 93 % z celkového složení oleje. Hlavním zástupcem aldehydů, který byl identifikován, je stejně jako ve studii [12] cis,cis,cis-hexadeka-7,10,13-trienal (25,5 %). Druhou nejvíce zastoupenou složkou byl seskviterpenový lakton dehydrocostus lakton (16,7 %). Z alkoholů byly nejvíce zastoupeny sloučeniny elemol (5,8 %), valerenol (4,2 %), vulgarol B (3,1 %), γ -costol (1,8 %) a terpinen-4-ol (1,6 %). Mimo tyto látky byly zastoupeny další alkoholy a uhlovodíky, jako jsou např. β -elemen (2,1 %) a (E)- β -ocimen (2,3 %). Estery a kyseliny identifikovány nebyly.

1.1.5 Farmakologické účinky

Byly provedeny studie, které zkoumaly farmakologické účinky chrpovníku lopuchového pomocí vhodných *in vitro* a *in vivo* testů. Výtažky z něj dle těchto studií vykazují mnohé farmakologické aktivity, např. protizánětlivé, protirakovinné, antibakteriální, imunomodulační,

angiogenezní, hepatoprotektivní, proti vředům, antikonvulzivní (při léčbě a prevenci epileptických záchvatů), antivirové, a další [1], [8]. Velká část těchto účinků chrpovníku lopuchového je způsobena přítomností seskviterpenových laktonů, a to zejména dehydrocostus laktonu, costunolidu a cynaropicrinu [1].

1.1.5.1 Antibakteriální účinky

Studie [14] zkoumala *in vitro* antibakteriální aktivitu ethanolových extraktů z 30 bylin používaných v TČM, včetně chrpovníku lopuchového. Jako testovací patogen byl použit jeden standardní a pět klinických kmenů *Helicobacter pylori*. Tato bakterie se může podílet na vzniku žaludečních vředů, chronické gastritidy až žaludečního karcinomu. Minimální inhibiční koncentrace (MIC, z angl. minimal inhibitory concentration) byla stanovena pomocí agarové diluční metody na Columbia agaru. MIC se v mikrobiologii označuje nejnížší koncentrace účinné látky, která viditelně inhibuje růst mikroorganismu po inkubaci. Chrpovník lopuchový vykazoval společně s dalšími dvěma rostlinnými extrakty nejnížší MIC proti všem šesti testovaným kmenům, která odpovídala 40 µg/ml. Tato studie rovněž naznačuje, že antibakteriální aktivita extraktů těchto bylin je způsobena zejména přítomností obsažených těkavých látek.

1.1.5.2 Protizánětlivé účinky

Studie [15] uvádí časté použití chrpovníku lopuchového v tradiční korejské medicíně při zánětlivých onemocněních. V této studii se zabývají inhibičními účinky 59 orientálních bylin na indukci interleukinu 8 (IL-8), což je peptid, který aktivuje neutrofile s chemotaktickým účinkem. Podílí se v patofyziologii u několika zánětlivých onemocnění, jako jsou např. revmatoidní artritida, plicní fibróza nebo lupénka. V uvedené studii byl použit methanolový extrakt z kořene chrpovníku lopuchového o koncentraci 0,1 mg/mg. 9 zkoumaných extraktů z celkových 59, včetně extraktu z chrpovníku lopuchového, vykazovalo více než 50% inhibici indukce IL-8.

V další studii popisující protizánětlivé účinky byly zkoumány *in vitro* účinky cynaropicrinu, což je seskviterpenový lakton vyskytující se v chrpovníku lopuchovém. Sledovaly se jeho účinky na faktor nádorové nekrózy α (TNF- α , z angl. tumor necrosis factor α), uvolňování oxidu dusnatého (NO) a proliferaci lymfocytů. Cynaropicrin silně

inhiboval uvolnění TNF- α a hromadění NO. Výsledky tedy ukázaly, že tato látka se účastní zánětlivé reakce pomocí inhibice produkce zánětlivých mediátorů a proliferace lymfocytů [16].

1.1.5.3 Protirakovinné účinky

Studie [1], [8] shrnují práce zabývající se protirakovinnými účinky chrpovníku lopuchového. Výčet zahrnuje např. testování působení na lidské leukemické buňky, buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic, buněčné linie rakoviny žaludku, karcinom prostaty, karcinom žaludku atd.

Účinky na zastavení růstu buněk a apoptózu (programovanou buněčnou smrt) v buňkách rakoviny žaludku se zabývala studie [17]. Jsou v ní zkoumány cytostatické účinky ethanolového extraktu z kořene chrpovníku lopuchového za použití žaludečních rakovinných buněk. Použití extraktu vedlo k apoptóze a zástavě buněčného cyklu v závislosti na použité dávce a délce působení. Tyto účinky jsou připisovány regulaci cyklinů a proapoptických molekul, a také potlačení antiapoptotických molekul. Výsledky této studie naznačují, že extrakty by mohly být kandidáty na léčbu rakoviny žaludku buď tradiční bylinnou terapií nebo kombinací s konvenční chemoterapií.

Ve studii [18] uvádí účinky costunolidu na indukci apoptózy a jeho předpokládané způsoby působení v lidských leukemických buňkách. Jedná se o účinnou látku izolovanou z kořene chrpovníku lopuchového. Posuzování probíhalo na základě analýzy apoptózy, měření reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) a posouzení mitochondriálních membránových potenciálů. Výsledky popisují mechanismus protirakovinného působení costunolidu. Jedná se o silný induktor apoptózy, generuje ROS, čímž vyvolá přechod mitochondriální propustnosti a uvolňování cytochromu C do cytosolu, který následně vede k nástupu apoptózy.

1.1.5.4 Účinky proti vředům

Studie [19] se zabývá protivředovou aktivitou ethylacetátového extraktu z kořene chrpovníku lopuchového pomocí sledování žaludeční a duodenální ulcerace u potkanů. Výsledky naznačují, že působení extraktu má významné účinky proti vředům, které mohou být způsobeny buď ochranným působením na buňky nebo posílením žaludeční a duodenální sliznice, která zesílí svoji ochrannou mukózní vrstvu.

1.2 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Esenciální oleje (EO) bývají běžně označovány také jako éterické, těkavé nebo aromatické oleje, silice či esence. Jsou charakterizovány jako těkavé, přírodní, komplexní sloučeniny vyznačující se silným specifickým zápachem, chutí nebo vůní. Jsou syntetizované rostlinami jako jejich sekundární metabolity v cytoplazmě a plastidech. Mohou být syntetizovány všemi částmi rostliny, tzn. jejími pupeny, květy, listy, stonky, větvemi, semeny, plody, kořeny a dřevem nebo kůrou. V rostlinách jsou uloženy v sekrečních buňkách, kanálech a dutinách nebo ve žláznatých trichomech [20].

Z rostlin jsou esenciální oleje izolovány pomocí metod založených na různých fyzikálních a chemických vlastnostech (např. lisováním, destilací či extrakcí). Výtěžnost EO ovlivňuje celá řada agronomických vlivů. Patří mezi ně vlhkost, vítr, déšť a teplota. Další faktor, který ovlivňuje jak množství, tak kvalitu oleje je proces sklizně [21]. Mimo již uvedené je také důležitý vliv podnebí, typ půdy, stres způsobený hmyzem a mikroorganismy a pěstitelské postupy [22].

Chemické složení vydestilovaného EO nemusí být stejné jako složení v olejových buňkách rostlinného materiálu. Tyto odlišnosti mohou být způsobeny kontaktem s vroucí vodou či párou, při kterém dochází k chemickým změnám. Může se jednat o produkty enzymatického štěpení nebo chemické degradace vysokomolekulárních netěkavých sloučenin přítomných v rostlinách [22].

1.2.1 Využití esenciálních olejů

EO jsou již od pradávna uznávané pro svoji léčivou hodnotu. Byly užívány např. v dřívější Mezopotámii, Číně, Indii, Persii či starověkém Egyptě. V současné době se používají zejména jako přísady do kosmetiky a parfémů, k ochucování a aromatizaci potravin a nápojů, při aromaterapii nebo k již zmiňovaným léčebným účelům. Nejčastěji se jedná o EO levandule, máty peprné, růže, eukalyptu, pelargónie, santalového dřeva a heřmánku [23].

Uvádí se také důležitá role těchto látek při ochraně rostlin pomocí antibakteriálních, antimykotických a insekticidních vlastností. EO mohou pomáhat rostlinám odrazovat nežádoucí hmyz a škůdce nebo naopak přitahovat užitečný hmyz, který rostlina potřebuje k opylení [20].

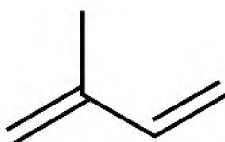
1.2.2 Chemické složení esenciálních olejů

Jedná se o velmi komplexní směsi přírodních látek, které většinou obsahují zhruba 20–60 složek v různých koncentracích. Vyznačují se dvěma nebo třemi hlavními složkami, které jsou typické pro danou rostlinu a obvykle jsou přítomné v poměrně vysokých koncentracích (20–70 %). Tyto majoritní složky určují biologické vlastnosti EO. Ostatní komponenty jsou oproti nim přítomné v nižších, mnohdy až stopových množstvích [24].

Hlavní skupinu složek zastoupených v EO tvoří uhlovodíky terpeny a terpenoidy. Druhou početnou složkou jsou ostatní aromatické a alifatické sloučeniny, mezi které se řadí alkoholy, kyseliny, aldehydy a ketony, estery, ethery atd. Všechny tyto složky jsou charakteristické svojí nízkou molekulovou hmotností [24].

1.2.2.1 Terpeny

Terpeny jsou přírodní uhlovodíky složené z několika jednotek izoprenu (Obrázek 4). Izopren má 5 uhlíků a jeho triviální označení je 2-methylbuta-1,3-dien. Terpenoidy jsou deriváty původních terpenů. Jsou biochemicky modifikované pomocí enzymů a liší se přítomností další molekuly kyslíku a změnou polohy či odstraněním methylové skupiny [24]. Terpeny se dělí do 6 tříd podle počtu uhlíků. Jsou to hemiterpeny (C_5), monoterpeny (C_{10}), seskviterpeny (C_{15}), diterpeny (C_{20}), triterpeny (C_{30}) a tetraterpeny (C_{40}) [20].



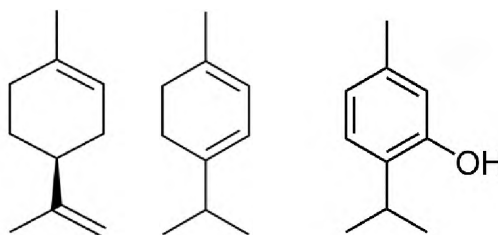
Obrázek 4: Struktura izoprenu

Při biosyntéze terpenů jsou výchozími látkami pro syntézu isopentenylpyrofosfát (IPP) a jeho izomer dimethylallylpyrofosfát (DMAPP). Tyto prekurzory vznikají buď mevalonovou cestou, která je odvozena od kyseliny mevalonové (MVA) a probíhá v cytosolu buněk. Druhou možností vzniku prekurzorů je methylerythritolpyrofosfátová (MEP) cesta probíhající v buněčných plastidech. V rostlinách lze najít obě tyto cesty. Triterpeny jsou produkovány MVA cestou, zatímco hemiterpeny, monoterpeny a diterpeny jsou produkovány cestou MEP [25], [26].

Hemiterpeny obsahují jednu izoprenovou jednotku (C_5) a v přírodě se vyskytují pouze ojedinele [26].

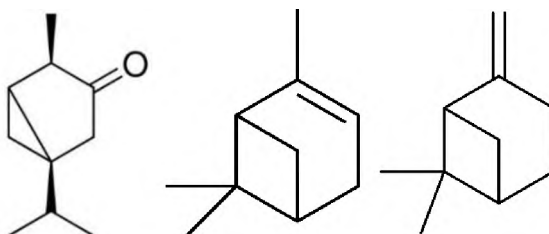
Monoterpeny jsou tvořeny spojením dvou izoprenových jednotek (C₁₀). Mají největší zastoupení v EO, tvoří asi 90 % z celkového množství. Existují ve velkém množství strukturních podob [20]. Monoterpeny se dělí do 3 podskupin: monocyklické, bicyklické a acyklické. Vyskytují se jako jednoduché nenasycené uhlovodíky nebo s funkčními skupinami jako alkoholy, fenoly, aldehydy, ketony nebo estery [26].

Mezi monocyklické monoterpeny vyskytující se v EO z kořene chrpovníku lopuchového se řadí např. limonen, α -terpinen a thymol (Obrázek 5) [13], [26].



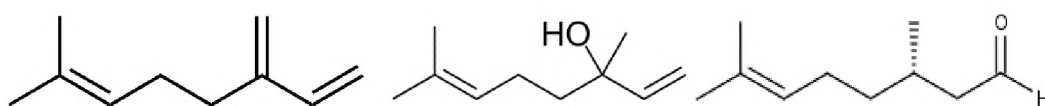
Obrázek 5: Monocyklické monoterpeny: limonen, α -terpinen, thymol

Bicyklické monoterpeny obsahují vždy jeden šestičlenný kruh a dělí se podle velikosti druhého kruhu, který je buď tříčlenný, čtyřčlenný nebo pětičlenný. Příkladem bicyklických monoterpenů vyskytujících se v EO izolovaném z chrpovníku lopuchového mohou být např. α -thujon, α -pinen a β -pinen. Jejich strukturní vzorce jsou na Obrázku 6 [13], [26].



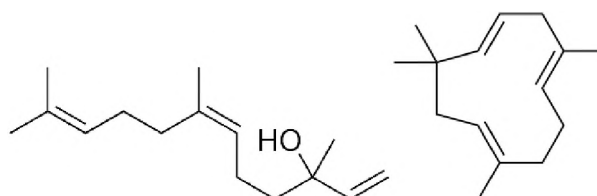
Obrázek 6: Bicyklické monoterpeny: α -thujon, α -pinen a β -pinen

Acyklické monoterpeny mají otevřený kruh a nenasycenou strukturu. Mezi zástupce acyklických monoterpenů, které se nachází v EO izolovaném z kořene chrpovníku lopuchového se může řadit např. myrcen, linalool a citronellal (Obrázek 7) [13], [26].



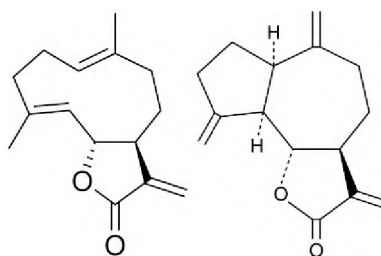
Obrázek 7: Acyklické monoterpeny: myrcen, linalool a citronellal

Seskviterpeny jsou sloučeniny odvozené ze tří jednotek izoprenu (C_{15}). Díky delšímu uhlovodíkovému řetězci se vyskytují ve velkém množství forem, které zahrnují stejně jako u monoterpenů struktury lineární, monocyklické, bicyklické a tricyklické [20], [26]. V EO z kořene chrpovníku se vyskytují např. nerolidol a α -humulen (Obrázek 8) [13], [26].



Obrázek 8: Seskviterpeny: nerolidol a α -humulen

Lze se také setkat se skupinou látek zvanou seskviterpenové laktony, které jsou chemicky odlišné díky přítomnosti γ -laktonu. Typickými zástupci v EO z kořene chrpovníku lopuchového jsou např. costunolid a dehydrocostus lakton (Obrázek 9) [13], [26].



Obrázek 9: Seskviterpenové laktony: costunolid a dehydrocostus lakton

Mezi **diterpeny** se řadí chemicky heterogenní skupina látek, která má společnou uhlíkovou kostru tvořenou ze čtyř jednotek izoprenu (C_{20}). Opět se mohou vyskytovat v různých formách jako lineární, bicyklické, tricyklické, tetracyklické, pentacyklické nebo makrocyclické diterpeny. V přírodě se tyto sloučeniny běžně vyskytují s keto a hydroxylovou skupinou a jsou také často esterifikovány malými alifatickými nebo aromatickými kyselinami [26].

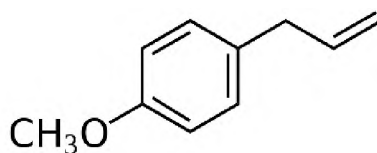
Uhlíková kostra **triterpenů** je složena z šesti izoprenových jednotek (C_{30}). Jedná se o poměrně složité cyklické struktury, většinou alkoholy, aldehydy nebo karboxylové kyseliny [26].

Tetraterpeny se skládají z osmi izoprenových jednotek (C_{40}). Nejvýznamnějšími zástupci tetraerpenů jsou karotenoidy, což jsou přírodní pigmenty rozpustné v tucích [26].

Diterpeny, triterpeny a tetraterpeny se v EO vyskytují převážně s nízkým zastoupením a v některých případech se nevyskytují vůbec [27].

1.2.2.2 Aromatické sloučeniny

Aromatické sloučeniny se v esenciálních olejích vyskytují v menší míře než terpeny. Jedná se o sloučeniny odvozené od fenylypropanu. Může se opět jednat o zástupce z řad alkoholů, aldehydů, fenolů či methoxy derivátů [20]. Z těchto sloučenin se v esenciálním oleji izolovaném z kořene chrpovníku lopuchového vyskytuje např. methoxy derivát estragol (Obrázek 10) [13], [20].



Obrázek 10: Aromatická sloučenina: estragol

1.2.3 Změny ve složení esenciálních olejů

Složení a množství jednotlivých látek obsažených v esenciálních olejích se může měnit v závislosti na různých podmínkách. Jedná se např. o klimatické podmínky a zeměpisnou polohu při růstu rostlinného materiálu, stáří rostlinného materiálu v okamžiku sklizně, techniku použitou při extrakci esenciálního oleje nebo způsob a délku skladování [28].

Vlivem doby a podmínek při skladování na složení esenciálních olejů se zabývá např. studie [28]. Byly v ní porovnávány změny ve složení těkavých složek esenciálních olejů extrahovaných ze semen koriandru setého pomocí kapilární plynové chromatografie. Z výsledků vyplývá, že klimatické podmínky způsobovaly menší změny ve složení EO než oblast růstu rostlinného materiálu. Při skladování EO ve tmě po dobu jednoho roku docházelo pouze k drobným změnám ve složení a organoleptických vlastnostech oleje. Naopak výraznější změny ve složení oleje způsobilo skladování po dobu jednoho roku za denního světla. Tyto změny mohly být způsobeny např. chemickou modifikací terpenů včetně jejich oxidací vyvolaných působením světla.

Změnami chemického složení esenciálních olejů během jejich skladování se zabývají také autoři ve studii [29]. Uvádí, že během skladování EO dochází k různým fyzikálním a chemickým reakcím. Tyto reakce vedou ke změnám ve složení, a mění se také organoleptické

a farmakologické vlastnosti těchto olejů. Změny ve složení jsou závislé na druhu esenciálního oleje, resp. rostlinného materiálu, z kterého jsou extrahovány. Může docházet ke zvýšení obsahu některých složek, ale i k jejich snížení až úplnému vymizení, resp. k jejich chemické přeměně na složky jiné.

1.3 METODY IZOLACE TĚKAVÝCH LÁTEK

V současné době se využívá několik způsobů izolace těkavých složek z přírodních materiálů. Jedná se o klasické destilační metody, při kterých vzniká esenciální olej. Mezi ně se řadí hydrodestilace a destilace s vodní parou. Dalšími využívanými metodami jsou extrakce, a to zejména extrakce nadkritickou tekutinou a mikroextrakce tuhou fází [21].

V parfémovém průmyslu se provádí extrakce za použití těkavých rozpouštědel, např. hexanu či petroletheru. Při tomto způsobu provedení extrakce je udržována stálá teplota (obvykle kolem 50 °C) v průběhu extrakce a výsledné esenciální oleje mají přirozenější vůni než esenciální oleje získané destilací, při které může docházet působením vysoké teploty k chemickým změnám [21].

Další možností získání esenciálního oleje je lisování, které se využívá pro produkci těkavých olejů z citrusových plodů (z pomerančů, citronů, grapefruitů a mandarinek). V tomto případě dochází k mechanickému narušení olejových buněk působením tlaku, které způsobí uvolnění esenciálního oleje. Za výhodu lisování se považuje to, že se provádí za normální laboratorní teploty, díky které nedochází ke změnám tepelně nestabilních složek olejů [22], [31].

V některých částech rostlinného materiálu (např. v okvětních lístcích) je přítomen pouze velmi nízký obsah těkavých sloučenin, a proto není možné využití výše uvedených způsobů izolace. V těchto případech lze použít technika zvaná enfleuráž, při které je rostlinný materiál umístěn do tuku, který absorbuje těkavé sloučeniny. Tento proces byl využíván zejména v dřívější době při výrobě parfémů [21].

Volba konkrétního procesu, kterým bude esenciální olej získán závisí na jeho citlivosti vůči působení tepla a vody, těkavosti a rozpustnosti ve vodě. Esenciální oleje s vysokou rozpustností ve vodě a citlivé k působení tepla nelze destilovat párou. K tomu, aby mohl být esenciální olej destilován pomocí páry musí být těkavý. Většina esenciálních olejů je přiměřeně stabilní vůči působení tepla a prakticky nerozpustná ve vodě, a proto jsou destilační metody vhodnými způsoby jejich izolace [21].

1.3.1 Destilační metody

Základním principem destilace je dělení směsi kapalin na základě jejich rozdílných bodů varu. Bod varu je taková teplota, při níž tenze páry nad kapalinou dosáhne okolního tlaku. Dochází

k tomu, že parní fáze je v rovnováze s fází kapalnou, ale parní fáze má odlišné složení (je obohacena o těkavější složku). Vzorek je zahříván až k bodu varu a vznikající páry kondenzují v další části destilační aparatury [32].

Destilace olejů z rostlinných materiálů zjednodušeně znamená odpařování nebo uvolňování oleje z olejových buněk v přítomnosti vlhkosti, za použití vysoké teploty a následné ochlazení směsi par a oddělení oleje od vody na základě vzájemné nemísitelnosti a rozdílné hustoty [21].

Mezi destilační metody využívající se k izolaci esenciálních olejů z rostlin patří hydrodestilace a destilace s vodní parou kde proud páry působí jako nosič EO. Modifikovanou metodou je destilace s mikrovlnným ohřevem [22].

1.3.1.1 Hydrodestilace

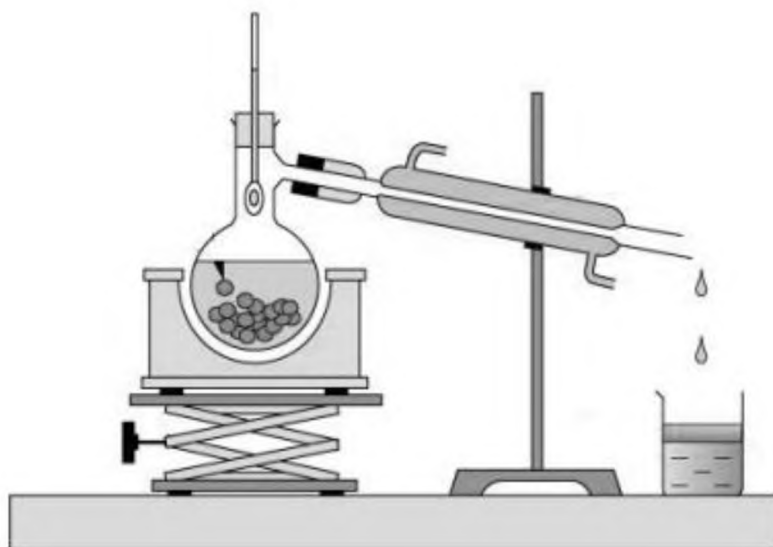
Hydrodestilace (HD, z angl. hydrodistillation) je metoda využívaná při výrobě a extrakci esenciálních olejů a bioaktivních sloučenin z rostlinného materiálu. Jedná se o nejjednodušší a také obvykle nejlevnější metodu destilace. Při hydrodestilaci se používá jednoduchá aparatura (Obrázek 11). Je vhodná i pro práškové a velmi tuhé materiály, kterými jsou např. kořeny, kůra či dřevo [33].

Při hydrodestilaci je rostlinný materiál plně ponořen do vody (popř. jiného rozpouštědla) v destilační baňce a přivádí se k varu. Během varu dochází k nasávání vody do rostlinného materiálu a olej obsažený v olejových buňkách difunduje přes buněčné stěny pomocí osmózy. Jakmile molekuly oleje přejdou z olejových buněk zpět do vody, dochází k jejich vypařování. Jsou odváděny proudem páry přes chladič, kde se navracejí do své kapalné formy. Vznikající kapalina je směsí oleje a vodné fáze (tzv. hydrolátu), a protože esenciální oleje nejsou rozpustné ve vodě, lze je snadno oddělit. Ve většině případů jsou esenciální oleje lehčí než voda a vznášejí se na povrchu [22], [33].

Hydrodestilace je mnohostranný proces, který lze využít pro velká i malá průmyslová odvětví. Doba trvání hydrodestilace závisí především na druhu zpracovávaného rostlinného materiálu. Prodloužením doby trvání hydrodestilace dochází již pouze k nepatrnému navýšení množství esenciálního oleje, ale může naopak docházet k hydrolýze, vzniku produktů oxidace a dalších nežádoucích sloučenin [30].

Důležitým faktorem při hydrodestilaci je dostatečné množství vody, které musí vystačit na celý destilační proces. V případě nedostatku vody by mohlo dojít k přehřátí až spálení

rostlinného materiálu. Esenciální olej získaný pomocí hydrodestilace má mírně tmavší barvu a lehce silnější intenzitu než oleje produkované jinými metodami. Při destilaci rostlinného materiálu ve formě prášku může docházet k jeho usazování na dně destilační baňky a k tepelné degradaci [21].



Obrázek 11: Schéma hydrodestilace [30]

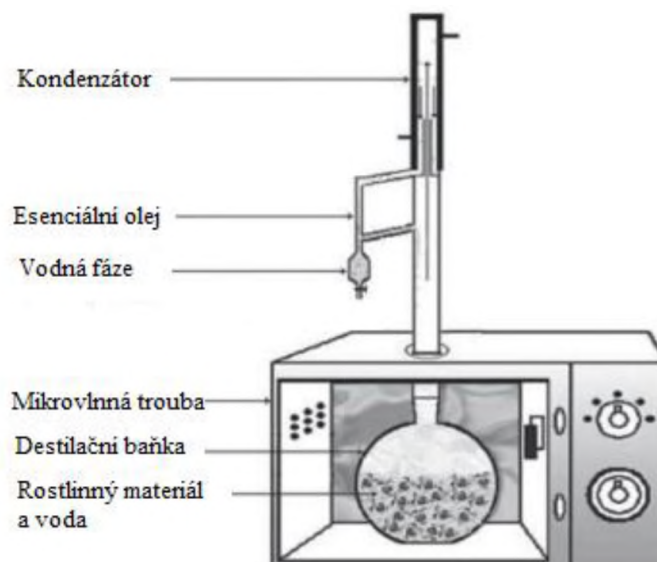
1.3.1.2 Destilace s vodní parou

Destilace s vodní parou (SD, z angl. steam distillation) je typ destilace, která se používá u termolabilních sloučenin, jako jsou přírodní aromatické sloučeniny, které se při vysokých teplotách rozkládají, a je potřeba je získat šetrnějším způsobem. Na rozdíl od hydrodestilace je rostlinný materiál vystaven pouze působení vodní páry bez přímé macerace ve vroucí vodě. Pára protéká rostlinným materiálem a funguje jako činidlo, které působí na olejové buňky a uvolňuje z nich esenciální olej. Vzniká směs páry obohacená o požadovaný esenciální olej. Tato směs stejně jako u hydrodestilace dále postupuje aparaturou, prochází přes chladič a kondenzuje. Nakonec dojde na základě nemísitelnosti k oddělení vodné fáze a oleje [30].

1.3.1.3 Hydrodestilace s mikrovlnným ohřevem

Další metodou využívanou k získávání esenciálních olejů z rostlinných materiálů je hydrodestilace s mikrovlnným ohřevem (MAHD, z angl. microwave-assisted hydrodistillation), jejíž schéma je zobrazeno na Obrázku 12. Rostlinný materiál je umístěn do destilační baňky a vystaven ohřevu. Ten probíhá pomocí přímého působení mikrovlnného

záření na rostlinný materiál a vodu (rozpouštědlo). Tato technika může být použita pro velké množství rostlinných materiálů za různých podmínek [21], [22], [30]. Aplikací MAHD při extrakci se zkracuje jak extrakční čas, tak množství potřebného rozpouštědla. Minimalizuje se i dopad na životní prostředí díky nízkému množství emitovaného oxidu uhličitého do atmosféry. Další výhodou MAHD je dobře regulovatelný proces zahřívání [30].



Obrázek 12: Schéma hydrodestilace s mikrovlnným ohřevem [30]

1.3.2 Extrakční metody

Extrakce jsou separační metody, které jsou založeny na distribuci složky mezi dvě nemísitelné fáze. Může se jednat o přechod mezi pevnou a kapalnou fází nebo mezi dvěma nemísitelnými kapalnými fázemi. Kromě izolace látky lze extrakci použít také k jejímu obohacení (prekoncentraci) [34].

1.3.2.1 Extrakce nadkritickou tekutinou

Extrakce nadkritickou tekutinou neboli superkritická fluidní extrakce (SFE, z angl. supercritical fluid extraction) je proces oddělování jedné složky (extrakčního činidla) od další (matrice) za použití superkritické tekutiny jako extrakčního rozpouštědla. Extrakce se provádí obvykle z tuhé matrice, ale může probíhat i z kapaliny [30].

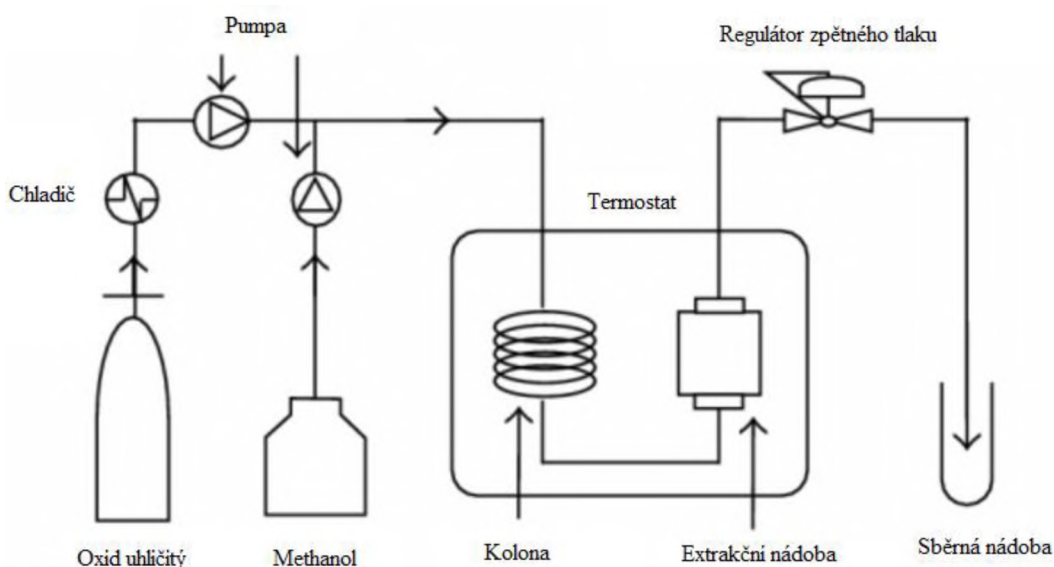
Nadkritická tekutina (fluidum) se vyskytuje při teplotách a tlacích, které jsou vyšší než teploty a tlaky kritické. Za těchto podmínek se nejedná o kapalinu, ani o plyn. Viskozita nadkritické parní fáze je podstatně nižší než viskozita kapalin a její hustotu je možné ovlivňovat tlakem [34].

Nejpoužívanější nadkritickou tekutinou je oxid uhličitý, který se využívá ve více než 90 % všech analytických aplikací. Oxid uhličitý má relativně nízký kritický tlak (7,4 MPa) a kritickou teplotu (32 °C). Je netoxický, nehořlavý, nekorozivní, bezpečný, dostupný ve vysoké čistotě a za příznivou cenu. Při pokojové teplotě je plynný, a proto lze z extraktu snadno odstranit. Oxid uhličitý je nepolární sloučenina vhodná pro extrakci nepolárních látek. Jeho nevýhodou je nedostatečná polarita pro extrakci polárních analytů, proto bývá v některých případech modifikován pomocnými polárními rozpouštědly, jako jsou např. ethanol nebo methanol [30].

Mezi další používané nadkritické tekutiny patří např. oxid dusný, chlordifluormethan (CHClF_2) nebo fluorid sírový (SF_6) [35].

SFE je technika vhodná pro některé esenciální oleje, které nelze získat pomocí hydrodestilace. Extrakty získané pomocí SFE mají vynikající kvalitu. Za nevýhodu této techniky může být považován fakt, že je poměrně nákladná [30].

Následující odstavec shrnuje přínosy použití SFE. Nadkritická tekutina má nižší viskozitu a vyšší difuzivitu. V důsledku toho může pronikat do pevných porézních materiálů rychleji a účinněji než kapaliny. Jako další výhoda této metody se uvádí, že obvykle bývá prováděna při nízkých teplotách, které jsou ideální ke studiu termolabilních sloučenin. SFE může být přímo spojena s chromatografickými metodami, což je přínosné při kvantifikaci vysoce těkavých sloučenin [36]. Schéma SFE je zobrazeno na obrázku 13.



Obrázek 13: Schéma extrakce nadkritickou tekutinou [37]

1.3.2.2 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (SPME, z angl. solid-phase microextraction) je extrakční technika, která se využívá při extrakci z kapalných, pevných nebo plyných materiálů, a slouží k izolaci a zakoncentrování analytů z matrice vzorku [21]. Využívá se při ní křemenné vlákno, které je potaženo malým objemem stacionární fáze s různou tloušťkou. Stacionární fáze je tvořena buď z polymerního materiálu (př. polydimethylsiloxan, polyakrylát) nebo směsí polymerního materiálu s pevným adsorbentem (př. částice na bázi grafitizovaného uhlíku, tzv. Carboxen) [21], [38]. Tabulka 1 uvádí příklady stacionárních fází na povrchu vláken, společně s jejich tloušťkou a využitím [40].

Tabulka 1: Příklady stacionárních fází SPME a jejich použití

Druh stacionární fáze	Tloušťka [μm]	Použití
Carboxen/Polydimethylsiloxan	75, 85	Plyny
Polydimethylsiloxan	7	Nepolární látky
	30	Středně těkavé nepolární látky
	100	Těkavé látky
Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen	60	Polární látky
	65	Těkavé látky
Polyakrylát	85	Středně těkavé polární látky
Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan	50/30	Látky těkavé, středně těkavé a ve stopovém množství
Polyethylenglykol	60	Polární látky

1.3.2.2.1 Průběh mikroextrakce tuhou fází

Vlákno je umístěno uvnitř kovové jehly, která slouží k jeho ochraně před mechanickým poškozením a zároveň k propíchnutí septa vialky se vzorkem. Při vzorkování se vlákno vysune z jehly a po dosažení sorpční rovnováhy je zasunuto zpět do jehly [39].

Při kontaktu se vzorkem jsou analyty buď absorbovány (v případě, že se jedná o polymerní vrstvu) nebo adsorbovány (v případě vrstvy pevné fáze) na vlákno v závislosti na jeho povaze [38]. Po extrakčním kroku jsou analyty desorbovány do chromatografu, kde dochází k jejich separaci a analýze. Desorpce analytů z vlákna u plynové chromatografie probíhá tepelně. U vysokoúčinné kapalinové chromatografie může být desorpce provedena proudem mobilní fáze (tzv. dynamická desorpce) nebo v případě silnější sorpce je vlákno nejdříve určitou dobu namáčeno v mobilní fázi a teprve poté je provedena desorpce na

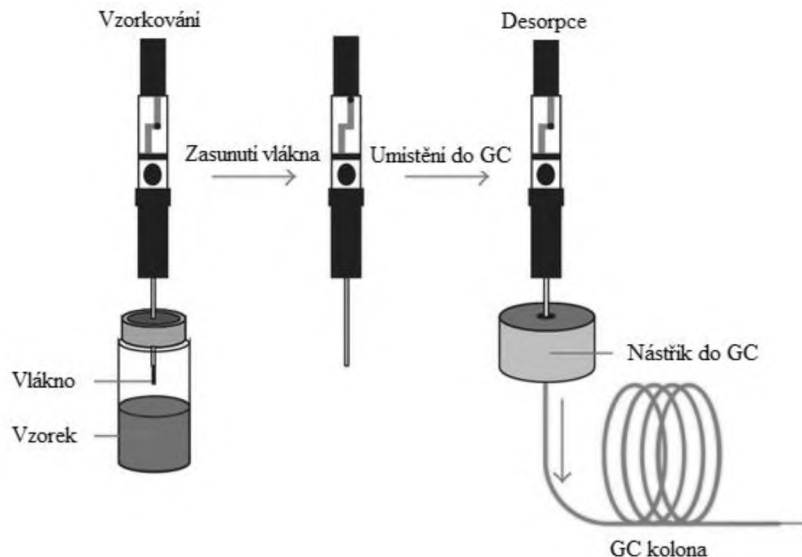
chromatografickou kolonu (tzv. statická desorpce). Tato technika tedy nabízí jednoduché spojení extrakce, vzorkování a analýzy vzorku [21], [38].

Při SPME se rozlišují dva základní principy vzorkování, a to buď přímé ponoření vlákna do plynné nebo kapalně matrice vzorku (DI-SPME, z angl. direct immersion) nebo tzv. headspace analýza (HS-SPME), při které je vlákno v plynném prostoru nad kapalným, popř. pevným vzorkem [41]. Schéma HS-SPME je zobrazeno Obrázku 14.

1.3.2.2.2 Výhody, nevýhody a využití mikroextrakce tuhou fází

Mezi hlavní přednosti metody SPME se řadí její rychlost, ekonomická stránka (vlákna jsou opakovaně použitelná – průměrně se na jednom vlákne provádí cca 50 extrakcí), i možnost univerzálního použití pro celou řadu aplikací, např. v toxikologii, při analýze vzorků životního prostředí, přírodních látek, biologických vzorků, potravin atd. Výhodou také je, že k provedení SPME není potřeba používat rozpouštědla ani složité aparatury. Velkou výhodou SPME je možnost spojení s plynovými a kapalinovými chromatografy [38].

SPME má i své nevýhody, patří mezi ně možnost snadného ohnutí a zlomení vlákna. Metoda lze použít pouze ke kvalitativním nebo semikvantitativním analýzám [41].



Obrázek 14: Schéma mikroextrakce tuhou fází [42]

1.3.2.2.3 Faktory ovlivňující mikroextrakci tuhou fází

Průběh SPME analýzy je ovlivňován mnoha faktory, které působí na ustavování rovnováhy, a je vhodné je optimalizovat. Mezi tyto faktory se řadí např. polarita a tloušťka stacionární

fáze, délka doby sorpce, teplota vzorku při extrakci, způsob vzorkování, množství vzorku, hodnota pH či míchání vzorku [39].

Výběr vhodného vlákna pro SPME se řídí tím, že pro extrakci polárních látek se používají vlákna polární a k extrakci nepolárních látek slouží vlákna nepolární. Vlákna se silnější vrstvou stacionární fáze se využívají pro zachycení těkavějších látek díky schopnosti vyextrahovat více analytu. Naopak u vláken s tenčí vrstvou dochází k rychlejšímu uvolňování výše vroucích látek při tepelné desorpci [39].

Optimální délka trvání sorpce je doba potřebná k dosažení rovnováhy, při které má metoda největší citlivost. Optimální délku trvání lze zjistit z proměření závislosti výtěžnosti analytu v závislosti na době trvání sorpce [39].

1.3.2.3 Headspace analýza

Headspace analýza se využívá u těkavých vzorků spolu ve spojení s plynovou chromatografií. Rozlišují se dva základní způsoby provedení headspace analýz, a to statický a dynamický. V dnešní době se lze setkat s více různými způsoby provedení, díky jejich miniaturizaci a automatizaci [43].

Při statickém provedení headspace analýzy je vzorek v nádobce temperován do vytvoření rovnováhy mezi kapalnou (popř. pevnou) a plynnou fází, ke které dochází vhodnou kombinací teploty a délky temperování vzorku. Poté se odebere známý objem plynné fáze z uzavřeného prostoru nad vzorkem a je převeden na chromatografickou kolonu. Pro přesnost a opakovatelnost tohoto uspořádání je důležité využívat automatické dávkovací systémy [44].

Při dynamickém způsobu provedení headspace analýzy je do prostoru nad vzorkem přiváděn inertní plyn. Poté dochází k jeho průchodu sorpční trubicí, která slouží k zachytu uvolněných těkavých látek. K zachytu těkavých látek se využívají např. sorbenty Porapak Q (polydivinylbenzen) či polydimethylsiloxan. Zachycené látky jsou následně převedeny na chromatografickou kolonu. K desorpci látek zachycených na sorbentu dochází nejčastěji termálně, přičemž teplota a délka desorpcí závisí na množství a typu použitého sorbentu. Jako promývací plyn a zároveň mobilní fáze se běžně používá helium. Speciálním způsobem provedení je tzv. purge and trap analýza, při které interní plyn na rozdíl od dynamické headspace analýzy prochází přímo vzorkem [44].

1.4 METODY ANALÝZY TĚKAVÝCH LÁTEK

Při analýzách esenciálních olejů, resp. těkavých látek je technickým cílem dosáhnout co nejlepší separace pomocí nejučinnější a snadno dostupné technologie. Výsledky z těchto analýz slouží jednak k výzkumu, objevování nových složek, charakterizaci chemických tříd přítomných sloučenin, a také k průmyslovým účelům, např. při kontrole kvality olejů a zkoumání jejich složení a případného falšování. Při analýzách esenciálních olejů je nejvíce využívanou metodou pro identifikaci jednotlivých složek spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS). K určení relativního zastoupení jednotlivých komponent esenciálního oleje se využívá plynová chromatografie s detekcí plamenovým ionizačním detektorem (GC/FID) [27].

1.4.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC, z angl. gas chromatography) je separační analytická metoda sloužící k separaci plynů a par těkavých kapalin a roztoků tuhých látek, které lze do plynného stavu převést. Při separaci využívá dvě heterogenní fáze, a to fázi mobilní a stacionární, mezi kterými dochází k opakovanému ustanovování rovnováhy [34], [45].

Jako mobilní fáze u plynové chromatografie slouží nosný inertní plyn, nejčastěji vodík, dusík, helium nebo argon. V případě plynové chromatografie je stacionární fáze umístěna v chromatografické koloně. Rozlišují se dva typy kolon, a to buď náplňové nebo kapilární. U náplňových kolon je stacionární fáze tvořena tuhým povrchově aktivním anorganickým (např. silikagel) či pórovitým organickým adsorbentem (např. styren-divinylbenzen). Kapilární kolony, které jsou v současné době nejvyužívanější, jsou vyráběny z taveného křemene pokrytého polyimidem. Tyto kolony mají nejčastěji délku 30 m a vnitřní průměr 0,25 mm. Stacionární fázi u kapilárních kolon tvoří velmi tenká (0,25–0,50 μm) vrstva kapaliny, která je chemicky vázaná na nosiči. Jako příklad těchto kapalin lze uvést např. nepolární polydimethylsiloxan v kolonách určených pro separaci nepolárních látek nebo polární polyethylenglykol pro separaci látek polárního charakteru [34], [45], [46].

1.4.1.1 Hlavní části plynového chromatografu

Při plynové chromatografii je nosný plyn odebírán z tlakové lahve přes redukční ventil. Po průchodu sušicí trubicí a regulátory tlaku a průtoku přichází nosný plyn do injektoru, ve kterém

se dávkuje propíchnutím silikonové zátky do proudu nosného plynu vzorek. Injektor je vyhříván na takovou teplotu, při které dojde k okamžitému zplynění vzorku, ale zároveň teplota nesmí být příliš vysoká, aby nedošlo k rozkladu látek. Teplota injektoru se pohybuje v rozmezí 150–350 °C [34], [47].

V případě použití kapilárních kolon je injektor opatřen děličem toku, který umožňuje nadávkování pouze malého množství vzorku kvůli podstatně nižší kapacitě kolony [47]. Jedná se o tzv. techniku splitování (splitovací poměr, split ratio), při které je směs vzorku a nosného plynu v injektoru rozdělena na dvě nestejně velké části. Menší část vstupuje k analýze na chromatografickou kolonu a větší část odchází do odpadu [48].

Páry vzorku jsou nosným plynem vneseny na chromatografickou kolonu umístěnou v termostatu [34], [47]. V případě, že je teplota kolony v průběhu celé analýzy konstantní, jedná se o isothermální analýzu. U vzorku směsi látek s rozdílnými body varu se využívá teplotní gradient, při kterém se teplota kolony během analýzy mění podle vytvořeného teplotního programu. Výhodou použití teplotního gradientu je zkrácení doby analýzy [48]. V koloně dochází k separaci jednotlivých složek vzorku, které společně s nosným plynem postupně vstupují do detektoru. Detektor je napojený na počítač, ve kterém dochází ke zpracování a vyhodnocování dat [34], [47].

1.4.1.2 Způsoby detekce u plynového chromatografu

Nejrozšířenějším detektorem využívaným ve spojení s plynovou chromatografií je plamenový ionizační detektor (FID, z angl. flame ionization detector) [47], [48]. Dalšími používanými detektory v plynové chromatografii jsou např. tepelně vodivostní detektor (TCD, z angl. thermal conductivity detector), detektor elektronového záchytu (ECD, z angl. electron capture detector) a hmotnostní spektrometr (MS, z angl. mass spectrometer) [34].

Důležitými parametry při výběru detektoru jsou vysoká citlivost, rychlost odezvy, stabilita poskytovaného signálu v čase a snadnost konstrukce a provozu detektoru [49].

Plamenový ionizační detektor je schopný detekovat téměř všechny organické látky. Skládá se z ocelové trysky, kde do plamene prochází eluát z kolony, vodík a vzduch jako doplňkový plyn, a v hořáku dochází ke spálení látek na ionty. Princip plamenového ionizačního detektoru spočívá v měření změny ionizačního proudu mezi dvěma polarizovanými elektrodami. Jednu elektrodu tvoří samotný hořák, druhou elektrodou je kolektor. Výsledný

grafický záznam je závislostí napěťové odezvy na čase, nazývá se chromatogram a lze z něj vyhodnotit retenční parametry jednotlivých signálů, např. retenční čas či plochy a výšky píků. Odezva detektoru přímo závisí na koncentraci stanované látky a na její struktuře. [47], [48].

1.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. mass spectrometry) je metoda, při které dochází k převedení molekul na ionty, jejich rozdělení podle poměru hmotnosti iontu a náboje (m/z) a záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Výsledné hmotnostní spektrum je tedy grafickou závislostí intenzity iontů na jejich m/z . Výhodou hmotnostní spektrometrie je vysoká citlivost, minimální spotřeba vzorku a možnost jejího využití v kvalitativní (např. určení molekulové hmotnosti, strukturních informací) i kvantitativní (odezva závisí na koncentraci) analýze. Nevýhodami hmotnostní spektrometrie jsou vysoké pořizovací a provozní náklady a destruktivnost metody [50].

1.4.2.1 Hlavní části hmotnostního spektrometru

Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Iontový zdroj převádí neutrální molekuly vzorku na nabitě částice a má různé konstrukce podle použité ionizační techniky. V hmotnostním analyzátoru se rozdělí ionty podle m/z v plynné fázi za vysokého vakua. Dělení iontů probíhá na základě různých fyzikálních principů, např. zakřivení dráhy letu jednotlivých iontů v elektrickém nebo magnetickém poli, různá doba rychlosti letu iontů nebo různá frekvence harmonických oscilací. Ve spojení GC/MS se velmi často využívá kvadrupólový analyzátor nebo iontová past, které jako fyzikální princip využívají různou stabilitu oscilací iontů v kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. V detektoru probíhá detekce jednotlivých iontů a určení jejich relativní intenzity. Používanými detektory v hmotnostní spektrometrii jsou elektronové násobiče, fotonásobiče a Faradayova klec. Mezi další důležité části hmotnostního spektrometru se řadí iontová optika pro urychlení a fokusaci iontů, vakuový systém a počítač k ovládní přístroje, zpracovávání dat a porovnávání s knihovnou spekter [51].

1.4.2.2 Způsoby ionizace vzorku u hmotnostní spektrometrie

Při spojení hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií se využívá ionizace vzorku pomocí elektronové nebo chemické ionizace. Ionizační techniky se dělí podle množství dodané vnitřní energie na tvrdé a měkké. Volba ionizační techniky závisí na povaze analytu [51]. Při spojení GC/MS používají iontové zdroje nejčastěji elektronovou a chemickou ionizaci [50].

Mezi tvrdé ionizační techniky patří např. elektronová ionizace (EI, z angl. electron ionization), při které získá molekula velký nadbytek vnitřní energie. Ten se projeví fragmentací molekulového iontu na menší nabitě a nenabitě části (tzv. fragmentové ionty). Při rozsáhlé fragmentaci může dojít až ke ztrátě molekulárního iontu. Elektronová ionizace pracuje za vakua a její výhodou je možnost přímého softwarového porovnání naměřených spekter s knihovny spekter v počítači. Pro možnost porovnání je nutné použít standardní ionizační energii, která je stanovena na 70 eV a při které byla naměřena spektra v knihovnách. [51].

Měkké ionizační techniky jsou šetrnější, molekula získá mnohem menší množství energie oproti elektronové ionizaci a ve spektrech se proto objevují zejména protonované a deprotonované molekuly a pouze minimum fragmentových iontů. Příkladem měkké ionizační techniky je chemická ionizace (CI, z angl. chemical ionization), která má stejný princip a konstrukci iontového zdroje jako elektronová ionizace, ale navíc je ve zdroji přítomen reakční plyn (nejčastěji methan). Nejdříve dochází k ionizaci molekul reakčního plynu, které poté ionizují molekuly analytu [51].

1.4.3 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Propojení technik GC/MS je velmi výhodné, je možné v jedné analýze kombinovat separaci a identifikaci i složitějších směsí látek. V současné době se jedná o rutinní metodu, která se používá ve spojení s vyhřívanými kapilárními kolonami o průtoku asi 1 ml/min. Nosný plyn spolu s analytem se zavede přímo do iontového zdroje umístěného ve vakuu a vakuový systém odstraní přebytek nosného plynu [50], [51].

1.4.3.1 Identifikace sloučenin

V případě plynové chromatografie se identifikace chromatografických píků provádí pomocí porovnání retenčních časů s referenčními sloučeninami. V takovém případě se používají komerčně dostupné standardy, které ovšem většinou nejsou dostupné pro všechny složky

složitých směsí, mezi které se řadí např. esenciální oleje. V takovém případě je možností identifikace výpočet retenčního indexu (viz kapitola 1.4.3.1.1). U techniky GC/MS se využívá kombinace porovnání retenčních indexů jednotlivých složek s publikovanými daty a přímého porovnávání naměřených hmotnostních spekter s knihovny spekter [52].

1.4.3.1.1 Retenční indexy

K identifikaci sloučeniny je možné použít i výpočet retenčního indexu (RI). Původní logaritmická verze retenčního indexu, tzv. Kovatsův index se používá při použití izotermálního průběhu separace. Vztah pro výpočet Kovatsova retenčního indexu uvádí rovnice (1). K výpočtu retenčního indexu je potřeba za stejných podmínek jako u vzorku stanovit také retenční časy homologické řady nerozvětvených n -alkanů. Retenční indexy jsou dostupné pro velké množství látek a na základě porovnání vypočítané a tabelované hodnoty lze provést identifikaci látky [34], [47].

$$RI = 100 \cdot \frac{[\log(t_x) - \log(t_z)]}{[\log(t_{z+1}) - \log(t_z)]} + 100 \cdot z \quad (1)$$

Kde RI je retenční index stanovované látky, t_x , t_z a t_{z+1} jsou retenční časy neznámé látky, n -alkanu s počtem uhlíků z a n -alkanu se $z+1$ uhlíky.

Při použití programovaného teplotního programu separace látek se využívá výpočet podle Van den Doola a Kratze (2).

$$RI = 100 \cdot \frac{(t_x - t_z)}{(t_{z+1} - t_z)} + 100 \cdot z \quad (2)$$

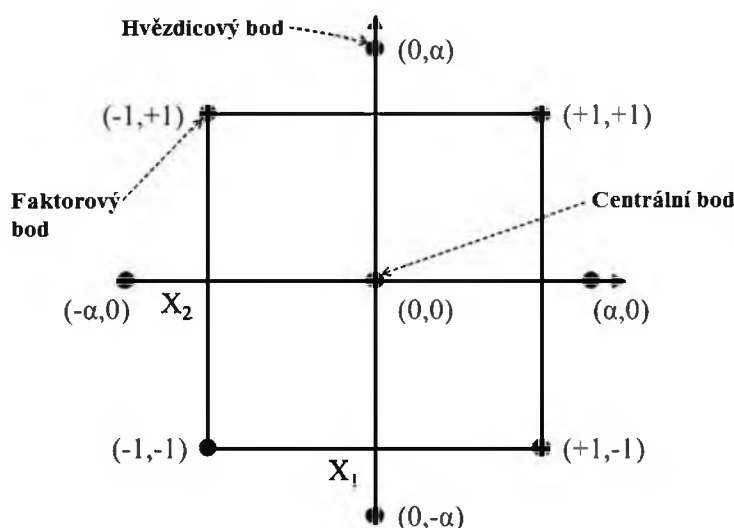
1.4.3.1.2 Knihovny hmotnostních spekter

Vzorky je možné identifikovat na základě počítačového porovnání neznámého spektra s knihovnou spekter. Vzorky v těchto knihovnách byly ionizovány pomocí elektronové ionizace při standardní urychlující energii 70 eV (při této hodnotě je spektrum bohaté na fragmentové ionty a u většiny látek je přítomen i molekulární ion). Jedná se např. o databáze Národního institutu standardů a technologie (NIST, z angl. National Institute of Standards and Technology) nebo Wiley online knihovnu (Wiley Registry of Mass Spectral Data, 11th Edition). Výsledkem porovnání neznámého spektra s knihovnou jsou návrhy látek seřazené podle největší podobnosti s vyjádřením jejich koeficientu shody v procentech. Vysoký koeficient shody nemusí svědčit o správné identifikaci, a je nutné ještě manuální posouzení

správnosti, zejména u nižšího koeficientu shody nebo při významných rozdílech mezi spektry naměřenými a spektry v knihovně [51].

1.4.4 Návrh a analýza experimentu

K optimalizaci podmínek SPME analýzy lze využít např. návrh na základě principů centrálně kompozitního plánování (CCD, z angl. central composite design). CCD se řadí mezi jedny ze základních metod plánování experimentů. Jedná se o kombinaci úplného faktorového plánu a hvězdicovitého plánu, který ve svém matematickém modelu zahrnuje zakřivení plochy. Při CCD je doporučený rozsah zkoumaných faktorů (parametrů) 2 až 10. Konstrukce každého centrálně kompozitního návrhu se skládá ze tří částí, kterými jsou jádro návrhu, centrální bod a axiální (hvězdicové) body. Jádro návrhu vychází z faktorových bodů, které tvoří vrcholy n-rozměrné krychle a jsou kódovány +1 a -1. Centrální bod leží uprostřed experimentálního prostoru a je kódován jako 0. Opakovaným měřením centrálního bodu (obvykle se provádí 3–6 opakování) lze získat data k hodnocení opakovatelnosti. Axiální body představují extrémní hodnoty (vysoké i nízké) pro každý faktor návrhu a jsou umístěny symetricky od středového bodu ve vzdálenosti $\pm\alpha$ [53], [54], [55]. Schéma centrálně kompozitního plánu a jeho základních bodů je zobrazeno na Obrázku 15.

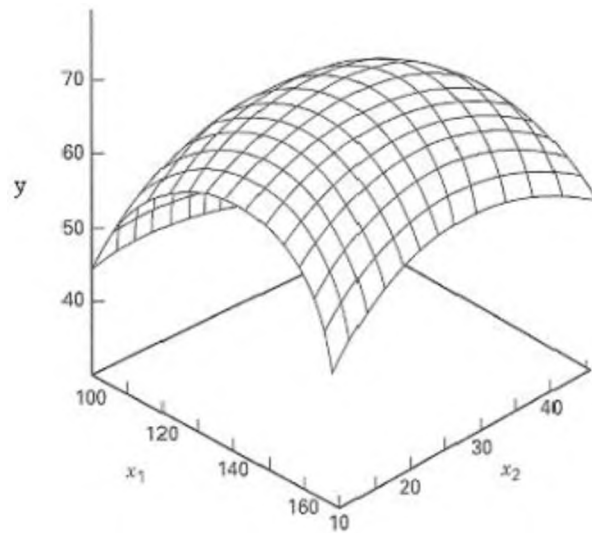


Obrázek 15: Centrálně kompozitní plán [56]

1.4.4.1 Metoda odezvové plochy

Pro analýzu získaných dat je možné použít např. metodu odezvové plochy (RSM, z angl. response surface methodology). RSM je jedna z nejčastěji využívaných matematických

a statistických metod při modelování a analýze procesu, ve kterém je odezva ovlivněna různými proměnnými, a cílem této metody je odezvu optimalizovat. Parametry ovlivňující proces se nazývají nezávisle proměnné (x_1 , x_2), odezva se označuje jako závisle proměnná (y). V případě, že model zohledňuje zakřivení plochy, používá se polynom druhého stupně [55], [57]. Optimální podmínky procesu se určí pomocí grafického znázornění odezvové plochy (Obrázek 16).



Obrázek 16: Metoda odezvové plochy–příklad grafického znázornění modelu polynomu druhého stupně [58]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Následující část diplomové práce popisuje experimentální postup. Cílem práce bylo pomocí vhodné metody izolovat těkavé látky ze sušeného kořene chrpovníku lopuchového (*Saussurea costus*), následně je zanalyzovat, a provést identifikaci co největšího počtu těchto látek. Extrakty byly analyzovány prostřednictvím plynového chromatografu s hmotnostním detektorem (GC/MS) a plynového chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem (CG/FID). Chromatogramy získané z GC/MS analýzy sloužily ke zjištění kvalitativního složení vzorku porovnáním vypočítaných retenčních indexů s publikovanými a na základě porovnání naměřených spekter jednotlivých látek s knihovnamí spekter. Relativní zastoupení jednotlivých identifikovaných složek bylo vypočítáno z GC/FID chromatogramů na základě shody retenčních indexů a velikosti jednotlivých píků. Jednou ze zvolených metod izolace těkavých složek byla hydrodestilace esenciálního oleje, který byl analyzován. Dalším způsobem provedení izolace těkavých sloučenin ze vzorku byla mikroextrakce tuhými fází v headspace uspořádání (HS-SPME) přímo z nadrceného neupraveného vzorku. Metodou centrálního kompozitního plánování byla navržena série měření a na jejím základě byly optimalizovány extrakční podmínky. Za optimalizovaných podmínek HS-SPME byla provedena analýza s následnou identifikací látek, opět pomocí měření na GC/MS a GC/FID.

2.1 Vzorek a jeho příprava k analýze

V diplomové práci byl jako vzorek použit usušený kořen chrpovníku lopuchového (*Saussurea costus*) původem z Vietnamu, kde byl zakoupen na místním trhu. Pro lepší průběh hydrodestilace a snadnější manipulaci se vzorkem byl kořen namlet na jemný prášek pomocí nožového mlýnku Grindomix GM 200 od firmy Retsch GmbH (Haan, Německo).

2.2 Použité chemikálie

- Destilovaná voda,
- *n*-hexan od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika),
- standardy *n*-alkanů C8–C40 firmy Restek (Bellefonte, PA, USA).

2.3 Použité přístroje a pomůcky

- Laboratorní váhy od firmy KERN & SOHN GmbH (Balingen, Německo),
- analytické váhy HR-120 od firmy DInstruments Ltd (Oxford, Anglie),
- aparatura pro hydrodestilaci,
- topné hnízdo LTHS 2000 od firmy Brněnská Drutěva (Brno, Česká republika),
- různé laboratorní nádoby a pomůcky (kádinky, odměrné válce, stříčky, mikropipety, lžičky, nádoby a vialky na vzorky, SPME vialky),
- plynový chromatograf s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 Plus od firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko),
- plynový chromatograf GC-2010 s plamenovým ionizačním detektorem od Shimadzu (Kyoto, Japonsko),
- autosampler Combi PAL od firmy CTC Analytics GmbH (Zwingen, Švýcarsko),
- SPME vlákna: červené 100 μm PDMS (Polydimethylsiloxan), šedé 50/30 μm DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan) a světle modré 85 μm CAR/PDMS (Carboxen/Polydimethylsiloxan), všechny od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA).

2.4 Postup a podmínky provedení hydrodestilace

Jedním z prováděných způsobů izolace těkavých složek z kořene chrpovníku lopuchového byla hydrodestilace. Aparatura použitá pro hydrodestilaci je zobrazena na **Obrázek 1**Obrázku 17. K hydrodestilaci bylo naváženo 100 g sušeného drceného kořene chrpovníku lopuchového, který byl vložen do destilační baňky o objemu 2 000 ml. Ke vzorku bylo do baňky přidáno asi 1 000 ml destilované vody, varné kuličky a byla zahájena samotná hydrodestilace, při které docházelo k zahřívání rostlinného materiálu plně ponořeného v destilované vodě pomocí topného hnízda. Vodní pára společně se složkami esenciálního oleje procházely přes chladič, kde kondenzovaly a ve sběrné části aparatury se odděloval esenciální olej, který plaval na povrchu. Přebytečné množství vody se vracelo zpět do destilační baňky a voda tedy nemusela být v průběhu hydrodestilace doplňována.

Hydrodestilace byla prováděna tak dlouho, dokud ještě docházelo k destilaci dalšího esenciálního oleje. V tomto případě se jednalo o čas 210 minut. Po uplynutí této doby byl esenciální olej převeden do skleněné nádoby s víčkem, byla zvážena jeho hmotnost a byl uskladněn v lednici při 4 °C do doby, než byl analyzován. Hydrodestilace byla provedena celkem dvakrát.



Obrázek 17: Aparatura pro hydrodestilaci

2.5 Mikroextrakce tuhou fází

Druhým způsobem provedení izolace těkavých složek z kořene chrpovníku lopuchového byla mikroextrakce tuhou fází v headspace uspořádání. Byla testována tři vlákna: červené vlákno 100 μm PDMS (Polydimethylsiloxan), šedé vlákno 50/30 μm DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan) a světle modré vlákno 85 μm CAR/PDMS (Carboxen/Polydimethylsiloxan). Jako vhodné vlákno bylo pro samotnou optimalizaci extrakce a analýzu vzorku zvoleno šedé vlákno. Před prvním použitím každého vlákna byla provedena kondicionace sorbentu za podmínek uvedených v návodu od výrobce. Optimalizace extrakce byla provedena v rozsahu 20-120 minut a 40-120 $^{\circ}\text{C}$. Vzorek byl nejdříve inkubován při teplotě extrakce po dobu 20 minut, aby došlo k ustavení rovnovážného stavu. Po proběhnutí HS-SPME byly analyty desorbovány z vlákna v nástřikovém bloku plynového chromatografu, desorpční čas byl 15 s a desorpční teplota 230 $^{\circ}\text{C}$. Mezi jednotlivými měřeními bylo vlákno čištěno při 250 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Celý proces HS-SPME i desorpce probíhal automaticky s využitím autosampleru.

2.6 Plynová chromatografie

2.6.1 Příprava vzorků k analýze

Vzorky vydestilovaného esenciálního oleje byly před analýzou na plynovém chromatografu naředěny *n*-hexanem v poměru 1:100.

Při přípravě vzorků k HS-SPME bylo do každé headspace vialky naváženo 100 mg nadrceného kořene chrpovníku. Vialky byly poté uzavřeny víčky s teflonovými septy.

2.6.2 Podmínky analýzy plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

K separaci vzorků byla použita kolona SLB-5ms od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA), s délkou 30 m, vnitřním průměrem 0,25 mm a vrstvou filmu o tloušťce 0,25 μm . Jako nosný plyn sloužilo helium 4.6 od firmy Linde Gas a.s. (Praha, Česká republika) s lineární rychlostí průtoku 30 cm/s. Teplota nástřikového bloku byla nastavena na 230 $^{\circ}\text{C}$. V případě EO byl dávkován 1 μl naředěného vzorku při splitovacím poměru 1:30. Extrakty získané HS-SPME byly desorbovány z extrakčního vlákna v nástřikovém bloku po dobu 15 sekund. Separace probíhala při teplotním programu, který začínal při teplotě 40 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 minut, poté se teplota zvedala rychlostí 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ až do konečné teploty 250 $^{\circ}\text{C}$, která byla udržována po dobu

5,5 minut. Celková doba analýzy byla tedy 112,5 minut. Teplota iontového zdroje i teplota převodníku do MS byla nastavena na 200 °C. Ionizace separovaných látek byla provedena pomocí elektronové ionizace s ionizační energií 70 eV a v režimu scan byla snímána odezva všech iontů v rozmezí $m/z = 35-500$. Samotné měření se záznamem signálu bylo spuštěno až po 5 minutách od nadávkování vzorku z důvodu ochrany detektoru (tzv. solvent cut time).

2.6.3 Podmínky analýzy plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem

K separaci vzorků pomocí GC/FID byla použita stejná kolona SLB-5ms jako v GC/MS (viz kapitola 2.6.2). Teplotní program a podmínky separace byly také stejné jako v případě GC/MS. Teplota nástřikového bloku byla nastavena na 230 °C, teplota na detektoru na 270 °C. Spalování látek v plamenovém ionizačním detektoru probíhalo v plameni, který tvořila směs vodíku se vzduchem. Rychlost průtoku vodíku byla nastavena na hodnotu 40 ml/min, rychlost průtoku vzduchu na 400 ml/min.

2.7 Vyhodnocení dat z chromatogramů

Pomocí GC/MS i GC/FID byly za stejných podmínek změřeny jednak samotné vzorky, a také směs *n*-alkanů. Retenční časy *n*-alkanů byly použity k výpočtům retenčních indexů jednotlivých sloučenin. Jelikož separace probíhaly při programované teplotě, retenční indexy byly vypočítány na základě vztahu dle Van den Doola a Kratze (viz rovnice 2 v kapitole 1.4.3.1.1) z retenčních časů *n*-alkanů a retenčních časů jednotlivých látek (Tabulka 2). Vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno v programech CGMS Solution 4.20 a GC Solution od Shimadzu (Kyoto, Japonsko).

Ke zjištění kvalitativního složení vzorku byly použity chromatogramy z GC/MS analýzy. Identifikace sloučenin byla provedena na základě srovnání naměřených hmotnostních spekter s knihovnými spekter. Bylo použito srovnání s knihovnými FFNSC (Mass Spectra of Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds od Shimadzu, Kyoto, Japonsko), NIST 11 a NIST 11s (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland, USA). Ověření probíhalo porovnáním vypočtených retenčních indexů s retenčními indexy publikovanými.

GC/FID chromatogramy sloužily k určení relativního zastoupení jednotlivých sloučenin. Byly vypočítány retenční indexy jednotlivých látek dle rovnice 2 (viz kapitola 1.4.3.1.1). Na základě srovnání retenčních indexů získaných z GC/MS a z GC/FID chromatogramů bylo provedeno přiřazení relativního zastoupení jednotlivým identifikovaným sloučeninám. Relativní procentuální zastoupení jednotlivých látek bylo vypočítáno z poměru plochy píku sloučeniny k celkové ploše všech píků chromatogramu a je vztaženo přímo na esenciální olej a SPME extrakt, nikoliv na celý kořen. Měření vzorků pomocí GC/FID bylo provedeno dvakrát a data byla zprůměrována.

Tabulka 2: Retenční časy n-alkanů a jejich retenční indexy

Název alkanu	Počet uhlíků	Retenční čas (MS) [min]	Retenční čas (FID) [min]	Retenční index
<i>n</i> -oktan	8	7,198	7,647	800
<i>n</i> -nonan	9	12,157	12,720	900
<i>n</i> -dekan	10	18,667	19,291	1 000
<i>n</i> -undekan	11	25,807	26,439	1 100
<i>n</i> -dodekan	12	32,962	33,584	1 200
<i>n</i> -tridekan	13	39,869	40,467	1 300
<i>n</i> -tetradekan	14	46,435	47,011	1 400
<i>n</i> -pentadekan	15	52,660	53,209	1 500
<i>n</i> -hexadekan	16	58,558	59,084	1 600
<i>n</i> -heptadekan	17	64,163	64,659	1 700
<i>n</i> -oktadekan	18	69,482	69,962	1 800
<i>n</i> -nonadekan	19	74,557	75,011	1 900
<i>n</i> -ikosan	20	79,401	79,828	2 000
<i>n</i> -henkosan	21	84,027	84,434	2 100
<i>n</i> -dokosan	22	88,462	88,844	2 200
<i>n</i> -trikosan	23	92,711	93,070	2 300
<i>n</i> -tetrakosan	24	96,795	97,127	2 400
<i>n</i> -pentakosan	25	100,726	101,033	2 500
<i>n</i> -hexakosan	26	104,506	104,786	2 600
<i>n</i> -heptakosan	27	108,190	–	2 700

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V následující části práce jsou popsány výsledky z experimentální části diplomové práce zaměřené na izolaci a analýzu těkavých složek z kořene chrpovníku lopuchového. Izolace byla provedena pomocí dvou extrakčních technik – hydrodestilace a mikroextrakce tuhou fází v headspace uspořádání. Je zde uveden postup optimalizace podmínek HS-SPME a jsou interpretovány výsledky jednotlivých analýz prováděných s využitím plynové chromatografie pomocí jednotlivých extrakčních technik, srovnány vzájemné rozdíly ve výsledcích po provedení jednotlivých typů extrakce, a také porovnány výsledky s dostupnými literárními zdroji.

3.1 Mikroextrakce tuhou fází

Metoda HS-SPME byla nejdříve optimalizována. Samotná optimalizace se skládala z výběru nejvhodnějšího SPME vlákna a z určení vhodných podmínek pro provedení extrakce (teploty a doby extrakce). Jako analytická koncovka byla při optimalizaci extrakční metody použita plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem.

3.1.1 Výběr vhodného SPME vlákna

V diplomové práci byla porovnávána tři různá vlákna, která byla vybrána na základě doporučení uváděného výrobcem [40]. Jednalo se o červené vlákno 100 μm PDMS, šedé vlákno 50/30 μm DVB/CAR/PDMS a světle modré vlákno 85 μm CAR/PDMS. Z těchto tří vláken byl poté proveden výběr na základě výsledků z provedení předběžných analýz. Ke všem prováděným analýzám bylo naváženo stejné množství (100 mg) drceného vzorku kořene chrpovníku lopuchového. Všechny tři typy vláken byly otestovány při různých hodnotách teploty a času. Jednalo se o časy extrakce 20 min, 60 min a 100 min, a o inkubační teploty 40 °C, 70 °C a 100 °C. Z výsledků těchto měření bylo pro extrakci těkavých sloučenin na základě počtu píků a celkové plochy píků (Tabulka 3) vybráno šedé vlákno, které poskytovalo jak nejvyšší celkový počet píků v chromatogramu, tak zároveň i nejvyšší celkovou plochu píků. S tímto vláknem byla provedena optimalizace extrakčních podmínek.

Tabulka 3: Výsledky analýz při testování tří vláken pro SPME

Doba a teplota při SPME	Šedé vlákno 50/30 μm DVB/CAR/PDMS		Červené vlákno 100 μm PDMS		Modré vlákno 85 μm CAR/PDMS	
	Celková plocha píků	Počet píků	Celková plocha píků	Počet píků	Celková plocha píků	Počet píků
20 min, 40 °C	881 775	61	583 020	41	585 650	48
60 min, 70 °C	8 230 976	126	5 441 551	88	5 640 616	109
100 min, 100 °C	8 531 732	141	4 865 572	91	5 041 865	107

3.1.2 Experimentální optimalizace podmínek HS-SPME

K optimalizaci podmínek HS-SPME byl opět použit vzorek chrpovníku lopuchového, který byl pouze nadrcený na jemný prášek, jinak byl bez dalších úprav. Množství vzorku bylo u všech analýz stejné (100 mg). Série měření pro optimalizaci dvou parametrů, a to konkrétně doby extrakce a extrakční teploty, byla provedena na základě návrhu centrálního kompozitního plánování. Návrh optimalizace tvořilo celkem 13 experimentů, (C) je v tabulce označen centrální bod. Chromatografická analýza na GC/FID byla provedena za podmínek uvedených v kapitole 2.6.3. Chromatogramy byly vyhodnoceny na počet píků a celkovou plochu píků (Tabulka 4). Optimální podmínky byly následně vyhodnoceny pouze na základě počtu píků v chromatogramech, celkové plochy píků jsou v Tabulce 4 uvedeny pouze pro doplnění.

Tabulka 4: Návrh optimalizace a její výsledky v podobě počtu píků a plochy celkového signálu chromatogramu při použití vlákna 50/30 μm DVB/CAR/PDMS

Pokus	Doba extrakce [min] (x)	Teplota extrakce [°C] (y)	Počet píků	Celková plocha píků
1	20	40	55	761 707
2	20	120	115	5 258 087
3	120	40	95	2 478 177
4	120	120	119	4 743 019
5	20	80	109	6 169 815
6	120	80	136	10 133 256
7	70	40	80	1 650 901
8	70	120	112	4 953 062
9 (C)	70	80	125	9 652 212

10 (C)	70	80	120	9 370 861
11 (C)	70	80	123	9 738 818
12 (C)	70	80	131	10 235 814
13 (C)	70	80	129	10 010 674

Vyhodnocení experimentu bylo provedeno metodou odezvové plochy ve statistickém softwaru STATISTICA 12 od firmy StatSoft CR (Praha, Česká republika). Tento program umožňuje mimo jiné vytvoření různých matematických modelů, např. polynomu druhého stupně. Cílem celého experimentu bylo identifikovat co možná nejvíce sloučenin ve vzorku kořene chrpovníku, proto bylo vyhodnocení provedeno podle počtu píků v chromatogramech. Metodou odezvové plochy byla vytvořena polynomická rovnice, jejíž proměnnou tvoří počet píků (rovnice 3). Grafické zobrazení polynomu je na Obrázku 18.

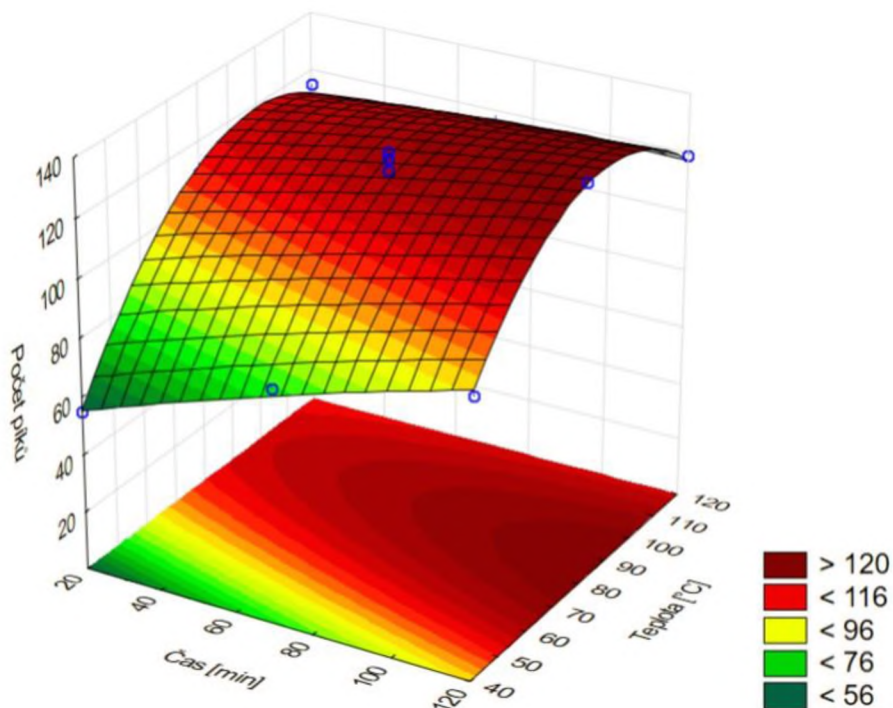
$$PP = -70,8175 + 0,6865x - 0,006x^2 + 3,6087y - 0,0176y^2 - 0,0045xy + 0 \quad (3)$$

Kde PP značí počet píků, x dobu extrakce a y teplotu extrakce.

Z grafu je patrné, že optimální podmínky leží v teplotním rozsahu 70–100 °C a čase trvání extrakce 100 min a více. Na základě vyhodnocení kritického bodu pomocí software byla zvolena teplota extrakce 85 °C a doba extrakce 120 minut. Za těchto podmínek byl předpokládán počet píků 136. S rostoucí dobou extrakce již nedocházelo k výraznějšímu růstu předpokládaného počtu píků, proto byla zvolena tato extrakční doba. Předpokládaný počet píků při teplotě extrakce 85 °C v závislosti na měnící se době extrakce uvádí Tabulka 5.

Tabulka 5: Předpokládaný počet píků na základě výpočtu při teplotě 85 °C

Doba extrakce [min]	Předpokládaný počet píků
100	133
105	134
110	135
115	135
120	136
125	137
130	138



Obrázek 18: Závislost počtu piků na čase a teplotě HS-SPME

3.2 Analýza vzorku

Těkavé látky z kořene chrpovníku lopuchového byly získány úpravou vzorku ve formě esenciálního oleje a ve formě SPME extraktu. Separace látek byla provedena pomocí plynové chromatografie. V příloze 1–4 jsou na ukázkou chromatografické záznamy z obou analýz.

3.2.1 Analýza esenciálního oleje

Esenciální olej byl získán hydrodestilací. Hydrodestilace byla provedena celkem dvakrát, v obou případech byla doba trvání 210 minut. Výtěžnost po provedení první hydrodestilace byla 0,1051 g esenciálního oleje z původní navážky 100 g vzorku chrpovníku, tzn. 0,11 %. V případě hydrodestilace u druhého vzorku se jednalo o výsledné množství 0,1019 g esenciálního oleje ze stejného množství navážky vzorku chrpovníku (100 g), tedy výsledně 0,10 %. Výtěžnost hydrodestilace byla vypočítána dle rovnice (4).

$$\text{výtěžek EO (\%)} = \frac{\text{hmotnost výtěžku HD (g)}}{\text{hmotnost navážky vzorku (g)}} \cdot 100 \quad (4)$$

Tabulka 6 uvádí jednotlivé identifikované složky esenciálního oleje, které jsou uspořádané do skupin podle jejich chemického složení. U každé složky je uvedeno její registrační číslo CAS (z angl. Chemical Abstracts Service). CAS je jedinečné číslo přiřazené konkrétní chemické sloučenině, které označuje vždy jen jednu konkrétní látku a slouží k její přesné identifikaci. Jedná se pouze o pořadová čísla látek, která nevyjadřují žádné údaje o jejich struktuře [59]. U každé složky je také uveden experimentálně stanovený retenční index a relativní zastoupení jednotlivých složek v esenciálním oleji, které bylo stanoveno z velikosti plochy píků jednotlivých sloučenin vztahených k celkové ploše všech píků v chromatogramu. U hodnot relativního zastoupení jednotlivých látek je v tabulce uvedena průměrná hodnota z výsledků dvou měření na GC/FID. Tabulka 6 také uvádí celková množství jednotlivých skupin sloučenin, která jsou vyznačena tučně.

Ve vzorku esenciálního oleje z chrpovníku lopuchového bylo z celkových 118 detekovaných píků identifikováno 63 sloučenin, které tvořily 98,1 % celkové plochy píků chromatogramu. Převažující zastoupení tvořily terpeny, a to konkrétně 9 monoterpenů, 4 oxidované monoterpeny, 19 seskviterpenů, 14 oxidovaných seskviterpenů a 3 seskviterpenové laktony. Dalšími složkami byly 4 alifatické uhlovodíky, 7 apokarotenoidů, 1 furan, 1 ether a 1 ester.

Složkou s majoritním zastoupením v esenciálním oleji byl aplotaxen ($C_{17}H_{28}$) neboli 1,8,11,14-heptadekatetraen, (Z,Z,Z)-, kterého olej obsahoval průměrně 29,24 %. Druhou nejvíce zastoupenou složkou byl dehydrocostus lakton s průměrným relativním zastoupením 9,37 %. Další složkou vyskytující se ve velkém množství byl β -costol s relativním obsahem 4,80 %. Ze skupiny seskviterpenů esenciální olej v největší míře obsahoval látky (E)- β -karyofylen (3,61 %), (E)- α -ionon (2,73 %), α -selinen (2,71 %), β -elemen (2,32 %) a β -selinen (2,04 %).

3.2.2 Analýza těkavých složek po mikroextrakci tuhou fází

Z celkových 114 detekovaných píků v chromatogramu bylo identifikováno 52 sloučenin, které tvořily 78,7 % celkové plochy chromatogramu v TIC. Všechny identifikované sloučeniny společně s jejich CAS čísly, experimentálně stanovenými retenčními indexy, relativním zastoupením jednotlivých složek uvedeným z průměru dvou měření na GC/FID a celkovým množstvím jednotlivých skupin látek uvádí Tabulka 6.

Identifikované sloučeniny tvořily opět zejména terpeny, konkrétně se jednalo o 3 monoterpeny, 1 oxidovaný monoterpen, 21 seskviterpenů, 12 oxidovaných seskviterpenů a 5 seskviterpenových laktonů. Dalšími stanovenými sloučeninami byly 3 alifatické uhlovodíky, 3 apokarotenoidy, 2 aldehydy a ketony, 1 fenol a 1 ether.

Složkou s největším zastoupením byl stejně jako u vzorku esenciálního oleje aplotaxen (1,8,11,14-heptadekatetraen, (Z,Z,Z)-), který se vyskytoval s průměrným relativním zastoupením 59,28 %. Druhou nejvíce zastoupenou složkou byl opět dehydrocostus lakton s relativním zastoupením 8,12 %. Kromě aplotaxenu byl ve vzorku ve větším množství stanoven také dihydro-aplotaxen (1,8,11-heptadekatrien, (Z,Z)-) v relativním množství 3,55 %. Dalšími látkami zastoupenými ve větší míře byly (E)- β -karyofylen (2,32 %), β -selinen (1,53 %), β -elemen (1,45 %) a α -curcumen (1,31 %) ze skupiny seskviterpenů, dále seskviterpenový lakton dihydrodehydrocostus lakton (1,38 %) a oxidovaný seskviterpen β -costol (1,31 %).

Tabulka 6: Identifikované sloučeniny v kořeni chrpovníku lopuchového po úpravě hydrodestilací (HD) a mikroextrakcí tuhou fází z parního prostoru (HS-SPME) a jejich relativní procentuální zastoupení (n=2)

	CAS	RI	Relativní zastoupení [%]	
			HD	HS-SPME
ALIFATICKÉ UHLOVODÍKY				
Oktan	111-65-9	802	0,05	–
Dihydro-aplotaxen	56134-03-3	1663	1,75	3,55
Aplotaxen	10482-53-8	1668	29,24	59,28
1-Heptadecen	6765-39-5	1695	0,02	0,23
Σ ALIFATICKÉ UHLOVODÍKY			31,06	63,06
MONOTERPENY				
α -Pinen	80-56-8	932	0,13	–
β -Pinen	127-91-3	976	0,31	–
α -Felandren	99-83-2	1006	0,2	0,01
α -Terpinen	99-86-5	1017	0,09	–
<i>p</i> -Cymen	99-87-6	1024	0,55	0,04
Limonen	138-86-3	1029	0,15	–
γ -Terpinen	99-85-4	1058	0,2	0,02
Terpinolen	586-62-9	1085	0,07	–
<i>p</i> -Cymenen	1195-32-0	1090	0,03	–
Σ MONOTERPENY			1,73	0,07

	CAS	RI	Relativní zastoupení [%]	
			HD	HS-SPME
OXIDOVANÉ MONOTERPENY				
Linalool	78-70-6	1101	0,07	–
4-Terpineol	562-74-3	1180	0,44	0,06
α -Terpineol	98-55-5	1195	0,11	–
Karvakrol	499-75-2	1300	0,07	–
Σ OXIDOVANÉ MONOTERPENY			0,69	0,06
APOKAROTENOIDY				
Dihydroedulan	72746-44-2	1287	0,07	–
α -Ionol	25312-34-9	1375	0,1	–
Dihydro- α -ionon	31499-72-6	1412	1,7	0,47
(E)- α -Ionon	127-41-3	1422	2,73	0,81
Nerylaceton	3879-26-3	1429	0,05	–
Geranylaceton	3796-70-1	1448	1,88	0,76
(E)- β -ionon	79-77-6	1479	1,93	–
Σ APOKAROTENOIDY			8,46	2,04
SESKVITERPENY				
β -Elemen	515-13-9	1389	2,32	1,45
(+)-Sativen	3650-28-0	1393	0,07	0,05
Isokaryofylen	118-65-0	1401	–	0,06
β -Longipinen	41432-70-6	1403	0,2	–
α -Cedren	469-61-4	1414	0,17	0,1
(E)- β -Karyofylen	87-44-5	1418	3,61	2,32
(E)- α -Bergamoten	13474-59-4	1433	0,63	0,58
α -Karyofylen	6753-98-6	1454	0,45	0,29
β -Santalen	511-59-1	1457	–	0,02
β -Acoradien	43219-80-3	1465	0,08	0,06
Aristolochen	823810-22-6	1469	0,05	0,03
Selina-4,11-dien	17627-30-4	1473	0,64	0,48
γ -Curcumen	451-55-8	1476	–	0,42
α -Curcumen	644-30-4	1481	1,14	1,31
β -Selinen	17066-67-0	1488	2,04	1,53
Valencen	4630-07-3	1489	–	0,02
α -Selinen	473-13-2	1495	2,71	–
β -Himachalen	1461-03-6	1499	0,05	0,05
β -Bisabolen	4891-79-6	1508	0,07	0,07
(Z)- γ -Bisabolen	13062-00-5	1511	0,36	0,39
β -Seskvifelandren	20307-83-9	1524	0,06	0,16
Selina-4(15),7(11)-dien	58893-88-2	1536	0,05	0,05
(E)- α -Bisabolen	25532-79-0	1541	0,14	0,17
Σ SESKVITERPENY			14,84	9,61

	CAS	RI	Relativní zastoupení [%]	
			HD	HS-SPME
OXIDOVANÉ SESKVITERPENY				
α -Elemol	19078-36-5	1548	0,51	0,19
(E)-Nerolidol	40716-66-3	1561	0,29	0,13
Karyofylen oxid	1139-30-6	1580	0,65	0,29
Humulen epoxid II	19888-34-7	1608	0,05	0,03
γ -Eudesmol	1209-71-8	1632	0,23	0,05
Karyofyla-4(12),8(13)-dien-5 α -ol	19431-80-2	1636	0,3	0,14
β -Eudesmol	473-15-4	1653	0,45	0,14
(Z,E)- α -Bergamotol	88034-74-6	1690	0,64	0,3
(6R,7R)-Bisabolon	72441-71-5	1736	0,04	0,02
γ -Costol	65018-14-6	1745	1,11	0,05
Lanceol, cis	10067-28-4	1755	0,12	–
13-Hydroxy-Valencen	438536-20-0	1758	0,07	–
β -Costol	515-20-8	1769	4,8	1,31
α -Costol	65018-15-7	1772	1,54	0,39
Σ OXIDOVANÉ SESKVITERPENY			10,80	3,04
SESKVITERPENOVÉ LAKTONY				
β -Cyklodihydrocostunolid	22387-64-0	1920	–	0,12
Dihydrodehydrocostus lakton	4955-03-7	1930	1,64	1,38
β -Cyclocostunolid	2221-82-1	1957	0,72	0,38
Dehydrocostuslakton	477-43-0	1984	9,37	8,12
Costunolid	553-21-9	2060	–	0,01
Σ SESKVITERPENOVÉ LAKTONY			11,73	10,01
OSTATNÍ				
2-Pentylfuran	3777-69-3	991	0,03	–
Italicen ether	104188-25-2	1533	0,21	0,03
Methyl linolát	112-63-0	2092	0,02	–
Furfural	98-01-1	829	–	0,04
Acetofenon	552-41-0	1436	–	0,04
<i>o</i> -Cresol	95-48-7	1052	–	0,02
Σ OSTATNÍ			0,26	0,13

3.3 Porovnání výsledků analýz

3.3.1 Porovnání majoritních složek z obou způsobů úpravy vzorku

Tabulka 7 uvádí srovnání nejvíce zastoupených složek ve vzorku kořene chrpovníku lopuchového. U vzorku byly provedeny dva typy extrakce. Část vzorku byla zpracována hydrodestilací, při které vznikl esenciální olej, s druhou částí vzorku byla provedena

mikroextrakce tuhou fází z parního prostoru. Složkou s majoritním obsahem byl při obou stanoveních aplotaxen, který se v extraktu po provedení HS-SPME vyskytoval v relativním zastoupení 59,28 %, u vzorku esenciálního oleje tvořilo relativní zastoupení 29,24 %. Druhou nejvíce zastoupenou složkou byl v obou případech dehydrocostus lakton, kterého se vyskytovalo relativní množství 8,12 % u vzorku po provedení HS-SPME a 9,37 % u EO. V obou vzorcích se výrazněji projevil také obsah (E)- β -karyofylenu, β -selinenu a β -elemenu. β -costol byl ve větší míře obsažen v EO (4,8 %), v extraktu po HS-SPME tvořil pouze (1,3 %). Naopak dihydro-aplotaxen, který tvořil u vzorku po HS-SPME 3,55 %, se v EO vyskytoval méně (1,75 %).

Složení i relativní zastoupení jednotlivých identifikovaných sloučenin ve vzorku se může lišit kvůli způsobu jeho zpracování. Při hydrodestilaci mohou některé sloučeniny (např. estery) podléhat hydrolytickým rozkladným reakcím nebo může docházet k polymeraci u některých citlivých sloučenin (např. aldehydů) [21].

Tabulka 7: Porovnání nejvíce zastoupených složek v závislosti na použité metodě úpravy vzorku před analýzou, HD...hydrodestilace, HS-SPME...mikroextrakce tuhou fází z parního prostoru

HD		HS-SPME	
Složka	Relativní zastoupení [%]	Složka	Relativní zastoupení [%]
Aplotaxen	29,24	Aplotaxen	59,28
Dehydrocostus lakton	9,37	Dehydrocostus lakton	8,12
β -Costol	4,80	Dihydro-aplotaxen	3,55
(E)- β -Karyofylen	3,61	(E)- β -Karyofylen	2,32
(E)- α -Ionon	2,73	β -Selinen	1,53
α -Selinen	2,71	β -Elemen	1,45
β -Elemen	2,32	Dihydrodehydrocostus lakton	1,38
β -Selinen	2,04	β -Costol; α -Curcumen	1,31

3.3.2 Porovnání zastoupení složek z hlediska skupin látek

Při porovnání výsledků z hlediska obsahu látek rozdělených do skupin po provedení jednotlivých technik extrakce je patrné, že pomocí HS-SPME byl získán nižší počet sloučenin ze skupin monoterpenů, oxidovaných monoterpenů a apokarotenoidů, oproti stanovení vzorku

esenciálního oleje získaného hydrodestilací. Při teplotě, která byla pro extrakci použita, se sice tyto sloučeniny pravděpodobně naadsorbovaly na SPME vlákno, ale vzápětí došlo k jejich desorpci. Použití nižší teploty při HS-SPME by pravděpodobně vedlo k identifikaci více látek ze skupin nízkovroucích monoterpenů, nicméně by velmi pravděpodobně poklesnul celkový počet extrahovaných látek. V ostatních skupinách látek nejsou rozdíly v počtu látek z hlediska jednotlivých extrakčních technik tolik výrazné.

Celkově bylo při podmínkách, za kterých byly extrakce prováděny ve vzorku esenciálního oleje identifikováno více sloučenin (63) než v extraktu po provedení HS-SPME (52). Důležité je poznamenat, že s měnící se teplotou při HS-SPME by docházelo ke změnám v celkovém počtu extrahovaných sloučenin a tím i identifikovaných látek. Všechny výsledky jsou podrobněji uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8: Porovnání skupin látek ve vzorku po hydrodestilaci (HD) a po mikroextrakci tuhou fází z parního prostoru (HS-SPME)

Skupina látek	HD		HS-SPME	
	Počet	Relativní zastoupení [%]	Počet	Relativní zastoupení [%]
MONOTERPENY	9	1,73	3	0,07
OXIDOVANÉ MONOTERPENY	4	0,69	1	0,06
APOKAROTENOIDY	7	8,46	3	2,04
SESKVITERPENY	19	14,84	21	9,61
OXIDOVANÉ SESKVITERPENY	14	10,80	12	3,04
SESKVITERPENOVÉ LAKTONY	3	11,73	5	10,01
ALIFATICKÉ UHLOVODÍKY	4	31,06	3	63,06
OSTATNÍ	3	0,26	4	0,13
CELKEM	63	79,57	52	88,02

3.3.3 Porovnání naměřených výsledků s literaturou

Analýzou čtyř různých vzorků komerčně dodávaných esenciálních olejů z kořene chrpovníku lopuchového pomocí GC/MS a GC/FID na koloně HP-1 se zabývá např. příspěvek z konference ve formě plakátového sdělení [60]. Stejně jako v této práci byl ve všech analyzovaných vzorcích nejvíce zastoupenou složkou aploaxen, který se vyskytoval v různých relativních

procentuálních zastoupeních (12,6–35,1 %). Jako další nejvíce zastoupené sloučeniny byly stanoveny dehydrocostunolid a elema-1,3,11(13)-trien-12-ol, které ve vzorku v této práci nebyly vůbec identifikovány. Naopak druhá nejvíce zastoupená sloučenina této práce dehydrocostus lakton nebyla identifikována v žádném z těchto komerčních olejů. Autoři zde vyslovují myšlenku, že složení esenciálního oleje z kořene chrpovníku lopuchového je pravděpodobně závislé na délce destilace, a to zejména z toho důvodu, že laktony s vysokou teplotou varu mohou být z rostlinného materiálu zcela získány až prodloužením destilační doby. Na základě jejich práce je také patrné, že složení jednotlivých esenciálních olejů se liší jednak v množství a druhu identifikovaných sloučenin, ale také v relativních zastoupeních jednotlivých složek.

Analýzou dvou vzorků esenciálního oleje z kořene chrpovníku lopuchového původem z Koreje a Číny se zabývala studie [12]. Hydrodestilace usušeného, nadrceného kořene byla prováděna po dobu 180 min, což je o 30 minut méně než v této práci. Získaný esenciální olej byl analyzován pouze pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, uvedené relativní procentuální zastoupení je tedy stanoveno pouze ze záznamu z hmotnostního spektrometru. Při analýze byla využita kolona HP-5MS. Ve vzorku z Koreje bylo stanoveno 63 sloučenin, což je stejné množství jako v této práci, ve vzorku z Číny to bylo pouze 46 sloučenin. V obou vzorcích byl nejvíce zastoupenou složkou cis,cis,cis-hexadeka-7,10,13-trienal (tvořil 21,2 % v případě vzorku z Koreje a 23,3 % u vzorku z Číny). Stejně jako v této práci byl druhou nejvíce zastoupenou sloučeninou v obou vzorcích dehydrocostus lakton (10,3 % ve vzorku z Koreje a 11 % ve vzorku z Číny).

Ve studii [13] byl analyzován vzorek kořene chrpovníku lopuchového z Indie, jehož těkavé sloučeniny byly extrahovány 6 hodin trvající hydrodestilací. Následná analýza byla provedena na koloně HP-5 na GC/FID a GC/MS. V této studii bylo identifikováno celkem 41 sloučenin (z toho 6 ve stopových množstvích). Největší relativní zastoupení ve zkoumaném vzorku tvořil aldehyd cis,cis,cis-hexadeka-7,10,13-trienal (25,5 %). Druhou nejvíce zastoupenou sloučeninou byl dehydrocostus lakton (16,7 %), kterého se vyskytovalo větší zastoupení než v této práci (9,37 %). V poměrně velkém relativním zastoupení byly ve studii také stanoveny elemol (5,8 %), který byl v této práci stanoven v podstatně nižším relativním zastoupení (0,5 %), a α -ionon (3,9 %), kterého se v této práci stanovilo podobné relativní zastoupení (2,73 %). Odlišné složení a relativní zastoupení sloučenin ve zmiňované studii oproti této práci by mohlo být, mimo další vlivy viz kapitola 1.2.3, způsobeno delší dobou trvání hydrodestilace.

ZÁVĚR

Cílem teoretické části diplomové práce bylo zpracování literární rešerše zabývající se chrpovníkem lopuchovým. V této části je uvedeno jeho charakteristické místo růstu, vlastnosti a vzhled rostliny, typické způsoby jeho využití a chemické složení. Následující kapitoly teoretické části práce popisují možnosti izolace a analýzy těkavých látek. Izolace těkavých sloučenin z rostlinného materiálu se provádí pomocí různých metod. Volba metody se vždy odvíjí od druhu rostlinného materiálu a charakteru izolovaných sloučenin. Esenciální oleje jsou těkavé aromatické kapaliny, které se získávají z rozličných částí rostlinného materiálu zejména pomocí destilačních a extrakčních metod. V případě chrpovníku lopuchového se esenciální oleje získávají z jeho aromatického kořene. V této části je také popsáno využití a chemické složení esenciálních olejů, včetně možných podmínek, které mohou mít vliv na změnu složení.

V experimentální části diplomové práce byla provedena izolace těkavých látek ze vzorku kořene chrpovníku lopuchového pomocí dvou metod. První použitou metodou izolace byla hydrodestilace, při které vznikal esenciální olej. Druhým způsobem izolace byla mikroextrakce tuhou fází z parního prostoru nad tuhým vzorkem, u které byla pomocí série měření provedena optimalizace podmínek provedení. Konkrétně bylo vybíráno nejvhodnější SPME vlákno a optimální doba trvání a teplota při extrakci. Vlastní analýza vzorku byla provedena s využitím plynové chromatografie s hmotnostní detekcí ke zjištění kvalitativního složení a plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem ke stanovení relativního kvantitativního zastoupení jednotlivých látek.

Vzorek obsahoval látky zejména ze skupin terpenů (monoterpeny, oxidované monoterpeny, seskviterpeny, oxidované seskviterpeny, seskviterpenové laktony), dále alifatické uhlovodíky, apokarotenoidy a ojediněle některé ostatní látky (estery, furany, ethery, fenoly, aldehydy a ketony), a to po provedení obou technik izolace. Za podmínek, při kterých byly extrakce prováděny bylo celkově ve vzorku esenciálního oleje identifikováno 63 sloučenin a ve vzorku po provedení HS-SPME 52 sloučenin. Nižší byl u vzorku po HS-SPME zejména počet látek ze skupin monoterpenů a oxidovaných monoterpenů, pravděpodobně kvůli teplotě použité při extrakci.

Po provedení obou způsobů izolace byl jako hlavní složka identifikován alifatický uhlovodík apilotaxen (1,8,11,14-heptadecatetraen, (Z,Z,Z)-), který se u vzorku esenciálního oleje vyskytoval v relativním zastoupení 29,24 %, ve vzorku po HS-SPME tvořilo relativní zastoupení 59,28 %. Druhou majoritní látkou byl v obou případech seskviterpenový lakton

dehydrocostus lakton, kterého se vyskytovalo relativní množství 9,37 % u vzorku esenciálního oleje a 8,12 % u vzorku po provedení HS-SPME. Dalšími látkami zastoupenými ve větším množství byly apokarotenoid (E)- α -ionon, seskviterpeny β -elemen, (E)- β -karyofylen, α -curcumen, β -selinen, α -selinen a oxidovaný seskviterpen β -costol.

Při porovnání výsledků analýz s dostupnou literaturou byly zjištěny rozdíly, jak ve složení, tak v relativním zastoupení jednotlivých složek. Tyto rozdíly mohou být způsobeny mnoha faktory, např. technikou použitou k extrakci a podmínkami jejího provedení, způsobem a délkou skladování vzorku, podmínkami při růstu rostlinného materiálu, stářím v době sklizně a zpracováním rostlinného materiálu před extrakcí. Množství identifikovaných látek se může měnit také vlivem parametrů použitých při analýze, např. použitým teplotním programem nebo typem kolony. Všechny tyto faktory mohou přispívat ke změnám ve složení a obsahu jednotlivých látek a porovnání s literaturou sloužilo jako ukázka dalších studií, ve kterých byla provedena analýza vzorku chrpovníku lopuchového.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] PANDEY, Madan Mohan; RASTOGI, Subha; RAWAT, Ajay Kumar Singh. Saussurea costus: botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant. *Journal of ethnopharmacology*, 2007, 110.3: 379-390.
- [2] KASANA, Shruti; DWIVEDI, Mayank D.; UNİYAL, P. L. Taxonomic Status of Saussurea costus (Falc.) Lipsch. (Asteraceae: Cardueae): a critically endangered species from Himalaya, India.
- [3] SAHA, D., VED, D., RAVIKUMAR, K. & HARIDASAN, K. [online]. *Saussurea costus*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2015 [cit. 2019-10-21]. Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/50126641/50131430>
- [4] MADHURI, K.; ELANGO, K.; PONNUSANKAR, S. Saussurea lappa (Kuth root): review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 2012, 12.1: 1-9.
- [5] PHARMACOPOEIA, Indian Herbal. Indian drug manufacturers' Association. *Revised edition. Mumbai: Indian Herbal Pharmacopoeia*, 2002, 493: 494.
- [6] LIU, Zhi Long, et al. Essential oil composition and larvicidal activity of Saussurea lappa roots against the mosquito Aedes albopictus (Diptera: Culicidae). *Parasitology research*, 2012, 110.6: 2125-2130.
- [7] ZAHARA, Kulsoom, et al. A review of therapeutic potential of Saussurea lappa-An endangered plant from Himalaya. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 2014, 7: S60-S69.
- [8] MADHURI, K.; ELANGO, K.; PONNUSANKAR, S. Saussurea lappa (Kuth root): review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 2012, 12.1: 1-9.
- [9] CHOPRA, R. N.; NAYAR, S. L.; CHOPRA, I. C. Glossary of Indian medicinal plants CSIR publication. *New Delhi*, 1956.
- [10] WYNN, Susan G. Safe Substitutes for Endangered Herbs: Plant Conservation and Loss of Our Medicines. In: *Veterinary Herbal Medicine*. Mosby, 2007. p. 265-271.

- [11] TRADITIONAL CHINESE MEDICINE: What You Need To Know [online]. *National Center for Complementary and Integrative Health (NCCIH)*. October 2013 [cit. 2019-12-07]. Dostupné z: <https://nccih.nih.gov/health/whatiscam/chinesemed.htm>
- [12] CHANG, Kyung-Mi; KIM, Gun-Hee. Comparison of volatile aroma components from *Saussurea lappa* CB Clarke root oils. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2008, 13.2: 128-133.
- [13] GWARI, Garima, et al. Volatile constituents of *Saussurea costus* roots cultivated in Uttarakhand Himalayas, India. *Pharmacognosy research*, 2013, 5.3: 179.
- [14] LI, Yang, et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 98.3: 329-333.
- [15] LEE, Gyeong-Im, et al. Inhibitory effects of oriental herbal medicines on IL-8 induction in lipopolysaccharide-activated rat macrophages. *Planta Medica*, 1995, 61.01: 26-30.
- [16] CHO, Jae Youl, et al. In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 398.3: 399-407.
- [17] KO, Seong Gyu, et al. *Saussurea lappa* induces G2-growth arrest and apoptosis in AGS gastric cancer cells. *Cancer letters*, 2005, 220.1: 11-19.
- [18] LEE, Min-Goo, et al. Constunolide Induces Apoptosis by ROS-mediated Mitochondrial Permeability Transition and Cytochrome C Release. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 24.3: 303-306.
- [19] SUTAR, Niranjana, et al. Antiulcerogenic activity of *Saussurea lappa* root. *Int J Pharm Life Sci*, 2011, 2.1: 516-520.
- [20] BAKKALI, Fadil, et al. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 2008, 46.2: 446-475.
- [21] UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION, et al. *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies, 2008.

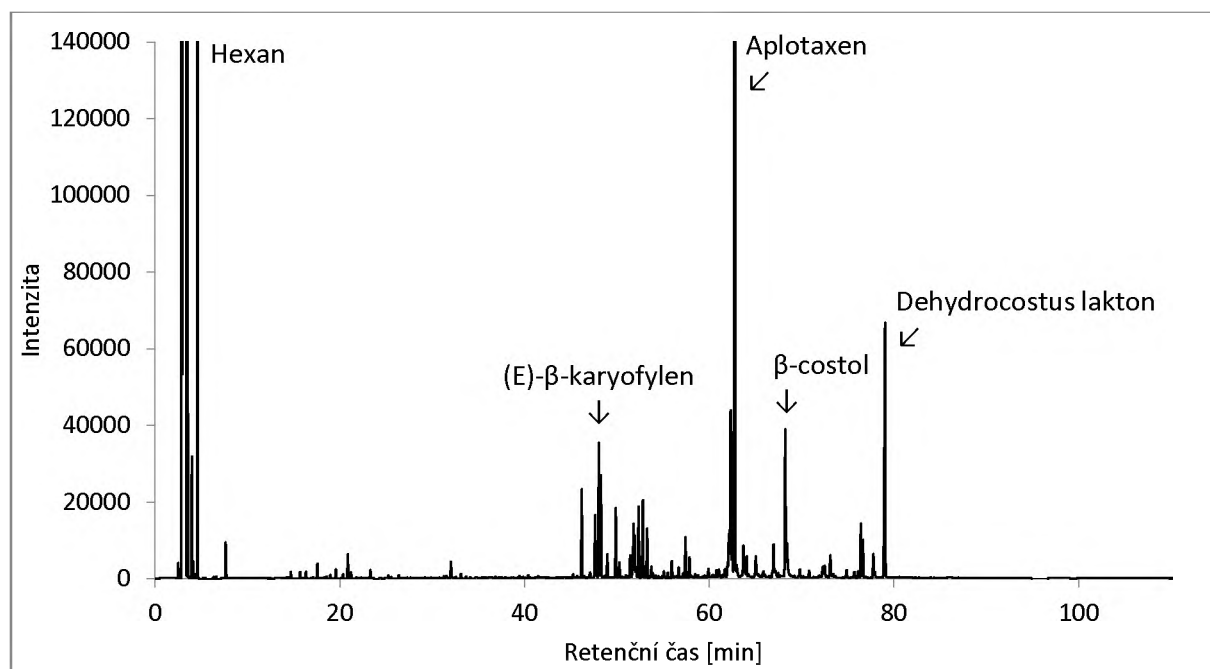
- [22] BASER, K. Husnu Can; BUCHBAUER, Gerhard. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC press, 2015.
- [23] DJILANI, Abdelouaheb; DICKO, Amadou. The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition, well-being and health*, 2012, 7: 155-179.
- [24] PAVELA, Roman. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. *Industrial crops and products*, 2015, 76: 174-187.
- [25] OLDFIELD, Eric; LIN, Fu-Yang. Terpene biosynthesis: modularity rules. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51.5: 1124-1137.
- [26] LUDWICZUK, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GEORGIEV, M. I. Terpenoids. In: *Pharmacognosy*. Academic Press, 2017. p. 233-266.
- [27] MARRIOTT, Philip J.; SHELLIE, Robert; CORNWELL, Charles. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 2001, 936.1-2: 1-22.
- [28] MISHARINA, T. A. Influence of the duration and conditions of storage on the composition of the essential oil from coriander seeds. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2001, 37.6: 622-628.
- [29] FEDOTOVA, Irina Anatolyevna, et al. Change of the chemical composition of essential oils during storage. *Plant Biology and Gardening: Theory, Innovation*, 2019, 151: 66-75.
- [30] RASSEM, Hesham HA; NOUR, Abdurahman H.; YUNUS, Rosli M. Techniques for extraction of essential oils from plants: a review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2016, 10.16: 117-127.
- [31] FERHAT, Mohamed A.; MEKLATI, Brahim Y.; CHEMAT, Farid. Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 2007, 22.6: 494-504.
- [32] HANDLÍŘ, Karel. *Laboratorní cvičení z obecné a anorganické chemie I*. Vyd. 3. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012. ISBN 978-80-7395-535-9.

- [33] AHMAD, Zainal Abidin Bin, et al. Hydro-distillation process in extracting of agarwood essential oil. 2015.
- [34] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [35] POURMORTAZAVI, Seied Mahdi; HAJIMIRSADEGHI, Seiedeh Somayyeh. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A*, 2007, 1163.1-2: 2-24.
- [36] LANG, Qingyong; WAI, Chien M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 2001, 53.4: 771-782.
- [37] JULIASIH, Ni Luh Gede Ratna, et al. Supercritical fluid extraction of quinones from compost for microbial community analysis. *Journal of Chemistry*, 2015, 2015.
- [38] LABICOM: SPME [online]. 2019 HPST, s.r.o. [cit. 2019-12-31]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/priprava-vzorku-prislusenstvi/spme>
- [39] MENDELU: Extrakční techniky [online]. *Univerzitní informační systém Mendelovy univerzity v Brně* [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968
- [40] SIGMAALDRICH: Fiber Selection Guide [online]. 2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany [cit. 2020-03-13]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/selecting-spme-fibers.html>
- [41] MÜLLER, L.; GORECKI, T.; PAWLISZYN, J. Solid-Phase Microextraction in Analysis of Pollutants in the Field. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 2006.
- [42] SCHMIDT, Kamila; PODMORE, Ian. Current challenges in volatile organic compounds analysis as potential biomarkers of cancer. *Journal of biomarkers*, 2015, 2015.
- [43] SNOW, Nicholas H.; SLACK, Gregory C. Head-space analysis in modern gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21.9-10: 608-617.

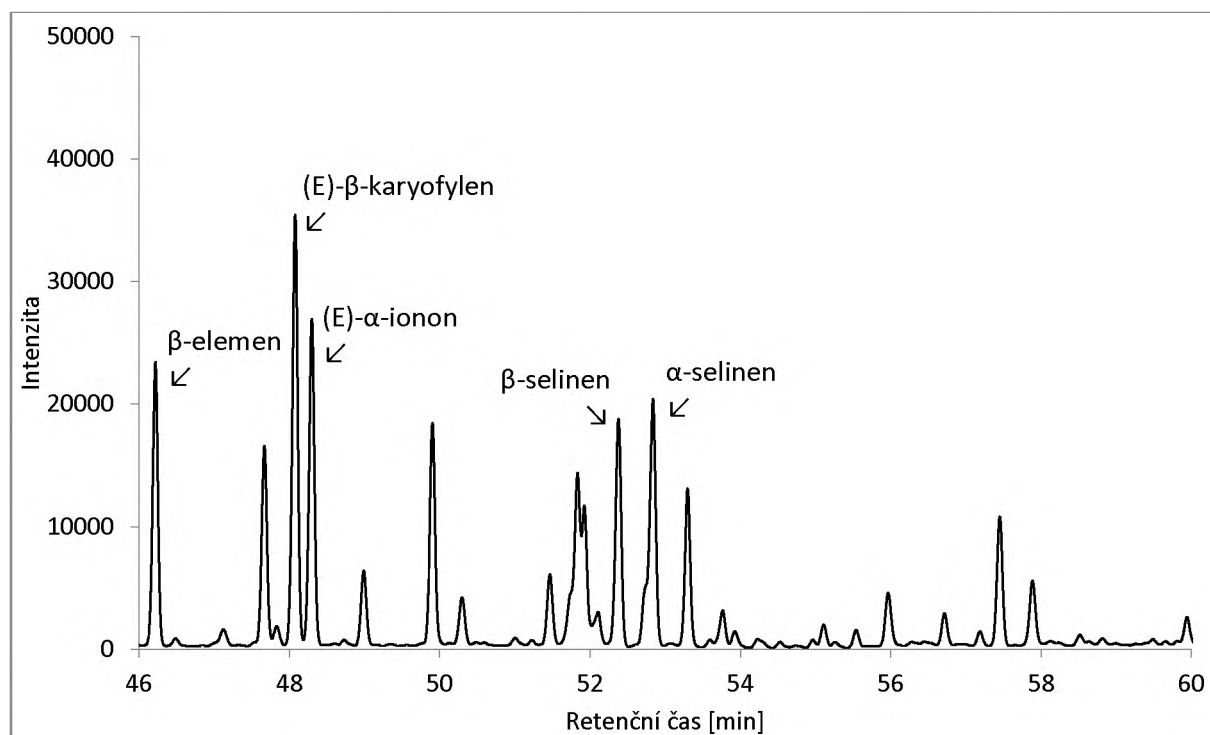
- [44] ŠTĚRBA, K.; DOSTÁLEK, P.; KARABÍN, M. Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu. *Chemické listy*, 2011, 105: 603-610.
- [45] VSCHT: TYPY KOLON A STACIONÁRNÍCH FÁZÍ V PLYNOVÉ CHROMATOGRAFII [online]. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*. [cit. 2020-02-11]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-4%20GC-2-KOLONY-SF_JP2018.pdf
- [46] SIGMAALDRICH: GC Column Selection Guide [online]. 2020, *Merck KGaA, Darmstadt, Germany* [cit. 2020-03-24]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/t407133.pdf
- [47] ZACHAŘ, P.; SÝKORA, D. Plynová chromatografie [online]. [cit. 2020-01-29]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>
- [48] MUNI: HLAVNÍ ČÁSTI PLYNOVÉHO CHROMATOGRAFU [online]. *Informační systém Masarykovy univerzity* [cit. 2020-01-29]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2005/C6390/um/365564/gc_popis_metody.pdf
- [49] MCWILLIAM, I. G. The comparison of detectors for gas chromatography. *Journal of Applied Chemistry*, 1959, 9.7: 379-388.
- [50] JANDERA, Pavel. *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů*. Vyd. 3. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. ISBN 978-80-7395-392-8.
- [51] HOLČAPEK, Michal, et al. Molekulová spektrometrie [online]. *Mass Spectrometry Group, Univerzita Pardubice* [cit. 2020-02-01]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf
- [52] JALALI-HERAVI, Mehdi; ZEKAVAT, Behrooz; SERESHTI, Hassan. Characterization of essential oil components of Iranian geranium oil using gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometric resolution techniques. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1114.1: 154-163.

- [53] HOLEC, Tomáš. *Plánovaný experiment*. Brno, 2016. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Josef Bednář.
- [54] NIST: Central Composite Designs (CCD) [online]. *National Institute of Standards and Technology* [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm>
- [55] SUCHÁNKOVÁ, Petra. *Analýza syntetických potravinářských barviv s využitím metody QuEChERS*. Pardubice, 2012. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Martin Adam.
- [56] YOON, Minseok, et al. Optimization of the processing conditions for the preparation of surimi products containing rice flour. *Fisheries and aquatic sciences*, 2014, 17.2: 167-173.
- [57] AYDAR, Alev Yüksel. Utilization of response surface methodology in optimization of extraction of plant materials. *Statistical Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes. InTech*, 2018, 157-169.
- [58] BRADLEY, Nuran. *The response surface methodology*. 2007. PhD Thesis. Indiana University South Bend.
- [59] TCEQ: Chemical Abstract Service (CAS) Numbers Information [online]. *Texas Commission On Environmental Quality* [cit. 2020-03-17]. Dostupné z: <https://www.tceq.texas.gov/assets/public/permitting/tier2/CAS-numbers.pdf>
- [60] WANNER, Juergen. Some rectifications on the composition of costus root oil (*Saussurea costus* (Falc.) Lipsch) and absolute and GC-MS-FID analyses thereof. *46th International Symposium on Essential Oils, At Lublin, Poland*, 2015.

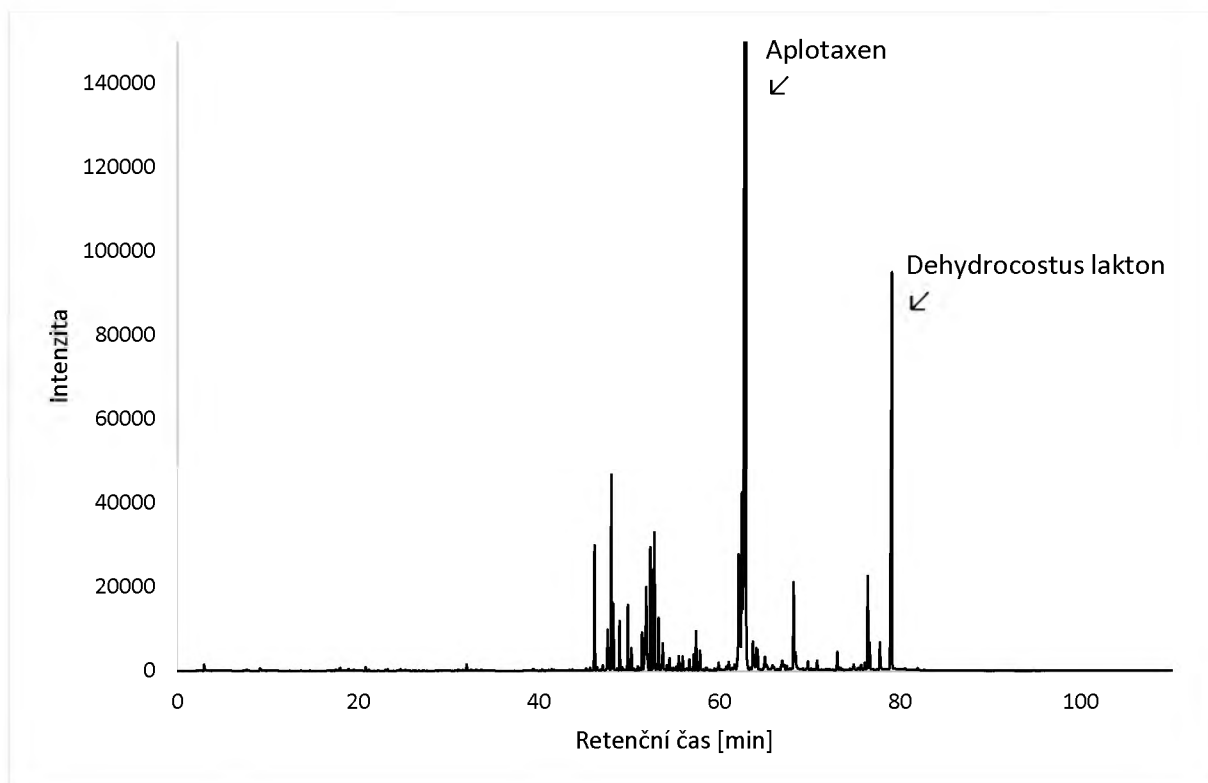
PŘÍLOHY



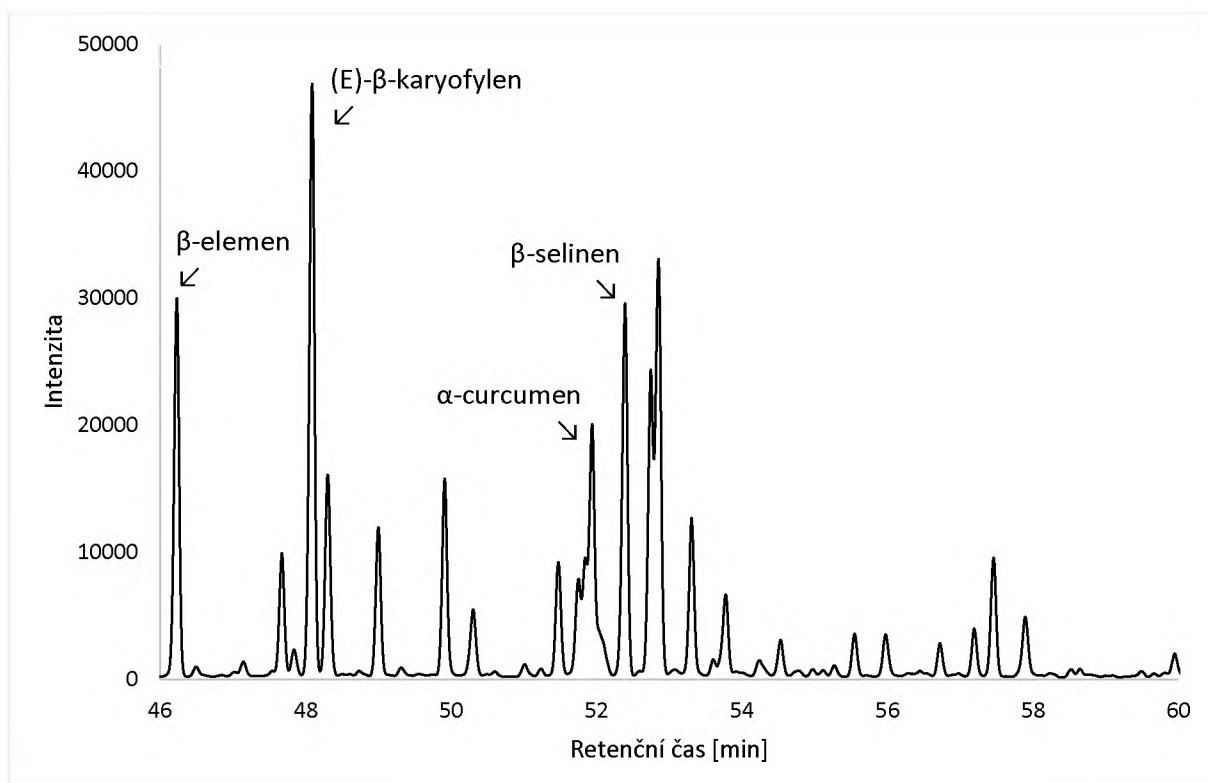
Příloha 1: Chromatogram z GC/FID esenciálního oleje chrpovníku lopuchového po provedení hydrodestilace



Příloha 2: Chromatogram z GC/FID esenciálního oleje chrpovníku lopuchového po provedení hydrodestilace s přiblížením oblasti retenčního času 46–60 minut



Příloha 3: Chromatogram z GC/FID chrpovníku lopuchového po provedení mikroextrakce tuhou fází z parního prostoru



Příloha 4: Chromatogram z GC/FID chrpovníku lopuchového po provedení mikroextrakce tuhou fází z parního prostoru s přiblížením oblasti retenčního času 46–60 minut