

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCA

2021

Bc. Jana Kubáleková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Využitie extrakcie nadkritickou tekutinou pre extrakciu polárnych a nepolárnych
látok z orechov

Bc. Jana Kubáleková

Diplomová práca

2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projekt, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana Kubáleková**
Osobní číslo: **C19484**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Využitie extrakcie nadkritickou tekutinou pre extrakciu polárných a nepolárných látok z orechov**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na extrakce nadkritickou tekutinou a možnostmi extrakce organických sloučenin z různých typů ořechů.
2. V experimentální části extrahujte vybrané typy ořechů nadkritickou tekutinou ve třech módech – a to extrakce statická bez přídavku a s přídavkem modifikátoru a dynamická. Všechny typy extraktů proměřte na GC-MS a porovnejte kvalitativní zastoupení z jednotlivých extrakcí. Identifikované sloučeniny v jednotlivých extraktech porovnejte s dostupnou literaturou a diskutujte je.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

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

Konzultanti diplomové práce: **Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Ing. Martina Machová
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prehlasujem:

Prácu s názvom Využitie extrakcie nadkritickou tekutinou pre extrakciu polárnych a nepolárnych látok z orechov som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 ods. 1 autorského práva, a s tým, že pokiaľ dôjde k použitiu tejto mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov a smernicou Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pre odovzdávanie, zverejňovanie a formálnu úpravu záverečných prác, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejnená prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice

V Pardubiciach dňa

.....

Bc. Jana Kubáleková

Pod'akovanie

V prvom rade by sa chcela veľmi poďakovať doc. Ing. Petre Bajerovej, Ph.D., za možnosť písania diplomovej práce pod jej vedením, trpezlivosť, cenné rady a pripomienky. Zároveň za čas, ktorý mi bola ochotná venovať počas spracovania diplomovej práce. Veľké ďakujem patrí aj Ing. Tomášovi Bajerovi, Ph.D., za jeho čas, trpezlivosť, cenné rady a ochotu kedykoľvek pomôcť a poradiť. Taktiež ďakujem Ing. Martine Machovej, ktorá bola nápomocná pri prevádzaní experimentálnej časti.

Zároveň ďakujem mojej rodine, ktorá ma vždy podporovala a verila mi po celú dobu štúdia.

ANOTÁCIA

Diplomová práca je zameraná na extrakty získané z rôznych druhov rastlinných matric. Teoretická časť je vo všeobecnosti zameraná na esenciálne oleje, najmä na ich vlastnosti a možnosti ich získania. Ďalej sa zaoberá konvenčnými technikami (hydrodestilácia, parná destilácia, lisovanie) a inovatívnymi postupmi, ktoré prinášajú niekoľko výhod (extrakcia nadkritickou tekutinou, destilácia s podporou mikrovlnného ohrevu). Veľká časť teoretickej časti je venovaná extrakcii nadkritickou tekutinou. Práca sa tiež zaoberá analýzou prchavých látok prostredníctvom plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou (GC-MS). V experimentálnej časti je extrakcia nadkritickou tekutinou prevádzaná v troch rôznych módoch (statická, statická s modifikátorom, dynamická). Skúma ich vplyv na zloženie extraktov, získaných z orechov (kokosový orech, pekanový orech, lieskový orech, betelový orech, muškátový orech, para orech). Extrakty sú analyzované prostredníctvom GC-MS. Získané výsledky sú porovnávané s dostupnou literatúrou.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Kokosový orech, pekanový orech, lieskový orech, betelový orech, muškátový orech, para orech, extrakt, extrakcia nadkritickou tekutinou, chromatografia

TITTLE

Use of supercritical fluid extraction for extraction of polar and non-polar substances from nuts

ANNOTATION

This diploma thesis is focused on extracts obtained from various types of plant matrices. The theoretical part is generally based on essential oils, mostly on their properties and possibilities of their recovery. This part also deals with conventional techniques (hydrodistillation, steam distillation, pressing) and innovative processes that bring number of advantages (supercritical fluid extraction, distillation with the support of microwave heating). Major part of theoretical part is dedicated to supercritical fluid extraction. Thesis is also focused on analyses of volatile compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Experimental part contains supercritical fluid extraction is performed in three different modes (static, static with modifier, dynamic). It includes studies of these extraction techniques and their influence on the composition of extracts obtained from nuts (coconut, pecan nut, hazelnut, betel nut, nutmeg, para nut). Extracts are analysed by GC-MS. Obtained results are compared with data available from scientific literature.

KEYWORDS

Coconut, pecan nut, hazelnut, betel nut, nutmeg, para nut, extract, supercritical fluid extraction, chromatography

Obsah

Zoznam obrázkov	12
Zoznam tabuliek	13
Zoznam príloh.....	14
Zoznam skratiek a značiek.....	15
Úvod	17
1 Teoretická časť	18
1.1 „Zelená chémia“	18
1.2 Extrakčné techniky a esenciálne oleje	20
1.2.1 Extrakcia s kvapaliny do kvapaliny.....	20
1.2.2 Extrakcia tuhou fázou.....	21
1.2.3 Mikroextrakcia tuhou fázou	21
1.2.4 QuEACHERS technika	22
1.3 Esenciálne oleje a extrakty, získané konvenčnými a nekonvenčnými technikami	22
1.3.1 Konvenčné techniky, využívané na získanie esenciálneho oleja z rastlinných matric.....	22
1.3.1.1 Porovnanie zloženia esenciálnych olejov získaných rôznymi extrakčnými postupmi	24
1.3.2 Inovatívne techniky, používané na získanie esenciálneho oleja	24
1.3.2.1 Porovnanie zloženia extraktu získaného SFE s ostatnými metódami	25
1.3.3 Laboratórna výroba esenciálnych olejov	25
1.4 Extrakcia nadkritickou tekutinou	25
1.4.1 Módy extrakcie nadkritickou tekutinou.....	26
1.4.2 Použitie nadkritickej tekutiny.....	26
1.4.3 Použitie SFE a nadkritických tekutín v rôznych oblastiach a aktuálne trendy.....	29
1.4.4 Prevedenie SFE spolu s ostatnými technikami.....	30
1.4.5 Optimalizácia podmienok pri použití SFE	34
1.5 Orechy	35
1.5.1 Delenie orechov podľa gastronomického a botanického hľadiska.....	37
1.5.1.1 Kokosový orech	37
1.5.1.2 Lieskový orech	37
1.5.1.3 Pekanový orech	38
1.5.1.4 Betelový orech	38

1.5.1.5	Muškatový orech	38
1.5.1.6	Para orech	39
1.5.2	Látky obsiahnuté v orechoch	39
1.5.2.1	Celkový obsah fenolických zlučenín	39
1.5.2.2	Flavonoidy	39
1.5.2.3	Fytosteroly	40
1.5.2.4	Terpény	40
1.6	Inštrumentálna analýza	42
1.6.1	Plynová chromatografia	42
1.6.1.1	Detektory používané v plynovej chromatografii	42
1.6.2	Hmotnostná spektrometria	44
1.6.3	Plynová chromatografia - hmotnostná spektrometria	45
1.6.3.1	Ionizačné techniky	45
1.6.3.2	Hmotnostné analyzátory	47
1.6.3.3	Kvalitatívna a kvantitatívna analýza	48
2	Experimentálna časť	50
2.1	Analýza	50
2.1.1	Chemikálie a plyny použité pri prevádzaní praktickej časti diplomovej práce	50
2.1.2	Prístroje, ktoré boli využité k prevedeniu experimentálnej časti diplomovej práce.....	50
2.1.3	Pomocný materiál a zariadenia	50
2.1.4	Vzorky	51
2.1.4.1	Príprava vzorky k analýze	51
2.2	Prevedenie extrakcie nadkritickou tekutinou	52
2.2.1	Postup extrakcie nadkritickou tekutinou	52
2.2.2	Helix SFE zariadenie	52
2.3	Chromatografická analýza	53
3	Výsledky a diskusia	54
3.1	Vplyv použitej SFE na výťažnosť aromatických látok	54
3.2	Vyhodnotenie extrakčných techník s využitím kokosového orechu ako vzorky	55
3.2.1	Porovnanie profilu látok extraktu kokosového orechu získaného SFE s dostupnou zahraničnou literatúrou	59
3.3	Vyhodnotenie profilu látok zastúpených v extrakte muškátového orechu s využitím troch typov extrakcií	63

3.3.1	Porovnanie profilu látok extraktu muškátového orechu s dostupnou literatúrou	68
3.4	Vyhodnotenie profilu látok zastúpených v extrakte betelového orechu.....	71
3.4.1	Porovnanie profilu látok extraktu betelového orechu s dostupnou literatúrou.....	74
3.5	Vyhodnotenie profilu látok zastúpených v extrakte pekanového orechu s využitím troch typov extrakcií.....	77
3.5.1	Porovnanie profilu látok extraktu pekanového orechu s dostupnou literatúrou.....	81
3.6	Vyhodnotenie profilu látok zastúpených v extrakte brazílskeho (para) orechu ..	85
3.6.1	Porovnanie profilu látok extraktu para orechu s dostupnou literatúrou	88
3.7	Vyhodnotenie profilu látok zastúpených v extraktoch lieskového orechu.....	92
3.7.1	Porovnanie profilu látok extraktu lieskového orechu s dostupnou literatúrou.....	96
4	Záver	99
5	Zoznam použitej literatúry	100
6	Prílohy	109

Zoznam obrázkov

Obrázok 1:	12 základných princípov „zelenej chémie“ (prevzaté a upravené z [3]).....	19
Obrázok 2:	Princíp extrakcie tuhou fázou (prevzaté a upravené z [8]).....	21
Obrázok 3:	Diagram extrakcie nadkritickou tekutinou (prevzaté a upravené z [21]).....	25
Obrázok 4:	Fázový diagram CO ₂ (prevzaté a upravené z [18]).....	28
Obrázok 5:	Schéma offline módu SFE extraktoru (prevzaté a upravené z [39]).....	31
Obrázok 6:	Tvar píkov pre rozpustné (A) a nerozpustné (B) analyty v nadkritickej tekutine (prevzaté a upravené z [45]).....	33
Obrázok 7:	Schéma pre rozdelenie fytochemických látok obsiahnutých v esenciálnych olejoch rastlinných matric (prevzaté a upravené z [64]).....	36
Obrázok 8:	Štruktúra vybraných flavonoidov (prevzaté a upravené z [64]).....	40
Obrázok 9:	Schéma plynového chromatografu 1 - zásobná fľaša nosného plynu, 2 - ventil, 3 - regulátor prietoku, 4 - dávkovacie zariadenie, 5 - termostat, 6 - kolóna, 7 - detektor, 8 - spracovanie dát(prevzaté a upravené z [68]).....	42
Obrázok 10:	Základná schéma hmotnostného spektrometru (prevzaté a upravené z [72]) ...	44
Obrázok 11:	Schéma usporiadania GC-MS (prevzaté a upravené z [75]).....	45
Obrázok 12:	Zariadenie Spe-ed SFE Helix pre SFE extrakciu	51
Obrázok 13:	Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch kokosového orechu.....	58
Obrázok 14:	Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch muškátového orechu.....	67
Obrázok 15:	Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch betelového orechu	73
Obrázok 16:	Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch pekanového orechu.....	80
Obrázok 17:	Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch para orechu	87
Obrázok 18:	Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch lieskového orechu.....	95

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1:	Kritické podmienky pre rôzne rozpúšťadlá [18, 31]	27
Tabuľka 2:	Hustota, difuzivita, vizkozita pre kvapaliny, plyny a nadkritické tekutiny [29]	28
Tabuľka 3:	Delenie terpenov aj s príslušnými počtami uhlíkov [67]	40
Tabuľka 4:	Vybrané terpeny, prítomné v esenciálnych olejoch a extraktoch rastlinných matric [67]	41
Tabuľka 5:	Princípy detektorov používaných v GC [70]	43
Tabuľka 6:	Súhrnná tabuľka pre použité vzorky v praktickej časti	51
Tabuľka 7:	Parametre používané pre SFE Helix zariadenie [83]	53
Tabuľka 8:	Podmienky pre statickú, statickú s modifikátorom a dynamickú extrakciu	54
Tabuľka 9:	Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch kokosového orechu	56
Tabuľka 10:	Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS analýzy v dostupnej literatúre pre kokosový orech	62
Tabuľka 11:	Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch muškátového orechu	64
Tabuľka 12:	Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS analýzy v dostupnej literatúre pre muškátový orech	70
Tabuľka 13:	Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch betelového orechu	72
Tabuľka 14:	Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS analýzy v dostupnej literatúre pre betelový orech	76
Tabuľka 15:	Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch pekanového orechu	78
Tabuľka 16:	Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS a GC-FID analýzy v dostupnej literatúre pre pekanový orech	84
Tabuľka 17:	Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch para orechu	86
Tabuľka 18:	Charakteristika profilu mastných kyselín para orechu v jednotlivých extrakčných technikách [108]	88
Tabuľka 19:	Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS a GC-FID analýzy v dostupnej literatúre pre para orech	91
Tabuľka 20:	Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch lieskového orechu	93
Tabuľka 21:	Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS a GC-FID analýzy v dostupnej literatúre pre lieskový orech	98

Zoznam príloh

Príloha 1: Homologická rada n-alkánov	109
Príloha 2: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky kokosového orechu	109
Príloha 3: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky muškátového orechu	110
Príloha 4: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky betelového orechu	110
Príloha 5: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky pekanového orechu	111
Príloha 6: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky para orechu	111
Príloha 7: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky lieskového orechu	112

Zoznam skratiek a značiek

CAS	registračné číslo (Registry number)
CI	chemická ionizácia (Chemical ionization)
DHS	dynamická head-space (Dynamic head-space)
DMADP	dimetylallyl difosfát (Dimethylallyl diphosphate)
ECD	detektor elektrónového záchytu (Electron capture detector)
EFSA	Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (European Food Safety Authority)
EI	elektrónová ionizácia (Electron ionization)
FDA	Správa potravín a liečív (Food and Drug Administration)
FID	plameňovo ionizačný detektor (Flame ionization detector)
GC	plynová chromatografia (Gas chromatography)
GC-MS	spojenie plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (Gas chromatography-mass spectrometry)
GCP	geranyl difosfát (Geranyl diphosphate)
HD	hydrodestilácia (Hydrodistillation)
HS	head-space
HS-SPME	mikroextrakcia tuhou fázou s head-space dávkovaním (Head-space solid phase microextraction)
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (High-performance liquid chromatography)
ID	vnútorný priemer (Inner diameter)
IDP	izopentenyl difosfát (Isopentenyl diphosphate)
LDL	lipoproteín s nízkou hustotou (Low density lipoproteins)
LLE	extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (Liquid-liquid extraction)
MS	hmotnostná spektrometria (Mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria (Tandem mass spectrometry)
MSD	hmotnostná selektívna detekcia (Mass selective detection)
5 - MTHF	5-metyltetrahydrofolát (5-metyltetrahydrofolate)
MUFA	mononenасыtené masťné kyseliny (Monounsaturated fatty acids)
PSD	periodický staticko-dynamický postup (Periodic static-dynamic procedure)

Zoznam skratiek a značiek

PUFA	polynenasýtené mastné kyseliny (Polyunsaturated fatty acids)
SC	konvenčná semikontinuálna metóda (Conventional semicontinuous method)
SCD	chemiluminescenčný detektor selektívny pre síru (Sulfur chemiluminescence detector)
SD	parná destilácia (Steam distillation)
SDE	súčasná destilácia parou a extrakcia (Simultaneous steam distillation and extraction)
SFC	nadkritická kvapalinová chromatografia (Supercritical fluid chromatography)
SFE	extrakcia nadkritickou tekutinou (Supercritical fluid extraction)
SFE-HPLC	extrakcia nadkritickou tekutinou v spojení s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography)
SFE-SFC	spojene extrakcie nadkritickou tekutinou s nadkritickou kvapalinovou chromatografiou (Supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography)
SIM	záznam vybraného iónu (Selected ion recording)
SPE	extrakcia tuhou fázou (Solid phase extraction)
SPME	mikroextrakcia tuhou fázou (Solid phase microextraction)
TCD	tepelne vodivostný detektor (Thermal conductivity detector)
TIC	celkový iónový prúd (Total ion current)
TLC	tenkovrstvová chromatografia (Thin-layer chromatography)
Q	kvadrupól (Quadrupole)
QuECHERS	rýchla, ľahká, lacná, efektívna, robustná, bezpečná („Quick, easy, cheap, effective, rugged, safe“)

Úvod

Éterické oleje, získané z rôznych rastlinných matric, sú charakteristické svojimi antioxidantnými, hojivými, protizápalovými, antivírusovými a antimikrobiálnymi vlastnosťami. Z tohto dôvodu sa už od nepamäti využívajú vo farmaceutickom, kozmetickom priemysle a v tradičných liečebných postupoch. Okrem iného nachádzajú uplatnenie aj v potravinárskom priemysle, ako rôzne dochucovadlá.

Oleje sú tvorené predovšetkým prchavými a nestabilnými molekulami. Existuje niekoľko spôsobov, ktorými možno získať esenciálny olej z rôznych matric - extrakčné techniky, hydrodestilácia, lisovanie za studena. Väčšina metód je časovo veľmi náročná, preto bola vyvinutá extrakcia nadkritickou tekutinou, s cieľom znížiť náročnosť daného procesu. Voľba techniky je závislá od charakteru vzorky. Napríklad, v prípade hydrodestilácie sa vplyvom vysokej teploty, môžu vysoko prchavé látky odpariť. Extrakcia nadkritickou tekutinou nachádza uplatnenie najmä v potravinárstve, pokiaľ rozpúšťadlá splňajú podmienky súvisiace s bezpečnosťou potravín a nevytvárajú žiadne škodlivé produkty.

Aj napriek tomu, že priaznivý účinok na ľudský organizmus každého jedného orechu nie je ešte doposiaľ dokonale preštudovaný, je potrebné poukázať na dôležitosť konzumácie tejto potraviny. Rôzne svetové štúdie a výskumy naznačujú, že pravidelná konzumácia orechov by mohla priaznivo pôsobiť na rôzne ochorenia ako sú hypertenzia, diabetes mellitus, ale aj kardiovaskulárne ochorenia. Po rastlinných olejoch sú najbohatšou matricou na mastné kyseliny. Tiež sú obohatené o tokoferoly, vlákninu, minerálne látky a vitamíny. Existujú však aj zvýšené obavy z konzumácie orechov, kvôli nožnej kontaminácii plesňami. Prítomnosť plesní je závislá od rôznych faktorov - klimatické podmienky, skladovanie, zber, druh plesne a jej genetické vybavenie.

Cieľom tejto diplomovej práce je sledovať profil látok v extraktoch, obsiahnutých v rôznych rastlinných matriciach (lieskový, pekanový, kokosový, muškátový, betelový a para orech) práve s využitím extrakcie nadkritickou tekutinou v rôznych módoch (statická, statická s modifikátorom a dynamická), s aplikáciou moderných technológií.

1 Teoretická časť

Prvá časť diplomovej práce je zameraná na popis a princípy jednotlivých extrakčných techník, so zameraním na extrakciu nadkritickou tekutinou, ktorá bola aplikovaná v praktickej časti tejto práce. Ďalej je táto časť zameraná na možnosti, ktorými získať esenciálne oleje a extrakty z rôznych rastlinných matric a ich charakterizáciu prostredníctvom plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou (GC-MS). Teoretická časť venuje pozornosť aj profilu látok, prítomných v orechoch a ich charakteristike.

1.1 „Zelená chémia“

Je definovaná ako „návrh chemických výrobkov a procesov na zníženie alebo vylúčenie používania a tvorby nebezpečných látok“. Koncept „zelenej chémie“ bol po prvýkrát sformulovaný v 90. rokoch. Vyznačuje sa snahou navrhnuť mechanizmy chemických syntéz tak, aby boli znemožnené alebo čiastočne eliminované nežiadúce dôsledky [1].

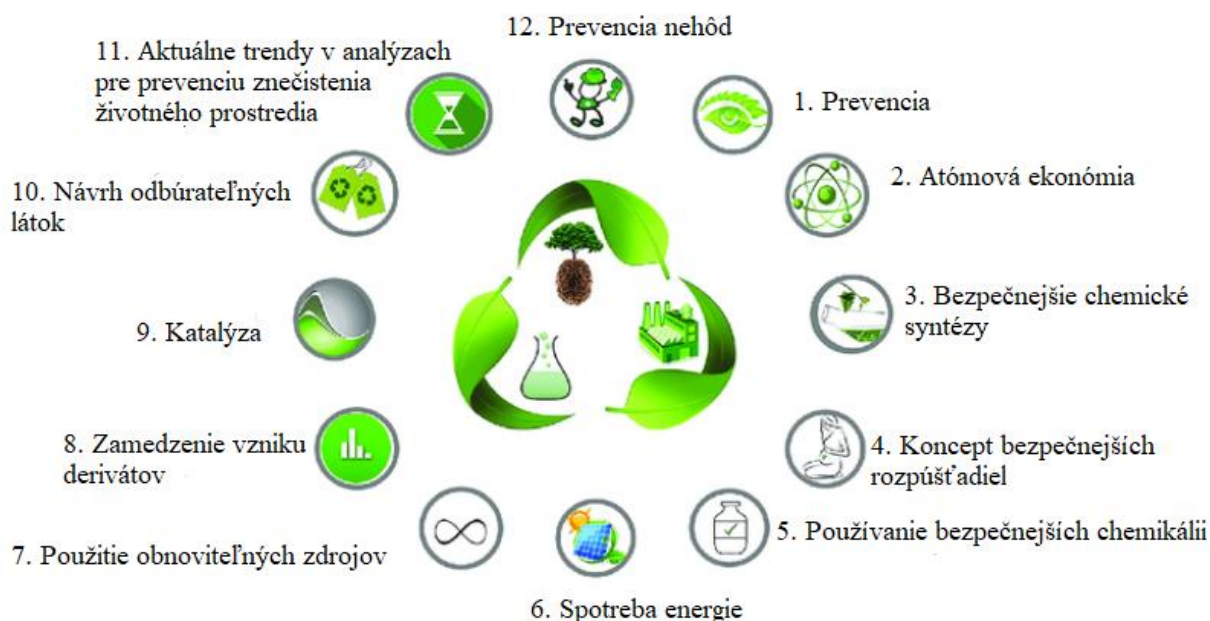
Za posledné storočie priemysel a odvetvia zaoberajúce sa chémiou zaznamenali výrazný rozvoj. Na druhej strane sa však chemický priemysel stáva príčinou vážnych ekologických katastrof a problémov. Zároveň je dôležité uvedomiť si celosvetový vplyv reklám a médií, v ktorých často nevidíme práve túto oblasť. Napriek tomu sa vedci neustále snažia zmeniť jej negatívny obraz vo svete. V súčasnosti sa zvyšuje dopyt po chemických technológiách a produktoch, ktoré sú šetrné k životnému prostrediu. „Zelená chémia“ preto predstavuje jeden z najatraktívnejších konceptov, ktoré sú založené na eliminovaní nebezpečných látok a výrobkov. Jej ideológia je založená na tvorbe nových chemických reakcií a podmienok s cieľom jednoduchosti, bezpečnosti zdravia a životného prostredia. Dnes už existujú stovky ocenených aplikácií od leteckého, automobilového, kozmetického, elektronického, energetického, domáceho až po poľnohospodársky priemysel [1].

3 hlavné body „zelenej chémie“:

- navrhuje všetky fázy chemického cyklu,
- cieľom je navrhnuť povahy výrobkov tak, aby sa znížilo ich nebezpečenstvo,
- funguje ako súdržný systém princípov [1].

Je potrebné neustále znižovať množstvo organických rozpúšťadiel, náročnosť na čas a obsluhu a zároveň zvýšiť bezpečnosť techník. V toho vyplýva nutnosť zmien v rámci odberu vzoriek až po odstraňovanie odpadu. Zmeny možno uskutočniť prostredníctvom štatistík, aby sa minimalizovalo množstvo vzoriek, používaním integrovaných systémov pre zvýšenie

účinnosti, znižovaním obsahu reagensí, ďalej aplikáciou netoxických a najlepšie prírodných činidiel, v mikro usporiadaní. Tieto zmeny tvoria základ pre zvýšenie ekologickej laboratórií. Vzhľadom na rôznorodosť analytov a metód nie je možné vytvoriť jeden postup, ktorý by bol použiteľný pre každý druh vzorky, avšak v budúcnosti bude všeobecným základom pre optimalizáciu a prevedenie daných metód. Na obrázku 1 sú uvedené základné princípy, ktorými sa riadi zelená chémia [2].



Obrázok 1: 12 základných princípov „zelenej chémie“ (prevzaté a upravené z [3])

Dvanásť princípov „zelenej chémie“ je zameraných najmä na minimalizáciu až úplnú elimináciu organických rozpúšťadiel. Vytvára rôzne návrhy chemických reakcií tak, aby nedochádzalo k tvorbe nadbytočného a nežiadúceho odpadu. Okrem iného sa zaoberá aj návrhom pre chemikálie, ktorých efektivita nebude zmenená ale eliminuje sa ich toxicita, a teda budú bezpečné. Reakcie za prítomnosti katalyzátoru, maximálne zvyšujú selektivitu, šetria energetické zdroje, zároveň umožňujú aplikáciu obnoviteľných zdrojov a znižujú náročnosť celého chemického postupu. „Zelená chémia“ upravuje chemické procesy a použitie rozpúšťadiel tak, aby sa minimalizovali nežiadúce úniky, nehody, požiare, výbuchy, s ohľadom na väčšiu bezpečnosť na pracovisku a vyššiu ochranu v súvislosti so životným prostredím [3].

1.2 Extrakčné techniky a esenciálne oleje

V laboratóriu zohrávajú extrakčné postupy veľmi dôležitú úlohu, a to najmä pri úprave vzoriek. Slúžia na odstránenie rušivých zložiek zo vzorky, pričom sa zároveň prevedie do kompatibilnej formy s analytickým prístrojom, ktorý je potrebný k samotnému prevedeniu analýzy [4]. Tieto techniky sú založené na prechode zložiek zmesi cez fázové rozhranie dvoch nemiesiteľných fáz, ktoré môžu byť kvapalné alebo pevné. Súčasné trendy v oblasti extrakčných techník sa zameriavajú na metódy založené na zníženom obsahu rozpúšťadla, sorpcii, environmentálnych aplikáciách [4, 5].

1.2.1 Extrakcia s kvapaliny do kvapaliny

Jej princíp spočíva v zmiešaní vzorky s extrakčným rozpúšťadlom, ktoré sú vzájomne nemiesiteľné. Zložky vzorky môžu prechádzať do extrakčného rozpúšťadla a za určitý časový úsek sa medzi vrstvami vytvorí rovnováha. Po premiešaní a usadení sa vytvoria dve vrstvy, pričom jedna obsahuje väčšinu zlúčeniny. Rovnováha sa popisuje prostredníctvom rozdeľovacieho koeficientu, ktorý je definovaný podľa rovnice (1). Pre efektívnu extrakciu z kvapaliny do kvapaliny (LLE) je potrebné voliť podmienky tak, aby sa skladala z čo najmenšieho počtu krokov a väčšina analytu sa nachádzala v extrakčnom rozpúšťadle. Nakoniec sa tieto dve vrstvy oddelia a jedna je využitá k ďalším analytickým krokom [6].

$$K_D = \frac{c_{org.}}{c_{voda}} \quad (1)$$

- K_D - rozdeľovací koeficient
- $c_{org.}$ - koncentrácia analytu v rozpúšťadle
- c_{voda} - koncentrácia analytu vo vode

V prípade, že sa tento proces prevádza v kolóne, ktorá je naplnená sorbentom, sa rovnica (1), pre definíciu rozdeľovacieho koeficientu prevedie na inú formu, vid' rovnica (2) [6].

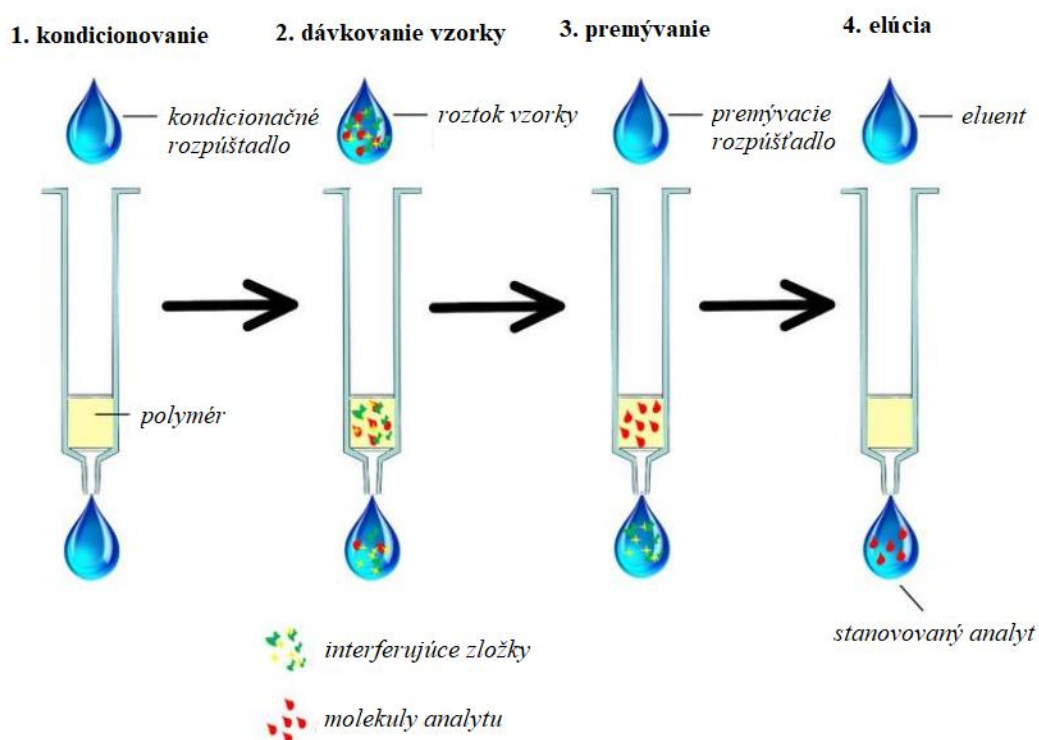
$$k = \frac{1}{(1 + k')} = \frac{V_0}{V_r} \quad (2)$$

- k - retenčný faktor
- V_0 - mŕtvy retenčný objem
- V_r - retenčný objem

LLE bola už pred mnohými rokmi uznávanou separačnou technikou v analytickej chémii, ktorá sa používa na separáciu homogénnej zmesi [7].

1.2.2 Extrakcia tuhú fázou

Pred vykonaním analýzy sa na úpravu vzoriek mnohokrát využíva extrakcia tuhú fázou (SPE), ktorej mechanizmus je uvedený na obrázku 2. Prvý krok SFE spočíva v kondicionovaní kolónky vhodným rozpúšťadlom, aby pevná fáza mohla interagovať so vzorkou. Po nadávkovaní vzorky, sa stanovovaný analyt nechá určitý čas adsorbovať na tuhý sorbent v kolónke. Vhodne zvolenými rozpúšťadlami sa prostredníctvom premývacích krokov odstraňujú interferujúce látky a v závere pomocou elučného rozpúšťadla dochádza k uvoľneniu analytu do zbernej nádoby [6].



Obrázok 2: Princíp extrakcie tuhú fázou (prevzaté a upravené z [8])

1.2.3 Mikroextrakcia tuhú fázou

Tradičná, rovnovážna technika, ktorá sa často aplikuje v súvislosti s analýzou životného prostredia, priemyslu, potravín, drog či v oblasti klinickej a forennej analýzy. Mikroextrakcia tuhú fázou (SPME) používa vlákna z rôznych sorbentov na izoláciu stanovovaného analytu. Po extrakcii sa za pomoci zariadenia, ktoré je obdobné injekčnej striekačke, prevedie vlákno do prístroja s následným uskutočnením analýzy a detegovaním cieľových analytov [9, 10]. Bola vyvinutá ako technika, ktorá zabezpečuje rýchlu prípravu vzorky nielen v laboratóriu ale aj na mieste odberu. SPME sa považuje za úplnú v prípade, že koncentrácia stanovovaného analytu dosiahne rovnováhu medzi matricou vzorky a vláknom [11].

1.2.4 QuECHERS technika

Táto skratka znamená „quick, easy, cheap, effective, rugged and safe“, čo v preklade znamená rýchla, ľahká, lacná, efektívna, robustná a bezpečná. V posledných rokoch sa dostáva do popredia z dôvodu znižovania množstva používaných rozpúšťadiel, znižovania časovej náročnosti a nákladov. Vo všeobecnosti sa najviac aplikuje pri vzorkách životného prostredia, najmä na detegovanie reziduí pesticídov a mykotoxínov. Postup úpravy vzorky spočíva v niekoľkých krokoch. Ako prvé sa vzorka zmieša s acetonitrilom v pomere 1:1. Následne sa po odstredení pridá sorbent na prečistenie (síran horečnatý - $MgSO_4$). Po ďalšom odstredení sa prevedie vlastná HPLC alebo GC analýza [12].

1.3 Esenciálne oleje a extrakty, získané konvenčnými a nekonvenčnými technikami

Podľa Európskeho liekopisu je esenciálny olej definovaný ako „*aromatický produkt, prevažne komplexného zloženia, získaný z botanicky definovanej suroviny, buď vodnou, parnou, suchou destiláciou alebo inou vhodnou mechanickou metódou. Esenciálny olej sa zvyčajne oddeľuje od vodnej fázy fyzikálnou metódou, ktorá nevedie k významnej zmene chemického zloženia esenciálneho oleja*“ [13].

Sú známe najmä svojimi antiseptickými, baktericidnými, liečivými vlastnosťami a charakteristickou vôňou. Tiež sa používajú ako sedatívne, protizápalové, analgetické a lokálne anestetické prostriedky. Extrahujú sa z rôznych aromatických rastlín, vyskytujúcich sa prevažne v miernom až teplom pásme. Sú prchavé, číre, tekuté, zriedka sfarbené, rozpustné v tukoch a organických rozpúšťadlách. Esenciálne oleje väčšinou pozostávajú z terpénových uhlíkov. Viac ako 80 % celkového zloženia tvoria monoterpény a seskviterpény. Ďalej sa významne na zložení oleja podieľajú aj izoprenoidy - oxidovaná forma terpénov (alkoholy, aldehydy, ketóny, estery) [13].

1.3.1 Konvenčné techniky, využívané na zisk esenciálneho oleja z rastlinných matric

Konvenčné metódy zahŕňajú postupy, založené prevažne na princípe destilácie vody, aby sa mohol uvoľniť esenciálny olej z rastlinnej matrice [13].

Lisovanie

Lisovanie za studena patrí medzi najstaršie extrakčné techniky, používané výlučne na výrobu citrusových éterických olejov. Počas extrakcie dochádza k lámaniu žliaz v šupke a kutikule, aby sa mohol uvoľniť olej. Tak vzniká vodná emulzia, ktorá sa následne oddeľuje za uvoľnenia oleja [14].

Destilácia

Medzi najbežnejšie využívané metódy patrí parná destilácia a hydrodestilácia. Tento extrakčný proces môže trvať v intervale od jednej až do desiatich hodín. Množstvo získaného oleja je závislé od niekoľkých faktorov - čas, teplota, tlak, typ rastlinného materiálu. Pri prevádzaní destilácie sú rastlinné matrice vystavené priamemu kontaktu s vodou alebo parou, aby sa následne mohol uvoľniť esenciálny olej. Pri skondenzovaní pary sa zložky zhromažďujú a separujú vo florentskej banke [14]. Destilácia aromatických rastlín vo všeobecnosti znamená odparenie alebo uvoľnenie olejov z bunkových membrán rastlín za prítomnosti vlhkosti, pomocou vysokej teploty a potom ochladením zmesi pár, dochádza k oddeleniu oleja od vody, na základe ich vzájomnej nemiesiteľnosti a rozdielnej hustoty [15].

Hydrodestilácia

Predstavuje najstaršiu, zároveň najjednoduchšiu formu ako získať esenciálny olej rastlinnej matrice, ktorá je v priamom kontakte s horúcou vodou. V princípe je založená na azeotropickej destilácii. Voda a esenciálny olej tvoria heterogénnu zmes, ktorá dosiahla svoj bod varu pri teplote 100 °C, zatiaľ čo pre zložky esenciálneho oleja je bod varu oveľa vyšší. Potom sa zmes destiluje, akoby šlo o jednu zlúčeninu. V separátore dochádza k oddeleniu vodnej a organickej fázy. Výhoda použitia vody spočíva v tom, že je nemiesiteľná s väčšinou terpénových molekúl esenciálneho oleja, a preto je možné po kondenzácii ju jednoducho oddeliť, napríklad dekantáciou. Hydrodestilácia Clevenger je vhodná predovšetkým pre extrakciu kvetov a okvetných lístkov, pretože nedochádza k zhlukovaniu rastlinného materiálu. Jednou hlavnou nevýhodou je časová náročnosť. Môže trvať po dobu 3 - 6 hodín. Vplyvom vysokej teploty môže dôjsť k štruktúrnym zmenám alebo degradácii terpénových molekúl a k ich odpareniu [13].

Parná destilácia

Je upravený proces destilácie, používaný na regeneráciu matríc, citlivých na teplo. Aplikuje sa v prípadoch, v ktorých by klasická destilácia mohla zapríčiniť degradáciu termolabilných zlúčením. Matrica je položená na mriežke alebo site, ktoré je v dostatočnej vzdialenosti od spodku destilačnej nádoby, a teda nie je v priamom kontakte s vodou. Vzniknutá para, prechádza cez matricu a obohacuje sa o prechavé zložky. Po prechode do chladiča, para skondenzuje a schladí sa na teplotu okolia. Kondenzovaná kvapalná zmes je tvorená dvoma vzájomne nemiesiteľnými fázami, ktoré sú potom v separátore od seba oddelené. Následne možno odobrať esenciálny olej, zadržovaný najčastejšie na vodnej fáze [16].

1.3.1.1 Porovnanie zloženia esenciálnych olejov získaných rôznymi extrakčnými postupmi

Analýza esenciálnych olejov poukázala na odlišnosti v zložení esenciálnych olejov. Profil látok sa môže líšiť nielen v ich relatívnom zastúpení ale aj štruktúrou, v závislosti od spôsobu extrakcie, ktorý ovplyvňuje vlastnosti esenciálneho oleja. Vo všeobecnosti platí, že extrakčné metódy s využitím mikrovlnného ohrevu poskytli veľmi podobné výsledky, zatiaľ čo olej, získaný turbodestiláciou mal silný pižmový zápach, pretože extrahované látky boli pravdepodobne poškodené [14].

1.3.2 Inovatívne techniky, používané na získanie esenciálneho oleja

Hlavná nevýhoda vyššie spomínaných konvenčných techník súvisí s termolabilitou zložiek, obsiahnutých v esenciálnych olejoch, ktoré podliehajú chemickým zmenám (oxidácia, hydrolýza) v dôsledku vysokej teploty [13].

Destilácia s mikrovlnným ohrevom

V porovnaní s konvenčnou metódou - parnou destiláciou a hydrodestiláciou, sa táto metóda javí ako oveľa efektívnejšia. Rovnaký výťažok sa dosiahne do 6 minút, za pôsobenia mikrovlnného ohrevu s výkonom 500 W na vzorku, oproti parnej destilácii, ktorá môže trvať aj viac ako dve hodiny [13]. Schopnosť mikrovlnného žiarenia, ohriať tuhý materiál sa dá využiť aj na získanie esenciálnych olejov. Rastlinný materiál je umiestnený do mikrovlnného priestoru, kde je ožarovaný mikrovlnami. Tento proces poskytuje výťažky obohatené o relatívne nízko prchavé látky, v porovnaní s esenciálnymi olejmi, získanými hydrodestiláciou. [15].

Extrakcia nadkritickou tekutinou

Tradične sa využívajú konvenčné metódy na získanie esenciálnych olejov (parná destilácia, hydrodestilácia). Nevýhodou je ich nízky výťažok, časová náročnosť a pri vyššej teplote dochádza k stratám prchavých zlúčenín. Tieto dôvody viedli k vývoju nových alternatívnych techník, napríklad SFE. Pri nízkych teplotách umožňuje extrahovať termolabilné látky. Interakcie medzi vzorkou a kvapalinou možno riadiť prostredníctvom teploty a tlaku, čím je zabezpečená vysoká selektivita. Metóda je zároveň priaznivá pre životné prostredie, pretože prevažne používaný oxid uhličitý je netoxický [13].

Extrakty získané SFE s použitím CO₂ sa nepovažujú za esenciálne oleje ale extrakty aj napriek tomu, že profil látok je takmer totožný s extrahovanou matricou. Preto sa často používa v potravinárskom priemysle, ak sú použité rozpúšťadlá, ktoré sú prijateľné pre potraviny a nezanechávajú žiadne škodlivé zbytky [17].

1.3.2.1 Porovnanie zloženia extraktu získaného SFE s ostatnými metódami

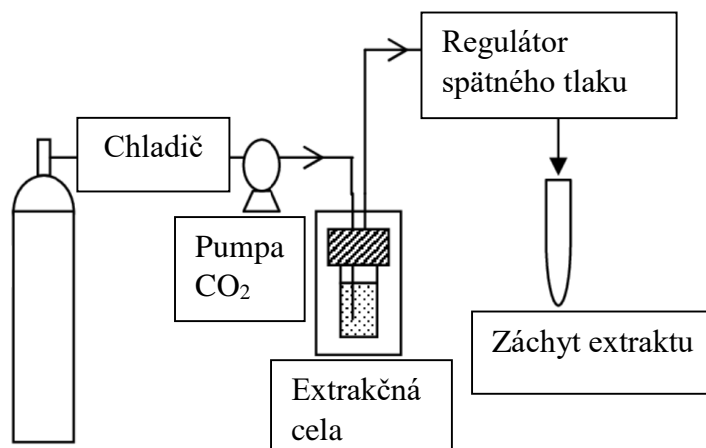
Pre úspešnú extrakciu nadkritickou tekutinou, je potrebné zohľadniť niekoľko faktorov - čas, teplotu, tlak, prietok nadkritickej tekutiny, typ vzorky a jej príprava, výber modifikátoru. V praxi sa najviac aplikuje CO₂, kvôli jeho nízkej kritickej teplote, nízkym nákladom a bezpečnosti. Extrakt SFE zároveň poskytoval najvyššie výťažky obohatené o prchavé látky. SFE taktiež umožňuje výrazne skrátiť extrakčnú dobu v porovnaní s ostatnými technikami [14].

1.3.3 Laboratórna výroba esenciálnych olejov

Ďalšie techniky sú zamerané na analýzu menšieho množstva prchavých zložiek a stanovenie látok, ktoré obsahuje olej v rastline. Aparatúra sa skladá sa z banky s guľatým dnom, ktorá je zároveň vyhrievaná. Po aplikácii rastlinnej vzorky sa banka pripojí ku kondenzátoru a trubici, ktorá slúži na objemové stanovenie oleja. Trojcestný ventil zabezpečuje tok vody späť do banky a na konci destilácie oddelenie esenciálneho oleja z vodnej fázy pre ďalšiu analýzu. Čas na celý proces je ovplyvňovaný druhom byliny, vo väčšine prípadov však minimálne 3 - 4 hodiny. Odporúča sa prídavok malého množstva xylénu (0,5 ml), aby bolo možné oddeliť aj malé kvapky oleja z vodnej zložky [17].

1.4 Extrakcia nadkritickou tekutinou

Zmienka o SFE, ktorej diagram je uvedený na obrázku 3, pochádza z Londýna, kde sa analytici zaoberali schopnosťou nadkritickej tekutiny rozpúšťať pevné materiály [18]. Najskôr boli oddelené neprchavé porfyríny použitím chlórfluorovaných uhlíkov ako mobilnej fázy. Samotná absorpčná a časticová chromatografia, s použitím oxidu uhličitého, *n*-pentánu a izopropanolu pri teplotách až do 245 °C a tlaku do 8 MPa bola aplikovaná neskôr spoločne so zavedením protokolu s cieľom znížiť, prípadne úplne vylúčiť výrobu zvlášť nebezpečných a škodlivých rozpúšťadiel, ktoré predstavovali vážnu hrozbu pre životné prostredie [19, 20].



Obrázok 3: Diagram extrakcie nadkritickou tekutinou (prevzaté a upravené z [21])

1.4.1 Módy extrakcie nadkritickou tekutinou

SFE možno prevádzkať v nasledujúcich modeloch - statický, dynamický, spojený. Statický si možno predstaviť ako interakciu medzi čajovým vrecúškom a pohárom s horúcou vodou. Extrakčná nádobka, ktorá je natlakovaná obsahuje maticu vzorky a stacionárnu fázu, pri určitej teplote. Na základe vysokej difuzivity, tekutina prechádza maticou a strháva analyt. Po ukončení extrakcie sa otvorí ventil na nádobke a s následným znížením tlaku, prechádza analyt do zbernej vialky. Tento model sa najviac využíva spolu s prídavkom modifikátoru alebo derivatizačného činidla (toluén), ktoré sa pridávajú ešte pred natlakovaním [22, 23].

V porovnaní so statickou, dynamická poskytuje vyššiu citlivosť a automatizáciu. Jej použitie vyplýva zo základov kontinuálnej extrakcie. Cez extrakčnú celu naplnenú vzorkou, je kontinuálne čerpaný oxid uhličitý. Výhoda spočíva v neustálom kontakte vzorky s nadkritickou tekutinou. Využíva čerpadlo, ktoré zavádza nadkritický oxid uhličitý (CO₂), tým pádom udržuje konštantný tlak v systéme [22, 23].

Kombinácia statického a dynamického módu s cieľom presunúť extrahovateľné látky do pasce, získava na popularite hlavne v situáciách, kedy je potrebné, aby analyt difundoval do matrice, a tak mohol byť extrahovaný. Táto extrakcia vždy začína statickým módom, v ktorom má systém nulový prietok. Po určitom časovom intervale je tento mód prevedený prostredníctvom prepnutia ventilu do dynamického usporiadania. Čerstvá nadkritická tekutina vchádza do nádoby, nahrádzajúc pôvod kritickú tekutinu, ktorá excitovala cez obmedzovač [24].

1.4.2 Použitie nadkritickej tekutiny

Nadkritická tekutina je dokonalo stlačiteľná a definovaná ako tekutina, ktorá sa nachádza v stave nad jej kritickou teplotou a tlakom. Nadkritická tekutina vykazuje fyzikálno-chemické vlastnosti podobné kvapalinám a plynom. Kritická teplota je najvyššia teplota, pri ktorej sa môže plyn premeniť na kvapalinu, zvýšením tlaku. Kritický tlak je najvyšší tlak, pri ktorom je možné premeniť na plyn kvapalinu, zvýšením teploty kvapaliny. Nadkritická tekutina nemá povrchové napätie, vykazuje vysokú hustotu, ktorá je podobná kvapaline a viskozitu, ktorá je blízka plynom a môže prechádzať ako plyn cez tuhú fázu [24, 25, 26].

Extrakcia nadkritickou tekutinou predstavuje efektívnejšiu prípravu vzoriek k analýze a zároveň napomáha k znižovaniu, prípadnému eliminovaniu halogénových rozpúšťadiel, ale aj k efektívnemu extrahovaniu vzoriek. Ďalšia výhoda extrakcie nadkritickou tekutinou spočíva v nízkej časovej náročnosti. Prostredníctvom nadkritickej tekutiny je možné oddeliť viacložkovú zmes, na základe prchavosti jednotlivých zložiek. Nadkritické tekutiny sa volia

Teoretická časť - Extrakčné techniky a esenciálne oleje

na základe kritickej teploty, tlaku a podľa toho akú látku extrahujeme. Kritická teplota a tlak pre jednotlivé nadkritické tekutiny sú uvedené v tabuľke 1 [18, 31]. Kvapalina môže získať určité vlastnosti plynu a síce, stráca povrchové napätie, a tak nevytvára meniskus na svojej hladine [19, 28].

Tabuľka 1: Kritické podmienky pre rôzne rozpúšťadlá [18, 31]

Nadkritická tekutina	Nadkritická teplota [°C]	Nadkritický tlak [MPa]
benzén (C ₆ H ₆)	289,0	4,89
cyklohexán (C ₆ H ₁₂)	280,3	4,07
chlórtrifluormetán (CClF ₃)	28,9	3,92
etán (C ₂ H ₆)	32,2	4,88
etylén (C ₂ H ₄)	9,3	5,04
oxid dusný (N ₂ O)	36,5	7,23
oxid uhličitý (CO ₂)	31,1	7,38
propán (C ₃ H ₈)	96,7	4,25
propylén (C ₃ H ₆)	91,9	4,62
<i>p</i> -xylén (C ₈ H ₁₀)	343,1	3,52
toluén (C ₇ H ₈)	318,6	4,11
voda (H ₂ O)	374,2	22,0

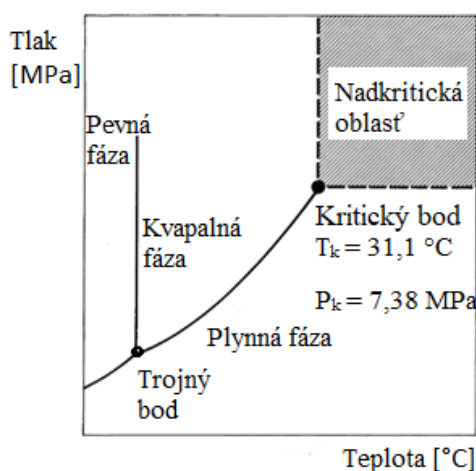
Tabuľka 1 naznačuje, že kritické hodnoty teplôt sa môžu líšiť aj o stovky stupňov. Z tohto dôvodu sa jednotlivé nadkritické tekutiny používajú v rôznych konkrétnych aplikáciách. Kritické teploty CO₂ a etánu sa výrazne nelíšia, preto sú vhodnými rozpúšťadlami pre termolabilné látky, medzi ktoré patria napríklad farmaceutiká, nestabilné lipidy a monoméry. Tepelne stabilné látky, ako napríklad priemyselné chemikálie a polyméry sa upravujú pomocou uhlíkovodíkov s teplotou medzi 100 - 150 °C. Uhlíkovodíky s ešte vyššou molekulovou hmotnosťou ako je cyklohexán a benzén s kritickou teplotou 250 - 300 °C, sa využívajú najmä na extrakciu neprchavých látok a vysokomolekulárne ropné frakcie. Použitie nadkritickej vody sa testuje v súvislosti s odstraňovaním nebezpečného odpadu a reformácie uhlíkovodíkov [18].

Nadkritická tekutina - oxid uhličitý

Najviac využívanou nadkritickou tekutinou je oxid uhličitý, ktorého fázový diagram je uvedený na obrázku 4. Má množstvo výhod - nie je finančne náročný, je ekologický a správa potravín

Teoretická časť - Extrakčné techniky a esenciálne oleje

a liečiv (FDA) spolu s Európskym úradom pre bezpečnosť potravín (EFSA) ho považujú za bezpečný. Pri izbovej teplote a tlaku vykazuje charakter plynu, čo uľahčuje regeneráciu analytu bez zostatkových rozpúšťadiel. Pri príprave potravinových a prírodných vzoriek sa využíva hlavne preto, že pri použití CO₂ sa pracuje pri nízkych teplotách, čo umožňuje extrakciu tepelne labilných látok. Hlavnou nevýhodou je jeho nepolárny charakter, avšak možno ho modifikovať. Prídavkom napríklad metanolu k oxidu uhličitému sa rozširuje rozsah jeho extrakcie o viac polárnych analytov. Extrakty, mastné kyseliny, bioaktívne zlúčeniny sa získavajú z ovocia a zeleniny pomocou nadkritického CO₂ [20].



Obrázok 4: Fázový diagram CO₂ (prevzaté a upravené z [18])

Obrázok 4 znázorňuje fázový diagram CO₂. Rovnovážny stav medzi pevnou a plynnou fázou popisuje sublimačná krivka. Rovnováha medzi pevným a kvapalným skupenstvom je daná topiacou krivkou a krivka pary znázorňuje rovnováhu medzi kvapalinou a jej parou. Fázový diagram CO₂ vychádza zo závislosti tlaku na teplote. Varom sa oddeľuje plynná a kvapalná zložka, pričom končí v kritickom bode, kde tieto zložky zmiznú a stanú sa jednou nadkritickou fázou. Charakteristické vlastnosti nadkritických tekutín v porovnaní s kvapalinami a plynmi sú uvedené v tabuľke 2. Všetky nadkritické tekutiny sú vzájomne miešateľné, takže pre zmes existuje zaručenie jednej fázy, v ktorej je prekročený kritický bod zmesi [29].

Tabuľka 2: Hustota, difuzivita, vizkozita pre kvapaliny, plyny a nadkritické tekutiny [29]

Porovnanie plynov, kvapalín a nadkritických tekutín			
Fyzikálna veličina	Hustota [kg/m ³]	Vizkozita [μPa·s]	Difuzivita [mm ² /s]
Plyn	1	10	1 - 10
Nadkritická tekutina	100 - 1000	50 - 100	0,01 - 0,1
Kvapalina	1000	500 - 1000	0,001

Nadkritická tekutina - voda

Voda je jedným najčastejšie používaným rozpúšťadlom. Vďaka vysokej kritickej teplote 374,2 °C a tlaku 22,05 MPa upútava pozornosť chemikov v oblasti SFE. Po presiahnutí kritických veličín voda mení svoje charakteristiky a dostáva sa do nadkritickej oblasti. Najväčšie pozitívum vody spočíva v nulovej toxicite a nízkej cene. Významnú súčasť jej vlastností tvoria vodíkové mostíky. S narastajúcou teplotou však dochádza k ich narušeniu a vytvárajú sa iba klastre molekúl H₂O bez interakcie. Po prekročení kritickej teploty sa v klastroch objavujú rozštiepené vodíkové väzby, ktoré zodpovedajú za významnú zmenu vlastností vody. Ako nadkritická tekutina má hustotu blízku kvapaline a difúzne vlastnosti sú blízke plynnému stavu. Vďaka nulovej toxicite sa využíva najmä v medicíne a v potravinárskom priemysle [30, 31].

Nadkritická tekutina - oxid dusný

Keďže použitie CO₂ je obmedzené pre jeho nepolárny charakter, tak sa musia niektoré vzorky derivatizovať, prípadne je potrebné použiť organické rozpúšťadlo. Možnou alternatívou je aj použitie oxidu dusného, ktorý má podobnú molekulovú hmotnosť ako CO₂. Pri aplikácii je potrebné byť obozretný, kvôli jeho oxidačným účinkom a výbušnosti [32].

1.4.3 Použitie SFE a nadkritických tekutín v rôznych oblastiach a aktuálne trendy

Zameriava sa najmä na fosílna palivá, životné prostredie, potraviny, prírodné zložky a polyméry [33].

Farmaceutická analýza sa zaoberá čistotou a kvalitou liečivých produktov, stabilitou východiskových a pomocných látok, ale aj aktívnymi farmaceutickými zložkami. Nadkritické tekutiny používa k výrobe jemných a monodisperzných práškov. Najviac využívaný je CO₂ - neškodný, „zelený“. Častice z plynových nasýtených roztokov využívajú toho, že je oveľa jednoduchšie rozpustiť CO₂ v organických rozpúšťadlách, než vykonávanie opačného procesu. Táto technológia je však vo vývoji, ale predstavuje perspektívny rozvoj priemyslu s možnou výrobou komerčných liečiv [34, 35]

V environmentálnej analýze cieľom vedcov bolo zachytiť čo najviac znečisťujúcich látok zo životného prostredia (pesticídy, polychlorované bifenyly, dioxiny, polycyklické aromatické uhľovodíky), načo využili práve SFE [36]. Použitie nadkritických tekutín nachádza využitie ako riešenie vyčerpávania alternatívnych zdrojov. Táto náhrada je možná vďaka pokroku v oblasti alternatívnej energie, ktorá je katalyzovaná predovšetkým negatívnym dopadom

na životné prostredie. V nedávnych štúdiách bol navrhnutý proces, s využitím nadkritického CO₂, na výrobu bionafty. Táto technológia však ešte dokonale nie je spracovaná, a preto bude cieľom ďalších štúdií v blízkej budúcnosti [37].

Nadkritické tekutiny nachádzajú uplatnenie aj v rade rôznych experimentálnych systémov a potravinárskeho priemyslu s aplikovaním CO₂. V blízkej budúcnosti môžeme očakávať rozvoj v oblasti dochucovadiel ale aj extrakcie a rafinácie potravinových prísad, alternatívnych liekov a špeciálnych olejov. Najširšie uplatnenie ako spolurozpúšťadlo má etanol a voda. Spolurozpúšťadlá sú preto, lebo zvyšujú rozpustnosť CO₂ v materiáloch ako napríklad rybíe a čučoriedkové oleje, monosacharidy [38].

1.4.4 Prevedenie SFE spolu s ostatnými technikami

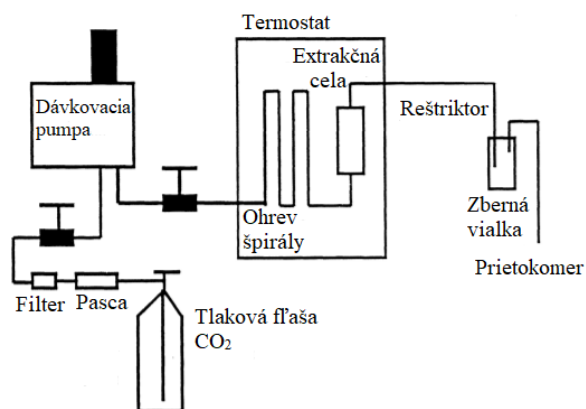
Prácu analytika v laboratóriu charakterizuje niekoľko krokov, a to príprava vzorky, analýza a samotná interpretácia výsledkov [39]. Jednou z najatraktívnejších extrakčných techník s možnosťou spojenia s analytickou metódou predstavuje práve SFE [33]. Prepojenie s jednotlivými technikami umožňuje neustále zlepšovanie separácie, s vysokou presnosťou a správnosťou ale aj s minimalizovaním časovej náročnosti. Hlavnou príčinou je snaha nahradiť doposiaľ používané metódy, ako napríklad Soxhletovu extrakciu, ktorej hlavná nevýhoda spočíva v nadmernej spotrebe rozpúšťadla a časovej náročnosti, s cieľom zaviesť postupy, prostredníctvom ktorých je príprava vzorky rýchla, jednoduchá a efektívnejšia, s možnou automatizáciou a minimálnou spotrebou nebezpečných rozpúšťadiel [40].

Samotnú SFE je možné previesť dvoma spôsobmi. V offline móde konečný produkt pozostáva z extraktu, ktorý je rozpustený v určitom rozpúšťadle. Táto forma musí byť však kompatibilná s analytickým prístrojom. Online mód je oveľa efektívnejší. Postup spočíva v prenose a zbere extrahovaných analytov zo SFE priamo do chromatografu. Aj keď offline usporiadanie ponúka jednoduchosť, komerčnú dostupnosť a výťažky, ktoré možno analyzovať rôznymi technikami, tak online mód má väčší potenciál z dôvodu vyššej citlivosti a automatizácie [40]. Prístroj SFE je možné pripojiť k ďalším analyzátorom, ktoré sa používajú napríklad v spojení s chromatografiou [41].

Offline usporiadanie SFE

Významne dôležitý je záchyt analytov. Nesprávny spôsob zberu v závere analýzy vedie k nespoľahlivým výsledkom a dôsledkom môže byť práve strata stanovovanej látky behom nesprávnej techniky zadržiavania analytu [41]. Inštrumentálne usporiadanie vid' obrázok 5, vychádza z tých istých prvkov, ako aj pre online tak aj pre offline usporiadanie [39].

Skvupalnený CO₂ sa dodáva do injekčnej pumpy cez tlakovú fľašu s CO₂, ktorá je opatrená membránou. Následne sa skvupalnený CO₂ prevedie do nadkritického stavu ešte pred naplnením extrakčnej nádoby. Zber materiálu je usmernený do vialky. Takýto systém môže obsahovať aj prietokomer, ktorý sa používa na meranie prietoku alebo prechodu kvapaliny. Offline mód sa v súčasnosti stále viac uprednostňuje, pretože nie je obmedzený kapacitou vzorky. Online model, ktorý poskytuje presnejšie výsledky sa využíva menej. Príčinou je obmedzená kapacita koncentrácie analytu - teda limitom detekcie a kvantifikovateľnosti [39].



Obrázok 5: Schéma offline módu SFE extraktora (prevzaté a upravené z [39])

Online usporiadanie SFE - spojenie SFE s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou

Nie všetky látky sú vhodné na analýzu GC-MS. Dôvodom je tepelná nestabilita látok alebo príliš vysoká polarita. Online usporiadanie SFE-HPLC je zvlášť prospešné pri stanovovaní svetlomitlivých látok a stopových množstiev. Svoju atraktivnosť zvyšuje najmä schopnosťou prenosu všetkých analytov do chromatografického systému. SFE-HPLC nie je až tak optimálna technika, najmä kvôli technike prípravy vzorky, v ktorej vyprodukovaný plyn interferuje s kvapalnou mobilnou fázou. HPLC analýzy sú založené predovšetkým na čo najnižšom obsahu plynu v systéme. Sonikácia alebo zahrievanie sú konvenčné spôsoby, ako sa efektívne zbaviť plynu z prístroja, pretože by hrozilo poškodenie kolóny s nepresnou detekciou [42].

Ďalšie problémy sa môžu objaviť, ak sa bubliny plynu dostanú do systému s UV detekciou, ktorá sa najčastejšie používa pri HPLC. Plyny tiež tlmia fluorescenciu jednotlivých látok, preto nemožno aplikovať ani tento druh detekcie. Kompatibilnejší je chemiluminescenčný detektor selektívny pre síru (SCD). Iba v mikro HPLC usporiadaní možno aplikovať SCD detektor. V závere možno skonštatovať, že HPLC je vhodná skôr pre kvalitatívnu analýzu.

V kvantitatívnej analýze sa môžu objaviť problémy súvisiace s presnosťou čerpadla a detektora [42].

Spojenie SFE s nadkritickou kvapalinovou chromatografiou

Najskôr sa SFE a SFC používali ako dve oddelené jednotky, slúžiace na extrakciu a následnú separáciu. V potravinárskych aplikáciách sa úspešne využíva na detekciu mastných kyselín, triglyceridov, terpenoidov a karotenoidov. Online usporiadanie SFE-SFC poskytuje množstvo výhod, pokiaľ ide o automatizáciu, urýchlenú analýzu a spoľahlivosť. Veľkým benefitom je možnosť priameho zavádzania extraktu do komerčného prístroja vhodného k separácii. Využíva sa najmä v stopovej analýze, predchádza degradácii analytu a jeho strate. V offline usporiadaní je najskôr extrakt zachytený do vialky a až potom analyzovaný [44].

SFE-SFC pozostáva z niekoľko po sebe idúcich krokov. Najprv je vzorka zbavená vlhkosti vysušením alebo prídavkom dehydratačného činidla, a následne vložená do extrakčnej cely. Po extrakcii sa analyty potom zachytávajú v injekčnom okruhu alebo sorbente. Kvôli obmedzenej znalosti všetkých premenných vplyvujúcich na separáciu, bola táto technika obmedzená pre kvantitatívne účely. Realizácia SFE-SFC je náročnejšia, pretože žiada optimalizáciu extrakčných parametrov - výber modifikátoru, vhodný prietok nadkritickej tekutiny, tlak, množstvo vzorky a doba extrakcie [44].

Spojenie SFE s plynovou chromatografiou

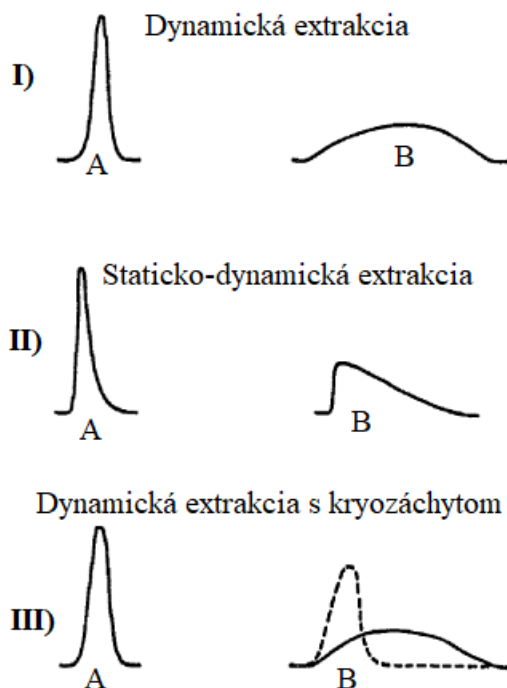
Spojenie plynovej chromatografie (GC) a SFE v praxi charakterizuje podstatné uľahčenie, ako rýchlo analyzovať neznámu látku. V prípade prítomnosti nadkritického CO₂ nenastáva žiadny problém, pretože mobilnou fázou v GC je plyn. Po záchyťte stanovovanej látky v kolóne a odvetraní CO₂ sa prevedie analýza [42].

GC poskytuje množstvo výhod. Nie je náročná na úpravu vzorky, čím sa skracuje celková doba analýzy. Vďaka nízkej náročnosti na úpravu, nedochádza k stratám a ani k degradácii stanovovanej látky. Poskytuje presné výsledky aj pri nízkych koncentráciách vďaka vysokej citlivosti. Deteguje napríklad polycyklické aromatické uhľovodíky a vonné látky v prostredí [43].

Spojenie SFE so spektrálnymi technikami

V dnešnej dobe sa považuje za rutinné spojenie SFE-GC a SFE-HPLC, ale spojenie so spektrálnymi technikami je vo vývoji. Doposiaľ infračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou je jedinou diskutovanou technikou v oblasti spektrálnych metód. Táto

nedeštruktívna metóda je však ovplyvnená rozpustnosťou stanovovanej látky v nadkritickom CO₂, ako uvádza obrázok 6 [45].



Obrázok 6: Tvar píkov pre rozpustné (A) a nerozpustné (B) analyty v nadkritickej tekutine (prevzaté a upravené z [45])

Segment I) Dynamickou extrakciou sú vyprodukované nízko objemové píky, ktoré nemožno alebo ťažko kvantifikovať. Píky sú rozľahlé a plochého tvaru. Je to znak toho, že analyt dosiahol maximálnu rozpustnosť v tekutine [45].

Segment II) Ponúka zlepšenie kvality píku pre oba prípady rozpustnosti - úplná/čiastočná. Vďaka tomu je možné zakoncentrovanie analytu v malom objeme CO₂ ešte pred dynamickým výplachom [45].

Segment III) Predstavuje potenciálny tvar píku pre oba prípady rozpustnosti, v ktorom bol použitý kryozáchyt. Pre akúkoľvek väzbu analytu v zložitej matrici kryozáchyt môže viesť k excelentným výsledkom a definitívnemu zlepšeniu oproti bezzáchytovým metódam [45].

Kryozachytávanie môže viesť k rozšíreniu píkov, u vysoko rozpustných analytov. Záleží od toho, ako efektívne je extrakt odstránený z pasce a privedený na hlavicu kolóny. Pre analyty s obmedzenou rozpustnosťou sa výsledky môžu líšiť. Prerušovaná čiara v segmente III predstavuje analyt, ktorý bol efektívne odstránený z povrchu pasce, naproti celej čiare, ktorá predstavuje oveľa postupnejšiu elúciu analytu z pasce [45].

1.4.5 Optimalizácia podmienok pri použití SFE

Aplikácia nadkritických tekutín sa zvyšuje kvôli ich vlastnostiam a schopnosti extrahovať organické zlúčeniny z najrôznejších typov matric. Existuje niekoľko parametrov, ktoré významne ovplyvňujú extrakciu. Medzi najvýznamnejšie patrí tlak, teplota, prípadné použitie modifikátoru a prietok nadkritickej tekutiny [46].

Vplyv tlaku na SFE

Medzi najhlavnejšie parametre, ktoré vplyvajú na účinnosť extrakcie, patrí tlak. Pokiaľ pri určitej teplote dôjde k jeho zvýšeniu, tak sa zároveň zvyšuje aj hustota kvapaliny, a to vedie k zvýšeniu rozpustnosti látok. Objem tekutiny potrebný na danú extrakciu je modifikovateľný úpravou tlaku. Zvýšením tlaku sa potrebný objem znižuje a naopak. Je potrebné poznamenať, že nie vždy je potrebné použitie vysokého tlaku. Závisí na type matrice vzorky [26, 46].

Vplyv teploty na SFE

So zvyšujúcou sa teplotou a konštantným tlakom sa zase znižuje hustota nadkritickej tekutiny. Teplota zároveň ovplyvňuje prchavé vlastnosti látky. Je ale náročné predpokladať určitý vplyv teploty na vzorku, pretože opäť závisí na jej charaktere [26, 46].

Účinok modifikátoru na prevedenie SFE

Jeho charakter je závislý od povahy extrahovanej látky. Ako už bolo spomínané, CO₂ je vhodný najmä pre nepolárne a stredne polárne látky. Polárne zložky možno extrahovať inou nadkritickou tekutinou alebo modifikovaným CO₂, kedy sa mení kritický bod zmesi. Medzi najviac aplikované modifikátory patrí metanol, etanol, acetonitril a toluén. Ich použitie doposiaľ nie je dokonalo preštudované, avšak nepoužíva sa iba na zvyšovanie polarita, ale prídavkom nízkeho množstva k nadkritickej tekutine sa pozoruhodne zvyšuje aj extrakčná účinnosť [26, 46].

Vplyv času a prietoku na účinnosť extrakcie

Celková doba extrakčného procesu je daná rýchlosťou toku nadkritickej tekutiny. Čím je prietok pomalší, tým sa tekutina dostáva hlbšie do matrice, a zároveň sa zvyšuje aj výťažnosť extrakcie. Aj keď pri vyššom prietoku dochádza k výraznému zníženiu časovej náročnosti, tak rovnako aj k znižovaniu výťažnosti, pretože tekutina sa nedostáva hlboko do matrice a tiež dochádza k stratám analytu behom záchytu do organického rozpúšťadla [26, 46].

1.5 Orechy

Patria medzi najstarší zdroj obživy pre človeka, vtáctvo a divoko žijúce zvieratá. Medzi najobľúbenejšie jedlé orechy patria mandle (*Prunus amigdalus*), lieskovce (*Corylus avellana*), vlašské orechy (*Juglans regia*) a pistácie (*Pistachia vera*). Konzumujú sa v rôznych formách - od celých (čerstvé, pražené), v rôznych nátierkach a maslách, alebo ako oleje [47, 48].

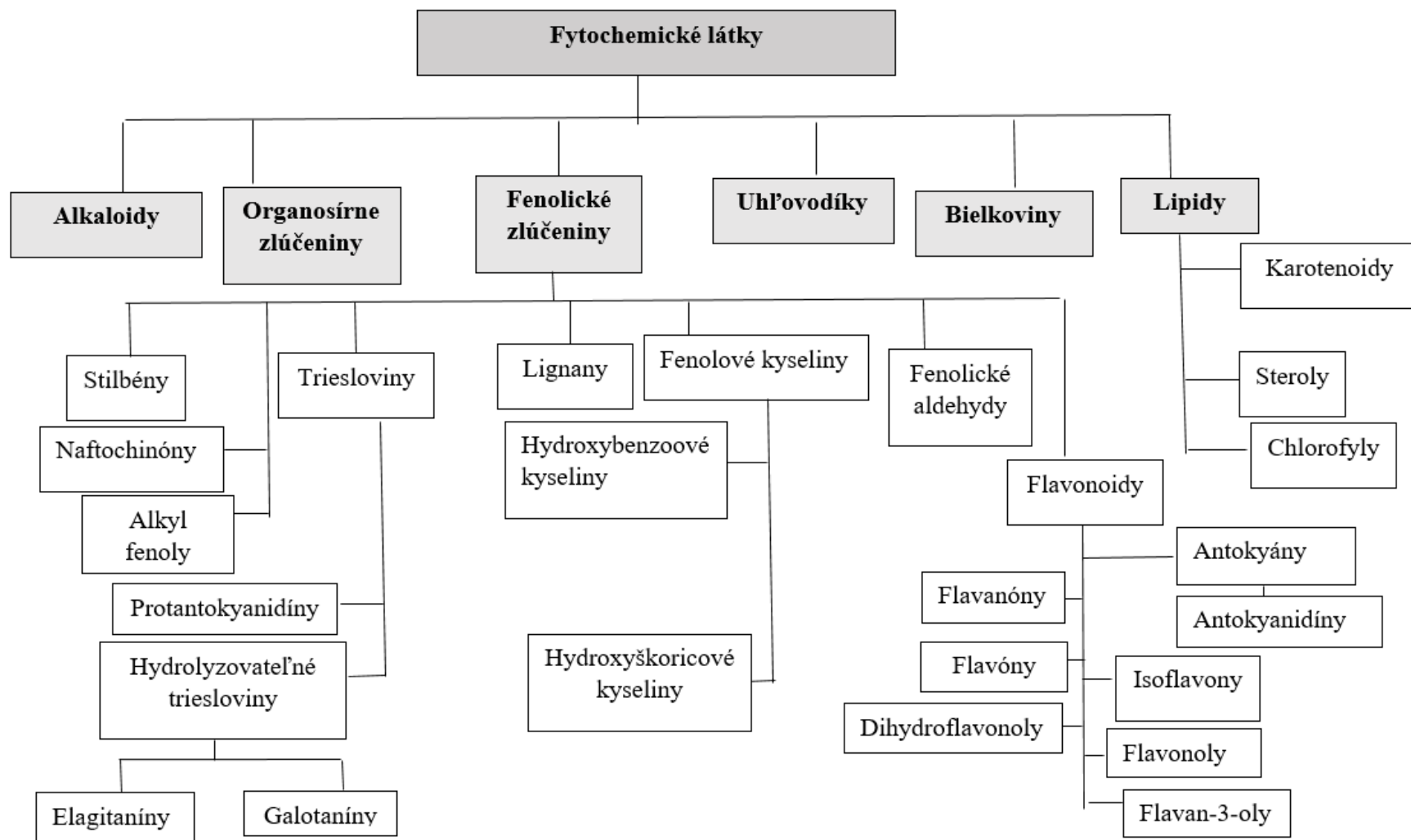
Presná definícia orechov je doposiaľ nejednoznačná. Podľa American Heritage Dictionary of the English Language orech predstavuje ovocie, ktoré má semeno uzatvorené v jednej škrupine. Zároveň sa za orech považuje aj väčšina suchých semien. Dôvodom je ich škrupina, preto nie každý plod, označovaný ako orech, je v skutočnosti orechom. Najčastejšie sa orech definuje ako tvrdé semeno škrupiny, ktoré obklopuje jedlé olejové jadro [47, 48].

Orechy sa od seba líšia najmä tvarom, veľkosťou a štruktúrou. Jadro môže byť pevné a jednoduché (mandle, gaštan, kokos, pistácie) alebo oddelené (hickory, pekanové orechy). Vo väčšine prípadov sú guľovitého tvaru, s výnimkou napríklad brazílskeho orechu, ktorý je trojuholníkový [49].

Po rastlinných olejoch sú najbohatšou matricou na tuky. Obsah nasýtených mastných kyselín tvorí 4 - 16 % . Viac ako polovica je tvorená nenasýtenými tukmi, mononenasýtenými mastnými kyselinami (MUFA). V para orechoch prevládajú polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA) - kyselina linolová a vo vlašských orechoch - kyselina α -linolénová. Zároveň sú veľmi dobrým zdrojom pre získanie potrebných zložiek pre správnu funkciu organizmu. Obsahujú vysokokvalitný rastlinný proteín, vlákninu, minerály (vápnik, horčík, draslík), tokoferoly, fytosteroly a fenolické zlúčeniny [48]. Schéma fytochemických látok, obsiahnutých v orechoch je uvedená na obrázku 7.

V súčasnosti však existujú aj obavy z konzumácie orechov. Okrem alergie, ide o potenciálnu toxicitu, kedy orech môže byť kontaminovaný mykotoxínom, najmä aflatoxínom. Ten môže zapríčiniť akútne poškodenie a cirhózu pečene, tvorbu nádorov, poruchy centrálného nervového systému, kožné poruchy a hormonálne poruchy [48, 50].

Emilio Ros [52] vo svojej rešerši naznačuje, že pravidelná konzumácia orechov, priaznivo vplyva na ľudský organizmus, v prípade obezity, hypertenzie, diabetu mellitu aj kardiovaskulárnych chorôb. Zároveň dokázu znížiť riziko zápalových ochorení. Napriek týmto záverom je však potrebné ešte presnejšie objasniť tieto výsledky, pretože účinky každého jedného orechu ešte nie sú úplne presne popísané [51, 52].



Obrázok 7: Schéma pre rozdelenie fytochemických látok obsiahnutých v esenciálnych olejoch rastlinných matric (prevzaté a upravené z [64])

1.5.1 Delenie orechov podľa gastronomického a botanického hľadiska

Orechy možno označiť za veľmi zložitú skupinu rastlín. Botanici definujú orech ako jednosemenné suché ovocie, ktoré je obalené v perikarpe (pletivo). Právě orechy sa však po dozretí nerozložia. Slovo orech sa v skutočnosti používa na pomenovanie akéhokoľvek veľkého olejovitého jadra v škrupine, ktoré možno skonzumovať. Vyznačuje sa schopnosťou poskytnúť ľudskému organizmu zdraviu prospešné látky [52, 49].

Gastronomická definícia je veľmi obsiahla. Zahŕňa orechy, semená (kešu, píniové oriešky, tekvicové, sezamové), strukoviny (arašidy) a kôstkovice (mandle, makadamový orech, pistácie a vlašský orech). V skratke gastronómia definuje orech ako jedlé jadro, obklopené škrupinou [53].

V tejto časti sú uvedené aj rastlinné matrice, ktoré nespĺňajú podmienku botanickej klasifikácie orechu, avšak boli použité v praktickej časti diplomovej práce. Príčinou je obsah látok, významných pre ľudský organizmus a dostupnosť. Orechové oleje sú veľmi využívanou surovinou v potravinárskom priemysle, ktoré majú zdraviu prospešné účinky. Okrem iného, majú aj široké uplatnenie v kozmetickom priemysle [54].

1.5.1.1 Kokosový orech

Je ovocím kokosovníku orechoplodého *Cocos nucifera*. Pestuje sa najmä kvôli jeho výživovým a liečivým schopnostiam. Olej sa získava zo sušeného ovocia, ktoré prechádza rôznymi rafinačnými krokmi a naopak panenský olej sa vyrába bez chemických postupov. Má antibakteriálne, protiplesňové, antivírusové, antiparazitárne, antioxidačné účinky. Kokosová voda a jadro obsahujú mikrominерály a živiny nevyhnutné pre ľudský organizmus. Kokosový olej obsahuje najmä nasýtené mastné kyseliny (kyselina laurová obsiahnutá v 50 - 55 %). Je obohatený aj o mastné kyseliny so stredným reťazcom (pozostávajú z kyseliny kaprónovej, kaprylovej, kaprínovej). Významnú zložku tvoria tokotrienoly, ktoré pôsobia proti peroxidácii lipidov a tokoferoly s antioxidačnou aktivitou [55, 56, 63].

1.5.1.2 Lieskový orech

Lieskový orech je plodom malých stromov alebo krov liesky *Corylus avellana*. Hlavným svetovým producentom je Turecko, ktoré v roku 2012 tvorilo približne 63 % celosvetovej produkcie. Jadro lieskového orechu obsahuje okolo 60 % oleja, ktorý sa získava buď lisovaním za studena alebo extrakciou rozpúšťadlom. Medzi hlavné zložky obsiahnuté v oleji z lieskovca patrí kyselina olejová a hlavnou vedľajšou zlúčeninou je β -sitosterol [54]. Zároveň je obohatený o draslík, fosfor, vápnik, horčík a selén. Služi ako významný zdroj vitamínu E a B. Obsahuje aj

glutámovú a asparagovú kyselinu, arginín, lyzín a tryptofán. Sacharidy, organické kyseliny, aminokyseliny zohrávajú významnú úlohu v senzorike ale vďaka jeho výživovým zložkám je dôležitý aj pre správnu funkciu organizmu [57, 63].

1.5.1.3 Pekanový orech

Plodom *Carya illinoensis* je kôstkovica tvorená jednou kôstkou, ktorá je obalená šupinou. Pochádza z USA, avšak je dobre adaptovaný aj v Južnej Afrike a Austrálii. Aj napriek tomu, USA tvorí 80 % celosvetovej produkcie. Hlavnou mastnou kyselinou je opäť kyselina olejová a hlavným tokoferolom je γ -tokoferol. Pekanový orech je najbohatší na β -sitosterol a 5-avenasterol. Vyššie koncentrácie sú charakteristické aj pre prítomnosť metyl a dimetylsterolov [54].

1.5.1.4 Betelový orech

Všeobecne známy aj ako arekový orech, je plodom palmy *Areca catechu*. Pestuje sa v Indii, Bangladéši, Japonsku. Farmaceutický význam tohto orechu spočíva v prítomnosti alkaloidu - arekolínu. Medzi hlavné zložky obsiahnuté v betelovom orechu patrí katechín, flaván-3,4-diol, leukocyandín, ktoré patria do skupiny polyfenolov. Zároveň tieto látky môžu prispievať k toxicite orechu. Ako karcinogén sa preukázal safrol, hydroxychavikol a katechíny. Medzi štyri hlavné alkaloidy izolované z areka orechu patrí arekolín (7,5 mg/g), arekaidín (1,5 mg/g), guvacolín (2,0 mg/g), guvacín (2,9 mg/g). Všetky tieto spomínané alkaloidy sú príbuzné arekolínu, ktorý je štruktúrne podobný nikotínu. Profil mastných kyselín pozostáva z kyseliny laurovej, myristovej, palmitovej, stearovej, dekánovej, dodecénovej a hexadecénovej [58, 59, 60].

1.5.1.5 Muškátový orech

Je vysušeným semenom aromatickej rastliny muškátovníku pravého *Myristica fragrans*, s charakteristickou vôňou a liečivými účinkami. Používa sa na liečbu žalúdočných vredov, porúch pečene aj ako diuretikum. Olej získaný z muškátového orechu obsahuje myristín, kyselinu myristovú. Produkuje 5 - 15 % prchavého oleja, ktorý je zložený z borovice, sabinénu, kamfénu, myristínu, elemicínu, izoelemikínu, eugenolu, izoeugenolu, metoxy eugenolu, safrolu, lignanov, neolignanov. Tradične sa používa v kulinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle, tiež ako dochucovalo pri príprave pečiva, mäsa, údenín, zeleniny, nealkoholických nápojov. Na univerzite v Calgary (Faculty of Medicine), sa **Dr. W. A. Whitelaw** [62], zaoberal intoxikáciou muškátovým orieškom. Narkotické účinky možno vyvolať požitím 2 - 5 g prášku. Príznaky sa objavujú približne po 6 hodinách od požitia.

Intoxikácia sa prejavuje sčervenáním pokožky, zrýchleným tepom, absenciou slinenia, výpadkami pozornosti, možným sluchovým a čuchovým poškodením [61, 62].

1.5.1.6 Para orech

Brazílsky orech, známy ako para orech sa využíva ako potravina a v kozmetickom priemysle. Plody stromu *Bertholetia excelsa* pochádzajú z Brazílie. Ovocie obsahuje 12 až 25 semien (orechov). Pri priemyselnom spracovaní sa semená oddeľujú od ovocia. Jadro para orechu je obohatené predovšetkým o tuk, bielkoviny, sacharidy, vitamíny B a E. Zo všetkých orechov obsahujú najviac horčíku, zinku, selénu, fosforu a vápniku. Ich olej, je bohatý na mastné kyseliny, hlavne kyselinu linolovú a olejovú. Vďaka jeho významným výživovým vlastnostiam, môže slúžiť ako prevencia voči chronickým závažným ochoreniam srdca či rakovine [63].

1.5.2 Látky obsiahnuté v orechoch

Orechové stromy sú zdrojom najmä fytochemických látok. Zloženie sa môže významne líšiť v závislosti od druhu orechu, podmienok, za akých bol pestovaný, skladovaný. Fytochemikálie sú spojené s priaznivým pôsobením na ľudský organizmus. Majú protizápalové, antioxidantné, antivírusové účinky. Prítomnosť organosírných alebo antioxidantných enzýmov doposiaľ nebola preštudovaná [64].

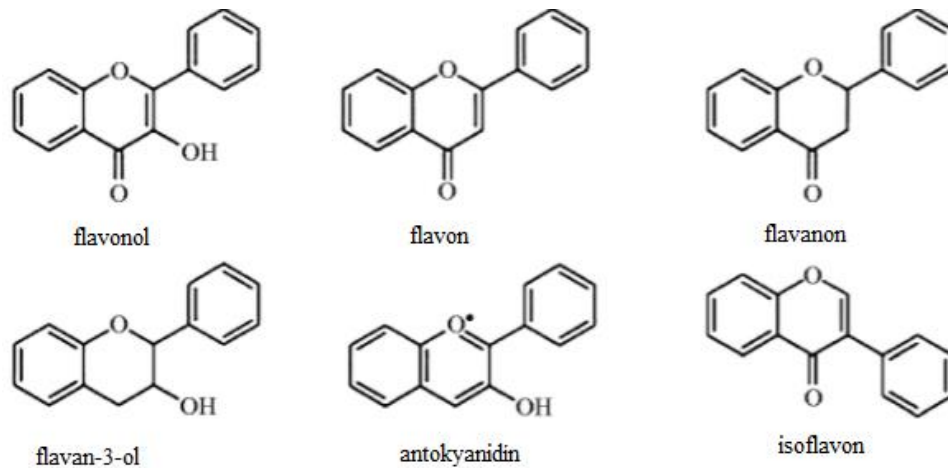
1.5.2.1 Celkový obsah fenolických zlučenín

Ich hladina je ovplyvnená rôznymi faktormi - environmentálnymi, zložením pôdy, úrovňou zrenia, tak isto ako je to pri ovocí a zelenine. Fenoly sú hlavnou skupinou látok, spadajúcich do triedy fytochemikálií. Zahŕňajú širokú skupinu látok - polyfenoly (molekula obsahujúca jednu alebo viac fenolických skupín) [64, 65].

1.5.2.2 Flavonoidy

Do skupiny flavonoidov spadajú - flavonoly, flavóny, flavanóny, flaván-3-oly, antokyanidíny a isoflavóny. Štruktúra látok je uvedená na obrázku 8 [64].

Flavonoidy vznikajú ako sekundárne metabolity rastlín, obohatené o antioxidanty. Funkčné hydroxylové skupiny preukazujú svoje antioxidantné vlastnosti tým, že vychytávajú voľné radikály, a teda potlačujú oxidačný stres. Pôsobia ako prevencia pred rakovinou, kardiovaskulárnymi a respiračnými ochoreniami [50, 64].



Obrázok 8: Štruktúra vybraných flavonoidov (prevzaté a upravené z [64])

1.5.2.3 Fytosteroly

Fytosteroly sú zlúčeniny veľmi podobné cholesterolu. Líšia sa štruktúrou bočného reťazca, napríklad β -sitosterol a stigmasterol majú etylovú skupinu na C24. Kampesterol a brassikasterol obsahujú metylenovú skupinu. Konzumáciou fytosterolu (2 - 3 gramy denne) vedú k zníženiu nízkodenzitného lipoproteínu (LDL cholesterol). Vitamín E je zložený z ôsmich prírodných zlúčenín - α , β , γ , 8-tokoferolu a α , β , γ , δ a 5-tokotrienolu. Tokoferol sa od tokotrienolu odlišuje stupňom nasýtenia hydrofóbneho reťazca. Tokotrienoly obsahujú tri dvojnásobné väzby na C3, C7 a C11 v bočnom reťazci [66].

1.5.2.4 Terpény

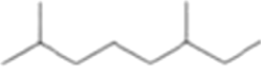


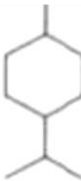
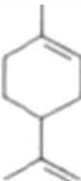
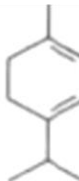


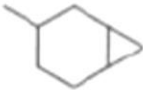
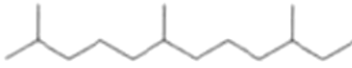
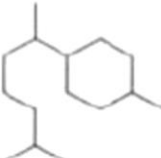
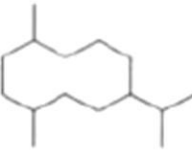
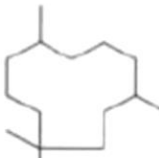
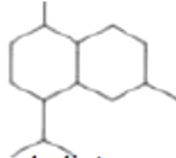
Prírodzene vyskytujúce sa zložky v rôznych rastlinných matriciach, ktoré pozostávajú z izoprénových jednotiek. Ich klasifikácia spočíva v počte týchto jednotiek a je uvedená v nasledujúcej tabuľke 3. Terpény sú prítomné najmä v matriciach rastlinného pôvodu. Výrazne prispievajú k charakteristickým organoleptickým vlastnostiam danej potraviny (chuť, vôňa). Mono- a seskviterpény nachádzame predovšetkým v esenciálnych olejoch a di-, tri a opäť seskviterpény hlavne v balzamochoch a živiciach [67].

Tabuľka 3: Delenie terpenov aj s príslušnými počtami uhlíkov [67]

Terpény	Počet uhlíkov
Monoterpény	C10
Seskviterpény	C15
Diterpény	C20
Sesterpény	C25
Triterpény	C30
Tetraterpény	C40

Monoterpény, vid' tabuľka 4, vznikajú kondenzáciou izopentenylu difosfátu (IDP) s dimetylallyl difosfátom (DMADP). Elimináciou difosfátového aniónu vzniká geranyl difosfát (GDP). Hydrolýza geranylu alebo neryldifosfátu, katalyzovaná prenilpyrofosfatázou poskytuje monoterpénové alkoholy - geraniol, nerol. Acyklické monoterpény (napríklad myrcén, ocimén) vznikajú dehydratáciou geraniolu. Kondenzácia IDP s GDP poskytuje farnezyldifosfát. Práve veľká časť seskvi- (tabuľka 4), di-, a polyterpénov sa tvorí z farnezyldifosfátu [67].

Tabuľka 4: Vybrané terpény, prítomné v esenciálnych olejoch a extraktoch rastlinných matric [67]

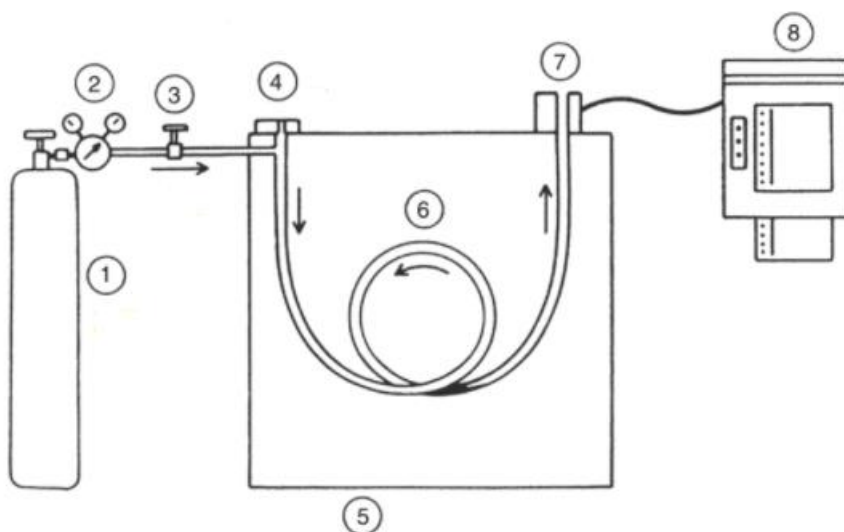
Monoterpény	
acyklické	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>2,6-dimetyloktán</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>myrcén</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>ocimén</p> </div> </div>
monocyklické	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>p-mentán</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>limonén</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>α-terpinén</p> </div> </div>
bicyklické	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>pinan</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>α-pinén</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>karan</p> </div> </div>
Seskviterpény	
acyklické	 <p>farnesan</p>
monocyklické	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>bisabolén</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>germakrén</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>humulén</p> </div> </div>
bicyklické	 <p>kadinén</p>

1.6 Inštrumentálna analýza

Chromatografia je metóda, v ktorej sú jednotlivé komponenty separované a distribuované medzi dve fázy, pričom jedna je stacionárna a druhá mobilná. V zmesi sa jednotlivé zlúčeniny rozdelia v rôznych pomeroch, v závislosti na ich rozpustnosti v daných fázach [68, 69].

1.6.1 Plynová chromatografia

Patrí do techník, ktoré sa využívajú pre separáciu a analýzu stredne prchavých a prchavých látok. Mobilnou fázou v GC je plyn (hélium, dusík, vodík) [68, 69].



Obrázok 9: Schéma plynového chromatografu

1 - zásobná fľaša nosného plynu, 2 - ventil, 3 - regulátor prietoku, 4 - dávkovacie zariadenie, 5 - termostat, 6 - kolóna, 7 - detektor, 8 - spracovanie dát (prevzaté a upravené z [68])

Prietok plynu je regulovaný pomocou ventilu a regulátoru prietoku. K dávkovaciemu zariadeniu je pripojená kolóna. Vzorka je zavádzaná do prúdu nosného plynu pri dostatočne vysokej teplote, aby sa odparili všetky zložky. Na dávkovanie sa väčšinou používa mikroinjekčná striekačka, ktorej ihla prepichne septum v dávkovacom zariadení. Pary sú potom unášané prostredníctvom nosného plynu kolónou, kde dochádza k ich separácii. Detektor je priamo napojený na výstup z kolóny a monitoruje prítomné zložky, ktoré sú eluované z kolóny. Detektor nesmie byť citlivý na nosný plyn, ale musí detegovať eluované látky. Záznam jeho odozvy v čase tvorí chromatogram. Základná schéma plynového chromatografu je uvedená na obrázku 9 [69].

1.6.1.1 Detektory používané v plynovej chromatografii

Na detekciu zlúčenín bolo vyvinutých niekoľko detekčných zariadení. Medzi najviac uplatňované v praxi sa radí plameňovo ionizačný detektor (FID), tepelne vodivostný detektor

a detektor elektrónového záchytu (ECD). Ideálny detektor by mal byť univerzálny, s vysokou citlivosťou a so širokým lineárnym rozsahom [69]. Ich charakteristiky a princípy sú uvedené v tabuľke 5 [70].

Tabuľka 5: Princípy detektorov používaných v GC [70]

Detektor	Princíp	Selektivita	Citlivosť [g/s]	Lineárny rozsah
Tepelne vodivostný (TCD)	Meranie rozdielov v tepelnej vodivosti vzorky a referenčným plynom	Univerzálny	10^{-10}	10^4
Plameňovo-ionizačný (FID)	Spaľuje zlúčeninu v plameni H_2/O_2 pri $2000\text{ }^\circ\text{C}$ a meria ióny	Reaguje na všetky oxidovateľné zlúčeniny uhlíka	10^{-12}	10^7
Elektrónového záchytu (ECD)	Meria prúd, ktorý sa mení po reakcii organickej zlúčeniny s elektrónom	Reaguje na všetky zlúčeniny reagujúce s Elektrónom	10^{-14}	10^3

Plameňovo-ionizačný detektor

Splňuje všetky charakteristické znaky pre ideálny detektor. Princíp spočíva v spálení organickej látky v plameni H_2/O_2 pri $2000\text{ }^\circ\text{C}$, pričom dochádza k produkcii radikálov a štepných fragmentov, ktoré indukujú prúd medzi elektródami. Na elektródy je vložené napätie (200 - 300 V). Počet fragmentov je úmerný prúdu, ktorý preteká medzi elektródami. Zo záznamu závislosti iónového prúdu na čase, možno reprodukovať koncentráciu organickej zlúčeniny ako pík, tvoriaci sa v systéme. Minimálny detekčný limit FID je 10^{-11} g [26, 69].

Detektor elektrónového záchytu

ECD sa využíva najmä v environmentálnej analýze, pretože je obzvlášť citlivý na halogénové zlúčeniny. Vysokú citlivosť vykazuje aj pri stanovení dusíkatých látok, alkylhalogenidov a organokovových zlúčenín. Nie je vhodný pre analýzu alkoholov a ketónov. Detektor obsahuje rádioaktívny β žiaric (^{63}Ni), ktorý koliduje s plynom za tvorby merateľného prúdu, ktorý je konštantný. Častice, ktoré sú eluované z kolóny môžu zachytávať elektróny a ich úbytok v prúde je potom zaznamenávaný [69, 70].

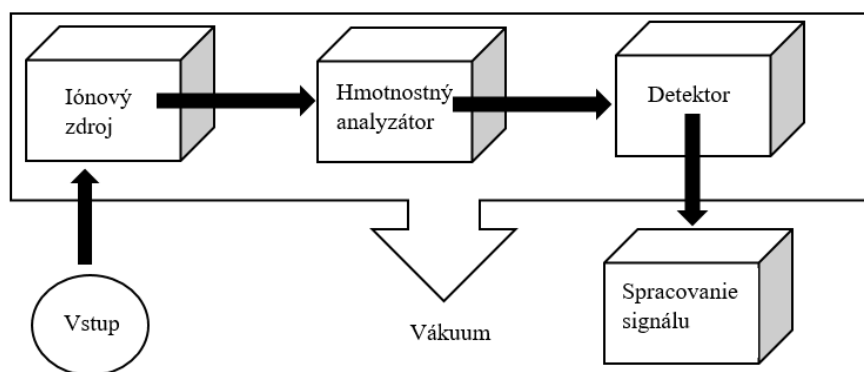
Tepelne vodivostný detektor

Figuruje ako prvý vyvinutý detektor pre GC. Možno ho charakterizovať ako nedeštruktívny, pomerne jednoduchý a citlivý. Je založený na meraní rozdielov medzi tepelnou vodivosťou nosného plynu a stanovovanej látky. Cez odporové vlákna, ktoré sú vyhrievané na určitú teplotu, prechádza prúd mobilnej fázy s unášanými analytmi. V prípade prítomnosti eluovanej látky v plyne s odlišnou tepelnou vodivosťou, dochádza k zmene teploty vlákna, a teda aj zmene jeho elektrického odporu [69, 70].

1.6.2 Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria (MS) je analytická metóda, ktorá zahŕňa meranie pomerov hmotnosti k náboju iónov, ktoré vznikli pri ionizácii vzorky. Výsledný záznam tvorí hmotnostné spektrum, pozostávajúce zo závislosti intenzity iónov na ich pomere m/z . Využíva sa na stanovenie hmotnosti atómov, avšak vďaka fragmentácii iónov, poskytuje informácie, týkajúce sa štruktúry danej látky [71, 72]. Schéma hmotnostného spektrometru je uvedená na obrázku 10.

Od 20. storočia je však možné prostredníctvom novo vyvinutých ionizačných techník ionizovať aj napríklad proteíny alebo polysacharidy. Spojenie s chromatografickými technikami (GC, HPLC) a rozvoj tandemovej hmotnostnej spektrometrie prispel k vývoju analýz v oblasti kontroly životného prostredia, metabolizmu liekov, proteomiky, dokonca sa dosiahlo aj priame stanovenie hmotnosti vírusov [71, 72].



Obrázok 10: Základná schéma hmotnostného spektrometru (prevzaté a upravené z [72])

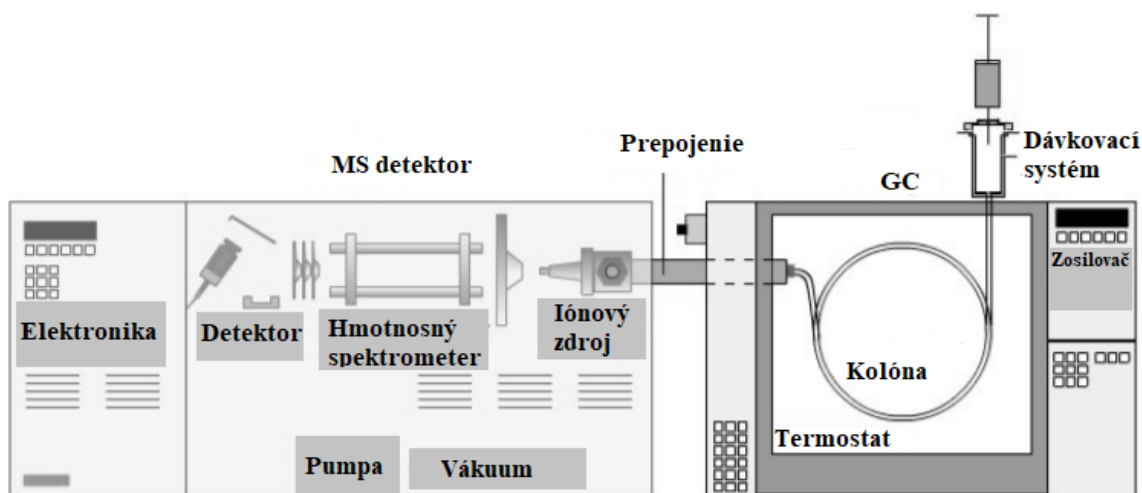
Ako je uvedené na obrázku 10, hmotnostný spektrometer je vybavený iónovým zdrojom, hmotnostným analyzátorom, detektorom, systémom na vyhodnocovanie a archiváciu získaných dát, obvykle počítačom s tlačiarňou. Funkcia iónového zdroja spočíva v prevedení neutrálnych zložiek analytov na nabitú časticu. Hmotnostný analyzátor následne rozdeľuje vzniknuté ióny na základe pomeru hmotnosti a náboja. Po rozdelení detektor nakoniec sníma ióny a určuje ich

relatívnu intenzitu. Hmotnostný spektrometer však môže obsahovať viacero analyzátorov pre prevedenie MS/MS analýzy. Najvýznamnejší režim skenovania v tandemovej hmotnostnej spektrometrii je výsledný iónový sken. Ióny s určitou hmotnosťou sa vyberú prvým hmotnostným analyzátorom. Následne prechádzajú do kolíznej cely, kde dochádza k zrážkam s inertným plynom a fragmentácii. Produktové ióny sa analyzujú v druhom analyzátoe. Ióny, ktoré nemajú vybranú hmotu, sú odvedené z cely. Ióny s určenou hmotou za krátky časový úsek podliehajú fragmentácii a následne sa analyzujú [71, 72].

1.6.3 Plynová chromatografia - hmotnostná spektrometria

Spojenie GC-MS, vid' obrázok 11 tvorí synergickú kombináciu dvoch výkonných analytických techník. Plynová chromatografia umožňuje separáciu zložitej zmesi v čase a hmotnostný spektrometer poskytuje informácie napomáhajúce k určeniu štruktúry každej zložky [73].

Vzorka v toku mobilnej fázy, v tomto prípade plynu, putuje do hmotnostného spektrometru. V prípade spojenia s chromatografickými technikami, je nevyhnutné odstrániť nadbytok mobilnej fázy pred vstupom do vákuua. V iónovom zdroji podlieha plynný eluát ionizácii a následne vzniknuté ióny sú delené podľa ich pomeru hmotnosti a náboja. Prostredníctvom ionizácie molekula získava prebytok vnútornej energie, čím je umožnená jej fragmentácia. Výsledkom fragmentácie je produkcia jednoduchších iónov, ktoré sú zaznamenávané pomocou detektoru [70, 74].



Obrázok 11: Schéma usporiadania GC-MS (prevzaté a upravené z [75])

1.6.3.1 Ionizačné techniky

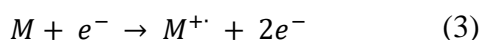
Pre úspešnú analýzu je nevyhnutné zvoliť vhodnú ionizačnú techniku. Existuje veľa dostupných ionizačných techník pre hmotnostný spektrometer, avšak pri spojení s plynovou

chromatografiou sa najviac využíva elektrónová a chemická ionizácia. Kompatibilita medzi hmotnostným spektrom a ionizáciou je nevyhnutnosťou. Pre každú skupinu zlúčenín je určený zoznam ionizačných techník, ktoré je možné použiť pri ich analýze. Zároveň pre každú ionizačnú techniku sú uvedené kompatibilné chromatografické metódy, ktoré možno použiť pri ich stanovení [73, 76].

Úloha iónového zdroju spočíva v dodaní energie pre molekulu, ktorá je bezpodmienečná pre vykonanie úspešnej ionizácie. Podmienkou je však dodržanie určitej teploty, aby analyt nemohol prejsť do kvapalného stavu [70].

Elektrónová ionizácia (EI)

Ionizácia nárazom elektrónov je najbežnejšou technikou. Eluát neutrálnych molekúl, ktorý vychádza z GC kolóny, vstupuje do iónového zdroja. Elektróny sú emitované pomocou žeravej väčšinou wolfrámovej katódy, ktoré sú následne zachytávané anódou. Elektróny sú zároveň vystavené prúdu s energiou 70 eV. Tým, že sa priblíži emitovaný elektrón k valenčnému elektrónu, dochádza k jeho následnému uvoľneniu a vzniku radikálového katiónu. Priebeh elektrónovej ionizácie možno popísať nasledujúcou rovnicou (3).



Vyprodukované ióny sú potom vytesnené z iónového zdroja, následne zaostrené a usmernené do hmotnostného analyzátoru. EI je vhodná pre prchavé zlúčeniny nepolárneho a stredne polárneho charakteru, s hmotnosťou menšou ako 1000 Da. Nemožno ju použiť v prípade vysokomolekulárnych a tepelne nestabilných látok [70, 73, 76, 77].

Chemická ionizácia (CI)

Využíva sa pre identifikáciu a kvantifikáciu organických molekúl. Časom našla uplatnenie aj v oblasti chémie, biochémie, lekárstve a environmentalistiky [78].

CI je na rozdiel od EI založená na ionizácii vzorky reakciou iónov/molekúl v plynnej fázy. Pri určovaní štruktúry je ale obzvlášť vhodné preskúmať oba typy spektier. CI najskôr využívala pozitívne reakcie iónov ale v posledných rokoch sa zvýšil záujem aj o negatívne reakcie ako metódy ionizácie. Vývoj záporných iónov bol spôsobený tým, že EI pri nízkych tlakoch zdroja, poukazovali na nízku intenzitu produkcie negatívnych iónov a zároveň silnú závislosť spektier negatívnych iónov od ionizačnej energie. Zároveň komerčné hmotnostné spektrometre neboli vybavené na analýzu v negatívnom móde. V súčasnosti je však prístroj

schopný pracovať bez problémov aj v negatívnom režime, pretože intenzity signálov sú minimálne také isté ako sú intenzity v pozitívnom móde [78].

CI je založená na dvoch krokoch. V prvom dochádza k ionizácii molekúl reakčného plynu a následne prostredníctvom ión molekulárnych interakcií, nastáva ionizácia analytu. Patrí medzi prvú mäkkú ionizačnú techniku, v ktorej sú produkované ióny s párnym počtom elektrónov [77].

1.6.3.2 Hmotnostné analyzátory

Po produkcii iónov v iónovom zdroji, je potrebná ich separácia v hmotnostnom analyzátore na základe pomeru hmotnosti a náboja. Ich voľba závisí na niekoľkých parametroch. Sú obmedzené svojim hmotnostným rozsahom (napríklad existujú analyzátory pre komponenty s hmotnosťou menej ako 1000 Da). Ďalej je to ich rozlišovacia schopnosť, chyba určenia m/z , dynamický rozsah a rýchlosť. Umožňujú meranie v dvoch módoch - sken a záznam vybraného iónu (SIM) [69, 71].

Sken

Takmer všetky vzorky sa najskôr analyzujú pomocou úplného skenu, aby bolo možné získať čo najviac informácií. Úplný sken umožňuje magnetický sektorový analyzátor, kvadrupól a analyzátor doby letu. Najčastejšie sa prevádza sken v určitom rozmedzí m/z , čím sa získa hmotnostné spektrum a na základe fragmentových iónov a logických strát, sú nám poskytnuté informácie o molekulovej hmotnosti [76].

SIM

Pokiaľ laboratórny pracovník chce vylúčiť alebo zistiť a následne určiť koncentráciu nejakej zložky už v preskúmanej vzorke, volí záznam vybraného iónu SIM [76].

Kvadrupólový analyzátor (Q)

Kvadrupól je tvorený štyrmi kovovými tyčami, s kruhovým prierezom dĺžky 20 - 30 cm. Kladné jednosmerné napätie je aplikované na dve protilahlé elektródy a záporné na zvyšné dve protilahlé elektródy. Zároveň je ešte na všetky elektródy vložené vysokofrekvenčné striedavé napätie. Ión začne okamžite oscilovať v momente, v ktorom je usmernený na stredovú os kvadrupólového analyzátoru. Jeho princíp spočíva vo vytvorení stabilnej trajektórie iónov s použitím jednosmerného a striedavého napätia. To znamená, že analyzátor zachytáva alebo vypudzuje ióny na základe ich trajektórie. Za určitých podmienok (určitý časový okamih a daný pomer U/V) je táto trajektória stabilná iba pre ión

s danou hodnotou m/z . Tento ión potom prechádza celým kvadrupólom, na rozdiel od ostatných, ktoré sú zachytené na tyčiach a následne je usmernený na detektor. Úpravou podmienok sa všetky ióny postupne dostávajú na detektor, a teda ho možno nazvať aj hmotnostným filtrom [70, 71, 79, 80].

V praxi nachádza najväčšie uplatnenie v kvalitatívnej analýze, lekárstve, letectve a GC-MS analýze. Aj keď má nízku rozlišovaciu schopnosť, tak poskytuje rýchly sken, a preto je vhodný pre kombináciu s chromatografickými metódami (HPLC, GC) [80].

Detekcia neznámych látok vo vzorke v GC-MS

Úspešnej GC-MS analýze nebránia žiadne negatívne aspekty. Jedine použitie kapilárnych kolón s malým priemerom vedie k zníženiu citlivosti a problémom s vákuovým systémom. Z tohto dôvodu sa v GC-MS nepoužíva ako nosný plyn dusík ale hélium, čím sa zvyšuje citlivosť. Ako nosný plyn sa môže použiť aj vodík ale pri elektrónovej ionizácii môžu byť produkované MH^+ ióny miesto M^+ . Aj napriek tomu, že MS je známa svojou vysokou citlivosťou, tak v prípade záznamu celého spektra počas chromatografie sa výrazne znižuje. Riešenie predstavuje záznam vybraného iónu, kedy sa citlivosť metódy zvyšuje o jeden až dva rády [80].

Medzi najviac využívané detektory v GC-MS analýze patrí FID a hmotnostne spektrometrický detektor (MSD), ktorý je založený na ionizácii neutrálneho atómu alebo molekuly a následnej separácii a detekcii vzniknutých iónov, na základe ich pomeru hmotnosti a náboja [70, 80].

Identifikácia neznámych látok sa uskutočňuje pomocou knižnice spektier v počítači. Získané spektrum sa teda porovnáva so spektrom, získaným z knižnice spektier pre elektrónovú ionizáciu s energiou 70eV. Nevýhodou je, že rôzne zlúčeniny poskytujú veľa podobných spektier, takže identifikácia je často neistá. Aj v prípade, že zhoda je väčšia ako 95% nemusí sa jednať o danú látku. Môžu to byť rôzne izoméry, homológy alebo odlišné zlúčeniny, ktoré majú spoločnú jednotku štruktúry. Aj keď identifikácia v tomto prípade nie je dostatočná, slúži ako výborná pomôcka pre určovanie štruktúry neznámej látky, čo si však vyžaduje určitú znalosť a skúsenosť [26, 81].

1.6.3.3 Kvalitatívna a kvantitatívna analýza

Každý pík je charakterizovaný dvoma parametrami. Plochou, ktorá odpovedá kvantite analyzovanej látky eluovanej z kolóny a retenčným časom reflektujúcim interakciu medzi analytom a stacionárnou fázou (kvalitatívna analýza). Pre dokazovanie prítomnosti daných

látok sa môžu v GC-MS analýze využívať retenčné indexy - Kovatsov index alebo van den Doolov index [82].

Kovatsov index bol navrhnutý pre izotermálne podmienky v plynovej chromatografii. Ako štandard bola využitá homologická rada n -alkánov, pričom každý mal charakteristickú hodnotu retenčného indexu. Tieto hodnoty sa počítajú ako stonásobok počtu uhlíkov, prítomných v danom alkáne. Napríklad retenčný index n -butánu je 400. Identifikácia stanovovanej (neznámej) látky sa potom prevádza na základe porovnania vypočítaného indexu, s indexom známej látky. Rovnica pre výpočet Kovatsovho indexu je uvedená v rovnici 4 [82, 83, 84].

$$RI_x = 100 \cdot n + 100 \frac{\log t_x - \log t_n}{\log t_{n+1} - \log t_n} \quad (4)$$

kde n je rovné počtu atómov uhlíku v najbližšom nižšom alkáne, t_x odpovedá retenčnému času stanovovanej látky, t_n retenčnému času najbližšieho nižšieho alkánu, a nakoniec t_{n+1} je retenčný čas najbližšieho vyššieho alkánu.

Van den Doolov index sa využíva v prípadoch, kedy podmienky nie sú izotermálne. Obdobne ako v prípade Kovatsovho indexu, je potrebné najprv určiť retenčné časy n -alkánov, ktoré sú premerané za takých istých podmienok ako vzorka. Rovnica pre výpočet van den Doolovho indexu je uvedený v nasledujúcej rovnici 5 [84].

$$RI_x = 100 \cdot n + 100 \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)} \quad (5)$$

kde RI_x odpovedá retenčnému indexu stanovovanej látky, t_x charakterizuje retenčný čas analyzovanej látky, ďalej t_n odpovedá retenčnému času člena rady s počtom uhlíkov n a t_{n+1} odpovedá retenčnému času člena homologickej rady s počtom uhlíkov $n+1$. Poslednou premennou je n čo odpovedá počtu atómov uhlíku v najbližšom nižšom alkáne [84].

2 Experimentálna časť

Táto časť bude podrobne popisovať prevedenie experimentu. Vzorky pred extrakciou boli najskôr nastrúhané a následne podrobené extrakcii nadkritickou tekutinou v troch rôznych módoch (statický, statický s modifikátorom a dynamický). Získaný extrakt bol analyzovaný pomocou GC-MS. Hmotnostné spektrá boli vyhodnocované na základe porovnávania s knižnicou hmotnostných spektier Národného inštitútu pre štandardy a technológiu (NIST '14 Mass Spectral Library) a FFNSC (Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds). Pre potvrdenie zhody zlúčeniny bol využitý van Den Doolov retenčný index. Pre jeho výpočet rovnica (5), je však nevyhnutné stanoviť retenčné časy homologickej rady *n*-alkánov (príloha 1), ktoré sú analyzované za takých istých podmienok ako vzorka.

2.1 Analýza

2.1.1 Chemikálie a plyny použité pri prevádzaní praktickej časti diplomovej práce

- Destilovaná voda,
- hélium 4.6 (Linde Gas a.s., Praha, Česká republika),
- *n*-hexán (Sigma - Aldrich, Praha, Česká republika, SZBC2640V),
- metanol (Sigma - Aldrich, Praha, Česká republika, SZBE167SV),
- oxid uhličitý potravinársky (Linde Gas a.s., Praha Česká republika),
- rada *n*-alkánov C8 - C40 (Sigma - Aldrich, Praha, Česká republika),
- tlakový vzduch.

2.1.2 Prístroje, ktoré boli využité k prevedeniu experimentálnej časti diplomovej práce

- Extraktor Spe-ed SFE Helix (Applied Separations, Allentown, PA, USA),
- prietokomer FMA 4000 OMEGA (Omega Engineering Inc., Norwalk, CT, USA),
- plynový chromatograf GC-2010 s hmotnostným detektorom QP 2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japonsko),
- autosamplér PAL-Combi (CTC, Analytics AG, Zwingen, Švajčiarsko),

2.1.3 Pomocný materiál a zariadenia

- Sklenený piesok,
- sklená vata (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA),
- mlynček na muškátový oriešok (Tescoma, Zlín, Česká republika),
- kadičky, pipety a odmerné valce rôznych objemov,
- vialky s viečkami a septami,
- váhy (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Nemecko).

2.1.4 Vzorky

K samotnej analýze bolo využitých niekoľko druhov známych orechov, ktoré boli zakúpené na internete alebo v miestnom obchode. V nasledujúcej tabuľke 6, sú uvedené konkrétne orechy, využitie k prevedeniu SFE a následnej analýze.

Tabuľka 6: Súhrnná tabuľka pre použité vzorky v praktickej časti

Názov	Firma	Distribútor
Pekanový orech	Naturalia	Penny Market, s.r.o., Počernická 257, Radonice, ČR
Lieskový orech	Belbake	Lidl Stiftung & Co. KG Stiftsberg str. 1 Neckarsulm, Nemecko
Muškatový orech	Vitana	Vitana, a.s., Mělnická 133, Byšice, ČR
Kokosový orech	Exver Food	-
Betelový orech	Fresh Stock Freeship	India
Para orech	Exver Food	-

2.1.4.1 Príprava vzorky k analýze

Vzorka bola nastrúhaná, aby sa lepšie zavádzala do extrakčnej patróny. Príprava extrakčnej patróny pozostávala z premývacieho kroku, pre elimináciu nežiadúcich látok, ktoré mohli byť prítomné z predchádzajúcej extrakcie. Následne sa na dno patróny aplikovala sklená vata (zabránenie nežiadúcej kontaminácie tesnenia). Potom sa do patróny nasypal piesok, pridala sa vzorka zmiešaná s pieskom, opäť piesok a sklená vata. Takto pripravená patróna bola zatesnená, uzatvorená vložená do Spe-ed Helix SFE extraktoru, ktorý je vyobrazený na obrázku 12.



Obrázok 12: Zariadenie Spe-ed SFE Helix pre SFE extrakciu

2.2 Prevedenie extrakcie nadkritickou tekutinou

Extrakcia sa prevádzala na prístroji Spe-ed SFE Helix. K tomuto prístroju bol pripojený aj prietokomer FMA 4000 OMEGA, ktorý umožňoval sledovať prietok oxidu uhličitého. Pred zahájením extrakcie bolo potrebné vykonať niekoľko nasledujúcich krokov. Zapnúť prívod vzduchu a potravinárskeho CO₂, skontrolovať či všetky ventile (vstupný a výstupný ventil CO₂, vypúšťací) sú zatvorené. Prístroj bol riadený pomocou počítača, kde sa nastavovali podmienky extrakcie (teplota, tlak). Po ustálení extrakčných podmienok bol CO₂ vedený do extrakčnej patróny, kde prebiehala samotná extrakcia. Extrakt spolu s oxidom uhličitým prechádzal kapilárou a dostával sa do záchytnej vialky, v ktorej bolo záchytné rozpúšťadlo (*n*-hexán).

2.2.1 Postup extrakcie nadkritickou tekutinou

Do kadičky bol navážený 1 g pomletého orechu a zmiešaný s pieskom. Táto zmes bola vložená do extrakčnej nádoby. Následne bola extrakčná nádoba uzatvorená a vložená do prístroja pre SFE. Potom na počítači boli zvolené extrakčné podmienky (teplota, tlak). Do záchytnej vialky sa odmeralo záchytné rozpúšťadlo (5 ml *n*-hexánu), ktoré sa vždy dopĺňalo na požadovanú hladinu, z dôvodu jeho postupného odparovania v priebehu záchytu extraktu. Pri zachytávaní extraktu sa sledoval a reguloval prietok oxidu uhličitého. Po ukončení extrakcie sa extrakt nechal v záchytnej vialke, ktorá sa uzavrela, pokryla parafilmom, aby nedochádzalo k odparovaniu extrahovaných látok a uchovávala v chladničke až po dobu, kým nebola prevedená GC-MS analýza.

2.2.2 Helix SFE zariadenie

Kompaktná základná jednotka o rozmeroch 25,4 cm × 40,64 cm × 86,36 cm je východiskovou platformou pre prevádzku. Tento laboratórny extraktor, ktorého parametre sú uvedené v tabuľke 7, bol vyvinutý pre optimalizáciu procesov s dôrazom na maximálnu flexibilitu. Výhodou tohto prístroja je možnosť doplnenia o ďalšie príslušenstvo, kedykoľvek pri zmene kritérií. Základ SFE HELIX extraktoru tvorí samotný extraktor, cyklonový separátor, pumpa CO₂, zariadenie pre recykláciu CO₂, pumpu pre modifikátor [83].

SFE extraktor možno využiť v oblasti farbenia textilu, pri produkcii nanočastíc a extrakcii prchavých a vonných látok. Ďalej sa uplatňuje napríklad pri čistení elektronických komponentov a súčiastok zo strojov a pri extrakcii nadkritickou vodou. Vhodnou kombináciou teploty, tlaku a modifikátoru, CO₂ dokáže rozpustiť širokú škálu polárnych a nepolárnych látok. V tejto diplomovej práci bude použitý na extrakciu rôznych druhov orechov [83].

Tabuľka 7: Parametre používané pre SFE Helix zariadenie [83]

Základné parametre:	
Extrakčná teplota:	až do 250 °C
Pracovný tlak:	68 MPa
Prietok CO ₂ :	až 400 ml (rozšírenie až na 800 ml/min)
Objem extrakčnej cely:	100 - 1000 ml
Cela cyklonového separátoru:	100 - 1000 ml (68 MPa)
Ďalšie parametre:	
Možnosť rozšíreného miešania	
V prípade potreby možnosť prídavku modifikátoru ku kvapalnému CO ₂	
Nezávislá kontrola tlaku a teploty extrakčných celách a nádob separátoru	

2.3 Chromatografická analýza

Systém bol vybavený kapilárnou kolónou SLB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm), od Supelco (Bellefonte, PA, USA). Ako nosný plyn bolo využité hélium, s lineárnou rýchlosťou 30 cm·s⁻¹. Teplotný program bol nastavený na počiatočnú teplotu 40 °C, ktorá bola udržiavaná 3 minúty. Následne sa systém vyhrieval na teplotu 230 °C, rýchlosťou 3 °C/min. Teplota nástreku bola nastavená na 200 °C, podobne ako teplota interface. Vzorka bola vždy dávkovaná v objeme 1 μl so splitom 1:10. Ionizácia molekúl prebiehala prostredníctvom elektrónovej ionizácie (ionizačná energia 70 eV) a následne boli ióny merané v rozsahu m/z 40 - 450.

Pred samotným zahájením analýzy sa získané extrakty zachytené v *n*-hexáne previedli do 5 ml odmerných bánk a boli doplnené po rysku opäť *n*-hexánom. Pre kvalitatívnu analýzu sa následne využili dostupné už spomínané knižnice spektier.

3 Výsledky a diskusia

V tejto časti diplomovej práce sú zhrnuté výsledky analýz extraktov kokosového, pekanového, lieskového, para, betelového, muškátového orechu pomocou GC-MS. Výsledky sú uvádzané formou tabuliek. V jednotlivých tabuľkách sú uvedené identifikované látky pomocou knižnice spektier a na základe porovnania vypočítaných a referenčných retenčných indexov neznámej a už známej látky, spolu s ich retenčnými časmi, CAS číslami, plochami v prípade GC-MS analýzy. Identifikované zlúčeniny sú rozdelené podľa jednotlivých skupín, pre lepšiu orientáciu. Ďalej sú v prílohe uvedené aj chromatogramy z GC-MS analýz pre jednotlivé druhy orechov.

3.1 Vplyv použitej SFE na výťažnosť aromatických látok

Klasické extrakčné metódy s použitím rozpúšťadiel sú časovo náročné a vyžadujú aj niekoľko desiatok hodín. Podľa dostupnej literatúry [85], po prevedení extrakcie môže byť získaný extrakt o nízkej koncentrácii, čo vyžaduje následné zakoncentrovanie a nemusí dôjsť ani k záchytu požadovaných látok pre kvantitatívnu analýzu. SFE umožňuje zisk aromatických, prírodných látok a široké spektrum možných aplikácií - farmaceutický priemysel, prečistenie zdravotníckych pomôcok ako uvádza príspevok [85].

V praktickej časti bol každý orech extrahovaný trikrát, avšak vždy za iných podmienok, ktoré sú uvedené v tabuľke 8. Po GC-MS analýze a následnej identifikácii neznámych látok obsiahnutých v extraktoch orechov, sa sledoval profil látok s ich relatívnym zastúpením. Nakoniec sa všetky výsledky extrakcií medzi sebou zrovnali.

Tabuľka 8: Podmienky pre statickú, statickú s modifikátorom a dynamickú extrakciu

Mód	Teplota [°C]	Čas [min]	Tlak [MPa]	Modifikátor	Zachytávanie
Statický	50	30	40	-	dynamické 30 minút
Statický s modifikátorom	50	30	40	metanol	dynamické 30 minút
Dynamický	50	30	40	-	dynamické 30 minút

3.2 Vyhodnotenie extrakčných technik s využitím kokosového orechu ako vzorky

Celkovo boli prevedené tri extrakčné techniky, ktorých podmienky sú uvedené v tabuľke 8. Získané extrakty sa následne analyzovali pomocou GC-MS a látky boli identifikované porovnaním retenčných indexov so známymi látkami (tabuľka 9).

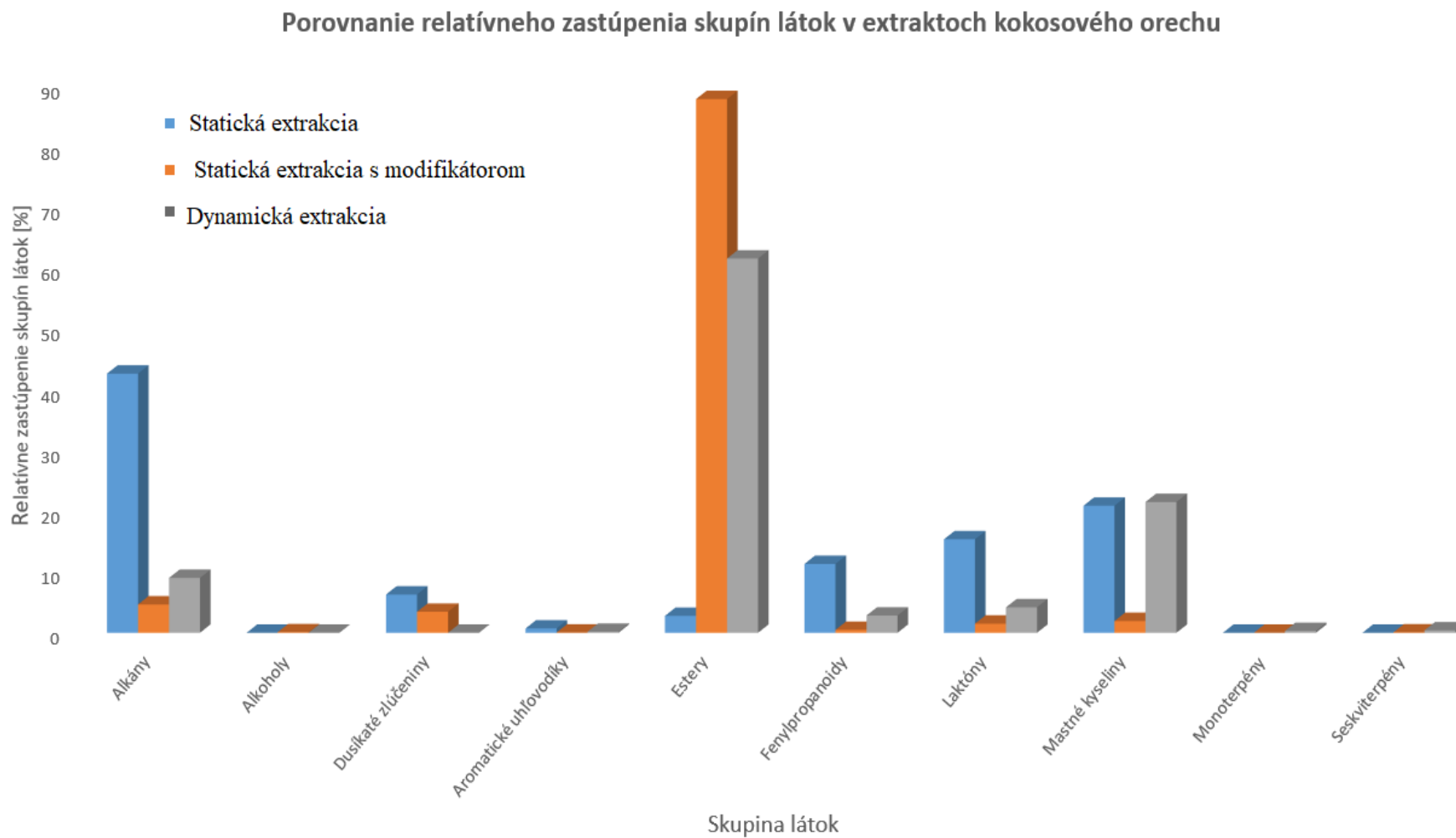
Pokiaľ by sme zrovnávali jednotlivé extrakčné techniky v našej štúdií medzi sebou, možno v závere konštatovať, že na výťažnosť extraktu majú vplyv rôzne faktory. Môže to byť pôvod rastlinnej vzorky, spôsob zberu, doba zberu, čistota, skladovanie, ako vyplýva zo zrovnania s vedeckými príspevkami. Ďalším faktorom je samozrejme aj spôsob získania extraktu, čiže voľba extrakčnej techniky a jej podmienky. Z našich výsledkov možno usúdiť, že zloženie extraktov, ktoré boli získané prostredníctvom extrakcie nadkritickou tekutinou (statická, statická s modifikátorom, dynamická) sa výrazne nelíši. Je potrebné zdôrazniť, že aj keď sa zloženie extraktov nemení, tak sa mení relatívne zastúpenie jednotlivých látok, obsiahnutých v extrakte (obrázok 13). V prípade statickej extrakcie, vid' tabuľka 9 (13 identifikovaných látok), najviac zastúpenými látkami boli alkány, ktoré tvorili až 42,63 % z celkového obsahu látok. Ďalšími významnými skupinami látok boli laktóny (15,38 %), ktoré zapríčiňujú charakteristickú vôňu kokosu a masné kyseliny (20,90 %). Po statickej extrakcii (19 stanovených zložiek) s použitím metanolu ako modifikátoru je relatívne zastúpenie látok v extrakte úplne odlišné. Najväčšiu časť tvoria estery, s celkovým obsahom až 87,80 %. Ostatné zložky boli v pomere s esterami zastúpené málo. Účinok modifikátoru je závislý aj od charakteru extrahovanej látky. Okrem zvyšovania polarít nadkritickej tekutiny, môže výrazne zvýšiť aj extrakčnú účinnosť. Ako posledná bola prevedená dynamická extrakcia, na základe ktorej sa podarilo stanoviť 23 prchavých látok. Najväčšiu časť opäť vytvárajú estery s celkovým obsahom 61,56 % (najmä metyl dodekanoát s relatívnym zastúpením 32,15 %). Ďalej sú zastúpené najmä masné kyseliny v 21,51 %. Pokiaľ by sme hodnotili relatívne zastúpenie skupín látok, tak obsah masných kyselín v prípade dynamickej (21,51 %) a statickej extrakcie (20,90 %) sa výrazne nelíši. Relatívne zastúpenie laktónov sa výrazne líši v statickej extrakcii (15,38 %) od dynamickej (4,19 %) ale aj od statickej extrakcie s použitím modifikátoru (1,50 %). Rozdiely v zastúpení sú spôsobené pravdepodobne rozdielnymi podmienkami pri prevádzaní extrakcie. Vo všetkých troch prípadoch ostatné fytochemické látky boli obsiahnuté vo veľmi malých množstvách, prípadne vôbec.

Tabuľka 9: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch kokosového orechu

Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorom}	SFE _{dynamická}
Alkány	oktán	801	800	111-65-9	40,69	4,45	8,64
	nonán	900	900	111-84-2	1,94	0,21	0,39
Alkoholy	2-(1,1-dimetyloxy) etanol	850	852	7580-85-0	neprítomné	0,08	neprítomné
Dusíkaté zlúčeniny	3-nitro-4-metyl-6-metoxychinolín	1938	1923	70945-23-2	6,29	neprítomné	neprítomné
	1,3-dinitrobenzén	1445	1471	99-65-0	neprítomné	3,45	neprítomné
Aromatické uhľovodíky	etylbenzén	891	893	100-41-4	0,70	0,03	0,17
Estery	metyl hexanoát	924	922	106-70-7	neprítomné	1,43	0,45
	metyl oktanoát	1123	1125	111-11-5	neprítomné	16,51	8,85
	metyl dekanoát	1323	1327	110-42-9	neprítomné	neprítomné	6,60
	etyl dekanoát	1394	1399	110-38-3	neprítomné	0,07	0,11
	metyl dodekanoát	1523	1527	111-82-0	neprítomné	48,00	32,15
	etyl dodekanoát	1592	1598	106-33-2	0,81	0,15	neprítomné
	metyl 2-[[4-(4-hydroxy-4-metylpentyl)-1-cyklohex-3-enyl]metylideneamino]benzoát	1585	1589	67634-12-2	1,97	neprítomné	neprítomné
	metyl tetradekanoát	1723	1728	124-10-7	neprítomné	14,54	9,00
	metyl hexadekanoát	1924	1925	112-39-0	neprítomné	4,28	2,61
	metylester elaidovej kyseliny	2098	2085	1937-62-8	neprítomné	1,55	neprítomné
	metylester olejovej kyseliny	2098	2085	112-62-9	neprítomné	neprítomné	1,01
metyl oktadekanoát	2126	2127	112-61-8	neprítomné	1,27	0,78	
Fenylpropanoidy	eugenol	1352	1357	97-53-0	9,18	0,48	2,32

Tabuľka 9: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch kokosového orechu - pokračovanie

Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorom}	SFE _{dynamická}
Fenylpropanoidy	eugenyl acetát	1514	1521	93-28-7	2,14	neprítomné	0,52
Laktóny	δ -oktalaktón	1281	1280	698-76-0	8,82	0,75	2,24
	δ -dekalaktón	1491	1494	705-86-2	5,89	0,75	1,52
	δ -dodekalaktón	1705	1708	713-95-1	neprítomné	neprítomné	0,43
	δ -tetradekalaktón	1919	1920	2721-22-4	0,67	neprítomné	neprítomné
Mastné kyseliny	dekánová kyselina	1365	1372	934-48-5	neprítomné	neprítomné	0,80
	dodekánová kyselina	1562	1570	143-07-7	9,52	1,94	12,45
	tetradekánová kyselina	1760	1769	544-63-8	11,38	neprítomné	6,86
	hexadekánová kyselina	1961	1968	57-10-3	neprítomné	neprítomné	1,40
Monoterpény	<i>p</i> -cymén	1046	1042	99-87-6	neprítomné	neprítomné	0,30
Seskviterpény	karyofylén	1421	1424	13877-93-5	neprítomné	0,06	0,40



Obrázok 13: Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch kokosového orechu

3.2.1 Porovnanie profilu látok extraktu kokosového orechu získaného SFE s dostupnou zahraničnou literatúrou

Alexia Prades, Manuel Dornier, Naffisatou Diop a Jean-Pierre Pain [86] uvádzajú, že existujú iba dve publikácie, zaoberajúce sa zložením kokosovej vody. Ako prvý menovali článok, vydaný **Jirovetz L., Buchbauer G. a kol. [86]**, ktorí sa zaoberali **HS-SPME** extrakciou kokosovej vody. Prostredníctvom GC-MS analýzy bolo analyzovaných niekoľko látok, pričom hlavnú zložku tvoril nonanál (14,2 %), nonanol (11,2 %), heptanál (8,2 %), etyl dekanoát (6,2 %), heptanol (5,3 %) a 2-nonanol (5,1 %). Jadro kokosu bolo obohatené ďalej o δ -oktalaktón (5,3 %), kyselinu nonánovú (7,2 %) a dekanol (6,8 %). Po prevedení **hydrodestilácie** boli stanovené ešte estery s krátkym uhl'ovodíkom, fenoly, thioly a ketóny [86]. V zrovnaní s našim experimentom možno poukázať na výrazný rozdiel relatívneho zastúpenia skupiny esterov. Po statickej extrakcii s modifikátorom sa estery podieľali až 87,80 % na celkovom obsahu látok. Podobne to bolo aj v prípade dynamickej extrakcie, kedy estery tvorili 61,56 % celkového obsahu. Laktóny sú typické tým, že prispievajú k charakteristickej vôni kokosu. Po HS-SPME tvorili 3,34 % celkového zastúpenia látok. Významne bola táto skupina zastúpená v našej práci po prevedení statickej extrakcie, kedy ich relatívne celkové zastúpenie bolo 15,38 %. V štúdiu [86] prostredníctvom HS-SPME bola vyextrahovaná aj skupina alkoholov, s celkovým zastúpením 30,5 %. V našej štúdiu sa podarilo identifikovať iba jeden alkohol v minimálnom zastúpení - 2-(1,1-dimetyloxy) etanol (0,08 %). Všetky tieto výrazné odlišnosti sú pravdepodobne zapríčinené použitím inej matrice. Kokosová voda je nízkokalorická, bohatá predovšetkým na minerály, rozpustné cukry a proteíny [86].

Xiaojun Shen, Weibo Chen, Yajun Zheng, Xintao Lei, Minmin Tang, Hui Wang a Fei Song [87] využili na získanie esenciálneho oleja kokosového orechu **hydrodestiláciu**. Výskum vykonávali botanici z Čínskej akadémie tropických a poľnohospodárskych vied. Čerstvé rastlinné matrice sa najskôr premyli. Vložili do banky s destilovanou vodou a destilovali po dobu 30 minút. Získané hydrozoly sa až do prevedenia analýzy uchovávali v sterilných tmavých nádobách pri teplote 4 °C. Analýza prchavého zloženia oleja sa uskutočnila pomocou GC-MS, na kapilárnej kolóne HP-5MS. Profil testovanej vzorky poukázal na prítomnosť širokého spektra zlúčenín vrátane uhl'ovodíkov, alkoholov, ketónov, aldehydov, esterov a kyselín. Hlavné zložky kokosu tvorili 1,1-oxybisoktán (17,10 %); 3,7-dimetyl-1,6-oktadién-3-ol (15,35 %) a etyl-2-(5-metyl-5-vinyltetrahydrofurán-2-yl),

propán 2-ylkarbonát (10,33 %). Vyššie množstvo benzylalkoholu (7,94 %) je benefitom, najmä kvôli jeho antiseptickým účinkom. V našom experimente nebola identifikovaná ani jedna zlúčenina z vyššie uvedených [87].

Dhanya G., Vivek P. a Ashish Gr. [88] extrahovali dozreté kokosové škrupiny, zozbierané v decembri 2016 v oblasti Kerala. Po vysušení boli rozdrvené na jemný prášok. Ich **destilácia** prebiehala pomocou prístroja Clevenger. Prostredníctvom GC-MS identifikovali 11 hlavných fytochemikálii zo 109 zlúčenín. Za hlavné zložky sa považovali látky, ktoré mali viac ako 90% zhodu s MS spektrom a percentuálnu plochu väčšiu ako 0,1 %. Najviac zastúpenými boli mastné kyseliny: dodekánová kyselina (4,07 %), tetradekánová kyselina (7,00 %), pentadekánová kyselina (0,38 %), *n*-hexadekánová kyselina (5,07 %), 9-oktadecénová kyselina (0,99 %) a terpény: najmä skvalén (0,34 %), ktorý je známy svojimi antioxidačnými a protirakovinovými účinkami. Výsledky GC-MS analýzy výskumu [88] naznačujú, že kokosový orech je obohatený najmä o nasýtené mastné kyseliny, čo sa potvrdilo aj v našej štúdií. Po statickej extrakcii bola identifikovaná kyselina dodekánová (9,52 %) a tetradekánová (11,38 %). Po prevedení statickej extrakcie s modifikátorom bola identifikovaná iba jedna mastná kyselina dodekánová (1,94 %). Po dynamickej extrakcii bola prítomnosť potvrdená pre kyselinu dodekánovú (12,45 %), tetradekánovú (6,86 %), hexadekánovú (1,40 %) a dekánovú kyselinu (0,80 %).

Pre **National Chemistry instrumentation Center [89]** bolo poskytnutých niekoľko komerčných vzoriek kokosového oleja na analýzu prchavých zlúčenín. Zistili, že kokosový olej je jedinečný medzi ostatnými rastlinnými olejmi vďaka obsahu kyseliny dodekánovej (45 - 55 %). Na prevedenie **SPME** extrakcie bolo využité vlákno divinylbenzén/karboxén/polydimetylsiloxán (DVB/CAR/PDMS). Vlákno bolo ponorené vo vzorke po dobu 30 minút, pri teplote 40 °C a desorbované do GC pri 260 °C. Po GC-MS analýze na kolóne DB-1, najviac zastúpenými boli laktóny (δ -dekalaktón LOD 70,15 ppm, δ -oktalaktón LOD 18,10 ppm). Významnú časť tvoril aj ester - etyl dekanóat (LOD 19,34 ppm), ktorý bol identifikovaný aj v našom experimente, avšak s minimálnym relatívnym zastúpením < 1 % [89].

Arie Febrianto Mulyadi, Matthias Schreiner a kolektív [90], poukázali nato, že významnú časť kokosového oleja tvoria najmä uhľovodíky, aldehydy, alkoholy, metylketóny, a δ -laktóny (hlavná zložka, ktorá prispieva k charakteristickej vôni kokosu). Ďalej bolo preukázané, že zákal v oleji zapríčiňuje prítomnosť voľných mastných kyselín. Po aplikácii **HS-SPME**

a GC-MS analýze boli identifikované nasledujúce zlúčeniny: etylacetát, kyselina octová, 2-pentanón, hexanál, *n*-oktán, 2-heptanón, limonén, nonanál, kyselina oktánová, etyl oktanoát, δ -dekalaktón a kyselina dodekánová. Vo všetkých testovaných výrobkoch z kokosu boli prítomné laktóny. Nízky, prípadne žiadny obsah mastných kyselín z dlhým reťazcom môže zapríčiniť ich nízka prchavosť. **Arie Febrianto Mulyadi, Matthias Schreiner a kolektív [90]** uvádzajú, že najviac zastúpenými zo skupiny laktónov, boli δ -oktalaktón a δ -dekalaktón, ktoré boli vyextrahované aj z našej matrice, ako je uvedené vyššie. Významnú časť tvorili nasýtené mastné kyseliny, podobne ako v našej štúdií - kyselina dekánová a dodekánová - ktoré sa pravdepodobne tvoria z hydrolýzy triglyceridov [90].

Vo všetkých vedeckých príspevkoch boli identifikované podobné skupiny látok ako v našej štúdií s výnimkou terpénov, ktoré boli zastúpené iba v malých množstvách. Niektoré mali percentuálne zastúpenie menej ako 0,10 %. V prípade statickej extrakcie sa podarilo určiť eugenol (9,18 %). Mastné kyseliny podobne ako v našom prípade tvoria významnú časť extraktu po prevedení akéhokoľvek extrakčného modu. Veľký rozdiel (tabuľka 9) spočíva v prítomnosti alkánov, ktoré v dostupnej literatúre neboli stanovené vôbec.

Podľa **Phacawat Tongnuanchan a Scoottawat Benjakul [91]** sa stala hydrodestilácia štandardnou metódou na získanie esenciálnych olejov z matric, akými sú drevo alebo kvetiny. Táto metóda vďaka okolitej vode zabraňuje do istej miery prehriatu esenciálneho oleja, čím nemusí vždy dochádzať k degradácii analytov [91].

Ezgi Aytac [92] sa zaoberal výťažnosťou mastných kyselín s použitím rôznych extrakčných techník (lisovanie za studena, Soxhletova extrakcia, SFE). Najvyššia výťažnosť sa potvrdila po prevedení Soxhletovej extrakcie aj keď v porovnaní s SFE obsah kyseliny laurovej bol takmer totožný. Z tohto dôvodu sa ako najvhodnejšia technika preukázala SFE, z hľadiska výťažku mastných kyselín a zdravia. Najnižší výťažok poskytlo lisovanie za studena. V našej štúdií bola prevedená SFE kokosového orechu. Po statickej extrakcii ich celkové zastúpenie tvorilo 20,90 % a po dynamickej extrakcii 21,51 %. Po použití modifikátoru celkové relatívne zastúpenie mastných kyselín tvorilo iba 1,94 %, čo mohlo byť zapríčinené práve modifikátorom, ktorý zvyšuje polaritu nadkritického CO₂. Ako vyplýva z grafu na obrázku 13, tak najvýznamnejšiu skupinu tvorila skupina esterov po prevedení statickej extrakcii s modifikátorom, najmä vďaka ich polárnemu charakteru. Pre lepší prehľad sú dostupné vedecké články spracované vo forme tabuľky 10 [92].

Tabuľka 10: Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS analýzy v dostupnej literatúre pre kokosový orech

Pôvod vzorky	Spracovaná časť vzorky	Typ extrakcie	Analýza	Hlavné analyzované zložky [%]	Dostupná literatúra
Brazília	kokosová voda	SPME	GC-MS	nonalol (11,23 %), nonanál (14,21 %), δ -dekalaktón (2,2 %), δ -dodekalaktón (1,14 %), nonánová kyselina (3,13 %), oktanál (2,55 %), dekánová kyselina (1,1 %)	[86]
Čína	kokosový orech	HD	GC-MS	metylsalicylát (0,49 %), benzaldehyd (0,37 %), benzylalkohol (7,94 %), geraniol (0,69 %), 1-heptanol (4,58 %), 3-heptadekán (0,82 %), pentadekán (2,41 %)	[87]
Kerala	kokosová škrupina	destilácia	GC-MS	tetradecénová kyselina (7,0 %), dodekánová kyselina (4,07 %), <i>n</i> -hexadecénová kyselina (5,07 %), asaron (0,11 %), skvalén (0,34 %), tumerón (0,16 %)	[88]
Neznámy	vzorky od Traders Asociacion	SPME	GC-MS	δ -dekalaktón, etyldekanoát, δ -oktalaktón, octová kyselina, oktánová kyselina, dodekánová kyselina	[89]
Neznámy	čerstvá kokosová dužina	HS-SPME	GC-MS	δ -oktalaktón, δ -dekalaktón, hexanál, nonanál, 2-pentanón, octová kyselina, limonén, oktán, etyl dekanoát, etyl acetát	[90]

3.3 Vyhodnotenie profilu látok zastúpených v extrakte muškátového orechu s využitím troch typov extrakcií

V extrakte, získanom statickým módom extrakcie nadkritickou tekutinou bolo určených 40 látok (z celkových 45 píkov). Po prevedení statickej extrakcie s využitím metanolu ako modifikátoru, bolo určených 39 látok (z celkového počtu 50 píkov). Po dynamickej extrakcii bolo identifikovaných v extrakte muškátového orechu 30 látok (z celkových 35).

Zloženie extraktov sa vo všetkých troch prípadoch výrazne nelíši (viď tabuľka 11). Veľké rozdiely nastávajú v percentuálnom zastúpení jednotlivých skupín látok. Graf na obrázku 14 naznačuje, že veľkú časť extraktu muškátového orechu tvoria fenylypropanoidy, monoterpény a monoterpenoidy. Ďalšou významne zastúpenou skupinou sú mastné kyseliny. V prípade statickej extrakcie z celkového množstva látok, tvoria fenylypropanoidy až 54,51 %, najmä myristicín (48,50 %), ktorého prítomnosť je charakteristická pre muškátový orech a pôsobí ako psychoaktívna látka. Myristicín bol identifikovaný aj v nasledujúcich módoch extrakcie nadkritickou tekutinou. Po statickej extrakcii s využitím modifikátoru tvoril 31,20 % z celkového obsahu látok a po dynamickej extrakcii bolo jeho percentuálne zastúpenie najnižšie, a to 17,72 %. Rozsiahlu skupinu tvoria aj monoterpény a monoterpenoidy. Obrázok 14 opäť poukazuje na veľký rozdiel v percentuálnom zastúpení týchto skupín. Po statickej extrakcii bolo identifikovaných 10 monoterpénov s celkovým zastúpením 3,47 % (najmä sabinén 1,15 %) a 12 monoterpenoidov s obsahom 29,50 % (hlavne terpinén-4-ol 10,91 % a ment-2-én-1-ol 6,27 %). Oveľa výraznejšie bolo zastúpenie monoterpénov po dynamickej extrakcii. Podieľajú sa až na 66,68 % celkového obsahu látok. Najväčšiu časť tvorí sabinén (29,26 %), β -pinén (12,86 %), α -pinén (7,02 %). Obsah monoterpénov po extrakcii s použitím modifikátoru je takmer o 29 % nižší. Limonén sa podieľa 4,36 % a α -pinén 6,27 % na celkových 38,47 %. Naopak skupina terpenoidov je najviac zastúpená po extrakcii s modifikátorom. Identifikovaných bolo 12 monoterpenoidov, pričom najväčšiu časť tvoril terpinén-4-ol (5,63 % a geranyl acetát (3,05 %). Vo všetkých typoch extrakcie boli identifikované rovnaké mastné kyseliny - dodekánová, tetradekánová, hexadekánová. V porovnaní s monoterpénmi, monoterpenoidmi a fenylypropanoidmi je ich zastúpenie výrazne nižšie. Ostatné skupiny sa podieľajú minimálne na zložení extraktu. Všetky tieto rozdiely v relatívnom zastúpení budú pravdepodobne zapríčinené rôznymi extrakčnými podmienkami a konkrétnou časťou rastlinnej matrice, ktorá extrahovaná, viď tabuľka 12.

Tabuľka 11: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch muškátového orechu

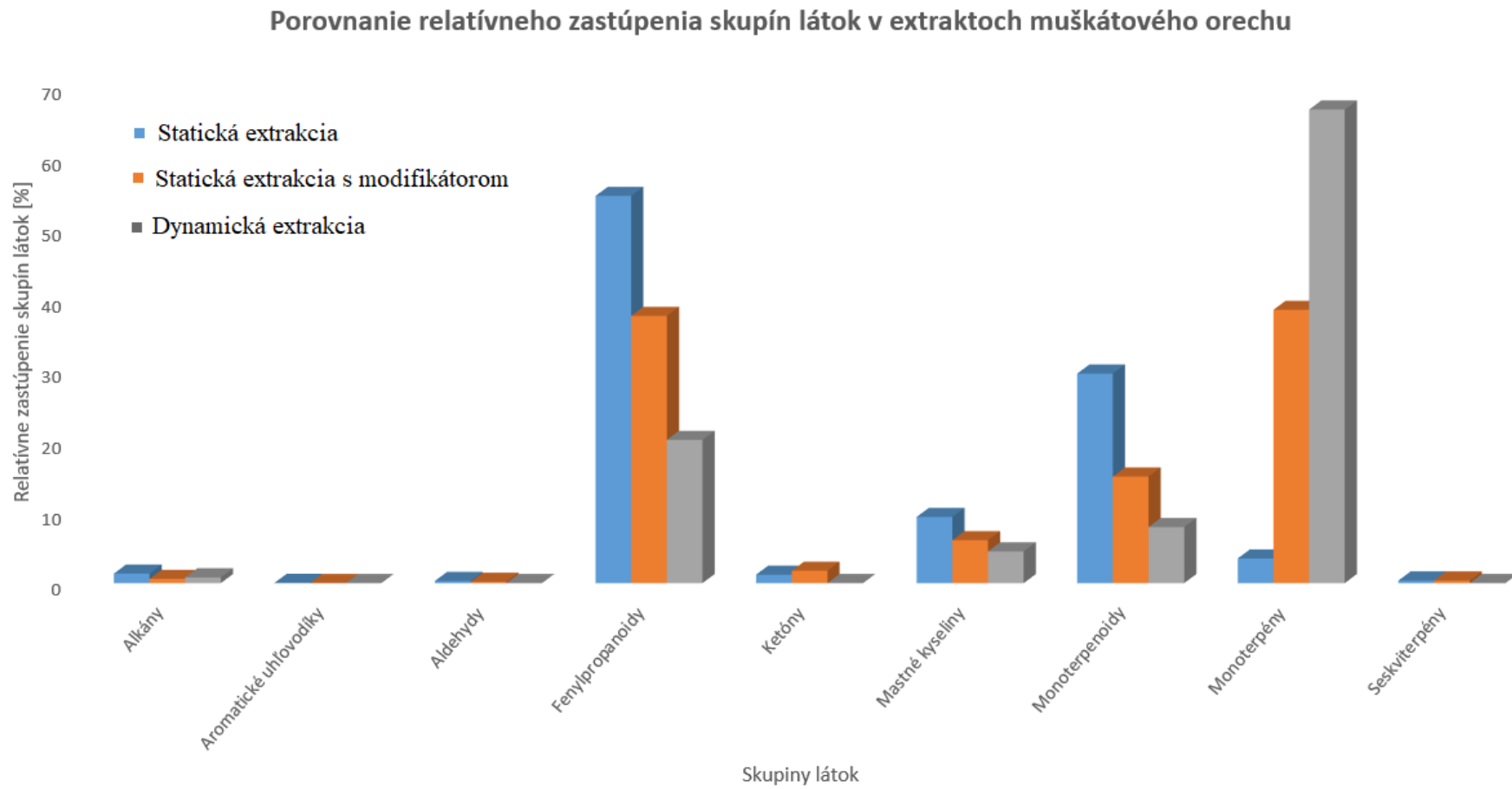
Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorom}	SFE _{dynamická}
Alkány	oktán	801	800	111-65-9	1,27	0,59	0,81
	nonán	901	900	124-18-5	0,06	neprítomné	neprítomné
Aromatické uhľovodíky	etylbenzén	892	893	100-41-4	0,03	neprítomné	neprítomné
Aldehydy	2,4-dodekadienál	1423	1418	21662-16-8	0,31	0,18	neprítomné
Fenylpropanoidy	eugenol	1354	1357	97-53-0	1,24	neprítomné	0,13
	metyl eugenol	1401	1403	93-15-2	1,03	0,91	0,31
	izoeugenol	1450	1452	97-54-1	neprítomné	1,06	0,21
	metoxy eugenol	1597	1600	6627-88-9	2,26	3,13	1,38
	metyl izoeugenol	1496	1496	96-16-3	0,15	0,22	neprítomné
	myristicín	1523	1520	607-91-0	48,50	31,20	17,72
Ketóny	elimicín	1548	1550	487-11-6	1,33	1,10	0,41
	sabina ketón	1160	1157	513-20-2	0,07	0,02	neprítomné
Mastné kyseliny	oxacyklohexadekán-2-ón	2139	2144	106-02-5	1,11	1,72	neprítomné
	dodekánová kyselina	1563	1570	143-07-7	2,15	0,67	0,78
	tetradekánová kyselina	1763	1769	544-63-8	5,90	4,65	2,94
Monoterpenoidy	hexadekánová kyselina	1963	1968	57-10-3	1,26	0,72	0,74
	γ -terpineol	1217	1200	586-81-2	0,35	0,18	0,15
	<i>cis</i> sabinén hydrát	1071	1069	15537-55-0	3,70	1,63	1,69
	<i>trans</i> sabinén hydrát	1102	1099	17699-16-0	neprítomné	2,53	1,66
	terpinén-4-ol	1182	1180	562-74-3	10,91	5,63	3,68
	linalyl acetát	1251	1250	115-95-7	0,50	neprítomné	neprítomné
	bornyl acetát	1285	1285	92618-89-8	0,57	neprítomné	0,16

Tabuľka 11: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch muškátového orechu - pokračovanie

Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorom}	SFE _{dynamická}
Monoterpenoidy	ment-2-én-1-ol	1102	1109	29803-82-5	6,27	neprítomné	neprítomné
	<i>cis, para</i> ment-2-én-1-ol	1126	1124	29803-82-5	0,69	0,29	0,20
	neryl acetát	1378	1361	141-12-8	4,22	neprítomné	neprítomné
	izobornyl acetát	1286	1287	125-12-2	neprítomné	0,30	neprítomné
	<i>cis</i> piperitol acetát	1336	1335	78774-33-1	neprítomné	0,04	neprítomné
	geranyl acetát	1378	1380	105-87-3	neprítomné	3,05	neprítomné
	<i>trans, para</i> ment-2-én-1-ol	1144	1139	29803-81-3	0,45	0,21	neprítomné
	terpin-1-én-4-yl acetát	1297	1296	4821-04-9	0,24	0,14	neprítomné
	<i>para</i> cymén-8-ol	1188	1189	1197-01-9	0,12	0,09	neprítomné
α -terpineol	1196	1195	98-55-5	1,48	0,91	0,35	
Monoterpény	α -thujén	926	927	2867-05-2	0,33	1,44	1,31
	α -pinén	933	933	80-56-8	0,42	6,27	7,02
	kamfén	949	943	79-92-5	neprítomné	0,11	0,12
	β -pinén	977	978	127-91-3	0,53	neprítomné	12,86
	α -felandrén	1006	1007	99-83-2	neprítomné	0,22	0,34
	α -terpinén	1017	1018	99-86-5	0,20	0,89	1,23
	<i>p</i> -cymén	1024	1025	99-87-6	0,13	1,00	1,64
	γ -terpinén	1059	1058	99-85-4	0,33	1,84	2,10
	terpinolén	1086	1086	586-62-9	0,08	0,46	0,73
	sabinén	972	972	3387-41-5	1,15	20,00	29,26
	myrcén	990	991	123-35-3	0,07	1,88	2,72
	limonén	1029	1030	138-86-3	0,23	4,36	6,90
3-karén	1009	1009	13466-78-9	neprítomné	neprítomné	0,45	
Seskviterpény	β -kubenén	1390	1392	13744-15-5	0,11	0,12	neprítomné

Tabuľka 11: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch muškátového orechu - pokračovanie

Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorom}	SFE _{dynamická}
Seskviterpény	β -farnesén	1454	1452	18794-84-8	neprítomné	0,14	neprítomné
	germakrén <i>D</i>	1484	1480	105453-16-5	0,13	0,10	neprítomné
	trans α -bergamotén	1435	1430	13474-59-4	0,12	neprítomné	neprítomné



Obrázok 14: Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch muškátového orechu

3.3.1 Porovnanie profilu látok extraktu muškátového orechu s dostupnou literatúrou

Siti Machmudah, Anny Sulaswatty a kolektív [93], sa zaoberali získaním extraktov prostredníctvom **extrakcie nadkritickou tekutinou** pri rôznych tlakoch, teplotách a časoch. Cieľom bolo zistiť vplyv týchto podmienok na extrakčnú účinnosť a štúdium profilu látok po GC-MS analýze na kapilárnej kolóne HP-5MS. Semiačka boli dovezené z Indie a pred zahájením extrakcie boli pomleté na rôzne veľkosti. V závere analytici poukázali nato, že extrakčný výťažok sa zvyšoval so znižujúcou sa teplotou a veľkosťou častíc. Naopak mierne sa zvyšoval s rastúcim prietokom CO₂. Zvyšovaním tlaku zase dochádzalo k výraznému zvyšovaniu extrakčnej účinnosti. Extrakt po extrakcii pri tlaku 15 MPa bol obohatený najmä o prítomnosť myristicínu (31,55 %), β -felandrénu (19,22 %), α -pinénu (8,37 %), β -pinénu (7,55 %) a δ -limonénu (4,81 %). Ostatné zastúpenie zložiek v extrakte bolo prevažne pod 3 %. Relatívne zastúpenie myristicínu je takmer zhodné s našou štúdiou po statickej extrakcii s použitím modifikátoru. Na rozdiel od nášho experimentu, v dostupnej literatúre [93] nebola identifikovaná ani jedná masťná kyselina a ani skupina alkánov.

Li-cheong Choo, Siew-Meng Wong a Kong-Yong Liew [95] sledovali profil látok muškátového orechu, získaného z perikarpu **hydrodestiláciou** po dobu 5 hodín, s využitím GC-MS analýzy na SPB-1 a Supelcowax 10 kolóne. Táto štúdia v závere naznačuje rozdielnosť profilu relatívneho zastúpenia látok medzi esenciálnym olejom z perikarpu, muškátového orechu a muškátového oleju. Esenciálny olej orechu pozostával zo 16 monoterpénov (60 %), 9 monoterpénových alkoholov (29 %), 8 aromatických éterov (7 %), 3 seskviterpénov (1 %), 6 esterov (1 %) a 8 ďalších vedľajších neznámych zložiek. Relatívne zastúpenie sabinénu, myristicínu a safrolu je oveľa nižšie, zatiaľ čo obsah terpinén-4-olu a α -terpineolu je podstatne vyšší než v muškátovom orechu a oleji. Pokiaľ by sme toto tvrdenie porovnávali s našou štúdiou tak, relatívne zastúpenie po statickej extrakcii terpinén-4-olu odpovedá 10,91 % a α -terpineolu 1,48 %. Významný rozdiel môžeme vidieť v dynamickej extrakcii, kedy relatívne zastúpenie terpinén-4-olu odpovedá 3,68 % a α -terpineolu iba 0,35 %. Odlišnosť relatívneho zastúpenia je evidentná aj v obsahu myristicínu (HD 1,0 %) v porovnaní s našou štúdiou, kedy prostredníctvom statickej extrakcie obsah myristicínu tvoril až 48,50 %, s použitím modifikátoru 31,20 % a po dynamickej extrakcii 17,72 % z celkového obsahu látok [95].

Na získanie esenciálneho oleja muškátového orechu **Muchtaridi, Anas Subarnas, Anton Apriyantono a Resmi Mustarichie [94]** preverovali účinnosť **extrakcie tuhou fázou**. Prchavé zložky boli analyzované prostredníctvom GC-MS na kapilárnej kolóne DB-5MS. Najviac

zastúpenými zložkami boli: sabinén (21,38 %), 4-terpineol (13,92 %), α -pinén (10,23 %) a myristicín (13,57 %). Menší podiel celkového obsahu tvoril limonén (5,57 %), γ -terpinén (3,98 %), α -terpineol (3,11 %) a safrol (4,28 %). Ostatné látky tvorili menej ako 3 % z celkového obsahu [55]. V zrovnaní s našou štúdiou je monoterpén sabinén významne zastúpený po statickej extrakcii s modifikátorom (20,00 %) a po dynamickej extrakcii (29,26 %). Obsah myristicínu sa výrazne nelíši od dynamickej extrakcie (naš experiment 17,72 %) [94].

Cinthia Bittencourt Spricigo a kolektív [96], využili opäť na získanie extraktu muškátového orechu z Brazílie, **extrakciu nadkritickou tekutinou**. Následná GC-MS analýza bola prevedená na kapilárnej kolóne Carbowax 20. Celkovo bolo identifikovaných 37 látok, z čoho najväčšiu časť tvoril sabinén (36,63 %), α -pinén (11,05 %), β -pinén (10,19 %) a myristicín (6,98 %). Ostatné zložky tvorili menej ako 4 % celkového obsahu [96]. Relatívneho zastúpenie sabinénu v zrovnaní s našim experimentom je celkom odlišné. Po statickej extrakcii bol zastúpený v 1,15 %, po statickej extrakcii s modifikátorom 20,00 % a po dynamickej 29,26 %. Vo výsledkoch štúdie bol významne zastúpený aj α -pinén a β -pinén. Po prevedení statickej extrakcie a GC-MS analýze zastúpenie α - a β -pinénu bolo < 1 %. Vo väčšej miere sa podielali na celkovom obsahu látok po dynamickej extrakcii α -pinén 7,02 % a β -pinén 12,86 % [96].

Susana Elja Sudradjat, Kris Herawan Titomus, Abdul Mun'im a Effionora Anwar [97] získali muškátový olej od spoločnosti Balitro. Esenciálny olej sa bol získaný **destiláciou**, ktorá sa prevádzala vždy trikrát za iných podmienok. Analýzy vzoriek sa potom previedli prostredníctvom GC-MS na kapilárnej kolóne HP-5MS. Identifikovaných bolo 55 zlúčenín s rôznym zastúpením. Z celkového počtu malo 21 látok relatívne zastúpenie viac ako 0,30 %. Hlavné zložky esenciálneho oleja tvorili α -terpineol (15,42 %), 4-terpineol (10,77 %), myristicín (12,90 %), α -terpinolén (9,77 %) a α -terpinén (6,09 %). Výsledky výskumu v zrovnaní s našim experimentom poukazujú na odlišné relatívne zastúpenie α -terpinolénu a α -terpinénu, α -terpineolu, ktoré v našom prípade neprekročilo 1,5 %. Relatívne zastúpenie myristicínu je oveľa vyššie v našom experimente v zrovnaní so štúdiou (statická extrakcia - 48,50 %, statická extrakcia s modifikátorom - 31,20 % a dynamická extrakcia - 17,72 %). Takmer zhodné je relatívne zastúpenie 4-terpineolu po prevedení dynamickej extrakcie [97].

V závere možno zhodnotiť, že zloženie extraktu muškátového orechu z rôznych častí rastlinnej matrice je podobné, avšak s rozdielnym relatívnym zastúpením. Všetky významne zastúpené zložky, získané rôznymi extrakčnými technikami, sú uvedené v tabuľke 12.

Tabuľka 12: Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS analýzy v dostupnej literatúre pre muškátový orech

Pôvod vzorky	Spracovaná časť vzorky	Typ extrakcie	Analýza	Hlavné analyzované zložky [%]	Dostupná literatúra
India	semiačka muškátového orechu	SFE	GC-MS	myristicín (31,55 %), β -felandrén (19,22 %), α -pinén (8,37 %), β -pinén (7,55 %), δ -limonén (4,81 %), asarón (1,91 %), kamfén (1,07 %), 3-cyklohexén-1-ol (4,02 %), kopaén (1,22 %)	[93]
Indonézia	muškátový orech	SPE	GC-MS	myristicín (13,57 %), α -pinén (10,23 %), sabinén (21,38 %), 4-terpineol (13,92 %), limonén (5,57%), safrol (4,28 %), γ -terpinén (3,98 %)	[94]
Penang (Malajzia)	perikarp muškátového orechu	HD	GC-MS	α -pinén (15,2 %), izoeugenol (4,5 %), α -terpineol (15,5 %), terpinén-4-ol (13,5 %), α -terpinolén (6,5 %), β -pinén (6,8 %), β -myrcén (3,3 %)	[95]
Brazília	celý muškátový orech	SFE	GC-MS	sabinén (36,63 %), α -pinén (11,05 %), β -pinén (10,19 %), myristicín (6,98 %), limonén (3,77 %), elimicín (3,29 %), myrcén (3,15 %)	[96]
Jáva	muškátový olej	destilácia	GC-MS	α -terpineol (15,42 %), 4-terpineol (10,77 %), myristicín (12,93 %), α -terpinolén (9,77 %), 1,8-cineol (3,53 %), γ -terpinén (4,05 %)	[97]

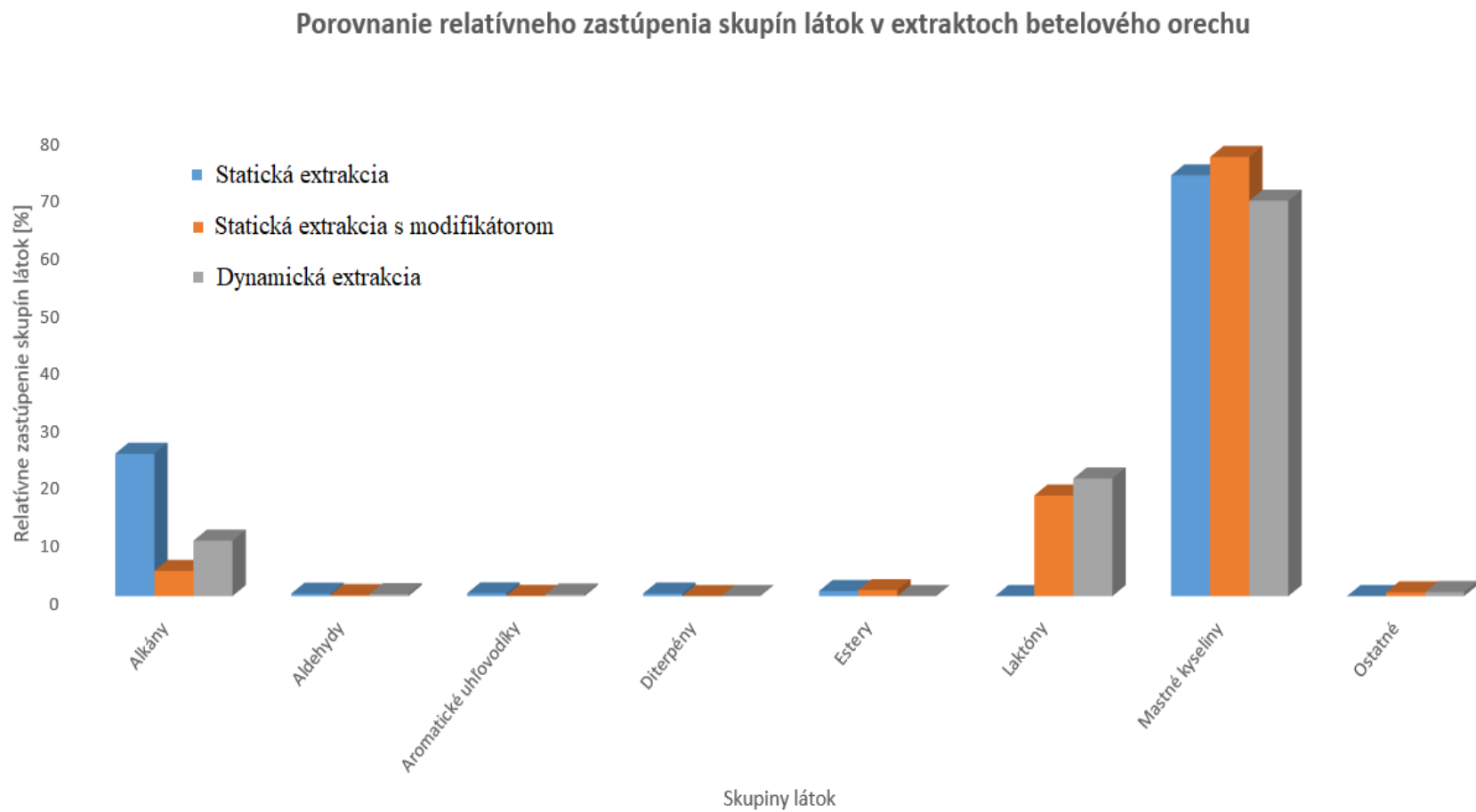
3.4 Vyhodnotenie profilu látok zastúpených v extrakte betelového orechu

Po prevedení statickej extrakcie a GC-MS analýzy bolo identifikovaných 9 prchavých zlúčenín (z celkových 20 píkov), po statickej extrakcii s modifikátorom 16 látok (z počtu 26 píkov) a po dynamickej extrakcii 10 látok (z celkových 19 píkov). Výsledky sú uvedené v tabuľke 13.

Spektrum skupín látok sa ani v tomto prípade výrazne nelíši. Diferencia je zrejma opäť v relatívnom zastúpení. Ako vyplýva z grafu, na obrázku 15, tak obsah extraktu v najväčšej miere tvoria mastné kyseliny (statická extrakcia - 73,04 %; statická extrakcia s modifikátorom - 76,23 %; dynamická extrakcia - 68,63 %). Najväčšiu časť tvorila kyselina dodekánová (statická 42,64 %, statická s modifikátorom 19,99 % a dynamická extrakcia 22,84 %) a tetradekánová (statická 22,14 %, statická s modifikátorom 31,25 % a dynamická extrakcia 29,18 %). Významne je zastúpená aj skupina laktónov - statická extrakcia s modifikátorom, s celkovým relatívnym zastúpením 17,46 % pre muskalatón a dynamická extrakcia s celkovým obsahom 20,42 % pre muskalatón. Značne zastúpená bola aj skupina alkánov. Do celkového obsahu z rôznych rastlinných matric sa táto skupinu nezapočítava, pretože alkány výrazne neovplyvňujú vôňu rastliny. Po statickej extrakcii sa ich celkové relatívne zastúpenie podieľalo na 24,72 % (hlavne oktán 23,26 %). Po prevedení dynamickej extrakcie ich zastúpenie tvorili 9,63 % (najmä oktán 9,27 %), čo je takmer trikrát menej ako v prípade statickej extrakcie. Po extrakcii s použitím modifikátoru tvorili menej ako 5 % celkového obsahu látok.

Tabuľka 13: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch betelového orechu

Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorom}	SFE _{dynamická}
Alkány	oktán	801	800	111-65-9	23,26	4,03	9,27
	nonán	901	900	111-84-2	1,46	0,22	0,36
	dekán	1000	1000	124-18-5	neprítomné	0,12	neprítomné
Aldehydy	nonanál	1105	1104	124-19-6	0,42	0,19	0,33
Aromatické uhľovodíky	<i>m</i> -xylén	858	857	100-41-4	neprítomné	0,05	neprítomné
	etylbenzén	891	893	100-41-4	0,49	neprítomné	0,28
Diterpény	neofytadién	1836	1836	504-96-1	0,45	neprítomné	neprítomné
Estery	metyl dekanoát	1323	1327	110-42-9	0,88	neprítomné	neprítomné
	metyl dodekanoát	1524	1527	111-85-0	neprítomné	0,11	neprítomné
	metyl tetradekanoát	1725	1727	124-10-7	neprítomné	0,18	neprítomné
	metyl hexadekanoát	1926	1925	112-39-0	neprítomné	0,30	neprítomné
	metyl linoleát	2093	2093	112-63-0	neprítomné	0,18	neprítomné
	metylester 11-oktadekánovej kyseliny	2099	2085	52380-33-3	neprítomné	0,27	neprítomné
Laktóny	muskalaktón	2141	2144	106-02-5	neprítomné	17,46	20,42
Mastné kyseliny	dekánová kyselina	1366	1372	334-48-5	neprítomné	0,45	1,64
	dodekánová kyselina	1565	1570	143-07-7	42,64	19,99	22,84
	tetradekánová kyselina	1764	1769	544-63-8	22,14	31,25	29,18
	hexadekánová kyselina	1964	1968	57-10-3	8,26	24,54	14,97
Ostatné	acetyl tributyl citrát	2249	2254	77-90-7	neprítomné	0,66	0,71



Obrázok 15: Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch betelového orechu

3.4.1 Porovnanie profilu látok extraktu betelového orechu s dostupnou literatúrou

K. Periyanyagam, M. Muuben a M. Sakeem [98] prácu započali vysušením listov, s prevedením **hydrodestilácie** po dobu 3 hodín. Po GC-MS separácii na kapilárnej kolóne DB-5MS, bolo celkovo identifikovaných 50 prchavých zlúčenín. Štúdia [98] zistila, že hlavnú zložku aromatických látok tvoria seskviterpény. Najmä germakrén *D* (16,07 %). Ďalšími zastúpenými zložkami v liste betelového orechu sú - lepizodén (14,99 %), β -karyofylén (9,86 %), 1,3,4-eugenol (7,17 %), β -elemén, α -selineol, β -kadimén (2,82 %) a cineol (2,80 %). V orechových listoch zozbieraných v oblasti Varnasi (India) bol najviac zastúpený eugenol (63,39 %) a acetyleugenol (14,05 %). Tento olej bol získaný rovnakou technikou, ako olej z listov orechu z časti Sholavandan. Spektrum látok prítomných v esenciálnych olejoch je ovplyvnené najmä klimatickými a geografickými podmienkami [98]. V porovnaní s našim experimentom, sa podarilo identifikovať maximálne 26 látok, z čoho vyplýva, že hydrodestilácia by mohla byť šetrnejšou technikou na získanie esenciálneho oleja rastlinných matric. Prítomnosť seskviterpénov sa však v našom experimente nepotvrdila.

Na získanie esenciálneho oleja z betelového orechu **XUE-YUA, Y. A. N. G a kolektív [99]** využili **head-space mikroextrakciu tuhou fázou** po dobu 30 minút, pri teplote 60 °C. Celkovo pomocou GC-MS bolo analyzovaných 29 zlúčenín, z ktorých medzi najviac zastúpené patrili: 1-metoxy-4-(1-propenyl) benzén (25,73 %), hexánová kyselina (17,23 %), 3-fenylpropenál (11,66 %), 4-metoxybenzaldehyd (4,51 %), dodekánová kyselina (4,46 %), hexanál (3,46 %) [99]. Pokiaľ by sme zastúpenie týchto látok zrovnávali s našim experimentom, tak skupinu aldehydov sa podarilo identifikovať vo všetkých troch prípadoch, aj keď prítomnosť je značná iba pre nonanál. Zároveň sa svojim relatívnym zastúpením nepodielal viac ako 1 % na celkovom obsahu. Taktiež v našej štúdii nebola potvrdená ani prítomnosť terpenových zlúčenín. Najviac zastúpenými masnými kyselinami boli - kyselina hexánová 17,23 % a dodekánová kyselina 4,46 %. V našej práci sa kyselina hexadekánová podieľala po statickej extrakcii s použitím modifikátoru až 24,54 % na celkovom obsahu látok v extrakte. Najmenšiu časť tvorila po statickej extrakcii s relatívnym zastúpením 8,26 %. Vo všetkých prípadoch bola kyselina dodekánová identifikovaná v oveľa vyšších relatívnych zastúpeniach oproti dostupnej literatúre. Po statickej extrakcii tvorila takmer 10 násobok relatívneho zastúpenia v porovnaní so štúdiou. Navyše od literatúry [99] v našej práci boli identifikované aj ďalšie masné kyseliny - tetradekánová a dekánová masná kyselina.

Mai Huỳnh Cang, Phan Thị Bảo Nhi, Nguyễn Thị Cẩm Linh [100] použili na extrakciu betelových listov **parnú destiláciu** po dobu 5 hodín. Prostredníctvom GC-MS analýzy sa

podarilo identifikovať 21 zlúčenín. Hlavné zložky esenciálneho oleja tvorili fenolové zlúčeniny, ktoré sa nám nepodarilo identifikovať. Najviac zastúpenými boli - acetugenol (27,51 %), 4-allyl-1,2-diacetyoxybenzén (27,39 %), eugenol (22,69 %). Olej ďalej obsahoval terpénové zlúčeniny terpinén-4-ol (2,69 %), γ -murolén (1,76 %), germakrén *D* (1,34 %), α -muurolén (1,09 %), α -kadioneol (8,02 %) [3]. Esenciálny olej orechového listu obsahoval hlavné zložky acetugenol, 4-allyl-1,2-diacetyoxybenzén a eugenol, ktorých prítomnosť sa nepotvrdila v našej práci [100].

Kemprai Phirose, Bora Pranjit Kumar, Mahanta Bhaskar Protim, Sut Dristi, Saikia Siddhartha Proteem, Banik Dipanwita a Haldar Saikat [101] identifikovali 21 zlúčenín v esenciálnom oleji nadzemnej časti rastliny po GC-MS na kapilárnej kolóne TR-5MS. Esenciálny olej bol vyextrahovaný prostredníctvom **hydrodestilácie**, ktorá sa prevádzala po dobu 10 hodín. Olej sa potom skladoval pri teplote 4 °C v tme až do doby, kým nebola prevedená samotná analýza. Najviac zastúpený bol β -karyofylén (19,35 %), germakrén (43,21 %), δ -kadinol (3,86 %), δ -elemén (1,11 %), *D*-limonén (2,03 %), viridiflorol (2,66 %), α -kopaén (0,70 %), linalool (1,22 %) [4]. Skupina seskviterpénov (hlavné zložky β -karyofylén, garmakrén) a seskviterpenoidov (viridiflorol) sa v našej práci nepotvrdili. Taktiež ani skupina terpénov a terpenoidov [101].

V Číne **Qu Li-jie, Liu Wen-Jie, Qian Xue-Jie a Sun Ai-Dong [102]** s použitím **extrakcie nadkritickou tekutinou** a GC-MS identifikovali až 105 zlúčenín v extrakte betelového orechu. Väčšinu tvorili alkoholy (49,79 %) a masťné kyseliny (17,76 %). Konkrétne analyzované zlúčeniny a podmienky extrakcie nadkritickou tekutinou však v tomto príspevku nie sú dostupné [102]. V porovnaní s našim experimentom sa výrazne podieľali na celkovom obsahu masťné kyseliny (statická extrakcia celkové relatívne zastúpenie 73,04 % statická extrakcia s použitím modifikátoru s celkovým relatívnym zastúpením 76,23 % a dynamická extrakcia 68,63 %). Výsledky našej práce poukazujú nato, že vo všetkých typoch extrakcie sa masťné kyseliny podieľajú viac ako z polovice na celkovom zastúpení jednotlivých látok. Naopak prítomnosť skupiny alkoholov sa v našej práci nepotvrdila [102].

Odlíšnosti v profile látok môžu byť zapríčinené rôznymi faktormi - geologické, klimatické podmienky, čas a spôsob zberu, skladovanie, preprava, pôvod matrice a konkrétna časť rastliny. Veľmi dôležitý je aj správny výber extrakčnej techniky a jej podmienky ale aj chromatografická analýza, pretože jednotlivé separácie sa uskutočňovali za rôznych podmienok, s použitím iných kolón. Opäť súhrn dostupnej zahraničnej literatúry je uvedený v nasledujúcej tabuľke 14.

Tabuľka 14: Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS analýzy v dostupnej literatúre pre betelový orech

Pôvod vzorky	Spracovaná časť vzorky	Typ extrakcie	Analýza	Hlavné analyzované zložky [%]	Dostupná literatúra
Sholavandan (India)	orechové listy	HD	GC-MS	bicyklo germakrén (14,99 %), germakrén <i>D</i> (16,07 %), karyofylén (9,86 %), β - <i>cis</i> ocimén (2,45 %), α -pinén (1,71 %), α -kadenol (2,26 %), γ -muroolén (3,18 %)	[98]
Varanasi (India)	orechové listy	HD	GC-MS	eugenol (63,39 %), acetyeugenol (14,05 %)	[98]
Čína	betelový orech	HS-SPME	GC-MS	1-metoxi-4-(1-propenyl) benzén (25,73 %), hexánová kyselina (17,23 %), 3-fenylpropenál (11,66 %), 4-metoxybenzaldehyd (4,51 %), dodekánová kyselina (4,46 %), hexanál (3,46 %)	[99]
Vietnam	orechové listy	SD	GC-MS	4-allyl-1,2-diacetoxybenzén (27,39 %), eugenol (22,69 %), acetueugenol (27,50 %), γ -muuroolén (1,76 %), terpinén-4-ol (2,67 %), α -kadionol (8,02 %),	[100]
Jorhat kampus (India)	nadzemná časť rastliny	HD	GC-MS	β -karyofylén (19,35 %), germakrén (43,21 %), δ -kadinol (3,86 %), δ -elemén (1,11 %), <i>D</i> -limonén (2,03 %), viridiflorol (2,66 %), linalool (1,2 %)	[101]
Hainan	betelový orech	SFE	GC-MS	vitamín E, skvalén, alkoholy (49,79 %), mastné kyseliny (17,76 %), uhľovodíky (8,31 %)	[102]

3.5 Vyhodnotenie profilu látok zastúpených v extrakte pekanového orechu s využitím troch typov extrakcií

Extrakt pekanového orechu bol získaný prostredníctvom statickej extrakcie (identifikovaných 9 látok z 13), statickej extrakcie s použitím modifikátoru (identifikovaných 17 látok z 21) a dynamickej extrakcie (identifikovaných 16 látok z celkových 18). Výsledky GC-MS analýzy sú uvedené v tabuľke 15.

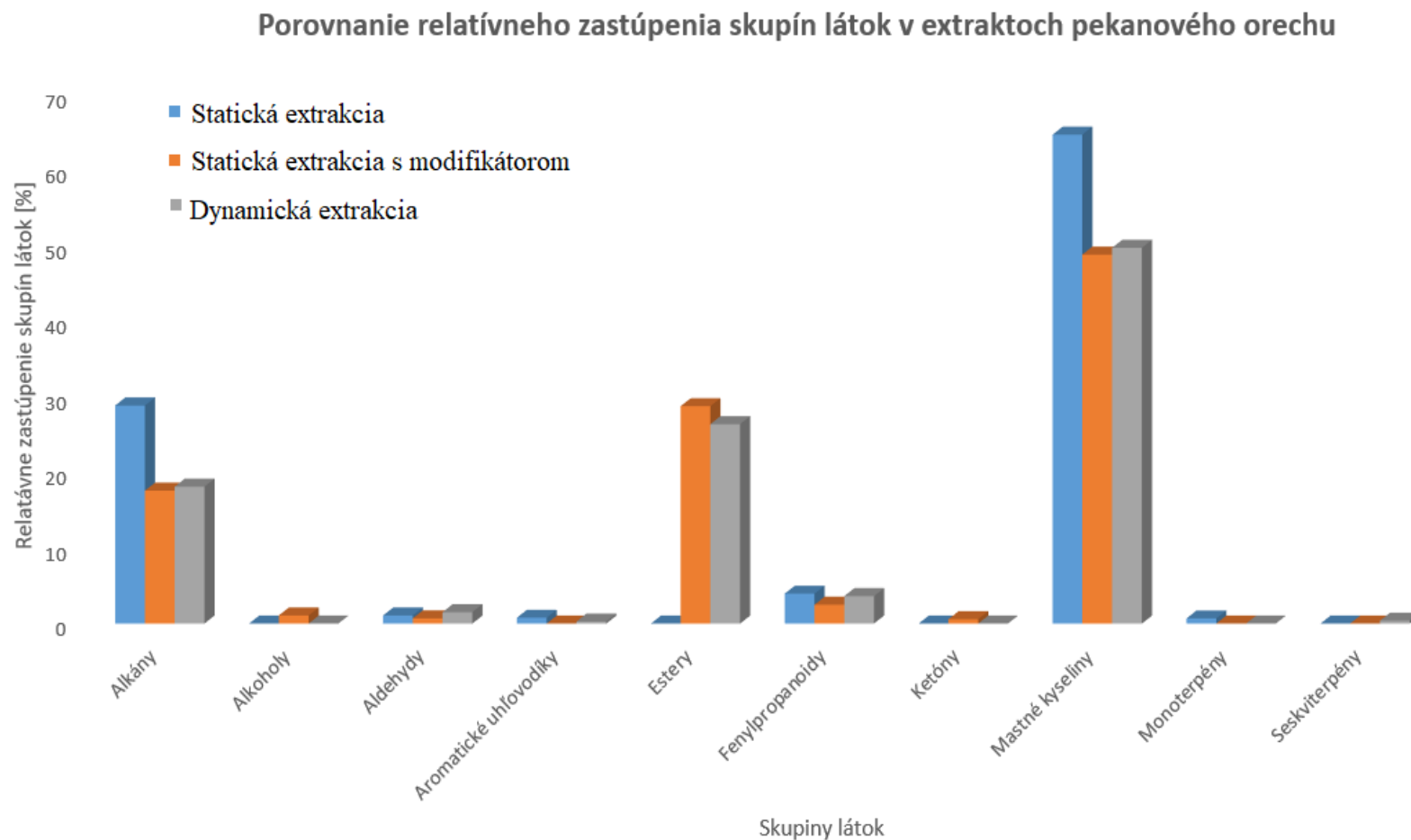
Spektrum látok po prevedení statickej extrakcie je odlišné od extrakcie, pri ktorej bol použitý modifikátor a dynamickej extrakcie. Navyše bola identifikovaná aj skupina esterov, alkoholov a seskviterpénov. Najviac zastúpenou skupinou boli mastné kyseliny, ktorých celkové relatívne zastúpenie tvorilo 64,67 % (kyselina dodekánová - 44,24 % a kyselina tetradekánová - 20,43 %). Po prevedení ostatných módov extrakcie ich celkové zastúpenie bolo o niečo nižšie (48,80 % statická s modifikátorom, 49,70 % dynamická). Seskviterpény boli identifikované iba po prevedení dynamickej extrakcie, avšak ich relatívne zastúpenie bolo < 1 %. Po dynamickej extrakcii sa podarilo identifikovať 5 esterov (najviac zastúpený - metylester 9-oktadecénovej kyseliny 12,92 % a metyl linoleát 9,29 %), ktorých celkového relatívne zastúpenie, bolo o niečo nižšie 26,38 % v porovnaní so statickou extrakciou s modifikátorom, po ktorej celkový podiel esterov v extrakte tvoril 28,76 % (najmä metylester 9-oktadecénovej kyseliny 14,12 % a metyl linoleát 9,17 %). Spektrum látok prítomných v extraktoch pekanového orechu a ich relatívne zastúpenie je pre lepšiu predstavu uvedené v grafe na obrázku 16.

Tabuľka 15: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch pekanového orechu

Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorm}	SFE _{dynamická}
Alkány	oktán	801	800	111-65-9	27,75	16,68	17,30
	nonán	900	900	111-84-2	1,09	0,91	0,81
Alkoholy	3-etylpentán-3-ol	815	809	597-49-9	neprítomné	0,49	neprítomné
	2-(1,1dimetyloxy) etanol	850	852	7580-85-0	neprítomné	0,59	neprítomné
Aldehydy	nonaldehyd	1104	1107	124-19-6	1,07	0,69	0,97
	dekanál	1206	1208	112-31-2	neprítomné	neprítomné	0,54
Aromatické uhľovodíky	etylbenzén	891	893	100-41-4	0,78	neprítomné	0,27
Estery	metyl oktanoát	1123	1125	111-11-5	neprítomné	0,49	neprítomné
	metyl dodekanoát	1523	1527	111-82-0	neprítomné	0,72	neprítomné
	metyl hexadekanoát	1925	1925	112-39-0	neprítomné	2,65	2,64
	metyl linoleát	2091	2093	112-63-0	neprítomné	9,17	9,29
	metylester 9-oktadecénovej kyseliny	2098	2085	1937-62-8	neprítomné	14,12	12,92
	metyl oktadekanoát	2126	2127	112-61-8	neprítomné	0,74	0,17
	metylester 2-[[[4-(4-hydroxy-4-methylpentyl)-, 3-cyklohexén-1-yl]metylén]amino] benzoovej kyseliny	1584	1589	67634-12-2	neprítomné	0,87	1,36
Fenylpropanoidy	eugenol	1353	1357	97-53-0	3,37	1,78	2,65
	eugenyl acetát	1515	1521	93-28-7	0,59	0,72	0,99
Ketóny	3,3-dimetoxy-2-butanón	824	821	21983-72-2	neprítomné	0,58	neprítomné

Tabuľka 15: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch pekanového orechu - pokračovanie

Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorom}	SFE _{dynamická}
Mastné kyseliny	dodekánová kyselina	1562	1570	143-07-7	44,24	31,20	26,16
	tetradekánová kyselina	1760	1769	544-63-8	20,43	17,60	15,10
	hexadekánová kyselina	1961	1968	57-10-3	neprítomné	neprítomné	8,44
Monoterpény	<i>p</i> -cymén	1046	1042	99-87-6	0,68	neprítomné	neprítomné
Seskviterpény	karyofylén	1422	1424	13877-93-5	neprítomné	neprítomné	0,39



Obrázok 16: Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch pekanového orechu

3.5.1 Porovnanie profilu látok extraktu pekanového orechu s dostupnou literatúrou

Stephanie Reis Ribeiro, Qullen Machado Ribeiro, Ingrid Duarte dos Santos a kolektív [103], sledovali profil látok obsiahnutých v rôznych kultivaroch pekanového orechu. Všetky vzorky boli zozbierané v apríli 2016. Po prirodzenom vysušení, boli orechy manuálne zbavené škrupiny. Lipidy extrahované zo vzorky sa najskôr alkalicky zmydelnili. Mastné kyseliny sa stanovili prostredníctvom GC-FID na kapilárnej kolóne CP-WAX 52 ako metylestery mastných kyselín. *Barton* kultivar bol bohatý predovšetkým na obsah mononenasytených mastných kyselín. Najviac zastúpenou bola kyselina olejová 66,92 % a kyselina linoleová s relatívnym zastúpením 22,50 %. Ešte vyšší obsah kyseliny olejovej sa potvrdil v kultivaroch *Mahan* (72,99 %) a *Chickasaw* (72,86 %). Naopak relatívne zastúpenie kyseliny linoleovej bolo nižšie *Mahan* (16,27 %) a *Chickasaw* (16,91 %). Tento výskum tiež uvádza štúdiu **Amaral a kolektív [104]**, v ktorej výsledky poukazujú na nepriamy súvis pomeru obsahu olejovej a linoleovej kyseliny, ktorý sa líši v jednotlivých kultivaroch. V porovnaní s našou prácou sú nasýtené mastné kyseliny v štúdiu [103] zastúpené pomerne v malom množstve. Ich celkové relatívne zastúpenie tvorí iba 9,27 % (hlavne kyselina hexadekánová 6,53 % a kyselina oktadekánová 2,46 %). V našom experimente bola identifikovaná kyselina dodekánová (44,24 %) a kyselina tetradekánová (20,43 %) po statickej extrakcii. Po prevedení statickej extrakcie s použitím modifikátoru relatívne zastúpenie kyseliny dodekánovej bolo 31,20 % a kyseliny tetradekánovej 17,60 %. Po dynamickej extrakcii sa kyselina dodekánová podieľala na celkovom obsahu 26,16 %, kyselina tetradekánová 15,10 % a kyselina hexadekánová 8,44 %.

Zároveň sa tento výskum zaoberal aj obsahom prchavých látok v rôznych kultivaroch pekanového orechu. Po **HS-SPME**, s použitím divinylbenzén/karboxén/polydimetylsiloxanového vlákna po dobu 35 minút, prebehla GC-MS analýza, na kapilárnej kolóne Chrompack WAX 52-CB. Bola potvrdená prítomnosť pre takmer 200 zlúčenín, z čoho sa podarilo identifikovať 83. Boli klasifikované ako alkoholy, kyseliny, aldehydy, ketóny, estery, furany, laktóny, terpény a zlúčeniny síry. Vo všetkých kultivaroch boli identifikované aldehydy, etanál, hexanál, 2-metylbutanál a 3-metylbutanál. Tieto zložky sa popisujú ako štipľavé a aromatické, podľa veľkosti uhlíkového reťazca. V našom experimente bola potvrdená prítomnosť skupiny aldehydov vo všetkých módoch extrakcie, ale s minimálnym relatívnym zastúpením vid' tabuľka 14. Výsledky našej práce poukazujú aj na bohaté zastúpenie skupiny esterov. Po prevedení statickej extrakcie s modifikátorom celkové relatívne zastúpenie esterov tvorilo 28,76 % po dynamickej extrakcii 26,38 %. Ďalej v našom experimente bola

potvrdená aj prítomnosť alkánov, podobne ako v štúdiu [103], avšak do výsledkov nebolo ich zastúpenie započítané, pretože neovplyvňujú arómu pekanového orechu. Naopak [103] identifikovala aj niekoľko alkoholov, ktoré sa v našom experimente nepodarilo určiť vôbec.

Intidhar Boudali, Ayda Khadhri, Sana Dallali, Ali Albouch a kolektív [105] hodnotili zloženie a antioxidačnú aktivitu esenciálneho oleja pekanového orechu, získaného **hydrodestiláciou** po dobu 3 hodín. Zistili, že výťažnosť esenciálneho oleja sa pohybuje v rozmedzí od 0,023 do 0,03 %. Prostredníctvom GC-MS analýzy bolo identifikovaných 74 zlúčenín, čo je niekoľko násobne krát viac než v prípade našich extrakčných techník. Najviac zastúpeným bol gáfor (44,03 %), fenchón (28,85 %), β -elemén (17,66 %), *cis*-, *z*- α - bisabolén epoxid (16,76 %), aromadendrán (13,31 %), kamfén (11,54 %) a karyofylén oxid (8,98 %). V zrovnaní s našou štúdiou sa nepodarilo identifikovať ani jednu z vyššie uvedených prchavých zlúčenín. Rozdielnosti môžu byť zapríčinené pôvodom matrice ale aj typom extrakcie a jej podmienkami [105].

Na **extrakciu rozpúšťadlom K. R. Cadwallader, H. Kim, S. Puangpraphant a Y. Lorjaroenphon [106]** použili čerstvo vylúpané pekanové jadrá (odroda *Steward*, 2007). GC-MS analýza neutrálnych a kyslých látok prebiehala na kapilárnej Stabilwax kolóne. Na analýzu zásaditých zložiek sa použila kapilárna kolóna SAC-5. Zásadité a kyslé zložky boli identifikované až po pražení. Z neutrálnych v čerstvom pekanovom orechu bol najviac zastúpený hexanál 55,44 %, δ -dekalaktón 18,37 %, massoiolaktón 14,15 % a δ -nonalaktón 6,48 %. Výsledky našej práce sa vôbec nezhodujú s profilom látok identifikovaných literatúrou [106].

Maria A Corella - Madueno, Marvin K. Harris, Agustin A Fu - Castillo a kolektív [107], extrahovali olej puku pekanového orechu **HS-SPME**. Vzorky boli zozbierané počas sezóny vo februári 2007 - 2009 na pobreží v Mexiku. Extrakcia prebiehala pri teplote 50 °C po dobu 20 minút, s využitím polydimetylsiloxán-karboxénového vlákna. GC-MS analýza bola prevedená na kapilárnej kolóne DB5. Najviac zastúpenými v puku pekanového orechu boli α -pinén (13,23 %), β -karyofylén (11,2 %), *p*-cymén (10,33 %), limonén (8,02 %), cuparén (7,58 %), β -pinén (7,04 %) a kamfén (6,03 %). V našej štúdiu sa podarilo zo spomínaných látok identifikovať *p*-cymén po statickej extrakcii s relatívnym zastúpením iba 0,68 % [107].

Okrem iného **Maria A Corella - Madueno, Marvin K. Harris, Agustin A Fu - Castillo a kolektív [107]**, skúmali zloženie výhonku pekanového orechu a samotného oriešku.

Extrakcia a analýza prebiehala za takých istých podmienok ako pri pukoch pekanového orechu. Identifikované zlúčeniny boli rozčlenené ako monoterpény a seskviterpény, ďalej alkoholy, estery, karbonyly, cyklické uhľovodíky. Terpénové zlúčeniny pritom boli najviac zastúpenými v esenciálnom oleji. Zo skupiny seskviterpénov najväčší podiel esenciálneho oleja tvoril α -cedrén (26 %), selina-3,7(11)-dién (23,2 %) a γ -gurjunén (11,3 %). Oproti seskviterpénom, kategória monoterpénov bola zastúpená pomerne v nízkych relatívnych zastúpeniach - α -ocimén (3,29 %), β -pinén (1,85 %) a limonén (1,85 %). Zo skupiny esterov najviac zastúpenými boli hexylester octovej kyseliny (1,54 %) a 3-hexenylester butánovej kyseliny (1,54 %). Ďalšie prchavé zlúčeniny mali relatívne zastúpenie < 1 % [4]. V našej práci bol zo skupiny seskviterpénov po dynamickej extrakcii identifikovaný karyofylén s relatívnym zastúpením 0,39 %, ktorého prítomnosť v dostupnej literatúre [107] nebola potvrdená. Výsledky štúdie poukazujú na výrazný rozdiel relatívneho zastúpenia skupiny esterov. Zatiaľ čo v štúdiu je ich zastúpenie < 2%, tak v našej práci sa výrazne podieľajú na celkovom zastúpení látok. Po statickej extrakcii s použitím modifikátoru ich celkové relatívne zastúpenie tvorí 28,76 % a po dynamickej extrakcii 26,38 % [107].

Výsledky štúdie [107] ďalej potvrdili, že oriešok je obohatený o α -gurjunén (31,04 %), ktorého zastúpenie je oveľa vyššie než vo výhonku pekanového orechu. Vyšší podiel na celkovom zložení esenciálneho oleja tvorí zo skupiny seskviterpénov valencén (11 %), γ -gurjunén (10,5 %) a α -kubenén (6,61 %). V našom experimente však neboli identifikované. Z vyššie uvedených výsledkov a informácií vyplýva, že výrazný vplav na zloženie extraktu má extrahovaná časť rastliny (tabuľka 16).

Tabuľka 16: Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS a GC-FID analýzy v dostupnej literatúre pre pekanový orech

Pôvod vzorky	Spracovaná časť vzorky	Typ extrakcie	Analýza	Hlavné analyzované zložky [%]	Dostupná literatúra
Brazília	pekanový orech	HD	GC-FID	<i>Mahan</i> - olejová kyselina 72,99 %, kyselina linoleová 16,27 % <i>Barton</i> - olejová kyselina 66,92 %, kyselina linoleová 22,50 <i>Chickasaw</i> - olejová kyselina 72,86 %, kyselina linoleová 16,91 %	[103]
Brazília	pekanový orech	HS-SPME	GC-MS	<i>Chickasaw</i> - octová kyselina 51,97 %, hexanál 20,49 % <i>Mahan</i> - octová kyselina 37,80 %	[103]
Tunisko	pekanový orech	-	GC-MS	gáfor 44,03 %, fenchón 28,85 %, β -elemén 17,66 %, <i>cis</i> -, α -bisabolén epoxid 16,76 %, kamfén 11,54 %	[105]
Georgia (USA)	pekanový orech	extrakcia rozpúšťadlom	GC-MS	hexanál 55,44 %, δ -dekalaktón 18,37 %, %, massoiaktón 14,15 %, δ -nonalaktón 6,48 %	[107]
Mexiko	puk pekanového orechu	HS-SPME	GC-MS	α -pinén 13,23 %, β -karyofylén 11,2 %, <i>p</i> -cymén 10,33 %, limonén 8,02 %, kuparén 7,58 %	[107]
Mexiko	výhonok/oriešok pekanového orechu	HS-SPME	GC-MS	výhonok: α -cedrén 26 %, γ -gurjunén 11,3 %, selina-3,7(11)dién 23,2 %, α -ocimén 3,29 %, β -pinén 1,85 %, oriešok : α -gurjunén 31,04%, valencén 11 %, γ -gurjunén 10,5 %	[107]

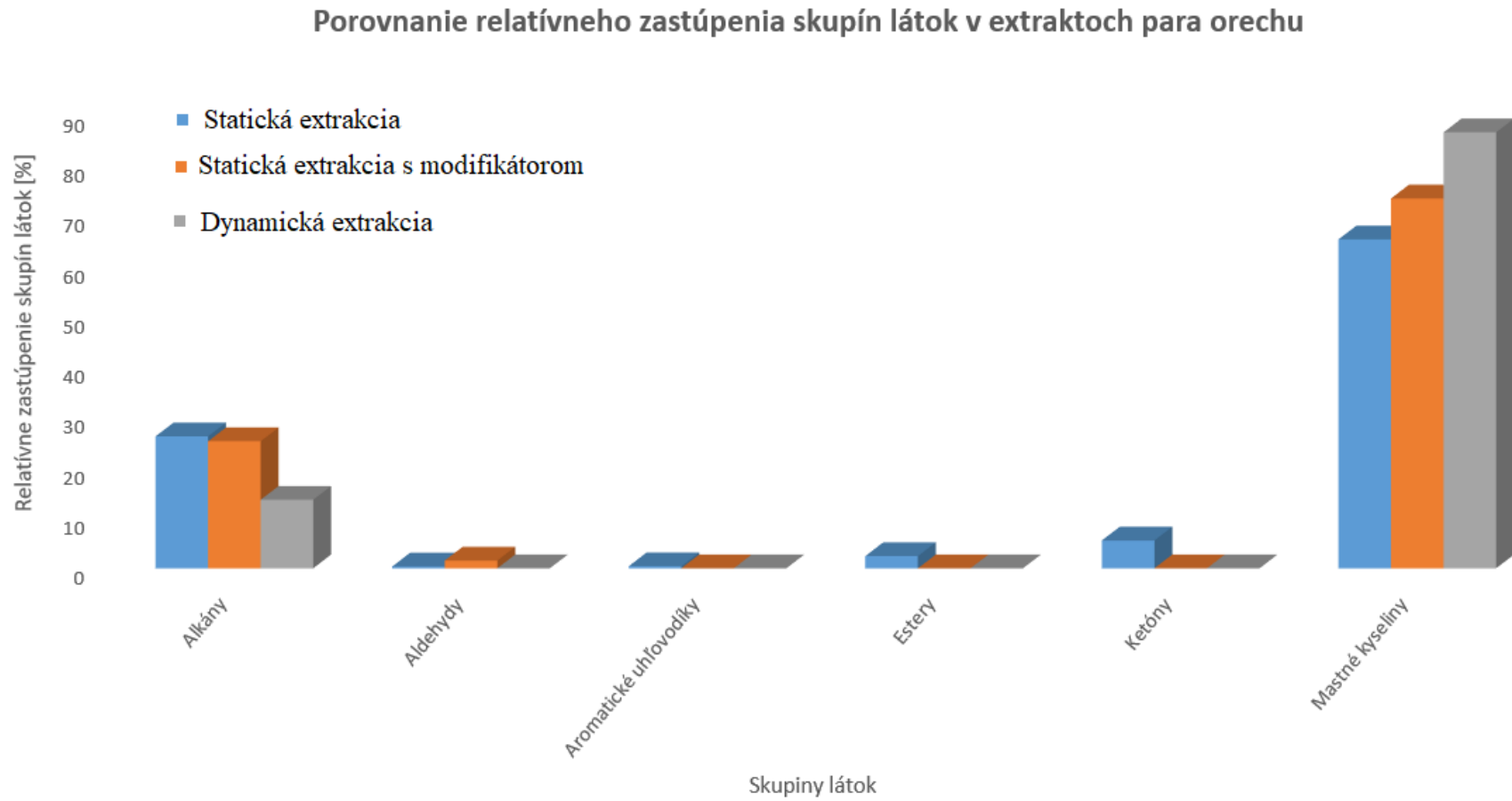
3.6 Vyhodnotenie profilu látok zastúpených v extrakte brazílskeho (para) orechu

Vo všetkých troch prípadoch bolo identifikovaných veľmi málo látok (viď tabuľka 17). Príčinou môže byť nevhodný spôsob extrakcie alebo nevyhovujúci typ orechu. **Pedro Barata, Ícaro Sarquis a Helison Carvalho [111]** uvádzajú, že para orech je bohatý predovšetkým na tuky 60 - 70 %, bielkoviny 15 - 20 %, vitamíny rozpustné v tukoch (A, E) a minerály (Se, K, Na, Ca, Fe, Zn) [111].

Po prevedení statickej extrakcie sa podarilo identifikovať v našej štúdii 9 látok (z celkových 10). Významnú časť celkového obsahu tvorili mastné kyseliny - najmä kyselina tetradekánová 32,62 %, kyselina dodekánová 23,76 % a kyselina hexadekánová 8,80 %. Ďalšou významne zastúpenou skupinou boli alkány, ktoré sa podieľali 26,15 % na celkovom obsahu extraktu para orechu (hlavne oktán 25,29 %). Po statickej extrakcii s využitím modifikátoru bolo identifikovaných iba 5 zlúčenín (z celkových 9). Opäť hlavnú časť celkového obsahu tvorili mastné kyseliny - kyselina dodekánová 35,39 % a kyselina tetradekánová 37,90 %. Ďalšou významne zastúpenou skupinou boli alkány s celkovým relatívnym zastúpením 25,19 %. Ostatné skupiny sa podieľali na celkovom obsahu látok menej ako 1 %. Vo výsledkoch sa podarilo najmenej látok identifikovať po dynamickej extrakcie, pri ktorej boli identifikované 4 látky (z celkových 5). Aj v tomto experimente najviac zastúpenými boli mastné kyseliny - kyselina dodekánová 34,32 %, tetradekánová 41,96 % a hexadekánová kyselina 10,14 %. Ako vyplýva z grafu na obrázku 17, prevažná väčšina extraktu získaného SFE bola tvorená mastnými kyselinami.

Tabuľka 17: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch para orechu

Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorom}	SFE _{dynamická}
Alkány	oktán	802	800	111-65-9	25,29	24,22	13,58
	nonán	901	900	111-84-2	0,86	0,97	neprítomné
Aldehydy	nonanál	1106	1104	124-19-6	0,35	1,52	neprítomné
Aromatické uhľovodíky	etylbenzén	892	893	100-41-4	0,40	neprítomné	neprítomné
Estery	metylester 2-[[[4-(4-hydroxy-4-metylpentyl)-, 3-cyclohexén-1-yl]metylén]amino] benzoovej kyseliny	1586	1589	67634-12-2	2,41	neprítomné	neprítomné
Ketóny	oxacyklohexadekán-2-ón	2140	2144	106-02-5	5,51	neprítomné	neprítomné
Mastné kyseliny	dodekánová kyselina	1563	1570	143-07-7	23,76	35,39	34,32
	tetradekánová kyselina	1762	1769	544-63-8	32,62	37,90	41,96
	hexadekánová kyselina	1966	1968	57-10-3	8,80	neprítomné	10,14



Obrázok 17: Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch para orechu

3.6.1 Porovnanie profilu látok extraktu para orechu s dostupnou literatúrou

V štúdií vykonávanej **O. V. Santos, N. C. F. Corrêa a kolektív [108]**, sa plodina zozbieraná v roku 2009 najskôr sušila v peci. Výskumníci sa zaoberali účinnosťou rôznych extrakčných techník na rastlinné matrice. Na **extrakciu lisovaním** sa použil hydraulický lis. Prebiehala po dobu 5 minút, s následnou vákuovou filtráciou. Rastlina bola podrobená aj **Soxhletovej extrakcii** s petroléterom a hexánovými činidlami a **extrakcii nadkritickou tekutinou**. Profil metylesterov mastných kyselín sa charakterizoval podľa normy ISO 5509. Navážil sa 1 g oleja a zmiešal s 10 ml *n*-heptanolu. Potom sa pridalo 0,5 ml NaOH a metanol. Po premiešaní po dobu 20 sekúnd sa oddelil supernatant a prebehla GC analýza, na kapilárnej kolóne SP-2560 [108].

Tabuľka 18: Charakteristika profilu mastných kyselín para orechu v jednotlivých extrakčných technikách [108]

Mastná kyselina Typ extrakcie	Lisovanie	Soxhletova extrakcia - petroleum éter	Soxhletova extrakcia - hexán	SFE
myristová kyselina	0,058 ± 0,00	0,054 ± 0,001	0,052 ± 0,002	0,516 ± 0,03
palmitová kyselina	14,24 ± 0,02	13,47 ± 0,00	12,63 ± 0,159	14,94 ± 0,927
stearová kyselina	11,19 ± 0,01	11,93 ± 0,012	11,63 ± 0,141	10,23 ± 0,07
olejová kyselina	36,26 ± 0,03	31,24 ± 0,02	29,76 ± 0,408	35,55 ± 2,275
linoleová kyselina	37,53 ± 0,03	42,42 ± 0,03	45,17 ± 0,722	40,51 ± 2,56
linolenová kyselina	0,076 ± 0,00	0,058 ± 0,004	0,074 ± 0,005	0,075 ± 0,005

Výsledky analýzy profilu mastných kyselín (tabuľka 18) poukazovali na bohaté zastúpenie nenasýtených mastných kyselín s priemerom 73,86 % po lisovaní, 73,73 % po Soxhletovej extrakcii - petroleum éter, 75 % po Soxhletovej extrakcii - hexán a 75,13 % po extrakcii nadkritickou tekutinou v porovnaní s nasýtenými mastnými kyselinami, ktoré v priemere tvorili iba 25,75 %. Naša štúdia naopak dokazovala bohaté zastúpenie práve na nasýtené mastné kyseliny, ktoré sa podieľali celkovým relatívnym zastúpením 65,18 % (hlavne kyselina tetradekánová 32,62 %) po statickej extrakcii. O niečo vyššie bolo zastúpenie nasýtených mastných kyselín po statickej extrakcii s použitím modifikátoru celkovo 73,29 % (kyselina dodekánová a tetradekánová s takmer totožným relatívnym zastúpením). Po dynamickej extrakcii okrem alkánov boli identifikované iba nasýtené mastné kyseliny s celkovým zastúpením až 86,42 %. Hlavný podiel tvorila kyselina tetradekánová 41,96 %. Všetky tieto odlišnosti sú pravdepodobne zapríčinené rozdielnymi extrakčnými technikami a prípravou vzorky k samotnej analýze [107].

Alan G. de O. Sartori, Geni R. Sampaio, Deborah H.M. Bastos a kolektív [109], monitorovali tvorbu prchavých látok počas skladovania para orechov. Prchavé látky boli vyťažené **head-space mikroextrakcie tuhou fázou** a analyzované prostredníctvom GC-MS na kapilárnej kolóne Rtx-5MS. Vzorka sa najprv vložila do head-space vialky, prepláchla dusíkom po dobu 10 sekúnd a uzavrela viečkom. Vialka bola potom ponorená do termostatu s vodou vyhrievanou na 80 °C, s magnetickým miešadlom po dobu 30 minút. Následne vlákno SPME bolo vložené cez septum do head-space priestoru po dobu 10 minút. Predbežne stanovili 4 aldehydy (najmä hexanál 66,41 % a *trans*-2-heptanál 8,9 %), 2 ketóny a 2 alkoholy. Uhl'ovodíky do tohto výskumu nebolo zahrnuté, pretože je nepravdepodobné, že by vplývali na arómu para orechov. Výskum [109] sa odvoláva sa spracovanú rešerš **R. G. Clark a H. E. Nursten [110]**, že existuje iba jedna štúdia, charakterizujúca prchavé zložky para orechu. V čerstvých orechoch identifikovali hexanál a 2-nonanón. V našom experimente bola potvrdená prítomnosť nonanálu (statická extrakcia - 0,25 % a statická extrakcia s modifikátorom - 1,52 %). Zároveň sa táto skupina vedcov zaoberala profilom mastných kyselín v orechu po lisovaní za studena. Metylestery mastných kyselín boli analyzované GC-FID na kapilárnej kolóne Rtx-Wax. Najviac zastúpenou bola kyselina linolenová s relatívnym zastúpením 39 %, ktorá v našom experimente nebola identifikovaná [109].

Olej para orechu bol zakúpený od firmy Amazon Oil Industry. Po esterifikácii sa uskutočnila GC-FID analýza na kapilárnej kolóne CP WA × 52 CB. **Marcos Antônio Pena Musiz a kolektív [111]** určili ako najviac zastúpené nenasýtené mastné kyseliny (kyselina olejová 38,50 % a kyselina linolová 31,26 %). Nasýtené mastné kyseliny predstavovali 25,55 % celkových nasýtených mastných kyselín (kyselina palmitová 14,27 % a kyselina stearová 11 %). V stopových množstvách boli identifikované aj ďalšie nasýtené mastné kyseliny - arachidonová a laurová [110]. Z porovnania profilu mastných kyselín v našej štúdii vyplýva, že mastné kyseliny sa podieľajú viac ako 50 % na celkovom zložení extraktu. Nasýtená mastná kyselina tetradekánová tvorila najväčšiu časť z celkového zastúpenia látok (statická extrakcia - 32,62 %, statická extrakcia s modifikátorom - 37,90 %, dynamická extrakcia - 41,96 %) [110].

Metylestery mastných kyselín pripravili **Nicola Cicero, Ambrogina Albergamo [112]** trepaním zmesi oleja v *n*-heptáne s metanolickým roztokom KOH po dobu 30 sekúnd pri laboratórnej teplote. Po dekantačnom kroku sa horná vrstva obsahujúca metylestery analyzovala pomocou GC-FID na kapilárnej kolóne SLB-IL 100. Najväčšiu časť celkového obsahu opäť tvorila kyselina olejová 47,78 % a kyselina linolová 24,65 % [112]. Nenasýtené mastné kyseliny v našej práci neboli identifikované.

Podobne sa profilom mastných kyselín zaoberali aj **Pedro H. S. Barata, Ícaro R. Sarquis [113]**, ktorí získali etylestery pomocou enzymatickej katalýzy za prítomnosti amano lipázy *Pseudomonas fluorescens*. Zmes vzorky, etanolu a amano lipázy sa inkubovala pri teplote 32 °C, po dobu 24 hodín. Po vysušení organickej fázy a odstránení rozpúšťadla, bola vzorka analyzovaná GC-MS na kapilárnej kolóne DB-5MS. Analýza poukazuje na zloženie mastných kyselín, pozostávajúce prevažne s nenasýtených mastných kyselín - kyselina olejová 32 % a kyselina linolová 29 %. Ďalšou identifikovanou bola nasýtená kyselina stearová so zastúpením 17 % a palmitová kyselina s relatívnym zastúpením 19 %, ktorá bola identifikovaná aj v našom experimente (statická extrakcia - 8,8 % a dynamická extrakcia - 10,14 %). Pre lepší prehľad sú výsledky dostupnej literatúry stručne zhrnuté v tabuľke 19 [113].

Tabuľka 19: Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS a GC-FID analýzy v dostupnej literatúre pre para orech

Pôvod vzorky	Spracovaná časť vzorky	Typ extrakcie	Analýza	Hlavné analyzované zložky [%]	Dostupná literatúra
Neznámy	rastlina para orechu	SFE	GC	kyselina palmitová (14,94 %), kyselina stearová (10,23 %), kyselina olejová (35,55 %), kyselina linolová (39,79 %)	[108]
Amazónia	vákuovo balené orechy	HS-SPME	GC-MS	hexanál (66,41 %), <i>trans</i> -2-heptanál (8,9 %), 3-oktén-2-ón (5,88 %), 1-oktén-3-ol (6,14 %), 1-pentanol (4,01 %), 2-nonanol (4,13 %)	[109]
Amazónia	vákuovo balené orechy	lisovanie za studena	GC-FID	kyselina linolenová (39 %), kyselina palmitová (16 %), kyselina stearová (11 %)	[109]
Brazília	orech prírodného pôvodu	lisovanie za studena	GC-FID	kyselina olejová (38,50 %), kyselina linoleová (31,26 %), kyselina palmitová (14,27 %), kyselina stearová (10,61 %)	[111]
Brazília	komerčne vyrobený olej	-	GC-FID	kyselina linolová (24,65 %), kyselina olejová (47,78 %), kyselina hexadekánová (12,11 %), kyselina oktadekánová (6,33 %)	[112]
Brazília	olej	-	GC-MS	kyselina olejová (32 %), kyselina linolová (29 %), kyselina vakcénová (< 2 %), kyselina palmitová (19 %), kyselina stearová (17 %)	[113]

3.7 Vyhodnotenie profilu látok zastúpených v extraktoch lieskového orechu

Lieskový orech bol podrobený najprv statickej extrakcii, po ktorej GC-MS analýzou sa podarilo identifikovať 31 látok z celkových 42. Taktiež sa sledoval profil látok v extrakte, získanom statickou extrakciou s použitím modifikátoru, kedy bolo identifikovaných 12 prchavých zlúčenín z celkových 15. Ako posledná bola prevedená dynamická extrakcia, po ktorej bolo identifikovaných iba 7 látok z celkových 9. Pre lepšiu orientáciu v texte boli dáta spracované vo forme tabuľky 20.

Spektrum látok v extraktoch lieskovca je výrazne odlišné (obrázok 18). Zatiaľ čo po statickej extrakcii, prevažnú väčšinu tvorili terpénové zlúčeniny, tak po statickej extrakcii s modifikátorom bolo ich celkové relatívne zastúpenie 2,02 % a po dynamickej neboli identifikované vôbec. Pokiaľ by sme hodnotili obsah terpénových zlúčenín v statickej extrakcii, tak podľa výsledkov možno usúdiť, že aj napriek relatívne nízkemu obsahu, početnú skupinu látok tvorili monoterpény a monoterpenoidy. Celkový obsah skupiny monoterpénov sa podieľal 15,18 % na zložení extraktu lieskového orechu a obsah monoterpenoidov tvoril 8,21 %. Najväčší podiel zo skupiny monoterpénov tvoril sabinén 6,41 %, β -pinén 2,08 %, limonén 2,22 % a γ -terpinén 1,48 %. Zo skupiny monoterpenoidov to bol terpinén-4-ol 5,36 % a α -terpinyl acetát 1,59 %. Najväčšia časť extraktu sa skladala z fenylypropanoidov, ktoré sa podieľali až 59,64 % na celkovom obsahu látok (hlavne myristicín 52,56 %, metoxy eugenol 3,44 % a izoeugenol 1,27 %). Relatívne zastúpenie mastných kyselín v zrovnaní so skupinou fenylypropanoidov je oveľa nižšie. Hlavnú zložku tvorila kyselina tetradekánová 5,71 %. Ostatné kategórie látok (aldehydy, alkány, aromatické uhľovodíky, laktóny) vzhľadom na vyššie uvedené skupiny látok nie sú významne zastúpené. Ako vyplýva z grafu na obrázku 18, možno sledovať zmeny v relatívnom zastúpení mastných kyselín, ktoré sa po statickej extrakcii s modifikátorom podieľajú až 48,88 % na celkovom obsahu látok v extrakte lieskovca (hlavne kyselina dodekánová 18,67 % a kyselina tetradekánová 21,98 %). Relatívne zastúpenie mastných kyselín je ešte vyššie po prevedení dynamickej extrakcie 62,13 % (najmä kyselina dodekánová 22,15 %, kyselina tetradekánová 31,54 %). Medzi ďalšiu značnú kategóriu patrili alkány s celkovým zastúpením 32,42 % (najviac oktán 31,05 %). Obsah myristicínu výrazne poklesol v porovnaní so statickou extrakciou. Po dynamickej extrakcii a GC-MS analýze bolo stanovené, že v najväčšej miere sa na celkovom zastúpení podieľajú mastné kyseliny 62,13 % (najmä tetradekánová kyselina 31,54 % a dodekánová kyselina 22,15 %). Laktóny sa podieľali 12,29 % (pre oxacyklohexadekán-2-ón) na celkovom obsahu.

Tabuľka 20: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch lieskového orechu

Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorom}	SFE _{dynamická}
Alkány	oktán	801	800	111-65-9	4,73	31,05	23,07
	nonán	901	900	111-84-2	0,19	1,37	1,03
Aldehydy	2,4-dodekadienál	1424	1418	21662-16-8	0,22	neprítomné	neprítomné
	nonanál	1105	1104	124-19-6	neprítomné	1,69	neprítomné
Aromatické uhľovodíky	etylbenzén	892	893	100-41-4	0,08	0,68	neprítomné
Estery	metylester 2-[[[4-(4-hydroxy-4-metylpentyl)-, 3-cyklohexen-1-yl]metylén]amino]benzoovej kyseliny	1586	1589	67634-12-2	neprítomné	1,25	neprítomné
Fenylpropanoidy	eugenol	1354	1357	97-53-0	0,81	neprítomné	neprítomné
	metyl eugenol	1401	1403	93-15-2	0,37	neprítomné	neprítomné
	izoeugenol	1450	1452	97-54-1	1,27	neprítomné	neprítomné
	metyl izoeugenol	1496	1496	93-16-3	0,13	neprítomné	neprítomné
	myristicín	1523	1520	607-91-0	52,56	11,46	1,48
	elimicín	1548	1551	487-11-6	1,06	neprítomné	neprítomné
	metoxy eugenol	1960	1968	57-10-3	3,44	1,60	neprítomné
Laktóny	oxacyklohexadekán-2-ón	2139	2144	106-02-05	1,14	neprítomné	12,29
Mastné kyseliny	dodekánová kyselina	1562	1570	143-07-7	3,55	18,67	22,15
	tetradekánová kyselina	1762	1769	544-63-8	5,71	21,98	31,54
	hexadekánová kyselina	1962	1968	57-10-3	1,35	8,23	8,44
Monoterpenoidy	<i>cis-,para-ment-2-én-1-ol</i>	1126	1124	29803-82-5	0,18	neprítomné	neprítomné

Tabuľka 20: Identifikované látky po GC-MS analýze v extraktoch lieskového orechu - pokračovanie

Skupina látok	Názov látky	Vypočítaný RI	Referenčný RI	CAS	Relatívne zastúpenie látok [%]		
					SFE _{statická}	SFE _{statická s modifikátorom}	SFE _{dynamická}
Monoterpenoidy	terpinén-4-ol	1182	1180	562-74-3	5,36	neprítomné	neprítomné
	α -terpineol	1197	1195	98-55-5	0,58	neprítomné	neprítomné
	bornyl acetát	1285	1285	92618-89-8	0,35	neprítomné	neprítomné
	terpin-1-én-4-yl acetát	1297	1296	4821-04-9	0,15	neprítomné	neprítomné
	α -terpinyl acetát	1349	1349	80-26-2	1,59	neprítomné	neprítomné
Monoterpény	α -thujén	926	927	2867-05-2	0,43	neprítomné	neprítomné
	α -pinén	933	933	80-56-8	0,52	neprítomné	neprítomné
	sabinén	972	972	3387-41-5	6,41	0,61	neprítomné
	β -pinén	977	978	127-91-3	2,08	neprítomné	neprítomné
	myrcén	990	991	123-35-3	0,70	neprítomné	neprítomné
	α -terpinén	1017	1018	99-86-5	0,57	neprítomné	neprítomné
	<i>p</i> -cymén	1024	1025	99-87-6	0,67	neprítomné	neprítomné
	limonén	1029	1030	138-86-3	2,22	neprítomné	neprítomné
	<i>o</i> -cymén	1047	1042	527-84-4	0,10	1,41	neprítomné
γ -terpinén	1059	1058	99-85-4	1,48	neprítomné	neprítomné	



Obrázok 18: Porovnanie profilu látok s ich relatívnym zastúpením obsiahnutých v extraktoch lieskového orechu

3.7.1 Porovnanie profilu látok extraktu lieskového orechu s dostupnou literatúrou

Mustafa Kiralan a S. Sezer Kiralan [114] využili na analýzu prchavých látok už vyrobený olej. SPME vlákno (karboxén/polydimetylsiloxán) bolo sorbované po dobu 45 minút pri 35 °C a potom priamym nadávkovaním do plynového chromatografu pri 250 °C boli zložky desorbované. K separácii dochádzalo na kapilárnej kolóne DB-624. Najviac zastúpenou bola skupina aldehydov, najmä heptanál 21,90 %, nonanál 28,23 % a hexanál 21,77 %. V našej štúdií po dynamickej extrakcii sa nepodarilo identifikovať skupinu aldehydov. V prípade statickej extrakcie s použitím modifikátoru bol identifikovaný iba jeden aldehyd - nonanál s relatívnym zastúpením 1,69 %. Tak isto to bolo aj v prípade statickej extrakcie, kedy bol identifikovaný 2,4-dodekadienál s relatívnym zastúpením 0,22 % [114].

Materiál na výskum prevádzaný **Agnieszka Barbara Najda a Magdalena Joanna Gantner [115]**, sa skladal z púčikov a listov lieskovca. Zber pukov sa konal v apríli, kedy rastlina nemá ešte listy. Tie boli zozbierané neskôr v júni. Vzorky sa najskôr sušili pri 35 °C tesne po zbere. Esenciálne oleje boli vyextrahované pomocou **parnej destilácie** a analyzované prostredníctvom GC-MS, na kolóne VF-5MS. V pukoch lieskovca bola potvrdená prítomnosť 43 zlúčenín, z čoho sa podarilo identifikovať 35. 13 zložiek malo relatívne zastúpenie väčšie ako 1 % - nerol (20,6 %), myrtenol (19,5 %). Zvyšných 22 látok sa podieľalo na celkovom obsahu v rozsahu 0,01 - 1 %. Listy po GC-MS analýze obsahovali 42 zlúčenín, z ktorých sa podarilo 37 identifikovať. 26 látok malo relatívne zastúpenie viac ako 1 % - nerol (13,0 %), myrtenol (9,4 %), α -kampholenol (9,0 %) a mentol (6,7 %). Profil látok obsiahnutý v esenciálnom oleji sa výrazne nelíši v prítomnosti monoterpenov (puky 25,5 %, listy 21,3 %). Výrazný rozdiel je viditeľný v zastúpení seskviterpenov (puky 1,5 %, listy 6,8 %), aldehydov a ketónov (puky 19,8 %, listy 11,5 %), tiež aj monoterpenov (puky 34,4 %, listy 42,8 %) [115]. Skupiny látok prítomných v pukoch a listov sa výrazne líšia od našej štúdie, v ktorej bol použitý lieskový orech. Vo výsledkoch experimentu [115] má najvyššie relatívne zastúpenie nerol (20,6 %) a myrtenol (19,5 %), ktorý v našom prípade nebol analyzovaný vôbec.

Orechy na štúdiu vykonanú **Cesarettin Alasalvar, Refeidoon Shahidi a Keith R. Cadwalder [116]** pochádzali zo závodu na spracovanie a vývoz lieskovcov v Turecku. Prírodný orech sa sušil iba na slnku, zatiaľ čo ďalší podiel orechov sa pražil pri 165 °C. Na záchyt prchavých látok bola aplikovaná **dynamická head-space extrakcia**. GC-MS analýza prebiehala na kremíkovej kolóne CP-Wax 52 CB. Celkovo bolo prítomných 79 prchavých zložiek v oboch typoch orechu. Podobne ako v surovom orechu, tak aj v praženom orechu významnú časť tvorili

ketóny. Veľký rozdiel spočíva v prítomnosti pyrazínov, terpénov, pyrolov a kyselín, ktoré boli stanovené iba v pražených lieskovcoch [116]. Aj napriek tomu, že v našej štúdií nebol použitý pražený lieskovec sa podarilo identifikovať veľké množstvo terpénov, terpenoidov, fenypropanoidov ako aj v prípade experimentu [115]. Z výsledkov je viditeľný rozdiel medzi štúdiou a našou prácou v profile látok ale aj relatívnom zastúpení. Po statickej extrakcii boli významné zastúpenými terpinén-4-ol (5,36 %), myristicín (52,56 %), sabinén (6,41 %) a metoxy eugenol (3,44 %). Výrazne nižšie je ale zastúpenie látok po prevedení statickej extrakcie s modifikátorom pre myristicín (11,46 %) a *o*-cymén (1,41 %). Po dynamickej extrakcii bol identifikovaný iba myristicín s relatívnym zastúpením < 2 %. Z dostupných informácií vyplýva, že značný vplyv na obsah látok v extraktoch má práve voľba extrakčnej techniky.

Fatemeh Amini-Noori a Parisa Ziarati [117] sa vo svojom výskume zamerali na stanovenie mastných kyselín v lieskovom orechu. Vzorka bola extrahovaná v **Soxhletovom extraktore** a potom prevedená na metylestery mastných kyselín, ktoré boli analyzované na GC-FID, s kapilárnou kolónou z oxidu kremičitého. Pri skúmaní dvoch odrôd lieskového orechu (*Rudsar*, *Tarem*) dospeli k tomu, že veľkú časť celkového obsahu mastných kyselín tvorí kyselina olejová (*Rudsar* 37,225 % a *Tarem* 36,56 %), ktorá v našej štúdií nebola identifikovaná vôbec. Vo všeobecnosti možno povedať že v našej štúdií bola výrazne zastúpená iba kyselina tetradekánová (myristová), vid' tabuľka 19 a po statickej extrakcii s modifikátorom kyselina dodekánová (laurová) so zastúpením 18,67 % [117]. Stručný prehľad dostupnej literatúry je uvedený v tabuľke 21.

Tabuľka 21: Prehľad rôznych extrakčných techník s výsledkami GC-MS a GC-FID analýzy v dostupnej literatúre pre lieskový orech

Pôvod vzorky	Spracovaná časť vzorky	Typ extrakcie	Analýza	Hlavné analyzované zložky [%]	Dostupná literatúra
Turecko	olej z lieskového orechu	SPME	GC-MS	2-heptanál (21,90 %), nonanál (28,23 %), hexanál (21,75 %), 2-dekanál (6,91 %), heptanál (5,38 %), <i>E,E</i> dekadienál (9,41 %)	[114]
Poľsko	puk lieskového orechu	SD	GC-MS	nerol (20,6 %), myrtenol (19,5 %), <i>p</i> -cymén (3,7 %), α -kampholenol (4,7 %), geraniol (2,4 %)	[115]
Poľsko	list zo stromu lieskového orechu	SD	GC-MS	nerol (13 %), myrtenol (9,4 %), β -linalol (1,5 %), limonén (3,9 %), α -kampholenol (9,0 %), mentol (6,7 %)	[115]
Turecko	čerstvý lieskový orech	DHS	GC-MS	hexanál (2780 ng/g), 2-petanol (1509 ng/g), 2-pentanón (1603 ng/g)	[116]
Šalamúnové ostrovy (Austrália)	čerstvý lieskový orech	Soxhletova extrakcia	GC-FID	kyselina olejová (37,23 %), kyselina stearová (3,13 %), nasýtené mastné kyseliny (38,11 %)	[117]

4 Záver

Cieľom diplomovej práce bolo porovnanie účinnosti troch módov SFE na zloženie extraktov, získaných z rôznych rastlinných matric (orechov) a prevedenie GC-MS analýzy, ktorou boli identifikované jednotlivé skupiny látok.

Teoretická časť je venovaná možnostiam, ktorými získať esenciálne oleje a extrakty z rôznych rastlinných matric, so zameraním na SFE a jej spojením s rôznymi separačnými metódami. Ďalšia časť teoretickej časti sa zaoberá botanicou a kulinárskou definíciou orechov, ich charakteristikou a látkami, ktoré sú obsiahnuté v orechoch. Výsledky klinických štúdií naznačujú dôležitosť konzumácie orechov, najmä kvôli ich obsahu mastných kyselín. Zároveň viac ako polovicu tvoria nenasýtené mastné kyseliny. Taktiež sú obohatené o významné zložky, prispievajúce k správnej funkcii organizmu (vláknina, minerály, proteíny). Ďalšia kapitola sa sústreďuje na popis inštrumentálnych techník, používaných následne v praktickej časti diplomovej práce (GC-MS). Posledná kapitola je zameraná na zrovnanie jednotlivých extrakčných módov medzi sebou s dostupnou zahraničnou literatúrou.

Z práce vyplýva, že výťažnosť je závislá od zvolenej extrakčnej metódy a jej podmienok. Na účinnosť SFE vplyva množstvo faktorov - tlak, teplota, modifikátor, čas a prietok nadkritickéj tekutiny. Úpravou vyššie uvedených parametrov sa výrazne mení výťažnosť extrakcie ale záleží aj od charakteru vzorky [34, 57]. Najviac látok identifikovaných v kokosovom orechu bolo po prevedení dynamickej extrakcie. Najviac látok identifikovaných po statickej extrakcii bolo v muškátovom orechu, lieskovom orechu a para orechu. Najviac látok po statickej extrakcii s použitím modifikátoru bolo identifikovaných v betelovom orechu a pekanovom orechu. Okrem toho, že modifikátor ovplyvňuje polaritu nadkritickéj tekutiny, dokáže zvýšiť aj extrakčnú účinnosť.

Zo získaných výsledkov nie je možné s určitou presnosťou povedať, ktorý mód SFE je najlepší a najúčinnjší, pretože každý z nich poskytol iné výsledky. V závere ale možno skonštatovať, že pre zahájením samotnej extrakcie je nevyhnutné brať do úvahy, ktorú časť rastliny budeme extrahovať. Ako vyplýva z porovnania s vedeckou dostupnou literatúrou, zastúpenie prchavých látok či už z listu, jadra orechu, výhonku alebo vyrobeného orechového produktu je odlišné. Taktiež záleží od geografických a klimatických podmienok, spôsobu zberu a veku rastliny.

5 Zoznam použitej literatúry

- [1] ANASTAS, P. a N. EGHBALI. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* 2010, **39**(1), 301-312. DOI:10.1039/B918763B.
- [2] GAŁUSZKA, A., Z. MIGASZEWSKI a J. NAMIEŚNIK. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013, **50**, 78-84. DOI:10.1016/j.trac.2013.04.010.
- [3] DE MARCO, B. A., B. S. RECHELO, E. G. TÓTOLI, A. C. KOGAWA a H. R. N. SALGADO. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019, **27**(1), 1-8. DOI:10.1016/j.jsps.2018.07.011.
- [4] RAYNIE, D. E. Modern Extraction Techniques. *Analytical Chemistry*. 2006, **78**(12), 3997-4004. DOI:10.1021/ac060641y.
- [5] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [6] SIMPSON, N. J. K. *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*. New York: Marcel Dekker, 2000. ISBN 9780824700218.
- [7] HANSON, C. *Recent advances in liquid-liquid extraction*. [1st ed.]. New York: Pergamon Press, [1971]. ISBN 0080156827.
- [8] SANDOVAL RIOFRIO, M. A. (2017): Extraction of Phorbol Esters (PEs) from Pinion cake using computationally-designed polymers as adsorbents for Solid Phase Extraction. University of Leicester.
- [9] OUYANG, G. a J. PAWLISZYN. SPME in environmental analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006, **386**(4), 1059-1073. DOI:10.1007/s00216-006-0460-z.
- [10] PAWLISZYN, J., B. PAWLISZYN a M. PAWLISZYN. Solid Phase Microextraction (SPME). *The Chemical Educator*. 1997, **2**(4), 1-7. DOI:10.1007/s00897970137a.
- [11] PAWLISZYN, J. *Sampling and sample preparation for field and laboratory: fundamentals and new directions in sample preparation*. Boston: Elsevier Science, 2002. ISBN 0444505105.
- [12] GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á., B. SOCAS-RODRÍGUEZ, A. V. HERRERA-HERRERA, J. GONZÁLEZ-SÁLAMO, J. HERNÁNDEZ-BORGES a M. Á. RODRÍGUEZ-DELGADO. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **71**, 169-185. DOI:10.1016/j.trac.2015.04.012.
- [13] ASBAHANI, A. EI, K. MILADI, W. BADRI, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, **483**(1-2), 220-243. DOI:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069.
- [14] STRATAKOS, A. Ch. a A. KOIDIS. Methods for Extracting Essential Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier, 2016, 2016, s. 31-38. DOI:10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3.

- [15] HANDA, S. S., S. P. S. KHANUJA, G. LONGO a D. D. RAKESH. *Extraction technologies for medical and aromatic plants*. Trieste: ICS-UNIDO, 2008.
- [16] MEIRELES, M. A. A. *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*. Boca Raton: CRC Press, c2009. Contemporary food engineering (Unnumbered). ISBN 9781420062373.
- [17] BASER, K. H. C. a G. BUCHBAUER, ed. *Handbook of Essential Oils*. CRC Press, 2015. ISBN 9780429155666.
- [18] MC HUGH, M. a V. KRUKONIS. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and practice*. 2rd. Elsevier, 2013. ISBN 9780080518176.
- [19] BARTLE, K. D. *Supercritical fluid: Historical Development*. Academic Press, 2000, 798-801.
- [20] HERRERO, M., J. A. MENDIOLA, A. CIFUENTES a E. IBÁÑEZ. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(16), 2495-2511. DOI:10.1016/j.chroma.2009.12.019.
- [21] WEI, P. Ch., Ch. Y. MAY, M. A. NGAN a Ch. Ch. HOCK. Supercritical Fluid Extraction of Palm Carotenoids. *American Journal of Environmental Sciences*. 2005, **1**(4), 264-269. DOI:10.3844/ajessp.2005.264.269.
- [22] ČULÍK, J., T. HORÁK, P. ČEJKA, M. JURKOVÁ, V. KELLNER, P. KARÁSEK a E. VOSTRÁ. Supercritical Fluid Extraction - New progressive method in brewing analytics. Part I. - Theoretical principles of supercritical fluid extraction and examples of its use. *Kvasny Prumysl*. 2006, **52**(4), 106-110. DOI:10.18832/kp2006009.
- [23] TAYLOR, L. T. Strategies for analytical SFE. *Analytical Chemistry*. 1995, **67**(11), 364-370. DOI:10.1021/ac00107a002.
- [24] HEDRICK, J. L., L. J. MULCAHEY a L. T. TAYLOR. Supercritical fluid extraction. *Mikrochimica Acta*. 1992, **108**(3-6), 115-132. DOI:10.1007/BF01242421.
- [25] SUN, Y.-P. *Supercritical fluid technology in materials science and engineering: synthesis, properties, and applications*. New York: Marcel Dekker, 2002. ISBN 9780824706517.
- [26] KAŠPAROVÁ, P. *Využití extrakce nadkritickou tekutinou a GC-MS při analýze růží*. Pardubice, 2017 Diplomová práce. University of Pardubice. Vedúci práce Ing. A. Eisner, Ph.D.
- [27] TAYLOR, L. T. *Supercritical fluid extraction*. New York: Wiley, c1996. ISBN 0471119903.
- [28] *Superkritické kapaliny*. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/77987/prif_m/superkriticke_kapaliny.pdf
- [29] SAPKALE, G. N., S. M. PATIL, U. S. SURWASE a P. K. BHATBHAGE. Supercritical fluid extraction. *International Journal Of Chemical Sciences*. 2010, **8**(2), 729-743.
- [30] ZYCHOVÁ, M., M. RUŽIČKOVÁ, J. MACÁK a V. JANDA. *Vlastnosti a použití superkritické vody*. 2013, (107), 126-135.
- [31] FUKUSHIMA, Y. *Application of supercritical fluids*. R&D, Review of Toyota CRDL, **35**(1).

- [32] DOUGLAS, R. E. Warning concerning the use of Nitrous oxide in supercritical fluid extractions. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 1993, **65**(21), 3127-3128. DOI: 10.1021/ac00069a028.
- [33] CHESTER, T. L., J. D. PINKSTON a D. E. RAYNIE. Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. *Analytical Chemistry*. 1998, **70**(12), 301-320. DOI:10.1021/a1980017d.
- [34] DESFONTAINE, V., D. GUILLARME, E. FRANCOTTE a L. NOVÁKOVÁ. Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, **113**, 56-71. DOI:10.1016/j.jpba.2015.03.007.
- [35] FAGES, J., H. LOCHARD, J-J. LETOURNEAU, M. SAUCEAU a E. RODIER. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. *Powder Technology*. 2004, **141**(3), 219-226. DOI:10.1016/j.powtec.2004.02.007.
- [36] BØWADT, S. a S. B. HAWTHORNE. Supercritical fluid extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*. 1995, **703**(1-2), 549-571. DOI:10.1016/0021-9673(95)00051-N.
- [37] GUMBA, R. E., S. SAALLAH, M. MISSON, C. M. ONGKUDON a A. ANTON. Green biodiesel production: a review on feedstock, catalyst, monolithic reactor, and supercritical fluid technology. *Biofuel Research Journal*. 2016, **3**(3), 431-447. DOI:10.18331/BRJ2016.3.3.3.
- [38] PALMER, M.V. a S. S. T. TING. Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chemistry*. 1995, **52**(4), 345-352. DOI:10.1016/0308-8146(95)93280-5.
- [39] WENCLAWIAK, B., ed. *Analysis with Supercritical Fluids: Extraction and Chromatography*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992. DOI:10.1007/978-3-642-77474-4.
- [40] HAWTHORNE, S. B. Methodology for off-line supercritical fluid extraction. WESTWOOD, S. A., ed. *Supercritical Fluid Extraction and its Use in Chromatographic Sample Preparation*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993, 1993, s. 39-64. DOI:10.1007/978-94-011-2164-4_2.
- [41] LEVY, J. M., R. M. RAVEY, R. K. HOUCK a M. ASHRAF-KHORASSANI. Considerations in off-line collection after SFE. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1992, **344**(10-11), 517-520. DOI:10.1007/BF00323754.
- [42] HOWARD, A. L. a L. T. TAYLOR. Supercritical fluid extraction-high performance liquid chromatography: on-line and off-line strategies. WESTWOOD, S. A., ed. *Supercritical Fluid Extraction and its Use in Chromatographic Sample Preparation*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993, 1993, s. 145-168. ISBN 978-94-010-4958-0.
- [43] JINNO, K. *Hyphenated techniques in supercritical fluid chromatography and extraction*. New York: Elsevier, 1992. ISBN 0444887946.
- [44] ZOCCALI, M., P. DONATO a L. MONDELLO. Recent advances in the coupling of carbon dioxide-based extraction and separation techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019, **116**, 158-165. DOI:10.1016/j.trac.2019.04.028.

- [45] TAYLOR, L.T a S.L JORDAN. Supercritical fluid extraction coupled directly with Fourier transform infrared spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1995, **703**(1-2), 537-548. DOI:10.1016/0021-9673(95)00124-6.
- [46] POURMORTAZAVI, S. M. a S. S. HAJIMIRSADEGHI. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1163**(1-2), 2-24. DOI:10.1016/j.chroma.2007.06.021.
- [47] BERNARD, A., F. LHEUREUX a E. DIRLEWANGER. Walnut: past and future of genetic improvement. *Tree Genetics & Genomes*. 2018, **14**(1). DOI:10.1007/s11295-017-1214-0.
- [48] ROS, E. Health Benefits of Nut Consumption. *Nutrients*. 2010, **2**(7), 652-682. DOI:10.3390/nu2070652.
- [49] OTHNER, K. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology: Nuts*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2000. ISBN 0471238961.
- [50] SALEEMULLAH, A. IQBAL, I. A. KHALIL a H. SHAH. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. *Food Chemistry*. 2006, **98**(4), 699-703. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.06.034.
- [51] Nuts and Human Health Outcomes: A Systematic Review. *Nutrients*. 2017, **9**(12). DOI:10.3390/nu9121311.
- [52] ALASALVAR, C., J. SALAS-SALVADÓ, E. ROS a J. SABATE. *Health benefits of nuts and dried fruits*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 978-1-315-17333-7.
- [53] HARRIS, L. J., J. R. SHEBUSKI, M. D. DANYLUK, M. S. PALUMBO a L. R. BEUCHAT. Nuts, Seeds, and Cereals. DOYLE, M. P. a R. L. BUCHANAN, ed. *Food Microbiology*. Washington, DC, USA: ASM Press, 2012, 2014-04-30, s. 203-221. DOI:10.1128/9781555818463.ch9.
- [54] FERNANDES, G. D., R. B. GÓMEZ-COCA, M. del C. PÉREZ-CAMINO, W. MOREDA a D. BARRERA-ARELLANO. Chemical Characterization of Major and Minor Compounds of Nut Oils: Almond, Hazelnut, and Pecan Nut. *Journal of Chemistry*. 2017, **2017**, 1-11. DOI:10.1155/2017/2609549.
- [55] DEBMANDAL, M. a S. MANDAL. Coconut (*Cocos nucifera* L: Arecaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2011, **4**(3), 241-247. DOI:10.1016/S1995-7645(11)60078-3.
- [56] APPAIAH, P., L. SUNIL, P. K. PRASANTH KUMAR a A. G. GOPALA KRISHNA. Composition of Coconut Testa, Coconut Kernel and its Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2014, **91**(6), 917-924. DOI:10.1007/s11746-014-2447-9.
- [57] ALASALVAR, C., F. SHAHIDI, Ch. M. LIYANAPATHIRANA a T. OHSHIMA. Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1. Compositional Characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(13), 3790-3796. DOI:10.1021/jf0212385.
- [58] ARJUNGI, K. Areca nut. *Arzneimittel-forschung*. 1976, **26**(5), 951-956.
- [59] GUPTA, A. K., S. TULSYAN, N. THAKUR, V. SHARMA, D. N. SINHA a R. MEHROTRA. Chemistry, metabolism and pharmacology of carcinogenic alkaloids

- present in areca nut and factors affecting their concentration. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2020, **110**. DOI:10.1016/j.yrtph.2019.104548.
- [60] AMUDHAN, M. Senthil, V. Hazeena BEGUM a K.B. HEBBAR. A review on phytochemical and pharmacological potential of Areca catechu l. seed. *International Journal of Pharmaceutical sciences and research*. 2012, **3**(11), 4151-4157.
- [61] PERIASAMY, G., A. KARIM, M. GIBRELIBANOS, G. GEBREMEDHIN a A.-U.-H. GILANI. Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier, 2016, 2016, s. 607-616. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00069-9.
- [62] WHITELAW, Dr.W.A. *History of medicine days*. DOI: 10.11575/PRISM/10356
- [63] ŠNAJDROVÁ, Z. *Nutriční charakteristika skořápkového ovoce a jeho využití v gastronomii*. Zlín, 2012. University of Tomas Bata in Zlín. Vedúci práce Vojtíšková, P.
- [64] BOLLING, B. W., C.-Y. O. CHEN, D. L. MCKAY a J. B. BLUMBERG. Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutrition Research Reviews*. 2011, **24**(2), 244-275. DOI:10.1017/S095442241100014X.
- [65] ABE, L. T., F. M. LAJOLO a M. I. GENOVESE. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2010, **30**, 254-259. DOI:10.1590/S0101-20612010000500038.
- [66] DEREWIKA, D., R. WOLOSIAK a E. SZWED. Physicochemical properties and composition of lipid fraction of selected edible nuts. *Pakistan Journal of Botany*. 2014, **46**(1), 337-343.
- [67] *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000. ISBN 3527306730.
- [68] MC. NAIR, H. M., J. M. MILLER a N. H. SNOW. *Basic Gas Chromatography*. 3rd. United States of America: Wiley, 2019. ISBN 1119450756.
- [69] KARASEK, Francis W. *Basic gas chromatography-mass spectrometry: principles and techniques*. Amsterdam: Elsevier Science, 1988. ISBN 0-444-42760-0.
- [70] KUŠNÍR, J. *Identifikace příbuzných látek pomocí GC-MS*. Hradec Králové, 2010. Diplomová práce. University of Hradec Králové. Vedoucí práce Kučera, R.
- [71] OTHNMER, K. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2000. ISBN 0471238961.
- [72] HOLČAPEK, M. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze*. University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, 2017. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf
- [73] KITSON, F. G., B. S. LARSEN a Ch. N. MCEWEN. *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. San Diego: Academic Press, c1996. ISBN 0-12-483385-3.
- [74] HOLČAPEK, M. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze*. University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/09_Spojneni_MS_separace.pdf

- [75] HUSSAIN, S.Z. a K. MAQBOOL. *GC-MS: Principle, Technique and its Application in Food science*. 2014.
- [76] ASHCROFT, Alison E. *Ionization methods in organic mass spectrometry*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1997. ISBN 0-85404-570-8.
- [77] HOLČAPEK, M. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze*. University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/02-03_Ionizacni_techniky.pdf
- [78] HARRISON, Alex. G. *Chemical ionization mass spectrometry*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c1992. ISBN 9780849342547.
- [79] HOLČAPEK, M. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze*. University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/04_MS_analyzatory_cast1.pdf
- [80] CAMPANA, J.E. Elementary theory of the quadrupole mass filter. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*. 1980, **33**(2), 101-117. DOI:10.1016/0020-7381(80)80042-8.
- [81] VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001, **921**(2), 227-236. DOI:10.1016/S0021-9673(01)00825-1.
- [82] *Encyclopedia of Chromatography*. 3rd. Taylor & Francis, 2010. DOI:10.1081/E-ECHR3-120040030.
- [83] HOLEKSA, M. *Využití plynové chromatografie v kontrole léčiv I. (GC stanovení zbytkových množství ethylenoxidu a dioxanu)*. Hradec Králové, 2007. Diplomová práce. Charles Univerzity of Praha. Vedoucí práce PharmDr. R. Kučera, PhD.
- [84] ŘEBÍČKOVÁ, K. *Využití hydrodestilace a parní destilace při extrakci těkavých látek z rostlinného materiálu*. Pardubice, 2018. Diplomová práce. University of Pardubice. Vedoucí práce Doc. Ing. P. Bajerová, Ph.D.
- [85] AL-JABARI, . *Kinetic models of supercritical fluid extraction*. 2002, **25**, 477-489. DOI: 10.1002/1615-9314(20020601)25:8<477::AID-JSSC477>3.0.CO;2-C.
- [86] PRADES, A., M. DORNIER, N. DIOP a J.-P. PAIN. Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*. 2012, **67**(2), 87-107. DOI:10.1051/fruits/2012002.
- [87] SHEN, X., W. CHEN, Y. ZHENG, X. LEI, M. TANG, H. WANG a F. SONG. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrosols from different parts of *Areca catechu* L. and *Cocos nucifera* L. *Industrial Crops and Products*. 2017, **96**, 110-119. DOI:10.1016/j.indcrop.2016.11.053.
- [88] DHANYA, G., P. VIVEK a GR. ASHISH. Phytochemical analysis of coconut shell (*Cocos nucifera* Linn.) using gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018, **7**(6), 384-386.
- [89] SANTOS, J. E. R. a B. J. VILLARINO. Analysis of Volatile Organic Compounds in Virgin Coconut Oil and their Sensory Attributes. *Philippine Journal of Science*. 2011, **140**(2), 161-171.
- [90] AIP Conference Proceedings 2021, 070020 (2018);. DOI:10.1063/1.5062818.

- [91] TONGNUANCHAN, P. a S. BENJAKUL. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*. 2014, **79**(7), 1231-1249. DOI:10.1111/1750-3841.12492.
- [92] AYTAÇ, E. Comparison of extraction methods of virgin coconut oil: cold press, soxhlet and supercritical fluid extraction. *Separation Science and Technology*. 1-7. DOI:10.1080/01496395.2021.1902353.
- [93] MACHMUDAH, S., A. SULASWATTY, M. SASAKI, M. GOTO a T. HIROSE. Supercritical CO₂ extraction of nutmeg oil: Experiments and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2006, **39**(1), 30-39. DOI:10.1016/j.supflu.2006.01.007.
- [94] MUCHTARIDI, A. SUBARNAS, A. APRIYANTONO a R. MUSTARICHIE. Identification of Compounds in the Essential Oil of Nutmeg Seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) That Inhibit Locomotor Activity in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010, **11**(11), 4771-4781. DOI:10.3390/ijms11114771.
- [95] CHOO, L.-CH., S.-M. WONG a K.-Y. LIEW. *Essential oil of nutmeg pericarp*. John Wiley & Sons, 1999, **79**(13), 1954. DOI:10.1002/(SICI)1097-0010(199910)79:13<1954::AID-JSFA460>3.0.CO;2-I.
- [96] SPRICIGO, C. B., L. T. PINTO, A. BOLZAN a A. FERREIRA NOVAIS. Extraction of essential oil and lipids from nutmeg by liquid carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 1999, **15**(3), 253-259. DOI:10.1016/S0896-8446(99)00012-1.
- [97] SUDRADJAT, S. E., K. H. TIMOTIUS, A. MUN'IM a E. ANWAR. The isolation of myristicin from nutmeg oil by sequences distillation. *Journal of Young Pharmacists*. 2018, **10**(1), 20-23. DOI: 10.5530/jyp.2018.10.6.
- [98] Phytochemical studies and GC/MS analysis on the isolated essential oil from the leaves of Piper betle L.var.sirugamani1(SGM1). *Journal of Pharmacy Research*. 2011, **4**(7), 2411-2413.
- [99] XUE-YU, Y., Z. PENG, L. XIA, L. LEI a Z. ZHAO-IIANG. Dostupné z: https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTTotal-SDJC201203004.htm. School of Resources and Environment.
- [100] CANG, M. H., P. T. B. NHI a N. T. C. LINH. Betel (*Piper betle* L.) leaf essential oil extraction using steam distillation. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*. 2020, **7**(6), 166-169. DOI:10.22161/ijaers.76.20.
- [101] KEMPRAI, P., P. K. BORA, B. P. MAHANTA, D. SUT, S. P. SAIKIA, D. BANIK a S. HALDAR. Piper betleoides C. DC: Edible source of betel-scented sesquiterpene-rich essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 2019, **35**(1), 70-78. DOI:10.1002/ffj.3537.
- [102] LI-JIE, ., L. WEN-JIE, Q. XUE-JIE a S. AI-DONG. *Add to Favorite Get Latest Update GC-MS analysis of essential oil of betel extracted by supercritical CO₂ extraction*. Dostupné z: https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTTotal-SPKJ201201036.htm
- [103] REIS RIBEIRO, S., B. KLEIN, Quellen M. R., et al. Chemical composition and oxidative stability of eleven pecan cultivars produced in southern Brazil. *Food Research International*. 2020, **136**. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109596.
- [104] AMARAL, J. S., S. CASAL, I. CITOVA', A. SANTOS, R. M. SEABRA a B. P. P. OLIVEIRA. Characterization of several hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars based in

- chemical, fatty acid and sterol composition. *European Food Research and Technology*. 2006, **222**(3-4), 274-280. DOI:10.1007/s00217-005-0068-0.
- [105] BOUALI, I., A. KHADHRI, S. DALLALI, A. ALBOUCHI, H. SEBEI, S. BOUKHCHINA a E. MASSON. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Three Varieties of *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch Grown in Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2018, **20**(6), 1472-1481 DOI:10.1080/0972060X.2017.1409655.
- [106] CADWALLADER, K. R., H. KIM, S. PUANGPRAPHANT a Y. LORYAROENPHON. Changes in the aroma components of pecans during roasting. *Department of Food Science and Human Nutrition*. 301-304.
- [107] CORELLA-MADUEÑO, M. A., M. K HARRIS, A. A FU-CASTILLO, M. A. MARTÍNEZ-TÉLLEZ, E. M. VALENZUELA-SOTO, J. C GÁLVEZ-RUIZ a I. VARGAS-ARISPURO. Volatiles emitted by *Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch as a prelude for semiochemical investigations to focus on *Acrobasis nuxvorella* Nuenzig (Lepidoptera: Pyralidae). *Pest Management Science*. 2011, **67**(12), 1522-1527 DOI:10.1002/ps.2205.
- [108] SANTOS, O. V., N. C. F. CORRÊA, F. A. S. M. SOARES, L. A. GIOIELLI, C. E. F. COSTA a S. C. S. LANNES. Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. *Food Research International*. 2012, **47**(2), 253-258. DOI:10.1016/j.foodres.2011.06.038.
- [109] SARTORI, A. G. de O., G. R. SAMPAIO, D. H. M. BASTOS, M. A. B. REGITANO D'ARCE a L. H. SKIBSTED. Volatiles and Tendency of Radical Formation of Cold-Pressed Brazil Nut Oil During Ambient Storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2018, **95**(6), 721-730. DOI:10.1002/aocs.12073.
- [110] CLARK, R. G. a H. E. NURSTEN. *Volatile flavour components of brazil nuts Bertholletia excelsa*. 1976, **27**(8), 713-720.
- [111] PENA MUNIZ, M. A., M. N. F. DOS SANTOS, C. E. F. DA COSTA, L. MORAIS, M. L. N. LAMARÃO, R. M. RIBEIRO-COSTA a J. O. C. SILVA. Physicochemical characterization, fatty acid composition, and thermal analysis of *Bertholletia excelsa* HBK oil. *Pharmacognosy Magazine*. 2015, **11**(41). DOI:10.4103/0973-1296.149730.
- [112] CICERO, N., A. ALBERGAMO, A. SALVO, et al. Chemical characterization of a variety of cold-pressed gourmet oils available on the Brazilian market. *Food Research International*. 2018, **109**, 517-525. DOI:10.1016/j.foodres.2018.04.064.
- [113] BARATA, P., Í. SARQUIS, H. CARVALHO, et al. Chemoenzymatic Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Fatty Acid Amides Prepared from *Bertholletia excelsa* (Brazil Nut) Triglycerides. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2020. DOI:10.21577/0103-5053.20200041.
- [114] KIRALAN, M. a S. Sezer KIRALAN. Changes in Volatile Compounds of Black Cumin Oil and Hazelnut Oil by Microwave Heating Process. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2015, **92**(10), 1445-1450. DOI:10.1007/s11746-015-2711-7.
- [115] NAJDA, A. B. a M. J. GANTNER. Chemical composition of essential oils from the buds and leaves of cultivated hazelnut. *Hortorum Cultus*. December 2012, **11**(5), 92-100.

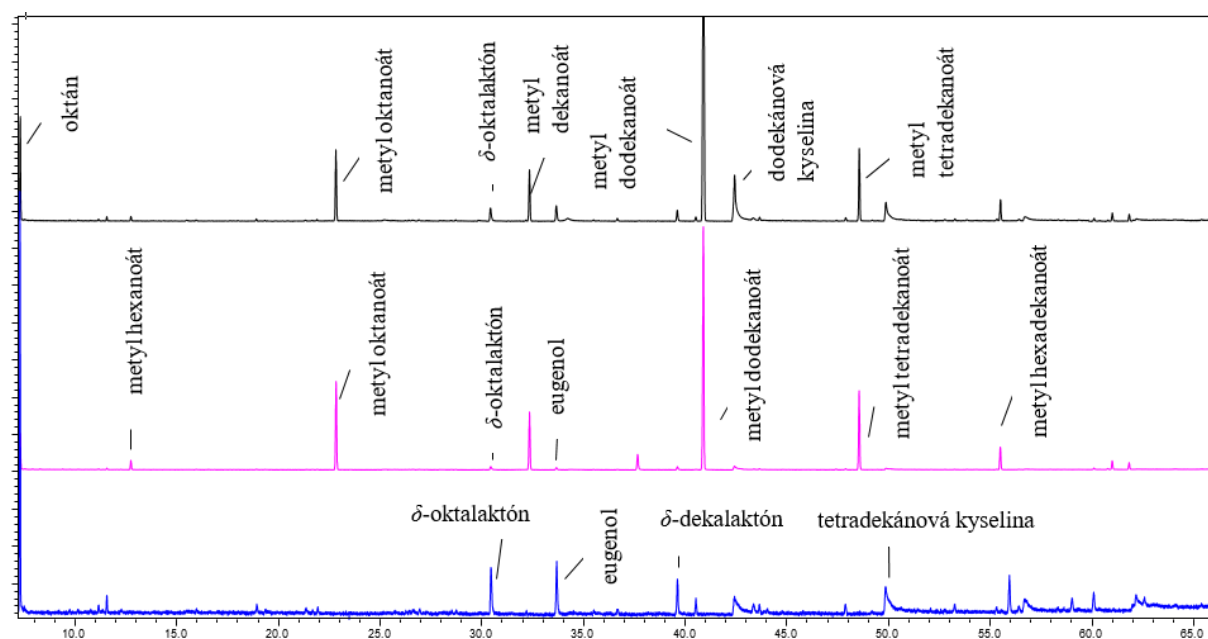
- [116] ALASALVAR, C., F. SHAHIDI a Keith R. CADWALLADER. Comparison of Natural and Roasted Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Volatiles and Flavor by DHA/GC/MS and Descriptive Sensory Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(17), 5067-5072. DOI:10.1021/jf0300846.
- [117] AMINI-NOORI, F. a P. ZIARATI. Chemical Composition of Native Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Varieties in Iran, Association with Ecological Conditions. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*. 2015, **12**(3), 2053-2060. DOI:10.13005/bbra/187.

6 Prílohy

Príloha 1: Homologická rada *n*-alkánov

Názov	Počet uhlíkov	Retenčný index	Retenčný čas [min]	CAS
<i>n</i> -oktán	8	800	7,23	111-65-9
<i>n</i> -nonán	9	900	11,55	111-84-2
<i>n</i> -dekán	10	1000	16,59	124-18-5
<i>n</i> -undekán	11	1100	21,71	1120-21-4
<i>n</i> -dodekán	12	1200	26,67	112-40-3
<i>n</i> -tridekán	13	1300	31,37	629-50-5
<i>n</i> -tetradekán	14	1400	35,81	629-59-4
<i>n</i> -pentadekán	15	1500	40,01	629-62-9
<i>n</i> -hexadekán	16	1600	43,98	544-76-3
<i>n</i> -heptadekán	17	1700	47,74	629-78-7
<i>n</i> -oktadekán	18	1800	51,32	593-45-3
<i>n</i> -nonadekán	19	1900	54,73	629-92-5
<i>n</i> -ikozán	20	2000	57,98	112-95-8
<i>n</i> -henkozán	21	2100	61,08	629-94-7
<i>n</i> -dokozán	22	2200	64,06	629-97-0

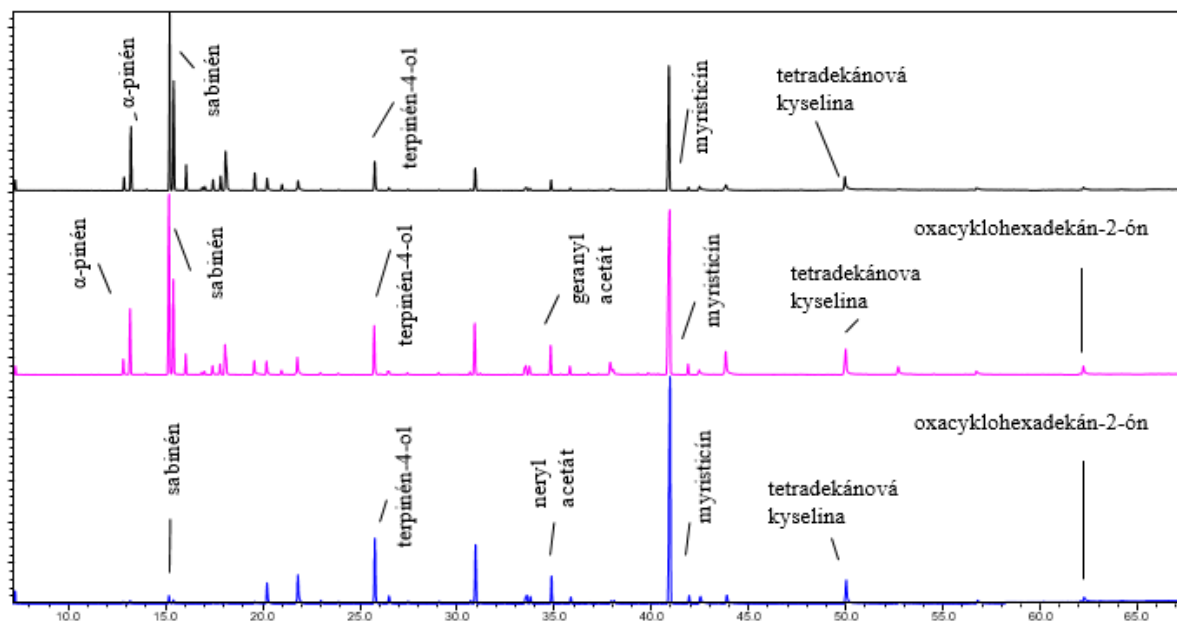
Príloha 2: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky kokosového orechu



Legenda k chromatogramu:

- Statická extrakcia, ■ Statická extrakcia s modifikátorom ■ Dynamická extrakcia

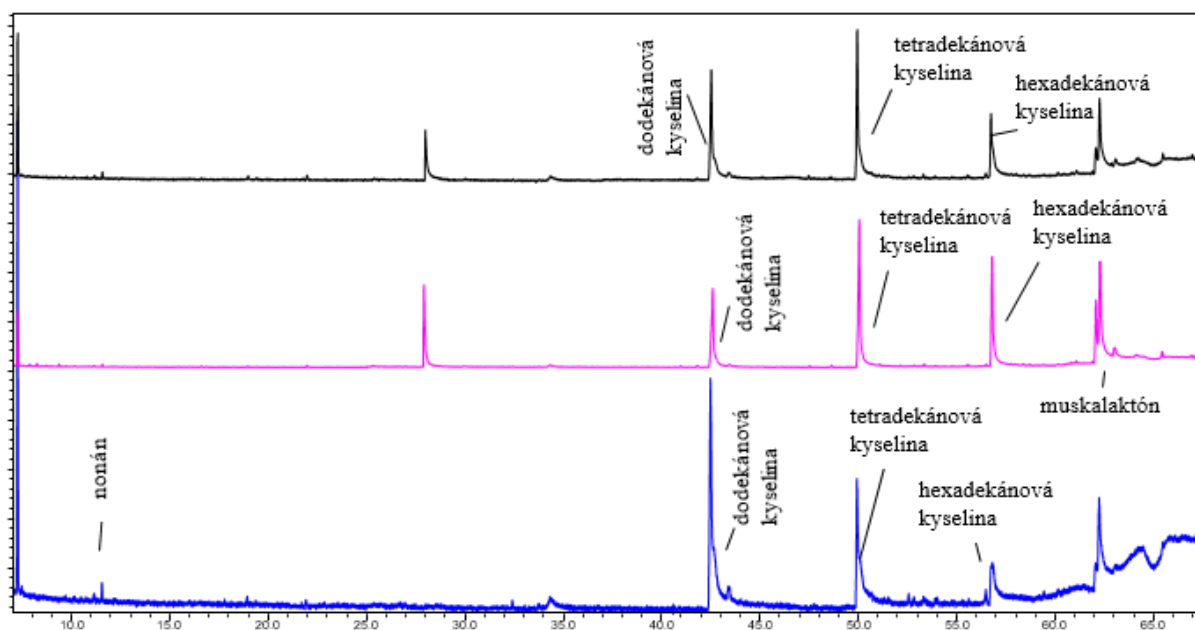
Príloha 3: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky muškátového orechu



Legenda k chromatogramu:

- Statická extrakcia, ■ Statická extrakcia s modifikátorom ■ Dynamická extrakcia

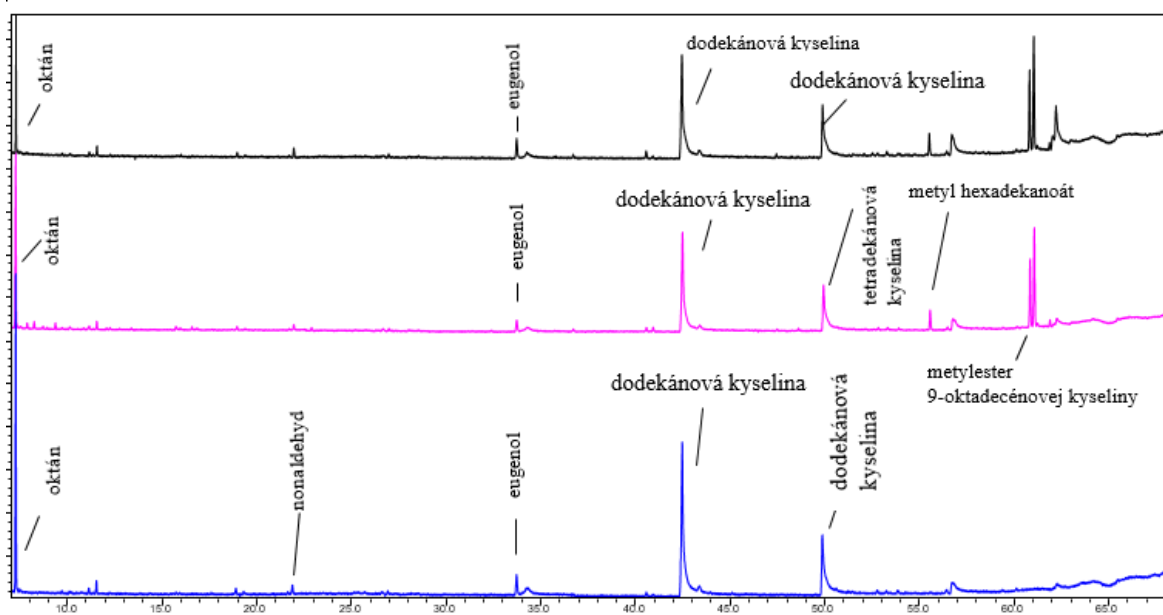
Príloha 4: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky betelového orechu



Legenda k chromatogramu:

- Statická extrakcia, ■ Statická extrakcia s modifikátorom ■ Dynamická extrakcia

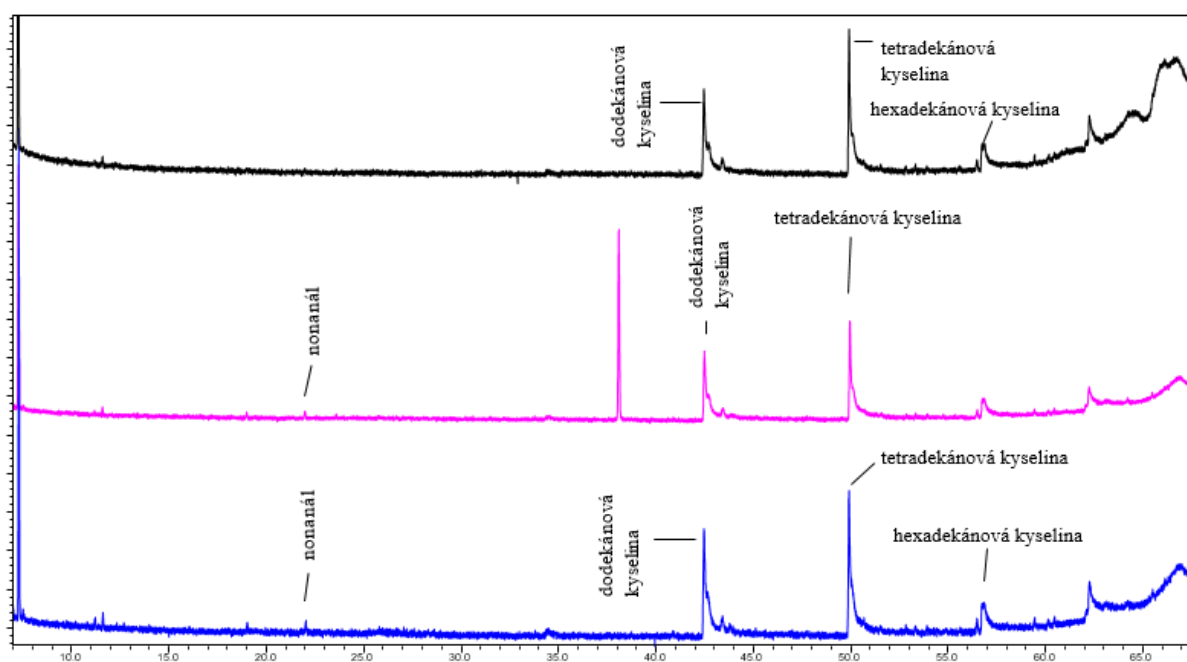
Príloha 5: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky pekanového orechu



Legenda k chromatogramu:

- Statická extrakcia, ■ Statická extrakcia s modifikátorom ■ Dynamická extrakcia

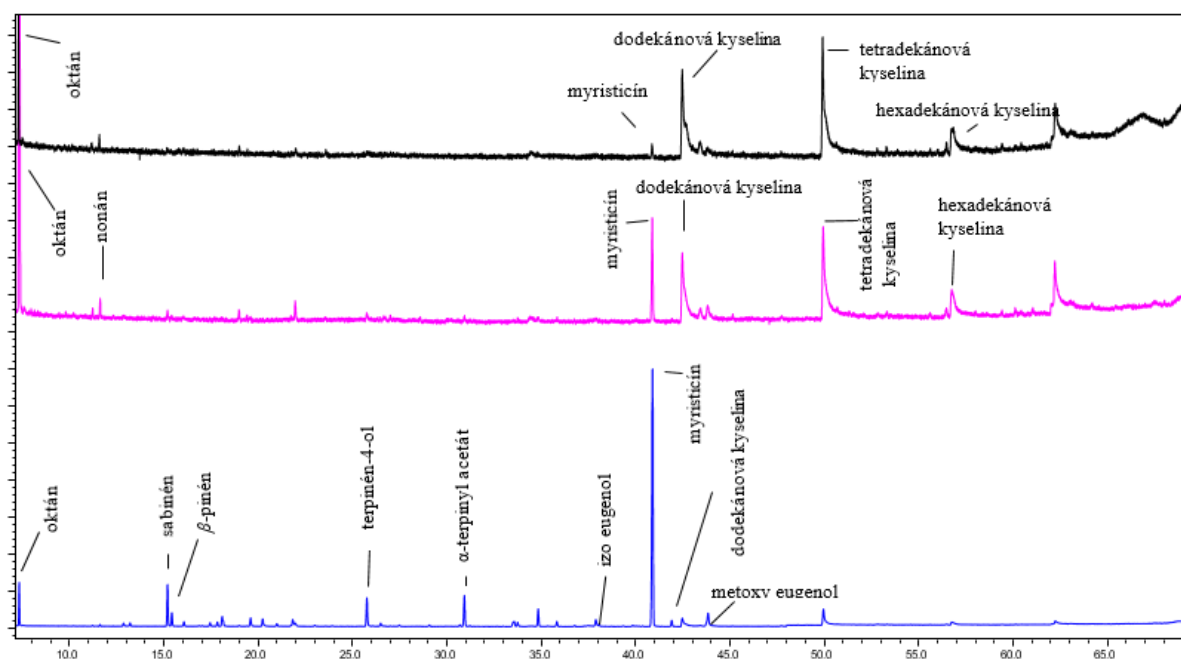
Príloha 6: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky para orechu



Legenda k chromatogramu:

- Statická extrakcia, ■ Statická extrakcia s modifikátorom ■ Dynamická extrakcia

Príloha 7: Ukážkové chromatogramy z GC-MS analýzy vzorky lieskového orechu

**Legenda k chromatogramu:**

- Statická extrakcia, ■ Statická extrakcia s modifikátorom ■ Dynamická extrakcia