

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Extrakce a analýza přírodních látek s využitím chromatografických technik

Disertační práce

2021

Ing. Kristýna Moučková

Prohlašuji:

Práci s názvem „Extrakce a analýza přírodních látek s využitím chromatografických technik“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 13. září 2021

Ing. Kristýna Moučková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala mé školitelce doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. a konzultantovi Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky, laskavý přístup, motivaci a v neposlední řadě za čas, který mi věnovali během celého mého studia, na které budu díky nim velice ráda vzpomínat. Také bych chtěla poděkovat vedoucímu katedry prof. Ing. Karlu Venturovi, Ph.D. za ochotu pomoci, milý přístup a přátelskou atmosféru, kterou na katedře udržuje. V neposlední řadě chci poděkovat Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za vstřícnost a vždy příjemnou spolupráci na Katedře Biologických a biochemických věd, Univerzity Pardubice.

Velký díky také patří mým kolegům Míši a Jakubovi za přátelství a pomoc při řešení nejednoho problému během celého výzkumu. Jsem vděčná za zkušenosti získané z Erasmus stáže u prof. Veronici Pino na Univerzitě La Laguna, kde vznikla jedna z publikací komentovaná v této disertační práci. Na tomto místě bych chtěla jí i celému jejímu výzkumnému týmu poděkovat za jejich pomoc, sdílení zkušeností, přátelství a pocit domova, který mi poskytly během této stáže.

Poděkování patří také celé mé rodině, hlavně mojí mamince za neutuchající podporu a víru ve mě. Dále bych chtěla poděkovat za povzbuzování a útěchu mým kamarádkám Ivet a Ivě, které mi dodávaly sebevědomí a sílu pokračovat ve dny, kdy psaní práce a studium nebylo lehké. A nakonec to největší díky patří mému manželovi Patrikovi za jeho podporu, oddanost, a zejména trpělivost po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Předmětem disertační práce je extrakce bioaktivních látek, zaměřující se především na izolaci esenciálních olejů a flavonoidů, z rostlinného materiálu. Teoretická část popisuje vlastnosti a využití rostlinných extraktů a vybrané rostlinné matrice. Nejrozsáhlejší část teorie disertační práce se věnuje moderním extrakčním technikám se zaměřením na zelenou extrakci. Dále jsou v práci popsány metody analýzy extraktů pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) a s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID) a pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí. V závěru teoretické části jsou stručně popsány metody stanovení antimikrobiální aktivity rostlinných extraktů v kapalně a plynné fázi. Veškerá popisovaná metodika je zobrazena v obrázkových a schematických formách.

Experimentální část je rozdělena do třech hlavních kapitol, popisující 3 témata výzkumu, která byla publikována ve 4 zahraničních impaktovaných časopisech. První kapitola je věnována chemickému složení a antimikrobiální aktivitě hydrolátů získaných z vybraných bylin, které se pěstují v České republice (levandule lékařská, hřebíčkovec kořený, fenykl obecný, vavřík ušlechtilý). V druhé kapitole je diskutováno chemické složení a antimikrobiální aktivita esenciálních olejů v kapalně, a navíc v parní fázi, získaných z vybraných asijských bylin (touleň srdčitá, rdesno vonné, kerblík třebule a bahnatka vonná). Poslední, třetí kapitola, je věnována využití „zelené“ mikrovlnné extrakce iontovou kapalinou pro stanovení profilu flavonoidů z listů ovocných stromů z Kanárských ostrovů (mango a mučenka).

KLÍČOVÁ SLOVA

Zelená extrakce, bioaktivní sloučeniny, esenciální oleje, destilace, iontové kapaliny, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, antimikrobiální aktivita.

TITLE

Extraction and analysis of plant-based products using chromatographic techniques

ANNOTATION

The subject of the doctoral thesis is the extraction of bioactive compounds from plant material, focusing mainly on extraction of essential oils and flavonoids. The theoretical part of thesis is focused on the properties and usage of plant extracts and a description of selected plant matrices. The most extensive part of the theory describes modern extraction techniques with a focus on green extraction. Furthermore, methods of analysis of extracts, namely gas chromatography with mass spectrometer detector (GC-MS) and with flame ionization detector (GC-FID) and high-performance liquid chromatography with UV detector are described. Finally, the theoretical part briefly describes methods for determining the antimicrobial activity of plant extracts in the liquid and vapor phase. All described methodology is shown in pictures and schemes forms.

The experimental part is divided into three main chapters, describing 3 research topics, published in 4 foreign impact journals. The first chapter deals with the chemical composition and antimicrobial activity of hydrolates obtained from selected plants that grow in the Czech Republic (*Lavandula angustifolia*, *Syzygium aromaticum*, *Foeniculum vulgare* and *Laurus nobilis*). The second chapter discusses the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils in the liquid, as well as the vapor phase, obtained from selected Asian herbs (*Houttuynia cordata*, *Persicaria odorata*, *Anthriscus cerefolium* and *Limnophilla aromatica*). The last, third chapter, considers use of green ionic liquid microwave extraction for flavonoid profile determination of leaves originated from Canary fruit trees (*Mangifera sp.* and *Passiflora sp.*).

KEYWORDS

Green extraction, bioactive compounds, essential oils, distillation, ionic liquids, gas chromatography, liquid chromatography, antimicrobial activity.

CÍLE PRÁCE

Pro disertační práci byly stanoveny následující cíle:

- 1) Shrnutí tradičních a moderních „zelených extrakčních“ metod pro extrakci přírodních látek
 - ✓ Shrnutí s ohledem na aktuální vědeckou situaci daného tématu
- 2) Shrnutí obecných principů separace a identifikace nepolárních látek obsažených v esenciálních olejích pomocí GC-MS a GC-FID
 - ✓ Interpretace MS spekter vybraných přírodních látek obsažených v esenciálních olejích
- 3) Chemické složení a antimikrobiální aktivita extraktů získaných tradiční hydrodestilací/destilací vodní parou
 - ✓ Izolace a analýza hydrolátů z bylin pěstovaných v České republice a stanovení jejich antimikrobiálních vlastností
 - ✓ Izolace a analýza esenciálních olejů z asijských bylin a stanovení jejich antimikrobiálních vlastností v parní a kapalně fázi esenciálního oleje
- 4) Využití „zelené extrakce“ iontovou kapalinou pro stanovení profilu flavonoidů z listů exotických ovocných stromů
 - ✓ Syntéza iontových kapalin
 - ✓ Optimalizace extrakce iontovou kapalinou pomocí statistického modelu
 - ✓ Porovnání extrakce iontovou kapalinou s konvenční extrakční metodou
 - ✓ Vliv struktury použité iontové kapaliny na složení extraktu
 - ✓ Stanovení vybraných flavonoidů v několika kultivarech listů dvou exotických ovocných stromů

OBSAH

Seznam obrázků	12
Seznam grafů	15
Seznam tabulek	16
Seznam zkratk	18
Úvod.....	21
1 Využití rostlinných extraktů v přírodní medicíně.....	23
1.1 Fytochemické složení rostlinných extraktů	23
1.1.1 Esenciální oleje	24
1.1.2 Flavonoidy	25
2 Charakteristika vybraných rostlinných matric použitých v experimentální části.....	26
2.1 Levandule lékařská (<i>Lavandula angustifolia</i>)	26
2.2 Hřebíčkovce kořený (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	26
2.3 Fenykl obecný (<i>Foeniculum vulgare</i>).....	27
2.4 Vavřín ušlechtilý (<i>Laurus nobilis</i>).....	27
2.5 Touleň srdčitá (<i>Houttuynia cordata</i>)	28
2.6 Rdesno vonné (<i>Persicaria odorata</i>)	28
2.7 Kerblík třebule (<i>Anthriscus cerefolium</i>)	28
2.8 Bahnatka vonná (<i>Limnophilla aromatica</i>).....	28
2.9 Třezalka kanárská (<i>Hypericum canariense</i>)	29
2.10 Mangovník (<i>Mangifera species</i>).....	29
2.11 Mučenka (<i>Passiflora species</i>).....	29
3 Metody extrakce bioaktivních sloučenin z rostlinných materiálů	30
3.1 Lisování za studena.....	31
3.2 Macerace, infúze, digesce	31
3.3 Destilace esenciálních olejů.....	32
3.3.1 Hydrodestilace	32

3.3.2	Parní destilace	33
3.3.3	Modifikované destilace	33
3.4	Soxhletova extrakce	34
3.5	Zelené extrakce	34
3.5.1	Extrakce bez použití rozpouštědel	35
3.5.2	Extrakce vodou v podkritickém stavu	36
3.5.3	Extrakce nadkritickým CO ₂	36
3.5.4	Extrakce iontovou kapalinou	39
3.5.5	Extrakce s použitím eutektických rozpouštědel.....	43
3.6	Mikroextrakce	44
3.6.1	Mikroextrakce tuhou fází a její modifikace	44
3.6.2	Mikroextrakce kapalnou fází a její modifikace	48
4	Metody analýzy těkavých látek v rostlinných extraktech.....	55
4.1	Plynová chromatografie	55
4.1.1	Využití hmotnostní spektrometrie v identifikaci složek esenciálních olejů	56
5	Metody analýzy netěkavých sloučenin v rostlinných extraktech se zaměřením na flavonoidy	72
5.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	72
6	Metody analýzy antimikrobiálních vlastností rostlinných extraktů.....	74
6.3	Metody kvalitativní.....	74
6.3.2	Disková difúzní metoda	74
6.3.3	Agarová jamková difúzní metoda.....	76
6.3.4	Disková volatilizační metoda.....	76
6.4	Metody kvantitativní.....	78
6.4.5	Bujonová diluční metoda	78
6.4.6	Agarová diluční metoda.....	80
6.4.7	Bujonová mikrodiluční volatilizační metoda.....	80

7	Chemické složení a antimikrobiální aktivita hydrolátů získaných z <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> a <i>Laurus nobilis</i>	83
7.1	Materiál a metody	83
7.1.1	Rostlinný materiál.....	83
7.1.2	Hydrodestilace	84
7.1.3	Destilace vodní parou	85
7.1.4	Extrakce tuhou fází	86
7.1.5	Testování antimikrobiální účinnosti	86
7.1.6	GC-MS.....	87
7.1.7	GC-FID	87
7.2	Výsledky a Diskuse	88
7.2.1	Hydrolát z květů levandule lékařské.....	90
7.2.2	Hydrolát z listů vavřínu ušlechtilého	94
7.2.3	Hydrolát ze semen fenyklu obecného	99
7.2.4	Hydrolát z květů hřebíčkovce kořeného	102
7.2.5	Antimikrobiální aktivita rostlinných hydrolátů	105
7.3	Shrnutí.....	110
8	Chemické složení a antimikrobiální aktivita esenciálních olejů z asijských bylin (<i>Houttuynia cordata</i> a <i>Persicaria odorata</i>) v kapalně a parní fázi.....	111
8.1	Materiál a metody	112
8.1.1	Rostlinný materiál.....	112
8.1.2	Izolace esenciálního oleje	112
8.1.3	Bakteriální kmeny a kultivační média	113
8.1.4	Metoda určení antimikrobiální aktivity	113
8.1.5	GC-MS analýza esenciálních olejů.....	114
8.1.6	Analýza GC-FID.....	115
8.2	Výsledky a Diskuse	115
8.2.1	Výtěžnost extrakce a chemické složení esenciálních olejů	115

8.2.2	Antimikrobiální aktivita.....	122
8.3	Chemické složení a antimikrobiální aktivita esenciálních olejů v kapalně a parní fázi získaných hydrodestilací bylin (<i>Anthriscus cerefolium</i> a <i>Limnophilla aromatica</i>).....	124
8.3.3	Výtěžnost extrakce a chemické složení esenciálních olejů	124
8.3.4	Antimikrobiální aktivita.....	131
8.4	Shrnutí.....	132
9	Využití zelené mikrovlnné extrakce iontovou kapalinou pro stanovení profilu flavonoidů z listů Kanárských ovocných stromů (<i>Mangifera sp.</i> a <i>Passiflora sp.</i>).....	133
9.1	Materiál a přístroje.....	135
9.1.1	Chemikálie a rostlinný materiál	135
9.1.2	Přístroje a zařízení	136
9.2	Metody	137
9.2.1	Syntéza povrchově aktivních iontových kapalin	137
9.2.2	HPLC-PDA.....	138
9.2.3	Extrakční metoda ILMA-SLE s použitím povrchově aktivních iontových kapalin	138
9.2.4	Extrakční metoda UA-SLE s použitím methanolu	139
9.2.5	Optimalizace IL-MA-SLE	142
9.3	Výsledky a Diskuse	143
9.3.1	Optimalizace IL-MA-SLE pomocí RSM.....	143
9.3.2	Analytické parametry metody IL-MA-SLE-HPLC-PDA.....	149
9.3.3	Vliv použité iontové kapaliny na složení extraktu.....	150
9.3.4	Analýza rostlinných extraktů při optimálních podmínkách metody IL-MA-SLE-HPLC-PDA.....	159
9.4	Stanovení rutinu, kvercetinu a apigeninu v extraktech listů Kanárské byliny <i>Hypericum canariense</i> pomocí navržené optimalizované metody IL-MA-SLE-HPLC-PDA	161
9.5	Shrnutí.....	164

Závěr	165
Literatura.....	167
Seznam publikační činnosti.....	190

Seznam obrázků

Obrázek 1 Mikroextrakce tuhou fází v uspořádání headspace (vlevo) a přímé vzorkování.....	45
Obrázek 2 Mikroextrakce na míchadélku potaženým sorbentem v uspořádání zleva direct a headspace	46
Obrázek 3 Mikroextrakce v jehle mikrostříkačky (vlevo) a mikroextrakce tuhým sorbentem ve špičce mikropipety (vpravo)	47
Obrázek 4 Mikroextrakce v jedné kapce rozpouštědla v uspořádání zleva direct a headspace	49
Obrázek 5 Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny	50
Obrázek 6 Mikroextrakce kapalnou fází v dutém vlákně	51
Obrázek 7 Typické štěpení pozorovatelné u terpenických sloučenin obsahujících kyslík	57
Obrázek 8 Strukturní vzorec isoprenu	58
Obrázek 9 Hmotnostní spektrum isoprenu	59
Obrázek 10 Strukturní vzorec β -myrcenu	60
Obrázek 11 Hmotnostní spektrum β -myrcenu	61
Obrázek 12 Strukturní vzorec allo-ocimenu	61
Obrázek 13 Hmotnostní spektrum allo-ocimenu	62
Obrázek 14 Strukturní vzorce α a β -pinenu	62
Obrázek 15 Hmotnostní spektrum α -pinenu (vlevo) a β -pinenu (vpravo)	63
Obrázek 16 Strukturní vzorec limonenu	63
Obrázek 17 Hmotnostní spektrum limonenu	64
Obrázek 18 Strukturní vzorec kafru.....	64
Obrázek 19 Hmotnostní spektrum kafru.....	65
Obrázek 20 Strukturní vzorec linalolu.....	65
Obrázek 21 Hmotnostní spektrum linalolu	67
Obrázek 22 Strukturní vzorec farnesenu	67
Obrázek 23 Hmotnostní spektrum farnesenu.....	68
Obrázek 24 Strukturní vzorec fytonu.....	69

Obrázek 25 Hmotnostní spektrum fytonu.....	70
Obrázek 26 Strukturální vzorec estragolu	70
Obrázek 27 Hmotnostní spektrum estragolu	72
Obrázek 28 Schéma diskové difúzní metody	75
Obrázek 29 Schéma diskové volatilizační metody	77
Obrázek 30 Schéma bujonové diluční metody	79
Obrázek 31 Schéma Bujonové mikrodiluční volatilizační metody na příkladu testování esenciálních olejů.....	81
Obrázek 32 Aparatura pro hydrodestilaci	85
Obrázek 33 Aparatura pro hydrodestilaci	85
Obrázek 34 Chromatogram z GC-MS analýzy hydrolátů levandule lékařské.....	93
Obrázek 35 Chromatogram z GC-MS analýzy hydrolátů vavřínu ušlechtilého	97
Obrázek 36 Chromatogram z GC-MS analýzy hydrolátu a esenciálního oleje získaného hydrodestilací vavřínu ušlechtilého	98
Obrázek 37 Chromatogram z GC-MS analýzy hydrolátů fenyklu obecného	101
Obrázek 38 Chromatogram z GC-MS analýzy hydrolátů hřebíčkovce kořeného	104
Obrázek 39 Chromatogram z GC-MS analýzy esenciálních olejů získaných z touleně srdčité a rdesna vonného	121
Obrázek 40 IL-MA-SLE metoda pro extrakci flavonoidů z ovocných listů (optimální podmínky extrakce).....	140
Obrázek 41 UA-SLE metoda pro extrakci flavonoidů z ovocných listů	141
Obrázek 42 Získané odezvy plochy popsané regresní rovnicí druhého řádu pro každý flavonoid popisující závislost plochy píku na studovaných proměnných.....	147
Obrázek 43 Extrakční účinnost metody MA-SLE-HPLC-PDA s využitím vybraných IL ke stanovení rutinu, kvercetinu a apigeninu v ovocných listech <i>Passiflora sp.</i> (PS032) a <i>Mangifera sp.</i> (Sweet tart)	155

Obrázek 44 Ukázka chromatogramu získaného analýzou extraktu *Passiflora sp.* PS032 získaného metodou IL-MA-SLE-HPLC-PDA s [C10Gu⁺][Cl⁻] v porovnání s chromatogramem získaným analýzou extraktu též rostliny metodou UA-SLE-HPLC-PDA.....158

Obrázek 45 Ukázka chromatogramu získaného analýzou extraktu třezalky kanárské získaného metodou IL-MA-SLE-HPLC-PDA s [C10Gu⁺][Cl⁻].....163

Seznam grafů

Graf 1 Aromaprofil hydrolátů získaných z levandule lékařské	92
Graf 2 Aromaprofil hydrolátů získaných z listů vavřínu ušlechtilého.....	96
Graf 3 Aromaprofil hydrolátů získaných ze semen fenyklu obecného	100
Graf 4 Aromaprofil hydrolátů získaných z květů hřebíčkovce kořenného.....	103
Graf 5 Grafické porovnání počtu identifikovaných sloučenin v jednotlivých skupinách	119
Graf 6 Aromaprofil esenciálních olejů získaných z touleně srdčité a rdesna vonného	120
Graf 7 Aromaprofil esenciálního oleje získaného z bahnatky vonné	129
Graf 8 Aromaprofil esenciálního oleje získaného z kerblíku třebule	130

Seznam tabulek

Tabulka 1 Srovnání extrakčních technik na příkladu izolace esenciálního oleje z levandule ..38	
Tabulka 2 Příklady složení kationtů a aniontů v iontových kapalinách39	
Tabulka 3 Příklady využití iontových kapalin při extrakci bioaktivních molekul z rostlinných materiálů40	
Tabulka 4 Příklady kombinací výchozích produktů pro syntézu DES a NADES43	
Tabulka 5 Srovnání výhod a nevýhod mikroextrakčních technik53	
Tabulka 6 Analyzované rostliny včetně základních informací (latinský název, čeleď, původ, dodavatel, anatomie).....84	
Tabulka 7 Porovnání analýz koncentrovaných extraktů H_{SD_SPE} a H_{HD_SPE}89	
Tabulka 8 Chemické složení hydrolátu získaného hydrodestilací a parní destilací květů levandule lékařské.....90	
Tabulka 9 Chemické složení hydrolátu získaného hydrodestilací a parní destilací listů vavřínu ušlechtilého94	
Tabulka 10 Chemické složení hydrolátu získaného hydrodestilací a parní destilací semen fenyklu obecného99	
Tabulka 11 Chemické složení hydrolátu získaného hydrodestilací a parní destilací květů hřebíčkovce kořeného102	
Tabulka 12 Antimikrobiální aktivita hydrolátů zakoncentrovaných s využitím SPE testovaná na kmenech Arkobakterů, průměr inhibičních zón \pm standardní odchylka je uveden v mm (zahrnující 6 mm disk) a minimální inhibiční/baktericidní koncentrace v %, n = 4108	
Tabulka 13 Antimikrobiální aktivita hydrolátů zakoncentrovaných s využitím SPE testovaná na vybraných mikroorganismech, průměr inhibičních zón \pm standardní odchylka je uveden v mm (zahrnující 6 mm disk) a minimální inhibiční/baktericidní koncentrace v %, n = 4109	
Tabulka 14 Chemické složení esenciálních olejů z touleně srdčité a rdesna vonného116	
Tabulka 15 Antimikrobiální aktivita testovaných esenciálních olejů z touleně srdčité a rdesna vonného a antibiotika ampicilin proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím.122	
Tabulka 16 Chemické složení esenciálních olejů z kerblíku třebule a bahnatky vonné.....125	

Tabulka 17 Antimikrobiální aktivita testovaných esenciálních olejů z kerblíku třebule a bahnatky vonné a antibiotika ampicilin proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím.	131
Tabulka 18 Chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti sledovaných flavonoidů (staženo z databáze SciFinder® 2020).....	143
Tabulka 19 Experimentální model – matice experimentů BBD použita pro optimalizaci metody IL-MA-SLE, včetně kódovaných a pracovních hodnot.....	144
Tabulka 20 Získané hodnoty pro konstantu a koeficienty regresní rovnice druhého řádu pro odezvy plochy pro rutin, kvercetin a apigenin.....	145
Tabulka 21 Parametry získané z analýzy rozptylu (ANOVA) experimentálních hodnot	148
Tabulka 22 Optimální podmínky metody IL-MA-SLE pro jednotlivé analyty.....	149
Tabulka 23 Analytické parametry metody IL-MA-SLE-HPLC-PDA pro stanovení rutinu, kvercetinu a apigeninu	150
Tabulka 24 Vybrané vlastnosti použitých iontových kapalin jako extrakčního činidla v metodě MA-SLE-HPLC-PDA k extrakci flavonoidů z rostlinných matric	152
Tabulka 25 Listy různých kultivarů <i>Passiflora sp.</i> a <i>Mangifera sp.</i> použité k extrakci a stanovení flavonoidů	159
Tabulka 26 Koncentrace sledovaných analytů v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ získané navrženou metodou IL-MA-SLE-HPLC-PDA s využitím iontové kapaliny $[\text{C}_{10}\text{Gu}^+][\text{Cl}^-]$ extrakcí listů mučenky a manga	161
Tabulka 27 Koncentrace sledovaných analytů v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ získané navrženou metodou IL-MA-SLE-HPLC-PDA s využitím iontové kapaliny $[\text{C}_{10}\text{Gu}^+][\text{Cl}^-]$ extrakcí listů <i>Hypericum canariense</i>	162

Seznam zkratek

BDM	Bujónová diluční metoda (Broth Dilution Method)
BMVM	Bujónová mikrodiluční volatilizační metoda (Broth Microdilution Volatilization Method)
CMC	Kritická micelární koncentrace (Critical Micelar Concentration)
DAD	Detektor s diodovým polem (Diod Array Detector)
DDM	Disková difúzní metoda (Disc Diffusion Method)
DI	Přímá (Direct)
DI-SPME	Mikroextrakce tuhou fází v přímém módu (Direct Solid Phase Microextraction)
DES	Eutektické rozpouštědlo (Deep Eutectic Solvent)
DLLME	Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAMHD	Enzymem asistovaná mikrovlnná hydrodestilace (Enzyme Assisted Microwave Hydrodistillation)
EO	Esenciální olej
FID	Plamenový ionizační detektor (Flame Ionization Detector)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HD	Hydrodestilace (Hydrodistillation)
HF-LPME	Mikroextrakce kapalnou fází v dutém vlákne (Hollow Fibre Liquid Phase Microextraction)
H _{SDSPE}	Hydroláty získané destilací vodní parou a zakoncentrované extrakcí tuhou fází
H _{HDSPE}	Hydroláty získané hydrodestilací a zakoncentrované extrakcí tuhou fází
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Pressure Liquid Chromatography)
HPLC-PDA	Vysoce účinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole

HS	Headspace
HS-SPME	Mikroextrakce tuhou fází v módu headspace (HeadSpace Solid Phase Microextraction)
IL	Iontové kapaliny (Ionic Liquids)
IL-MA-SLE	Mikrovlnná extrakce kapalina-tuhá látka s použitím iontové kapaliny
ILE	Extrakce iontovou kapalinou (Ionic Liquid Extraction)
LLE	Extrakce kapalina-kapalina (Liquid Liquid extraction)
LOD	Limit detekce (Limit Of Detection)
LOQ	Limit kvantifikace (Limit Of Quantification)
LPME	Mikroextrakce kapalnou fází (Liquid Phase Microextraction)
MAD	Destilace podporovaná mikrovlnným ohřevem (Microwave Assisted Distillation)
MAE	Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (Microwave Assisted Extraction)
MEPS	Mikroextrakce v jehle mikrostříkačky pomocí tuhého sorbentu (Microextraction with Packed Sorbent)
MF	Mobilní fáze
MH	Mueller-Hinton
MHD	Hydrodestilace podporovaná mikrovlnným ohřevem (Microwave assisted HydroDistillation)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace (Minimal Inhibition Concentration)
MBC	Minimální baktericidní koncentrace (Minimal Bactericidal Concentration)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MSD	Parní destilace podporovaná mikrovlnným ohřevem (Microwave assisted Steam Distillation)
MTT	Thiazolyová modř tetrazoliumbromidu (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)

MW	Mikrovlnné záření (Microwave)
NADES	Přírodní eutektické rozpouštědlo (Natural Deep Eutectic Solvents)
PT-SPE	Mikroextrakce tuhou fází ve špičce pipety (Pipette Tips Solid Phase Microextraction)
PDA	Detekce fotodiodovým polem (Photodiode Array Detection)
PVDF	Polyvinyliden fluorid
R ²	Determinační koeficient (Coefficient of Determination)
RSD	Standardní relativní odchylka (Relative Standard Deviation)
S/N	Poměr signál/šum (Signal/Noise ratio)
SBSE	Extrakce na míchadélku (Stirr Bar Sorptive Extraction)
SD	Parní destilace (Steam Distillation)
SDME	Mikroextrakce jednou kapkou rozpouštědla (Single Drop Microextraction)
SF	Stacionární fáze
SFE	Extrakce nadkritickou tekutinou (Supercritical Fluid Extraction)
SFME	Mikrovlnná extrakce bez použití rozpouštědla (Solvent Free Microextraction)
SLE	Extrakce tuhá látka kapalina (Solid Liquid Extraction)
SPE	Extrakce na tuhé fázi (Solid Phase Extraction)
SPME	Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction)
SWE (PHWE)	Extrakce vodou v subkritickém stavu (Subcritical Water Extraction/Pressurized Hot Water Extraction)
UAE	Extrakce podporovaná ultrazvukem (Ultrasound Assisted Extraction)
UA-SLE	Extrakce kapalina-tuhá látka podporovaná ultrazvukem (Ultrasound Assisted Solid-Liquid Extraction)
UV/Vis	Spektrofotometrický detektor
UZ	Ultrazvuk

Úvod

Prvním aspektem této disertační práce zabývající se extrakcí bioaktivních sloučenin z rostlinných matric je náhled na porovnání různých extrakčních technik, a to zejména těch „zelených“ v návaznosti na trend „zelené chemie“. Příkladem těchto extrakčních technik je destilace či extrakce s použitím iontových kapalin (IL), ale i další metody popisované v teoretické části této práce. Trendem současné doby je udržitelně smýšlející populace. Roste poptávka po zhodnocení vedlejších rostlinných produktů (tj. listů, slupek, semen, buničiny) s cílem použít je jako zdroj bioaktivních sloučenin pro četné aplikace ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Tyto vedlejší produkty představují problém s likvidací pro zemědělský a potravinářský průmysl a jsou skutečně bohaté na přírodní bioaktivní sloučeniny, jako jsou, mimo jiné, terpeny, flavonoidy, karotenoidy a fytosteroly. Bioaktivní sloučeniny z rostlin poskytují mnohostranné výhody pro zdraví jedince a jsou široce používány pro své antimikrobiální, antioxidační nebo funkční vlastnosti.

Druhým aspektem pro výzkum v této disertační práci je nalezení nových a účinných antimikrobiálních látek, které by bylo možné použít proti multi-rezistentním mikroorganismům, kterých v posledních letech přibývá. Léčivé rostliny a jejich přírodní produkty tvoří převládající zdroj přírodních léčiv, a proto už od nepaměti slouží jako nejdostupnější prostředek k léčbě mnoha nemocí. Přírodní rostlinné extrakty mohou mít velké potencionální využití v léčbě mnoha, například bakteriálních, onemocnění. Tyto extrakty, zejména esenciální oleje, mají rozmanité biologické vlastnosti, neboť obsahují mnoho bioaktivních látek. Obsahují široké rozmezí komplexních a strukturálně odlišných sloučenin, které jsou biologicky, respektive antimikrobiálně aktivní, a na jejichž kombinaci by si mohly bakterie hůře vypěstovat rezistenci na rozdíl od komerčních antimikrobiálních látek, které jsou založené pouze na jedné chemické substanci. Aby tyto extrakty mohly být v budoucnu používány k léčbě různých onemocnění, je důležité, aby byly správně chápány souvislosti mezi jejich chemickým složením a potencionální antimikrobiální aktivitou.

TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část disertační práce je rozdělena do 6 hlavních kapitol zabývajících se využitím rostlinných extraktů a charakteristikou rostlinných matric použitých v experimentální části disertační práce. Dále popisuje tradiční a moderní extrakční metody používané pro extrakci přírodních látek z rostlinných materiálů s praktickými příklady a s ohledem na aktuální vědecké publikace. Nakonec jsou popisovány metody analýzy těkavých a netěkavých přírodních látek v rostlinných extraktech a metody pro stanovení jejich antimikrobiální aktivity.

1 Využití rostlinných extraktů v přírodní medicíně

Použití léčivých rostlin a jejich extraktů je staré jako lidská civilizace a neustále je vyvíjeno úsilí o zlepšení produkce rostlinných extraktů ve smyslu zvýšení kvality a zároveň i produkovaného množství pomocí různých extrakčních technologií. Léčivé rostliny jsou nejbohatším biologickým zdrojem léčiv pro tradiční systém medicíny, moderní lékové formy, doplňky stravy, lidová léčiva, farmaceutické meziprodukty a chemické entity pro syntetická léčiva [1]. Některá léčiva na bázi rostlin se používají po staletí a neexistuje pro ně jiná alternativa, například srdeční glykosidy [2]. Rostlinné extrakty jsou dodnes hlavním zdrojem léčivých přípravků ve velké části světa, především v rozvojových zemích, a to i přes velký rozvoj nově syntetizovaných léčiv během počátku 20. století. Příkladem může být aspirin (kůra z vrby), dioxin (náprstník červený), chinin (kůra z chinovníku) nebo morfin (mák setý) [3]. V posledních letech je pozorován opět zvýšený zájem o rostlinné extrakty a jejich využití ve farmaceutickém průmyslu a medicíně [4-9]. Mimo jiné tento zájem souvisí do jisté míry s možnou toxicitou syntetických léčiv nebo velkým množstvím nežádoucích účinků. Dalším faktorem, který opět zvýšil zájem o přírodní extrakty, je zvýšená rezistence mikroorganismů vůči komerčně dostupným léčivým přípravkům a nově se objevující infekční onemocnění, na něž nemáme dostupnou léčbu [10]. Jak je známo, rostlinné extrakty mají široké spektrum účinků na lidský organismus. Mají hojivé, protizánětlivé, antiinsekticidní, antibakteriální, antimykotické a antivirotické vlastnosti [11-15]. Vonné silice z extraktů se navíc dají využít v aromaterapii (léčba bolesti hlavy, nespavost, deprese, aj.) [16]. Fytomedicína, neboli rostlinolékařství, je v současné době celosvětově akceptována jako platný alternativní systém léčby ve formě léčiv, funkčních potravin, aj., a je uznávána a podporována Světovou zdravotnickou organizací [10].

1.1 *Fytochemické složení rostlinných extraktů*

Základem fytochemického složení rostlin je rozdělení látek na primární a sekundární metabolity. Primární metabolity se vyskytují u všech druhů rostlin. Jsou to produkty životně důležitých metabolických cest a zahrnují proteiny, tuky, cukry a organické kyseliny. Sekundární metabolity v rostlinách jsou považovány spíše za odpadní produkty, avšak mají rozmanité chemické a biologické vlastnosti, a proto jsou velice zajímavé pro další zkoumání. Řadí se sem například alkaloidy, terpeny, flavonoidy nebo saponiny [17]. V rostlinách a jejich extraktech existuje nespočet jednotlivých sloučenin a složení extraktů se často velice liší například v závislosti na stáří rostliny, klimatu, doby sklizně, použité extrakční technice a podobně [18, 19]. Z tohoto hlediska lze rozdělit extrakty na ty, které obsahují polární,

netěkavé látky a ty, které obsahují nepolární, těkavé látky. Pro tuto disertační práci byly vybrány jako zástupci nepolárních sloučenin terpeny obsažené v esenciálních olejích a jako zástupci polárních sloučenin flavonoidy obsažené v surových extraktech, které budou dále popisovány v následujících kapitolách [17-20].

1.1.1 Esenciální oleje

Esenciální oleje (EO) jsou složité směsi organických látek, které mohou obsahovat desítky složek v odlišných koncentracích, v závislosti na druhu rostliny [15, 16]. Jsou to látky, které se extrahují z květů, listů, stonků, plodů či kořenů rostlin. Jsou charakterizovány jako příjemně vonící oleje, rozpustné v lipidech a organických rozpouštědlech, nerozpustné ve vodě [21]. Nejvíce používanou technikou k získávání esenciálních olejů je destilace, při níž se uvolňuje velké množství těkavých molekul. S čímž souvisí i hydrofobicita a body varu těkavých sloučenin, které jsou dostatečně nízké, aby bylo možné provést destilaci za atmosférického tlaku s použitím vody či vodní páry a po ukončení destilace šlo snadno oddělit olej od hydrosolu/hydrolátu [1, 21]. Esenciální oleje jsou směsi nasycených a nenasycených uhlovodíků, alkoholů, aldehydů, esterů, etherů, ketonů, oxidů, fenolů. Mohou však obsahovat i deriváty dusíku nebo síry, jako jsou aminy a sulfidy. Ve většině případů jsou EO tvořeny dvěma až třemi hlavními složkami ve vysokých koncentracích (20-70 %) ve srovnání s ostatními složkami, které jsou zastoupeny pouze minoritně. Hlavní složkou EO jsou terpeny a jejich oxidované formy. Základní stavební jednotkou terpenů je isopren. Vyskytují se ve formě glykosidů, anebo ve volné formě. Biosyntéza terpenů probíhá dvěma cestami, které se od sebe liší způsobem vzniku základních prekurzorů terpenů – mevalonátová dráha a dráha kyseliny šikimové. Dělí se podle počtu uhlíků na hemiterpeny (C5), monoterpeny (C10), seskviterpeny (C15), diterpeny (C20), triterpeny (C30) a tetraterpeny (C40), avšak v esenciálních olejích se vyskytují převážně jen mono a seskviterpeny a jejich oxidované formy. Dále se často v esenciálních olejích vyskytují aromatické sloučeniny odvozené od fenylypropenu, tzv. deriváty fenylypropenu [15, 16].

Esenciální oleje, respektive jejich složky, mají široké spektrum biologických vlastností. Jsou baktericidní, virucidní, fungicidní, antiparazitické, antioxidační a insekticidní. Z terapeutického hlediska mají vlastnosti antiseptické, sedativní, spasmolytické a analgetické [12, 15, 20, 22, 23].

1.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy se vyskytují v rostlinách zejména jako žluté a bílé pigmenty, které způsobují například podzimní zbarvení listů. V rostlinách mají především funkci ochrannou (UV záření, antioxidanty), ale také enzymatickou [17]. Jsou to látky méně či více polární, rozpustné ve vodě a organických rozpouštědlech [20]. Vyskytují se buď ve volné formě, nebo vázané glykosidickou vazbou. Jejich chemická struktura je založena na molekule C₁₅. Jsou to produkty metabolické dráhy kyseliny šikimové a acetátu. Existuje několik tříd flavonoidů, avšak nejdůležitější jsou zejména flavony (apigenin) a flavonoly (kvercetin) [17].

Z terapeutického hlediska mají flavonoidy efekt na srdeční činnost, cirkulační systém a zvyšují pevnost a pružnost kapilár. Mají synergický efekt s kyselinou askorbovou. Jsou antioxidační, baktericidní a virucidní. Mají protizánětlivé a hojivé vlastnosti [17, 24-27].

2 Charakteristika vybraných rostlinných matric použitých v experimentální části

2.1 *Levandule lékařská (Lavandula angustifolia)*

Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*) je silně aromatický trvalý polokeř patřící do čeledi hluchavkovité (*Lamiaceae*). Dorůstá do výšky 60 cm [28]. Její květy jsou fialové a mají tradiční využití v mnoha odvětvích. Levandule je známá pro svou příjemnou vůni a léčivé a aromaterapeutické účinky. Je nedílnou součástí různých kosmetických produktů [14, 29-31] a používá se k léčbě nespavosti, úzkosti a psychosomatických onemocnění. Zklidňuje a harmonizuje činnost centrálního a autonomního nervového systému. Na rozdíl od léků na spaní navozuje přirozený, posilující spánek, po kterém se člověk cítí odpočatý. Dále zlepšuje trávení, protože má mírné karminativní a protikřečové účinky na střevo, používá se k léčbě zánětu tlustého střeva [32]. Levandule se pěstuje zejména v Bulharsku a Francii, v menším rozsahu v Maroku, bývalých oblastech Jugoslávie, Maďarsku, Itálii, Rusku, Turecku a na Ukrajině [33]. Silice z levandulového oleje mají antimikrobiální a antioxidační účinky, jak prokázalo několik studií [34, 35]. O levandulovém esenciálním oleji se také hovoří jako o možném konzervačním prostředku potravin, díky jeho biologickým vlastnostem [14]. Esenciální olej získaný z levandule lékařské je bezbarvý a skládá se především z linalylacetátu, linalolu, eukalyptolu a dalších složek [11, 31, 33].

2.2 *Hřebíčkovec kořený (Syzygium aromaticum)*

Hřebíček je sušený kalich s poupětem hřebíčkovce kořeného (*Syzygium aromaticum*) a patří do čeledi myrtovité (*Myrtaceae*). Strom je středně velký, stálezelený, dorůstá do výšky až 20 m a průměr kmene dospělých stromů může dosáhnout až 30 cm. Tradičně se používá jako dochucovadlo, antimikrobiální aditivum do potravin nebo přísada do parfémů [36, 37]. **Silice z hřebíčku funguje jako ústní dezinfekce a analgetikum. Doporučuje se při zánětu sliznice dutiny ústní nebo zánětu dásní. Při bolesti zubů způsobené zubním kazem se aplikuje přímo na postižené místo, kde dočasně zmírňuje bolest. Esenciální olej z hřebíčku lze použít také jako povzbuzující prostředek, ale ve srovnání s kofeinem má mírnější účinky [32].** Hřebíčkovec kořený pochází z vulkanických ostrovů ve východní části Indonésie, která je vedle Madagaskaru a Zanzibaru jedním z největších producentů hřebíčku. Esenciální olej se získává z celých nebo mletých pupenů. Pupy hřebíčku se sklízí ve chvíli, kdy dosáhnou své plné velikosti a zbarví se do červena. Po sklizni jsou pupeny odděleny od stonků ručně nebo strojem a ihned jsou vysušeny na slunci nebo v sušičce. Pokud by byly pupeny špatně

skladovány, mohlo by dojít ke ztrátě olejů, růstu plísní a vzniku zápachu. Pupeny hřebíčku obsahují 15-20 % esenciálního oleje z jejich celkové hmotnosti [37]. Esenciální olej z hřebíčku má antibakteriální, antifungální, insekticidní a antioxidační vlastnosti. Má rovněž terapeutické účinky, včetně analgetických, antispasmodických a antiseptických [36, 38, 39]. Silice mají nažloutlou barvu, lehce dohněda [36]. V esenciálním oleji jsou nejvíce zastoupeny eugenol, eugenylacetát a karyofylen [36, 38].

2.3 *Fenykl obecný (Foeniculum vulgare)*

Fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*) je jednoletá, dvouletá nebo trvalá aromatická bylina patřící do čeledi miříkovité (*Apiaceae*). Fenykl roste na kyprých, hlubokých půdách bohatých na živiny s obsahem vápníku a dorůstá do výšky 1,5–2 m. Kvete v červenci až začátkem října a jeho semena se sbírají před začátkem mrazů, respektive, než zhnědnou [40]. Používá se jako koření, ochucovadlo, aroma a přidává se do likérů, kosmetiky a léků [41]. **Fenykl se používá zejména ke zmírnění nadýmání, protože usnadňuje odchod plynů a stimuluje peristaltiku střev. Má mírně projímavé účinky. Zlepšuje trávení tím, že napomáhá vyprazdňování žaludku. Dále usnadňuje vykašlávání při zánětech průdušek a nachlazení [32, 42].** Pochází z jižní Evropy a oblasti Středomoří [41]. Fenykl je široce pěstován v mírných a subtropických oblastech světa. Hlavními producenty jsou Francie, Německo, Rusko, Itálie, Indie a Spojené státy americké [43]. Pěstuje se také v Egyptě a roste divoce v mnoha oblastech Sahary. Stejně jako ostatní zmíněné esenciální oleje má fenyklový olej antioxidační, antibakteriální, antifungální a insekticidní účinky. Hlavní složky esenciálního oleje jsou fenchon, limonen, anetol a pinen [41].

2.4 *Vavřín ušlechtilý (Laurus nobilis)*

Vavřín ušlechtilý (*Laurus nobilis*) je stálezelený strom nebo keř patřící do čeledi vavřínovité (*Lauraceae*). Dorůstá do výšky až 12 m. Jeho listy jsou známé jako bobkový list, který se používá zejména jako koření a dochucovadlo v potravinářském průmyslu, ale má využití také v kosmetice. Vavřín pochází z oblasti jižní Evropy a Středomoří. Pěstuje se hlavně v Evropě a Spojených státech amerických jako ozdobná a léčivá rostlina [44]. Silice z bobkového listu mají antimikrobiální a antioxidační vlastnosti, jak prokázalo několik studií [44-49]. **Olej z vavřínu je velmi účinný při zevním použití na revmatickou bolest a má rovněž protizánětlivé účinky. Balzám z vavřínového oleje se používá k masírování ztuhlé šije, bederního ústřelu, ischiasu, vymknutého kotníku a dalších bolestí svalů a kloubů [32].** Největší zastoupení v chemickém složení esenciálního oleje získaného z bobkového listu má eukalyptol, sabinen a linalol [44, 50].

2.5 Touleň srdčitá (*Houttuynia cordata*)

Touleň srdčitá (*Houttuynia cordata*) je kvetoucí trvalá bylina patřící do čeledi ještěrkovcovité (*Saururaceae*). Roste do výšky 20–80 cm, má žlutozelené květy a rybí vůni. Touleň srdčitá se používá v přírodní medicíně několika asijských zemí k léčbě kašle, pneumonie, bronchitidy, úplavice, ekzému, oparu, akné či žaludečních vředů. Dále se používá jako stimulant imunity a jako protinádorové agens [51]. Touleň pochází z Asie a pěstuje se zejména v Číně, Japonsku, Koreji a Jihovýchodní Asii. V posledních letech bylo publikováno několik studií, které se zabývají účinky této byliny na lidský organismu a bylo prokázáno, že má protizánětlivé [52], protialergické [53], virucidní [54], antileukemické [55], antioxidační [56], antibakteriální [23] a antikarcinogenní [57] účinky. Mimo běžných léčebných využití se touleň srdčitá používá jako dochucovadlo v asijské kuchyni a přidává se do kosmetických přípravků. Její extrakty se přidávají do kosmetiky používané k prevenci vrásek, k léčbě popraskané kůže a k celkovému zlepšení stavu pokožky [51].

2.6 Rdesno vonné (*Persicaria odorata*)

Rdesno vonné (*Persicaria odorata*) je bylina patřící do čeledi rdesnovité (*Polygonaceae*). Dorůstá výšky 30-35 cm, má tmavě zelené listy a pro její aroma a chuť se jí přezdívá vietnamský koriandr. Tradičně se celosvětově používá v přírodní medicíně, kuchyni a kosmetice. V přírodní medicíně se používá ke snížení horečky, proti bolesti žaludku a k léčbě kašle. Bylina pochází z tropických oblastí Jihovýchodní Asie. Má antibakteriální, antifungicidní, protizánětlivé, antioxidační a insekticidní účinky [58, 59].

2.7 Kerblík třebule (*Anthriscus cerefolium*)

Kerblík třebule (*Anthriscus cerefolium*) nebo také třebule pravá, je jednoletá rostlina patřící do čeledi miříkovité (*Apiaceae*). Dorůstá do výšky 70 cm. Vůní a chutí připomíná petržel a ve Francii je velice využívanou a ceněnou bylinou v kulinářství. Pomáhá stimulovat trávení. Dále má tradiční využití v kosmetickém průmyslu. Kerblík pochází z jihovýchodní Evropy, západní Asie a jižní oblasti Ruska [60].

2.8 Bahnatka vonná (*Limnophilla aromatica*)

Bahnatka vonná (*Limnophilla aromatica*) je jednoletá aromatická vodní bylina patřící do čeledi jitrocelovité (*Plantaginaceae*). Dorůstá až do výšky 30 cm. Je známá pro své využití v akvaristice, tradiční medicíně a asijské kuchyni. Voní a chutná po limetách a římském kmínu. Má cholagogické, protizánětlivé, diuretické účinky a uklidňuje žaludek. Dále se v tradiční medicíně používá k léčbě virové hepatitidy či horečky. Bahnatka roste v jihovýchodní Asii,

především v tropických oblastech severovýchodního Thajska [61, 62]. Extrakty z bahnatky vonné mají antibakteriální [63], antioxidační [61] a antikarcinogenní [64] vlastnosti.

2.9 Třezalka kanárská (*Hypericum canariense*)

Třezalka kanárská (*Hypericum canariense*), známá také jako „Canary St. John’s wort“ patří do čeledi třezalkovité (*Hypericaceae*). Je to žlutě kvetoucí keř dorůstající do výšky 1,5–4 m, který roste především v oblasti Kanárských ostrovů [20, 65]. Jedná se o dekorativní dřevinu, avšak čeleď třezalkovité je známá také pro své léčivé účinky. Má neuroprotektivní [66], antibakteriální [67] a antikarcinogenní [68] vlastnosti. Druhy rodu *Hypericum* se celosvětově používají v tradiční rostlinné medicíně k hojení ran, léčbě deprese nebo pro jejich sedativní účinky [20].

2.10 Mangovník (*Mangifera species*)

Mangovník (*Mangifera species*) je rod rostlin z čeledi ledvinovnickovité (*Anacardiaceae*), známý pro své plody. Je to mohutný stálezelený strom s jednoduchými zelenými listy a různě barevnými květy podle daného druhu. Tento rod zahrnuje na 63 druhů a roste především v tropické Asii [69]. Jeho pěstování je rozšířené také na Kanárských ostrovech, odkud je mango vyváženo. Plod mangovníku, mango, je známé pro svoji specifickou chuť a bohaté nutriční složení. Listy mangovníku mají prospěšné účinky na lidský organismus a jsou důležitou rostlinou v Ajurvédské medicíně. Mají antioxidační, antiproliferativní a protizánětlivé účinky. Listy mangovníku jsou bohaté na polyfenoly, karotenoidy a kyselinu askorbovou [70, 71].

2.11 Mučenka (*Passiflora species*)

Mučenka (*Passiflora species*), známá také jako maracuja nebo „passion fruit“, je rod vytrvalých, popínavých bylin a keřů z čeledi mučenkovité (*Passiflora*). Mučenky jsou kromě funkce okrasných květin používány v potravinářství a přírodní medicíně. Plody mučenky jsou aromatické se specifickou chutí a zpracovávají se do šťáv, džusů nebo marmelád. V přírodní medicíně je používána pro své analgetické, sedativní a spasmolytické účinky. Listy mučenky jsou bohaté na flavonoidy a jejich glykosidy [72, 73].

3 Metody extrakce bioaktivních sloučenin z rostlinných materiálů

Extrakce je separační technika založená na přechodu složky směsi dvou nemísitelných fází fázovým rozhraním z jedné fáze (plynné, kapalné nebo tuhé) do druhé fáze (plynné, kapalné nebo tuhé). Extrakce se provádí často nejen za účelem separace, ale také za účelem zakoncentrování analytu z relativně velkého objemu do malého objemu extrakčního činidla.

Koncept přípravy léčivé rostliny pro experimentální účely zahrnuje řádný a včasný sběr rostliny, identifikaci a ověření rostliny odborníkem a její adekvátní zpracování (sušení, mletí). Po primárním zpracování rostlinného materiálu následuje extrakce, případně dále frakcionace a izolace bioaktivní sloučeniny. Extrakce rostlinných materiálů je z farmaceutického hlediska proces separace, kdy se z léčivých rostlinných částí a tkání získává extrakt standardními postupy pomocí selektivních rozpouštědel. Tyto extrakční techniky oddělují rostlinné metabolity rozpustné v daném rozpouštědle od nerozpustného buněčného zbytku. Účelem standardizovaných extrakčních postupů je dosáhnout terapeuticky požadovaných dávek a vyizolovat požadované sloučeniny vhodným selektivním rozpouštědlem [74]. Takto získaný extrakt může být po standardizaci použit jako léčivé činidlo ve formě tinktury, oleje, tekutých extraktů, nebo dále zpracován tak, aby byl včleněn do požadované lékové formy, jako jsou tablety a tobolky. Všechny tyto produkty obsahují komplexní směs mnoha léčivých rostlinných sekundárních metabolitů, jako jsou alkaloidy, glykosidy, terpeny a flavonoidy. Aby extrakt mohl být dále použit jako moderní léčivo, může být dále zpracován různými technikami frakcionace, aby se izolovala jednotlivá chemická individua (např. kodein). Základními parametry, které určují kvalitu rostlinných extraktů a olejů, je použitá část rostliny k extrakci, použité extrakční činidlo a extrakční technologie a koncentrace požadované léčivé látky v extraktu.

Tradiční techniky extrakce látek z léčivých a aromatických rostlin zahrnují destilace, zejména parní destilace (SD) a hydrodestilace (HD) a dále různé aplikace extrakce tuhá látka kapalina (SLE). Příkladem SLE jsou macerace, infuze, digesce či Soxhletova extrakce. Tyto konvenční extrakce rozpouštědlem se používají již od nepaměti i v domáckém prostředí. Existují však nevýhody spojené s těmito tradičními extrakčními technikami. Jsou neekonomické díky nadměrné spotřebě času a energie a často také neekologické díky použití toxických rozpouštědel. Tyto elementární nevýhody vyvolaly zájem o výzkum efektivnějších a „zelenějších“ extrakčních technik pro extrakci bioaktivních sloučenin z rostlinných materiálů [75]. Z těchto důvodů se začaly objevovat a používat „zelené extrakce“ (z anglického Green Extraction), jako je extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (MAE) [76],

nebo ultrazvukovým vlněním (sonikace, UAE) [77], extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) [45], nebo hydrolytická macerace s následnou destilací [75]. Příklady aplikací těchto extrakcí jsou uvedeny v Tabulce 1 (str. 37) na příkladu levandule. Řadí se sem ale také moderní miniaturizované techniky, jako je mikrodestilace [78], termomikrodestilace [79], molekulární destilace [79], mikroextrakce v jedné kapce rozpouštědla (SDME) [80], mikroextrakce kapalnou fází v dutém vlákne (HF-LPME) [81], nebo extrakce iontovou kapalinou (ILE) [82-84] či eutektickým rozpouštědlem (DES) [4, 85, 86]. Zvláštní skupinou extrakcí jsou extrakce tuhou fází, kam se řadí například extrakce na míchadle (SBSE) [87, 88] nebo mikroextrakce tuhou fází na křemenném vlákne (SPME) [89-91]. Tyto dvě zmíněné extrakční techniky se často využívají pro analýzu silic v rostlinných materiálech. Slouží však pouze ke kvalitativním nebo semikvantitativním analýzám. Nevýhodou těchto metod je nemožnost průmyslového využití, neboť nelze získat extrakt pro další využití, např. k výrobě kosmetických produktů [92, 93].

3.1 Lisování za studena

Lisování za studena je jednou z nejstarších technik extrakce esenciálních olejů. Je to průmyslově mechanizovaný extrakční proces, při kterém jsou pod tlakem za laboratorní teploty narušovány olejové buňky v citrusové slupce. Takto získané esenciální oleje bývají vysoce kvalitní a obsahují jak těkavé, tak i netěkavé složky [94, 95].

Ferhat a kol. [96] lisovali za studena citrusové slupky po dobu 60 minut a získali esenciální olej s výtěžností 0,05 %. Pro porovnání také použili k získání esenciálního oleje hydrodestilaci a hydrodestilaci podporovanou mikrovlnným ohřevem a po 180, respektive 30 minutách destilace získali výtěžek 0,21 % pro HD a 0,24 % pro MHD. Nejvíce zastoupenou složkou ve všech získaných olejích byl limonen (69,65 – 75,68 %) a β -pinen (6,61 – 8,70 %) [96].

3.2 Macerace, infúze, digesce

Obecně se macerace, infúze a digesce označuje jako loužení. Je to proces, při kterém je celá nebo nejmenší nadrcená rostlinná část umístěna v uzavřené nádobě s rozpouštědlem. Rozdíl mezi těmito třemi jednotlivými technikami je v délce loužení a použité teplotě. Poté je směs oddělena pomocí dekantace či filtrace [1, 97].

Kowalski a kol. [98] porovnali výtěžnost a složení esenciálního oleje z tymiánu získaného klasickou macerací a macerací podporovanou ultrazvukem. Obě metody extrakce probíhaly po dobu 120 minut a bylo použito 20 g tymiánu a 400 ml destilované vody. Vyšší výtěžek byl získán macerací podporovanou ultrazvukem [98].

3.3 Destilace esenciálních olejů

Přestože je destilace separační technikou a její princip je odlišný od extrakčních technik popisovaných v kapitole 3, kdy je analyt izolován na základě rozdělovací rovnováhy, tak v mnoha zahraničních publikacích je destilace řazena a diskutována jako extrakční technika [99-103]. Z tohoto důvodu jsou níže popsané destilační metody zařazeny v kapitole o extrakčních technikách rostlinného materiálu.

Hydrodestilace a destilace vodní parou jsou nejpoužívanější metody získávání esenciálních olejů z rostlin. Zjednodušeně řečeno je principem hydrodestilace nebo destilace vodní parou obohacení vody nebo vodní páry o těkavé sloučeniny, tvořící esenciální olej, které jsou uvolněné z rostlinných buněk za dané teploty varu. Uvolněné těkavé sloučeniny jsou unášeny parou do chladiče, kde se ochladí a kondenzují. Vodní pára funguje jako nosič esenciálního oleje a v momentě kondenzace se esenciální olej oddělí od vodného zbytku (hydrolátu/hydrosolu) díky nemísitelnosti oleje s vodou.

Kvalita a výtěžky esenciálních olejů závisí jednak na typu izolační techniky, ale také na řadě agronomických faktorů. Závisí na podmínkách, ve kterých jsou rostliny pěstovány, zejména pak na klimatických podmínkách, typu půdy, vodním stresu, působení hmyzu a mikroorganismů, na procesu pěstitelství, době sklizně nebo způsobu skladování rostlinného materiálu. Rovněž závisí také na postupu zpracování vzorku před destilací [18, 104].

Například Sowbhagya a kol. [105] získali esenciální olej z kmínu enzymatickou hydrolyzou a následně použili konvenční destilační metodu (SD a HD), aby dosáhli lepší výtěžnosti a kvality esenciálního oleje. Předúprava vzorku enzymatickou hydrolyzou podle nich zlepšuje aroma esenciálního oleje [105-107]. HD a SD mají při získávání esenciálních olejů několik nevýhod, jako je tepelný rozklad některých analytů nebo délka doby destilace [41]. V průmyslové výrobě se klade důraz, vedle zlepšení kvality olejů, také na zvýšení procentuální výtěžnosti, protože rostlinný materiál je poměrně drahý a výtěžky jsou malé [43].

3.3.1 Hydrodestilace

Hydrodestilace je nejjednodušší a nejlevnější metoda destilace [19]. Při hydrodestilaci je rostlinný materiál ponořený do vroucí vody. Rostlinný materiál při varu v destilační baňce pohltí část vody. Následně podle principu osmózy projde esenciální olej přes buněčnou stěnu olejových buněk rostliny do vody. Tato směs je varem odpařena a v chladiči páry směsi zkondenzují. V separační části aparatury se oddělí esenciální olej od hydrolátu [18]. Separace esenciálního oleje od hydrolátu je důležitou fází, a to jak pro hydrodestilaci, tak všechny ostatní

destilační techniky, neboť se jedná o velmi malá množství olejů a cílem je získání co největšího množství esenciálního oleje. Většina esenciálních olejů je lehčí než voda, tudíž plave na jejím povrchu. Některé oleje mají větší hustotu než voda a klesají dolů, například silice heřmánku. Po oddělení by měl být esenciální olej skladován v hnědých skleněných lahvích, těsně uzavřených bez přístupu kyslíku, který by mohl měnit jeho vonné vlastnosti [19].

Filly a kol. [108] získali esenciální oleje z levandule několika různými destilačními technikami – hydrodestilací, parní destilací podporovanou mikrovlnným ohřevem (MSD) a hydrodestilací podporovanou mikrovlnným ohřevem s enzymatickou úpravou (EAMHD). Výsledky jejich výzkumu jsou uvedené v Tabulce 1. Dosáhli výtěžností esenciálního oleje z levandule 4,55 % (HD), 5,40 % (MSD) a 4,58 % (EAHD). Hlavními složkami esenciálního oleje byly linalol (32,7 – 24,0 %), linalylacetát (29,6 – 12,3 %) a kafr (7,0 – 8,3 %) (Tabulka 1) [108].

3.3.2 Parní destilace

Parní destilace je upřednostňovaná pro destilaci termolabilních sloučenin. Typicky se jedná o aromatické sloučeniny [19]. Vodní pára vzniká v destilační baňce a prochází přes destilovaný materiál (rostlinnou matici), kde je obohacena o esenciální olej. Jak pára stoupá přes rostlinný materiál, způsobuje otevření olejových buněk a uvolnění esenciálních olejů. Jednotlivé složky oleje se odpařují a odvádí se do chladiče, kde pára zkondenzuje a v separátoru poté dojde k oddělení esenciálního oleje od hydrolátu. Vydestilovaný olej se jako v případě hydrodestilace většinou drží na povrchu vodní fáze, proto jej lze lehce odebrat [18, 19].

Chemat a kol. [109] porovnali výtěžnost a složení esenciálního oleje získaného z levandule pomocí tradiční parní destilace a parní destilace podporované mikrovlnným ohřevem za stejných podmínek. Esenciální oleje získané oběma metodami jsou ve svém složení velmi podobné. V obou esenciálních olejích byl nalezen stejný počet sloučenin s podobným procentuálním zastoupením. Výtěžnost destilace byla 8,86 % z MSD a 8,75 % z SD. Značnou výhodou MSD je úspora času (10 minut při MSD versus 90 minut při SD) a energie [109].

3.3.3 Modifikované destilace

Destilace podporovaná mikrovlnným ohřevem (MAD) je jednou z modifikací tradiční SD či HD, kde je na vzorek s vodou aplikován mikrovlnný ohřev. Rozdíly mezi konvenční destilací vodou či vodní parou a MAD jsou zejména ve vynaložené energii potřebné k získání EO, ale také úspoře času a získání většího výtěžku kvalitnějšího esenciálního oleje [50, 110].

Flamini a kol. [50] použili hydrodestilaci podporovanou mikrovlnným ohřevem (MHD) k získání esenciálního oleje z bobkového listu. Vzorek usušeného bobkového listu byl nastříhán

a vložen do 1000 ml baňky, která obsahovala 650 ml destilované vody. Parametry mikrovlnného ohřevu byly následující: mikrovlnná energie do 800 W při 2450 MHz v pulsním vlnovém režimu a maximálním výkonu 8 kW a energie 300 W v kontinuálním režimu po dobu 1 h. Výtěžnost EO MAD v pulsním režimu činila 0,65 % a byla nižší v porovnání s klasickou HD, kde byla výtěžnost 0,78 %. Naopak u MAD v kontinuálním režimu byla výtěžnost nejvyšší 1,13 %. Z čehož vyplývá, že neúčinnější se jeví MAD v kontinuálním režimu [50].

V posledních letech je jedním z alternativních přístupů k získání kvalitního esenciálního oleje enzymatická extrakce. Její hlavní výhodou je environmentální kompatibilita, vysoká účinnost a jednoduché provedení. Hydrolytické enzymy interagují s buněčnou stěnou, narušují ji a v důsledku toho snadno uvolní intracelulární obsah rostlinných materiálů. Enzymatické předúpravy vzorku využila při MHD (EAMHD) skupina Jiao a kol. [111] k získání silice ze zlatice převislé. Prokázali, že EAMHD měla o 1 % větší výtěžnosti než MHD a HD, a navíc vykazovala i větší antimikrobiální účinnost.

3.4 Soxhletova extrakce

Při Soxhletově extrakci se jemně rozemletý rostlinný materiál umístí do patrony ze silného filtračního papíru, který se vloží do extrakčního nástavce Soxhletovy aparatury. Extrakční rozpouštědlo v baňce se zahřívá a jeho páry kondenzují v kondenzátoru a extrakční činidlo stéká do patrony s rostlinným materiálem a extrahuje jej. V momentě, kdy hladina tohoto rozpouštědla dosáhne určité hladiny, přeteče zpět do baňky s rozpouštědlem, odkud bylo původně odpařeno. Tento proces je kontinuální [1]. Soxhletova extrakce je značně nevýhodná zejména díky délce celého extrakčního procesu a velké spotřebě organických rozpouštědel. Eikani a kol. [112] získali esenciální olej z levandule Soxhletovou extrakcí. Celý proces trval celkem 12 hodin a spotřebovalo se při něm 200 ml *n*-hexanu. Získaný esenciální olej obsahoval borneol (19,0 %), linalol (18,3 %) a eukalyptol (11,8 %). V porovnání s hydrodestilací, bylo identifikováno stejné množství těkavých sloučenin v obou esenciálních olejích, avšak hydrodestilace trvala pouze 3 hodiny a spotřebovalo se při ní 120 ml destilované vody [112].

3.5 Zelené extrakce

V posledních letech se téměř všechny extrakční procesy ve farmaceutických, kosmetických a potravinářských průmyslech zakládají na použití organických těkavých rozpouštědel, které pocházejí z neobnovitelných zdrojů (např. ropa). Tyto procesy, potažmo použítá rozpouštědla, mají a v budoucnu budou mít stále větší dopad na lidské zdraví a životní prostředí.

Hlavní výhodou těchto rozpouštědel je snadná výroba a jejich chemické vlastnosti. Paradoxem je, že při procesech, které využívají těchto rozpouštědel, je velice často potřeba obrovské množství energie, velký objem rozpouštědel a výtěžnost extrakce bývá velice malá. Proto se hledají ekonomičtější a ekologičtější alternativy pro tyto postupy. Ideální alternativní rozpouštědlo by mělo mít vysokou rozpouštěcí sílu, vysoký bod vzplanutí, nízkou toxicitu s nízkým dopadem na životní prostředí a mělo by být biologicky rozložitelné. Dále by mělo být získáno ideálně z obnovitelných zdrojů a mělo by být snadno recyklovatelné bez škodlivých účinků na životní prostředí. Nalezení výše popsaného rozpouštědla je velice náročným úkolem, proto se ve většině případů jedná o kompromis vlastností a je potřeba se rozhodnout o použití optimálního rozpouštědla v závislosti na použitém extrakčním procesu, rostlině a cílových biomolekulách. V současnosti je kladen stále větší důraz na ochranu životního prostředí, bezpečnost a na vývoj „zelené chemie“ (z anglického Green Chemistry), potažmo „zelených extrakcí“. Proto je hledání alternativních rozpouštědel k současným rozpouštědlům pocházejícím převážně z ropného průmyslu hlavním cílem chemických výzkumníků. Existuje několik variant zelených extrakcí jako je extrakce bez použití rozpouštědel, extrakce vodou v podkritickém stavu, extrakce nadkritickým CO₂, extrakce s použitím iontových kapalin či eutektických rozpouštědel [110].

3.5.1 Extrakce bez použití rozpouštědel

Mezi bez-rozpouštědlové extrakce je řazeno například lisování za studena, ale i jiné novější techniky uvedené níže. Výhodou je snížení nákladů a rizik spojených s použitím organických rozpouštědel. Existuje několik moderních technik, které zahrnují extrakci bez použití rozpouštědla k izolaci primárních i sekundárních metabolitů rostlin a využívají různých mechanismů jako je okamžitý regulovaný pokles tlaku, pulzní elektrické pole nebo mikrovlnné záření (MW). Jsou to inovativní techniky, které umožňují zkrátit dobu extrakce z několika hodin na několik minut, protože nedochází k destilaci rozpouštědla, eliminují následné odstranění odpadu a obvykle je potřeba jen zlomek energie oproti konvenčním technikám extrakce založených na organických rozpouštědlech. Při mikrovlnné extrakci bez použití rozpouštědla (SFME) je extrahován čerstvý rostlinný materiál bez přídavku rozpouštědla. Princip extrakce je založen na tom, že rostlinné buňky obsahující vodu jsou stimulovány ohřevem, který produkuje MW záření a v momentě, kdy vzroste teplota a tlak v buňce, dojde ke zvětšení buňky a následné ruptuře buněčné stěny, kdy je uvolněn její obsah. Existuje také modifikovaná SFME, kdy je nádoba s rostlinným materiálem otočena dnem dolů a po aplikaci MW záření a uvolnění kapalného extraktu začne působit hydrodifúze a gravitační síla a extrakt

se tak oddělí a odvede z reaktoru. Tyto techniky byly doposud aplikovány na několik různých vzorků aromatických rostlin, citrusů, cibule, nebo ovoce [113].

Filly a kol. [108] použili pro extrakci esenciálního oleje z levandule SFME, konkrétně mikrovlnný reaktor. Celkem 125 g usušeného rostlinného materiálu bylo na 10 minut ponořeno do 500 ml destilované vody. Poté byl rostlinný materiál vytažen z vody a vložen do mikrovlnného reaktoru. Extrakce probíhala 45 minut. Výtěžnost extrakce byla 5,4 % [108].

3.5.2 Extrakce vodou v podkritickém stavu

Použití vody jako extrakčního činidla má několik výhod. Je cenově dostupná, netoxická, nehořlavá a neprodukuje polutanty. Od nepaměti je používána pro extrakci biomolekul z potravy a rostlinných materiálů, například při výše zmíněné maceraci. Avšak je často nevhodná pro extrakci nepolárních a semipolárních sloučenin. Extrakce vodou v podkritickém stavu (SWE, resp. PHWE) [114] vyžaduje specifické vybavení pro dosažení podkritických podmínek vhodných pro vodu. Voda v podkritickém stavu se objevuje při teplotách mezi jejím bodem varu a kritickým bodem (100 °C při tlaku 0,1 MPa a 374 °C při tlaku 22,1 MPa) za dostatečně vysokých tlaků, tak aby bylo možné tento stav udržet. Na polaritu vody má větší účinek teplota, než tlak a za ideálních podmínek jsou organické molekuly více rozpustné ve vodě za podkritických podmínek díky její nižší polaritě. Lze tak vyextrahovat i analyty nepolárního charakteru. Při nižší teplotě vody v podkritickém stavu je možné vyextrahovat více polárních látek, za normálního stavu vody v ní rozpustných, a naopak při vysokých teplotách vody v podkritickém stavu je možné vyextrahovat méně polární látky [115-117].

Eikani a kol. [112] získali esenciální olej z levandule pomocí SWE. Extrakce trvala 30 minut a byly použity 4 g rostlinného materiálu. Esenciální olej obsahoval zejména borneol (16,1 %), linalol (29,2 %) a eukalyptol (14,6 %) [112]. Jayawardena a kol. [118] použili také SWE k extrakci esenciálního oleje ze skořicové kůry. Extrakce trvala 30 minut stejně jako v případě Eikani a kol. a byly použity 2 g rostlinného materiálu. Byly zkoumány tři různé teploty vody v nadkritickém stavu a to 100, 150 a 200 °C a byly získány výtěžky 0,68; 0,71 a 1,50 %. Výsledky byly porovnány s parní destilací, která poskytla výtěžek esenciálního oleje 0,80 %. Esenciální oleje získané SWE obsahovaly nižší počet těkavých sloučenin než esenciální olej získaný SD [118].

3.5.3 Extrakce nadkritickým CO₂

Extrakce nadkritickou tekutinou je variantou extrakce tuhé látky kapalinou [1]. Pokud má plyn vyšší teplotu, než je jeho kritická teplota a je na něj aplikován dostatečně vysoký tlak (MPa),

pak přechází do stavu tzv. nadkritické tekutiny. Nadkritická tekutina neboli fluidum, má některé vlastnosti typické pro plyny (viskozita), jiné pro kapaliny (hustota). Je vhodná pro extrakci tuhých látek právě díky její nízké viskozitě, protože vzorkem dobře proniká. Nejčastěji se pro extrakci nadkritickou tekutinou používá oxid uhličitý, který je nepolární a tudíž je vhodný pro extrakci nepolárních látek [119]. Jeho hlavní výhodou je jednoduché zplynění a odstranění po dokončení extrakce, environmentální neškodnost a zachování organoleptických vlastností rostlinného materiálu [36]. Extrakce se většinou provádí při mírné teplotě (nad kritickými podmínkami CO₂: 31 °C a 7,38 MPa), díky tomu mohou být tepelně labilní sloučeniny získány bez rozkladu. Obvykle se používají teploty 35 - 60 °C [120-127], ale existují také příklady, kde jsou používány vysoké teploty SFE [128]. Další výhodou je, že extrakt je prostý extrakčního rozpouštědla, protože CO₂ je při pokojové teplotě plynný a z extraktu vytěká [19]. Nevýhodou SFE je vysoká pořizovací cena a práce při vysokých tlacích.

Před vstupem do extraktoru je CO₂ postupně zahříván a tlakován, aby se dostal do nadkritického stavu. Následně je přiveden do extrakční nádoby se vzorkem, která je vyhřátá na teplotu extrakce (nad kritickým bodem CO₂). V tomto bodě rozlišujeme dva typy SFE, a to statickou a dynamickou. Při statické SFE je přiveden CO₂ do extrakční nádoby a ponechán v klidu do ustanovení rovnováhy. Zatímco při dynamické SFE je CO₂ kontinuálně čerpán přes vzorek, který je tak neustále v kontaktu s čerstvým extrakčním rozpouštědlem. V extrakční nádobě dochází k extrakci analytu pomocí difúze CO₂ do porézní matrice. Analyt je odváděn do separátoru, kde se nadkritický CO₂ vrací do původního plynného stavu a analyt je oddělen pomocí gravitace. CO₂ v plynném stavu poté může být vypuštěn do ovzduší, nebo znovu recyklován na nadkritickou tekutinu v závislosti na vybavení přístroje [110].

Reverchon a kol. [129] extrahovali esenciální olej z květů levandule pomocí SFE. Extrakce trvala 45 minut a byly zvoleny následující podmínky pro CO₂: teplota 48 °C a tlak 9 MPa. Výtěžnost extrakce byla 4,9 % a extrakt obsahoval zejména linalylacetát (34,7 %), linalol (25,29 %) a eukalyptol (5,83 %).

Tabulka 1 Srovnání extrakčních technik na příkladu izolace esenciálního oleje z levandule

Extrakční technika	HD	SD	MSD	EAMHD	Soxhletova extrakce	SWE	SFE	SFME
Zdroj	[108]	[109]	[108]	[108]	[112]	[112]	[129]	[108]
Doba extrakce	120 min	60 min	120 min	180 min	12 h	30 min	150 min	45 min
Množství vzorku	250 g	50 g	125 g	250 g	4 g	4 g	100 g	125 g
Množství a typ extrakčního činidla	3000 ml voda	200 ml voda	3000 ml voda	3000 ml voda	200 ml <i>n</i> -hexan	5 l voda	2 kg CO ₂ (průtok 0,8 kg/h)	-
Výtěžnost [%]	4,55	8,75	5,40	4,58	-	-	4,9	5,4
Hlavní složky extraktu [%]	linalol (30,0) linalylacetát (13,7) kafr (7,2)	linalol (46,9) kafr (10,2) linalylacetát (11,9)	linalol (24,0) linalylacetát (29,6) kafr (7,0)	linalol (32,7) linalylacetát (12,3) kafr (8,3)	borneol (19,0) linalol (18,3) eukalyptol (11,8)	borneol (16,1) linalol (29,2) eukalyptol (14,6)	linalylacetát (34,7) linalol (25,3) eukalyptol (5,8)	linalol (27,1) linalylacetát (30,1) kafr (7,8)

3.5.4 Extrakce iontovou kapalinou

Iontové kapaliny se skládají z organického kationtu a organického nebo anorganického aniontu, které mají většinou teploty tání pod 100 °C. Nejběžnější příklady kationtů a aniontů používaných k syntéze IL jsou uvedeny v tabulce 2. Mají výbornou tepelnou, chemickou i elektrochemickou stabilitu, jsou nehořlavé, mají zanedbatelnou těkavost a syntetickou všestrannost [110]. Jsou aprotické a jako rozpouštědlo jsou vhodné pro širokou škálu sloučenin a materiálů nejen přírodního charakteru. Fungují jako dobré stabilizační médium pro enzymy, proteiny a nukleové kyseliny ve srovnání s jinými rozpouštědly. Využívají se pro čištění vyextrahovaných molekul nebo k samotné extrakci z rostlin. Jsou vhodné pro extrakci proteinů, nukleových kyselin, enzymů, protilátek, alkaloidů, esenciálních olejů, vitamínů, aminokyselin, tuků, fenolických látek či karotenoidů [130]. K extrakci výše zmíněných biomolekul lze použít několik extrakčních technik s iontovou kapalinou jako extrakčním činidlem, například extrakci tuhá látka-kapalina (SLE), včetně využití ultrazvukové a mikrovlnné extrakce, nebo extrakce na tuhé fázi (SPE), kde jsou na použitých sorbentech navázané modifikované IL. Hlavním důvodem pro využití IL jako extrakčního činidla je to, že mnohé konvenčně používané techniky jsou neselektivní, mají nízkou extrakční účinnost, velkou energetickou a časovou náročnost a obvykle obsahují toxická a těkavá organická rozpouštědla, což vede ke znečištění životního prostředí. Velmi výhodné jsou především již zmiňované extrakce iontovou kapalinou podporované mikrovlnným zářením nebo ultrazvukem (UZ), neboť mají vyšší účinnost extrakce a menší časovou náročnost. Bylo prokázáno, že extrakce využívající iontové kapaliny jako rozpouštědlo, pomocné rozpouštědlo nebo jako podpůrný materiál poskytují vyšší výtěžek extrakce a lepší čistící schopnosti ve srovnání s tradičními rozpouštědly [130]. Nevýhodou IL je, že jsou málo biokompatibilní a biologicky nerozložitelné. Proto je v současné době trend směřován k syntézám přírodních IL pocházejících z přírodních zdrojů, jako jsou lipidy, aminokyseliny a kyseliny [110]. Příklady extrakcí s využitím iontových kapalin jsou uvedené v tabulce 3.

Tabulka 2 Příklady složení kationtů a aniontů v iontových kapalinách

Iontové kapaliny	
Kationt	Aniont
Tetraalkylamonium	Hexafluorofosfát
Tetraalkylfosforium	Chlorid/Bromid
Alkylmethylimidazolium	Glykolát
Trialkylsulfonium	Tetrafluoroborid

Tabulka 3 Příklady využití iontových kapalin při extrakci bioaktivních molekul z rostlinných materiálů

Extrakce	Další úprava vzorku	Typ iontové kapaliny	Iontová kapalina	Matrice (latinský název)	Analyt	Instrumentální technika	Zdroj
ILMAE	-	hydrofilní	[C ₄ Mim]Br	Kudzu (<i>Pueraria lobata</i>)	isoflavonoidy	LC-UV	[131]
ILMAE	destilace	hydrofilní	[C ₄ Mim]Br	Rakytník řešetlákový (<i>Hippophae rhamnoides</i>)	flavonoidy	LC-UV	[132]
ILMAE	rozpuštěno ve vodě	hydrofilní	[BMIm]Br	Řemdihák plstnatý (<i>Uncaria tomentosa</i>)	alkaloidy	LC-UV	[133]
ILSLE	-	hydrofilní	[C ₄ Mim]Cl	Paulinie nápojná (<i>Pauillinia cupana</i>)	kofein	UV/Vis spektroskopie	[134]
ILSLE	-	surfaktant	[C _n Mim]Cl	Pepřovník černý (<i>Piper nigrum</i>)	piperin	LC-UV	[135]
ILMAE	vakuum	hydrofilní	[C ₆ Mim][BF ₄]	Jeřáb tianshanský (<i>Sorbus tianschanica</i>)	rutin, hyperosid, hesperidin	LC-UV	[136]
ILMAE	-	hydrofilní	[HO ₃ SC ₄ Mim][HSO ₄]	Pomelo (<i>Citrus maxima</i>)	naringinin, pektin	LC-UV	[137]
ILMAE	extrakce <i>n</i> -hexanem	hydrofilní	[BMIm][HSO ₄]	Chlorela (<i>C. sorokiniana</i>)	Lipidy	GC-MS po derivatizaci	[138]

Extrakce	Další úprava vzorku	Typ iontové kapaliny	Iontová kapalina	Matrice (latinský název)	Analyt	Instrumentální technika	Zdroj
ILMAE	-	hydrofilní	[HO ₃ S(CH ₂) ₄ Mim]HSO ₄	Blahovičník kulatoplodý (<i>Eucalyptus globulus</i>)	kyselina ellagová a gallová	LC-UV	[139]
ILUAE	-	hydrofilní	[C ₁ Mim][BF ₄]	Angínovník čínský (<i>Belamcandae chinensis</i>)	flavonoidy	LC-UV	[140]
ILUAE	ABS	hydrofilní	[BMIm][N(CN) ₂]	Toješť (<i>Apocynum venetum</i>)	flavonoidy	LC-UV	[141]
ILUAE	-	hydrofilní	[AmIm]Br	Barvínkovec růžový (<i>Catharanthus roseus</i>)	alkaloidy	LC-UV	[142]
ILSPE	rozpuštěno ve vodě	hydrofilní	DIMCARB	Akácie katechová (<i>Acacia Catechu</i>)	taniny	LC-MS	[143]

3.5.4.1 Extrakce tuhá látka – kapalina s využitím iontových kapalin

IL-SLE zahrnují použití vodných roztoků IL, čistých IL nebo kombinace IL s organickým rozpouštědlem k extrakci a izolaci bioaktivních sloučenin jako jsou terpeny, fenolické látky nebo lignin. Rostlina nebo její část je přímo smíchána s roztokem iontové kapaliny a je optimalizována teplota extrakce, poměr kapalně fáze (rozpouštědlo) a tuhé fáze (rostlina) (l/s) a doba extrakce. Často je SLE kombinována s UAE a MAE za účelem zrychlení celého procesu, zvýšení extrakční účinnosti a snížení množství použitého rozpouštědla. Z tohoto hlediska lze SLE rozdělit na jednoduchou IL-SLE, IL-MAE a IL-UAE [130].

Celý postup IL-MAE, respektive IL-UAE je založen na tom, že po smíchání rostlinného materiálu s iontovou kapalinou je aplikována na reakční směs mikrovlnná nebo ultrazvuková energie, která značně urychlí a zefektivní celý proces extrakce. Kromě doby extrakce a poměru l/s je potřeba optimalizovat mikrovlnné záření/ultrazvukové vlnění. Mikrovlnné záření má velice krátkou vlnovou délku a jeho frekvence leží mezi 300 MHz a 30 GHz. Má podobné vlastnosti jako infračervené záření, které je schopno se odrážet a absorbovat. Hlavním důvodem použití MW je v podstatě zahřátí produktu. MAE je rychlá technika a rychlost ohřevu je vyšší než u běžných topných těles. Teplota je v celém objemu jednotná. Frekvence ultrazvuku je nižší než u mikrovln a pohybuje se v rozmezí 20 kHz až 10 MHz. Ultrazvuková vlna ovlivňuje přenos hmoty při průchodu přes médium. Tyto vlny vytvářejí uvnitř tekutin bubliny, které jsou známé jako kavitační bubliny, ty pak rozbijí buňku a uvolní biomolekuly, respektive usnadní difúzi rozpouštědla k biomolekulám. Rozdíl mezi MAE a UAE je v tom, že při MAE je přenos hmoty ve vzorku urychlován rychlým zahříváním, zatímco při UAE je přenos hmoty urychlen mechanicky. Pro méně teplotně stabilní bioaktivní molekuly je proto lepší UAE bez ohřevu [130].

3.5.4.2 Extrakce tuhou fází s využitím iontových kapalin

Extrakce tuhými fázemi využívá tuhé materiály jako stacionární fázi s navázanou iontovou kapalinou, která absorbuje biomolekuly z kapalného extraktu. Kapalná povaha iontových kapalin zmizí v momentě, kdy se imobilizují na tuhém nosiči, které je obvykle z polymeru nebo silikagelu. Při této extrakci je potřeba optimalizovat poměr s/l, délku alkylového řetězce iontové kapaliny, teplotu a dobu extrakce. Iontové kapaliny s kratšími řetězci navázanými na imidazolium vykazují vyšší extrakční účinnost. V extrakci IL-SPE jsou preferovány spíše IL na bázi imidazoliového kationtu, který je zodpovědný za specifické interakce s analytem, jako je vodíková vazba či π - π interakce, které zvyšují extrakční účinnost [130].

3.5.5 Extrakce s použitím eutektických rozpouštědel

Eutektická rozpouštědla (DES), jsou podtřída IL, která je v posledních letech alternativou za IL, které nejsou biokompatibilní. DES mohou být připraveny smícháním tuhých sloučenin, které vytvoří eutektickou směs s bodem tání nižším, než byl jejich původní bod tání. Tento fenomén vzniká zejména díky intermolekulárním vodíkovým vazbám mezi vodíkovým akceptorem a donorem [4]. Hlavním rozdílem mezi IL a DES je rozdílná vazebná interakce, IL pojí vazba iontová, zatímco DES pojí vazba vodíková. DES mají mnoho fyzikálně-chemických vlastností stejných jako IL, jako je vysoká viskozita, nehořlavost, chemická a termální stabilita. Navíc mají oproti IL několik výhod, jako je jednoduchost jejich skladování, syntéza a nižší cena výchozích produktů potřebných k jejich syntéze a v neposlední řadě jsou netoxické. Existují také DES syntetizované z přírodně vyskytujících se výchozích materiálů (NADES). V tabulce 4 jsou uvedeny nejběžnější příklady kombinací výchozích produktů k syntéze jak DES, tak NADES. NADES jsou kromě všech výše zmíněných výhod DES šetrné k životnímu prostředí a jsou biodegradabilní díky jejich přírodnímu původu, tudíž i jejich extrakty mohou být dále použité bez dalších úprav v potravinářství, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Jsou schopné rozpustit nespočet biomolekul nerozpustných ve vodě i lipidech. NADES mohou být klasifikované podle jejich původu do 4 skupin: deriváty organických kyselin, deriváty chloridu cholinu, směsi sacharidů a další kombinace [110]. Bylo vyextrahováno několik polárních i nepolárních primárních a sekundárních metabolitů z rostlinných materiálů pomocí DES a ukázalo se, že tato rozpouštědla poskytují extrakty s vyššími výtěžky za kratší dobu ve srovnání s komerčními organickými rozpouštědly. Většinou se DES kombinuje s UAE a MAE [4, 86]. Vzhledem ke svému přírodnímu složení se NADES jeví jako vynikající kandidát pro nahrazení konvenčních organických rozpouštědel. Kromě toho mají také vysoké stabilizační a solubilizační schopnosti. Jsou levnější, jejich příprava je jednoduchá a jsou bezpečnější, vzhledem k jejich netoxičnosti a netěkavosti [110].

Tabulka 4 Příklady kombinací výchozích produktů pro syntézu DES a NADES

Konvenční DES	
Akceptory vodíkové vazby	Donory vodíkové vazby
	močovina
cholin chlorid	4-chlorfenol

Akceptory vodíkové vazby	Donory vodíkové vazby
cholin chlorid	kyselina mléčná
glukóza	kyselina jablečná

3.6 Mikroextrakce

Trendem v analytické chemii není jen použití ekologických materiálů, ale současně i automatizace a miniaturizace metod přípravy vzorků k analýze za účelem redukovat či eliminovat množství rozpouštědla při zachování nebo dokonce zlepšení citlivosti [144]. Typickými příklady miniaturizovaných technik v oblasti přípravy vzorků k analýze je mikroextrakce tuhou fází (SPME) [87] a její různé modifikace a mikroextrakce kapalnou fází (LPME) a její modifikace [145, 146]. Souhrnná tabulka s mikroextrakčními technikami a jejich výhody a nevýhody jsou popsány v Tabulce 5.

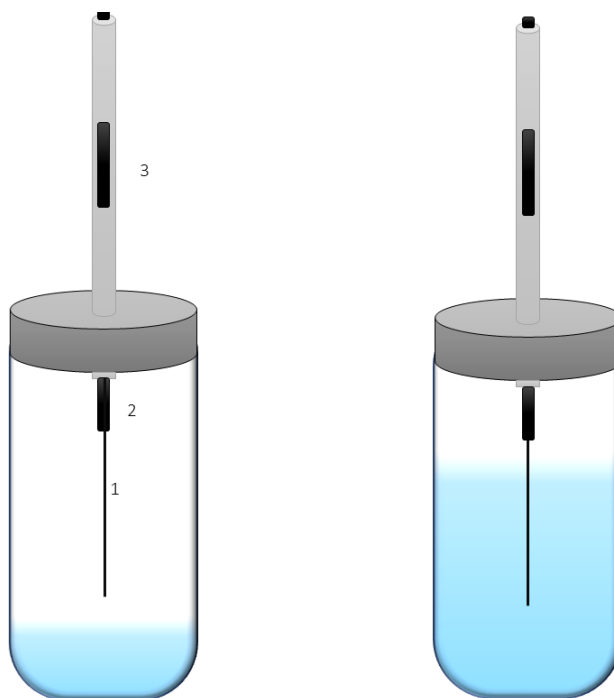
3.6.1 Mikroextrakce tuhou fází a její modifikace

3.6.1.1 Mikroextrakce tuhou fází

SPME je jednoduchá a rychlá extrakční technika, která pro přípravu vzorku nepotřebuje rozpouštědlo. Její výhodou je, že do jednoho kroku můžeme integrovat vzorkování, izolaci i obohacení analytu. Obvykle je malé množství extrakční fáze (sorbentu) navázáno na nosné médium (tenké křemenné nebo ocelové vlákno) a uloženo v duté ocelové jehle. Sorbent je po určitou dobu vystaven vzorku, kde dochází buď k adsorpci, nebo absorpci, podle použitého sorbentu. Následně je vlákno zataženo zpět do ocelové jehly a vpraveno do nástřikového prostoru chromatografického systému, kde dochází k desorpci analytu. Výběr vhodného sorbentu hraje klíčovou roli v účinné extrakci. Sorbenty se vybírají v závislosti na vlastnostech analytu, jako je molekulová hmotnost, těkavost a polarita. Desorpce probíhá buď teplem, anebo rozpouštědlem, v závislosti na následně použité analytické metodě k separaci a analýze vzorků. SPME se nejčastěji kombinuje s plynovou chromatografií (GC) [87, 89-91, 93, 147, 148] a méně s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) [149, 150].

Existují dva základní módy vzorkování v SPME, a to přímý (DI-SPME) a headspace (HS-SPME), jak je zobrazeno na Obrázku 1. V režimu DI-SPME je vlákno se sorbentem přímo ponořeno do roztoku vzorku a analyty jsou extrahovány na vlákno přímo z matrice. Extrakční proces může urychlit míchání vzorku. V módu HS-SPME je vlákno se sorbentem umístěno

v parním prostoru nad temperovanou maticí vzorku, kde jsou extrahovány těkavé látky obsažené ve vzorku. Výhodou je, že tímto režimem vzorkování lze zabránit zanesení nečistot do chromatografického systému z matrice [148]. Existuje také několik dalších modifikací SPME jako je mikroextrakce na míchadle potaženým tuhým sorbentem (SBSE) [151], mikroextrakce v jehle mikrostríkačky pomocí tuhého sorbentu (MEPS) [152], nebo mikroextrakce ve špičce mikropipety pomocí tuhého sorbentu (PT-SPE) [153].



Obrázek 1 Mikroextrakce tuhou fází v uspořádání headspace (vlevo) a přímé vzorkování

1 – sorbent na křemenném vlákne, 2 – dutá ocelová jehla, 3 – držák SPME s pístem

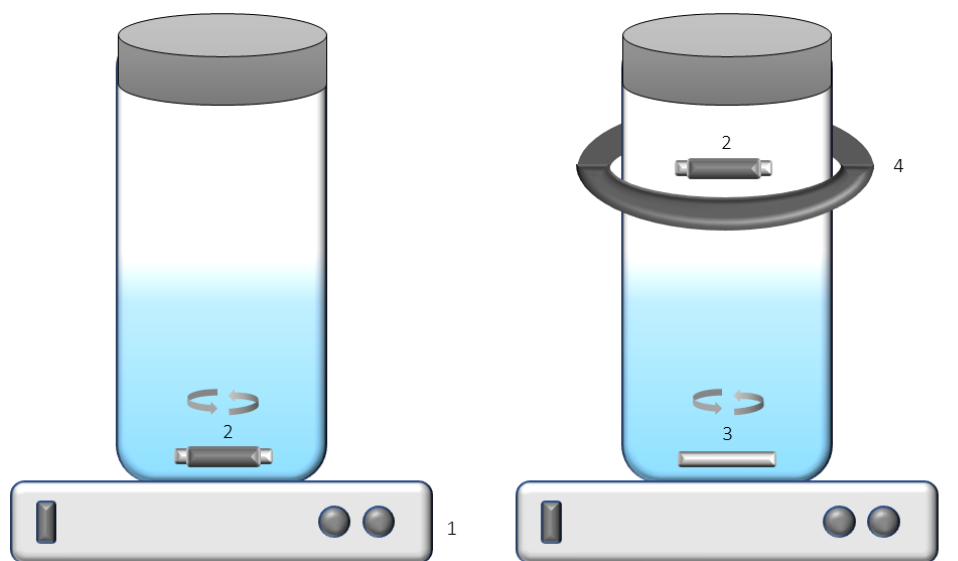
Přepřacováno z [154]

Lyczko a kol. [155] použili HS-SPME k porovnání vlivu sušících metod na složení extraktu z levandule. Extrakční doba HS-SPME probíhala po dobu 30 minut a poté byly analyty tepelně desorbovány přímo do chromatografického systému GC-MS. Bylo vyextrahováno a identifikováno přes 100 těkavých složek z levandulových listů. Nejvíce zastoupenými sloučeninami byly *p*-cymen-8-ol (4,09 %), *o*-cymen (4,81 %), bornylacetát (5,57 %), karyofylen (6,11 %) a eukalyptol (7,28 %). Výsledkem studie byl prokazatelný vliv sušícího procesu na složení aromaprofilu levandule [155].

3.6.1.2 Mikroextrakce na míchadle

Mikroextrakce využívající extrakce na magnetické míchadlo s vrstvou stacionární fáze je modifikací extrakce tuhou fází, tedy principem je sorpční extrakce. Používá se zejména k extrakci těkavých sloučenin [151, 156]. Magnetické míchadlo je pokryté vrstvou sorbentu

(0,5-1 mm), obvykle polymethylsiloxanem, a je vloženo přímo do kapalného vzorku při uspořádání přímém (direct), nebo nad kapalným vzorkem při uspořádání headspace, kde dochází k sorpci požadovaných sloučenin za konstantního míchání, jak je zobrazeno na Obrázku 2. Analyt je extrahován na extrakční fázi na základě rozdělovacího koeficientu oktanol-voda a fázového poměru. Stejně jako v případě klasické SPME je analyt po extrakci desorbován teplem v případě GC analýzy nebo rozpouštědlem v případě HPLC analýzy. Hlavní výhodou SBSE oproti SPME jsou vysoké obohacovací faktory díky větší sorpční kapacitě povrchu míchadla [87, 151, 156, 157].



Obrázek 2 Mikroextrakce na míchadélku potaženým sorbentem v uspořádání zleva direct a headspace

1 – míchadlo, 2 – magnetické míchadélko potažené sorbentem, 3 – magnetické míchadélko, 4 – magnetický kroužek

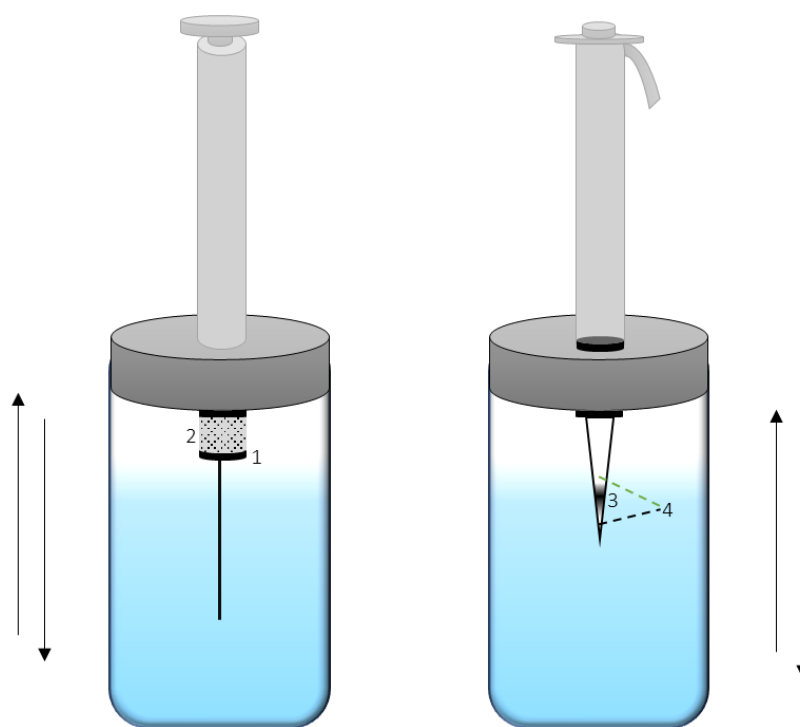
Přepřacováno z [156]

Vararu a kol. [158] extrahovali aromatické sloučeniny z grepového moštu pomocí SBSE s míchadélkem potaženým polymethylsiloxanem. Nepolární sloučeniny byly extrahovány z 1 ml vzorku grepového moštu po dobu 100 minut. V extraktu bylo identifikováno celkem 50 aromatických sloučenin pomocí GC-MS.

3.6.1.3 Mikroextrakce v jehle mikrostříkačky pomocí tuhého sorbentu

MEPS je další modifikací SPE, kdy je sorbent umístěn ve speciálně upravené jehle mikrostříkačky, jak je zobrazeno na Obrázku 3. Vlastní extrakční proces je shodný s extrakcí na tuhém vlákně, ale je miniaturizovaný a pracuje s objemy vzorků 10-1000 μ l. Při této metodě je malé množství sorbentu, obvykle 1-2 mg, vloženo a utěsněno přímo do jehly mikrostříkačky o objemu 100-250 μ l nebo mezi jehlu a mikrostříkačku, do které je poté nasát vzorek. Vzorek

je přes sorbent prosáván dvakrát, a to při nasátí vzorku do stříkačky a podruhé při jeho vytlačení ven. Lze použít prakticky jakýkoliv sorpční materiál, stejně jako u konvenčních SPE technik. Nejvíce se používají sorpční materiály na bázi silikagelu (C2, C8, C18) nebo organických polymerů [152]. Zachycené sloučeniny jsou poté vymyty vhodným rozpouštědlem přímo do chromatografické kolony, buď GC nebo LC, podle požadované aplikace. Výhodou této techniky je její jednoduchost, rychlost provedení a vyžaduje pouze velice malé objemy vzorku a rozpouštědla v porovnání s konvenční SPE. Navíc je možná i semi a plná automatizace MEPS, kdy je offline nebo online zapojena do LC a GC systémů [159, 160]. Principem totožná extrakce je mikroextrakce tuhým sorbentem umístěným ve špičce pipety (PT-SPE), kdy je sorbent umístěn ve špičce mikropipety mezi dvěma fritami (Obrázek 3). Kuželová patrona s malým vnitřním průměrem a malým množstvím sorbentu (cca 50 mg) je umístěna ve špičce mikropipety. Má stejné výhody jako MEPS, je to dostupná, levná, jednoduchá technika, která je snadno automatizovatelná a omezuje spotřebu rozpouštědel a vzorku [147, 153].



Obrázek 3 Mikroextrakce v jehle mikrostříkačky (vlevo) a mikroextrakce tuhým sorbentem ve špičce mikropipety (vpravo)

1 – frit, 2,3 – sorbent, 4 – vata

Přepřacováno z [160]

Mercolini a kol. [161] zkoumali bioaktivní fenolické frakce v extraktech listů arganovníku. 25 g usušených a namletých listů bylo nejprve extrahováno 250 ml 70% ethanolu po dobu

24 hodin. Po přefiltrování byla k extraktu přidána voda a směs byla oddělena v rotační odparce. Ve vodném extraktu zůstali hydrofilní sloučeniny a v organickém extraktu lipofilní sloučeniny. Obě frakce byly zředěny methanolem na požadovanou koncentraci a dále zfiltrány. Následně byla použita jako čistící technika MEPS pro vodný i organický extrakt. Sorbent ve stříkačce byl aktivován pomocí 200 μl methanolu a poté ekvilibrován 200 μl ultračisté vody. Do stříkačky byla nasáta směs 100 μl vodného extraktu, 100 μl organického extraktu a 5 μl vnitřního standardu. Následně byla tato směs 10 krát nasáta do stříkačky tam a zpět. Sorbent byl poté promyt 100 μl vody a 100 μl směsi voda:methanol (90:10, v:v). Nakonec byly analyty eluovány 500 μl methanolu. Eluent byl poté usušen pod vakuem a rozpuštěn ve 100 μl methanolu a dávkován do kapalinového chromatografu s Uv/Vis detektorem a hmotnostním spektrometrem. Celkem bylo v extraktu identifikováno 8 fenolických sloučenin [161].

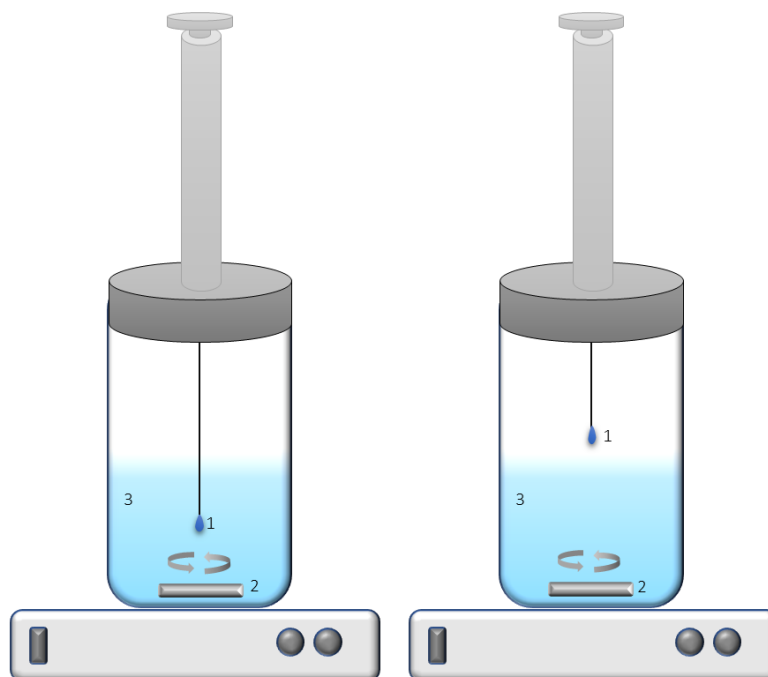
3.6.2 Mikroextrakce kapalnou fází a její modifikace

Mikroextrakce kapalnou fází je miniaturizovaná verze extrakce kapalina-kapalina, která využívá k extrakci pouze několik μl rozpouštědla, oproti klasické LLE, kde jsou zapotřebí řádově desítky ml. Tyto techniky jsou plně kompatibilní s GC a HPLC. V LPME se extrakce obvykle provádí v malém množství rozpouštědla nemísitelného s vodou a z vodného roztoku obsahujícího analyty. Řadí se sem především mikroextrakce v jedné kapce rozpouštědla (SDME), disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME) a mikroextrakce kapalnou fází v dutém vlákně (HF-LPME) [162, 163].

3.6.2.1 Mikroextrakce v jedné kapce rozpouštědla

Mikroextrakce v jedné kapce rozpouštědla je jednou z modifikací mikroextrakce kapalnou fází, kdy je mikropapka organického rozpouštědla, o objemu obvykle 1-3 μl , nemísitelného s vodou, zachycena na hrotu jehly mikrostríkačky. Tato technika je vhodná pro nepolární a málo polární analyty. První aplikací v roce 1996 bylo použití teflonové tyčinky, na které byla zavěšena kapka *n*-oktanu, ta byla ponořena do míchaného vodného roztoku obsahující analyt při určité teplotě a po stanoveném čase se vyjmula a nadávkovala do GC [164]. Později byla teflonová tyčinka nahrazena hrotem mikrostríkačky, čímž se technika zjednodušila [165]. Kapka s analytem se po skončení extrakce vtáhne zpět do mikrostríkačky a dávkuje přímo do chromatografického systému. Výhodou SDME je, že není potřeba použití žádného speciálního zařízení, tedy jinak řečeno tato metoda je velice jednoduchá. Existují dvě základní uspořádání SDME – přímé (DI) a headspace (HS) vzorkování (Obrázek 4). DI-SDME spočívá v tom, že kapka organického rozpouštědla na špičce stríkačky je ponořena přímo do vodného roztoku obsahující analyt. Je vhodná pro středně polární až nepolární analyty v závislosti na použitém rozpouštědle [163].

Při HS-SDME je kapka organického rozpouštědla s vysokou teplotou varu ve styku s parním prostorem vzorku a extrahují se do ní těkavé látky [166]. Její hlavní výhodou oproti DI-SPME je možnost širšího výběru rozpouštědel, a navíc lze použít jako rozpouštědlo i vodu k extrakci těkavých látek rozpustných ve vodě [163]. Mimo těchto uvedených uspořádání ještě existuje dynamická extrakce SDME, která lze realizovat na hrotu nebo přímo uvnitř stříkačky [165]. Mezi hlavní výhody SDME patří prakticky nulová spotřeba rozpouštědel, tudíž i nízká cena. Nevýhodou je dlouhý extrakční čas, horší stabilita kapky a náročnost manipulace.



Obrázek 4 Mikroextrakce v jedné kapce rozpouštědla v uspořádání zleva direct a headspace

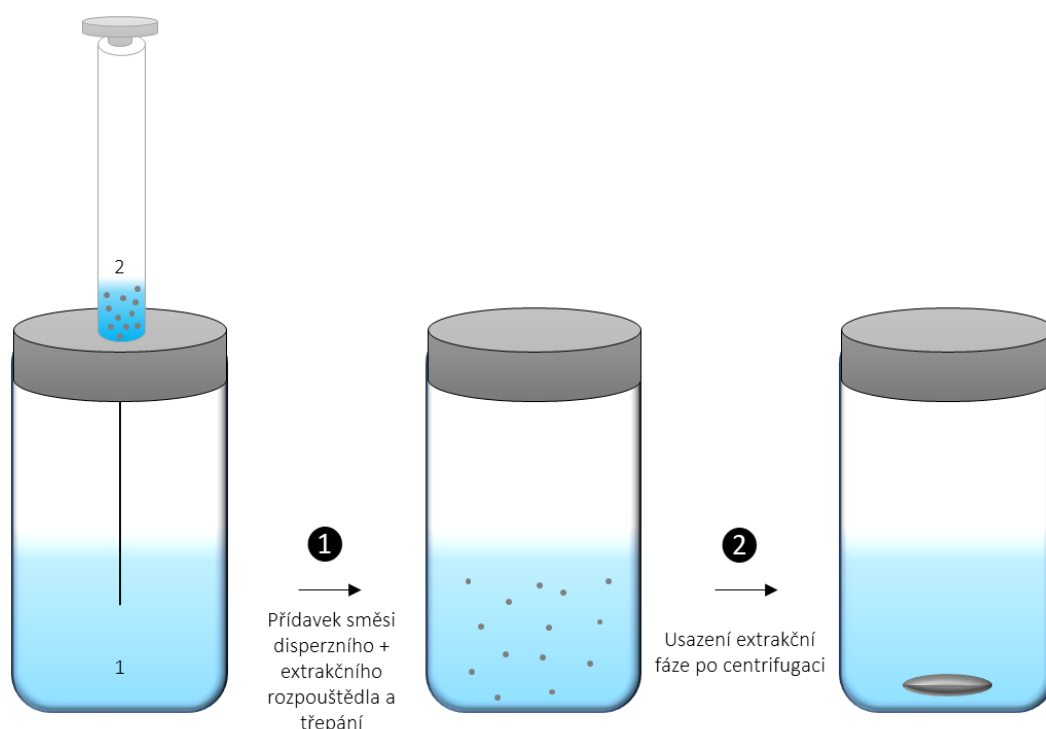
1 – organické rozpouštědlo, 2 – magnetické míchadlo, 3 – vodný roztok s analytem

Přepřacováno z [167]

Moradi a kol. [168] extrahovali těkavé sloučeniny z myrty pomocí HS-SDME, kterou porovnávali s HD. Mikrokapka *n*-oktadekanu o objemu 3 μ l obsahovala interní standard (mentol) a byla umístěna nad rostlinný vzorek (0,6 g) po dobu 30 minut. Poté byla kapka vtažena do mikrostříkačky a extrakt byl nadávkován přímo do GC-MS systému. Oproti tomu pro hydrodestilaci bylo použito 50 g vzorku a doba destilace byla 100 minut. V extraktu z hydrodestilace bylo identifikováno celkem 22 těkavých sloučenin, zatímco v extraktu z HS-SDME 18. Hlavními sloučeninami v obou extraktech byl α -pinen, limonen a eukalyptol v různých procentuálních zastoupeních. Autoři uvádějí, že dle dosažených výsledků může být metoda HS-SDME použita pro extrakci a separaci těkavých sloučenin z rostlin [168].

3.6.2.2 Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakční a disperzní rozpouštědlo (např. methanol, ethanol, aceton) jsou společně přidány do vodného roztoku obsahujícího analyt (Obrázek 5). Po protřepání vznikne zakalený roztok, který se po určitou dobu centrifuguje. Extrakční fáze se usadí a odebere. Výhodou této techniky je rychlost, jednoduchost, nízká spotřeba rozpouštědla a velké obohacovací faktory. Nevýhodou je složitější výběr extrakčního rozpouštědla, které musí být těžší než voda (např. brombenzen, chloroform) [163].



Obrázek 5 Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny

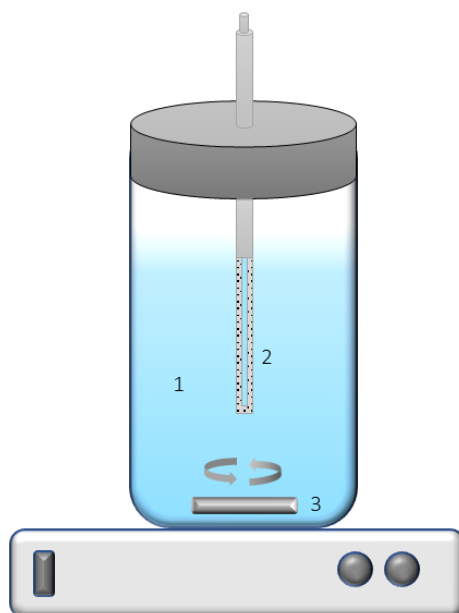
1 – vodný roztok s analytem, 2 – extrakční a disperzní rozpouštědlo

Přepřacováno z [146]

Meira a kol. [169] použili DLLME k extrakci sekundárních rostlinných metabolitů z methanolového extraktu keře mimosa. Studovali celkem 19 kombinací extrakčního a disperzního rozpouštědla. Pomocí GC-MS identifikovali celkem 283 sloučenin, z nichž 14 zvolili pro kvantitativní analýzu. Metoda je dle autorů jednoduchá, rychlá, má vysoký obohacovací faktor a je šetrná k životnímu prostředí díky nízké spotřebě organických rozpouštědel [169].

3.6.2.3 Mikroextrakce kapalnou fází v dutém vlákne

Do lahvičky s vodným roztokem vzorku je umístěno hydrofobní porézní duté vlákno (Obrázek 6). Před extrakcí se duté vlákno několikrát ponoří do organického rozpouštědla, aby došlo k imobilizaci daného rozpouštědla v pórech vlákna, které vytvoří v pórech tenkou vrstvu. Rozpouštědlo je nemísitelné s vodou, čímž se zabrání jeho úniku z pórů dutého vlákna v momentě ponoření do vzorku. Analyt přechází z vodného prostředí do vlákna a extrahuje se do organického rozpouštědla. Extrakční rozpouštědlo musí být kompatibilní s dutým vláknem, tak aby zaplnilo kompletně všechny póry. Dále musí mít dobrou afinitu k požadovaným sloučeninám, být nemísitelné s vodou a být minimálně těkavé. Výhodou této techniky je prakticky nulová spotřeba rozpouštědla a nízká cena. Nevýhodou je naopak náročná manipulace a možnost kontaminace vlákna [163].



Obrázek 6 Mikroextrakce kapalnou fází v dutém vlákne

1 – vodný roztok s analytem, 2 – porézní duté vlákno s organickým rozpouštědlem, 3 – magnetické míchadlo

Přepřacováno z [145]

Hadjmohammadi a kol. [170] použili HF-LPME v kombinaci s HPLC k extrakci flavonoidů z máty peprné. Nejprve vzorek máty extrahovaly v roztoku methanol:voda (60%, v:v) okyseleném HCl. Poté do methanolového extraktu vložili duté vlákno napuštěné extrakčním rozpouštědlem a po určitou dobu probíhala extrakce za stálého míchání. Poté byl extrakt z vlákna vysát mikrostříkačkou a nadávkován přímo do chromatografického systému. Celkem

bylo stanoveno 6 flavonoidů v získaném extraktu. Autoři uvádějí, že metoda je citlivá, spolehlivá s vysokým obohacovacím faktorem [170].

Tabulka 5 Srovnání výhod a nevýhod mikroextrakčních technik

Extrakční technika	SPME	SBSE	MEPS	SDME	DLLME	HF-LPME
Zdroj	[144]	[144]	[152, 160]	[144]	[144, 171]	[144]
Čas [min]	5-120	30-240	1-2	10-30	<1	10-120
Množství vzorku	malé	malé	velice malé	malé	malé	malé
Množství extr. rozpuštědla	-	-	-	μl	μl	μl
Množství sorbentu	vrstva 100-250 μm	vrstva 100-3000 μm	2-4 mg	-	-	-
Obohacovací faktor	Vysoký	Vysoký	Vysoký	Vysoký	Vysoký	Vysoký
Cena	Mírná	Mírná	Nízká	Nízká	Nízká	Nízká
Výhody	Bez rozpuštědla, vysoký obohacovací faktor, vysoká účinnost, automatizace, vhodné pro těkavé sloučeniny	Vysoká účinnost zakoncentrování vzorku, vysoká citlivost	Automatizace, rychlá a jednoduchá technika, dobrá extrakční účinnost	Nezávislé na komerčním dodavateli	Vysoká extrakční účinnost, nezávislé na komerčním dodavateli	Nezávislé na komerčním dodavateli, dobrá stabilita

Extrakční technika	SPME	SBSE	MEPS	SDME	DLLME	HF-LPME
Zdroj	[144]	[144]	[152, 160]	[144]	[144, 171]	[144]
Nevýhody	Závislé na komerčním dodavateli, nižší robustnost, pouze pro analýzu	Dlouhá doba k dosažení rovnováhy, nevhodné pro polární sloučeniny, pouze pro analýzu, těžce proveditelná plná automatizace	Snadné ucpání sorbentu, nevhodné pro vysoké objemy vzorku	Horší stabilita kapky, nevhodné pro špinavé vzorky	Vhodné pouze pro kapalné matrice, limitace volby rozpouštědla	Potřeba úpravy membránových pórů, možnost paměťových efektů

4 Metody analýzy těkavých látek v rostlinných extraktech

Pro charakterizaci těkavých látek je požadována vysoká citlivost a specifita použité analytické metody. Těkavé sloučeniny v rostlinných extraktech, především v esenciálních olejích, jsou těkavé a nepolární. Z tohoto důvodu je nejpoužívanější metodou pro analýzu těkavých látek z rostlinných extraktů plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MS) nebo s plamenovým ionizačním detektorem (FID) [31, 172].

4.1 Plynová chromatografie

Principem plynové chromatografie je separace složek směsi mezi mobilní a stacionární fází. Je vhodná pro analýzu těkavých sloučenin, které je možné převést do plynného stavu. Principem separace látek v chromatografickém systému je opakované ustavování rovnováhy analytu mezi mobilní a stacionární fází [119]. Mobilní fází (MF) je v případě plynové chromatografie plyn, nejčastěji helium nebo dusík [31, 39, 104]. Stacionární fáze (SF) je zakotvena v koloně a rozlišujeme fáze polární a nepolární [119, 173]. Analyt je unášen mobilní fází kolonou, kde dochází k separaci. Při průchodu vzorku kolonou dochází k jeho opakované interakci se stacionární fází. Komponenty vzorku jsou opakovanou interakcí se SF selektivně brzděny ve svém pohybu a míra brzdění je úměrná vazebné síle dané interakce [119, 174].

Vlastní analýza těkavých látek v rostlinných extraktech, respektive v esenciálních olejích se provádí separací látek plynovou chromatografií a identifikací v hmotnostním spektrometru [11, 109, 175]. Látky je možné identifikovat dvěma způsoby. První způsob identifikace je na základě porovnání hmotnostního spektra s dostupným standardem. Druhým způsobem je identifikace látek pomocí dostupných knihoven spekter jednotlivých sloučenin. V knihovnách spekter jsou uvedena spektra sloučenin, které byly v hmotnostním spektrometru ionizovány za standardních podmínek elektronovou ionizací při ionizační energii 70 eV. Používá se například knihovna spekter Národního institutu pro standardy a technologii (NIST 14 Mass Spectral Library) nebo Wiley knihovna (Wiley Registry™ of Mass Spectral Data, 11th Edition) [44, 176]. Pro potvrzení identity sloučeniny může sloužit tzv. retenční index. Výpočet retenčního indexu podle van den Doola a Kratze je uveden níže (1). Tento výpočet se používá pro neizotermální analýzu sloučenin. V případě, že analýza probíhá za konstantní teploty, tzn. je izotermální, používá se pro výpočet retenčního indexu vzorec podle Kovatse. Pro výpočet je nezbytné stanovit retenční časy homologické řady alkanů analyzované za stejných separačních podmínek jako vzorek. Vypočítaný retenční index dané sloučeniny identifikované pomocí knihovny spekter se porovná s retenčním indexem dané sloučeniny dostupným z literatury [176].

$$RI = 100 \cdot n + 100 \cdot \frac{(t'_x - t'_n)}{(t'_{n+1} - t'_n)} \quad (1)$$

RI je retenční index analyzované složky, t'_x je redukovaný retenční čas analyzované složky, t'_n je redukovaný retenční čas členu homologické řady s počtem uhlíků n , t'_{n+1} je redukovaný retenční čas členu homologické řady s počtem uhlíků $n+1$.

V případě stanovení relativního zastoupení jednotlivých složek esenciálního oleje se analýza provádí pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem [15], ale ne všechny publikace se tímto řídí a vypočítávají relativní procentuální zastoupení z ploch získaných z GC-MS [155, 158]. Chromatograf s FID detektorem bývá vybaven a nastaven na stejný teplotní program jako v případě GC-MS analýzy. Pro spárování s identifikovanými sloučeninami z GC-MS analýzy se používají van den Doolovy retenční indexy. Nebo lze píky v GC-FID chromatogramech identifikovat a kvantifikovat komerčně dostupnými standardy, které však bývají dostupné pouze pro malou část složek daného EO [39, 176].

4.1.1 Využití hmotnostní spektrometrie v identifikaci složek esenciálních olejů

Hmotnostní spektrometrie ve spojení s plynovou chromatografií se s výhodou používá k identifikaci složek esenciálního oleje, díky možnosti využití rozsáhlých knihoven spekter za použití elektronové ionizace (70 eV). Jak již bylo zmíněno, esenciální oleje jsou směsi nasycených a nenasycených uhlovodíků, alkoholů, aldehydů, esterů, etherů, ketonů, oxidů, fenolů. Hlavní složkou esenciálních olejů jsou terpeny, jejich oxidovaná forma a aromatické sloučeniny odvozené od fenypropenu. V této kapitole je výběr několika typických zástupců sloučenin, které se vyskytují v esenciálních olejích a jsou zde popsány charakteristické štěpení a přesmyky. Neexistuje mnoho literatury zabývající se přímo hmotnostními spektry terpenů a derivátů fenypropenu, proto je v popisu hmotnostních spekter vycházeno ze základních znalostí štěpení a přesmyků obecných uhlovodíků a jejich derivátů.

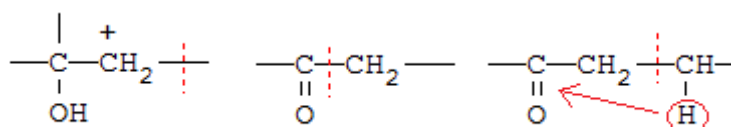
4.1.1.1 Hmotnostní spektra terpenů

Vzhledem k tomu, že terpeny jsou uhlovodíky, je třeba znát základní štěpení a ztráty, které tyto sloučeniny ve hmotnostních spektrech doprovází. Níže v kapitolách je uvedeno několik příkladů interpretace hmotnostních spekter vybraných terpenů nacházejících se v esenciálních olejích.

Reakce v iontovém zdroji při elektronové ionizaci jsou monomolekulární. Ke štěpení molekulárního ion-radikálu dochází přímo nebo přesmykem. Pro acyklické alkany obecně platí, že se přednostně štěpí v místě rozvětvení, protože stabilita vznikajících iontů je v pořadí

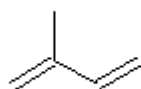
terciární > sekundární > primární. Díky tomuto pravidlu lze poté určit polohu větvení [177]. Charakteristické ztráty pro alkyly jsou následující: $\Delta m/z = 15, 29, 43, \dots$. Ztráta methylové skupiny ($\Delta m/z = 15$) nebývá ve spektru pozorovatelná, pokud je přítomna v bodě větvení řetězce. Ztráta ethylového radikálu ($\Delta m/z = 29$) se vyskytuje i u alkanů s nerozvětveným řetězcem a na rozdíl od ztráty methylu je v hmotnostním spektru pozorovatelná. Intenzivní iont odpovídající ztrátě ethylu téměř vždy ukazuje, že byl připojen v místě rozvětvení řetězce. Dalším intenzivním iontem ve spektru bývá isopropyl s $m/z = 43$, případně iont s $m/z = 41$, který odpovídá ztrátě dvou vodíků z isopropylu [178]. U cyklických alkanů je ztráta methylové skupiny snadná, pokud je přímo připojena na kruh nebo je v poloze můstku mezi dvěma kruhy, proto je i pozorovatelná v hmotnostním spektru. Ztráta ethylu je rovněž, jako v případě methylu, pozorovatelná, pokud je připojena na kruh nebo je v poloze můstku mezi dvěma kruhy. Avšak v mnoha případech je spíše preferována ztráta ethylenu ($\Delta m/z = 27$) [178]. Charakteristické ztráty pro aromáty jsou následující: $\Delta m/z = 38, 39, 50-52, 63-65, 75-78$ [177].

U sloučenin obsahujících kyslík dochází ke ztrátám následujícím: pro aldehydy a ketony $\Delta m/z = 29, 43, 57, \dots$ a pro alkoholy a ethery $\Delta m/z = 31, 45, 59, \dots$. Přednostně u těchto sloučenin dochází k β -štěpení hydroxylové skupiny ($m/z = 43$), které je zobrazeno na Obrázku 7, vlevo. Rovněž může nastat také odštěpení molekuly vody, avšak je pravděpodobnější spíše u primárních než terciárních molekulárních iontů. V některých případech může dojít k termální eliminaci molekuly vody, a to například při vstupu vzorku do iontového zdroje. Pokud je přítomna v molekule keto skupina, je pozorována ztráta 28 hmotnostních jednotek, která odpovídá oxidu uhelnatému a ztráta 29 hmotnostních jednotek, která odpovídá aldehydicke skupině. Převládající je u keto skupin α -štěpení na karbonylu, jak je znázorněno na Obrázku 7, uprostřed. Obvyklé je také β -štěpení s doprovodnou migrací vodíku (Obrázek 7, vpravo). U etherových vazeb je obvykle pozorováno štěpení vazby uhlík-uhlík v poloze β ke kyslíku [178].



Obrázek 7 Typické štěpení pozorovatelné u terpenických sloučenin obsahujících kyslík

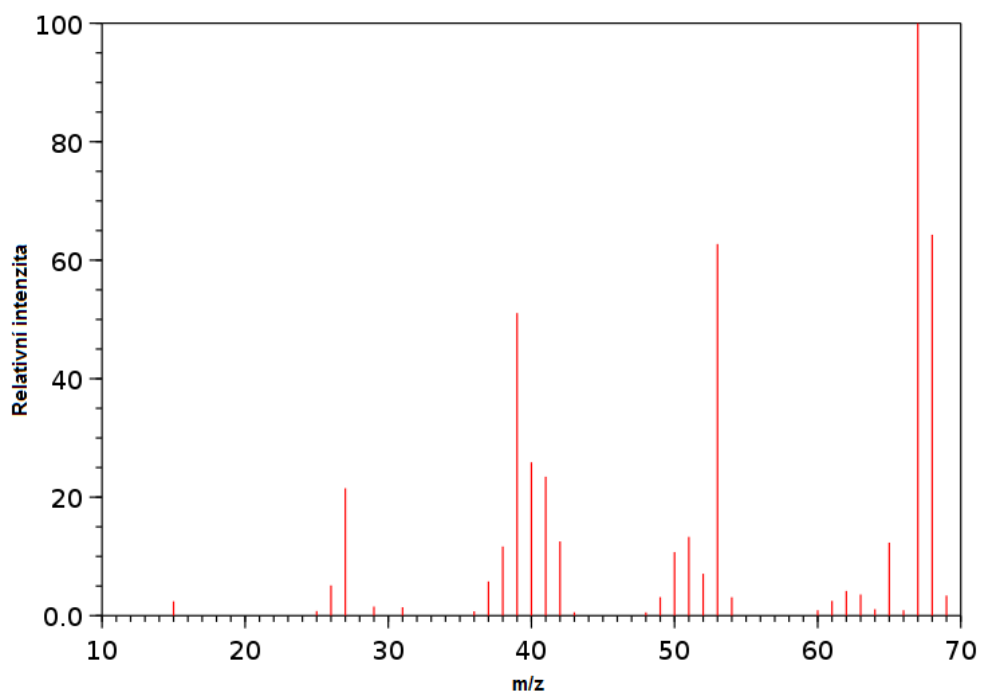
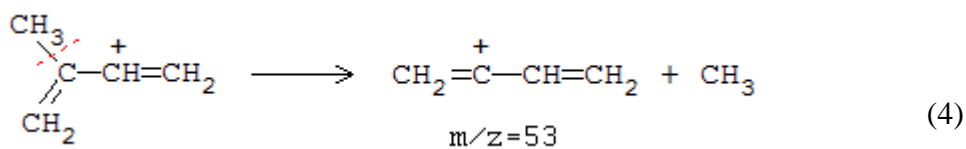
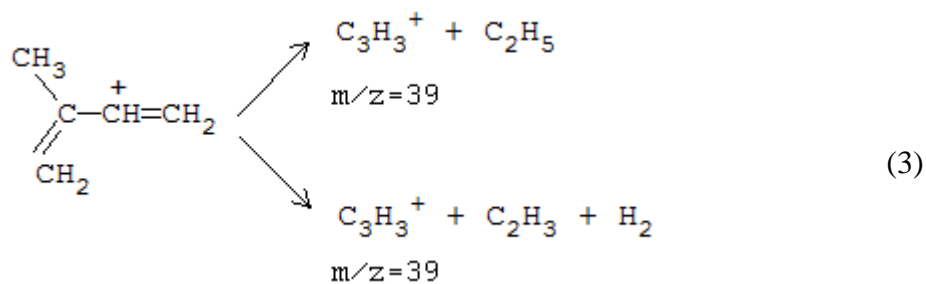
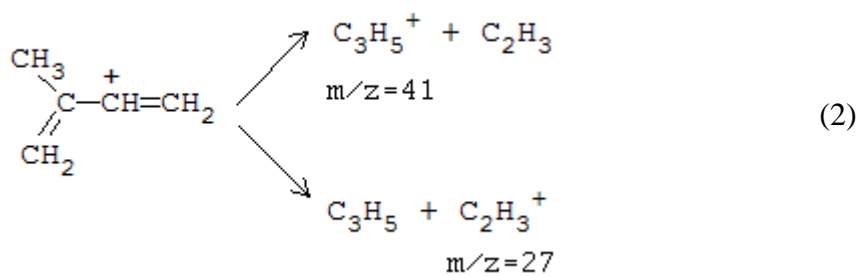
a. Isopren



Obrázek 8 Strukturní vzorec isoprenu

Přepřacováno z NIST Chemistry Webbook [179]

Isopren C_5H_8 je základní stavební jednotkou terpenů [180]. Má charakteristickou strukturu molekuly (Obrázek 8), která koreluje s charakteristickými ztrátami v hmotnostním spektru. Iont prekurzoru má pouze jedno kvartérní centrum, které je primárním zdrojem nestability molekulárního iontu. Molekulární iont má $m/z = 68$. Základním píkem hmotnostního spektra je iont $m/z = 67$, který vznikl odštěpením vodíku z molekulárního iontu. V hmotnostním spektru isoprenu jsou dále pozorovatelné ztráty iontů $\Delta m/z = 53, 41, 39$ a 27 , jak je vidět na Obrázku 9. Z publikovaných spekter uhlovodíků vyplývá, že preferované centrum fragmentace molekulového iontu je v místě větvení řetězce, obecně je odštěpena spíše delší větev řetězce. V následujícím rovnici (2) se získají ionty s $m/z = 41$ odštěpením vinylu z molekulárního iontu. Nejprve přenosem vodíku vznikne stabilní neutrální molekula acetylenu a iontu $C_3H_3^+$ nebo cyklického iontu $C_3H_6^+$. Iont $C_3H_3^+$ s $m/z=39$ je velice stabilní a vzniká buď ztrátou dvou vodíkových atomů nebo molekuly vodíku z iontu $m/z = 41$, nebo dvojitým přesmykem vodíku za vzniku ethylového radikálu, jak je naznačeno v rovnici (3). Nakonec další fragmentace na kvartérním centru vede ke ztrátě methylového radikálu a vzniku iontu $m/z = 53$ (4) [178, 179]. Iont s $m/z = 27$ odpovídá vinylu.



Obrázek 9 Hmotnostní spektrum isoprenu

Převzato z NIST Chemistry Webbook [179]

b. Monoterpeny

Acyklické monoterpeny

Acyklické monoterpeny jsou odvozeny od isoprenu a vznikají dimerizací molekuly isoprenu [178]. Řadí se sem například allo-ocimen a β -myrcen [15].

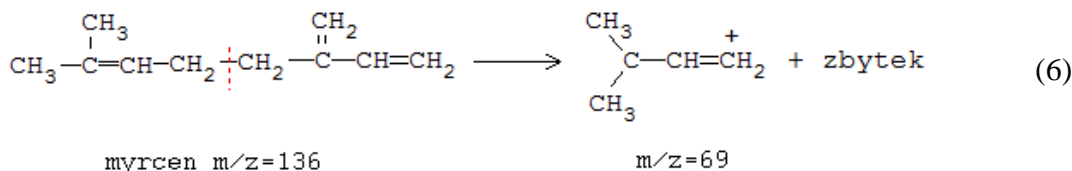
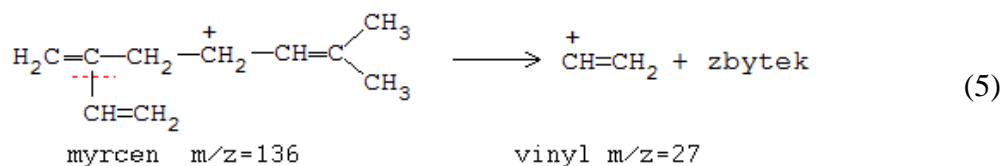
β -myrcen (2-ethenyl-6-methyl-1,5-heptadien)

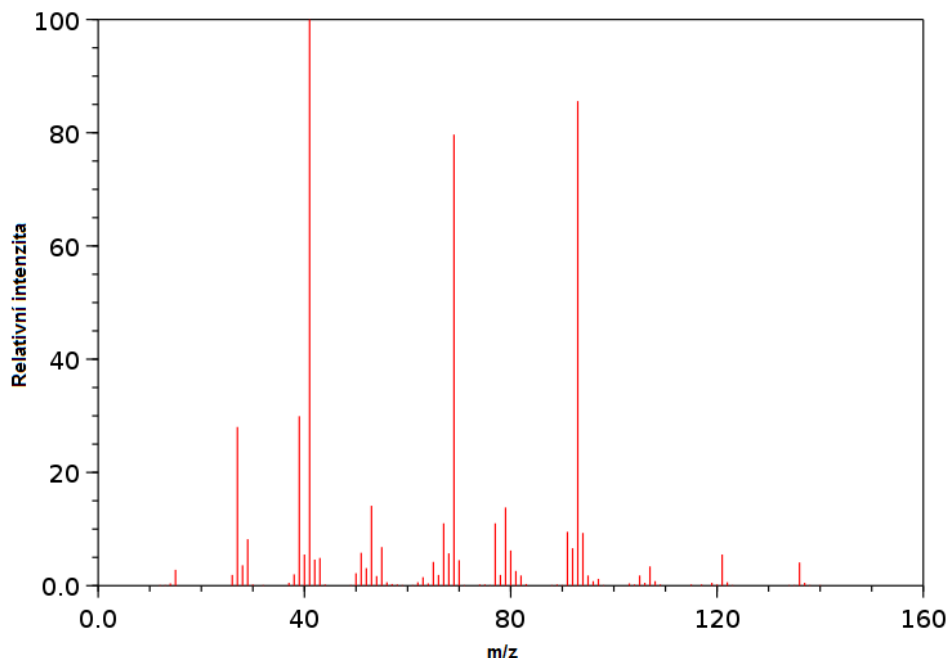
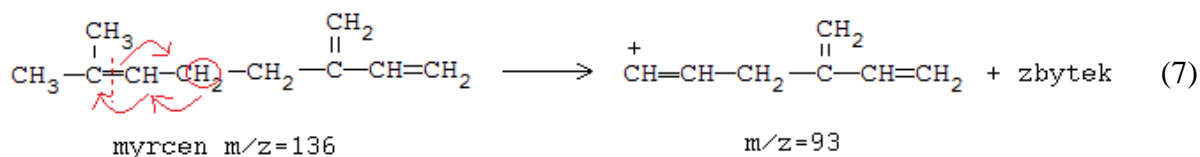


Obrázek 10 Strukturální vzorec β -myrcenu

Přepřacováno z NIST Chemistry Webbook [179]

Myrcen má molekulovou hmotnost 136 a sumární vzorec $C_{10}H_{16}$. Charakteristické ztráty pro myrcen stejně jako v případě isoprenu korelují s jeho strukturou, která je vyobrazena na Obrázku 10. Iont prekursoru má nízkou intenzitu, díky přítomnosti dvou kvartérních center v molekule a dvojně alkenylové vazbě. Oba tyto faktory snižují stabilitu molekulárního iontu, který má $m/z = 136$. Základním píkem spektra je iont $C_3H_5^+$ s $m/z = 41$, kdy se z prvního kvartérního centra odštěpí radikál C_7H_{11} . V hmotnostním spektru myrcenu jsou dále pozorovatelné ionty $m/z = 27, 39, 69$ a 93 , jak je vidět na Obrázku 11. Odstranění fragmentu z jednoho kvartérního centra poskytuje iont s $m/z = 27$ (vinyl, $C_2H_3^+$), jak je popsáno v rovnici (5). Iont s $m/z = 39$ vzniká stejným mechanismem, jako v případě isoprenu. Štěpení popsáno v rovnici (6) poskytuje iont s $m/z = 69$ ($C_5H_9^+$). Zbývající fragment C_5H_7 odpovídá ztrátě $\Delta m/z = 67$. Intenzivní pík s $m/z = 93$ vzniká dvojitým přesmykem vodíku a posunem dvojně vazby, jak je naznačeno v rovnici (7) [178].





Obrázek 11 Hmotnostní spektrum β -myrcenu

Převzato z NIST Chemistry Webbook [179]

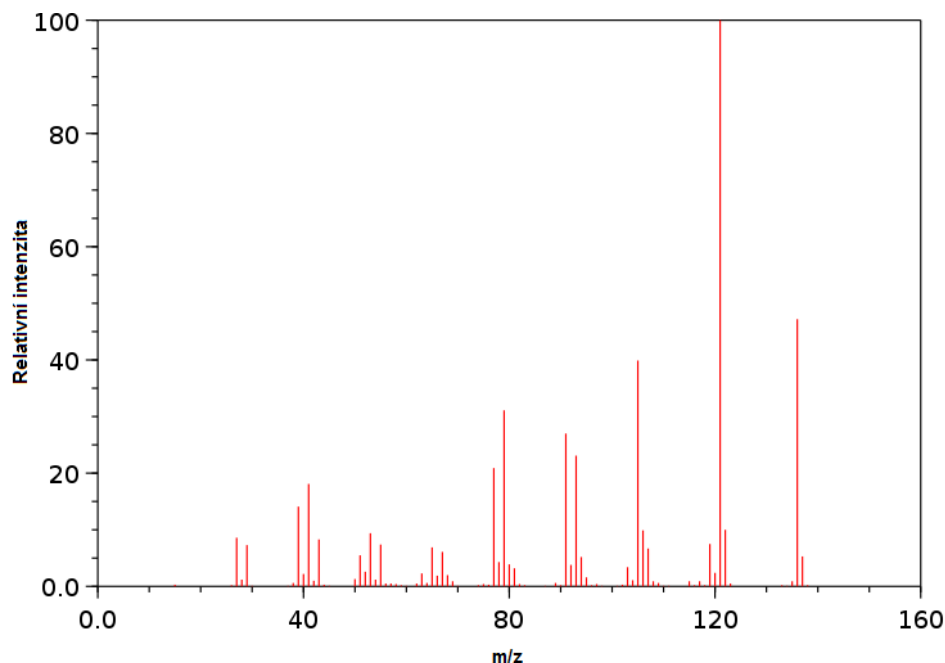
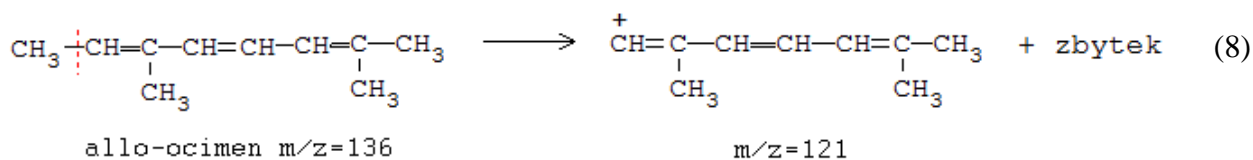
Allo-ocimen (2,6-dimethyl-2,4,6-oktatrien)



Obrázek 12 Strukturální vzorec allo-ocimenu

Přpracováno z NIST Chemistry Webbook [179]

Allo-ocimen (Obrázek 12) s molekulovou hmotností 136 a sumárním vzorcem $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$, má stejně jako myrcen dvě kvartérní centra. Molekulový iont má hodnotu $m/z = 136$ a má ve spektru velkou intenzitu. Základním píkem spektra je iont s $m/z = 121$, jak je vidět na Obrázku 13, který odpovídá ztrátě methylového radikálu, naznačené v rovnici (8). V hmotnostním spektru se objevují také ionty s $m/z = 27$, 41, 93. Z kvartérního centra lehce fragmentuje methylová skupina ($m/z = 15$) a vinylový radikál ($m/z = 27$) [178]. Iont s $m/z = 93$, vzniká stejným principem jako v případě myrcenu.



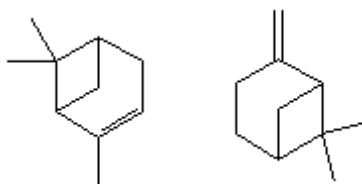
Obrázek 13 Hmotnostní spektrum allo-ocimenu

Převzato z NIST Chemistry Webbook [179]

Cyklické monoterpeny

Pinen

Pinen se v esenciálních olejích objevuje ve dvou izomerech – α a β (Obrázek 14) s molekulovou hmotností 136.

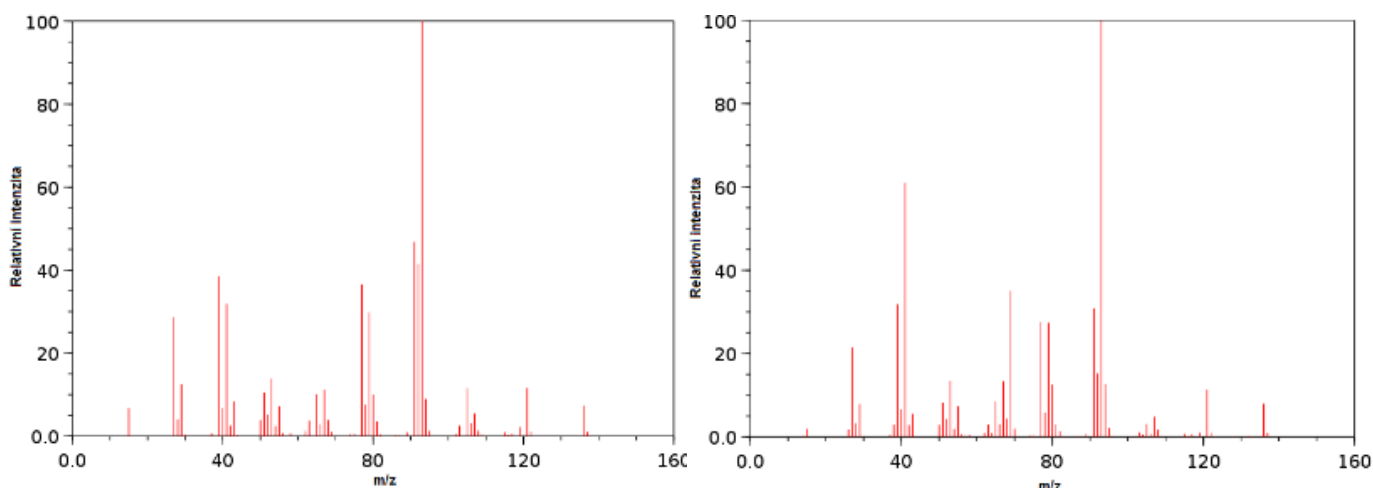


Obrázek 14 Strukturální vzorce α a β -pinenu

Přepracováno z NIST Chemistry Webbook [179]

Ionty prekursoru obou izomerů, odpovídají sumárnímu vzorci $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$, mají oba relativně nízkou intenzitu v hmotnostním spektru. Základní pík ve spektru s $m/z = 93$ odpovídá ztrátě 43 hmotnostních jednotek. Tento komplementární iont s $m/z = 43$ má většinou velmi nízkou intenzitu a odpovídá ztrátě fragmentu C_3H_7^+ . Rozlišit tyto dva izomery od sebe lze díky iontu C_3H_5^+ s $m/z = 41$, který je pro β -pinen více než o polovinu menší než základní pík spektra,

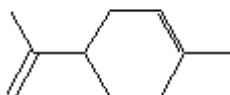
zatímco u α -pinenu je tento iont více než o čtvrtinu menší než základní iont spektra, jak je patrné na Obrázku 15. Dále se v obou spektrech objevují ionty charakteristické pro aromatickou sérii $m/z = 39$. Iont s $m/z = 77$ je charakteristický pro aromatickou sérii s elektrodonorním substituentem na jádře (methyl, ethyl). Tropyliový iont C_7H_{10} s $m/z = 91$ je typický pro alkylaromáty a s intenzitou kolem 30 % je jasné, že na aromátu je navázaný alkyl – propyl a vyšší.



Obrázek 15 Hmotnostní spektrum α -pinenu (vlevo) a β -pinenu (vpravo)

Převzato z NIST Chemistry Webbook [179]

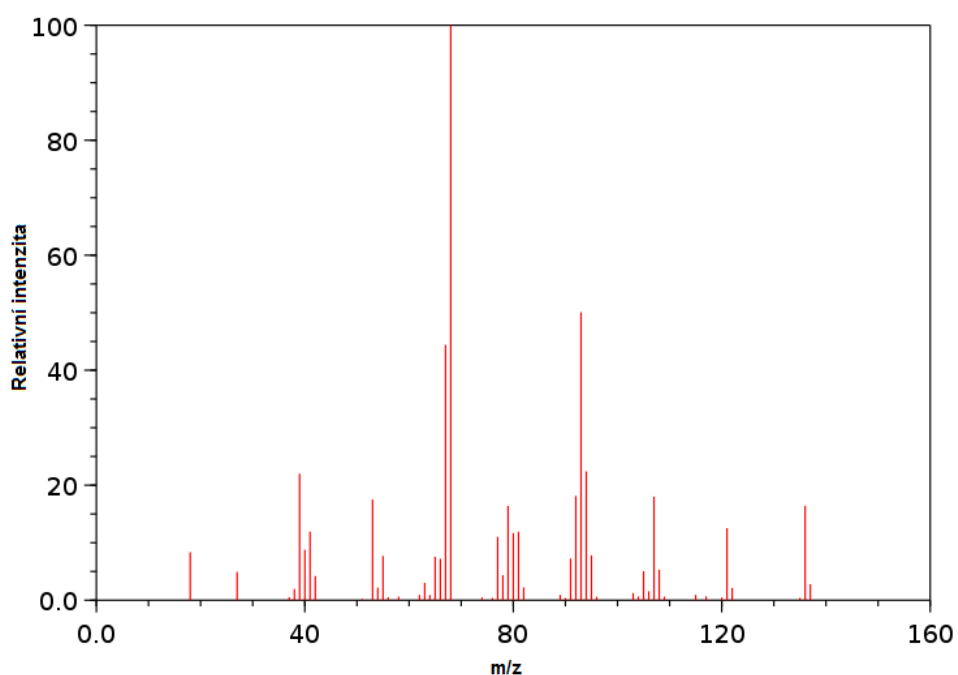
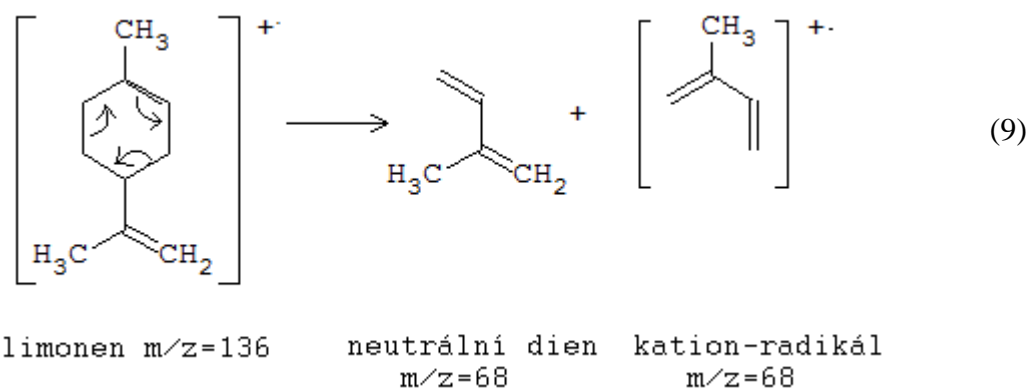
Limonen



Obrázek 16 Strukturální vzorec limonenu

Přepracováno z NIST Chemistry Webbook [179]

Limonen (Obrázek 16) se sumárním vzorcem $C_{10}H_{16}$ má molekulovou hmotnost 136. Základním píkem spektra je iont s $m/z = 68$, který vzniká retro Diels-Alderovou reakcí, která je popsána v rovnici (9) [181, 182]. Molekulární iont $m/z = 136$ je ve spektru viditelný, avšak má nízkou intenzitu. Dále se ve spektru objevují ionty charakteristické pro aromatickou sérii s $m/z = 39$, 77 a 79 , jak je vidět na Obrázku 17. Dalším intenzivním píkem ve spektru je iont $C_7H_9^+$ s $m/z = 93$, odpovídající ztrátě fragmentu C_3H_7 (43 hmotnostních jednotek) z molekulárního iontu a iont $C_5H_7^+$ s $m/z = 67$ vzniklý odštěpením vodíku z neutrální molekuly dienu vzniklého při retro Diels-Alderově reakci.

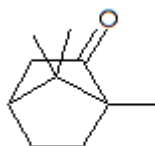


Obrázek 17 Hmotnostní spektrum limonenu

Převzato z NIST Chemistry Webbook [179]

Acyklické a cyklické oxidované monoterpeny

Kafr

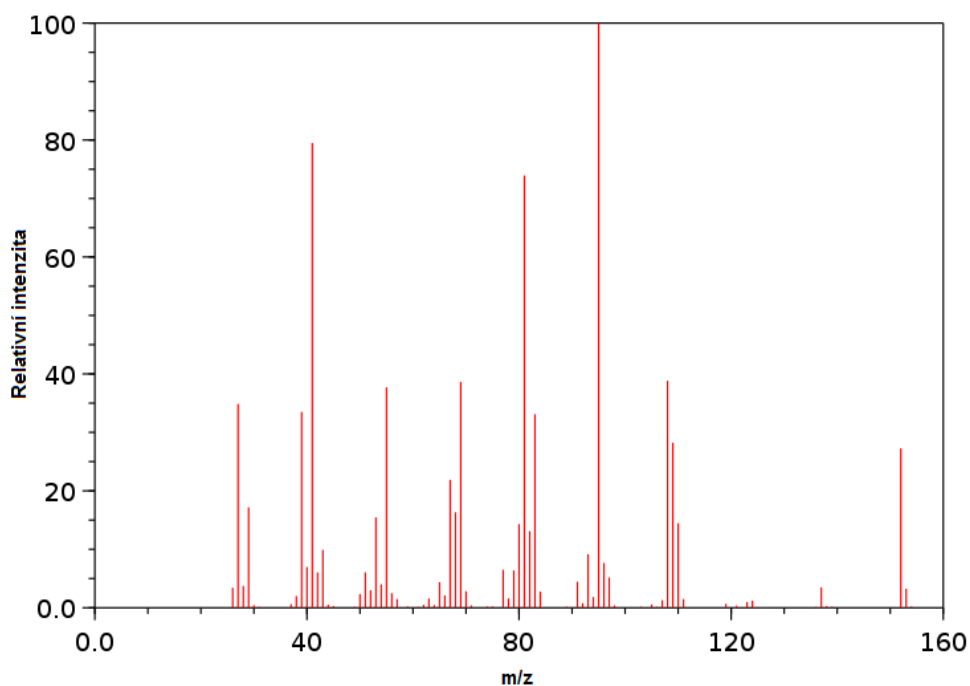


Obrázek 18 Strukturní vzorec kafru

Přepočováno z NIST Chemistry Webbook [179]

Kafr se sumárním vzorcem $C_{10}H_{16}O$ je cyklický monoterpen s keto skupinou a sumárním vzorcem $C_{10}H_{16}$ (Obrázek 18), který má molekulovou hmotnost 152. Základním píkem spektra

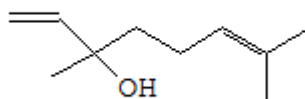
je iont s $m/z = 95$ odpovídající ztrátě 57 hmotnostních jednotek, která náleží typickému fragmentu pro karbonyly C_3H_5O . Molekulární iont $m/z = 152$ je ve spektru viditelný, avšak má nízkou intenzitu, jak je vidět na Obrázku 19. Ionty s $m/z = 41$ a 55 jsou charakteristické ionty pro alkenyly, v tomto případě odpovídají isopropenylu $C_3H_5^+$ a isobutenylu $C_4H_7^+$. A iont $m/z = 81$, který odpovídá ztrátě 71 hmotnostních jednotek náležících karbonylu C_4H_7O .



Obrázek 19 Hmotnostní spektrum kafru

Převzato z NIST Chemistry Webbook [179]

Linalol

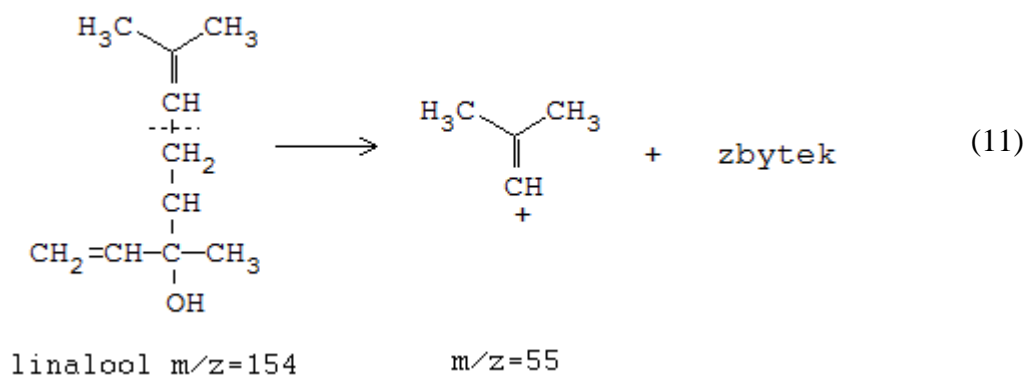
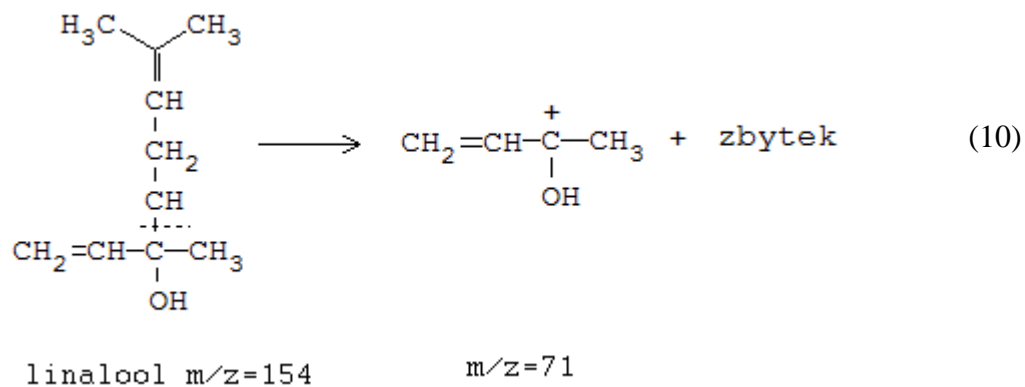


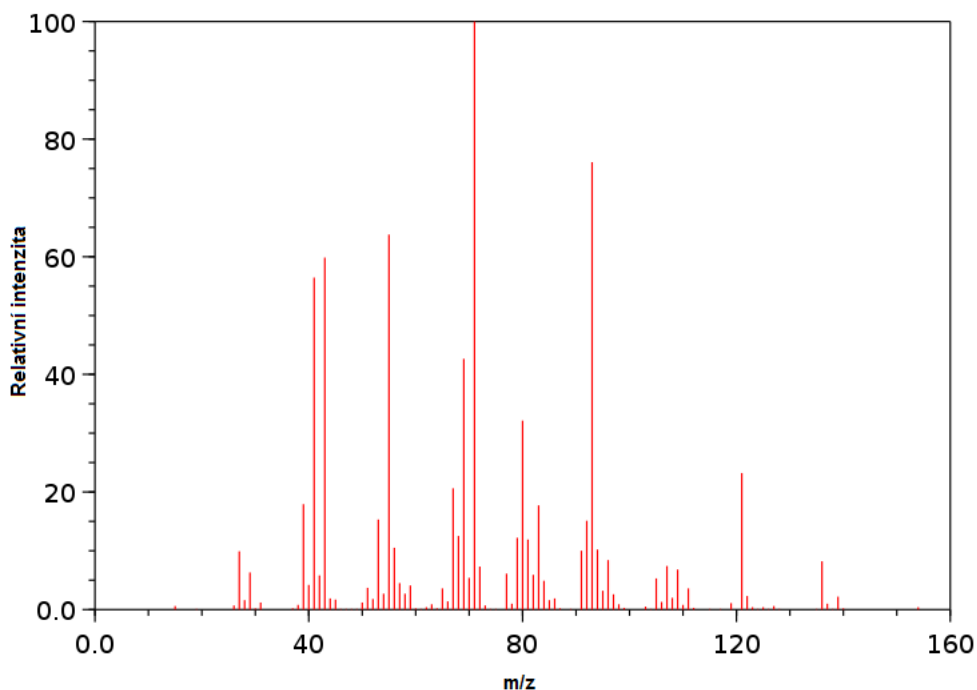
Obrázek 20 Strukturní vzorec linalolu

Přepřacováno z NIST Chemistry Webbook [179]

Linalol se sumárním vzorcem $C_{10}H_{18}O$ je acyklický monotерpen s OH skupinou (Obrázek 20), který má molekulovou hmotnost 154. Základním píkem spektra je iont $C_4H_7O^+$ s $m/z = 71$, který vzniká α -štěpením na karbonylu, jak je naznačeno v rovnici (10). Molekulární iont s $m/z = 154$ ve spektru není téměř rozpoznatelný. Dalšími ionty, které můžeme pozorovat v hmotnostním spektru (Obrázek 21) jsou $m/z = 41, 43, 55, 93, 121$ a 136 . Odštěpením

molekuly vody z molekulárního iontu vznikne iont s $m/z = 136$. Následnou fragmentací tohoto iontu vzniká po odštěpení methylového radikálu iont s $m/z = 121$ nebo po odštěpení isopropylu iont s $m/z = 93$. Iont $C_4H_7^+$ s $m/z = 55$, charakteristický pro alkenyly, vzniká odštěpením fragmentu podle mechanismu naznačeného v rovnici (11). Iont s $m/z = 43$ je charakteristický pro iont s karbonylovou skupinou, v tomto případě $C_2H_3O^+$. Ionty s $m/z = 41$, charakteristický pro alkenyly, v tomto případě odpovídají isopropenylu $C_3H_5^+$.





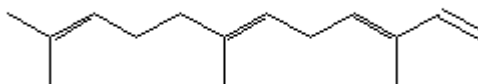
Obrázek 21 Hmotnostní spektrum linalolu

Převzato z NIST Chemistry Webbook [179]

c. Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou terpeny skládající se ze tří isoprenových jednotek. Příkladem seskviterpenů je farnesen.

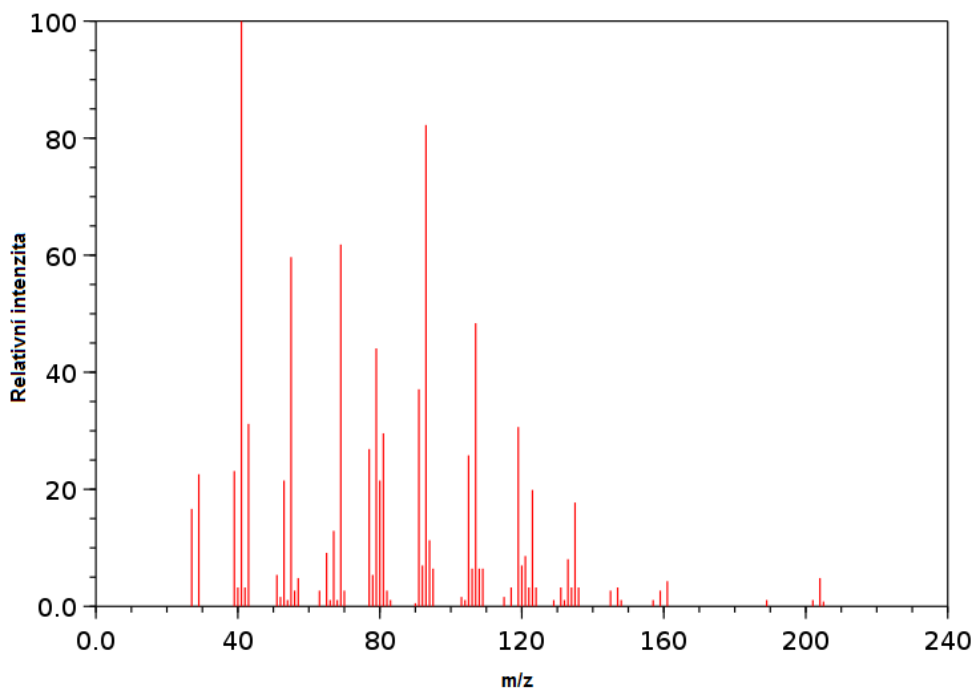
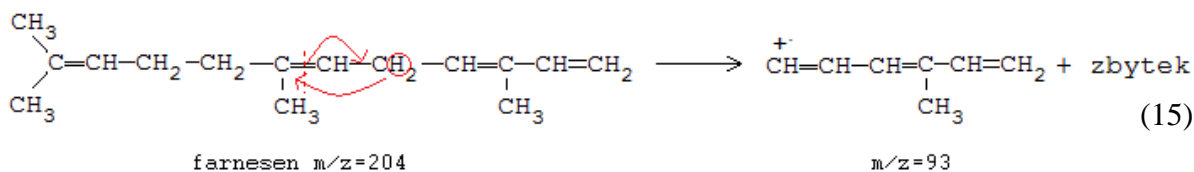
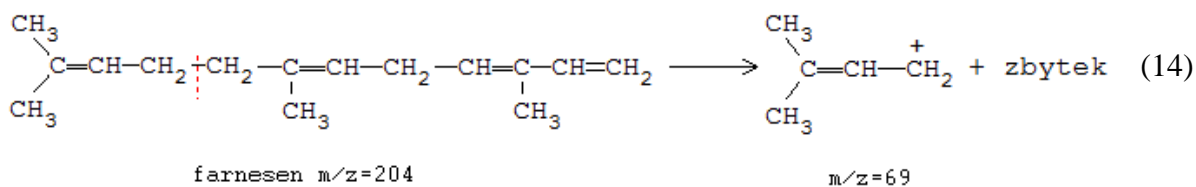
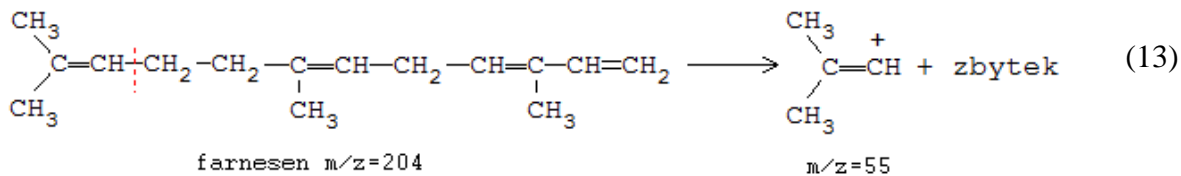
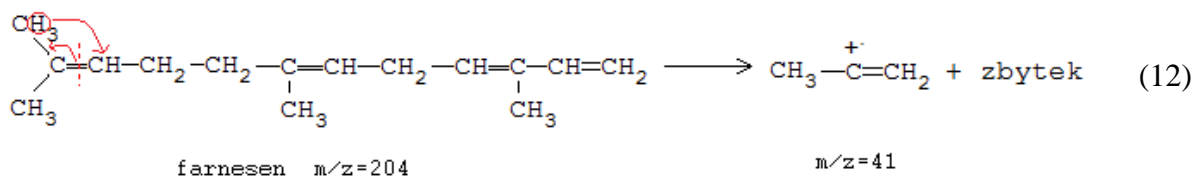
Farnesen



Obrázek 22 Strukturální vzorec farnesenu

Přepracováno z NIST Chemistry Webbook [179]

Farnesen se sumárním vzorcem $C_{15}H_{24}$ je acyklický seskviterpen (Obrázek 22), který má molekulovou hmotnost 204. Základním píkem spektra je iont $C_3H_5^+$ s $m/z = 41$, který vzniká α -štěpením doprovázeným migrací dvojné vazby a přesmykem vodíku, jak je naznačeno v rovnici (12). Dalšími ionty, které můžeme pozorovat v hmotnostním spektru farnesenu (Obrázek 23) jsou $m/z = 55, 69$, nebo 93 . Iont $C_4H_7^+$ s $m/z = 55$ vzniká β -štěpením podle rovnice (13). Iont $C_5H_9^+$ s $m/z = 69$ vzniká štěpením molekulárního iontu podle rovnice (14). Iont $C_7H_9^+$ s $m/z = 93$ vzniká dvojitým přesmykem vodíku a migrací dvojné vazby v molekulárním iontu podle rovnice (15).



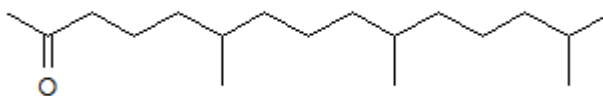
Obrázek 23 Hmotnostní spektrum farnesenu

Převzato z NIST Chemistry Webbook [179]

d. Diterpeny

Diterpeny jsou terpeny skládající se ze čtyř isoprenových jednotek. Příkladem diterpenu je fyton.

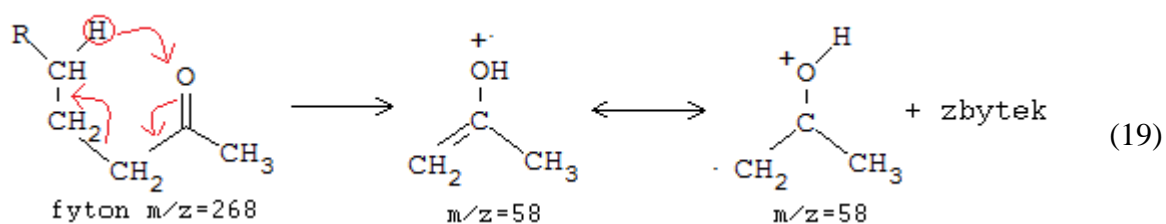
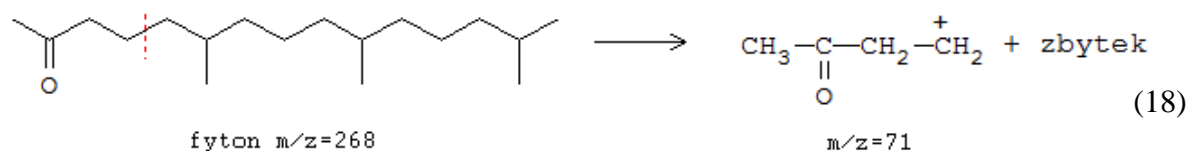
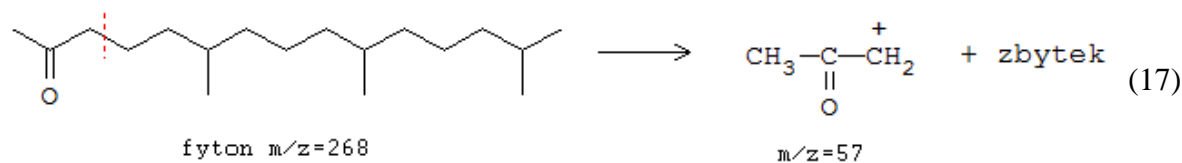
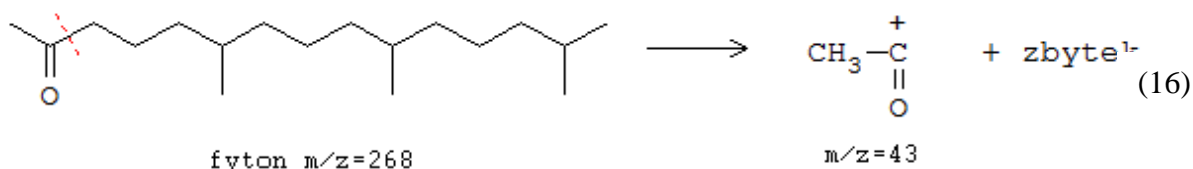
Fyton (6,10,14-trimethylpentadekan-2-on)

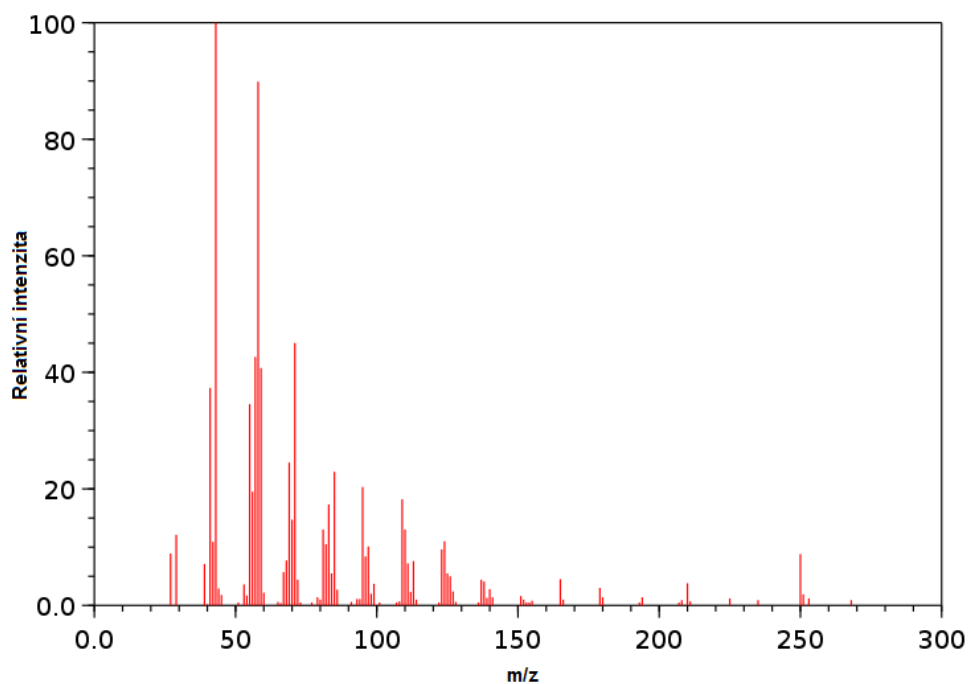


Obrázek 24 Strukturální vzorec fytonu

Přepracováno z NIST Chemistry Webbook [179]

Fyton se sumárním vzorcem $C_{18}H_{36}O$ je acyklický diterpen s keto skupinou (Obrázek 24), který má molekulovou hmotnost 268. Základním píkem spektra je iont $C_2H_3O^+$ s $m/z = 43$, který vzniká α -štěpením, naznačeným v rovnici (16) a je typickým iontem pro karbonyly. Tento iont odpovídá rovněž $C_3H_7^+$, který vzniká štěpením na kvartérním centru na opačné straně řetězce. Dalšími ionty, které můžeme pozorovat v hmotnostním spektru fytonu (Obrázek 25) jsou $m/z = 57$, který vzniká β -štěpením, které je naznačené v rovnici (17) a iont s $m/z = 71$, jehož mechanismus vzniku je naznačený v rovnici (18). Oba tyto ionty odpovídají také štěpení charakteristickému pro alkylovou sérii, stejně jako ionty $m/z 43$. Iont se sudým $m/z = 58$, vzniká McLaffertyho přesmykem charakteristickým pro sloučeniny typu $RCOCH_3$, podle rovnice (19) [177].



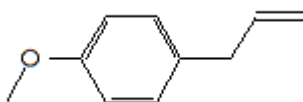


Obrázek 25 Hmotnostní spektrum fytonu

Převzato z NIST Chemistry Webbook [179]

4.1.1.2 Hmotnostní spektra derivátů fenypropenu

Estragol

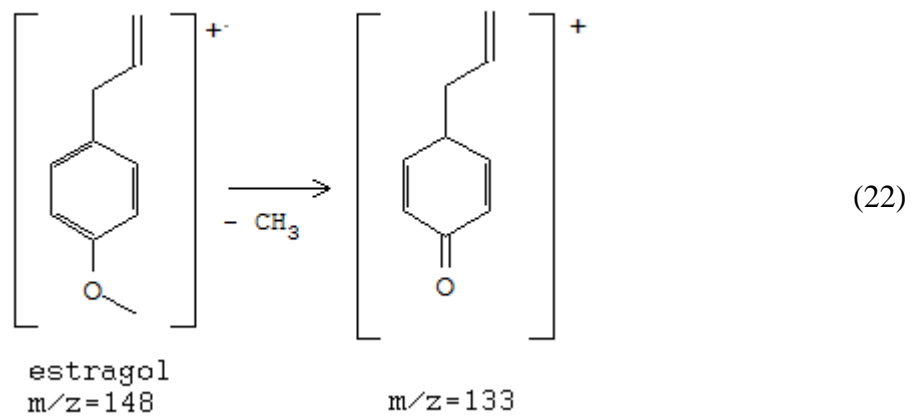
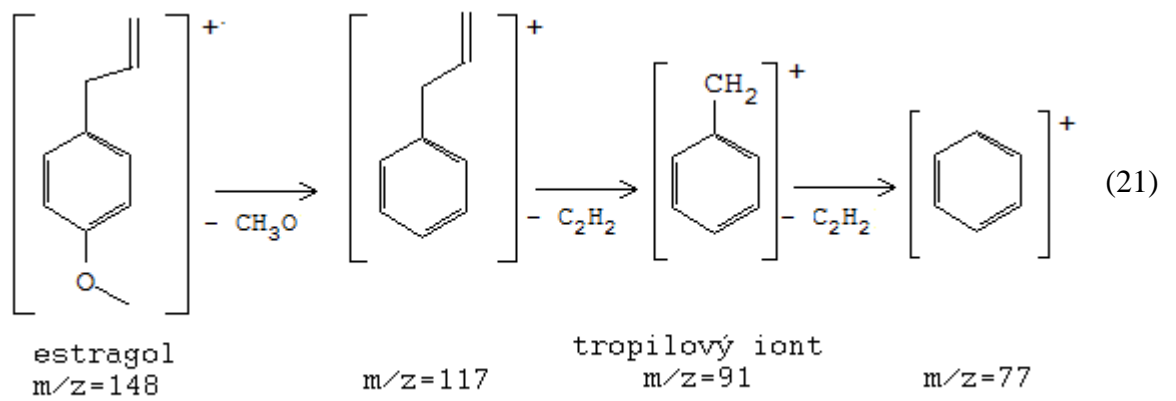
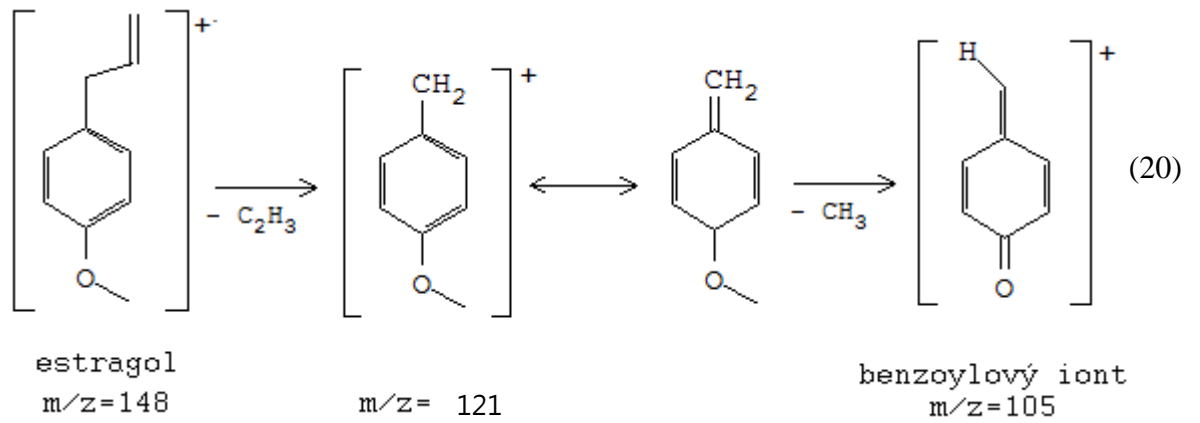


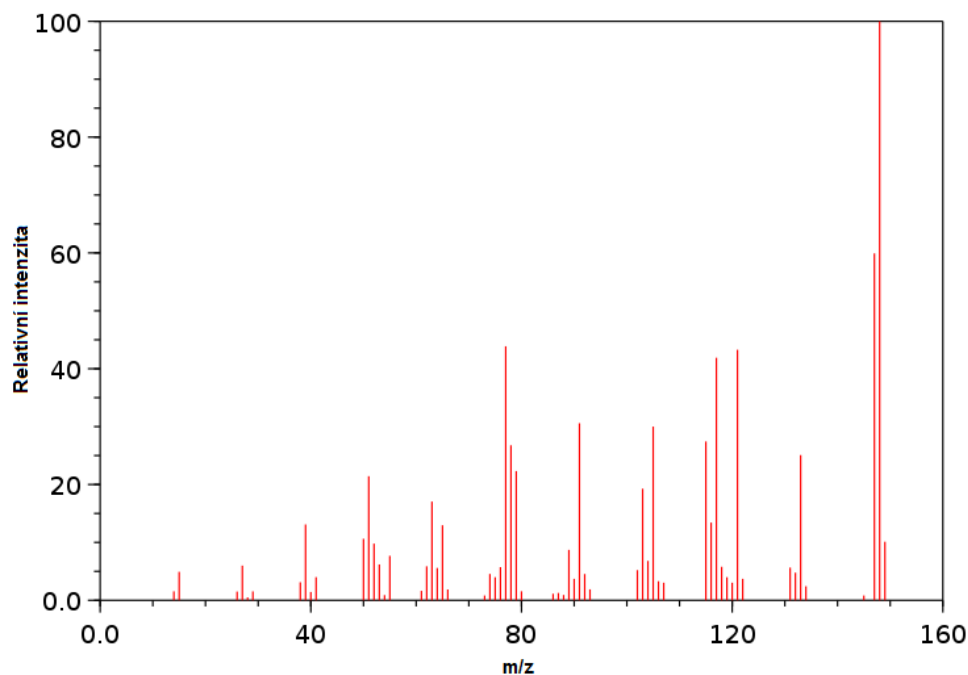
Obrázek 26 Strukturální vzorec estragolu

Přepřacováno z NIST Chemistry Webbook [179]

Estragol se sumárním vzorcem $C_{10}H_{12}O$ je cyklický monoterpen s keto skupinou (Obrázek 26), který má molekulovou hmotnost 148. Základním píkem spektra je iont s $m/z = 148$ odpovídající molekulárnímu iontu. Dalšími intenzivními ionty, které můžeme pozorovat ve hmotnostním spektru estragolu (Obrázek 27) jsou $m/z = 77, 91, 105, 117, 121, 133$ a 147 . Iont s $m/z = 147$ vzniká odštěpením jednoho vodíku z molekulárního iontu. Iont s $m/z = 121$ vzniká odštěpením vinylu z molekulárního iontu, jak je popsáno v rovnici (20), další fragmentací tohoto iontu, odštěpením methylového radikálu, vzniká intenzivní benzoylový iont s $m/z = 105$, jak je popsáno v rovnici (20). Odštěpením methoxy skupiny z molekulárního iontu vzniká iont $m/z = 117$, jak je popsáno v rovnici (21). Další fragmentací tohoto iontu vzniká tropyliový iont $m/z = 91$ a iont $m/z = 77$, charakteristický pro aromatickou sérii, jak je popsáno v rovnici (19).

Iont m/z 133 vzniká podle rovnice (22) odštěpením methylového radikálu z molekulárního iontu.





Obrázek 27 Hmotnostní spektrum estragolu

Převzato z NIST Chemistry Webbook [179]

5 Metody analýzy netěkavých sloučenin v rostlinných extraktech se zaměřením na flavonoidy

K analýze netěkavých látek obsažených v rostlinných extraktech je široce využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie [132, 183]. Kromě samotné analýzy je možné využít HPLC také k izolaci určitých aktivních složek z extraktů či přečištění fyto-molekul [184].

5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Principem separace složek v HPLC je distribuce složek mezi stacionární a mobilní fází chromatografického systému. Během této separace dochází k mnoha typům interakcí, jako je interakce analytu s MF, interakce mezi MF a SF a sorpce analytů na SF. Stacionární fází jsou částice zakotvené na stěně chromatografické kolony. Mobilní fází bývají organická rozpouštědla a jejich směsi v různých poměrech. Podle složení mobilní fáze během analýzy můžeme rozdělit analýzu HPLC na dva typy, a to HPLC s isokratickou elucí, kdy je složení MF konstantní, nebo HPLC s gradientovou elucí, kdy se složení MF mění v průběhu analýzy. Podle polarity SF a MF se HPLC dělí na HPLC na normálních fázích (NP), kdy je SF více polární než MF a HPLC na reverzních fázích (RP), kdy je naopak MF více polární než SF. K analýze netěkavých lipofilních látek, jako jsou oleje, tuky a lipidy se využívá NP-HPLC s mobilními fázemi jako je *n*-hexan, heptan, chloroform či alkoholy. Avšak k analýze většiny biologicky

aktivních sloučenin, jako jsou například flavonoidy, které jsou mimo jiných předmětem zájmu této disertační práce, se využívá především RP-HPLC. V RP-HPLC se používá jako mobilní fáze směs destilované vody s méně polárním rozpouštědlem jako je methanol nebo acetonitril a velmi často také s přídavkem pufru pro úpravu pH [184, 185]. Jako stacionární fáze bývá používán pro RP-HPLC nepolární oktadecylsilan (C18). K detekci flavonoidů po separaci v chromatografické koloně se nejčastěji používají UV/Vis detektor a hmotnostní spektrometr [185, 186]. Při použití UV/Vis detektoru probíhá identifikace látek na základě porovnání polohy píku analytu a standardu, případně metodou standardního přídavku, kdy se sleduje zvětšení plochy píku po přidání malého množství standardu. Kvantita analytů se určí podle plochy příslušného píku, a to různými metodami, jako například metoda kalibrační křivky, nebo metoda standardního přídavku. Identifikace látek při použití hmotnostního spektrometru probíhá na základě manuálního vyhodnocování MS spekter, či srovnání spektra se standardem.

6 Metody analýzy antimikrobiálních vlastností rostlinných extraktů

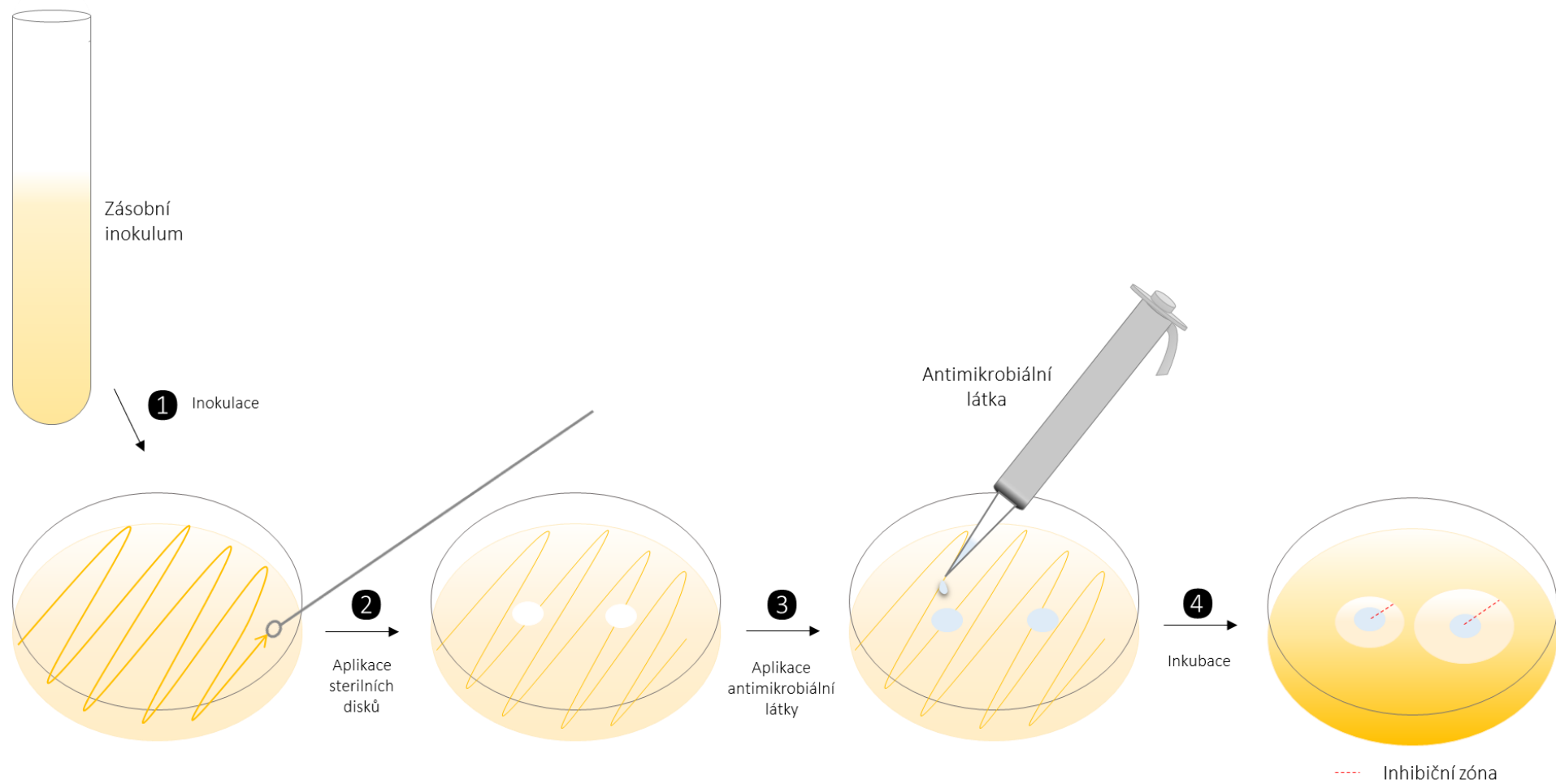
Pro výběr vhodné antimikrobiální terapie na daný patogen je důležité znát jeho specifickou citlivost k antibiotikům, potažmo přírodním extraktům, které lze také potencionálně použít. Metody analýzy antimikrobiálních vlastností se dělí na difúzní (kvalitativní) a diluční (kvantitativní). Hodnotí se schopnost mikroorganismu růst v přítomnosti daného antimikrobiálního agens. Difúzní metody se využívají k semikvantitativnímu určení citlivosti mikroorganismů na antimikrobiální látky. Principem těchto metod je difúze antimikrobiálních látek od zdroje do okolí, čímž vzniká koncentrační gradient bránící růstu mikroorganismů do vzdálenosti inhibiční zóny. Diluční metody slouží ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) antimikrobiální látky na daný mikroorganismus [187-189].

6.3 Metody kvalitativní

Mezi kvalitativní metody analýzy antimikrobiálních vlastností rostlinných extraktů patří metody difúzní, a to zejména agarová disková difúzní metoda a agarová jamková difúzní metoda. Tyto metody jsou screeningové a jsou schopné odhalit pouze to, zda je zkoumaný vzorek antimikrobiálně aktivní či nikoliv. Nelze pomocí nich určit minimální inhibiční koncentraci, která je mírou účinnosti daného antimikrobiálního agens [187].

6.3.2 Disková difúzní metoda

Při diskové difúzní metodě (DDM) na Obrázku 28 jsou nejprve agarové destičky inokulovány standardizovanou bakteriální suspenzí mikroorganismu (1). Poté je na agar aplikován sterilní disk z filtračního papíru (\varnothing 6 mm) (2), který obsahuje testovanou antimikrobiální látku (3). Poté se sleduje inhibice růstu mikroorganismu v okolí disku (4). Inhibiční zóna v okolí disku je mírou antimikrobiální aktivity a měří se v délkových jednotkách (mm). Tato metoda bohužel není vhodná k určení minimální inhibiční koncentrace, protože není možné přesně kvantifikovat množství antimikrobiální látky, která difunduje do agaru. I přes tuto nevýhodu skýtá DDM mnoho výhod jako je jednoduchost jejího provedení, je levná a lehce se interpretují výsledky [187].



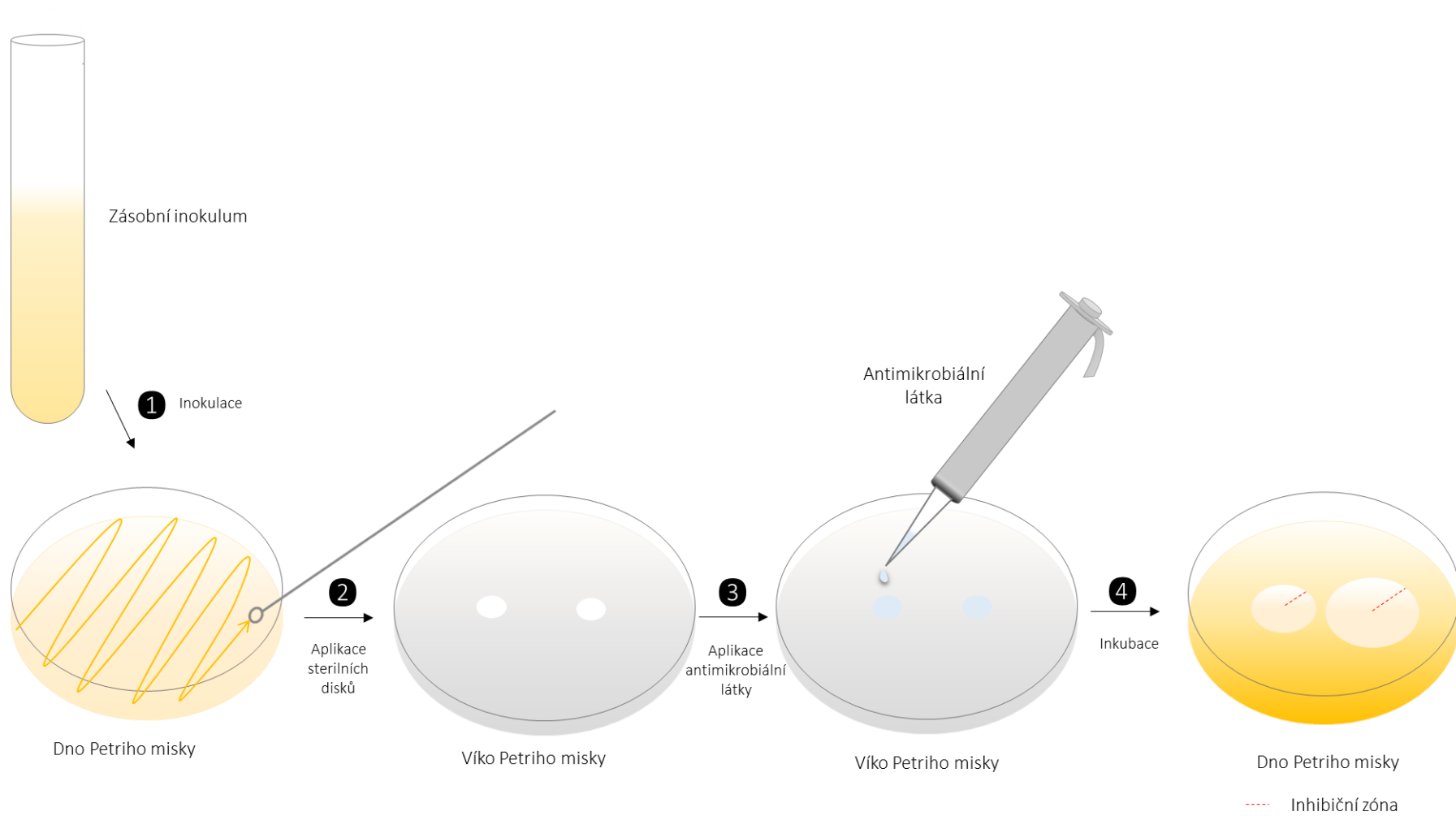
Obrázek 28 Schéma diskové difúzní metody

6.3.3 Agarová jamková difúzní metoda

Tato metoda je široce využívána pro určení antimikrobiální aktivity rostlin a jejich extraktů. Principem je velice podobná DDM. Petriho miska s agarem je inokulována mikroorganismem, poté je do agaru asepticky vyhloubena jamka o poloměru 6-8 mm a do ní přidáno 20-200 μ l extraktu obsahujícího látky s antimikrobiální účinností. Poté jsou takto připravené Petriho misky inkubovány podle nároků testovaného mikroorganismu. Antimikrobiální agens difunduje agarem a inhibuje růst mikrobiální kultury. Stejně jako v případě DDM se poté měří inhibiční zóna růstu mikroorganismu [187].

6.3.4 Disková volatilizační metoda

Pro testování parní fáze těkavého extraktu doposud neexistuje žádná standardizovaná metoda. V literatuře se objevuje mnoho obměn, jak aktivitu parních fází testovat, avšak disková volatilizační metoda je zřejmě nejčastější (Obrázek 29). Používá se ke screeningovému testování antimikrobiální aktivity par těkavých extraktů. Je to obdoba diskové difúzní metody, s tím rozdílem, že sterilní disk není aplikován přímo na agar inokulovaný mikroorganismem (1), ale na vrchní víčko Petriho misky (2), poté je na disk aplikována antimikrobiální látka (3). Petriho miska se ihned po dokončení přípravné fáze experimentu uzavře a zabalí do parafilmu tak, aby nedocházelo k úniku parní fáze. Po inkubaci se měří inhibiční zóna růstu mikroorganismu (4), stejně jako v předchozích zmíněných metodách [69, 70, 72].



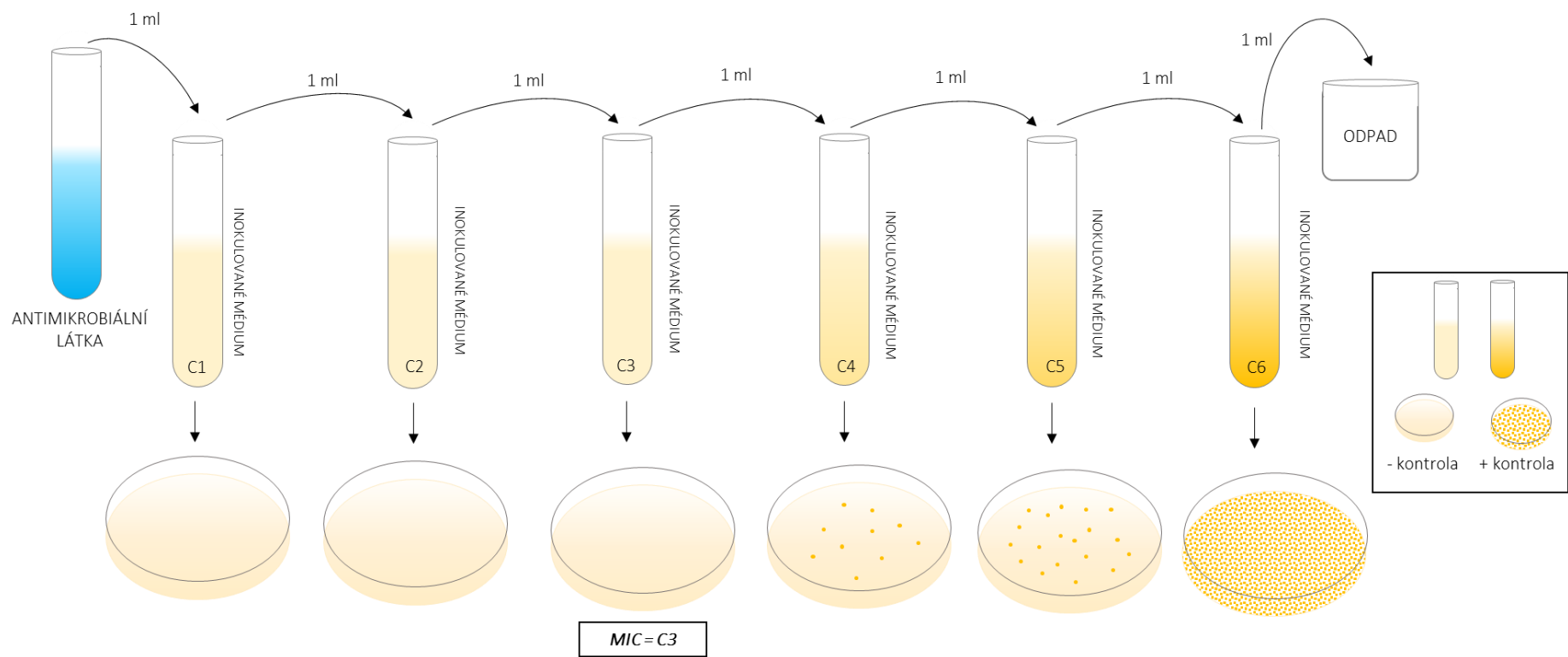
Obrázek 29 Schéma diskové volatizační metody

6.4 Metody kvantitativní

Diluční metody jsou nejvhodnější pro správné určení minimální inhibiční koncentrace mikroorganismu, protože umožňují přesné stanovení koncentrace testovaného antimikrobiálního agens v agaru nebo bujónu. Hodnota MIC je definovaná jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která viditelně inhibuje růst testovaného mikroorganismu a udává se obvykle v jednotkách $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ nebo $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [187].

6.4.5 Bujonová diluční metoda

Bujonová diluční metoda (BDM) je nejjednodušší metoda testování citlivosti mikroorganismu na antimikrobiální agens (Obrázek 30). Tato metoda je založena na dvojkovém ředění testované antimikrobiální látky v tekutém médiu do zkumavek o objemu více než 2 ml (mikrodiluční metody) nebo do mikrotitračních destiček o menších objemech (mikrodiluční metody). Poté je každá zkumavka či jamka inokulována požadovanou suspenzí mikroorganismu o turbiditě 0,5 stupně McFarlanda. Po důkladném promíchání jsou takto připravené zkumavky či mikrotitrační destičky inkubované podle potřeb daného mikroorganismu. MIC je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, který plně inhibuje růst mikroorganismu ve zkumavce či jamce. Nevýhodou makrodiluční metody je větší spotřeba materiálu na rozdíl od mikrodiluční metody. K vyhodnocení MIC v mikrodiluční metodě se často používají kolorimetrické metody využívající různá barviva, například thiazolovou modř tetrazoliumbromidu (MTT).



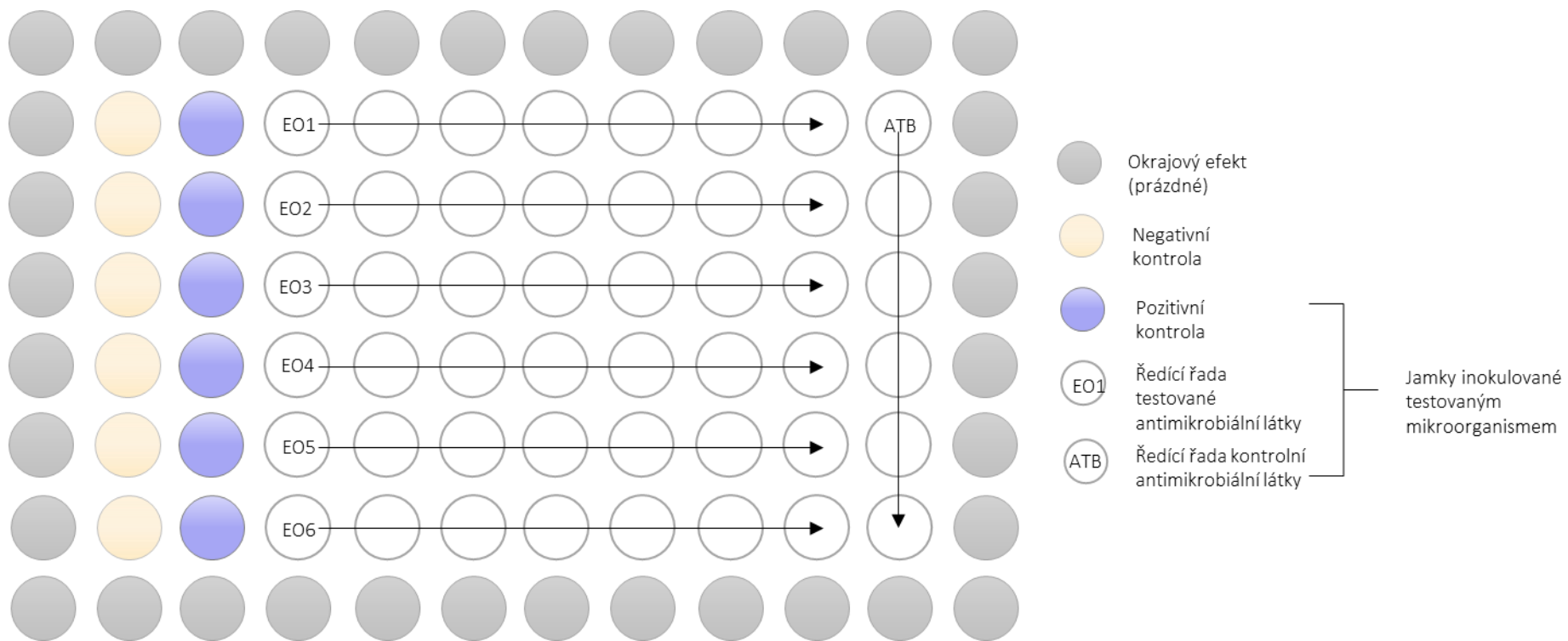
Obrázek 30 Schéma bujonové diluční metody

6.4.6 Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda zahrnuje dávkování různých koncentrací antimikrobiálního agens do agarového média. Nejčastěji s využitím dvojkového ředícího systému a následné inokulace mikroorganismem. MIC je hodnocena stejně jako v případě BDM.

6.4.7 Bujónová mikrodiluční volatilizační metoda

Bujónová mikrodiluční volatilizační metoda (BMVM) je nová metoda sloužící k testování esenciálních olejů v parní a kapalně fázi vyvinuta týmem Houdkové a kol. [190] Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu, která umožňuje v jednom experimentu stanovit minimální inhibiční koncentrace rostlinných těkavých extraktů v kapalně i plynně fázi. Výhodou je, že při jednom experimentu je možné analyzovat až 6 různých extraktů na jeden mikroorganismus. Experiment se provádí ve sterilní 96-jamkové mikrotitrační destičce, kde má každá jamka objem 400 μ l (Obrázek 31). Okrajové řady mikrotitrační destičky se nechávají vždy prázdné, aby se zabránilo falešnému okrajovému efektu. Na víčko mikrotitrační destičky se aplikuje agar, který se inokuluje daným mikroorganismem a nechá se zaschnout, čímž je připraven k testování plynně fáze extraktu. Těkavé extrakty (esenciální oleje) se zředí na počáteční požadovanou koncentraci a napipetují se do řad 2-6 mikrotitrační destičky, odkud se dvojkovým ředěním postupuje dále až ke sloupci před ředěním antibiotika, viz Obrázek 31. Ve sloupcích, označených příslušnou legendou na Obrázku 31 je negativní kontrola růstu a je pozitivní kontrola růstu mikroorganismu. V předposledním sloupci mikrotitrační destičky se nachází dvojkově zředěné antibiotikum. Nakonec se jamky mikrotitrační destičky inokulují daným mikroorganismem, zafixují se dřevěnými deskami a svorkami a dají se inkubovat podle potřeby mikroorganismu. Po inkubaci se stanovuje minimální inhibiční koncentrace extraktu vizuálním zhodnocením růstu mikroorganismu po obarvení metabolicky aktivních kolonií barvivem MTT [12, 190, 191].



Obrázek 31 Schéma Bujonové mikrodiluční volatilizační metody na příkladu testování esenciálních olejů

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část disertační práce je rozdělena do tří kapitol shrnující hlavní okruhy disertační práce dle přiložených publikací. Každá kapitola začíná stručným uvedením do dané problematiky s ohledem na aktuální vědeckou situaci dané problematiky, dále experimentální postupy a použité metody, výsledky, diskuzi a stručné shrnutí celého výzkumu.

7 Chemické složení a antimikrobiální aktivita hydrolátů získaných z *Lavandula angustifolia*, *Syzygium aromaticum*, *Foeniculum vulgare* a *Laurus nobilis*

Rostliny produkují mnoho těkavých sloučenin, které jsou využívány pro výrobu esenciálních olejů. Nejpoužívanější metodou sloužící k získání EO zůstává destilace, jejíž vedlejší produkty jsou hydroláty. Hydroláty patří mezi přírodní extrakty obsahující mnoho bioaktivních látek s antimikrobiálními účinky. Cílem studie bylo rozšířit současné znalosti o chemickém složení a antimikrobiální aktivitě hydrolátů získaných z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*), hřebíčkovce kořeného (*Syzygium aromaticum*), fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare*) a vavřínu ušlechtilého (*Laurus nobilis*). Jednotlivé hydroláty získané destilací vodní parou a hydrodestilací byly analyzovány pomocí GC-FID a GC-MS. Antimikrobiální aktivita těchto hydrolátů byla hodnocena proti širokému spektru bakteriálních kmenů pomocí diskové difúzní metody. Byly porovnávány hydroláty získané SD a HD, zakoncentrované pomocí SPE a nezakoncentrované. Výsledky ukázaly významnou antimikrobiální aktivitu, zejména u zakoncentrovaných hydrolátů pomocí SPE. Dosažené výsledky poukazují na to, že i hydroláty by mohly být využity v přírodní medicíně či k prezervačním účelům.

Data popisována a diskutována v této kapitole byla publikována v odborném časopise (Publikace č. 1: Šilha D. a kol., Chemical Composition of Natural Hydrolates and Their Antimicrobial Activity on Arcobacter-Like Cells in Comparison with Other Microorganisms Molecules, 2020, vol. 25, no. 23, s. 5654. ISSN: 1420-3049.). Hydrolát získaný z vavřínu je krátce diskutován a porovnáván s publikací z odborného časopisu o esenciálních olejích z vavřínu (Publikace č. 2: Moučková K. a kol. Comparison of Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation of *Laurus nobilis* L. Plant Foods for Human Nutrition, 2020, vol. 75, no. 4, s. 495-504. ISSN: 0921-9668.) vydanou v rámci doktorského studia, avšak data byla již diskutována v rámci diplomové práce, proto nejsou v této disertační práci více rozebírána.





7.1 Materiál a metody

7.1.1 Rostlinný materiál

V tomto experimentu byly použity hydroláty extrahované z květů levandule lékařské, listů vavřínu ušlechtilého, květů hřebíčkovce kořeného a semen fenyklu obecného. Český a latinský název vzorků rostlin, včetně jejich původu je uveden v Tabulce 6. Vzorky byly uchovány v uzavíratelných pytlích do doby destilace. Květy levandule, květy hřebíčku

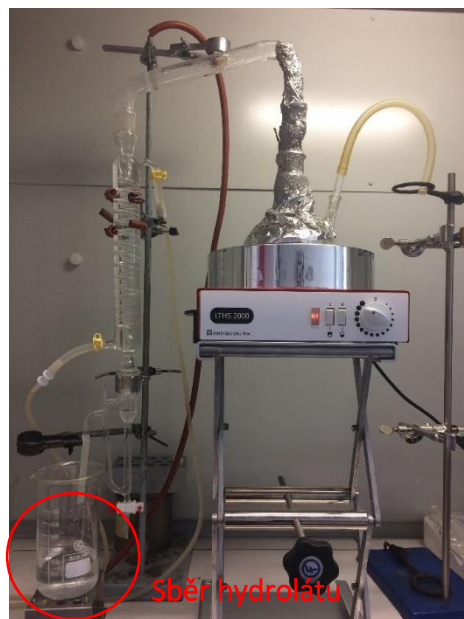
a semena fenyklu byly k destilaci použity celé. Bobkové listy byly nastříhány na kusy o rozměrech cca 0,5 × 0,5 cm.

Tabulka 6 Analyzované rostliny včetně základních informací (latinský název, čeleď, původ, dodavatel, anatomie).

Rostlina	Latinský název	Čeleď	Původ	Dodavatel	Anatomie
Levandule lékařská	<i>Lavandula angustifolia</i>	Hluchavkovité (<i>Lamiaceae</i>)	Chorvatsko	Mediate, s.r.o. (Libchavy, ČR)	
Vavřín ušlechtilý	<i>Laurus nobilis</i>	Vavřínovité (<i>Lauraceae</i>)	Brazílie	Kasia Vera, s.r.o. (Říčany, ČR)	
Hřebíčkovec kořený	<i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtovité (<i>Myrtaceae</i>)	Madagaskar	Kasia Vera, s.r.o. (Říčany, ČR)	
Fenykl obecný	<i>Foeniculum vulgare</i>	Miříkovité (<i>Apiaceae</i>)	ČR	Kasia Vera, s.r.o. (Říčany, ČR)	

7.1.2 Hydrodestilace

K hydrodestilaci (HD) byla použita aparatura v klasickém uspořádání s destilační baňkou objemu 2000 ml (Obrázek 32). Hydrolát byl získán následovně: odpovídající množství rostlinného materiálu bylo naváženo do destilační baňky, do níž bylo následně přilito 1500 ml demineralizované vody, která byla průběžně doplňována podle potřeby. Esenciální olej společně s hydrolátem byl destilován do separátoru s vývodem na hydrolát, který ústil do sběrné kádinky o objemu 1000 ml. Esenciální olej byl v separátoru oddělen. Destilace probíhala tak dlouho, dokud nebylo vydestilované množství esenciálního oleje konstantní (cca 280 minut, objem hydrolátu 1,8 l). Po skončení destilace byl hydrolát odebrán a uskladněn v tmavě skleněné sběrné nádobě při 4 °C. Finální vzorek vznikl smícháním hydrolátů ze třech destilací.



Obrázek 32 Aparatura pro hydrodestilaci

7.1.3 Destilace vodní parou

K destilaci vodní parou byla použita aparatura v klasickém uspořádání s destilační baňkou o objemu 2000 ml (Obrázek 33). Hydrolát byl připraven stejným způsobem jako při hydrodestilaci. Destilace vodní parou probíhala do doby vydestilování konstantního množství esenciálního oleje (280-340 minut) a objemu hydrolátu 1,8 l. Po skončení destilace byl esenciální olej a hydrolát oddělen, odebrán a uskladněn v tmavé skleněné sběrné nádobě při 4 °C. Finální vzorek vznikl smícháním hydrolátů ze třech destilací.



Obrázek 33 Aparatura pro hydrodestilaci

7.1.4 Extrakce tuhou fází

Hydroláty získané hydrodestilací a parní destilací byly 50× zakoncentrovány pomocí SPE kolonky Separon SGX C18 (modifikovaný oktadecylsilikagel, 60 µm, 0,5 g). Sorbent v extrakční patronce byl aktivován 5 ml methanolu a 10 ml sterilní destilované vody. Následně 100 ml hydrolátu bylo prosáto s využitím stříkačky přes extrakční patronku, ze které byly poté zachycené látky eluovány 2 ml ethanolu.

7.1.5 Testování antimikrobiální účinnosti

Celkem 13 mikroorganismů bylo testováno na antimikrobiální účinnost získaných hydrolátů: *A. butzleri* LMG 10828, *A. butzleri* CCUG 30484, *A. butzleri* UPa 2012/3, *A. cryaerophilus* CCM 7050, *A. cryaerophilus* UPa 2013/13, *A. lanthieri* LMG 28517, *A. skirrowii* LMG 6621, *A. thereius* LMG 24488, *S. aureus* CCM 4223, *Ent. faecalis* CCM 4224, *Ps. aeruginosa* CCM 3955, *E. coli* CCM 3954, a *C. albicans* CCM 8180. Bakteriální kmeny byly zakoupeny od České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, Česká republika), Sbírký mikroorganismů Univerzity Göteborg (CCUG, Göteborg, Švédsko) a Belgické koordinované sbírky mikroorganismů (LMG, Ghent, Belgie). Antimikrobiální aktivita získaných hydrolátů byla testována pomocí diskové difúzní metody, dle Obrázku 28 v teoretické části práce. Před experimentem byly připraveny bakteriální suspenze s turbiditou podle McFarlandovy stupnice odpovídající stupni 0,5 ($\sim 1,5 \cdot 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$). Mikrobiální suspenze byla nanesena na Mueller-Hintonův agar (Himedia, Indie) nebo Sabouradův agar s dextrózou (Himedia, Indie) pomocí sterilního vatového tampónu. Sterilní disky o průměru 6 mm (Oxoid Ltd., UK) byly napuštěny 8 µl testovaného hydrolátu nebo ethanolu jako kontroly. Po kultivaci při 30 °C (*Arcobacter*) nebo 37 °C (ostatní mikroorganismy) byl průměr inhibiční zóny odečten pomocí automatické čtečky a analyzátoru BACMED 6iG2 (Aspiag, Litomyšl, Česká republika). Jako referenční standard antimikrobiální látky byly použity komerční disky (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA): ampicilin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), klindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), flukonazol (25 µg) a tetracyklin (30 µg). Každý experiment byl proveden třikrát a inhibiční zóny jsou vyjádřeny jako průměr tří experimentů se standardní směrodatnou odchylkou.

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena na 96jamkové mikrotitrační destičce (SPL Life Sciences, Pocheon-si, Jižní Korea). Hydroláty byly zředěny v Mueller-Hintonově bujónu (Himedia, Indie) v koncentracích 0,02 – 50 % na konečný objem 100 µl v každé jamce. Jamky byly naočkovány suspenzí mikroorganismu s turbiditou podle McFarlandovy stupnice odpovídající stupni 0,5 ($\sim 1,5 \cdot 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$). Po kultivaci byla MIC stanovena dle vizuálního

zákalu. Pro vyhodnocení minimální baktericidní koncentrace (MBC) byl obsah každé jamky subkultivován na Mueller-Hintonově agaru nebo Sabouardově agaru s dextrózou. MBC byla stanovena jako nejnižší koncentrace hydrolátu, která zcela inhibovala růst mikroorganismů (99,99 %) v jednotkách CFU · ml⁻¹. Každý experiment byl proveden třikrát a MIC a MBC jsou vyjádřeny jako průměr tří experimentů se standardní směrodatnou odchylkou.

7.1.6 GC-MS

GC-MS analýza vzorků byla provedena na plynovém chromatografu GC 2010 s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 Plus (obojí Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a autosamplerem Combi Pal (CTC Analytics, Zwingen, Švýcarsko). Chromatograf byl vybaven kapilární kolonou ZB-5HT Inferno 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm tloušťka filmu. (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Jako nosné médium bylo použito helium 5,0 (Linde, Praha, Česká republika). Separace látek probíhala při konstantní lineární rychlosti nosného plynu 30 cm·s⁻¹. Teplotní program byl nastaven na počátku na 40 °C po dobu 3 minut, poté byl termostat vyhříván na finální teplotu 250 °C rychlostí 2 °C·min⁻¹ a finální teplota byla udržována po dobu 10 minut. Teplota nástřiku a převodníku do detektoru byla nastavena na 200 °C. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 200 °C. Dávkován byl vždy 1 μl vzorku při splitovacím poměru 1:50. Hmotnostní spektrometr byl provozován v režimu elektronové ionizace, ionizační energie byla 70 eV a ionty byly měřeny v rozsahu m/z 33-500.

Identifikace hmotnostních spekter jednotlivých sloučenin byla provedena porovnáním hmotnostních spekter získaných měření s hmotnostními spektry z komerčně dostupných knihoven (NIST'14 Mass Spectral Library a GC-MS Flavor & Fragrance Natural & Synthetic Compounds Library). K potvrzení identity sloučeniny byly použity experimentálně zjištěné retenční indexy vypočtené dle van den Doolovy a Kratzovy metody s použitím *n*-alkanů (C8 – C33) v *n*-hexanu (Restek, Bellefonte, PA, USA) o koncentraci 100-200 μg·ml⁻¹, které se porovnávaly s daty z knihoven.

7.1.7 GC-FID

GC-FID analýza vzorků byla provedena na plynovém chromatografu GC 2010 s plamenovým ionizačním detektorem (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a autosamplerem Combi Pal (CTC Analytics, AG, Zwingen, Švýcarsko). Chromatografické podmínky byly totožné jako u GC-MS analýz. Teplota nástřiku byla nastavena na 200 °C a teplota detektoru na 260 °C. Dávkován byl 1 μl vzorku při splitovacím poměru 1:50.

Identifikace chemických sloučenin byla provedena pomocí experimentálně zjištěných retenčních indexů vypočtených dle van den Doolovy a Kratzovy metody s použitím *n*-alkanů. Vypočítané retenční indexy byly navíc spárovány s retenčními indexy identifikovaných sloučenin z analýzy hmotnostních spekter. Semikvantitativní stanovení jednotlivých sloučenin bylo následovně provedeno metodou vnitřní normalizace.

7.2 *Výsledky a Diskuse*

V Tabulce 7 jsou uvedené výsledky analýzy koncentrovaných hydrolátů získaných destilací vodní parou (H_{SDSPE}) a hydrodestilací (H_{HDSPE}). Analyzované hydroláty, zejména z levandule a vavřínu, byly bohaté na řadu sloučenin. Při srovnání výsledků s ohledem na hydroláty získané hydrodestilací (H_{HD}) a destilací parou (H_{SD}) bylo v extraktech z hydrolátů získaných destilací vodní parou (SD) nalezeno více sloučenin.

Vyšší počet sloučenin v hydrolátu získaného destilací vodní parou je pravděpodobně způsobeno příznivějšími podmínkami během destilace vodní parou. Během hydrodestilace je rostlinný materiál v kontaktu s vroucí vodou a některé těkavé sloučeniny mohou být převedeny (oxidačními reakcemi, polymerací a hydrolyzou) na jiné sloučeniny [192]. Obsah jednotlivých sloučenin je vyjádřen jako procento z celkové plochy píku v chromatogramu získaných analýzou GC-FID extraktů H_{SDSPE} a H_{HDSPE} .

Tabulka 7 Porovnání analýz koncentrovaných extraktů H_{SD-SPE} a H_{HD-SPE}

Rostlinný materiál	Počet píků v chromatogramu		Počet identifikovaných sloučenin		Hlavní sloučeniny [% rel.]	
	H _{SD-SPE} ^a	H _{HD-SPE} ^b	H _{SD-SPE}	H _{HD-SPE}	H _{SD-SPE}	H _{HD-SPE}
Levandule lékařská (<i>Lavandula angustifolia</i>)	186	172	48 (90,0 %)	48 (93,2 %)	1,8-cineol (20,6 %) linalol furanoxid (11,9 %) α -terpineol (10,4 %)	linalol (23,2 %) 1,8-cineol (19,5 %) α -terpineol (13,0 %)
Vavřík ušlechtilý (<i>Laurus nobilis</i>)	227	166	33 (78,0 %)	33 (79,4 %)	1,8-cineol (56,4 %) 4-terpineol (6,0 %) α -terpineol (5,0 %)	1,8-cineol (54,1 %) 4-terpineol (7,1 %) α -terpineol (6,4 %)
Fenykl obecný (<i>Foeniculum vulgare</i>)	87	68	11 (85,1 %)	11 (85,1 %)	estragol (37,4 %) fenchon (22,5 %) p-methoxy skořicový aldehyd (7,0 %)	estragol (33,0 %) fenchon (26,5 %) eugenol (5,6 %)
Hřebíčkovce kořenný (<i>Syzygium aromaticum</i>)	98	80	9 (99,3 %)	9 (99,3 %)	eugenol (89,1 %) eugenylacetát (9,3 %) chavikol (0,4 %)	eugenol (92,7 %) eugenylacetát (5,6 %) chavikol (0,4 %)

^a H_{SD-SPE} = Hydroláty (H) získané hydrodestilací (HD) a 50 × zakoncentrované na tuhém sorbentu (SPE)

^b H_{HD-SPE} = Hydroláty (H) získané destilací vodní parou (SD) a 50 × zakoncentrované na tuhém sorbentu (SPE)

7.2.1 Hydrolát z květů levandule lékařské

V hydrolátu z levandule lékařské bylo celkem identifikováno 48 sloučenin (Tabulka 8). Identifikované sloučeniny činily 93,2 % v extraktech H_{HDSPE} a 90,0 % v extraktech H_{SDSPE} . Hlavní skupinou identifikovaných sloučenin byly oxidované monoterpeny (34 identifikovaných sloučenin, které představovaly 86,5 % v extraktu H_{HDSPE} a 82,3 % v extraktu H_{SDSPE}). Největší rozdíl v chemickém složení obou extraktů levandulových hydrolátů byl v obsahu linalolu (23,2 % H_{HDSPE} , 7,9 % H_{SDSPE}), jak je patrné z aromaprofilu hydrolátů (Graf 1). Rozdílné složení hydrolátů je také patrné z chromatogramů (Obrázek 34). Linalol je jednou z hlavních sloučenin levandulových olejů. Další významnou sloučeninou v levandulových olejích je linalylacetát. Již dříve byl popsán rozklad linalylacetátu na linalol v důsledku hydrolyzy [193], tento rozklad by mohl být hlavní příčinou vyššího obsahu linalolu v hydrolátu získaném hydrodestilací (HD) v důsledku méně příznivých podmínek při HD než při SD. Relativně vysoký rozdíl byl pozorován v obsahu kumarinů (konkrétně kumarinu a 7-methoxykumarinu; H_{SDSPE} celkem 3,8 %, H_{HDSPE} celkem 0,9 %) a také v podílu derivátů linalolu (hlavně furanoxidů a pyranoxidů; H_{SDSPE} 23,5 %, H_{HDSPE} 15,7 %). Druhou nejhojnější sloučeninou v extraktech byl 1,8-cineol neboli eukalyptol, jehož obsah byl podobný (20,6 % v extraktu H_{SDSPE} , 19,5 % v extraktu H_{HDSPE}).

Tabulka 8 Chemické složení hydrolátu získaného hydrodestilací a parní destilací květů levandule lékařské

Sloučenina	CAS číslo	Retenční index		Plocha píku [%]	
		Vypočítaný ^a	Publikovaný ^b	$H_{SD_SPE}^c$	$H_{HD_SPE}^d$
Oxidované monoterpeny					
linalolyl oxid	7392-19-0	968	971	0,2	0,1
(E)-dehydroxy linalol oxid	54750-70-8	987	993	0,1	0,1
(Z)-dehydroxy linalol oxid	54750-69-5	1004	1009	0,1	<0,1
1,4-cineol	470-67-7	1014	1016	<0,1	<0,1
1,8-cineol (eukalyptol)	470-82-6	1030	1032	20,6	19,5
(Z)-linalol furanoxid	5989-33-3	1070	1067	11,9	7,9
(E)-linalol furanoxid	34995-77-2	1086	1074	9,1	5,9
linalol	78-70-6	1101	1101	7,9	23,2
hotrienol	29957-43-5	1103	1106	0,8	0,5
sabinol	471-16-9	1139	1143	0,1	0,2
kafr	76-22-2	1144	1149	0,4	0,5
lilakový aldehyd (B/C)	67920-63-2	1148	1141	<0,1	<0,1
nerol oxid	1786-08-9	1151	1155	0,4	0,2
(E)-ocimenol	5986-38-9	1154	1153	<0,1	<0,1
sabinon	513-20-2	1158	1156	<0,1	<0,1
pinokarvon	30460-92-5	1160	1164	<0,1	<0,1
lilakový aldehyd D	53447-47-5	1163	1169	<0,1	<0,1
(Z)-linalol pyranoxid	14009-71-3	1169	1167	1,3	1,1

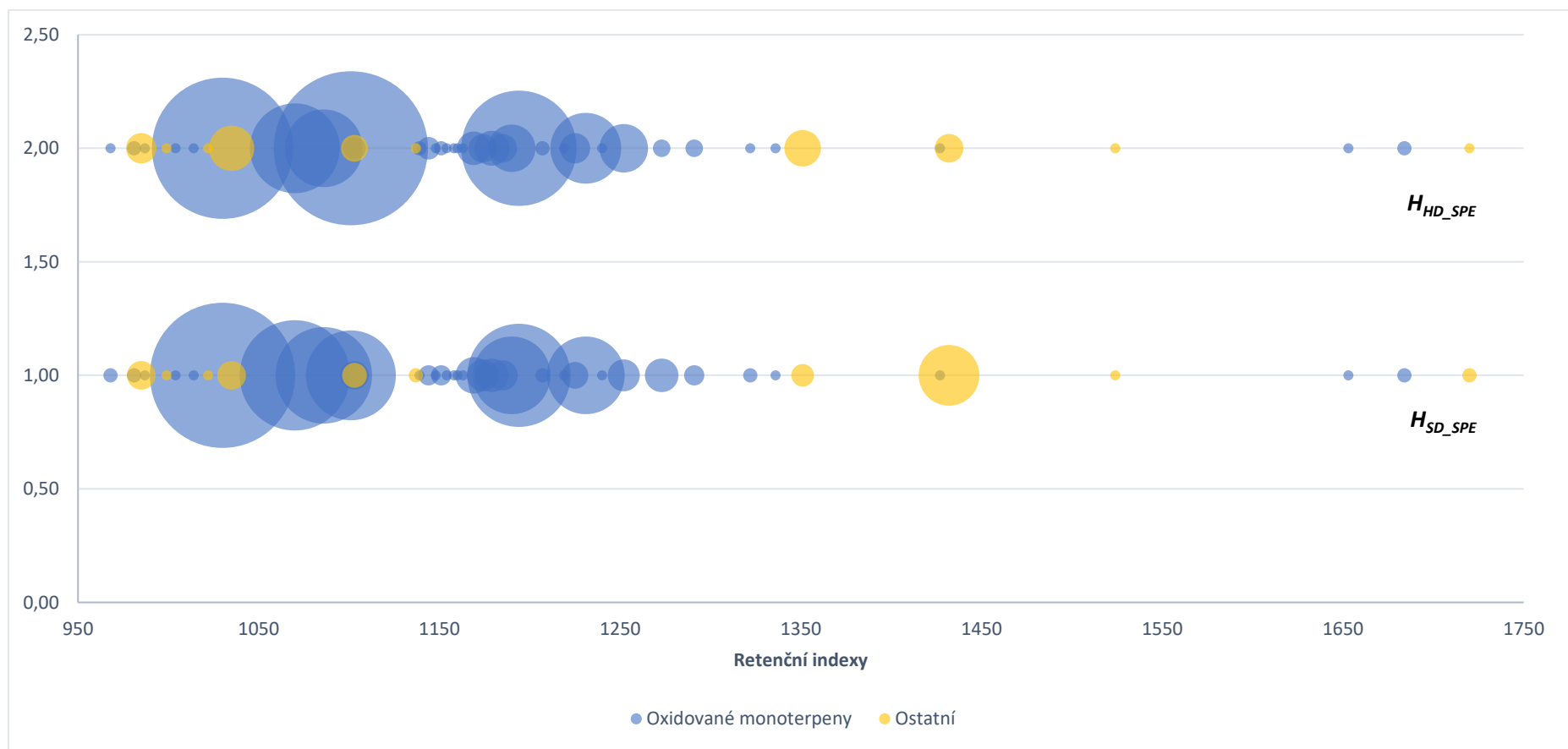
Sloučenina	CAS číslo	Retenční index		Plocha píku [%]	
		Vypočítaný ^a	Publikovaný ^b	H _{SD_SPE} ^c	H _{HD_SPE} ^d
(E)-linalol pyranoxid	39028-58-5	1174	1178	1,0	0,8
4-terpineol	562-74-3	1179	1177	1,1	1,2
4-isopropyl-2-cyklohexenon	500-02-7	1185	1187	0,9	0,8
2,6-dimethyl-3,7-oktadien-2,6-diol	13741-21-4	1190	1186	5,9	2,2
α -terpineol	98-55-5	1194	1195	10,4	13,0
verbenon	80-57-9	1207	1204	0,2	0,2
(E)-karveol	1197-07-5	1219	1217	<0,1	<0,1
nerol	106-25-2	1225	1126	0,7	0,9
neodihydrokarveol	18675-34-8	1231	1226	5,9	4,9
kmínový aldehyd	122-03-2	1240	1238	0,1	0,1
geraniol	106-24-1	1252	1249	1,0	2,3
2,6-dimethyl-1,7-oktadien-3,6-diol	51276-33-6	1273	1277	1,1	0,3
kmínový alkohol	536-60-7	1291	1291	0,4	0,3
4-hydroxy-4-isopropyl-2-cyklohexenon	39725-34-3	1322	1321	0,2	<0,1
3-oxo-p-menth-1-en-7-al	160152-34-1	1336	1336	0,1	<0,1
8-hydroxykarvoton	7712-46-1	1427	1420	<0,1	<0,1
α -bisabolol oxid B	26184-88-3	1653	1658	0,1	0,1
(2Z,6E)-farnesol	3790-71-4	1684	1686	0,2	0,2
Suma [%]				82,3	86,5
Ostatní					
hexyl alkohol	111-27-3	872	876	0,2	0,2
1-okten-3-ol	3391-86-4	981	978	0,2	0,2
3-oktanol	589-98-0	999	999	0,1	0,1
3-oktanon	106-68-3	985	989	0,8	0,9
cymen	99-87-6	1022	1025	<0,1	<0,1
levandulový lakton	1073-11-6	1035	1035	0,8	2,0
6-methyl-3,5-heptadien-2-on	1604-28-0	1103	1107	0,6	0,7
nopinon	24903-95-5	1137	1138	0,2	0,1
eugenol	97-53-0	1351	1356	0,5	1,3
kumarin	91-64-5	1432	1432	3,6	0,8
dihydroaktinidiolid	17092-92-1	1524	1525	<0,1	<0,1
7-methoxykumarin (hernianin)	531-59-9	1720	1732	0,2	<0,1
Suma [%]				7,7	6,7
Celková plocha píků [%]				90,0	93,2

^a Retenční index vypočítaný dle vzorce $RI = 100 \cdot n + 100 \cdot \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$

^b Data publikovaná v NIST (2001) a Adams (2007)

^c H_{SD_SPE} = Hydroláty (H) získané hydrodestilací (HD) a 50 × zakoncentrované na tuhém sorbentu (SPE)

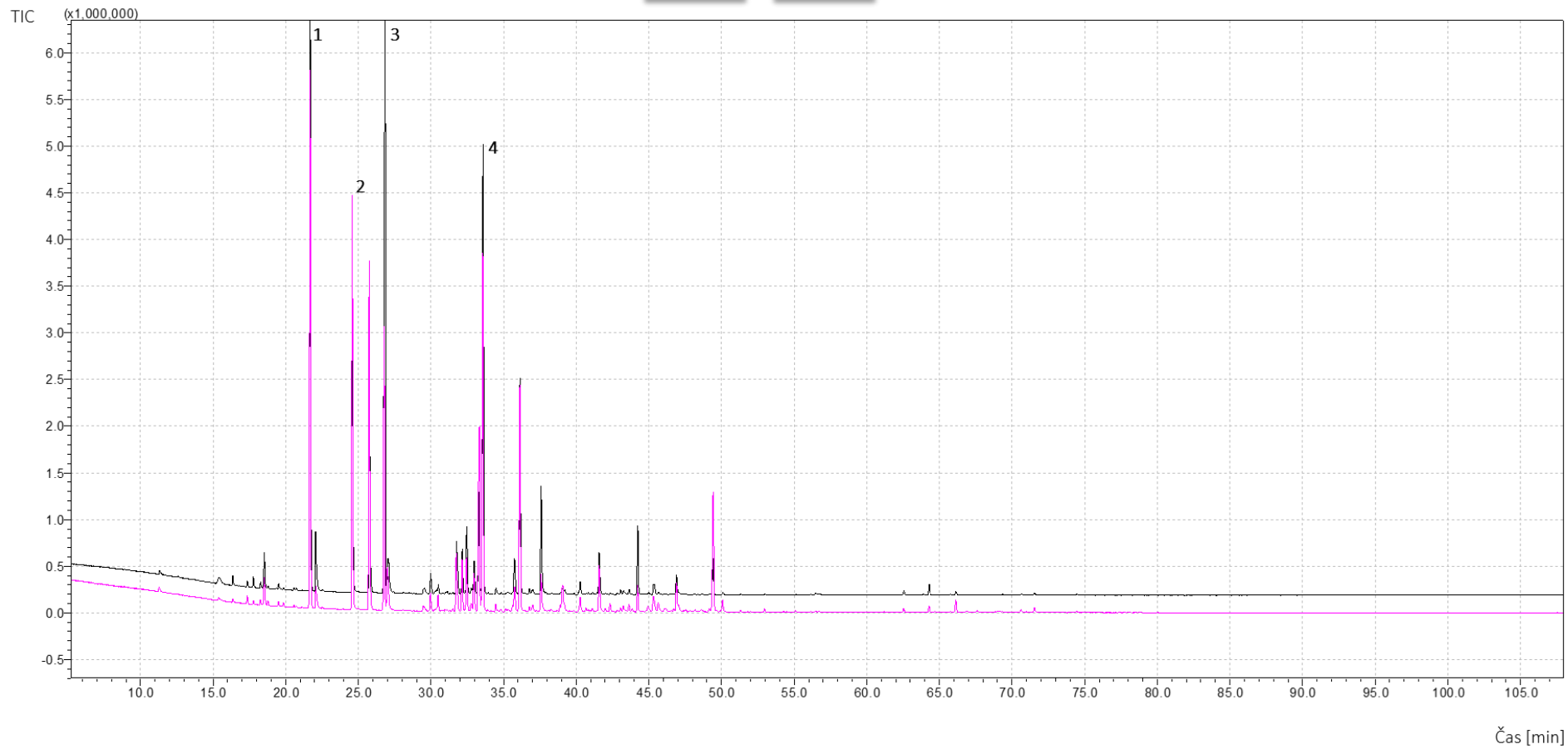
^d H_{HD_SPE} = Hydroláty (H) získané destilací vodní parou (SD) a 50 × zakoncentrované na tuhém sorbentu (SPE)



Graf 1 Aromaprofilů hydrolátů získaných z levandule lékařské

HD

SD



1: 1,8-cineol, 2: linalol furanoxid, 3: linalol, 4: α -terpineol

Obrázek 34 Chromatogram z GC-MS analýzy hydrolátů levandule lékařské

7.2.2 Hydrolát z listů vavřínu ušlechtilého

Celkem bylo u obou typů hydrolátů identifikováno 33 sloučenin (Tabulka 9). Identifikované sloučeniny činily 78,0 % v extraktech H_{HDSPE} a 79,4 % v extraktech H_{SDSPE} . Složení obou hydrolátů bylo podobné, pokud jde o identifikované sloučeniny. Většina identifikovaných sloučenin byly oxidované monoterpeny (22 sloučenin představovalo 72,1 % v extraktech H_{SDSPE} a 73,2 % v extraktech H_{HDSPE}). Dominantní sloučeninou v obou typech extraktů byl eukalyptol (56,4 % v extraktu H_{SDSPE} , 54,1 % v extraktu H_{HDSPE}). Esenciální oleje této matrice dále obsahují zvláště vysoké hladiny eukalyptolu, linalolu a α -terpinylacetátu a také benzenové sloučeniny (eugenol, methyleugenol a elemicin) [90].

Při srovnání hydrolátu z vavřínu s esenciálním olejem z vavřínu (data vydána v Publikaci č. 2), ve kterém bylo identifikováno celkem 74 sloučenin (SD) a 54 sloučenin (HD), je na první pohled patrné, že esenciální olej je bohatší na těkavé sloučeniny oproti hydrolátům. Stejně jako v případě hydrolátu jsou nejvíce zastoupenými skupinami monoterpeny a jejich oxidované formy (79,1 % SD a 84,3 % HD). Nejvíce zastoupené skupiny se v hydrolátu a EO liší, jak je patrné na Obrázku 36, kde je porovnán chromatogram získaný analýzou GC-MS EO a hydrolátu z hydrodestilace. V EO bylo nejvíce α -pinenu (10,9 % SD, 8,9 % HD), sabinenu (13,7 % SD, 10,4 % HD), eukalyptolu (27,0 % SD, 37,3 % HD) a α -terpinylacetátu (17,5 % SD, 15,3 % HD). α -pinen nebyl v hydrolátu nalezen vůbec, zatímco druhá nejvíce zastoupená sloučenina v EO, eukalyptol, byl v hydrolátu obsažen rovněž ve vysoké míře [46]. V porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých složek EO mezi HD a SD je pozorovatelný rozdíl, zatímco u hydrolátů je rozdíl mnohonásobně menší a složení hydrolátů HD a SD je velmi podobné, jak je patrné z aromaprofilů (Graf 2) a chromatogramů (Obrázek 35).

Tabulka 9 Chemické složení hydrolátu získaného hydrodestilací a parní destilací listů vavřínu ušlechtilého

Sloučenina	CAS číslo	Retenční index		Plocha píku [%]	
		Vypočítaný ^a	Publikovaný ^b	$H_{SD_SPE}^c$	$H_{HD_SPE}^d$
Oxidované monoterpeny					
1,4-cineol	470-67-7	1014	1016	<0,1	<0,1
1,8-cineol (eukalyptol)	470-82-6	1030	1032	56,4	54,0
linalol	78-70-6	1099	1101	0,3	0,5
hotrienol	29957-43-5	1101	1106	<0,1	<0,1
dehydrosabinon	36262-12-1	1120	1119	0,1	0,1
sabinol	471-16-9	1136	1143	<0,1	<0,1
nerol oxid	1786-08-9	1151	1155	<0,1	<0,1
sabinon	513-20-2	1157	1156	0,5	0,6
pinokarvon	30460-92-5	1160	1164	0,4	0,3
4-terpineol	562-74-3	1178	1177	6,0	6,4

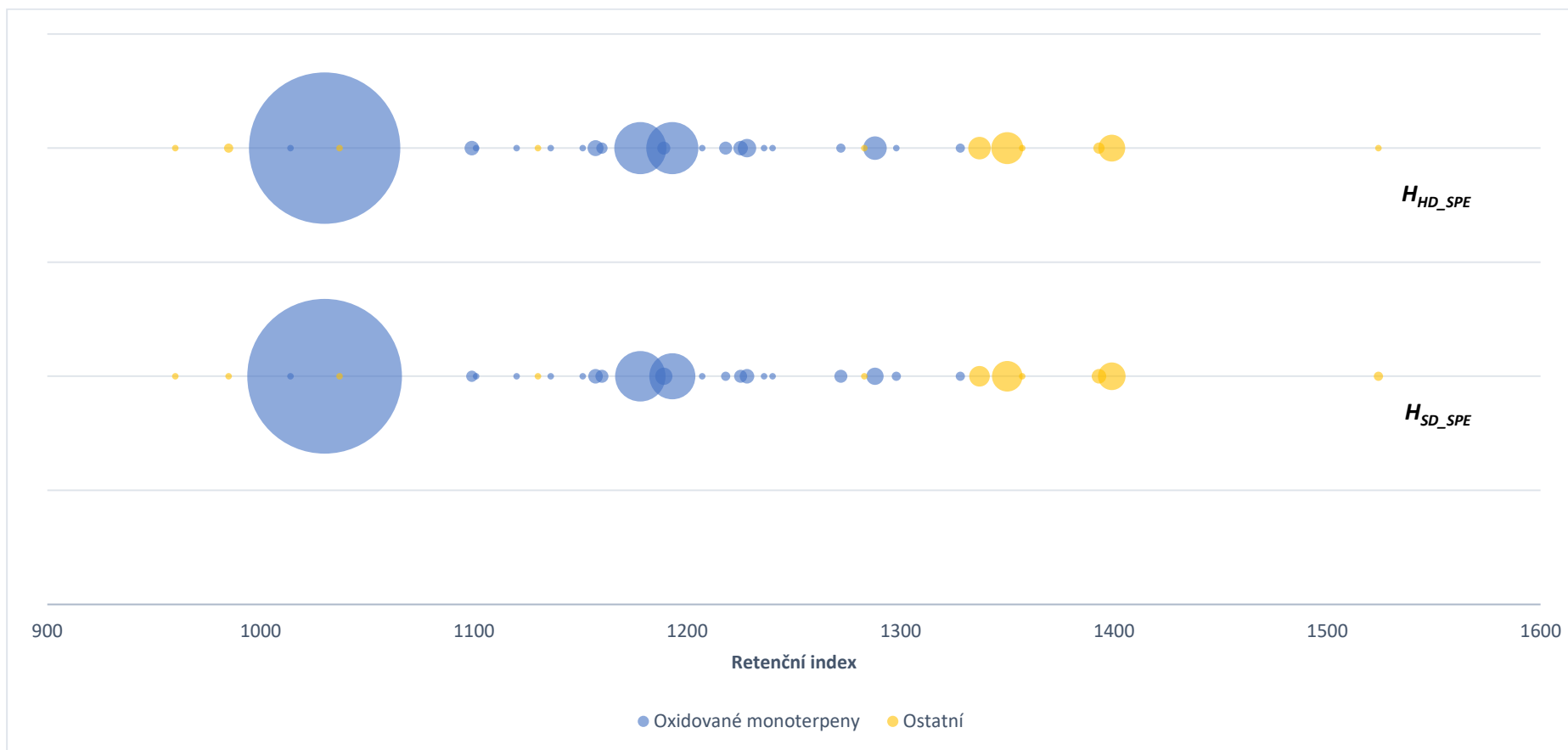
Sloučenina	CAS číslo	Retenční index		Plocha píku [%]	
		Vypočítaný ^a	Publikovaný ^b	H _{SD_SPE} ^c	H _{HD_SPE} ^d
2,6-dimethyl-3,7-oktadien-2,6-diol	13741-21-4	1189	1186	0,7	0,4
α-terpineol	98-55-5	1193	1195	5,0	6,4
verbenon	80-57-9	1207	1204	<0,1	<0,1
karveol	99-48-9	1218	1225	0,2	0,4
2-hydroxy-1,8-cineol	18679-48-6	1225	1229	0,4	0,5
cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	22626-43-3	1228	1231	0,5	0,8
homoveratrol	494-99-5	1236	1230	<0,1	<0,1
kmínový aldehyd	122-03-2	1240	1238	<0,1	<0,1
2,6-dimethyl-1,7-oktadien-3,6-diol	51276-33-6	1272	1277	0,4	0,2
kmínový alkohol	536-60-7	1288	1291	0,7	1,3
thymol	89-83-8	1298	1290	0,2	0,1
p-mentha-1,4-dien-7-ol	22539-72-6	1328	1333	0,2	0,2
Suma [%]				72,1	73,2
Ostatní					
benzaldehyd	100-52-7	960	961	<0,1	<0,1
6-methyl-5-hepten-2-on	110-93-0	985	986	<0,1	0,2
levandulový lakton	1073-11-6	1037	1035	<0,1	0,1
citronový keton	6090-09-1	1130	1131	<0,1	<0,1
bornylacetát	76-49-3	1283	1283	<0,1	<0,1
1,3,3-trimethyl-2-oxabicyklo[2.2.2]okt-5-ylacetát	81781-24-0	1337	1343	1,0	1,2
eugenol	97-53-0	1350	1356	2,2	2,4
1,3,3-trimethyl-2-oxabicyklo[2.2.2]okt-6-ylacetát	57709-95-2	1357	1358	0,1	0,1
vanilin	121-33-5	1393	1393	0,5	0,3
methyleugenol	93-15-2	1399	1403	1,8	1,7
dihydroaktinidiolid	17092-92-1	1524	1525	0,2	<0,1
Suma [%]				7,3	4,8
Celková plocha píků [%]				79,4	78,0

^a Retenční index vypočítaný dle vzorce $RI = 100 \cdot n + 100 \cdot \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$

^b Data publikovaná v NIST (2001) a Adams (2007)

^c H_{SD_SPE} = Hydroláty (H) získané hydrodestilací (HD) a 50 × zakoncentrované na tuhém sorbentu (SPE)

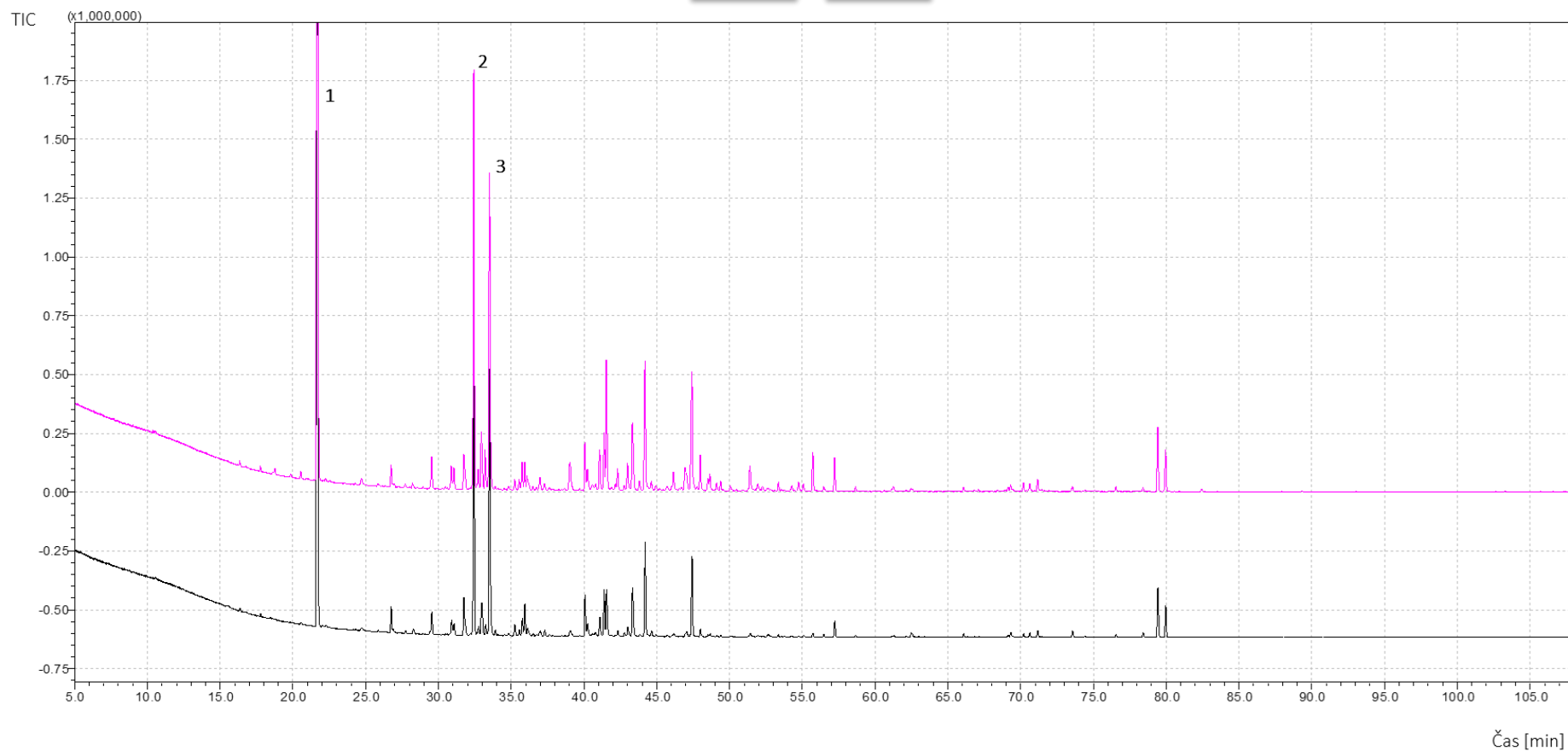
^d H_{HD_SPE} = Hydroláty (H) získané destilací vodní parou (SD) a 50 × zakoncentrované na tuhém sorbentu (SPE)



Graf 2 Aromaprofilý hydrolátů získaných z listů vavřínu ušlechtilého

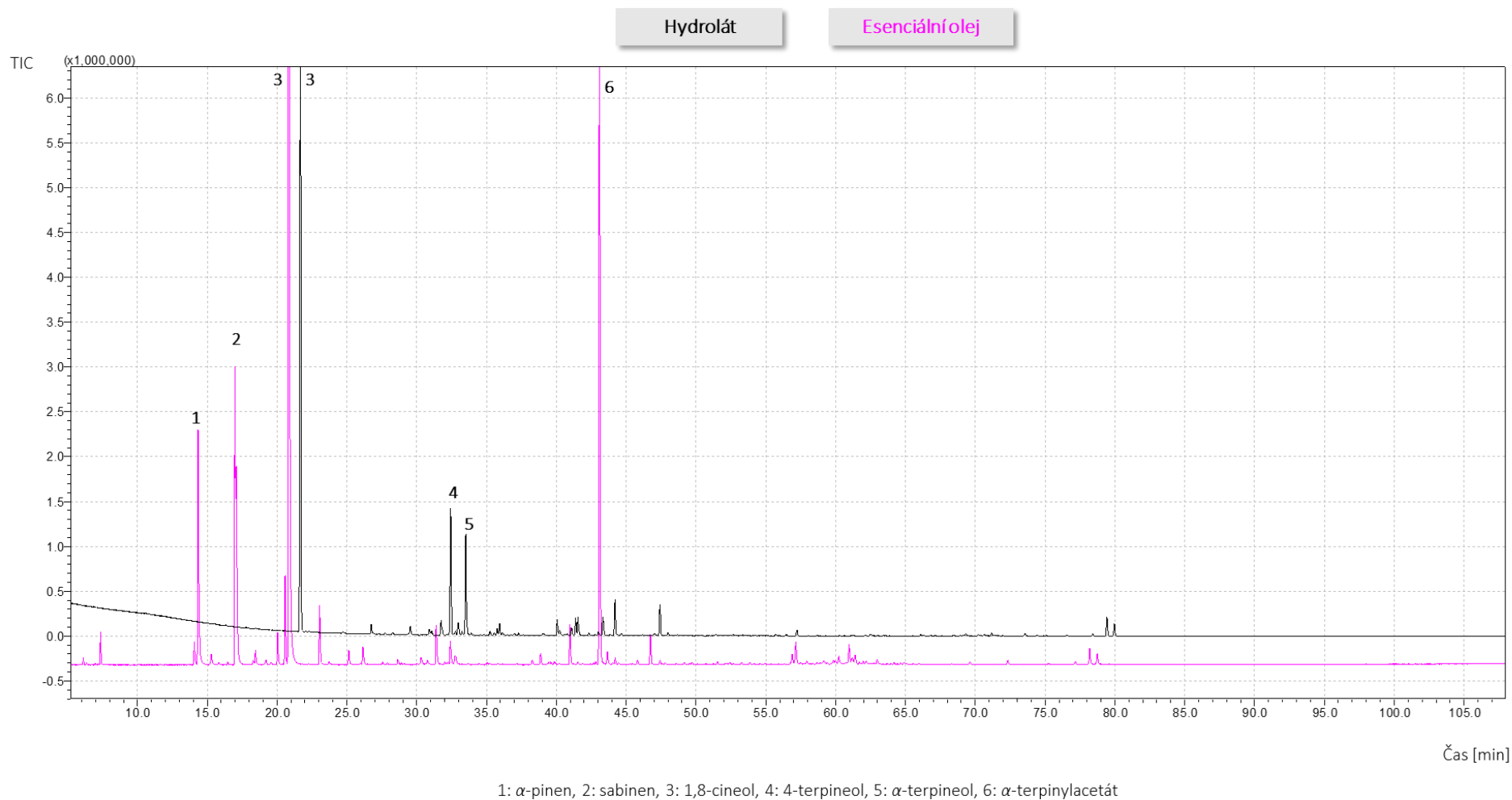
HD

SD



1: 1,8-cineol, 2: 4-terpineol, 3: α -terpineol

Obrázek 35 Chromatogram z GC-MS analýzy hydrolátů vavřínu ušlechtilého



Obrázek 36 Chromatogram z GC-MS analýzy hydrolátu a esenciálního oleje získaného hydrodestilací vavřínu ušlechtilého

7.2.3 Hydrolát ze semen fenyklu obecného

Celkem bylo identifikováno 13 sloučenin v obou typech hydrolátů (Tabulka 10) a tyto sloučeniny tvořily 84,1 % v extraktech H_{SDSPE} a 85,1 % v extraktech H_{HDSPE}. Hlavní sloučeniny v hydrolátech byly estragol a fenchon. Estragol a fenchon jsou hlavními složkami EO fenyklu [194-196]. Estragol byl dále charakterizován jako jeden z klíčových odorantů v EO z fenyklu [197]. Další hlavní složka (často nejhojnější) fenyklového EO, (E)-anethol, nebyla detekována. Aromaprofilu obou získaných hydrolátů z fenyklu obecného jsou zobrazeny v Grafu 3, ze kterého je patrné, že složení hydrolátů bylo velmi podobné, což je pozorovatelné také na získaných chromatogramech (Obrázek 37).

Tabulka 10 Chemické složení hydrolátu získaného hydrodestilací a parní destilací semen fenyklu obecného

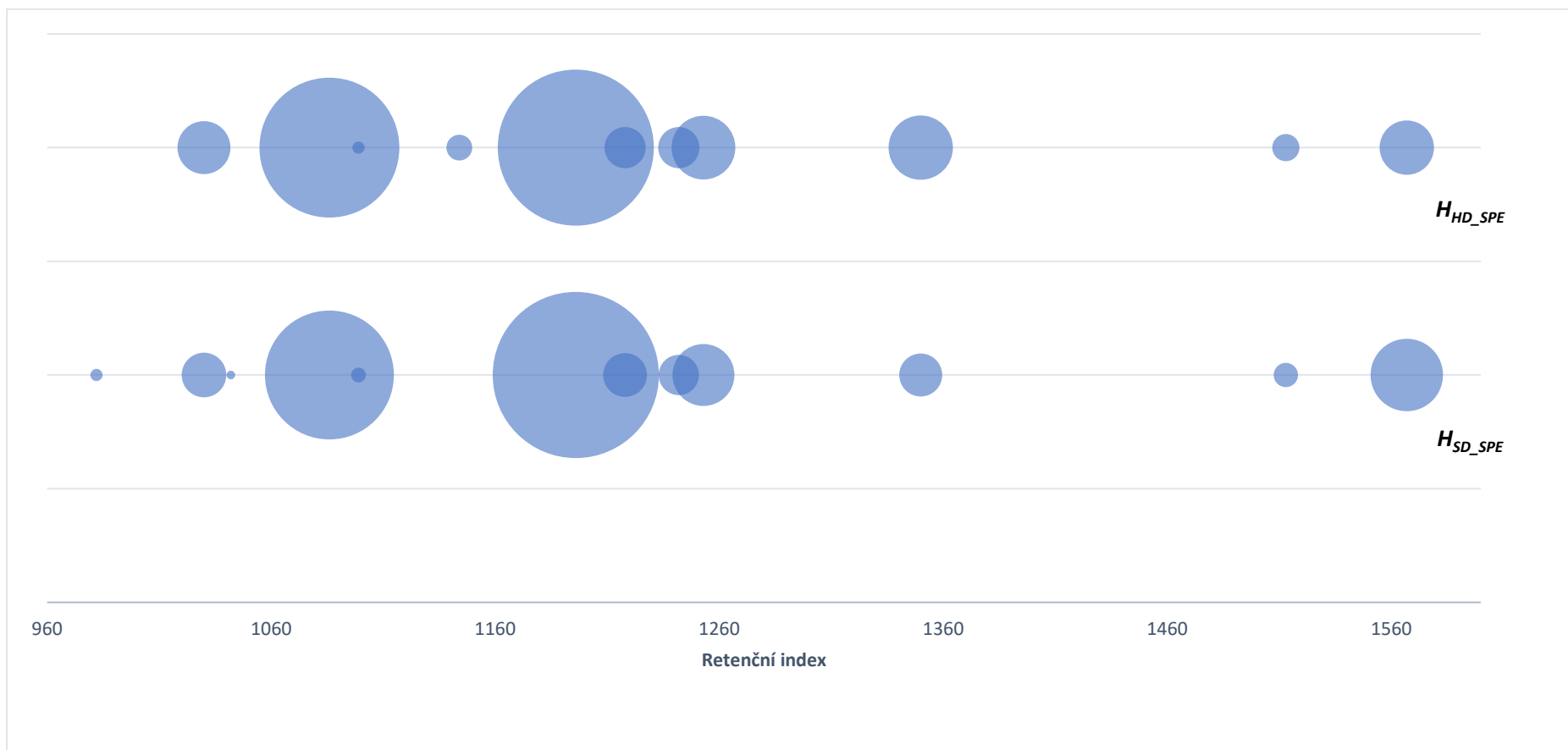
Sloučenina	CAS číslo	Retenční index		Plocha píku [%]	
		Vypočítaný ^a	Publikovaný ^b	H _{SD_SPE} ^c	H _{HD_SPE} ^d
kyselina kapronová	142-62-1	982	981	0,2	-
1,8-cineol (eukalyptol)	470-82-6	1030	1032	2,7	3,8
fenylacetaldehyd	122-78-1	1042	1044	0,1	-
fenchon	1195-79-5	1086	1096	22,5	26,5
linalol	78-70-6	1099	1101	0,3	0,2
kafr	76-22-2	1144	1149	0,7	0,9
estragol	140-67-0	1196	1201	37,4	33,0
karveol	99-48-9	1218	1225	2,6	2,3
karvon	99-49-0	1242	1246	2,2	2,3
<i>p</i> -anýzaldehyd	123-11-5	1253	1258	5,2	5,5
eugenol	97-53-0	1350	1356	2,5	5,6
eugenylacetát	93-28-7	1513	1520	0,8	1,0
<i>p</i> -methoxy skořicový aldehyd	1963-36-6	1567	1564	7,1	4,0
Celková plocha píků [%]				83,6	85,1

^a Retenční index vypočítaný dle vzorce $RI = 100 \cdot n + 100 \cdot \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$

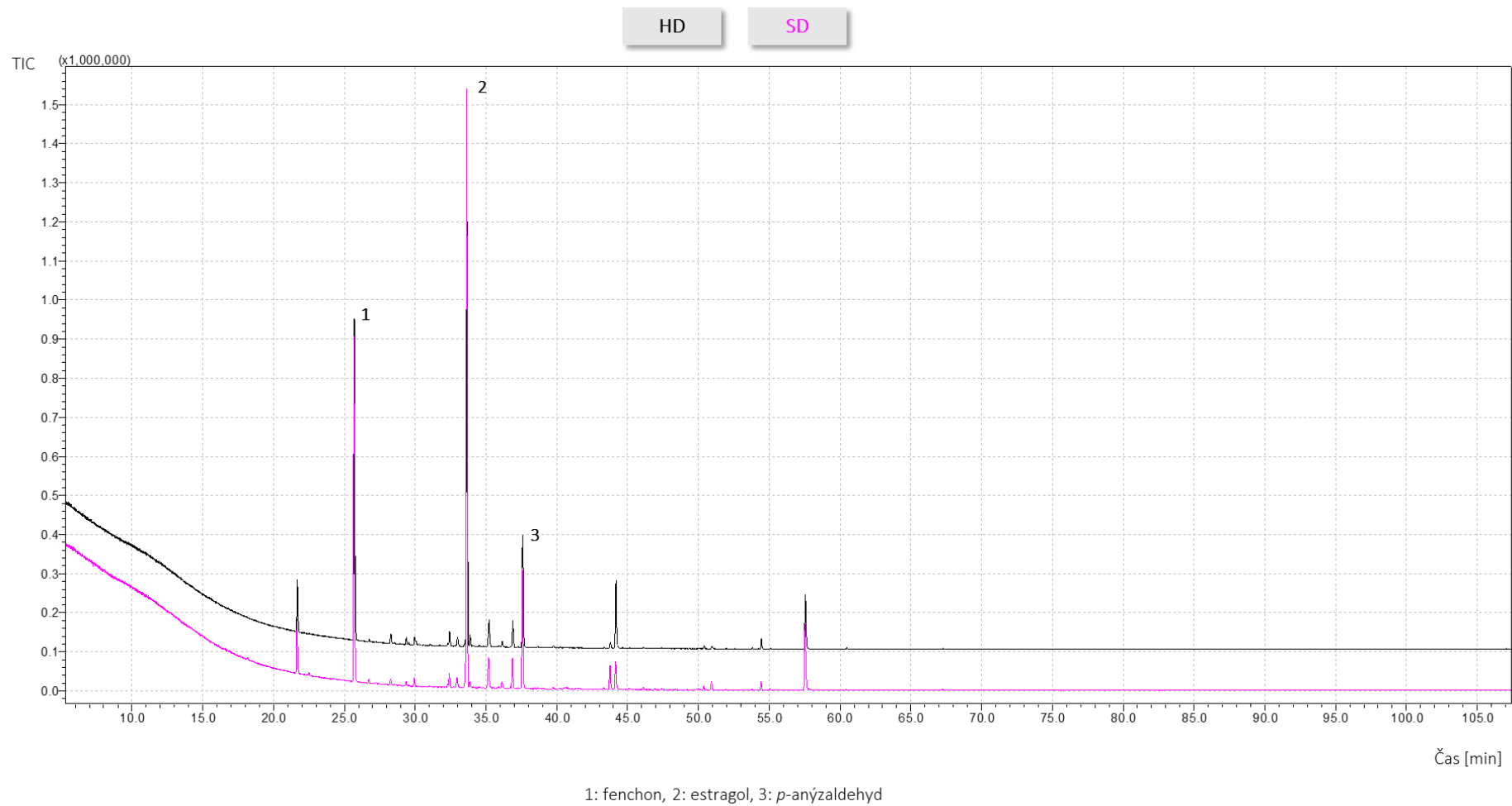
^b Data publikovaná v NIST (2001) a Adams (2007)

^c H_{SD_SPE} = Hydroláty (H) získané hydrodestilací (HD) a 50 × zakoncentrované na tuhém sorbentu (SPE)

^d H_{HD_SPE} = Hydroláty (H) získané destilací vodní parou (SD) a 50 × zakoncentrované na tuhém sorbentu (SPE)



Graf 3 Aromaprofily hydrolátů získaných ze semen fenyklu obecného



Obrázek 37 Chromatogram z GC-MS analýzy hydrolátů fenyklu obecného

7.2.4 Hydrolát z květů hřebíčkovce kořeného

Celkem 9 identifikovaných sloučenin (Tabulka 11) činilo v obou extraktech 99,3 %. Hlavní skupinou identifikovaných sloučenin byly fenolové deriváty, a to eugenol (92,7 % v extraktu H_{HD}SPE, 89,1 % v extraktu H_{SD}SPE) a eugenylacetát (9,4 % v extraktu H_{SD}SPE, 5,6 % v extraktu H_{HD}SPE). Rozdíl v poměru eugenolu a eugenylacetátu v obou extraktech je dán méně příznivými podmínkami během HD než během SD. Eugenylacetát se hydrolyzuje za vzniku eugenolu. Princip je podobný jako v případě linalylacetátu, který se hydrolyzuje během hydrodestilace levandulového oleje. Aromaprofilu obou získaných hydrolátů z hřebíčkovce kořeného jsou v Grafu 4, z kterého je patrné, že složení hydrolátů bylo velmi podobné, což je pozorovatelné také na získaných chromatogramech (Obrázek 38).

Tabulka 11 Chemické složení hydrolátu získaného hydrodestilací a parní destilací květů hřebíčkovce kořeného

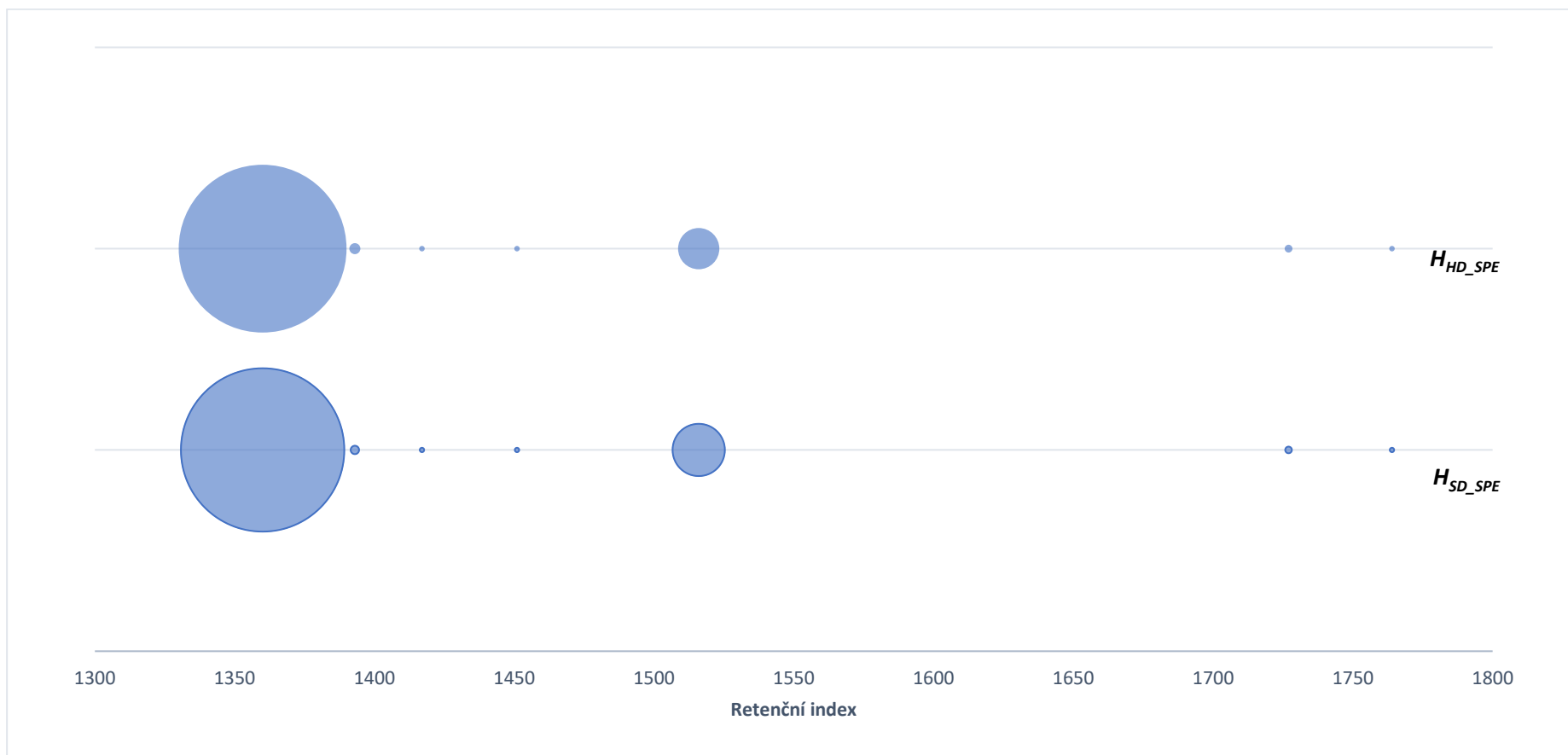
Sloučenina	CAS číslo	Retenční index		Plocha píku [%]	
		Vypočítaný ^a	Publikovaný ^b	H _{SD_SPE} ^c	H _{HD_SPE} ^d
eugenol	97-53-0	1360	1356	89,1	92,7
eugenylacetát	93-28-7	1516	1520	9,4	5,6
chavikol	501-92-8	1253	1254	0,4	0,4
vanilin	121-33-5	1393	1393	0,3	0,4
koniferylaldehyd	458-36-6	1727	1728	0,2	0,2
methylosalicylát	119-36-8	1189	1191	<0,1	<0,1
β-karyofylen	87-44-5	1417	1419	<0,1	<0,1
α-humulen	6753-98-6	1451	1454	<0,1	<0,1
benzyl benzoát	120-51-4	1764	1770	<0,1	<0,1
Celková plocha píků [%]				99,3	99,3

^a Retenční index vypočítaný dle vzorce $RI = 100 \cdot n + 100 \cdot \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$

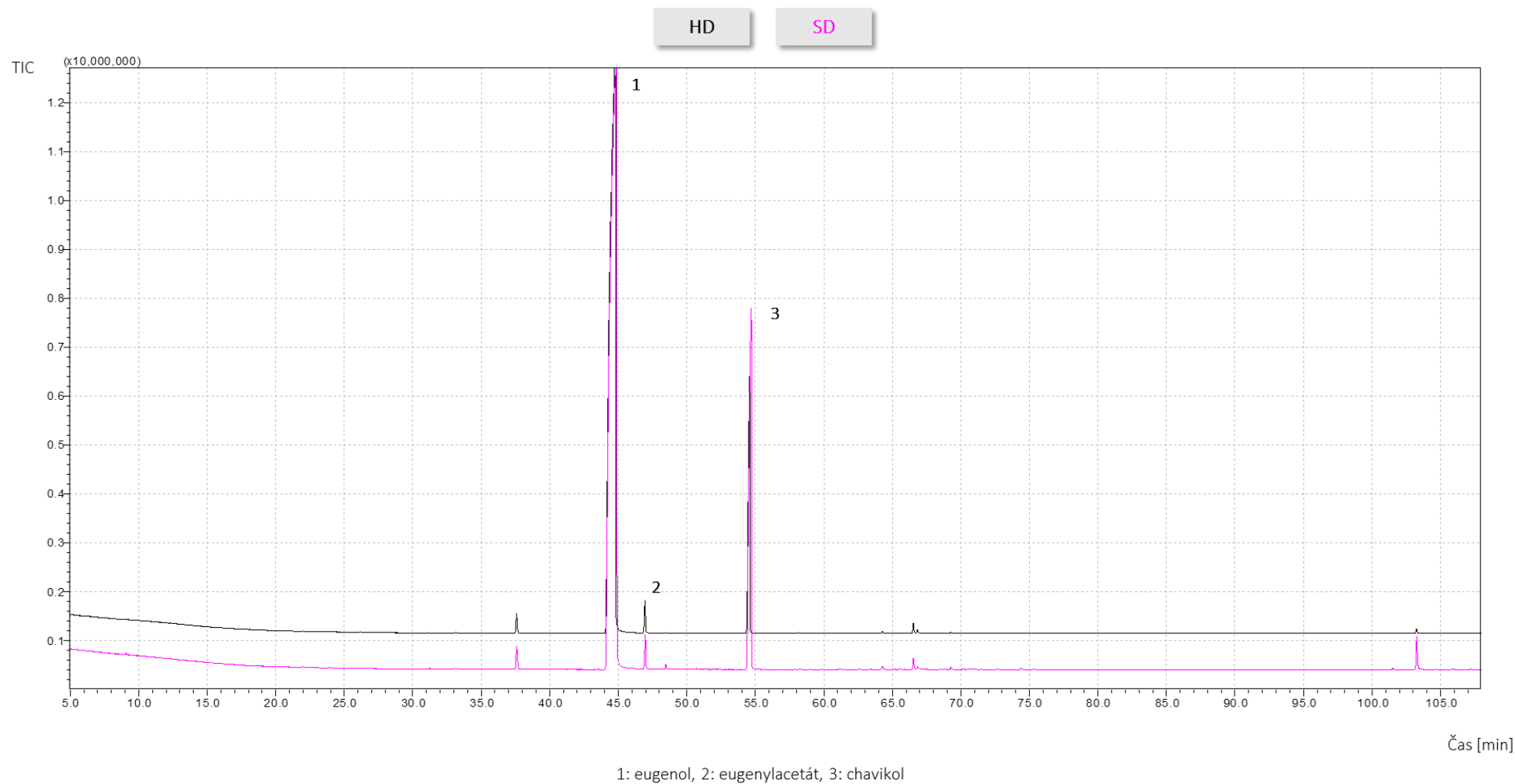
^b Data publikovaná v NIST (2001) a Adams (2007)

^c H_{SD_SPE} = Hydroláty (H) získané hydrodestilací (HD) a 50 × zakoncentrované na tuhém sorbentu (SPE)

^d H_{HD_SPE} = Hydroláty (H) získané destilací vodní parou (SD) a 50 × zakoncentrované na tuhém sorbentu (SPE)



Graf 4 Aromaprofilu hydrolátů získaných z květů hřebíčkovce kořeného



Obrázek 38 Chromatogram z GC-MS analýzy hydrolátů hřebíčkovce kořeného

7.2.5 Antimikrobiální aktivita rostlinných hydrolátů

Antimikrobiální aktivity osmi vzorků nekoncentrovaných a osmi vzorků koncentrovaných hydrolátů z levandule lékařské, hřebíčkovce kořenného, vavřínu ušlechtilého a fenyklu obecného proti osmi kmenům bakterií z rodu *Arcobacter* a dále proti *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Escherichia coli* CCM 3954 a kvasinky *Candida albicans* CCM 8186, jsou uvedeny v Tabulce 12 a 13.

7.2.5.1 Antimikrobiální aktivita nekoncentrovaných rostlinných hydrolátů

U většiny nekoncentrovaných hydrolátů H_{HD} a H_{SD} nebyla zaznamenána žádná antimikrobiální aktivita proti pozorovaným mikroorganismům. Byla sledována pouze slabá inhibice *A. thereius* LMG 24488 (H_{HD} , inhibiční zóna $6,5 \pm 0,3$ mm; H_{SD} , inhibiční zóna $6,8 \pm 0,4$ mm) hydrolátem z hřebíčku, avšak další mikroorganismy z rodu *Arcobacter* nebyly inhibovány žádným z nekoncentrovaných hydrolátů. Další testované gramnegativní bakterie inhiboval rovněž pouze hydrolát z hřebíčku (*Ps. Aeruginosa*, *E. coli*) a to v rozmezí inhibičních zón $7,0$ – $7,3$ mm. Obecně platí, že gramnegativní bakterie jsou odolnější vůči bioaktivním látkám v porovnání s grampozitivními bakteriemi, zejména díky složení buněčné stěny [197]. U testovaných grampozitivních bakterií (*S. aureus*, *Ent. Faecalis*) byla pozorována slabá antibakteriální aktivita všech sledovaných hydrolátů. Nejvyšší inhibici růstu grampozitivních bakterií způsobily hydroláty z fenyklu a hřebíčku. U *S. aureus* CCM 4223, s fenyklem nebo hřebíčkem H_{HD}/H_{SD} , byly pozorovány inhibiční zóny $8,0/8,0$ a $7,8/8,3$ mm. Podobné antimikrobiální účinky u fenyklu (esenciálního oleje) byly také popsány v dřívějších publikacích [198, 199]. *Ent. faecalis* CCM 4224 byl nejvíce inhibován hydrolátem z vavřínu (H_{HD} $7,8 \pm 1,3$; H_{SD} $7,8 \pm 0,5$ mm), fenyklem (H_{HD} $7,8 \pm 0,5$; H_{SD} $7,8 \pm 0,5$ mm) a hřebíčkem (H_{HD} $7,5 \pm 0,5$; H_{SD} $7,5 \pm 0,6$ mm). Při porovnání inhibice růstu *Ent. faecalis* EO z vavřínu, z naší předchozí publikace (Publikace č. 2) [46], je inhibice hydrolátem téměř poloviční oproti inhibiční zóně při použití EO (H_{D} $14,5 \pm 0,5$; S_{D} $20,0 \pm 0,0$); navíc EO získaný SD vavřínu vykazoval stejnou inhibiční zónu jako antibiotikum ampicilin. Z dřívějších publikací je známo, že EO z hřebíčku také vykazuje významné účinky proti *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* a *E. coli* [200]. Při testování *C. albicans* CCM 8186 nebyla prokázána inhibice žádným z testovaných hydrolátů. Avšak při testování EO z vavřínu v naší dřívější publikaci (Řebíčková a kol.) [46] byla *C. albicans* inhibována tímto esenciálním olejem (H_{D} $15,0 \pm 1,0$; S_{D} $18,0 \pm 1,0$). Vyšší účinnost inhibice mikroorganismů esenciálním olejem z vavřínu je dána jeho bohatším složením a obsahem antimikrobiálních látek na bázi terpenů, jako jsou například hlavní složky identifikovány

v našem EO – eukalyptol, α -terpinylacetát, sabinen a α -pinen. Jak je známo, biologická aktivita rostlinných extraktů úzce souvisí s jejich složením, strukturní konfigurací a funkčními sloučeninami chemických sloučenin v extraktech, a dokonce možným synergickým účinkem jednotlivých složek.

Linalol, obsažený v získaných hydrolátech, je známý jako silné antimikrobiální agens proti širokému spektru mikroorganismů [201], tudíž byla očekávána vysoká antimikrobiální aktivita hydrolátů s linalolem proti testovaným mikroorganismům, cože se bohužel nepotvrdilo při prováděných antimikrobiálních testech. Také kumarin a jeho deriváty byly dříve hodnoceny jako látky s potenciálně širokou antimikrobiální aktivitou [202, 203]. V kombinaci s relativně vysokými rozdíly v obsahu derivátů linalolu to může být jedna z příčin vyšší antimikrobiální aktivity H_{SD} extraktů (viz Tabulka 12). Již dříve bylo pozorováno, že vysoký obsah linalolu nebo jeho přidání k esenciálnímu oleji významně zvyšuje jeho antimikrobiální účinky [204]. V dosud publikované literatuře je popsán větší antimikrobiální účinek hydrolátů z vavřínu proti gram pozitivním bakteriím [205]. To však v naší studii nebylo jednoznačně potvrzeno.

Ze získaných výsledků je patrné, že hydroláty získané destilací bez dalšího zakoncentrování nemají významný antimikrobiální potenciál vůči testovaným mikroorganismům v této studii. Antimikrobiální aktivita hydrolátů je významně ovlivněna použitou destilační metodou. I přes velké množství publikací zabývajících se antimikrobiální aktivitou [206-208] esenciálních olejů, hydrolátům je věnováno velmi malé množství odborných článků. Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů je jednoznačně vyšší než hydrolátů a je způsobena zejména vyšší koncentrací hlavních složek v extraktu. I přesto, hydroláty získané destilací mají antimikrobiální aktivitu [49], a lze je dále efektivně použít, a to zejména v koncentrované formě.

7.2.5.2 Antimikrobiální aktivita koncentrovaných hydrolátů

Hydroláty zakoncentrované pomocí SPE vykazovaly oproti nekoncentrovaným významnou antimikrobiální aktivitu (Tabulka 12 a 13) s inhibičními zónami až 23,5 mm a minimální inhibiční (baktericidní) koncentrací až 0,1 %. Antimikrobiální aktivita koncentrovaných hydrolátů je do jisté míry ovlivněna přítomností použitého elučního rozpouštědla (ethanol) při SPE, jehož antimikrobiální aktivita byla rovněž testována jako kontrola (Tabulka 12 a 13). Samotný ethanol způsobil inhibiční zónu u mikroorganismů 6,3 – 9 mm a MIC 1,6 - 12,5 % v závislosti na testovaném kmeni. Stanovené minimální inhibiční koncentrace všech sledovaných vzorků byly v rozmezí 0,1–6,3 %. U většiny testů byly hodnoty MIC a MBC

stejně, nebo nižší. Obecně však většina hydrolátů získaných destilací vodní parou vykazovala vyšší antimikrobiální aktivitu ve srovnání s hydroláty získanými hydrodestilací. Oba koncentrované hřebíčkové hydroláty vykazovaly nejvyšší antimikrobiální aktivitu ze všech testovaných rostlinných matric. Hřebíček je zdrojem bohatým na různé antimikrobiální látky [209]. Mimo jiné v hydrolátech z hřebíčku byl nalezen vyšší obsah eugenolu a eugenylacetátu, které jsou známé pro své antimikrobiální účinky. Pro hydrolát z hřebíčku byly měřeny nejnižší minimální inhibiční koncentrace (0,1 – 0,8 %) a jsou tak nejvíce účinné v inhibici mikroorganismů ze všech testovaných rostlinných matric.

Tabulka 12 Antimikrobiální aktivita hydrolátů zakoncentrovaných s využitím SPE testovaná na kmenech Arkobakterů, průměr inhibičních zón ± standardní odchylka je uveden v mm (zahrnující 6 mm disk) a minimální inhibiční/baktericidní koncentrace v %, n = 4

Rostlinný materiál			Ab	Ab	Ab	Ac	Ac	Al	As	At
			LMG 10828	CCUG 30484	UPa 2012/3	CCM 7050	UPa 2013/13	LMG 28517	LMG 6621	LMG 24488
Levandule lékařská	IZ	H _{HD_SPE}	9,5±0,3	8,8±0,3	12,8±0,3	8,3±0,5	8,0±0	11,3±1,0	9,0±0,8	11,5±0,3
		H _{SD_SPE}	10,8±0,3	13,5±0,6	10,5±0,3	9,5±0,9	11,5±0,1	11,8±0,3	10,3±0,5	13,3±0,9
	MIC/MBC	H _{HD_SPE}	0,4/0,8	0,8/0,8	0,8/1,6	0,8/0,8	0,8/0,8	0,8/0,8	0,4/0,4	0,8/1,6
		H _{SD_SPE}	0,4/0,4	0,4/0,8	1,6/1,6	0,4/0,8	0,4/0,4	0,4/0,8	0,4/0,4	0,4/0,8
Fenykl obecný	IZ	H _{HD_SPE}	7,8±0,2	9,0±0,8	10,5±0,9	9,8±0	8,5±1,3	10,8±0,5	7,8±0,5	12,0±0,1
		H _{SD_SPE}	10,8±0	10,8±0,5	10,8±0,9	10,0±0,2	10,0±0,8	11,8±0	10,3±0,3	11,3±0,5
	MIC/MBC	H _{HD_SPE}	1,6/1,6	3,1/3,1	1,6/3,1	0,8/0,8	1,6/1,6	1,6/1,6	0,8/0,8	1,6/1,6
		H _{SD_SPE}	0,8/1,6	1,6/3,1	1,6/1,6	0,4/0,8	0,8/0,8	0,8/1,6	0,4/0,4	0,8/0,8
Vavříň ušlechtilý	IZ	H _{HD_SPE}	8,0±0,2	9,0±0,8	9,0±0	9,5±0,3	9,5±0,3	11,3±0,3	9,0±0,3	10,8±0
		H _{SD_SPE}	10,5±0,3	9,5±0,6	14,0±0,8	10,3±0,3	10,0±0,3	10,5±0,6	12,5±0,7	13,3±0,6
	MIC/MBC	H _{HD_SPE}	1,6/1,6	1,6/1,6	1,6/3,1	0,8/1,6	0,8/1,6	1,6/3,1	1,6/3,1	1,6/1,6
		H _{SD_SPE}	0,8/1,6	0,8/1,6	0,8/1,6	0,8/1,6	0,8/1,6	1,6/3,1	1,6/1,6	0,8/0,8
Hřebíčkovce kořený	IZ	H _{HD_SPE}	10,5±0,3	12,0±0,9	13,0±0,6	10,5±0,3	14,3±0,5	12,0±0,6	12,0±0,9	14,8±0,5
		H _{SD_SPE}	12,5±0,7	13,5±0,4	14,5±0,3	12,5±0,3	16,5±0,3	12,8±0,7	11,0±0,3	15,5±0,7
	MIC/MBC	H _{HD_SPE}	0,1/0,1	0,2/0,2	0,8/0,8	0,2/0,2	0,4/0,4	0,4/0,4	0,2/0,2	0,4/0,4
		H _{SD_SPE}	0,1/0,1	0,1/0,1	0,8/0,8	0,1/0,1	0,1/0,1	0,4/0,4	0,1/0,1	0,2/0,4
Kontrola	IC		8,0±0,8	7,7±0,5	7,7±0,5	8,0±0,8	7,0±0,8	6,7±0,5	8,3±0,5	8,0±0,8
	MIC/MBC		3,1/6,3	3,1/6,3	3,1/6,3	1,6/3,1	3,1/3,1	3,1/3,1	1,6/3,1	3,1/3,1

H_{SD_SPE} = Hydroláty (H) získané hydrodestilací (HD) a 50 × zakoncentrované tuhým sorbentem (SPE); H_{HD_SPE} = Hydroláty (H) získané destilací vodní parou (SD) a 50 × zakoncentrované extrakcí tuhým sorbentem (SPE); IZ = inhibiční zóna; MIC = minimální inhibiční koncentrace; MBC = minimální baktericidní koncentrace; Kontrola – rozpouštědlo bez aktivních sloučenin; Ab = *A. butzleri*; Ac = *A. cryaerophilus*; Al = *A. lanthieri*; As = *A. skirrowii*; At = *A. thereius*

Tabulka 13 Antimikrobiální aktivita hydrolátů zakoncentrovaných s využitím SPE testovaná na vybraných mikroorganismech, průměr inhibičních zón ± standardní odchylka je uveden v mm (zahrnující 6 mm disk) a minimální inhibiční/baktericidní koncentrace v %, n = 4

Rostlinný materiál	Antimikrobiální aktivita	Extrakční metoda	Sa	Ef	Pa	Ec	Ca
			CCM 4223	CCM 4224	CCM 3955	CCM 3954	CCM 8186
Levandule lékařská	IZ	H _{HD_SPE}	8,5±0,7	7,5±0,6	8,5±0,4	8,8±0,5	6,0±0
		H _{SD_SPE}	8,3±0,5	9,5±0,3	10,5±0,3	9,0±0,3	6,0±0
	MIC/MBC	H _{HD_SPE}	1,6/3,1	3,1/3,1	1,6/3,1	1,6/3,1	6,3/6,3
		H _{SD_SPE}	1,6/3,1	1,6/3,1	1,6/1,6	1,6/3,1	6,3/6,3
Fenykl obecný	IZ	H _{HD_SPE}	10,8±0,9	9,3±0,9	11,0±0,8	11,3±0,5	10,5±0,6
		H _{SD_SPE}	11,3±0,7	15,0±0,1	11,5±0,8	11,5±0,3	11,8±0,7
	MIC/MBC	H _{HD_SPE}	3,1/6,3	3,1/6,3	3,1/3,1	1,6/3,1	1,6/3,1
		H _{SD_SPE}	3,1/6,3	1,6/3,2	1,6/3,1	1,6/3,1	1,6/3,1
Vavřík ušlechtilý	IZ	H _{HD_SPE}	9,5±0,3	11,0±0,8	10,3±0,7	10,3±0,7	9,8±0,9
		H _{SD_SPE}	9,5±0,6	12,3±0,5	11,5±0,9	10,5±0,9	13,3±0,9
	MIC/MBC	H _{HD_SPE}	1,6/1,6	6,3/12,5	1,6/3,1	3,1/6,3	1,6/3,1
		H _{SD_SPE}	1,6/1,6	6,3/6,3	3,1/6,3	1,6/3,1	0,4/0,8
Hřebíčkovce kořený	IZ	H _{HD_SPE}	15,8±0,7	15,3±0,3	11,3±0,1	13,5±0,7	14,8±0,4
		H _{SD_SPE}	15,5±0,9	18,8±0,9	12,8±0,7	14,0±0,8	23,5±0,7
	MIC/MBC	H _{HD_SPE}	0,4/0,4	0,8/0,8	0,8/1,6	3,1/6,3	6,3/6,3
		H _{SD_SPE}	0,4/0,8	0,4/0,8	0,4/0,8	1,6/3,1	1,6/3,1
Kontrola	IZ		7,3±0,5	9,0±0,8	8,7±0,5	8,0±0	6,3±0,5
	MIC/MBC		12,5/12,5	12,5/12,5	3,1/6,3	6,3/12,5	6,3/12,5

H_{SD_SPE} = Hydroláty (H) získané hydrodestilací (HD) a 50 × zakoncentrované tuhým sorbentem (SPE); H_{HD_SPE} = Hydroláty (H) získané destilací vodní parou (SD) a 50 × zakoncentrované extrakcí tuhým sorbentem (SPE); IZ = inhibiční zóna; MIC = minimální inhibiční koncentrace; Sa = *S. aureus*; Ef = *E. faecalis*; Pa = *P. aeruginosa*; Ec = *E. coli*; Ca = *C. albicans*

7.3 *Shrnutí*

V této části disertační práce bylo hodnoceno chemické složení hydrolátů získaných hydrodestilací a destilací vodní parou levandule lékařské, hřebíčkovce kořenného, fenyklu obecného a vavřínu ušlechtilého. Mimo jiné byl tento výzkum ve spolupráci s Katedrou biologických věd zaměřen také na antimikrobiální vlastnosti hydrolátů na planktonní a biofilmové buňky, které v této disertační práci nejsou popisovány, ale výsledky jsou popsány ve zmíněné publikaci. V hydrolátech bylo celkem identifikováno 48 (levandule), 9 (hřebíček), 13 (fenykl) a 33 (vavřín) různých složek. Levandulový hydrolát obsahoval největší podíl eukalyptolu, linalol furanoxidu a linalolu. Hlavními složkami vavřínového hydrolátu byly eukalyptol, 4-terpineol a α -terpineol. Fenchon a estragol byly nejhojněji obsaženy v hydrolátu z fenyklu a eugenol a eugenylacetát v hydrolátu z hřebíčku. Koncentrované hydroláty vykazovaly významnou antimikrobiální aktivitu. Hydrolát z hřebíčku byl mezi nejvíce antimikrobiálně aktivními, zejména proti *C. albicans*, s inhibiční zónou až 23,5 mm. Navíc koncentrované hydroláty nevykazovaly žádný cytotoxický účinek na lidské buňky A549, jak je popsáno ve zmíněné publikaci. Výzkum ukazuje nové poznatky o hydrolátech, které mohou být důležité v přírodní medicíně nebo pro konzervační účely.

8 Chemické složení a antimikrobiální aktivita esenciálních olejů z asijských bylin (*Houttuynia cordata* a *Persicaria odorata*) v kapalně a parní fázi

Tato kapitola se věnuje esenciálním olejům izolovaným hydrodestilací z asijských bylin, touleň srdčitá (*Houttuynia cordata*) a rdesno vonné (*Persicaria odorata*), které byly pro tento výzkum vybrány dle jejich stejného geografického výskytu a podobného využití. Výsledky diskutované v této kapitole byly publikovány během doktorského studia v odborném zahraničním časopise (Publikace č. 3: Řebíčková K. a kol., Chemical Composition and Determination of the Antibacterial Activity of Essential Oils in Liquid and Vapor Phases Extracted from Two Different Southeast Asian Herbs-*Houttuynia cordata* (Saururaceae) and *Persicaria odorata* (Polygonaceae) *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 10, s. "2432-1"- "2432-11". ISSN: 1420-3049.). Složky esenciálních olejů byly separovány a identifikovány pomocí GC-MS a bylo stanoveno jejich procentuální zastoupení pomocí GC-FID. Získané esenciální oleje, v parní i kapalně fázi, byly testovány na antimikrobiální aktivitu pomocí mikrodiluční volatilizační metody. Antimikrobiální aktivita byla testována na gramnegativních a grampozitivních bakteriích – *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescense* a *Bacillus subtilis*.

V posledních letech se mnoho výzkumníků soustředilo na nalezení nových antimikrobiálních látek, které by bylo možné použít na multi-resistentní mikroorganismy. Léčivé rostliny a jejich přírodní produkty tvoří převládající zdroj přírodních léčiv, a proto už od nepaměti slouží jako nejdostupnější prostředek k léčbě mnoha nemocí. Esenciální oleje, které jsou přírodními extrakty z rostlin, mohou mít velké potencionální využití v léčbě mnoha, například bakteriálních, onemocnění. Jak již bylo zmíněno v teoretické části této práce, esenciální oleje mají rozmanité biologické vlastnosti. Obsahují široké rozmezí komplexních a strukturálně odlišných sloučenin, které jsou biologicky, respektive antimikrobiálně aktivní, a na jejichž kombinaci by si mohly bakterie hůře vypěstovat rezistenci na rozdíl od komerčních antimikrobiálních látek, které jsou založené pouze na jedné chemické substanci [210]. Aby mohly být v budoucnu esenciální oleje používány k léčbě různých onemocnění, je důležité, aby byly správně chápány souvislosti mezi jejich chemickým složením a potencionální antimikrobiální aktivitou.

Složky esenciálních olejů jsou těkavé a jejich páry ovlivňují jejich antimikrobiální aktivitu. Proto je důležité kromě kapalně fáze dostatečně prozkoumat i složení a vlastnosti plynně fáze. V současnosti se parní fázi esenciálních olejů věnovalo několik výzkumných skupin, avšak toto odvětví by si zasloužilo mnohem širší výzkum a pozornost při zkoumání vlastností esenciálních

olejů [13, 191, 211-214]. Předpokládá se, že aktivní molekuly v plynné i kapalně fázi působí synergicky a ukázalo se, že mnohdy parní fáze esenciálního oleje je proti některým mikroorganismům účinnější [191, 215]. V případě, že by se v parní fázi nacházely biologicky aktivní molekuly, byla by zde například možnost využít esenciální oleje k inhalaci a léčbě onemocnění dýchacích cest [212, 213]. Dále je zde potencionální možnost využití těchto vlastností esenciálních olejů k výrobě potravinářských obalových materiálů, které chrání potraviny proti šíření mikroorganismů a prodlužují jejich životnost [216-218].

Tradičně se k vyhodnocení účinnosti antimikrobiálního agens užívá minimální inhibiční koncentrace, kterou lze získat několika metodami. Nejčastěji agarovou nebo bujonovou diluční a mikrodiluční metodou [215, 219]. Tyto metody jsou však vhodné pouze pro stanovení minimální inhibiční koncentrace v kapalně fázi antimikrobiálního agens. V posledních letech bylo navrženo několik metod a jejich modifikací k testování MIC mikroorganismů v parní fázi antimikrobiální látky. Nejčastěji se používá disková volatilizační metoda a její modifikace [13, 22, 214, 219, 220]. Pro tento výzkum byla zvolena moderní metoda, vyvinuta skupinou Houdkové a kol., nazývána bujonová mikrodiluční volatilizační metoda [12]. Je jednoduchou a rychlou metodou vhodnou pro simultánní vyhodnocení antimikrobiálního potenciálu rostlinných extraktů v kapalně i parní fázi.

8.1 Materiál a metody

8.1.1 Rostlinný materiál

Na lokálním vietnamském trhu (TTTM Sapa, Praha, Česká republika) bylo zakoupeno cca 120 g čerstvých asijských bylin touleň srdčitá a rdesno vonné. Čerstvý rostlinný materiál byl sušen volně na vzduchu v temné místnosti při laboratorní teplotě. Před destilací byl rostlinný materiál včetně stonků a listů rozdrcen na malé kousky.

8.1.2 Izolace esenciálního oleje

Esenciální oleje byly získány hydrodestilací v Clevengerově aparatuře. Rostlinný extrakt byl připraven následujícím způsobem: 26,7 g (touleň srdčitá) nebo 18,4 g (rdesno vonné) usušené byliny bylo naváženo a vpraveno do 2000 ml destilační baňky, následně bylo přidáno 1000 ml vody, která byla přivedena k varu. Hydrodestilace probíhala po dobu 4 hodin. Esenciální olej byl poté oddělen od hydrolátu a skladován v uzavřených lahvičkách z tmavého skla při 4 °C až do analýzy.

8.1.3 Bakteriální kmeny a kultivační média

Čtyři gramnegativní a čtyři grampozitivní bakterie způsobující respirační infekce, včetně onemocnění horních a dolních dýchacích cest byly vybrány pro testování EO v parní a kapalně fázi. Pro experiment byly použity standardní kmeny: *Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Streptococcus pyogenes* NPK01, *Klebsiella pneumoniae* NPK12, *Serratia marcescens* CCM 303 a *Bacillus subtilis* CCM 2215. Bakteriální kmeny byly zakoupeny od České sbírky mikroorganismů (CCM), Brno, Česká republika. Bakterie byly inkubovány při 37 ° C po dobu 24 hodin. Před experimentem byly připraveny bakteriální suspenze s turbiditou podle McFarlandovy stupnice odpovídající stupni 0,5 (~ 10⁸ CFU · ml⁻¹). Jako kultivační a testovací médium bylo použito Mueller-Hintonovo médium (agar a bujón; Himedia, Indie). pH bujónu bylo upraveno na konečnou hodnotu 7,6 za použití báze Trizma a kyseliny chlorovodíkové (obě Himedia, Indie). Pro pozitivní kontrolu testu bylo použito antibiotikum Ampicilin (St. Louis, MO, USA).

8.1.4 Metoda určení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita kapalně a plynně fáze esenciálních olejů byla stanovena bujonovou mikrodiluční volatilizační metodou dle Obrázku 31 v teoretické části práce [12]. Experiment byl proveden v 96jamkových mikrotitračních destičkách s objemem jedné jamky 400 µl. Test je určen k testování antimikrobiální aktivity maximálně 6 vzorků najednou proti jednomu mikroorganismu. Při tomto experimentu byly testovány pouze dva EO. Mikrotitrační destičky byly sesvorkovány pomocí dvou dřevěných desek a plastových svorek, tak aby se zabránilo úniku plynně fáze. Okrajové jamky mikrotitrační destičky byly ponechány prázdné, aby se zabránilo okrajovému efektu. Nejprve byly připraveny vzorky esenciálního oleje následujícím způsobem: přibližně 2 µl EO byly přidány k odpovídajícímu množství dimethylsulfoxidu (DMSO) v koncentraci 1 %, poté byly dále zředěny v odpovídajícím bujónu na počáteční koncentraci. Nakonec bylo připraveno antibiotikum v počáteční koncentraci 4 µg·ml⁻¹.

V první části experimentu bylo na víčko destičky napipetováno 30 µl agaru a naočkováno 5 µl bakteriální suspenze pro testování v plynně fázi. Ve druhé části experimentu (test v kapalně fázi) bylo do jamek pipetováno 100 µl pufrovaného Mueller-Hintonova bujónu. Každá jamka měla konečný objem 100 µl. Pro každý esenciální olej v jedné řadě bylo připraveno sedm dvojnásobně zředěných koncentrací vzorků počínaje koncentrací 1024 µg·ml⁻¹. V prvních dvou sloupcích byla připravena pozitivní a negativní kontrola růstu bakterií. V posledním sloupci bylo připraveno 6 dvojnásobně zředěných koncentrací antibiotika s počáteční koncentrací

4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nakonec byly všechny jamky kromě negativní kontroly naočkovány 5 μl bakteriální suspenze. Destičky byly uzavřeny, zafixovány a inkubovány při 37 ° C po dobu 24 hodin. Po inkubaci byl vizuálně vyhodnocen růst bakterií pomocí minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů, obarvením metabolicky aktivní bakteriální kolonie barvivem „Thiazolyl blue Tetrazolium Bromid“ (MTT; Sigma Aldrich, Praha, Česká republika). Na víko a každou jamku destičky bylo nanášeno 25 μl barviva o koncentraci 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a ekvilibrováno po dobu 10 minut. Barva se změnila ze žluté (mrtvé buňky) na fialovou (živé buňky). Poté byly zaznamenány hodnoty MIC. Všechny experimenty byly prováděny třikrát ve třech nezávislých experimentech. Výsledky jsou vyjádřeny jako medián minimální inhibiční koncentrace hodnot antimikrobiálního činidla.

8.1.5 GC-MS analýza esenciálních olejů

Analýza vzorků EO byla provedena na plynovém chromatografu GC 2010 s hmotnostním spektrometrem GCMS-QP2010 Plus (oba Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a Combi Pal Autosamplerem (CTC Analytics, AG, Zwingen, Švýcarsko) na kapilární koloně SLB-5MS od firmy Supelco (30 m \times 0,25 mm, tloušťka filmu 2,5 μm ; Bellefonte, PA, USA). Jako nosný plyn bylo použito Helium 5.0 (Linde, Praha, Česká republika). Separace látek probíhala při konstantní lineární rychlosti nosného plynu 30 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Teplotní program byl nastaven na počáteční teplotu 40 °C po dobu 3 minut, poté byl termostat vyhříván na 250 °C rychlostí 2 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ a finální teplota byla udržována na 250 °C po dobu 10 minut. Teplota injektoru a převodníku do detektoru byla nastavena na 200 °C. Hmotnostní spektrometr byl provozován v režimu elektronové ionizace při ionizační energii 70 eV a byly skenovány ionty s m/z 33–500. 1 μl zředěného esenciálního oleje (200 \times , *n*-hexan) bylo dávkováno při splitovacím poměru 1:50.

Retenční indexy látek byly experimentálně vypočteny vzhledem k C8 – C33 *n*-alkanům v koncentracích 100–200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ rozpuštěných v *n*-hexanu (Restek, Bellefonte, PA, USA). Výpočet byl proveden metodou van den Doola a Kratze a výsledky byly dále porovnány s publikovanými údaji. Sloučeniny byly identifikovány porovnáním jejich hmotnostních spekter s hmotnostními spektry několika standardů (Tabulka 15) a komerčními databázemi hmotnostních spekter NIST'14 Mass Spectral Library a FFNSC 2 GC MS Library Release 2.0 (Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds Library) a dále verifikovány manuálním vyhodnocením hmotnostních spekter.

8.1.6 Analýza GC-FID

Analýza vzorků EO byla provedena na plynovém chromatografu Gas Chromatograph GC 2010 s plamenovým ionizačním detektorem (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a Autosamplerem Combi Pal (CTC Analytics, AG, Zwingen, Švýcarsko) na kapilární koloně SLB-5MS od firmy Supelco (30 m × 0,25 mm, tloušťka filmu 2,5 μm; Bellefonte, PA, USA). Podmínky pro GC-FID byly stejné pro analýzu GC-MS. Teplota injektoru byla nastavena na 200 °C a teplota detektoru na 260 °C. 1 μl zředěného esenciálního oleje (200×, *n*-hexan) bylo dávkováno při splitovacím poměru 1:50. Stejně jako v případě GC-MS byly vypočítány experimentální retenční indexy a porovnány s publikovanými údaji.

8.2 Výsledky a Diskuse

8.2.1 Výtěžnost extrakce a chemické složení esenciálních olejů

Hydrodestilací nadzemních částí usušené rostliny toulenu srdčité byl získán světle žlutý esenciální olej se slabou citrusovo-rybí vůní. Výtěžnost hydrodestilace byla 0,34 %. Výtěžek extrakce je vyšší ve srovnání s výtěžky dříve publikovanými Vermou a kol. [221], kteří dosáhli výtěžnosti 0,06–0,14%. V esenciálním oleji bylo celkem identifikováno 41 sloučenin (90,6 % plochy), které jsou uvedeny v Tabulce 15. Esenciální olej obsahoval 75,5 % terpenických sloučenin a 15,1 % neterpenických sloučenin, jako jsou deriváty fenypropenu, aldehydy, ketony, estery a mastné kyseliny. Hlavní skupinu látek obsažených v EO jsou monoterpeny s obsahem 59,4 %, dále skupina dalších sloučenin s obsahem 14,8 %, oxidované monoterpeny s obsahem 7,2 % a seskviterpeny s obsahem 6,6 % (Graf 5). Dalšími skupinami obsaženými v EO byly oxidované seskviterpeny a deriváty fenypropenu. Hlavní sloučeniny obsažené v získaném esenciálním oleji byly β -myrcen (51,6 %), 2-undekanon (6,7 %), tridekan-2-on (6,1 %), *cis*- β -ocimen (5,7 %), geranylacetát (3,1 %), bornylacetát (2,9 %) a *cis*-karyofylen (2,6 %). Koncentrace ostatních sloučenin v získaném EO byla nižší než 2 %. Výsledky získané v tomto výzkumu jsou podobné výsledkům předchozích studií [23, 221, 222]. V porovnání s dalšími studii bylo pozorováno pouze v několika málo případech mírně odlišné složení EO, které jsou nejspíše způsobeny jiným původem vzorku, či odlišnou extrakční metodou použitou k izolaci EO. Za charakteristickou rybí vůni a příchut' éterických olejů z toulenu srdčité je zodpovědná sloučenina houttuynin (dekanoyl acetaldehyd). Tato sloučenina je však velice nestabilní, a proto nebyla nalezena v EO získaném v tomto výzkumu. Je obvyklé, že dekanoyl acetaldehyd je během procesu destilace snadno oxidován na 2-undekanon, který byl v získaném EO identifikován látkou s druhou nejvyšší koncentrací [221]. Z důvodu

nestability houčtuyninu, je koncentrace 2-undekanonu primárním ukazatelem kvality éterického oleje získaného z listů touleň srdčité [221, 223].

Tabulka 14 Chemické složení esenciálních olejů z touleň srdčité a rdesna vonného

Sloučenina	CAS číslo	Retenční index		Plocha píku [%]	
		Vypočítaný ^a	Publikovaný ^b	Touleň srdčítá	Rdesno vonné
Monoterpeny					
α -pinen	80-56-8	930	933	0,53	-
kamfen	79-92-5	946	953	0,36	-
β -pinen	127-91-3	974	978	0,45	-
β -myrcen	123-35-3	993	991	51,64	-
limonen	138-86-3	1027	1030	0,49	-
<i>cis</i> - β -ocimen	3338-55-4	1036	1040	5,72	-
<i>trans</i> - β -ocimen	3779-61-1	1046	1046	0,18	-
7- <i>epi</i> -seskvithujen	159407-35-9	1387	1387	-	0,02
Suma [%]				59,37	0,02
Oxidované monoterpeny					
perilen	539-52-6	1097	1098	0,51	-
linalol	78-70-6	1100	1101	0,28	-
myroxid	33281-83-3	1131	1129	0,01	-
isoborneol	10385-78-1	1169	1165	0,08	-
α -terpineol	98-55-5	1193	1195	0,06	-
β -cyklocitral	432-25-7	1218	1219	-	0,04
<i>trans</i> -geraniol	102-24-1	1251	1255	0,2	-
bornylacetát	92618-89-8	1283	1285	2,85	-
nerylacetát	141-12-8	1358	1365	0,12	-
geranylacetát	105-87-3	1378	1383	3,11	-
Suma [%]				7,22	0,04
Seskviterpeny					
<i>cis</i> -karyofylen	13877-93-5	1419	1424	2,58	3,88
<i>trans</i> - α -bergamoten	13474-59-4	1431	1432	0,1	0,25
isogermakren D	317819-80-0	1441	1447	-	0,08
<i>trans</i> - karyofylen	87-44-5	1452	1451	0,99	-
α -humulen	6753-98-6	1455	1454	-	4,50

Sloučenina	CAS číslo	Retenční index		Plocha píku [%]	
		Vypočítaný ^a	Publikovaný ^b	Touleň srdčitá	Rdesno vonné
γ -gurjunen	22567-17-5	1474	1476	-	0,30
selina-4,11-dien	17627-30-4	1476	1482	1,13	0,23
α -kurkumen	644-30-4	1482	1480	-	0,23
β -selinen	17066-67-0	1487	1491	-	0,40
valencen	4630-07-3	1490	1492	0,67	0,04
β -bisabolen	4891-79-6	1508	1508	-	0,07
β -kurkumen	72345-84-7	1510	1511	-	0,08
7- <i>epi</i> - α -selinen	123123-37-5	1517	1518	0,54	0,52
<i>trans</i> -kalamenen	73209-42-4	1519	1527	0,24	-
<i>cis</i> -seskvisabinen hydrát	58319-05-4	1543	1544	-	0,96
Suma [%]				6,25	11,54
Oxidované seskviterpeny					
β -elemen	33880-83-0	1387	1390	0,13	-
ishwaran	26620-70-2	1465	1468	0,24	-
α -farnesen	502-61-4	1503	1504	0,18	-
β -nerolidol	40716-66-3	1560	1561	0,76	0,53
spatulenol	72203-24-8	1575	1576	0,37	-
karyofylen oxid	1139-30-6	1580	1587	0,99	1,42
humulen epoxid II	19888-34-7	1608	1613	-	1,09
karyofyl-4(12),8(13)-dien-5-ol	19431-80-2	1632	1636	-	0,69
<i>epi</i> - β -bisabolol	235421-59-7	1669	1675	-	0,34
α -bisabolol	515-69-5	1686	1688	-	0,05
<i>trans</i> - α -bergamotol	88034-74-6	1688	1688	-	0,05
drimenol	19078-37-6	1768	1769	-	1,24
drimenin	2326-89-8	1944	1944	-	0,30
Suma [%]				2,67	5,71
Oxidované diterpeny					
fyton	502-69-2	1840	1841	-	0,38
Suma [%]				0	0,38
Deriváty fenylpropenu					
methyleugenol	93-15-2	1401	1403	0,25	-

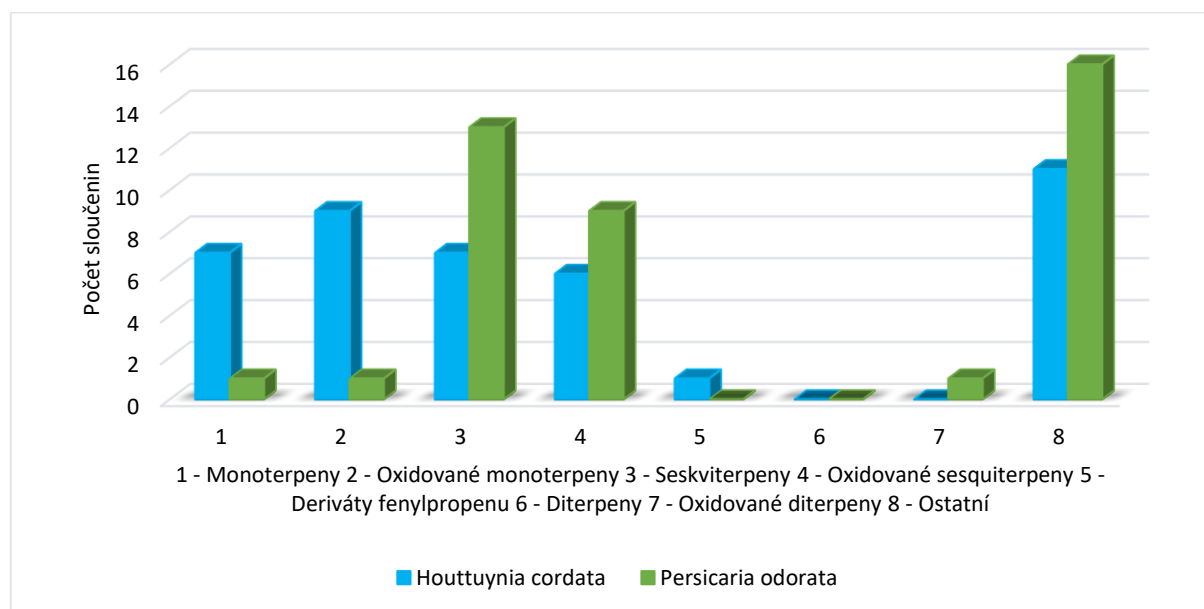
Sloučenina	CAS číslo	Retenční index		Plocha píku [%]	
		Vypočítaný ^a	Publikovaný ^b	Touleň srdčitá	Rdesno vonné
Suma [%]				0,25	0
Ostatní					
6-methyl-hept-5-en-2-on	110-93-0	985	986	0,05	-
2-pentyl-furan	3777-69-3	993	991	-	0,06
6-methyl-Hept-5-en-2-ol	1569-60-4	998	995	-	0,03
<i>n</i> -undekan	1120-21-4	1101	1100	-	2,52
<i>n</i> -nonanal	124-19-6	1104	1107	0,12	0,26
1-nonanol	143-08-8	1172	1169	0,33	0,35
<i>n</i> -dekanal	112-31-2	1208	1208	0,15	18,4
1-dekanol	112-30-1	1276	1278	-	5,37
2-undekanon	112-12-9	1293	1294	6,67	-
<i>n</i> -undekanal	112-44-7	1307	1309	-	1,37
1-undekanol	112-42-5	1377	1379	-	1,16
2-dodekanon	6175-49-1	1393	1393	0,07	-
<i>n</i> -dodekanal	112-54-9	1411	1410	0,02	37,08
1-dodekanol	112-53-8	1477	1476	-	4,81
tridekan-2-on	593-08-8	1496	1495	6,06	-
<i>n</i> -dodekanová kyselina	143-07-7	1569	1570	0,70	-
<i>n</i> -tetradekanal	124-5-4	1612	1614	-	0,26
intermedeol	6168-59-8	1661	1668	-	0,13
2-pentadekanon	2345-28-0	1696	1697	0,21	-
<i>n</i> -hexadekanová kyselina	57-10-3	1963	1968	0,45	0,44
linoleoyl chlorid	7459-33-8	2135	2139	-	0,16
<i>n</i> -dodekanyl sukcinový anhydrid	1978-11-1	2159	2159	-	0,29
Suma [%]				14,83	72,69
Celková plocha píků [%]				90,59	90,38

^a Retenční index vypočítaný dle vzorce $RI = 100 \cdot n + 100 \cdot \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$

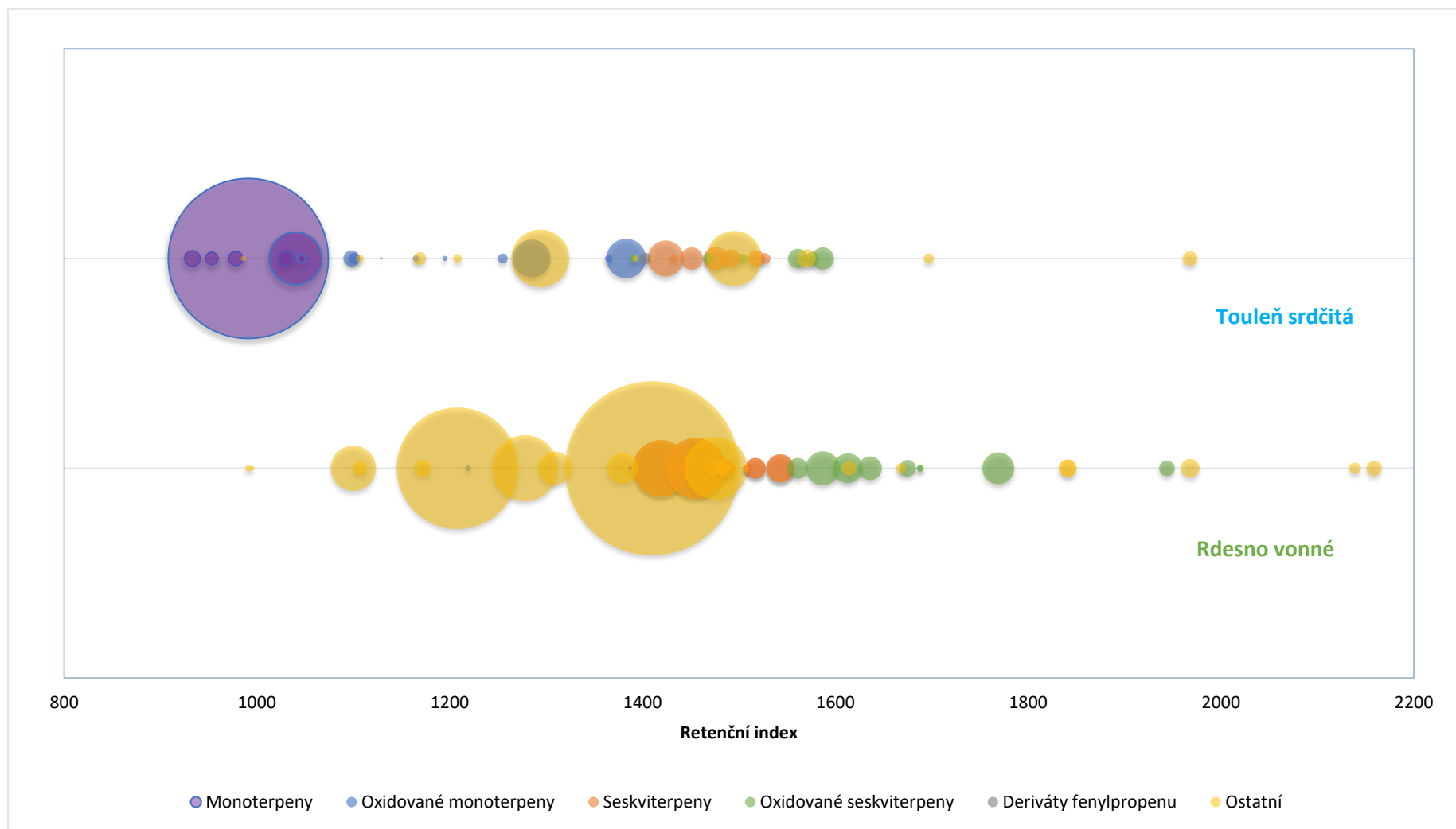
^b Data publikovaná v NIST (2001) a Adams (2007)

Hydrodestilací nadzemních částí usušené rostliny rdesna vonného byl získán tmavě žlutý esenciální olej se silnou kořeněnou vůní podobnou koriandru. Díky své vůni je rdesno vonné známé také pod jménem vietnamský koriandr [59]. Výtěžnost z hydrodestilace byla 0,41 %.

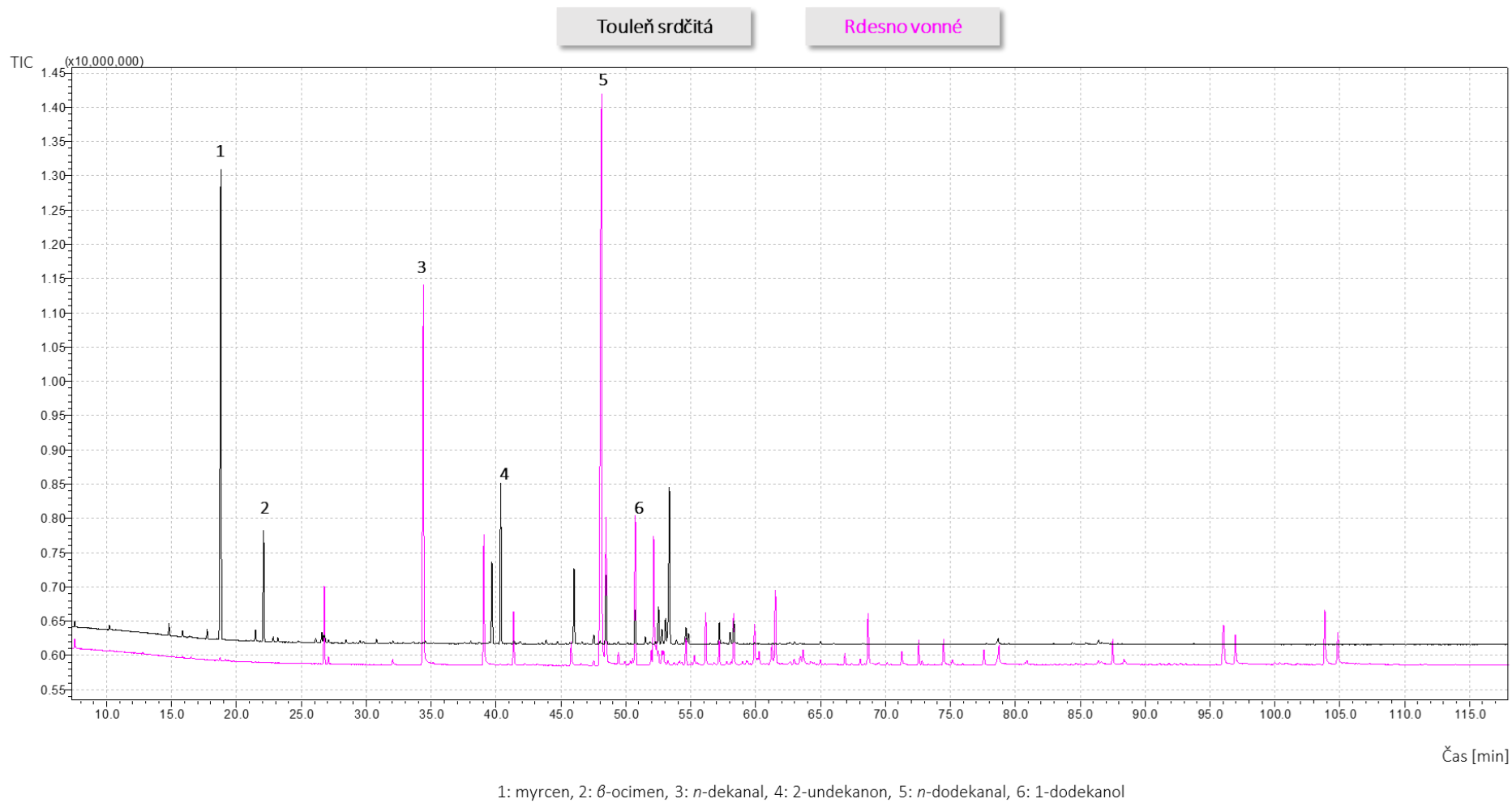
Výtěžek hydrodestilace je nižší ve srovnání s výtěžkem 0,64 %, dříve publikovaným Almarie a kol. [224]. V esenciálním oleji bylo celkem identifikováno 41 sloučenin (90,4 % plochy), které jsou uvedeny v Tabulce 14. Ve srovnání s jinými studii bylo v tomto výzkumu identifikováno více sloučenin [225, 226]. Dung a kol. [225] použili pro izolaci EO destilaci vodní párou a identifikovali pouze 28 sloučenin s nejvyšším obsahem β -karyofylenu, dodekanalu a karyofylen oxidu. Hunter a kol. [226] identifikovali 17 sloučenin v esenciálním oleji získaným destilací vodní parou rostliny rdesna vonného, kde byly nejhojněji obsaženými sloučeninami α -humulen, dekanal a dodekanal. Získaný esenciální olej obsahoval 72,7 % neterpenických sloučenin a 17,7 % terpenických sloučenin. Karbonyly a alkoholy, zejména C10 a C12, tvořily 68,8 % z celkového složení EO, seskviterpeny 11,5 % a oxidované seskviterpeny 5,7 %. Ostatní skupiny (monoterpeny, oxidované monoterpeny a oxidované diterpeny) tvořily méně než 1 % složení esenciálního oleje. Hlavní sloučeniny obsažené v EO byly *n*-dodekanal (37,1 %), *n*-dekanal (18,1 %), 1-dekanol (5,4 %), 1-dodekanol (4,8 %), α -humulen (4,5 %), *cis*-karyofylen (3,9 %) a *n*-undekan (2,5 %). Koncentrace ostatních sloučenin v získaném EO byla nižší než 2 %. Získané výsledky relativního procentuálního zastoupení látek v EO získaném z rdesna vonného jsou podobné dříve získaným výsledkům. Je zřejmé, že EO z rdesna vonného je bohatý na C10 a C12 karbonyly. Dodekanal a dekanal jsou hlavními sloučeninami esenciálního oleje z rdesna vonného v tomto i dříve publikovaných výzkumech [59, 224-226].



Graf 5 Grafické porovnání počtu identifikovaných sloučenin v jednotlivých skupinách



Graf 6 Aromaprofilý esenciálních olejů získaných z toulleň srdčité a rdesna vonného



Obrázek 39 Chromatogram z GC-MS analýzy esenciálních olejů získaných z touleň srdčité a rdesna vonného

Při porovnání obou EO bylo zjištěno, že mají pouze 12 shodných sloučenin z celkových 41, ale liší se v procentuálním obsahu, jak je patrné z aromaprofilů obou esenciálních olejů (Graf 6). Esenciální olej z touleně srdčité byl mnohem více bohatý na monoterpeny a oxidované monoterpeny, kde nejvíce zastoupenou sloučeninou byl β -myrcen (51 %), který nebyl nalezen v EO získaném ze rdesna vonného. Na druhou stranu EO získaný ze rdesna vonného byl bohatý na seskviterpeny a jejich oxidované formy a zejména aldehydy (Graf 5) s dominantní sloučeninou *n*-dodekanal (37,1 %) ve srovnání s EO z touleně srdčité, kde bylo jeho procentuální zastoupení pouze 0,02 %. Obecně je složení obou EO odlišné, obě byliny nejsou ani ze stejného rodu, ani z čeledi, tudíž jejich podobné složení nebylo očekáváno. Chromatogramy získané analýzou esenciálních olejů jsou na Obrázku 39.

8.2.2 Antimikrobiální aktivita

Výsledky antimikrobiální aktivity EO získaných hydrodestilací touleně srdčité a rdesna vonného jsou uvedeny v Tabulce 15. Oba testované EO vykazovaly antimikrobiální účinnost v různých koncentracích. Esenciální oleje z touleně srdčité a rdesna vonného prokázaly inhibiční účinnost na bakterie v rozmezí 128–1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 512–1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v bujónu a 1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 512–1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na agaru. V kapalně fázi byla nejnižší MIC získána u EO z touleně srdčité (128 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) proti *E. faecalis* a u EO z rdesna vonného (512 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) proti *S. pyogenes*, *E. faecalis* a *B. subtilis*. V parní fázi byla nejnižší MIC pozorována u EO z touleně srdčité (1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) proti *E. faecalis* a *E. coli* a u EO z rdesna vonného (512 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) proti *E. coli*. Mezi testovanými EO jsou viditelné rozdíly mezi inhibiční účinností na bakterie v parní a kapalně fázi. Ve většině případů bylo dosaženo vyšší MIC v kapalně fáze EO, s výjimkou EO ze rdesna vonného na *E. coli*, kde byla parní fáze dvakrát účinnější než fáze kapalná.

Tabulka 15 Antimikrobiální aktivita testovaných esenciálních olejů z touleně srdčité a rdesna vonného a antibiotika ampicilin proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím.

	Vzorek/Růst/MIC [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]					
	Touleň srdčitá		Rdesno vonné		Ampicilin	
	Agar	Bujon	Agar	Bujon	Agar	Bujon
Gramnegativní bakterie						
<i>Escherichia coli</i>	1024	512	512	1024	>4	0,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1024	>1024	>1024	1024	>4	1,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1024	1024	>1024	1024	>4	>4,00
<i>Serratia marcescens</i>	>1024	1024	>1024	>1024	>4	4,00
Grampozitivní bakterie						
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1024	1024	>1024	>1024	>4	0,50
<i>Enterococcus faecalis</i>	1024	126	>1024	512	>4	0,25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	>1024	512	1024	512	>4	1,00
<i>Bacillus subtilis</i>	>1024	>1024	>1024	512	>4	2,00

Gramnegativní bakterie jsou obecně odolnější vůči EO než grampozitivní bakterie [197]. Toto tvrzení je v souladu s výsledky tohoto výzkumu, jak je patrné z Tabulky 16. Grampozitivní bakterie byly citlivější na testované EO ve srovnání s gramnegativními bakteriemi. Je možné, že aktivní sloučeniny v EO mohou snadněji narušit důležité vazby (typu peptidoglykan) ve struktuře buněčné stěny grampozitivních bakterií. Struktura buněčné stěny grampozitivních bakterií umožňuje hydrofobním molekulám snadno proniknout do buněk a působit tak jak na buněčnou stěnu, tak i přímo v cytoplazmě. Po rozbití buněčné stěny mohou reaktivní složky EO proniknout do buněčného prostoru a poškodit buněčnou DNA. Další skutečností je, že fenolové sloučeniny, přítomné v získaných EO, obecně vykazují antimikrobiální aktivitu spíše proti grampozitivním bakteriím. Na druhou stranu, buněčná stěna gramnegativních bakterií je mnohem složitější a je mimo jiné také důvodem, proč jsou gramnegativní bakterie obecně odolnější vůči biologicky aktivním sloučeninám [227].

β -Myrcen, sloučenina s nejvyšším procentuálním zastoupením v EO z toulenně srdčité, je antimikrobiálně aktivní látka, a navíc synergicky zvyšuje aktivitu antibiotik [188]. Esenciální oleje s vysokým obsahem β -myrcenu mají pozitivní vliv na infekce močových cest a genitálií [228, 229]. Tyto infekce mohou být způsobeny mimo jiné *E. coli* a *E. faecalis*; bylo by možné tedy předpokládat, že EO z toulenně srdčité na ně bude inhibičně působit, což bylo potvrzeno v této studii. Sloučenina α -humulen, která byla nejvíce procentuálně zastoupenou látkou v EO získaného ze rdesna vonného, je známá svým protizánětlivým účinkem. Bylo prokázáno, že EO obsahující α -humulen mají antimikrobiální aktivitu [230-232]. Pichette a kol. [232] testovali antimikrobiální aktivitu α -humulenu proti *E. coli* a *S. aureus* pomocí mikrodiluční metody. α -humulen vykazoval MIC $2,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proti *S. aureus* a MIC více než $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proti *E. coli*. Jang a kol. [231] testovali antimikrobiální aktivitu α -humulenu proti *B. fragilis* a získali MIC $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vysoký obsah α -humulenu by mohl být důvodem, proč EO ze rdesna vonného inhiboval růst šesti z osmi testovaných bakterií. I přes vysokou účinnost EO ze rdesna vonného a toulenně srdčité, je zde riziko při orálním nebo vnitřním použití těchto olejů, spojené s obsahem *cis*-karyofylenu v obou EO [233]. Před samotným použitím těchto esenciálních olejů k léčbě nemocí je nutné dále zkoumat možné negativní účinky na lidské tělo pro každou látku obsaženou v esenciálních olejích.

V této studii byly poprvé popsány účinky parní fáze esenciálních olejů ze rdesna vonného a toulenně srdčité na vybrané bakterie, tudíž není možné tyto výsledky dále porovnávat s jinými publikacemi. Existují však některé zprávy o testování kapalné fáze EO z toulenně srdčité. Verma a kol. [221] testovali antimikrobiální aktivitu EO z toulenně proti čtyřem bakteriím

(*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Mycobacterium smegmatis* a *Enterococcus faecalis*). Jejich EO vykazoval MIC v rozmezí 0,52–1,04 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ji a kol. [234] provedli diskový difúzní test ke stanovení antimikrobiální aktivity EO z touleně proti *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*; bohužel diskový difúzní test je pouze screeningovou metodou, kterou není možné porovnat s MIC. Lu a kol. [235] testovali antimikrobiální aktivitu EO z touleně proti *Staphylococcus aureus* a *Sarcina ureae* pomocí bujonové a agarové diluční metody. Jejich dosažená MIC na bakterie byla v rozmezí 0,5–1,0 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$.

8.3 Chemické složení a antimikrobiální aktivita esenciálních olejů v kapalně a parní fázi získaných hydrodestilací bylin (*Anthriscus cerefolium* a *Limnophilla aromatica*)

V rámci popsaného výzkumu v kapitole 8, byla provedena také destilace esenciálních olejů z bylin kerblík třebule (*Anthriscus cerefolium*) a bahnatka vonná (*Limnophilla aromatica*) stejnou metodikou za použití stejných postupů, avšak tato data nebyla publikována v žádném odborném časopise. V této kapitole jsou stručně shrnuty dosažené výsledky.

8.3.3 Výtěžnost extrakce a chemické složení esenciálních olejů

Hydrodestilací nadzemních částí usušené rostliny kerblíku třebule v nekvetoucím stádiu byl získán nažloutlý esenciální olej s vůní podobnou anýzu. Výtěžnost hydrodestilace byla 0,37 % a je nižší v porovnání s literaturou [236-238]. V esenciálním oleji bylo celkem identifikováno 47 sloučenin (96,9 % plochy), které jsou uvedeny v Tabulce 16 a aromaprofil EO je zobrazen v Grafu 8. Esenciální olej obsahoval 75,3 % neterpenických sloučenin jako jsou deriváty fenypropenu, aldehydy, ketony, estery a mastné kyseliny a pouze 23,7 % terpenických sloučenin. Hlavní skupinu látek obsažených v EO jsou deriváty fenypropenu s obsahem 69,8 %, dále skupina seskviterpenů s obsahem 18,1 %, a skupina ostatní sloučenin s obsahem 6,5 %. Dalšími skupinami obsaženými v EO byly oxidované seskviterpeny, monoterpeny a jejich oxidovaná forma a jeden diterpen. Hlavní sloučeniny obsažené v získaném esenciálním oleji byly methyleugenol (74,84 %), estragol (7,50 %) germakren D (3,72 %) a α -zingiberen (2,82 %). Koncentrace ostatních sloučenin v získaném EO byla nižší než 2 %.

Výsledky získané v tomto výzkumu jsou poměrně odlišné od výsledků předchozích studií esenciálních olejů získaných hydrodestilací [236-238]. V esenciálním oleji získaném ve studii Atteya a kol. [236] byl nejvíce zastoupen methyleugenol (33,8 – 47,2 %), estragol (16,2 – 18,0 %) a 2-allyl-1,4-dimethoxybenzen (5,5 – 7,9 %). Methyleugenol a estragol byly rovněž obsaženy v esenciálním oleji získaném v našem výzkumu, avšak v odlišných koncentracích,

zatímco 2-Allyl-1,4-dimethoxybenzen nebyl detekován vůbec. Esenciální olej skupiny Chizzola a kol. [237] obsahoval estragol (12,6 – 70,4 %), 1-allyl-1,4-dimethoxybenzen (22,4 – 77,8 %) a 2-undekan; obsah jednotlivých látek v EO se lišil v závislosti na stádiu růstu rostliny. EO této skupiny vůbec neobsahoval methyleugenol, který byl v našem výzkumu nejvíce zastoupenou složkou. Nakonec, EO skupiny Kilic a kol. [238] byl nejvíce odlišný ze všech zmíněných. Hlavní sloučeninami v EO byly karyofylen (16,9 %), δ -kadinen (16,4 %), *trans*-pinokarveol (12,5 %), spatulenol (7,5 %) a karyofylen oxid (6,8 %). Karyofylen a karyofylen oxid byl rovněž identifikován v EO získaném v našem výzkumu, avšak byly obsaženy pouze v desetinách procent v porovnání s ostatními sloučeninami, ostatní sloučeniny nebyly detekovány vůbec. Pozorované různé či naprosto odlišné složení esenciálního oleje získaného v naší studii v porovnání s publikovanou literaturou je nejpravděpodobněji způsobeno jiným původem vzorku (Egypt [236], Turecko [238], Rakousko [237]). Jak již bylo dříve v práci zmíněno, původ vzorku, stejně jako jeho růstové stádium má významný vliv na složení esenciálních olejů.

Tabulka 16 Chemické složení esenciálních olejů z kerblíku třebule a bahnatky vonné

Sloučenina	CAS číslo	Retenční index		Plocha píku [%]	
		Vypočítaný ^a	Publikovaný ^b	Kerblík třebule	Bahnatka vonná
Monoterpeny					
α -pinen	80-56-8	930	933	0,01	1,81
kamfen	79-92-5	946	953	-	0,17
sabinen	3387-41-5	970	972	-	0,06
β -pinen	127-91-3	974	978	0,04	0,14
β -myrcen	123-35-3	993	991	-	41,73
α -felandren	99-83-2	1004	1007	0,15	-
<i>p</i> -cymen	99-87-6	1022	1025	0,03	-
limonen	7705-14-8	1027	1030	0,40	31,85
β -ocimen	3779-61-1	1047	1040	-	2,87
γ -terpinen	99-85-4	1057	1058	-	0,02
terpinolen	586-62-9	1084	1086	-	0,05
kafr	76-22-2	1144	1149	-	2,34
α -ionon	127-41-3	1431	1421	0,03	-
neryl aceton	3879-26-3	1453	1445	0,03	-
Suma [%]				0,69	81,04
Oxidované monoterpeny					
vinyl amyl karbinol	3391-86-4	981	978	-	1,29
linalol	78-70-6	1099	1101	0,25	0,19
menton	89-80-5	1143	1158	0,12	-
mentol	2216-51-5	1176	1184	0,07	-
<i>trans</i> -4-karanon	4176-04-09	1199	1200	-	3,07
<i>cis</i> -4-karanon	4176-01-6	1207	1205	-	7,79

karvon	99-49-0	1242	1246	0,12	-
perilaldehyd	2111-75-3	1273	1278	-	0,44
bornylacetát	92618-89-8	1287	1285	-	0,21
α -terpinylacetát	80-26-2	1345	1349	0,10	0,09
Suma [%]				0,66	13,08
Seskviterpeny					
α -copaen	3856-25-5	1373	1375	0,09	-
alloaromadendren	25246-27-9	1387	1386	0,09	-
<i>trans</i> -karyofylen	87-44-5	1424	1419	0,01	1,01
<i>trans</i> - α -bergamoten	13474-59-4	1435	1432	0,03	-
γ -muurolen	30021-74-0	1435	1435	0,09	-
α -humulen	6753-98-6	1454	1454	-	1,80
germakren D	23986-74-5	1481	1480	3,72	-
α -zingiberen	495-60-3	1496	1496	2,82	-
β -bisabolen	495-61-4	1508	1508	0,65	-
β -seskvifelandren	20307-83-9	1523	1523	0,29	-
γ -bisabolen	53585-13-0	1526	1511	0,04	-
karyofylen oxid	1139-30-6	1584	1587	0,02	-
Suma [%]				7,85	2,81
Oxidované seskviterpeny					
β -farnesen	18794-84-8	1455	1452	0,10	-
α -farnesen	502-61-4	1504	1504	0,19	-
nerolidol	142-50-7	1560	1561	-	0,11
neofytadien	504-96-1	1837	1836	1,03	-
fyton	68607-88-5	1837	1841	0,01	-
Suma [%]				1,33	0,11
Deriváty fenypropenu					
estragol	140-67-0	1199	1201	7,50	-
anetol	4180-23-8	1285	1288	1,35	-
methyleugenol	93-15-2	1419	1403	74,84	-
myristicin	607-91-0	1519	1520	0,15	-
Suma [%]				83,84	0
Ostatní					
<i>n</i> -oktan	111-65-9	801	800	0,25	-
4-methyloktan	2216-34-4	860	863	0,02	-
etyl hexanol	589-98-0	999	999	-	0,13
1-nonen-3-ol	21964-44-3	1080	1081	0,04	-
nonan-3-on	925-78-0	1085	1088	0,02	-
nonanal	124-19-6	1104	1107	0,01	-
<i>trans</i> -okt-2-enylacetát	3913-80-2	1216	1210	0,20	-
β -cyklohomocitral	472-66-2	1253	1256	0,04	-
kuminol	536-60-7	1291	1310	0,03	-
<i>n</i> -tridekan	629-50-5	1299	1300	0,07	-
anisylacetát	1331-83-5	1393	1390	1,31	-
<i>n</i> -pentadekan	629-62-9	1501	1500	0,17	-
2-methylbutyrát-geranyl	68705-63-5	1590	1596	0,02	-
geranylisovalerát	109-20-6	1603	1604	0,13	-
<i>n</i> -hexadekanová kyselina	57-10-3	1963	1977	0,17	-

methyl ester kyseliny 9,12-oktadekanové	2462-85-3	2093	2093	0,02	-
methyl ester kyseliny 9,12,15-oktedekanové	7361-80-0	2099	2101	0,03	-
Suma [%]				2,53	0,13
Celková plocha píků [%]				96,90	97,17

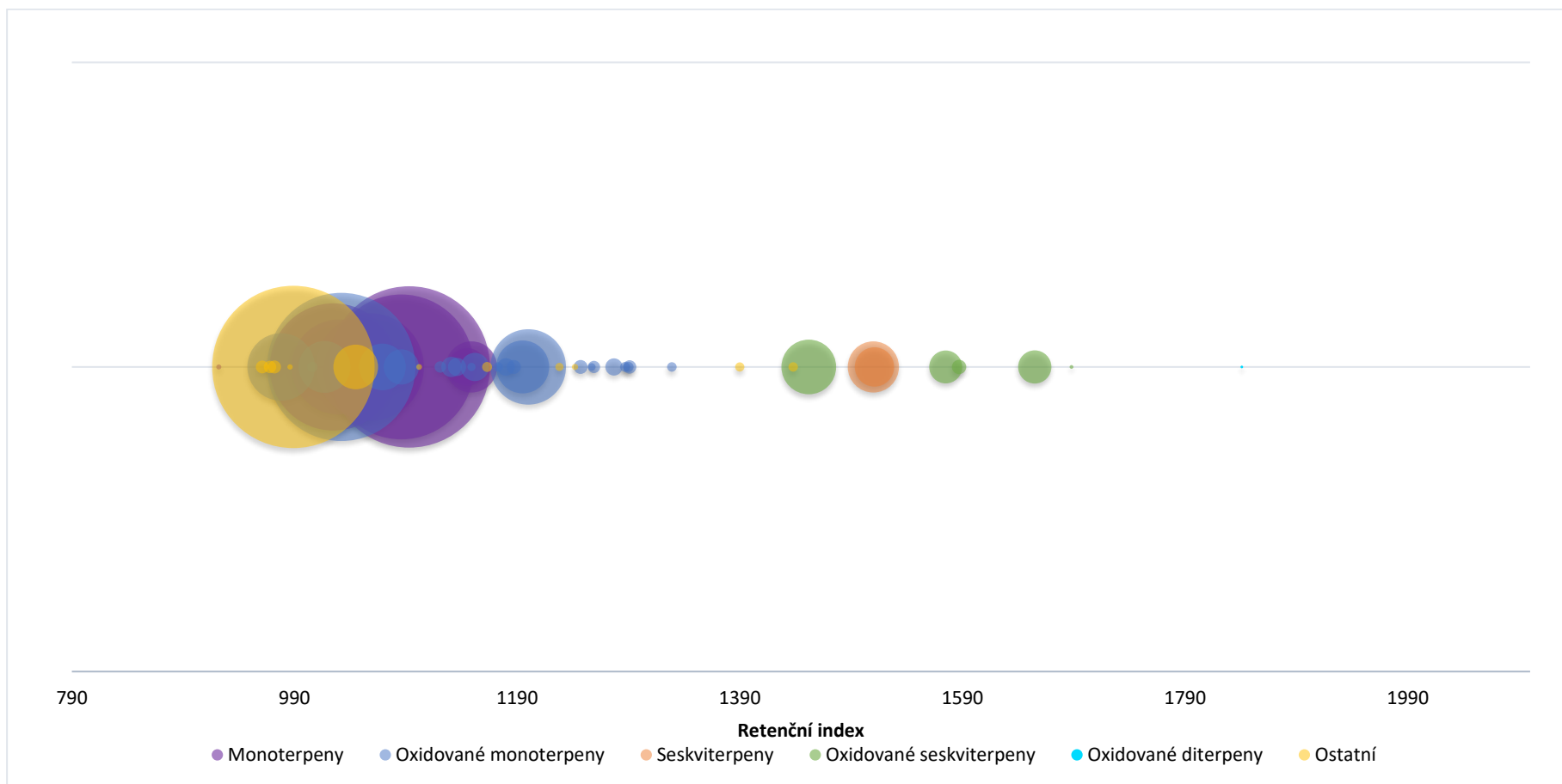
^a Retenční index vypočítaný dle vzorce $RI = 100 \cdot n + 100 \cdot \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$

^b Data publikovaná v NIST (2001) a Adams (2007)

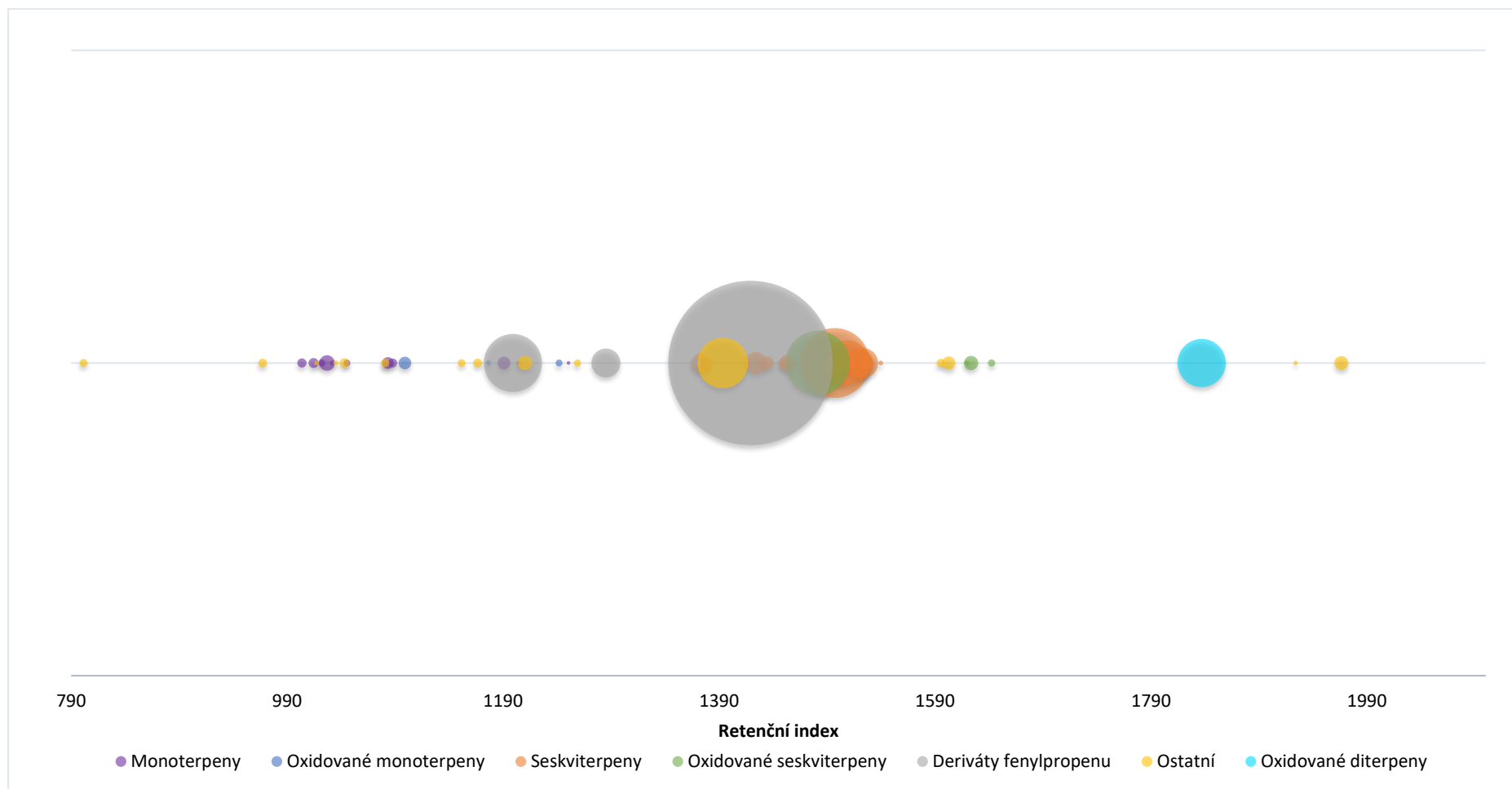
Hydrodestilací nadzemních částí usušené rostliny bahnatky vonné byl získán světle žlutý esenciální olej s unikátní kořeněnou vůní. Výtěžnost hydrodestilace byla 0,32 % a je nižší v porovnání s literaturou [63, 239-241]. V esenciálním oleji bylo celkem identifikováno 21 sloučenin (96,9 % plochy), které jsou uvedeny v Tabulce 16 a aromaprofil EO je zobrazen v Grafu 7. Esenciální olej obsahoval 75,3 % neterpenických sloučenin jako jsou deriváty fenypropenu, aldehydy, ketony, estery a mastné kyseliny a pouze 23,7 % terpenických sloučenin. Hlavní skupinu látek obsažených v EO jsou monoterpeny s obsahem 70,9 %, dále skupina oxidovaných monoterpenů s obsahem 19,7 %, a skupina seskviterpenů s obsahem 6,2 %. Dalšími skupinami obsaženými v EO byly oxidované seskviterpeny a deriváty fenypropenu. Hlavní sloučeniny obsažené v získaném esenciálním oleji byly methylmyrcen (41,73 %), limonen (31,85 %), *cis*-4-karanon (7,79 %) a *trans*-4-karanon (3,07 %), β -ocimen (2,87 %) a kafr (2,34 %). Procentuální zastoupení ostatních sloučenin v získaném EO byla nižší než 2 %.

Výsledky získané v tomto výzkumu jsou odlišné od výsledků předchozích studií esenciálních olejů získaných hydrodestilací [63, 239, 240]. V esenciálním oleji získaném ve studii Bhuiyan a kol. [239] byl nejvíce zastoupen methylocimen (39,2 %), terpinolen (17,2 %) a kafr (12,9 %). Všechny tři sloučeniny byly obsaženy i v esenciálním oleji získaném v našem výzkumu, avšak s obsahem do 3 %. Naopak nejvíce obsažené složky β -myrcen a limonen v našem esenciálním oleji byly zastoupeny v EO této studie pouze 9,5 %, respektive 3,8 %. Esenciální olej skupiny Houdkova a kol. [63] obsahoval nejvíce limonenu (48,3 %), 3-*p*-menthen-7-alu (20,1 %) a myrtanolacetátu (7,7 %). Velký obsah limonenu byl i v našem EO, avšak zbylé dvě zmíněné sloučeniny nebyly detekovány. β -Myrcen, nejvíce zastoupená sloučenina v našem EO byla obsažena v EO od Houdkové a kol. pouze 0,17 %. EO skupiny Tucker a kol. [240] obsahoval stejně jako Houdkové a kol. nejvíce limonenu (53,1 %) a poté byl od ostatních odlišný a obsahoval *cis*-karnon (12,2 %), α -pinen (5,0 %) a β -ocimen (4,1 %). Hlavní složka β -myrcen v našem EO nebyl skupinou Tucker a kol. v jejich EO identifikován. Skupina Yingngam a kol.

[241] získala EO z bahnatky vonné hydrodestilací následovanou mikrovlnnou extrakcí a dosáhla výtěžku 0,20 – 0,24 % EO v závislosti na měsíci sběru rostliny během roku. Zajímavé je, že nejvyšší výtěžnosti byly získané z rostlin vypěstovaných v Thajsku a sesbíraných v suchém období (listopad-leden). Získané EO obsahovaly stejně jako většina publikovaných studií včetně naší velké procento limonenu (45,4 – 53,5 %). Dále EO obsahoval velké procento perilaldehydu (24,9 – 45,4 %) v porovnání s naší studií (0, 1 %), v ostatních diskutovaných studiích nebyl detekovaný vůbec. A nakonec, stejně jako EO ve studii Tucker a kol. [240] obsahoval EO skupiny Yingngam a kol. [241] *cis*-karnon (1,1 – 5,4 %). Velmi odlišné složení našeho EO a esenciálních olejů ve zmíněných studiích bude pravděpodobně způsobeno stejně jako v případě kerblíku odlišným původem, podnebím, ročním obdobím sběru atp.



Graf 7 Aromaprofil esenciálního oleje získaného z bahnatky vonné



Graf 8 Aromaprofil esenciálního oleje získaného z kerblíku třebule

8.3.4 Antimikrobiální aktivita

Výsledky antimikrobiální aktivity EO získaných hydrodestilací kerblíku třebule a bahnatky vonné jsou uvedeny v Tabulce 17. Oba testované EO vykazovaly antimikrobiální účinnost v různých koncentracích. Esenciální olej z kerblíku třebule a bahnatky vonné prokázal inhibiční účinnost na bakterie v rozmezí 256–1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 512–1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v bujónu a na agaru byla účinnost parní fáze prokázána jen v případě EO z kerblíku 512–1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V kapalně fázi byla nejnižší MIC získána u kerblíku (256 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) proti *E. coli* a *Str. pyogenes* a u bahnatky (512 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) proti *E. coli* a *S. aureus*. V parní fázi byla nejnižší MIC pozorována pouze u EO z kerblíku (512 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) proti *Str. pyogenes* a u bahnatky vonné. Mezi testovanými EO jsou viditelné rozdíly mezi inhibiční účinností na bakterie v parní a kapalně fázi. Ve všech případech bylo dosaženo vyšší MIC v kapalně fázi EO.

Tabulka 17 Antimikrobiální aktivita testovaných esenciálních olejů z kerblíku třebule a bahnatky vonné a antibiotika ampicilin proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím.

	Vzorek/Růst/MIC [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]					
	Kerblík třebule		Bahnatka vonná		Ampicilin	
	Agar	Bujon	Agar	Bujon	Agar	Bujon
Gramnegativní bakterie						
<i>Escherichia coli</i>	>1024	256	>1024	512	>4	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	>4	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1024	512	>1024	>1024	>4	>4
<i>Serratia marcescens</i>	>1024	512	>1024	1024	>4	4
Grampozitivní bakterie						
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1024	>1024	>1024	512	>4	0,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	>1024	>1024	>1024	1024	>4	0,25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	512	256	>1024	1024	>4	1
<i>Bacillus subtilis</i>	>1024	>1024	>1024	1024	>4	2

V této studii byly poprvé popsány účinky parní a kapalně fáze esenciálního oleje z kerblíku třebule na vybrané bakterie, tudíž není možné tyto výsledky dále porovnávat s jinými publikacemi. Antimikrobiální aktivitu methyleugenolu, jako hlavní složku EO z kerblíku třebule, na široké spektrum mikroorganismů testovala skupina Kivanc a kol. [242] a prokázali velký inhibiční vliv methyleugenolu na různé mikroorganismy. Velký obsah methyleugenolu v našem EO z kerblíku třebule bude nejspíše důvodem inhibičního efektu růstu *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* a *Str. pyogenes*. Je zajímavé, že EO z kerblíku třebule měl silnější inhibiční efekt na gramnegativní bakterie, které jsou díky své stavbě buněčné stěny většinou odolnější vůči působení EO [197]. Efekt parní a kapalně fáze EO z bahnatky vonné na růst bakterie *Staphylococcus aureus* byl dříve popsán skupinou Houdková a kol [63].

Získaný esenciální olej neměl v parní ani kapalně fázi žádný inhibiční účinek na sledovaný mikroorganismus, zatímco námi získaný EO měl MIC v kapalně fázi $512 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Mírně odlišná účinnost esenciálních olejů z bahnatky vonné je nejspíše způsobena odlišným složením esenciálních olejů získaných v naší studii a studii Houdkové a kol., jak již bylo popsáno v kapitole 2.3.3. Jak již bylo zmíněno v případě EO z touleně, β -myrcen, jedna z hlavních sloučenin obsažených v našem EO z bahnatky vonné, je antimikrobiálně aktivní látka, a navíc synergicky zvyšuje aktivitu antibiotik [188]. V EO Houdkové a kol. byl β -myrcen obsažen pouze v desetinách procent, je tedy možné, že právě z tohoto důvodu je námi získaný EO antimikrobiálně účinnější na *S. aureus*.

8.4 Shrnutí

Tato studie ukazuje nové poznatky o esenciálních olejích získaných hydrodestilací 4 asijských bylin – *Persicaria odorata*, *Houttuynia cordata*, *Anthriscus cerefolium* a *Limnophilla aromatica*. Chemické složení esenciálních olejů odpovídá dříve publikovaným studiím s malými či většími rozdíly, které mohou být způsobeny agronomickými faktory, skladováním, různou přípravou vzorků a dalšími faktory. Všechny esenciální oleje vykazovaly antimikrobiální aktivitu v různých koncentracích vůči různým bakteriím. Díky velké antibakteriální aktivitě spolu se složením esenciálních olejů je zde velký potenciál pro budoucí použití těchto olejů, například ve formě přírodních antibiotik nebo konzervantů potravin. V této studii byly poprvé popsány antimikrobiální vlastnosti esenciálních olejů z *Persicaria odorata*, *Houttuynia cordata* a *Anthriscus cerefolium* v parní i kapalně fázi zároveň na osmi vybraných bakteriích, jak grampozitivních, tak gramnegativních. Dále je nutné studovat možnou cytotoxicitu těchto olejů. Nevýhodou je, že všechny oleje obsahují jako jednu ze složek *cis*-karyofylen, který způsobuje alergické reakce a podráždění pokožky. Bylo by nutné najít rovnováhu v koncentracích prospěšných antimikrobiálních účinných látek a potenciálně toxických sloučenin pro další použití těchto esenciálních olejů v přírodní medicíně.

9 Využití zelené mikrovlnné extrakce iontovou kapalinou pro stanovení profilu flavonoidů z listů Kanárských ovocných stromů (*Mangifera sp.* a *Passiflora sp.*)

Tato kapitola se věnuje „zelené“ mikrovlnné extrakci s využitím iontové kapaliny pro stanovení flavonoidů v listech ovocných stromů z Kanárský ostrovů a výsledky diskutované v této kapitole byly vydány v zahraničním odborném časopise (Publikace č. 4: Moučková K. a kol., Evaluation of Structurally Different Ionic Liquid-Based Surfactants in a Green Microwave-Assisted Extraction for the Flavonoids Profile Determination of *Mangifera sp.* and *Passiflora sp.* Leaves from Canary Islands *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 20, s. 4734. ISSN: 1420-3049.). Vodné roztoky iontových kapalin (IL) s povrchovou aktivitou mají výborné solvatační vlastnosti, které jsou vhodně využívány pro „zelené extrakce“. Zeleným extrakcím je v dnešní době věnována velká pozornost. Jednou z hlavních strategií je použití nových rozpouštědel namísto konvenčních organických rozpouštědel, která se vyznačují velkou těkavostí, hořlavostí a toxicitou. V tomto smyslu v posledních letech získaly při přípravě vzorku velkou oblibu iontové kapaliny [243]. Iontové kapaliny jsou skupina nemolekulárních rozpouštědel s teplotou tání pod 100 °C připravená kombinací objemných organických kationtů a organických či anorganických aniontů, jak již bylo popsáno v teoretické části v kapitole 3.5.4. IL byly zkoumány jako slibná alternativa k organickým rozpouštědlům v procesu extrakce kapalinou díky jejich silné solvatační schopnosti, tepelné, chemické a elektrochemické stabilitě, nehořlavosti, a zanedbatelné těkavosti a zároveň nízké toxicitě ve srovnání s konvenčními organickými rozpouštědly. Nejdůležitější je, že vlastnosti IL lze snadno ladit výběrem odpovídající kombinace kationtu a aniontu nebo začleněním různých funkčních skupin do jejich struktury. To umožňuje přípravu IL se specifickými vlastnostmi, protože i jednoduchá modifikace struktury IL vede k velkým změnám v jejich vlastnostech. Vzhledem k této působivé všestrannosti byla popsána široká škála derivátů IL, včetně povrchově aktivních IL [130, 244-247]. Povrchově aktivní IL jsou takové IL, které jsou schopné tvořit micelární agregáty, pokud jsou rozpuštěny ve vodě nad určitou koncentraci, známou jako kritická micelární koncentrace (CMC) [248]. Kombinují inherentní vlastnosti IL, ale mají lepší solvatační vlastnosti v důsledku tvorby micel. Mohou být připraveny zabudováním dlouhých alkylových řetězců do kationtové nebo aniontové části. Obecně mají IL hodnoty CMC nižší než konvenční povrchově aktivní látky s podobnými strukturami. Navíc multikationtové povrchově aktivní IL představují ještě nižší CMC ve srovnání s jejich analogickými monokationtovými povrchově aktivními IL. Proto lze použít menší množství IL k využití jejich povrchově

aktivních vlastností ve srovnání s běžnějšími povrchově aktivními látkami [248]. Vzhledem k této zajímavé sadě charakteristik existuje v posledním desetiletí rostoucí počet aplikací využívajících povrchově aktivních IL pro různé extrakční postupy [130]. Zejména byly zkoumány vodné roztoky IL jako slibná alternativa k organickým rozpouštědlům pro extrakci bioaktivních sloučenin z rostlinného materiálu metodami extrakce tuhá látka-kapalina (SLE) [244-247]. Solvatační charakteristiky povrchově aktivních IL umožňují extrakci široké škály sloučenin z rostlin a stanovení jejich složení. Tato konkrétní aplikace je zvláště užitečná pro zhodnocení vedlejších produktů rostlin [249].

V návaznosti na trend „zelené chemie“ roste poptávka po využití vedlejších rostlinných produktů (tj. listů, slupek, semen, buničiny) s cílem použít je jako zdroj bioaktivních sloučenin pro četné aplikace ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu [250]. Tyto vedlejší produkty představují problém s likvidací pro zemědělský a potravinářský průmysl a často jsou skutečně bohaté na přírodní bioaktivní sloučeniny, jako jsou mimo jiné flavonoidy, karotenoidy a fytosteroly [251, 252]. Bioaktivní sloučeniny z rostlin poskytují mnohostranné výhody pro zdraví jedince a jsou široce používány pro své antimikrobiální, antioxidační nebo funkční vlastnosti. Flavonoidy jsou rostlinné sekundární metabolity, které jsou v rostlinách široce rozšířené a jsou známé hlavně pro svou antioxidační kapacitu. Jsou schopné neutralizovat volné radikály odpovědné za poškození buněk [253].

Mangifera sp. (Anacardiaceae) a *Passiflora sp. (Passifloraceae)*, které jsou jedním z nejpěstovanějších tropických rostlin na Kanárských ostrovech. Druhy rodu *Passiflora* a *Mangifera* jsou známé zejména pro své plody, které jsou lahodným tropickým ovocem. Některé druhy rodu *Passiflora* jsou také známé pro jejich použití v tradiční rostlinné medicíně. A oba druhy mají vysoký obsah polyfenolů. Zejména flavonoidy a flavonoidové glykosidy jsou přítomny ve vysokých množstvích u většiny druhů *Passiflora* [254]. Některé z nich již byly dříve zkoumány, včetně isoorientinu, orientinu, isovitexinu nebo vitexinu [72]. Mango je oblíbené tropické ovoce známé pro své skvělé nutriční složení a příznivé zdravotní vlastnosti, jako jsou antioxidační, antiproliferativní nebo protizánětlivé účinky. *Mangifera sp.* obsahuje různé třídy polyfenolů, karotenoidů a kyseliny askorbové [70, 73]. V případě obou druhů ovoce se jejich prospěšné a antioxidační vlastnosti připisují jejich sekundárnímu metabolitům, zejména fenolickým sloučeninám. Proto by mohly být vedlejší produkty mučenky a manga použity jako přírodní antioxidanty nebo jako funkční potravinářské suplementy a zároveň tak přispěly k minimalizaci odpadu z potravinových vedlejších produktů [71, 253].

Mastellone a kol. vyvinuli metodu SLE podporovanou mikrovlnným zářením s použitím povrchově aktivní látky na bázi imidazoliové iontové kapaliny (IL-MA-SLE) pro stanovení polyfenolického profilu listů *Vitis vinifera* [82]. Studie prokázala vynikající vlastnosti této metody, pokud jde o zelenost, rychlost a účinnost extrakce ve srovnání s konvenční metodou UA-SLE používající jako extrakční médium methanol [255]. Navzdory dobré účinnosti této metody je důležité zdůraznit rostoucí obavy z toxicity IL, zejména u těch nejčastěji používaných, které obsahují imidazoliový kationt. Složení kationtové a aniontové části hraje důležitou roli ve výsledné toxicitě IL. V tomto smyslu jsou vhodnější IL s anionty bez fluoru a s více biologicky odbouratelnými kationty (např. pyridinium nebo guanidinium). Navíc, čím delší je postranní řetězec iontové kapaliny ve kterékoliv ze skupin, tím toxičtější je výsledná iontová kapalina [82, 243].

Vzhledem k výše uvedenému bylo cílem tohoto výzkumu vyhodnotit vliv struktury iontové kapaliny na extrakci flavonoidů z listů rostlin metodou MA-SLE. Ve smyslu zlepšení zelenosti předchozí publikované analytické extrakční metody IL-MA-SLE [82] bylo vybráno a hodnoceno šest povrchově aktivních IL, které obsahují různé kationtové složky (imidazolium, guanidinium a pyridinium) a s různými strukturálními charakteristikami (multikationtové a délka alkylového řetězce). Metoda byla kombinována s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií a detektorem fotodiodového pole (HPLC-PDA) pro stanovení tří flavonoidů dříve nalezených v *Passiflora sp.* a *Mangifera sp.*: rutin, kvercetin a apigenin. Metoda byla optimalizována pomocí Box-Behnkenova experimentu a pro stanovení profilu flavonoidů pro několik odrůd a kultivarů vybraných ovocných listů byla použita optimální povrchově aktivní iontová kapalina.

9.1 Materiál a přístroje

9.1.1 Chemikálie a rostlinný materiál

Iontová kapalina hexadecylpyrimidiniumbromid ($[C_{16}Py^{+}Br^{-}]$) (97%) byla zakoupena od společnosti Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Guanilační činidlo 1H-pyrazol-1-karboxamidhydrochlorid (99%), decylamin (99%) a oktylamin (99%) použité k syntéze guanidiniových IL byly také zakoupeny od Sigma-Aldrich. Pro syntézu imidazoliových IL byly zakoupeny 1-methylimidazol, 1-butyylimidazol, 1-bromhexadekan, imidazol, 1-brombutan, 1-bromoktan a dimethylsulfoxid od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Isopropanol, ethylacetát, dichlormethan, chloroform, hydroxid draselný, acetonitril, 1,3,5-tris (brommethyl)benzen a diethylether byly získány od společnosti Fisher Scientific (Fair Lawn,

NJ, USA). Ethanol LiChrosolv® grade LC byl dodán společností Merck KGaA (Darmstadt, Německo), zatímco methanol Chromasolv™ třídy LC byl zakoupen od společnosti Honeywell (Seelze, Německo).

Studované analyty (flavonoidy), včetně rutinu (95%), kvercetin (95%) a apigeninu (95%) byly dodány společností Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Jednotlivé standardní roztoky byly připraveny v acetonitrilu HiPerSolv Chromasolv™ třídy LC zakoupeného od společnosti VWR (Llinars del Vallés, Španělsko) a to v následujících koncentracích: 500 mg·l⁻¹ pro rutin, 804 mg·l⁻¹ pro kvercetin, 500 mg·l⁻¹ pro apigenin. Pracovní standardní roztoky obsahující cílové analyty byly připraveny v koncentracích v rozmezí od 0,05 mg·l⁻¹ do 500 mg·l⁻¹ v acetonitrilu. Všechny standardní roztoky byly chráněny před světlem při 4 ° C.

Ultračistá voda (18,2 MΩ·cm) byla získána ze systému Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Při chromatografické separaci byly použity acetonitril HiPerSolv Chromasolv™ třídy LC dodávané společností Honeywell Riedel-de Haën™ (Německo) a kyselina octová (99%) dodávaná společností Sigma-Aldrich.

Listy 5 různých kultivarů *Passiflora sp.* a 4 různé odrůdy *Mangifera sp.* byly získány od Kanárského institutu zemědělského výzkumu (San Cristóbal de La Laguna, Španělsko). Rostliny stejného druhu byly pěstovány na vzorkovacím pozemku a listy byly sbírány v listopadu 2019. Všechny listy byly lyofilizovány, rozdrceny na prášek a uloženy do plastových vzorkovacích nádob, které byly umístěny do sušárny.

9.1.2 Přístroje a zařízení

Byla použita analytická váha Sartorius (Madrid, Španělsko) s minimální odečitelností 0,1 mg. Při syntéze iontové kapaliny byla použita magnetická míchadla s topným hnízdem a digitální rotační odparka RV 10 s regulací teploty od firmy IKA® (Staufen, Německo), která byla vybavena vakuovou pumpou VP 2 Autovac od společnosti Vacuubrand (Wertheim, Německo). Syntetizované IL byly charakterizovány ¹H-NMR za použití spektrometru AVANCE™ NMR (500 MHz) od firmy Bruker (Billerica, MA, USA). K provedení extrakčního postupu byly použity PYREX® (Staffordshire, Velká Británie) centrifugační zkumavky o objemu 25 ml (délka 10 cm × 2,6 cm OD), magnetické míchací tyčinky (12,7 mm × 3,2 mm) od společnosti Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo), mikrovlnný syntetizátor Discover® SP CEM (Matthews, NC, USA), odstředivka 5702 od Eppendorfu a ultrazvuková lázeň KM od Shenzhen Codyson Electrical Co., Ltd. (Shenzhen, Čína). 2ml skleněná injekční stříkačka Fortuna Optima® od společnosti Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo), injekční filtry z polyvinyliden

fluoridu (PVDF) (průměr 13 mm, póry 0,2 μm) od společnosti Whatman (GE Healthcare, Buckinghamshire, Velká Británie), skleněné Pasteurovy pipety a 2ml uzavíratelné lahvičky se septem od společnosti Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) byly použity pro extrakci.

Stanovení rutinu, kvercetin a apigeninu bylo provedeno v systému HPLC Varian ProStar 230 s detektorem fotodiodového pole Varian ProStar 330 (PDA) (Palo Alto, CA, USA). Chromatografický systém byl vybaven systémem ručního dávkování, včetně ventilu Rheodyne 7725i se smyčkou 5 μl, oba dodávané společností Supelco (Bellefonte, PA, USA). Pro chromatografickou separaci byla použita kolona Purosphere STAR RP-18E (150 mm × 4,6 mm × 5 μm) od společnosti Merck (Darmstadt, Německo) a předkolona Pelliguard LC-18 (Supelco). Nástřik vzorku do systému HPLC byl proveden manuálně pomocí 100μl Hamiltonovy injekční stříkačky (Reno, NV, USA).

Pro kalibrační analýzu a statistické výpočty byly použity aplikace Excel (Microsoft Office, v.2016) a STATGRAPHICS® Centurion XV (Statgraphics Technologies, Inc.)

9.2 Metody

9.2.1 Syntéza povrchově aktivních iontových kapalin

9.2.1.1 Syntéza monokationových iontových kapalin imidazoliového typu

IL imidazoliového typu byly syntetizovány podle dříve popsaného postupu [256]: 0,10 mol 1-butyylimidazolu nebo 1-metyylimidazolu, 0,11 mol odpovídajícího 1-bromalkanu a 20 ml isopropanolu bylo smícháno a zahříváno (70 °C, 24 hodin, míchání). Isopropanol byl následně odstraněn ve vakuu při (60 °C, 15 kPa) a produkt byl poté rozpuštěn ve 25 ml vody Milli-Q. Přebytek výchozího materiálu byl pětkrát extrahován 15 ml ethylacetátu. Po čistícím kroku byla voda odpařena ve vakuu při 80 °C. Poté byl produkt sušen ve vakuové odparce po dobu 2 dnů.

9.2.1.2 Syntéza trikationových iontových kapalin imidazoliového typu

Trikationová iontová kapalina [(C8Im)₃Bn⁺] [3Br⁻] byla syntetizována podle dříve popsaného postupu [257]: 16,68 mmol imidazolu a 62,3 mmol hydroxidu draselného bylo rozpuštěno ve 40 ml dimethylsulfoxidu. Poté bylo přidáno 4,45 mmol 1,3,5-tris (brommethyl) benzenu a směs byla míchána po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. K reakční směsi bylo přidáno 40 ml vody a převedeno do dělicí nálevky a byla extrahována čtyřikrát 40 ml chloroformu. Organická fáze byla oddělena, promyta několikrát vodou, sušena bezvodým síranem sodným a nakonec zfiltrována. Rozpouštědlo bylo částečně opařeno ve vakuu a poté byl přidán nadbytek diethyletheru. Po přidání přebytku diethyletheru se vysrážel bílý prášek, který byl

přefiltrován a promyt diethyletherem. Výsledná sloučenina byla rekrystalizována za použití směsi rozpouštědel dichlormethan-diethylether a sušena při 60 °C po dobu 12 hodin. 3,14 mmol výsledné sloučeniny a 4,09 mmol 1-bromoktanu v acetonitrilu se zahřívalo pod zpětným chladičem po dobu 7 dnů, poté se rozpouštědlo částečně odpařilo ve vakuu. Získaná tuhá látka byla filtrována a několikrát promyta diethyletherem. Produkt byl opět rekrystalizován za použití směsi rozpouštědel dichlormethan-diethylether, následovalo odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku, a výsledný produkt byl sušen při teplotě 70 °C po dobu 24 hodin.

9.2.1.3 Syntéza iontových kapalin guanidiniového typu

IL s guanidiniovým kationtem byly syntetizovány podle dříve popsaného postupu [258]. Stručně, 19,2 mmol oktylaminu a 19,3 mmol hydrochloridu 1H-pyrazol-1-karboxamidinu a 5 ml ethanolu se za stálého míchání 48 hodin vaří pod zpětným chladičem při 35 °C. Poté byl ethanol odstraněn ve vakuu (50 °C, 15 kPa) a produkt byl třikrát promyt 5 ml ethanolu.

9.2.2 HPLC-PDA

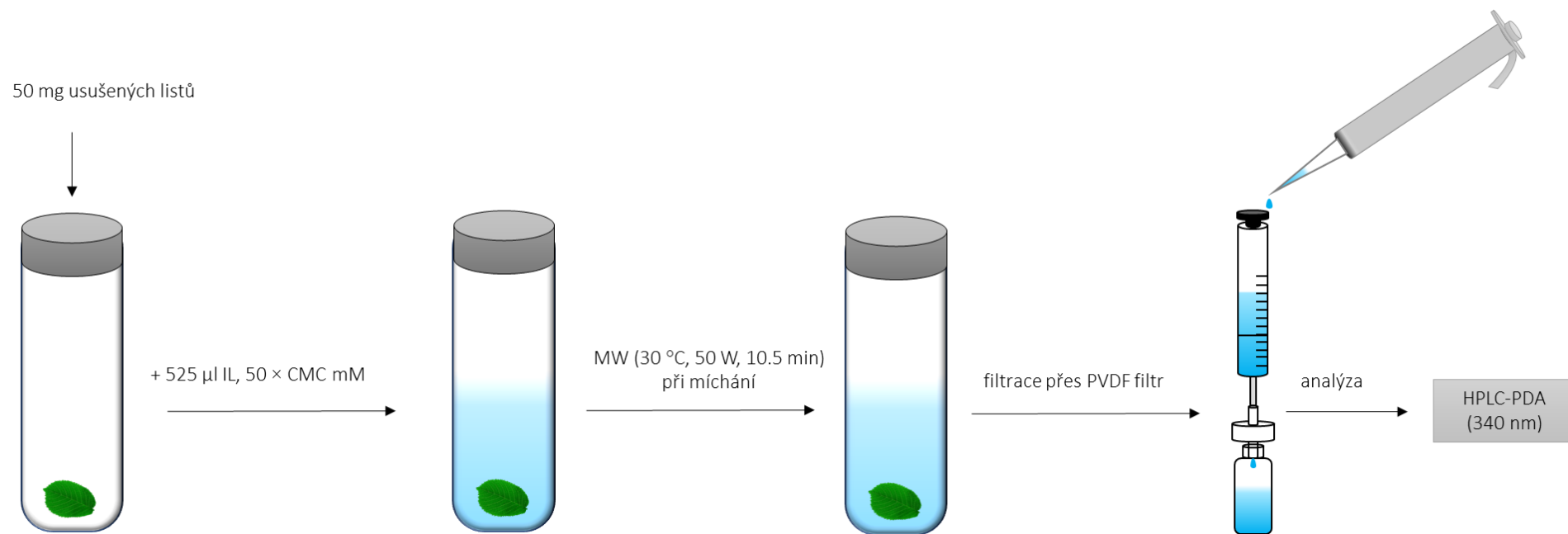
Chromatografická separace analytů byla provedena za použití acetonitrilu a ultra čisté vody s 0,1 % (v/v) kyseliny octové jako mobilní fáze a při konstantním průtoku 1 ml·min⁻¹. Eluční gradient začínal při 10% acetonitrilu (v/v) a byl zvýšen na 30% (v/v) za 40 minut. Poté se podíl acetonitrilu během 10 minut zvýšil na 100% (v/v) a nakonec se tyto podmínky udržovaly po dobu 2 minut. Vlnová délka pro všechny analyty byla nastavena na 340 nm. Analyty byly nejprve identifikovány v extraktech pomocí uměle připravených extraktů získaných metodou IL-MA-SLE za náhodných předem stanovených podmínek s použitím vzorku *Passiflora flavicarpa* (PS032). Pro kvantifikaci analytů byla použita metoda externí kalibrace.

9.2.3 Extrakční metoda ILMA-SLE s použitím povrchově aktivních iontových kapalin

V metodě IL-MA-SLE bylo dané množství lyofilizovaných listů umístěno do 25 ml centrifugační zkumavky a byl přidán odpovídající objem vodného roztoku povrchově aktivní iontové kapaliny v určité koncentraci. Poté byly analyty extrahovány mikrovlnnou extrakcí nastavením výkonu záření MW na 50 W, při odpovídající teplotě a po určitou dobu. Nakonec byl extrakt přefiltrován přes stříkačkový filtr PDVF a sbírán do 2 ml lahvičky. Byly provedeny tři opakování každé extrakce. Obrázek 40 zahrnuje obecné schéma extrakčního postupu. Za optimálních podmínek bylo smícháno 50 mg listů a 525 µl vodného roztoku iontové kapaliny s koncentrací 50 × CMC (různé v závislosti na extrakčním činidle). Extrakce byla provedena při 30 °C, 50 W a po dobu 10,5 minut.

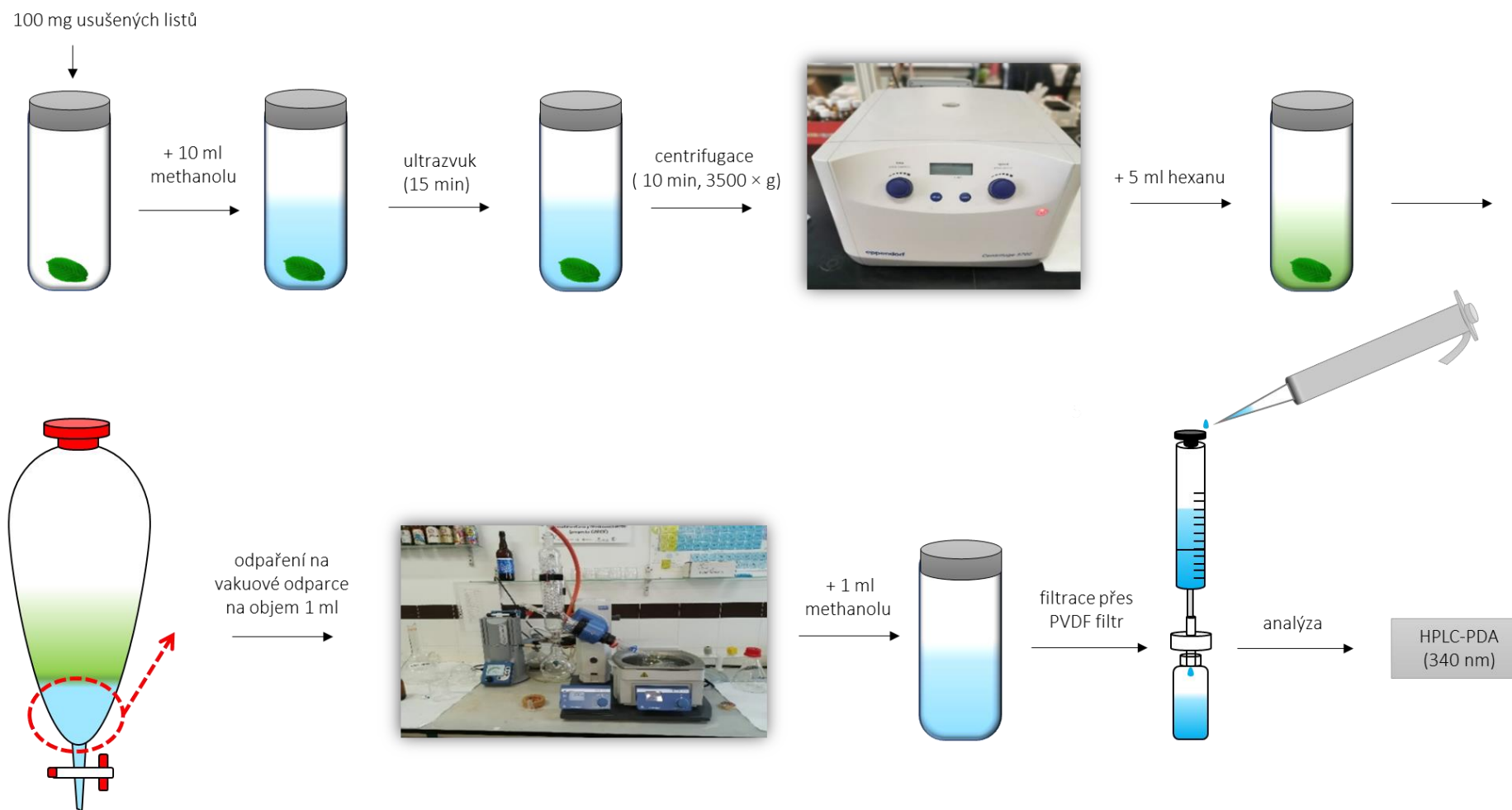
9.2.4 Extrakční metoda UA-SLE s použitím methanolu

Srovnávací extrakční metoda byla provedena podle dříve publikované studie [82]. 100 mg lyofilizovaných listů bylo smícháno s 10 ml methanolu/vody 70% (v/v) v centrifugační zkumavce. Zkumavka byla uzavřena a umístěna do ultrazvukové lázně na 15 minut při laboratorní teplotě. Na konci procesu byl supernatant odebrán do jiné zkumavky a centrifugován při 2515×g po dobu 10 minut. Poté byl supernatant přelit do dělicí nálevky a byla provedena extrakce chlorofylu 5 ml *n*-hexanu jemným třepáním po dobu 5 minut. Hydroalkoholický extrakt byl odebrán do baňky s kulatým dnem a odpařován ve vakuu při 50 °C, dokud nebyl získán konečný objem 1 ml. Nakonec byl přidán 1 ml methanolu a výsledný extrakt byl filtrován přes PVDF stříkačkový filtr a odebrán do lahvičky k následné analýze. Byly provedeny tři opakování každé extrakce. Obrázek 41 popisuje schéma tohoto postupu.



Obrázek 40 IL-MA-SLE metoda pro extrakci flavonoidů z ovocných listů (optimální podmínky extrakce)

Přepřacováno z [82]



Obrázek 41 UA-SLE metoda pro extrakci flavonoidů z ovocných listů

9.2.5 Optimalizace IL-MA-SLE

K nalezení optimálních extrakčních podmínek a zlepšení výtěžku extrakce byla použita metodika povrchové odezvy (RSM) pomocí experimentálního designu Box-Behnken (BBD). Byly studovány čtyři faktory na třech úrovních, včetně doby mikrovlnného záření MW (X_1), extrakční teploty (X_2), poměru kapalina-tuhá látka (l/s, vodný roztok iontové kapaliny/rostlinný materiál) (X_3) a koncentrace iontové kapaliny (X_4). Plocha píku získaná pro každý analyt byla použita jako proměnná odezvy (Y).

Počet experimentů se počítá jako $N=2k(k-1)+C_0$, kde k je počet faktorů a C_0 je počet centrálních bodů. Provozní hodnoty byly vypočítány pomocí následující rovnice (23):

$$C_i = \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i} \cdot \alpha \quad (23)$$

Kde C_i je kódovaná hodnota pro úroveň faktoru i , X_i je jeho skutečná hodnota v experimentu, X_i^0 je skutečná hodnota ve středu experimentální domény, ΔX_i je variační krok skutečné hodnoty a α je limit kódované hodnoty pro každý faktor.

Získané povrchy odezvy odpovídají následující multivariační regresní rovnici druhého řádu (24), která koreluje proměnné a výtěžek extrakce:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (24)$$

Kde x_i a x_j představují nezávislé proměnné, Y je proměnná odezvy a β_0 , β_i , β_{ii} a β_{ij} jsou konstanty, regresní koeficienty jednoho členu, kvadratické členy a členy interakce. Vzhledem k tomu, že jsou studovány čtyři proměnné, má předchozí rovnice následující podobu (25):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{14} x_1 x_4 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{24} x_2 x_4 + \beta_{34} x_3 x_4 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{44} x_4^2 \quad (25)$$

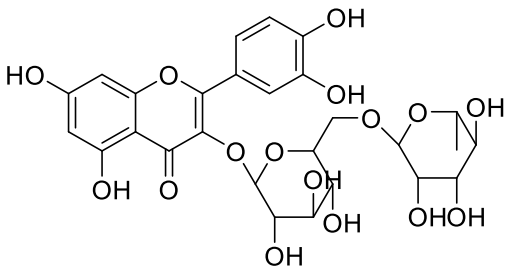
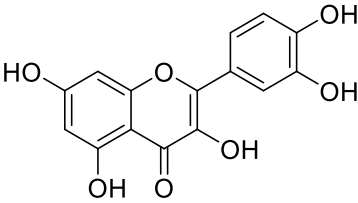
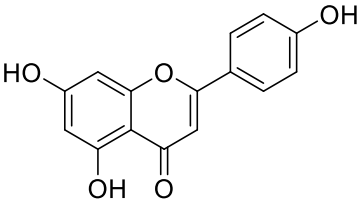
Pro optimalizaci metody byla vybrána iontová kapalina [C16C4Im⁺][Br⁻] a získané optimální podmínky byly extrapolovány pro ostatní testované IL. K získání povrchů odezvy a optimálních podmínek byl použit software STATGRAPHICS® Centurion XV.

9.3 Výsledky a Diskuse

9.3.1 Optimalizace IL-MA-SLE pomocí RSM

Vzhledem k dobrým výsledkům předchozí studie skupiny Mastellone a kol. extrakce fenolických látek z listů *Vitis vinifera* metodou IL-MA-SLE s použitím [C16C4Im⁺][Br⁻] [82] byla tato IL vybrána pro optimalizaci extrakčního postupu v naší studii. Jako cílové analyty byly vybrány tři flavonoidy (apigenin, rutin, kvercetin) vzhledem k jejich významnému zastoupení v listech mučenky a manga, jak bylo již dříve uvedeno v literatuře [70-73, 259]. Tabulka 18 obsahuje hlavní fyzikálně-chemické charakteristiky těchto analytů spolu s jejich strukturou. Optimalizace byla provedena pomocí experimentálního designu s cílem snížit počet experimentů, ušetřit extrakční činidla a rostlinný materiál a stanovit interakce mezi proměnnými, které ovlivňují účinnost extrakce vůči cílovým analytům. Ze všech vzorků byla jako reprezentativní matrice pro optimalizaci použita *Passiflora flavicarpa* (PS032).

Tabulka 18 Chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti sledovaných flavonoidů (staženo z databáze SciFinder® 2020)

Analyt	Chemická struktura	MW [g·mol ⁻¹]	pK _a	Log K _{ow} ^a
rutin		610,52	6,17	-0,90
kvercetin		302,24	6,31	1,99
apigenin		270,24	6,53	2,13

^a Logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda při 25 °C.

Pro výběr nejlepších experimentálních podmínek při použití metody IL-MA-SLE lze zvážit několik parametrů, jako jsou podmínky MW záření, množství vzorku, množství extrakčního činidla a koncentrace iontové kapaliny. Podle předběžných testů a dalších metod uvedených v literatuře zabývající se metodami MA-SLE [244, 260-263] byly pro optimalizaci vybrány

čtyři hlavní faktory: doba MW záření, teplota MW záření, poměr kapaliny a pevné látky (l/s) a koncentrace iontové kapaliny. Výkon MW záření byl stanoven na 50 W, aby se ušetřila energie. Kromě toho, pokud by byl zvolen vysoký výkon MW záření, teplota uvnitř rostlinného materiálu se zvyšuje a může zničit některé cílové sloučeniny a snížit účinnost extrakce [264]. Množství vzorku bylo stanoveno na 50 mg, zatímco objem vodného roztoku iontové kapaliny se měnil, aby se vyhodnotil vliv poměru l/s.

K optimalizaci metody byl použit Box-Behnkenův statistický design. Tento design pro čtyři proměnné (zkoumané vždy na třech úrovních) a se třemi opakováními centrálního bodu zahrnuje 27 experimentů uspořádaných do ortogonálních bloků [265]. Ve srovnání s ostatními metodami plánování experimentu (centrální kompozitní plánování (CCD), Doehlertova matice (DM) a plný faktoriální design) je BBD spolu s DM nejefektivnější. Výhodou BBD je, že neobsahuje kombinace faktorů a úrovní, a proto jsou všechny faktory hodnoceny současně na své nejvyšší a nejnižší úrovni. Kromě toho je ve srovnání s CCD počet potřebných experimentů pro všechny faktory nižší [265]. Kódované a pracovní hodnoty BBD této studie jsou uvedeny v Tabulce 19. Mezní hodnoty faktorů byly vybrány na základě předchozích studií [244, 260-264] a několika předběžných testů, zatímco závislou proměnnou použitou pro hodnocení účinnosti extrakce v experimentálním návrhu byla plocha píků tří cílových analytů. Rozsahy posuzovaných proměnných tedy byly 5-30 minut pro dobu extrakce, 30-80 °C pro teplotu extrakce, 10-50 ml·g⁻¹ pro poměr l/s a 0,9-45 mM (od CMC do 50×CMC) pro koncentraci iontové kapaliny [C16C4Im⁺][Br⁻].

Tabulka 19 Experimentální model – matice experimentů BBD použita pro optimalizaci metody IL-MA-SLE, včetně kódovaných a pracovních hodnot

Série ^a	Kódovaná hodnota ^b				Pracovní hodnota ^b			
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	β ₁	β ₂	β ₃	β ₄
1	-1	-1	0	0	5,00	30,00	30,00	22,95
2	-1	1	0	0	5,00	80,00	30,00	22,95
3	1	-1	0	0	30,00	30,00	30,00	22,95
4	1	1	0	0	30,00	80,00	30,00	22,95
5	0	0	-1	-1	17,50	55,00	10,00	0,90
6	0	0	-1	1	17,50	55,00	10,00	45,00
7	0	0	1	-1	17,50	55,00	50,00	0,90
8	0	0	1	1	17,50	55,00	50,00	45,00
9	-1	0	0	-1	5,00	55,00	30,00	0,90
10	-1	0	0	1	5,00	55,00	30,00	45,00

11	1	0	0	-1	30,00	55,00	30,00	0,90
12	1	0	0	1	30,00	55,00	30,00	45,00
13	0	-1	-1	0	17,50	30,00	10,00	22,95
14	0	-1	1	0	17,50	30,00	50,00	22,95
15	0	1	-1	0	17,50	80,00	10,00	22,95
16	0	1	1	0	17,50	80,00	50,00	22,95
17	-1	0	-1	0	5,00	55,00	10,00	22,95
18	-1	0	1	0	5,00	55,00	50,00	22,95
19	1	0	-1	0	30,00	55,00	10,00	22,95
20	1	0	1	0	30,00	55,00	50,00	22,95
21	0	-1	0	-1	17,50	30,00	30,00	0,90
22	0	-1	0	1	17,50	30,00	30,00	45,00
23	0	1	0	-1	17,50	80,00	30,00	0,90
24	0	1	0	1	17,50	80,00	30,00	45,00
25	0	0	0	0	17,50	55,00	30,00	22,95
26	0	0	0	0	17,50	55,00	30,00	22,95
27	0	0	0	0	17,50	55,00	30,00	22,95

Indexy jednotlivých parametrů C a β – 1: extrakční čas (min); 2: extrakční teplota (°C); 3: l/s poměr (ml·g⁻¹); a 4: koncentrace iontové kapaliny (mM).

^a Počet experiment je dán vztahem $N = 2k(k-1) + C_0$, kde k počet faktorů a C_0 je počet opakování centrálního bodu.

^b Vztah mezi kódovanou a pracovní hodnotou je dán vztahem: $C_i = \frac{\beta_i - \beta_i^0}{\Delta\beta_i} \cdot \alpha$, kde C_i je kódovaná hodnota pro level faktoru i, β_i je jeho skutečná hodnota v experimentu, β_i^0 je skutečná hodnota centrálního bodu, $\Delta\beta_i$ je krok variance reálných hodnot, and α je kódovaný limit pro každý faktor.

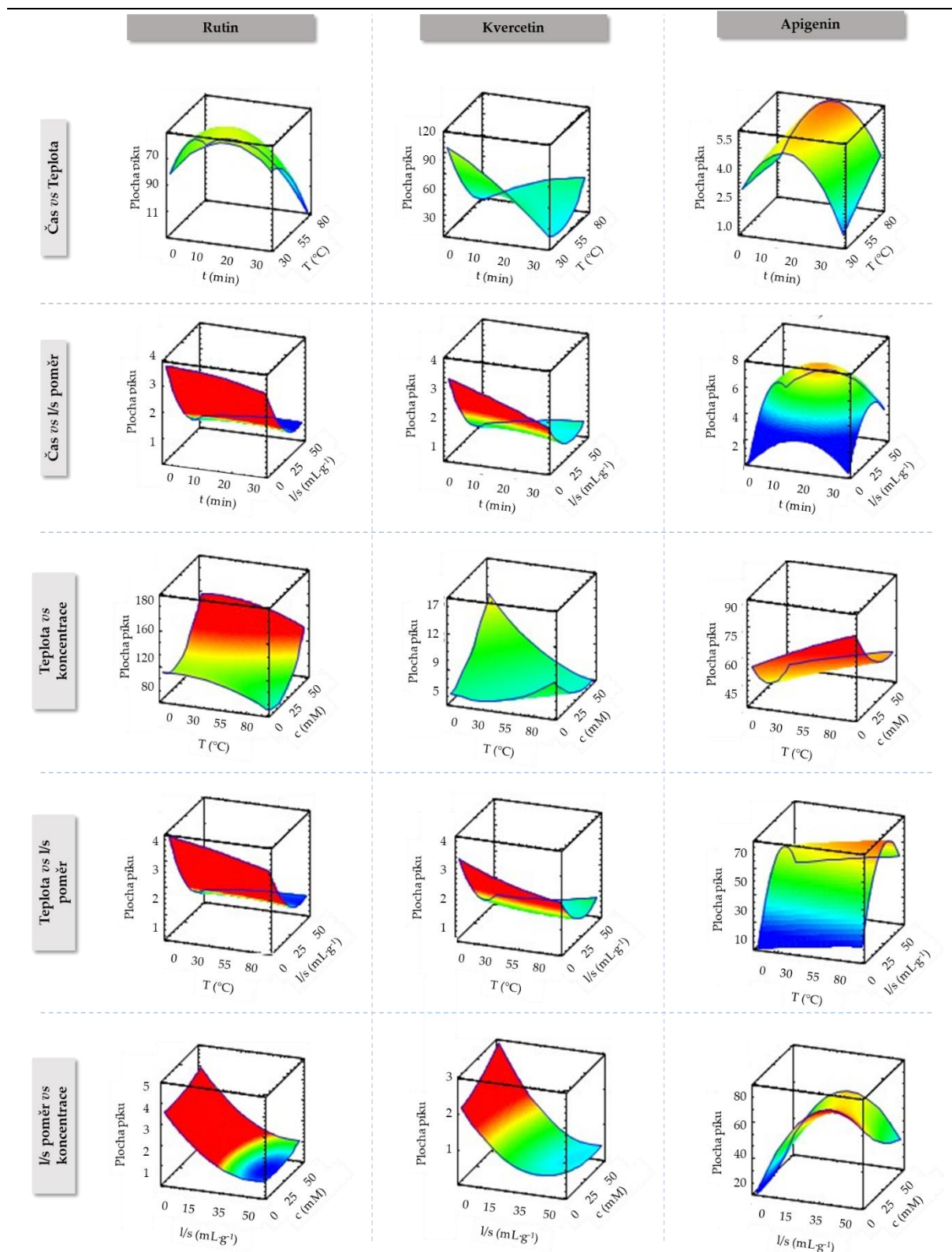
Konstanta a koeficienty pro vícerozměrnou regresní rovnici druhého řádu, která popisuje odhadnuté plochy odezvy, jsou uvedeny v Tabulce 20. Byly sestrojeny 3D grafy znázorňující závislost plochy píku na studovaných proměnných, které jsou uvedeny na Obrázku 42. Z tvaru 3D plochy odezvy lze odhadnout vliv zvolených parametrů na účinnost extrakce cílových sloučenin a interakce mezi nimi.

Tabulka 20 Získané hodnoty pro konstantu a koeficienty regresní rovnice druhého řádu pro odezvy plochy pro rutin, kvercetin a apigenin

Koeficient ^a	Rutin	Kvercetin	Apigenin
Konstanta	41687300,00	512030,00	-42617,30
β_1	71028,90	-8404,82	3488,87
β_2	-24583,40	-5079,28	78,75
β_3	-1534080,00	-14381,40	4355,19

β_4	-54115,50	2468,22	41,96
β_{11}	-4968,56	-25,11	-142,89
β_{12}	-1816,22	69,96	18,34
β_{13}	5295,74	133,30	-9,96
β_{14}	-249,25	28,00	-3,22
β_{22}	-1005,11	23,13	-0,99
β_{23}	4287,16	61,99	1,34
β_{24}	69,62	-43,22	-2,73
β_{33}	13203,30	115,11	-59,59
β_{34}	-864,87	-43,37	-22,85
β_{44}	3061,48	20,47	10,45

Indexy koeficientu β – 1: extrakční čas (min); 2: extrakční teplota (°C); 3: l/s poměr (ml·g⁻¹); a 4: koncentrace iontové kapaliny (mM), s použitím [C₁₆C₄Im⁺][Br⁻] jako modelové iontové kapaliny a *Passiflora flavicarpa* (PS032) jako modelového vzorku (50 mg).



Obrázek 42 Získané odezvy plochy popsané regresní rovnicí druhého řádu pro každý flavonoid popisující závislost plochy píku na studovaných proměnných

S cílem zjistit, které ze studovaných faktorů významně ovlivňují účinnost extrakce IL-MA-SLE, byla provedena analýza rozptylu (ANOVA), jejíž výsledky jsou uvedeny v Tabulce 21. Koeficienty determinace (R^2) regresní rovnice ukazují, že přizpůsobené modely vysvětlují

89 % variability u rutinu, 58 % u kvercetin a 37 % u apigeninu. Model je tedy dobře přizpůsoben pro rutin, ale méně pro kvercetin a apigenin. Podle P-hodnot byl hlavním statisticky významným faktorem ovlivňujícím plochu píku poměr l/s v lineárním (β_3) a kvadratickém členu (β_{13} , β_{23} , β_{33} a β_{34}) u všech analytů s výjimkou apigeninu. Jak lze pozorovat na 3D plochách odezvy uvedených na Obrázku 42, s nárůstem poměru l/s se plocha píku rutinu a kvercetin snižovala. U apigeninu je však chování zcela odlišné, protože účinnost extrakce se zvyšuje s rostoucím poměrem l/s a poté začíná klesat. Podle hodnot P je doba extrakce důležitým faktorem ovlivňujícím výtěžnost extrakce apigeninu (β_1 a β_{11}). U všech analytů se nejprve výtěžnost extrakce zvyšuje s rostoucí dobou extrakce. S dalším zvyšováním času však výtěžek extrakce klesá, což je zvláště výrazné u apigeninu, nejspíše v důsledku rozkladu analytů.

Tabulka 21 Parametry získané z analýzy rozptylu (ANOVA) experimentálních hodnot

Koefficient	Rutin		Kvercetin		Apigenin	
	F-poměr	P-hodnota	F-poměr	P-hodnota	F-poměr	P-hodnota
β_1	0,41	0,5364	0,29	0,5997	0,82	0,3841
β_2	0,89	0,3647	0,36	0,5587	0,31	0,5899
β_3	79,11	0,0000	8,78	0,0118	0,07	0,8029
β_4	1,84	0,2000	0,07	0,7971	0,45	0,5142
β_{11}	0,28	0,6049	0,02	0,8894	1,51	0,2432
β_{12}	0,11	0,7424	0,47	0,506	0,07	0,7896
β_{13}	0,62	0,4479	1,09	0,3166	0,01	0,9076
β_{14}	0,00	0,9682	0,06	0,8129	0,00	0,967
β_{22}	0,18	0,6749	0,27	0,6102	0,00	0,9735
β_{23}	1,61	0,2280	0,94	0,3503	0,00	0,9752
β_{24}	0,00	0,9822	0,56	0,4694	0,01	0,9442
β_{33}	13,06	0,0036	2,78	0,1213	1,72	0,2146
β_{34}	0,05	0,8250	0,36	0,5598	0,23	0,6401
β_{44}	1,04	0,3285	0,13	0,7249	0,08	0,7846

^a1: extrakční čas (min); 2: extrakční teplota (°C); 3: l/s poměr (ml·g⁻¹); a 4: koncentrace IL (mM), s použitím [C₁₆C₄Im⁺][Br⁻] jako modelové IL a *Passiflora flavicarpa* (PS032) jako modelového vzorku (50 mg).

Optimální podmínky pro každý analyt předpovězené statistickým softwarem jsou uvedeny v Tabulce 22. Obecně platí, že rutin a kvercetin vykazují podobné optimální podmínky: nízké extrakční časy, teplota a l/s a maximální koncentrace iontové kapaliny (50×CMC). V případě apigeninu jsou nejlepší výsledky dosaženy při vyšších extrakčních časech a poměrech l/s, nejvyšší teplotě extrakce a nejnižší koncentraci iontové kapaliny (hodnota CMC). Aby bylo

možné využít extrakci pro co největší počet analytů, bylo navrženo kompromisní řešení a pro další extrakce byly zvoleny následující optimální podmínky: 10 minut extrakční čas, 30,0 °C extrakční teplota, 10,5 ml·g⁻¹ poměr l/s a 50×CMC pro koncentraci iontové kapaliny. Poměr l/s byl ponechán na této hodnotě ve prospěch rutinu a kvercetin, pro které byla tato proměnná obzvláště významná. Doba extrakce, která nejvíce ovlivnila apigenin, byla stanovena na střední hodnotu mezi optimálními časy, které byly velmi podobné. Vzhledem k nevýznamnému vlivu teploty byla nastavena na minimální hodnotu, aby se ušetřila energie, zatímco nejvyšší koncentrace iontové kapaliny byla použita kvůli jejímu pozitivnímu účinku při nízkých teplotách pro rutin a kvercetin.

Tabulka 22 Optimální podmínky metody IL-MA-SLE pro jednotlivé analyty

Analyt	Extrakční čas [min]	Extrakční teplota [°C]	l/s [ml·g ⁻¹]	Koncentrace IL [mM]
rutin	5,0	31,7	10,2	45,0
kvercetin	10,5	30,0	10,5	45,0
apigenin	15,9	80,0	35,7	0,9

9.3.2 Analytické parametry metody IL-MA-SLE-HPLC-PDA

Po optimalizaci metody IL-MA-SLE a správné identifikaci cílových sloučenin v chromatogramu bylo nutné provést kvantifikaci analytů za účelem stanovení jejich koncentrace v různých vzorcích. Pro kvantifikaci analytů ve vzorcích byla použita metoda externí kalibrace. Byly stanoveny následující parametry: lineární rozsah, citlivost kalibrace, mezi-denní přesnost, determinační koeficient (R^2), mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ) chromatografické metody. Výsledky kalibračních dat spolu s několika analytickými parametry jsou uvedeny v Tabulce 23. Metoda vykazuje dobrou linearitu s hodnotami R^2 vyššími než 0,9988 v koncentračním rozsahu 0,1-500 mg·l⁻¹ pro rutin a 0,05-500 mg·l⁻¹ pro apigenin a kvercetin. Hodnoty LOD byly experimentálně získány snižováním koncentrace analytů ve standardu v acetonitrilu, dokud nebylo dosaženo poměru signál/šum (S/N) 3, zatímco hodnoty LOQ byly odhadnuty jako 10/3násobek LOD a poté experimentálně ověřeny. LOD tedy byly 40, 20 a 10 µg·l⁻¹ pro rutin, kvercetin a apigenin. LOQ se pohybovaly od 30 do 100 µg·l⁻¹. Za účelem posouzení přesnosti metody byly standardní roztoky o koncentraci 30 mg·l⁻¹ analyzovány metodou HPLC-PDA třikrát po sobě ve stejný den a ve třech po sobě jdoucích dnech. Navržená metoda vykazuje dobrou mezilehlou přesnost s hodnotami RSD nižšími než 3,22 %.

Tabulka 23 Analytické parametry metody IL-MA-SLE-HPLC-PDA pro stanovení rutinu, kvercetinu a apigeninu

Analyt	Kalibrační rozmezí [mg·L ⁻¹]	(Směrnice ± t _{n-2} ·SD ^a)·10 ⁻⁴	R ² ^b	LOD ^c [μg·L ⁻¹]	LOQ ^d [μg·L ⁻¹]	Denní RSD ^e [%]	Mezidenní RSD ^f [%]
rutin	0,1 – 500	9,1 ± 0,2	0,9992	40	100	2,32	3,22
kvercetin	0,05 – 150	14,3 ± 0,4	0,9988	20	50	2,37	2,33
apigenin	0,05 – 150	26,8 ± 0,6	0,9991	10	30	2,08	2,55

^aMezní hodnoty intervalu spolehlivosti pro 10 kalibračních bodů s 95% spolehlivostí v kalibračním rozmezí.

^bDeterminační koeficient.

^cLimit detekce (LOD), experimentálně stanovený postupným snižováním koncentrace standardů, dokud nebyl získán poměr S/N=3.

^dLimit kvantifikace (LOQ), stanoven jako 10/3·LOD a experimentálně ověřen analýzou standardu s predikovanou koncentrací.

^eStandardní relativní odchylka (RSD) pro analýzu analytů v jeden den (n = 3) za použití standardu o koncentraci 30 mg·L⁻¹.

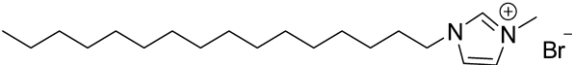
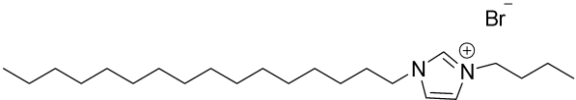
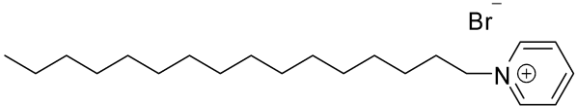
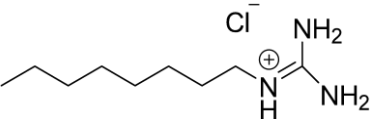
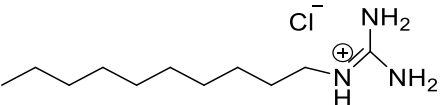
^fStandardní relativní odchylka (RSD) a pro analýzu analytů ve třech nesledujících dnech (n = 9) za použití standardu o koncentraci 50 mg·L⁻¹.

9.3.3 Vliv použité iontové kapaliny na složení extraktu

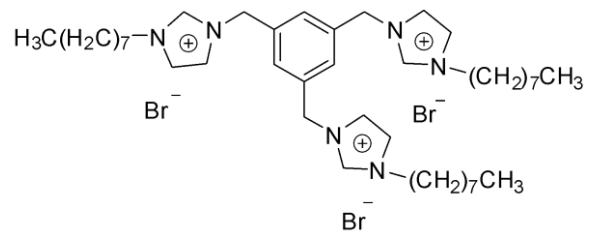
Vliv struktury iontové kapaliny na extrakci cílových analytů z rostlinných matric byl hodnocen pomocí šesti vybraných IL. Tabulka 24 uvádí chemickou strukturu a některé nejdůležitější vlastnosti IL hodnocených v této studii, včetně jejich CMC [256, 257, 266-269] Všechny byly kompatibilní s HPLC analýzou díky své rozpustnosti v mobilní fázi, a nevyžadovaly tak odstranění iontové kapaliny zpětnou extrakcí před nadávkováním do přístroje. Byly vybrány s ohledem na různé faktory. Imidazoliové IL byly široce používány pro extrakci různých analytů z různých vzorků [245, 247, 260, 264, 270, 271]. Vliv sekundárního alkylového řetězce byl posuzován pomocí [C16MIm⁺][Br⁻] a [C16C4Im⁺][Br⁻]. V případě multikationtových IL byly navzdory svým zajímavým vlastnostem v extrakčních postupech hodnoceny jen zřídka, a proto byla vybrána [(C8Im)₃Bn⁺][3Br⁻]. Vzhledem k obavám z toxicity většiny běžných imidazoliových IL [272] byla hodnocena další kationtová jádra, včetně pyridiniových [C16Py⁺][Br⁻] a alkyl guanidinium chloridových IL. V případě guanidiniových IL, o kterých bylo nedávno referováno jako o nízké cytotoxických IL [256, 268], byly studovány také různé alkylové řetězce ([C8Gu⁺][Cl⁻] a [C10Gu⁺][Cl⁻]). Vzhledem k odlišné struktuře testovaných IL vykazují různé hodnoty CMC, které se pohybují od 0,61 mM pro [C16MIm⁺][Br⁻] do 44,6 mM pro [C8Gu⁺][Cl⁻]. Imidazoliové IL vykazují nejnižší hodnoty CMC a k využití jejich povrchově aktivních vlastností je ve srovnání s guanidiniovými IL zapotřebí nižší množství iontové kapaliny. IL s guanidiniovými řetězci však mají lepší toxikologické profily. Kromě těchto vlastností, několik studií poukázalo na to, že struktura iontové kapaliny má významný vliv na účinnost extrakce cílových analytů [261, 264, 273, 274]. Obecně platí, že aniont i délka alkylového řetězce iontové kapaliny ovlivňují mísitelnost s vodou, čímž ovlivňují účinnost extrakce cílových sloučenin [264, 275-277]. IL s halogenidovými anionty, jako je [Cl⁻] nebo

[Br⁻], jsou tedy mísitelné s vodou v jakémkoli poměru, ale IL obsahující [PF₆⁻] jsou hydrofobní. Na druhou stranu zvyšování délky alkylového řetězce iontové kapaliny také zvyšuje hydrofobicitu a viskozitu iontové kapaliny, zatímco hodnoty hustoty a povrchového napětí klesají [278].

Tabulka 24 Vybrané vlastnosti použitých iontových kapalin jako extrakčního činidla v metodě MA-SLE-HPLC-PDA k extrakci flavonoidů z rostlinných matic

Iontová kapalina	Struktura	Skupenství	MW [g·mol ⁻¹]	CMC ^a [mM]
<i>1-hexadecyl-3-methyl imidazolium bromid</i>				
[C ₁₆ MIm ⁺][Br ⁻]		Pevné	386,9	0,61 [31]
<i>1-hexadecyl-3-butyl imidazolium bromid</i>				
[C ₁₆ C ₄ Im ⁺][Br ⁻]		Pevné	428,3	0,10 [21]
<i>hexadecyl pyridinium bromid</i>				
[C ₁₆ Py ⁺][Br ⁻]		Pevné	384,4	0,72 [32]
<i>oktyl guanidinium chlorid</i>				
[C ₈ Gu ⁺][Cl ⁻]		Kapalné	206,5	44,6 [33]
<i>decyl guanidinium chlorid</i>				
[C ₁₀ Gu ⁺][Cl ⁻]		Kapalné	234,5	18,6 [20]

3,3',3''-oktyl-1,1',1''-(1,3,5)tris(methylen)benzen imidazolium bromid



$[(C_8Im)_3Bn^+][3Br^-]$

Pevné

849,8

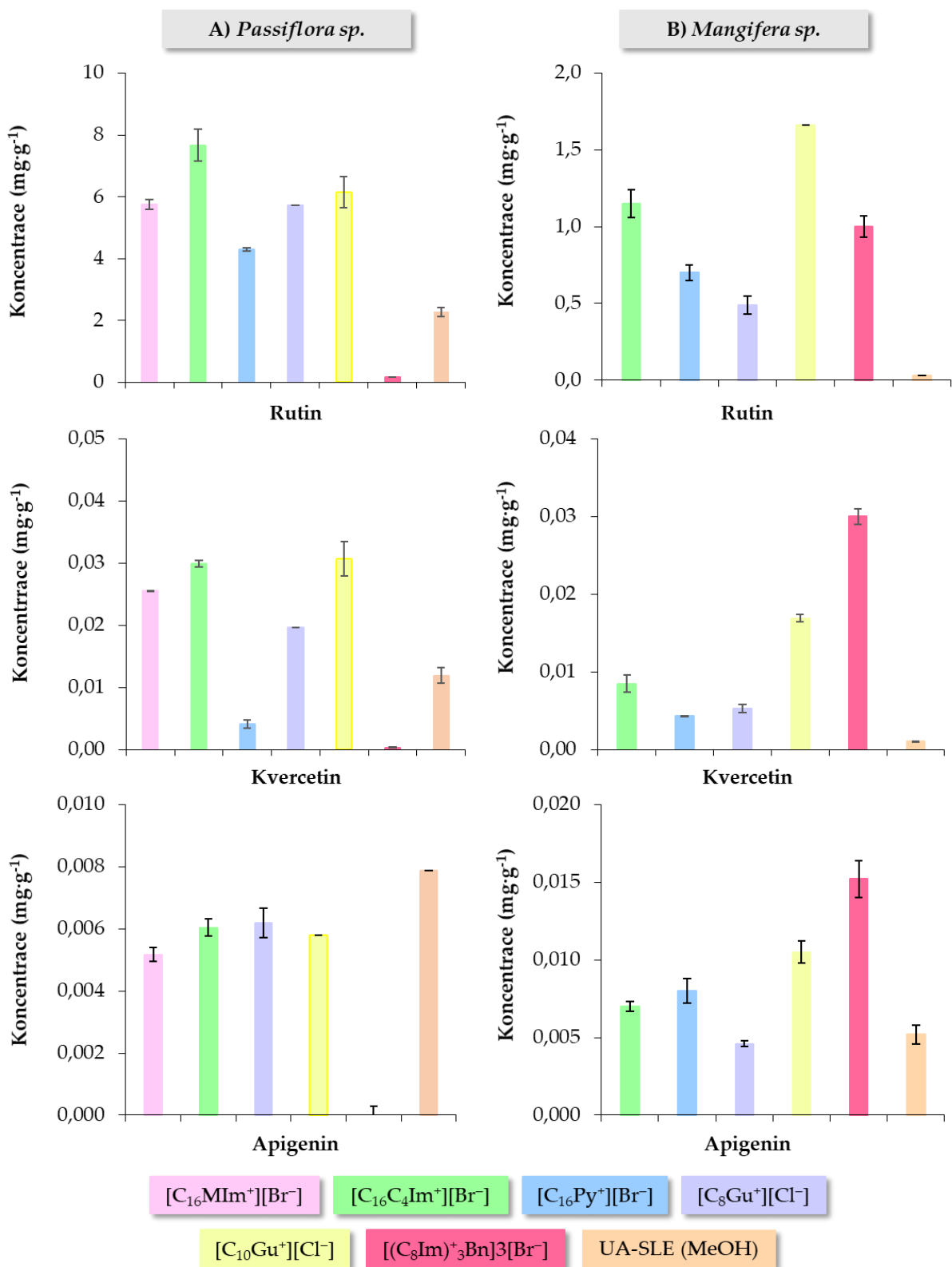
2,30 [22]

^a Kritická micelární koncentrace získaná z literatury

Byla provedena screeningová studie k vyhodnocení extrakční účinnosti vybraných IL optimalizovanou metodou IL-MA-SLE a za použití vzorků PS032 a Sweet tart jako reprezentativních rostlinných matric pro mučenku, resp. mango. Získané optimální podmínky extrakce byly použity také pro ostatní IL. Proto byly doba extrakce, teplota a poměr l/s stejné, zatímco koncentrace iontové kapaliny byla pro každou iontovou kapalinu jiná, protože závisí na jejich hodnotě CMC. Pro $[C_{16}MIm^+][Br^-]$ byla použita koncentrace 30,5 mM, pro $[C_{16}MIm^+][Br^-]$ 115 mM, pro $[C_{16}C4Im^+][Br^-]$ 45 mM, pro $[C_{16}Py^+][Br^-]$ 36 mM, pro $[C_8Gu^+][Cl^-]$ 2,23 M, pro $[C_{10}Gu^+][Cl^-]$ 930 mM, a 115 mM pro $[(C_8Im)_3Bn^+][3Br^-]$.

Získané výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 43, kde jsou uvedeny koncentrace získané pro každý flavonoid při použití různých IL jako extrakčních činidel. Je důležité zdůraznit dobrou přesnost stanovení analytů při použití všech IL s hodnotami RSD nižšími než 2,48 %.

Jak je zřejmé, v rámci stejného kationtového jádra platí, že čím delší je alkylový řetězec, tím lepší je účinnost extrakce pro všechny analyty. $[C_{10}Gu^+][Cl^-]$ tak poskytla lepší výsledky než její analog s řetězcem s 8 atomy uhlíku pro oba vzorky, zatímco IL na bázi imidazolu s nejdelšími řetězci vykazovala lepší extrakční účinnost pro vzorek *Passiflora sp.* Trikationtová iontová kapalina poskytla nejnižší extrakční účinnost při analýze listů *Passiflora sp.* a nebyla schopna extrahovat apigenin. Tato trikationtová iontová kapalina však vykazovala nejlepší výsledky při extrakci apigeninu a kvercetinu ve vzorcích *Mangifera sp.*, zejména v případě kvercetinu. V případě pyridiniové iontové kapaliny byla účinnost extrakce ve srovnání se zbývajícími IL mírně nižší, s výjimkou apigeninu v obou vzorcích, u kterého byly získány podobné výsledky. Obecně je tedy zřejmé, že $[C_{16}C4Im^+][Br^-]$ a $[C_{10}Gu^+][Cl^-]$ jsou nejúčinnějšími extrakčními činidly pro listy mučenky, zatímco trikationtová iontová kapalina a $[C_{10}Gu^+][Cl^-]$ byly ve srovnání s ostatními hodnocenými IL nejlepší pro mango. Vzhledem k výrazně odlišnému chování pozorovanému u obou vzorků (bez ohledu na jejich rozdílný obsah flavonoidů) nelze určit, zda jediný nebo konkrétní typ iontové kapaliny poskytne pro tuto aplikaci nejlepší výsledky. Při porovnávání rostlinných extraktů je třeba vzít v úvahu, že mají velmi složité a komplexní složení ovlivněné různými faktory. Proto je při hodnocení různých vlastností IL pro extrakci flavonoidů z jakéhokoli typu rostlinného materiálu třeba vzít v úvahu mimo jiné původ rostlinného materiálu.



Obrázek 43 Extrakční účinnost metody MA-SLE-HPLC-PDA s využitím vybraných IL ke stanovení rutinu, kvercetinu a apigeninu v ovocných listech *Passiflora sp.* (PS032) a *Mangifera sp.* (Sweet tart)

Extrakce byla provedena 3× při optimálních podmínkách experiment popsaných v kapitole 3.3.1

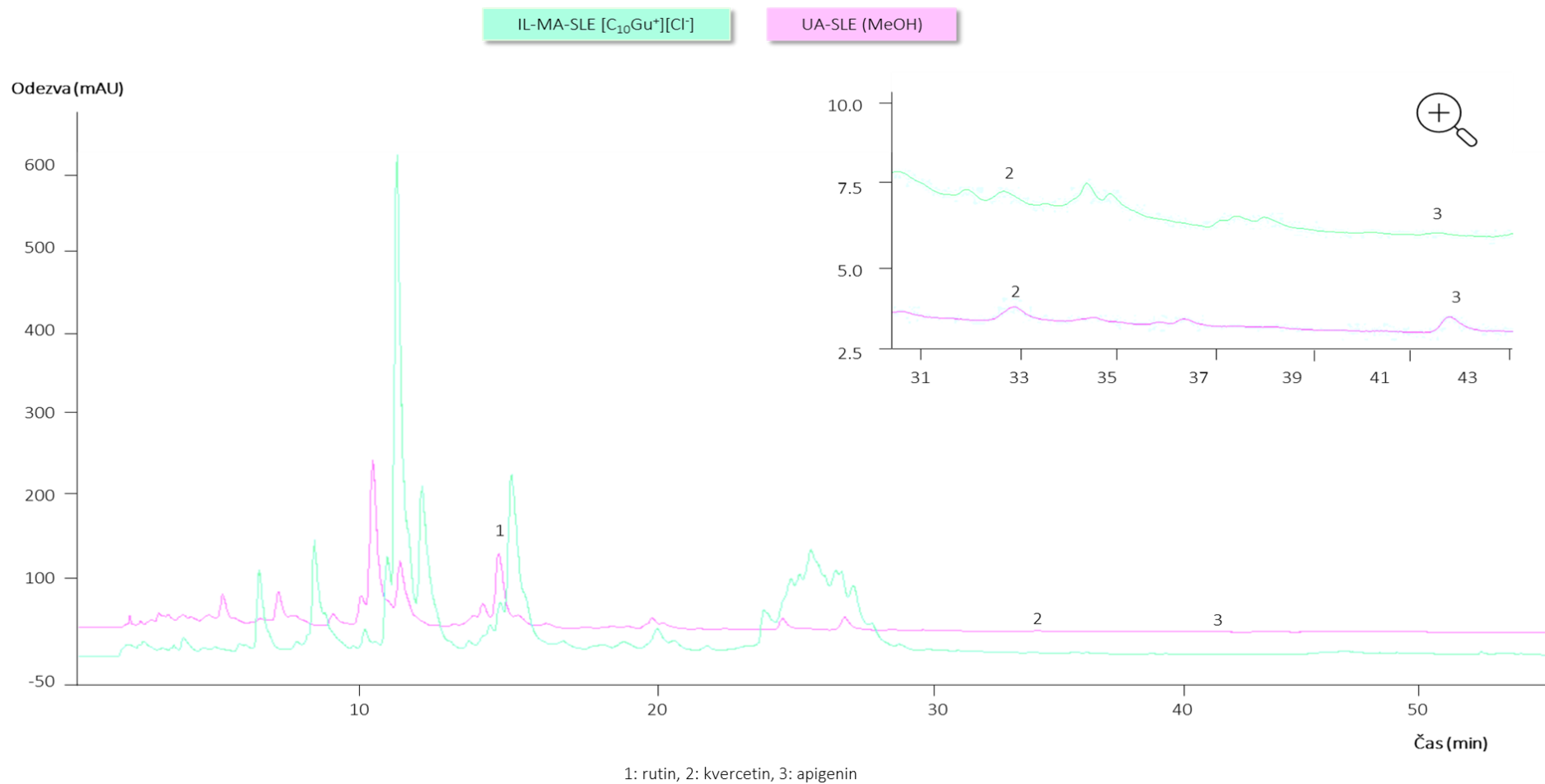
S ohledem na výše popsané dosažené výsledky a s cílem dosáhnout co nejlepší extrakční výtěžnosti pro oba typy vzorků a zároveň zlepšit udržitelnost metody byla jako optimální iontová kapalina pro další výzkum vybrána $[C_{10}Gu^+][Cl^-]$. Tato iontová kapalina vykazuje nízkou cytotoxicitu ve srovnání s imidazoliiovými IL, jak bylo již dříve uvedeno [256]. Přestože je pro $[C_{10}Gu^+][Cl^-]$ zapotřebí větší množství iontové kapaliny kvůli vyšší CMC, množství této iontové kapaliny pro každou extrakci bylo 488 μ l, což je stále opravdu málo. Navíc $[C_{16}C_4Im^+][Br^-]$ a $[(C_8Im)_3Bn^+][3Br^-]$ jsou při pokojové teplotě pevné látky, zatímco $[C_{10}Gu^+][Cl^-]$ je kapalina, což usnadňuje manipulaci a přípravu vodných roztoků.

Bylo také provedeno srovnání navržené metody IL-MA-SLE s konvenční extrakční metodou, která byla dříve popsána [279]. Stejně vzorky se stejnými podmínkami poměru l/s jako u navrhované metody byly třikrát extrahovány metodou UA-SLE s použitím methanolu a dále analyzovány pomocí HPLC-PDA za účelem získání průměrných koncentrací cílových flavonoidů. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 43 pro oba vzorky spolu s výsledky získanými s dalšími IL použitými s metodou MA-SLE. Obě metody poskytly podobné absolutní složení rutinu, kvercetin a apigeninu, ale v různých koncentracích. Obrázek 44 zahrnuje chromatogramy extraktů *Passiflora sp.* PS032 získaných metodou IL-MA-SLE-HPLC-PDA s $[C_{10}Gu^+][Cl^-]$ ve srovnání s metodou UA-SLE-HPLC-PDA, které ukazují rozdíly v koncentracích flavonoidů. Konvenční metoda UA-SLE poskytla mnohem nižší koncentrace analytů, s výjimkou apigeninu u *Passiflorora sp.*, u kterého byly výsledky mírně vyšší. Obecně lze říci, že ve srovnání se studii uvedenými v literatuře, které se týkají jiných extrakčních metod pro izolaci flavonoidů z rostlinného materiálu, vykazovala navrhovaná metoda s iontovou kapalinou vyšší nebo srovnatelné výtěžky rutinu, kvercetin a apigeninu [255, 259].

Kromě rozdílů ve výtěžnosti extrakce obou metod je důležité zdůraznit další výhody navrhované metody IL-MA-SLE oproti metodě UA-SLE používané pro stejnou aplikaci. Navrhovaná metoda má méně kroků, jak je uvedeno na Obrázku 40, díky čemuž je proces méně zdoluhavý a rychlejší díky eliminaci kroku čištění. Předchozí studie prokázala, že použití vodných roztoků iontových kapalin jako extrakčního rozpouštědla zabraňuje koextrakci zelených chlorofylů, které mohou snížit účinnost analytické kolony [82]. Celá metoda IL-MA-SLE vyžaduje méně času, 15 minut oproti více než 45 minutám u metody UA-SLE. MW záření navíc způsobuje zahřívání vzorku, které usnadňuje rozrušení rostlinné matrice a umožňuje rychlejší difúzi cílových sloučenin do rozpouštědla [280, 281]. Další důležitou výhodou metody navržené v této studii ve srovnání s konvenčnější metodou a předchozí studií [82] je použití

iontové kapaliny s nízkou cytotoxicitou oproti organickému rozpouštědлу v metodě UA-SLE a IL imidazoliového typu v předchozí metodě MA-SLE [82].

Flavonoidy z ovoce byly již dříve stanoveny různými extrakčními metodami s použitím různých extrakčních rozpouštědel, včetně IL na bázi imidazolu v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s reverzní fází a UV detektorem [261-264] nebo hmotnostním spektrometrem [72, 253]. Extrakce rozpouštědly s použitím rozpouštědel s různou polaritou, jako je ethanol [72, 253, 259], methanol [20, 255] nebo chloroform [255], jsou jednou z nejpoužívanějších extrakčních technik pro izolaci flavonoidů z ovoce. Další možností extrakce flavonoidů z ovoce je konvenční Soxhletova extrakce, která je však mnohem časově a energeticky náročnější [251, 263]. Ve všech případech jsou LOD v $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, avšak metoda navržená v této studii dosahuje nižších LOD. Navržená metoda navíc využívá IL s nízkou toxicitou a vyžaduje relativně nízké nebo podobné objemy roztoků IL jako extrakčního rozpouštědla ve srovnání s jinými dříve publikovanými metodami (~500-2500 μl na 50 mg rostlinného materiálu) [261-264]. Metoda navržená v této studii je tedy pro extrakci flavonoidů z rostlin mnohem účinnější a ve srovnání s ostatními metodami je více ekologická, a to především z hlediska toxicity extrakčního média a spotřeby času a energie.







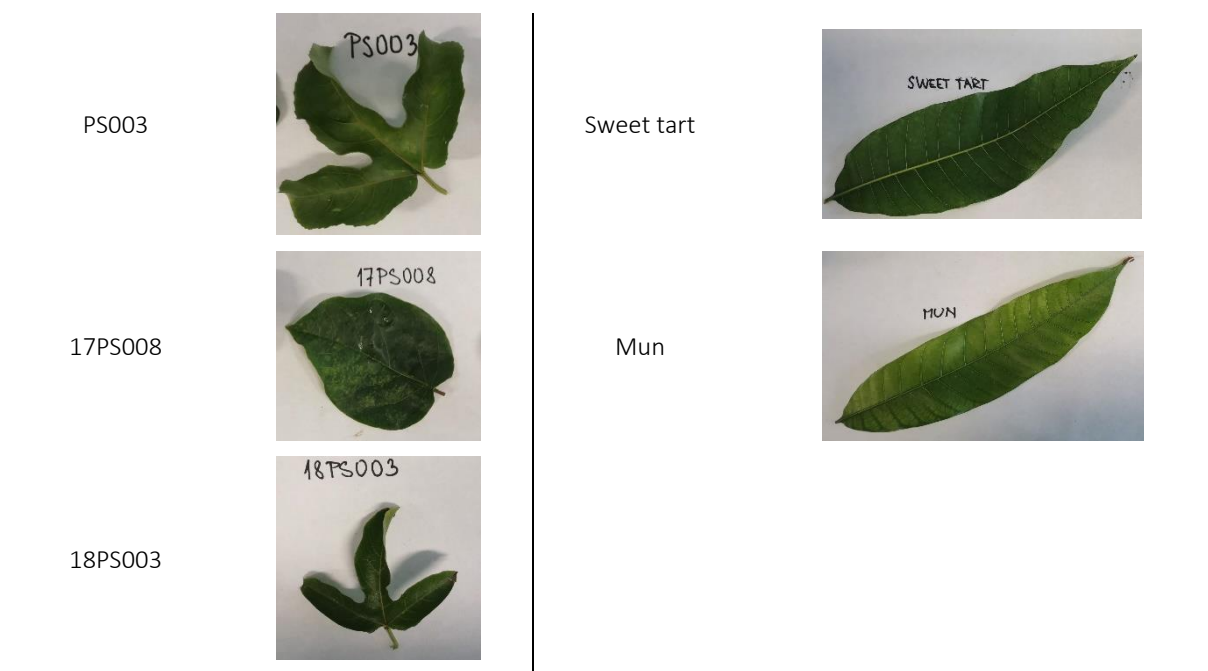
Obrázek 44 Ukázka chromatogramu získaného analýzou extraktu *Passiflora sp.* PS032 získaného metodou IL-MA-SLE-HPLC-PDA s [C₁₀Gu⁺][Cl⁻] v porovnání s chromatogramem získaným analýzou extraktu též rostliny metodou UA-SLE-HPLC-PDA.

9.3.4 Analýza rostlinných extraktů při optimálních podmínkách metody IL-MA-SLE-HPLC-PDA

Optimalizovaná metoda IL-MA-SLE-HPLC-PDA byla použita ke stanovení tří flavonoidů ve vzorcích listů plodů *Passiflora sp.* a *Mangifera sp.* Tabulka 25 obsahuje identifikaci vzorků spolu s obrázky anatomie listů. Původně bylo uvažováno o sedmi analytech (rutin, kvercetin, apigenin, myricetin, kaempferol, naringinin a kyselina ellagová), ale v obou vzorcích byly zjištěny pouze tři dříve studované flavonoidy. Poté byly všechny vzorky extrahovány pomocí $[C10Gu^+][Cl^-]$ za optimálních podmínek získaných a popsanych v kapitole 9.3.1. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 26. Rutin, kvercetin a apigenin byly zjištěny ve všech typech vzorků listů mučenky a manga. Koncentrace rutinu, kvercetinu a apigeninu se u všech typů listů mučenky pohybovala v rozmezí od 2,35 do 6,15 $mg \cdot g^{-1}$ pro rutin, od 0,021 do 0,090 $mg \cdot g^{-1}$ pro kvercetin a od 0,006 do 0,017 $mg \cdot g^{-1}$ pro apigenin. Také koncentrace rutinu, kvercetinu a apigeninu se u všech typů listů manga pohybovala od 0,082 do 0,239 $mg \cdot g^{-1}$ pro rutin, od 0,006 do 0,044 $mg \cdot g^{-1}$ pro kvercetin a od 0,007 do 0,015 $mg \cdot g^{-1}$ pro apigenin. Je zřejmé, že koncentrace flavonoidů se mezi jednotlivými typy jednoho druhu ovoce liší. Obsah fenolických látek v rostlinném extraktu je ovlivněn několika faktory, jako je prostředí (např. teplota, srážky, délka dne [282]), sklizeň (např. roční období, zeměpisná poloha, růstová fáze, denní doba sklizně [283-285]) a následné zpracování rostlinného materiálu (např. sušení [286, 287]).

Tabulka 25 Listy různých kultivarů *Passiflora sp.* a *Mangifera sp.* použité k extrakci a stanovení flavonoidů

Typ	Anatomie listu	Typ	Anatomie listu
<i>Passiflora sp.</i>		<i>Mangifera sp.</i>	
PS032		Gomera 1	
17PS009		Gomera 3	



Nejbohatším druhem *Passiflora sp.* na flavonoidy byl typ PS032, zatímco nejbohatším druhem *Mangifera sp.* na flavonoidy byl typ „Mun“. Extrakty z mučenky byly mnohem bohatší na rutin než extrakty z manga (30krát vyšší), zatímco obsah kvercetin a apigeninu byl v listech obou stromů velmi podobný. Mučenka PS032 byla ze všech mučenek nejbohatší na rutin, zatímco typ 17PS008 byl nejbohatší na kvercetin a apigenin. Extrakt z mučenky 18PS003 měl nejnižší koncentraci flavonoidů ze všech typů mučenky. Extrakty z manga typů Gomera 1 a 3 jsou si velmi podobné vzhledem ke stejnému původu (ostrov Gomera). Mango Sweet tart mělo nižší obsah flavonoidů ve srovnání s typem Sweet tart, ale vyšší ve srovnání s typy Gomera 1 a 3. Vzhledem k celkové zjištěné koncentraci flavonoidů vykazují listy *Passiflora sp.* velký potenciál k využití při zhodnocení tohoto vedlejšího produktu rostliny (např. jako přírodní antioxidant), zejména díky vysokému obsahu rutinu. Rutin byl dříve stanoven ve 3 druzích vzorků mučenek z Brazílie v koncentracích od 0,57 do 3,48 mg·g⁻¹ [259], což je ve srovnání s koncentracemi získanými v této studii podobné nebo mírně nižší. Kromě kvercetin a apigeninu, které byly stanoveny v této studii, bylo již dříve publikováno, že *Passiflora sp.* je bohatá také na orientin, isorientin, vitexin a isovitexin [73, 259]. El-Hawary a kol. [287] studovali obsah flavonoidů v listech manga pocházejícího z Egypta. Stanovili 9 flavonoidů v extraktech 8 druhů listů manga získaných macerací. Mimo jiné stanovili také rutin, kvercetin a apigenin v koncentracích od 0,67 do 6,99 mg·g⁻¹, od 0,04 do 0,14 mg·g⁻¹ a od 0,005 do 0,17 mg·g⁻¹. Koncentrace všech analytů byla vyšší než v extraktech získaných v této práci [287].

Tabulka 26 Koncentrace sledovaných analytů v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ získané navrženou metodou IL-MA-SLE-HPLC-PDA s využitím iontové kapaliny $[\text{C}_{10}\text{Gu}^+][\text{Cl}^-]$ extrakcí listů mučenky a manga

Typ	Rutin \pm SD ^a (RSD ^b) [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	Kvercetin \pm SD ^a (RSD ^b) [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	Apigenin \pm SD ^a (RSD ^b) [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]
<i>Passiflora sp.</i>			
PS032	6,15 \pm 0,50 (8,0 %)	0,031 \pm 0,002 (9,0 %)	0,006 \pm 0,000 (5,0 %)
17PS009	4,15 \pm 0,33 (8,0 %)	0,046 \pm 0,003 (7,0 %)	0,006 \pm 0,000 (0,5 %)
PS003	4,51 \pm 0,20 (5,0 %)	0,021 \pm 0,002 (9,0 %)	0,010 \pm 0,001 (8,0 %)
17PS008	2,59 \pm 0,18 (7,0 %)	0,090 \pm 0,002 (2,0 %)	0,017 \pm 0,000 (2,0 %)
18PS003	2,35 \pm 0,07 (3,0 %)	0,036 \pm 0,002 (6,0 %)	0,008 \pm 0,000 (6,5 %)
<i>Mangifera sp.</i>			
Sweet tart	0,163 \pm 0,002 (2,0 %)	0,031 \pm 0,001 (1,5 %)	0,015 \pm 0,001 (8,5 %)
Mun	0,239 \pm 0,001 (0,3 %)	0,044 \pm 0,001 (3,0 %)	0,011 \pm 0,001 (9,0 %)
Gomera 1	0,082 \pm 0,002 (2,0 %)	0,006 \pm 0,000 (1,7 %)	0,007 \pm 0,000 (1,2 %)
Gomera 3	0,082 \pm 0,001 (1,2 %)	0,011 \pm 0,000 (2,0 %)	0,008 \pm 0,000 (2,0 %)

^a Standardní směrodatná odchylka (n = 3)

^b Standardní relativní odchylka v procentech

9.4 Stanovení rutinu, kvercetinu a apigeninu v extraktech listů Kanárské byliny *Hypericum canariense* pomocí navržené optimalizované metody IL-MA-SLE-HPLC-PDA

V rámci popsaného výzkumu v kapitole 9, byla provedena také extrakce kanárské byliny *Hypericum canariense* s následnou analýzou a stanovením 3 flavonoidů – rutin, kvercetin a apigenin, pomocí optimalizované metody IL-MA-SLE-HPLC-PDA. Byl identifikován také flavonoid myricetin, avšak nebyla stanovena jeho koncentrace ve vzorcích. Následující data nebyla publikována v žádném odborném časopise a jsou stručně popsána v této dodatkové subkapitole. *Hypericum canariense* je léčivá bylina pocházející z Kanárských ostrovů, používána v přírodním lékařství zejména k léčbě mírných až středních depresí. Produkuje široké spektrum léčivých látek, zejména naftodianthrony (hypericin, pseudohypericin) floroglucinoly (hyperforin, adhyperforin), flavonoidy (hyperosid, rutin nebo kvercetin), xanthyony a esenciální oleje [288, 289]. Díky svému bohatému složení, které stojí za zkoumání, má *Hypericum canariense* také hojivé, antioxidační a antimikrobiální účinky [20].

Optimalizovaná metoda IL-MA-SLE-HPLC-PDA byla použita pro stanovení tří flavonoidů ve vzorcích listů *Hypericum canariense*. Lyofilizovaný vzorek listů byl extrahován 3× pomocí $[\text{C}_{10}\text{Gu}^+][\text{Cl}^-]$ za optimálních podmínek získaných a popsaných v kapitole 9.3.1. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 27. Kromě rutinu, kvercetinu a apigeninu, byl identifikován také myricetin ve všech třech extraktech, jak je zobrazeno na Obrázku 45. Z důvodu nedostatku standardu a času, nebyla stanovena jeho koncentrace ve vzorcích. Koncentrace rutinu ve vzorku byla $6,15 \pm 0,50 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, kvercetinu $0,031 \pm 0,002 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ a apigeninu $0,006 \pm 0,000 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Mnoho

literatury věnující se popisu fytochemického složení extraktů z *Hypericum canariense* není dostupné. Zorzetto a kol. [20] jako jediní popsali fytochemické složení extraktů 3 druhů rodu *Hypericum*, včetně *Hypericum canariense*, získaných konvenční Soxhletovou extrakcí (MeOH-acetone 1:1) s následnou analýzou HPLC-PDA. Identifikovali a stanovili v těchto extraktech celkem 5 flavonoidů – kyselinu chlorogenovou (3,19 mg·g⁻¹), rutin (1,70 mg·g⁻¹), hyperosid (0,26 mg·g⁻¹), isokvercitrin (0,91 mg·g⁻¹) a kvercetin (0,18 mg·g⁻¹). Rutin a kvercetin byl také identifikován v naší studii, navíc s myricetinem a apigeninem. Koncentrace rutinu v porovnání se studií Zorzetto a kol. byla vyšší, zatímco obsah kvercetinu byl nižší. Odlišné složení extraktů bude způsobeno rozdílnou metodou použitou k extrakci bioaktivních sloučenin z rostlinného materiálu. Přestože oba vzorky *Hypericum canariense* byly nasbírány na Tenerife (Kanárské ostrovy), avšak v jinou roční dobu, je možné, že složení je odlišné také díky tomuto faktoru, který má vliv na složení extraktů, jak již bylo popsáno dříve [286, 287, 290]. Mimo extrakci polárních sloučenin se skupina Zorzetto a kol. zaměřila také na destilaci esenciálních olejů z *Hypericum canariense* s následnou separací a analýzou GC-MS, kde identifikovali celkem 95 těkavých sloučenin. Z nichž největší zastoupení měly alkany (49,7 %), seskviterpeny (19,5 %) a monoterpeny (12,2 %); s hlavními složkami *n*-nonan (44,3 %), karyofylen (7,9 %) a β -pinen (7,7 %) [20].

Tabulka 27 Koncentrace sledovaných analytů v mg·g⁻¹ získané navrženou metodou IL-MA-SLE-HPLC-PDA s využitím iontové kapaliny [C₁₀Gu⁺][Cl⁻] extrakcí listů *Hypericum canariense*

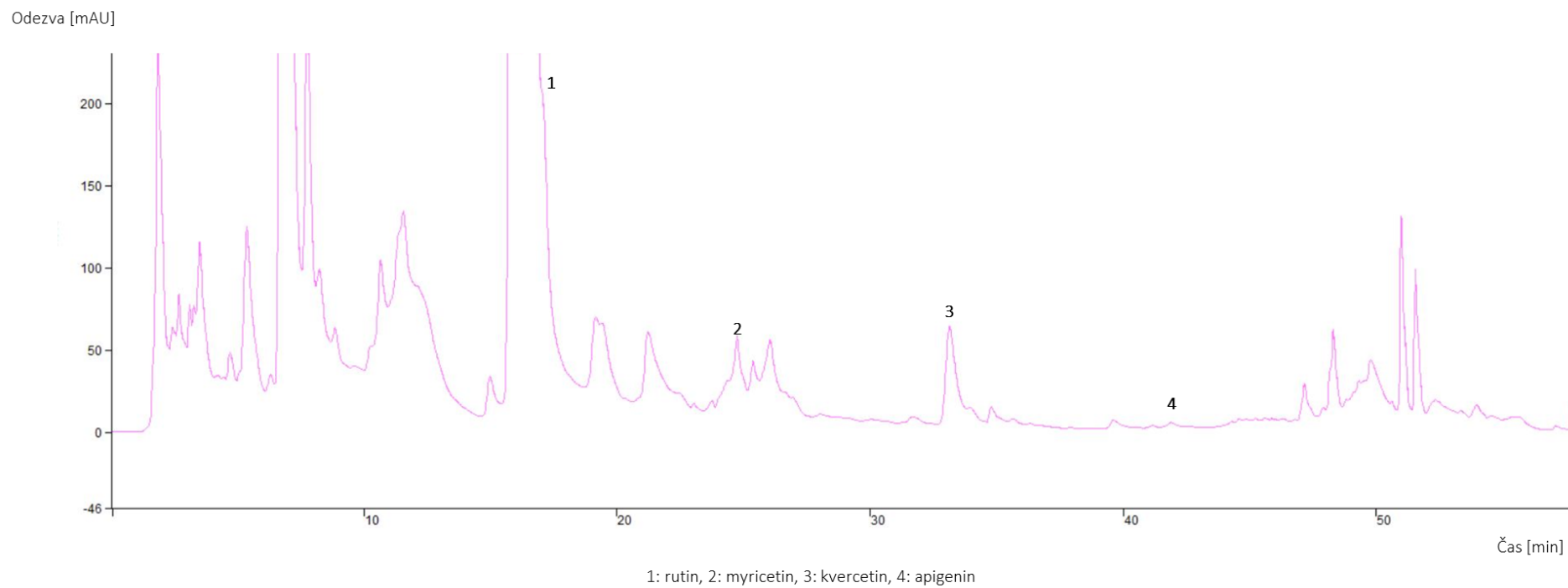
Analyt	Rutin \pm SD ^a (RSD ^b)	Kvercetin \pm SD ^a (RSD ^b)	Apigenin \pm SD ^a (RSD ^b)
Koncentrace [mg·g ⁻¹]	6,15 \pm 0,50 (8,0 %)	0,031 \pm 0,002 (9,0 %)	0,006 \pm 0,000 (5,0 %)

^a Standardní směrodatná odchylka (n = 3)

^b Standardní relativní odchylka v procentech

Lze říct, že vyvinutá metoda použitá k extrakci flavonoidů z *Hypericum canariense* je minimálně stejně účinná jako konvenční Soxhletova extrakce použita ve studii Zorzetto a kol. [20]. Jako hlavní výhodu lze zmínit její rychlost, účinnost, a především ekologičnost vůči konvenčním extrakčním metodám využívajících organická rozpouštědla. Vzhledem k nedostatku literatury věnující se extrakci bioaktivních látek z *Hypericum canariense*, není možné diskusi více rozvést a porovnat tak výsledky s jinými dosaženými. Extrakty získané z *Hypericum canariense* rozhodně stojí za další zkoumání díky jejich bohatému složení a blahodárným účinkům této byliny na lidský organismus.

IL-MA-SLE [C10Gu⁺][Cl⁻]
Třezalka kanárská



Obrázek 45 Ukázka chromatogramu získaného analýzou extraktu třezalky kanárské získaného metodou IL-MA-SLE-HPLC-PDA s [C10Gu⁺][Cl⁻]

9.5 Shrnutí

Šest povrchově aktivních IL obsahujících různé kationtové části (IL imidazolového, guanidiniového a pyridiniového typu) bylo použito v metodě MA-SLE v kombinaci s HPLC-PDA s cílem vyhodnotit vliv struktury a složení IL na účinnost extrakce vůči flavonoidům. Bylo prokázáno, že struktura iontové kapaliny má významný vliv na účinnost extrakce cílových analytů, spolu s původem rostlinného materiálu, který byl rovněž důležitým faktorem, který je třeba vzít v úvahu při hodnocení jejich účinnosti. Bylo zjištěno, že čím delší je délka alkylového řetězce iontové kapaliny v rámci stejného kationtového jádra, tím lepší je účinnost extrakce pro všechny analyty. $[C_{16}C_4Im^+][Br^-]$ a $[C_{10}Gu^+][Cl^-]$ byly nejúčinnějšími extrakčními činidly ve srovnání s ostatními hodnocenými IL pro *Passiflora sp.* zatímco $[C_{16}C_4Im^+][Br^-]$ a $[(C_8Im)_3Bn^+][3Br^-]$ byly nejúčinnějšími extrakčními činidly pro *Mangifera sp.* Všechny tři tyto IL poskytly podobné výsledky, ale s cílem zlepšit udržitelnost metody byla jako optimální extrakční iontová kapalina vybrána $[C_{10}Gu^+][Cl^-]$ vzhledem k její nízké cytotoxicitě. Kromě toho, že je metoda MA-SLE jednodušší a rychlejší, je také ekologická díky použití MW energie a iontové kapaliny na bázi guanidinia s nízkou cytotoxicitou. Tyto zmíněné vlastnosti spolu s vysokou účinností extrakce dosaženou v celé metodě jsou hlavními výhodami navrhované metodiky ve srovnání s metodou UA-SLE využívající jako extrakční médium methanol. Nakonec byly pomocí navržené metody stanoveny 3 flavonoidy v 5 různých kultivarech *Passiflora sp.*, 4 různých druzích *Mangifera sp.* a 1 druhu byliny *Hypericum canariense*. Koncentrace flavonoidů se u listů ovoce i byliny lišily, přičemž *Passiflora sp.* měla nejvyšší obsah flavonoidů. Kromě toho bylo dosaženo rozdílného obsahu flavonoidů v extraktech mezi všemi odrůdami u jednotlivých druhů plodů, což nebylo tak významné, ale přesto pozorovatelné.

Závěr

Přírodní extrakty s obsahem bioaktivních látek se v posledních letech těší velké oblibě. Díky antimikrobiálním a antioxidačním vlastnostem bioaktivních látek obsažených v rostlinných extraktech je vnímán jejich velký potenciál v léčbě různých onemocnění a současně také potenciál využití extraktů ke konzervaci potravin. Využití rostlinných extraktů je velice výhodné, neboť jejich výroba je poměrně levná, rychlá a jednoduchá, například v porovnání se syntetickými léčivy. Navíc dnešní společnost produkuje mnoho organického odpadu, jako jsou slupky, listy a podobné dále nevyužité části rostlin, které by mohly být využívány právě pro výrobu přírodních extraktů, protože v těchto částech rostlin je mnoho prospěšných bioaktivních látek, které mohou být dále použity jako přírodní léčiva či antioxidanty. Je nutné zmínit, že jednoduchost extrakce bioaktivních sloučenin může mít také negativní efekt a tím je poměrně jednoduchá výroba drog a jejich užívání, neboť stejně jako může být extrakt velmi prospěšný a užitečný pro společnost, může být současně i nebezpečný.

V této disertační práci byl shrnut přehled několika současných trendů ale i tradičních postupů v extrakčních metodách používaných k izolaci rostlinných extraktů, které jsou popsány v teoretické části spolu s jejich analýzou a identifikací pomocí chromatografických metod. Současně se v experimentální části podařilo izolovat a analyzovat extrakty z 11 rostlinných matric s různým původem různými extrakčními metodami. Byly izolovány a analyzovány hydroláty ze 4 různých bylin používaných v České republice a esenciální oleje ze 4 bylin používaných v Asijské kuchyni pomocí hydrodestilace, respektive destilace vodní parou jakožto tradičního zástupce extrakce bioaktivních látek z rostlin. Dále byly získány a analyzovány extrakty ze 2 druhů listů ovocných stromů a jejich několika kultivarů a jedné byliny pocházejících z Kanárských ostrovů pomocí extrakce iontovou kapalinou jakožto moderního zástupce extrakce bioaktivních látek z rostlin. Během celého výzkumu byl kladen důraz na zelenost použitých extrakčních metod a co nejmenší ekologickou zátěž. Pro 8 z 11 rostlinných matric byla navíc vyhodnocena také antimikrobiální aktivita získaných extraktů a většina z nich vykazovala výborné antimikrobiální účinky s ohledem na jejich chemické složení. Pro 4 matrice byla zkoumána antimikrobiální aktivita extraktů jak v kapalně, tak v plynné fázi a přinesla nové dosud nepublikované poznatky. V tomto ohledu disertační práce přináší náhled a nové informace o zkoumaných matricích a jejich extraktech, ale také přináší rozšířené poznatky o extrakci s použitím iontových kapalin. S ohledem na výše popsané, disertační práce naplnila stanovené cíle.

Výsledky výzkumu byly publikovány ve 4 publikacích v zahraničních impaktovaných časopisech, z nichž jedna vznikla při zahraniční spolupráci díky programu Erasmus+.

Literatura

1. Swami, S., a kol., *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. 2008: str. 200-66.
2. Ramawat, K.G. a J. M. Mérillon, *Bioactive molecules and medicinal plants*. 2008: Springer.
3. Vickers, A. a C.J.B. Zollman, *Herbal medicine*. 1999. **319**(7216): str. 1050-1053.
4. Ali, M.C., a kol., *Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction*. *Talanta*, 2019. **203**: str. 16-22.
5. Azib, L., a kol., *Pistacia lentiscus* L. leaves extract and its major phenolic compounds reverse aluminium-induced neurotoxicity in mice. *Industrial Crops and Products*, 2019. **137**: str. 576-584.
6. Chen, L.F., a kol., *Antiviral activity of ethanol extract of *Lophatherum gracile* against respiratory syncytial virus infection*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019. **242**.
7. Lagzian, M., a kol., *Identification of new promising plant-based lead compounds for inhibition of prokaryotic replicative DNA polymerases: combination of in silico and in vitro studies*. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2019. **37**(16): str. 4222-4237.
8. Mwinga, J.L., a kol., *In vitro antimicrobial effects of *Hypoxis hemerocallidea* against six pathogens with dermatological relevance and its phytochemical characterization and cytotoxicity evaluation*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019. **242**.
9. Zengin, G., a kol., *Chemical profiling of *Centaurea bornmuelleri* Hausskn. aerial parts by HPLC-MS/MS and their pharmaceutical effects: From nature to novel perspectives*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019. **174**: str. 406-413.
10. Ahmad, I., F. Aqil, a M. Owais, *Modern phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs*. 2006: John Wiley & Sons.
11. Danh, L.T., a kol., *Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils extracted by supercritical CO₂, hexane and hydrodistillation*. *Food and Bioprocess Technology*, 2013. **6**(12): str. 3481-3489.
12. Houdkova, M., a kol., *Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay*. *Fitoterapia*, 2017. **118**: str. 56-62.

13. Reyes-Jurado, F., a kol., *Antimicrobial activity of Mexican oregano (Lippia berlandieri), thyme (Thymus vulgaris), and mustard (Brassica nigra) essential oils in gaseous phase*. Industrial Crops and Products, 2019. **131**: str. 90-95.
14. Djemaa, F.G.B., a kol., *Antioxidant and wound healing activity of Lavandula aspic L. ointment*. Journal of Tissue Viability, 2016. **25**(4): str. 193-200.
15. Bakkali, F., a kol., *Biological effects of essential oils—a review*. Food and chemical toxicology, 2008. **46**(2): str. 446-475.
16. Ali, B., a kol., *Essential oils used in aromatherapy: A systemic review*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2015. **5**(8): str. 601-611.
17. Pengelly, A., *Constituents of medicinal plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine*. 2004: CABI Pub.
18. Baser, K.H.C. a G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. 2015, Boca Raton: CRC Press.
19. Rakersh Kumar, Y.C.T., *Training manual on extraction technology of natural dye and aroma therapy and cultivation value addition of medicinal plants*, F.R. Institute, Editor. 2011: Dehradun. str. 200.
20. Zorzetto, C., a kol., *Phytochemical analysis and in vitro biological activity of three Hypericum species from the Canary Islands (Hypericum reflexum, Hypericum canariense and Hypericum grandifolium)*. Fitoterapia, 2015. **100**: str. 95-109.
21. Hüsni, K., C. Başer, aF. Demirci, *Chemistry of Essential Oils*. 2007, Berlin: Springer 43-86.
22. Doran, A.L., a kol., *Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA*. Letters in Applied Microbiology, 2009. **48**(4): str. 387-392.
23. Lu, H.M., a kol., *Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of Houttuynia THUNB*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2006. **54**(7): str. 936-940.
24. Cushnie, T.P.T. a A.J. Lamb, *Antimicrobial activity of flavonoids*. 2005. **26**(5): str. 343-356.
25. García-Lafuente, A., a kol., *Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease*. 2009. **58**(9): str. 537-552.
26. Kim, H.P., a kol., *Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms*. 2004: str. 0411110005-0411110005.

27. Rice-Evans, C.A., a kol., *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. 1996. **20**(7): str. 933-956.
28. Korbelař, J., Z. Endris, a J. Krejřa, *Naše rostliny v lékařství*. 1974: Avicenum.
29. Mori, H. M., a kol., *Wound healing potential of lavender oil by acceleration of granulation and wound contraction through induction of TGF- β in a rat model*. BMC complementary and alternative medicine, 2016. **16**(1): str. 144.
30. Franco, L., a kol., *Both lavender fleur oil and unscented oil aromatherapy reduce preoperative anxiety in breast surgery patients: a randomized trial*. Journal of Clinical Anesthesia, 2016. **33**: str. 243-249.
31. Kim, N.S. a D.S. Lee, *Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from Lavandula species by gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography a, 2002. **982**(1): str. 31-47.
32. Pamplona-Roger, G.D., *Encyclopedia of medicinal plants*. 2005.
33. Jianu, C., a kol., *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (Lavandula angustifolia) and lavandin (Lavandula x intermedia) grown in Western Romania*. Int. J. Agric. Biol, 2013. **15**: str. 772-776.
34. Lesage-Meessen, L., a kol., *Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology*. Applied microbiology and biotechnology, 2015. **99**(8): str. 3375-3385.
35. Raut, J.S. a S.M. Karuppayil, *A status review on the medicinal properties of essential oils*. Industrial Crops and Products, 2014. **62**: str. 250-264.
36. Guan, W., a kol., *Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods*. Food Chemistry, 2007. **101**(4): str. 1558-1564.
37. Peter, K., *Handbook of herbs and spices*. 2006, Cambridge: Woodhead publishing.
38. de Oliveira, M.S., a kol., *Chemical composition and phytotoxic activity of clove (Syzygium aromaticum) essential oil obtained with supercritical CO₂*. Journal of Supercritical Fluids, 2016. **118**: str. 185-193.
39. Huang, X.W., a kol., *Chemical composition, antioxidant and the possible use as skin-care ingredient of clove oil (Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry) and citronella oil (Cymbopogon goeringii) from China*. Journal of Essential Oil Research, 2013. **25**(4): str. 315-323.
40. Veit, M., *Léřivá kosmetika z přírody*. 2015, Praha: Grada Publishing s.r.o. 200

41. Hammouda, F.M., a kol., *Evaluation Of The Essential Oil Of Foeniculum Vulgare Mill (Fennel) Fruits Extracted By Three Different Extraction Methods By Gc/Ms*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2014. **11**(2): str. 277-279.
42. Macku, J. a J.I. Krejča, *Atlas liecivych rastlin*. 1965.
43. Baby, K.C. a T.V. Ranganathan, *Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of fennel (Foeniculum vulgare) volatile oil*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2016. **8**: str. 248-256.
44. Caputo, L., a kol., *Laurus nobilis: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities*. Molecules, 2017. **22**(6).
45. Santoyo, S., a kol., *Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from Laurus nobilis L. Chemical and functional characterization*. European Food Research and Technology, 2006. **222**(5-6): str. 565.
46. Řebíčková, K., a kol., *Comparison of Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation of Laurus nobilis L*. Plant Foods for Human Nutrition, 2020.
47. Ozcan, B., a kol., *Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of Laurus nobilis seed oil*. 2010. **31**(5): str. 637-641.
48. Fidan, H., a kol., *Chemical composition and antimicrobial activity of Laurus nobilis L. essential oils from Bulgaria*. 2019. **24**(4): str. 804.
49. El, S.N., a kol., *Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils extracted from Laurus nobilis L. leaves by using solvent-free microwave and hydrodistillation*. 2014. **2014**.
50. Flamini, G., a kol., *Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of Laurus nobilis L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven*. Journal of Chromatography A, 2007. **1143**(1): str. 36-40.
51. Fu, J., a kol., *Houttuynia cordata Thunb: a review of phytochemistry and pharmacology and quality control*. 2013. **4**(03): str. 101.
52. Lu, H., a kol., *Anti-inflammatory effect of Houttuynia cordata injection*. 2006. **104**(1-2): str. 245-249.
53. Kim, I.S., a kol., *The inhibitory effect of Houttuynia cordata extract on stem cell factor-induced HMC-1 cell migration*. 2007. **112**(1): str. 90-95.

54. Hayashi, K., M. Kamiya, a T. Hayashi, *Virucidal effects of the steam distillate from Houttuynia cordata and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV*. 1995. **61**(03): str. 237-241.
55. Chang, J.S., a kol., *Antileukemic activity of Bidens pilosa L. var. minor (Blume) Sherff and Houttuynia cordata Thunb.* 2001. **29**(02): str. 303-312.
56. Ng, L.T., a kol., *Protective effect of Houttuynia cordata extract on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats*. 2007. **35**(03): str. 465-475.
57. Kim, S.K., a kol., *Cytotoxic alkaloids from Houttuynia cordata*. 2001. **24**(6): str. 518-521.
58. Ridzuan, P., a kol. *Antibacterial and antifungal properties of Persicaria odorata leaf against pathogenic bacteria and fungi*. in *The Open Conference Proceedings Journal*. 2013.
59. Shavandi, M.A., Z. Haddadian, a M.H.S. Ismail, *Eryngium foetidum L. Coriandrum sativum and Persicaria odorata L.: a review*. Journal of Asian Scientific Research, 2012. **2**(8): str. 410.
60. De Guzman, C. a J. Siemonsma, *Plant resources of South-East Asia*. Vol. 13. 1999: Backhuys Publ.
61. Kukongviriyapan, U., a kol., *Antioxidant and vascular protective activities of Cratoxylum formosum, Syzygium gratum and Limnophila aromatica*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007. **30**(4): str. 661-666.
62. Dai, D.N., a kol., *Chemical constituents of leaf essential oils of four Scrophulariaceae species grown in Vietnam*. Journal of Essential Oil Research, 2015. **27**(6): str. 481-486.
63. Houdkova, M., a kol., *In vitro growth-inhibitory effect of Cambodian essential oils against pneumonia causing bacteria in liquid and vapour phase and their toxicity to lung fibroblasts*. South African Journal of Botany, 2018. **118**: str. 85-97.
64. Tuntipopipat, S., C. Muangnoi, a M.L. Failla, *Anti-inflammatory activities of extracts of Thai spices and herbs with lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 murine macrophages*. 2009. **12**(6): str. 1213-1220.
65. Ernst, E., *Hypericum: the genus Hypericum*. 2003: CRC Press.
66. Öztürk, Y., a kol., *Hepatoprotective activity of Hypericum perforatum L. alcoholic extract in rodents*. 1992. **6**(1): str. 44-46.
67. Rabanal, R., a kol., *Antimicrobial studies on three species of Hypericum from the Canary Islands*. 2002. **81**(2): str. 287-292.

68. Couldwell, W.T., a kol., *A phase I/2 study of orally administered synthetic hypericin for treatment of recurrent malignant gliomas*. 2011. **117**(21): str. 4905-4915.
69. Shah, K., a kol., *Mangifera indica (mango)*. *Pharmacogn. Rev.*, 2010. **4**(7): str. 42.
70. Umamahesh, K., S.N. Sivudu, a O.V.S. Reddy, *Evaluation of antioxidant activity, total phenolics and total flavonoids in peels of five cultivars of mango (Mangifera indica) fruit*. *J. Med. Plants Stud.*, 2016. **4**(2): str. 200-203.
71. Kanwal, Q., a kol., *Flavonoids from mango leaves with antibacterial activity*. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2009. **74**(12): str. 1389-1399.
72. Sakalem, M.E., G. Negri, a R. Tabach, *Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the Passiflora genus*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 2012. **22**(6): str. 1219-1232.
73. Abourashed, E.A., J.R. Vanderplank, a I.A. Khan, *High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - I. Application to Passiflora flavonoids*. *Pharm. Biol.*, 2002. **40**(2): str. 81-91.
74. Abubakar, A.R. a M. Haque, *Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes*. 2020. **12**(1): str. 1.
75. Ameer, K., a kol., *Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review*. 2017. **16**(2): str. 295-315.
76. Mandal, V., Y. Mohan, a S.J.P. Hemalatha, *Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research*. 2007. **1**(1): str. 7-18.
77. Esclapez, M., a kol., *Ultrasound-assisted extraction of natural products*. 2011. **3**(2): str. 108-120.
78. Baser, K., a kol., *Microdistillation as a useful tool for the analysis of minute amounts of aromatic plant materials*. 2001. **37**(4): str. 336-338.
79. Pangarkar, V.G., *8 Microdistillation, Thermomicrodistillation and Molecular Distillation Techniques*. 2008: str. 129.
80. Jeannot, M.A., A. Przyjazny, a J.M. Kokosa, *Single drop microextraction—development, applications and future trends*. 2010. **1217**(16): str. 2326-2336.
81. Li, M., a kol., *Development of a novel hollow-fiber liquid-phase microextraction based on oil-in-salt and its comparison with conventional one*. 2017. **40**(14): str. 2941-2949.
82. Mastellone, G., a kol., *Sustainable Micro-Scale Extraction of Bioactive Phenolic Compounds from Vitis vinifera Leaves with Ionic Liquid-Based Surfactants*. *Molecules*, 2020. **25**(13): str. 3072.

83. Tang, B., a kol., *Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants*. 2012. **904**: str. 1-21.
84. Moučková, K., a kol., *Evaluation of Structurally Different Ionic Liquid-Based Surfactants in a Green Microwave-Assisted Extraction for the Flavonoids Profile Determination of Mangifera sp. and Passiflora sp. Leaves from Canary Islands*. 2020. **25**(20): str. 4734.
85. Nam, M.W., a kol., *Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from Flos sophorae*. *Green Chem.*, 2015. **17**(3): str. 1718-1727.
86. Zainal-Abidin, M.H., a kol., *New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review*. 2017. **979**: str. 1-23.
87. Bicchi, C., a kol., *Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted Arabica coffee and coffee brew*. 2002. **50**(3): str. 449-459.
88. Pardo-García, A.I., a kol., *Effect of eugenol and guaiacol application on tomato aroma composition determined by headspace stir bar sorptive extraction*. 2013. **93**(5): str. 1147-1155.
89. Kaya, M., a kol., *Analysis of Echinacea flower volatile constituents by HS-SPME-GC/MS using laboratory-prepared and commercial SPME fibers*. *Journal of Essential Oil Research*, 2019. **31**(2): str. 91-98.
90. Diaz-Maroto, M., M.S. Pérez-Coello, a M. Cabezudo, *Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile components of spices*. *Chromatographia*, 2002. **55**(11-12): str. 723-728.
91. Guerra-Abreu, L., a kol., *Coupling the extraction efficiency of imidazolium-based ionic liquid aggregates with solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry: application to polycyclic aromatic hydrocarbons in a certified reference sediment*. *J. Chromatogr. A*, 2008. **1214**(1-2): str. 23-29.
92. Mills, G.A. aV.J. Walker, *Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials*. 2000. **902**(1): str. 267-287.
93. Vas, G. a K. Vekey, *Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*. 2004. **39**(3): str. 233-254.
94. Zoccali, M., a kol., *Characterization of Limonoids in Citrus Essential Oils by Means of Supercritical Fluid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. *Food Analytical Methods*, 2018. **11**(11): str. 3257-3266.

95. Hatab, S., a kol., *Survival and Reduction of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in a Fresh Cold-Pressed Juice Treated with Antimicrobial Plant Extracts*. Journal of Food Science, 2016. **81**(8): str. M1987-M1995.
96. Ferhat, M.A., a kol., *Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation*. 2007. **22**(6): str. 494-504.
97. Singh, J., *Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants*. 2008. **67**: str. 32-35.
98. Kowalski, R., J.J.F. Wawrzykowski, *Effect of ultrasound-assisted maceration on the quality of oil from the leaves of thyme Thymus vulgaris L*. 2009. **24**(2): str. 69-74.
99. Masango, P., *Cleaner production of essential oils by steam distillation*. Journal of Cleaner Production, 2005. **13**(8): str. 833-839.
100. Vichi, S., *Extraction techniques for the analysis of virgin olive oil aroma*, in *Olives and olive oil in health and disease prevention*. 2010, Elsevier. str. 615-623.
101. Chemat, F., a kol., *Extraction//steam distillation*. 2015: str. 1-12.
102. Saoud, A.A., a kol., *Study of eucalyptus essential oil acquired by microwave extraction*, in *WOCMAP III: Quality, Efficacy, Safety, Processing and Trade in MAPs*, E. Brovelli, a kol., Editors. 2005. str. 173-179.
103. Aziz, Z.A.A., a kol., *Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review*. Current Drug Metabolism, 2018. **19**(13): str. 1100-1110.
104. Cassel, E., a kol., *Steam distillation modeling for essential oil extraction process*. Industrial crops and products, 2009. **29**(1): str. 171-176.
105. Sowbhagya, H., a kol., *Enzyme-assisted extraction of volatiles from cumin (Cuminum cyminum L.) seeds*. Food chemistry, 2011. **127**(4): str. 1856-1861.
106. Sowbhagya, H. a V. Chitra, *Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials*. Critical reviews in food science and nutrition, 2010. **50**(2): str. 146-161.
107. Sowbhagya, H., a kol., *Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil*. Food Chemistry, 2009. **113**(4): str. 1234-1238.
108. Filly, A., a kol., *Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers*. 2016. **19**(6): str. 707-717.

109. Chemat, F., a kol., *Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach*. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **555**(1): str. 157-160.
110. Chemat, F., a kol., *Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects*. *Molecules*, 2019. **24**(16).
111. Jiao, J., a kol., *Enzyme-assisted microwave hydro-distillation essential oil from Fructus forsythia, chemical constituents, and its antimicrobial and antioxidant activities*. *Food Chemistry*, 2012. **134**(1): str. 235-243.
112. Eikani, M.H., a kol., *Superheated Water Extraction of Lavandula Latifolia Medik Volatiles: Comparison with Conventional Techniques*. *Journal of Essential Oil Research*, 2008. **20**(6): str. 482-487.
113. Chemat, F., M. Abert-Vian, a X. Fernandez, *Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas*, in *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds*. 2012, Springer. str. 53-68.
114. Teo, C.C., a kol., *Pressurized hot water extraction (PHWE)*. 2010. **1217**(16): str. 2484-2494.
115. Ibañez, E., a kol., *Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants*. 2003. **51**(2): str. 375-382.
116. Gamiz-Gracia, L. a M.L.J.T. De Castro, *Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques*. 2000. **51**(6): str. 1179-1185.
117. Essien, S.O., a kol., *Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials*. 2020. **97**: str. 156-169.
118. Jayawardena, B. a R.M. Smith, *Superheated water extraction of essential oils from Cinnamomum zeylanicum (L.)*. 2010. **21**(5): str. 470-472.
119. Opekar, F., a kol., *Základní analytická chemie*. UK, Karolinum, Praha. 2010. 203 str.
120. Kwiecinski, M., a kol., *SFE from Bidens pilosa Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity*. 2011. **56**(3): str. 243-248.
121. Mišić, D., a kol., *Antimicrobial activity of celery fruit isolates and SFE process modeling*. 2008. **42**(2): str. 148-152.
122. Roseiro, L.B., a kol., *Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (Ceratonia siliqua L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity*. 2013. **47**: str. 132-138.

123. Costa, P., a kol., *Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from Lavandula viridis L'Her.* Food Chemistry, 2012. **135**(1): str. 112-121.
124. Scodro, R.B.D., a kol., *A new benzoic acid derivative from Piper diospyrifolium and its anti-Mycobacterium tuberculosis activity.* Phytochemistry Letters, 2015. **11**: str. 18-23.
125. Santos, D.N.E., a kol., *Study of supercritical extraction from Brazilian cherry seeds (Eugenia uniflora L.) with bioactive compounds.* Food and Bioproducts Processing, 2015. **94**: str. 365-374.
126. Cor, D., a kol., *Two-stage extraction of antitumor, antioxidant and antiacetylcholinesterase compounds from Ganoderma lucidum fruiting body.* Journal of Supercritical Fluids, 2014. **91**: str. 53-60.
127. da Silva, R., T.A.P. Rocha-Santos, a A.C. Duarte, *Supercritical fluid extraction of bioactive compounds.* Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2016. **76**: str. 40-51.
128. Czaikoski, K., a kol., *Kinetics, composition and biological activity of Eupatorium intermedium flower extracts obtained from scCO₂ and compressed propane.* 2015. **97**: str. 145-153.
129. Reverchon, E., a kol., *Supercritical CO₂ extraction and fractionation of lavender essential oil and waxes.* 1995. **43**(6): str. 1654-1658.
130. Ullah, H., C.D. Wilfred, a M.S. Shaharun, *Ionic liquid-based extraction and separation trends of bioactive compounds from plant biomass.* Separation Science and Technology, 2019. **54**(4): str. 559-579.
131. Mocan, A., a kol., *Bioactive isoflavones from Pueraria lobata root and starch: Different extraction techniques and carbonic anhydrase inhibition.* 2018. **112**: str. 441-447.
132. Li, C., a kol., *Separation of the main flavonoids and essential oil from seabuckthorn leaves by ultrasonic/microwave-assisted simultaneous distillation extraction.* 2018. **5**(7): str. 180133.
133. Chang, C.W., a kol., *Rapid determination of oxindole alkaloids in cat's claw by HPLC using ionic liquid-based microwave-assisted extraction and silica monolithic column.* 2017. **31**(8): str. e3925.
134. Cláudio, A.F.M., a kol., *Enhanced extraction of caffeine from guarana seeds using aqueous solutions of ionic liquids.* 2013. **15**(7): str. 2002-2010.
135. Ressmann, A.K., a kol., *Surface-active ionic liquids for micellar extraction of piperine from black pepper.* 2013. **68**(10): str. 1129-1137.

136. Gu, H., a kol., *Application of ionic liquids in vacuum microwave-assisted extraction followed by macroporous resin isolation of three flavonoids rutin, hyperoside and hesperidin from Sorbus tianschanica leaves*. 2016. **1014**: str. 45-55.
137. Liu, Z., a kol., *Development of Brönsted acidic ionic liquid based microwave assisted method for simultaneous extraction of pectin and naringin from pomelo peels*. 2017. **172**: str. 326-337.
138. Pan, J., a kol., *Microwave-assisted extraction of lipids from microalgae using an ionic liquid solvent [BMIM][HSO₄]*. 2016. **178**: str. 49-55.
139. Liu, Z., a kol., *Microwave-assisted method for simultaneous hydrolysis and extraction in obtaining ellagic acid, gallic acid and essential oil from Eucalyptus globulus leaves using Brönsted acidic ionic liquid [HO₃S (CH₂)₄mim] HSO₄*. 2016. **81**: str. 152-161.
140. Li, S., a kol., *Ionic-liquid-based ultrasound-assisted extraction of isoflavones from Belamcanda chinensis and subsequent screening and isolation of potential α -glucosidase inhibitors by ultrafiltration and semipreparative high-performance liquid chromatography*. 2017. **40**(12): str. 2565-2574.
141. Tan, Z., a kol., *Extraction, preconcentration and isolation of flavonoids from Apocynum venetum L. Leaves using ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction coupled with an aqueous biphasic system*. 2016. **21**(3): str. 262.
142. Yang, L., a kol., *Ultrasound-assisted extraction of the three terpenoid indole alkaloids vindoline, catharanthine and vinblastine from Catharanthus roseus using ionic liquid aqueous solutions*. 2011. **172**(2-3): str. 705-712.
143. Chowdhury, S.A., R. Vijayaraghavan, a D. MacFarlane, *Distillable ionic liquid extraction of tannins from plant materials*. 2010. **12**(6): str. 1023-1028.
144. Yang, C., J. Wang, a D. Li, *Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: a review*. 2013. **799**: str. 8-22.
145. Ghambarian, M., Y. Yamini, a A. Esrafil, *Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications*. 2012. **177**(3-4): str. 271-294.
146. Zgoła-Grześkowiak, A. a T. Grześkowiak, *Dispersive liquid-liquid microextraction*. 2011. **30**(9): str. 1382-1399.
147. Kataoka, H., *Current developments and future trends in solid-phase microextraction techniques for pharmaceutical and biomedical analyses*. 2011. **27**(9): str. 893-893.
148. Ouyang, G. a R. Jiang, *Solid phase microextraction: recent developments and applications*. 2016: Springer.

149. Liu, H.T., a kol., *Simultaneous determination of Phytohormones in plant extracts using SPME and HPLC*. *Chromatographia*, 2007. **66**(7-8): str. 515-520.
150. Ghiasvand, A., a kol., *A solid-phase microextraction platinized stainless steel fiber coated with a multiwalled carbon nanotube-polyaniline nanocomposite film for the extraction of thymol and carvacrol in medicinal plants and honey*. *Journal of Chromatography A*, 2015. **1406**: str. 87-93.
151. Kechagia, M., M. Kissoudi, a V.F. Samanidou, *Stir-bar Sorptive Extraction for Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*. 2019: str. 152-162.
152. Abdel-Rehim, M., *Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial*. 2011. **701**(2): str. 119-128.
153. Arabi, M., M. Ghaedi, a A.J. Ostovan, *Synthesis and application of in-situ molecularly imprinted silica monolithic in pipette-tip solid-phase microextraction for the separation and determination of gallic acid in orange juice samples*. 2017. **1048**: str. 102-110.
154. Tholl, D., a kol., *Practical approaches to plant volatile analysis*. 2006. **45**(4): str. 540-560.
155. Lyczko, J., a kol., *HS-SPME Analysis of True Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) Leaves Treated by Various Drying Methods*. *Molecules*, 2019. **24**(4).
156. Yujian, L., a kol., *Stir Bar Sorptive Extraction Technology*. 2020. **32**(9): str. 1334.
157. David, F. a P.J. Sandra, *Stir bar sorptive extraction for trace analysis*. 2007. **1152**(1-2): str. 54-69.
158. Vararu, F., a kol., *Grape musts differentiation based on selected aroma compounds using SBSE-GC-MS and statistical analysis*. *Vitis*, 2015. **54**(2): str. 97-105.
159. Abdel-Rehim, M.J., *Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis*. 2010. **1217**(16): str. 2569-2580.
160. Moein, M.M., A. Abdel-Rehim, a M. Abdel-Rehim, *Microextraction by packed sorbent (MEPS)*. 2015. **67**: str. 34-44.
161. Mercolini, L., a kol., *Analytical profiling of bioactive phenolic compounds in argan (*Argania spinosa*) leaves by combined microextraction by packed sorbent (MEPS) and LC-DAD-MS/MS*. *Phytochemical Analysis*, 2016. **27**(1): str. 41-49.
162. Psillakis, E. a N. Kalogerakis, *Developments in liquid-phase microextraction*. 2003. **22**(9): str. 565-574.
163. Sarafraz-Yazdi, A. a A. Amiri, *Liquid-phase microextraction*. 2010. **29**(1): str. 1-14.
164. Jeannot, M.A. a F.F. Cantwell, *Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle*. 1997. **69**(2): str. 235-239.

165. Psillakis, E. a N. Kalogerakis, *Developments in single-drop microextraction*. 2002. **21**(1): str. 54-64.
166. Xiao, Q., a kol., *Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus pesticides in water and fruit juice with gas chromatography-flame photometric detection*. 2006. **69**(4): str. 848-855.
167. Tang, S., a kol., *Single-drop microextraction*. 2018. **108**: str. 306-313.
168. Moradi, M., a kol., *Comparison of Headspace Solid-phase Microextraction, Headspace Single-drop Microextraction and Hydrodistillation for Chemical Screening of Volatiles in Myrtus Communis L.* *Phytochemical Analysis*, 2012. **23**(4): str. 379-386.
169. Meira, C.L.C., a kol., *Application of principal component analysis for the evaluation of the chemical constituents of Mimosa tenuiflora methanolic extract by DLLME/GC-MS*. *Microchemical Journal*, 2020. **152**.
170. Hadjmohammadi, M., H. Karimiyan, a V. Sharifi, *Hollow fibre-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of flavonoids in Echinophora platyloba DC. and Mentha piperita*. *Food Chemistry*, 2013. **141**(2): str. 731-735.
171. Kocúrová, L., a kol., *Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review*. 2012. **102**: str. 11-17.
172. Pallado, P., a kol., *Gas chromatography/mass spectrometry in aroma chemistry: a comparison of essential oils and flavours extracted by classical and supercritical techniques*. *Rapid communications in mass spectrometry*, 1997. **11**(12): str. 1335-1341.
173. Jurkova, M., a kol., *New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials. Part 3. Comparison of HPLC and UHPLC determination of alpha-and beta-acids*. *Kvasny Prumysl (Czech Republic)*, 2012.
174. Ševčík, J.G., *Plynová chromatografie a její aplikace v organické analýze*. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*, 2002. **1**: str. 103-150.
175. Méndez-Tovar, I., a kol., *By-product of Lavandula latifolia essential oil distillation as source of antioxidants*. *journal of food and drug analysis*, 2015. **23**(2): str. 225-233.
176. Zheljazkov, V.D., a kol., *Distillation time effect on lavender essential oil yield and composition*. *Journal of oleo science*, 2013. **62**(4): str. 195-199.
177. Holčapek, M. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze*. [citováno 2021]; Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>.
178. McLafferty, F.W., *Mass spectrometry of organic ions*. 2012: Elsevier.

179. Linstrom, P.J. a W.G. Mallard, *The NIST Chemistry WebBook: A chemical data resource on the internet*. Journal of Chemical & Engineering Data, 2001. **46**(5): str. 1059-1063.
180. Adorjan, B. a G. Buchbauer, *Biological properties of essential oils: an updated review*. Flavour and Fragrance Journal, 2010. **25**(6): str. 407-426.
181. de Castilho, R., a kol., *Ionic fragmentation of a natural product, limonene (C₁₀H₁₆), following core [C 1s] photoionization*. Journal of electron spectroscopy and related phenomena, 2007. **155**(1-3): str. 77-80.
182. Harris, D., S. McKinnon, a R.K. Boyd, *The origins of the base peak in the electron impact spectrum of limonene*. Organic Mass Spectrometry, 1979. **14**(5): str. 265-272.
183. Wei, Z., a kol., *Ionic liquids-based microwave-assisted extraction of active components from pigeon pea leaves for quantitative analysis*. 2013. **102**: str. 75-81.
184. Yuan, J., a kol., *Multiple responses optimization of ultrasonic-assisted extraction by response surface methodology (RSM) for rapid analysis of bioactive compounds in the flower head of Chrysanthemum morifolium Ramat*. Ind. Crop. Prod., 2015. **74**: str. 192-199.
185. Lozano-Sánchez, J., a kol., *Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, in *Modern Techniques for Food Authentication*. 2018, Elsevier. str. 459-526.
186. Jimenez-Sanchez, C., a kol., *Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice processing. Part 2: Effect on composition, phytochemical content, and physicochemical, rheological, and organoleptic properties of fruit juices*. Critical reviews in food science and nutrition, 2017. **57**(3): str. 637-652.
187. Balouiri, M., M. Sadiki, a S.K. Ibensouda, *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016. **6**(2): str. 71-79.
188. Sieniawska, E., a kol., *Natural terpenes influence the activity of antibiotics against isolated Mycobacterium tuberculosis*. Medical Principles and Practice, 2017. **26**(2): str. 108-112.
189. Fisher, B., R.P. Harvey, a P.C. Champe, *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology (Lippincott's Illustrated Reviews Series)*. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-7817-8215-5, 2007.
190. Netopilova, M., a kol., *Evaluation of in vitro growth-inhibitory effect of carvacrol and thymol combination against Staphylococcus aureus in liquid and vapour phase using new broth volatilization checkerboard method*. Fitoterapia, 2018. **129**: str. 185-190.

191. Houdkova, M., a kol., *Evaluation of Antipneumonic Effect of Philippine Essential Oils Using Broth Microdilution Volatilization Method and Their Lung Fibroblasts Toxicity*. Natural Product Communications, 2018. **13**(8): str. 1059-1066.
192. Turek, C. a F.C. Stintzing, *Stability of Essential Oils: A Review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2013. **12**(1): str. 40-53.
193. Chlodwig, F. a N. Johannes, *Handbook of Essential Oils*. 2015, CRC Press Boca Raton, FL, USA:.
194. Mota, A.S., a kol., *Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of Portuguese Foeniculum vulgare fruits*. 2015. **10**(4): str. 673 - 676.
195. Pouryousef, M.J., *Variation in the essential oil constituents in indigenous populations of Foeniculum vulgare var. vulgare from different locations of Iran*. 2014. **26**(6): str. 441-445.
196. González-Rivera, J., a kol., *Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis*. 2016. **33**: str. 308-318.
197. Trombetta, D., a kol., *Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes*. 2005. **49**(6): str. 2474-2478.
198. Kwiatkowski, P., a kol., *The effect of fennel essential oil in combination with antibiotics on Staphylococcus aureus strains isolated from carriers*. 2017. **43**(7): str. 1544-1551.
199. Roby, M.H.H., a kol., *Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (Foeniculum vulgare L.) and chamomile (Matricaria chamomilla L.)*. 2013. **44**: str. 437-445.
200. de Oliveira, S.P., a kol., *Antimicrobial activity of essential oils extracted from clove and lemongrass against pathogenic bacteria isolated from bovine, swine and poultry feces*. 2019. **40**(5): str. 1937-1950.
201. Carson, C. a T.J. Riley, *Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of Melaleuca alternifolia*. 1995. **78**(3): str. 264-269.
202. de Souza, S.M., F. Delle Monache, a A. Smânia, *Antibacterial activity of coumarins*. 2005. **60**(9-10): str. 693-700.
203. Kayser, O. a H. Kolodziej, *Antibacterial activity of simple coumarins: structural requirements for biological activity*. 1999. **54**(3-4): str. 169-174.
204. Herman, A., K. Tambor, a A. Herman, *Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils*. Current microbiology, 2016. **72**(2): str. 165-172.

205. Vijayakumar, S., a kol., *Laurus nobilis leaf extract mediated green synthesis of ZnO nanoparticles: Characterization and biomedical applications*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016. **84**: str. 1213-1222.
206. Smigielski, K., a kol., *Biological properties and chemical composition of essential oils from flowers and aerial parts of lavender (Lavandula angustifolia)*. 2018. **21**(5): str. 1303-1314.
207. Lira, P.D.L., a kol., *Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (Laurus nobilis L.) from Argentina*. 2009. **30**(2): str. 259-264.
208. Kunicka-Styczynska, A., a kol., *Preservative activity of lavender hydrosols in moisturizing body gels*. Letters in Applied Microbiology, 2015. **60**(1): str. 27-32.
209. Cai, L.N. a C.D. Wu, *Compounds from Syzygium aromaticum possessing growth inhibitory activity against oral pathogens*. Journal of Natural Products, 1996. **59**(10): str. 987-990.
210. Kon, K.V. a M.K. Rai, *Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria (vol 10, pg 775, 2012)*. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2012. **10**(9): str. 1070-1070.
211. Feyaerts, A.F., a kol., *Assay and recommendations for the detection of vapour-phase-mediated antimicrobial activities*. Flavour and Fragrance Journal, 2017. **32**(5): str. 347-353.
212. Acs, K., a kol., *Essential Oils and Their Vapors as Potential Antibacterial Agents against Respiratory Tract Pathogens*. Natural Product Communications, 2016. **11**(11): str. 1709-1712.
213. Amat, S., D. Baines, a T.W. Alexander, *A vapour phase assay for evaluating the antimicrobial activities of essential oils against bovine respiratory bacterial pathogens*. Letters in Applied Microbiology, 2017. **65**(6): str. 489-495.
214. Santomauro, F., a kol., *Liquid and Vapor-Phase Activity of Artemisia annua Essential Oil against Pathogenic Malassezia spp*. Planta Medica, 2018. **84**(3): str. 160-167.
215. Laird, K. a C. Phillips, *Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?* Letters in Applied Microbiology, 2012. **54**(3): str. 169-174.
216. Azadbakht, E., a kol., *Development and structural characterization of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil: Potential as an antimicrobial carrier for packaging of sliced sausage*. Food Packaging and Shelf Life, 2018. **17**: str. 65-72.

217. Chen, C.W., a kol., *Properties, vapour-phase antimicrobial and antioxidant activities of active poly(vinyl alcohol) packaging films incorporated with clove oil*. Food Control, 2018. **88**: str. 105-112.
218. Silva, F. a F.C. Domingues, *Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017. **57**(1): str. 35-47.
219. Ji, H., a kol., *Synergistic antimicrobial activities of essential oil vapours against *Penicillium corylophilum* on a laboratory medium and beef jerky*. International Journal of Food Microbiology, 2019. **291**: str. 104-110.
220. Torpol, K., a kol., *Antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum* L.) and holy basil (*Ocimum sanctum* L.) essential oils applied by liquid vs. vapour phases*. International Journal of Food Science and Technology, 2018. **53**(9): str. 2119-2128.
221. Verma, R.S., a kol., *Chemical Composition and Allelopathic, Antibacterial, Antifungal, and Antiacetylcholinesterase Activity of Fish-mint (*Houttuynia cordata* Thunb.) from India*. Chemistry & biodiversity, 2017. **14**(10): str. e1700189.
222. Asakawa, Y., a kol., *Volatile Compounds from the Different Organs of *Houttuynia cordata* and *Litsea cubeba* (L. citriodora)*. Journal of oleo science, 2017. **66**(8): str. 889-895.
223. Pang, J., a kol., *Purification of *houltuynia cordata thunb.* essential oil using macroporous resin followed by microemulsion encapsulation to improve its safety and antiviral activity*. Molecules, 2017. **22**(2): str. 293.
224. Almarie, A., a kol., *Chemical composition and phytotoxicity of essential oils isolated from Malaysian plants*. Allelopathy Journal, 2016. **37**(1): str. 55-69.
225. Dũng, N.X., L. Van Hac, a P.A.J. Leclercq, *Volatile Constituents of the Aerial Parts of Vietnamese *Polygonum odoratum* L.* 1995. **7**(3): str. 339-340.
226. Hunter, M.V., a kol., *Composition of *Polygonum odoratum* Lour. from southern Australia*. 1997. **9**(5): str. 603-604.
227. Nazzaro, F., a kol., *Effect of essential oils on pathogenic bacteria*. 2013. **6**(12): str. 1451-1474.
228. Lis, A. aP. Banaszczak, *Chemical composition of the essential oils from flowers and leaves of *Phellodendron chinense* CK Schneid.* Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2010. **13**(1): str. 52-58.

229. Arnal-Schnebelen, B., a kol., *Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases*. International Journal of Aromatherapy, 2004. **14**(4): str. 192-197.
230. Fernandes, E.S., a kol., *Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of Cordia verbenacea*. European journal of pharmacology, 2007. **569**(3): str. 228-236.
231. Jang, H.I., K.J. Rhee, a Y.B. Eom, *Antibacterial and antibiofilm effects of α -humulene against Bacteroides fragilis*. Canadian Journal of Microbiology, 2020. **66**(999): str. 1-11.
232. Pichette, A., a kol., *Composition and antibacterial activity of Abies balsamea essential oil*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 2006. **20**(5): str. 371-373.
233. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 5322111. 2021 [citováno 2021 June 1]; Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caryophyllene>.
234. Ji, Y.B., a kol., *Study on Medicinal Plant Active Substances Extraction and Antibacterial Activity of Houttuynia Cordata*, in *1st International Global on Renewable Energy and Development*. 2017, Iop Publishing Ltd: Bristol.
235. Lu, H., a kol., *Variation in Chemical Composition and Antibacterial Activities of Essential Oils from Two Species of Houttuynia THUNB*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2006. **54**(7): str. 936-940.
236. Atteya, A.K.G., a kol., *Vegetative growth characters, yield and chemical composition of Anthriscus cerefolium plants grown under Egyptian conditions on different sowing dates*. Bioscience Research, 2020. **17**(1): str. 524-538.
237. Chizzola, R., *Composition of the Essential Oils from Anthriscus cerefolium var. trichocarpa and A. caucalis Growing Wild in the Urban Area of Vienna (Austria)*. Natural Product Communications, 2011. **6**(8): str. 1147-1150.
238. Kilic, O., *Essential Oil Composition of Aerial Parts of Two Anthriscus Pers. Species From Turkey*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2017. **20**(2): str. 591-596.
239. Bhuiyan, M.N.I., a kol., *Chemical constituents of essential oils from aerial parts of Adenosma capitatum and Limnophila aromatica*. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2010. **5**(1): str. 13-16.

240. Tucker, A.O., a kol., *Volatile leaf and stem oil of commercial Linnophila chinensis (Osbeck) Merrill ssp. aromatica (Lam.) Yamazaki (Scrophulariaceae)*. Journal of Essential Oil Research, 2002. **14**(3): str. 228-229.
241. Yingngam, B., a kol., *Optimization of the eco-friendly solvent-free microwave extraction of Linnophila aromatica essential oil*. Industrial Crops and Products, 2021. **165**.
242. Kivanc, M., *Antimicrobial activity of cortuk (echinophora-sibthorpiana guss) spice, its essential oil and methyl-eugenol*. Nahrung-Food, 1988. **32**(6): str. 635-637.
243. Pacheco-Fernández, I. a V. Pino, *Green solvents in analytical chemistry*. Curr. Opin. Green Sustainable Chem., 2019. **18**: str. 42-50.
244. Liu, X., a kol., *Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of quercetin from Chinese herbal medicine*. Anal. Methods, 2012. **4**(4): str. 1012-1018.
245. Liu, Z., a kol., *Microwave-assisted method for simultaneous hydrolysis and extraction in obtaining ellagic acid, gallic acid and essential oil from Eucalyptus globulus leaves using Brönsted acidic ionic liquid [HO₃S (CH₂)₄mim] HSO₄*. Ind. Crop. Prod., 2016. **81**: str. 152-161.
246. Passos, H., M.G. Freire, a J.A. Coutinho, *Ionic liquid solutions as extractive solvents for value-added compounds from biomass*. Green Chem., 2014. **16**(12): str. 4786-4815.
247. Zhao, C., a kol., *Optimization of ionic liquid based simultaneous ultrasonic-and microwave-assisted extraction of rutin and quercetin from leaves of velvetleaf (Abutilon theophrasti) by response surface methodology*. Sci. World J., 2014. **2014**.
248. Pacheco-Fernández, I., a kol., *Ionic liquid-based surfactants: a step forward*, in *Ionic Liquid Devices*. 2017. str. 53-78.
249. Villacís-Chiriboga, J., a kol., *Valorization of byproducts from tropical fruits: Extraction methodologies, applications, environmental, and economic assessment: A review (Part I: General overview of the byproducts, traditional biorefinery practices, and possible applications)*. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 2020. **19**(2): str. 405-447.
250. Altınok, E., a kol., *Valorisation of grape by-products as a bulking agent in soft candies: Effect of particle size*. LWT Food Sci. Technol., 2020. **118**: str. 108776.
251. Jangra, A. a B. Pawar, *Quantification of Flavonoids from different Parts of Grapefruit (Citrus x Paradisi) from different Extraction Methods*. JASFT, 2019. **6**(1): str. 75-78.
252. Pimentel-Moral, S., a kol., *Recent advances in extraction technologies of phytochemicals applied for the revaluation of agri-food by-products*, in *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals*. 2020, Elsevier. str. 209-239.

253. Hanganu, D., a kol., *Evaluation Of Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity for Some Salvisia Species*. Farmacia, 2019. **67**(5): str. 801-805.
254. Fonseca, L.R.d., a kol., *Herbal medicinal products from Passiflora for anxiety: An unexploited potential*. Sci. World J.. **2020**.
255. Seal, T., *Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, Sonchus arvensis and Oenanthe linearis of North-Eastern region in India*. J. Appl. Pharm., 2016. **6**(2): str. 157-166.
256. Pacheco-Fernández, I., a kol., *Salt-induced ionic liquid-based microextraction using a low cytotoxic guanidinium ionic liquid and liquid chromatography with fluorescence detection to determine monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine*. Anal. Bioanal.Chem., 2018. **410**(19): str. 4701-4713.
257. Baltazar, Q.Q., a kol., *Interfacial and micellar properties of imidazolium-based monocationic and dicationic ionic liquids*. Colloids Surf., A, 2007. **302**(1-3): str. 150-156.
258. El Hankari, S. a P. Hesemann, *Guanidinium vs. Ammonium Surfactants in Soft-Templating Approaches: Nanostructured Silica and Zwitterionic i-Silica from Complementary Precursor–Surfactant Ion Pairs*. Eur. J. Inorg. Chem., 2012. **2012**(32): str. 5288-5298.
259. Gomes, S.V., a kol., *Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in Passiflora species*. Microchem. J., 2017. **132**: str. 28-35.
260. Li, C., a kol., *Ionic-liquid-based ultrasound/microwave-assisted extraction of 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1, 4-benzoxazin-3-one and 6-methoxy-benzoxazolin-2-one from maize (Zea mays L.) seedlings*. J. Sep. Sci., 2015. **38**(2): str. 291-300.
261. Wei, Z., a kol., *Ionic liquids-based microwave-assisted extraction of active components from pigeon pea leaves for quantitative analysis*. Sep. Pur. Tech., 2013. **102**: str. 75-81.
262. Xu, W., a kol., *Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of flavonoids from Bauhinia championii (Benth.) Benth*. Molecules, 2012. **17**(12): str. 14323-14335.
263. Zeng, H., a kol., *Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of rutin from Chinese medicinal plants*. Talanta, 2010. **83**(2): str. 582-590.
264. Li, C., a kol., *Separation of the main flavonoids and essential oil from seabuckthorn leaves by ultrasonic/microwave-assisted simultaneous distillation extraction*. R. Soc. Open Sci., 2018. **5**(7): str. 180133.

265. Ferreira, S.C., a kol., *Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods*. Anal. Chim. Acta, 2007. **597**(2): str. 179-186.
266. Asakawa, T., a kol., *Convenient estimation for counterion dissociation of cationic micelles using chloride-sensitive fluorescence probe*. J. Colloid Interface Sci., 2001. **242**(2): str. 284-287.
267. Nacham, O., a kol., *Interfacial and aggregation behavior of dicationic and tricationic ionic liquid-based surfactants in aqueous solution*. Colloids Surf., A, 2015. **469**: str. 224-234.
268. Pacheco-Fernández, I., a kol., *Guanidinium ionic liquid-based surfactants as low cytotoxic extractants: Analytical performance in an in-situ dispersive liquid-liquid microextraction method for determining personal care products*. J. Chromatogr. A, 2018. **1559**: str. 102-111.
269. Vanyur, R., L. Biczok, aZ. Miskolczy, *Micelle formation of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids in aqueous solution*. Colloid Surface A, 2007. **299**(1-3): str. 256-261.
270. Gu, H., a kol., *Application of ionic liquids in vacuum microwave-assisted extraction followed by macroporous resin isolation of three flavonoids rutin, hyperoside and hesperidin from Sorbus tianschanica leaves*. J. Chromatogr. B, 2016. **1014**: str. 45-55.
271. Liu, Z., a kol., *Development of Brønsted acidic ionic liquid based microwave assisted method for simultaneous extraction of pectin and naringin from pomelo peels*. Sep. Pur. Tech., 2017. **172**: str. 326-337.
272. Mena, I.F., a kol., *Cation and anion effect on the biodegradability and toxicity of imidazolium- and choline-based ionic liquids*. Chemosphere, 2020. **240**.
273. Lou, Z., a kol., *Ionic liquids based simultaneous ultrasonic and microwave assisted extraction of phenolic compounds from burdock leaves*. Anal. Chim. Acta, 2012. **716**: str. 28-33.
274. Yang, L., a kol., *Ultrasound-assisted extraction of the three terpenoid indole alkaloids vindoline, catharanthine and vinblastine from Catharanthus roseus using ionic liquid aqueous solutions*. Chem. Eng. J., 2011. **172**(2-3): str. 705-712.
275. Liang, H., a kol., *Optimization of ionic liquid-based microwave-assisted extraction technique for curcuminoids from Curcuma longa L*. Food Bioprod. Process., 2017. **104**: str. 57-65.

276. Remsing, R.C., a kol., *Mechanism of cellulose dissolution in the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride: a ¹³C and ^{35/37}Cl NMR relaxation study on model systems*. Chem. Commun., 2006(12): str. 1271-1273.
277. Zhang, Q., a kol., *Application of ionic liquid-based microwave-assisted extraction of flavonoids from Scutellaria baicalensis Georgi*. J. Chromatogr. B, 2015. **1002**: str. 411-417.
278. Huddleston, J.G., a kol., *Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation*. Green Chem., 2001. **3**(4): str. 156-164.
279. Acquadro, S., a kol., *Grapevine Green Pruning Residues as a Promising and Sustainable Source of Bioactive Phenolic Compounds*. Molecules, 2020. **25**(3).
280. Chan, C.H., a kol., *Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants*. J. Chromatogr. A, 2011. **1218**(37): str. 6213-6225.
281. Fan, Y., a kol., *Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of verbascoside from Rehmannia root*. Ind. Crop. Prod., 2018. **124**: str. 59-65.
282. Papoulias, E., a kol., *Effects of genetic, pre-and post-harvest factors on phenolic content and antioxidant capacity of white asparagus spears*. Int. J. Mol. Sci., 2009. **10**(12): str. 5370-5380.
283. Gimeno, E., a kol., *The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil*. Food Chem., 2002. **78**(2): str. 207-211.
284. Bilgin, M. a S. Şahin, *Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (Olea europaea) leaves*. J. Taiwan Inst. Chem. Eng. , 2013. **44**(1): str. 8-12.
285. Iqbal, S. a M. Bhangar, *Effect of season and production location on antioxidant activity of Moringa oleifera leaves grown in Pakistan*. J. Food Compos. Anal., 2006. **19**(6-7): str. 544-551.
286. Hossain, M., a kol., *Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs*. Food Chem., 2010. **123**(1): str. 85-91.
287. El-Hawary, S.S., a kol., *Genetic, chemical, and biological diversity in Mangifera indica L. cultivars*. Pharmacogn. Res, 2020. **12**(2): str. 186-193.
288. Kirakosyan, A., a kol., *The production of hypericins and hyperforin by in vitro cultures of St. John's wort (Hypericum perforatum)*. Biotechnol Appl Biochem, 2004. **39**(1): str. 71-81.

289. Kirakosyan, A., D.M. Gibson, a P.B. Kaufman, *The production of dianthrones and phloroglucinol derivatives in St. John's Wort*, in *Bioactive molecules and medicinal plants*. 2008, Springer. str. 149-164.
290. Orphanides, A., V. Goulas, a V. Gekas, *Effect of drying method on the phenolic content and antioxidant capacity of spearmint*. Czech J. Food Sci., 2013. **31**(5): str. 509-513.

SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Publikace v odborných časopisech

Publikace č. 1

MOUČKOVÁ, K. - PACHECO-FERNÁNDEZ, I. - AYALA, J. - BAJEROVÁ, P. - PINO, V. Evaluation of Structurally Different Ionic Liquid-Based Surfactants in a Green Microwave-Assisted Extraction for the Flavonoids Profile Determination of Mangifera sp. and Passiflora sp. Leaves from Canary Islands Molecules, 2020, vol. 25, no. 20, s. 4734. ISSN: 1420-3049.

Publikace č. 2

MOUČKOVÁ, K. - BAJER, T. - ŠILHA, D. - VENTURA, K. - BAJEROVÁ, P. Comparison of Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation of Laurus nobilis L. Plant Foods for Human Nutrition, 2020, vol. 75, no. 4, s. 495-504. ISSN: 0921-9668.

Publikace č. 3

ŘEBÍČKOVÁ, K. - BAJER, T. - ŠILHA, D. - HOUDKOVA, M. - VENTURA, K. - BAJEROVÁ, P. Chemical Composition and Determination of the Antibacterial Activity of Essential Oils in Liquid and Vapor Phases Extracted from Two Different Southeast Asian Herbs-Houttuynia cordata (Saururaceae) and Persicaria odorata (Polygonaceae) Molecules, 2020, vol. 25, no. 10, s. "2432-1"- "2432-11". ISSN: 1420-3049.

Publikace č. 4

ŠILHA, D. - ŠVARCOVÁ, K. - BAJER, T. - KRÁLOVEC, K. - TESAŘOVÁ, E. - **MOUČKOVÁ, K.** - PEJCHALOVÁ, M. - BAJEROVÁ, P. Chemical Composition of Natural Hydrolates and Their Antimicrobial Activity on Arcobacter-Like Cells in Comparison with Other Microorganisms Molecules, 2020, vol. 25, no. 23, s. 5654. ISSN: 1420-3049.

Výsledky prezentované na konferencích (autor)

ŘEBÍČKOVÁ, K. - BAJER, T. - ŠILHA, D. - VENTURA, K. - BAJEROVÁ, P. Comparison of Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils Obtained by Hydrodistillation and Steam Distillation of Laurus nobilis L.. In YISAC 2019 : book of abstracts. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2019. s. 27 s. ISBN 978-80-7560-224-4.

ŘEBÍČKOVÁ, K. - BAJER, T. - ŠILHA, D. - VENTURA, K. - BAJEROVÁ, P. Porovnání chemického složení a biologických vlastností esenciálních olejů získaných hydrodestilací a parní destilací vavřínu ušlechtilého (Laurus nobilis L.). In Monitorování cizorodých látek a hodnocení rizik v životním prostředí I. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2019. s. 139-154 s. ISBN 978-80-7560-234-3.

Výsledky prezentované na konferencích (spoluautor)

VOKÁLOVÁ, M. - **ŘEBÍČKOVÁ, K.** - BAJER, T. Vliv pH vody při hydrodestilaci na chemické složení esenciálního oleje Anthriscus cerefolium. In Sborník příspěvků: Studentská vědecká odborná činnost 2019/2020. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2020. s. 221-226 s. ISBN 978-80-7560-333-3.

ŠVARCOVÁ, K. - ŠILHA, D. - PEJCHALOVÁ, M. - **MOUČKOVÁ, K.** - BAJEROVÁ, P. - BAJER, T. Biologická aktivita hydrolátů získaných z rostlinných matic. In Čo nového v mikrobiologii. Praha: Československá společnost mikrobiologická, 2020. s. 27 s. ISBN 978-80-973411-1-4.

Zahraniční stáž

Universidad de La Laguna, Department of Analytical chemistry, Tenerife, Spain, Material for Chemical Analysis Research Group, Supervisor: Prof. Veronica Pino, 1.9.2019 – 2.12.2019