

# **Analýza vybraných látek z rostliny *Calendula officinalis* L.**

Ing. David Sikora

---

Diplomová práce  
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav chemie  
akademický rok: 2009/2010

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ing. David SIKORA**  
Osobní číslo: **T080361**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**

Téma práce: **Analýza vybraných látek z rostliny Calendula officinalis L.**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Z obsahových látek rostlin *Calendula officinalis* L. vytipujte skupiny látek vhodné pro chromatografickou analýzu.
2. Zaměřte se zejména na metody plošné a kolonové chromatografie.

### II. Praktická část

1. Provedte analýzu vytipovaných skupin látek za použití chromatografických metod vhodných k provozní kontrole a při průmyslovém zpracování.
2. Získané výsledky vyhodnoťte dostupnými metodami, jak z hlediska kvantitativního, tak i kvalitativního.
3. Dosažené výsledky statisticky zpracujte a proveďte diskuzi.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] JANČA, J., ZENTRICH, J. A. Herbář léčivých rostlin 3. díl. Praha: Eminent, 1995. ISBN 80-85876-14-0

[2] ILLAVA, B., STARÝ, F., POSPÍŠIL, F. Rostliny v kosmetice. Praha: Atia, 1987.

[3] BARNES, J., ANDERSON, J. A., PHILLIPSON J. D. Herbal Medicines, third edition. London: Pharmaceutical Press, 2007. ISBN 978 0 85369 623 0

[4] JAROŠ, Z., Léčivé látky z rostlin. 1. vyd. České Budějovice: Dona, 1992. ISBN 80-85463-04-0

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Pavel Valášek, CSc.**

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

**4. ledna 2010**

Termín odevzdání diplomové práce:

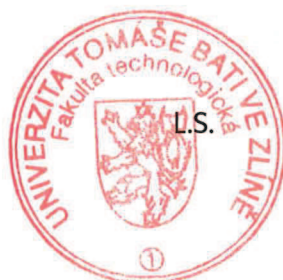
**19. května 2010**

Ve Zlíně dne 13. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

*děkan*



prof. Ing. Antonín Klásek, DrSc.

*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....



---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

V rámci diplomové práce jsme se zabývali rostlinou *Calendula officinalis* L. jak z botanického tak i chemického hlediska. Důraz je kladen na její látky s bioaktivními vlastnostmi a jejich stanovení v pěti různých vzorcích. V praktické části byly hlavně pomocí chromatografických metod analyzovány vybrané skupiny látek rostliny *Calendula officinalis* L. Získané výsledky byly vyhodnoceny dostupnými metodami.

Klíčová slova: Měsíček lékařský, *Calendula officinalis* L., plynová chromatografie,

## **ABSTRACT**

In this diploma thesis we were engaged in herb *Calendula officinalis* L. from both botanical and chemical point of view. Emphasis is laid on its matters with bio-active features and their determination at five samples. They were analysed selected groups of substances from plant *Calendula officinalis* L. by chromatographic methods in practical part of this aim. The results obtained are assessed using the available methods.

Keywords: Pot Marigold, *Calendula officinalis* L., gas chromatography

Děkuji Ing. Pavlu Valáškov, CSc. za odborné rady, cenné připomínky, konzultace a čas, který mi věnoval při sestavování této diplomové práce. Děkuji také paní laborantce Jaroslavě Řemenovské za pomoc při práci v laboratoři.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 ROSTLINY MĚSÍČKU LÉKAŘSKÉHO</b> .....	<b>13</b>
1.1 BOTANICKÉ CHARAKTERISTIKY .....	13
<b>2 PĚSTOVÁNÍ, SBĚR A SUŠENÍ</b> .....	<b>14</b>
2.1 PĚSTOVÁNÍ.....	14
2.2 SBĚR .....	14
2.3 SUŠENÍ .....	14
<b>3 MOŽNOSTI POUŽITÍ MĚSÍČKU V DOMÁCÍ LÉČBĚ</b> .....	<b>16</b>
3.1 NÁLEV.....	16
3.2 MĚSÍČKOVÝ OLEJ I. ....	16
3.3 MĚSÍČKOVÝ OLEJ II. ....	16
3.4 MĚSÍČKOVÁ TINKRŮRA .....	16
3.5 MĚSÍČKOVÁ MAST .....	16
<b>4 OBSAHOVÉ LÁTKY</b> .....	<b>17</b>
4.1 TERPENOVÉ LÁTKY.....	17
4.1.1 Terpenové alkoholy a jejich estery.....	17
4.1.2 Karotenoidy .....	19
4.2 FLAVONOIDY .....	20
4.3 POLYSACHARIDY:.....	21
4.4 SILICE:.....	21
<b>5 ÚČINKY MĚSÍČKU NA ORGANIZMUS A JEHO POUŽITÍ</b> .....	<b>22</b>
5.1 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK .....	22
5.2 PODPORA HOJENÍ KOŽNÍCH PORANĚNÍ .....	22
5.3 PROTIZÁNĚTLIVÝ ÚČINEK .....	22
5.4 IMMUNOMODULAČNÍ ÚČINEK .....	23
5.5 ANTIOXIDAČNÍ ÚČINEK.....	23
5.6 POUŽITÍ .....	23
<b>6 TOXICITA, ALERGIE A KONTRAINDIKACE</b> .....	<b>25</b>
6.1 TOXICITA.....	25
6.2 ALERGIE.....	25
6.3 KONTRAINDIKACE .....	25
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>26</b>

<b>7</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>27</b>
7.1	VZORKY A JEJICH PŘÍPRAVA .....	27
7.1.1	Příprava vzorků 5, 8, 10 – Extrakce za laboratorní teploty .....	29
7.1.2	Příprava vzorků 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10 - Extrakce v Soxhletově aparatuře .....	29
7.2	STANOVENÍ OBSAHU LÁTEK ROZPUSTNÝCH V NEPOLÁRNÍM ROZPOUŠTĚDLE .....	30
7.3	STANOVENÍ NEUTRÁLNĚ-DETERGENTNÍ VLÁKNINY .....	30
7.4	CHROMATOGRAFIE .....	33
7.4.1	Analýza aminokyselin rostliny měsíčku lékařského pomocí iontovýměnné chromatografie .....	33
7.4.1.1	Příprava vzorků pro stanovení volných aminokyselin .....	34
7.4.1.2	Příprava vzorků pro stanovení sirných aminokyselin .....	35
7.4.2	Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí chromatografie na tenké vrstvě .....	36
7.4.2.1	Vyhodnocení chromatogramů pomocí hodnot $R_F$ .....	36
7.4.2.2	Denzitometrické vyhodnocení vybraných chromatogramů .....	37
7.4.2.3	Materiál a přístroje pro chromatografií na tenké vrstvě .....	38
7.4.3	Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí plynové chromatografie .....	39
7.4.3.1	Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID .....	40
7.4.3.2	Stanovení látek v heptanovém extraktu pomocí GC-MS .....	41
7.4.3.3	Stanovení těkavých látek pomocí GC-MS headspace analýzy .....	42
7.4.4	Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí kapalinové chromatografie .....	42
7.4.4.1	Stanovení látek rostlin měsíčku lékařského rozdělených na TLC pomocí LC-MS .....	44
<b>8</b>	<b>MATEMATICKO – STATISTICKÉ METODY VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ .....</b>	<b>45</b>
8.1	ARITMETICKÝ PRŮMĚR .....	45
8.2	SMĚRODATNÁ ODCHYLKA .....	45
8.3	KORELAČNÍ KOEFICIENT .....	45
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>46</b>
9.1	STANOVENÍ OBSAHU LÁTEK ROZPUSTNÝCH V NEPOLÁRNÍM ROZPOUŠTĚDLE .....	46
9.2	STANOVENÍ NEUTRÁLNĚ-DETERGENTNÍ VLÁKNINY .....	46
9.3	CHROMATOGRAFIE .....	48
9.3.1	Analýza aminokyselin rostliny měsíčku lékařského pomocí iontovýměnné chromatografie .....	48
9.3.2	Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí chromatografie na tenké vrstvě .....	49
9.3.3	Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí plynové chromatografie .....	51
9.3.3.1	Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID .....	51
9.3.3.2	Stanovení látek v heptanovém extraktu pomocí GC-MS .....	54
9.3.3.3	Stanovení těkavých látek pomocí GC-MS headspace analýzy .....	58

9.3.4	Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí kapalinové chromatografie .....	58
<b>ZÁVĚR</b> .....		<b>59</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....		<b>61</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....		<b>65</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....		<b>66</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....		<b>67</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....		<b>68</b>

## ÚVOD

Měsíček lékařský (latinsky *CALENDULA OFFICINALIS* L., anglicky Pot Marigold, slovensky Nechtík lékařsky) patří do čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). Můžeme ho také najít v lidovém léčitelství pod různými názvy jako kalendule, krušíček, umrlčí květ, měsíček zahradní, nechtík, pampalík, pazourky nebo sluníčko. [1, 2]

Historie měsíčku začíná ve Východní Evropě a Středomoří, kde si vážili jeho léčivých vlastností už od dávných dob. Měsíček byl oblíbený ve starověkém Řecku, ale i dříve ho pěstovaly Indické a Arabské kultury. Od 12. století se stává běžnou součástí zahradního rostlinstva a je zmíněny v několika herbářích. Jméno *Calendula* pochází z latinského *Kalendae*, což znamená první den v měsíci nebo měsíc sám. Toto pojmenování odkazuje na dlouho kvetoucí rostlinu.

Měsíček polní (*Calendula arvensis*) je také užívaný jako lék, protože má podobné složky jako měsíček lékařský [3]



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**



## 2 PĚSTOVÁNÍ, SBĚR A SUŠENÍ

### 2.1 Pěstování

Měsíčku se daří téměř na každé půdě, velmi dobře pak na půdě slatinné, na výslunném místě, chráněném před větry. Vhodnou před-plodinou jsou obiloviny. Hnojení není nutné, je však prospěšné.

Semeno se vysévá v březnu, častěji však až v dubnu, do řádků 30—40 cm širokých, do hloubky 1—2 cm. Na 1 ar je zapotřebí 120—150 g semene, 1 g je asi 100 nažek. Semeno má klíčivost 80 %, a tu si udržuje po 2—3 roky. Klíčí na světle i ve tmě, při teplotě 20—30° C ve 14—21 dnech. Porost se jednotí na 25—30 cm. Kultury se během vegetace, která trvá 12—20 týdnů, 2—3krát okopávají a plejí.

Výnos semene z 1 aru kultur je asi 2—3 kg. Pro vyšší výnosu je významnější počet rostlin na jednotce plochy než zvýšení počtu úborů na rostlině. Přídavkem hnojiva lze v omezené míře dosáhnout stoupnutí výnosu; velikost úborů se sice přídavkem hnojiva neovlivní, ale jejich počet na jedinci stoupne. Plnost květů neovlivňuje výživa, nýbrž určité účinné látky, květní hormony. [2]

### 2.2 Sběr

Sbírá se za suchého počasí (nejlépe v poledních hodinách) jen obvodový (jazykovitý) květ zcela rozvitých úborů (*Flos calendulae sine calyce*) přímým vytrháváním. Nejlepší výnos sklizně poskytuje srpnový sběr. Mnohdy se doporučuje z praktických důvodů (snazší získávání) sběr celých úborů a po jejich usušení dodatečné vytrhávání obvodových květů. Tento druh drogy je však méněcenný (droga není čistá). Dříve se prodávaly celé úbory (*Flos calendulae cum calyce*), kterých se však dnes již k léčivým účelům nepoužívá. [2, 4]

### 2.3 Sušení

Suší se ve stínu, protože sušením na slunci by droga ztratila barvu a znehodnotila by se. Při použití umělého tepla nesmí teplota překročit 35° C (květy obsahují silici). Sušení umělým teplem má značné přednosti. Poměr ztráty na váze při sušení obvodových květů je asi 10 : 1, celých úborů 8 : 1. Výnos sklizně z 1 aru je asi 10 kg celých úborů a 2—3 kg vytrhávaných obvodových květů. Snadno přijímá vzdušnou vlhkost, proto se uchovává v dobře

utěsněných nádobách, na místech suchých a vzdušných. Droga má typickou kořenitou aromatickou vůni a chutná slabě hořce.[2, 4]

### 3 MOŽNOSTI POUŽITÍ MĚSÍČKU V DOMÁCÍ LÉČBĚ

Květy měsíčku jsou již dlouho používány v lidové medicíně a je známo více jak 35 různých přípravků a tinktur z těchto květů. [10] Pro názornost uvádím nejběžnější přípravky:

#### 3.1 Nálev

Nálev je nejčastější formou přípravy čaje z jednotlivé rostliny či rostlinné směsi. Nálev se připravuje tak, že se předepsané množství usušené rostlinné části nebo čajové směsi přelije předepsaným množstvím vařící vody a po 15 – 30 minutách vyluhování při obyčejné teplotě v přikryté nádobě se zfiltruje za použití sítka a řídkého čistého pláténka nebo gázy.[9]

#### 3.2 Měsíčkový olej I.

Úbory měsíčku se napěchují do průhledné láhve se širokým hrdlem, láhev se vzduchotěsně uzavře a postaví za okno na slunce. Za několik dnů začne z měsíčku samovolně vytékat olejovitá oranžová tekutina a usazovat se na dně. Takto připravený olej můžeme ještě rozpustit v etanolu a zakonzervovat. [1, 4]

#### 3.3 Měsíčkový olej II.

Měsíčkový olej II můžeme vyrobit macerací čerstvých květů v rostlinném oleji po dobu jednoho týdne. Takto připravený olej je třeba před použitím potřepat. [3]

#### 3.4 Měsíčková tinktura

Měsíčková tinktura se vyrábí jednoduchou macerací v lihu. Do láhve se dají květy a zalijí se lihem (90%), tak že na 1 objemový díl květů se přilije 10 dílů lihu. Maceruje se 14 dní za občasného protřepávání. Dále ředíme lihem (40%) na požadovanou potenci. Tinktura se užívá vnitřně i zevně k obkladům. Její využití je velmi široké. [1]

#### 3.5 Měsíčková mast

Měsíčková mast se připravuje buď vmícháním jemně namleté drogy nebo tinktury do masťového základu. U tinktury je zapotřebí zvýšena teplota aby se odpařil líh. Jako masťový základ se používá vepřové sádlo nebo také včelí vosk nebo pryskyřice, které jsou samy o sobě velmi léčivé. [1]

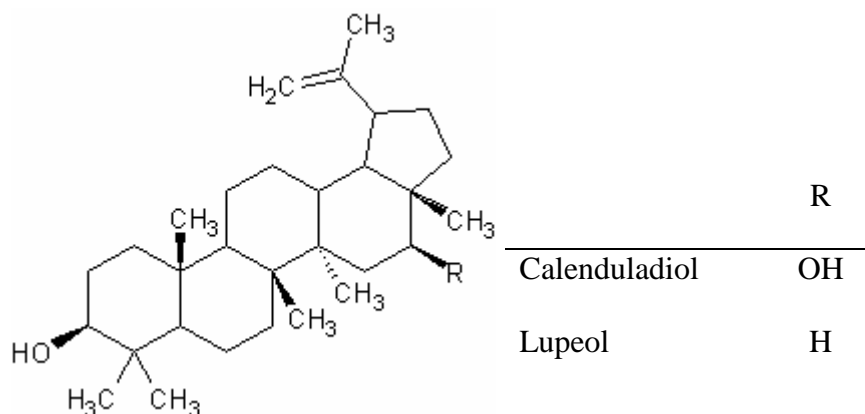
## 4 OBSAHOVÉ LÁTKY

Hlavními obsahovými látkami, kterým měsíček vděčí za svoje vlastnosti, jsou terpeny, flavonoidy, karotenoidy, polysacharidy a silice.

### 4.1 Terpenové látky

Terpeny zahrnují mnoho složek jako alfa- a beta-amyrin, lupeol, longispinogenin, kyselinu oleanolovou, arnidiol, calenduladiol, erythrodiol, faradiol, helantrioly A1, B0, B1 a B2, maniladiol a ursadiol. [3, 6, 7]

#### 4.1.1 Terpenové alkoholy a jejich estery



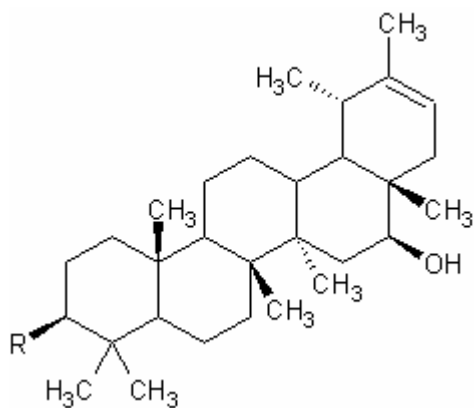
Obr.2 Molekulární struktura Calenduladiolu a Lupeolu

Měsíček obsahuje hodně triterpenových alkoholů (monoolů, diolů a triolů). Okolo 10 % monoolů, 98 % diolů a jen 1 % triolů je esteryfikováno. Monooly jsou esteryfikovány především kyselinou octovou a dioly jsou esteryfikovány mastnými kyselinami, především kyselinou laurovou, myristovou a palmitovou. Diolestery jsou z 98 % vázané 3-monoesterovou vazbou a jen 2 % jsou diestery. Triterpendiol-3-monoestery jsou hlavně monoestery faradiolu. 2-4 % váhy suché drogy tvoří triterpendiol-3-monoestery, z čehož 85 % tvoří estery faradiolu, 6 % to jsou estery calenduladiolu a malá množství esterů maniladiolu a arnidiolu.

Bylo zjištěno, že monoolestery jsou hlavní prekurzory diol-3-monoesterů, zatímco volné monooly jsou hydroxylovány na dioly a trioly. Z výsledků experimentů se předpokládá, že

hydroxylace volných monooolů, diolů a monoolesterů je situována jen v chromoplastech, zatímco hydrolyza monoolesterů a esterifikace volných monooolů probíhá jak uvnitř tak i navenek chromoplastů.

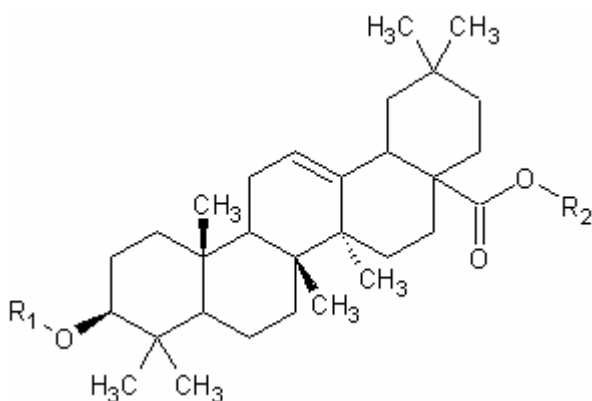
Triterpendiolové monoestery faradiolu (faradiol-3-O-myristát, faradiol -3-O-palmitát, faradiol-3-O-laurát) byly identifikovány jako hlavní aktivní sloučeniny, které jsou používány jako parametry pro standardizaci měsíčkových extraktů. Byly také vyvinuty metody pro získání těchto esterů. Tyto metody jsou založeny na kombinaci superkritické fluidní extrakce a chromatografických čištění. Takto se získávají monoestery faradiolu o 96-98% čistotě a vedlejší produkty jako estery maniladiolu. [3, 6, 7, 11, 12, 13]



	R
Faradiol	OH
Faradiol-3-O-laurát	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COO
Faradiol-3-O-myristát	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COO
Faradiol-3-O-palmitát	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COO

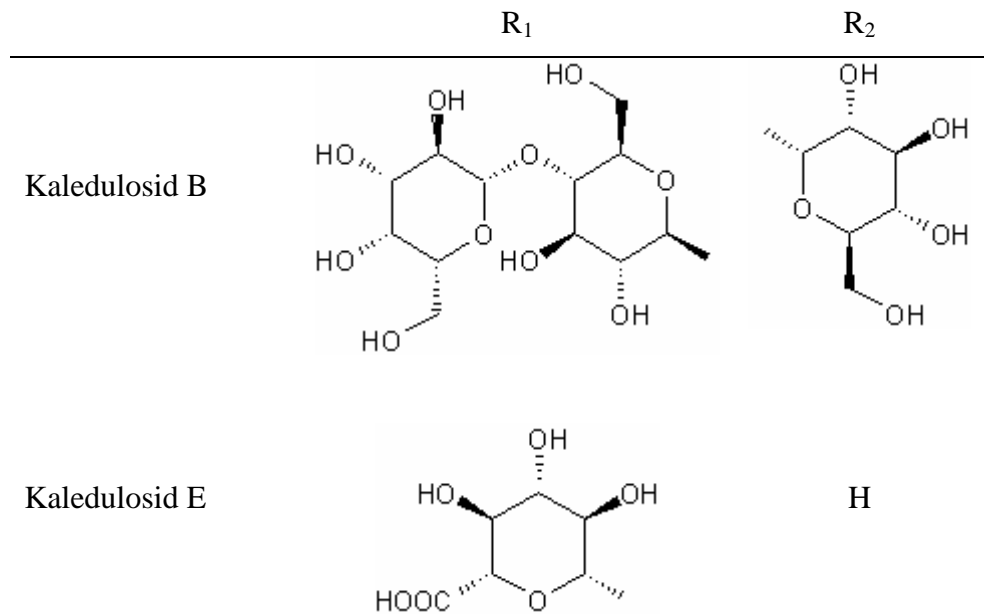
Obr.3 Estery faradiolu

Měsíček také obsahuje triterpenové saponiny založené na kyselině oleanolové (calendulosidy C až H). Suchá droga obsahuje 2-10 % těchto saponinů. Dále měsíček obsahuje steroly (campesterol, cholesterol, sitosterol, stigmasterol a taraxasterol). [3, 6, 7]



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Kyselina oleanolová	H	H

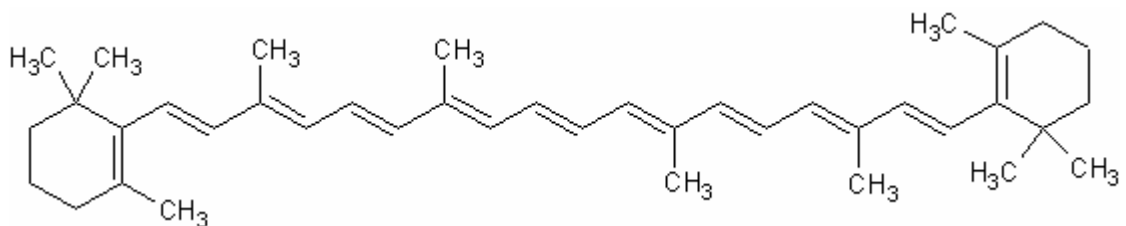




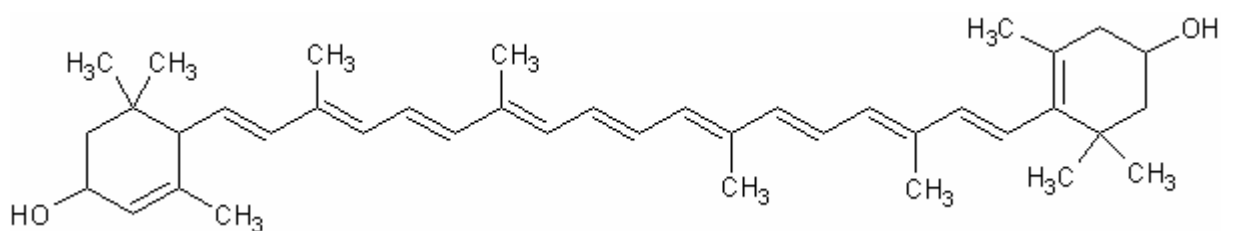
Obr.4 Kaledulosidy

#### 4.1.2 Karotenoidy

Měsíček vděčí karotenoidům za svoji barvu. Droga obsahuje 1,5 až 3 % karotenoidů. Odrůdy měsíčku se žlutými květy jsou bohaté na lutein a odrůdy měsíčku s oranžovými květy mají více beta-karotenu. Karotenoidy jsou velmi citlivé na světlo a znehodnocují se během skladování nebo sušení na světle. [7]



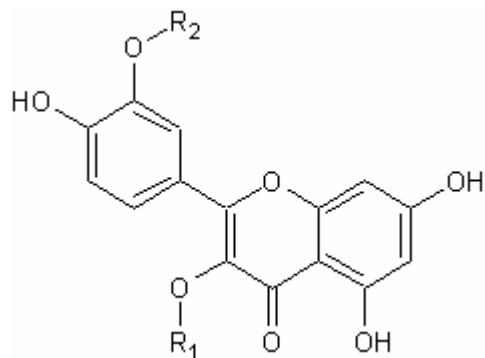
Obr.5 Beta-karoten



Obr.6 Lutein

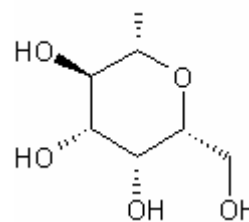
## 4.2 Flavonoidy

Droga obsahuje nejméně 0,4 % flavonoidů, počítáno jako hyperosid, vztaženo na vysušenou drogu. Flavonolové glykosidy (3- O - glykosidy isorhamnetinu a quercetinu) zahrnují hyperosid, isorhamnetin, narcissin a rutin. [6]



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Quercetin	H	H

Hyperosid

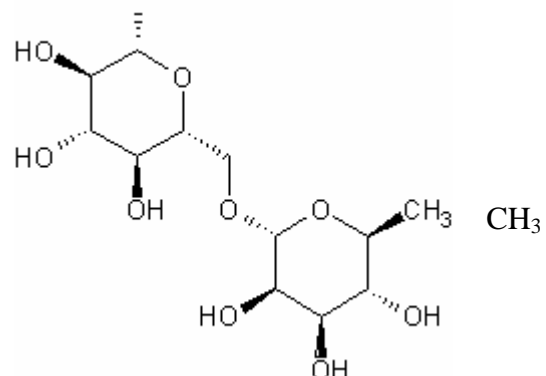


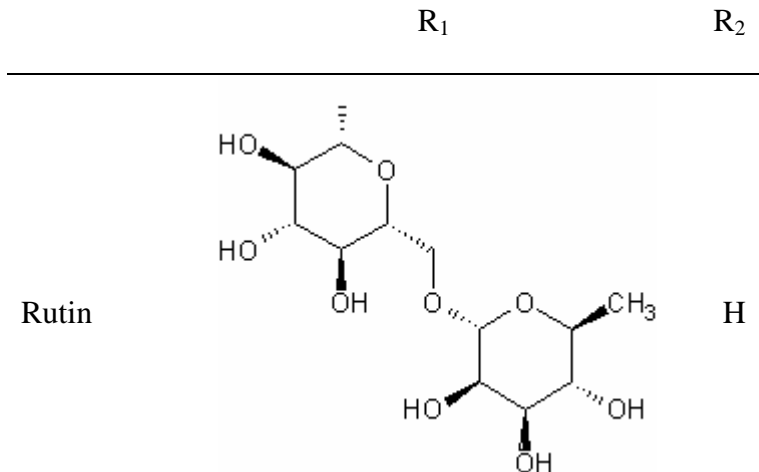
Isorhamnetin

H

CH<sub>3</sub>

Narcissin





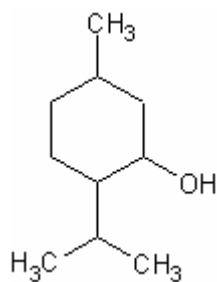
Obr.7 Flavonoidy

### 4.3 Polysacharidy:

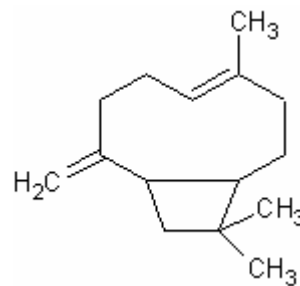
Aktivní polysacharidy v měsíčku (PS-I, PS-II a PS-III) mají (1->3)-beta-D-galaktan hlavní řetězec s krátkými postranními řetězci na C-6, zahrnující alfa-araban-(1->3)-araban, alfa-L-rhamnan-(1->3)-araban nebo jen alfa-L-rhamnan. Tyto polysacharidy prokázaly immunostimulační účinky v mnoha in vitro immunostimulačních testech.[6, 14]

### 4.4 Silice:

Terpenoidní složky zahrnují mentol, caryophyllen a deriváty epoxidů a ketonů, alfa- a beta-jonony, deriváty beta-jononových epoxidů a dihydroakitinidiol. [6]



Obr.8 Mentol



Obr.9 Caryophyllen

Měsíček dále obsahuje hořčinu calenden, kyselinu salicylovou, kyselinu askorbovou, pryskyřice, sliz a také minerální látky (vápník, sodík, draslík, hořčík, železo, měď a mangan). [1, 3]

## 5 ÚČINKY MĚSÍČKU NA ORGANIZMUS A JEHO POUŽITÍ

### 5.1 Antimikrobiální účinek

Etanolvé extrakty mají antibakteriální, protivirové a protiplísňové účinky. Protiplísňové účinky extraktů byly in vitro zkoumány na *Aspergillus niger*, *Rhizopus japonicum*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* a *Rhodotorula glutinis*. Měsíčekový extrakt také ukázal vysokou účinnost proti plísním a inhibiční efekt byl srovnatelný se standardními přípravky proti plísním. Extrakt také inhiboval bakterie *Trichomonas vaginalis*. Extrakt má virocidní aktivitu proti viru chřipky a potlačil růst viru *Herpes simplex*. Extrakt projevil in vitro inhibiční aktivitu proti viru HIV, když inhiboval replikaci HIV viru typu 1 a při tom byl relativně netoxický pro lidské lymfocytické buňky (MOLT-4). [3, 15]

### 5.2 Podpora hojení kožních poranění

Bylo zjištěno, že mast obsahující 5 % extraktu z měsíčku a masti obsahující měsíčekový extrakt v různém poměru úspěšně pomáhaly hojit rány. Tyto účinky byly testovány na chirurgicky indukovaných ranách. Základem hojivého účinku (fyziologická regenerace a epitelizace poranění) je tvoření nových krevních cest a urychlení metabolismu glykoproteinů, nukleoproteinů a kolagenních bílkovin. Angiogenní aktivita byla prokázána u sublimačně usušeného vodného extraktu měsíčku, kdy vzorek byl testován na chorioalantoidní membráně fertilizovaného slepičího vejce. Počet nových krevních cest byl výrazně vyšší u vzorku ošetřeného měsíčkem než u kontrolního vzorku. Samotný allantoin měl mnohem slabší účinky. [3, 6]

Poslední studie dokazují, že extrakty z měsíčku jsou vhodné pro popáleniny a především popálení slunečním zářením, protože jednak pomáhají léčit poškozenou tkáň, ale také preventivně chránit kůži proti oxidativnímu stresu vyvolaným UV zářením.[10]

### 5.3 Protizánětlivý účinek

Protizánětlivý účinek byl demonstrován na několika zvířecích modelech. Léčba byla prováděna 80% etanolvým extraktem a zmírňovala indukovaný edém u krys při dávce 100 mg extraktu na kilogram. Také 70% extrakty (etanolvý extrakt a extrakt získaný superkritickou fluidní extrakcí CO<sub>2</sub>) prokázaly inhibující účinky na experimentálně vyvolaných

zánětech a edémech. Tyto záněty byly vyvolané krotonovým olejem na myších uších, přičemž etanolový extrakt inhiboval zánět z 20 % a extrakt získaný pomocí CO<sub>2</sub> inhiboval zánět z 70 % a to při stejné dávce (1200 µg/ucho). [3, 6]

#### 5.4 Immunomodulační účinek

U izolovaných polysacharidů o velké molekulové hmotnosti (PS I, -II a -III) bylo zjištěno, že stimulují fagocytózu u lidských granulocytů in vitro v koncentracích 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-6</sup> mg/ml. 70% etanolový extrakt měsíčku zcela inhiboval množení lymfocytů v přítomnosti phytohemagglutininu in vitro. [3, 6]

#### 5.5 Antioxidační účinek

Ukázalo se, že měsíček má antioxidační schopnosti a zhasí volné radikály. Byly připraveny 70% extrakty měsíčku v etheru, chloroformu, etylacetátu a n-butanolu. Každý z těchto extraktů byl následně zakoncentrován a rozpuštěn v 50% etanolu tak, aby byl získán 6% roztok, na kterém byla dále stanovena antioxidační aktivita na lipozomálních lipidech oxidovaných Fe<sup>2+</sup> a kyselinou askorbovou. Etherové, butanolové a vodné extrakty vykazovaly antioxidační aktivitu. Tato aktivita je závislá na celkovém obsahu fenolických a flavonoidních látek. Také isorhamnetinové glykosidy izolované z měsíčku inhibovaly lipooxygenázovou aktivitu. [3, 6]

#### 5.6 Použití

Měsíček je hlavně užíván při zánětlivých kožních chorobách nebo zánětech a také jako pomoc při regeneraci poranění. V minulosti se přípravky z květů měsíčku používaly pro urychlení hojení ran, popálenin, modřin, škrábanců, ale i při menších kožních infekcích. V moderní kosmetice se přidává droga nebo olejové výtažky z ní do hojivých krémů na rozpraskané ruce, opruzeniny, zhojení, ale dosud citlivé popáleniny a omrzliny.

Lze jej používat i perorálně. Vhodnou formou je odvar, připravovaný z 1-4 g sušené drogy. Doba varu nesmí překročit 1, maximálně 2 minuty. Při vnitřním podávání příznivě ovlivní činnosti jater a žlučníku; droga se uplatní v léčbě astmatu, kašle, při bušení srdce, upravuje menstruaci, hojí vnitřní i vnější záněty, můžeme ji užít i při vředové chorobě žaludku a dvanáctníku, zánětech střev, Crohnově chorobě, ulcerózní kolitidě (zánět tlustého střeva s

tvorbou vředů). Droga působí také mírně sedativně a snižuje reflektorní dráždivost, zlepšuje práci srdce při mírném poklesu krevního tlaku a působí antibioticky.

Měsíček je jedna z mála léčivek, které vykazují kancerostatický efekt i při normálním podávání formou čaje, zejména v oblasti trávicího ústrojí a ženských orgánů. [1, 3, 4]

Měsíček kromě léčivého a dekorativního významu má také náboženský význam: mnoho měsíčkových květů spotřebují v Orientě při náboženských obřadech, nejvíce při pohřbech jako kadilo místo drahého šafránu. [8]

## 6 TOXICITA, ALERGIE A KONTRAINDIKACE

### 6.1 Toxicita

Vodný extrakt měsíčku má LD<sub>50</sub> 375 mg/kg (nitrožilně) a LD<sub>100</sub> 580 mg/kg (podbřišnicově) u myši. Vodné extrakty v 30% etanolu (droga/extrakt 1 : 1 a 0,5 : 1) měl LD<sub>50</sub> hodnoty 450 mg/myš (podkožně) a 526 mg/100 g krysy (nitrožilně).

I když extrakty z měsíčku mají proměnné hodnoty látek v závislosti na použité rostlině nebyly pozorovány žádné příznaky po dlouhodobé aplikaci extraktů z měsíčku na zvířatech. Pomocí Amesova testu s použitím *Salmonella typhimurium* nebyla zjištěna žádná mutagenita ani karcenogenita a extrakty byly označeny jako nekarcinogenní na krysách a křečcích, ale je nedostatek klinických studií na toxicitu u člověka. [3, 6, 16]

### 6.2 Alergie

Měsíček může způsobit alergickou reakci u citlivých jedinců, zvláště pak u těch s existující hypersensitivitou na další členy čeledi *Asteraceae*. Laktony seskviterpenů jsou největšími alergeny vyskytujícími se u měsíčku, ale je jen málo případů výskytů alergií na tyto látky. Ve studiích, kde byl měsíček testován na více než 1000 pacientů, jen jeden pacient vykazoval přecitlivělost na měsíček. [3, 6]

### 6.3 Kontraindikace

Interakce s léky není řádně zdokumentována. Nicméně, potencionální riziko hrozí u léků podávaných souběžně, zvláště pak u těch, které mají podobné nebo protichůdné účinky.

Je také známo, že měsíček má uterotonický účinek (in vitro) a triterpenoidní složky působí spermicidně. Díky nedostatku údajů o toxicitě je lépe se měsíčku vyhnout v období těhotenství a kojení. [3, 6]




## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**


## 7 MATERIÁL A METODY

### 7.1 Vzorky a jejich příprava

Tab.1 Vzorky I

Vzorek I	Původ vzorku:	Bystřice	
	Zeměpisná délka:	49° 38' 8''	
	Zeměpisná šířka:	18° 43' 51''	
	Nadmořská výška:	400 m	
	Barva květů	Oranžová	

Obr.10 Vzorek I

Vzorek II	Původ vzorku:	Bystřice	
	Zeměpisná délka:	49° 38' 8''	
	Zeměpisná šířka:	18° 43' 51''	
	Nadmořská výška:	400 m	
	Barva květů	Žlutá	

Obr.11 Vzorek II


Vzorek III	Původ vzorku:	Březnice	
	Zeměpisná délka:	49° 11' 7''	
	Zeměpisná šířka:	17° 39' 28''	
	Nadmořská výška:	294 m	
	Barva květů	Oranžová	

Obr.12 Vzorek III

Vzorek IV	Původ vzorku:	Březnice	
	Zeměpisná délka:	49° 11' 7''	
	Zeměpisná šířka:	17° 39' 28''	
	Nadmořská výška:	294 m	
	Barva květů	Oranžová	

Vzorek je o rok starší než všechny jiné vzorky

Obr.13 Vzorek IV

Vzorek V	Původ vzorku:	Zlín-Zarámí	
	Zeměpisná délka:	49° 13' 39''	
	Zeměpisná šířka:	17° 40' 00''	
	Nadmořská výška:	230 m	
	Barva květů	Oranžová	

Obr.14 Vzorek V

Z těchto vzorků byly připraveny extrakty:

Tab.2 Extrakty

Označení vzorku	Číslo původního vzorku	Rozpouštědlo	Teplota při extrakci
1	I	EtOH	Teplota varu (78°C)
2	I	Voda	Teplota varu (100°C)
3	II	EtOH	Teplota varu (78°C)
4	II	Voda	Teplota varu (100°C)
5	I	EtOH	Laboratorní teplota (25°C)
6	III	EtOH	Teplota varu (78°C)
7	III	Voda	Teplota varu (100°C)
8	III	EtOH	Laboratorní teplota (25°C)
9	IV	EtOH	Teplota varu (78°C)
10	V	EtOH	Laboratorní teplota (25°C)

### 7.1.1 Příprava vzorků 5, 8, 10 – Extrakce za laboratorní teploty

**Postup:** Čerstvé úbory měsíčku byly vloženy do láhve a byly zality příslušným extrakčním činidlem (EtOH, voda). Takto byly ponechány několik měsíců a poté byly vzorky zfiltrvány. Získané extrakty byly převedeny do skleněných lékovek a použity na další stanovení.

**Chemikálie:**

Použité chemikálie byly v čistotě per analysis (p.a.)

Etanol

Destilovaná voda

### 7.1.2 Příprava vzorků 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10 - Extrakce v Soxhletově aparatuře

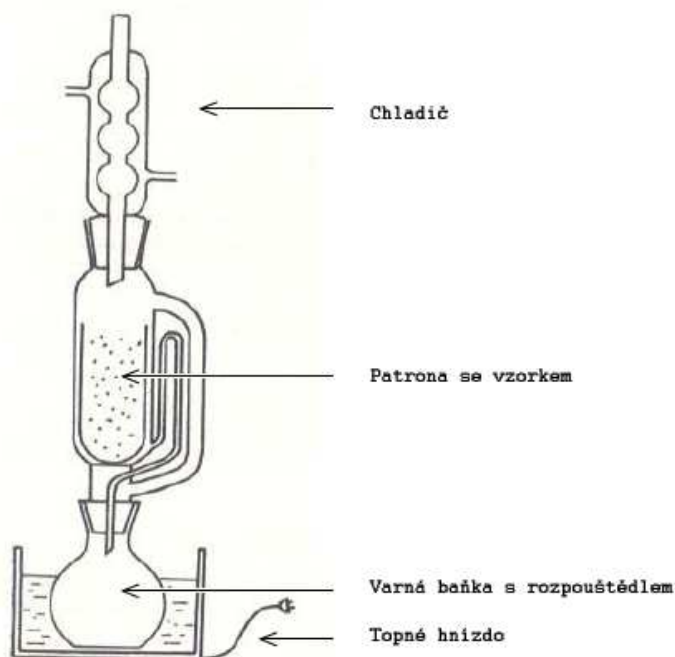
**Postup:** Vzorky byly vysušeny do konstantní hmotností při teplotě 30°C. Byly naváženy 3g vzorku a následně byla navážka vložena do papírové extrakční patrony, která byla uzavřena vatou, zbavenou extrahovatelných složek. Patrona se vzorkem byla vložena do střední části extraktoru (viz. Obr. 15), která byla nasazena na varnou baňku (250 ml) s vhodným rozpouštědlem (EtOH, voda). Varná baňka byla naplněna do jedné třetiny (asi 80ml). Na střední část byl nasazen zpětný chladič. Po otevření přívodu vody do chladiče a bylo zapnuto topné hnízdo. Doba extrakce byla 2 hodiny. Takto získané extrakty byly standardizovány na 50 ml, převedeny do skleněných lékovek a použity na dělení pomocí TLC. [18]

**Chemikálie:**

Použité chemikálie byly v čistotě p.a.

Etanol

Destilovaná voda



Obr.15 Soxhletův extraktor [17]

## 7.2 Stanovení obsahu látek rozpustných v nepolárním rozpouštědle

**Postup:** Bylo naváženo 1,5g vzorku a následně byla navážka vložena do papírové extrakční patrony, která byla uzavřena vatou, zbavenou extrahovatelných složek. Patrona se vzorkem byla vložena do střední části extraktoru (viz. Obr. 15), která byla nasazena na předem vysušenou a zváženou varnou baňku (250 ml) s rozpouštědlem (50ml heptanu). Na střední část byl nasazen zpětný chladič. Byl otevřen ventil od přívodu vody do chladiče a bylo zapnuto topné hnízdo. Doba extrakce byla 1,5 hodiny. Takto získaný extrakt byl vysušen a zvážen. Následně byl vypočítán obsah extrahovatelných látek. [18]

### Chemikálie:

Heptan p.a.

## 7.3 Stanovení neutrálně-detergentní vlákniny

Pro stanovení neutrálně-detergentní vlákniny (dále jen NDF) byly použity vzorky I, II a III.

### Princip:

NDF, jako zbytek buněčných stěn rostlinných pletiv, se stanoví vázkově po hydrolýze vzorku v prostředí neutrálního roztoku laurylsulfátu sodného.[18,19]

**Postup:** Filtrační sáčky označené popisovačem na textil byly vyprány v acetonu a vysušeny po odvětrání v digestoři byly zváženy ( $m_1$ ). Do sáčku bylo naváženo 0,5g vzorku s přesností 0,0001g ( $m_2$ ) a filtrační sáček byl zataven. Po zatavení sáčku byl poklepáním vzorek rozprostřen na celou plochu uzavřeného sáčku. Byl ponechán jeden prázdný sáček (slepý pokus), který byl použit pro stanovení korekcí ( $c_1, c_2$ ).

Všechny sáčky byly umístěny do zavěšovače po třech do jednoho oddílu. Poslední oddíl zůstal prázdný, sloužil jako víko a bylo na něj položeno závaží. Zavěšovač se vzorky byl umístěn do analyzátoru vlákniny (ANKOM 200/220 Fiber analyzer). Do přístroje byl nalit pracovní roztok neutrálně-detergentního činidla (dále jen NDČ) v množství 100 ml/sáček, nejméně však 1500 ml. Bylo zapnuto míchání a topení. Po zavření a utěsnění víka byl přístroj zapnut. Po 75 minutách bylo vypnuto míchání a ohřev, byl otevřen vypouštěcí kohout a bylo otevřeno víko přístroje.

Po vypuštění NDČ roztoku byl uzavřen vypouštěcí kohout a do přístroje byly nality 2 l horké (85-90 °C) vody, do které byly přidány 4 ml  $\alpha$ -amylázy. Bylo zapnuto míchání a ohřev na 4 minuty, ale víko se neutahovalo. Tento postup byl opakován dvakrát.

Při třetím propláchnutí byla použita studená voda bez  $\alpha$ -amylázy. Po vypuštění vody byl zavěšovač vytáhnout z přístroje, sáčky byly vyjmuty a voda z nich byla jemně vymačkána pomocí filtračního papíru.

Sáčky byly vloženy do kádinky a přelity acetonem. Po 3 minutách byly vyjmuty a aceton byl jemně vytlačen pomocí filtračního papíru. Sáčky byly rozprostřeny na suchý filtrační papír a nechány vyvětrat v digestoři. Poté, co aceton vytěkal, byly sušeny v sušárně při 105 °C po dobu 3 hodin.

Po vysušení a vychladnutí v exsikátoru byly sáčky zváženy ( $m_3$ ), vloženy do vyžíhaných a zvážených porcelánových kelímků a spáleny v muflové peci při 550 °C po dobu 5 hodin. Po ochlazení v exsikátoru byly kelímky znovu zváženy ( $m_4$ ). [18, 19]

### **Chemikálie:**

#### **1. *Roztok neutrálně-detergentního činidla:***

Složení činidla:

Chelaton III (sodná sůl kyseliny etyldiaminotetraoctové),

Tetraboritan sodný dekahydrát

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát

Laurylsulfát sodný

Ve 2 l destilované vody se rozpustí 120 g činidla, 20 ml trietylglykolu. Roztok má mít pH v rozmezí 6,9-7,1.

## 2. Pracovní roztok NDČ (laurylsulfát sodný v neutrálním prostředí):

Do 2 l NDČ se přidá siřičitan sodný v množství 1 g / 100 ml NDČ a  $\alpha$ -amyláza v množství 0,2 ml/100 ml NDČ.

## 3. Aceton

### Výpočet korekcí:

$$c_1 = \frac{m_s}{m_1}$$

$$c_2 = \frac{m_p}{m_1}$$

Kde:

$m_s$  je hmotnost prázdného vysušeného sáčku po hydrolýze (g)

$m_p$  je hmotnost popela prázdného sáčku (g).

### Výpočet obsahu NDF:

$$V = \frac{(m_3 - m_1 c_1) - (m_4 - m_1 c_2)}{m_2} * 100$$

Kde:

V je obsah NDF (%)

$m_1$  je hmotnost sáčku (g)

$m_2$  je hmotnost navážky vzorku (g)

$m_3$  je hmotnost vysušeného sáčku s rezidui vzorku po hydrolýze (g)

$m_4$  je hmotnost popela po spálení vysušeného sáčku s rezidui vzorku po hydrolýze (g)

$c_1$  je korekce hmotnosti sáčku po hydrolýze (g)

$c_2$  je korekce hmotnosti sáčku po spálení (g)

## 7.4 Chromatografie

### 7.4.1 Analýza aminokyselin rostliny měsíčku lékařského pomocí iontovýměnné chromatografie

Pro analýzu aminokyselin pomocí automatického analyzátoru aminokyselin (dále jen AAA) byly použity vzorky I, II, III a IV.

AAA je určen pro stanovení aminokyselin v hydrolyzátech bílkovin, peptidů, pro stanovení volných aminokyselin ve fyziologických roztocích a extraktech a pro stanovení biogenních aminů. Díky tomu nachází analyzátor uplatnění v základním biochemickém výzkumu bílkovin, výzkumu výživy lidí a zvířat, v lékařské diagnostice, při kontrole léčiv a potravin.

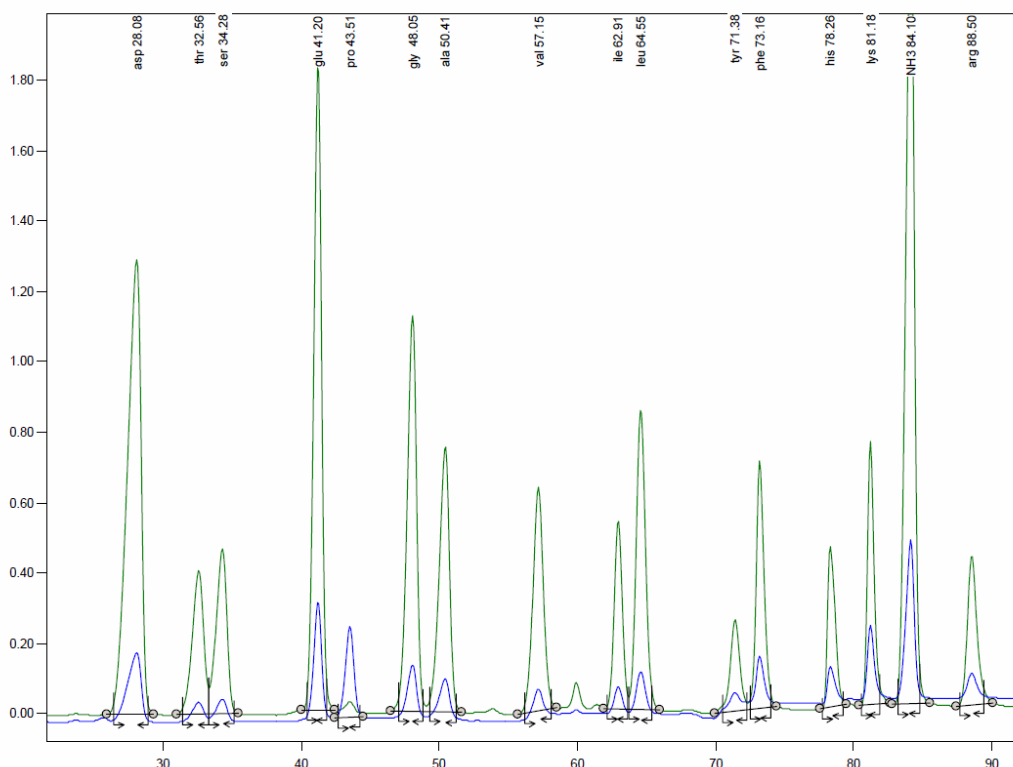
Přístroj pracuje na principu středotlaké kapalinové chromatografie s ionexovou kolonou, ninhydrinovou derivatizací a fotometrickou detekcí.

Všechny procesy přístroje včetně vyhodnocení výsledků a tvorby protokolu řídí počítač.[18, 20]

Na obrázku (obr. 16) je zachyceno dělení směsi aminokyselin na katexovém iontoměničči. Aminokyseliny jsou příslušnými pufrů eluovány z kolony. Směs aminokyselin na chromatogramu je výsledkem kyselé hydrolýzy proteinu. Částečně jsou rozloženy serin (Ser) a threonin (Thr), a proto nemohou být po kyselé hydrolýze kvantifikovány.

Aminokyseliny jsou z kolony eluovány v pořadí od polárnějších k nepolárním a od negativně nabitých (kyselých) k těm, které mají náboj pozitivní. Aminokyseliny eluátu jsou bezbarvé. K jejich zviditelnění, případně stanovení, se využívá reakce s ninhydrinem. Identifikovat jednotlivé aminokyseliny lze použitím standardů aminokyselin, které se nanesou na kolonu a určí se objem pufru nutný k eluci (eluční objem). Poté porovnáme eluční objemy standardu a směsi.[18, 21]





Obr.16 Dělení aminokyselin[18]

#### 7.4.1.1 Příprava vzorků pro stanovení volných aminokyselin

Bylo odváženo množství vzorku s přesností na 0,0001 g. Navážka vzorku byla kvantitativně převedena do hydrolyzační baňky, byl přidán dostatečný objem kyseliny chlorovodíkové ( $c = 6 \text{ mol/l}$ ), tj. asi 150 až 250 ml na 1 g navážky a kroužením byl obsah promíchán. Kyselá hydrolyza byla provedena ve varných baňkách pod zpětným, vzdušným chladičem v olejové lázni při teplotě 110 až 115 °C po dobu 23 hodin.

Po ukončení hydrolyzy byl obsah hydrolyzační baňky zfiltrován přes filtrační papír (390) a kvantitativně kyselinou chlorovodíkovou ( $c = 0.1 \text{ mol/l}$ ) převeden do odměrné baňky (250 ml). Filtrát byl doplněn 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou po rysku.

Z filtrátu byl odebrán alikvotní podíl (25 ml), který byl odpařen na rotační vakuové odparce (RVO 400, Ingos, Praha) do sirupovité konzistence při teplotě do 50 °C. Sirupovitý odpařek byl rozpuštěn v několika ml destilované vody a znovu odpařen a pak ještě jednou rozmíchán v několika ml destilované vody a znovu odpařen. Odpařek byl kvantitativně převeden do odměrné baňky (10ml) pomocí tlumivého roztoku o  $\text{pH} = 2,2$  a doplněn po rysku. Takto upravený vzorek byl použit k analýze na AAA. [18]

**Chemikálie:**

Použité chemikálie byly v čistotě p.a.

kyselina chlorovodíková

destilovaná voda

**7.4.1.2 Příprava vzorků pro stanovení sirných aminokyselin**

**Příprava oxidační směsi:** Oxidační směs byla připravena smícháním peroxidu vodíku (30 %) a kyseliny mravenčí (85 %) v poměru 1:9. Po dvou hodinách při laboratorní teplotě byla umístěna do chladničky při teplotě 0°C na dobu 15 minut.[18]

**Hydrolyza:** Bylo odváženo množství vzorku s přesností na 0,0001 g. Navážka vzorku byla kvantitativně převedena do varné baňky. Ke vzorku bylo přidáno 15 ml oxidační směsi a po opatrném rozmíchání byl umístěn do chladničky při teplotě 0 až 4°C na dobu 16 hodin. K oxidovanému vzorku byl pak přidán nejprve 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a po vyšumění dalších 100 – 150 ml kyseliny chlorovodíkové ( $c = 6 \text{ mol/l}$ ). Kyselá hydrolyza byla provedena ve varných baňkách pod zpětným vzdušným chladičem po dobu 23 hodin při teplotě 110 °C od dosažení teploty. Po ukončení hydrolyzy byl obsah hydrolyzační baňky kvantitativně převeden kyselinou chlorovodíkovou ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ) přes filtrační papír (390) do odměrné baňky (250 ml). Baňka byla doplněna kyselinou chlorovodíkovou ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ) po rysku. Z filtrátu byl odebrán alikvotní podíl (50 ml), který byl odpařen na rotační vakuové odparce RV-05-ST (Ika Werke, Německo) do sirupovité konzistence při teplotě do 50°C. Sirupovitý odparek byl rozpuštěn v několika ml vody a znovu odpařen – tento proces byl opakován ještě jednou. Odparek byl následně kvantitativně převeden do odměrné baňky (10 ml) a doplněn tlumivým roztokem o pH 2,2 po rysku. Takto upravený vzorek byl použit k analýze na AAA.[18]

**Chemikálie:**

Použité chemikálie byly v čistotě p.a.

peroxid vodíku 30 %

kyselina mravenčí 85 %

kyselina chlorovodíková

destilovaná voda

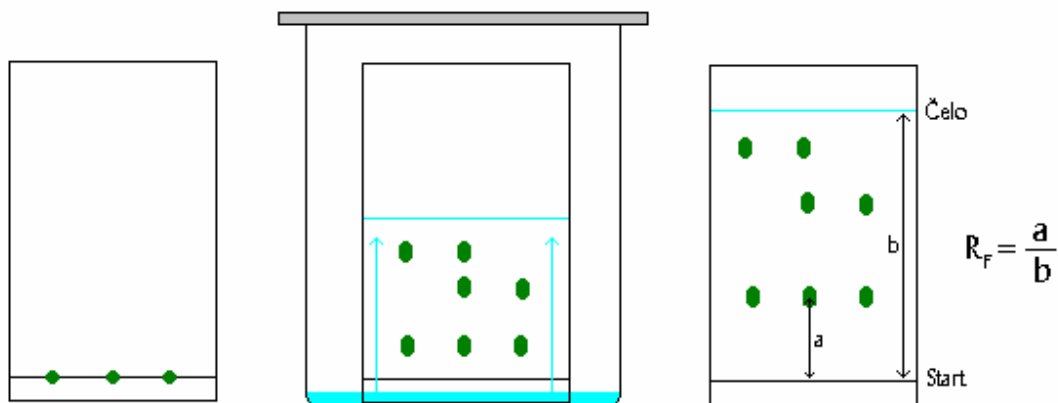
pufr pH 2,2

#### 7.4.2 Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí chromatografie na tenké vrstvě

K chromatografickému procesu na tenké vrstvě dochází při průtoku mobilní fáze tenkou vrstvou jemnozrnného sorbentu nebo nosiče zakotvené fáze, který je rozprostřen a buď volně uložen (nasypán), nebo fixován na vhodné podložce. Podložkou je buď skleněná deska, nebo hliníková, popř. plastová fólie. Tenké vrstvy se připravují v laboratoři nebo se používá hotových komerčních desek nebo fólií s nanesenou tenkou vrstvou. Vzorek se nanesne na start a po odpaření rozpouštědla se deska uloží v komoře s mobilní fází na dně a vyvíjí se vzestupně nebo horizontálně. Jakmile čelo mobilní fáze dosáhne potřebné vzdálenosti, chromatogram vyjmeme a po vysušení provedeme detekci. Pro každou látku je na chromatogramu opět charakteristická její poloha, vyjádřená hodnotou  $R_F$  (retardation factor). [18, 22]

##### 7.4.2.1 Vyhodnocení chromatogramů pomocí hodnot $R_F$

Každá sloučenina má v daných podmínkách charakteristickou rychlost migrace, určující její polohu na chromatogramu. K vyjádření rychlosti migrace se používají tzv. hodnoty  $R_F$ . Je to poměr vzdálenosti středu (těžiště) skvrny od startu a vzdálenosti čela rozpouštědla od startu (viz. obr. 17). To znamená, že se hodnoty  $R_F$  pohybují od 0 do 1; pro látky u startu se blíží nule, pro látky u čela se blíží jedné. Když nelze zjistit čelo rozpouštědla (např. při vyvíjení na přečtení), používají se tzv. hodnoty  $R_X$ ; vyjadřují polohu látky k látce X, jejíž  $R_F$  jsme položili rovno 1. Místo indexu X se potom uvádí název nebo zkratka této látky, např.  $R_{Glc}$ .  $R_X$  je tedy poměr vzdálenosti určité látky od startu a vzdálenosti látky X od startu. [18, 22]



Obr.17 Dělení látek na chromatogramu[18]

Hodnoty  $R_F$  by sice měly být při přesném dodržování experimentálních podmínek reprodukovatelné, avšak ovlivňuje je tolik faktorů (teplota, změny ve složení mobilní fáze, způsobené chybami v odměřování nebo jejím stárnutím, obsah zakotvené fáze v papíře, vzdálenost startu od hladiny rozpouštědla, druh atd.), že při praktickém provádění chromatografie vždy kolísají. Proto je nikdy nelze považovat za konstanty. Při praktické analýze relativně nejméně vadí, mění-li se hodnoty  $R_F$  všech látek na chromatogramu stejným způsobem, takže zůstává zachováno dělení. U sloučenin různého typu se však mohou hodnoty  $R_F$  měnit různým směrem, takže může dojít až ke změně v pořadí skvrn na chromatogramu.

Přes tyto nedostatky má používání a udávání  $R_F$  svůj význam:

- a) při jednorázové analýze. Jedná-li se třeba jen o jedinou látku, má význam dokumentační, neboť nás informuje o přibližném chování dané sloučeniny v použité soustavě.
- b) při vypracovávání nových metod. Tabulka hodnot  $R_F$  ukazuje vhodnost soustavy a účinnost i zákonitost dělení uvnitř skupiny.
- c) při zpracovávání tabulek hodnot  $R_F$  pro velké skupiny látek. Hodnoty  $R_F$  třeba několika set sloučenin nelze získat z jednoho chromatogramu. [18, 22]

#### 7.4.2.2 Denzitometrické vyhodnocení vybraných chromatogramů

Denzitometrie se zabývá měřením optické hustoty. K vyhodnocení hustoty zbarvení v plošném uspořádání se používá optických denzimetřů. Jedná se postup podobný fotometrickému měření, liší se v uspořádání. Měřením intenzity záření odraženého od neprůhledné podložky se zabývá reflexní denzitometrie.

Při této technice se sleduje odražené záření od homogenně zbarvené podložky. Reflexní fotometry se používají pro kvantitativní vyhodnocení reakcí probíhajících na pevné fázi se suchými činidly po jejich aktivaci vodou obsaženou v měřeném vzorku. Na principu reflexní fotometrie jsou také založeny denzitometry pro kvantitativní hodnocení chromatogramů na tenké vrstvě nebo obarvených elektroforeogramů na neprůhledných nosičích.[18, 24]

Při přímé denzitometrii se získává grafický záznam fotometrovaného úseku, jednotlivé frakce dělené směsi tvoří na záznamu v ideálním případě souměrné křivky zvonovitého tvaru. Plocha těchto píků připadajících jednotlivým frakcím je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi.[18,23]

#### 7.4.2.3 *Materiál a přístroje pro chromatografii na tenké vrstvě*

Na rozdělení jednotlivých látek byly použity chromatografické desky ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>. Na start byly vzorky dávkovány v množství 3 x 3,5 µl. Po vyjmutí z lázně a vysušení byly desky pozorovány na denní světlo, kde byly zaznamenány barevné skvrny a dále pod UV lampou při 254nm a 366nm a následně u vybraných desek byla prováděna detekce pomocí denzimetru (Camag TLC-Scanner II). [18]

Příslušná rozpouštědla uvedená v tabulce (tab. 3) byla v čistotě p.a. a voda byla destilovaná. Pro rozdělení látek pomocí tenkovrstvé chromatografie byly použity následující vyvíjecí soustavy:

Tab.3 Soustavy pro dělení látek pomocí TLC

Soustava	Vyvíjecí soustava	Poměr použitých látek
1	Chloroform : MeOH : voda	13:7:2
2	MeOH : voda	2:1
3	n-hexan : etylacetát	4:1
4	Toulen : etylacetát : MeOH : voda	9:1:5:5
5	Chloroform : MeOH : amoniak	13:7:1
6	Etylacetát : cyklohexan : voda	60:40:1
7	Etylacetát : cyklohexan	9:1
8	Chloroform : kyselina octová	5:2
9	Toulen : MeOH : voda	10:5:5

Soustava	Vyvíjecí soustava	Poměr použitých látek
10	Chloroform : MeOH	13:7
11	Etylacetát : cyklohexan	4:1
12	Hexan : dietylether	1:1
13	Benzen : etylacetát : kyselina octová	75:25:1
14	Chloroform : EtOH	15:5
15	MeOH : voda	1:2
16	Chloroform	
17	Chloroform : EtOH : kyselina octová : voda	34:6:4:1
18	Aceton : isopropylalkohol	1:1
19	Chloroform : aceton	16:9
20	MeOH	
21	Benzen : etylacetát : kyselina octová	50:50:1
22	Hexan : aceton	15:10
23	Aceton	
24	Aceton : EtOH	15:10
25	MeOH : amid kyseliny mravenčí	1:1

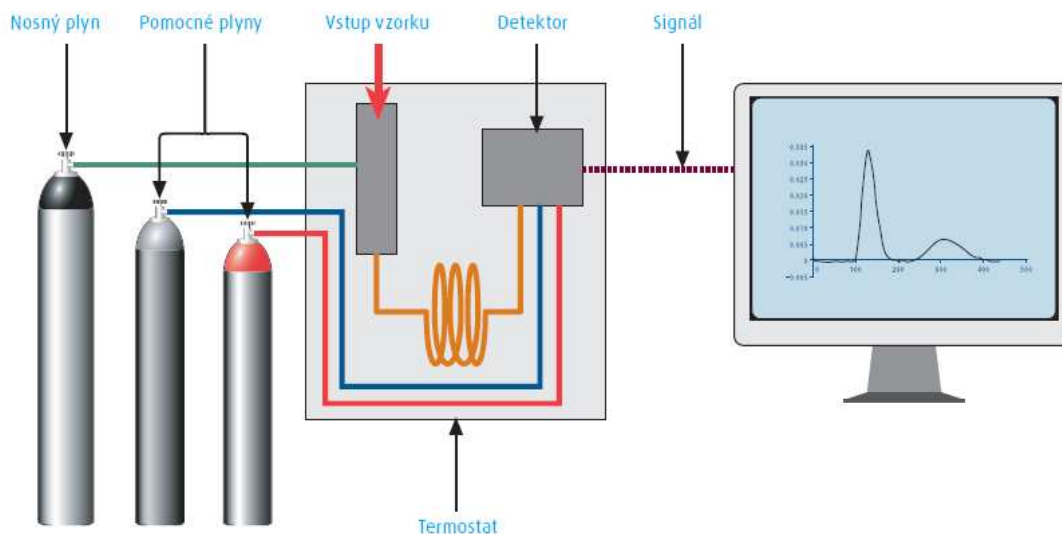
### 7.4.3 Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí plynové chromatografie

Chromatografie je proces umožňující dělení směsí na jednotlivé složky. Takto může být každá složka ve vzorku identifikována (kvalitativně) a zároveň změřena (kvantitativně). Je několik druhů chromatografických technik, plynová chromatografie (dále jen GC) je jednou z nich. GC se používá pro směsi, které jsou teplotně stálé a zároveň těkavé (nebo mohou být na těkavé přeměněny). Díky jednoduchosti, citlivosti a účinnosti při oddělování složek je GC jedním z nejdůležitějších nástrojů v analytické chemii.

Prvním krokem při použití metody GC je odpaření vzorku v temperovaném dávkovacím zařízení (injektoru), následuje oddělení jednotlivých složek směsi v chromatografické koloně, detekce každé složky a její vyhodnocení.

Přístroj se skládá z dávkovacího zařízení, chromatografické kolony umístěné v termostatu, detektoru a systému na zpracování dat (nebo integrátoru, popřípadě zapisovače). Nosný plyn protéká kolonou kontrolovanou rychlostí nebo při kontrolovaném tlaku do detektoru.

Stanovení se provádí buď při konstantní teplotě, nebo podle daného teplotního programu.



Obr.18 Schéma plynové chromatografie[27].

Vzorek z injektoru je zaveden do proudu nosného plynu, který protéká kolonou se stacionární fází umístěnou v termostatu. Kolony mohou být náplňové nebo kapilární. Při průtoku plynu kolonou se jednotlivé složky směsi pohybují různými rychlostmi ovlivněnými mírou interakce se stacionární fází. V důsledku toho se jednotlivé složky směsi oddělují a při výstupu z kolony mohou být kvantifikovány vhodným detektorem a/nebo zachyceny pro další analýzy.

Obvykle se používají plamenoionizační detektory (dále jen FID), ale podle účelu analýzy mohou být použity i další detektory: elektronového záchytu, dusíko-fosforový, hmotnostní spektrometr (dále jen MS), tepelně vodivostní, spektrofotometr v infračervené oblasti s Fourierovou transformací a jiné. [27, 28]

#### 7.4.3.1 Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID

##### **Princip:**

Metoda je založena na zmýdelnění glyceridů a fosfolipidů a na následné esterifikaci volných mastných kyselin v alkalickém prostředí metanolu. Metylestery mastných kyselin se po extrakci do heptanu stanoví GC s využitím FID. [29]

##### **Příprava nasyceného roztoku NaCl**

Ve 100 ml destilované vody bylo za mírného zahřívání rozpuštěno 160 g NaCl. Po ochlazení vypadnou na dně baňky krystaly NaCl.[29]

### **Příprava metylesterů mastných kyselin**

Do 250 ml baňky s kulatým dnem bylo naváženo přibližně (s přesností na 4 desetinná místa) 1,5 g vzorku po přidání 15 ml 0,5 M metanolického roztoku NaOH. Byla baňka 15 min zahřívána na topném hnízdě pod zpětným chladičem, poté bylo přidáno 6 ml heptanu a směs byla zahřívána ještě 1 minutu. Po vypnutí topného hnízda byl přidán nasycený roztok NaCl a obsah baňky byl krouživým pohybem promíchán. Pak byl obsah baňky převeden do odměrného válce a byl přidán další nasycený roztok NaCl, aby heptanová vrstva vystoupila a bylo ji možno odsát. Povychladnutí a rozzdělení vrstev bylo pipetou odebráno cca 1,5 ml horní vyčěrené heptanové vrstvy do vialky pro stanovení.[29, 30]

Pro stanovení byl použit GC-FID s detektorem Shimadzu GC-FID 2010 a kolona Supelco SPB<sub>TM</sub>-PUFA 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm. Jako nosný plyn bylo použito helium. Analýza byla prováděna v režimu konstantní lineární rychlosti 38 cm/s. Teplotní program byl následující: start při 80 °C po dobu 1 minuty s následným zvýšením 40 °C/min na teplotu 250°C, která byla udržována po dostatečně dlouhou dobu. FID byl nataven na 250 °C Pro určení mastných kyselin byl použit standart Food industry FAME Mix 30mg/ml in Methylene Chloride (katalogové číslo 35077). Všechny integrace a výpočty byly prováděny v programu GCsolution Software.

#### **Chemikálie:**

Použité chemikálie byly v čistotě p.a.

Metanol

NaOH – 0,5 M roztok v metanolu

NaCl

Heptan

Destilovaná voda

#### **7.4.3.2 Stanovení látek v heptanovém extraktu pomocí GC-MS**

Postup práce byl shodný jako v kapitole 7.4.3.1 Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID. Pro stanovení byl použit GC s kvadrupólovým hmotnostním detektorem Shimadzu GC-MS QP2010 a kolona Equity-1 30m × 0,32mm × 1μm. Jako nosný plyn bylo použito helium. Analýza byla prováděna v režimu konstantní lineární rychlosti 38 cm/s. Teplotní



program byl následující: start při 100 °C podobu 5 minut s následným zvýšením 25 °C/min na teplotu 250 °C, která byla udržována po dostatečně dlouhou dobu. Iontový zdroj 200 °C, 70 event. Pro určení látek byla použita MS knihovna NIST 02. Všechny integrace a výpočty byly prováděny v programu GCsolution Software.

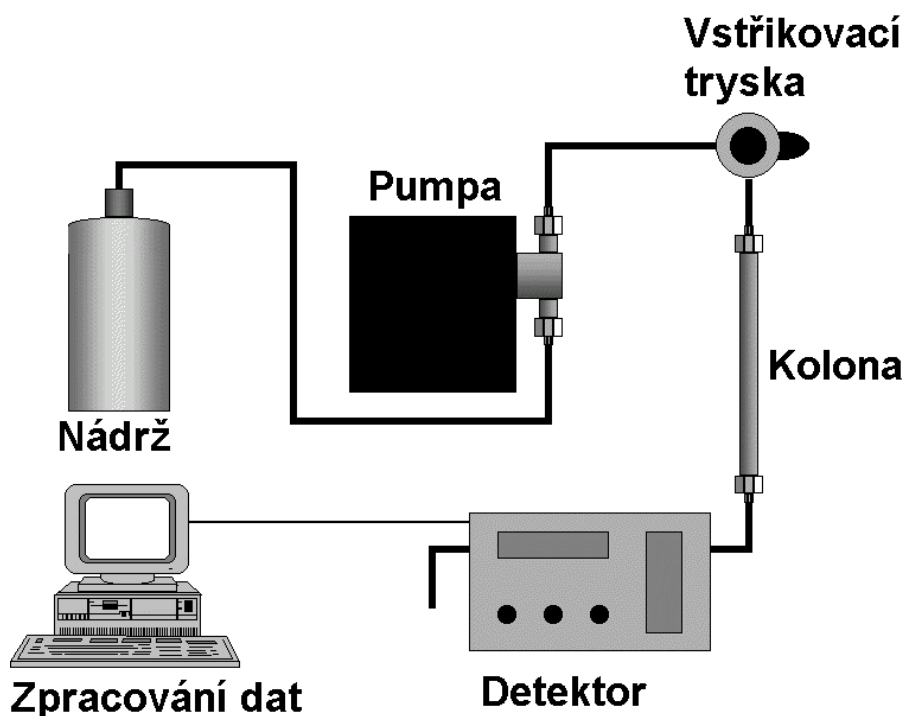
#### 7.4.3.3 Stanovení těkavých látek pomocí GC-MS headspace analýzy

**Postup:** Do vialky bylo naváženo cca 0,5g vzorku. Poté byl vzorek umístěn do auto-sampléru, zahříván na teplotu 55°C po dobu 20 minut a poté byl odebrán vzorek.

Pro stanovení byl použit GC s kvadrupólovým hmotnostním detektorem Shimadzu GC-MS QP2010 a kolona Equity-1 30m × 0,32mm × 1µm. Jako nosný plyn bylo použito helium. Analýza byla prováděna v režimu konstantní lineární rychlosti 38 cm/s. Teplotní program byl následující: start při 100 °C podobu 5 minut s následným zvýšením 25 °C/min na teplotu 250 °C, která byla udržována po dostatečně dlouhou dobu. Iontový zdroj 200 °C, 70 event. Pro určení látek byla použita MS knihovna NIST 02.

#### 7.4.4 Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí kapalinové chromatografie

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika HPLC. Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky a to „high performance liquid chromatography“ (vysokoučinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf.



Obr.19 Schéma HPLC[31]

Vysokotlaká bezpulzní pumpa zajišťuje průchod mobilní fáze kolonou. Vzorek je dávko-  
ván do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky nebo pomocí automatického dáv-  
kovače. Vzorek putuje do kolony. Zpravidla se jedná o nerezovou trubici o vnitřním prů-  
měru okolo 4 mm a délce typicky 5-25 cm, která je naplněna stacionární fází. O schopnosti  
kolony separovat určité směsi na jednotlivé složky opět rozhoduje zejména typ stacionární  
fáze zakotvené na silikagelovém nosiči. Separované látky následně putují na detektor.  
V metodě HPLC je dostupná opět řada různých detektorů, které se liší principem funkce,  
konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Meto-  
da HPLC využívá tyto typy detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluo-  
rescenční detektor, MS, refraktometrický detektor a další. Volba detektoru opět závisí na  
konkrétní aplikaci.

Metoda HPLC existuje jako tzv. „normální“ a „reversní“.

Při normální HPLC je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Při reversní HPLC je  
naopak stacionární fáze méně polární než fáze mobilní.[32]

Při praktickém provádění analytiky pomocí HPLC je nutno se velice striktně držet již vy-  
pracovaných metod včetně takových detailů, jako je použití chemikálií a kolonek od kon-  
krétního výrobce. Metody bývají také zpravidla vypracovány pro určitý okruh materiálů a u

jiných je nutno změnit alespoň úvodní čištění vzorků. Nevýhodou je také značná materiálová náročnost plynoucí z nákladů na pořízení a provoz přístroje.

Hlavním problémem vysokotlaké kapalinové chromatografie jsou ztráty při čištění. Mohou se měnit podle použité metody i analyzovaného materiálu.[33]

#### *7.4.4.1 Stanovení látek rostlin měsíčku lékařského rozdělených na TLC pomocí LC-MS*

##### **Postup:**

Po rozdělení látek na TLC byla skvrna o  $R_F=0,35\pm 0,02$  ze soustavy 13 seškrabána do vialky. Následně do vialky byl přilít MeOH jako rozpouštědlo pro obsaženou látku a vialka byla 1 minutu protřepávána. Poté byl extrakt nasán do stříkačky, přefiltrován přes mikrofiltr do čisté vialky a dán na stanovení.

Rozdělení látek proběhlo na přístroji Dionex UltiMate 3000 Standard LC Systéme [34] a detekce byla prováděná na detektoru Bruker amaZon 3 [35]. Jako mobilní fáze byl použit MeOH.

##### **Chemikálie:**

MeOH p.a.

## 8 MATEMATICKO – STATISTICKÉ METODY VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ

K matematicko-statistickému vyhodnocení dat byly použity následující statistické metody:

### 8.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je definován jako součet všech hodnot vydělený jejich počtem. [25]

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

### 8.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka se obvykle definuje jako odmocnina z rozptylu náhodné veličiny X, tzn.

$$\sigma = \sqrt{D(X)} = \sqrt{\text{var}(X)}$$

kde  $D(X)$  označuje rozptyl náhodné veličiny X. Směrodatnou odchylku lze vypočítat pomocí střední hodnoty  $E(X)$  a případně i  $E(X^2)$ .

$$\sigma = \sqrt{E((X - E(X))^2)}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} = \sqrt{\left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i^2\right) - \bar{x}^2}$$

[26]

### 8.3 Korelační koeficient

Chceme-li posoudit, je-li variabilita malá nebo velká, porovnáme směrodatnou odchylku s průměrem. [26]

$$v_x = \frac{s_x}{x} \cdot 100[\%]$$

## 9 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 9.1 Stanovení obsahu látek rozpustných v nepolárním rozpouštědle

Měření bylo provedeno za účelem zjištění a nastavení vhodných parametrů pro stanovení na plynovém chromatografu. Celkově lze říct, že sušená droga obsahuje  $10,57 \pm 2,04$  % látek extrahovatelných v nepolárním rozpouštědle (Tab. 4). Na první pohled lze také říct, že vzorky vypěstované v Bystřici (Vzorek I a II) mají o skoro 30 % více takto extrahovatelných látek, než vzorky původem z Březnice (Vzorek II a IV), ale z důvodů nedostatku hodnot nelze toto statisticky potvrdit.

Tab.4 Obsah látek rozpustných v nepolárním rozpouštědle.

Vzorek	Navážka (g)	Hmotnost vyextrahovaných látek (g)	Obsah vyextrahovaných látek vztahovaný na navážku (%)
I	1,8852	0,2226	<b>11,81</b>
II	1,4129	0,1652	<b>11,69</b>
III	1,5161	0,1244	<b>8,21</b>
IV	1,5086	0,1283	<b>8,50</b>

### 9.2 Stanovení neutrálně-detergentní vlákniny

Vláknina byla stanovena dle metodiky popsané v kapitole 7.3. Ke stanovení byly použity vzorky I, II, III. Stanovení bylo u každého vzorku prováděno 3x vedle sebe. Výsledky byly vypočteny a zaneseny do tabulky č.5. a pro lepší názornost vyneseny do grafu (Obr. 20). Z výsledků vyplývá, že sušená droga obsahuje  $20,78 \pm 3,05$  % NDF. Nejvíce NDF měl vzorek I, následoval vzorek II a III. Porovnáním průměru vzorků z Bystřice (Vzorek I a II) a vzorek z Březnice (Vzorek III), lze říct, že vzorky z Bystřice obsahují o 20 % více NDF než vzorek z Březnice.

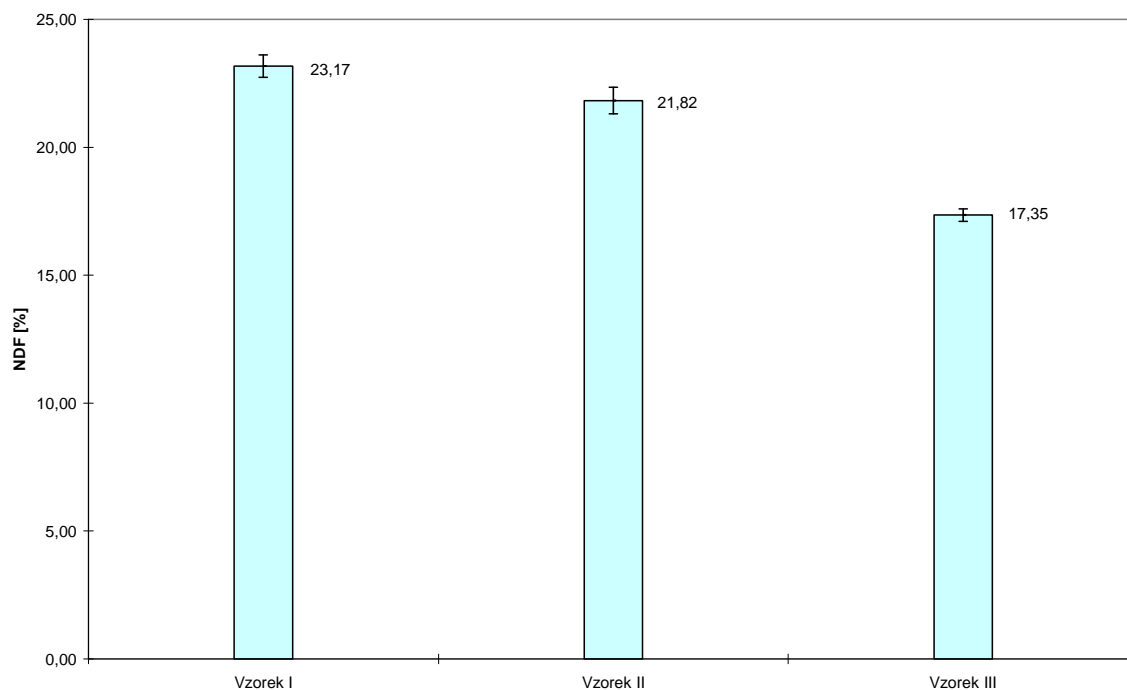
Tab.5 Výsledky stanovení NDF u vzorků I, II, III.

Vzorek	$m_1$ (g)	$m_2$ (g)	$m_3$ (g)	$m_4$ (g)	$c_1$	$c_2$	NDF (%)
I A	0,4575	0,2572	0,5209	0,0066	0,06222	0,002268	23,31
I B	0,4570	0,3129	0,5344	0,0066	0,07622	0,002273	23,63
I C	0,4620	0,2798	0,5299	0,0079	0,06671	0,003526	22,58

Vzorek	$m_1$ (g)	$m_2$ (g)	$m_3$ (g)	$m_4$ (g)	$c_1$	$c_2$	NDF (%)
II A	0,4599	0,3165	0,5342	0,0072	0,07311	0,002845	22,20
II B	0,4583	0,3075	0,5281	0,0081	0,06862	0,003761	21,09
II C	0,4509	0,303	0,5237	0,0087	0,07164	0,004431	22,18
III A	0,4558	0,3763	0,5246	0,0075	0,06762	0,003184	17,12
III B	0,4576	0,3335	0,5183	0,0064	0,05952	0,002067	17,26
III C	0,4578	0,3303	0,5187	0,0056	0,05972	0,001265	17,70

	$m_1$ (g)	$m_s$ (g)	$m_p$ (g)
Prázdný filtrační sáček	0,4647	0,4659	0,0044

	Průměr NDF v %	Směrodatná odchylka	Korelační koeficient
<b>Vzorek I</b>	<b>23,17</b>	0,44	14,66
<b>Vzorek II</b>	<b>21,82</b>	0,52	17,27
<b>Vzorek III</b>	<b>17,35</b>	0,25	8,31



Obr.20 Zastoupení NDF ve vzorcích

## 9.3 Chromatografie

### 9.3.1 Analýza aminokyselin rostliny měsíčku lékařského pomocí iontovýměnné chromatografie

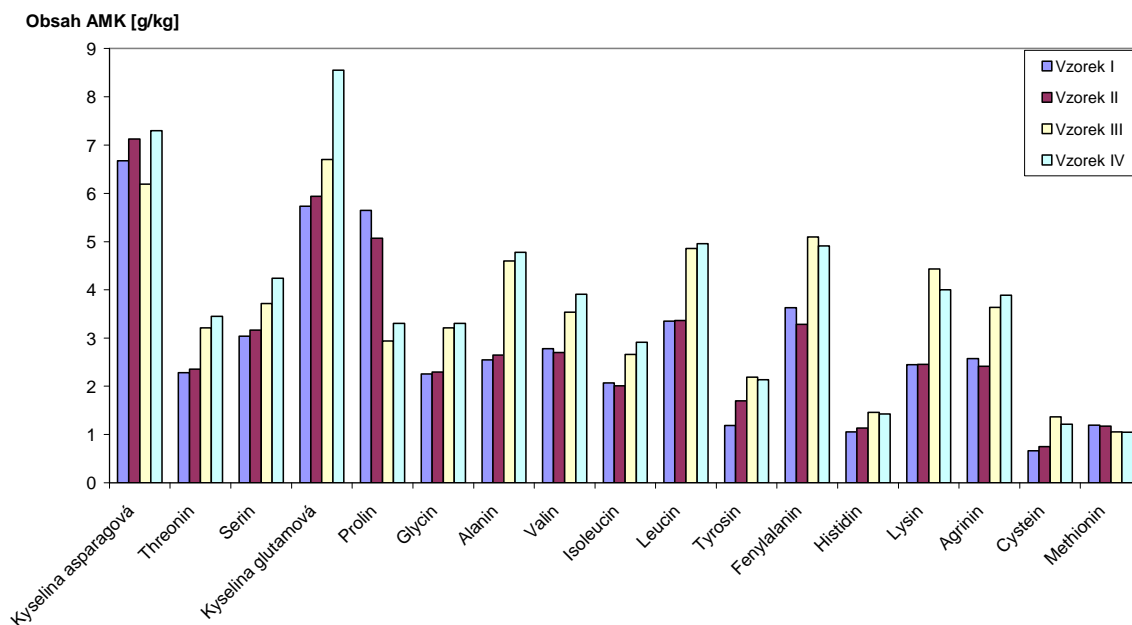
Byla provedena analýza aminokyselin pomocí AAA dle metodiky popsané v kapitole 7.4.1. Analýza byla provedena 2x vedle sebe u každého vzorku na stanovení volných aminokyselin a jednou při stanovení sirných aminokyselin. Navážky vzorků k analýze jsou uvedeny v tabulce 6, výsledky hydrolýzy jsou uvedeny v přílohách (PI: Tabulka obsahu aminokyselin ve vzorcích). V přílohách se nachází i grafy, kde je znázorněn obsah AMK se směrodatnou odchylkou pro každý vzorek zvlášť (PII: Obsahy aminokyselin ve vzorcích). Pro lepší názornost byl zpracován graf (Obr. 21), kde je porovnání obsahů aminokyselin v měřených vzorcích.

Průměrně měla sušená droga  $51,12 \pm 6,34$  g AMK na 1 kg sušiny. Z grafu lze vyčíst, že nejvíce AMK obsahoval vzorek IV, po něm následovaly vzorky III, II a I. Při porovnání průměrů vzorků z Bystřice ( $47,46 \pm 0,255$  g/kg) a průměrů vzorků z Březnice ( $60,76 \pm 3,274$  g/kg) bylo zjištěno, že vzorky z Březnice (Vzorek III a IV) obsahovaly o 20 % AMK více než vzorky z Bystřice (Vzorky I a II). Co do obsahu jednotlivých AMK vzorky I a II převyšují obsahem AMK vzorky III a IV jen u prolinu a methioninu. U kyseliny asparagové je pořadí následující: vzorek IV, vzorek II, vzorek I a vzorek III. Kyselina asparagová je jediná AMK, u které se průměrné obsahy AMK střídaly a netvořily dvojice vzorků Bystřice-Bystřice, Březnice-Březnice.

Tab.6 Navážky vzorků na analýzu aminokyselin

Kyselá hydrolýza			Oxidativní hydrolýza		
Vzorek	Značení vzorku	Navážka (g)	Vzorek	Značení vzorku	Navážka (g)
I	I A	0,1515	I	I O	1,1058
	I B	0,1507			
II	II A	0,1497	II	II O	1,0809
	II B	0,1590			
III	III A	0,1570	III	III O	1,0681
	III B	0,1589			
IV	IV A	0,1570	IV	IV O	1,0597
	IV B	0,1589			

Vzorek	Značení vzorku	Navážka (g)
IV	IV A	0,1551
	IV B	0,1533



Obr.21 Srovnání obsahů aminokyselin ve vzorcích

### 9.3.2 Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí chromatografie na tenké vrstvě

Pomocí TLC byly rozdělovány extrakty uvedené v tabulce 2. Z použitých soustav z kapitoly 7.4.2 tabulky 3 se látky nejlépe dělily na soustavě 5 (chloroform:MeOH:amoniak 13:7:1) a soustavě 13 (benzen:etylacetát:kys. octová 75:25:1). Na zbývajících soustavách buď látky zůstaly na startu, putovaly s čelem nebo nedošlo k dostatečnému rozdělení. Tenké vrstvy se soustavou 5 a 13 byly následně vizuálně a denzitometricky vyhodnoceny. Fotografie desek s rozdělenými látkami se nacházejí v přílohách (PIII: Fotografie rozdělených látek na soustavě 5, PIV: Fotografie rozdělených látek na soustavě 13). Záznamy z denzitometrického vyhodnocení se nacházejí rovněž v přílohách (PV: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 5, PVI: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 13). V tabulce 7 se nacházejí  $R_F$  hodnoty rozdělených látek na soustavě 5 a v tabulce 8 jsou  $R_F$  hodnoty rozdělených látek na soustavě 13.





Na desce se soustavou 13 byly charakteristické látky s hodnotou  $R_F=0,92$ , které byly detekovány jen u extraktu 1 a 3 a to jen u vzorků I a II extrahovaných etanolem při bodu varu rozpouštědla. Jak bylo zmíněno výše, látky s  $R_F=0,36 \pm 0,01$  byly detekovány u všech extraktů a mohou mít souvislost s látkou detekovanou na soustavě 5 s  $R_F=0,78 \pm 0,01$  a vodné extrakty neobsahují látky s  $R_F>0,60$  (vyjimku tvoří extrakt 7 s  $R_F=0,87$ ).

Tab. 8. Dělení látek na soustavě 13

	Vzorek									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$R_F$	0,92		0,92							
	0,88		0,88			0,88	0,87		0,88	0,88
	0,78		0,78			0,80			0,78	0,78
										0,70
	0,60									0,63
			0,55			0,54	0,53			
	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,36	0,35	0,35
		0,29	0,29					0,28		
		0,23			0,25				0,21	0,24
	0,15	0,15	0,15		0,17	0,15				
				0,10	0,10	0,09	0,09	0,10		0,09
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

### 9.3.3 Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí plynové chromatografie

#### 9.3.3.1 Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID

V lidové medicíně se z měsíčku vyrábí různé oleje a masti založené na nepolárních látkách obsažených v droze (kapitola 3). Tyto látky obsahují především mastné kyseliny, a proto tato část práce se zabývá obsahem mastných kyselin v dostupných vzorcích. Analýza byla prováděna na GC-MS. Jako standart byl použitý Food industry FAME Mix 30mg/ml in Methylene Chloride (katalogové číslo 35077). Výsledné chromatogramy jsou k dispozici v přílohách (PVII: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku I až V). Výsledky jsou rovněž uvedené v tabulkách (Tab. 9, Tab. 10, Tab. 11) a pro lepší názornost jsou vyneseny v grafu (Obr. 22). Z důvodu neostatečné rozdělovací schopnosti kolony ne-

bylo možné určit jednoznačně mastné kyselina o retenčních časech 22,006 a 23,631±0,001, proto jsou uvedeny obě možnosti.

Ve všech vzorcích s výjimkou vzorku I byly detekovány stopové množství krátkých nasycených mastných kyselin (C<sub>4:0</sub>, C<sub>6:0</sub>, C<sub>8:0</sub>). Všechny vzorky obsahovaly nejvíce kyseliny palmitové (32,3 ± 1,69 %), dále následovala kyselina myristová (25,5 ± 4,12 %), u které vzorky z Bystřice (Vzorek I a II) měly v průměru o 25 % více této kyseliny než zbylé vzorky (Vzorek III, IV a V). Třetí v pořadí byla kyselina alfa/gama-linolenová (16,2 ± 3,20 %), u které měly vzorky z Bystřice v průměru o 28 % méně této kyseliny než zbylé vzorky. Čtvrtou v pořadí byla kyselina linolová/linolelaidová (průměrně 12,8 ± 5,9 %), u které měly vzorky z Bystřice v průměru o 58 % méně této kyseliny než zbylé vzorky. Další mastné kyseliny jsou stearová (3,2 ± 1,79 %), laurová (3,1 ± 0,82 %) a arachová (1,7 ± 0,95 %). Ve stopovém množství a s průměrným výskytem byly také detekovány méně obvyklé mastné kyseliny jako kyselina heptadecenová (pouze vzorky z Bystřice), pentadecenová a myristoolejová.

Tab. 9. Zastoupení mastných kyselin ve Vzorku I a Vzorku II

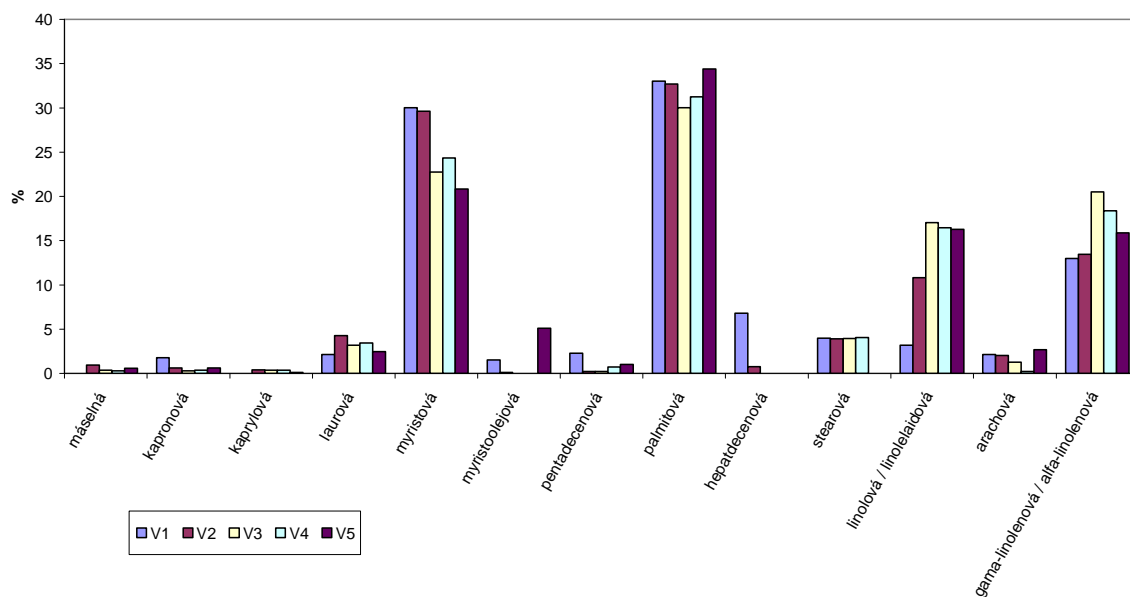
Vzorec	Mastná kyselina	Vzorek I		Vzorek II	
		Retenční čas	%	Retenční čas	%
C4:0	másečná			3,738	1,0
C6:0	kapronová	6,684	1,8	6,686	0,6
C8:0	kaprylová			9,846	0,4
C12:0	laurová	14,460	2,2	14,459	4,3
C14:0	myristová	16,018	30,0	16,019	29,6
C14:1 Δcis-9	myristoolejová	16,266	1,6	16,264	0,1
C15:1 Δcis-10	pentadecenová	17,219	2,3	17,240	0,2
C16:0	palmitová	17,919	33,0	17,920	32,7
C17:1 Δcis-10	heptadecenová	19,532	6,8	19,529	0,8
C18:0	stearová	20,914	4,0	20,914	3,9
C18:2 Δtrans-9,12 / C18:2 Δcis-9,12	linolová / linolelaidová	22,006	3,2	22,006	10,8
C20:0	arachová	22,494	2,2	22,497	2,0
C18:3 Δcis-6,9,12 / C18:3 Δcis-9,12,15	gama-linolenová / alfa-linolenová	23,361	13,0	23,360	13,5

Tab. 10. Zastoupení mastných kyselin ve Vzorku III a Vzorku IV

Vzorec	Mastná kyselina	Vzorek III		Vzorek IV	
		Retenční čas	%	Retenční čas	%
C4:0	máselná	3,741	0,4	3,742	0,3
C6:0	kapronová	6,688	0,3	6,690	0,4
C8:0	kaprylová	9,847	0,4	9,847	0,4
C12:0	laurová	14,460	3,2	14,460	3,4
C14:0	myristová	16,019	22,7	16,020	24,4
C15:1 $\Delta$ cis-10	pentadecenová	17,145	0,2	17,144	0,7
C16:0	palmitová	17,921	30,0	17,922	31,3
C18:0	stearová	20,912	4,0	20,914	4,1
C18:2 $\Delta$ trans-9,12 / C18:2 $\Delta$ cis-9,12	linolová / linolelaidová	22,005	17,0	22,006	16,5
C20:0	arachová	22,498	1,3	22,502	0,2
C18:3 $\Delta$ cis-6,9,12 / C18:3 $\Delta$ cis-9,12,15	gama-linolenová / alfa-linolenová	23,360	20,5	23,362	18,4

Tab. 11. Zastoupení mastných kyselin ve Vzorku V

Vzorec	Mastná kyselina	Vzorek V	
		Retenční čas	%
C4:0	máselná	3,741	0,6
C6:0	kapronová	6,690	0,6
C8:0	kaprylová	9,799	0,1
C12:0	laurová	14,461	2,5
C14:0	myristová	16,019	20,8
C14:1 $\Delta$ cis-9	myristoolejová	16,262	5,1
C15:1 $\Delta$ cis-10	pentadecenová	17,143	1,0
C16:0	palmitová	17,919	34,4
C18:2 $\Delta$ trans-9,12 / C18:2 $\Delta$ cis-9,12	linolová / linolelaidová	22,005	16,3
C20:0	arachová	22,511	2,7
C18:3 $\Delta$ cis-6,9,12 / C18:3 $\Delta$ cis-9,12,15	gama-linolenová / alfa-linolenová	23,360	15,9



Obr.22 Porovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích

### 9.3.3.2 Stanovení látek v heptanovém extraktu pomocí GC-MS

Byla provedena analýza dle metodiky popsané v kapitole 7.4.2.3. Výsledky analýzy pro jednotlivé vzorky jsou uvedené v tabulkách (Tab. 13., Tab.14, Tab. 15, Tab.16). V přílohách (PVIII: Chromatogram GC-MS analýzy Vzorku I až IV) se nacházejí chromatogramy jednotlivých vzorků s příslušnými chemickými vzorci, které odpovídají detekovaným látkám. Ve všech vzorcích byly zaznamenány mastné kyseliny, ale protože stanovení mastných kyselin byla věnována samostatná kapitola (9.3.3.1 Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID) s metodikou lépe odpovídající tomuto stanovení, nebudeme v této kapitole pojednávat o mastných kyselinách.

Ve všech vzorcích byly v malém množství nalezeny krátké rozvětvené metylestery kyselin. U všech vzorků byl také zaznamenán sesquiterpen Germacren D, který má prokázanou antimikrobní aktivitu [36]. Dále byl u všech vzorků zaznamenán diundecylester kyseliny ftalové, ale pravděpodobnost, že by se jednalo o tuto látku je malá (75 %), může se však jednat o nějaký jiný diester kyseliny ftalové. Dále u vzorku I, II a III byly detekovány látky jako Damascenon, trans-beta-Ionon a Megastigmatrienon. Tyto látky patří do skupiny ketonů, jsou velmi aromatické i v malých koncentracích, a proto se používají jako složky parfémů. Vznikají degradací karotenů, které jsou v měsíčku hojně zastoupeny (kapitola 4.1.2 Karotenoidy) [37, 38, 39].

U vzorků I, II a III byl detekován Hexahydropseudoionon. Tato látka se používá jako výchozí při výrobě fytolu ( $C_{20}H_{39}-OH$ ) [40]. Jen u vzorku IV byl detekován Cycloartenol. Jedná se o sterol, který se vyskytuje u fotosyntetizujících rostlin. Jeho syntéza vychází z triterpenoidu skvalenu [41]. Nepřítomnost Damascenonu, trans-beta-Iononu a Megastigmatrienonu a naopak přítomnost Cycloartenolu ve vzorku IV může být způsobena tím, že vzorek je o rok starší než zbylé vzorky.

Tab. 12. Vzorek I

Retenční čas (min.)	Plocha píku (%)	Výška píku (%)	Název (% pravděpodobnosti, že se jedná o danou látku)
5,709	2,29	1,46	Metylester kyseliny 2-metylbutanové (92)
8,034	5,54	2,22	Metylester kyseliny 2-metyl-2-butenové (94)
11,493	0,80	0,56	Metylester kyseliny 3-methylpentanové (80)
12,567	0,65	0,70	Metyl ester kyseliny kapronové (79)
13,030	5,05	4,98	Metylester kyseliny 3-metyl-2-pentenové (92)
13,640	2,04	2,15	6-metyl-5-hepten-2-on (89)
15,417	0,70	1,04	Metylester kyseliny kaprylové (86)
17,088	0,55	0,82	Metylester kyseliny stearové (73)
18,337	0,23	0,62	Damascenone (81)
18,375	1,22	1,37	trans beta Ionon (72)
18,541	5,66	6,80	Metylester kyseliny laurové (92)
18,675	0,34	0,58	5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4,7a-trimetyl-2(4H)-benzofuranon (83)
18,731	2,74	1,97	Germacren D (89)
19,275	0,46	0,67	Megastigmatrienon (77)
19,771	28,68	37,69	Metylester kyseliny stearové (93)
19,928	0,73	1,02	Kyselina pentadekanová (81)
20,519	1,70	1,89	Hexahydropseudoionon (89)
21,001	24,54	23,50	Metyl ester kyseliny palmitové (95)
21,194	2,02	1,53	Diundecylester kyseliny ftalové (76)
22,396	2,04	2,00	Metylester kyseliny linolové (92)
22,452	4,10	3,50	Metylester kyseliny 11,14,17-eikosatrienové (91)
22,675	7,92	2,93	Metylester kyseliny 6-oktadekenové (84)

Tab. 13. Vzorek II

Retenční čas (min.)	Plocha píku (%)	Výška píku (%)	Název (% pravděpodobnosti, že se jedná o danou látku)
5,713	1,16	0,66	Metylester kyseliny 2-metylbutanové (94)
8,030	2,28	0,86	Metylester kyseliny 2-metyl-2-butenové (92)
11,500	0,75	0,50	Metylester kyseliny 3-methylpentanové (90)
12,566	0,64	0,58	Metyl ester kyseliny kapronové (86)
13,033	2,34	2,12	Metylester kyseliny 3-metyl-2-pentenové (93)
15,417	0,50	0,69	Metylester kyseliny kaprylové (90)
17,140	0,22	0,33	Metylester kyseliny stearové (84)
18,543	4,91	6,15	Metylester kyseliny laurové (92)
18,734	1,12	0,84	Germacren D (88)
19,277	0,24	0,30	Megastigmatrienon (73)
19,772	34,91	43,08	Metylester kyseliny stearové (93)
19,931	0,64	0,89	Kyselina pentadekanová (88)
20,517	0,58	0,69	Hexahydropseudoionon (86)
21,002	33,62	31,09	Metyl ester kyseliny palmitové (95)
21,195	0,64	0,57	Diundecylester kyseliny ftalové (74)
22,398	3,27	2,89	Metylester kyseliny linolové (95)
22,449	6,88	5,32	Metylester kyseliny 11,14,17-eikosatrienové (92)
22,713	5,29	2,44	Metylester kyseliny 12-metylmyristové (87)

Tab. 14. Vzorek III

Retenční čas (min.)	Plocha píku (%)	Výška píku (%)	Název (% pravděpodobnosti, že se jedná o danou látku)
5,717	0,80	0,43	Metylester kyseliny 2-metylbutanové (87)
8,019	2,45	0,81	Metylester kyseliny 2-metyl-2-butenové (92)
12,565	0,62	0,56	Metyl ester kyseliny kapronové (87)
13,03	1,23	1,18	Metylester kyseliny 3-metyl-2-pentenové (94)
13,647	0,58	0,66	6-metyl-5-hepten-2-on (91)
15,415	0,52	0,74	Metylester kyseliny kaprylové (86)
17,14	0,25	0,32	Metylester kyseliny stearové (83)
18,542	4,36	5,42	Metylester kyseliny laurové (93)

Retenční čas (min.)	Plocha píku (%)	Výška píku (%)	Název (% pravděpodobnosti, že se jedná o danou látku)
18,726	0,68	0,49	Germacren D (89)
19,772	29,63	36,61	Metylester kyseliny stearové (93)
19,93	0,70	0,81	Kyselina pentadekanová (87)
20,51	0,25	0,34	Hexahydropseudoionon (83)
21,002	36,06	33,68	Metyl ester kyseliny palmitové (95)
21,203	0,39	0,44	Diundecylester kyseliny ftalové (76)
22,396	7,40	6,51	Metylester kyseliny linolové (95)
22,449	10,82	8,78	Metylester kyseliny 11,14,17-eikosatrienové (92)
22,711	3,24	2,23	Metylester kyseliny 12-metylmyristové (91)

Tab. 15. Vzorek IV

Retenční čas (min.)	Plocha píku (%)	Výška píku (%)	Název (% pravděpodobnosti, že se jedná o danou látku)
5,716	0,55	0,36	Metylester kyseliny 2-metylbutanové (94)
8,039	2,01	0,74	Metylester kyseliny 2-metyl-2-butenové (94)
12,566	0,58	0,52	Metyl ester kyseliny kapronové (86)
13,032	1,54	1,40	Metylester kyseliny 3-metyl-2-pentenové (92)
13,649	0,33	0,35	6-metyl-5-hepten-2-on (90)
15,415	0,53	0,68	Metylester kyseliny kaprylové (90)
17,142	0,25	0,36	Metylester kyseliny stearové (86)
18,543	4,18	5,32	Metylester kyseliny laurové (93)
18,715	1,38	0,82	Germacren D (87)
19,474	0,25	0,29	Tau-Muurolol (83)
19,773	29,66	37,24	Metylester kyseliny stearové (93)
19,934	0,94	1,17	Kyselina pentadekanová (91)
20,937	0,60	0,58	(3beta)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol=Cycloartenol (83)
21,004	35,86	32,99	Metyl ester kyseliny palmitové (93)
21,204	0,89	0,74	Diundecylester kyseliny ftalové (75)
22,401	7,51	6,31	Metylester kyseliny linolové (94)
22,451	8,11	7,38	Metylester kyseliny 11,14,17-eikosatrienové (92)
22,715	4,69	2,50	Metylester kyseliny 12-metylmyristové (91)



### 9.3.3.3 Stanovení těkavých látek pomocí GC-MS headspace analýzy

Měsíček má svou charakteristickou vůni, a proto je pěstován i v orientu a používá se jako kadidlo (kapitola 5.6). Tato část diplomové práce byla zaměřena na látky, díky kterým má droga svojí charakteristickou vůni. Postup analýzy je popsán v kapitole 7.4.3.3 Stanovení těkavých látek pomocí GC-MS. Výsledky jsou v tabulce 17 a v přílohách (PIX: Chromatogram těkavých látek měsíčku) se nachází chromatogram s chemickými vzorci příslušných látek.

Největší množství bylo alfa-Thujenu, alfa-Pipenu a jejich mezomerů Sabininu a Nopinenu. Další látky byly zaznamenány ve stopovém množství.

Tab. 16. Určení těkavých látek u měsíčku lékařského

Retenční čas (min.)	Plocha píku (%)	Výška píku (%)	Název (% pravděpodobnosti, že se jedná o danou látku)
13,851	63,46	62,69	alfa-Thujen (95)
13,966	28,71	28,05	alfa-Pinen (97)
14,481	3,56	3,92	Sabinin (91)
14,552	0,94	1,14	Nopinen (77)
14,672	1,26	1,41	Myrcen (81)
14,877	1,14	1,65	beta-Thujen (83)
15,159	0,92	1,14	Eucalyptol (81)

### 9.3.4 Analýza látek rostlin měsíčku lékařského pomocí kapalinové chromatografie

Záměrem této části práce bylo určit rozdělené látky na TLC pomocí MS detektoru a srovnání výsledků s databází spekter. Vzhledem k tomu, že došlo k technickým problémům, byl změřen pouze jeden vzorek, a to látka rozdělená pomocí TLC na soustavě 13 o  $R_F=0,35\pm 0,02$ . V této době nebyla k dispozici databáze příslušných spekter, a proto se nepodařilo určit konkrétně o jaké látky se jedná. Výsledná spektra jsou k dispozici v přílohách (PX: Hmotnostní spektra látek z analýzy extraktu pomocí HPLC-MS). Při analýze bylo zaznamenáno 14 různých látek. Toto množství látek je možné vyvodit z toho, že skvrna se nacházela v dolní části desky a látky, které putovaly tímto místem, zanechaly po sobě stopy. Jelikož přístroj je velmi citlivý tak zaznamenal i tyto látky. Vyhodnocení analýzy bude možno, až bude k dispozici vyhovující databáze spekter.

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na analýzu vybraných látek rostliny *Calendula officinalis* L. použitím chromatografických metod a metod vhodných k provozní kontrole při průmyslovém zpracování.

Teoretická část diplomové práce je věnována botanické charakteristice rostliny. Dále je kladen důraz na její hlavní obsahové látky a jejich působení na organismus.

V praktické části diplomové práce jsou popsány materiály, které byly k dispozici, a metody, které byly použity k analýze vzorků. Následně jsou uvedeny výsledky, které jsou zhodnoceny.

K analýze bylo k dispozici pět vzorků, které se lišily prostředím, ve kterém byly pěstovány, stářím a barvou. Ze všech vzorků byly nejdříve připraveny vodné a etanolické extrakty, které sloužily ke chromatografií na tenké vrstvě a následně k určení rozdělených látek pomocí HPLC-MS. Poté byly připraveny heptanové extrakty, které sloužily ke stanovení mastných kyselina pomocí GC-FID a určení vyextrahovaných látek pomocí GC-MS. U sušené drogy byl následně stanoven obsah neutrálně-detergentní vlákniny, obsah aminokyselin a byly stanoveny těkavé látky.

Bylo stanoveno, že sušená droga obsahuje 10,6 % látek extrahovatelných v nepolárním rozpouštědle a 20,8 % NDF. Dále bylo stanoveno, že sušená droga obsahuje 5,1 % základních aminokyselin. Na tenké vrstvě silikagelu se vodné a etanolické extrakty nejlépe dělily na soustavě chloroform:metanol:amoniak 13:7:1 a soustavě benzen:etylacetát:kyselina octová 75:25:1. Díky své nenáročnosti na technické vybavení se zdají být vhodné pro provozní kontroly při průmyslovém zpracování rostliny.

Při stanovení celkových mastných kyselin byl zjištěn nejvyšší obsah kyseliny palmitové (32,3 %), dále kyseliny myristové (25,5 %), následuje kyselina alfa/gama-linolenová (16,2 %). Čtvrtou nejzastoupenější mastnou kyselinou je kyselina linolová/linolelaidová (12,8 %). Další méně zastoupené mastné kyseliny a jejich obsahy jsou uvedeny v kapitole 9.3.3.1.

Pomocí knihovny spekter byly v heptanových extraktech, kromě mastných kyselin, identifikovány látky jako je Germacren D, Damascenon, trans-beta-Ionon, Megastigmatrienon a

Hexahydropseudoionon. Další látky a jejich charakteristiky jsou uvedeny v kapitole 9.3.3.2.

Pomocí knihovny spekter byly také identifikovány těžké látky drogy. Tyto látky představují především Thujeny, Pipeny a jejich mezomery. Další látky jsou uvedeny v kapitole 9.3.3.3.

Poslední analýzou byla identifikace rozdělených látek na TLC pomocí HPLC-MS. Protože nebyla k dispozici knihovna spekter k uvedenému přístroji, nebylo možné identifikovat žádnou z rozdělených látek. Tuto problematiku popisuje kapitola 9.3.4.

Z provedených analýz vyplývá, že není rozdíl ve zkoumaných látkách mezi oranžovým a žlutým zbarvením květů drogy, které rostly na stejném stanovišti. Ovšem jeví se rozdíly mezi vzorky drogy pěstovanými v na různých stanovištích. Tyto rozdíly jsou patrné především u obsahu a zastoupením aminokyselin a mastných kyselin. Vliv skladovacích podmínek nelze prokázat z analýz, které byly provedeny v této práci.

Pro další studium by bylo zajímavé více se zaměřit na agrogeologický a agrotechnický rozbor podmínek, za kterých je droga pěstována.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] JANČA, J., ZENTRICH, J. A. *Herbář léčivých rostlin 3. díl*. Praha: Eminent, 1995. ISBN 80-85876-14-0
- [2] BLAŽEK, Z., KUČERA, M., HUBÍK, J. *Léčivé rostliny ve sběru a v kultuře*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1956.
- [3] BRAUN, L., COHEN, M. *Herbs and Natural Supplements, second edition*. Australia: Elsevier, 2007. ACN 001 002 357
- [4] ILLAVA, B., STARÝ, F., POSPÍŠIL, F. *Rostliny v kosmetice*. Praha: Atia, 1987.
- [5] *Wikipedia: the free encyclopedia* [online] [cit. 2010-01-16]. Dostupné na WWW: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/Měsíček\\_lékařský](http://cs.wikipedia.org/wiki/Měsíček_lékařský)>
- [6] BARNES, J., ANDERSON, J. A., PHILLIPSON J. D. *Herbal Medicines, third edition*. London: Pharmaceutical Press, 2007. ISBN 978 0 85369 623 0
- [7] THOMPSON, L. *Enrichment of Biologically Active Compounds from Selected Plants Using Adsorptive Bubble Separation*. TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN, 2004.
- [8] MACKŮ, J., MOKRÝ, J. *Naše léčivé rostliny*. Bratislava: vydavateľstvo slovenskej akadémie vied, 1958
- [9] JAROŠ, Z., *Léčivé látky z rostlin*. 1. vyd. České Budějovice: Dona, 1992. ISBN 80-85463-04-0
- [10] FONCESA, Y. M., LATINI, C. D., VICENTINI, F. T., et al, Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion, *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, Volume 127, Issue 3, s. 596-601
- [11] WILCKOMIRSKI, B., Intracellular localization of metabolism of lupeol and its palmitate in *Calendula officinalis* flowers, *Phytochemistry*, 1987, Volume 26, Issue 6, s. 1635-1637
- [12] HAMBURGER, M., ADLER, S., BAUMANN, D., et al, Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*), *Fittoterapia*, 2003, Volume 74, Issue 4, s. 328-338

- [13] WOJCIECHOWSKI, Z., BOCHEŃSKA-HRYNIEWICZ, M., KUCHARCZAK, B., et al, Sterol and triterpene alcohol esters from *Calendula officinalis*, *Phytochemistry*, 1972, Volume 11, Issue 3, s. 1165-1168
- [14] VYROJEN, J., LOPTÁM, A., WAGNER, A., Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*, *Phytochemistry*, 1989, Volume 28, Issue 9, s. 2379-2383
- [15] KALVATCHEV, Z., WALDER, R., GARZARO, D., Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers, *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 1997, Volume 51, Issue 4, s. 176-180
- [16] RE, T. A., MOONEY, D., ANTIGNAC, E., et al, Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of calendula flower (*Calendula officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products, *Food and Chemical Toxicology*, 2009, Volume 47, Issue 6, s. 1246-1254
- [17] Analýza a hodnocení potravin I, Distanční text, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007
- [18] SIKORA, D., *Analýza vybraných látek z rostliny Tribulus terrestris chromatografickými metodami*, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009
- [19] *Stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [on-line]. [cit. 2010-01-16]. Dostupné na WWW:  
<[http://database.zeus.cz/bokrs/vestniky/nrl\\_1\\_1\\_05\\_doplnek\\_06.pdf](http://database.zeus.cz/bokrs/vestniky/nrl_1_1_05_doplnek_06.pdf)>
- [20] *Ingos. Analyzátor aminokyselin AAA* [on-line]. [cit. 2010-01-16]. Dostupné na WWW: <<http://www.instruments.ingos.cz/pristroj-detail.php?id=analyzator-aminokyselin-aaa-400>>
- [21] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. ISBN 80-7080-586-2 [online]. [cit. 2010-01-16]. Dostupné na WWW:  
<[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-80-7080-586-2/pages-img/](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-586-2/pages-img/)>
- [22] GASPARIČ, J. a kolektiv. *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1981. ISBN 04 –613 – 81.

- [23] *ABZ slovník cizích slov - Pojem denzitometrie* [on-line]. [cit. 2010-01-16]. Dostupné na WWW: <<http://slovník-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/denzitometriedensitometrie>>
- [24] ŠTERN, P., *Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii*. Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha [on-line]. [cit. 2010-01-16]. Dostupné na WWW: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>>
- [25] *Wikipedia: the free encyclopedia* [online] [cit. 2010-01-16]. Dostupné na WWW: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/Aritmetický\\_průměr](http://cs.wikipedia.org/wiki/Aritmetický_průměr)>
- [26] *Wikipedia: the free encyclopedia* [online] [cit. 2010-01-16]. Dostupné na WWW: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/Směrodatná\\_odchylka](http://cs.wikipedia.org/wiki/Směrodatná_odchylka)>
- [27] Plynová chromatografie - Plynová chromatografie s HiQ® speciálními plyny. Aplikční list, Speciální plyny. *The Linde Group* [on-line]. [cit. 2010-03-19]. Dostupné na WWW: <[http://www.linde-gas.cz/international/web/lg/cz/like35lgcz.nsf/repositorybyalias/pdf\\_plynova\\_chromatografie/\\$file/Plynova\\_chromatografie.pdf](http://www.linde-gas.cz/international/web/lg/cz/like35lgcz.nsf/repositorybyalias/pdf_plynova_chromatografie/$file/Plynova_chromatografie.pdf)>
- [28] Plynová chromatografie. *Český lékopis 1997* [on-line]. [cit. 2010-03-19]. Dostupné na WWW: <[http://www.lekopis.cz/Kap\\_2\\_2\\_28.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_28.htm)>
- [29] Stanovení mastných kyselin – návod pro laboratorní cvičení předmětu Laboratoře oboru I. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [on-line]. [cit. 2010-03-19]. Dostupné na WWW: <[http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/navody/oborI/GC\\_MK.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/GC_MK.pdf)>
- [30] Stanovení methylesterů mastných kyselin pomocí plynové chromatografie (GC-FID) - návod pro laboratorní cvičení předmětu Laboratoř analýzy potravin a přírodních produktů Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [on-line]. [cit. 2010-03-20]. Dostupné na WWW: <[http://web.vscht.cz/kohoutkj/mastkyslab\\_ofic.pdf](http://web.vscht.cz/kohoutkj/mastkyslab_ofic.pdf)>
- [31] Getting Started in HPLC, Section 1C. HPLC Instruments, [on-line]. [cit. 2010-03-19]. Dostupné na WWW: <<http://www.lcresources.com/resources/getstart/1c01.htm>>
- [32] Chromatografie [online]. [2009-03-13]. Dostupné z WWW: <[http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy\\_B/chromatografie.doc](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc)>
- [33] ŠIMŮNEK, J., Mykotoxiny - Fyzikálně chemické metody, [on-line]. [cit. 2010-03-19]. Dostupné na WWW: <<http://www.med.muni.cz/prelek/MYKOTW/mtanafch.htm>>

- [34] DIONEX, UltiMate 3000 Standard LC Systeme, [online]. [2010-04-13]. Dostupné z WWW: <<http://www.dionex.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-systems/standard/lp-72459.html>>
- [35] BRUKER, Bruker Daltonics - amaZon ETD/X, [on-line]. [cit. 2010-04-19]. Dostupné na WWW: <<http://www.bdal.de/products/esi-ion-trap-ms/amazon-x-and-etd/overview.html>>
- [36] HE., X., CANE, D. E., Mechanism and stereochemistry of the germacradie-nol/germacrene D synthase of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of the American Chemical Society*, 2004, s. 2678-2679.
- [37] LEFFINGWELL, J. C., Rose (*Rosa damascena*), [on-line]. [cit. 2010-05-04]. Dostupné na WWW: <<http://www.leffingwell.com/rose.htm>>
- [38] chemicalland21, beta-IONONE, [on-line]. [cit. 2010-05-04]. Dostupné na WWW: <<http://chemicalland21.com/lifescience/foco/BETA-IONONE.htm>>
- [39] ISOE, S., SHIGEO, K., TAKEO, S., The Synthesis of Damascenone and beta-Damascone and the possible mechanism of their formation from karotenoids, *Chemical Society of Japan*, 1971, s. 1767.
- [40] Americký patent US2272122, Proces for producing hexahydropseudoionone, [online]. [cit. 2010-04-19]. Dostupné na WWW: <<http://www.freepatentsonline.com/2272122.pdf>>
- [41] *Wikipedia: the free encyclopedia* [online] [cit. 2010-05-04]. Dostupné na WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Cycloartenol>>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
LD <sub>x</sub>	Smrtelná dávka (Lethal dose)
p.a.	per analysis = pro analýzu
GC	Gas chromatography = Plynová chromatografie
MS	Mass spektrometry = Hmotnostní spektrometrie
TLC	Thin layer chromatography = Tenkovrstvá chromatografie
FID	Flame ionization detektor = Plamenově ionizační detektor
NDF	Neutrálně-detergenční vlákna
NDČ	Neutrálně-detergenční činidlo
AAA	Automatický analyzátor aminokyselin
UV lampa	Ultrafialová lampa
R <sub>F</sub>	Retardační faktor
NMR	Nukleární magnetická rezonance



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr.1 Základní zobrazení rostliny .....	13
Obr.2 Molekulární struktura Calenduladiolu a Lupeolu.....	17
Obr.3 Estery faradiolu.....	18
Obr.4 Kalendulosidy .....	19
Obr.5 Beta-karoten.....	19
Obr.6 Lutein.....	19
Obr.7 Flavonoidy .....	21
Obr.8 Mentol      Obr.9 Caryophyllen.....	21
Obr.10 Vzorek I .....	27
Obr.11 Vzorek II.....	27
Obr.12 Vzorek III.....	27
Obr.13 Vzorek IV .....	28
Obr.14 Vzorek V.....	28
Obr.15 Soxhletův extraktor .....	30
Obr.16 Dělení aminokyselin .....	34
Obr.17 Dělení látek na chromatogramu.....	37
Obr.18 Schéma plynové chromatografie.....	40
Obr.19 Schéma HPLC .....	43
Obr.20 Zastoupení NDF ve vzorcích.....	47
Obr.21 Srovnání obsahů aminokyselin ve vzorcích.....	49
Obr.22 Porovnání obsahu mastných kyselin ve vzorcích .....	54

**SEZNAM TABULEK**

Tab.1 Vzorky I.....	27
Tab.2 Extrakty.....	28
Tab.3 Soustavy pro dělení látek pomocí TLC .....	38
Tab.4 Obsah látek rozpustných v nepolárním rozpouštědle. ....	46
Tab.5 Výsledky stanovení NDF u vzorků I, II, III. ....	46
Tab.6 Navážky vzorků na analýzu aminokyselin.....	48
Tab. 7. Dělení látek na soustavě 5 .....	50
Tab. 8. Dělení látek na soustavě 13 .....	51
Tab. 9. Zastoupení mastných kyselin ve Vzorku I a Vzorku II.....	52
Tab. 10. Zastoupení mastných kyselin ve Vzorku III a Vzorku IV.....	53
Tab. 11. Zastoupení mastných kyselin ve Vzorku V .....	53
Tab. 12. Vzorek I.....	55
Tab. 13. Vzorek II.....	56
Tab. 14. Vzorek III.....	56
Tab. 15. Vzorek IV .....	57
Tab. 16. Určení těkavých látek u měsíčku lékařského.....	58

## SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha PI: Tabulka obsahu aminokyselin ve vzorcích
- Příloha PIIa: Obsahy aminokyselin ve vzorcích
- Příloha PIIb: Obsahy aminokyselin ve vzorcích
- Příloha PIII: Fotografie rozdělených látek na soustavě 5
- Příloha PIV: Fotografie rozdělených látek na soustavě 13
- Příloha PVa: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 5
- Příloha PVb: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 5
- Příloha PVc: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 5
- Příloha PVIa: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 13
- Příloha PVIb: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 13
- Příloha PVIc: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 13
- Příloha PVIIa: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku I
- Příloha PVIIb: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku II
- Příloha PVIIc: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku III
- Příloha PVIIId: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku IV
- Příloha PVIIe: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku V
- Příloha PVIIIa: Chromatogram GC-MS analýzy Vzorku I
- Příloha PVIIIb: Chromatogram GC-MS analýzy Vzorku II
- Příloha PVIIIc: Chromatogram GC-MS analýzy Vzorku III
- Příloha PVIIId: Chromatogram GC-MS analýzy Vzorku IV
- Příloha PIX: Chromatogram těkavých látek měsíčku
- Příloha PXa: Hmotnostní spektra látek z analýzy extraktu pomocí HPLC-MS
- Příloha PXb: Hmotnostní spektra látek z analýzy extraktu pomocí HPLC-MS
- Příloha PXc: Hmotnostní spektra látek z analýzy extraktu pomocí HPLC-MS
- Příloha PXd: Hmotnostní spektra látek z analýzy extraktu pomocí HPLC-MS

## Příloha PI: Tabulka obsahu aminokyselin ve vzorcích

	Obsah sirných aminokyselin [g/kg]											
	Vzorek I			Vzorek II			Vzorek III			Vzorek IV		
AMK	Ø	S <sub>x</sub>	V <sub>x</sub>	Ø	S <sub>x</sub>	V <sub>x</sub>	Ø	S <sub>x</sub>	V <sub>x</sub>	Ø	S <sub>x</sub>	V <sub>x</sub>
<b>Cystein</b>	0,66	0,016	2,3	0,75	0,045	5,9%	1,37	0,016	1,2	1,22	0,026	2,2
<b>Methionin</b>	1,19	0,040	3,4	1,17	0,017	1,5%	1,05	0,015	1,5	1,05	0,029	2,7
<b>Součet</b>	1,86			1,93			2,42			2,26		

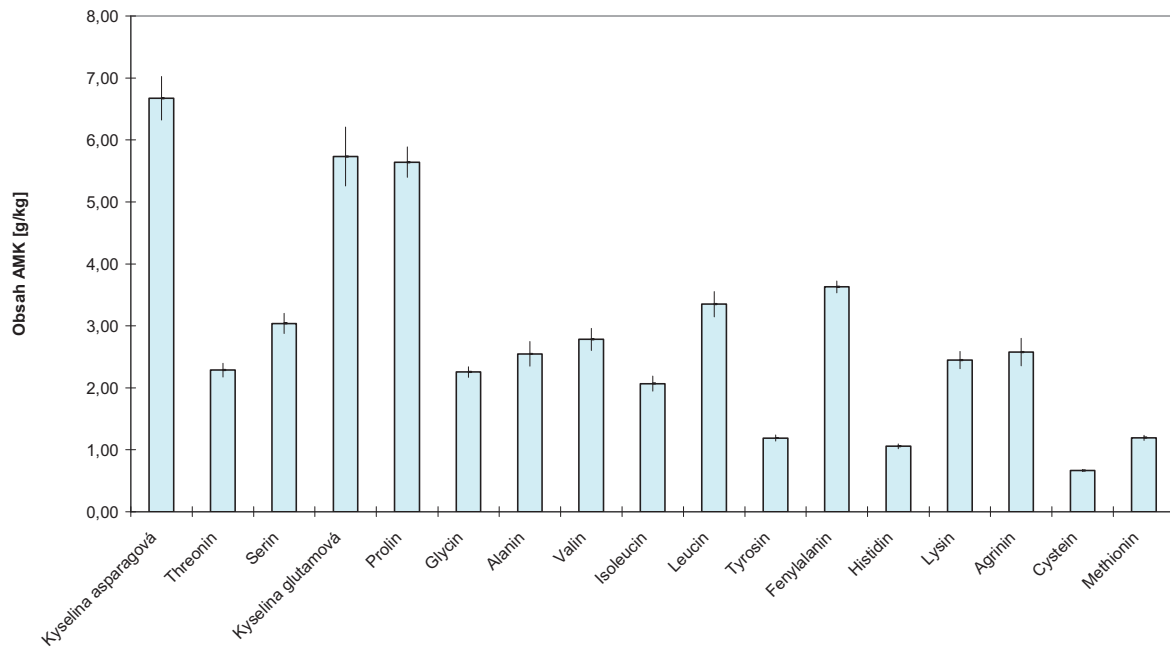
	Obsah aminokyselin [g/kg]											
	Vzorek I			Vzorek II			Vzorek III			Vzorek IV		
AMK	Ø	S <sub>x</sub>	V <sub>x</sub>	Ø	S <sub>x</sub>	V <sub>x</sub>	Ø	S <sub>x</sub>	V <sub>x</sub>	Ø	S <sub>x</sub>	V <sub>x</sub>
<b>Kyselina asparagová</b>	6,67	0,351	5,3%	7,13	0,264	3,7%	6,19	0,122	2,0%	7,30	0,262	3,6%
<b>Threonin</b>	2,29	0,110	4,8%	2,36	0,048	2,1%	3,21	0,085	2,6%	3,45	0,162	4,7%
<b>Serin</b>	3,04	0,160	5,3%	3,16	0,108	3,4%	3,72	0,093	2,5%	4,24	0,276	6,5%
<b>Kyselina glutamová</b>	5,73	0,474	8,3%	5,94	0,069	1,2%	6,70	0,117	1,7%	8,55	0,333	3,9%
<b>Prolin</b>	5,64	0,246	4,4%	5,06	0,333	6,6%	2,94	0,127	4,3%	3,30	0,198	6,0%
<b>Glycin</b>	2,26	0,085	3,8%	2,30	0,049	2,1%	3,21	0,045	1,4%	3,30	0,098	3,0%
<b>Alanin</b>	2,55	0,200	7,8%	2,64	0,043	1,6%	4,60	0,037	0,8%	4,78	0,121	2,5%
<b>Valin</b>	2,78	0,178	6,4%	2,70	0,085	3,1%	3,53	0,071	2,0%	3,91	0,233	6,0%
<b>Isoleucin</b>	2,07	0,123	6,0%	2,01	0,106	5,3%	2,66	0,139	5,2%	2,91	0,208	7,1%
<b>Leucin</b>	3,35	0,205	6,1%	3,37	0,132	3,9%	4,86	0,197	4,1%	4,96	0,190	3,8%
<b>Tyroxin</b>	1,19	0,049	4,1%	1,70	0,101	5,9%	2,19	0,147	6,7%	2,14	0,201	9,4%
<b>Fenylalanin</b>	3,63	0,096	2,6%	3,28	0,141	4,3%	5,10	0,204	4,0%	4,91	0,350	7,1%
<b>Histidin</b>	1,05	0,038	3,6%	1,13	0,043	3,7%	1,46	0,094	6,5%	1,43	0,074	5,2%
<b>Lysin</b>	2,45	0,141	5,8%	2,45	0,071	2,9%	4,44	0,403	9,1%	4,00	0,127	3,2%
<b>Arginin</b>	2,58	0,221	8,6%	2,41	0,049	2,0%	3,64	0,141	3,9%	3,89	0,052	1,3%
<b>Součet</b>	47,28			47,64			58,44			63,07		

Kde:

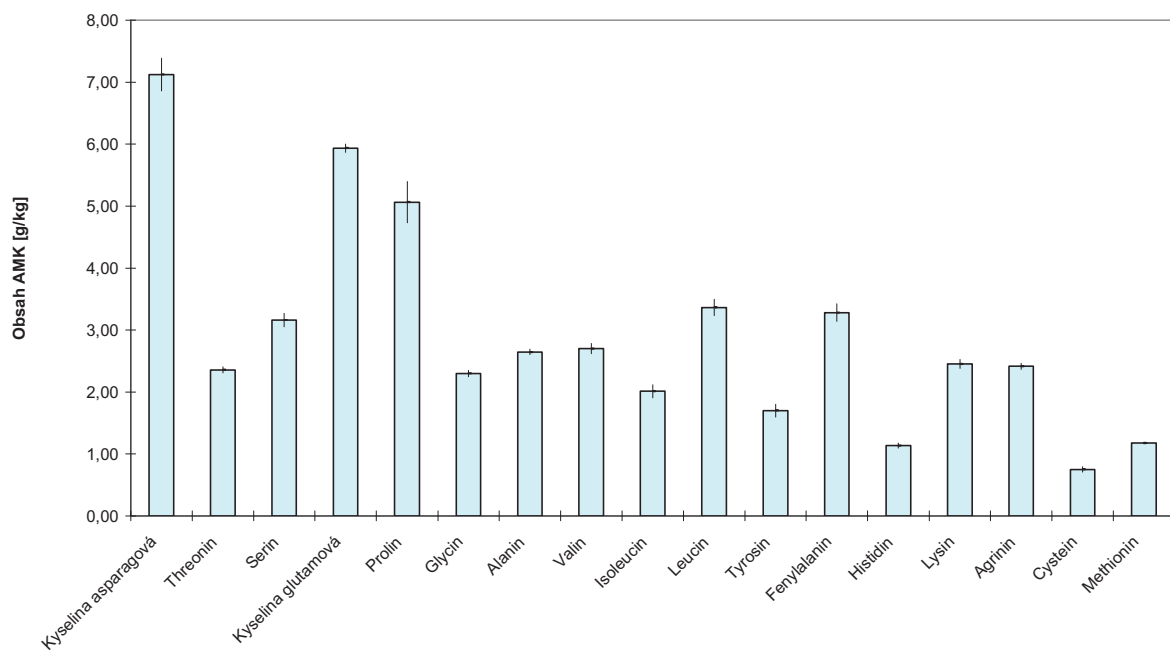
- Ø je aritmetický průměr
- S<sub>x</sub> je směrodatná odchylka
- V<sub>x</sub> je korelační koeficient

## Příloha PIIa: Obsahy aminokyselin ve vzorcích

Vzorek I

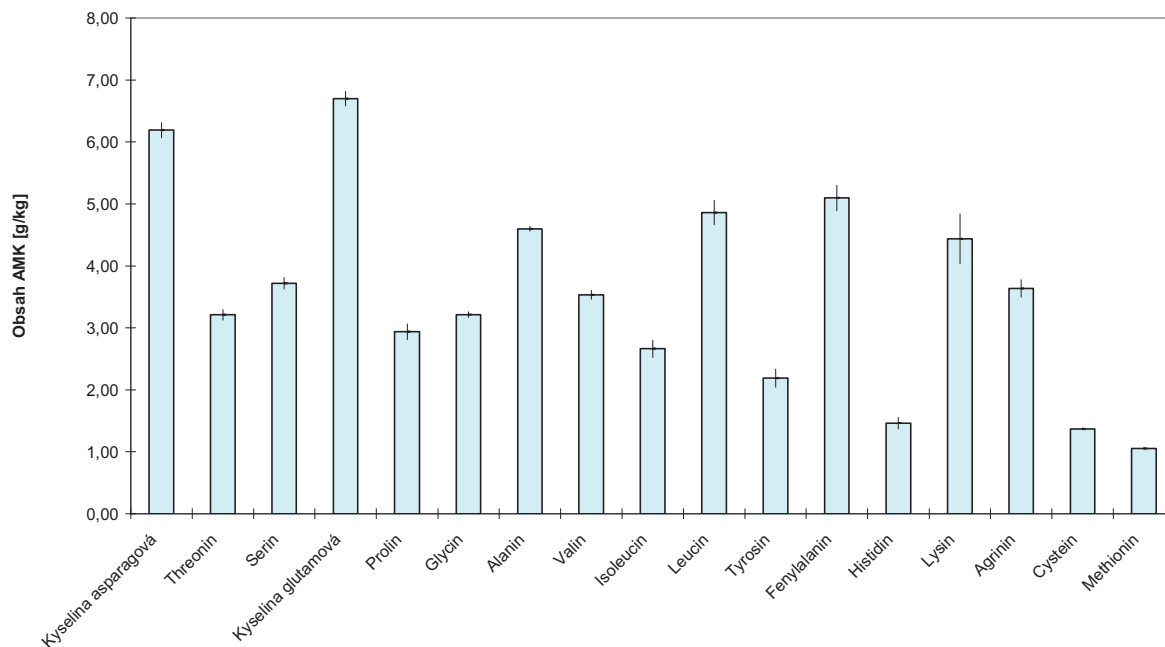


Vzorek II

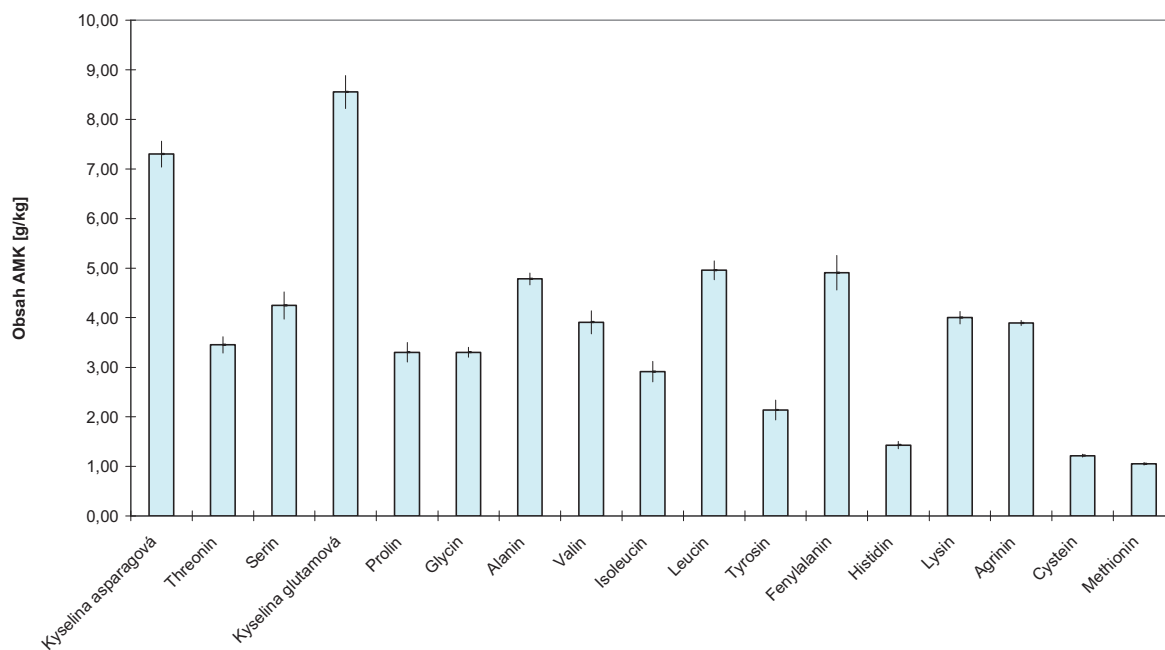


## Příloha PIIb: Obsahy aminokyselin ve vzorcích

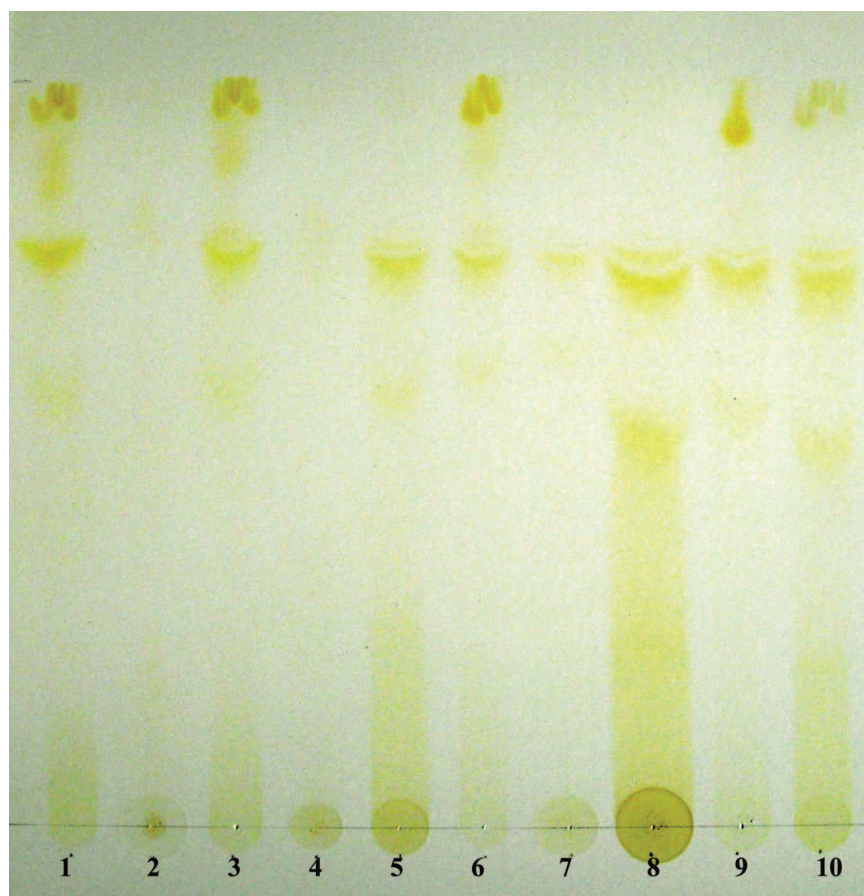
Vzorek III



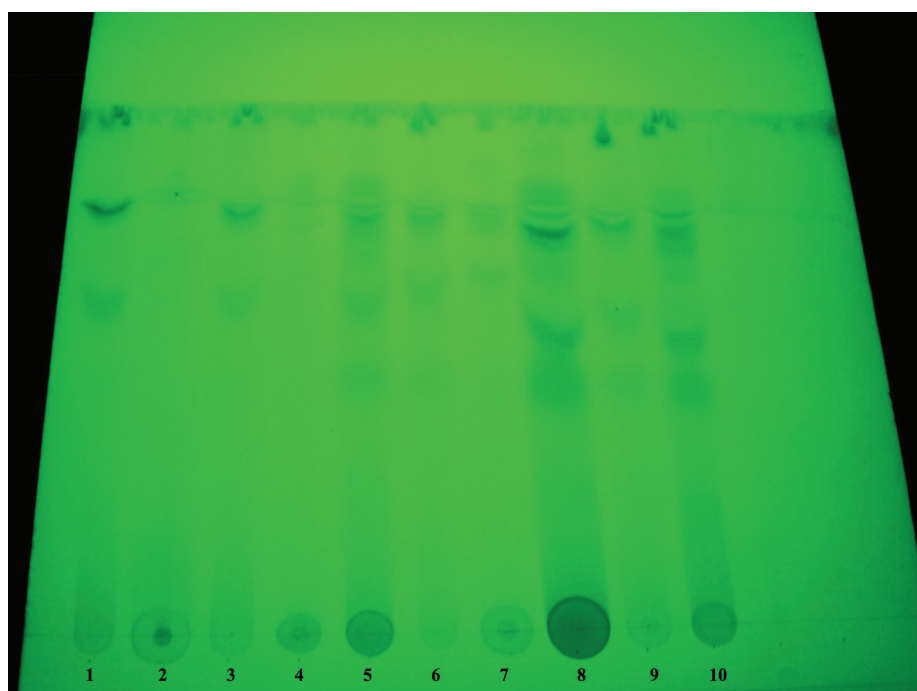
Vzorek IV



### Příloha PIII: Fotografie rozdělených látek na soustavě 5



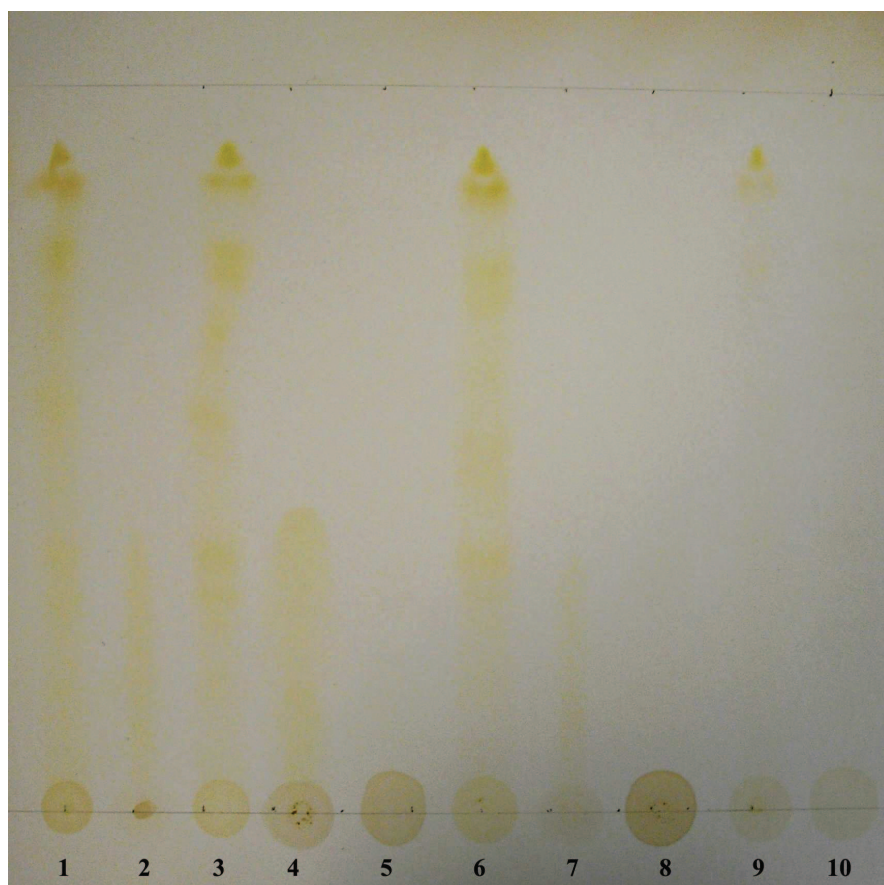
Látky pod denním světlem



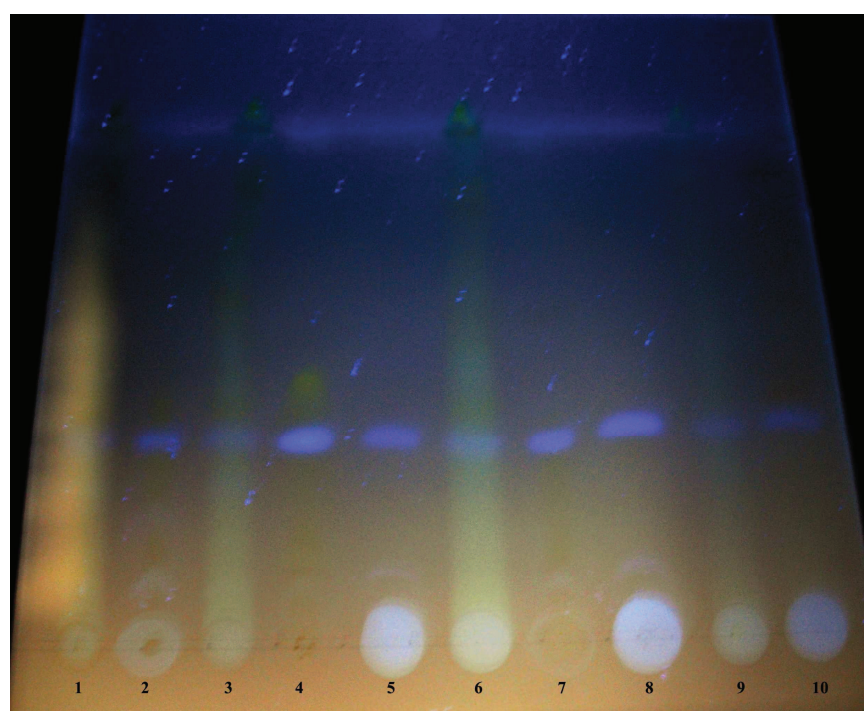
Látky pod UV světlem



## Příloha PIV: Fotografie rozdělených látek na soustavě 13



Látky pod denním světlem

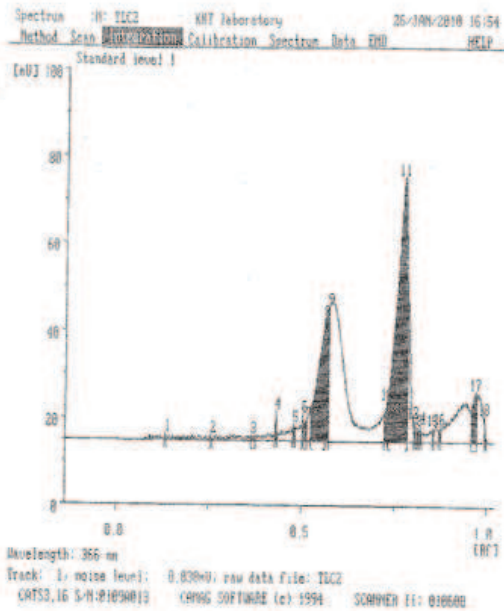


Látky pod UV světlem

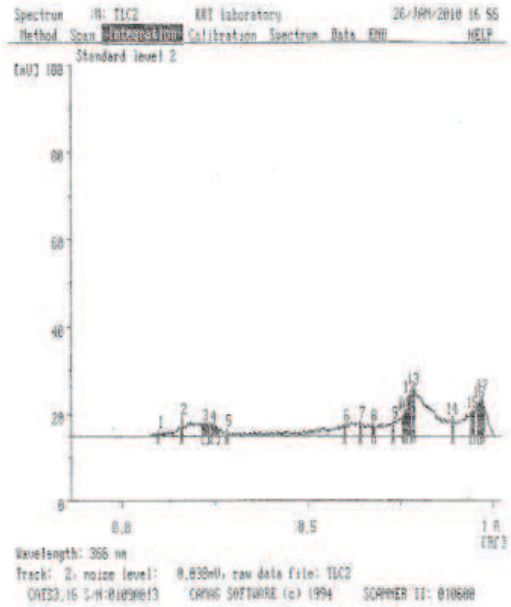


# Příloha PVa: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 5

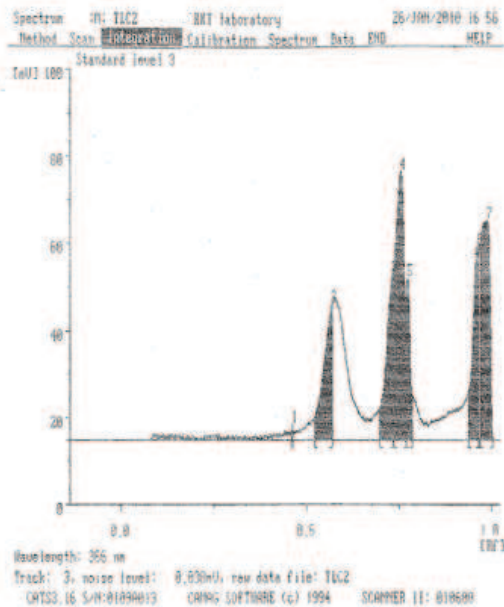
## Vzorek 1



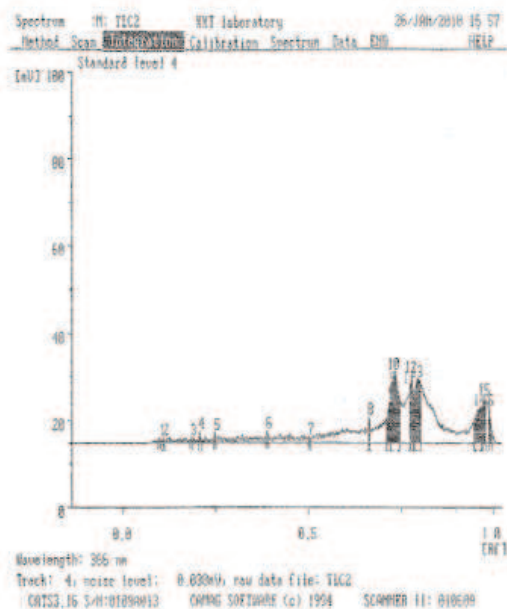
## Vzorek 2



## Vzorek 3

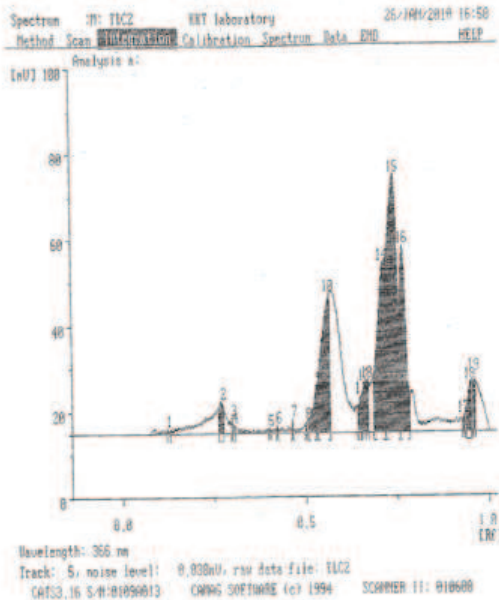


## Vzorek 4

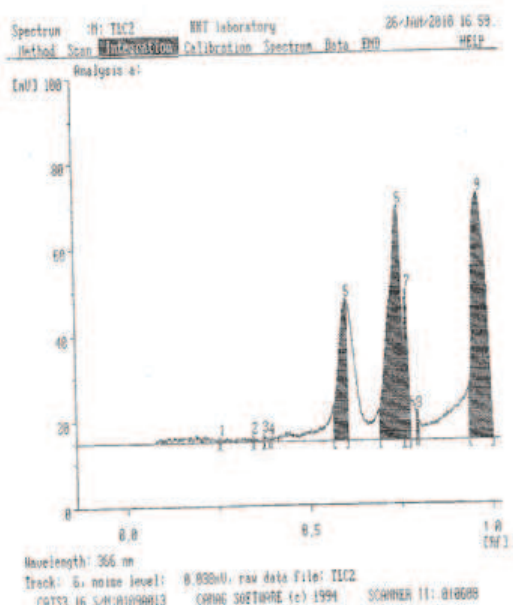


## Příloha PVb: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 5

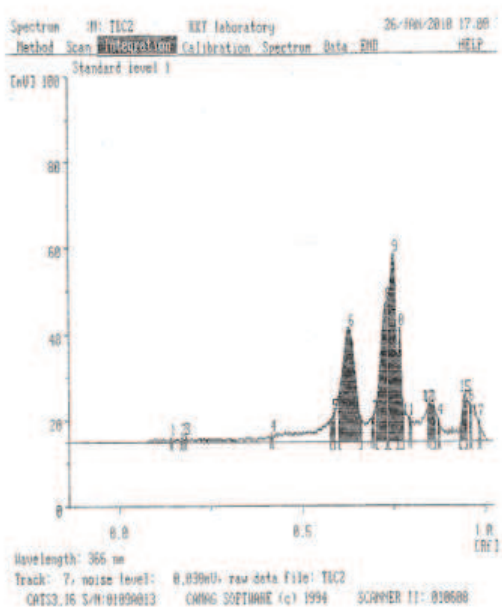
### Vzorek 5



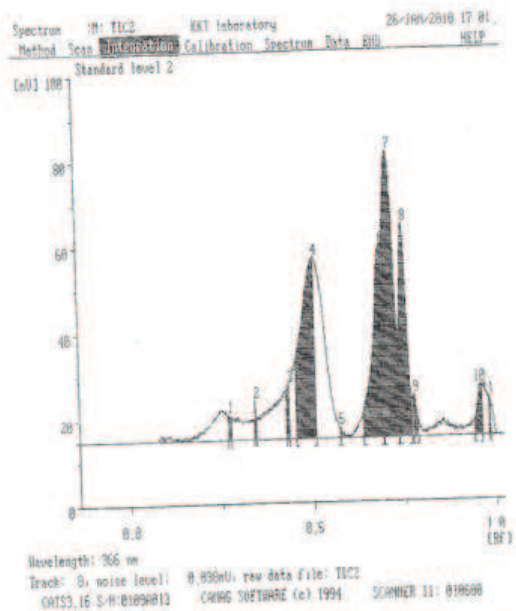
### Vzorek 6



### Vzorek 7

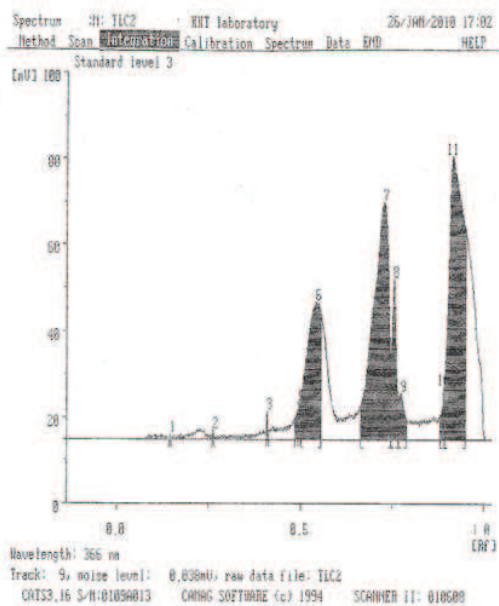


### Vzorek 8

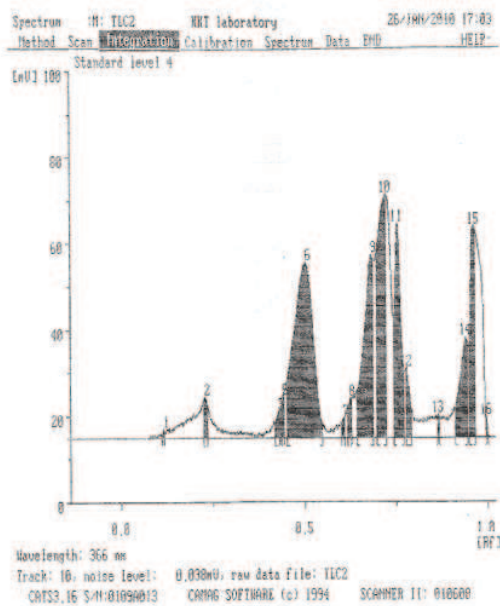


## Příloha PVc: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 5

### Vzorek 9

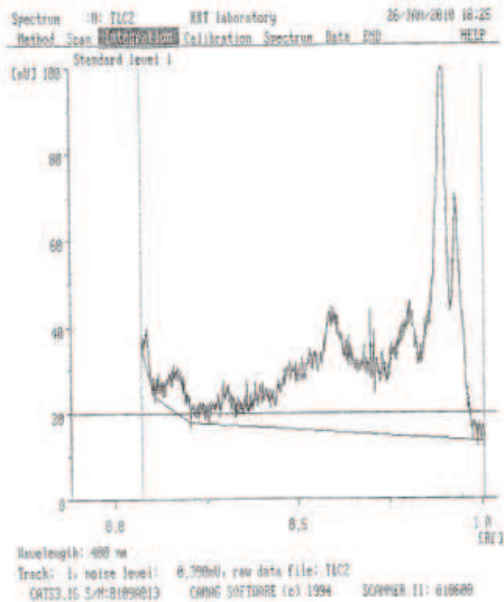


### Vzorek 10

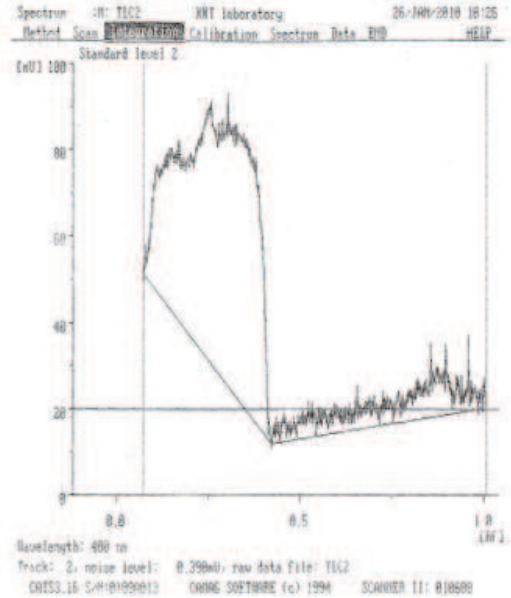


# Příloha PVIa: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 13

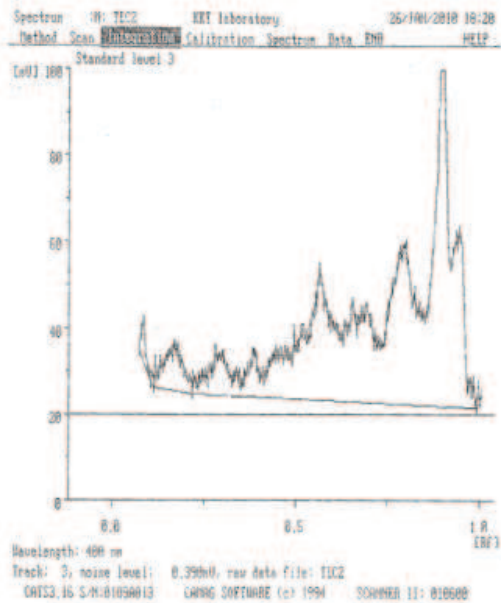
## Vzorek 1



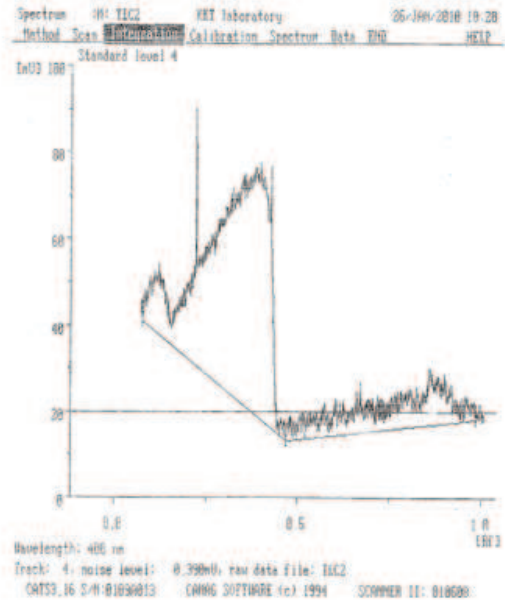
## Vzorek 2



## Vzorek 3

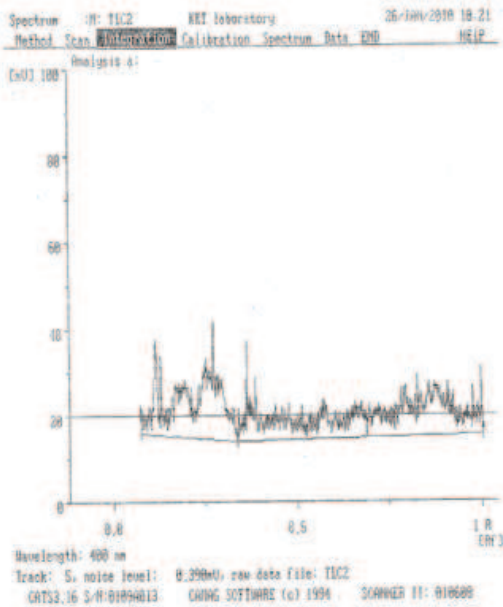


## Vzorek 4

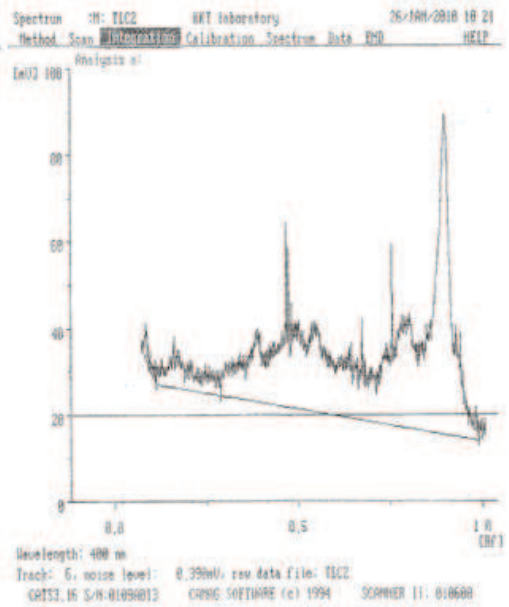


# Příloha PVib: Densitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 13

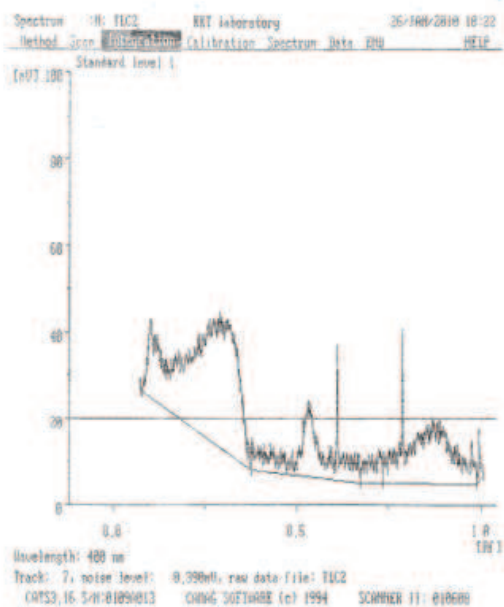
## Vzorek 5



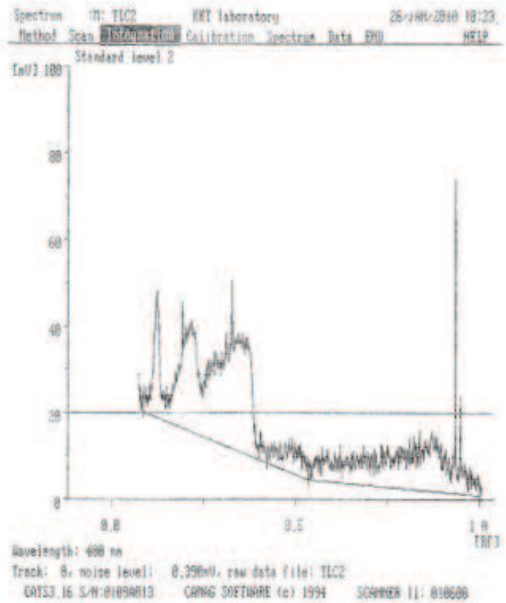
## Vzorek 6



## Vzorek 7

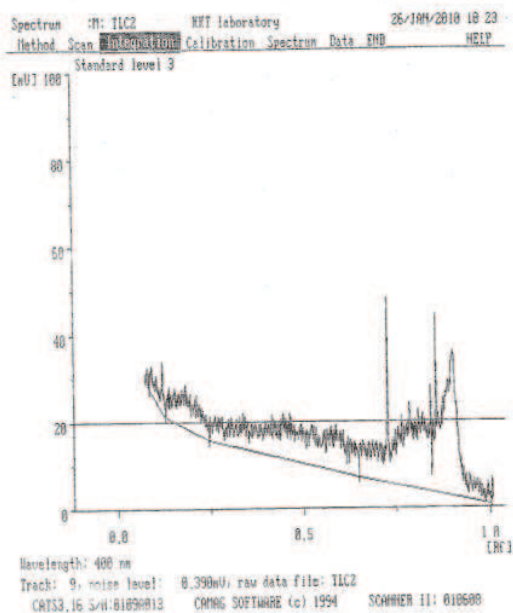


## Vzorek 8

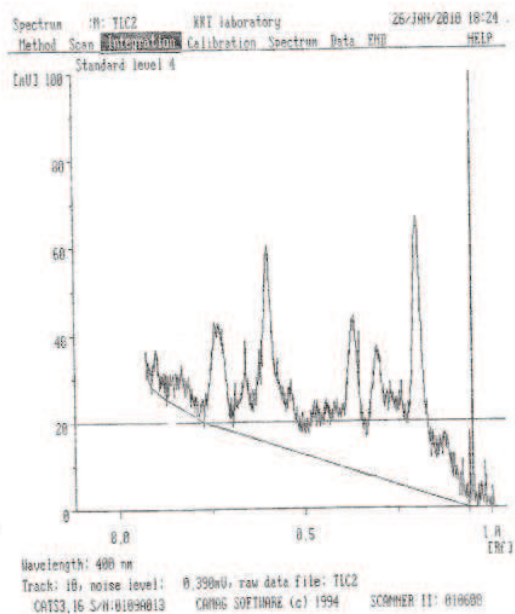


## Příloha PVic: Denzitometrické záznamy chromatogramů ze soustavy 13

### Vzorek 9

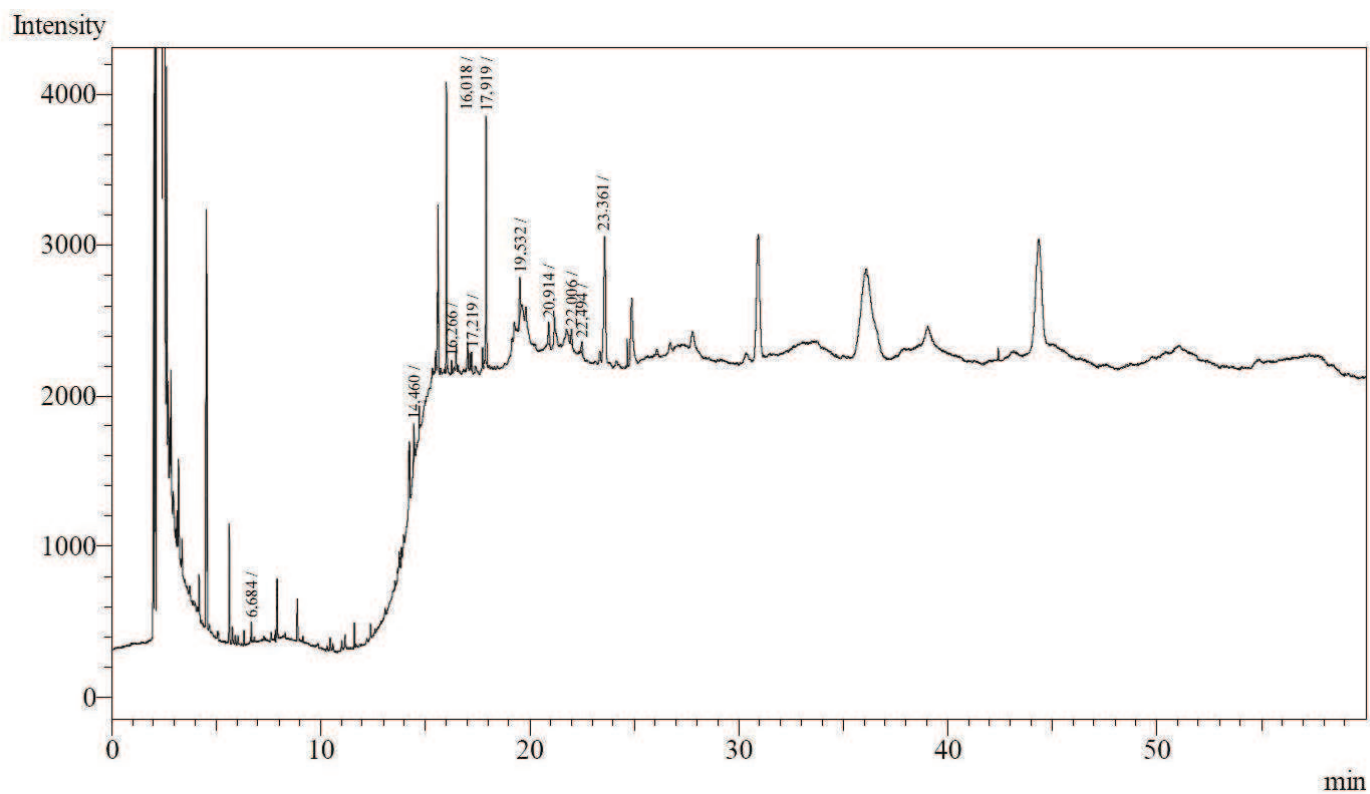


### Vzorek 10



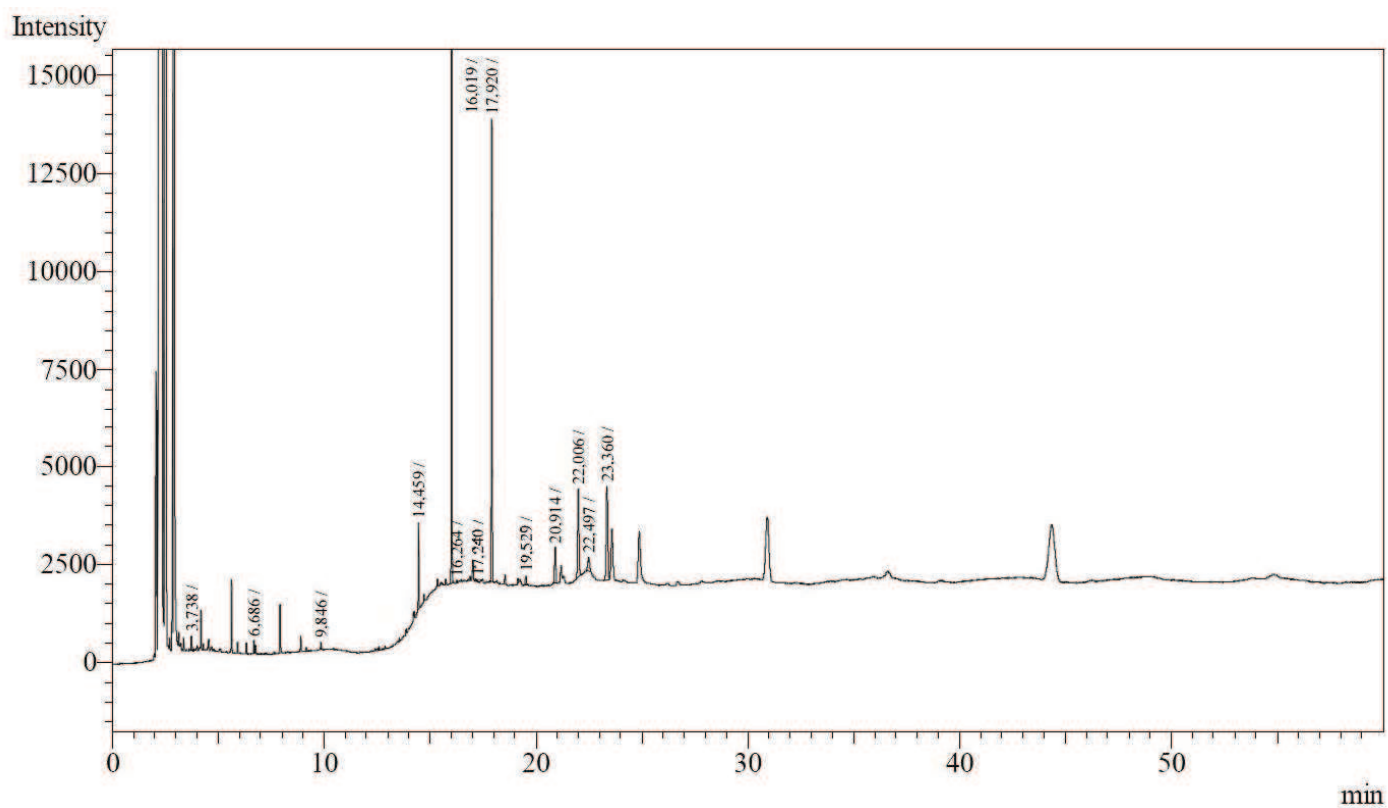


## Příloha PVIIa: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku I



Retenční čas (min.)	Mastná kyselina	Obsah v %
6,684	kapronová	1,8
14,460	laurová	2,2
16,018	myristová	30,0
16,266	myristolejová	1,6
17,219	pentadecenová	2,3
17,919	palmitová	33,0
19,532	hepatdecenová	6,8
20,914	stearová	4,0
22,006	linolová / linolelaidová	3,2
22,494	arachová	2,2
23,361	gama-linolenová / alfa-linolenová	13,0

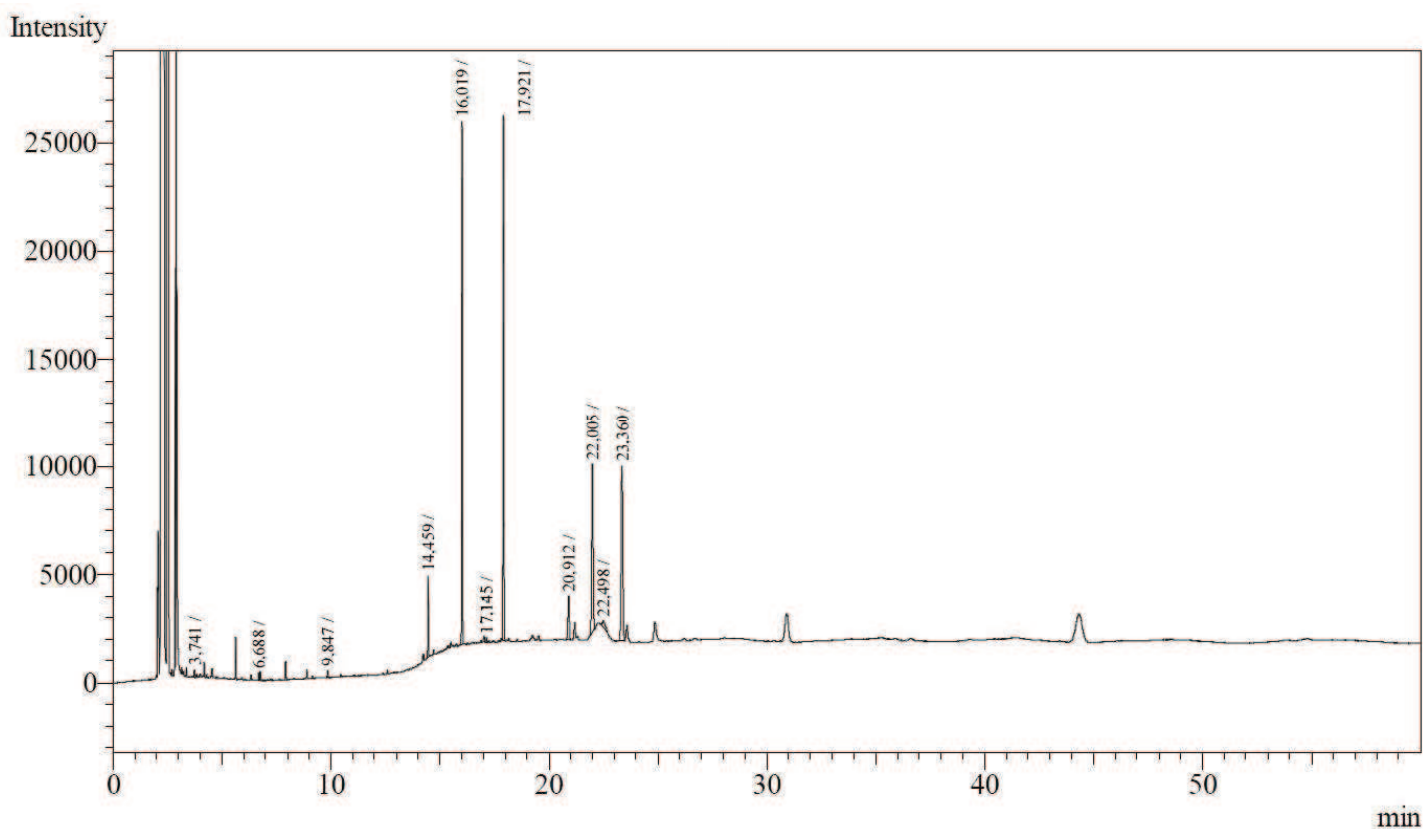
## Příloha PVIIb: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku II



Retenční čas (min.)	Mastná kyselina	Obsah v %
3,738	máselná	1,0
6,686	kapronová	0,6
9,846	kaprylová	0,4
14,459	laurová	4,3
16,019	myristová	29,6
16,264	myristolejová	0,1
17,240	pentadecenová	0,2
17,920	palmitová	32,7
19,529	hepatdecenová	0,8
20,914	stearová	3,9
22,006	linolová / linolelaidová	10,8
22,497	arachová	2,0
23,360	gama-linolenová / alfa-linolenová	13,5

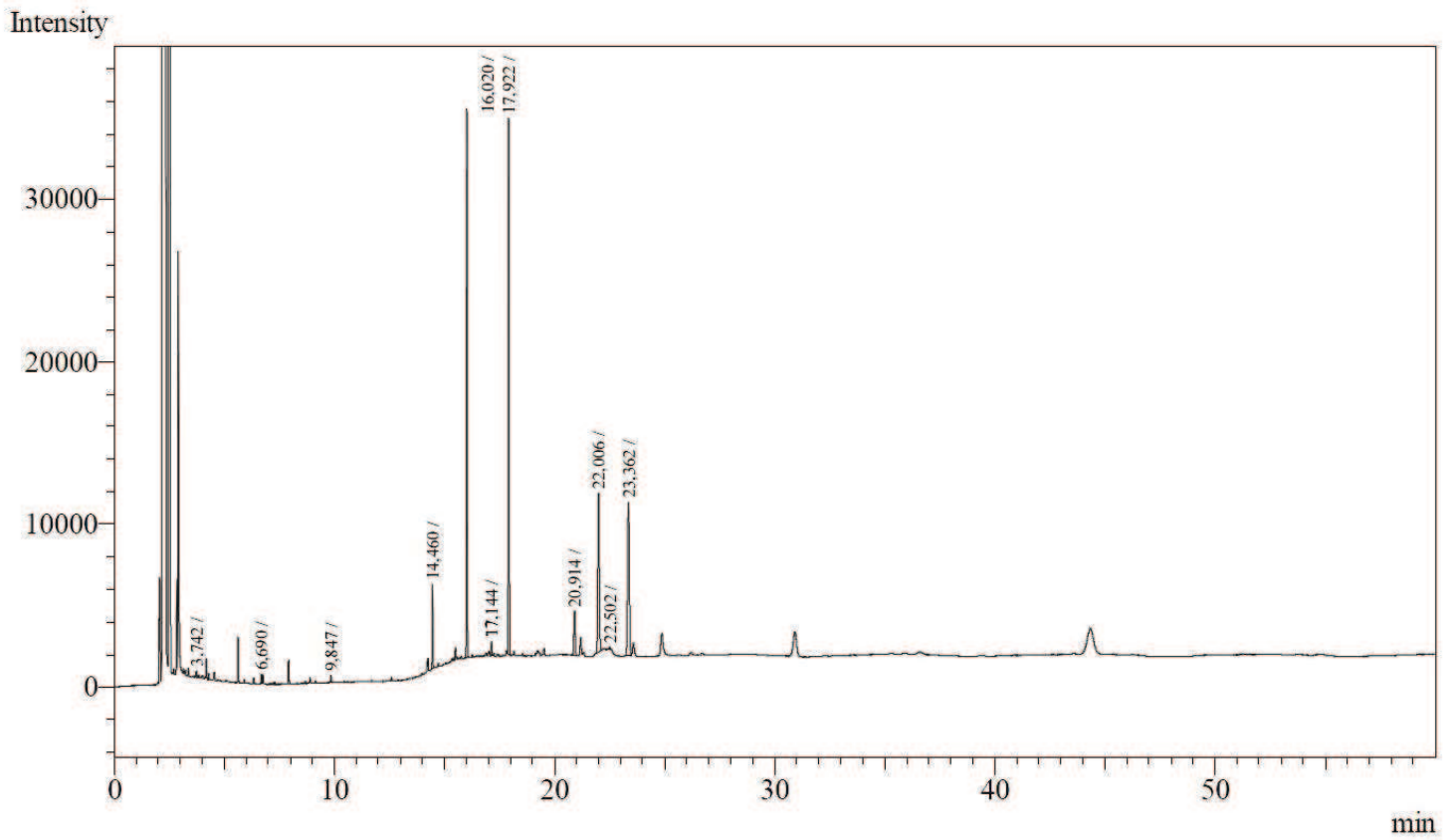


## Příloha PVIIc: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku III



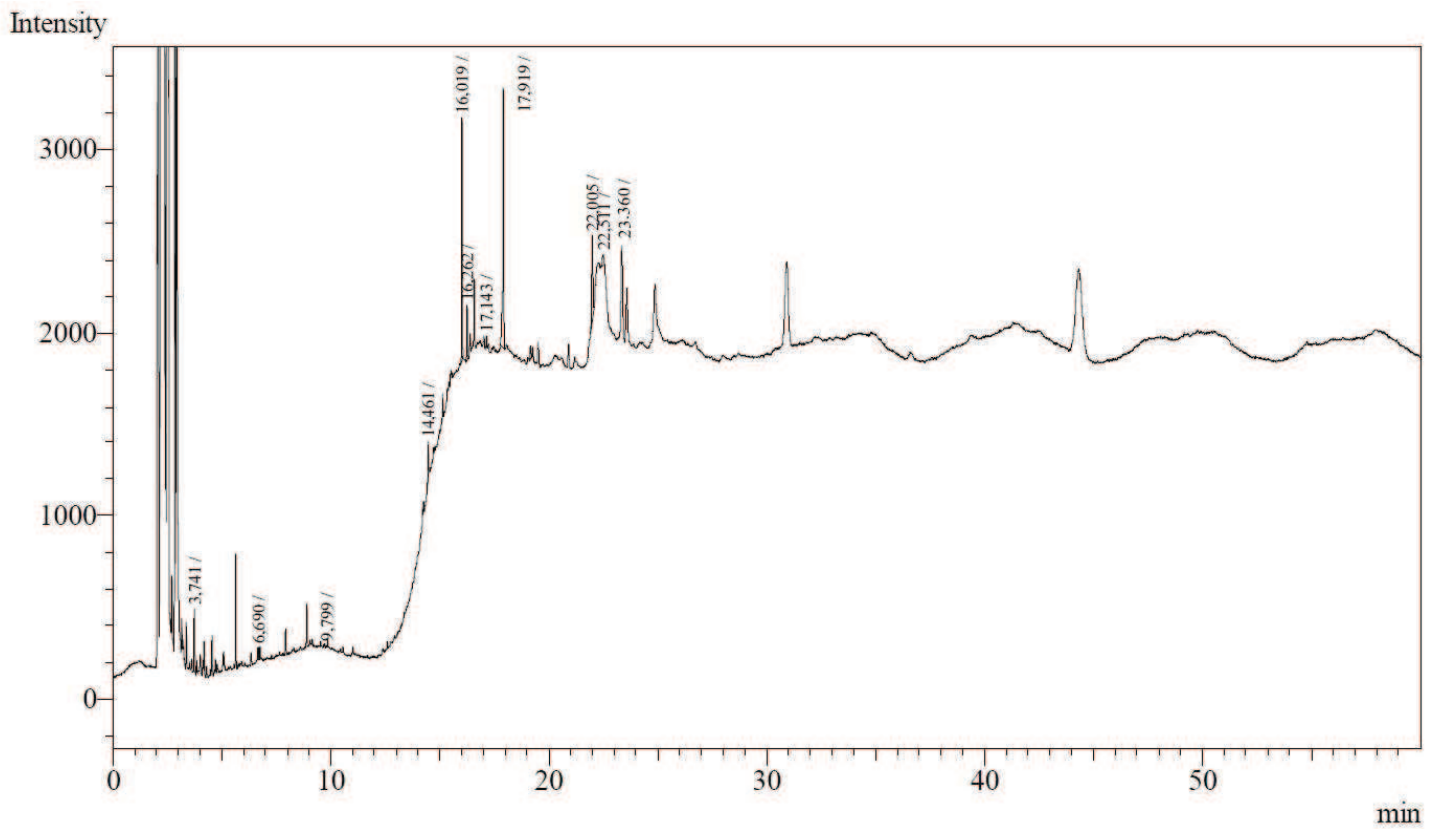
Retenční čas (min.)	Mastná kyselina	Obsah v %
3,741	máselná	0,4
6,688	kapronová	0,3
9,847	kaprylová	0,4
14,460	laurová	3,2
16,019	myristová	22,7
17,145	pentadecenová	0,2
17,921	palmitová	30,0
20,912	stearová	4,0
22,005	linolová / linolelaidová	17,0
22,498	arachová	1,3
23,360	gama-linolenová / alfa-linolenová	20,5

## Příloha PVIId: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku IV



Retenční čas (min.)	Mastná kyselina	Obsah v %
3,742	máselná	0,3
6,690	kapronová	0,4
9,847	kaprylová	0,4
14,460	laurová	3,4
16,020	myristová	24,4
17,144	palmitová	0,7
17,922	stearová	31,3
20,914	arachová	4,1
22,006	gama-linolenová / alfa-linolenová	16,5

## Příloha PVIIe: Chromatogram ze stanovení MK pomocí GS-FID Vzorku V



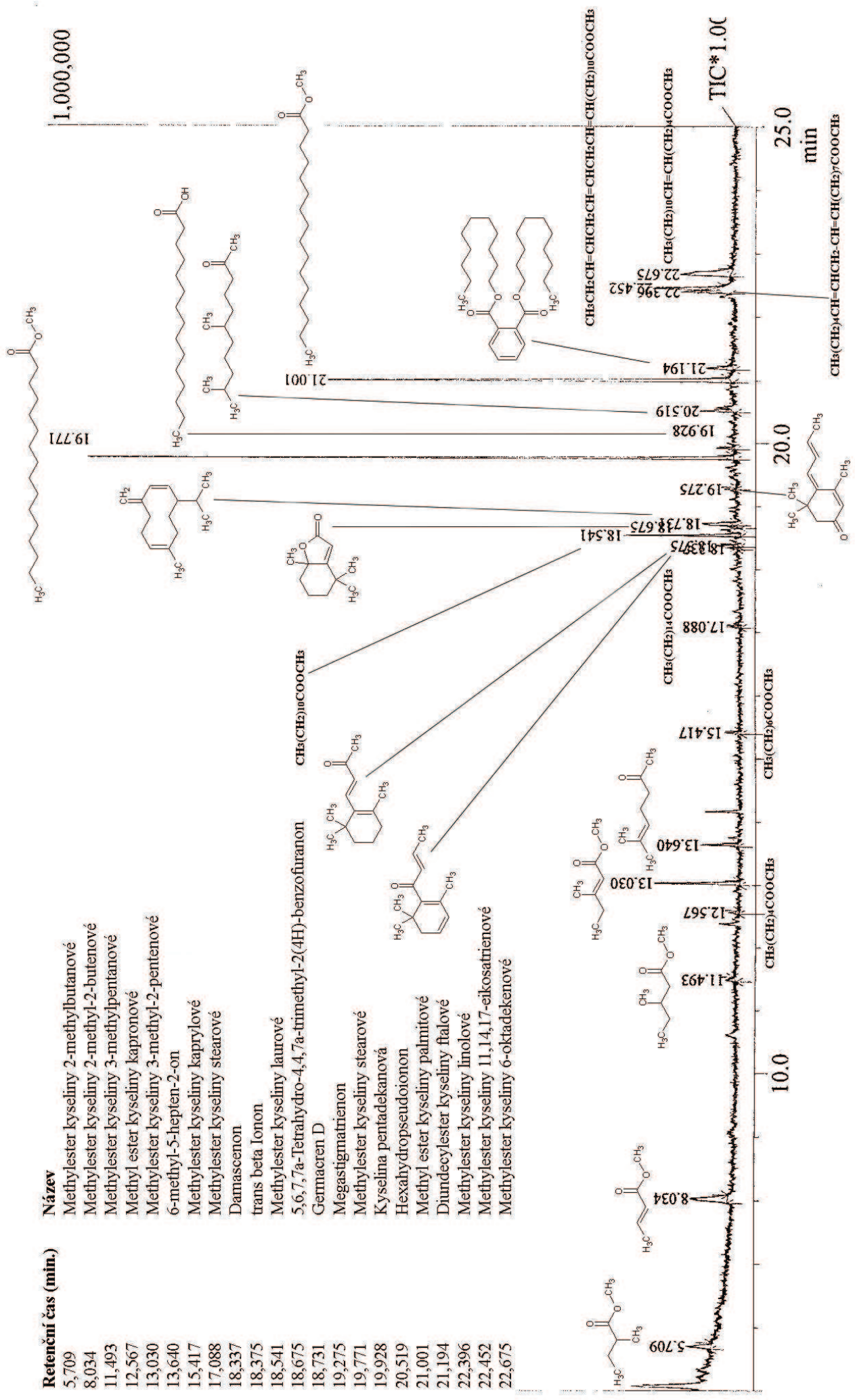
Retenční čas (min.)	Mastná kyselina	Obsah v %
3,741	másečná	0,6
6,690	kapronová	0,6
9,799	kaprylová	0,1
14,461	laurová	2,5
16,019	myristová	20,8
16,262	myristolejová	5,1
17,143	pentadecenová	1,0
17,919	palmitová	34,4
22,005	linolová / linolelaidová	16,3
22,511	arachová	2,7
23,360	gama-linolenová / alfa-linolenová	15,9

# Příloha PVIIIa: Chromatogram GC-MS analýzy Vzorku I

**Retenční čas (min.)**

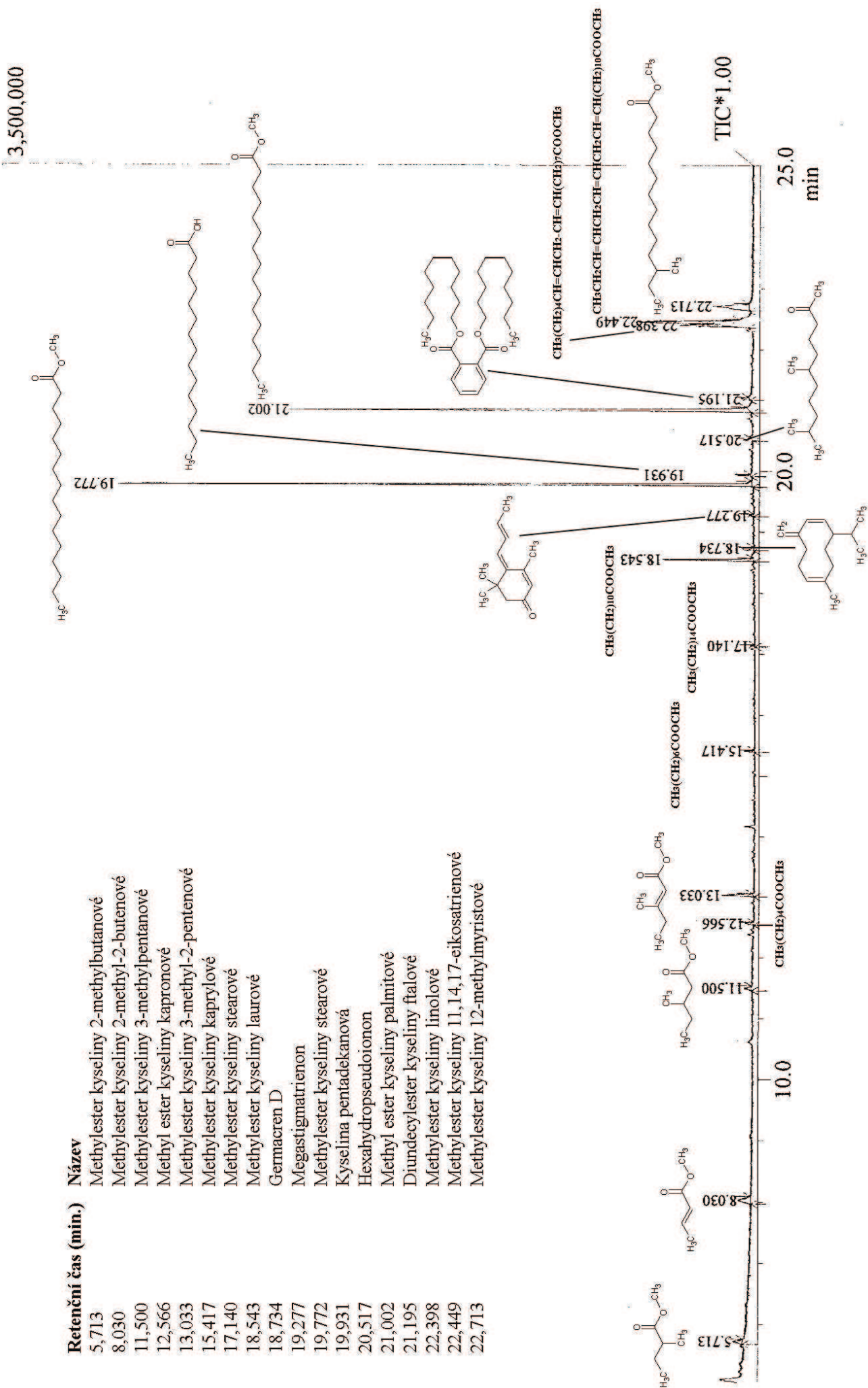
- 5,709
- 8,034
- 11,493
- 12,567
- 13,030
- 13,640
- 15,417
- 17,088
- 18,337
- 18,375
- 18,541
- 18,675
- 18,731
- 19,275
- 19,771
- 19,928
- 20,519
- 21,001
- 21,194
- 22,396
- 22,452
- 22,675

- Název
- Methylester kyseliny 2-methylbutanové
- Methylester kyseliny 2-methyl-2-butenové
- Methylester kyseliny 3-methylpentanové
- Methyl ester kyseliny kapronové
- Methylester kyseliny 3-methyl-2-pentenové
- 6-methyl-5-hepten-2-on
- Methylester kyseliny kaprylové
- Methylester kyseliny stearové
- Damascenon
- trans beta Ionon
- Methylester kyseliny laurové
- 5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4H)-benzofuranon
- Germacren D
- Megastigmatienon
- Methylester kyseliny stearové
- Kyselina pentadekanová
- Hexahydropseudoionon
- Methyl ester kyseliny palmitové
- Diundecylester kyseliny fialové
- Methylester kyseliny linolové
- Methylester kyseliny 11,14,17-eikosatinenové
- Methylester kyseliny 6-oktadekenové



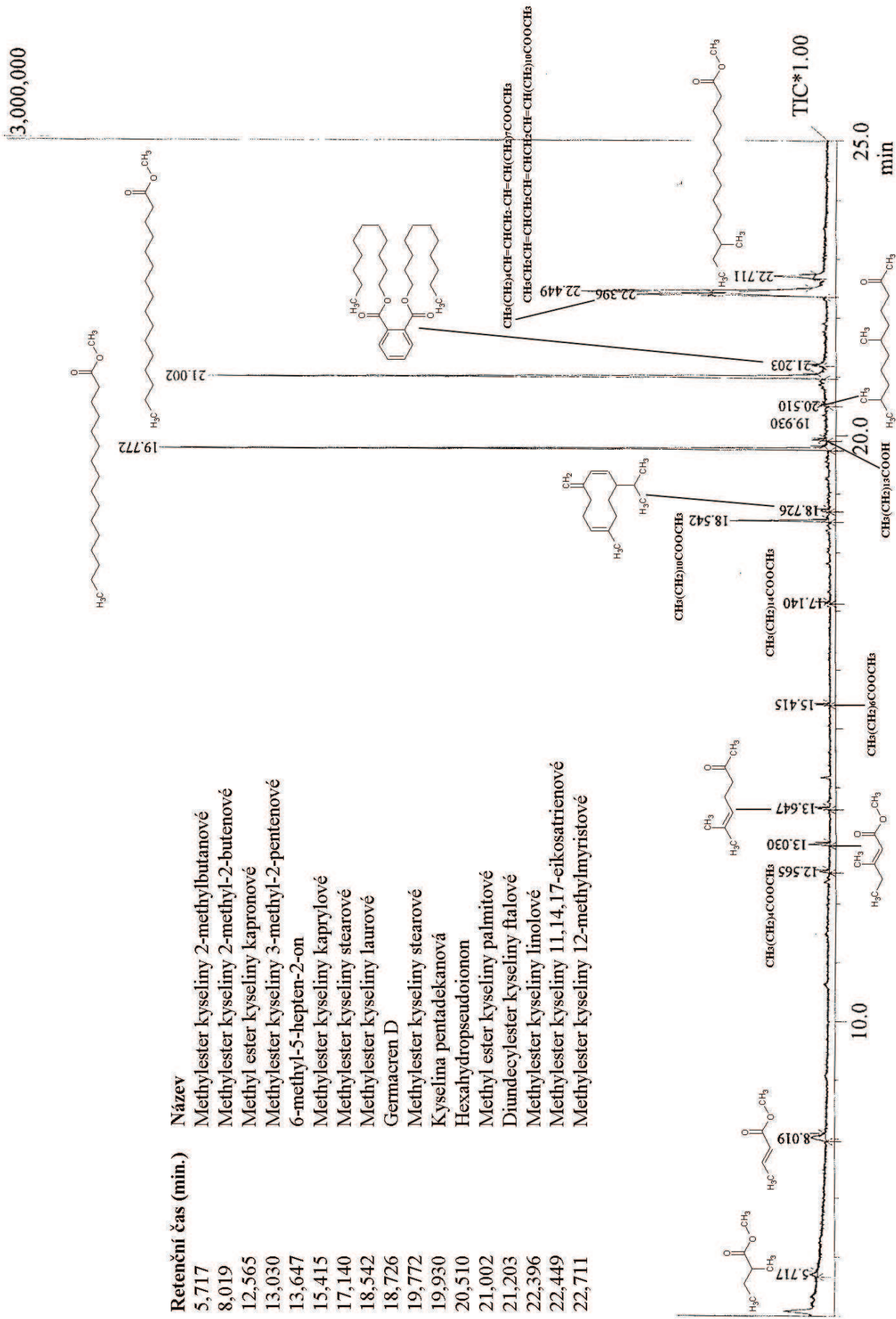
# Příloha PVIIIb: Chromatogram GC-MS analýzy Vzoroku II

Retenční čas (min.)	Název
5,713	Methylester kyseliny 2-methylbutanové
8,030	Methylester kyseliny 2-methyl-2-butenové
11,500	Methylester kyseliny 3-methylpentanové
12,566	Methyl ester kyseliny kapronové
13,033	Methylester kyseliny 3-methyl-2-pentenové
15,417	Methylester kyseliny kaprylové
17,140	Methylester kyseliny stearové
18,543	Methylester kyseliny laurové
18,734	Germacren D
19,277	Megastigmatrienon
19,772	Methylester kyseliny stearové
19,931	Kyselina pentadekanová
20,517	Hexahydropseudoionon
21,002	Methyl ester kyseliny palmitové
21,195	Diundecylester kyseliny ftalové
22,398	Methylester kyseliny linolové
22,449	Methylester kyseliny 11,14,17-eikosatrienové
22,713	Methylester kyseliny 12-methylmyristové





# Příloha PVIIIc: Chromatogram GC-MS analýzy Vzorku III



Retenční čas (min.)	Název
5,717	Methylester kyseliny 2-methylbutanové
8,019	Methylester kyseliny 2-methyl-2-butenové
12,565	Methyl ester kyseliny kapronové
13,030	Methylester kyseliny 3-methyl-2-penténové
13,647	6-methyl-5-hepten-2-on
15,415	Methylester kyseliny kaprylové
17,140	Methylester kyseliny stearové
18,542	Methylester kyseliny laurové
18,726	Germacren D
19,772	Methylester kyseliny stearové
19,930	Kyselina pentadekanová
20,510	Hexahydropseudoionon
21,002	Methyl ester kyseliny palmitové
21,203	Diundecylester kyseliny ftalové
22,396	Methylester kyseliny linolové
22,449	Methylester kyseliny 11,14,17-eikosatrienové
22,711	Methylester kyseliny 12-methylmyristové

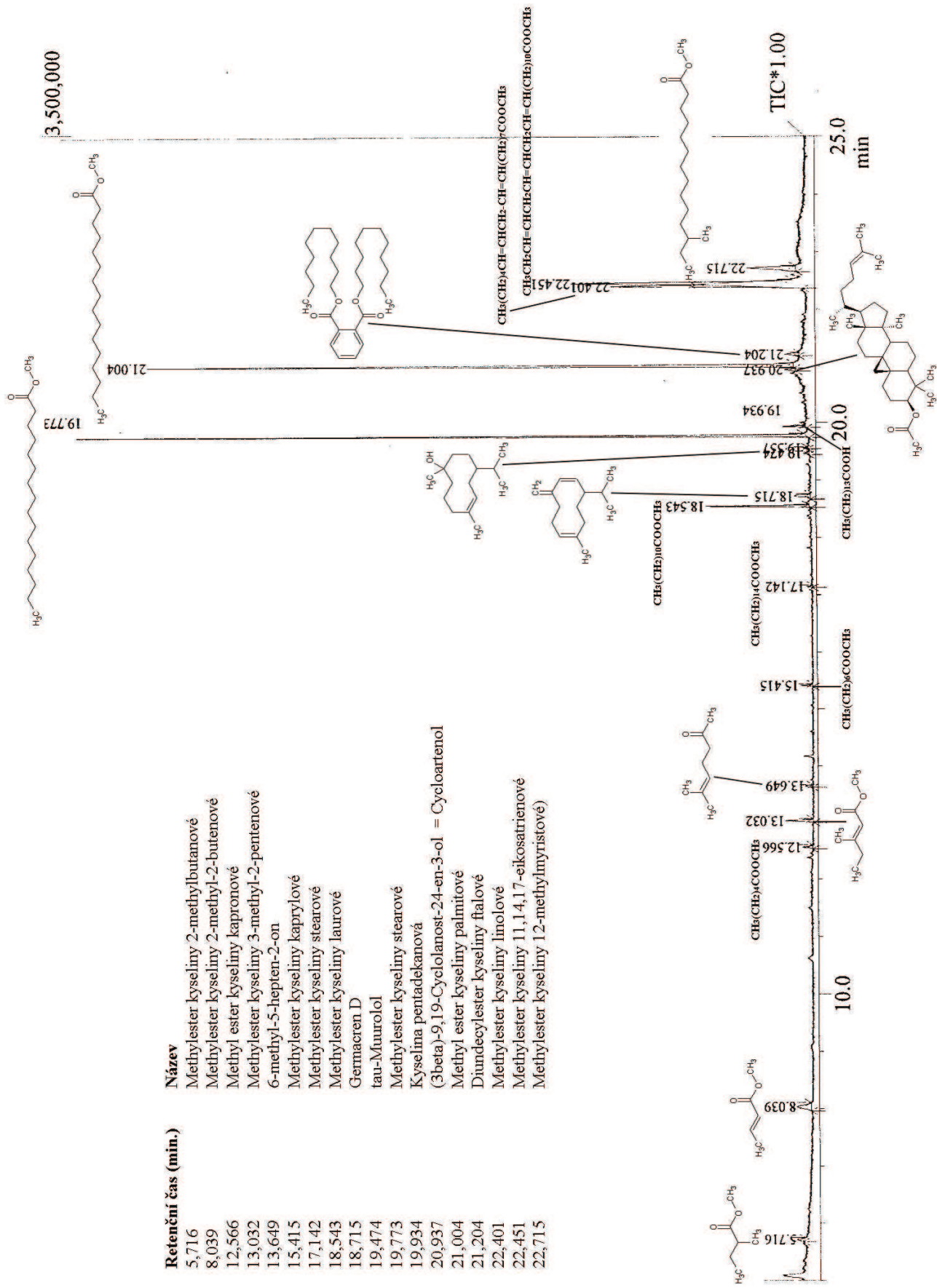
# Příloha PVIIIId: Chromatogram GC-MS analýzy Vzorčku IV

## Retenční čas (min.)

- 5,716
- 8,039
- 12,566
- 13,032
- 13,649
- 15,415
- 17,142
- 18,543
- 18,715
- 19,474
- 19,773
- 19,934
- 20,937
- 21,004
- 21,204
- 22,401
- 22,451
- 22,715

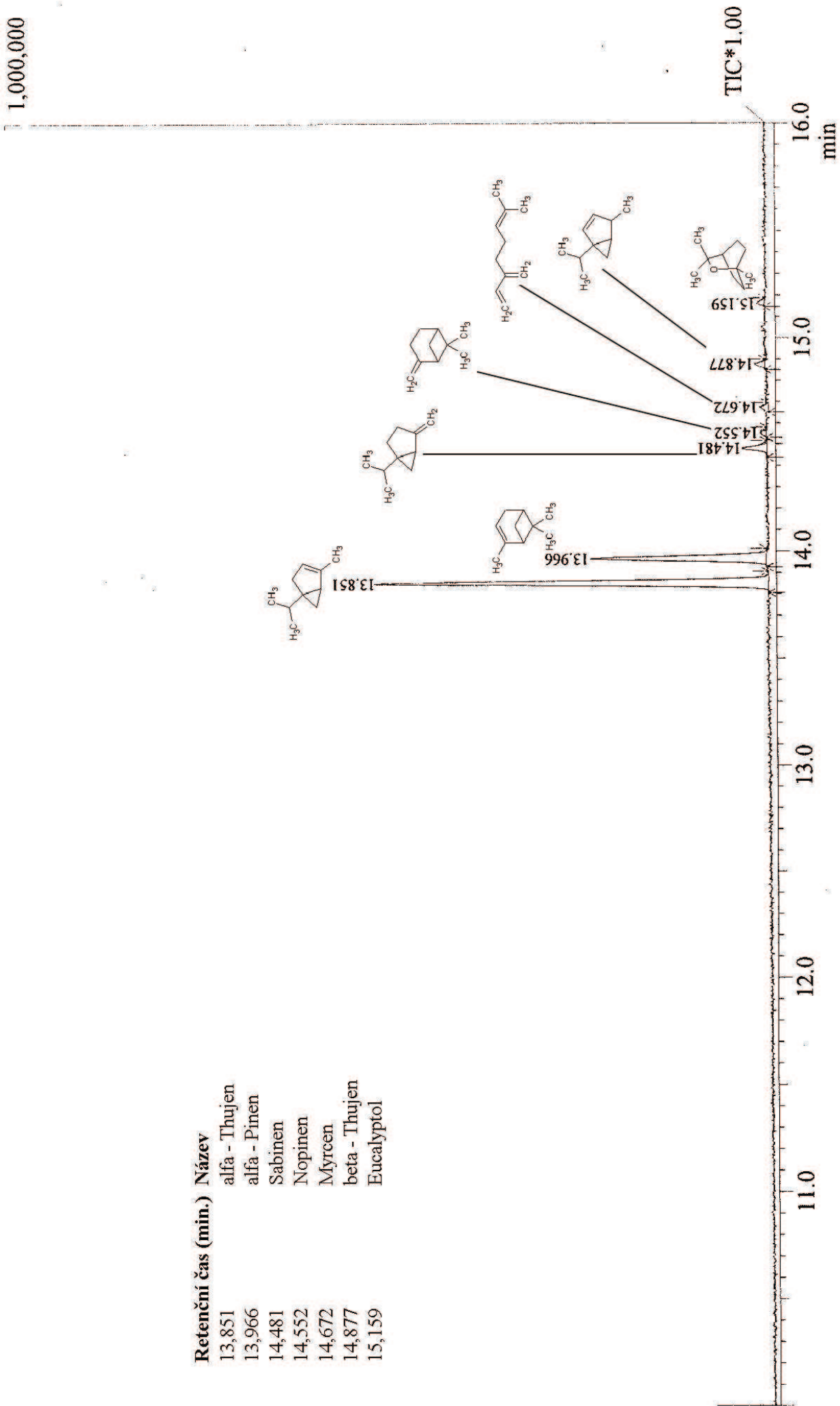
## Název

- Methylester kyseliny 2-methylbutanové
- Methylester kyseliny 2-methyl-2-butanové
- Methyl ester kyseliny kapronové
- Methylester kyseliny 3-methyl-2-pentenové
- 6-methyl-5-hepten-2-on
- Methylester kyseliny kaprylové
- Methylester kyseliny stearové
- Methylester kyseliny laurové
- Germaeren D
- tau-Muurolol
- Methylester kyseliny stearové
- Kyselina pentadekanová
- (3beta)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol = Cycloartenol
- Methyl ester kyseliny palmitové
- Diundecylester kyseliny flalové
- Methylester kyseliny linolové
- Methylester kyseliny 11,14,17-eikosatrienové
- Methylester kyseliny 12-methylmyristové



# Příloha PIX: Chromatogram těkavých látek měsíčku

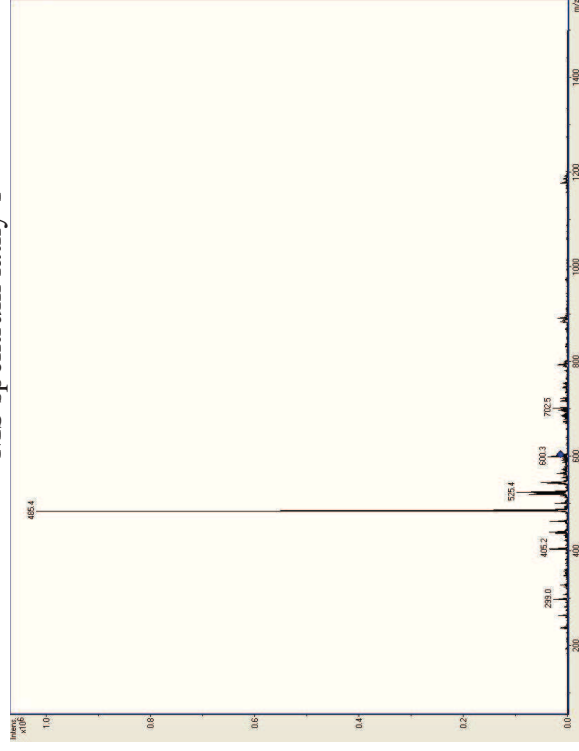
Retenční čas (min.)	Název
13,851	alfa - Thujen
13,966	alfa - Pinen
14,481	Sabinen
14,552	Nopinen
14,672	Myrcen
14,877	beta - Thujen
15,159	Eucalyptol



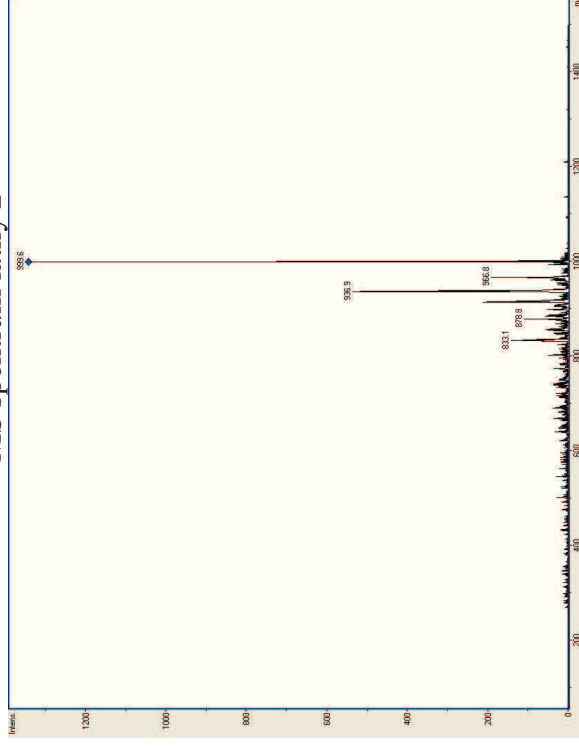


# Příloha PXa: Hmotnostní spektra látek z analýzy extraktu pomocí HPLC-MS

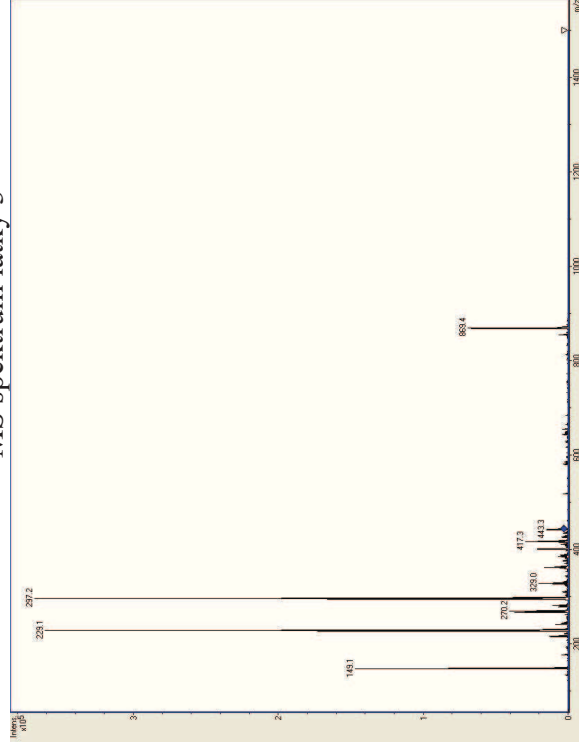
MS spektrum látky 1



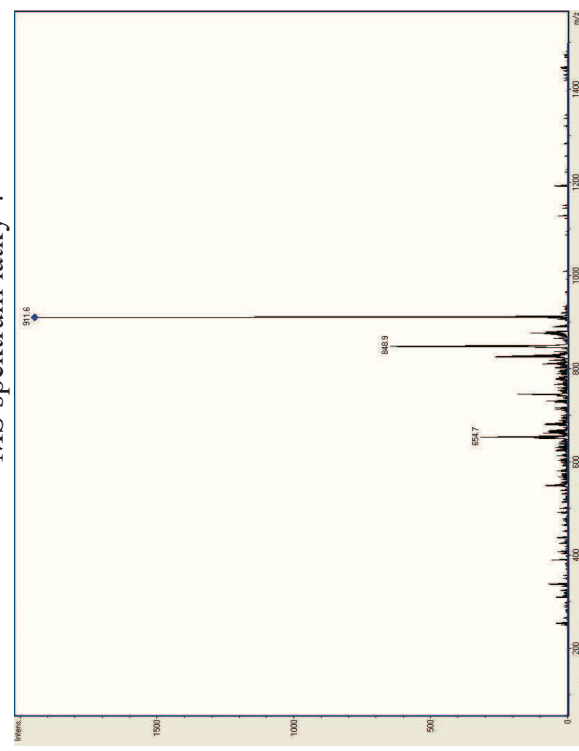
MS spektrum látky 2



MS spektrum látky 3

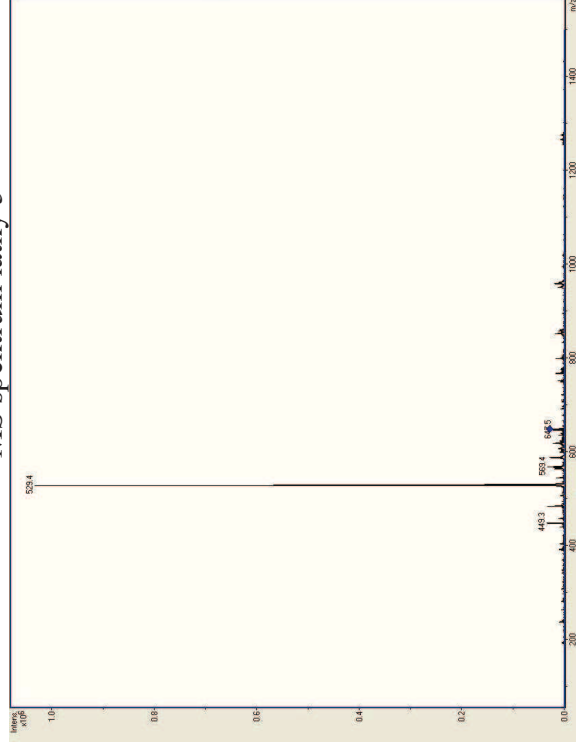


MS spektrum látky 4

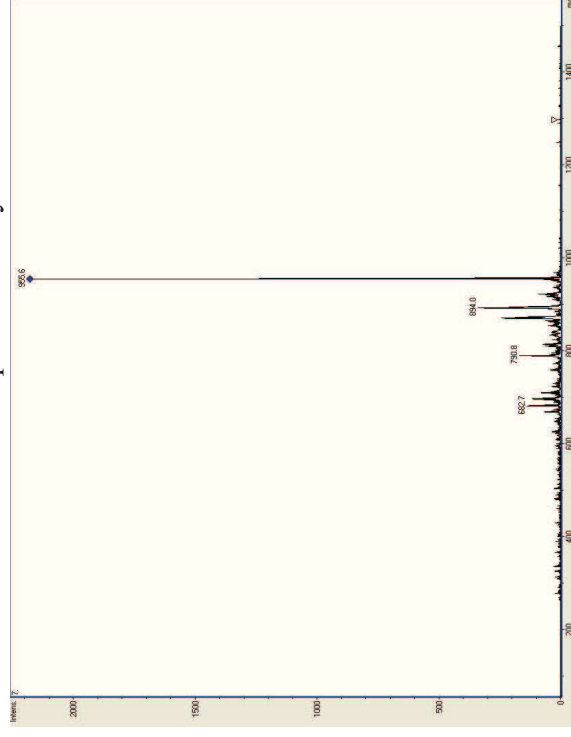


# Příloha PXb: Hmotnostní spektra látek z analýzy extraktu pomocí HPLC-MS

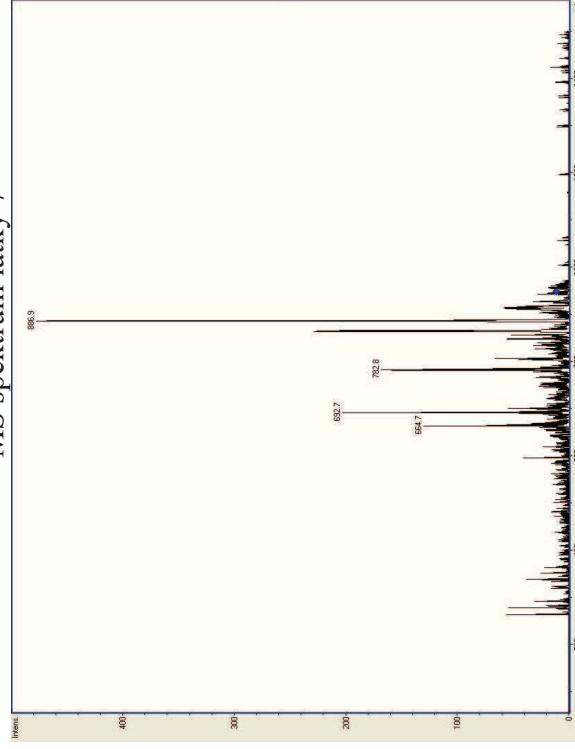
MS spektrum látky 5



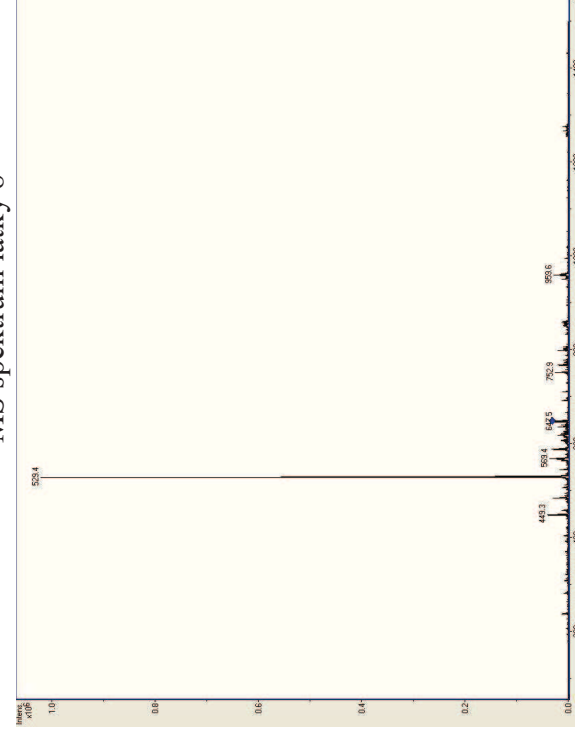
MS spektrum látky 6



MS spektrum látky 7

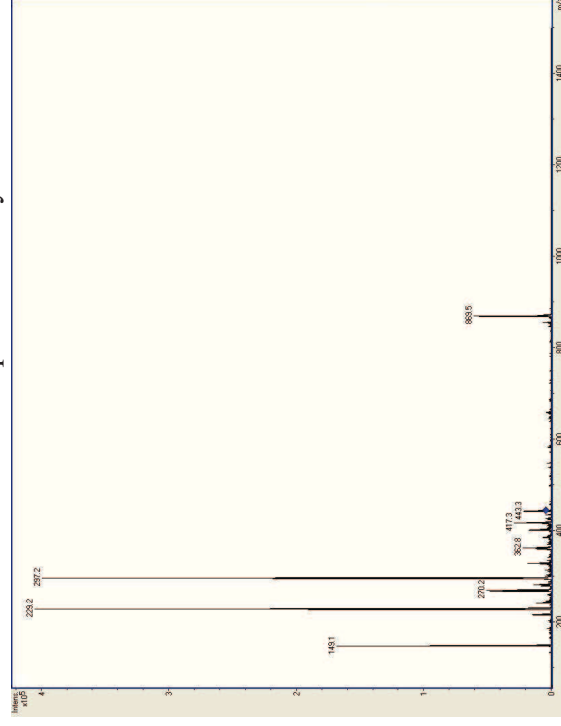


MS spektrum látky 8

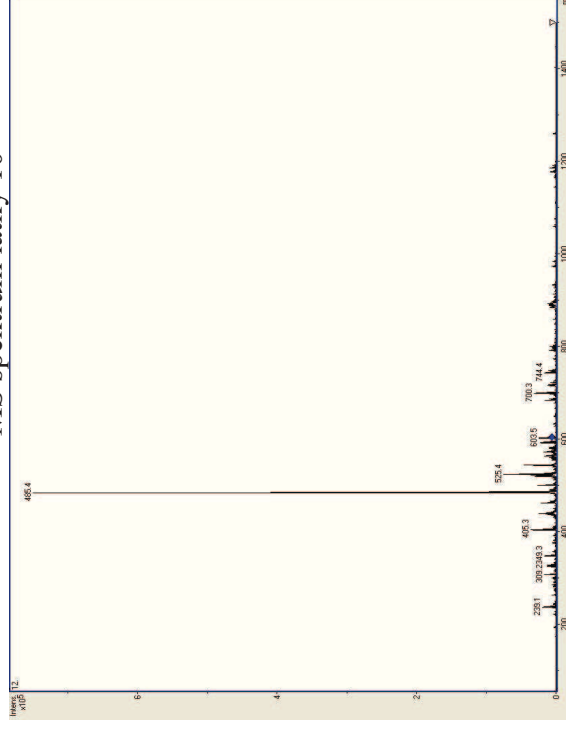


# Příloha PXc: Hmotnostní spektra látek z analýzy extraktu pomocí HPLC-MS

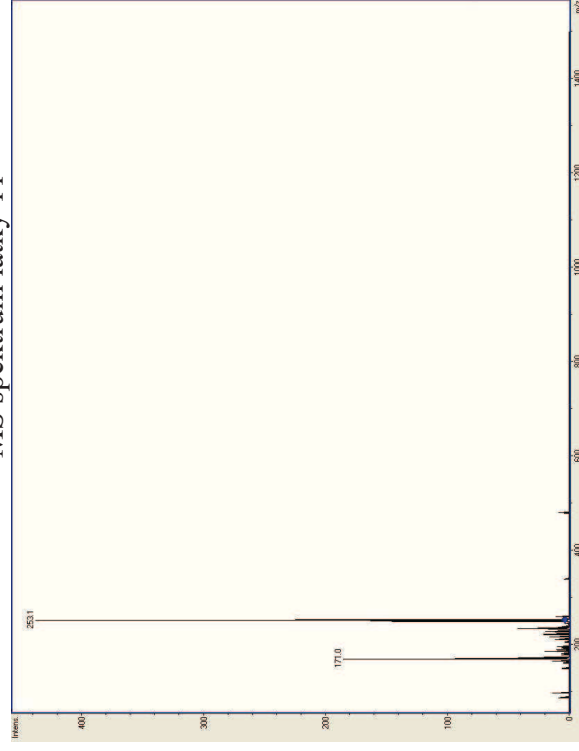
MS spektrum látky 9



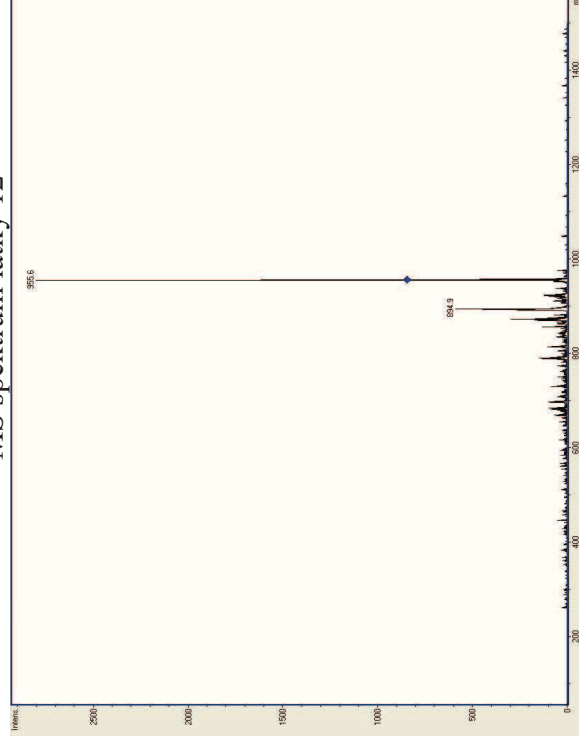
MS spektrum látky 10



MS spektrum látky 11

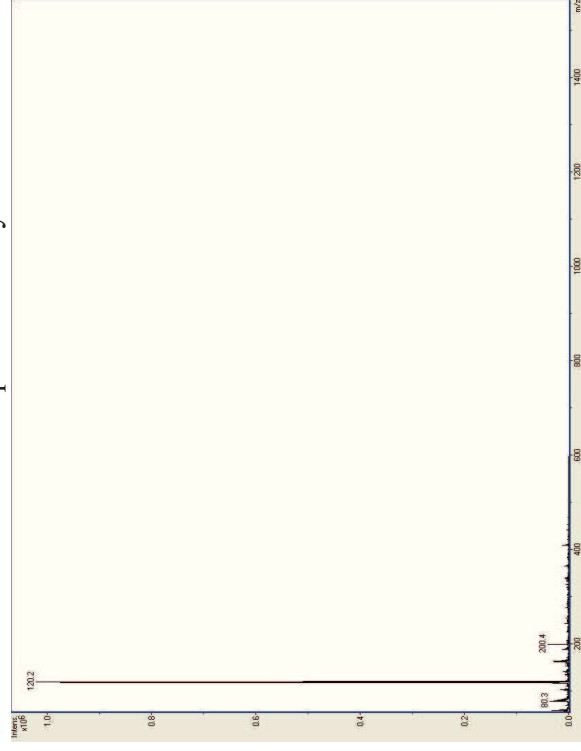


MS spektrum látky 12



# Příloha PXd: Hmotnostní spektra látek z analýzy extraktu pomocí HPLC-MS

MS spektrum látky 13



MS spektrum látky 14

