

Analýza sensoricky aktivních látek bylin

Barbara Stonawská

Bakalářská práce
2007



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Barbara STONAWSKÁ**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Analýza sensoricky aktivních látek bylin**

Zásady pro vypracování:

Formou literární rešerše zpracujte téma o analytickém stanovení sensoricky aktivních látek

1. Charakterizujte sensoricky aktivní látky vyskytující se v potravinách, bylinách
2. Popište analytické metody využívané pro hodnocení sensoricky aktivních látek

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Dle doporučení vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce:

8. ledna 2007

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. června 2007

Ve Zlíně dne 2. května 2007



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

V bakalářské práci jsou charakterizovány sensoricky aktivní látky obsažené v bylinách a metody jejich stanovení. K nejdůležitějším sensoricky aktivním látkám se řadí látky vonné (především terpenické uhlovodíky, aldehydy a ketony), chuťové látky (látky sladké, slané, kyselé, hořké a trpké) a barviva (karotenoidní, flavonoidní a chlorofylová barviva).

Dále jsou popsány metody izolace a identifikace těchto látek z bylin. K izolačním metodám se řadí především extrakční a destilační metody, k metodám stanovení pak různé spektrometrické metody (spektrofotometrie, IR) a především chromatografické techniky (kapalinová chromatografie, plynová chromatografie) s využitím různé detekce (UV, MS, FID).

Bylo také charakterizováno sedm bylin (dobromysl, heřmánek, levandule, máta, šalvěj, rozmarýna, třezalka a tymián), vyznačujících se vysokým obsahem sensoricky aktivních látek (především vonných látek obsažených v silici).

Klíčová slova: byliny, sensoricky aktivní látky, izolace, chromatografické metody (HPLC, GC), spektrometrické metody.

ABSTRACT

In the thesis there are sensory active substances in herbs and methods for their determination characterized. The most important sensory active substances are odorants (especially turpentine hydrocarbons, aldehydes and ketones), taste substances (sweet, acid, bitter and astringent substances) and colorants (carotenoids, flavonoids and chlorophyllous dyes).

There are also described methods of isolation and identification of these substance in herbs. For isolation are useful extraction and distillation methods, for determination - various spectrometric methods (spectrophotometry, IR) and especially chromatographic techniques (liquid chromatography, gas chromatography) with various detectors (UV, MS, FID).

There is also characterized seven herbs (oregano, chamomile, lavender, mint, sage, rosemary and thyme) characterized by high content of sensory active substances (especially odorants of essential oil).

Keywords: herbs, sensory active substances, isolation, spectrometric methods, chromatographic techniques (HPLC, GC).

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce Ing. Soni Škrovánkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, skvělý přístup, cenné rady a podnětné připomínky, které mi poskytla při zpracování bakalářské práce.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 SENZORICKY AKTIVNÍ LÁTKY	11
1.1 VONNÉ LÁTKY	12
1.1.1 Silice.....	13
1.1.2 Významné skupiny vonných látek.....	14
1.2 CHUŤOVÉ LÁTKY	18
1.3 BARVIVA	21
1.3.1 Karotenoidy	21
1.3.2 Flavonoidní barviva.....	22
1.3.3 Chlorofylová barviva.....	23
2 METODY IZOLACE A STANOVENÍ SENZORCKY AKTIVNÍCH LÁTEK	25
2.1 DESTILAČNÍ METODY	25
2.1.1 Prostá a frakční destilace	25
2.1.2 Destilace s vodní parou	26
2.1.3 Destilace za sníženého tlaku	27
2.1.4 Nové techniky destilační metody	28
2.2 EXTRAKČNÍ METODY	29
2.2.1 Extrakce.....	29
2.2.1.1 Extrakce tuhých látek.....	29
2.2.1.2 Extrakce kapalin	30
2.2.1.3 Head space extrakce.....	31
2.2.2 Mikroextrakční metody	31
2.2.2.1 SPME	31
2.2.2.2 SDME	32
2.2.3 Superkritická CO ₂ extrakce	33
2.3 DALŠÍ IZOLAČNÍ POSTUPY	34
2.4 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	35
2.4.1 Klasifikace chromatografických metod.....	35
2.4.2 Planární chromatografie	36
2.4.3 Kapalinová chromatografie	38
2.4.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	39
2.4.4 Plynová chromatografie	39
2.5 SPEKTROMETRIKÉ METODY	41
2.5.1 Spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti.....	41
2.5.2 Infračervená spektrometrie.....	42
2.5.3 Hmotnostní spektrometrie	43
2.6 DALŠÍ METODY STANOVENÍ.....	43
3 BYLINY (LÉČIVÉ ROSTLINY)	44

3.1	DOBROMYSL OBEČNÁ.....	44
3.2	HEŘMÁNEK PRAVÝ	44
3.3	LEVANDULE LÉKAŘSKÁ.....	45
3.4	MÁTA PEPRNÁ	46
3.5	ŠALVĚJ LÉKAŘSKÁ.....	47
3.6	ROZMARÝNA LÉKAŘSKÁ	47
3.7	TYMIÁN OBEČNÝ	48
	ZÁVĚR	49
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	57
	SEZNAM OBRÁZKŮ	58

ÚVOD

Bylinám neboli léčivým rostlinám jsou od pradávna připisovány pozitivní léčivé účinky při léčbě mnoha nemocí, což také potvrdila i moderní medicína. Kromě léčení se některé z nich používají jako koření, pomocné konzervační látky i jako aromatické látky, protože mají vysoký obsah sensoricky aktivních látek. Složení a obsah sensoricky aktivních látek se mění podle místa výskytu, doby sběru a růstových podmínek. Nevhodnou sklizní, sušením, zpracováním a skladováním dochází ke ztrátě sensoricky aktivních látek a získaný bylinný materiál se stává nevhodný.

Mezi sensoricky aktivní látky patří látky chuťové, vonné a barviva. Za vůni jsou odpovědné především uhlovodíky, alkoholy, étery a karbonylové sloučeniny. Tyto látky se v bylinách vyskytují hlavně jako složky silic. Mezi chuťové látky patří sloučeniny mající sladkou, slanou, hořkou, trpkou či pálivou chuť. Na zbarvení rostlin se podílejí hlavně karotenoidy, flavonoidní a chlorofylová barviva.

Směsi sensoricky aktivních látek, zejména látek vonných, získané z rostlinných materiálů označujeme jako silice. Silice jsou těkavé kapaliny, ve vodě nerozpustné a jsou důležitou surovinou pro kosmetický a farmaceutický průmysl a v neposlední řadě také pro průmysl potravinářský. Pro tyto účely se mnoho bylin pěstuje jako zemědělská plodina. Pro užití v uvedených odvětvích průmyslu je nutné sledovat jejich kvalitu a čistotu.

Stanovení obsahu sensoricky aktivních látek v bylinách je poměrně náročné, protože často jde o látky vyskytující se ve velmi malém množství. K izolaci se používají různé metody extrakce a destilace. Extrakce se provádí za použití různých organických rozpouštědel, či jejich směsí, nebo také pomocí extrakce nadkritickým CO₂. Destilaci lze provádět také několika způsoby, nejběžnější je prostá a frakční destilace, destilace s vodní parou či destilace za sníženého tlaku.

Ke stanovení sensoricky aktivních látek se nejčastěji používají metody chromatografické a spektrometrické. Z chromatografických metod patří k nejpoužívanějším plynová a kapalinová chromatografie, v některých případech se využívá také metod planární chromatografie. Metody spektrometrické se rozlišují podle vlnové délky použitého záření, jde zejména o spektrometrii ve viditelné a UV oblasti, spektrometrii infračervenou a hmotnostní.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SENZORICKY AKTIVNÍ LÁTKY

Nejvýznamnějším psychickým faktorem ve výživě člověka je sensorická neboli smyslová jakost, která zásadně ovlivňuje druh a jakost konzumované potraviny. Sensorickou jakost ovlivňují sensoricky aktivní látky obsažené v potravinách. Jsou to látky, které vnímáme smysly: [1, 2, 3]

- čichem, vyvolávající olfaktorické (čichové) vjemy
- chutí, látky vyvolávající (gustativní) chuťové vjemy
- zrakem, těmto vjemům říkáme vizuální (zrakové)
- hmatem, jde o vjemy haptické (hmatové)
- sluchem, pak jde o vjemy auditorické (zvukové).

K nejvýznamnějším sensoricky aktivním látkám tedy patří:

- látky vonné (ovlivňující vůni potravin)
- látky chuťové (udělující potravinám chuť)
- barviva (látky propůjčující potravinám barvu)
- látky ovlivňující texturu potravin

Vůně, chuť, barva a textura jsou důležitými organoleptickými vlastnostmi potravin. Mají pro konzumenta větší význam než jiné atributy (např. obsah vitaminů), protože je vnímá jako první informaci, která výrazně přispívá k vytvoření celkového dojmu o konzumované potravine. Proto se mnoho potravin a pokrmů aromatizuje, ochucuje, barví a upravuje jejich textura. Každá přídatná látka (potravinové aditivum) musí projít před svým použitím v potravine přísným hodnocením své bezpečnosti. Dále se musí prokázat opodstatněnost a nezbytnost použití aditiva v potravine. [2, 4]

Podle původu lze vonné, chuťové i barevné látky rozlišit do dvou základních skupin: [1, 2]

1. Látky, které jsou přítomny v potravinách (potravinářských surovinách) živočišného či rostlinného původu jako produkty sekundárního metabolismu. Jsou to tedy sekundární metabolity vnitrobuněčných procesů. Jejich kvalita a kvantita závisí hlavně na genetických dispozicích daného organismu. Existuje ale i jistá variabilita

způsobená některými zevními faktory. Pro tyto sensoricky aktivní látky se používá termín primární sensoricky aktivní látky.

2. Řada vonných, chuťových a barevných látek je v potravinách přítomna ve vázané, sensoricky inaktivní formě (jako glykosidy nebo estery). Z těchto sloučenin se sensoricky aktivní látky uvolňují působením enzymů. Vznikají také během skladování a zpracování potravin jako produkty enzymových a neenzymových reakcí bílkovin, sacharidů a lipidů, případně vitamínů a pigmentů. Fermentační pochody a tepelné zpracování potravin jsou hlavními procesy, při kterých tyto látky vznikají ze svých prekurzorů. Z chemických reakcí se při jejich vzniku uplatňují především antioxidační reakce, Maillardova reakce a reakce enzymového hnědnutí. Sensoricky aktivní látky vznikající v průběhu zpracování a skladování potravin se často označují jako sekundární sensoricky aktivní látky.

Výsledný vjem vůně, chuti a barvy bývá ve vyjimečných případech určován přítomností jedné látky (tzv. klíčová látka), několika látek, ale ve většině případů jde o složité směsi několika nebo mnoha sloučenin. [1, 4]

1.1 Vonné látky

Vonné látky působí na čichové receptory a vyvolávají dojem vůně. Mohou zároveň působit na chuťové receptory, pak je označujeme jako aromatické látky. Vonné látky jsou převážně málo polární nebo nepolární těkavé látky vyvolávající širokou škálu nejrůznějších sensorických vjemů. [1, 5]

Obsah aromatických látek v potravinách je většinou velmi nízký, ale například v koření nebo drogách jejich obsah dosahuje až několika procent. Vůně potravin je velmi často komplexním vjemem vyvolaným velkým počtem vonných látek. Běžně bývá v každé potravine několik set různých vonných sloučenin. Na charakteristické vůni potraviny se sice z různých důvodů (charakter vůně, vysoká prahová koncentrace) řada z nich nepodílí vůbec, jiné velmi málo, některé sloučeniny však mají zásadní význam. Výslednou vůni potom tvoří těchto několik látek. Pouze ve výjimečných případech lze typickou vůni potraviny spojovat s vůní jediné nebo několika málo sloučenin, tzv. klíčových složek. [1, 4, 5]

Intenzita a kvalita vůně závisí nejen na přítomných vonných látkách, ale také na dalších složkách potravin jako jsou bílkoviny, sacharidy a lipidy, se kterými vonné látky interagují. [4]

Vonné látky lze nalézt v každé skupině organických sloučenin. Primárními a sekundárními vonnými látkami jsou některé uhlovodíky, ale většina vonných látek obsahuje v molekule kyslík (alkoholy, etery, aldehydy, ketony, kyseliny, estery), dusík (aminy, dusíkaté heterocykly) a síru (trioly, sulfidy, sírné heterocykly). [1, 2]

1.1.1 Silice

Silice, někdy nazývané éterické oleje, či olea aetherea, jsou pestrá směsí různých senzory aktivních látek (vonných, chťových i barviv). Jedná se o těkavé, olejnaté, ve vodě nerozpustné látky nebo jejich rozmanité směsi. Jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech jako jsou: eter, chloroform, benzín. Obvykle se jedná o složité směsi látek. Nejčastěji jsou tvořeny terpeny a terpenovými deriváty, ale i uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, karboxylovými kyselinami a dalšími látkami. [6, 7, 8]

Obsah terpenových uhlovodíků zhoršuje rozpustnost silic v etanolu a také kvalitu silic. Provádí se proto jejich deterpenace (tzn. odstranění monoterpenových a seskviterpenových uhlovodíků) za pomoci destilace (např. destilace za sníženého tlaku), extrakce nebo adsorpce. Terpenové uhlovodíky nemají na charakter vůně příliš velký vliv, protože nositeli vůně jsou především kyslíkaté sloučeniny. Silice zbavené terpenových uhlovodíků se označují jako deterpenové a jsou odolnější vůči autooxidaci. [1]

Získávají se z rostlin a to z různých částí, např. květů, stonků, kvetoucích stonků, plodů, semen, dřeva, listů nebo kořenů, kde jsou uloženy ve speciálních pletivech. Účinků silic na lidský organismus je mnoho. Podporují vyměšování žaludečních šťáv, vzbuzují chuť k jídlu a mívají antiseptické a desinfekční účinky. Některé způsobují dráždění a červenání kůže a tím její zahřívání. Jiné usnadňují odkašlávání nebo působí jako mírné diuretikum. Využívají se také do masážních olejů v rámci tzv. aromaterapie. Z hlediska potravinářského průmyslu mají význam také jako antioxidanty tuků. [1, 8]

Silice jsou primárně vytvářeny jako látky chránící rostliny před býložravci, mohou proto vykazovat toxické účinky. Protože jsou lipofilní, dochází k jejich absorpci pokožkou a mohou způsobit podráždění pokožky a kontaktní dermatitidy. Toxické jsou např. některé mo-

noterpenové složky jako je thujon v rostlinách čeledi cypřišovitých a pulegon v rostlinách z čeledi hluchavkovitých, které působí na centrální nervový systém. Muselo by ale dojít k požití vysokých dávek. [8]

Existují také silice syntetické neboli rekonstituované, které obsahují syntetické aromatické látky, stejné jako přírodní. Nevýhodou je, že postrádají jemnost typickou pro silice přírodní, jsou ale levnější a mají standardní kvalitu. [1]

1.1.2 Významné skupiny vonných látek

Uhlovodíky

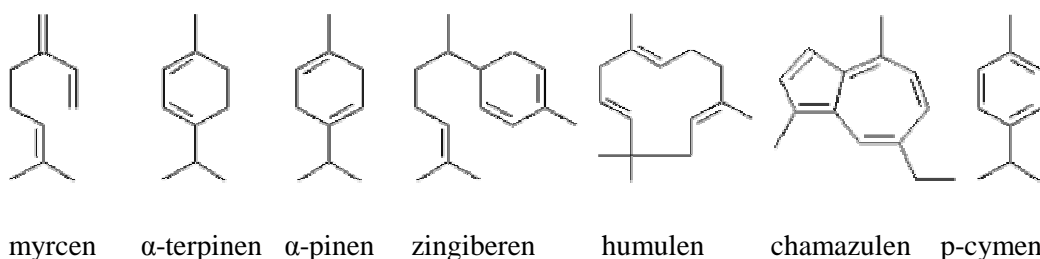
Uhlovodíky jsou přítomny v potravinách a pochutinách jako významné složky silic, nebo složky lipofilních podílů. Jsou přirozenou složkou potravinářských surovin a materiálů. Některé mohou vznikat sekundárně během skladování, tepelného zpracování či ozařování ionizujícím zářením. Ze sensorického hlediska jde o významné látky, jejichž prahové hodnoty se však výrazně liší. K nejvýznamnějším se řadí terpenové a aromatické. [1, 4, 9]

Terpenové uhlovodíky – obecný vzorec terpenových uhlovodíků je $(C_5H_8)_n$ a základní stavební jednotkou je isopren. Polymerací isoprenu vznikají monoterpeny ($n=2$), seskviterpeny ($n=3$), diterpeny ($n=4$), triterpeny ($n=6$) a tetraterpeny ($n=8$). Terpenové uhlovodíky tvoří aroma rostlinných silic. Jsou složkami téměř všech druhů ovoce, zeleniny a koření. Příklady významných uhlovodíků jsou uvedeny na Obr. 1. [1, 4, 9]

Monoterpenové uhlovodíky – z monoterpenových uhlovodíků jsou nejběžnější: myrcen, který je obsažen v silici chmelu a v koriandru, ocimen, který je obsažen v silici fenyklu. D-limonen, vonící po citrusových plodech, α -terpinen, tvořící složku tymiánové, kmínové, majoránkové, fenyklové a pomerančové silice. Běžně se také v bylinných silicích vyskytují dva isomery lišící se polohou dvojné vazby α -terpenen a γ -terpenen, α - a β -felandren jsou přítomny v silicích badyánu či skořice, α - a β -pinen, sabinen, kamfen se také často vyskytují v potravinách rostlinného původu. [1, 4]

Seskviterpenové uhlovodíky – nejběžnější seskviterpeny reprezentují: β - a γ -bisabolen, obsažené v tymiánu a bazalce, zengiberen, který tvoří podstatnou část silice zázvoru, α -karyofyllen neboli α -humulen, který se nachází v chmelu, jalovci a puškvorci, β -karyofyllen (voní po hřebíčku), chamazulen (heřmánková silice, viz Obr. 1). [1, 4, 10]

Aromatické uhlovodíky – tyto látky se vyskytují jako přirozené složky silic, příkladem je *p*-cymen (viz Obr. 1), který vzniká rozkladem citranu a voní intenzivně po tymiánu. [1, 9]



Obr. 1 Vzorce významných terpenových a aromatických uhlovodíků

Alkoholy

Alkoholy bývají jak primárními, tak sekundárními vonnými a chuťovými látkami potravin rostlinného původu. Sekundárně mohou alifatické alkoholy vznikat ze sacharidů a aminokyselin působením enzymů. V potravinách je najdeme jak volné, tak vázané. Přírodními vonnými látkami jsou především nižší alifatické, nasycené a nenasycené alkoholy, zvláště monoterpenové a seskviterpenové alkoholy. Příklady významných alkoholů jsou uvedeny na Obr. 2.[1, 4, 9]

Alifatické a alicyklické alkoholy

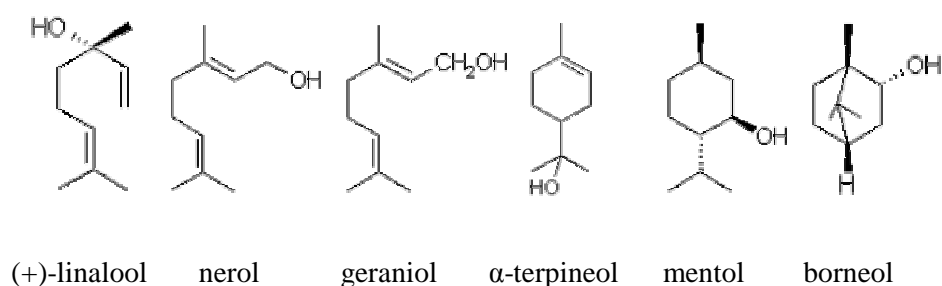
Nenasycené alkoholy jsou významnými aromatickými složkami ovoce, zeleniny a hub. Nositeli příjemné bylinné (zelené) vůně jsou isomery hex-3-en-1-olu (listový alkohol). [1]

Monoterpenové alkoholy jsou charakteristickou složkou různých silic, jsou nositeli sladké, těžké, květinové vůně. Nejvýznamnější jsou (-)linalool, který je vonnou látkou mnoha květů (např. levandule, konvalinek), (+)linalool (koriandol), který je složkou silice ze semen koriandru další citonellol, geraniol, nerol. Vůně geraniolu a nerolu připomíná růže. Častou složkou silic je také α -terpineol, který se vyskytuje v silici majoránky, kardamonu, vavřínu a badyánu, dále 4-terpineol, který je složkou silice majoránky, muškátového ořechu a tymiánu, a mentol, tvořící významnou složku silice máty, borneol, který je významnou složkou silice šalvěže, muškátového ořechu a levandule. [1, 4, 9]

Mezi zástupce *seskviterpenových alkoholů* se řadí alicyklický alkohol farnesol, který voní po květinách a je obsažen v pomerančové silici a čaji, α - a β -bisabolon, které jsou obsaženy v citrusech. [1, 4, 9]

Aromatické a heterocyklické alkoholy

Aromatické a heterocyklické alkoholy jsou primárními složkami silic, vznikají také při fermentaci a termických procesech. Mají význam v parfumerii. Příkladem je skořicový alkohol, který má hyacintovou vůni. [1, 4]



Obr. 2 Vzorce významných terpenových alkoholů

Étery

Étery se jako vonné a chuťové látky vyskytují poměrně málo. Jako složky různých druhů koření se vyskytují některé alkyl (aryl) étery – sloučeniny odvozené od anisolu. Významné jsou estragon (vyskytující se v estragonové silici), anetol (v anýzové, fenyklové a badyánové silici), metyleugenol (v hřebíčkové silici) a asaron (obsažený v silici kořene puškorce). [1, 4]

K této skupině látek se také řadí látky s připojeným 1,3-dioxolovým kruhem, příkladem je myristicin, obsažený v silicích koření (kmín). Tento eter má halucinogenní účinky. Dalším představitelem je safrol, obsažený v sassafrasové silici ze stromu kašta bělavá, je také přítomen v silici muškátového ořechu, anýzu a skořice. [1]

Karboonylové sloučeniny

Karboonylové sloučeniny se dělí na aldehydy, které obsahují aldehydickou skupinu $-\text{CH}=\text{O}$ a ketony, obsahující ketonickou skupinu $-\text{C}-$. Tyto skupiny jsou vysoce reaktivní. [1]

O

Těkavé aldehydy a ketony jsou nejvýznamnějšími vonnými a chuťovými látkami, které již v malých koncentracích velmi ovlivňují sensorickou jakost. V potravinách jsou přítomny jako primární i sekundární látky, jejichž prekurzory jsou aminokyseliny, mastné kyseliny a sacharidy. [1, 4, 9]

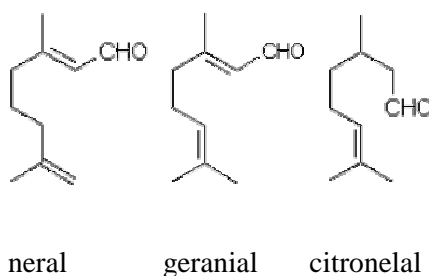
Aldehydy

Ze sensorického hlediska jsou významné *monoterpenové*, zřídka i *seskviterpenové* aldehydy. Nejčastěji se vyskytuje nenasycený aldehyd citral a jeho isomery: citral a (geranial) a citral b (neral), který je složkou citrónové silice, a také silice zázvoru, eukalyptu a pepře. Významný je také citronelal, který tvoří až 40% silice citrónu a eukalyptu, a také safranal, který je charakteristickou vonnou složkou šafránu setého. [1, 4, 9]

Aromatické aldehydy bývají velice často složkami silic a aromatu různých potravin a pochutin. Příkladem je benzaldehyd, který je složkou hořkomandlové silice, vyskytuje se volný nebo vázaný v glykosidu amygdalinu. Je obsažen také ve skořicové silici a tvoří jednu ze složek aromatu destilátů získaných kvašením peckového ovoce. Další látkou patřící do této skupiny je kumaldehyd, vyskytující se ve skořicové a bazalkové silici a skořicový aldehyd obsažený ve skořicové silici. Dále anisaldehyd, který je vonnou složkou anýzové, badyánové, fenyklové a vanilkové silice. [1, 4, 9]

Z hydroxyderivátů aromatických aldehydů je významný vanilin, který tvoří charakteristickou složku arómatu vanilky. [1, 4]

Příklady významných aldehydů jsou uvedeny na Obr. 3.



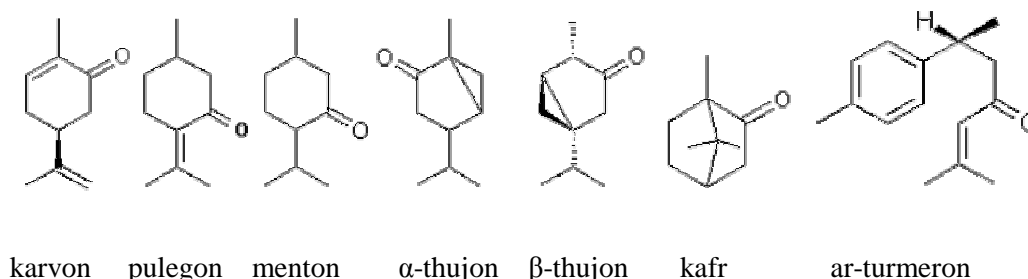
Obr. 3 Vzorce významných aldehydů

Ketony

Ketony jsou také přítomny v potravinách jako primární i sekundární látky a složky žádoucích i nežádoucích aromat. [4]

Do skupiny ketonů patří 2-pentanon, což je složka skořicové a badyánové silice a je obsažen v mnoha silicích květin, 2-methyl-2-hepten-6-on byl identifikován v zázvoru, kakau a citróněch. [1, 4]

Senzoricky významné jsou především *monoterpenové ketony*, příkladem je karvon (složka kmínové a koprové silice), dihydrokarvon (kmínová a mátová silice) a jeho isomer pulegon a také menton (oba se vyskytují v mátové a také majoránkové silici). Thujon, se vyskytuje jako stereoisomerní α - a β -thujon v silici šalvěže a různých druhů pelyňku. Kafr je složka skořicové, šalvějové a rozmarýnové silice, získává se ze dřeva Kafrovníku lékařského. Fenchon je složkou fenyklové silice a 4-methoxyfenylacetone (anýzový keton), který je přítomen v anýzové silici. Monocyklické *seskviterpenové ketony* turmeson a ar-turmeron jsou složkami silice kurkumy. Příklady významných ketonů jsou uvedeny na Obr. 4. [1, 4, 9]



Obr. 4 Vzorce významných ketonů

1.2 Chuťové látky

Přijímání potravy a jiných látek dutinou ústní je doprovázeno subjektivními chuťovými pocity. Chuťové látky jsou podnětem pro podráždění chuťových receptorů umístěných v celé dutině ústní, především na jazyku. Tyto látky jsou většinou polární, ve vodě rozpustné a netěkavé sloučeniny. Celkový vjem je kombinací především čtyř základních chutí: sladké, slané, kyselé a hořké a případně dalších chutí: trpké, pálivé a umami. Chuťové vjemy základních chutí vznikají v různých částech dutiny ústní, kde jsou umístěny specializované receptory. Ostatní chuti jsou registrovány celou ústní dutinou. [1, 2, 4]

Vnímání chuti je možno chápat jako interakci chuťové látky s chuťovým receptorem. Tyto interakce jsou nejlépe prozkoumány u sladkých látek. [1]

Sladká chuť je běžně spojována s cukry. Sladké jsou monosacharidy, oligosacharidy a cukerné alkoholy. Tento vjem vyvolávají také například syntetická náhradní sladidla, která mají odlišnou strukturu než sacharidy. Sladké látky se liší kvalitou a intenzitou chuti, které jsou ovlivněny druhem anomeru a koncentrací látky, teplotou a přítomností jiných látek. Jako referenční látka se používá sacharóza. [1, 2, 4]

Slanou chuť vyvolávají hlavně anorganické soli a jejich ionty, kationty i anionty. Z organických sloučenin slanou chuť vyvolávají některé karboxylové kyseliny, aminokyseliny a oligopeptidy. Čistě slanou chuť má NaCl. Stejně jako u sladké chuti kvalitu ovlivňuje koncentrace, druh látky a přítomnost dalších látek. [1, 2]

Kyselá chuť potravin je způsobená přítomností disociovaných a nedisociovaných kyselin a oxoniových kationů. V potravinách mají největší význam kyseliny citrónová, jablečná, L-askorbová, vinná, šťavelová, mléčná a propionová. Tyto kyseliny se liší jak chutí tak prahovou hodnotou vnímání. [1, 4]

Z hlediska sensorické jakosti bylin jsou velmi významné látky způsobující **hořkou chuť**, kterou vykazuje řada látek, jako jsou různé organické sloučeniny (aminokyseliny, peptidy), dusíkaté heterocyklické sloučeniny a další. V potravinách dělíme hořké látky dle původu na: [1]

- Látky v potravinách přirozeně přítomné (geneticky podmíněné)
- Látky vzniklé při skladování a zpracování potravin (chemické a enzymatické reakce)
- Látky vzniklé činností kontaminujících mikroorganismů
- Látky, které byly záměrně do potravin přidány.

U některých potravin je vjem hořké chuti žádoucí (např. u kaka, piva, čaje, kávy), u některých je považován za pachut (např. u džusů, sýrů). Intenzita hořké chuti souvisí s hydrofobností molekuly a velikostí nepolární části molekuly. Za standard se považuje chinin nebo kofein, přičemž kofein je 60krát méně hořký než chinin. [1, 2]

Hořké látky se přirozeně vyskytují v různých druzích bylin a koření. V pelyňku je santonin nebo absintin, α - a β -tujon v šalvěji. Hořec a zeměžluč obsahují genciopikrin (jeho obsah u

hořce je 2-3,5%), swertiamarin a amarogentin, který je považován za nejvíce hořkou látku vyskytující se v přírodě. Šalvěj a rozmarýna obsahují hořké látky karnosol a pikrosalvin. Pikrocin je hořkou látkou šafránu. Oddenek puškvorce obsahuje akorin. U hořkých látek s toxickým účinkem jsou stanoveny maximální limity obsahu v potravinách. [1, 11]

Hořké látky povzbuzují chuť k jídlu a příznivě ovlivňují činnost trávicího ústrojí, jater a žlučníku. Žlučník díky nim vylučuje dostatečné množství žluče (žlučových kyselin) a tím podporuje správný průběh trávení ve střevech. V játrech podporují hořčiny vznik antialergenů, čímž pomáhají při alergiích, ekzémech a různých typech vyrážek. Mají příznivý vliv na odbourávání tuků a detoxikaci organismu. Některé mohou být i jedovaté (alkaloidy). V potravinářském průmyslu mají význam při výrobě alkoholických i nealkoholických (např. chinin získávaný z kůry stromu chininovníku) nápojů. [1, 7, 11]

Vjem **trpké chuti** vzniká interakcí bílkovin slin a sloučenin, které jsou přítomné hlavně v potravinách rostlinného původu. V rostlinách jsou lokalizovány většinou jen v určitých strukturách. Tyto látky označujeme jako třísloviny. Dělí se na hydrolyzovatelné, což jsou polymery esterů kyseliny gallové, a kondenzované, které jsou polymery flavonoidních látek. [1, 11]

Příklady hydrolyzovatelných tříslovin jsou tellimagrandin I a II, pedunculagin a kasuariktin vyskytující se v mnoha rostlinách, ellagotanin se vyskytuje v rostlinách z čeledi růžovitých a v léčivých rostlinách mochně nátržníku a řepíku. Hydrolýzou látek z této skupiny tříslovin vzniká cukr a různý počet molekul kyseliny gallové. [1, 4, 11]

Kondenzované třísloviny jsou meziproduktem syntézy flavonoidů a vyskytují se téměř ve všech rostlinných materiálech. Představitely jsou katechiny a gallokatechiny. Ve významnějším množství se vyskytují v jablkách, hruškách, víně, kakau a čajových lístcích. [1, 4, 11]

Mírou intenzity chuti nebo vůně je nejnižší detegovatelná koncentrace látky v roztoku nebo ve vzduchu vyvolávající daný vjem, která se nazývá prahová hodnota, koncentrace, (angl. detection value).

Rozeznává se [1]

- podnětový práh (angl. detection threshold), který vyjadřuje koncentraci, při které lze zjistit rozdíl v chuti nebo vůni ve srovnání s prostředím, které tuto látku neobsahuje
- práh rozpoznání (angl. recognition threshold), který vyjadřuje koncentraci, při které lze identifikovat kvalitu chuti nebo vůně dané látky.

1.3 Barviva

Rostlinné barviva neboli pigmenty jsou velice rozmanitou skupinou chemických látek, které absorbují určité vlnové délky viditelné části spektra a proto jsou různě barevné. Jsou významnou skupinou sensoricky aktivních látek a některé z nich i jako výživové faktory. Způsobují celkový ráz přírody. [4, 12]

Přírodní barviva, která se vyskytují v potravinách se uplatňují také jako důležité sensorické složky. [5]

Přírodní barviva dělíme z několika hledisek: podle původu (přírodní, přírodně identická a syntetická), podle struktury (dusíkaté heterocyklické sloučeniny, fenoly a z nich odvozená barviva a terpenoidy) či podle rozpustnosti (hydrofilní a lipofilní). [9, 12]

1.3.1 Karotenoidy

Karotenoidy patří mezi velmi rozšířená rostlinná barviva, existuje kolem 270 druhů, v široké barevné škále od žluté přes oranžovou až po červenou a fialovou. Jedná se o polymery isoprenu, přesněji jsou to tetraterpeny. Ve svých molekulách mají nejčastěji 40 uhlíkových atomů. Karotenoidy se vyznačují pouze několika variantami uhlíkového skeletu: mají buď ryze alifatický řetězec, nebo řetězec zakončený jedním či dvěma cykly (šestičlenným nebo pětičlenným). Dvojně vazby karotenoidů umožňují *cis-trans*-isomerii. Většinou mají konfiguraci *all-trans*, konfigurace *cis* se vyskytuje jen ve dvojných vazbách nesubstituovaných metyly. Jejich barva je vyvolána systémem většího množství konjugovaných dvojných vazeb (11 a více). Tato barviva se nazývají polyenová. Rozpouštějí se v tukách a nepolárních rozpouštědlech. [4, 9, 13]

Karotenoidy se dělí na dvě základní skupiny: [14]

- Karoteny,
- Xantofyly – kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů, nejčastěji alkoholy, aldehydy, ketony a karbové kyseliny.

Karoteny

Karoteny byly roku 1831 poprvé izolovány z kořene mrkve obecné (*Daucus carota*), podle níž byly pojmenovány. Nejjednodušším karotenem je acyklický polynenasycený uhlovodík lykopen, jehož isomerací a cyklizací lze odvodit postupně γ -, α - a β - karoten, které se od sebe liší pouze strukturním uspořádáním na koncích molekuly. α - a β - karoten se vyskytují v rostlinných pletivech a jsou uloženy v chromoplastech (fotoaktivních organelách). Z hlediska výživy člověka má význam β - karoten, α -karoten, γ -karoten a β -kryptoxantin, které jsou provitaminy vitamínu A. Lykopen je barvivem rajčat a šípků, kryptoxantin je hlavním pigmentem kukuřice a papriky. [4, 13]

Xantofyly

Xanthofyly jsou v listech přítomny ve volné formě na rozdíl od plodů, kde jsou vázány ve formě esterů vyšších mastných kyselin. Nejrozšířenějším barvivem této skupiny je žlutý lutein, derivát α -karotenu obsažený v květech a plodech. Je běžně nazýván xantofyl. Mezi xantofyly patří dále zeaxantin, violaxantin, β -kryptoxantin, anteroxantin, neoxantin a taxaxantin, které bývají součástí fotosystémů. Podobnou strukturu mají červená barviva kapsantin a kapsorubin, obsažené v paprice. Dále sem patří žlutý krocetin obsažený v šafránu. Hlavním barvivem citrusových plodů je β -citaurin. [13, 14]

Karotenoidní barviva se používají k přibarvování potravin. Z tohoto hlediska je významný β -karoten a lutein. [4]

1.3.2 Flavonoidní barviva

Flavonoidní barviva patří mezi pyranová barviva. V přírodě se vyskytují vázána na molekulu cukru jako glykosidy. Jsou rozpustné ve vodě. Dodávají rostlinám barvy od žluté přes červenou až po modrou. Jsou obsažena v květech, plodech a v listech. Většina z nich má biologickou aktivitu. [11]

Nejdůležitějšími barvivy této skupiny jsou: flavony, izoflavony, flavonoly a antokyany

Flavony, izoflavony a flavanoly

Zahrnují větší množství žlutých pigmentů, které jsou hydroxyderiváty flavonu a izoflavonu. Patří sem apigenin, který je aglykonem žlutých glykosidů přítomných v heřmánku, petrželi a celeru a také gesperidin, který dodává žlutou barvu citrusovým plodům. Základní složkou tzv. bílé „mouky“ na stvolech a listech prvosenky pomoučené je flavon. [11]

Flavonoly jsou rovněž v přírodě hojně zastoupeny. Do této skupiny patří i jedno z nejrozšířenějších barviv v přírodě - kvercetin, který se vyskytuje chmelu obecném, čaji, kukuřici, česneku kuchyňském a v plodech jírovce maďalu. Je oranžově-hnědý a ovlivňuje permeabilitu buněčných stěn. [11]

Antokyany

Jsou to hydroxyderiváty flavyliových solí a jsou nositeli barev od modré přes fialovou až po červenou a dodávají barvu zejména květům a plodům rostlin. Jejich barva je značně závislá na pH prostředí a na přítomnosti iontů některých kovů (zvláště železitých a hliníkových). Antokyanidy souvisí s příslušnými rostlinami: pelargonidin (květy pelargónií), kyanidin (květy růží, peckovic třešní a bobulí brusinky obecné), delfinidin (květy macešky trojbarevné a bobule révy vinné), perunicin (květy petúnie zahradní), peonidin (květy pivoněk) a malvidin (malvice jabloně). [4, 11, 14]

Antokyanidiny, neboli aglykony, obsahují minimálně čtyři hydroxylové skupiny, což vzhledem k velkému množství různých druhů cukrů a jejich kombinacím, představuje obrovské množství různých antokyanů. Vázaným cukrem nejčastěji bývá glukóza, dále ramnósa, arabinósa, disacharidy rutinósa nebo soforósa. [11, 14]

1.3.3 Chlorofylová barviva

Základ jejich struktury tvoří porfirinový skelet, který je složen ze čtyř pyrrolových jader spojených do cyklu methinovými můstky. Porfyrin snadno ztrácí vodíky z dusíku a je proto schopen vázat kationty kovů. V centru molekuly chlorofylu je atom hořčíku. Dále je v chlorofylu cyklopentanové jádro, obsahující karboxylovou skupinu. Rozdíl mezi chlorofylem a a chlorofylem b je v tom, že na druhém pyroly má chlorofyl a metylovou skupinu, zatímco chlorofyl b aldehydickou. Oba chlorofyly se od sebe liší rozpustností a absorpčním spektrem. [4, 9, 14]

Chlorofyly jsou nejdůležitější fotosynteticky aktivní pigmenty rostlin, uložené v chloroplastech. V současné době je známo 7 typů - chlorofyl a, b, g, d, e, bakteriochlorofyl a bakterioviridin. Dominantní při fotosyntéze jsou chlorofyl a a chlorofyl b. Vyskytují se ve všech autotrofních organismech, s výjimkou pigmentů bakterií. K nejdůležitějším se řadí chlorofyl a, který je modrozelený, chlorofyl b je žlutozelený. [4, 9, 14]

Při vyšších teplotách a v kyselém prostředí dochází k odštěpení atomu hořčíku a jeho nahrazení vodíkem vznikají feofytiny, které mají olivově zelenou až žlutou barvu. [4, 14]

2 METODY IZOLACE A STANOVENÍ SENZORCKY AKTIVNÍCH LÁTEK

Stanovení sensoricky aktivních látek v potravinářském materiálu, i bylinách, je dosti složitý úkol, neboť jejich koncentrace jsou ve srovnání s ostatními složkami analyzovaného vzorku poměrně nízké.

Pro izolaci sensoricky aktivních látek se využívají různé izolační techniky. Pro izolaci vonných látek jsou to především techniky extrakční a destilační (získání silice). Pro izolaci chuťových látek a barviv jsou to extrakční techniky.

Před izolací je nutný odběr reprezentativního vzorku a zabránění nežádoucím chemickým a biochemickým změnám. Postup při odběru vzorku je obvykle přesně stanoven příslušnou normou. U většiny stanovení se provádí také úprava vzorku – rozemletí (koření nebo sušené byliny), i zde je nutné dodržovat jisté zásady – vzorek by se neměl zahřívat, a vzorky obsahující vodu nebo olej se drtí v třecí misce nebo krájí. [3, 5, 15]

Pro stanovení sensoricky aktivních látek v bylinách se nejčastěji používají metody chromatografické, hlavně planární, kapalinová a plynová chromatografie, a metody spektrometrické a to spektrometrie ve viditelné a UV oblasti, infračervená spektrometrie a hmotnostní spektrometrie.

2.1 Destilační metody

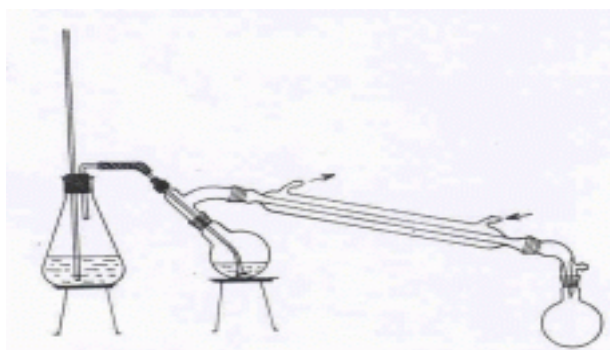
Destilace je nejpoužívanější metodou dělení kapalných směsí o různém bodu varu nebo odstraňování rozpouštědel z méně těkavých látek. Principem destilace je převedení vzorku, nejčastěji kapaliny, k varu přiváděním tepla a následné jímání kondenzujících par v oddělené části přístroje. Destilací lze oddělit těkavější látku od méně těkavé a zároveň zjistit teplotní rozmezí varu směsi, tzv. bod varu. [16, 17, 18]

2.1.1 Prostá a frakční destilace

Prostou destilací se od sebe oddělují kapalné látky o značně rozdílné těkavosti nebo se oddestilovává rozpouštědlo od netěkavého zbytku. Prostá destilace může sloužit i k sledování průběhu varu směsí a ke stanovení destilační křivky. [16]

2.1.2 Destilace s vodní parou

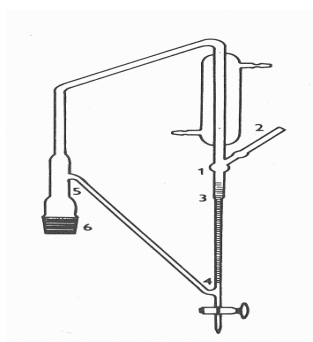
Destilací vodní parou se získává největší množství silic. Rostlinný materiál je buď v destilační nádobě zahříván zalitý vodou nebo je pára do destilační nádoby přiváděna z externího zdroje. (Obr. 5.) [19]



Obr. 5 Aparatura pro destilaci vodní parou

Destilací s vodní parou se většinou dělí látky, které jsou ve vodě málo rozpustné a při bodu varu vody mají znatelný tlak nasycených par. Vodní pára s sebou strhává složky silice, a ta je v destilační nádobě jímána jako olejovitá vrstva, kterou je nutné frakcionovat, sušit a čistit. [16, 19]

U aromatických látek se stanovuje tzv. aromové číslo, které je definováno jako množství 0,1 N dichromanu draselného potřebného na oxidaci aromatických látek v 100g nebo 100ml vzorku. Aromatické látky se destilují s dichromanem draselným, v přítomnosti kyseliny sírové. Vzniká kyselina octová a přebytek dichromanu se stanoví titračně. [5]



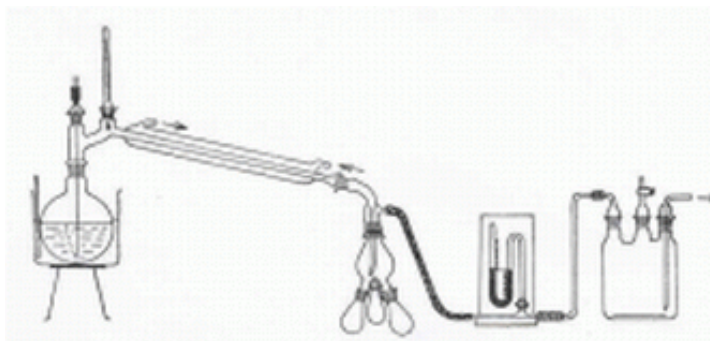
Obr. 6 Speciální nástavec pro destilaci těkavých silic

Principem stanovení obsahu silic destilační metodou je destilace s vodní parou a následné stanovení kondenzátu volumetricky nebo gravimetricky. Destilační stanovení se provádí na speciálním nástavci, kde dojde k oddestilování silic a stanoví se jejich obsah ve vzorku (vhodné pro vzorky s vysokým obsahem silic – koření). Pokud je silice těžší než voda, použije se pro destilaci směs vody a glycerolu nebo se do postranního ramene přivede xylen. Tato metoda je vhodná zejména pro vzorky s vysokým obsahem silic. [3, 5]

Jiným způsobem stanovení je oxidace silic, vydestilovaných s vodní parou, kyselinou bromovou nebo manganistanem. Předestilované silice lze stanovit i titračně dichromanem draselným v prostředí kyseliny sírové. Směs se zahřívá a dochází k oxidaci silic. Do ochlazeného vzorku se přidá KI, který reaguje s dichromanem a uvolní se jód, který se stanoví titrací thiosíranem sodným. Vorek musí být však rozemletý, aby bylo stanovení kvantitativní. [3, 5]

2.1.3 Destilace za sníženého tlaku

Za sníženého tlaku se destilují většinou látky o vyšším bodu varu, které by se při destilaci za normálního tlaku rozkládaly nebo by je nebylo vůbec možné předestilovat. [16]



Obr. 7 Aparatura pro destilaci za sníženého tlaku

Destilací za sníženého tlaku se získávají těkavé sensoricky aktivní látky z potravinářských materiálů, jejichž hlavní složkou je voda (ovoce). Následně jsou jímány do nádob chlazených směsí CO_2 a kapalným dusíkem. [3]

Destilačními metodami lze izolovat uhlovodíky, alkoholy, karboxylové kyseliny a karbo-nylové sloučeniny. [3, 5]

2.1.4 Nové techniky destilační metody

Rouatbi a kol. provedli izolaci těkavých látek z listů tymiánu a plodů černého pepře destilací superhorkou párou. Vydestilované silice byly izolovány pomocí rozpouštědel a analyzovány GC. Výsledky ukázaly, že výnosy extrakce jsou nejvyšší pro rozemletý pepř. Vzhledem ke kvalitě silice je vhodné používat páru o teplotě nepřesahující 175°C. [20]

Lucchesi a kol. porovnali klasickou destilaci vodní parou s SFME (Solvent-free Microwave Extraction), která je kombinací mikrovlnného ohřevu a suché destilace, provedené za atmosférického tlaku a bez přídavku rozpouštědla nebo vody. Izolace a zakoncentrování těkavých složek u této metody probíhala v jednom kroku. Stanovili těkavé složky u tří aromatických bylin (bazalky, máty a tymiánu) a porovnali jí s klasickou destilací. Obě metody byly kvalitativně (složení aromatických látek) i kvantitativně (množství výnosů) srovnatelné a silice získané touto metodou obsahují více hodnotných kyslíkatých aromatických sloučenin. [21]

Tigrine-Kordjani a kol. porovnávali klasickou destilaci s vodní parou s mikrovlnou destilací (Microwave Accelerated Distillation - MAD) při získávání silice rozmarýny. Výsledky ukázaly, že při použití metody MAD došlo k výrazné úspoře energie a času (30 min proti 3 h) a vyšší byl i výnos kyslíkaté frakce (59% proti 46%). Byla přitom získaná silice splňující požadovanou kvalitu. V obou případech bylo získáno také přibližně stejné množství silice. MAD je proto ze stejných důvodů jako SFME považována za dobrou alternativu pro extrakci silic z aromatických rostlin používaných v aromaterapii a v potravinářském průmyslu. [22]

Také Chemata a kol. vypracovali novou destilační techniku, tzv. mikrovlnnou parní destilaci (Microwave Accelerated Steam Destillation – MASD), kterou vyzkoušeli pro izolaci levandulové silice. Během MASD je vzorek květů levandule umístěn nad zdrojem páry, takže vzorkem prochází jen pára, bez příměsi vroucí vody, jak je tomu v případě destilace. Touto metodou došlo k úspoře energie, protože byla mnohem rychlejší (10 min oproti 90 min u klasické destilace), byl vyšší výnos, čistota a kvalita silice. [23]

2.2 Extrakční metody

2.2.1 Extrakce

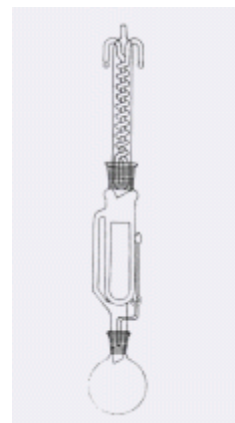
Extrakce je čistící a rozdělovací metoda, založená na kontaktu dvou nemísitelných fází, při které dochází k přechodu složky či složek ze směsi látek (ze vzorku) v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze (rozpouštědla). Extrakce je velmi vhodná pro izolaci termolabilních látek, i těch přítomných v bylinách, protože je možné ji provádět i za laboratorních teplot a nebo za chladu. Extrakce je prováděna tak, aby zároveň docházelo k zakoncentrování analytu. [15, 24]

2.2.1.1 Extrakce tuhých látek

Analyt (tuhá látka) je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle nebo směsi rozpouštědel. Nejjednodušší extrakce, při níž se tuhá fáze rozmíchá s rozpouštědlem a zfiltruje, se nazývá macerace. Opakovaná macerace několika menšími dávkami rozpouštědla je účinnější než jediná macerace celým množstvím rozpouštědla. Macerace horkým rozpouštědlem se nazývá digesce. Podobným způsobem se extrahují účinné látky z bylin. [15, 24, 25]

Extrakci lze provádět kontinuálně (Soxhletův extraktor) nebo diskontinuálně (vsádkově). [18]

Extrakcí bylin organickými rozpouštědly se získá konkrétní silice (konkret). Jedná se o voskovitou, polotuhou hmotu, která obsahuje balastní látky (vosky), a proto se silice rozpouští za tepla v etanolu a vymrazí. Dojde k vyloučení vosků, které se odfiltrují a etanol se odpaří. Takto získaná silice se označuje jako silice absolutní. [1, 19]



Extrakce karbonylových sloučenin se provádí pomocí vody nebo alkoholu na sloupcích silně kyselých nebo silně zásaditých ionexů. Extrakce aromatických karboxylových kyselin z rostlinných materiálů se provádí horkým 80% etanolem. Po odpaření rozpouštědla se odparek znovu rozpustí v horké vodě a extrahuje dietylerem. K extrakci sacharidů se také používá 80% etanol, ale při laboratorní teplotě. [3, 26]

Optimální podmínky pro extrakci fenolických látek ze sušené šalvěže (*Salvia officinalis*) zjišťovali Durling a kol. za pomoci směsi etanol-voda. Byla sledována teplota, doba kontaktu, poměr rozpouštědlo/šalvěj a poměr etanol/voda na extrakci aktivních složek. Zjistili,

že optimální extrakční podmínky poskytují vyšší výnosy všech aktivních složek. Nejvhodnější extrakční teplota byla 40°C, poměr etanol/šalvěj 6:1, k extrakci byl použit 55 – 75% etanol a doba extrakce 3 hodiny. [1, 27]

Tato metoda se používá i pro izolaci barviv z bylin.

Flavonoidní barviva se extrahují z čerstvého materiálu krátkým povařením (inaktivace enzymů), poté se směs zfiltruje a zhomogenizuje a následně extrahuje etanolem. U suchých vzorků se extrahuje přímo metanolem, vodným roztokem metanolu pod zpětným chladičem nebo v Soxhletově přístroji. [3]

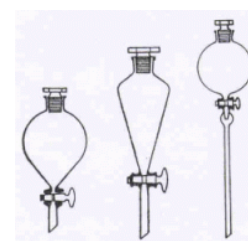
U chlorofylových barviv se taktéž doporučuje inaktivace enzymů. K extrakci se používají směsi rozpouštědel o vysoké koncentraci, např. metanol a petroleter nebo metanol a aceton a provádí se ve vysokoobrátkovém homogenizátoru nebo v třecí misce. [3]

Karotenoidní barviva se extrahují acetonem, extrakt se zahustí, poté se přidá petroleter, do kterého přejdou karotenoidy po následném vytřepání. Extrakt se opět zahustí a vysuší bezvodým síranem sodným. [3]

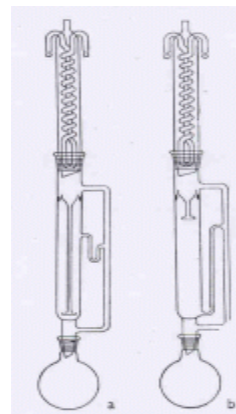
2.2.1.2 *Extrakce kapalin*

Extrakce látek z vodných roztoků je důležitou a v dnešní době jednou z nejpoužívanějších izolačních operací. Látky mohou být ve vodné fázi rozpuštěny, emulgovány či suspendovány a lze je získat extrakcí jiným rozpouštědlem, které se nemísí s původním roztokem, takže se vytvářejí dvě zřetelně ohraničené vrstvy. Takové vrstvy vznikají např. při smísení vody s četnými nepolárními organickými rozpouštědly (eterem, chloroformem, benzenem). Další podmínkou je, aby extrahovaná látka byla lépe rozpustná v organickém rozpouštědle než ve vodě. Optimální extrakční podmínky poskytují vyšší výnosy jednotlivých složek. [15, 17, 24, 25]

Diskontinuální extrakce se nazývá vytřepávání. Provádí se v dělicích nádobách – děličkách kulového, kónického nebo válcového tvaru. Perforace je kontinuální extrakce kapalin. Je časově náročnější, zato však účinnější než vytřepávání, a proto je vhodná pro extrakci látek poměrně dobře rozpustných ve vodě. Přístroje pro kontinuální extrakci kapalin se nazývají perforátory. [24]



Při extrakci kapaliny tuhou látkou je absorbent rozmíchán ve vzorku (statické provedení) nebo je proléván kolonou obsahující adsorbent (dynamické provedení). Analyt je z absorbentu uvolněn teplem nebo vymytím roztokem. [15]



2.2.1.3 *Head space extrakce*

Dalším typem extrakce je extrakce plynem (head space analysis). Princip této metody spočívá v jímání těkavých složek unikajících z kapalin do plynné fáze. Účinnost této metody lze zvýšit tzv. dynamickým provedením, kdy je do analytu vháněn proud plynu. Uvolněné těkavé složky jsou poté zachytávány na tuhém adsorbentu. [15]

2.2.2 *Mikroextrakční metody*

K izolaci senzoričky aktivních látek lze využít i novější mikroextrakční metody. Jde především o mikroextrakci na tuhé fázi (SPME – solid phase microextraction) a mikroextrakci kapalnou fází (SDME – single-drop microextraction). [6]

2.2.2.1 *SPME*

SPME je sorpčně - desorpční metoda, při níž dochází k zakoncentrování analytu. Je účinná a jednoduchá, protože nevyžaduje rozpouštědlo ani komplikované aparatury. Princip metody spočívá v interakci malého množství extrakční fáze s nadbytkem vzorku. Celý proces SPME je rozdělen do dvou fází. Prvním krokem je extrakce analytu na křemenné vlákno, které je pokryto různými typy stacionární fáze, a druhým je desorpce analytu z vlákna. K desorpci dochází nejčastěji v chromatografickém přístroji. Bylo prokázáno, že pro zachycení většího množství analytu je důležitá tloušťka vrstvy stacionární fáze a její poréznost. SPME technika se může využít i na izolaci těkavých látek z headspace prostoru nad vzorkem. Pro identifikaci izolovaných složek se používá plynová i kapalinová chromatografie. [6, 28]

An a kol. použili k izolaci silice z květů levandule techniku SPME. Obsah a přítomnost hlavních složek silice získaných touto metodou byly porovnány s výsledky tradiční metody - extrakce organickými rozpouštědly, přičemž obě metody poskytly podobné výsledky. [29]

López a kol. provedli optimalizaci podmínek SPME metody pro těkavé látky uvolňované z bazalky, hřebíčku, rozmarýny lékařské, meduňky a skořice. Zjistili, že tato metoda dává poměrně přesné informace o složení a do jisté míry i o množství jednotlivých těkavých látek analyzovaných bylin. [30]

Také Baranauskienėová a kolektiv testovali těkavé látky z tymiánu a dobromysli metodou SPME, a následně těkavé látky zachycené na SPME vlákne, analyzovali pomocí CG-MS. [31]

2.2.2.2 SDME

SDME je „téměř“ bezrozpouštědlová technika. Principem metody je, tak jako u SPME, interakce malého množství extrakční fáze s nadbytkem vzorku. K extrakci analytu ze vzorku dochází sorpcí do kapky o objemu několika mikrolitrů. V SDME dochází k rozdělení extrahované látky mezi dvě nemísitelné fáze. Její dělicí schopnost je dána selektivní rozpustností látek v rozpouštědle. U SDME odpadá proces desorpce analytu z extrakční fáze. [6]

SDME používá pro každou analýzu vždy nové rozpouštědlo, přičemž SPME vlákna jsou používána opakovaně a nezabrání se tak účinku negativních paměťových efektů z předchozí analýzy. Mezi další výhody techniky SDME patří její vysoká citlivost, což umožňuje minimalizaci vzorku. Pro identifikaci analytu se používá plynová i kapalinová chromatografie. [6, 28]

Důležité je optimalizovat podmínky SPME a SDME pro dosažení správných a přesných výsledků. Velkou roli hraje konstantní velikost vzorkovací nádoby a objem vzorku. Důležitými parametry jsou i konstantní hloubka ponoru u SPME vlákna, která je zajišťována regulovatelnou jehlou, a výběr vhodného vlákna. [6]

2.2.3 Superkritická CO₂ extrakce

Speciálním případem extrakce je extrakce nadkritickou (superkritickou) kapalinou (Supercritical fluid extraction – SCF). Nadkritická kapalina je plyn, jež je vystaven velkému tlaku (desítky MPa). Má vlastnosti kapalin (hustota) i plynů (viskozita). [15]

Tato extrakce se je zvláště vhodná pro extrakci tuhých látek, protože nadkritická kapalina dobře proniká vzorkem. Pro tyto účely se velmi často využívá CO₂, jedná se totiž o nepolární látku a je tudíž vhodný pro extrakci nepolárních sloučenin. Jeho polaritu lze ovlivnit přidávkem např. vody nebo etanolu. Aromatické látky se zachytávají na adsorbent, ze kterého jsou následně uvolňovány (např. zahříváním za vakua). [5, 15]

Reverchon a kol. studovali vlivy různých parametrů nadkritické CO₂ na složení extraktu silice šalvěže a zjistili, že důležitými parametry extrakce jsou hustota (tlak) CO₂ a doba extrakce. [32]

Catchpole a kol. uskutečnili téměř kritickou CO₂ extrakci šalvěže, celeru a koriandrových semen. Podmínky extrakce byly následující: tlak 25MPa a 40°C. Potvrdilo se také, že největší vliv na výnosy má velikost částic rozdrceného vzorku a doba extrakce. [33]

Ada Nalan a kol. sledovali vliv čtyř různých podmínek (teploty, tlaku, rychlosti toku CO₂ a velikosti částic) na výnosy silice levandulových květů nadkritickou CO₂ extrakci. Doba extrakce byla stanovena na 4 hodiny. Zjistili, že optimální podmínky pro extrakci jsou: tlak 8,58 MPa, teplota 36°C, rychlost proudění CO₂ 10,11 l/hod, a průměr částic 2,14μm. [43]

Aleksovski a Sovová provedli extrakci sušených lístků šalvěže lékařské nadkritickým CO₂ za následujících podmínek: tlak – 9 až 12,8 MPa, teplota – 25 až 50°C, množství šalvěže – 3 až 4g, rychlost toku CO₂ – 0,05-0,35 g/min, podíl rozpouštědlo/navážka – 16/21. Zjistili, že extrakce jemně mletých částí je jednodušší, protože dochází k lepšímu kontaktu mezi vzorkem a rozpouštědlem. Zjistili také, že výnosy extrakce kyslíkatého monoterpenu manoolu byla více než dvojnásobná oproti výnosům získaným destilací. [34]

Ramírezová a kolektiv zkoumali podmínky frakcionace extraktu rozmarýny získaného extrakcí kapalinou o nadkritické teplotě. Optimální podmínky byly stanoveny tak, aby došlo k izolaci sloučenin zodpovědných za antioxidační a antimikrobiální aktivitu. Pečlivým výběrem separačních podmínek je možné získat dvě různé frakce, jednu obohacenou o antioxidační a antimikrobiální sloučeniny a bez žádného zbytkového rozmarýnového aroma,

a další obsahující silici. Jako optimální se ukázaly podmínky: teplota kolony - 80 °C, tlak – 13 MPa. [35]

Barton a kolektiv provedli extrakci silic z máty peprné a kadeřavé, z čestvých i ze sušených rostlin, pomocí nadkritického CO₂ a destilace vodní parou. Podmínky extrakce CO₂ byly následující: teplota – 24 až 43°C, tlak 6 až 18 MPa. Množství rozpouštědla se pohybovalo mezi 6 – 30 g/g suchého rostlinného materiálu. Doba extrakce se pohybovala od 4 do 9 hodin. Zjištěné složení silic a dosažené výnosy byly u obou metod téměř stejné. Bylo také zjištěno, že chuť a vůně mátového extraktu, získaného pomocí CO₂ extrakce, se svou kvalitou blíží chuti a vůni skutečných mátových lístků, ve srovnání s mátovou silicí vyráběnou klasickou destilací s vodní parou. [36]

Zizovicová a kol. sledovali vliv nadkritického CO₂ na speciální váčky, v nichž je uložena silice a jež se nachází těsně pod povrchem v listech rostlin z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Nadkritický CO₂ byl následně použit k uvolnění silic z těchto váčků. Tento pokus byl proveden konkrétně u bazalky, rozmarýny, majoránky a máty. [37]

Superkritická CO₂ extrakce poskytuje poměrně pevné extrakty, protože se spolu se silicemi extrahují i kutikulární vosky. Ernesto Reverchon proto provedl frakcionaci extraktu, získaného pomocí SCF z listů majoránky na sérii separátorů. Principem frakcionace byla různá rozpustnost těchto látek a také jejich různá koncentrace v roztoku. [38]

Köse a kol. studovali částečnou deterpenaci silice dobromysli nadkritickým CO₂ v koloně, na jejíž horní a dolní část byly aplikovány rozdílné teploty. Vědci hledali nejvhodnější kombinaci teploty a tlaku a sledovali obsah 14 hlavních složek a monoterpenových (MT) a vyšších terpenových (VT) frakcí silice, které byly získány z kolony ve čtyřech různých deterpenyčních časech. Bylo nutné brát v úvahu také velikost dávky vzorku a poměr rozpouštědlo/silice. Nejlepších výsledků separace MT a NMT bylo dosaženo při tlaku 7 MPa, teplotě 38°C v dolní, 55°C v horní části kolony a 15 – 25 minutách deterpenace. [39]

2.3 Další izolační postupy

K izolaci silic z rostlin se používá tzv. anfleráž anebo lisování za studena. Tyto postupy však mají v dnešní době význam jen v parfumérském průmyslu. [1, 19]

Anfleráž, se používá i izolaci silic květů (květ pomarančovníku, jasmín). Čerstvě květy se pokládají na skleněný plát, který je pokryt vrstvou směsi tuků. Tuk pohlcuje silici, která se

z květů uvolňuje. Květy se vyměňují tak dlouho dokud se tuk silicí nenasytí. Tuk nasycený silicí se nazývá pomáda. Pomáda se extrahuje etanolem, extrakt se vymrazí a filtruje, vzniklý produkt se nazývá laváž. Po oddestilování ethanolu se získá čistá silice. [1, 19]

Izolace silic pomocí lisování se používá při získávání silic z oplodí citrusových plodů (pomarančová a citrónová silice). [19]

2.4 Chromatografické metody

Podstatou dělicího procesu složek vzorku pomocí chromatografie je postupné a několikanásobné ustavování rovnováhy mezi dvěma fázemi. Jedna z těchto fází se označuje jako mobilní, protože nese vzorek postupně sestupující separačním prostorem, a druhá z nich je stacionární fází, protože tvoří nepohybující se obsah separačního prostoru. Při postupu vzorku separačním prostorem, dochází k interakcím mezi stacionární a mobilní fází (tyto interakce mají různou kvalitu i kvantitu). Jednotlivé frakce vzorku jsou proto brzděny a to různou silou v závislosti na druhu frakce. Pohyb, neboli distribuci frakce (složky) vzorku lze charakterizovat tzv. distribuční konstantou K_D . Zkoumaná látka obsahuje frakce o různém K_D a tyto frakce se pohybují separačním prostorem jinou rychlostí, což vede k jejich vzájemnému oddělení. Je důležité, že hodnoty K_D nezávisí jen na charakteru zkoumané látky, ale také na charakteru (vlastnostech) mobilní a stacionární fáze. [15, 25, 17, 18]

2.4.1 Klasifikace chromatografických metod

Chromatografické metody můžeme rozlišit podle několika hledisek [15, 25]:

1. podle skupenství použité mobilní fáze:
 - plynová chromatografie (GC)
 - kapalinová chromatografie (LC)
2. podle typu použité stacionární fáze – toto rozdělení zohledňuje mechanismus separace:
 - adsorpční
 - rozdělovací
 - iontově výměnnou
 - gelovou permeační
 - afinitní.

2.4.2 Planární chromatografie

Planární chromatografie je instrumentálně nejjednodušší a hojně používaná chromatografická metoda. Rozlišujeme dva základní typy: [15, 18]

1. papírová chromatografie (PC) – používá se většinou sestupné uspořádání, tzn., že proužek chromatografického papíru je na okraji smočen mobilní fází v mělké nádobce a je volně zavěšen přes její okraj, mobilní fáze se pohybuje papírem díky jejímu vzlínání a gravitaci. Jako stacionární fáze se používá papír na bázi čisté celulózy.
2. tenkovrstvá chromatografie (TLC) – stacionární fázi tvoří tenká vrstva sorbentu, pro TLC je typické vzestupné uspořádání, kdy spodní okraj tenké vrstvy je smáčen mobilní fází a k jejímu pohybu vrstvou dochází díky vzlínání. Jako stacionární fáze se používá silikagel, oxid hlinitý, škrob nebo mikrokrystalická celulóza.

Detekce se provádí selektivně zjištěním pozic skvrn, barevné látky jsou viditelné pouhým okem, nebarevné látky absorbují záření v ultrafialové oblasti. Dalším způsobem detekce je chemický způsob, kdy je na vrstvu nanášeno činidlo, které reaguje s separovanými složkami za vzniku barevných produktů. [15, 25, 17, 18]

Při kvalitativní analýze vyhodnocujeme hodnoty retardačních faktorů separovaných látek. [15]

Identifikace separovaných frakcí se provádí porovnáním jejich retardačních faktorů s retardačními faktory standardů. Kvantitativní analýzu lze u planární chromatografie provést jen omezeně. [17, 18]

Metody planární chromatografie lze aplikovat ke stanovení: vonných (uhlovodíky, alkoholy, karbonylové sloučeniny) i chuťových látek a především barviv.

Stanovení karbonylových sloučenin ve formě 2,4-dinitrofenylhydrazonů se provádí jak papírovou (pro detekci se používá etanolový roztok hydroxidu sodného), tak tenkovrstvou chromatografií (nejčastěji se používá silikagel). [5, 3, 26]

Pothier a kol. provedli srovnání analýzy silic ze sedmi chemotypů tymiánu prostřednictvím tenkovrstvé chromatografie (TLC) a plynové chromatografie (GC), která se v dnešní době k analýzám silic nejvíce používá. Zjistili, že výsledky TLC jsou srovnatelné s výsledky GC.

Přestože TLC má určitá omezení, je stále vhodnou metodou díky své jednoduchosti, rychlosti a nízkým nákladům. Používáním automatických dávkovačů a denzitometrů a také nových modifikovaných metod (Optimum Performance Laminar Chromatography OPLC), se reprodukovatelnost a kvalita separace značně zlepší. [40]

Z hlediska obsahu chuťových látek v bylinách jsou nejvýznamnějšími látkami hořké a trpké. Absintin, obsažený v pelyňku stanovoval Lachenmeier pomocí tenrovrstevné chromatografie na silikagelu, k vyvíjení použil směs acetonu, kyseliny octové, toluenu a dichlorometanu. Následnou detekci pak provedli pomocí denzitometrie (554 nm). Ke stanovení tříslovin papírovou chromatografií se jako rozpouštědlo používá směs 1-butanolu, kyseliny octové a vody, detekuje se etanolovým roztokem kyseliny molybdenfosforečné nebo v ultrafialovém záření. U chromatografie na tenké vrstvě celulósy se jako rozpouštědlo používá benzen, metanol a kyselina octová, detekuje se Dotyho rozpouštědlem nebo fluoroglucinolem. [3, 5, 41]

Flavonoidní barviva se dělí papírovou chromatografií přímo jako rostlinné extrakty nebo jako frakce, již přečištěné sloupcovou chromatografií. Jako rozpouštědla se pro flavonoidní látky používá kyselina octová nebo směsi n-butanolu, kyseliny octové a vody, pro antokyany, směsi n-butanol a kyselina octová nebo kyselina octová, voda a kyselina chlorovodíková. Tenkovrstvá chromatografie se provádí nejčastěji na vrstvě celulósy, polyamidu, silikagelu nebo oxidu hlinitého. Pro antokyanová barviva se používají dvourozměrné metody chromatografie na vrstvě celulózy, kdy se jako vyvíjecí činidlo v prvním směru používá směs n-butanol, kyselina chlorovodíková a v druhém směru směs voda, kyselina chlorovodíková a kyselina mravenčí. Detekce flavonoidních látek je možná na základě jejich vlastního zbarvení ve viditelné nebo ultrafialové oblasti, nebo aplikací činidel (amoniaku, metanolický roztok chloridu hlinitého, roztok vanilinu). [3]

Rozdělení chlorofylových barviv papírovou chromatografií se uskutečňuje použitím směsi petroleteru, benzenu a acetonu. Jako adsorpční materiály se u TLC uplatňují křemelina a silikagel. Použitím dvourozměrné chromatografie se dosáhne lepšího rozdělení složitějších směsí. [3]

Při dělení karotenoidních barviv se používá petroleter nebo jeho směsi s acetonem, při TLC se jako adsorbentu využívá silikagel nebo jeho směs s oxidem křemičitým. Rozdělené skvrny se eluují dietylerem a stanoví spektrometricky. [3, 5]

2.4.3 Kapalinová chromatografie

Princip kapalinové chromatografie byl v podstatě popsán již v úvodu chromatografických metod. Separační prostor tvoří skleněná kolona naplněná stacionární fází. Vzorek vstupující do kolony je unášen a zároveň rozdělován tokem mobilní fáze. Kolona může být také naplněna různými sorbenty (polyamid, škrob), na kterých se dělená látka při průtoku mobilní fáze zachycuje. Rozdělené frakce vzorku jsou následně vyhodnocovány. [15, 18]

Vyhodnocení se provádí pomocí detektoru, výsledkem je záznam odezvy detektoru na čas, neboli chromatogram. V chromatografii se používají detektory zaznamenávající odezvu úměrnou koncentraci a zóny oddělovaných látek procházejících detektorem jsou zaznamenány jako tzv. chromatografické píky. [15, 25, 17, 18]

Z chromatogramu je možné určit: [15]

1. retenční čas frakce vzorku – časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce maximální hodnoty koncentrace první frakce prošlé detektorem,
2. mrtvý čas kolony – časový interval od okamžiku nástřiku vzorku do okamžiku detekce maximální hodnoty koncentrace frakce, která není stacionární fází zadržována a pohybuje se rychlostí mobilní fáze,
3. šířka chromatografického píku – běžně se udává v jednotkách času
4. výška a plocha chromatografického píku – udává se v příslušných délkových a plošných jednotkách

Využití dat získaných chromatografickým měřením v kvalitativní analýze závisí na typu použitého detektoru. Při použití spektrálního detektoru je identifikace látky možná na základě rozboru příslušného spektra. Při použití běžných detektorů lze identifikaci (přiřazení určité látky píku) provést na základě porovnání referenčních časů a referenčních faktorů dané frakce vzorku a standardu. Častěji se v kvantitativní analýze využívá kombinace chromatografických metod s některou instrumentální metodou jako tzv. „hyphenated-techniques“ (GC-MS, LC-IR). K detekci se nejčastěji používá fotometrický detektor (UV detektor), který měří absorpenci analytu vystupujícího z kolony, a také hmotnostní detektor (MS), který identifikuje analyt na základě hmotnostních spekter. [15, 17, 18]

Kvantitativní analýza je založena na principu porovnávání ploch chromatografických píků stanovené frakce k standardu o známé koncentraci. [18]

2.4.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography HPLC) je pokročilá a instrumentálně náročná metoda. Používají se kolony naplněné stacionární fází o malé a dobře známé velikosti částic, čímž se dosahuje vysoké separační účinnosti. [15, 17]

Mobilní fáze je dodávána pomocí vysokotlakého čerpadla. Dávkovací zařízení musí pracovat tak, aby do proudu mobilní fáze byl nastříknut přesně definovaný objem vzorku a aby byly co nejvíce omezeny fluktuace mobilní fáze. Kolony používané v HPLC jsou vyrobeny většinou z ocelové trubice nebo tlustostěnné skleněné trubice, aby odolaly vysokému tlaku mobilní fáze. Stacionární fázi uvnitř trubice tvoří oxid křemičitý nebo granulovaný iontoměnič, tvořený většinou síťovaným polystyrenem (Ionově výměnná chromatografie – IEC). K detekci separovaných látek v HPLC se používá fotometrický detektor (nejčastěji fotometrický detektor pracující v UV oblasti, který je pro organické látky univerzální), fluorimetrický, hmotnostní a elektrochemický detektor. [15, 17]

HPLC se pro analýzu sensoricky aktivních látek v bylinách využívá ke stanovení chuťových látek – sacharidů a hořkých látek.

Okurama a kol. v použili HPLC ke stanovení karnosolu (hořké látky) v rozmarýnu a šalvěji a to v různých částech rostliny. Jako mobilní fázi použili kyselinu fosforečnou a acetonitril, jejichž rychlost proudění byla 1 ml/min, detekci provedli při 230 nm pomocí UV detektoru. [42]

2.4.4 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (Gas Chromatography GC) je metoda vhodná především pro analýzu těkavých látek, které je možné převést do plynného stavu. Těkavé látky jsou unášeny nosným plynem, který je inertní jak k analytu, tak k stacionární fázi, a jejich množství zaznamenává detektor. Vzorek může být jak pevný tak kapalný. [17, 18, 25]

Vzorek je unášen proudem plynné mobilní fáze (nosný plyn – vodík, dusík nebo helium) do chromatografické kolony a detektoru, které jsou umístěny v termostatu. Zařízení je vybaveno počítačem, který zpracovává údaje z detektoru a řídí průběh analýzy. K detekci se u plynové chromatografie používá několik typů detektorů, v současné době nepoužívanější plamenově ionizační detektor, detektor elektronového záchytu a také hmotnostní detektor.

Plamenově ionizační detektor pracuje na principu měření elektrického napětí vzniklého při shoření analytu po výstupu z kolony. Detektor elektronového záchytu měří pokles proudu při průchodu analytu detekční komorou s konstantním proudem. [15, 18, 25]

GC je nepostradatelnou metodou pro dělení těkavých látek a proto je vhodná také pro stanovení těkavých sensoricky aktivních látek bylin: uhlovodíky, karbonylové sloučeniny a alkoholy. Plynovou chromatografií lze stanovit také karboxylové kyseliny. [3, 5]

Ada Nalan a kol. provedli stanovení jednotlivých složek levandulové silice pomocí GC-MS. Identifikovali fenchon, kafr, linalool, bornyl acetát a kadinen, přičemž fenchon a kamfor byly identifikovány jako převažující složky. [43]

Sur se spolupracovníky vyvinuli metodu plynové chromatografie pro stanovení významných biologicky aktivních monoterpenoidů v rostlinném materiálu a vodném extraktu z máty, fenyklu, šalvěže a plazivého tymiánu. Analýza vyžaduje 1-2 g rostlinného materiálu nebo 100-200 g vodného extraktu a netrvá déle než 1,5 hod, včetně destilace a GC. [41]

K analýze těkavých látek obsažených v silici šalvěže luční použili Cai, Lin a kol. kombinace metod GC – FTIR a GC – MS. Informace získané těmito metodami se doplňují a zvyšuje se tak spolehlivost kvalitativní i kvantitativní analýzy [44]

Goodner a kol. stanovovali profil těkavých látek ve vzorcích silic tymiánu pomocí GC/MS. Zjistili, že mezi sloučeniny, které nejvíce přispívají k aromatu tymiánu jsou linalool, borneol, thymol, β -damascenon, eucalyptol a terpinyl acetát. [45]

Shellie a kol. analyzovali devět vzorků levandulové silice pomocí GC-MS. Hmotnostní spektrometrie umožňuje identifikaci dosud „neznámých“ sloučenin a činí identifikaci spolehlivější, protože tento přístup poskytuje dva nezávislé parametry, na kterých je identifikace založena. V každém vzorku se podařilo spolehlivě charakterizovat 70% obsažených složek. Celkově bylo identifikováno 85 sloučenin. Metodou GC-MS se identifikuje mnohem více složek silic než metodou GC-FID. [46]

Také Mohammad a kol. aplikovali GC/MS analýzu na vyhodnocení těkavých silic získaných destilací tymiánu (*Thymus vulgaris*) v různých vegetačních stádiích. Silice byly bohaté na obsah monoterpenů (thymol a karvol) a také na jejich prekurzory (p -cymen, γ -terpinen), což poukazuje na změny složení silic během vegetace. Silice získané ze starších rostlin obsahovaly prokazatelně nižší množství monoterpenových uhlovodíků (hlavně γ -terpinenu) a vyšší obsah kyslíkatých monoterpenů (linalool a borneol), monoterpenových

fenolů (hlavně thymolu) a jejich derivátů, seskviterpenů a jejich kyslíkatých derivátů, ve srovnání s jinými vzorky. Naproti tomu mladší rostliny poskytovaly nejlepší výnosy silic (1,2%) a také vyšší výnosy monoterpenových fenolů. [47]

2.5 Spektrometrické metody

Spektrometrické metody jsou založeny na měření optických vlastností a spekter zkoumané soustavy. [18]

2.5.1 Spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti

Molekulová absorpční spektrometrie je založena na interpretaci změn, které nastávají v molekulách při absorpci záření v rozmezí vlnových délek 200 – 800 nm. Látky absorbující záření o vlnové délce nižší než 380 nm se jeví jako bezbarvé, naproti tomu látky absorbující záření o vlnových délkách 380 – 760 nm se jeví jako barevné. Pohlcením určitého kvanta zářivé energie, přejde molekula z nižšího do vyššího elektronového stavu, který je spojen s změnou jejich vibračních a rotačních stavů. Výsledkem měření absorpčního spektra molekul jsou absorpční pásy, jejichž porovnáním je možné identifikovat zejména organické látky. Kvantitativní analýza je pak založena na platnosti Lambert-Beerova zákona. [15, 18, 25, 48]

Měření se provádí na spektrofotometrických přístrojích. Zdrojem záření je vodíková nebo deuteriová výbojka (pro UV oblast) a wolframová nebo halogenová žárovka (pro VIS oblast). Aby bylo možné měření vyhodnotit, musí se změřit i tzv. „blank“ (roztok obsahující všechny složky, kromě analytu). [18, 48]

Současné spektrometrické metody umožňují i průtokovou analýzu. Jsou to kontinuální průtoková analýza (Continuous Flow Analysis – CFA) a průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis – FIA). Látky je možné také průtokově detegovat po výstupu z chromatografické kolony. [15]

Spektrometrickými metodami lze v bylinách stanovit: karboxylové kyseliny, aldehydy, ketony, alkoholy, přírodní barviva, trísloviny, hořké a sladké látky. U flavonoidních barviv se měří změny ultrafialového spektra v roztoku, metanolátu sodného nebo v kyselém roztoku chloridu hlinitého a dalších. Spektrometrické stanovení antokyanů se provádí po předchozí extrakci octanovým puforem a následně se měří absorbance při vlnové délce 500nm.

Také třísloviny izolované z bylin lze stanovit spektrometricky. Působením železitých solí na třísloviny v alkalickém prostředí vzniká červenohnědé zbarvení. Spektrometrické stanovení se provádí měřením absorbance při 600nm. [2, 3, 5, 26]

2.5.2 Infračervená spektrometrie

Principem infračervené spektrometrie (IR – Infrared Spektrometry) je měření vibračních a rotačních pochodů, které odpovídají vlnové délce infračerveného záření (800nm - 100 μ m). Přechod molekuly do vyššího vibračního a rotačního stupně je vyvolán právě absorpcí příslušného kvanta infračerveného (tepelného) záření. [18, 25]

Zdrojem infračerveného záření u infračerveného spektrometru jsou zářiče z polovodičových materiálů, součástí přístroje je také monochromátor. Detektorem bývá termoelektrický článek nebo pneumatický, tzv. Golayův (založený na bázi tepelné roztažnosti plynů) detektor. [18]

V dnešní době se používá k převedení polychromatického záření na monochromatické pomocí Fourierovy transformace, která výrazně zvyšuje citlivost, přesnost a rychlost měření a rozlišení. [25]

Analýzu za použití různých spektroskopických metod: IR, NIR (spektrometrie v blízké infračervené oblasti (Near Infrared Spektrometry) a Ramanovy spektroskopie k analýze silic izolovaných z bazalky, heřmánku, tymiánu a dobromysli provedli Schulz a kolektiv. Zatímco spektroskopická data získaná pomocí NIR mohou být interpretována jen pomocí složitých matematických výpočtů, spektra získaná IR a Ramanovou spektroskopií silic mohou být jednoduše použita jako skupina ukazatelů k identifikaci různých rostlinných chemotypů bylin. Tato metoda může být velmi užitečná v potravinářském a parfumářském průmyslu ke kontrole čistících, směšovacích a redestilačních procesů. [49]

Podobné srovnání metod IR a NIR-Ramanovy spektroskopie, bylo provedeno jinou pod vedením Schulze u větší skupiny bylin (dobromysl, saturejka, šalvěj, tymián, levandule). Byla získána vibrační spektra charakterizující jednotlivé těkavé složky bylin - karvakrol, tymol, p-cymen, γ -terpinen, kafr, 1,8-cineol, α - and β -pinen. Srovnávané metody poskytují rychlou, snadnou a spolehlivou chemotaxonomickou charakterizaci. Obě spektrální metody mohou potenciálně nahradit existující standardní metody používané pro kontrolu kvality a kontinuální vyhodnocování destilačního procesu. [50]

2.5.3 Hmotnostní spektrometrie

Principem metody je ionizace látky (vzorku) a následné určení četnosti výskytu iontu o určité hmotnosti v závislosti na relativní hmotnosti (tj. na poměru hmotnost/náboj). [25]

Vzorek je ionizován, např. nárazem elektronu, a vznikají molekulové ionty a fragmenty. Jejich proud je veden do homogenního magnetického pole, kde dojde k jejich rozlišení podle jejich hmotností a k zakřivení jejich drah. Kvalita svazku letících částic se určuje podle místa dopadu na detektor. Kvantita podle intenzity dopadu (čím více částic dopadne na dané místo, tím je vyšší intenzita signálu). [15, 18, 25, 48]

Tato metoda se často užívá v kombinaci s plynovou chromatografií. Obsah analytu je stanoven s přesností 10^{-7} %. Podmínkou analýzy je většinou tlak kolem 10^{-4} Pa, čímž se omezí srážky iontů se zbytkovou atmosférou spektrometru a použitou instrumentací. Základními prvky instrumentace jsou: zdroj iontů, analyzátor, detektor. [25]

2.6 Další metody stanovení

Instrumentální metody analýzy potravin řadu výhod: poskytují dobře opakovatelné a snadno reprodukovatelné výsledky, provedení je jednoduché, často automatizované a provedení analýzy je poměrně rychlé. Nevýhodou instrumentálních metod je, že je lze použít jen tehdy, pokud známe vztah mezi intenzitou podnětu a charakterem vjemu. Před provedením analýzy je nutné přístroj nakalibrovat pomocí vzorků ohodnocených senzoricou analýzou. Instrumentálně lze měřit barvu (spektrofotometricky, obrazovou analýzou), některé texturní vlastnosti (např. přístroj Instron), aromatické látky (elektronický nos) apod. Kromě instrumentálních metod je pro stanovení organoleptických vlastností (chuti, vůně), za které jsou odpovědné sensoricky aktivní látky, vhodné použít i metod sensorické analýzy potravin a potravinářských materiálů. Pomocí sensorické analýzy se měří počitky a vjemy, kdežto instrumentálními metodami se měří podněty (fyzikální či chemické vlastnosti). [51, 52]

3 BYLINY (LÉČIVÉ ROSTLINY)

Poznávání léčivých rostlin je jedním z nejstarších odvětví botaniky. Léčivá rostlina je bylina, jejíž části se používají k léčení chorob nebo k výrobě léčiv a léků. Nejčastěji sbírané části jsou květy, listy nebo nať. [53, 54]

Pro účely této práce jsou popsány nejznámější druhy bylin převážně z čeledi hluchavkovitých (*Laminaceae*), které jsou charakterizovány z analytického, sensorického i zdravotního hlediska: Dobromysl obecná, Heřmánek pravý, Levandule lékařská, Máta peprná, Šalvěj lékařská, Rozmarýna obecná a Tymián obecný.

3.1 Dobromysl obecná



Dobromysl obecná (*Origanum vulgare L.*) je rostlina z čeledi hluchavkovitých (*Laminaceae*).

Sbírá se kvetoucí nať, která se používá zejména jako koření (pod názvem oregano); typickým použitím je kořenění pizzy, jako součást provensálského koření. Používá se též v léčitelství pro své aseptické a protizánětlivé účinky, usnadňuje odkašlávání, zvyšuje vyměšování žluči, dále se užívá proti bolestem hlavy a při astmatu. [10, 55, 56]

Chuť dobromysli je výrazná. Celá rostlina voní příjemně kořenitě.

Nať dobromyslu obsahuje asi 0,1 – 1,1% silice, která je tvořena z 50% thymolem, dále karvakrolem, cymolem, linaloolem, α -pinenem, kafrem, bornylacetátem, a asi z 8% tříslovinami a hořčinami. Kvetoucí vrcholky se používají také jako barvivo, barví vlnu na červenohnědo. [1, 53, 54, 57]

3.2 Heřmánek pravý

Heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla L.*) je léčivá rostlina z čeledi hvězdicovitých (*Astraceae*).

V léčitelství se jako droga používá sušený květ (*Flos chamomillae*). Odvar či čaj z heřmánku působí proti zánětlivým onemocněním, při nemocech trávicího traktu (křečím, koli-



ce, nadýmání) a snižuje bolest. Dále pomáhá hojit rány a brání tvorbě jizev, proto se přikládá ve formě obkladů na rány, mokvavé ekzémy i oči. Byly dokázány jeho baktericidní účinky. Hojně se využívá i v kosmetickém průmyslu. Někteří lidé jsou však na heřmánek alergičtí. [10, 56, 58]

Rostlina má charakteristickou, pronikavou a příjemně aromatickou vůni, která pochází ze silice. Silice má jemně modrou barvu způsobenou přítomností azululenů. V heřmánku je tato silice obsažena v množství 0,2 – 1%. Obsahuje především terpenové uhlovodíky (α -bisabolol, azulen, β -karyophylen, bisabolen, bisabolol, trans- α -farnesen, trans- β -farnesen, farnesol, geraniol, guajazulen, chamazulen, chamomillol, karyofylen, matrikarin, thujon), aromatické kyseliny (kyselina salicylová, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina 3,4-dihydroxykrotonová, kyselina 4-methoxybenzoová, kyselina kávová), kumariny, steroidy, flavonoidy, některé sacharidy, glykosidy a vitaminy (vitamin C, niacin, thiamin). [1, 10, 53, 59, 54]

3.3 Levandule lékařská



Levandule lékařská (*Lavandula officinalis* L.) patří do čeledě hluchavkovitých (*Lamiaceae*).

Květy se v kuchyni hodí k dušeným masům a k rybám, do voňavých džemů, levandulového octa a kandují se. [57]

V léčitelství se používá výhradně květ. Levandule působí mírně diureticky, proti křečím a zvyšuje činnost centrální nervové soustavy. Při vnitřnímu použití uklidňuje, zlepšuje psychickou odolnost, pomáhá při nadýmání, průjmeh, poruchách trávení a střevních potížích nervového původu, při funkčních poruchách v nadbřišku, dráždivém žaludku, při srdečních potížích; při kašli; potlačuje růst bakterií, mírně snižuje krevní tlak. Zevní použití se aplikuje při nespavosti a bolestech hlavy, zmírňuje silné emoce a nervové napětí, silice povzbuzuje krevní oběh a prokrvení pokožky. Ve farmacii se používá k aromatizování léků. V kosmetice se používá při léčbě lupů a nadměrném vypadávání vlasů;

dále na posilující pleťovou vodu pro jemnou a citlivou pokožku do mýdel a při akné; silice jako přísada do parfémů, olej je základem masážních olejů (např. při bolestech svalů). [10, 54, 55, 60]

Obsahuje 1 až 3% silice, jejíž hlavní složkou je alkohol linalool a linalyacetát. Dále obsahuje borneol, isborneol, cineol, geraniol, kumarin, kafr a asi dalších 25 složek. Má vysoký obsah (asi 12%) tříslovin, obsahuje také antokyany, hořčiny, pryskyřice. Nať obsahuje více tříslovin, květ více silice. V květu byl v něm zjištěn kumarin a kyselina koumarová, herniarin a sesquiterpen cedren. [53, 59]

3.4 Máta peprná



Máta peprná (*Mentha piperita L.*), lidově nazývaná pepřová máta, balšám, větrová bylina, větrové koření - je vytrvalá bylina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*).

Sbírají se listy nebo mladé kvetoucí vršky s listy. Droga se používá při výrobě likérů, v cukrářství a kosmetice. Aromatické listy mají pepermintovou chuť a vůni. Květy chutnají jako pepermintový bonbon. [10, 55]

Máta tlumí a odstraňuje křeče zažívacího ústrojí, podporuje chuť k jídlu, působí proti nadýmání, upravuje činnost žlučníku apod. Má i osvěžující a protizánětlivé účinky. Příznivě působí na nervovou soustavu, neboť silice potlačuje citlivost nervových zakončení. Nejčastěji se používá ve formě nálevu ze samotné drogy nebo v čajových směsích. Mátová silice se používá také jako kloktadlo, k inhalacím při zánětech hrtanu a průdušek, zevně ke koupelím při revmatismu a kožních vyrážkách. Mentol bývá součástí protirevmatických a osvěžujících mastí a mazání, dále je v kosmetice nezbytnou surovinou pro výrobu zubních past, ústních vod a různých krémů. Dodává jim příjemnou vůni a při styku s pokožkou chladivý pocit. [56, 60, 58]

Máta obsahuje 1 – 2 % silice, v níž je přes 50 % mentolu, dále jeho estery s kyselinou octovou, přes 10 % mentonu a celou řadu terpenů, jako jsou: pulegon, α -pinen, α -fellandren, cineol, limonen, sabinen, β -karyofylen kyselinu isovalerovou. Poměr těchto látek je dosti

proměnlivý. Estery mentholu dodávají typické aromatické vlastnosti. Dále jsou v nati obsaženy třísloviny (5 – 10 %) a hořčiny. [53, 54, 59]

3.5 Šalvěj lékařská



Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis* L.) je rostlina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*).

Sbírá se kvetoucí nat'. Jako koření se užívají čerstvé nebo sušené listy. Šalvěj chutná trpce a lehce nahořkle. Přidává se do omáček, nádivek, k ochucení sýrů. Používá se též v léčitelství pro své protizánětlivé účinky. Připravují se čaje a odvary používané jako kloktadlo při angíně, na vyplachování ústní dutiny na vymývání špatně se hojících ran. Šalvěj zabraňuje průjmům a omezuje pocení. Bývá součástí ústních vod, zubních past a čajů. [10, 55, 56]

Obsahuje 1,5 až 2,5% silice, která je odpovědná za charakteristickou šalvějovou vůni. Skládá se hlavně ze salviolu, dále z 1,8-cineolu, tujonu, cineolu, kafru, borneolu, myrcenu, α - a β -pinenu, dále obsahuje třísloviny, hořčiny (karnozol), saponiny, flavonoidy, pryskyřice, organické kyseliny, estrogenní hormony a amid kyseliny nikotinové. [1, 53, 57]

3.6 Rozmarýna lékařská



Rozmarýn lékařský nazývaný též Rozmarýna lékařská (*Rosmarinus officinalis*) je stálezelená rostlina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*).

Má kastrovitou chuť a vůni. [10]

Jako koření se užívají listy, sušené i čerstvé, samotné nebo jako součást provensálského koření. Rozmarýna pomáhá lepšímu trávení, působí proti nadýmání, podporuje vylučování žluči, při nízkém krevním tlaku. [10, 55]

Bylo prokázáno, že některé složky silic rozmarýny mají antimikrobiální účinky. Touto problematikou se zabývali Gachkara a kol., kteří studovali antimikrobiální účinky silice rozmarýny na *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*. Zjistili, že nejvíce působily tyto silice na *Escherichia coli* (k usmrcení všech mikroorganismů došlo

po 25 min), relativně nejméně působily na *Listeria monocytogenes* (k usmrcení všech mikroorganismů došlo 190 minutách). [61]

Obsahuje 1,4 až 2% silice, ve které se nachází: verbenon, borneol, cineol, kafr, limonen aj. Rozmarýn také obsahuje flavonoidy: luteolin, apigenin, diosmetin; diterpenové hořčiny: pikrosalvin, rosmanol, rosmadial, dále kyselinu ursulovou, oleanovou, kávovou, chlorge-novou a rozmarýnovou; třísloviny (až 8%) a další látky. [53, 57, 65]

3.7 Tymián obecný



Tymián obecný (*Thymus vulgaris* L.) je rostlina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*).

Čerstvá rostlina je velmi aromatická a je téměř univerzálním kořením. Má nahořklou chuť. [57]

V léčitelství se používají listy, celá nať a kvetoucí vrcholky. Při vnitřní použití (formou čaje) podporuje zažívání, uvolňuje hlen, omezuje nadýmání, mírní průjmy, podněcuje tvorbu bílých krvinek pro ochranu před infekcí, snižuje nespavost a zbavuje svalových bolestí. Při zevním použití (formou obkladů, koupelí a vdechování) působí na kožní onemocnění, rány, vředy apod. [10, 56, 60]

Nať tymiánu obsahuje 0,1 - 0,6% silice, jehož hlavní složkou je tymol a karvakrol, dále obsahuje p-cymen, linalool, limonen, α -pinen, terpinen, borneol, 5 - 7,5% tříslovin a hořčinu serpyllín, organické kyseliny, saponiny a flavonoidy. [53, 54, 55]

ZÁVĚR

Cílem této práce je zpracování rešerše, týkající se charakteristiky sensoricky aktivních látek, metod izolace a stanovování těchto látek v bylinách.

Sensoricky aktivní látky jsou nositeli vůně, chuti nebo zbarvení všech přírodních materiálů a jejich analýza je v současné době velice studovanou oblastí, a to zejména proto, že silice (směsi sensoricky aktivních látek získané z rostlinných materiálů) jsou přírodními surovinami pro farmaceutický, kosmetický a potravinářský průmysl.

V poslední době dochází k nárůstu zájmu o přírodní sensoricky aktivní látky oproti syntetickým. Jedním z důvodů je riziko negativního působení syntetických aditiv na lidský organismus (alergie ap.).

Izolace a stanovení sensoricky aktivních látek se provádí několika základními metodami, ale počet úprav a modifikací těchto metod je vysoký. Také zdokonalování stávajících a vývoj nových metod jde rychle dopředu. Důraz je kladen na rychlost, přesnost, snadnou reprodukovatelnost a úsporu času, energie a činidel. To všechno má vést k získávání co nejkvalitnějších extraktů a silic, které mají typickou chuť a vůni.

Nejčastěji využívanými izolačními metodami jsou extrakční a destilační metody. Užití konkrétní metody závisí na povaze látky, která bude izolována. Pro těžké sensoricky aktivní látky je vhodnou a v dnešní době hojně využívanou extrakční metodou extrakce nadkritickým CO₂, která je rychlá a má vysokou účinnost. Poměrně novými metodami jsou také SPME (mikroextrakce pevnou fází) a SDME (mikroextrakce kapalnou fází), které pracují s malým množstvím vzorku i činidel. Z destilačních metod se nejvíce využívá destilace vodní parou, která také poskytuje poměrně kvalitní silice.

Z metod vhodných pro stanovení sensoricky aktivních látek se využívají především chromatografické a spektrometrické metody. Chromatografické metody mají v analýze sensorických látek zásadní význam. Nejčastěji používanou je plynová chromatografie, ale významná je také kapalinová chromatografie - HPLC.

Spektrometrické metody využívají ke stanovování sensoricky aktivních látek jejich optické vlastnosti. Realizují se měřeními a interpretací energetických spekter, která vznikají při absorpci nebo emisi zářivé energie nebo částic. Uplatňují se hlavně spektrometrie ve viditelné a UV oblasti, infračervená spektrometrie a hmotnostní spektrometrie, která se mimo jiné

velice často používá jako detektor u plynové a kapalinové chromatografii. Pro svou jednodušost a nenáročnost se využívají i metody planární chromatografie.

Doufám, že zpracování bakalářské práce přispěje k lepší orientaci v metodách, využívaných k analýze senzoričky aktivních látek bylin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, Jan, *Chemie potravin 2.*, 2. vyd. Tábor: Osis, 2002. 239 s. ISBN 80-902391-4-5
- [2] HÁLKOVÁ, Jana, RUMÍŠKOVÁ, Marie, RIEGROVÁ Jana. *Analýza potravin.* 2. vyd. Újezd u Brna: Straka, 2001, 94 s. ISBN 80-86494-02-0
- [3] DAVÍDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin.* 1. vyd. Praha: STNL, 1977. 719 s. ISBN 04-830-77
- [4] DAVÍDEK, Jiří, JANÍČEK, Gustav, POKORNÝ, Jan. *Chemie potravin.* 1. vyd. Praha: SNTL/ALFA, 1983. 632 s. ISBN 04-815-83
- [5] PRÍBELA, Alexander. *Základy analýzy potravin.* 1. vyd. Bratislava: SVŠT, 1981.
- [6] ČÍŽKOVÁ Lenka, ADAM Martin, a kol. *Aplikace vybraných mikroextrakčních technik na headspace analýzu silic* [online]. [cit. 28-4-2007]. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/anl/soutez2007/abstrakt-Cizkova.pdf>>
- [7] KOUKAL, Milan. *Nejlepší je zelený doktor!* [online]. [cit. 21-5-2007]. dostupné z WWW: <<http://www.21stoleti.cz/view.php?cislocianku=2005072116>>
- [8] *Silice* [online]. [cit. 21-3-2007]. dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Silice>>
- [9] DAVÍDEK, Jiří a kol. *Chemie potravin.* 1. vyd. Praha: SNTL, 1986. 142 s.
- [10] ODYOVÁ, Penelope. *Velký atlas léčivých rostli.* 1.vyd. Martin: Vydavatelstvo Osveta, 1995. 192 s. ISBN 80-217-0521-3
- [11] MORAVCOVÁ, Jitka. *Biologicky aktivní přírodní látky* [online]. VŠCHT v Praze, FPBT, Ústav chemie přírodních látek, [cit. 28-4-2007]. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003-01.pdf>>
- [13] *Vlastnosti karotenoidů* [online]. [cit. 24-4-2007]. Dostupné z WWW: <http://sweb.cz/HPLC1/Carotenoids/ch_karotenoids.htm#_Obecná_charakteristik_a_->
- [14] VELÍŠEK, Jan, *Chemie potravin*, díl 3., 2. vyd. Tábor: Osis, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-02-X

- [15] OPEKAR František, JELÍNEK Ivan a kol. *Základní analytická chemie*, 1. vyd., Praha: Nakladatelství Karolinum, 2002. 202 s. ISBN 80-246-0553-8
- [16] *Separáční metody – destilace* [online]. [cit. 28-3-2007]. Dostupné z WWW: <<http://www.kralupy.cz/dg/www2/stranky/chemie/destilace.htm>>
- [17] ZÝKA, Jaroslav a kol. *Analytická příručka 1*. 4. vyd. Praha: SNTL, ALFA, 1988. 680 s. ISBN 04-606-88
- [18] HOLZBECHER, Z., CHURÁČEK, J. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, ALFA, 1987. 664 s. ISBN 04-612-87
- [19] MARTINKOVÁ, Miroslava. *Kozmatické chémie* [online]. [cit-27-5-2007], dostupné z WWW: <<http://kekule.science.upjs.sk/chemia/kuch/CHBZ3.html>>
- [20] ROUATBI, M., DUQUENOZ, A., GIAMPAOLI P. Extraction of the essential oil of thyme and black pepper by superheated steam. *Journal of Food Engineering*. 2007. roč. 78, č. 2, s. 708-714.
- [21] LUCCHESI, M. E., CHEMAT, F., SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*. 2004, roč. 1043, č. 2, s. 323-327.
- [22] TIGRINE-KORDJANI, N., MEKLATI, B.Y., CHEMAT, F. Microwave 'dry' distillation as an useful tool for extraction of edible essential oils. *Journal of Aromatherapy*. 2006, roč. 16, č. 3-4, s. 141-147.
- [23] CHEMAT, F., LUCCHESI, M.E. a kol. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*. 2006, roč. 555, č. 1, 5, s. 157-160.
- [24] *Separáční metody – extrakce* [online]. [cit. 28-3-2007]. Dostupné z WWW: <<http://www.kralupy.cz/dg/www2/stranky/chemie/extrakce.htm>>
- [25] JOSKA Luděk, PŘÍKRYLOVÁ Kateřina. *Speciální chemické a instrumentální analytické metody*, 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1990. 251 s. ISBN 80-7080-060
- [26] HÁLKOVÁ, Jana, RUMÍŠKOVÁ, Marie a RIEGROVÁ Jana. *Analýza potravin – laboratorní cvičení*. 1. vyd. Újezd u Brna: Straka, 2000.164 s., ISBN 80-902775-4-3

- [27] DURLING, N. E., CATCHPOLE O. J. a kol. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry*, 2007. roč. 101, č. 4, s. 1417-1424.
- [28] PSILLAKIS, E., KALOGERAKIS, N. Solid-phase microextraction versus single-drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. *Journal of Chromatography A*. 2001, roč. 938, č. 1-2, s. 113-120.
- [29] AN, M., HAIG, T., HATFIELD, P. On-site field sampling and analysis of fragrance from living Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) flowers by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography and ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2001, roč. 917, č. 1-2, , s. 245-250.
- [30] LÓPEZ, P., HUERGA, M. a kol. Use of solid phase microextraction in diffusive sampling of the atmosphere generated by different essential oils. *Analytica Chimica Acta*. 2006, roč. 559, č. 1, s. 97-104.
- [31] BARANAUSKIENE, R., VENSKUTONIS, P. R. a kol. Testing of microencapsulated flavours by electronic nose and SPME–GC. *Food Chemistry*. 2005, roč. 92, č. 1, s. 45-54.
- [32] REVERCHON, E., TADDEO, R. a DELTA PORTA G. Extraction of sage oil by supercritical CO₂: Influence of some process parameters. *The Journal of Supercritical Fluids*. 1995, roč. 8, č. 4, s. 302-309.
- [33] CATCHPOLE, J. Owen, GREY, B. John, a SMALLFIELD, M. Bruce. Near-critical extraction of sage, celery and coriander seed. *The Journal of Supercritical Fluids*. 1996, roč. 9, č. 4, s. 273-279.
- [34] ALEKSOVSKI, S.A. a SOVOVÁ H. Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2007, roč. 40, č. 2 , s. 239-245.
- [35] RRAMÍREZ, P., GARCÍA-RISCO, M. R. a kol. Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, roč. 41, č. 5, s. 1606-1613.

- [36] BARTON, P, HUGHES, E.R., Jr. a HUSSEIN, M. M. Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint. *The Journal of Supercritical Fluids*. 1992, roč. 5, č. 3, , s. 157-162.
- [37] ZIYKOVIC, I., SSTAMENIĆ, M. a kol. Supercritical carbon dioxide essential oil extraction of Lamiaceae family species: Mathematical modelling on the micro-scale and process optimization. *Chemical Engineering Science*. 2005, roč. 60, č. 23, s. 6747-6756.
- [38] REVERCHON, E. Fractional separation of SCF extracts from marjoram leaves: Mass transfer and optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*. 1992, roč. 5, č. 4, s. 256-261.
- [39] KÖSE, O., AKMAN, U. a HORTACSU, Ö. Semi-batch deterpenation of origanum oil by dense carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2000, roč. 18, č. 1, s. 49-63.
- [40] POTHIER, J., GALAND, N. a kol. Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. *Il Farmaco*. 2001, roč. 56, č. 5-7 , s. 505-511.
- [41] SUR, S. V., TULJUPA, F. M. a SUR, L. I. Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants. *Journal of Chromatography A*. 1991, roč. 542, s. 451-458
- [42] OKAMURA, N., FUJIMOTO, Y. a kol. High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*. 1994, roč. 679, č. 2, s. 381-386.
- [43] ADA, N., DINPER, S. a BOLAT, E. Supercritical-fluid extraction of essential oil from Turkish lavender flowers. *The Journal of Supercritical Fluids*. 1994, roč. 7, č. 2, s. 93-99.
- [44] CAI, J., LIN P. a kol. Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea L.*) oil volatiles by GC-FTIR and GC-MS. *Food Chemistry*. 2006, roč. 99, č. 2, s. 401-407.
- [45] GOODNER, K.L., MAHATTANATAWEE K. a kol. Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC-MS/GC-O. *Industrial Crops and Products*. 2006, roč. 24, č. 3, s. 264-268.

- [46] SHELLIE, R., MONDELLO, L. a kol. Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography–mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2002, roč. 970, č. 1-2, s. 225-234.
- [47] HUDAI, M., SPERONI, E. a kol. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris L.*) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, roč. 29, č. 4, s. 691-700.
- [48] ZÝKA, Jaroslav a kol. *Analytická příručka 2*, 4. vyd. Praha: SNTL, ALFA, 1988. 832 s. ISBN 04-611-88
- [49] SCHULZ, H., BARANSKA, M. a kol. Chemotaxonomic characterisation of essential oil plants by vibrational spectroscopy measurements. *Vibrational Spectroscopy*. 2004, roč. 35, č. 1-2, s. 81-86.
- [50] SCHULZ, H., ÖZKAN, G. a kol. Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 2005, roč. 39, č. 2, s. 249-256.
- [51] KINCLOVÁ, V., JAROŠOVÁ, A, TREMLOVÁ, B. *Senzorická analýza potravin* [online]. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, MZLU. [cit. 21-5-2007]. dostupné z WWW: <<http://www.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=2984>>
- [52] *Elektronický nos* [online]. [cit. 21-5-2007]. dostupné z WWW: <<http://automatizace.hw.cz/viewphp?cislocclanku=2006042901>>
- [53] MACKŮ, Ján, MOKRÝ, Jozef. *Naše liečivé rastliny, sber, pestovanie, úprava, účinné látky, upotrebenie*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied, 1958. 408 s.
- [54] MACKŮ, Ján, KREJČA, Jindřich. *Atlas liečivých rastlín* 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied, 1964. 468s. ISBN 71-004-64
- [55] BEGUIVINOVÁ, Helena, MÜLLEROVÁ, Hana. *Rostlinná medicína*. 1. vyd. Praha: Resder's Digest Výběr, 2003. 352 s.
- [56] BODLÁK, Jiří. *Příroda léčí – Bylinář na konci 20. století*. 1. vyd. Praha: Granit, 1995. 239 s. ISBN 80-85805-30-8

- [57] *Bylinky* [online]. [cit. 28-4-2007]. Dostupné z WWW: http://web.quick.cz/iveta_kulhava/Bylinky/Bylinky.htm
- [58] PETRBOK, Jaroslav. *Sbíráme léčivé rostliny*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství dětské knihy, 1958. 263 s.
- [59] *Virtuální učebnice farmakognozie* [online]. [cit. 23-5-2007]. dostupné z WWW: <http://faf.vfu.cz/html/docs/plants/>
- [60] BREMNESSOVÁ, Lesley. *Bylinář – Zdraví, krása a radost*. 1. vyd. Praha: Fortuna Print, 1994. 286 s. ISBN 80-85873-00-1
- [61] GACHKAR, L., YADEGARIA, D. a kol. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*. 2007, roč. 102, č. 3, s. 898-904.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CFA	Kontinuální průtoková analýza (Continuous Flow Analysis)
FIA	Průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
FID	Plamenově ionizační detektor (Flame Ionization Detektor)
FTIR	Furierova transformační infračervená spektrometrie (
GC	Plynová chromatografie (Gas CHromatography)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
IEC	Iontově výměnná chromatografie (Ion Exchange Chromatography)
IR	Infračervená spektrometrie (Infrared Spektrometry)
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
MAD	Mikrovlná destilace (Microwave Accelarated Distilation)
MPa	Megapaskal
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spektrometry)
MT	Monoterpenové
NIR	Spektrometrie v blízké infračervené oblasti (Near Infrared Spektrometry)
NMT	Vyšší terpenové frakce (nemonoterpenové frakce)
PC	Papírová chromatografie (Paper chromatography)
SCF	Extrakce nadkritickou kapalinou (Supercrotocal Fluid Extraction)
SDME	Mikroextrakce kapalnou fází (Single-Drop Mikroextraction)
SFME	Bezrozpouštědlová mikrovlnná extrakce (Solvent Free Microwave Extraction)
SPME	Mikroextrakce na tuhé fázi (Solid Phase Mikroextraction)
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
UV	Spektrometrie v ultrafialové oblasti, UV detektor

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Vzorce významných terpenových a aromatických uhlovodíků	15
Obr. 2 Vzorce významných terpenových alkoholů	16
Obr. 3 Vzorce významných aldehydů	17
Obr. 4 Vzorce významných ketonů.....	18
Obr. 5 Aparatura pro destilaci vodní parou	26
Obr. 6 Speciální nástavec pro destilaci těkavých silic	26
Obr. 7 Aparatura pro destilaci za sníženého tlaku	27