

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

DISERTAČNÍ PRÁCE

PharmDr. Tomáš Bílek

Hradec Králové 2013

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

**VYUŽITÍ GC A SPME
V ANALÝZE PŘÍRODNÍCH LÁTEK**

Disertační práce

PharmDr. Tomáš Bílek

Školitel: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Farmakognosie

Hradec Králové 2013

Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. Luďkovi Jahodářovi, CSc. za podporu v průběhu celého studia, za vytvoření vhodných podmínek pro odborný růst a cenné rady a připomínky během mé práce.

Děkuji kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření příjemného prostředí pro studium.

Děkuji kolektivu vědců, přátel z Università di Camerino (Dr. Maggi, Dr. Sagratini, Dr. Papa, Dr. Conti, Prof. Vittori) za vřelé a přátelské přijetí při mém pobytu v Itálii a za poskytnutí kvalitního vědeckého zázemí a odborného růstu.

Děkuji za podporu své rodině, zejména pak svému otci, který mě motivoval pro přírodovědnou profesní dráhu.

V Hradci Králové 2013

Tomáš Bílek

Prohlášení o autorství

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškeré zdroje, z nichž jsem při práci čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Hradci Králové 2013

Tomáš Bílek

OBSAH	5
ABSTRAKT.....	8
ABSTRACT	10
1. ÚVOD	12
2. CÍL	14
3. TEORETICKÁ ČÁST	15
3.1. Botanická charakteristika čeledi <i>Lamiaceae</i>	15
3.1.1. <i>Melittis melissophyllum</i> L.	17
3.1.2. <i>Teucrium flavum</i> L.	18
3.2. Biologická aktivita, farmakognostická charakteristika rostlin čeledi <i>Lamiaceae</i>	19
3.2.1 Biologická aktivita rostlin rodu <i>Teucrium</i> L. a <i>Melittis</i> L.	24
3.3. Český lékopis	25
3.4. Těkavé látky přírodního původu	26
3.4.1. Těkavé látky rostlinného původu, silice	27
3.4.1.1. Chemická charakteristika	28
3.4.1.2. Biosyntéza	35
3.4.1.3. Biologická aktivita	40
3.4.2. 1-okten-3-ol	41
3.5. Metody izolace, extrakce a zakoncentrování těkavých látek z rostlin	41
3.5.1. Destilační metody	42
3.5.1.1. Destilace za sníženého tlaku	43
3.5.1.2. Destilace s vodní parou	43
3.5.1.3. Simultánní destilace-extrakce	43
3.5.2. Extrakční techniky	44
3.5.2.1. Extrakce rozpouštědlem	44
3.5.2.2. Superkritická fluidní extrakce	45
3.5.2.3. Headspace techniky	45
3.5.2.3.1. Statická headspace	45
3.5.2.3.2. Dynamická headspace	46
3.5.3. Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction – SPME)	47
3.5.3.1. Teoretické vztahy pro výpočet extrahovaného množství analytu	49
3.5.3.1.1. Absorpce	49

3.5.3.1.2. Adsorpce	50
3.5.3.1.3 TWA (Time Weight Average) metoda měření koncentrace analytu v prostředí	51
3.5.3.2. Optimalizace podmínek SPME	52
3.5.3.2.1. SPME stacionární fáze	52
3.5.3.2.2. Způsob vzorkování	54
3.5.3.2.3. Teplota	54
3.5.3.2.4. Čas	54
3.5.3.2.5. Změna pH a přidavek soli	55
3.5.3.2.6. Míchání	55
3.5.3.2.7. Množství analyzovaného vzorku a velikost analyzovaných částic	56
3.5.3.3. Uspořádání SPME experimentu	56
3.5.3.3.1. Na vlákne	56
3.5.3.3.2. In-Tube SPME	59
3.6. Separační a analytické metody	60
3.6.1. Plynová chromatografie	60
3.6.1.1. Mobilní fáze	62
3.6.1.2. Čistící zařízení	63
3.6.1.3. Regulátory tlaku a průtoku	63
3.6.1.4. Injektor	63
3.6.1.4.1. Metody nástřiku	63
3.6.1.4.2. Dynamický head-space dávkovací systém	64
3.6.1.4.3. Statický head-space dávkovací systém	64
3.6.1.5. Kolona	65
3.6.1.6. Detektor	66
3.6.1.6.1. Plamenově ionizační detektor (FID)	68
3.6.1.6.2. Hmotnostní spektrometr (MS)	68
3.6.2. Významné teoretické aspekty v plynové chromatografii	71
3.6.2.1. Záznam chromatogramu	71
3.6.2.2. Důležité pojmy v plynové chromatografii	71
3.6.2.3. Kvantitativní analýza v plynové chromatografii	72
3.6.2.4. Kvalitativní analýza v plynové chromatografii	74
3.6.3. Statistické zpracování dat	77
3.6.3.1. Linearita	77
3.6.3.2. Opakovatelnost	77
3.6.3.3. Mez detekce	78
3.6.3.4. Mez stanovitelnosti	79

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	80
4.1. Rostlinný materiál	80
4.1.1. <i>Melittis melissophyllum</i> L. subsp. <i>melissophyllum</i>	80
4.1.2. <i>Teucrium flavum</i> L. subsp. <i>flavum</i>	80
4.2. Chemikálie	81
4.2.1. <i>Melittis melissophyllum</i> L. subsp. <i>melissophyllum</i>	81
4.2.2. <i>Teucrium flavum</i> L. subsp. <i>flavum</i>	81
4.3. Metody izolace, extrakce a zakoncentrování	81
4.3.1. Destilace s vodní parou (SD)	81
4.3.1.1. <i>Melittis melissophyllum</i> L. subsp. <i>melissophyllum</i>	82
4.3.1.2. <i>Teucrium flavum</i> L. subsp. <i>flavum</i>	82
4.3.2. SPME analýza	82
4.3.2.1. <i>Teucrium flavum</i> L. subsp. <i>flavum</i>	82
4.4. Separační a analytické metody	83
4.4.1. GC-FID	83
4.4.2. HS-GC	84
4.4.3. GC-MS	84
4.5. Identifikace a kvantifikace těkavých látek	85
4.5.1. <i>Melittis melissophyllum</i> L. subsp. <i>melissophyllum</i>	85
4.5.1.1. Kvantifikace 1-okten-3-olu v silici	85
4.5.2. <i>Teucrium flavum</i> L. subsp. <i>flavum</i>	86
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	88
6. ZÁVĚR	113
7. LITERATURA	114
8. PŘÍLOHA – AUTORSKÉ PUBLIKACE	129

ABSTRAKT

Vzhledem k široké možnosti využití SPME a GC v analýze přírodních látek byl tento výzkum zaměřen v oblasti botaniky a ekologie na studium těkavých látek z rostlin.

Studovaným materiálem byly 2 druhy z čeledi *Lamiaceae*, *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* a *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*. V teoretické části je jednak uvedena botanická a farmakognostická charakteristika čeledi *Lamiaceae*, resp. studovaných druhů a dále pojednání o těkavých látkách přírodního, rostlinného původu včetně chemické charakteristiky, biologické aktivity a způsobu jejich analýzy sensu lato.

Silice z kvetoucích nadzemních částí *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum*, rostoucího ve střední Itálii, byla získána destilací s vodní parou a charakterizována pomocí GC-FID a GC-MS. Bylo identifikováno 48 komponent (94,7 – 95,0 %). Hlavní složkou byl po houbách vonící 1-okten-3-ol (43,6 – 54,2 %). Výsledek by naznačoval možné využití rostliny jako nového přírodního zdroje této látky, používané např. v potravinářském průmyslu. Následným provedením headspace analýzy (HS-GC) bylo zjištěno, že tato aromatická sloučenina je v rostlině přítomna pouze v nízké koncentraci a její množství se zvyšuje destilací tohoto materiálu s vodní parou (SD).

Stále větší význam při analýze těkavých látek z rostlin, s ohledem na způsob vzorkování, má Headspace (HS) – Solid Phase Microextraction (SPME). Předmětem výzkumu bylo tedy vybrat nejúčinnější SPME vlákno, optimalizovat podmínky vzorkování a porovnat HS-SPME metodu s další extrakční technikou, destilací s vodní parou (SD). Na tomto základě, byla provedena analýza těkavých látek *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*, rostoucí ve střední Itálii, jak pomocí destilace s vodní parou (SD), tak headspace – solid phase microextraction (HS-SPME), ve spojení s GC / FID a GC / MS. V silici získané destilací s vodní parou bylo identifikováno 102 látek (99,0 – 99,3% všech složek analyzové silice). Nejvíce zastoupeny byly seskviterpenické uhlovodíky (48,5 – 49,4%), hlavní složkou po jablkách vonící (Z, E)- α -farnesen. Při HS-SPME analýze byly testovány tři typy vláken: 100 μ m polydimethylsiloxan (PDMS), 65 μ m PDMS / divinylbenzen (DVB) a 50/30 μ m DVB-carboxen-PDMS.

Nejvíce vyhovující se ukázalo být PDMS vlákno, použité za následujících podmínek: teplota 60°C, extrakční čas 30min, množství vzorku 30mg, velikost částic vzorku 1mm. HS-SPME metodou bylo identifikováno 76 (sušený vzorek) resp. 66 (čerstvý vzorek) různých těkavých látek (95,8 – 97,8%). Kromě toho bylo zjištěno, že přítomnost vody ve vzorku může zvýšit absolutní množství alkoholických látek, jako je 1-okten-3-ol a snížit přítomnost esterů, jako např. methyl geranat. Pomocí metody HS-SPME byly analyzovány jednak vzorky celé nadzemní části rostliny, jednak

jednotlivé její části a to také v rámci jednoho květu. Ukázalo se, že co se týká těkavých látek, má největší příspěvek na rostlinnou vůni květní kalich. SPME technika tedy umožňuje také analýzu pouze cílené části rostliny s obsahem specifických látek. Tudiž může být vhodná pro odběr vzorku např. při průmyslovém využití aromatických rostlin či studiu na poli chemické ekologie.

Rostliny emitují těkavé organické sloučeniny, které hrají důležitou roli v jejich interakci s prostředím a mají zásadní dopad na chemii atmosféry. Rozvoj statické a dynamické techniky pro sběr těkavých látek z prostoru nad studovaným materiálem (headspace) v kombinaci s analýzou pomocí plynové chromatografie – hmotnostní spektrometrie může významně zlepšit naše chápání biosyntézy a ekologie těkavých rostlinných látek.

ABSTRACT

Due to the wide use of SPME and GC in the analysis of natural products, this research is focused on the field of botany and ecology on the study of volatile compounds from plants.

The material for a study were two species of *Lamiaceae* family, *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* a *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*. In the theoretical part are described as botanical as farmacognostical characteristics of the family *Lamiaceae* and the species under the study, respectively. Furthermore, the discussion on volatile substances of natural, plant origin including chemical characteristics, biological activity and methods of analysis sensu lato is given.

The essential oil of flowering aerial parts of *Melittis melissophyllum* subsp. *melissophyllum* (*Lamiaceae*), growing in central Italy, was obtained by steam distillation and characterised by GC-FID and GC-MS. The total of 48 components were identified (94.7 - 95.0%). The main component was the mushroom-like flavour 1-octen-3-ol (43.6 - 54.2%). The result suggests, that the plant could be considered as a new natural source of this molecule used for example in the food industry. The subsequent performing headspace analysis (HS-GC), suggested that this aromatic compound is present in the plant only at low concentration and its amount increases by the steam distillation of this material (SD). Increasing importance in the analysis of volatile compounds from plants, with respect to the sampling, has assumed the headspace (HS) - Solid Phase Microextraction (SPME). The goal of research was to choose the most effective SPME fiber to optimize the conditions of sampling and comparison of HS-SPME with other extraction techniques, steam distillation (SD). On this basis, the analysis of volatile compounds *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*, growing in central Italy, was carried out by means both by steam distillation (SD) and Headspace - Solid Phase Microextraction (HS-SPME) coupled with GC / FID and GC / MS. A total of 102 substances were identified from the essential oil obtained by steam distillation (99.0 - 99.3% of the all ingredients of the analyzed oil). The sesquiterpene hydrocarbons constituted the major fraction (48.5 - 49.4%), with the apple-like flavour (Z,E)- α -farnesene being the major component. During HS-SPME analysis three kinds of fibers was tested: 100 μ m polydimethylsiloxan (PDMS), 65 μ m PDMS / divinylbenzen (DVB) and 50/30 μ m DVB-Carboxen-PDMS. The best fibre was found to be PDMS when working in the following conditions: 60°C temperature, 30 min extraction time, 30 mg sample amount, 1mm sample particle size. By HS-SPME method was identified 76 (dry sample) resp. 66 (fresh sample) of various volatiles (95.8 - 97.8%). In addition, it was found that the presence of water in the sample can enhance the absolute quantity of alcoholic compounds such as 1-octen-3-

ol, and reduce the presence of esters, such as methyl geranate. Using this method, the HS-SPME samples as of the whole flowering aerial part of plants as of the different their parts and the components of flowers were analyzed. The flower calyx shows to be the largest contributor – in terms of volatile substances – to plant aroma. SPME technique thus allows to analyze only targeted parts of plants, too. Therefore, it may be appropriate for sampling as in the industrial applications of aromatic plants or on the field of chemical ecology.

Plants emit volatile organic compounds (VOCs) that play important roles in their interaction with the environment and have a major impact on atmospheric chemistry. The development of static and dynamic techniques for headspace collection of volatiles in combination with gas chromatography–mass spektrometry analysis has significantly improved our understanding of the biosynthesis and ecology of plant VOCs.

1. ÚVOD

Jedním z cílů moderní chemie přírodních látek je vyvinout analytické metody a postupy, kterými by bylo možné stanovit různé druhy organických molekul z živých systémů co nejefektivněji a pokud možno v reálném čase.

Vzhledem k šíři problematiky byla studie zaměřena na chemii rostlin.

V této práci byla provedena analýza těkavých látek z rostlin *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* a *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* z čeledi *Lamiaceae*, jako typického zástupce siličných drog. Výzkum byl zaměřen na různé metody analýzy s důrazem na možnost využití mikroextrakční techniky SPME (solid phase microextraction). Dosud používané metody jsou často složité, drahé, vyžadují náročnou instrumentaci a jejich časová náročnost je velká. Proto je jejich použití v některých případech omezené. Metoda, která by splňovala tyto požadavky je právě zmíněná SPME. SPME je jednoduchá a účinná sorpčně – desorpční technika používaná pro izolaci, zakoncentrování, stanovení organických molekul z různých druhů matric. Nevyžaduje rozpouštědla ani komplikované aparatury a lze ji použít v kombinaci jak s plynovou tak kapalinovou chromatografií. Metoda může být vhodná jak pro kvalitativní tak i kvantitativní analýzu. Vzhledem k tomu, že velmi náročným a kritickým krokem analytického procesu je vzorkování, je nejdůležitější optimalizovat podmínky mikroextrakce (SPME) pro dosažení správných a přesných výsledků. V tomto případě se jedná o vzorkování z prostoru nad zkoumaným materiálem, tzv. headspace (HS-SPME). Mezi výhody techniky SPME patří její vysoká citlivost, což umožňuje minimalizaci vzorku. [52, 56] Jako porovnávací metoda mikroextrakční techniky byla použita metoda destilace s vodní parou (SD).

Část výzkumu byla věnována *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* ze střední Itálie. Nejprve byla provedena analýza silice plynovou chromatografií (GC-FID, GC-MS) po předchozí destilaci s vodní parou (SD). Na základě zjištění výrazného množství „houbové látky“ 1-okten-3-olu (43,6-54,2%) ve vzorku byla také použita metoda HS-GC pro analýzu surového rostlinného materiálu, zaměřená na kvantitativní analýzu této látky.

V další části byla provedena analýza těkavých látek rostliny *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* rostoucí ve střední Itálii. Pro jejich charakterizaci byla použita jak metoda destilace s vodní parou (SD) tak HS-SPME a to v kombinaci s GC-FID a GC-MS. Byla provedena srovnávací studie. HS-SPME je stále ještě relativně nová technika používaná při výzkumu těkavých látek z rostlin. Práce byla tedy také zaměřena na hledání ideálních parametrů analýzy (typ SPME vlákna, množství vzorku, velikost částic vzorku, teplota a čas extrakce, desorpční čas v GC injektoru) a tudíž optimalizaci metody HS-SPME v kombinaci s GC-FID a GC-MS tak, aby byla co nejlépe aplikovatelná pro studium těchto látek. K tomu bylo použito 10

charakteristických složek na základě výsledků z GC chromatogramu. Metodou HS-SPME byla analyzována jak sušená tak čerstvá rostlina a potom také zvlášť její jednotlivé části (včetně separace květu).

Cílené použití této techniky v rámci konkrétní části rostliny může odhalit molekuly významné jak v oblasti medicíny, farmacie, chemické ekologie, tak užitečné třeba v potravinářském průmyslu.

V práci je také uvedena botanická a farmakognostická charakteristika studované čeledi *Lamiaceae*, obecné pojednání o těkavých látkách přírodního původu včetně metod jejich analýzy. Jsou zde uvedeny teoretické aspekty SPME-GC analýzy. A to základní vztahy mezi matricí se vzorkem a SPME vláknem, základní instrumentace pro provádění extrakce pomocí SPME a vliv fyzikálních a chemických vlastností na výtěžnost, přesnost, správnost a reprodukovatelnost extrakcí.

2. CÍL

Cílem této práce bylo jednak analyzovat těkavé látky dvou rostlinných taxonů z čeledi Lamiaceae (*Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum*, *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*) pomocí GC-FID a GC-MS po předchozí extrakci, izolaci pomocí destilace s vodní parou (SD), dále také zkoumání možnosti využití metody SPME při analýze rostlinného materiálu (*Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*), optimalizace SPME parametrů extrakce, vliv přídavku vody na analýzu a v neposlední řadě také srovnání s klasickou extrakční technikou používanou pro získání silic – destilací s vodní parou.

Vzhledem k zajímavému zjištění během analýzy silice *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum*, týkající se jedné ze složek (1-okten-3-olu), byla také provedena studie této rostliny pomocí HS-GC. Tato metoda byla použita za účelem kvantifikace 1-okten-3-olu ve studovaném materiálu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Botanická charakteristika čeledi *Lamiaceae*

Rostliny čeledi hluchavkovité (*Lamiaceae*) jsou jednoleté, dvouleté nebo vytrvalé byliny či polokeře, mimo území ČR i keře a stromy. Jednoduché či větvené lodyhy jsou nejčastěji čtyřhranné se vstřícným, převážně křížmostojným postavením listů. Listy hluchavkovitých rostlin jsou jednoduché (mimo území ČR i dlanitě složené) s celistvými či vzácně peřeně členitými okraji. K lodyze se listy připojují pomocí řapíku nebo jsou přisedlé a bez palistů. Květy vytvářejí ve stažených vrcholících lichopřesleny, které jsou oddálené či nahloučené do koncových lichoklasů. Některé druhy hluchavkovitých rostlin skládají latovitá nebo vidlanovitá květenství a u dalších druhů může být vrcholík redukován na jednotlivé květy. Květy jsou zřetelně souměrné, oboupohlavné či druhotně jednopohlavné.

U řady druhů byla zjištěna gynodioecie (jeden a týž druh rostliny má v populaci oboupohlavní i čistě samičí květy), při které se rostliny navzájem liší v některých morfologických znacích (např. velikost květů). Pětičetný kalich má pravidelný trubkovitý až zvonkovitý tvar, za plodu vytrvává. Koruna je srostlá z pěti lístků a je zřetelně dvoupyská. Horní pysk je celokrajný, často vyklenutý a na vrcholu vykrojený. Vzácně může být horní pysk členěný do dvou laloků či redukován (zdánlivě chybí). U dolního pysku, který je obvykle trojlaločný, je střední lalok největší a postranní laloky jsou redukovány na malé výrůstky.

Tyčinky jsou zpravidla čtyři, dvoumocné, mohou být ukryté pod horním pyskem, nebo mohou z koruny nápadně vyčnívat. Zřídka se vyskytují tyčinky skryté v korunní trubce či přisedlé k dolnímu pysku koruny. Občas jsou fertillní pouze dvě tyčinky a zbylé dvě tyčinky jsou sterilní, redukováné ve staminodia (některá vylučují nektar). Prašník má dva prašné váčky (u druhů s dvěmi tyčinkami je funkční pouze jeden) a puká podélnou štěrbinou ke středu květu (introrzní). Pylová zrna jsou obvykle dvoubuněčná nebo trojbuněčná. Gyneceum (soubor plodolistů v květu) je složeno ze dvou plodolistů, které srůstají stěnami (synkarpní). Semeník je svrchní, dvoupouzdrý s nepravou přepážkou, která ho rozděluje na čtyři části. Každá část semeníku odpovídá polovině plodolistu a obsahuje jedno jednoobalné vajíčko. Čnělka vyrůstá z báze rozděleného semeníku (gynobazická). Blizna je dvouramenná s rameny stejně či různě dlouhými, vzácně je jedno rameno redukováno. Plodem je tvrdka, vzácně u mimoevropských druhů peckovice či tobolka. Semena jsou bez endospermu, mimo Evropu i s endospermem. [58]

Čeleď hluchavkovitých rostlin zahrnuje okolo 220 rodů s více jak 4 000 druhy rostlin, které jsou rozšířeny po celém světě, zvláště v oblastech okolo Středozemního moře. V květeně ČR můžeme najít okolo 100 druhů rostlin z 37 rodů této čeledi, z toho k nám bylo přibližně 10 rodů zavlečeno. V ČR se vykytují rostliny těchto rodů [58]:

1. *Acinos* Mill. – pamětník (marulka)
2. *Ajuga* L. – zběhovce
3. *Ballota* L. – měrnice
4. *Betonica* L. – bukvice
5. *Clinopodium* L. – klinopád (marulka)
6. *Dracocephalum* L. – včelník
7. *Elsholtzia* Willd. – klasnatka
8. *Galeobdolon* Hudson – pitulník
9. *Galeopsis* L. – konopice
10. *Glechoma* L. – popenec
11. *Hesiodia* Moench – hojník
12. *Hyssopus* L. – yzop
13. *Chaiturus* Willd. – buřina
14. *Chamaepitys* Hill. – zběhoveček
15. *Ladanella* Pouzar et Slavíková – konopička
16. *Lamium* L. – hluchavka
17. *Lavandula* L. – levandule
18. *Leonurus* L. – srdečník
19. *Lycopus* L. – karbinec
20. *Majorana* Mill. – majoránka
21. *Marrubium* L. – jablečník
22. *Melissa* L. – meduňka
23. *Melittis* L. – medovník
24. *Mentha* L. – máta
25. *Nepeta* L. – šanta
26. *Ocimum* L. – bazalka
27. *Origanum* L. – dobromysl
28. *Phlomis* L. – sápa
29. *Prunella* L. – černoohlávek
30. *Pulegium* Mill. – polej
31. *Salvia* L. – šalvěj
32. *Satureja* L. – saturejka
33. *Scutellaria* L. – šišák
34. *Stachys* L. – čistec
35. *Teucrium* L. - ožanka
36. *Thymus* L. – mateřídouška

3.1.1. *Melittis melissophyllum* L.

Melittis melissophyllum L., jediný zástupce tohoto rodu, je vytrvalá bylina vysoká 20 – 60cm s přímou chlupatou lodyhou. Listy jsou řapíkaté, čepel vejčitá až eliptická, s vroubkovaně pilovitým až pilovitým okrajem. Lichopřesleny 2 – 6tkvěté, květy stopkaté. Kalich dvoupyský, světle zelený. Koruna rovněž dvoupyská, bílá až narůžovělá, střední lalok dolního pysku růžový. Plody jsou tvrdky. Rostliny slabě voní po medu. Je to lesní teplomilná rostlina, a proto nejvíce roste v teplomilných doubravách, také v květnatých bučinách, habrových lesích, na pasekách a stráních. [3, 58]

V Itálii se vyskytují dva poddruhy, subsp. *albida* (Guss) a subsp. *melissophyllum* L. [8]



Melittis melissophyllum L. (foto Tomáš Bílek)

3.1.2. *Teucrium flavum* L.

Do rodu *Teucrium* L. patří okolo 120 druhů aromatických rostlin, které se vyskytují hlavně v subtropickém a mírném pásu severní polokoule, s těžištěm rozšíření ve Středomoří a subtropické Asii. Vzácněji jsou také v Jižní Americe, jižní Africe a Austrálii. V ČR se vyskytuje ožanka kalamandra (*T. chamaedrys* L.), ožanka chlumní (*T. montanum* L.), ožanka lesní (*T. scorodonia* L.), ožanka čpavá (*T. scordium* L.), ožanka hroznatá (*T. botrys* L.) a ožanka kočičí (*T. marum* L.). V této práci studovaná *Teucrium flavum* L. je keřovitá, až 60 cm vysoká bylina. Listy má téměř trojúhelné, vejčité až obvejčité o velikosti 10–40 × 10–25 mm. Řapík je tak dlouhý jako šířka čepele. Kalich je 7–10 mm velký, koruna žlutá, přesleny 3květé. Je to teplomilná rostlina domácí ve Středomoří. [58, 21]

V Itálii se vyskytují 2 poddruhy, subsp. *flavum* L. a subsp. *glaucum* (Jord a Fourr) L. [8]



Teucrium flavum L. (foto Fabrizio Papa)

3.2. Biologická aktivita, farmakognostická charakteristika rostlin čeledi

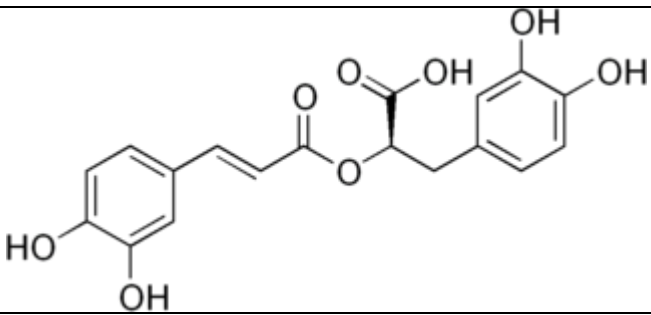
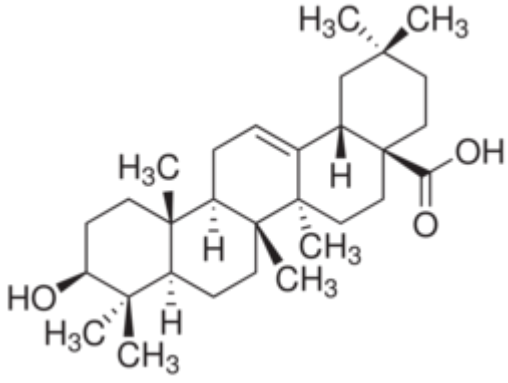
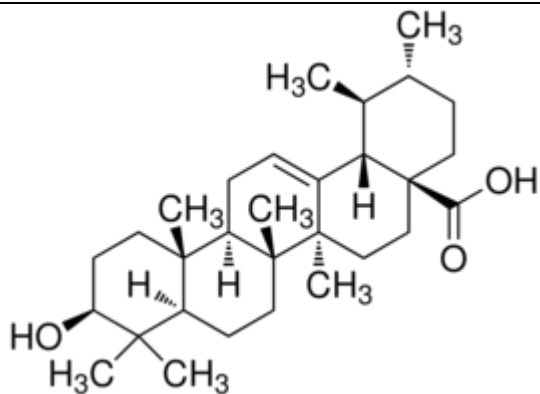
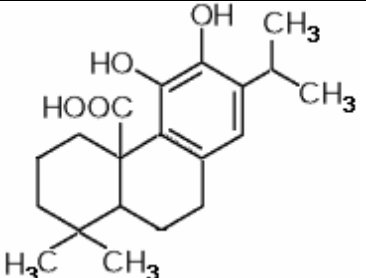
Lamiaceae

Mnohé rostliny z čeledi *Lamiaceae* byly hojně využívány v tradičním lidovém léčitelství a také proto jsou neustále předmětem zájmu mnoha výzkumných týmů moderní farmacie a medicíny. Mezi obsahové látky hluchavkovitých rostlin patří silice, hořčiny, třísloviny a v menší míře zastoupené saponiny, flavonoidy, slizové látky, organické kyseliny, flavonové glykosidy, cholin aj. [60].

Ve většině hluchavkovitých rostlin jsou nejvíce zastoupeny silice, jimž byl také věnován výzkum a je o nich pojednáno v samostatné kapitole. Třísloviny jsou chemicky různorodé látky používané jako adstringencia, působící proti krvácení, průjmům, omezující nadměrné pocení a potlačující působení některých jedů [60]. Hořčiny jsou látky hořké chuti, které povzbuzují chuť k jídlu a podporují trávení. Např. v jablečníku (*Marrubium vulgare* L.) je obsažena hořčina marrubiin [60, 62].

Mezi významné organické kyseliny obsažené v rostlinách čeledi *Lamiaceae* patří kyselina rozmarýnová, oleanová, ursolová, kávová, karnosová aj. Tyto látky jsou obsažené např. v rozmarýně (*Rosmarinus officinalis* L.), tymiánu (*Thymus vulgaris* L.), šalvěji (*Salvia officinalis* L.) a černohlávkou (*Prunella vulgaris* L.). Organické kyseliny mají širokou biologickou aktivitu (Tab. 1) [59, 63, 123, 124, 125, 126].

Tab. 1: Organické kyseliny a jejich účinky

Látka	Vzorec[82]	Účinky
Kyselina rozmarýnová		antioxidační, protizánětlivé, antimutagenní, antibakteriální, protivirové a adstringentní. [63,125]
Kyselina oleanová		antioxidační, protizánětlivé, protinádorové, hepatoprotektivní, antihyperlipidemický, antiulcerózní, diuretický, kardiotonický, hypotenzivní, vazodilatační a anti-HIV. [126]
Kyselina ursolová		stejně jako oleanová[126]
Kyselina karnosová		antidiabetický, antioxidační, protinádorové, antimikrobiální, antikoagulační a protizánětlivé. [59,123,124]

Lamiaceae mají také významné účinky antioxidační. Významná v tomto směru je kyselina rozmarýnová [63, 125]. Antioxidační aktivita byla prokázána např. u máty, šalvěje, dobromysli [127]. Dále to jsou účinky protizánětlivé a protialergické. Účinnými látkami jsou převážně fenolické sloučeniny – kyselina rozmarýnová,

ursolová a oleanová. Například vodný extrakt karbince (*Lycopus lucidus* Turcz.) snižuje vyplavování histaminu z žírných buněk, a tím tlumí okamžitou alergickou reakci (1. typ) [128]. Protialergický efekt byl zaznamenán např. u rostlin *Mentha piperita* L., *Salvia miltiorrhiza* (Bunge), *Perilla frutescens* L., protizánětlivý např. u *Thymus satureioides* L., *Ocimum sanctum* L. [64, 65, 66, 129,130]. Mezi další významný účinek rostlin čeledi hluchavkovité patří účinek antimikrobiální. V tabulce (Tab. 2) je shrnuto působení vybraných druhů na různé druhy mikroorganismů.

Tab. 2: Lamiaceae a jejich inhibiční efekt na mikroorganismy [131, 132]

Rostlina	Obsahové látky	Inhibované mikroorganismy
<i>Ocimum basilicum</i> L.	linalool, methylchavikol, eugenol, methyl-cinnamát	<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. nigar</i> , <i>Enterbacter aerogenas</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Shigella flexneri</i>
<i>Origanum vulgare</i> L.	thymol, karvakrol	<i>Aspergillus</i> (toxinogenní kmeny), <i>Salmonella spp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>S.enertica</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E.coli</i>
<i>Rosmarinus officianalis</i> L.	karnosol, rosmanol, silice, borneol, bornyl-acetát	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Shigella flexneri</i>
<i>Thymus vulgaris</i> L.	thymol, karvakrol, kyselina kávová, taniny	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> . <i>Shigella sonnei</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>S.enertica</i> , <i>L. monocytogenes</i>
<i>Salvia officinalis</i> L.	thymol, eugenol	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Scutellaria albida</i> L.	linalool	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>
<i>Scutellaria barbata</i> D.Don.	apigenin	MRSA (meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>)

Rostlinná hypoglykemika, mezi něž se řadí i některé rostliny čeledi hluchavkovité, snižují hladinu glykémie: např. vodný extrakt dobromysli (*Origanum vulgare* L.), máty (*Mentha piperita* L.), meduňky (*Melissa officinalis* L.), šalvěže (*Salvia officinalis* L.) a rozmarýny (*Rosmarinus officinalis* L.) [133]. V klinickém pokusu se hypoglykemický účinek prokázal také u bazalky šedé (*Ocimum canum* Sims.) [124]. Ožanka polejová (*Teucrium polium* L.) signifikantně snižuje hladinu glukózy v krvi

pomocí stimulace sekrece inzulínu β -buňkami pankreatu, a to až o 135 % [124, 134]. U rozmarýny lékařské (*Rosmarinus officinalis* L.) bylo zjištěno hypoglykemické i hyperglykemické působení. Při pokusech na králících snížil lihový extrakt z listů rozmarýny hladinu glukózy v krvi díky zvýšenému vyplavení inzulínu, zatímco u rozmarýnové silice byl zjištěn hyperglykemický účinek způsobený snížením hladiny inzulínu v krvi [135, 136]. Další rostliny této čeledi s hypoglykemickým účinkem jsou: bazalka (*Ocimum sanctum* L.), ožanka (*Teucrium oliverianum* Ging.), zběhovce (*Ajuga iva* L.) [124, 137].

Antihypertenzní efekt způsobený inhibičním účinkem angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE) byl prokázán, při pokusech na králících, např. u vodného extraktu rozmarýny (*Rosmarinus officinalis* L.) (90,5 %), meduňky (*Melissa officinalis* L.) (81,9 %) a dobromysli (*Origanum vulgare* L.) (37,4 %) [133]. Další možností ovlivnění krevního tlaku je působení některých hluchavkovitých rostlin na stěnu cév. Extrakty rostlin způsobují blokaci Ca^{2+} kanálů v buňkách hladké svaloviny cév, a tím jejich relaxaci. Takto účinkuje například silice máty (*Mentha villosa* Huds.), silice bazalky (*Ocimum gratissimum* L.), jejíž hlavní účinnou složkou je eugenol, a diterpenová látka marrubenol izolovaná z extraktu jablečnicku (*Marrubium vulgare* L.) [67, 138, 139]. Vysoký obsah cholesterolu v krvi je rizikovým faktorem pro aterosklerózu a jiná kardiovaskulární onemocnění. Vodný extrakt zběhovce (*Ajuga iva* L.) má pozitivní vliv na faktory ovlivňující lipidemii a také snižuje absorpci cholesterolu ve střevě [140]. Olej připravený ze sušených semen bazalky (*Ocimum sanctum* L.) má antiulcerózní účinek [141]. Levandulová silice inhibuje agregaci destiček a má tak antitrombotický účinek, který je způsoben synergickým efektem sloučenin obsažených v silici. Při zkoumání antitrombotického účinku jednotlivých sloučenin byl zaznamenán pokles aktivity oproti silici (z 36 % na 5 %) [142]. Další možné využití hluchavkovitých rostlin je uvedeno v tabulce (Tab. 3) a v kapitolách 3.2.1., 3.4.1.3..

Tab.3: Indikace rostlin čeledi Lamiaceae [143]

Droga	Rostlina	Indikace
<i>Ballotae herba</i>	měrnice černá	nervinum, sedativum
<i>Basilici herba</i>	bazalka pravá	stomachikum, karminativum, spasmolytikum
<i>Betonicae herba</i>	bukvice lékařská	adstringens, antidiarrhoikum
<i>Galeopsidis herba</i>	konopice	expectorans při bronchitidách, diuretikum

<i>Hederae terrestris herba</i>	popenec břečťanovitý	adstringens, antidiarrhoikum
<i>Hyssopi herba</i>	yzop lékařský	antihydrotikum, expectorans, stomachikum, diuretikum
<i>Lavandulae flos</i>	levandule úzkolistá	nervinum, sedativum, cholagogum, zevně jako derivans
<i>Lavandulae herba</i>	levandule úzkolistá	nervinum, sedativum, zevně jako derivans
<i>Leonuri herba</i>	srdečník obecný	mírné kardiotonikum, sedativum, hypotenzivum
<i>Majoranae herba</i>	majoránka zahradní	stomachikum, karminativum, spasmolytikum, diuretikum, diaforetikum
<i>Marrubii herba</i>	jablečník obecný	antidiarrhoikum, choloretikum, expectorans
<i>Melissae folium, herba</i>	meduňka lékařská	sedativum, stomachikum, karminativum, diaforetikum, nespavost, vegetativní dystonie
<i>Menthae crispae folium, herba</i>	máta kadeřavá	stomachikum, karminativum, nemoci žlučníku
<i>Menthae piperitae folium, herba</i>	máta peprná	stomachikum, spasmolytikum, cholagogum, korigens, karminativum, kolika trávicího ústrojí a žlučových cest
<i>Origani herba</i>	dobromysl obecná	expectorans, choloretikum
<i>Rosmarini folium</i>	rozmarýna lékařská	stomachikum, cholagogum, karminativum, silice - derivans
<i>Salviae folium, herba</i>	šalvěj lékařská	omezuje sekreci potu a mléka, záněty dýchacích cest, zevně jako adstringens, antiseptikum a fungicidum
<i>Saturejae herba</i>	saturejka zahradní	adstringens, antidiarrhoikum, stomachikum, karminativum, expektorans, gastroenteritis, poruchy trávení, tlumí pocit žízně u diabetiků
<i>Serpylli herba</i>	mateřídouška obecná	stomachikum, aromatikum amarum, antitusikum
<i>Sideritis herba</i>	čistec přímý	adstringens, antidiarrhoicum, expectorans
<i>Thymi herba</i>	tymián obecný	expektorans, bronchitis, laryngitis, pertusis, stomachikum, spasmolytikum, karminativum; zevně k obkladům, koupelím, kloktání, výplachům úst, silice - derivans

3.2.1. Biologická aktivita rostlin rodu *Teucrium* L. a *Melittis* L.

Melittis melissophyllum L. je rostlina tradiční italské medicíny, dříve používaná proti nespavosti, křečím a na záněty očí [10]. Dnes je znám její antioxidační efekt [79].

Také *Teucrium flavum* L. je rostlina tradiční italské medicíny. Květy byly používány jako antipyretikum a antiseptikum, zatímco odvar z listů byl aplikován přímo na kůži jako cicatrizant [22]. Současné fytochemické a farmakologické studie prokázaly, že tato rostlina obsahuje norclerodane diterpenoidy (teuflin, teuflidin) [23,24] a její extrakty působí jako antiflogistikum [25], analgetikum [26], hypotensivum [27] a antioxidant [28].

V tabulce (Tab. 4) jsou uvedeny další indikace rostlin rodu *Teucrium* a *Melittis*.

Tab. 4: Biologická aktivita rostlin rodu *Teucrium* L. a *Melittis* L.

Název rostliny	Biologická aktivita
<i>Teucrium arduini</i> L.	antimikrobiální [68, 69, 77] antioxidační [68]
<i>Teucrium flavum</i> L.	kardiovaskulární (snížení tlaku a tepové frekvence [27], působení na CNS, analgetikum [70])
<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	hepatotoxicita [71]
<i>Teucrium oliverianum</i> Ging.	hypoglykemický účinek [124]
<i>Teucrium persicum</i> Boiss.	protizánětlivý a antioxidační efekt při kolitidě [72]
<i>Teucrium pilosum</i> Aschers. & Schweinf.	antioxidační, antimikrobiální [73]
<i>Teucrium polium</i> L.	podpůrný efekt na cytotoxickou a apoptotickou aktivitu protinádorových léků (vinkristin, vinblastin, doxorubicin) [74], hepatoprotektivum [75], antimikrobiální [76], hypoglykemický [124, 134]
<i>Teucrium stocksianum</i> Boiss.	spasmolytikum [72]
<i>Teucrium viscidum</i> Blume	hepatotoxicita [78]
<i>Melittis melissophyllum</i> L.	antioxidační [79]

3.3. Český lékopis

Některé druhy hluchavkovitých rostlin, resp. jejich drogy, jsou oficiálními surovinami používanými ve farmaceutickém průmyslu. V platném Českém lékopise lze nalézt drogy rostlin z čeledi *Lamiaceae* jak v monografii Evropského lékopisu, tak i v národní části lékopisu. Lékopisné rostlinné drogy se získávají pěstováním nebo sběrem planě rostoucích rostlin. Kvalitu drogy lze ovlivnit vhodným výběrem rostliny, ze které se má droga vyrobit a správným způsobem manipulace s drogou. Drogy pro farmaceutické použití se suší v sušárně při teplotě 40 – 50 °C po dobu 2h a uchovávají se ve zcela naplněných vzduchotěsných obalech, chráněny před světlem, teplem a vlhkostí. Silice (v anglické literatuře – esenciální olej) se z čerstvých rostlin získávají destilací s vodní parou. O izolaci a analýze silic je podrobněji pojednáno v dalších kapitolách této práce.

V tabulce (Tab. 5) je uveden seznam lékopisných drog. [80]

Tab. 5 : Oficiální drogy Českého lékopisu 2009 [80]

Lékopisná droga	Mateční rostlina
<i>Ballotae nigrae herba</i>	<i>Ballota nigra</i> L.
<i>Lavandulae flos</i>	<i>Lavandula angustifolia</i> P. Mill. (<i>L. officinalis</i> Chaix.)
<i>Leonuri herba</i>	<i>Leonurus cardiaca</i> L.
<i>Marrubii herba</i>	<i>Marrubium vulgare</i> L.
<i>Melissae folium</i>	<i>Melissa officinalis</i> L.
<i>Melissae herba</i>	<i>Melissa officinalis</i> L.
<i>Menthae arvensis etheroleum partim mentholi depletum</i>	<i>Mentha canadensis</i> L.
<i>Menthae piperitae etheroleum</i>	<i>Mentha x piperita</i> L.
<i>Menthae piperitae folium</i>	<i>Mentha x piperita</i> L.
<i>Menthae piperitae herba</i>	<i>Mentha x piperita</i> L.
<i>Origani herba</i>	<i>Origanum onites</i> L., <i>O. vulgare</i> L. subsp. <i>hirtum</i> (LINK) IETSW. nebo jejich směs
<i>Orthosiphonis folium</i>	<i>Orthosiphon stamineus</i> Benth. (<i>Orthosiphon aristatus</i> Miq., <i>Orthosiphon spicatus</i> Bak.)
<i>Rosmarini etheroleum</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
<i>Rosmarini folium</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
<i>Salviae herba</i>	<i>Salvia officinalis</i> L. sensu lato

<i>Salviae officinalis folium</i>	<i>Salvia officinalis</i> L.
<i>Salviae sclareae etheroleum</i>	<i>Salvia sclarea</i> L.
<i>Salviae tinctura</i>	z listů <i>Salvia officinalis</i> L.
<i>Salviae trilobae folium</i>	<i>Salvia fruticosa</i> MILL. (<i>S. triloba</i> L. fil)
<i>Serpylli herba</i>	<i>Thymus serpyllum</i> L. sensu lato
<i>Thymi etheroleum</i>	<i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Thymus zygis</i> Loefl. ex L. nebo jejich směs
<i>Thymi herba</i>	<i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Thymus zygis</i> L. nebo jejich směs
<i>Thymi extractum fluidum</i>	lihovodný výtažek z tymiánové natě
<i>Unguentum acidi salicylici 1% cum etheroleo lavandulae</i>	hydrofóbní mast s kyselinou salicylovou 1% a levandulovou silicí

3.4. Těkavé látky přírodního původu

Těkavé látky hrají v živých systémech významnou roli. Jedná se o chemicky zprostředkovanou komunikaci, interakce mezi organismy. Veškeré organismy vypouštějí chemické signály a reagují na ty ostatních. Chemické signály slouží pro rychlé, jednoduché a jednoznačné předání informací nezbytných pro život.

V živočišné říši slouží k vyhledávání kořisti, identifikaci možného predátora, umožňují mezidruhovou i druhovou komunikaci (poplach, obrana, útok) a mají významnou úlohu při vyhledávání partnera. Tyto chemické látky lze rozdělit podle typu interakcí. Komunikaci mezi jedinci stejného druhu zprostředkovávají látky, semiochemikálie, nazývané feromony. Ty lze rozdělit na základě biologické funkce na několik typů. Jednak to jsou feromony sexuální, dále agregační, stopovací, poplašné, značkovací, identifikační, dispersní. Pro komunikaci mezi různými druhy slouží látky allelochemikálie. Ty jsou děleny na základě toho, je-li je signál výhodný pro příjemce (kairomony), producenta (allomony) či pro oba (synomony). [81]

Mezi významné těkavé látky patří např. monoterpeny. Jsou to přírodní produkty charakteristické vůně, uplatňující se v regulaci růstu, reprodukčním cyklu, obranných mechanismech a přenosu signálů různých organismů. Přestože se vyskytují ve všech organismech, syntetizovat je dokáží pouze rostliny, bakterie, některé druhy hmyzu a také mořský fytoplankton. [121]

O rostlinných těkavých látkách, silicích je pojednáno v následující kapitole, kde je také uvedena jejich úloha v přírodě, včetně tzv. tritrofických interakcí (rostlina-hmyz-hmyz, rostlina-hmyz-rostlina, rostlina-hmyz-pathogen). [81, 121]

3.4.1. Těkavé látky rostlinného původu, silice

Silice jsou definovány jako těkavé, intenzivně vonící směsi látek olejovité konsistence, lipofilní, ve vodě těžko rozpustné. Většinou jsou bezbarvé, zvláště v čerstvém stavu. Delším uchováváním snadno oxidují, pryskyřičnatí a tmavnou. Za obvyčejné teploty jsou zpravidla tekuté. Silice jsou směsí velkého počtu chemických sloučenin, s obsahem převážně terpenů a fenylpropanů.

Výskyt silic je typický v čeledi *Pinaceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Zingiberaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Piperaceae*, *Asteraceae*. Jsou však rozdíly v ukládání těchto látek. *Lamiaceae* tvoří žlaznaté trichomy, *Apiaceae* siličné kanálky, *Piperaceae* siličné buňky. Silice se tvoří v protoplasmě nebo rozpadem buněčných blan nebo hydrolysou určitých glykosidů. Mohou prostupovat všechna pletiva, nebo se koncentrují v určitých orgánech, např. v plodech mrkvovitých, v oplodí nebo květech citroníku, v žlaznatých trichomech listů máty. [60]

Klíčový význam těkavých látek v přírodě je v oblasti chemické ekologie. Důležité jsou např. monoterpeny (viz výše), patřící k látkám, jenž jsou významné především tím, že zprostředkovávají interakce mezi rostlinou a prostředím, zajišťují komunikaci mezi rostlinami, chrání rostlinu před vysycháním, napadením škůdci či lákají opylující hmyz.

Rostlina se brání proti pozeru buď mechanicky, pomocí ostnů a trnů, nebo produkcí toxických či odpuzujících látek, např. polyfenolů, alkaloidů a také monoterpenů – obranných látek. Jsou-li rostliny přesto napadeny, procházejí sérií metabolických změn, jejichž výsledkem je vyšší produkce obranných látek nebo změna jejich složení. Zajímavé také je, že rostlina dokáže rozlišit mezi napadením škůdcem a mechanickým poškozením. Produkce monoterpenů je totiž dána vzájemnou interakcí rostliny, hmyzu a mikroorganismů. Škůdce požírající rostlinu ovlivňuje její metabolismus, a to pomocí chemických látek, enzymů nebo bakterií přítomných v jeho sekretech. Poté rostlinou vylučované látky jsou pak hlavním signálem pro predátory hmyzích larev, např. parazitické vosy.

Další úlohou monoterpenů je, že slouží jako atraktanty. Smyslem produkce květní vůně je přilákání opylovačů a tím zajištění přenosu genetického materiálu za účelem opylení a tím zachování druhu. V květní vůni se vyskytují látky, které jsou někdy zároveň složkami feromonů opylujícího hmyzu. Příkladem je linalool, sexuální a agregační feromon samotářských včel. Hmyz bývá při procesu opylení odměněn nektarem. Výjimkou však jsou zemní orchideje. Jejich květy napodobují vzhled i vůni včelí samičky, ale přilákaný sameček není odměněn (rostlina neprodukuje nektar). Tato šálivá opylovací strategie je pro orchideje typická.

Rostliny dokáží vnímat změny v okolí a informovat o nich sousední rostliny pomocí chemických signálů. Mediátory této komunikace jsou ethylen, methyljasmonát a některé monoterpeny (beta-ocimen). Jejich prostřednictvím komunikují

zejména rostliny napadené škůdci s okolními zdravými rostlinami. Chemické komunikace využívají rostliny i k ovlivnění růstu rostlin jiného druhu tak, aby si navzájem nekonkurovaly v příjmu vody a živin. Parazitické rostliny zase využívají chemické komunikace k nalezení hostitele.

Monoterpeny mají zásadní význam také pro živočichy. Řada rostlin je napadána hmyzem, jehož různá vývojová stádia se na nich živí. Hmyz nalezne hostitele čichem a rostlinné monoterpeny v řadě případů transformuje na feromony. Dále monoterpeny emitované stromy na obranu mohou být zároveň prekurzory hmyzích agregačních feromonů (např alfa-pinen u lýkožrouta).

Mohou také sloužit jako obranné látky hmyzu. [121]

Těkavé látky, silice mají význam i pro vyšší organismy. Lidmi jsou využívány v potravinářství, kosmetice, ale také jako insekticidy, herbicidy a ve farmacii jako tzv. bioaktivní látky.

3.4.1.1. Chemická charakteristika

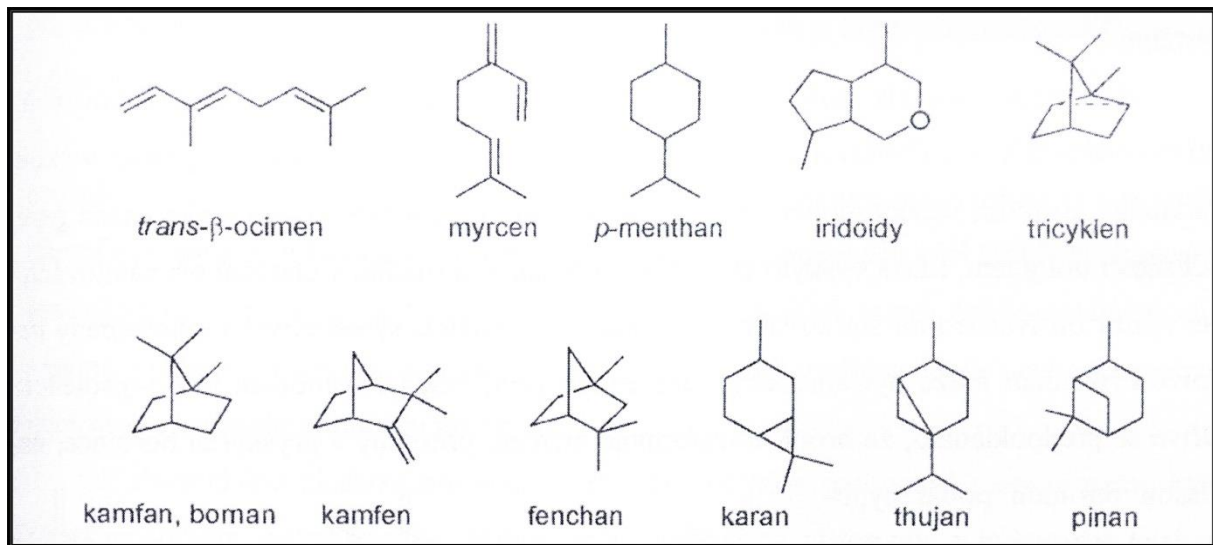
Silice se skládají z velkého počtu chemických sloučenin. Jsou zastoupeny látky všech biogenetických skupin (acetogeniny, terpeny, fenylypropany, látky se sírou, dusíkem v molekule), a to zvláště látky s nižší molekulovou hmotností, s menším počtem kyslíkatých funkcí, bez glykosidní vazby na cukry. Tyto vlastnosti mají hlavně monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny a fenylypropany. V silicích jsou zastoupeny prakticky všechny typy organických sloučenin – uhlovodíky, alkoholy, ketony, aldehydy, kyseliny, estery, ethery aj.[60]

Terpeny vyskytující se v silicích lze rozdělit do těchto základních typů [60, 61, 82, 83]:

Monoterpeny (obecný vzorec $C_{10}H_{16}$)

Monoterpeny se vyskytují jednak ve formě acyklické (deriváty 2,6-dimethyloktanu), jednak cyklické. U cyklických forem se jedná o látky obsahující řadu základních skeletů (cyklopentan, cyklohexan, cykloheptan). Monoterpeny mohou být mono-, bi-, tricyklické a také substituovány kyslíkatými funkcemi a vytvářet enantiomerní formy. Jsou to látky velmi těkavé, tv cca 140 – 180°C.

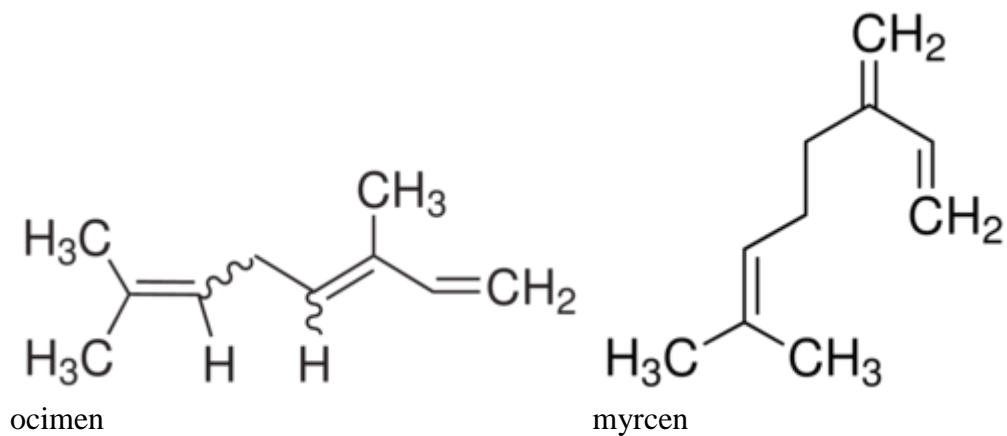
Obr. 1: Základní typy (skelety) monoterpenů [154]



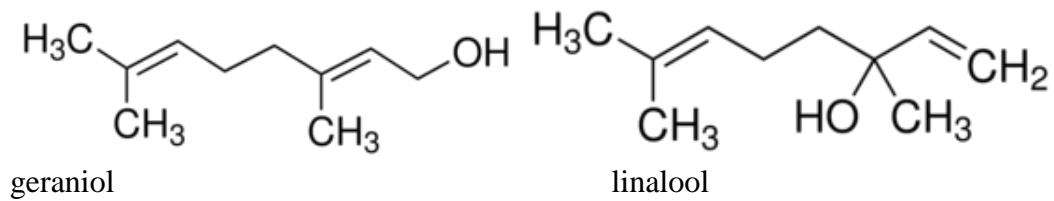
Vzhledem ke struktuře a možnosti vzniku různých kyslíkatých derivátů lze monoterpeny rozdělit takto [60, 82]:

1. acyklické, s otevřeným řetězcem

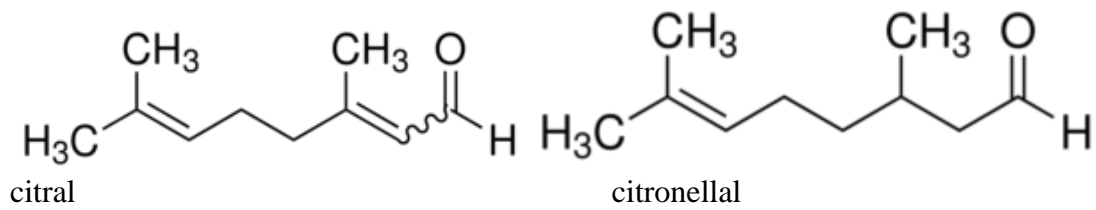
a) uhlovodíky (např. ocimen, myrcen)



b) alkoholy (např. geraniol, linalool)

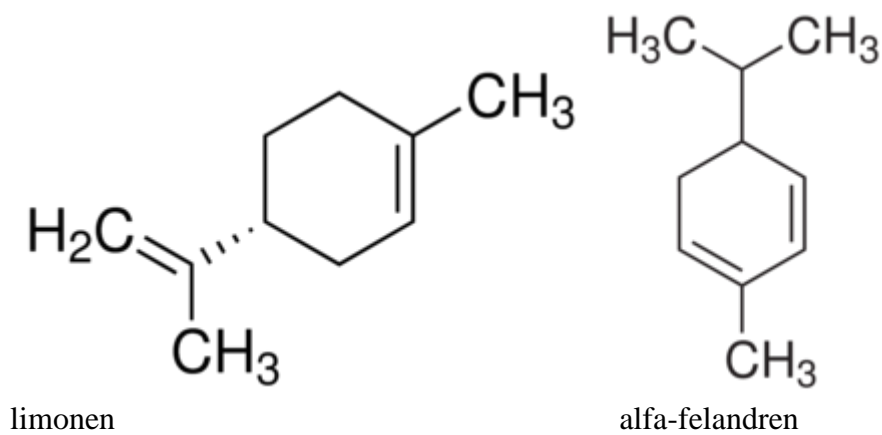


c) aldehydy (např. trans-, cis-citral, citronellal)

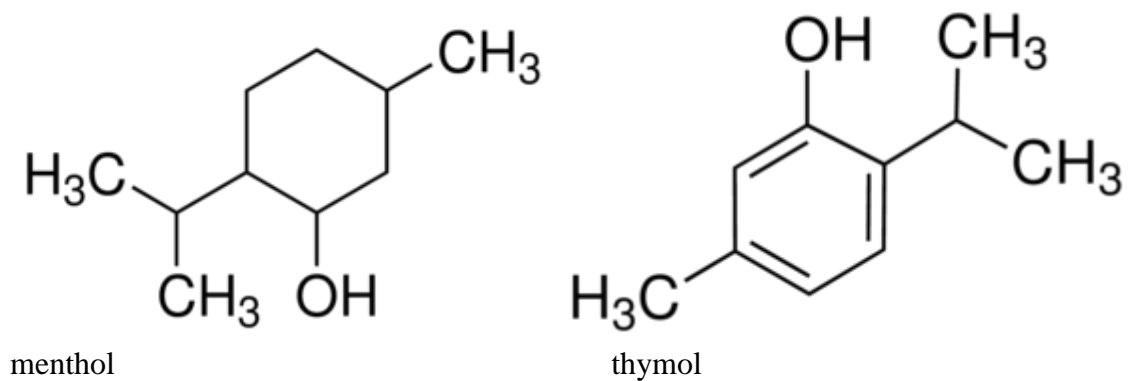


2. monocyklické

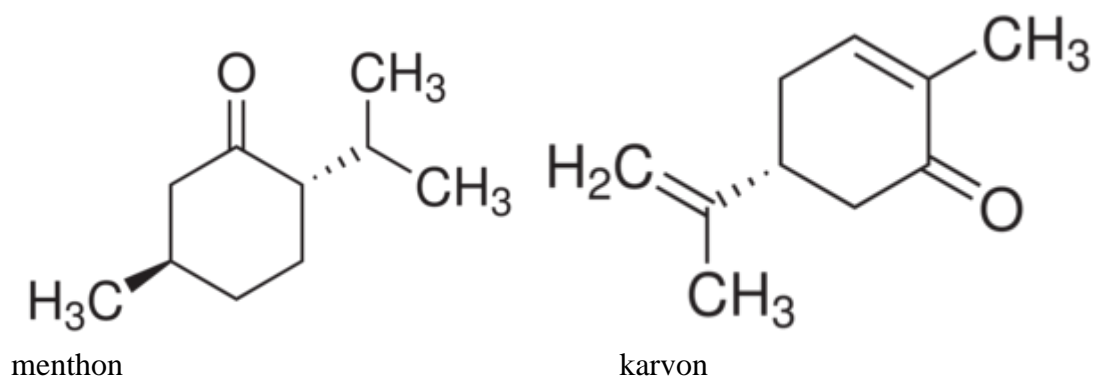
a) uhlovodíky (např. limonem, alfa-, beta-felandren)



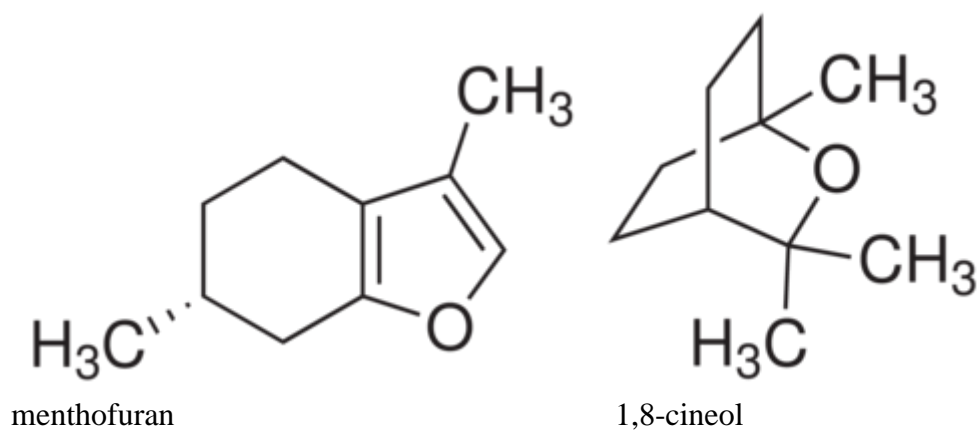
b) alkoholy a fenoly (např. menthol, thymol)



c) ketony (např. menthon, karvon)

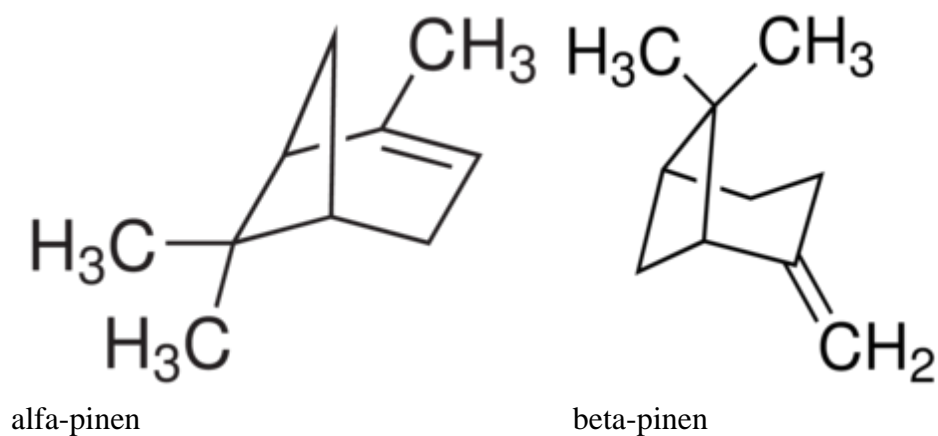


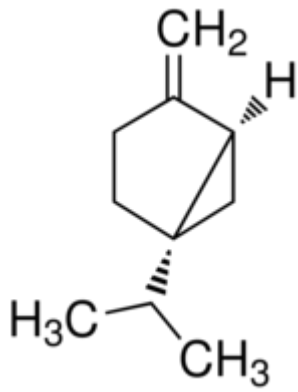
d) oxidy a peroxidy (např. menthofuran, 1,8-cineol)



3. bicyklické

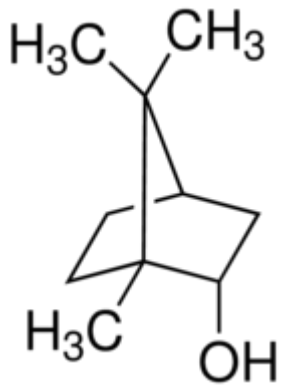
a) uhlovodíky (např. alfa-, beta-pinen, sabinen)



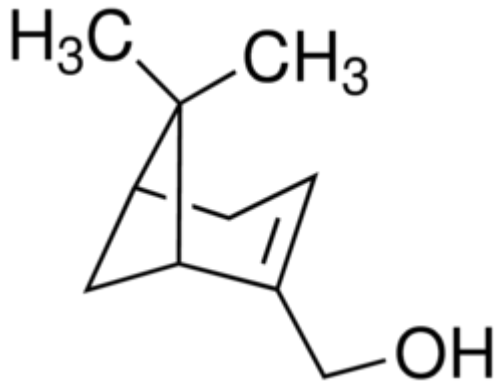


sabinen

b) alkoholy (např. thujol, myrtenol, borneol, sabinol)

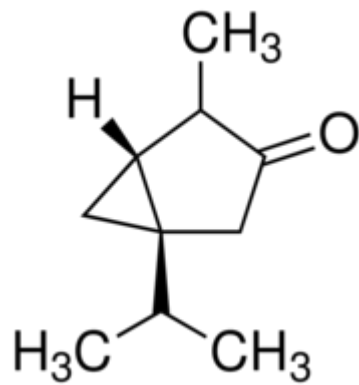


borneol

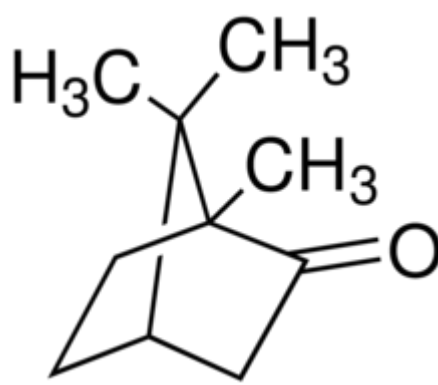


myrtenol

c) ketony (např. thujon, kafr)



thujon

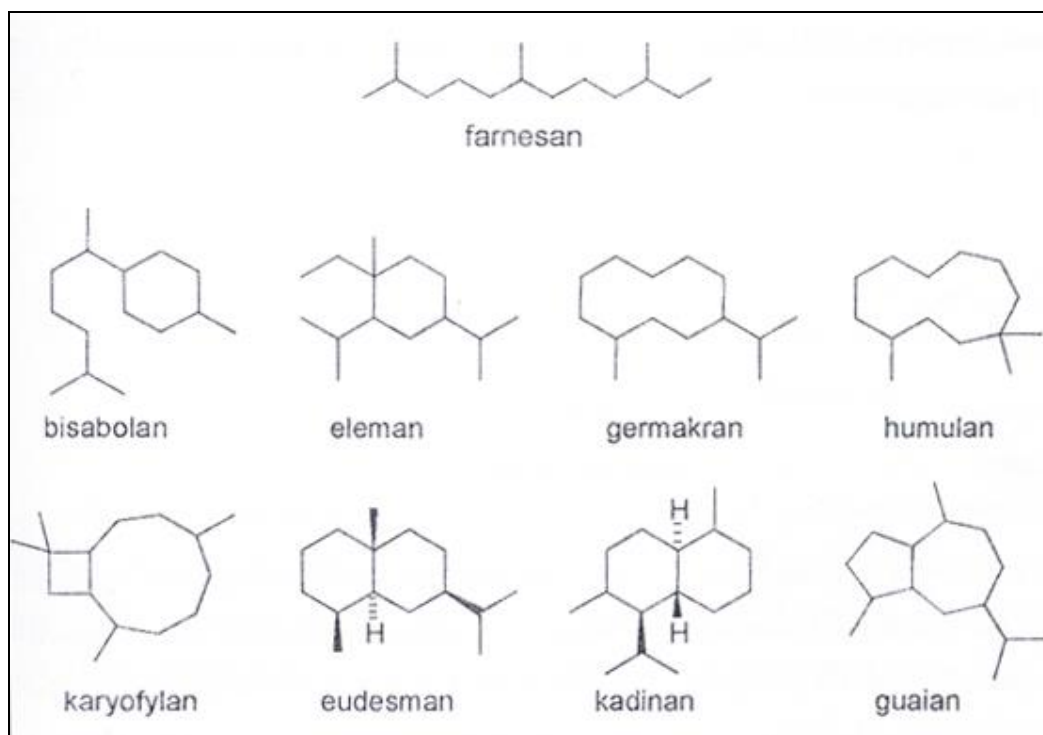


kafr

Seskviterpeny (obecný vzorec $C_{15}H_{24}$)

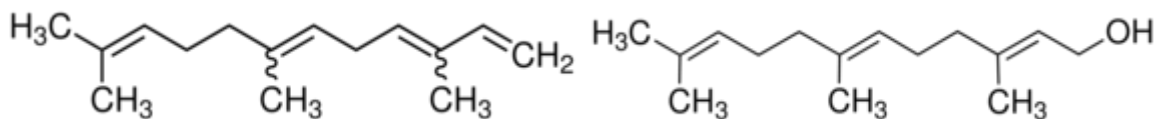
Seskviterpeny tvoří nejpočetnější skupinu terpenů, $tv > 200^\circ C$. Mají až tetracyklickou strukturu. Jsou významnou součástí silic a tvoří např. hořčiny čeledi Asteraceae. Mezi seskviterpeny patří také kyselina abscisová (fytormon), různé fytoalexiny, fytotoxiny, jувabion (hmyzí juvenilní hormon). [61]

Obr. 2: Některé typy (skelety) seskviterpenů [154]



Seskviterpeny také nabízí různé strukturální možnosti a tvorbu kyslíkatých derivátů [60, 82]:

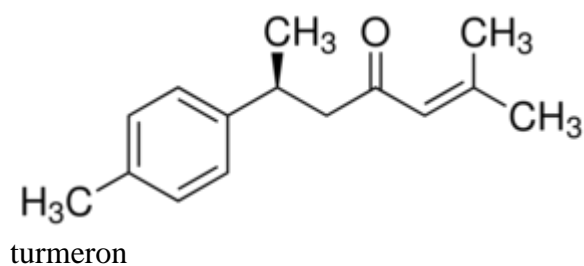
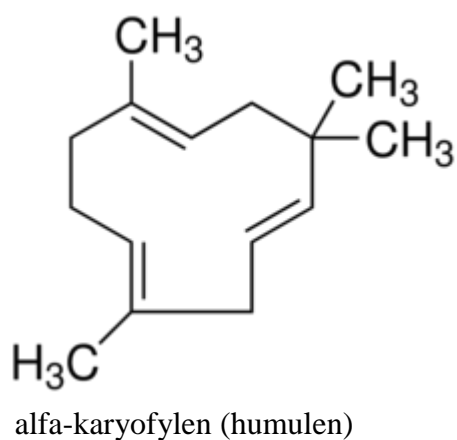
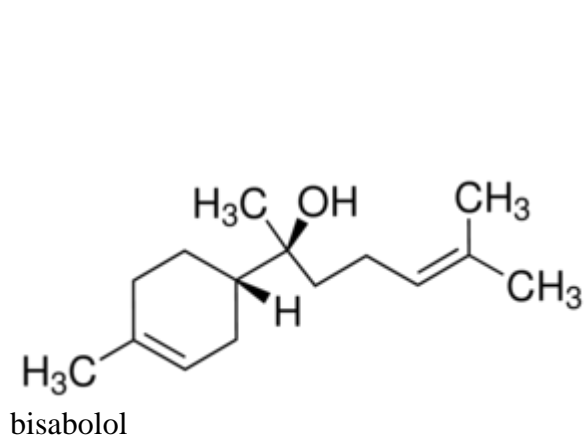
1. acyklické (např. farnesen, farnesol)



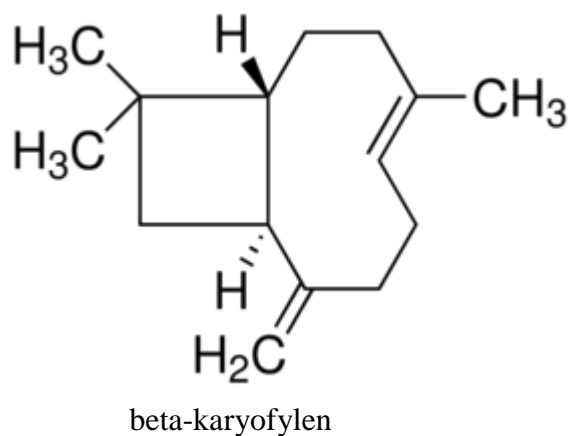
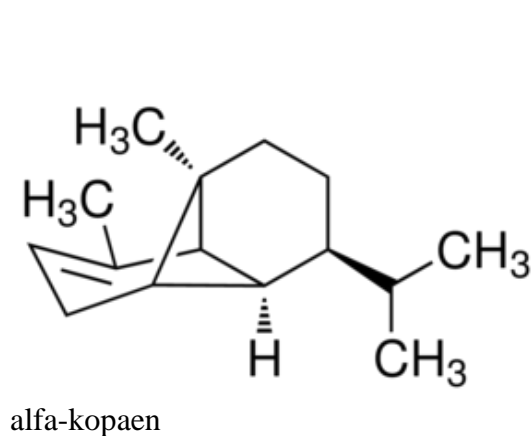
farnesen

farnesol

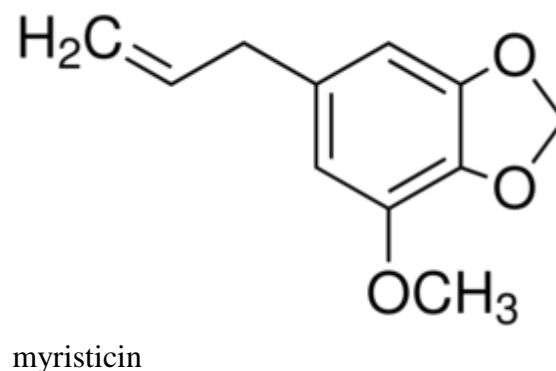
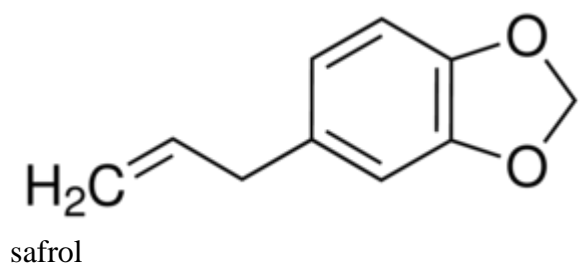
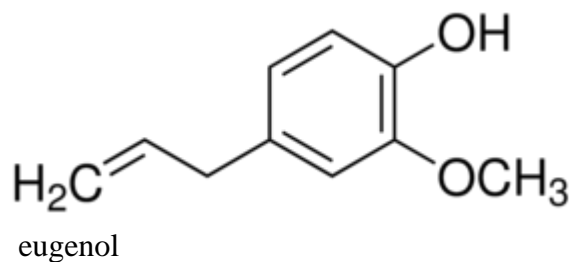
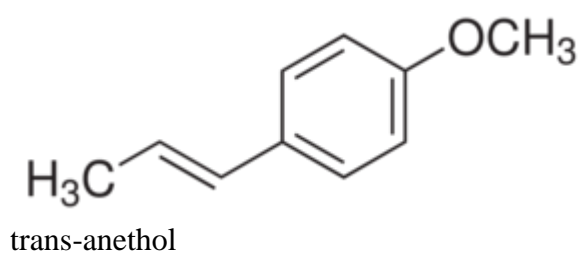
2. monocyklické (např. beta-bisabolen, alfa-zingiberen, bisabolol, alfa-karyofylen, turmeron)



3. bi- a tricyklické (např. alfa-kadinen, kopaen, beta-karyofylen)



Jednou z hlavních složek silic jsou taktéž deriváty fenylnpropanu (např. skořicový aldehyd, anethol, foenikulin, eugenol, safrol, myristicin, apiol) [60, 82].



Občasný je také výskyt diterpenů (např. fytol). Dominantní podíl mají však spíše v pryskyřici (např. diterpenické kyseliny v pryskyřici jehličnanů).

Mohou být acyklické, mono- až tetracyklické a také tvořit makrocyclické struktury. Mezi diterpeny patří regulátory rostlinného růstu (gibbereliny) či vitamin A (retinol). [61]

Stárnutím mění silice své vlastnosti, tmavnou, pryskyřičnatí, mění vůni. Dochází k autooxidaci, polymerizaci, hydrolýze esterů. Chemické změny podporují vlhkost, teplo, vzdušný kyslík, světlo. Nejrychleji se mění silice s vysokým obsahem terpenických uhlovodíků (citrusové silice), zatímco silice obsahující jako hlavní složku alkoholy jsou relativně stálé (ol.geranii).[60]

3.4.1.2. Biosyntéza

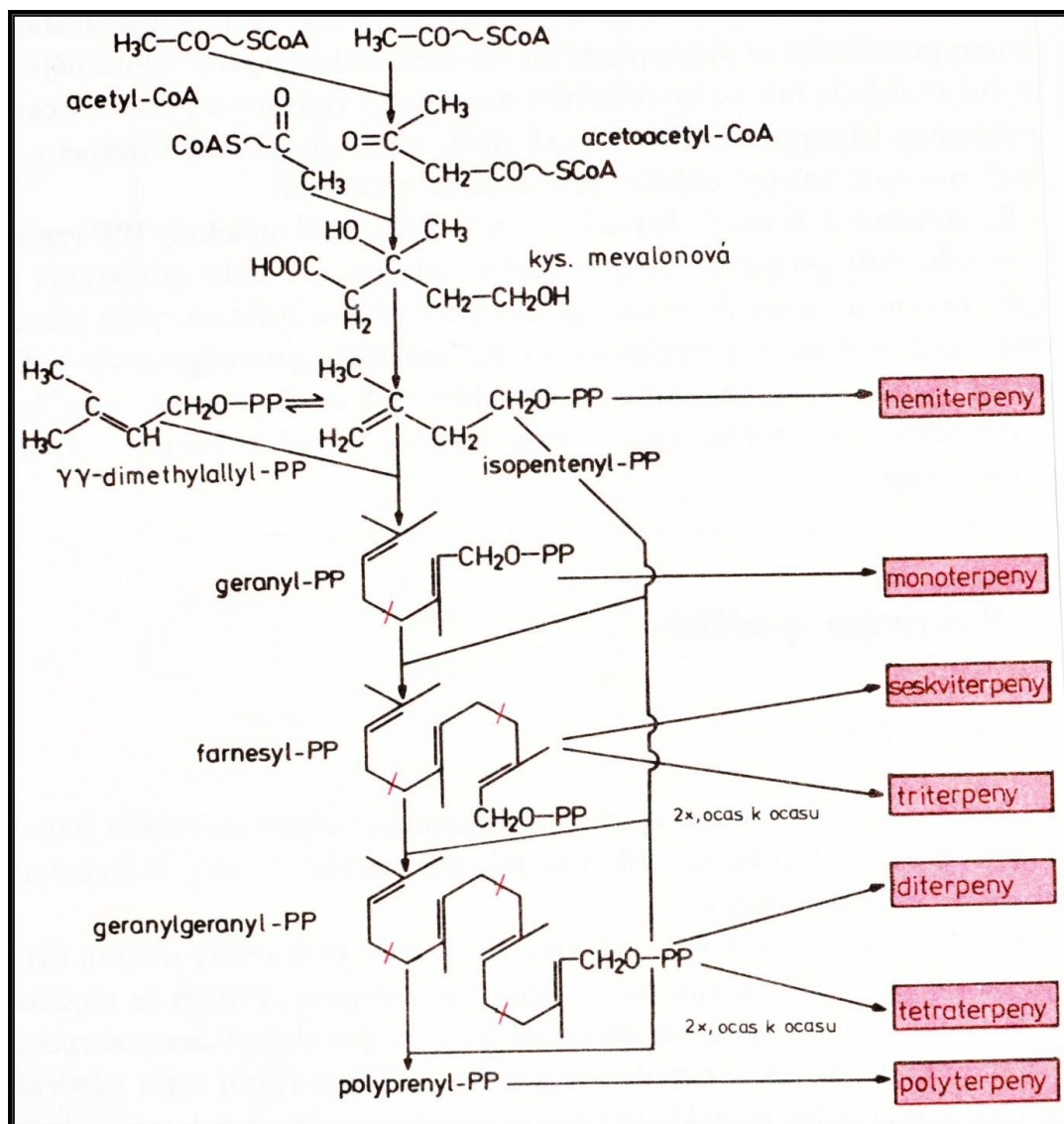
Vonné látky (silice) patří mezi produkty sekundárního metabolismu rostlin a jsou vytvářeny při degradaci vysokomolekulárních produktů primárního metabolismu. Hlavní obsahové látky jsou terpenoidy (isoprenoidy) a fenylpropany. [61, 83]

Biosyntéza terpenoidů

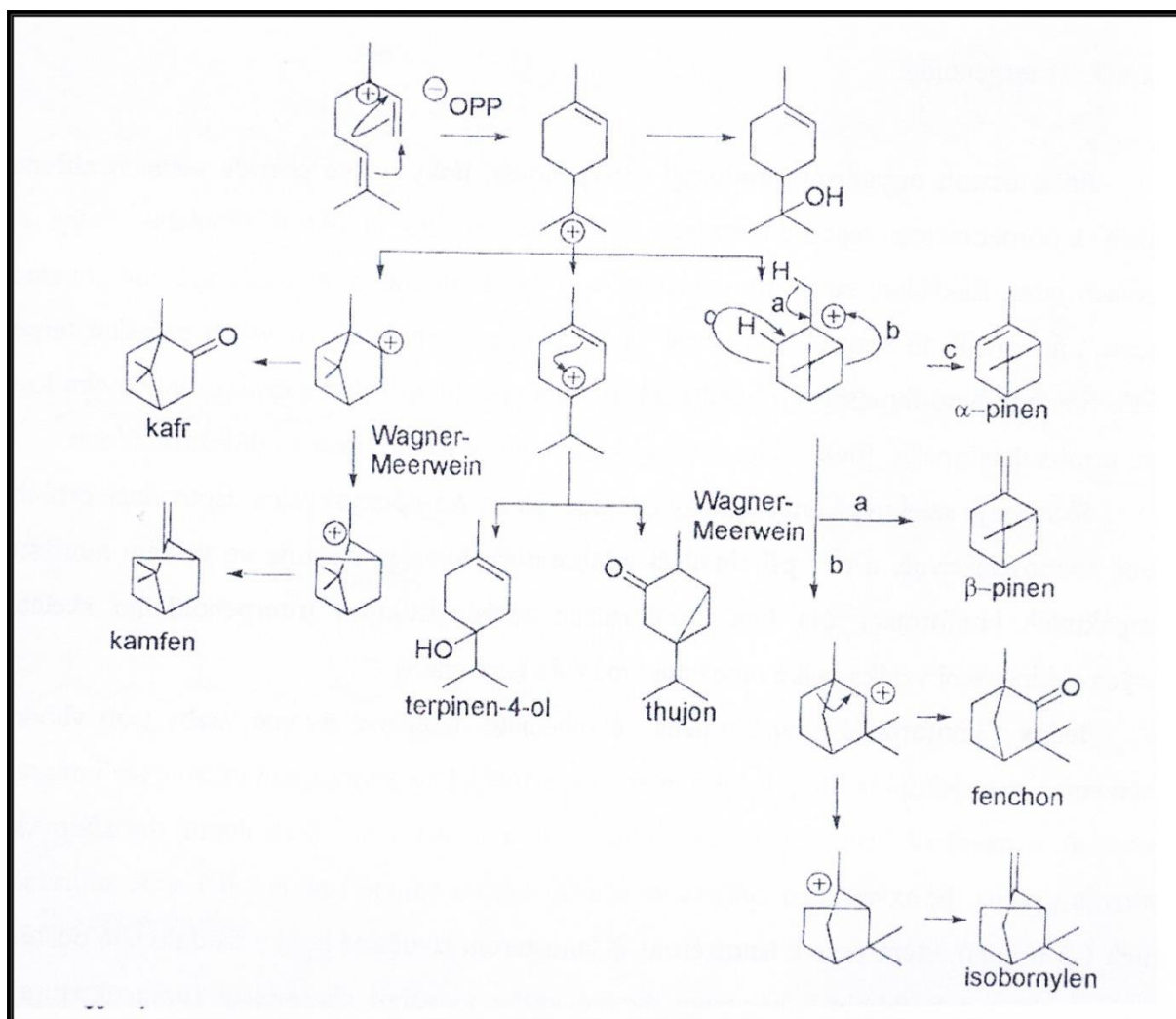
Biosyntéza isprenoidů vychází z acetyl-CoA, který se spojuje s další jednotkou acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA. Připojí se ještě třetí jednotka acetyl-CoA, vzniklý šestiuhlíkatý skelet je účinkem NADPH + H⁺ redukován na kyselinu mevalonovou za uvolnění koenzymu A. Kyselina mevalonová – růstový faktor mikroorganismů, je klíčovým meziproductem. Dekarboxylací, odštěpením vody a za spotřeby ATP

vznikne z ní aktivní isopren, isopentenylpyrofosfát (IPP). IPP je v rovnováze se svým izomerem – dimethylallylpyrofosfátem. Tato druhá sloučenina je startérem syntézy isoprenoidů, protože pouze s dimethylallylpyrofosfátem lze spojit IPP v otevřený monoterpen – geranylpyrofosfát. Odštěpí se pyrofosfát. Od geranylpyrofosfátu vede cesta k dalším otevřeným i cyklickým monoterpenům. (obr. 4) Adicí další jednotky IPP na geranylpyrofosfát vznikne seskviterpen – farnesylpyrofosfát. Adice postupuje způsobem „hlava k ocasu“: IPP nasedne svou CH₂-skupinou, svou „hlavou“, na pyrofosfátový konec – „ocas“ geranylpyrofosfátu. Vzniklý farnesylpyrofosfát se může přeměnit na další seskviterpeny. Adicí další molekuly IPP („hlava k ocasu“) vznikne z farnesylpyrofosfátu geranylgeranylpyrofosfát, diterpen. [83]

Obr. 3: Biosyntéza terpenoidů [83]



Obr. 4: Vznik monoterpenů z geranyldifosfátu [154]



Další způsob syntézy isoprenoidů je tzv. Pyruvátová (Rohmerova) cesta. Prekurzory (IPP a DMAPP) monoterpenů, diterpenů a tetraterpenů jsou touto cestou syntetizovány přes 1-deoxy-D-xyluloso-5-fosfát v plastidech buněk. IPP i DMAPP zde vznikají odděleně (DMAPP nevzniká izomerizací IPP). Rozdělení způsobu vzniku prekurzorů jednotlivých skupin terpenů ale není striktní. Bylo zjištěno, že v rostlinách může docházet k propojení obou biochemických cest, kdy prekurzory vzniklé v plastidech pyruvátovou cestou jsou poskytovány pro syntézu seskviterpenů a triterpenů v cytosolu. [121]

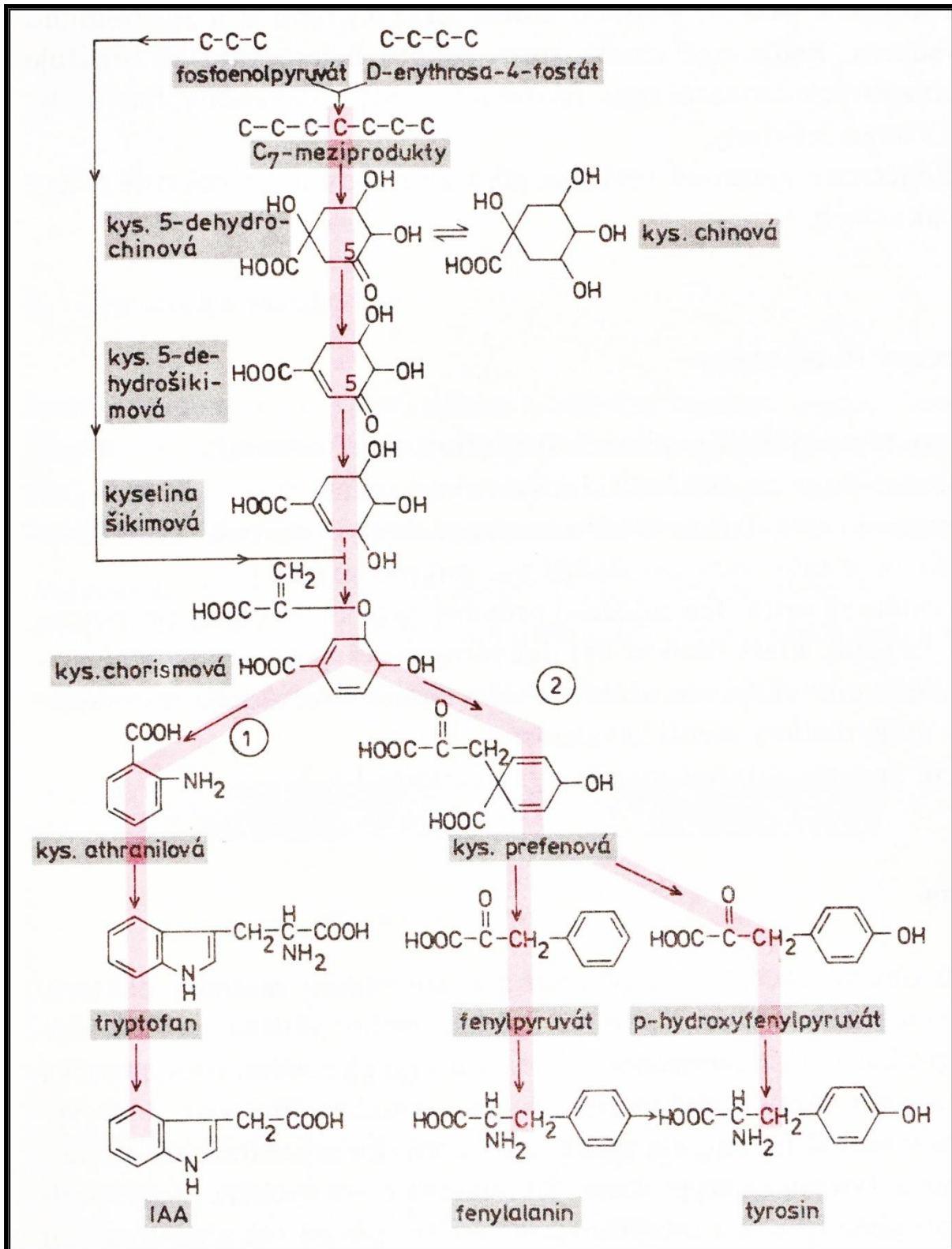
Biosyntéza fenylypropanů

Fenylypropany jsou látky C₆-C₃. Jejich biosyntéza vede k vytvoření aromatického kruhu, a to šikimátovou cestou. Výchozí látky pocházejí z metabolismu sacharidů, a to pouze v rostlinách, živočišný organismus fenylypropany nevytváří.

Primárními produkty této skupiny jsou aminokyseliny fenylylalanin a tyrosin. Sekundárním metabolismem z nich vznikají aromatické stavební jednotky tříslovin,

ligninů, flavonoidů a kumarinů. Biosyntetický mechanismus dostal svůj název podle meziprojektu – kyseliny šikimové. Jeho význam netkví jenom v tvorbě fenolů, ale především ve vzniku aromatických aminokyselin – fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Šikimátová cesta vychází z fosfoenol-pyruvátu (vzniká při glykolýze) a z D-erythrosa-4-fosfátu (původ má v pentosovém cyklu). Obě látky se slučují na meziprojekt, obsahující 7 atomů C. Jeho cyklizací vznikne kyselina 5-dehydrochinová. Kyselina 5-dehydrochinová je v rovnováze s kyselinou chinovou. Biosyntetická cesta vede přes kyselinu 5-dehydrošikimovou a šikimovou na kyselinu 5-fosfošikimovou. Na ni se napojuje další jednotka fosfoenolpyruvátu. Produkt je převeden v několika stupních na kyselinu chorismovou. Zde je křižovatka šikimátové cesty, která se dále dělí na dvě větve. Jedna větev vede přes kyselinu anthranilovou k tryptofanu. Druhá větev vede od kyseliny chorismové nejdříve ke kyselině prefenové. Tady dochází opět k větvení: cestou fenylpyruvátu se získá fenylalanin, přes hydroxyfenylpyruvát tyrosin. Fenylalanin poskytuje deaminací kyselinu skořicovou, tyrosin kyselinu p-kumarovou, derivát kyseliny skořicové. Od kyseliny skořicové se odvozují fenolické sloučeniny, tj. také fenylpropany. Vzhledem k tomu, že se v těchto reakcích odštěpuje amoniak ve formě NH_3 , klíčovou roli v syntéze fenylpropanů má enzym fenylalaninamoniaklyasa. [83]

Obr. 5: Biosyntéza fenylypropanů [83]



3.4.1.3. Biologická aktivita [60]

O úloze těkavých látek v přírodě bylo pojednáno výše. Humání využití je především ve farmaceutickém, potravinářském, zemědělském, kosmetickém průmyslu.

Ve farmacii se používají jednak siličné drogy, dále samotné silice či z nich izolované čisté látky (např. *Herba menthae* – *Oleum menthae* – menthol). V účincích se tyto často liší.

V tab. 6 jsou uvedeny některé indikace a k nim příklady siličných drog, silic či izolovaných čistých látek. [60]

Tab. 6: Indikace siličných drog sensu lato [60]

indikace	obsahová látka n. silice n. siličná droga
prostředky dráždící kůži	<i>Oleum terebinthinae</i> , <i>Oleum rosmarini</i> , kafr, thymol
antiflogistika	<i>Oleum chamomillae</i> , alfa-bisabolol, beta-farnesen, chamazulen
expektorancia	<i>Oleum eucalypti</i> , <i>Herba thymi</i> , <i>Fructus a Oleum anisi</i>
stomachika	<i>Rhizoma calami</i> , <i>Rhizoma zingiberis</i>
karminativa	<i>Flos chamomillae</i> , <i>Folium menthae</i> , <i>Fructus foeniculi</i>
diuretika	<i>Fructus juniperi</i> , <i>Radix levistici</i> , <i>Fructus petroselini</i>
emmenagoga a abortiva	<i>Semen myristicae</i> , <i>Folium lauri</i>
antiseptika, desinficiencia, antiparasitika	karvakrol, eugenol, <i>Folium bucco</i> , <i>Oleum chenopodii</i> , askaridol
insekticida	terpeny rodu <i>Chrysanthemum</i> , <i>Oleum cassiae</i>

Velké množství monoterpenů vykazuje protinádorovou aktivitu. Monoterpeny vzniku rakoviny buď předcházejí, nebo rozvoj rakoviny inhibují. Mezi takové monoterpeny patří limonen, perillyl alkohol (inhibice vývoje rakoviny prsu, jater, slinivky), karvon (prevence nádorového bujení plic a žaludku), geraniol (inhibice rozvoje leukemie, rakoviny tlustého střeva a jater), karveol, mentol a sobrerol (inhibice nádorového bujení prsu, prostaty a jater). Některé působí proti srdečním chorobám, předcházejí osteoporóze a vykazují protiplísňové a antibakteriální účinky. [121]

Rostliny s obsahem siličných drog nemají pochopitelně pouze pozitivní farmakologické účinky, ale také toxické. Monoterpeny alfa-thujon a beta-thujon jsou dominantní složkou např. pelyňkové šalvějové, thujové silice. Oba thujony vykazují chronickou neurotoxicitu, mají rovněž i abortivní účinek. Toxické účinky vykazují také (+)-pulgeon, tj. (R)-(+)-p-menth-4(8)-en-3-on, nacházející se v silicích různých druhů máty. Rostliny se vesměs používají jako karminativum a spasmolytikum. Pulgeon vykazuje neurotoxicitu a poměrně značnou hepatotoxicitu vedoucí k nekróze jaterních buněk. Hořký seskviterpen santonin se vyskytuje zejména v kvetoucí nati pelyňku a v příslušných silicích. Dříve se tyto drogy používaly jako anthelmintikum. Santonin vyvolává chromatopsiasu (iluzi barevného vidění, purpurové vize). Karcinogenní účinky vykazují některé deriváty fenylypropanu např. safrol, isosafrol, estragol, methyleugenol a myristicin. Myristicin, obsažený v mrkvové silici a v semenech ostatních rostlin čeledi *Apiaceae* je současně psychomimetická látka, vykazující ve větším množství halucinogenní a narkotické účinky. [149]

3.4.2. 1-okten-3-ol

1-okten-3-ol, je těkavý alkohol vyráběný převážně houbami [7]. Má charakteristickou „houbovou“ vůni a je považován za významnou C8 aroma sloučeninu hub [20]. Byl objeven Murahashim v *Tricholoma matsutake* (S. Ito & S. Imai) Singer a nejprve nazván matsutake alkohol [14]. 1-okten-3-ol je tvořen v plodnicích vyšších hub enzymatickou oxidační degradací kyseliny linolové [2]; má dva opticky aktivní isomery, přirozeně se vyskytující (-) forma má výraznější aroma než (+) forma [7]. 1-okten-3-ol je produkován houbami jako odpudivá látka proti predátorům [19], ale může také působit jako houbový hormon, zvýšení jeho hladiny u hmyzu rekrutuje šíření spórů [6]. 1-okten-3-ol, je široce používán jako aromatická přísada do jídla [45], zahrnut také v potravinářské databázi přísad - Food and Drug Administration (FDA) [17], v FAO a WHO Kodex Alimentarius (www.codexalimentarius.net/download/standards/9/CXA_006e.pdf) jako aromatická látka potravinářského průmyslu. 1-okten-3-ol byl nalezen také v rostlinách, zejména v čeledi *Lamiaceae*, kde je součástí silice a hraje tak důležitou roli v jejich aromatickém profilu [16]. Zejména bylo zjištěno významné množství (> 10%) této látky u některých druhů: 12,4-20,7% v *Prasium majus* L. [4], 19,7% v *Stachys recta* L. [5], a 12,62% v *Sideritis romana* L. subsp. *romana* [11].

3.5. Metody izolace, extrakce a zakoncentrování těkavých látek z rostlin

Výběr metody získání přírodních těkavých látek závisí na samotném produktu a jeho dalším využití, ať už se jedná o potravinářství, kosmetiku, farmacii či např. chemickou ekologii. Většina izolačních technik využívá některou formu extrakce nebo

destilace, popřípadě kombinaci obou. Tyto metody jsou především založeny na rozdílné rozpustnosti látek v různých rozpouštědlech a na rozdílech v tlacích par. Nejstarší způsob získávání silic je extrakce tuky. Tuk nasycený silicí se pak extrahuje alkoholem. Pro farmaceutické účely se silice většinou získávají destilací. Destilace z vody se používá pro materiál, v němž vroucí voda nezpůsobuje nežádoucí změny.

V jiném případě je proto třeba použít destilaci přeháněním vodní parou. Tyto typy destilace jsou velmi důležitou metodou pro izolaci a zakoncentrování těkavých látek z matrice a získání silic. Je však nutné, aby byl zvolen vhodný startovací materiál, a požadované aromatické sloučeniny musí být stabilní při podmínkách destilace. Nevýhodou ovšem je, že silice často podléhají chemické modifikaci, jsou náchylné na fyzikální změny (např. světlo, teplo). Destilací získané silice se liší svým pachem od silic získaných extrakcí, vyšší teplota způsobuje změny ve složkách silic, hydrolysu esterů apod. Často je vhodné pro získání silice kombinace destilace a extrakce. Organické sloučeniny izolované destilací musí být separovány z vody, často pomocí extrakce rozpouštědlem (např. hexan). Silice, které nelze bez rozkladu destilovat se nejlépe získávají lisováním, zvl. jsou-li siličné buňky nebo kanálky uloženy v povrchových vrstvách drogy (např. oplodí pomeranče). [60]

Kromě již zmíněné destilace, vhodné pro získání silic, je dále pro izolaci těkavých látek z rostlin velmi důležité zvolit vhodnou techniku extrakce a zakoncentrování. Kromě extrakce rozpouštědlem (kapalnou fází), headspace technik (extrakce plynem) se v poslední době rozšiřuje využití tzv. SPME (solid phase microextraction) [103, 105]. Jedná se o sorpčně – desorpční metodu izolace a zakoncentrování analytu. Pro kvantitativní a kvalitativní hodnocení se využívá plynového chromatografu opatřeného vždy vhodným detektorem. [52]

3.5.1. Destilační metody

Veškeré kapalně látky mají tlak par stálý při dané teplotě. Když teplota vzroste tak, že tlak par látky se rovná vnějšímu tlaku, látka vře, a tato teplota je definovaná jako teplota varu látky. Látky s vyšším tlakem par se oddělují ze směsi nejdříve. Destilační techniky jsou velmi používané při získávání silic a poskytují užitečné informace při analýze rostlinných materiálů, Ovšem také tyto postupy mohou způsobit tvorbu artefaktů. To je také významnou nevýhodou této techniky. Destilace může zahrnovat prostou destilaci, destilaci za sníženého tlaku a destilaci s vodní parou. Ve všech případech musí být dostatek výchozího materiálu a požadované složky analytu musí být stabilní za podmínek destilace. [84]

3.5.1.1. Destilace za sníženého tlaku

Za sníženého tlaku se destilují většinou látky s vyšším bodem varu, které by se při destilaci za normálního tlaku rozkládaly nebo by je nebylo vůbec možné predestilovat. Extrakce rozpouštědlem ve spojení se zakoncentrováním extraktu pomocí vakuové destilace je jednou z nejstarších technik užívaných v analýze těkavých látek. [98, 99]

3.5.1.2. Destilace s vodní parou

U destilace heterogenních směsí sestávajících se ze substancí navzájem v sobě nerozpustných, jestliže jednou ze substancí je voda, se užívá termín destilace s vodní parou (SD – Steam Distillation). Používá se pro izolaci těkavých, ve vodě nerozpustných organických složek. Nachází také uplatnění při izolaci těkavých látek, pro které není vhodná přímá headspace analýza, kvůli jejich vazbě na strukturu matrice nebo kvůli vysokému rozdělovacímu koeficientu analytu mezi vzorkem a plynnou fází. Vzhledem k použití zvýšené teploty může dojít k tepelné degradaci některých komponent a tvorbě artefaktů. SD proto není vhodná pro analýzu produktů obsahujících tepelně nestabilní substance a látky citlivé na oxidaci. [84] Největší množství silic je získáváno právě destilací s vodní parou. Rostlinný materiál se zahřívá v destilační aparatuře zalitý vodou, nebo se pára do destilační baňky přivádí z odděleného zdroje. Oddestilovaná olejovitá silice se oddělí od vodné vrstvy, vysuší a dále zpracovává. [60]

3.5.1.3. Simultánní destilace-extrakce

Metoda simultánní destilace-extrakce (SDE – Simultaneous Distillatio-Extraction) je v podstatě spřažení destilace s vodní parou a kontinuální extrakce. Simultánní destilace-extrakce nebo též Likens-Nickerson extrakční metoda byla rozšířením technik užívaných při získávání silic. Tato metoda umožňuje izolaci a zakoncentrování v jednom kroku, což výrazně snižuje časovou náročnost procesu a minimalizuje objemy použitých kapalin v důsledku jejich nepřetržité recirkulace: kondenzovaná pára je oddělena od silice jednoduchým záchytem a vrácena znovu k destilátu, aby se minimalizovala ztráta ve vodě rozpustných těkavých látek. [84,85]

Konečný profil silice je ovlivňován těkavostí jednotlivých složek, rozpustností destilátu během extrakce rozpouštědlem, a také ztrátami těkavých složek během zakoncentrování. Tepelná degradace a tvorba artefaktů je redukována, protože SDE může být provedena při sníženém tlaku a teplotě, SDE pod vakuem je ovšem méně účinná. [84] Metoda SDE byla využita např. při studiu těkavých látek v ovoci. [86, 87, 100]

3.5.2. Extrakční techniky

Před vlastní analýzou je třeba analyty extrahovat z matrice a zakoncentrovat. Výběr vhodné metody přípravy vzorku pak výrazně ovlivňuje rychlost, spolehlivost a přesnost analýzy. Pro zakoncentrování těkavých látek se nejčastěji používá destilace s vodní parou (viz výše), extrakce rozpouštědlem, headspace metody (extrakce plynem) a mikroextrakce tuhou fází (SPME). [97, 103, 105, 114]

Extrakce je dělicí metoda založená na distribuci složky mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Její dělicí schopnost je podmíněna selektivní rozpustností, rozdílnými rozdělovacími koeficienty látek v rozpouštědlech. [84, 88].

3.5.2.1. Extrakce rozpouštědlem

Jeden z nejjednodušších postupů izolace těkavých látek je přímá extrakce rozpouštědlem. V analýze těkavých látek se setkáváme s extrakcí tuhá látka – kapalina a kapalina – kapalina [84]. Extrakce tuhá látka – kapalina se používá nejčastěji k izolaci jedné nebo více složek z přírodního materiálu. Extrahuje se obvykle v přístroji, ve kterém se jednoduchým způsobem realizuje opakovaná extrakce, aby výtěžek izolace byl co největší.

Nejčastěji používaným přístrojem pro extrakci tuhé látky kapalinou je Soxhletův extraktor nebo extraktor podle Twisselmana. [84, 88, 107] Extrakce kapalina – kapalina umožňuje mnoho jednoduchých, rychlých a selektivních dělení různých druhů látek v širokém rozmezí koncentrací. Těkavé látky lze většinou extrahovat přímo do vhodného rozpouštědla.

Extrakční systémy jsou velmi rozmanité. [89] Předpokladem úspěšného provedení extrakce rozpouštědlem je jeho správný výběr. Důležitými aspekty jsou polarita, teplota varu (při vyšších teplotách jsou extrahovány látky s vyššími molekulovými hmotnostmi) a viskozita. Nejběžněji užívaná rozpouštědla jsou organické sloučeniny, které mají nízkou teplotu varu (pentan, hexan, methylalkohol, ethanol, dichlormethan, chloroform, ethylacetát, ether a aceton). Základní nedostatek klasické extrakce rozpouštědlem, po které se obvykle koncentruje extrakt pomocí destilace, je nejen časová náročnost (zdlouhavá úprava vzorku vede ke ztrátě analytu), ale také nízká selektivita izolace. Významným omezením této metody je, že netěkavé složky, jako vosky a tuky, jsou extrahovány také. Po přímé extrakci je tedy ve většině případů nezbytné rozdělení netěkavých a těkavých složek. Snahy o odstranění zbytkových množství rozpouštědel z extraktu vedou k trvalým kvantitativním změnám vzorku. Rozpouštědlo může interferovat s těkavými látkami během plynové chromatografické analýzy extraktu. [84] Navzdory mnoha nedostatkům, extrakce rozpouštědlem zůstává uspokojivým řešením analýzy těkavých látek.

3.5.2.2. Superkritická fluidní extrakce

Alternativou extrakce rozpouštědlem je superkritická fluidní extrakce (SFE – Supercritical Fluid Extraction), kdy k extrakci pevného vzorku používáme nadkritickou (superkritickou) tekutinu, běžně oxid uhličitý. Je to rychlá, selektivní metoda na úpravu v podstatě veškerých suchých rostlinných materiálů obsahujících silice nebo pryskyřice. [84, 90, 91] Oxid uhličitý má kritickou teplotu 31°C a kritický tlak 7 149 kPa. Je nepolární, a proto rozpouští nepolární a málo polární sloučeniny. [90] Vysoce nepolární charakter oxidu uhličitého může být pozměněn přidavkem chemických modifikátorů (např. methylalkoholu). [84] SFE se obvykle provádí při nízkých teplotách, z čehož vyplývá, že je vhodná ke studiu tepelně labilních látek. [92] Ve srovnání s headspace technikami, je zde možné také použití při izolaci nepříliš těkavých látek nebo látek silně vázaných v matici. SFE byla použita např. ke studiu aromaticky aktivních látek v celeru [93], či těkavých látek v Angelica dahurica. [101]

3.5.2.3. Headspace techniky

Těkavé látky lze z kapalných i pevných vzorků izolovat pomocí šetrné extrakce plynem, tedy s využitím tzv. headspace techniky. Podstatou těchto metod je analýza plynné fáze, která byla v kontaktu s extrahovaným materiálem, v ideálním případě až do ustavení rovnovážné distribuce těkavých látek mezi plynnou a pevnou (kapalnou) fází, která je popsána distribuční konstantou jednotlivých složek v dané soustavě. V posledních letech je instrumentální analýza těkavých látek ovládána právě headspace technikami. Důležitou charakteristikou těchto látek je, že musí mít dostatečný tlak par k tomu, aby byly přítomné v plynné fázi v koncentraci, kterou je možné zvolenou technikou detekovat. [84, 97, 114]

3.5.2.3.1. Statická headspace

Jednoduchou a relativně levnou technikou je tzv. statická headspace(HS). V tomto uspořádání se analyzuje vzorek plynu odebraný z prostoru nad pevnou (kapalnou) fází ve statickém uzavřeném systému (např. vialka uzavřená septem). Těkavé složky se rozptýlí v plynné fázi v koncentracích, které odpovídají jejich tlaku par. Koncentrace látek v headspace závisí na několika faktorech. Jedná se o množství analyzovaného vzorku, koncentraci dané látky ve vzorku a její tlaku par (tzv. těkavosti). Dále jsou také důležité podmínky extrakce, tj. teplota, čas extrakce, velikost vialky aj. Statická headspace je užitečná pro analýzu velmi těkavých látek. Limity detekce při analýze plynovou chromatografií požadují určité množství látek v headspace, to je možné zvýšit zahrátím vzorku. Zvýšení teploty ovšem může vést k tvorbě artefaktů a dát tak nereálný obraz těkavých složek ve vzorku. Může také zkreslit kvantitativní složení

látek. Statická headspace je velmi rychlá metoda, která poskytuje také možnost automatizace celé procedury. Kromě toho získaný extrakt neobsahuje takové artefakty, jako je tomu u extrakce rozpouštědlem, destilace s vodní párou nebo simultánní destilace-extrakce. Na druhé straně, headspace techniky vykazují tendence k diskriminaci méně těkavých látek. [84, 97, 102, 114, 144]

3.5.2.3.2. Dynamická headspace

Relativně nízká citlivost statické headspace analýzy vyplývá ze skutečnosti, že rovnovážný stav je dosahovaný mezi plynnou fází a vzorkem. Tento problém je eliminován dynamickou headspace analýzou (DHS), také nazývanou „purge and trap“ technika (PT).

Pevná (kapalná) fáze se kontinuálně extrahuje proudem inertního plynu (tzv. stripování), z něhož jsou vynášeny páry těkavých látek vhodným způsobem zachycovány. V dynamické headspace neutrální plyn (dusík nebo helium) protéká kolem vzorku, v případě kapalného jím probublává. Strhává tak s sebou těkavé látky, což má za následek větší výtěžek materiálu k analýze než při statické headspace. V separační části zařízení jsou těkavé látky zachyceny z proudu plynu. Headspace vzorku je tak neustále obnovován. Často je vzorek zahříván, míchán nebo jinak rozrušován proto, aby se zvýšil transfer hmoty ze vzorku do headspace. Těkavé složky mohou být také zachyceny pomocí vhodných záchytných systémů. Těmi jsou polymery Tenax, Porapak Q, Chromosorb 101 – 105, aktivní uhlí, či kryogenní záchyt. Kryogenní záchyt je nejméně selektivní. Problémem je vznik vodného roztoku v důsledku současného záchytu vody. Proto je nutná následná extrakce rozpouštědlem, což může změnit skutečný profil těkavých látek. Problémem při záchytu na adsorbentech, kterými jsou pórovité polymery Tenax, Porapak, Chromosorb, je především jejich nízká kapacita. Také může docházet ke ztrátám analytu v důsledku zahlcení adsorbentu a dále k nevrátné adsorpci látek s dlouhým řetězcem nebo polárních sloučenin.

Tuhé adsorbenty mohou mít alternativu ve formě nepolárního kapalného sorbentu, např. silikonového polymeru, u kterého nedochází k diskriminaci ani ke vzájemnému konkurování si látek s krátkým řetězcem a sloučenin s větší molekulovou hmotností. Desorpce zachycených analytů se provádí především tepelně. Tepelná desorpce sloučenin z adsorbentu, ačkoli je vhodná a rychlá, může způsobit degradaci vzorku. Záchyt aktivním uhlím vykazuje vysokou afinitu a velkou kapacitu pro většinu těkavých složek. Pouze 1 – 10 mg uhlí je schopno zachytit těkavé látky z 10 – 100 l inertního plynu. Dynamická headspace umožňuje analýzy s minimem tvorby artefaktů vzniklých během odběru vzorků. Headspace analýzy umožňují analyzovat skutečný profil těkavých látek produkovaných rostlinami bez artefaktů vzniklých během izolace. Bez ohledu na metody zachycení a stupně desorpce analytu, dynamická

headspace analýza se vyznačuje delším extrakčním časem než ostatní techniky nepoužívající rozpouštědla. [84, 106, 144]

3.5.3. Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction – SPME)

Mikroextrakce tuhou fází (SPME –Solid Phase Microextraction) je velmi jednoduchá, levná, efektivní technika používaná k izolaci a zakoncentrování těkavých látek z matrice. Jedná se o sorpčně – desorpční techniku, která nevyžaduje složitou instrumentaci ani použití rozpouštědla.[94] SPME jednotka je tvořena křemenným vláknem pokrytým sorpční vrstvou, které je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v duté ocelové jehle, která vlákno chrání před mechanickým poškozením. [95, 96, 97]

Analýza pomocí SPME má dvě fáze. V první fázi se vlákno vsune do vzorku nebo se umístí do headspace prostoru nad vzorkem a analyty se sorbují do vrstvy pokrývající vlákno. Množství extrahovaného analytu závisí na hodnotě rozdělovacího koeficientu analyt – vlákno. Extrakce je považována za kompletní, když koncentrace analytu dosáhne distribuční rovnováhy mezi matricí vzorku a sorpční vrstvou vlákna. V praxi to znamená, že jakmile se dosáhne rovnováhy, naextrahované množství je konstantní a nezávislé na dalším růstu extrakčního času. Na rozdíl od klasických extrakčních metod není analyt extrahován ze vzorku v co nejvyšší koncentraci, ale pouze do dosažení rovnovážného stavu. Z hlediska fyzikálně-chemického je rovnovážný stav SPME techniky závislý na koncentraci analytu ve vzorku a také na typu a tloušťce polymeru, který pokrývá křemenné vlákno. Množství sorbovaného analytu závisí na distribuční konstantě a na tloušťce vrstvy polymeru. Čas extrakce je daný časem potřebným pro extrakci dostatečné koncentrace analytu s nejvyšší distribuční konstantou. Distribuční konstanta všeobecně vzrůstá s rostoucí molekulovou hmotností a bodem varu analytu.

V druhém kroku je vlákno s extrahovanými analyty přeneseno do analytického zařízení, ve kterém probíhá desorpce, separace a kvantifikace analytů.

SPME je nejčastěji používáno ve spojení s GC nebo HPLC. [94, 96, 97]

SPME má oproti tradičním presepuračním technikám několik důležitých výhod: [96, 97]

- absence rozpouštědla je v SPME důležitým rysem; separace je rychlejší a šetrnější k životnímu prostředí,
- další důležitou vlastností je malá velikost využívaného zařízení; je možné analyzovat i velmi malé objekty za použití miniaturních vláken,
- citlivost a limit stanovení je srovnatelný s technikami, které spoléhají na kapalinovou extrakci; i když je z matrice vyextrahováno jen malé množství analytu, veškerý je přemístěn do analytického zařízení – to je rozdíl oproti

kapalinové extrakci, kde se většina analytu dostane do organické fáze, ale jen malé množství je následně přeneseno do přístroje,

- významně jsou zkráceny časy potřebné pro analýzy vzorků. Kombinovány jsou totiž operace vzorkování, extrakce, zakoncentrování a dávkování do jednoho kroku. Volbou vhodného typu stacionární fáze je možné dosáhnout maximálního výtěžku a významného zlepšení sorpční selektivity.

Techniku SPME lze používat jak pro orientační analytická stanovení, tak s interním standardem pro vysoce přesné a reprodukovatelné kvantitativní analýzy.

Účinná extrakce a následná desorpce z SPME vlákna závisí na následujících faktorech [96, 97]:

- molekulová hmotnost,
- tvar molekuly,
- bod varu a tenze par analytu,
- polarita analytu a vlákna,
- funkční skupiny v molekule analytu,
- koncentrační rozsah pro stanovení analytu a typ detektoru.

SPME je možno využít k analýze všech typů vzorků (plynů, kapalin i tuhých látek). Analyty mohou být těkavé, semi-těkavé a dokonce i netěkavé organické i anorganické látky.

Kromě metody SPME použité v této práci, existuje tzv. dynamická mikroextrakce tuhou fází (**Solid Phase Dynamic Microextraction – SPDE**).

Jedná se o dynamickou extrakci kapalných nebo plynných vzorků. Princip metody SPDE je obdobný jako SPME s tím rozdílem, že sorbent je nanesen na vnitřní povrch jehly připojené k plynotěsné stříkačce. Opakovaným nabíráním plynné nebo kapalné fáze vzorku dochází k zakoncentrování stanovovaných analytů uvnitř jehly. Tento způsob extrakce umožňuje stanovit i velmi nízké koncentrace. [146]

V posledních letech se začala kromě SPME extrakce používat také **SDME -single-drop mikroextrakce**. SDME je miniaturizace tradiční extrakce kapalina-kapalina, kde je významně sníženo množství organického rozpouštědla. K extrakci analytu ze vzorku dochází sorbcí do kapky rozpouštědla vytlačeného z jehly stříkačky se zkoseným hrotem. [109]

ITEX – In-Tube Extraction

ITEX je nová technika přípravy vzorku pro GC analýzy těkavých a semitěkavých látek v plynných, kapalných a pevných maticích. U této techniky je plynná fáze pomocí head-space stříkačky prosávána a adsorbována na sorbent. Po ukončení adsorpce jsou analyty tepelně desorbovány přímo do nástřikového bloku plynového chromatografu. Pro tuto techniku se mohou používat různé náplně (sorbenty) podle typu aplikace. Tato metoda našla uplatnění např. při analýze těkavých látek v tělních tekutinách. [145]

3.5.3.1. Teoretické vztahy pro výpočet extrahovaného množství analytu

3.5.3.1.1. Absorpce

Separční proces SPME je založen na rozdělení analytu mezi maticí vzorku, která může být v plynném, kapalném nebo pevném stavu a vláknem SPME které může být opatřeno na povrchu kapalnou nebo pevnou vrstvou [111]. Přitom nedochází k extrakci veškerého analytu z matrice, ale pouze k extrakci části celkového množství analytu přítomného ve vzorku. Uplné nebo téměř úplné extrakce lze dosáhnout pouze při vytvoření speciálních podmínek, kdy je množství analytu vzorku malé a afinita k povrchu vlákna velká [113]. U absorpce dochází k sorpci analytu do vrstvy sorbentu. Pro kapalně sorbenty SPME vláken je v rovnovážném stavu celkové množství analytu sorbovaného do sorpční vrstvy přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Pro dvoufázové systémy je množství analytu absorbovaného při extrakci v kapalně vrstvě na povrchu vlákna vyjádřeno pomocí rovnice (1). [111]

Rovnice (1)

$$n = \frac{K_{fs} V_s V_f C_0}{V_s + K_{fs} V_f}$$

K_{fs} rozdělovací koeficient systému vlákno/vzorek;

V_f objem vrstvy na povrchu vlákna;

V_s objem vzorku;

C_0 počáteční koncentrace analytu ve vzorku;

n množství analytu extrahovaného absorpcí

Z této rovnice vyplývá lineární vztah mezi počáteční koncentrací analytu ve vzorku a množstvím analytu sorbovaného vláknem. Materiály používané na SPME vlákna se vybírají s ohledem na co nejvyšší hodnoty K_{fs} co způsobuje vysokou sorpční

schopnost vlákna se selektivním efektem. Hodnota K_{fs} většinou není dost vysoká na to, aby se analyt úplně extrahoval z matrice a proto je metoda SPME metodou rovnovážnou (kapacita vlákna je také nízká). Proto je pro stanovení koncentrace nutná kalibrace nebo použití vnitřního standardu. Rovnice dále ukazuje, že v případě, kdy je hodnota V_s velmi vysoká, nemá množství extrahovaného analytu souvislost s objemem vzorku. Toho se využívá pro stanovení při terénní analýze. Hodnota V_s ve jmenovateli je mnohem větší než hodnota $K_{fs}V_s$, a proto je možné celou rovnici upravit do tvaru popsaného rovnicí (2). [111,113]

Rovnice (2)

$$n = K_{fs}V_fC_0$$

3.5.3.1.2. Adsorpce

Adsorpce je proces, při kterém jsou látky vázány na povrch sorbentu chemickými nebo fyzikálními silami. Průběh adsorpce je charakterizován adsorpční rovnováhou, která určuje množství látky schopné se sorbovat na povrch a adsorpční kinetikou, která určuje rychlost tohoto děje. Adsorpční rovnováha je popsána funkční závislostí naadsorbovaného množství analytu na koncentraci. Tedy adsorpční izotermy nebo izobary. Častěji jsou používány adsorpční izotermy, především rovnice Freundlichovy a Langmuirovy izotermy [110].

Proces extrakce na pevnou vrstvu na povrchu vlákna je možné popsat na základě Langmuirovy teorie adsorpce a je vyjádřen následující rovnicí (3). [111]

Rovnice (3)

$$n = C_{fA}^{\infty}V_f = \frac{K_A V_s V_f C_{0A} (C_{fmax} - C_{fA}^{\infty})}{V_s + K_A V_f (C_{fmax} - C_{fA}^{\infty})}$$

C_{fA}^{∞} koncentrace analytu A na vlákně v rovnovážném stavu;

K_A adsorbční rovnovážná konstanta pro analyt A;

C_{fmax} maximální dosažitelná koncentrace analytu na vrstvě;

V_f objem vrstvy na povrchu vlákna;

V_s objem vzorku;
 n množství analytu extrahováno adsorpcí

Je-li C_{fmax} mnohem větší než C_{fA}^* , anebo je-li afinita analytu k adsorpční vrstvě velmi malá, pozorujeme lineární závislost mezi počáteční koncentrací a extrahovaným množstvím. Pokud ovšem množství analytu na adsorpční vrstvě není zanedbatelné ve srovnání s celkovým povrchem adsorpční vrstvy, lineární závislost nebude pozorována. [111]

3.5.3.1.3. TWA (Time Weight Average) metoda měření koncentrace analytu v prostředí

Další metodou extrakce analytů v plynné fázi pomocí SPME je tzv. TWA, měření koncentrace v prostředí. Stanovení pomocí SPME metodou TWA není nutné dosažení rovnováhy mezi vláknem a prostředím ani provádět kalibraci. TWA koncentrace je definována rovnicí (4). [111]

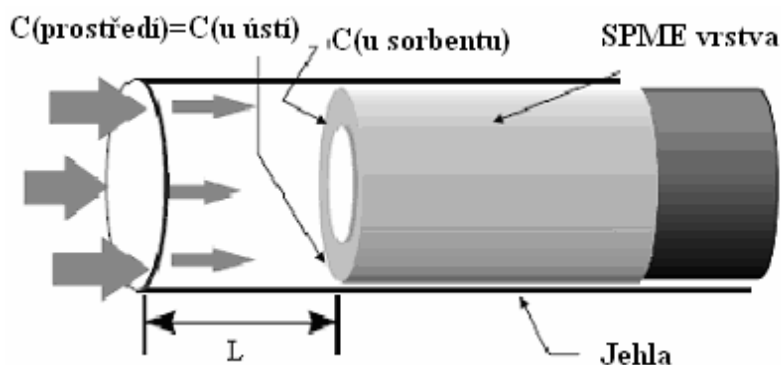
Rovnice (4)

$$\overline{C}_{t_n} = \frac{C_1 t_1 + C_2 t_2 + C_3 t_3 + \dots + C_n t_n}{t_1 + t_2 + t_3 + \dots + t_n}$$

\overline{C}_{t_n} TWA koncentrace;

C_1 koncentrace analytu v čase t_1

Této metody se používá pro stanovení koncentrace analytu v prostředí v různých časech. Pro tento druh měření byla vyvinuta speciální technika odběru kdy je SPME vlákno ponecháno uvnitř jehly. Tímto se zabrání ovlivnění stanovení působením vzdušných proudů a koncentrace na vlákně je pouze výsledkem difuzních sil, které působí uvnitř jehly. Prostřednictvím těchto sil je analyt transportován od ústí jehly až k SPME vlákně. [111] (obr. 6)



Obr. 6: Vlákno umístěné uvnitř jehly ve vzdálenosti L (délka difúzního prostoru), c je koncentrace analytu. [111]

3.5.3.2. Optimalizace podmínek SPME

3.5.3.2.1. SPME stacionární fáze

Výběr vhodné stacionární fáze zakotvené na SPME vlákne hraje klíčovou roli při stanovení látek pomocí SPME.

Stacionární fáze je možné dělit podle mnoha kritérií. Jedním z možných rozdělení je, zda-li je stacionární fáze na vákno:

- **vázaná,**
- **nevázaná.**

Vázané fáze jsou stabilní ve většině běžně používaných organických rozpouštědlech. V některých nepolárních rozpouštědlech mohou slabě bobtnat. Nevázané fáze jsou stabilní v organických rozpouštědlech mísitelných s vodou, ve kterých mohou slabě bobtnat. Nikdy nesmí být čištěny nepolárními organickými rozpouštědly. [112]

Stacionární fáze lze také rozdělit na:

- **homogenní čisté polymery – absorbenty,**
- **porézní částice suspendované v polymeru – adsorbenty.**

Při absorpci je analyt zachycen přímo ve vrstvě pokrývající křemenné vlákno, v případě adsorpce je analyt zachycen na povrchu porézních částic, které jsou suspendované ve vrstvě na povrchu vlákna. [112,114]

Dále je možné rozdělení stacionárních fází na:

- **polární,**
- **nepolární.**

Vliv polarity se ovšem projeví až u molekul o $M_r > 90$. Nepochární fáze jsou mnohem efektivnější pro extrakci nepolárních látek a polární fáze naopak pro extrakci polárních analytů. [112]

Jednou z nejdůležitějších vlastností stacionární fáze je její tloušťka. Silnější vrstva je schopna sorbovat větší množství analytu než vrstva tenká. Silnější vrstva se tedy hodí pro více těkavé látky, protože analyt je na tuto vrstvu sorbován rychleji, ve větším množství a dochází k menším ztrátám. Také dobře extrahuje látky s vysokým bodem varu, ale jejich sorpce je zdlouhavá a při nedostatečném ošetření vlákna mezi jednotlivými extrakcemi může dojít k přenesení analytu na vlákne z jedné extrakce do dalších. Oproti tomu tenká vrstva nemá tak dobré extrakční vlastnosti jako vrstva silná, ovšem termální desorpce probíhá rychleji. Proto je třeba při výběru vhodné tloušťky vrstvy přihlídnout nejen k množství analytu získaného při extrakci a velikosti molekul, ale také k časové náročnosti celého postupu. [112]

Vlákna mohou být tvořena taveným křemenem, který je chemicky inertní. Extrakční fázi je většinou sesítěný organický polymer. Polymerní vrstva je využívána k ochraně vlákna proti přelomení. Vlákna je možné pokrývat čistými kapalnými polymerními fázemi (např. polydimethylsiloxan, PDMS) nebo porézními tuhými fázemi (přesněji porézními tuhými látkami dispergovanými v kapalných polymerních maticích; např. Carboxen/PDMS). Dva nečastěji používané polymery jsou polydimethylsiloxan a polyakrylát. Polydimethylsiloxan se chová jako kapalina, polyakrylát je tuhý. Křemenná vlákna mají typicky průměr 100 až 200 μm a tloušťka filmu dosahuje 10 až 100 μm . [97, 151]

Následující Tab. 7 ukazuje základní komerčně dostupná SPME vlákna, použité sorpční materiály, jejich tloušťku a doporučené použití. [112]

Tab. 7: Přehled komerčně dostupných SPME vláken [112]

Stacionární fáze/tloušťka vrstvy	Zkratka názvu stacionární fáze	Určeno pro chromatografii	Doporučeno pro analýzu
Polydimethylsiloxan	PDMS	GC/HPLC	Těkavé látky
100 μm			Nepolární středně těkavé látky
30 μm			
7 μm			Slabě polární až nepolární střednětěkavé látky
Polydimethylsiloxan/divinylbenzen	PDMS/DVB	GC	Polární těkavé látky
65 μm		HPLC	Obecné užití (pouze pro HPLC)
60 μm			

Polyakrylát	PA	GC/HPLC	Polární středně těkavé látky
85 µm			
Carboxen/polydimethylsiloxan	CAR/PDMS	GC	Stopové koncentrace těkavých látek
75 µm			
Carbowax/divinylbenzen	CW/DVB	GC	Polární látky
65 µm			
Carbowax/pryskyřice	CW/TPR	HPLC	Povrchově aktivní látky
50 µm			
Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan	DVB/CAR/PDMS	GC	Těkavé a středně těkavé látky C3-C20
50 µm Carboxen /30 µm Polydimethylsiloxan			

3.5.3.2.2. Způsob vzorkování

Existují dva základní způsoby extrakce analytu z analyzovaného prostředí. Vlákno může být vystaveno pevnému, kapalnému nebo plynnému analytu s použitím různých druhů extrakce:

- přímé ponoření vlákna do kapalně nebo plynné matrice analytu, tzv. **direct immersing(DI)**,
- extrakce z prostoru nad analytem pevného nebo kapalného skupenství, který je umístěn v uzavřené lahvičce, tzv. **headspace (HS)**. [111]

HS-SPME je vhodná pro extrakci těkavých látek, látek s nízkým bodem varu. V plynném prostředí je pohyb molekul rychlejší a dochází k rychlejšímu ustanovení rovnováhy mezi vláknem a analytem.

Oproti tomu DI-SPME je vhodná pro extrakci netěkavých látek z analytu v pevném nebo kapalném skupenství. V případě, že jsou v matrici přítomny i makromolekulární látky a mechanické nečistoty, které by mohly ovlivnit průběh extrakce, je možné SPME vlákno chránit membránou. [115]

3.5.3.2.3. Teplota

Vliv teploty na SPME extrakci lze rozdělit do dvou skupin:

- **extrakční,**
- **skladovací.**

Vliv extrakční teploty je zřejmý. V případě zvýšení extrakční teploty dochází ke zvýšení difúze analytu směrem k vláknem, ale současně se také z vlákna zachycený

analyt snáze uvolňuje. Mezi těmito dvěma procesy není přímá úměra a je tedy vhodné provádět všechna opakovaná měření při stejné, nejlépe optimální teplotě. [111]

Podmínky skladování vzorku zachyceného na vlákne jsou zvláště významné s rostoucí prodlevou mezi časem extrakce a časem analytického stanovení. [113]

3.5.3.2.4. Čas

Jedním z nejdůležitějších kroků při SPME extrakci je stanovení času nutného pro dosažení rovnováhy mezi analytem ve vzorku a analytem zachyceným na sorpční vrstvě SPME vlákna. V případě, že analyt není v roztoku v nadbytečném množství schopnem vysytit SPME vlákno je rovnovážný extrakční čas především určen hodnotou rozdělovacího koeficientu analyt/SPME vlákno (K_{fs}).

V případě, že roztok obsahuje takové množství analytu, které je schopné vysytit všechna aktivní místa sorbentu vlákna dochází k tomu, že i přes vysokou koncentraci analytu v prostředí nedochází již k sorpci na vlákno.

V případě směsi více analytů může docházet i ke zpětné desorpci některých analytů z vlákna zpět do roztoku. Analyty, které snáze unikají z vlákna jsou poté na vlákne nahrazeny analyty, jejichž afinita k SPME vláknu je vyšší. [148]

Technika SPME extrakce má maximální účinnost v bodě ekvivalence. To znamená, že dojde k ustavení rovnováhy mezi analytem v okolním prostředí a analytem zachyceným na vlákne. Nicméně vzhledem k tomu, že v nerovnovážném stavu existuje lineární závislost mezi množstvím analytu zachyceným na vlákne a koncentrací analytu v matrici vzorku, není pro přesné stanovení nezbytně nutné dosáhnout rovnováhy.

V některých případech může být dosažení rovnováhy časově velmi náročné. Z praktických důvodů se tedy pro extrakci volí časový interval kratší s ohledem na praktické využití extrakce. Délka tohoto extrakčního času je volena jako kompromis mezi plochou píku, citlivostí stanovení a tímto časem. V případě, kdy pro extrakci analytu není volen rovnovážný stav, je nutné přesně dodržet čas jednotlivých extrakcí. [115]

3.5.3.2.5. Změna pH a přidavek soli

Je-li vzorek v kapalném stavu tak úprava pH či přidavek soli může mít výrazný vliv na výsledek extrakce. Přidání 25 – 30 % hmotnostních procent chloridu sodného nebo úpravou pH vzorku můžeme docílit zvýšení iontové síly roztoku a tím snížit rozpustnost analytů. Zvýšením iontové síly roztoku přidáním soli se zvýší výtěžek extrakce především polárních a těkavých látek. Naopak u vysoce polárních látek může vést přidání soli ke vzniku interferujících píků. Úprava pH také může vést k vyššímu výtěžku extrakce. Kyselé složky jsou snáze extrahovány v kyselém prostředí a bazické

zase v bazickém. [113] Vhodnou kombinací vlivu iontové síly a hodnoty pH se zlepší extrakce analytu z prostoru headspace. Ustálení rovnováhy je rychlejší v prostoru headspace než při ponoření do vzorku, protože se molekuly v plynné fázi pohybují mnohem vyšší rychlostí než v kapalině.

3.5.3.2.6. Míchání

Při HS-SPME vzorkování těkavých látek nemá míchání téměř žádný vliv na extrakci. Pouze u méně těkavých látek urychluje transport a má za následek rychlejší dosažení rovnováhy mezi vláknem a okolním prostředím. V případě DI-SPME vzorkování má míchání za následek rychlejší dosažení rovnováhy (hlavně u molekul s vyšší molekulovou hmotností a vysokým difúzním koeficientem). [113]

Během vzorkování není vhodné rychlost míchání měnit z důvodu nereprodukovatelnosti měření.

3.5.3.2.7. Množství analyzovaného vzorku a velikost analyzovaných částic materiálu

Množství analyzovaného vzorku je velmi důležitým faktorem SPME metody, zvláště s ohledem na extrakční kapacitu stacionární fáze. Při kvalitativní analýze velkém množství vzorku tak může docházet k diskriminaci méně těkavých látek.

Velikost částic je faktor důležitý např. v analýze těkavých látek sušených rostlin. Drcením může docházet k zvýšenému množství těchto látek. Dále je zde faktor praktický vzhledem k menšímu objemu vzorku a tudíž snadnější provedení analýzy headspace.

Množství extrahovaného analytu ovlivňuje celá řada dalších faktorů. Při nízkých koncentracích těkavých látek změna objemu neovlivní odezvu, protože rovnováha je závislá na koncentraci. Při vyšších koncentracích začínají být změny objemu významné. U velkých vzorků, které obsahují vyšší koncentrace analytu, množství analytu získaného ze vzorku neodpovídá lineární změně koncentrace. Kalibrační křivka je nelineární obzvláště u látek s vysokou distribuční konstantou. Lineární závislost platí jen pro nízké koncentrace. Vzhledem k tomu, že koncentrace analytu není obvykle známa, je lepší používat menší, stejný objem vzorku a kalibrační standard. Při metodě ponoření vlákna do vzorku je doporučováno minimalizovat headspace prostor ve vialce se vzorkem.

U techniky SPME není nutná ani úplná extrakce analytu ani úplná rovnováha. Důležité ale je dodržovat konstantní parametry extrakce (např. extrakční čas, teplota extrakce, hloubku ponoru vlákna, množství vzorku, velikost vialky) Získání shodných výsledků vyžaduje zároveň optimalizaci desorpčních parametrů jednotlivých analytů,

tj. teploty nástřiku, hloubku vsunutí vlákna do nástřikového portu a desorpčního času. [55, 151]

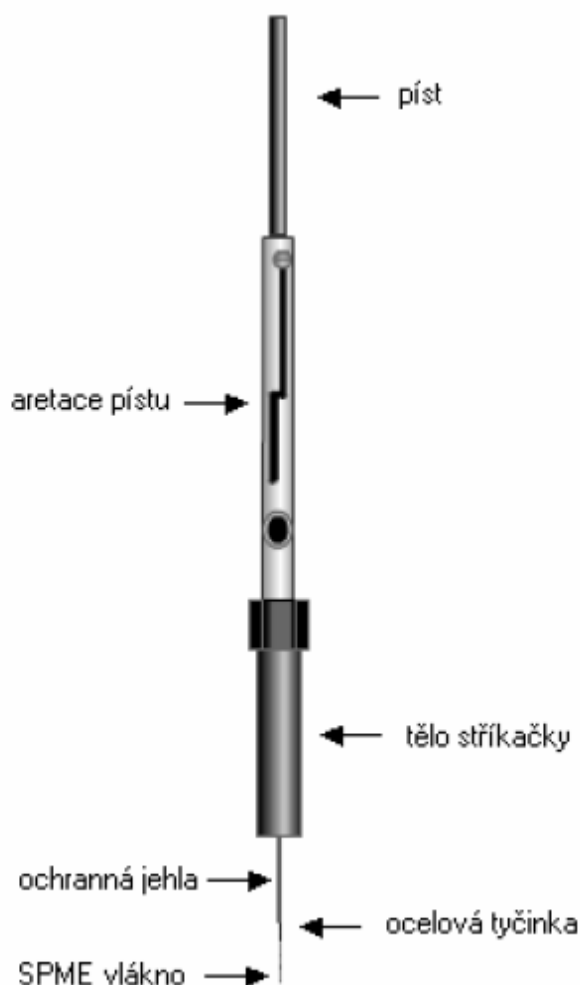
3.5.3.3. Uspořádání SPME experimentu

3.5.3.3.1. Na vlákně

Jedná se o základní uspořádání SPME pro odběr vzorků. Pro tento účel slouží zařízení podobné injekční stříkačce zobrazené na obr. 7. Základem celého zařízení je 1 cm dlouhé vlákno potažené polymerním materiálem, na kterém dochází k sorpci analytu. Toto vlákno je umístěno uvnitř duté ocelové jehly a upevněno k pístu, jehož prostřednictvím je možné vtáhnout vlákno dovnitř jehly nebo jej naopak vysunout a vystavit působení analytu. [115]

Existuje několik základních druhů těchto zařízení: [113]

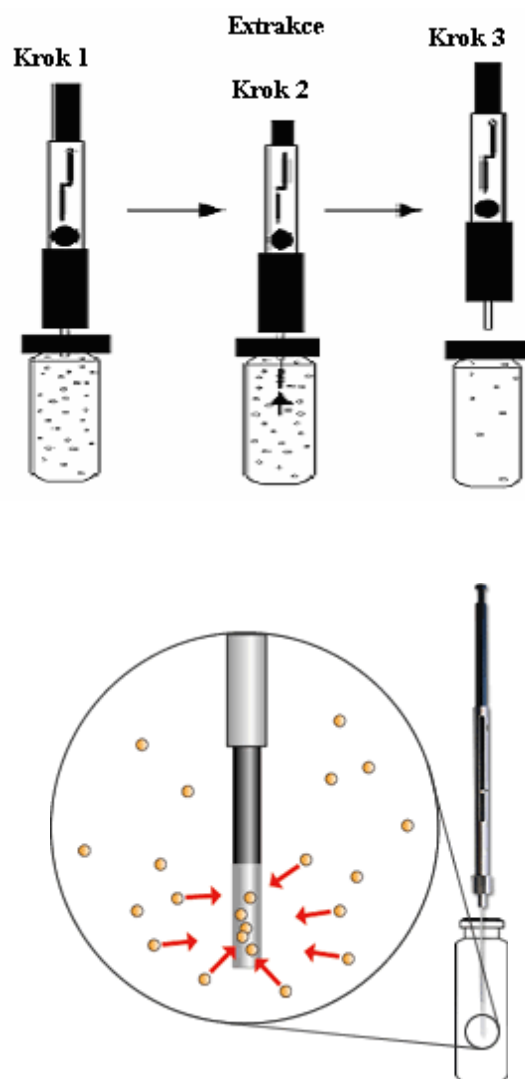
- pro automatické vzorkování SPME,
- pro manuální vzorkování,
- přenosný vzorkovač pro terénní analýzu.



Obr. 7: zařízení pro SPME [152]

Extrakce a desorpce

Proces odběru vzorku je uveden na obr. 8. V prvním kroku je vlákno nejprve vtažené dovnitř SPME držáku a píst vytažen v horní poloze. Ocelová jehla je prostrčena septem na ampulce. Při tomto kroku je třeba dbát na to, aby bylo vlákno opravdu vtažené do držáku, jinak by mohlo dojít velice snadno k jeho poškození. Ve druhém kroku je prostřednictvím pístu vysunuto vlákno do prostředí s analytem a vystaveno jeho působení v čase experimentem určeném. Poté je pomocí pístu opět vtaženo do SPME držáku. Ve třetím kroku držák vytažen ze septa na ampulce [113].



Obr. 8: Proces odběru vzorku (extrakce) [113, 154]

Desorpce analytu z vlákna probíhá buď přímo v injektoru plynového chromatografu, nebo také např. na rozhraní SPME/HPLC. V případě GC je analyt z vlákna tepelně desorbován v injekčním portu, v případě SPME-HPLC je vyplavován rozpouštědlem v desorbční komoře. Analyt putuje přímo do kolony, kde je následně rozdělen na jednotlivé frakce, poté dochází k detekci a vyhodnocení. Schéma desorpce je uvedeno na obr. 9. [113,115]

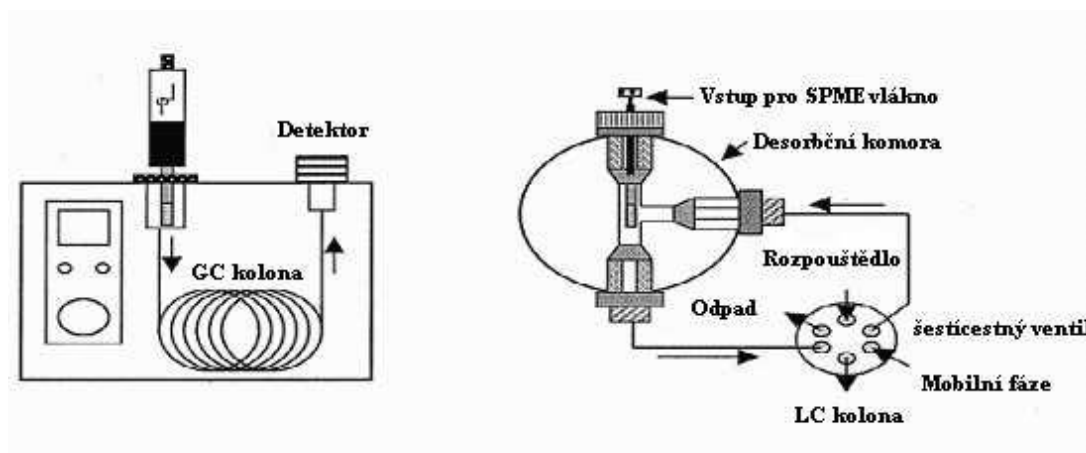
3.5.3.3.2. In-Tube SPME

Toto SPME zařízení bylo vyvinuto pro stanovení analytu pomocí HPLC, nebo LC-MS. Základ tvoří otevřené trubicovité kapiláry, uvnitř kterých je vrstva polymeru, která je stejná jako se nanáší na komerční SPME vlákna. Hodí se pro automatizaci a může spojitě vykonávat extrakci, desorpci a nástřik. Při In-tube SPME technice jsou kapalné vzorky přímo extrahovány do stacionární fáze uvnitř kapilár a poté desorbovány mobilní fází nebo rozpouštědlem k němuž mají mnohem větší afinitu než k stacionární fázi uvnitř kapilár. [115]

Extrakce a desorpce

Kapilární trubice je umístěna přímo mezi injekční smyčkou a injekční jehlou automatického vzorkovače HPLC. Počítačem řízený automatický proces neustále dávkuje vzorek z ampulky do kolony, kde se váže na tuhou fázi uvnitř kapiláry s polymerem, dokud není dosaženo rovnováhy. [115] Následně je analyt desorbován z kapiláry mobilní fází nebo rozpouštědlem. Desorbovaný analyt je unášen do HPLC kolony, kde je detekován pomocí UV spektroskopie nebo MS.

Obr. 9: Desorpce v GC injekčním portu a na HPLC rozhraní [115, 152]



3.6. Separační a analytické metody

Plynová chromatografie je analytická a separační metoda, která má výsadní postavení v analýze těkavých látek. Mezi hlavní výhody této techniky patří jednoduché a rychlé provedení analýzy, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebné k analýze. V praxi jsou nejvíce rozšířené plynové chromatografy s kapilárními kolonami. V současné době je nejvíce využívána plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

Aplikace vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) v této analýze je omezená. Důvodem je nedostatečná citlivost a rozlišení. [147]

3.6.1. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je metoda určená k dělení a stanovení plynů, kapalin i látek pevných s bodem varu do cca 400 °C. Metoda je založena na rozdělování složek mezi dvě fáze, fázi mobilní a stacionární.

V plynové chromatografii je mobilní fází plyn, nazývaný nosný plyn. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně. Stacionární fáze u náplňových kolon může být pevná látka (aktivní uhlí, silikagel, oxid hlinitý, polymerní sorbenty apod.) nebo vysokovroucí kapalina nanosená v tenké vrstvě na pevném, inertním nosiči. U kapilárních kolon je stacionární fáze nanosená v tenké vrstvě přímo na upravenou vnitřní stěnu křemenné kapiláry.

Princip separace látek plynovou chromatografií je následující. Kolonou se stacionární fází prochází stále nosný plyn. Vzorek se vnese (nastříkne) do vyhřívaného bloku – nástřikové komory (injektoru), kde se odpaří a ve formě par je unášen nosným plynem do kolony. Složky ze vzorku se sorbují na začátku kolony ve stacionární fázi a pak desorbují čerstvým nosným plynem. Nosný plyn unáší složky vzorku postupně ke konci kolony a dělicí proces se neustále opakuje. Každá složka ze vzorku postupuje kolonou svou vlastní rychlostí závislou na distribuční konstantě složky $K_D = c_s/c_m$, kde c_s a c_m jsou rovnovážné koncentrace složky ve stacionární a v mobilní fázi. Látky postupně vycházejí z kolony v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant a vstupují do detektoru. Detektor indikuje okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Signál detektoru je vhodně upraven a plynule se registruje. Výsledný grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá chromatogram (eluční technika).

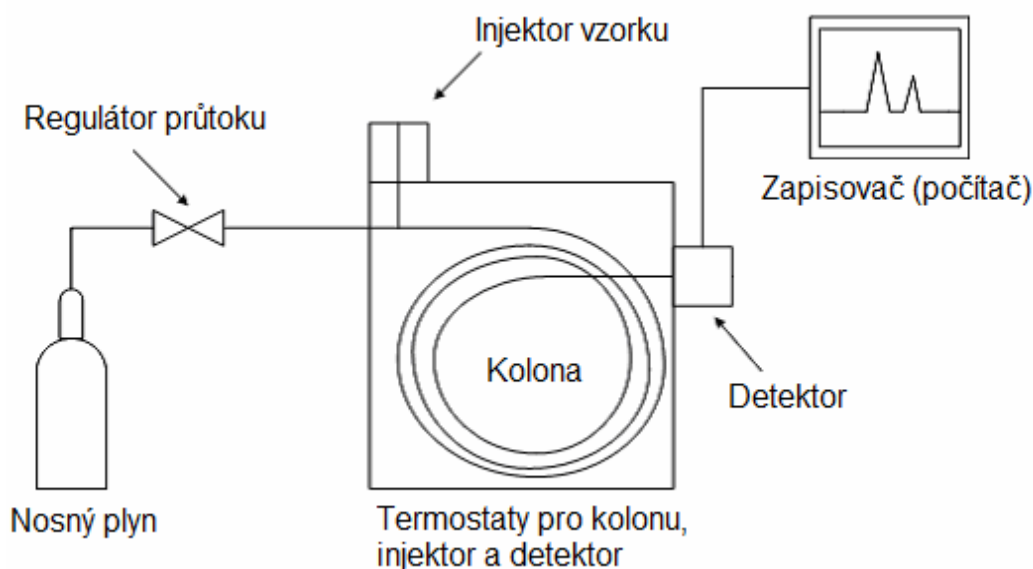
Dojde-li na chromatografické koloně k rozdělení – separaci všech n-složek analyzovaného vzorku, obsahuje chromatogram n-elučních křivek – píků těchto složek. Podle polohy píku lze vyslovit předpoklad o identitě látky. Plocha píku je úměrná množství látky ve vzorku.

U chromatogramu je na ose y zaznamenána odezva detektoru a na ose x délkové jednotky nebo čas. Z teorie chromatografické separace vyplývá, že chromatografický pík má tvar GAUSSovy křivky. [122]

Plynový chromatograf obsahuje tyto hlavní části:

- zásobník plynné (mobilní) fáze,

- čističí zařízení,
- zařízení na regulaci tlaku, resp. průtoku plynné fáze,
- dávkovací zařízení – injektor,
- chromatografickou kolonu,
- termostat se zařízením pro izotermickou analýzu a pro analýzu s programovanou změnou teploty,
- detektor,
- zařízení na zpracování a záznam signálu detektoru a vyhodnocení analýzy. [88]



Obr. 10: Zjednodušené schéma plynového chromatografu [108]

Plynová chromatografie se obvykle dělí na chromatografii v systému plyn – pevná látka (GSC) a na chromatografii plyn – kapalina (GLC). V případě GSC je distribuce analytu mezi stacionární a mobilní fází založena na adsorpci, nevýhodou je úzká oblast linearit adsorpční isotermy. GLC je příkladem rozdělovací chromatografie, kdy dochází k rozpouštění látky v obou fázích. Kapalná fáze je v koloně ukotvena, musí mít nízkou tenzi par a musí být chemicky stabilní i při vysoké pracovní teplotě. Jako kapalnou stacionární fázi pro GLC se často používají např. polyethylenglykoly, polyestery nebo polysiloxany. [108]

3.6.1.1. Mobilní fáze [90, 108, 116]

Mobilní fáze je představována nosným plynem. Jako nosné plyny se nejčastěji používají vodík, dusík, helium, argon.

Při volbě nosného plynu se uvažují následující faktory: viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, typ používaného detektoru a cena plynu.

Průtok mobilní fáze musí být optimalizován tak, aby se dosáhlo co nejlepšího rozdělení látek na koloně, tj. nejmenšího rozšíření zón separovaných látek.

Čtyři hlavní děje, které se podílejí na rozšiřování zón během průchodu kolonou jsou:

- vířivá difúze – různé molekuly musí urazit různé vzdálenosti,
- podélná molekulární difúze – molekuly putují z místa o vyšší koncentraci do místa o nižší koncentraci, po i proti směru proudění mobilní fáze,
- odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi – různé molekuly difundují různě hluboko do stacionární fáze,
- odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi – rychlostní profil mobilní fáze je parabolický.

Účinnost chromatografické kolony lze kvantifikovat pomocí tzv. počtu teoretických pater kolony nebo souvisejícího výškového ekvivalentu teoretického patra. Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na průměrné lineární rychlosti mobilní fáze (u) pro daný typ nosného plynu popisuje van Deemterova rovnice: [108]

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u ,$$

kde konstanta A zastupuje vířivou difúzi, B podélnou difúzi a C odpor proti přenosu hmoty jak ve stacionární, tak i mobilní fázi.

3.6.1.2. Čisticí zařízení

Čisticí zařízení zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu. Zbavuje nosný plyn nežádoucích stop ostatních plynů. [90]

3.6.1.3. Regulátory tlaku a průtoku

Jedná se o elektronické regulační zařízení, které slouží k ovládní průtoků a tlaku nosného plynu. Regulátor průtoku zaručuje konstantní průtok plynu kolonou a detektorem bez ohledu na typ nosného plynu, teplotu a rozměry kolony. Tlak je potom proměnnou veličinou a nastaví se automaticky podle viskozity plynu, vnitřního průměru kolony a délky kolony tak, aby průtok kolonou byl konstantní. [90, 108]

3.6.1.4. Injektor

Injektor je vstupem analyzované látky do plynového chromatografu. Nástřik látky se nejčastěji provádí pomocí speciální injekční stříkačky přes septum, které odděluje vnitřek injektoru od vnějšího prostoru. Součástí injektoru je skleněná vložka (liner), ve které dochází vysokou teplotou k rychlému odpaření vzorku a ke správnému promíchání par vzorku s nosným plynem. Mezi injektor a kolonu je zařazen dělič toku (splitter), který umožňuje vést jen část odpařeného vzorku na kolonu (splitovací poměr, split ratio). Technika nástřiku bez splitu (splitless injection) se používá při stopové analýze nebo pro analýzu směsí látek, které se výrazně liší v bodu varu. [90, 108, 116]

3.6.1.4.1. Metody nástřiku

Nástřikem vzorku se rozumí dávkování roztoku pomocí injekčních stříkaček přes pryžové septum.

- Nástřik do kolony je základní metodou u náplňových kolon. Vzorek je dávkován v objemu 1 – 2 μl . Tato metoda nástřiku se běžně používá i pro kapilární kolony a vzorek je dávkován v objemu 0,2 – 2 μl . Horní část kolony je zahřívána na teplotu o 10 – 30°C nižší, než je teplota varu rozpouštědla. Vzorek se musí rychle nástříknout a vytvořit kapalný film na stěně kolony. Po 30 – 60 s se teplota kolony prudce zvýší, aby nastalo odpaření.
- Nástřik pomocí děliče toku (split injection). Tenké kapilární kolony mají malou kapacitu, proto se u koncentrovaných vzorků musí pomocí děliče toku část s nosným plynem oddělit. Do kolony se dostává jen zlomek nástřikovaného množství, zhruba asi 0,1 – 2 μl .
- Nástřik bez děliče toku (splitless injection). Tato metoda je vhodná pro velké objemy, asi 0,5 – 5 μl , které se používají pro stopovou analýzu.
- Koncentrátor na počátku kolony je metoda zachycování vzorku ze vzduchu nebo vodného roztoku na adsorbent, jako je pórovitý polymer nebo grafitizované saze. Vzorek je poté termicky desorbován přímo do kolony. [90]

Nástřiky plynné fáze mohou být prováděny také pomocí statických nebo dynamických head-space dávkovacích systémů.

3.6.1.4.2. Dynamický head-space dávkovací systém

Dynamické head-space dávkovací systémy pro adsorpci a desorpci obsahují probublávací zařízení, pomocí kterého jsou těkavé látky uvolňovány z roztoku a vyplavovány do adsorpční kolony udržované na nízké teplotě. Zadržené látky jsou pak desorbovány do mobilní fáze rychlým ohřátím adsorpční kolony. [106]

3.6.1.4.3. Statický head-space dávkovací systém

Statické head-space dávkovací systémy jsou zvláště vhodné pro dělení a stanovení těkavých látek přítomných v pevných nebo kapalných vzorcích. Tato metoda je založena na analýze plynné fáze, která je v rovnováze s pevnou nebo kapalnou fází.

Přístroj se skládá z plynového chromatografu opatřeného zařízením pro zavádění zkoušeného vzorku, které může být připojeno k modulu, jenž automaticky ovládá tlak a teplotu. Je-li to nutné, může být připojeno zařízení pro eliminaci rozpouštědel.

Analyzovaný vzorek se vpraví do lahvičky opatřené vhodným uzávěrem a systémem ventilů umožňujícím průchod nosného plynu. Lahvička se umístí do termostátované nádoby vyhřívané na vhodnou teplotu podle povahy zkoušeného vzorku. Vzorek se zahřívá na tuto teplotu dostatečně dlouho, aby se ustavila rovnováha mezi pevnou nebo kapalnou fází a plynnou fází. Nosný plyn se zavádí do nádoby a po předepsaném čase se otevře vhodný ventil, takže plyn expanduje a unáší zplyněné látky do chromatografické kolony. Místo chromatografu speciálně vybaveného pro zavádění vzorků je též možné použít plynotěsnou stříkačku a běžný chromatograf. Ustavení rovnováhy pak probíhá v oddělené komůrce a plynná fáze se dávkuje do kolony při zajištění podmínek zaručujících, že nedojde k porušení rovnováhy. [12, 102, 104]

3.6.1.5. Kolona [116]

V plynové chromatografii se používají náplňové nebo kapilární kolony. Náplňové kolony jsou trubice o průměru 2 až 5 mm obsahující adsorbent nebo nosič se zakotvenou kapalnou fází, délka náplňových kolon bývá od desítek centimetrů do několika metrů. Kolony se zhotovují ze skla nebo nerezové oceli. Kapilární kolony se vyrábějí z křemenného skla a kvůli pevnosti jsou potaženy filmem polyimidu.

Kapilární kolony nemají průměr větší než 5 mm, délka se může pohybovat od 10 do stovek metrů. Stacionární fáze je rozprostřena na vnitřních stěnách kapiláry.

Podle uložení mobilní fáze rozlišujeme tři typy kapilárních kolon:

- WCOT (Wall Coated Open Tubular) – kapalná stacionární fáze tvoří tenký film na vnitřní straně kapiláry; kolony musí být velmi úzké, aby byl zajištěn dostatečný styk mobilní fáze se stacionární fází;
- SCOT (Support Coated Open Tubular) – mají na vnitřní stěny kapiláry vrstvu nosiče se zakotvenou kapalinou;
- PLOT (Porous Layer Open Tubular) – mají na vnitřní stěně kapiláry tenkou vrstvičku pórovitého materiálu (např. aluminy) jako adsorbentu. [90]

Adsorbenty mohou být různé druhy aktivního uhlí, silikagel, molekulová síta a syntetické makromolekulární adsorbenty. Stacionární kapaliny musí dobře rozpouštět separované látky, být teplotně stálé, mít nízkou těkavost a nízkou viskozitu při pracovní teplotě. Měly by pevně smáčet nosič, aby nedocházelo k jejich vymývání. Dále nesmí reagovat s analyzovanými látkami a rozpustnost složek vzorku v těchto kapalinách má být různá. Volba stacionární fáze je obvykle rozhodující pro výběr vhodné kolony pro stanovovaný vzorek. Důležitá je selektivita a polarita stacionárních kapalin.

Kolona je umístěna v peci, která je temperována na určitou teplotu. Teplota je důležitá proměnná v plynové chromatografii. Pokud je teplota kolony během analýzy vzorku konstantní, jedná se o isotermální analýzu. Pro analýzu vzorků multikomponentních směsí látek s rozdílnými body varu je vhodné použít teplotního gradientu, kdy se teplota kolony během analýzy bude měnit podle vytvořeného teplotního programu. Výhodou použití teplotního gradientu je zlepšení tvaru chromatografických píků (zúžení signálů, vyšší citlivost) a výrazné zkrácení doby analýzy.

3.6.1.6. Detektor

Detektory jsou konstrukční části měřicích zařízení, ve kterých je fyzikálně chemická vlastnost analytu převáděna na měřitelný, zpravidla elektrický signál. Nosný plyn z kolony protéká detektorem, který reaguje na přítomnost analytu a vysílá signál, jenž je zaznamenáván v závislosti na čase. Detektor sleduje takovou vlastnost plynu z kolony, která závisí na druhu a koncentraci složek (analytická vlastnost). Musí mít

dostatečnou citlivost (nízký detekční limit) a jeho odezva by měla být lineární funkcí obsahu analytu. GC se vyznačuje jak největší variabilitou detekčních možností, tak detektory s největší citlivostí a největší selektivitou mezi všemi separačními metodami. [89, 90]

Teplota detektoru by měla být vyšší než je teplota plynů vycházejících z kolony, aby se zabránilo kondenzaci látek na stěnách detektoru. [89,90]

V plynové chromatografii se užívá několiktypů detektorů: [90, 116, 117]

Tepelně vodivostní detektor (TCD, katarometr)

Detektor obsahuje zahřívané odporové vlákno, které se ochlazuje protékajícím plynem, čímž se mění jeho elektrický odpor. Průchod látky detektorem se projeví změnou tepelné kapacity proudícího plynu a změnou vodivosti odporového vlákna. V praxi se vedle sebe zapojují dva TCD detektory, do jedné z měrných cel se přivádí čistý nosný plyn, do druhé plyn vycházející z kolony. Tento typ detektoru je oblíben pro svou univerzalitu a široké rozmezí linearitu odezvy detektoru. [90, 116, 117]

Dusíko-fosforový detektor

Tento detektor je v GC analýze znám pod řadou názvů. Jako jsou termoionizační specifický detektor (TSD – Thermionic Specific Detector), dusíko-fosforový detektor (NPD – Nitrogen- Phosphorus Detector), alkalický plamenově ionizační detektor (AFID – Alkali Flame Ionization Detector) a termoionizační ionizační detektor (TID – Thermionic Ionization Detector). Tento typ detektoru je modifikací FID, jedná se o selektivní termoionizační detektor s alkalickým kovem. Modifikace spočívá v umístění perličky nebo prstence se solí alkalického kovu v prostoru hořáčku (používají se hlavně síran sodný, chlorid draselný, bromid cesný, chlorid rubidný), detekce je založena na ionizaci alkalického kovu vlivem spalin organické látky. Dochází k selektivní ionizaci organickými sloučeninami obsahujícími atomy dusíku nebo fosforu. [90, 116, 117]

Plamenově fotometrický detektor

Plamenově fotometrický detektor (FPD – Flame Photometric Detector) je selektivním detektorem pro sloučeniny obsahující fosfor a síru. Je založen na měření intenzity emise heteroatomů přítomných v molekule analytu. Aplikace FPD není tak rozšířená jako FID především kvůli jeho selektivitě. [89, 117]

Fotoionizační detektor

Fotoionizační detektor (PID – Photoionization Detector) je relativně novým komerčně používaným GC detektorem. Je to nedestruktivní detektor, který se používá ke stanovení fotoionizujících sloučenin, jakými jsou aromatické uhlovodíky a některé anorganické sloučeniny. Energie pro ionizaci je získávána prostřednictvím UV lampy. [90, 116, 117]

Tepelně vodivostní detektor

Tepelně vodivostní detektor (TCD – Thermal Conductivity Detector) je nejlevnějším a snadno použitelným detektorem GC. Principem detekce je odvod tepla z rozžhaveného odporového vlákna plynem vytékajícím z kolony. Změnou teploty vlákna se mění elektrický odpor. Je to univerzální nedestruktivní detektor s velkým dynamickým rozsahem, ale limitující citlivostí. TCD se obvykle využívá pro analýzu uhlovodíků a plynů. [89, 116, 117]

Detektor elektronového záchytu (ECD)

Selektivní ionizační detektor citlivý na elektronegativní atomy, zejména na halogeny. Nosný plyn (dusík) je vlivem β záření v detektoru ionizován, čímž vzniká konstantní proud. Atomy halogenů (elektronegativní atomy) zachytávají pomalé elektrony, čímž dochází ke snížení ionizačního proudu. Zdrojem ionizace je v ECD ^{3}H nebo ^{63}Ni , emitující částice β . Nejmenší detekované množství je o několik řádů nižší než u FIDu. Detektor je velmi vhodný pro stopovou analýzu pesticidů v životním prostředí. [89, 116]

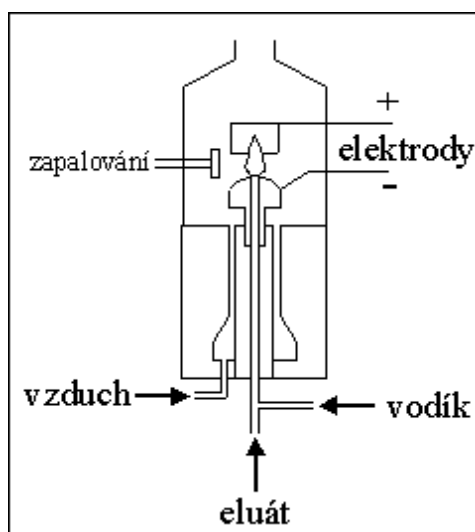
3.6.1.6.1. Plamenově ionizační detektor (FID)

Plyn z chromatografické kolony je zaváděn do kyslíko-vodíkového plamene, kde probíhají chemionizační reakce vedoucí ke vzniku nabitých částic. Detektor se sestává z ocelové trysky, do které vstupuje směs nosného plynu, vodíku a doplňkového plynu. Na špičce mikrohořáku pak dochází v proudu vzduchu ke spálení této směsi na ionty, které se detekují na polarizovaných elektrodách (obr. 11). Proudové pozadí je mezi

10^{-13} a 10^{-14} A, zatímco proud generovaný po spálení solutů je v rozmezí 10^{-12} – 10^{-6} A. FID poskytuje odezvu téměř na všechny organické látky, pro uhlovodíky je odezva úměrná počtu uhlíkových atomů v molekule. Odezvu nedává většina anorganických plynů a par a některé organické látky (formaldehyd, chlorid uhličitý).

Nastavení průtoků vodíku a vzduchu je velmi důležité a musí být provedeno i s ohledem na nosný plyn. Maximální linearitu a citlivosti se dosahuje při optimálním poměru doplňkový plyn/vodík. Odchytky od optimálního poměru mají za následek nestabilní plamen a velký šum. [89, 90, 116]

Obr. 11: Plamenově ionizační detektor [153]



3.6.1.6.2. Hmotnostní spektrometr (MS) [90, 116]

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založená na interakci iontů s elektrickým a magnetickým polem. Výstupem je hmotnostní spektrum, což je dvourozměrný graf závislosti intenzity naměřeného signálu na poměru hmoty a náboje (m/z). Ionť vzniklý ionizací celé molekuly poskytuje informaci o molekulové hmotnosti analyzované sloučeniny, ionty fragmentové pak poskytují informaci o její struktuře.

Tato technika je využívána pro organické molekuly i pro anorganické prvky a sloučeniny. V současnosti je MS nejpoužívanější spektrometrickou technikou. Nejčastěji se používá se spojením s některou ze separačních metod, např. GC nebo HPLC. Hmotnostní spektrometrie je metoda, při níž se z neutrálních molekul nebo prvků v iontovém zdroji vytváří ionty, které se při přebytku vnitřní energie získané při ionizaci dále štěpí na fragmentové ionty, radikály a neutrální částice. Nabité částice

(molekulární a fragmentové ionty) jsou pak separovány v analyzátoru podle poměru hmotnosti k náboji (m/z) a nakonec jsou zaznamenány v detektoru.

Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, analyzátor a detektor.

Iontový zdroj

Iontový zdroj je místo, kde dochází k ionizaci analyzovaných atomů, sloučenin a molekul. Úspěšná ionizace je klíčovým krokem pro úspěch celé hmotnostně spektrometrické analýzy. Při spojení GC/MS je nejčastěji využívána elektronová ionizace. Elektrony, emitované žhaveným kovovým (W, Re) vláknem, udržovaným na záporném potenciálu, jsou urychleny elektrostatickým polem (na energii 70 eV) a při jejich interakci s cílovou neutrální molekulou dochází k „vyražení“ jednoho (příp. více) elektronu za vzniku jednou nebo vícenásobně nabitých molekulových iontů (kladně nabitých).

Při interakci však dochází k přenosu větší energie ionizujících elektronů na molekulový ion, než je ionizační energie, což následně způsobí fragmentaci molekulového iontu. Vznikající hmotnostní spektra jsou u této jediné metody ionizace reprodukovatelná (existují knihovny spekter), a proto je EI ionizace základní technikou při identifikaci neznámého analytu pomocí MS. Podmínkou změření EI hmotnostních spekter je dostatečná těkavost analytu za podmínek ionizace, protože k ionizaci dochází v plynné fázi za vakua (teplota 150 – 400°C, tlak ca. 10^{-3} – 10^{-5} Pa). EI nelze použít pro netěkavé látky a pro látky termolabilní.

Vzhledem k tomu, že tedy některé typy analytů nelze touto cestou ionizovat (nebo jen velmi obtížně s malým výtěžkem), byly vyvinuty další techniky ionizace – chemická ionizace (CI), ionizace polem (FI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI), ionizace urychlenými atomy (FAB), termosprej (TSI), elektrosprej (ESI).

Analyzátor

Analyzátor slouží k rozdělení iontů podle poměru hmotnost a náboje (m/z), přičemž jsou využívány různé fyzikální principy (př. měření doby letu, odchýlení trajektorie v magnetickém a elektrickém poli). Nejčastěji využívaným hmotnostním analyzátozem je kvadrupólový hmotnostní filtr.

Kvadrupólový analyzátor (Q) obsahuje 4 rovnoběžné tyčové elektrody. Na každou tyč je přiváděna stejnosměrná složka napětí (stovky voltů) a současně složka radiofrekvenčního pole. Nastavení parametrů (napětí, amplituda a frekvence radiofrekvenčního pole) předurčuje trajektorie drah, po kterých se mezi tyčemi budou pohybovat ionty s určitou hodnotou m/z . Při daném nastavení mají stabilní trajektorii vedoucí k detektoru ionty právě určité hodnoty m/z . Ostatní ionty k detektoru

neprojdou. Nastavení veličin kvadrupólu se postupně mění a detektor zachycuje ionty o různých hodnotách m/z .

Kromě kvadrupólového analyzátoru lze použít také analyzátor magnetický, elektrostatický, průletový (TOF), iontovou past (IT), analyzátor s dvojitou fokusací (HRMS) a iontovou cyklotronovou rezonancí (ICR).

Hmotnostní analyzátoři mohou pracovat ve 2 základních módech – SCAN a SIM. Při SCAN módu jsou registrována hmotnostní spektra v nastaveném rozsahu m/z (využití pro identifikaci); v SIM módu se sleduje intenzita jednoho nebo několika zvolených iontů v čase (o 2 řády nižší mez detekce; využití pro ultrastopovou analýzu). Důležitým parametrem analyzátorů je jejich rozlišovací schopnost (RP). Nízkorozlišovací analyzátoři jsou schopni stanovit molekulovou hmotnost analyzovaných látek s přesností na jednotky či desetiny, vysokorozlišovací systémy umožňují přesnost na 3 až 4 desetinná místa.

Detektor

Detektor registruje ionty po průletu analyzátořem. Tok iontů je tedy převáděn na elektrický signál. Základními typy detektorů jsou elektronový násobič a fotonový násobič.

Datový systém slouží pro sběr dat a rovněž i řízení analýzy a kontrolu všech funkcí přístroje.

Vakuový systém zajišťuje udržení vysokého vakua ($10^{-4} - 10^{-8}$ Pa), které zabraňuje srážce iontu s jinou částicí během celé jeho cesty hmotnostním spektrometrem. Typický vakuový systém hmotnostních spektrometrů bývá dvoustupňový. První stupeň tvoří standardní rotační olejová vývěva, druhý difuzní nebo turbomolekulární čerpadlo.

Hmotnostní spektrometry mohou být spojeny jako tandemové hmotnostní spektrometry (MS/MS). První reakce generuje ionty, z nichž se separuje požadovaný ion, ten se podrobí další reakci a z něj vzniklé ionty jsou analyzovány.

MS je všestranná, rychlá a citlivá analytická metoda, která je často využívána ke kvalitativní i kvantitativní chemické analýze, protože poskytuje velké množství informací o vzorku a jeho složení. Významně napomáhá k identifikaci, určení struktury organické látky i její relativní molekulové hmotnosti. [90, 116]

Hmotnostní spektrum:

- normalizace spekter: hmotnostní spektra jsou obvykle uváděna v normalizovaném tvaru, tzn. nejintenzivnějšímu píku spektra je přiřazena relativní intenzita 100% a intenzity ostatních píků se dopočítávají, kromě grafické formy lze spektrum uvést i v tabelární formě,

- hmotnostní spektrum: osa y = relativní intenzita v %, osa x = poměr hmotnost a náboje (m/z), ve většině případů je náboj roven jedné a potom hodnota na ose x odpovídá přímo hmotnosti iontu.

Spojení GC s MS

Přímé spojení náplňové kolony GC s hmotnostním spektrometrem není možné, neboť velké množství nosného plynu by porušilo vakuum v hmotnostním spektrometru. Mezi chromatografickou kolonu a iontový zdroj se tedy zařazuje molekulový separátor nebo dělič toku, který snižuje množství nosného plynu. Průtok mobilní fáze kapilární kolonou je podstatně nižší, takže konec kapilární kolony lze umístit přímo do iontového zdroje. Nepostradatelné je spojení GC-MS tam, kde se provádějí identifikace neznámých složek směsí. Pro každou složku lze získat její hmotnostní spektrum a identifikovat ji porovnáním jejího spektra s knihovnou spekter sloučenin uloženou v počítači. [116]

V analýze těkavých látek se používají především FID a MS detektory a jejich spojení s GC představuje nejvíce využívané analytické techniky. Spojení GC s hmotnostním spektrometrem (MS – Mass Spectrometr) má nezastupitelný význam v analýze těkavých látek. [90, 116]

3.6.2. Významné teoretické aspekty v plynové chromatografii [108]

3.6.2.1. Záznam chromatogramu

Chromatogram se získá jako grafický záznam závislosti napěťové odezvy detektoru na čase. Ze získaných chromatogramů lze vyhodnotit retenční parametry jednotlivých signálů, plochy a výšky píků atd. Ideální pík má tvar Gaussovy křivky.

3.6.2.2. Důležité pojmy v plynové chromatografii

Retenční objem V_r :

Objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony.

Retenční čas t_r :

Celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně.

Mrtvý objem kolony V_M :

Objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.

Mrtvý čas kolony t_M :

Retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejný čas - mrtvý čas kolony.

Redukovaný retenční čas t'_r :

Čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi.

Důležitou charakteristikou je tzv. kapacitní poměr k_i , který naznačuje, do jaké míry je složka i zadržována na koloně během separace. Kapacitní poměr je přímo úměrný distribuční konstantě dané látky mezi stacionární a mobilní fází.

$$k_i = \frac{(n_i)s}{(n_i)m}$$

také

$$k_i = \frac{t_{r,i} - t_M}{t_M} = \frac{t'_{r,i}}{t_M}$$

kde $(n_i)s$ a $(n_i)m$ jsou množství látky i ve stacionární a mobilní fázi

3.6.2.3. Kvantitativní analýza v plynové chromatografii

Za předpokladu lineární odezvy detektoru je plocha či výška píku úměrná množství látky. To umožňuje určovat množství či koncentraci dané látky v neznámém vzorku. Kvalita kvantitativní analýzy je především ovlivněna přípravou vzorků, správnou funkcí přístroje a kvalitou zpracování dat, s čímž také souvisí správná volba kalibrační metody.

Kalibrační graf

Za určitých podmínek (tj. v oblasti lineární odezvy detektoru) je plocha píku dané komponenty přímo úměrná množství této komponenty ve vzorku. Pro zjištění množství látky ve vzorku je potřeba signál detektoru kalibrovat. V praxi to znamená,

že se změní závislost ploch píků dané látky na množství či koncentraci této komponenty a sestrojí se příslušný graf.

V oblasti lineární odezvy je možné kalibrační přímku vyjádřit:

$$y = a + b \cdot x ,$$

kde:

x je nezávislá proměnná (= koncentrace standardu)

y je závislá proměnná (= odezva), plocha píku

a je úsek na ose y

b je směrnice přímky

Kvantitativní vyhodnocovací metody v plynové chromatografii

■ Metoda vnitřní normalizace

Touto metodou se určuje obsah látek ve směsích, je-li počet komponent relativně nízký a všechny komponenty jsou známy. Tento typ kalibrace se většinou provádí při rutinních stanoveních. Množství určité komponenty se pak vyjadřuje jako relativní frakce z celku. Tedy, v určité směsi je x % látky A , y % látky B , z % látky C atd. Výsledky při použití této metody nezávisí na přesnosti objemu při nástřiku vzorku.

■ Absolutní kalibrace

Touto metodou se určuje absolutní koncentrace nebo absolutní množství látky na základě kalibrační závislosti. Protože u této metody je kritický objem nástřiku, závisí správnost metody na dobré reprodukovatelnosti dávkovaných objemů; často se doporučuje pracovat s autosamplrem.

■ Metoda vnitřního standardu

Při této metodě se ke vzorku přidává určité množství známé látky, tzv. vnitřní standard (internal standard, IS). Tato látka nesmí být přítomna v původním vzorku, nesmí reagovat s žádnou složkou vzorku, musí být dobře oddělena od všech složek v původním vzorku a musí se eluovat v blízkosti stanovované složky. Výhodou metody je to, že není třeba znát přesný objem nástřiku vzorku. Navíc, s použitím IS se eliminuje vliv změn pracovních podmínek, protože jak stanovovaná složka tak IS jsou těmito změnami stejně ovlivněny. Koncentrace složky x ve vzorku lze vypočítat pomocí faktoru citlivosti detektoru f_x (response factor), který je potřeba stanovit kalibrací pro danou komponentu a daný vnitřní standard.

Kalibrační přímka může mít tvar:

$$\frac{A_x}{A_{IS}} = f_x \left(\frac{c_x}{c_{IS}} \right)$$

kde:

A_x je plocha signálu analytu x ve standardním roztoku,

A_{IS} je plocha signálu vnitřního standardu ve standardním roztoku analytu x

f_x je tzv. response factor detektoru

c_x je koncentrace standardního roztoku analytu x

c_{IS} je koncentrace vnitřního standardu ve standardním roztoku analytu x

■ Metoda standardního přídavku

Při použití této metody se ke vzorku přidává známé množství stanovované látky. Z plochy píku látky obsažené ve vzorku a plochy píku po přidání definovaného množství látky ke vzorku lze vypočítat množství látky v původním vzorku. V závislosti na typu komponenty se tento přídavek může provést buď ve formě čisté látky, nebo jako roztok dané látky ve vhodném rozpouštědle. Stanovení může být založeno na jednom nebo několika přídavných známého množství analytu k neznámému vzorku.

3.6.2.4. Kvalitativní analýza v plynové chromatografii

Chromatografie je separační metoda a jako taková neposkytuje informace o struktuře látek ve vzorku. Při kvalitativní analýze v chromatografii se identifikace analytu provádí na základě srovnání retenčních dat analytu a standardu. Retenční data analytu odrážejí specifické interakce analytu se stacionární a mobilní fází. Např. retenční čas lze považovat za specifickou vlastnost analytu v daném chromatografickém systému, a tedy retenční časy mohou sloužit jako prostředek pro identifikaci látek v daném chromatografickém systému. Je však nutno si uvědomit, že retenční čas není neměnnou vlastností analytu, změny chromatografického systému vedou ke změně retenčního času. Také je jasné, že retenční čas sám o sobě nemůže sloužit k identifikaci daného analytu a že bez předchozí částečné znalosti vzorku se retenční čas nedá obecně použít pro identifikaci látek. Existuje vždy předpoklad o identitě, který závisí na předběžné znalosti analytu, efektivnosti systému a použité identifikační metodě. Identifikace neznámých složek se může provést také pomocí speciálních detektorů. V současné době se často používá kombinace plynového chromatografu s hmotnostním detektorem GC-MS.

Přístupy:

■ Identifikace na základě retenčních časů

Při této metodě se srovnává retenční čas neznámé látky s retenčním časem standardu. Standard je látka, u které je známa struktura a jedná se o snahu dokázat, že neznámá látka je s ní identická. Správná identifikace látky na základě srovnání retenčních časů látky a standardu je možné jen tehdy, jestliže podmínky měření obou vzorků jsou stejné.

■ Identifikace látek na základě retenčních indexů

U předchozí metody je potřeba mít známou látku (standard), jejíž retenční parametry jsou srovnávány s retenčními parametry látky neznámé. Toto není při metodě retenčních indexů nutné. U této metody se naopak porovnávají retenční časy neznámé látky s určitou látkou nebo skupinou látek, které slouží jako referentní látky. Neznámá látka se tedy identifikuje na základě srovnání retenčního indexu s retenčními indexy látek známých z literatury.

Nejznámější metodou tohoto typu, která se uplatnila hlavně v plynové chromatografii, je Kovatsova metoda, která pracuje s tzv. Kovatsovým indexem. Retenční čas látky se přepočítá na retenční (Kovatsov) index, který je vztažen na rozsáhlou skupinu referenčních látek. Identifikace neznámé látky (analytu) se pak uskutečňuje na základě srovnání tohoto indexu s indexy známých látek.

Výpočet retenčního indexu (RI):

$$RI = n \cdot 100 + 100 (\log t'_{r,vz} - \log t'_{r,n}) / (\log t'_{r,n+1} - \log t'_{r,n})$$

kde

n je počet atomů uhlíku v nejbližším nižším n -alkanu

$t'_{r,vz}$ je redukovaný retenční čas píku vzorku, analytu

$t'_{r,n}$ je redukovaný retenční čas nejbližšího nižšího n -alkanu

$t'_{r,n+1}$ je redukovaný retenční čas nejbližšího vyššího n -alkanu

V Kovatsově indexovém systému se retenční data chemických komponent naměřené za daných chromatografických podmínek vztahují na homologickou řadu n -alkanů, pro které Kovats definoval retenční indexy následujícím způsobem:

Retenční index n -alkanu se vypočítá jako stonásobek počtu uhlíku v daném n -alkanu; např. retenční index n -propanu je 300; n -butanu 400, n -pentanu 500, atd.

Retenční indexy všech ostatních látek jsou vztaženy k těmto hodnotám a to tak, že např. má-li daná látka za daných podmínek retenční čas mezi *n*-pentanem a *n*-hexanem, bude mít Kovatsův index mezi hodnotami 500 a 600. Podobně, eluuje-li látka mezi *n*-dekanem a *n*-dodekanem, bude mít retenční index v rozmezí 1000 a 1200. Retenční index je charakteristický pro danou látku; závisí však na stacionární fázi a teplotě. Platí, že teplotní závislost je větší pro polární komponenty na polárních fázích ve srovnání s méně polárními látkami na nepolárních fázích. V případě nepolárních fází je retenční index na teplotě téměř nezávislý.

V praxi se Kovatsův index používá následovně: naměřený retenční čas neznámé komponenty a retenční časy *n*-alkanů, které se určily za stejných chromatografických podmínek, se dosadí do Kovatsovy rovnice a vypočítá se Kovatsův index. Identifikace látky se provede na základě srovnání experimentálně zjištěného retenčního indexu s literárními hodnotami.

■ Identifikace na základě relativních retenčních časů

Při této metodě se retenční čas analytu vztahuje na mrtvý čas t_M nebo na retenční čas určité vhodné látky (standardu), která se přidává do vzorku. S použitím relativních retenčních časů se pak eliminuje vliv délky kolony, fluktuace průtoku, teploty apod.

Identifikace směsí

Jsou případy, kdy se chemik nezajímá o určení identity neznámé látky, ale jde mu o identitu směsi jako takové, např. petrochemické frakce. V tomto případě se uplatní metoda „fingerprint“, kdy se srovnává profilové složení vzorku s referenčními směsmi, podle kterého se dá usoudit např. na původ vzorku.

3.6.3. Statistické zpracování dat

3.6.3.1. Linearita [118, 120]

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. analytickým signálem (v tomto případě plochy píků) a koncentrací analytu. Je vyjádřena korelačním a regresními koeficienty.

Lineární závislost dvou náhodných proměnných je matematicky vyjádřena obecným vztahem:

$$y = a + bx ,$$

kde b je směrnice kalibrační přímky a a úsek posunutí.

Pro počet m vzorků známého obsahu analytu x_i se určí odpovídající intenzita signálu y_i , pak pro každou z m naměřených hodnot se vypočítá odchylka od průměru $Y_i = y_i - \bar{y}$ a $X_i = x_i - \bar{x}$, kde \bar{y} je průměr hodnoty y_i , \bar{x} je průměr hodnoty x_i .

Pro lineární závislost se pak může korelační koeficient, který charakterizuje těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných, odhadnout takto:

$$R = \frac{\sum X_i Y_i}{\sqrt{(\sum X_i^2)(\sum Y_i^2)}}$$

Stanovení se provede minimálně pro tři různé koncentrace standardní látky pro jednotlivé analyty. Korelační koeficient nesmí být nižší než 0,98. [94]

3.6.3.2. Opakovatelnost [119, 120]

Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti, Tj. navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí.

Aritmetický průměr

Při opakování analýzy ($n \rightarrow \infty$) získáme soubor rozdílných hodnot x_i , které mají často normální (Gaussovo) pravděpodobnostní rozdělení. Očekávaná hodnota \bar{x} , která v případě normálního rozdělení současně představuje nejčtenější hodnotu, se nejčastěji odhaduje jako aritmetický průměr.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

Směrodatná odchylka

Rozptýlení jednotlivých hodnot x_i okolo průměru \bar{x} je zpravidla charakterizováno hodnotou směrodatné odchylky. Směrodatná odchylka je tedy mírou přesnosti výsledků stanovení.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka udává procentuální rozptyl od střední hodnoty.

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

3.6.3.3. Mez detekce [118, 120]

Mezi detekce (LOD – Limit Of Detection) individuálního analytického postupu je rozuměno obecně nejmenší množství analytu ve vzorku, které je možné detekovat, ale které není nutně kvantifikované jako exaktní hodnota. U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie (h_{\max}) v oblasti dané dvacetinásobkem pološířky píku stanovovaného analytu.

Pro odezvu meze detekce platí:

$$y_D = 3 \cdot h_{\max}$$

a pro koncentraci na mezi detekce:

$$x_D = \frac{y_D}{b_1} ,$$

přičemž směrnice kalibrační přímky b_1 musí vycházet z koncentrační závislosti $y = b_1 x$, kde y je výška chromatografického píku a ne plocha, jak je obvyklé.

3.6.3.4. Mez stanovitelnosti [118, 120]

Mezi stanovitelnosti (LOQ – Limit Of Quantitation) individuálního analytického postupu lze chápat nejnižší množství analytu ve vzorku, které je možné stanovit jako exaktní hodnotu se stanovenou přesností.

U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie (h_{\max}) v oblasti dané dvacetinásobkem pološířky píku stanovovaného analytu.

Pro odezvu meze detekce platí:

$$y_s = 10 \cdot h_{\max} \cdot b_1,$$

a pro koncentraci na mezi detekce:

$$x_s = \frac{y_s}{b_1},$$

přičemž směrnice kalibrační přímky b_1 musí vycházet z koncentrační závislosti $y = b_1 x$, kde y je výška chromatografického píku a ne plocha jak je obvyklé.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Rostlinný materiál

4.1.1. *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum*

Nadzemní části rostliny *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* byly sbírány v období květu v květnu 2007 na dvou lokalitách v centrální Itálii (lokalita 1: Piedilapiaggia, v blízkosti města Camerino, 600 m nad mořem, poloha N43°09'10" E13° 07'18"; lokalita 2: Crispiero, v blízkosti města Castelraimondo, 400 m nad mořem, poloha N43° 11'19" E13° 06'27"). Dokladové exempláře byly identifikovány a uloženy v Herbarium Camerinensis (Ústav environmentálních věd, Sekce botaniky a ekologie, University of Camerino, Itálie) v rámci přístupových kódů CAME13429 a CAME13430, jsou k dispozici také na webových stránkách: <http://erbariitaliani.unipg.it>. Pro headspace analýzu (HS) byl sušený rostlinný materiál upraven za pomoci mixéru (model MFC DCFH48 IKA-WERK) s filtry o průměru 2 mm.

4.1.2. *Teucrium flavum* L. subsp. *Flavum*

Nadzemní části rostliny *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* byly sbírány v období květu v květnu až červnu 2007 a 2008 na skalnatých místech regionu Marche (centrální Itálie): název lokality, Bistocco; GPS souřadnice 43°04'33" N, 13°01'35" E. Rostlinný materiál získaný v roce 2007 byl sušen při pokojové teplotě po dobu jednoho týdne, chráněn před světlem. Zatímco sběr z roku 2008 byl použit jako čerstvý vzorek. Dokladové exempláře byly identifikovány a uloženy v Herbarium Camerinensis (Ústav environmentálních věd, Sekce botaniky a ekologie, University of Camerino, Itálie) v rámci přístupového kódu CAME13412, jsou k dispozici také na webových stránkách: <http://erbariitaliani.unipg.it>. Pro SPME analýzu byl sušený i čerstvý materiál (kvetoucí nadzemní části, listy, stonky a květy) upraven pomocí mixéru MFC model DCFH 48 IKA-WERK (IKA, Staufen, Německo) s filtry o velikosti 1, 1,5 a 2 mm v průměru. Kromě toho, byly k SPME extrakci použity zvlášť celé sušené a čerstvé květy a také jednotlivé části květů (kalich, koruna).

4.2. Chemikálie

4.2.1. *Melittis melissophyllum* L. subsp. *Melissophyllum*

Standardy byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Milán, Itálie).

Jednalo se o 1-okten-3-ol, hexadekanová kyselina, oktadekan, heneikosan, trikosan, tetrakosan, pentakosan, heptakosan, nonakosan, benzacetaldehyd, kumarin, α -pinen, sabinen, γ -terpinen, terpinolen, linalool, terpinen-4-ol, α -terpineol, (E)- β -ionon, (E)-karyofylen, α -humulen, karyofylen oxid, α -bisabolol, globulol, fytol. Pro extrakci byl použit hexan (Carlo Erba ,Milán, Itálie), analytické činidlo Na₂SO₄ (J.T. Baker, Deventer, Holandsko).

4.2.2. *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*

K analýze byly použity tyto referenční sloučeniny; tj. α -pinen, kamfen, sabinen, β -pinen, myrcen, *p*-cymen, limonen, terpinolen, linalool, oktanal, 1,8-cineol, γ -terpinen, kafr, (-)-verbenon, nerol, (-)-karvon, isobornyl acetát, dodekanal, terpinen-4-ol, α -terpineol, α -kopaen, α -gurjunen, (E) karyofylen, α -humulen, allo-aromadendren, dodekanol, germacren D, α -zingiberen, (E)-nerolidol, spathulenol, α -bisabolol, karyofylen oxid, hexahydrofarnesyl aceton, 1-okten-3-ol, hexadekanová kyselina, *n*-alkany (C7-C30), benzaldehyd, *p*-vinylanisol, eugenol.

Byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich/Milán, Itálie). Všechny sloučeniny měly statut (kvalitu) analytického standardu.

4.3. Metody izolace, extrakce a zakoncentrování těkavých látek

4.3.1. Destilace s vodní parou (SD)

4.3.1.1. *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum*

Destilace s vodní parou byla použita za účelem získání silice.

Nadzemní části rostliny (120 – 193 g) byly sušeny při pokojové teplotě, chráněny před světlem, po dobu jednoho týdne. Dále byly zpracovány na malé části a umístěny v baňce obsahující 2,4 – 3,8 l vody. Poté proběhla destilace s vodní parou po dobu 4 hodin (přístroj typ - Clevenger), bylo přidáno 10 ml hexanu pro zachycení těkavých složek. Po destilaci bylo rozpouštědlo eliminováno proudem N₂ a olej vysušen bezvodým Na₂SO₄. Olej byl uložen v uzavřených lahvičkách v –20°C, chráněn před světlem a připraven pro GC-FID a GC-MS analýzy. Každý vzorek byl rozdělen na tři části, každá část byla destilována a analyzována pomocí GC-FID a GC-MS. Výtěžek oleje byl (w/w, 0,02 – 0,04%) vztaženo na sušinu. Olej měl žlutou barvu a typickou houbovou vůni.

4.3.1.2. *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*

Destilace s vodní parou, za účelem získání silice (ze sušených a čerstvých nadzemních částí rostliny), byla provedena za použití zařízení typ – Clevenger (Ciro Donati, Řím, Itálie) po dobu 3 h. Pro zachycení těkavých složek byl použit hexan (3 ml). Silice byly vysušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo odpařeno pomocí proudu N₂. Poté byly uloženy v uzavřených lahvičkách v –20°C, chráněny před světlem a připraveny pro GC/FID a GC/MS analýzy (Agilent, Santa Clara CA, USA). Ze tří různých vzorků pocházejících ze sběrného místa byly destilací získány tři těkavé frakce. Výtěžek silice (w/w, 0,02 – 0,05%) vztaženo k sušině. Silice měla typickou ovocnou vůni.

4.3.2. SPME analýza

4.3.2.1. *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*

Křemičitá vlákna pro SPME analýzu i manuální SPME přístroj byly zakoupeny od Supelco (Bellefonte, PA, USA). Testována a následně porovnána byla tři vlákna: polydimethylsiloxan (PDMS, 100 µm), polydimethylsiloxan-divinylbenzen (PDMS/DVB, 65 µm) a Stableflex divinylbenzen-carboxen-polydimethylsiloxan (DVB/CAR / PDMS, 50/30 µm). Pro optimalizaci podmínek extrakce byly zvoleny tyto faktory: extrakční teplota, extrakční čas, velikost částic, desorpční čas a množství vzorku rostlinného materiálu. Plášť všech SPME vláken byl dlouhý 1 cm. Před GC/FID a GC/MS analýzou, bylo každé vlákno stabilizováno v injektoru GC, podle pokynů uvedených výrobcem.

Sušený i čerstvý rostlinný materiál (požadované množství kvetoucích nadzemních částí, listů, stonků a květů; jeden samotný celý květ, kalich a koruna) byl hermeticky uzavřen ve 4 ml lahvičce opatřené polypropylenovým víčkem s otvorem vyplněným PTFE/silikon septem (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a následně umístěn (ekvilibrován) v termostatické lázni požadované teploty. Před vzorkováním byly jak samotný květ, tak i jednotlivé květní části zváženy (tři stanovení) a vypočítán průměr. Poté byl do uzavřené lahvičky vložen pomocí manuální penetrace septa jehlou SPME přístroj. Dále došlo k vysunutí vlákna a jeho vystavení v prostoru nad rostlinným materiálem (headspace) po zvolenou dobu, tzv. extrakční čas.

Při optimalizaci podmínek SPME analýzy bylo pracováno: s množstvím (5 – 100 mg) zkoumaného vzorku, při teplotě (20 až 90°C). Po určité extrakční době (5 – 60 min), byla vlákna opět vtažena do jehly, vysunuta z lahvičky skrze septum a vložena přímo do injektoru GC chromatografu. Desorpce

analytů z vlákna byla provedena zahřátím v místě nástřiku při teplotě 280°C po dobu 1 – 5 min (desorpční čas).

Poté došlo k přenosu analytů přímo na chromatografickou kolonu za účelem instrumentální analýzy. Vždy před odběrem vzorků bylo každé vlákno čištěno, tj. na 5 min vloženo do GC injektoru při teplotě 280°C.

Při srovnávací analýze (SPME vs destilace s vodní parou) byly experimentální podmínky stanoveny následovně: extrakční teplota, 60°C; extrakční čas, 30 min, velikost částic, 1 mm (sušený materiál) a 2 mm (čerstvý materiál); přídavek vody, 60 µl, desorpční čas, 3 min (při 250 °C v režimu splitless – bez děliče toku).

Pro každou zkoumanou část byla SPME analýza provedena ve třech vyhotoveních. Po odběru vzorku byl SPME přístroj okamžitě vložen do GC injektoru a vlákno tepelně desorbováno. Před každým dalším odběrem vzorku byla vždy potřeba rekondice (vyčištění) vlákna v GC chromatografu, jako tzv. „slepý“ vzorek.

4.4. Separační a analytické metody

Analýzy obou rostlinných materiálů byly provedeny na stejných přístrojích, za shodných chromatografických podmínek. Při výzkumu těkavých látek z *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* předcházela GC analýze také SPME (viz výše). Pro studium těkavých látek z *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* (1-okten-3-olu) byl použit headspace vzorkovač spojený s plynovým chromatografem (viz níže).

4.4.1. GC-FID

GC/FID analýza těkavých složek byla provedena za použití přístroje Agilent 4890D s plameno-ionizačním detektorem (FID). Látky byly separovány na HP-5 kapilární koloně (5% phenylmethylpolysiloxan, 25 m, 0.32 mm i.d.; 0,17 µm tloušťka vrstvy) (J & W Scientific, Folsom, CA, USA), s následujícím teplotním programem: 60°C po dobu 5 min, následně nárůst teploty 4°C /min do 220°C, dále 11°C /min do 280°C, poté ponecháno 15 min; teplota injektoru a detektoru byla 280°C (250°C pro SPME); nosný plyn, helium (1.4 ml /min), objem nastříknutého vzorku 1 µl, dělicí poměr 1:34, bez děliče toku (pro SPME). Směs alifatických uhlovodíků (C₈-C₃₀) (Sigma, Milán, Itálie) v hexanu byla přímo zavedena do vstříkovače GC nebo na SPME vlákno a aplikována pod výše uvedeným teplotním programem, za účelem výpočtu retenčních indexů (Kovats indexů) každé extrahované sloučeniny získané jak pomocí SD tak HS-SPME. Všechny GC/FID analýzy byly provedeny třikrát.

4.4.2. HS-GC

Za účelem analýzy 1-okten-3-olu v rostlinném materiálu *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* byla provedena analýza headspace (HS) pomocí Agilent 7694E headspace vzorkovače spojeného s plynovým chromatografem (Agilent 4890D). Tři rostlinné vzorky (0,5 g,) byly umístěny v 10-ml headspace lahvičkách a analyzovány takto: inkubační čas, 30 min; čas natlakování, 20 s; čas naplnění smyčky, 20 s; čas ustanovení rovnováhy (vyrovnání) dávkovací smyčky, 5 s; čas nástřiku, 1 min; tlakovací plyn, Helium; inkubační teploty (°C), 40, 60, a 80; teploty smyčky (°C), 50, 70, 90; teploty převodní linky (°C), 70, 90, 110. Každá analýza byla provedena třikrát. Byla použita kapilární kolona Innowax (30 m, 0,32 mm i.d., 0,25 µm tloušťka vrstvy) (J & W Scientific, Folsom), teplotní program: 60 °C po dobu 5 min, poté nárůst teploty 3°C/min do 200°C, dále 10°C/min do 240°C ponecháno po dobu 10 min; teplota injektoru a detektoru, 280°C; nosný plyn, helium (1,4 ml/min); režim split-less (bez děliče toku). Identita 1-okten-3-olu byla potvrzena, co-injekcí standardu, přičemž jeho procentuální podíl byl získán elektronickou integrací pomocí FID. Pozitivní kontrola byla provedena pomocí vzorku těkavá frakce (silice) z lokality 1 získaného destilací s vodní parou (inkubační teplota 40°C).

4.4.3. GC-MS

GC/MS analýza byla provedena pomocí plynového chromatografu Agilent 6890N s hmotnostním spektrometrem 5973N. Přístroj je vybaven kapilární kolonou HP-5ms (5% phenylmethylpolysiloxan, 30 m, 0,25 mm id, 0,1 µm tloušťka vrstvy) (J & W Scientific, Folsom). Teplotní program GC byl naprogramován takto: 60°C po dobu 5min, poté nárůst teploty 4°C/min do 220°C, dále 11°C /min do 280°C, ponecháno 15 min a nakonec 11°C/min do 300°C, ponecháno po dobu 5 min; nosný plyn: helium; průtoková rychlost: 1,0 ml/min, teplota injektoru a převodní linky: 280°C (250°C pro SPME); objem nástřiku vzorku: 2 µl; dělicí poměr: 1: 50; bez děliče toku pro SPME, čas skenování: 75 min; získaný hmotnostní rozsah (range): 29 – 400 m/z. Všechna hmotnostní spektra byla získána v režimu elektronového dopadu EI s ionizačním napětím 70 eV.

4.5. Identifikace a kvantifikace těkavých látek

4.5.1. *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum*

Identifikace těkavých látek byla založena na počítačovém porovnání s knihovny WILEY275, NIST05 a ADAMS a také na základě srovnání hmotnostních spekter a retenčních indexů (RI) [13] uvedených v literatuře. [1, 35] Kromě toho byla použita domácí knihovna, vytvořená na základě analýzy referenčních silic a komerčně dostupných standardů. Pokud to bylo možné, byly komponenty identifikovány na základě srovnání jejich retenčních časů, hmotnostních spekter a retenčních indexů vztaženo na n-alkany, se standardy dostupnými v laboratoři. Procentuální zastoupení siličných složek bylo získáno elektronickou integrací za použití plamenově ionizační detekce (FID, 280°C), rozdělením plochy každé složky podle celkové plochy všech složek izolovaných za těchto podmínek. Procentuální hodnoty těkavých složek byly průměrem ze tří stanovení.

4.5.1.1. Kvantifikace 1-okten-3-olu v silici

Množství 1-okten-3-olu v silici bylo zjištěno metodou násobku standardního přídávku. [12] (Tab. 8) Znamé množství analytu (0,05, 0,1, 0,2 mg) bylo přidáno ke vzorku silice, byl vytvořen graf závislosti naměřené plochy píku k množství přídávku. Každý příravek byl proveden třikrát. Průsečík regresní přímky s osou znamenající množství přídávku značí množství analytu (mg) v původním siličném vzorku.

Amount of 1-octen-3-ol added (mg)	Peak area	Average area	SD	CV%
0	22912.0000	23685.6667	1615.9487	6.8225
	22602.0000			
	25543.0000			
0.05	37100.0000	39555.0000	3053.3491	7.7192
	38591.0000			
	42974.0000			
0.1	65341.0000	66482.0000	4106.1687	6.1764
	63067.0000			
	71038.0000			
0.2	113614.0000	105801.6667	6841.3174	6.4662
	102910.0000			
	100881.0000			
<i>Linear regression</i>				
Correlation coefficient <i>r</i>	0.997			
Slope <i>a</i>	420,545			
Intercept <i>b</i>	21,856			

Tab. 8: Analýza těkavé frakce (silice) *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* (lokalita1) pro 1 - okten-3-ol, s použitím metody násobku standardního přídávku [45]

4.5.2. *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*

Systém identifikace těkavých složek z *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* byl shodný jako u *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* (viz výše).

Bylo-li to možné, látky byly také identifikovány porovnáním retenčních časů chromatografických píků se standardy (dostupné v laboratoři), při stejných podmínkách analýzy. Relativní množství těkavých látek, vyjádřená v procentech, byla získána normalizací FID ploch píků (průměr z pěti opakování), na základě výpočtu faktoru odezvy (RF) na FID pro osm různých skupin těkavých látek (viz Tab. 9).

Vzhledem k velkému počtu identifikovaných složek a nedostupnosti obchodních standardů pro mnohé z nich, byl u sloučenin z každé z osmi skupin předpoklad, že mají stejný kvantitativní GC korekční faktor. Standardní sloučeniny, zastupující stanovené chemické třídy, byly vybrány z těch dostupných v laboratoři (Tab. 9). Pro vyšší spolehlivost byl, dle možností použit více než jeden standard pro každou třídu. Bylo připraveno pět replik, směsí se stejným množstvím vnitřních standardů (oktanu a oktadekanu) a reprezentativních sloučenin; jejich konečné koncentrace byly v rozsahu 0,35-0,40 mg mL⁻¹, s přihlédnutím na čistotu stanovenou pro každou z nich na GC/FID. Korekční faktor 1 byl předpokládán pro sloučeniny, které nebyly členy žádné z těchto tříd. Faktory odezvy (RFs) představovaly takové faktory odezvy (které byly samy o sobě průměrem pěti běhů) vytvořené každou standardní sloučeninou v rámci chemické třídy.

Použitý vzorec byl $RF = C_{\text{analyte}} / [(A_{\text{analyte}} / A_{\text{is}})] \times C_{\text{is}}$, kde C_{analyte} je koncentrace standardu představující chemickou skupinu (např. β -pinen pro monoterpenické uhlovodíky), A_{analyte} jeho absolutní plocha píku, A_{is} je průměr absolutních ploch píků oktanu a oktadenu a C_{is} jejich koncentrace.

Použitím obecného faktoru odezvy pro sloučeniny v rámci osmi tříd mohou být odvozené kvantitativní údaje považovány za přiblížení absolutní kvantifikace.

Grouped compounds	Mean \pm SD	RF
Terpenoids		
<i>Monoterpenes hydrocarbons</i>		
β -Pinene	1.04 \pm 0.01	1.09 \pm 0.06
Limonene	1.15 \pm 0.01	
γ -Terpinene	1.04 \pm 0.01	
<i>p</i> -Cymene	1.14 \pm 0.01	
<i>Oxygenated monoterpenes</i>		
1,8-Cineole	1.29 \pm 0.01	1.36 \pm 0.09
Linalool	1.33 \pm 0.01	
Camphor	1.32 \pm 0.01	
Terpinen-4-ol	1.29 \pm 0.01	
Verbenone	1.42 \pm 0.01	
Nerol	1.53 \pm 0.01	
Carvone	1.35 \pm 0.01	
<i>Sesquiterpenes hydrocarbons</i>		
(<i>E</i>)-Caryophyllene	1.11 \pm 0.01	1.11 \pm 0.00
α -Humulene	1.11 \pm 0.01	
<i>Oxygenated sesquiterpenes</i>		
Caryophyllene oxide	1.20 \pm 0.01	1.20 \pm 0.00
Aliphatics		
<i>Alcohols</i>		
1-Octen-3-ol	1.30 \pm 0.01	1.38 \pm 0.11
Dodecanol	1.45 \pm 0.01	
<i>Esters</i>		
Isobornyl acetate	1.39 \pm 0.01	1.39 \pm 0.01
Isobornyl isovalerate	1.38 \pm 0.01	
<i>Aldehydes</i>		
Octanal	1.50 \pm 0.01	1.49 \pm 0.03
Dodecanal	1.47 \pm 0.01	
Aromatics		
Benzaldehyde	1.28 \pm 0.01	1.32 \pm 0.05
<i>p</i> -Vinylanisole	1.36 \pm 0.01	

Tab. 9: Hodnocení (stanovení) GC-FID faktoru odezvy (RF) pro různé skupiny těkavých látek obsažených v *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* [53]

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

S ohledem na zvyšující se popularitu metody SPME roste také možnost jejího využití při analýze přírodních látek. Zásadní význam má fyzikální a chemická charakteristika studovaných složek. Tento aspekt je důležitý jednak pro proces vzorkování a dále také pro výběr vhodné analytické separační techniky. Výhodou SPME metody je možné použití jak v kombinaci s GC tak HPLC. Proto také SPME našla uplatnění v mnoha oborech lidské činnosti. Jedná se o průmysl farmaceutický, kosmetický (např. analýza parfémů), potravinářský (analýza jídla, nápojů), toxikologii (např. analýza látek v tělních tekutinách), forenzní analýzu, chemickou ekologii (např. feromony), obor životního prostředí (analýza vody, ovzduší, půdy), mikrobiologii. [150, 151]

Vzhledem k širší možnosti využití SPME a GC v analýze přírodních látek byla tato práce zaměřena na oblast botaniky a ekologie, konkrétně na analýzu těkavých látek z rostlin.

Byla provedena analýza těkavých látek dvou druhů rostlin z čeledi *Lamiaceae*, *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* a *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*. Obě rostliny byly jednak destilovány s vodní parou za účelem extrakce látek, získu těkavé frakce (silice) a následně analyzovány pomocí GC-FID, GC-MS. Destilací s vodní parou rostliny *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* byla objevena zajímavá skutečnost a to výrazně zvýšené množství látky 1-okten-3-ol v silici. Proto byla dále také provedena kvantifikace této komponenty a to pomocí HC-GC. Při analýze těkavých látek rostliny *Teucrium flavum* byla použita extrakční technika SPME následovaná GC-FID a GC-MS. Výzkum byl zaměřen na optimalizaci parametrů SPME analýzy a také na srovnání této metodiky s destilací s vodní parou (SD).

Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum

Analýza těkavé frakce (silice)

Dříve byla analyzována silice z *M. melissophyllum* subsp. *albida* z Řecka [15], s hlavními složkami: terpineol (17,1 %), chrysanthenyl acetát (12,3 %) a karyofylen oxid (10,8 %). Silice z *M. melissophyllum* subsp. *melissophyllum* byla studována ve Španělsku [18]. Hlavními složkami byly 8,11,14-eicosatrienová kyselina (29,1 – 31,4 %) a hexadekanová kyselina (10,9 – 21,4 %) a to jak v čerstvých tak v sušených vzorcích. 1-okten-3-ol byl zjištěn v malém množství, viz níže.

Složení silice *M. melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* z Itálie je uvedeno (Tab. 10). Bylo identifikováno 48 komponent, což představuje 94,7 – 95,0 % studované silice. Hlavní komponenta byla „houbová“ sloučenina 1-okten- 3-ol,

představující 43,6 – 54,2 % (vypočteno na základě plochy píku 1-okten-3-ol/celková plocha piků) silice (obr. 12), a jejíž hmotnostní spektrum je uvedeno na obr. 13. Na základě údajů z literatury je toto doposud největší zjištěné množství 1-okten-3-olu v silici. Další látky přispívající k charakteristické houbové vůni jsou 3-oktanol a 3-oktanon. Ty byly přítomny v silici v omezeném množství (0,5 – 0,6 % resp. 0,3 %). Alifatické sloučeniny tvořily více než dvě třetiny (71,9 – 75,4 %) složek silice, alkoholy byly hlavní frakcí (44,4 – 56,0 %). Druhá nejčastější sloučenina byla alifatická hexadekanová kyselina (9,0 – 11,3 %). Terpeny představovaly menší podíl (16,6 – 20,7 %). Linalool (1,9 – 2,3 %), (E)-karyofylen (1,3 – 3,0 %) fytol (3,8 – 4,6 %), jakožto nejvýznamnější zástupci monoterpenů, seskviterpenů resp. diterpenů. Ve srovnání s dříve publikovanými výsledky analýzy silice, ovšem ze Španělska [18], je možné vidět kvalitativní a kvantitativní rozdíly obsahových látek. Vzorky ze Španělska obsahují pouze 28 oproti 48 zjištěných komponent v této studii. 8,11,14-eicosatrienová kyselina, která byla nejhojnější složkou (29,1 – 31,4 %) ve španělských vzorcích, nebyla zde vůbec detekována ve vzorku silice. Zatímco 1-okten-3-ol, zde převládající (43,6 – 54,2 %), byl přítomen jen v malém množství (3,9 %) a ve stopovém množství (< 0,1 %), v čerstvých resp. sušených španělských vzorcích. Fytol a spathulenol, dvě hlavní složky v sušených španělských vzorcích (16,0 % resp. 5,2 %), byly přítomny v menším množství (3,8 – 4,6 % resp. 0,3 %). Pro zjištění koncentrace 1-okten-3-olu byla použita metoda násobku standardního přídatku: výsledky ukázaly koncentraci v rozmezí 260 – 323 mg analytu/g silice (nižší než byla vypočítána z poměru plochy píku vztaženého k ploše celého chromatogramu). Vztah mezi množstvím (x) a plochou píku (y) 1-okten-3-olu je uveden v tab. 8 (viz výše).

Lineární regresní rovnice byla $y = 420,545 x + 21,856$ ($r = 0,997$); relativní směrodatná odchylka (RSD) v rozmezí od 6,17 % do 7,71 % ($n = 3$).

1-okten-3-ol

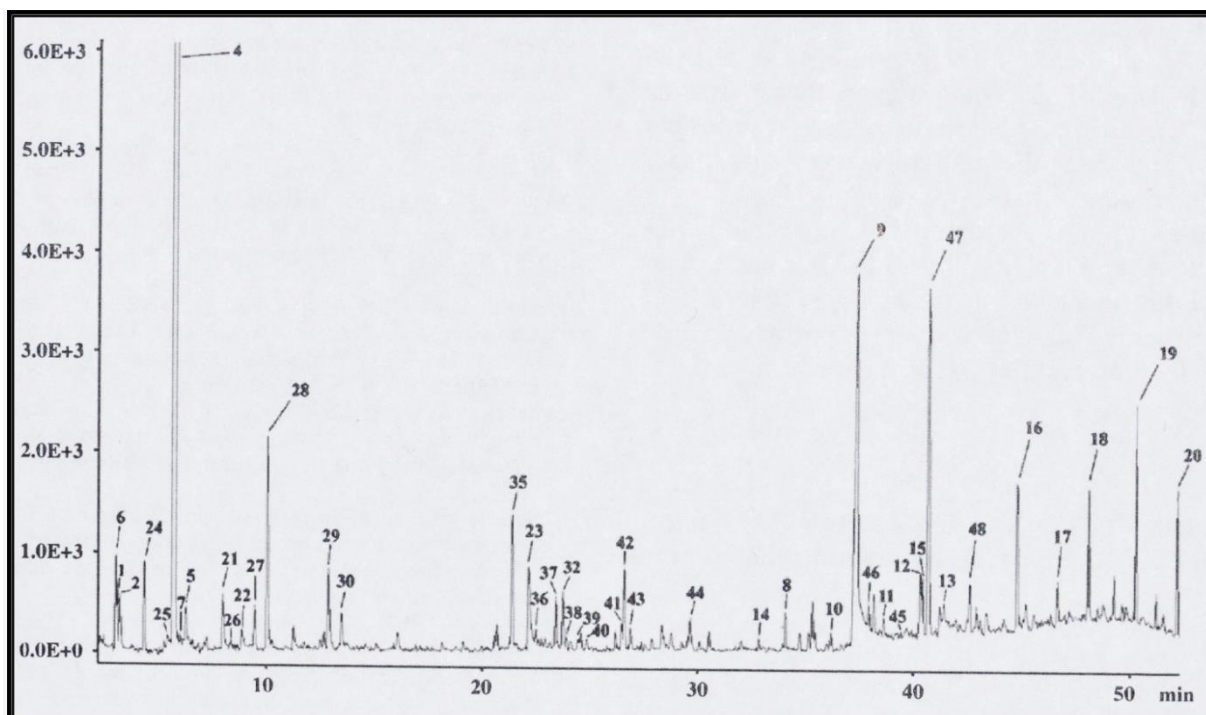
Pro zjištění, zda vysoká koncentrace 1-okten-3-olu je přítomna v rostlině jako taková, nebo byla vytvořena během extrakčních procedur, byla dále studie zaměřena na hodnocení hladiny 1-okten-3-olu v rostlině metodou HS-GC. Na obr. 14 jsou znázorněny 3 chromatografické profily sušeného rostlinného materiálu analyzovaného metodou HS-GC za použití 3 inkubačních teplot. Na základě výsledků je možné vidět, že 1-okten-3-ol není detekován při teplotě 40°C; procentuální podíl při 60°C byl 1,3 %, zatímco při teplotě 80°C dosáhl 7,5 %. Nicméně, toto procentuální zastoupení bylo mnohem nižší než při destilování silice (43,6 – 54,2 %), množství 28,0 % bylo také zjištěno pozitivní kontrolou (silice, inkubována při 40°C a analyzována HS-GC).

Všechny tyto údaje naznačují, že vysoké teploty (okolo 100°C) a vlhké prostředí patrně způsobují v rostlinném materiálu hydrolytické / oxidativní reakce, mající za následek zvýšení množství 1-okten-3-olu.

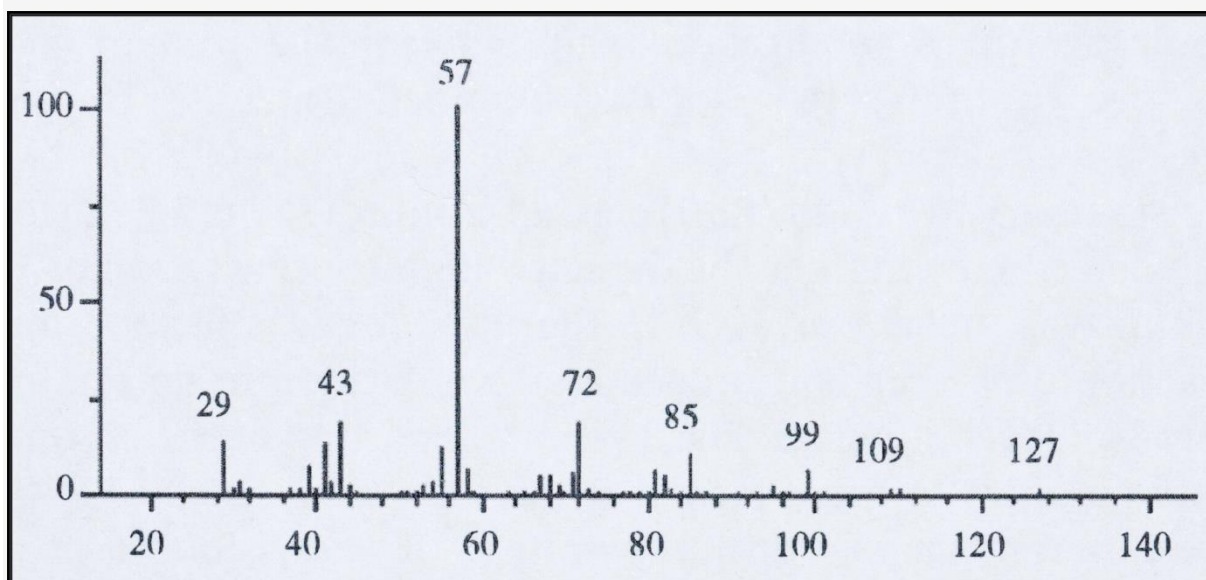
No.	Compounds ^a	RI ^b	Peak area (%) ^c		Identification methods ^d
			Site 1	Site 2	
<i>Alcohols</i>					
1	(3Z)-Hexenol	860	0.2	0.4	MS, RI
2	(2Z)-Hexenol	870	0.1	0.7	MS, RI
5	Hexanol	872	Tr ^f	Tr	MS, RI
4	1-Octen-3-ol ^e	983	43.6	54.2	MS, RI, std
5	3-Octanol	1000	0.5	0.6	MS, RI
<i>Aldehydes and chetons</i>					
6	(2E)-hexenal	854	1.0	0.5	MS, RI
7	3-Octanone	992	0.3	0.3	MS, RI
8	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	1843	0.7	0.4	MS, RI
<i>Acids</i>					
9	Hexadecanoic acid	1973	11.3	9.0	MS, RI, std
<i>Esters</i>					
10	Methyl hexadecanoate	1922	0.3	0.2	MS, RI
11	isopropyl hexadecanoate	2026	-	0.2	MS, RI
12	Methyl linolenate	2095	0.6	0.7	MS, RI
13	Ethyl linoleate	2146	3.0	1.0	MS, RI
<i>Alkanes</i>					
14	Octadecane	1800	Tr	0.2	MS, RI, std
15	Heneicosane	2100	0.7	0.6	MS, RI, std
16	Tricosane	2300	2.5	1.5	MS, RI, std
17	Tetracosane	2400	0.3	0.9	MS, RI, std
18	Pentacosane	2500	1.6	1.4	MS, RI, std
19	Heptacosane	2700	2.9	1.5	MS, RI, std
20	Nonacosane	2900	2.2	1.1	MS, RI, std
<i>Aromatics</i>					
21	Benzene acetaldehyde	1052	0.6	1.2	MS, RI, std
22	Acetophenone	1075	-	0.3	MS, RI
<i>Phenols</i>					
23	Coumarin	1439	1.6	1.6	MS, RI, std
<i>Monoterpene hydrocarbons</i>					
24	α -Pinene	933	1.1	0.7	MS, RI, std
25	Sabinene	974	0.4	0.1	MS, RI, std
26	γ -Terpinene	1063	-	0.2	MS, RI, std
27	Terpinolene	1089	0.1	0.5	MS, RI, std
<i>Oxygenated monoterpenes</i>					
28	Linalool	1102	1.9	2.2	MS, RI, std
29	Terpinen-4-ol	1179	0.3	1.1	MS, RI, std
30	α -Terpineol	1192	0.3	0.5	MS, RI, std
31	cis-Chrysanthenyl acetate	1265	0.4	-	MS, RI
32	[E]- β -Ionone	1487	0.8	0.7	MS, RI, std
<i>Sesquiterpene hydrocarbons</i>					
33	β -Bourbonene	1381	0.1	-	MS, RI
34	β -Elemene	1390	0.4	-	MS, RI
35	(E)-Caryophyllene	1414	3.0	1.3	MS, RI, std
36	α -Humulene	1450	0.4	0.3	MS, RI, std
37	Germacrene D	1477	1.8	0.7	MS, RI, std
38	Bicyclogermacrene	1492	0.3	0.2	MS, RI
39	(E,E)- α -Farnesene	1509	0.5	0.2	MS, RI
40	δ -Cadinene	1522	0.3	0.2	MS, RI
<i>Oxygenated sesquiterpenes</i>					
41	Spathulenol	1575	0.4	0.3	MS, RI, std
42	Caryophyllene oxide	1579	1.7	0.9	MS, RI, std
43	Globulol	1588	-	0.4	MS, RI, std
44	α -Bisabolol	1684	0.9	0.5	MS, RI, std
<i>Diterpene hydrocarbons</i>					
45	Abietatriene	2055	0.1	Tr	MS, RI
<i>Oxygenated diterpenes</i>					
46	Manool oxide	1997	0.2	0.6	MS, RI
47	Phytol	2111	4.6	3.8	MS, RI, std
48	2-Keto-manool oxide	2213	0.9	1.1	MS, RI
Total identified			94.7	95.0	

^a Compounds belonging of each classes are listed in order of their elution from a HP-5 column.
^b RI, retention indices as determined on HP-5 column using homologous series of C8-C30 alkanes.
^c Percentage values were the mean of three determinations with a RSD in the range of 2-10%.
^d Identification methods: MS, by comparison of the mass spectrum with those of the computer mass libraries Wiley, NIST 05 and ADAMS; RI, by comparison of RI with those reported from Adams (2007) and Davies (1990); std, by comparison of the retention time, mass spectrum and retention index of authentic standard.
^e Quantified by the multiple standard addition method: 260-323 mg analyte/g of essential oil.
^f Tr, traces (mean value below 0.1%).

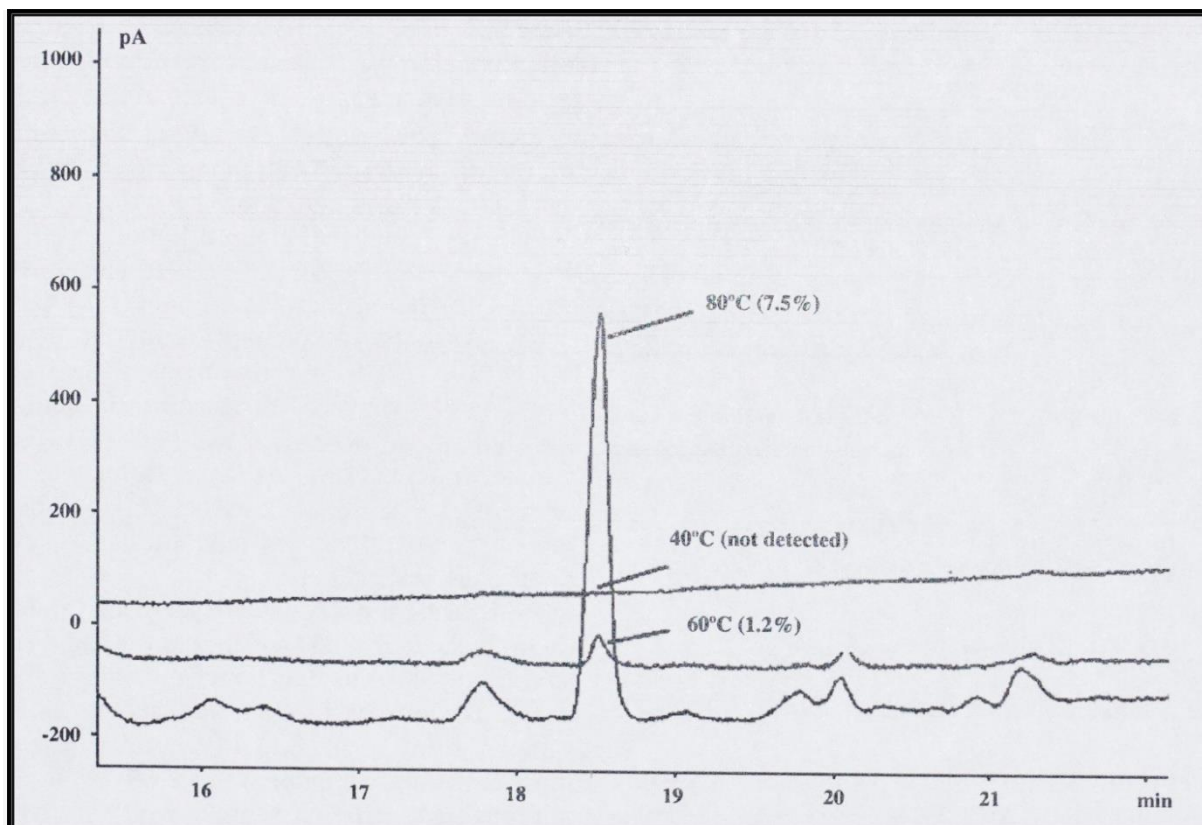
Tab. 10: Složení silice *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* z centrální Itálie [45]



Obr. 12: GC-FID chromatogram těkavých látek silice získané destilací s vodní parou z *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* z centrální Itálie (vzorek z lokality 2). čísla píků odpovídají identifikaci látek uvedených v tbl. 10 [45]



Obr. 13: hmotnostní spektrum 1-octen-3-olu [45]



Obr. 14: HS-GC profil 1-okten-3-olu získaného za třech různých extrakčních podmínek na sloupci Innowax (vzorek z lokality1); procentuální zastoupení získáno z elektronické integrace pomocí FID. [45]

Teucrium flavum L. subsp. *flavum*

Literatura uvádí chemickou charakterizaci různých silic z rostlin rodu *Teucrium*: *T. scorodonia* [29], *T. lusitanicum* a *T. algarbiensis* [48], *T. leucocladum* [50], *T. fruticans* [49], *T. royleanum* [57], za použití destilace s vodní parou a plynové chromatografie-hmotnostní spektrometrie (GC-MS). Je jen velmi málo studií zabývajících se silicí *Teucrium flavum*: jedna z Íránu [30], jedna ze Srbska a Černé Hory [31], dvě z Řecka [32, 33] a jedna z Itálie [34]. Pouze v poslední jmenované práci se jedná o subsp. *flavum*. V listech byly zjištěny jako hlavní těkavé látky trans-4-methoxyskořicová kyselina a borneol, v listenech borneol a α -pinen, v kalichu β -kubeben a α -farnesen, v koruně trans-4-methoxyskořicová kyselina. Je však třeba uvést, že v této studii [34] hodnocené látky byly extrahovány z rostlinného materiálu chloroformem a tudíž byly získány i některé s vysokým bodem varu, jako jsou deriváty aromatických kyselin, které nemohou být v pravém smyslu slova považovány za komponenty silic. Ze studií výše citovaných je vidět, že mezi těkavými látkami dominují seskviterpeny. (E)-karyofylen a germakren D jsou hlavními složkami ve

vzorcích z Íránu a Řecka [30,32], karyofylen a 4 - vinyl guajakol v druhé řecké studii [33], a β -bisabolen je hlavní složkou ve vzorku ze Srbska a Černé hory [31].

Pro extrakci těkavých sloučenin z *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* byly použity dvě techniky: destilace s vodní parou (SD) a HS-SPME. Pro SD byla použita celá nadzemní kvetoucí část rostliny. HS-SPME byla provedena jednak na celé kvetoucí nadzemní části rostliny, ale také zvlášť na listech, stoncích a květech. Byla provedena také analýza jednotlivého květu i jeho samotných částí (kalichu a koruny).

Analýza těkavé frakce (silice)

Složení silic získaných ze suchých a čerstvých nadzemních částí *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* je uvedeno v tab. 11.

Component ^b	RI ^c	HD ^a		SPME ^a		Identification methods ^d
		Dry	Fresh	Dry	Fresh	
(2E)-Hexenal	857	t	1.4 ± 1.1	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	MS, RI
n-Hexanol	872	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	MS, RI
α-Thujene	922	–	t	–	–	MS, RI
α-Pinene	933	5.3 ± 0.4	4.5 ± 1.4	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.1	MS, RI, std
Camphene	949	t	t	–	–	MS, RI, std
Benzaldehyde	953	–	t	0.1 ± 0.0	t	MS, RI, std
Sabinene	969	t	t	–	–	MS, RI, std
β-Pinene	976	4.5 ± 0.5	3.1 ± 1.2	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.1	MS, RI, std
1-Octen-3-ol	984	2.9 ± 0.2	4.8 ± 0.8	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.0	MS, RI, std
Myrcene	993	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS, RI, std
3-Octanol	1002	–	0.1 ± 0.1	–	–	MS, RI
(2E,4E)-Heptadienal	1007	0.1 ± 0.1	t	–	–	MS, RI
p-Cymene	1024	t	t	–	–	MS, RI, std
Limonene	1031	3.5 ± 0.6	3.0 ± 0.9	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	MS, RI, std
(Z)-β-Ocimene	1045	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS, RI
Benzene acetaldehyde	1054	t	t	–	–	MS, RI
(E)-β-Ocimene	1056	t	0.1 ± 0.1	t	t	MS, RI
Isopentyl butanoate	1069	t	t	–	–	MS, RI
3,5-Octadien-2-one	1084	–	–	t	–	–
Terpinolene	1089	t	t	–	–	MS, RI, std
Linalool	1103	7.6 ± 0.9	7.8 ± 1.2	4.0 ± 0.2	3.4 ± 0.0	MS, RI, std
Nonanal	1109	1.1 ± 0.0	1.0 ± 0.1	t	0.2 ± 0.0	MS, RI
n-Amyl isovalerate	1113	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.0	t	MS, RI
β-Thujone	1119	0.5 ± 0.4	–	–	–	MS, RI, std
1-Octen-3-yl acetate	1121	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	MS, RI
α-Campholenal	1124	t	–	–	–	MS, RI
3-Octanol, acetate	1134	t	t	1.0 ± 0.1	0.1 ± 0.0	MS, RI
trans-Pinocarveol	1137	t	t	0.2 ± 0.0	–	MS, RI
Isobutyl hexanoate	1149	t	t	–	–	MS, RI
p-Vinylanisole	1160	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.3	–	–	MS, RI, std
Pinocarvone	1167	t	t	0.1 ± 0.0	–	MS, RI
Terpinen-4-ol	1182	t	t	–	–	MS, RI, std
Butanoic acid, hexyl ester	1190	–	–	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	–
α-Terpineol	1194	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	–	–	MS, RI, std
Methyl salicylate	1195	t	t	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	MS, RI
Hexanoic acid, butyl ester	1198	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1	–	–	MS, RI
Myrtenol	1196	–	–	t	t	–
Decanal	1211	t	t	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS, RI
Verbenone	1205	–	–	0.1 ± 0.0	–	–
β-Cyclocitral	1219	t	t	0.1 ± 0.0	–	MS, RI
n-Hexyl 2-methyl butanoate	1244	t	t	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS, RI
cis-3-Hexenyl isovalerate	1239	–	–	t	0.1 ± 0.0	–
Carvone	1244	–	–	t	t	–
Hexyl isovalerate	1249	t	t	0.1 ± 0.0	t	MS, RI
Isoamyl hexanoate	1259	1.7 ± 0.0	1.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	MS, RI
(2E)-Decenal	1268	t	0.1 ± 0.1	t	–	MS, RI
Dihydroedulan I	1286	t	t	–	–	MS, RI
trans-Linalool oxide acetate (pyranoid)	1291	0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.0	2.0 ± 0.1	MS, RI, std
Theaspirane A	1296	t	t	–	–	MS, RI
Tridecane	1300	–	0.3 ± 0.2	–	–	MS, RI, std
Undecanal	1305	–	–	t	–	–
Theaspirane B	1315	t	t	–	–	MS, RI
Isoamyl heptanoate	1319	t	t	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS, RI
p-Vinyl-guaiacol	1320	0.1 ± 0.1	t	–	–	MS, RI
Methyl geranate	1328	t	t	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	MS, RI

Component ^b	RI ^c	HD ^a		SPME ^a		Identification methods ^d
		Dry	Fresh	Dry	Fresh	
Hexyl tiglate	1336	t	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS, RI
α-Longipinene	1350	–	–	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	
Eugenol	1365	t	t	t	t	MS, RI, std
α-Copaene	1373	0.2 ± 0.0	t	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	MS, RI, std
Isoledene	1375	–	–	t	0.1 ± 0.0	
3,4-Dimethoxystyrene	1379	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.1	–	–	MS, RI
Geranyl acetate	1379	–	–	0.1 ± 0.0	t	
β-Bourbonene	1384	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.2	1.6 ± 0.3	0.9 ± 0.0	MS, RI
(E)-β-Damascenone	1389	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.1	–	–	MS, RI
hexyl hexanoate	1392	t	0.3 ± 0.2	–	–	MS, RI
7-epi-Sesquijutene	1392	–	–	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	
Sesquijutene	1405	–	–	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	
α-Gurjunene	1407	t	t	–	–	MS, RI, std
(E)-Caryophyllene	1414	5.7 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.0	8.4 ± 0.0	MS, RI, std
β-Copaene	1426	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.0	MS, RI
trans-α-Bergamotene	1435	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0	MS, RI
(Z)-β-Farnesene	1443	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.0	2.2 ± 0.0	1.6 ± 0.0	MS, RI
α-Humulene	1450	2.8 ± 0.1	2.5 ± 0.1	t	t	MS, RI, std
allo-Aromadendrene	1456	t	t	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	MS, RI, std
(E)-β-Farnesene	1460	7.3 ± 0.1	5.7 ± 0.2	12.3 ± 0.1	13.3 ± 0.2	MS, RI
Germacrene D	1478	5.5 ± 0.2	6.6 ± 0.3	3.1 ± 0.0	13.2 ± 0.1	MS, RI, std
γ-Curcumene	1481	t	t	–	–	MS, RI
α-Curcumene	1484	t	t	–	–	MS, RI
(E)-β-Ionone	1488	0.2 ± 0.0	t	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	MS, RI
Bicyclogermacrene	1493	0.8 ± 0.0	0.9 ± 0.0	–	–	MS, RI
α-Zingiberene	1495	2.1 ± 0.1	2.6 ± 0.1	6.0 ± 0.0	6.5 ± 0.0	MS, RI, std
(Z,E)-α-Farnesene	1498	11.5 ± 0.2	14.9 ± 0.5	33.9 ± 0.2	27.3 ± 0.4	MS, RI
β-Bisabolene	1509	7.5 ± 0.3	5.0 ± 0.4	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	MS, RI
β-Curcumene	1512	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	t	t	MS, RI
δ-Cadinene	1522	t	t	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	MS, RI
β-Sesquiphellandrene	1524	1.2 ± 0.0	1.4 ± 0.1	2.8 ± 0.0	2.6 ± 0.0	MS, RI
(E)-γ-bisabolene	1529	t	t	t	t	MS, RI
trans-α-Bisabolene	1537	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.6 ± 0.0	2.8 ± 0.0	MS, RI
cis-α-Bisabolene	1545	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	MS, RI
(E)-Nerolidol	1568	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	MS, RI, std
Spathulenol	1579	1.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0	MS, RI, std
Caryophyllene oxide	1583	–	–	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	
Humulene epoxide II	1601	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS, RI
β-Atlantol	1608	–	–	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	
α-Acorenol	1634	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	–	–	MS, RI
α-Cadinol	1656	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	–	–	MS, RI
β-Bisabolol	1674	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	–	–	MS, RI
α-bisabolol	1687	1.1 ± 0.5	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS, RI, std
11-αH-Himachal-4-en-1-β-ol	1699	6.2 ± 0.3	10.1 ± 1.9	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1	MS, RI
Mint sulfide	1740	t	t	–	–	MS, RI
Benzyl benzoate	1763	t	t	–	–	MS, RI
Tetradecanoic acid	1770	t	t	–	–	MS, RI
α-Bisabolol acetate	1795	–	–	0.1 ± 0.0	t	
Octadecane	1800	–	–	t	–	
Hexahydrofarnesyl acetone	1845	1.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS, RI, std
Benzyl salicylate	1862	t	–	–	–	MS, RI
Nonadecane	1900	–	–	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.0	
(5E,9E)-Farnesyl acetone	1916	0.1 ± 0.1	–	–	–	MS, RI
Farnesyl acetone	1927	–	–	0.1 ± 0.0	–	

(continued overleaf)

Component ^b	RI ^c	HD ^a		SPME ^a		Identification methods ^d
		Dry	Fresh	Dry	Fresh	
Hexadecanoic acid	1965	0.4 ± 0.1	t	–	–	MS, RI, std
Heneicosane	2100	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.4	–	–	MS, RI, std
Docosane	2200	t	t	–	–	MS, RI, std
Tricosane	2300	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.1	–	–	MS, RI, std
Tetracosane	2400	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	–	–	MS, RI, std
Pentacosane	2500	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.2	–	–	MS, RI, std
Hexacosane	2600	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1	–	–	MS, RI, std
Heptacosane	2700	1.8 ± 0.6	1.0 ± 0.4	–	–	MS, RI, std
Octacosane	2800	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	–	–	MS, RI, std
Nonacosane	2900	1.0 ± 0.4	0.4 ± 0.2	–	–	MS, RI, std
Triacontane	3000	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.1	–	–	MS, RI, std
Grouped compounds (%)						
Terpenoids		83.3	82.7	90.7	93.7	
Monoterpenes hydrocarbons		14.2	11.5	1.8	1.3	
Oxygenated monoterpenes		8.9	9.4	6.7	5.7	
Sesquiterpenes hydrocarbons		48.5	49.4	76.4	83.4	
Oxygenated sesquiterpenes		11.1	12.2	5.4	3.0	
C ₁₃ -Norisoprenoids		0.6	0.2	0.5	0.2	
Aliphatics		14.4	16.5	4.7	3.8	
Alcohols		3.4	6.0	1.7	1.6	
Esters		3.5	3.4	2.5	1.4	
Aldehydes		1.2	2.6	–	–	
Acids		0.4	t	–	–	
Alkanes		5.9	3.5	0.1	0.2	
Aromatics		1.6	0.7	0.3	0.3	
Sulfur-containing compounds		t	t	–	–	
Total components		97	97	76	66	
Total identified (%)		99.3	99.0	95.8	97.8	

^a Values, expressed in percentages, are means ± standard error of triplicate measurements. They were obtained at FID by peak area normalisation calculating the relative response factor (see Table 1).

^b Compounds belonging to each class are listed in order of their elution from a HP-5 column.

^c RI, retention indices as determined on HP-5 column using homologous series of C₈-C₃₀ alkanes.

^d Identification methods: MS, by comparison of the mass spectrum with those of the computer mass libraries Wiley, NIST 05 and ADAMS; RI, by comparison of RI with those reported from literature;¹⁶⁻¹⁷ std, by comparison of the retention time, mass spectrum and retention index of authentic standard.

t, traces (mean value below 0.1%); –, not detected.

Tab. 11: Chemické složení silic získaných SD a SPME ze sušených a čerstvých kvetoucích nadzemních částí *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* [53]

Bylo identifikováno 102 složek, což představuje 99,0 – 99,3 % studované silice. V silicích byly dominantní terpenoidy (82,7 – 83,3 %), zatímco ostatní převážně alifatické sloučeniny představují pouze zlomek (14,4 – 16,5 %). Hlavní složky byly (Z, E)- α -farnesen (11,5 – 14,9 %), 11- α -H-Himachal-4-en-1- β -ol (6,2 – 10,1 %), (E)- β -farnesen (5,7 – 7,3 %), β -bisabolen (5,0 – 7,5 %), linalool (7,6 – 7,8 %) a germakren D (5,5 – 6,6 %). Seskviterpeny představovaly hlavní část silice (59,6 – 61,6 %), nejhojněji zastoupeny byly seskviterpenické uhlovodíky (48,5 – 49,4 %). Tyto údaje jsou v souladu s těmi, uvedenými v literatuře. Potvrzují, že v silici rostlin rodu *Teucrium* L. dominují seskviterpeny [29 – 32, 36]. Monoterpeny byly v silici zastoupeny jako druhá frakce (20,9 – 23,1 %). α -pinen (4,5 – 5,3 %), β -pinen (3,1 – 4,5%) a limonen (3,0 – 3,5%) byly nejhojnější mezi uhlovodíky a linalool (7,6 – 7,8 %) mezi kyslíkatými sloučeninami. Nebyly zaznamenány výrazné kvalitativní a kvantitativní rozdíly mezi silicemi získanými ze suchých a čerstvých nadzemních částí kvetoucích rostlin. Při porovnání výsledků s literaturou, ve věci týkající se téhož

subjektu, [34] jsou zřejmě jak kvalitativní, tak kvantitativní rozdíly. Např. borneol, jedna z nejvíce zastoupených složek v listech (27,86 %) a listenech (54,07 %) kontrolních vzorků z ostrova Elba, zcela chybí ve vzorku, jenž byl předmětem tohoto výzkumu, stejně tak jako k. trans-4-methoxyskořicová. Dále α -pinen, který byl bohatě přítomen v listenech (21,09 %) a kališích (16,19 %) vzorků z ostrova Elba, se vyskytoval pouze v malém množství v této práci studovaných vzorcích. Jinak ovšem vzorky z ostrova Elba byly kvalitativně chudší než tyto. Bylo zaznamenáno pouze 14 těkavých látek, oproti 102 zjištěných v této studii. Významné jsou rozdíly, pokud jde o silice z jiných zemí, zejména z Řecka. [33] Jedná se o jiné kvalitativní složení látek (58 vs 102 komponent) s rozdílnými hlavními součástmi (karyofylen a 4-vinyl guaiacol).

Při srovnání komponent silice získané SD s těmi získanými SPME extrakcí kvetoucích nadzemních částí (tab. 11), je zřejmé, že těkavé látky extrahované pomocí SPME jsou především terpenoidy (90,7 – 93,7 %), s největším zastoupením seskviterpenických uhlovodíků (76,4 – 83,4 %). Hlavní sloučenina z této frakce, (Z, E)- α -farnesen, vykazuje vyšší procento zastoupení v analýze pomocí SPME (27,3 – 33,9 %) než v silici získané SD (11,5 – 14,9 %). Zastoupení monoterpenů bylo větší v silici získané SD ve srovnání s headspace technikou, u monoterpenických uhlovodíků (11,5 – 14,2 % vs 1,3 – 1,8 %) a u kyslíkatých monoterpenů (8,9 – 9,4 % vs 5,7 – 6,7 %). Silice (SD) také obsahovaly více alifatických látek ve srovnání s frakcí získanou pomocí SPME (14,4 – 16,5% vs 3,8 – 4,7 %). Zejména vzhledem k vysokým teplotám a hydrolytickým reakcím, vyskytujícími se během destilace s vodní parou bylo v těchto silicích na rozdíl od SPME zaznamenáno vyšší množství alkanů (3,5 – 5,9 % vs 0,1 – 0,2 %). Hlavní látka (Z, E)- α -farnesen je jedním ze dvou přirozeně se vyskytujících stereoisomerů α -farnesenu. Jedná se o seskviterpenický acyklický uhlovodík, který byl nalezen v povlaku jablka [37] a dalším ovoci. Tyto dva stereoisomery způsobují charakteristickou jablečnou vůni. Byly zjištěny v jablečných destilátech, kde jsou odpovědné za kvalitu jablečné vůně. [38-40] Jsou také používány pro zvýšení aroma nebo chuti potravin a léčivých přípravků [41]. Uplatnění těchto látek je taktéž v parfumerii. V silici (SD) je pozoruhodný výskyt seskviterpenického uhlovodíku zingiberenu (2,1 – 2,6 %), který je hlavní složkou komerčně dostupné silice získané z oddenku zázvoru *Zingiber officinale* Roscoe. Tato látka byla zjištěna u mnoha rostlin z čeledi *Lamiaceae* z oblasti Středomoří a přispívá k jejich zvláštní vůni. Proto také jsou některé z těchto rostlin využívány např. jako příchut' do bílých vín. [42] Kromě toho je také zajímavé poukázat na přítomnost malých množství některých norisoprenoidů v silicích, β -cyclocitral, dihydroedulan I, theaspirane, theaspirane B, (E)- β -damascenon a (E)- β -ionon. Jedná se o C13 látky vyplývající z rozkladu molekul karotenoidů, [43] a také z hydrolýzy glukosidů [44]. Norisoprenoidy jsou využívány jako zápach a aroma modifikující látky vzhledem k jejich nízkému prahu čichového vnímání. Proto jsou často využívány v parfumerii,

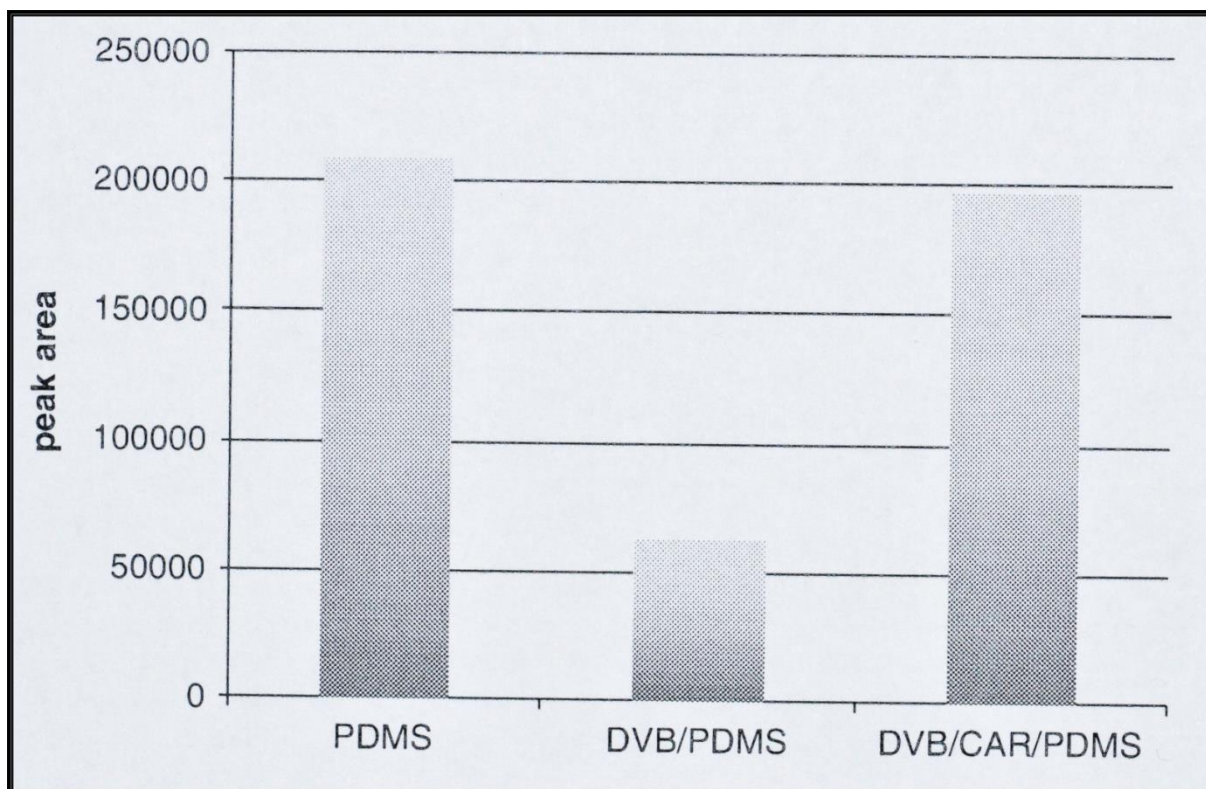
potravinářství a také k aromatizaci farmaceutických přípravků. Zajímavostí je také, i vzhledem k analýze *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum*, zastoupení látky charakteristické houbové vůně 1-okten-3-olu (2,9 – 4,8 %). [45] Při analýze byly také zjištěny estery kyseliny salicylové, molekuly zapojené do obranného systému rostlin proti patogenům.

SPME analýza

SPME je vhodnou alternativou k destilaci s vodní parou (SD), používající se běžně v kombinaci s GC a GC/MS. Je úspěšně aplikována na širokou škálu sloučenin, a to zejména při extrakci těkavých a středně těkavých organických látek z environmentálních, biologických a také potravinářských vzorků.

Optimalizace SPME podmínek

Pro zlepšení reprodukovatelnosti a kvantifikace SPME, je nutné pečlivě kontrolovat a monitorovat požadované extrakční parametry, jako jsou: teplota extrakce, čas extrakce, velikost částic vzorku, množství vzorku, čas desorpce. [55] Část práce byla tedy zaměřena na optimalizaci citovaných parametrů ovlivňujících SPME analýzu. SPME-GC-FID analýzy byly pro každou studovanou část provedeny třikrát. V první řadě bylo hodnoceno nejlepší SPME vlákno. Použity a následně hodnoceny byly tři SPME vlákna, polydimethylsiloxan (PDMS, 100 μm), polydimethylsiloxan-divinylbenzen (PDMS/DVB, 65 μm) a Stableflex divinylbenzen-carboxen-polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm). Hodnocení vláken, tedy extrakční výkonnost (obr. 15), bylo založeno na součtu ploch píků všech těkavých látek zjištěných v matrici.



Obr. 15: Příjem (extrakce) těkavých látek, jako součet ploch píků, třemi typy SPME vláken. Data byla získána pomocí GC/FID analýzy. [53]

SPME podmínky a parametry byly: množství rostlinného materiálu 30 mg, velikost částic 1mm, extrakční teplota 60°C, extrakční čas 30 min, desorpční čas 3 min při teplotě 250°C. Na základě získaných výsledků bylo pro extrakci těkavých látek *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* vyhodnoceno jako nejlepší vlákno nejvíce lipofilní PDMS. Vykazovalo nepatrný rozdíl s ternárním DVB-CAR-PDMS a výraznější s PDMS-DVB. Zejména se však toto vlákno ukázalo jako nejvhodnější pro extrakci (Z, E)- α -farnesenu [46], který je hlavní těkavou složkou zkoumané rostliny.

Pro studium SPME parametrů bylo hodnoceno deset vybraných molekul, které představují různé chemické skupiny analyzovaných sloučenin *T. flavum* a mající také odlišné chromatografické chování: (1) 1-okten-3-ol, (2) linalool, (3) isoamyl hexanoát, (4) trans-linalool oxid acetát (pyranoid), (5) (E)-karyofylen, (6) (E)- β -farnesen, (7) germakren D, (8) (Z, E)- α -farnesen, (9) trans- α -bisabolen a (10) 11- α H-Himachal-4-en-1- β -ol.

Sloučeniny č. 1 a 2 nebyly v suchém vzorku detekovány, k zaznamenání došlo pouze po přidání vody do rostlinného materiálu. [54] Jak je také uvedeno [45], je jejich zastoupení, a to platí zejména pro 1-okten-3-ol, silně závislé na přítomnosti vody. V tomto smyslu byly také prováděny experimenty a jsou diskutovány níže. Všechny další experimenty pro optimalizaci metody, diskutovány v následujících odstavcích, byly prováděny s použitím PDMS vlákna. Pro studium vlivu teploty na extrakci na

vlákně byla lahvička (vialka) obsahující 30 mg rostlinného materiálu umístěna do vodní lázně s elektrickým nastavením teploty (electric vertex). Byla studována také inkubační doba materiálu ve vialce (bez vlákna), která by byla ekvilibračním časem při dané teplotě. Při analýze však nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v čase 0 – 30 min. Proto také inkubační doba nebyla považována za zajímavý parametr pro následnou analýzu.

Dále, pro studium extrakční teploty, bylo vlákno skrze uzávěr septa zavedeno do lahvičky se vzorkem a provedena extrakce při určené teplotě po dobu 30 min. Bylo testováno následujících osm různých teplot: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 a 90°C. Výsledky jsou uvedeny (obr.16A). Jasně z nich vyplývá, že teplota 60°C se ukázala být nejlepší extrakční teplotou pro většinu sloučenin. U látky 10 (11- α H-himachal-4-en-1- β -ol) bylo zaznamenáno odlišné chování, ukazující maximální hodnotu plochy píku při 90°C. Sloučeniny č. 3 (isoamyl hexanoát) a 4 (trans-linalool oxid acetát) mají nejnižší teplotou varu, dosáhnou rovnováhy na vlákně dřívě. Z tohoto důvodu je nejlepší teplota extrakce pro tyto těkavé složky 50°C. Obecně lze říci, že pokud je teplota vyšší než 60°C plochy píků se výrazně sníží. (Obr.16A) Tato skutečnost by mohla být vysvětlena snížením rozdělovacího koeficientu mezi HS a vláknem, což posune rovnováhu směrem HS a tudíž poklesne absorpce těkavých látek.

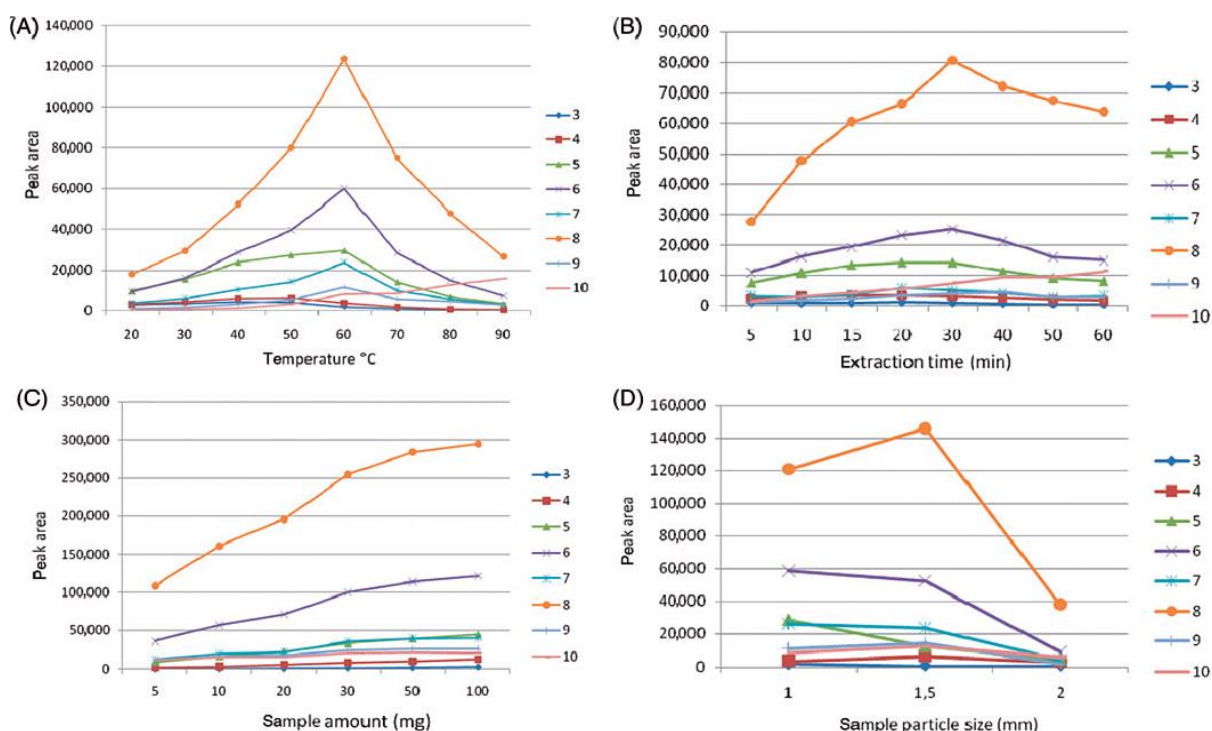
Při zkoumání doby potřebné k dosažení rovnováhy mezi stacionární fází (vláknem), HS prostorem lahvičky a analytem bylo testováno osm extrakčních časů: tj. 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 a 60 min., při teplotě 60°C. Výsledky jsou uvedeny. (Obr.16B) Z výsledků je možné vydedukovat, že čas potřebný k nasycení, dosažení správné rovnováhy je 30min. Výjimkou je látka č. 9. Při tomto čase je možné extrahovat největší množství analyzovaných látek.

Pro zvýšení citlivosti SPME metody, je velmi důležité zvolit správné množství vlákna extrahovaného vzorku. V rámci této práce bylo testováno šest různých množství rostlinného materiálu: tj. 5, 10, 20, 30, 50 a 100 mg, při teplotě 60°C a po dobu 30 min. Výsledky jsou uvedeny na obr.16C. Příliš velké množství vzorku může někdy způsobit potíže při procesu vzorkování v důsledku statické adsorpce vzorku na vlákno SPME zařízení. Zejména pokud je pro analýzu použit jemně prachovitý vzorek. Z tohoto důvodu bylo preferováno množství 30 mg místo 100 mg. Znamenalo to sice lehké snížení absolutního množství extrahovaných analytů (viz křivky na obr.16C), bylo to však ve prospěch vyšší reprodukovatelnosti (CV% jsou nižší, než ty u 100 mg) výsledků a delší životnosti vlákna.

Když je SPME použita na analýzu pevného vzorku, hraje často v procesu extrakce důležitou roli velikost jeho částic. Byly studovány tři různé velikosti částic vzorku: tj. 1, 1,5 a 2 mm, při použitém množství rostlinného materiálu 30 mg, extrakční teplotě 60°C a extrakčním čase 30 min. Výsledky jsou uvedeny na obr.16D. Z profilu křivek vyplývá, že nejlepšími výsledky, pokud jde o extrahované analyty, bylo dosaženo použitím vzorku o minimální velikosti částic, tj. 1 mm. Bylo tomu tak u většiny

studovaných látek vyjma č. 8, zatímco větší velikosti (zejména 2 mm) vykazují horší výsledky. Velikost částic menší než 1 mm nebyla testována, vzhledem k možným závažným statickým efektům.

Posledním studovaným parametrem SPME metody byl čas desorpce v nástřikovém systému plynového chromatografu. Byl studován v rozsahu 1 – 5 min. Během těchto měření nebyly nalezeny významné rozdíly. Následně byl vybrán čas 3 min, vzhledem k úplné desorpci analytu z SPME vlákna.



Obr. 16: Vliv (A) teploty, (B) extrakčního času, (C) množství vzorku a (D) velikosti částic vzorku na extrakční kapacitu 100 μ m vlákna PDMS na látky 3-10. (3) isoamyl hexanoát, (4) trans-linalool oxid acetát (pyranoid), (5) (E)-karyofylen, (6) (E) - β -farnesen, (7) germakren D, (8) (Z, E) - α -farnesen, (9) trans- α -bisabolen a (10), 11 - α H-himachal-4-en-1- β -ol.

Všechny experimenty byly provedeny třikrát, s hodnotou CV % v rozmezí od 1 % do 16 %. [155]

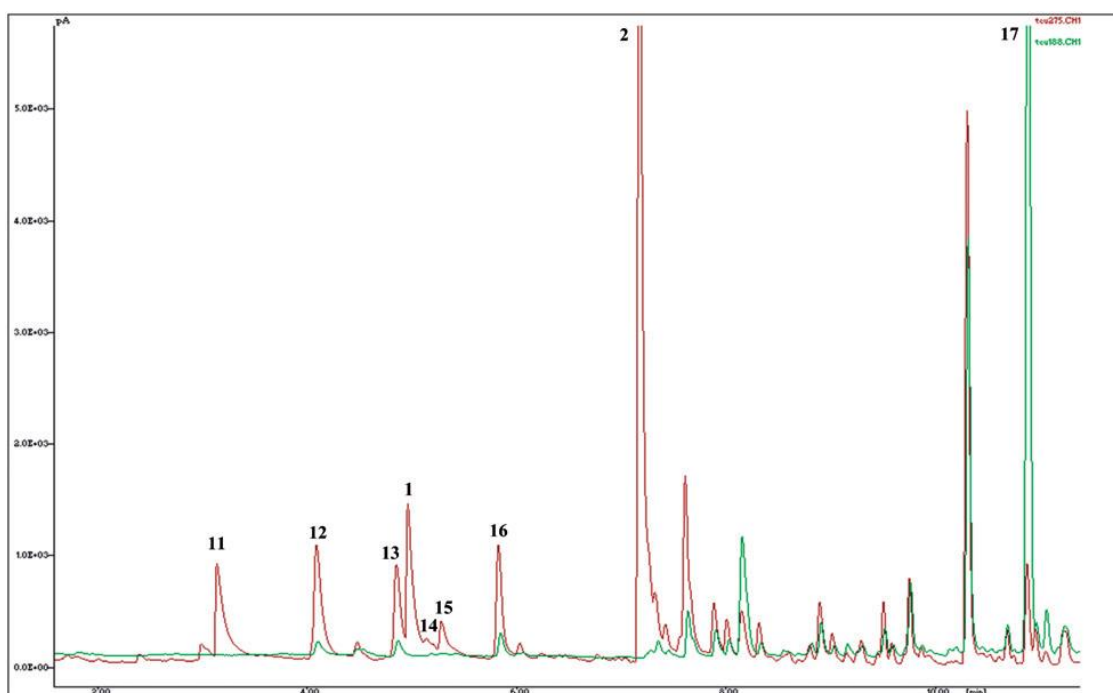
Přídavek vody k sušenému vzorku

Zajímavým zjištěním během SPME experimentů bylo, že některé látky jsou tvořeny, či jejich množství (odezva) se zvyšuje, jen v přítomnosti určitého množství vody ve vzorku. Sloučeniny, které jsou tvořeny pouze po přidání vody, jsou zejména látky ze skupiny alkoholů. Takto byly identifikovány 1-okten-3-ol (1), zajímavý alkohol vonící po houbách [45], linalool (2), n-hexanol (11), a oktanol (15). Záznamy v literatuře uvádějí, že 1-octen-3-ol je alkohol vytvořený enzymatickou reakcí lipoxygenázové (LOX) cesty. [51]

Kromě toho, je možno uvést, že ve vzorcích obsahujících přídavek vody chromatografická odezva terpenických uhlovodíků, jako α -pinen (12), β -pinen (13), myrcen (14) a limonen (16), je zesílena 5 krát nebo 6 krát. Je zajímavé také poznamenat, že u sloučenin patřících do chemické skupiny esterů, jako methyl geranat (17), je snížena jejich chromatografická odezva až 10 krát v přítomnosti vody ve srovnání se sušeným vzorkem. Jako příklad lze uvést obr. 17, kde je ukázán překryv dvou chromatogramů:

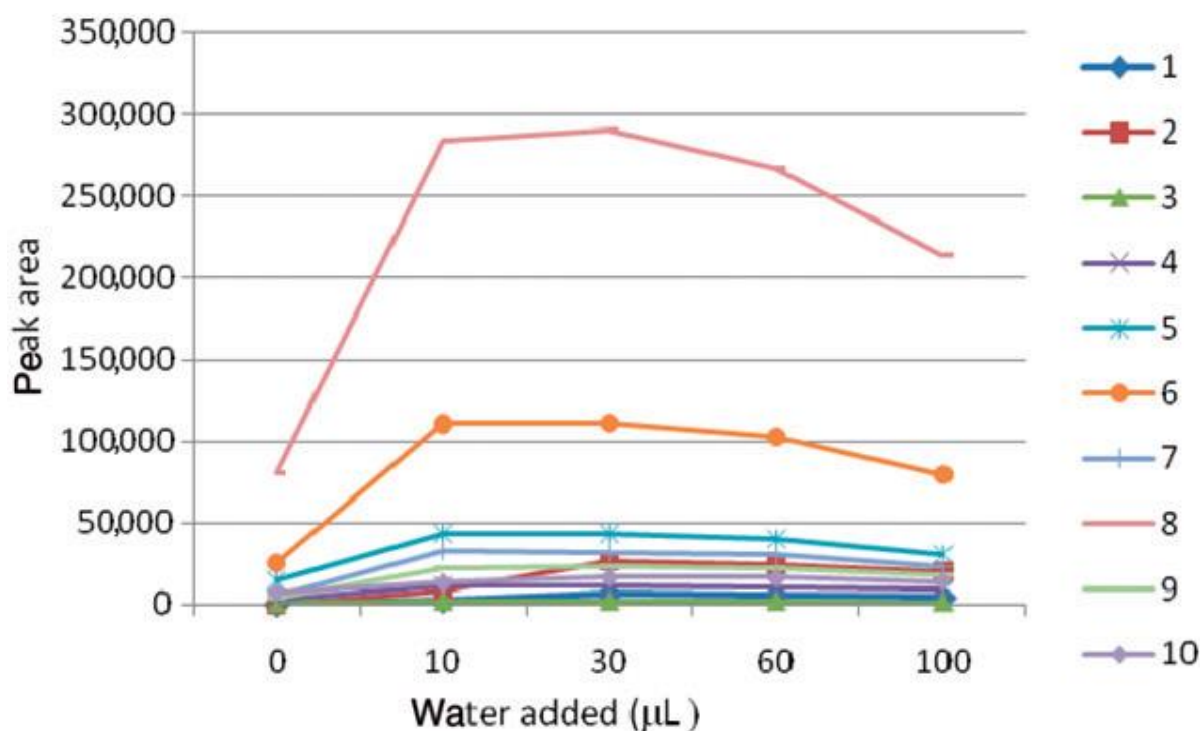
- (a) HS-SPME-GC-FID chromatogram sušeného vzorku *T. flavum* L. subsp. *flavum*,
 (b) HS-SPME-GC-FID chromatogram vzorku *T. flavum* L. subsp. *flavum* s přidaným množstvím 30 μ l vody.

Je zde možné vidět některé vzniklé sloučeniny, jiné ve zvýšeném či sníženém množství. Experimenty byly provedeny vystavením SPME vlákna PDMS 100 μ m do lahvičky s 30 mg vzorku (kvetoucí nadzemní část rostliny) s přídavkem vody, na dobu 30 min, při teplotě 60°C. Přidané množství vody bylo zahrnuto v rozsahu 10-100 μ l. Na obr. 18 jsou uvedeny získané výsledky. Bylo zjištěno, že 10 μ l vody stačí k zvýšení citlivosti všech sledovaných sloučenin. Avšak optimální množství bylo stanoveno na 30 μ l.



Obr. 17: Překryv (a) HS-SPME-GC-FID chromatogramu sušeného vzorku *T. flavum* L. subsp. *flavum* a (b) HS-SPME-GC-FID chromatogramu vzorku *T. flavum* L. subsp. *flavum* po přidání 30 μ l vody, ve kterém jsou uvedeny látky nově vytvořené či ve zvýšeném množství.

1-okten-3-ol (1), linalool (2), n-hexanol (11), α -pinen (12), β -pinen (13), myrcen (14), oktanol (15), limonen (16) a methyl geranat (17). [155]



Obr. 18: Vliv vody na extrakční schopnost 100µm vlákna PDMS na látky 1-10. (1) 1-okten-3-ol, (2) linalool, (3) isoamyl hexanoát, (4), trans-linalool oxid acetát (pyranoid), (5) (E)-karyofylen, (6) (E) -β-farnesen, (7) germakren D, (8) (Z, E) -α-farnesen, (9) trans-α-bisabolen a (10) 11 -αH-himachal-4-en-1-β-ol.

Všechny pokusy byly provedeny ve třech vyhotoveních s hodnotou CV% v rozmezí od 2 % do 16 %. [155]

Opakovatelnost

Opakovatelnost může být vyjádřena variačním koeficientem (CV)% získaným provedením HS-SPME analýzy v trojím vyhotovení, při hodnocení všech SPME parametrů.

CV% získané při studiu teploty (20 – 90°C) byly v rozmezí od 1 do 16%.

CV% získané při studiu extrakčního času (5 – 60 min) byly v rozmezí od 2 do 16 %.

CV% získané při studiu množství vzorku (5 – 100 mg) byly v rozmezí od 3 do 12 %.

CV% získané při studiu velikosti částic vzorku (1 – 2 mm) byly v rozmezí od 1 do 19 %.

CV% získané při studiu přídavku vody (10 – 100 µl), byly v rozmezí od 2 do 16 %.

Užitím optimálních podmínek byla mezidenní opakovatelnost HS-SPME-GC-FID metody stanovena 5-denními opakovanými analýzami těkavých sloučenin hodnocených na základě ploch píků deseti vybraných látek a vyjádřena jako CV% v rozmezí od 1 % do 16 %.

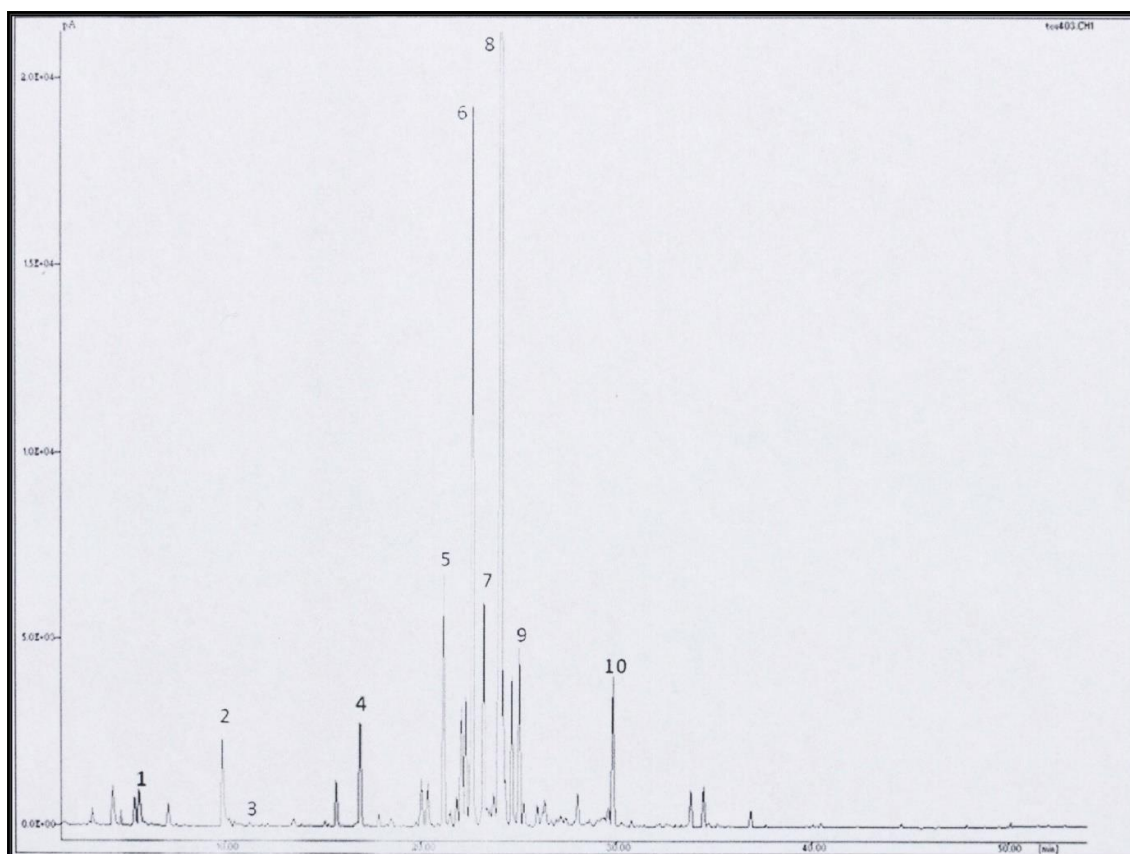
Mezidenní opakovatelnost byla hodnocena cestou ANOVA (SPSS 13.0 software pro Windows), pomocí Fisher testu. F-test byl použit k vyhodnocení průměru ploch

píků každé sloučeniny. Analýza neukázala významné rozdíly mezi měřeními v poměru k deseti označeným látkám, získané F v rozmezí od 0,17 do 2,26 s F Crit. 3,48. Získané výsledky naznačují, že navrhovaná metoda je spolehlivá.

Výsledky analýzy těkavých látek metodou HS-SPME

HS-SPME-GC-FID analýza kvetoucích nadzemních částí *T. flavum* L. subsp *flavum* umožnila identifikaci (95,8 – 97,8 %) 76 (sušené) a 66 (čerstvé) různých těkavých látek. Nejvíce zastoupenou chemickou třídou byly terpenoidy (90,7 – 93,7 %), zatímco alifatické sloučeniny představovaly pouze malou část (3,8 – 4,7 %). Hlavní komponenty, extrahované v různé kvantitě, byly následující: (Z, E)- α -farnesen (27,3 – 33,9 %), 11- α H-himachal-4-en-1- β -ol (1,7 – 2,0 %), (E)- β -farnesen (12,3 – 13,3 %), β -bisabolen (0,5 – 0,6 %) a germakren D (3,1 – 13,2 %). Seskviterpenické uhlovodíky představovaly hlavní část těkavých sloučenin (76,4 – 83,4 %).

Typický HS-SPME-GC-FID chromatogram kvetoucích nadzemních částí *T. flavum* subsp. *flavum* je uveden na obr. 19.

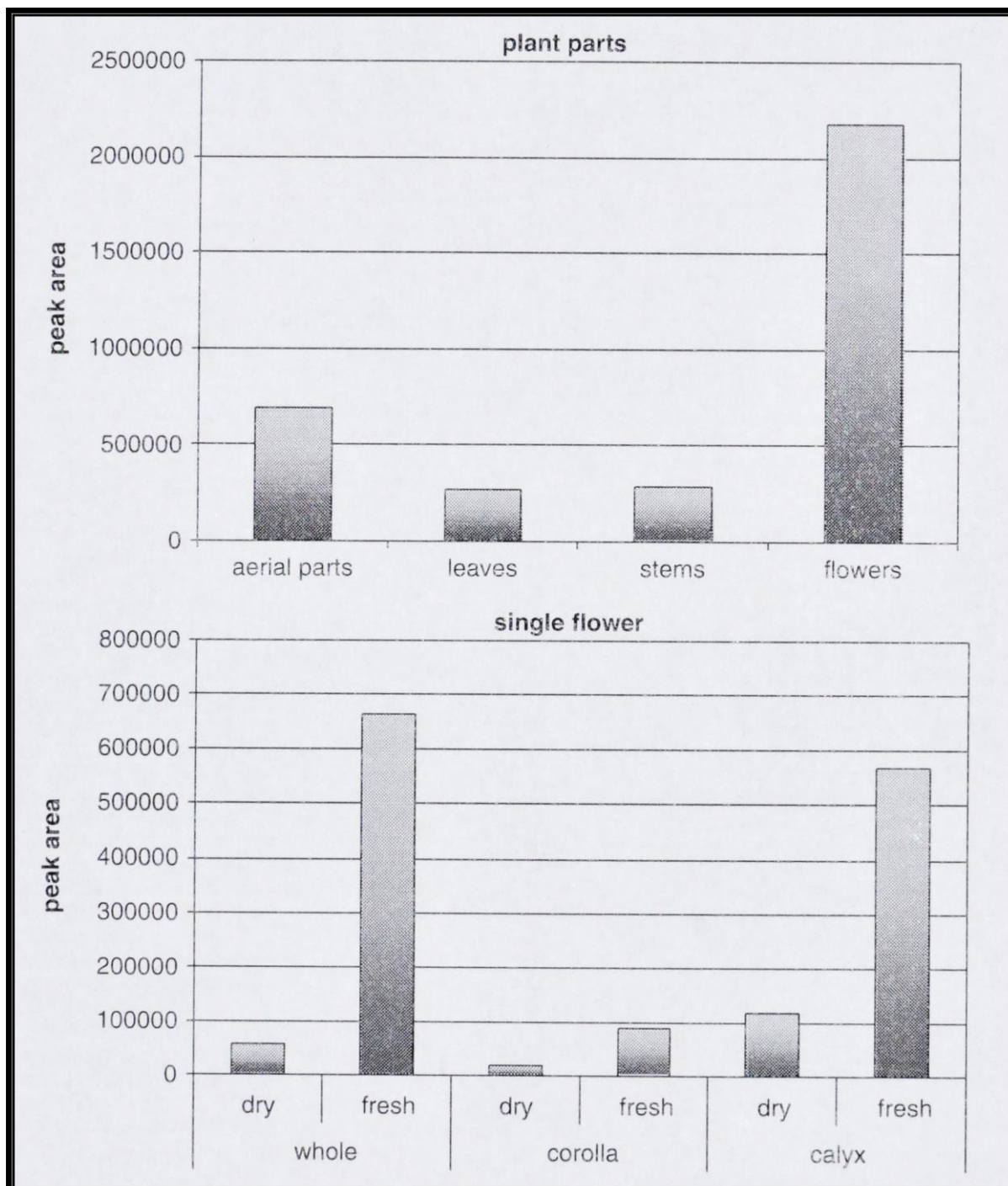


Obr. 19: Typický chromatogram těkavých látek *T. flavum* subsp. *flavum* získaný metodou HS-SPME-GC-FID. (1) 1-okten-3-ol, (2) linalool, (3) isoamyl hexanoát, (4), trans-linalool oxid acetát (pyranoid), (5) (E)-karyofylen, (6) (E) - β -farnesen, (7) germakren D, (8) (Z, E) - α -farnesen, (9) trans- α -bisabolen a (10) 11 - α H-himachal-4-en-1- β -ol. [155, nepubl. doplňkový materiál]

HS-SPME-GC ověřená metoda byla proto použita pro analýzu různých částí rostliny *T. flavum* L. subsp *flavum* (nadzemní části, listy, stonky, květy) a podrobné výsledky byly také publikovány. [53]

SPME umožňuje vzorkování (sběr) těkavých látek emitovaných z malého množství (30 mg) různých částí rostliny rychle a jednoduchým způsobem. Navíc, dobrá schopnost zakoncentrování u této techniky umožňuje identifikaci mnoha sloučenin (76 různých těkavých látek) (tab. 12). Seskviterpenické uhlovodíky byly hlavní skupinou těkavých látek ve všech zkoumaných částech rostliny. Jejich množství bylo zaznamenáno v rozmezí od 45,7 % v listech do 87,9 % v květech. Hlavní komponenty byly (Z, E)- α -farnesen (18,1 – 38,5 %), (E)- β -farnesen (7,7 – 15,4 %) a germakren D (3,1 – 13,2 %). Jak je uvedeno na obr. 20, nejvyšší množství těkavých látek, hodnoceno na základě součtu SPME/GC/FID ploch píků, bylo u analýzy květů. Výsledkem analýzy květů bylo také největší zastoupení seskviterpenických uhlovodíků (87,9 %), jako jsou (Z, E)- α -farnesen (38,5 %), (E)- β -farnesen (15,4 %), a α -zingiberen (7,7 %). Tyto komponenty, jak je uvedeno výše, jsou těkavé složky, které přispívají k specifické vůni rostliny. Největší obsah monoterpenů ze všech zkoumaných částí rostliny měly listy (27,7 %), s největším zastoupením linaloolu (19,0 %). Zatímco seskviterpeny byly v listech zastoupeny naopak nejméně (49,8 %). Kromě toho bylo v listech zjištěno největší množství po houbách vonícího 1-okten-3-olu (6,6 %) (obr. 21). Jak vyplývá z SPME analýzy v rámci jednoho květu (tab. 12), (obr. 20), kalich má hlavní příspěvek z hlediska těkavých látek ve srovnání s korunou. To by mohlo být způsobeno vyšším množstvím sekrečních trichomů na sepalech ve srovnání s petaly [34]. Kalich obsahoval zejména vyšší procento seskviterpenů (85,1 % a 86,2 % v sušeném resp. čerstvém vzorku), na rozdíl od koruny (57,4 % a 63,6 % v sušeném resp. čerstvém vzorku). V koruně bylo obsaženo vyšší množství monoterpenů (14,3 – 23,6 %). Ve všech případech se těkavé látky sušením početně i kvantitativně snižovaly. Zejména u koruny, kde sušení způsobilo ztrátu mnoha komponent ve srovnání s čerstvým materiálem (18 vs 49). Následkem toho byla také sušená koruna bohatá na monoterpenický ester metyl geranat (23,6 %).

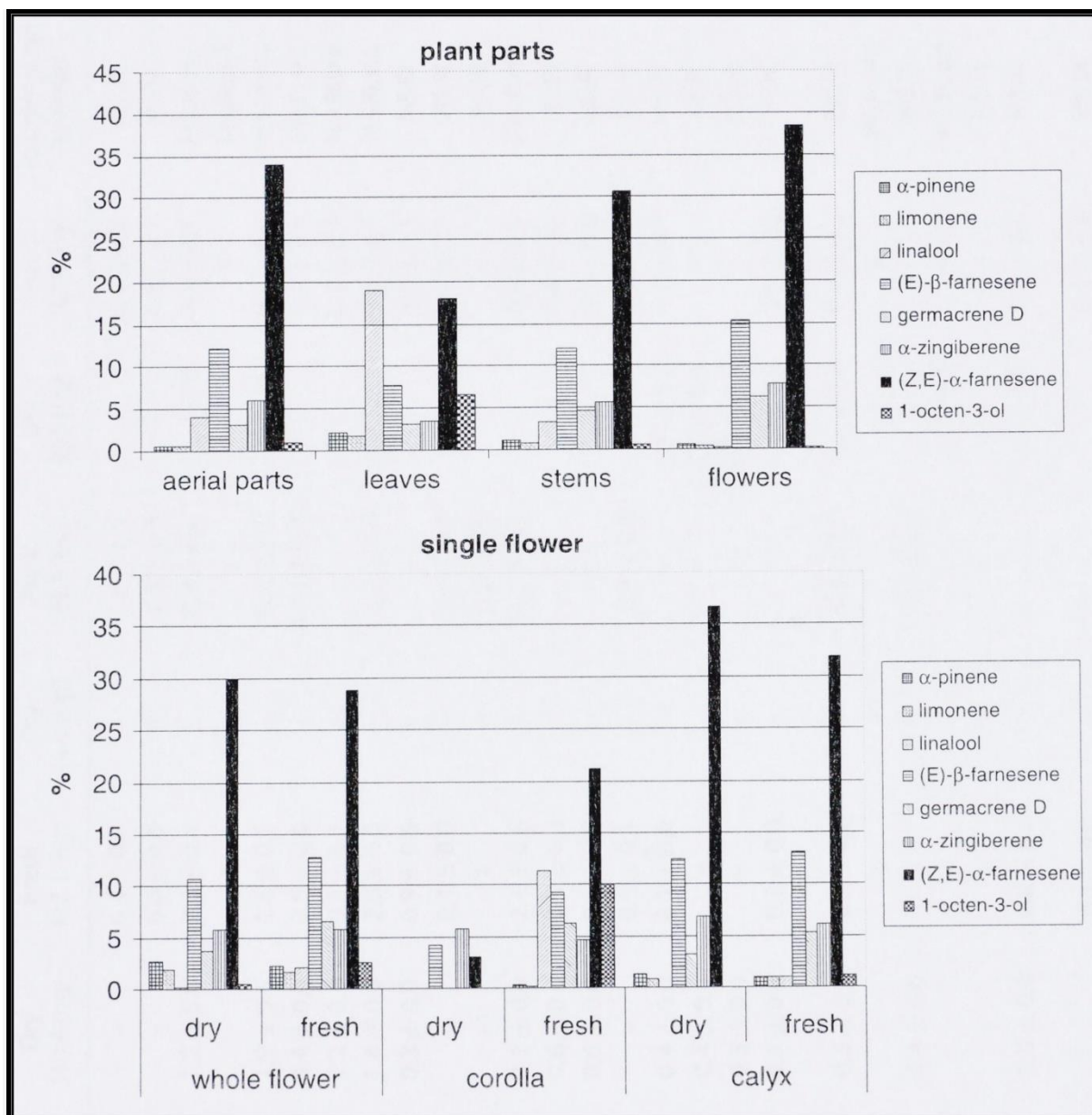
Je také zajímavé, že čerstvá koruna byla shledána jako hlavní zdroj linaloolu (11,3 %) a C8 látky 1-okten-3-olu (10,1 %) (obr. 21). V rámci jednoho sušeného květu bylo také zjištěno, že emise těkavých látek se zvyšuje s ručním oddělením kalicha od koruny. Na obr. 22 jsou zaznamenány SPME/GC/FID chromatogramy z jednoho sušeného květu a to jednak, když kalich a koruna jsou přirozeně spojeny (obr. 22a), nebo ručně odděleny (obr. 22b). Výsledek také koresponduje s grafem na obr. 20, kde emise těkavých látek v sušeném celém květu byla nižší než v sušeném kalichu. Vysvětlením by mohla být skutečnost, že sekreční trichomy odpovědné za emisi látek jsou soustředěny v oblasti květu, kde je koruna napojena na kalich. A tedy následkem oddělení těchto dvou květních komponent je zvýšené množství těkavých substancí.



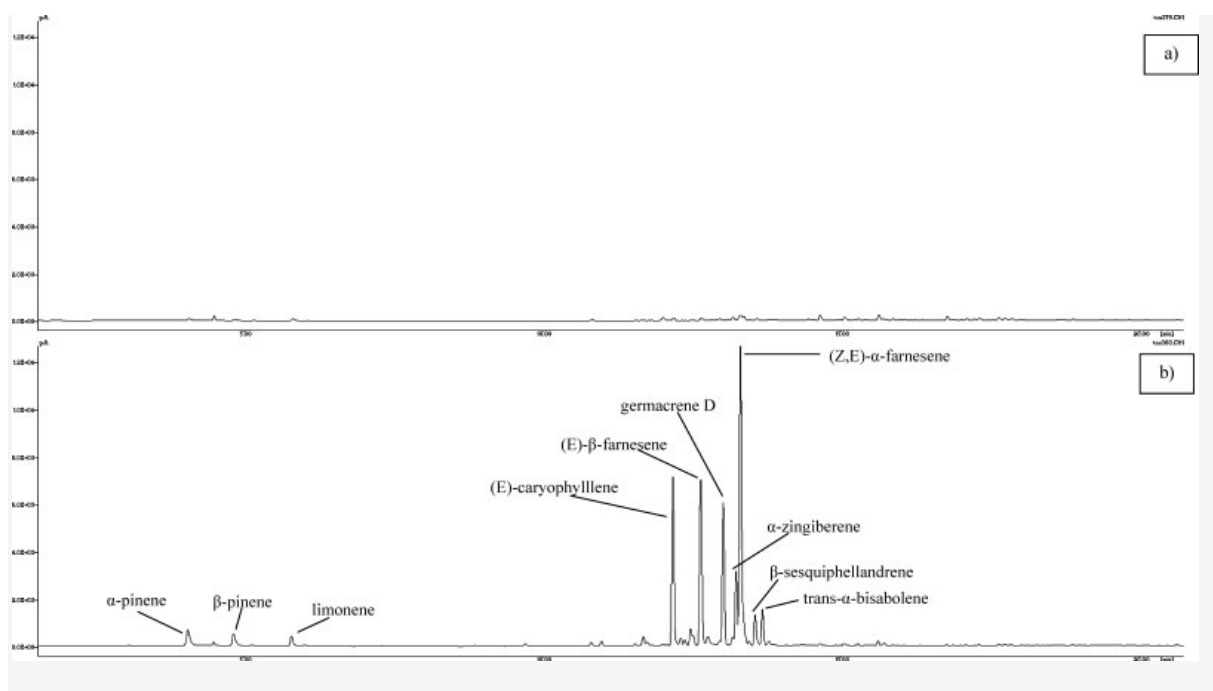
Obr. 20: grafy emise těkavých látek, na základě součtu ploch píků SPME/GC/ FID chromatogramů *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*:

- a) u různých částí rostliny (sušené),
- b) v rámci jednoho květu.

Hodnoty jsou průměrem tří stanovení. [53]



Obr. 21: SPME / GC / FID analýza: procentuální vyjádření (průměrné hodnoty) některých aromatických látek v různých rostlinných částech a v rámci jednoho květu *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*. [53]



Obr. 22: SPME/GC/FID chromatogram jednoho celého sušeného květu *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*.

- (a) celý květ, kalich je spojen s korunou,
- (b) tentýž květ, kalich je ručně oddělen od koruny. [53]

Component ^b	Rf ^c	Single flower										Identification Methods ^d		
		Flowering aerial parts					Whole						Calyx	
		Leaves		Stems		Flowers		Corolla		Corolla			Dry (6.1 mg)	Fresh (12.4 mg)
		Dry	Fresh	Dry		Dry	Fresh	Dry	Fresh	Dry	Fresh	Dry	Fresh	
(2E)-Hexenal	848	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.1 ± 0.0	-	0.4 ± 0.1	-	-	1.0 ± 0.5	-	-	-	0.4 ± 0.1	MS,RI
n-Hexanol	865	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	2.4 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	-	-	2.5 ± 0.5	-	-	-	0.5 ± 0.1	MS,RI
α-Pinene	935	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	2.3 ± 0.4	2.7 ± 0.8	-	0.3 ± 0.0	1.2 ± 0.0	-	-	0.9 ± 0.1	MS,RI,std
Benzaldehyde	955	0.1 ± 0.0	t	-	0.1 ± 0.0	t	-	-	-	-	-	-	t	MS,RI,std
β-Pinene	977	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.5	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.6	0.9 ± 0.0	-	0.9 ± 0.0	MS,RI,std
1-Octen-3-ol	980	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.0	6.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	2.5 ± 0.6	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	10.1 ± 3.4	-	-	-	1.1 ± 0.2	MS,RI,std
Myrcene	988	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.0	t	-	-	-	-	0.2 ± 0.1	MS,RI,std
Limonene	1028	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1	2.0 ± 0.5	1.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.1	-	0.6 ± 0.1	MS,RI,std
(Z)-β-Ocimene	1035	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.5	0.3 ± 0.0	t	-	-	-	-	0.5 ± 0.1	MS,RI
(E)-β-Ocimene	1044	t	t	0.1 ± 0.0	-	0.4 ± 0.0	-	t	0.2 ± 0.0	-	-	-	0.1 ± 0.1	MS,RI
3,5-Octadien-2-one	1084	t	-	0.1 ± 0.0	-	t	-	t	0.2 ± 0.0	-	-	-	-	MS,RI
Linalool	1098	4.0 ± 0.2	3.4 ± 0.0	19.0 ± 0.4	3.3 ± 0.0	2.1 ± 0.6	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	11.3 ± 3.3	-	-	-	0.9 ± 0.3	MS,RI,std
Nonanal	1100	t	0.2 ± 0.0	t	t	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	t	-	-	-	0.4 ± 0.0	MS,RI
n-Amyl isovalerate	1109	0.4 ± 0.0	t	1.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.0	t	t	-	-	-	0.2 ± 0.0	MS,RI
1-Octen-3-yl acetate	1112	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.2	-	-	-	0.1 ± 0.0	MS,RI
3-Octanol, acetate	1120	1.0 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	-	-	-	0.1 ± 0.0	MS,RI
trans-Pinocarveol	1139	0.2 ± 0.0	-	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	-	0.4 ± 0.0	t	-	-	-	-	0.6 ± 0.0	MS,RI
Pinocarvone	1162	0.1 ± 0.0	-	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	-	0.3 ± 0.0	t	-	-	-	-	0.2 ± 0.0	MS,RI
Butanoic acid, hexyl ester	1190	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	-	-	-	0.2 ± 0.0	MS,RI
Methyl salicylate	1194	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.1	-	0.1 ± 0.1	MS,RI
Myrtenol	1196	t	t	t	-	t	-	t	-	-	-	-	t	MS,RI,std
Decanal	1202	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	t	0.4 ± 0.0	t	0.5 ± 0.2	-	-	-	-	MS,RI
Verbenone	1205	0.1 ± 0.0	-	-	-	t	-	t	-	0.2 ± 0.0	-	-	-	MS,RI,std
β-Cyclocitral	1220	0.1 ± 0.0	-	0.3 ± 0.0	t	-	-	-	-	-	-	-	-	MS,RI
n-Hexyl 2-methyl butanoate	1233	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	MS,RI
cis-3-Hexenyl isovalerate	1239	t	0.1 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	t	-	-	-	-	0.1 ± 0.0	MS,RI

(continued overleaf)

Component ^b	R ^c	Single flower										Identification Methods ^d			
		Flowering aerial parts					Whole								
		Leaves		Stems		Flowers		Whole		Corolla			Calyx		
Dry	Fresh	Dry	Dry	Dry	Dry	Fresh	Dry	Fresh	Dry	Fresh	Dry	Fresh	Dry	Fresh	
						(10.4 mg)	(4.0 mg)	(26.3 mg)	(6.1 mg)	(12.4 mg)					
Hexyl isovalerate	1241	0.1 ± 0.0	t	0.1 ± 0.0	-	-	-	0.1 ± 0.0	-	-	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.0	MS,RI		
Carvone	1244	t	t	-	-	-	-	t	-	-	-	-	MS,RI,std		
Isoamyl hexanoate	1246	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.5 ± 0.1	0.2 ± 0.0	2.5 ± 0.5	0.6 ± 0.2	-	-	-	-	0.5 ± 0.2	MS,RI		
(2E)-Decenal	1260	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MS,RI		
trans-Linalool oxide acetate (pyranoid)	1289	1.8 ± 0.0	2.0 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.9 ± 0.6	1.1 ± 0.3	-	-	0.5 ± 0.0	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.2	MS,RI		
Undecanal	1305	t	-	0.1 ± 0.0	t	-	-	-	-	-	-	-	MS,RI		
Isoamyl heptanoate	1316	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	-	-	-	0.1 ± 0.0	MS,RI		
Methyl geranate	1320	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	2.4 ± 2.3	0.1 ± 0.1	23.6 ± 4.9	1.1 ± 0.3	-	1.2 ± 0.6	0.4 ± 0.1	MS,RI		
Hexyl tiglate	1322	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	-	-	-	-	0.1 ± 0.0	MS,RI		
α-Longipinene	1350	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	-	-	-	0.1 ± 0.0	MS,RI,std		
Eugenol	1356	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MS,RI,std		
α-Copaene	1374	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	-	-	-	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	MS,RI,std		
Isolodene	1375	t	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	t	0.1 ± 0.0	-	-	-	0.7 ± 0.0	t	MS,RI		
Geranyl acetate	1379	0.1 ± 0.0	t	0.1 ± 0.0	t	-	0.1 ± 0.0	-	0.4 ± 0.0	-	-	0.1 ± 0.0	MS,RI		
β-Bourbonene	1389	1.6 ± 0.3	0.9 ± 0.0	1.5 ± 0.0	2.0 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	-	0.4 ± 0.1	-	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.1	MS,RI		
7-epi-Sesquithujene	1392	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1	-	0.4 ± 0.0	-	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.2	MS,RI		
Sesquithujene	1405	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	-	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.1 ± 0.0	2.1 ± 0.4	-	-	-	0.1 ± 0.0	MS,RI		
(E)-Caryophyllene	1420	5.1 ± 0.0	8.4 ± 0.0	2.2 ± 0.0	3.8 ± 0.0	1.6 ± 0.9	7.8 ± 0.6	-	5.4 ± 0.4	-	3.1 ± 1.1	7.5 ± 0.6	MS,RI,std		
β-Copaene	1430	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1	-	0.4 ± 0.0	-	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2	MS,RI		
trans-α-Bergamotene	1433	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	-	0.3 ± 0.0	-	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	MS,RI		
(Z)-β-Farnesene	1442	2.2 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1	-	1.1 ± 0.1	-	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.2	MS,RI		
Aromadendrene	1443	1.2 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	-	0.6 ± 0.0	-	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1	MS,RI,std		
α-Humulene	1455	t	t	t	t	t	t	-	0.3 ± 0.0	-	t	t	MS,RI,std		
(E)-β-Farnesene	1456	12.3 ± 0.1	13.3 ± 0.2	7.7 ± 0.1	12.1 ± 0.0	10.6 ± 1.5	12.7 ± 1.1	4.1 ± 0.3	9.2 ± 1.0	-	12.5 ± 1.5	13.1 ± 4.4	MS,RI		
allo-Aromadendrene	1459	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.2	3.1 ± 0.2	0.9 ± 0.0	-	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	MS,RI,std		

Component ^b	Rf ^c	Single flower												Identification Methods ^d				
		Flowering aerial parts				Leaves		Stems		Flowers		Whole			Corolla		Calyx	
		Dry	Fresh	Dry	Fresh	Dry	Dry	Dry	Dry	Dry	Fresh	Dry	Fresh		Dry	Fresh	Dry	Fresh
<i>α</i> -Curcumene	1478	0.5 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.0	2.7 ± 0.2	t	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.0	MS,RI				
Amorpha-4,7(11)-diene	1479	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0	-	-	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	MS,RI				
Germacrene D	1485	3.1 ± 0.0	13.2 ± 0.1	3.1 ± 0.0	4.7 ± 0.1	6.2 ± 0.1	3.7 ± 1.1	6.6 ± 3.3	-	-	6.2 ± 0.5	3.2 ± 0.6	5.2 ± 3.8	MS,RI,std				
(E)-β-ionone	1489	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1.3 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.0	2.0 ± 0.4	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	MS,RI,std				
<i>α</i> -Zingiberene	1495	6.0 ± 0.0	6.5 ± 0.0	3.4 ± 0.0	5.7 ± 0.1	7.7 ± 0.2	5.8 ± 0.7	5.7 ± 0.4	5.7 ± 1.9	4.6 ± 1.0	4.6 ± 1.0	6.9 ± 0.7	6.0 ± 2.5	MS,RI,std				
(Z,E)- <i>α</i> -Farnesene	1498	33.9 ± 0.2	27.3 ± 0.4	18.1 ± 0.2	30.7 ± 0.3	38.5 ± 0.1	30.0 ± 1.4	28.9 ± 2.8	3.1 ± 0.5	21.2 ± 4.3	21.2 ± 4.3	36.7 ± 4.4	31.9 ± 2.5	MS,RI				
β-Bisabolene	1506	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.1 ± 0.0	1.4 ± 0.8	0.5 ± 0.0	7.0 ± 3.2	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	MS,RI				
β-Curcumene	1515	t	t	t	t	t	3.0 ± 0.6	0.7 ± 0.1	t	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	t	0.8 ± 0.1	MS,RI				
δ-Cadinene	1523	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.1	-	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.1	MS,RI				
β-Sesquiphellandrene	1524	2.8 ± 0.0	2.6 ± 0.0	1.7 ± 0.0	2.7 ± 0.0	3.4 ± 0.0	2.7 ± 0.3	2.6 ± 0.2	1.4 ± 0.0	2.2 ± 0.5	2.2 ± 0.5	3.5 ± 0.4	3.1 ± 0.1	MS,RI				
(E)-γ-Bisabolene	1530	t	t	t	t	0.3 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	-	t	-	-	0.1 ± 0.0	MS,RI				
<i>trans</i> - <i>α</i> -Bisabolene	1535	2.6 ± 0.0	2.8 ± 0.0	1.4 ± 0.0	2.8 ± 0.1	3.9 ± 0.0	3.0 ± 0.4	3.2 ± 0.4	1.0 ± 0.3	2.6 ± 0.7	2.6 ± 0.7	4.4 ± 0.8	3.8 ± 0.3	MS,RI				
<i>cis</i> - <i>α</i> -Bisabolene	1542	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0	1.8 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	MS,RI				
(E)-Nerolidol	1561	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	-	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.0	MS,RI,std				
Spathulenol	1577	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.0	-	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	MS,RI,std				
Caryophyllene oxide	1583	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.0	MS,RI,std				
β-Atlantol	1608	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.3	0.1 ± 0.0	2.2 ± 0.6	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0	MS,RI				
Humulene epoxide II	1610	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	-	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.0	MS,RI				
<i>α</i> -Bisabolol	1688	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	0.1 ± 0.0	-	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.0	MS,RI,std				
11- <i>α</i> -Himachal-4-en-1- <i>β</i> -ol	1699	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.6 ± 1.3	2.2 ± 0.1	7.2 ± 1.5	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.4	3.0 ± 1.1	5.4 ± 0.3	MS,RI				
<i>α</i> -Bisabolol acetate	1795	0.1 ± 0.0	t	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	t	-	-	-	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS,RI				
Octadecane	1800	t	-	-	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	t	0.9 ± 0.0	-	-	0.1 ± 0.0	t	MS,RI,std				
Hexahydrofarnesyl acetone	1845	0.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1	t	1.9 ± 1.4	0.1 ± 0.0	16.0 ± 6.4	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS,RI,std				

(continued overleaf)

Component ^b	RI ^c	Flowering aerial parts				Single flower								Identification Methods ^d
		Leaves		Stems		Flowers		Whole		Corolla		Calyx		
		Dry	Fresh	Dry	Dry	Dry	Fresh (37.1 mg)	Dry (10.4 mg)	Fresh (37.1 mg)	Dry (4.0 mg)	Fresh (26.3 mg)	Dry (6.1 mg)	Fresh (12.4 mg)	
Nonadecane	1900	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	MS, RI; std	
Farnesyl acetone	1927	0.1 ± 0.0	-	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	-	-	-	-	-	-	MS, RI	
Grouped compounds (%)														
Terpenoids		90.7	93.7	79.1	89.2	94.6	88.9	90.0	83.0	78.2	90.2	91.6		
Monoterpenes hydrocarbons		1.8	1.3	6.2	3.1	1.2	6.6	7.6	-	1.0	2.5	3.3		
Oxygenated monoterpenes		6.7	5.7	21.5	5.7	1.8	5.1	3.4	23.6	13.3	2.6	2.0		
Sesquiterpenes hydrocarbons		76.4	83.4	45.7	73.7	87.9	70.4	75.6	31.9	58.4	78.7	79.0		
Oxygenated sesquiterpenes		5.4	3.0	4.1	6.0	3.6	6.4	3.3	25.5	5.2	6.4	7.2		
C ₁₃ -Norisoprenoids		0.5	0.2	1.5	0.7	0.1	0.4	0.1	2.0	0.3	-	0.1		
Aliphatics		4.7	3.8	15.4	5.8	1.8	6.9	6.2	1.7	15.1	1.4	2.5		
Alcohols		1.7	1.6	9.0	1.3	0.3	0.4	3.2	-	12.6	-	1.6		
Esters		2.5	1.4	4.9	4.1	1.0	5.0	2.0	-	0.4	1.2	1.4		
Aldehydes and ketones		0.3	0.6	1.4	0.3	0.1	1.0	1.0	-	1.8	-	0.8		
Alkanes		0.1	0.2	0.1	0.1	0.3	0.5	0.1	1.7	0.3	0.2	0.1		
Aromatics		0.3	0.3	0.4	0.4	0.1	0.5	0.1	-	0.4	0.3	0.2		
Total components		76	66	66	67	72	54	68	18	49	47	65		
Total identified (%)		95.8	97.8	94.9	95.4	96.5	96.4	96.3	84.6	93.8	91.9	95.6		

^a Values, expressed in percentages, are means ± standard error of triplicate measurements.

^b Compounds belonging to each class are listed in order of their elution from a HP-5 column.

^c RI, retention indices as determined on HP-5 column using homologous series of C₈-C₃₀ alkanes.

^d Identification methods: MS, by comparison of the mass spectrum with those of the computer mass libraries Wiley, NIST 05 and ADAMS; RI, by comparison of RI with those reported from literature;^{16,17} std, by comparison of the retention time, mass spectrum and retention index of authentic standard.

t, traces (mean value below 0.1%); -, not detected.

Tab. 12: SPME / GC / FID analýza: procentuální zastoupení těkavých látek v různých částech rostliny a také v rámci samotného květu *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* [53]

6. ZÁVĚR

Melittis melissophyllum L. subsp. *melissophyllum*

V silici *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* bylo identifikováno 48 komponent, což představuje 94,7 – 95,0 % studovaného materiálu. Hlavní komponenta byla „houbová“ sloučenina 1-okten-3-ol, představující 43,6 – 54,2 %. Zjištěné vysoké množství 1-okten-3-olu v silici naznačuje možné využití rostliny *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* jako významného přírodního zdroje této molekuly.

Teucrium flavum L. subsp. *flavum*

HS-SPME ve spojení s GC-FID a GC-MS je rychlá a jednoduchá metoda, která byla poprvé použita k extrakci a identifikaci těkavých sloučenin *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum*. V první části studie byly hodnoceny parametry, které mají vliv na reprodukovatelnost a kvantifikaci SPME techniky. Nejlepším vláknem pro analýzu těkavé frakce *T. flavum* L. subsp. *flavum* byl PDMS, použitý v těchto podmínkách: teplota 60°C, extrakční čas 30 min, množství vzorku 30 mg, velikost částic vzorku 1mm.

Dále bylo zjištěno, že přítomnost vody ve vzorku může zvýšit absolutní množství některých alkoholických sloučenin jako 1-okten-3-ol a snížit přítomnost určitých esterů např. methyl geranat.

SPME se ukázala být vysoce účinnou a výkonou technikou ve spojitosti s jednoduchostí a rychlostí. Není nutná složitá příprava vzorku, ani použití rozpouštědel. Z výše uvedeného tedy vyplývá, že se jedná o vyhovující metodu pro charakterizaci těkavé frakce *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* a obecně aromatických rostlin.

Porovnání obou extrakčních technik:

Destilací s vodní parou (SD) bylo získáno větší množství těkavých látek ve srovnání s SPME (106 vs 76). Výsledky vykazovaly vyšší obsah monoterpenů (20,9 – 23,1 %) a alkanů (3,5 – 5,9 %). Na druhé straně při analýze pomocí SPME bylo vyšší zastoupení seskviterpenů (81,8 – 86,4 % vs 59,5 – 61,6 %), zejména „ovocné“ složky (Z, E)- α -farnesenu (27,3 až 33,9%). SPME analýza ukázala odlišnosti v kvalitativní i kvantitativní emisi těkavých látek mezi různými částmi rostliny i v rámci samotného květu. Hlavní příspěvek těkavých látek k rostlinnému aroma byl dán květy. Jejich množství je potom dáno především emisí ze sepal kalichu, který obsahoval většinu látek zjištěných v celém květu (47 ze 54 a 65 z 68, v suchém resp. čerstvém vzorku).

7. LITERATURA

- [1] Adams R. P.: Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation (2007).
- [2] Badings H. T.: Cold storage defects in butter and their relation to the autoxidation of unsaturated fatty acids. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 24,149–257 (1970).
- [3] Ball P. W., Melittis L. in Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walter S.M., et al: *Flora Europea*, Cambridge: Cambridge University Press, 3, 143 (1972).
- [4] Basta A., Tzakou O., Couladis M., Yannitsaros A.: Essential oil composition of *Prasium majus* L. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 347–349 (2007).
- [5] Chalchat J. C., Petrovic S.D., Maksimovic Z.A., Gorunovic M. S.: Essentials oil of the herb of *Stachys recta* L., Lamiaceae from Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 12, 455–458 (2000).
- [6] Chitarra G. S., Abee T., Rombouts F. M., Dijksterhuis J.: 1-Octen-3-ol inhibits conidia germination of *Penicillium paneum* despite of mild effects on membrane permeability, respiration, intracellular pH, and changes the protein composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 54, 67–75 (2005).
- [7] Combet E., Henderson J., Eastwood D. C., Burton K.S.: Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: Properties, analysis and biosynthesis. *Mycoscience*, 47, 317–326 (2006).
- [8] Conti F., Abbate G., Alessandrini A., Blasi C.: *An annotated checklist of the Italian vascular flora*. Rome: Palombi Press, 173–174 (2005).
- [9] Davies N. W.: Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A*, 503, 1–24 (1990).
- [10] Guarrera P. M.: Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia*, 76, 1–25 (2005).
- [11] Kirimer N., Tabanca N., Özek T., Tümen G., Bas_er K. H. C.: Essential oils of annual *Sideritis* species growing in Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 38, 106–111 (2000).

- [12] Kolb B., Ettre L. S.: Static headspace–gas chromatography – Theory and practice. New York: Wiley-VCH, Inc. (1997).
- [13] Kovats E.: Gas chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. I. Retentions indices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta*, 41, 1915–1932 (1958).
- [14] Murahashi S.: Über die riechstoffe des matutake. *Scientific Papers of the Institute of Physical and Chemical Research*, 34, 155–172 (1938).
- [15] Skaltsa-Diamantidis H., Tsitsa-Tzardi E., Tzakou O., Argiriadou N.: Analysis of the essential oil of *Melittis melissophyllum* L. subsp. *albida* Guss. *Journal of Essential Oil Research*, 3, 367–368 (1991).
- [16] Tomei P. E., Uncini Manganelli R.E., Flamini G., Cioni P.L., Morelli I.: Composition of the Essential Oil of *Mentha microphylla* from the Gennargentu Mountains (Sardinia, Italy). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3614–3617 (2003).
- [17] US FDAs Center for Food Safety and Applied Nutrition. US FDA/CFSAN – EAFUS List.(2008) /cit. 16.03.08/.
- [18] Velasco-Negueruela A., Sanz J., Pérez-Alonso M. J., Palá-Paúl J.: The volatile components of the aerial parts of *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* gathered in Spain. *Botanica Complutensis*, 28, 133–136 (2004).
- [19] Wood W. F., Archer C.L., Largent D.L.: 1-Octen-3-ol, a banana slug antifeedant from mushrooms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 531–533 (2001).
- [20] Zawirska-Wojtasiak R.: Optical purity of (R)-(-)-1-octen-3-ol in the aroma of various species of edible mushrooms. *Food Chemistry*, 86, 113–118 (2004).
- [21] Tutin T. G., Wood D., *Teucrium* L. in Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., et al: *Flora Europaea*, Cambridge, Cambridge University Press, 3, 129–135 (1972).
- [22] Sanna C., Ballero M., Maxia A.: Le piantemedicinali utilizzate contro le patologie epidermiche in Ogliastra (Sardegna centro-orientale). *Atti della Societa` Toscana di Scienze Naturali, Memorie, Serie B*, 113, 73–82 (2006).
- [23] Savona G., Paternostro M. P., Piozzi F., Hanson J.R., Hitchcock P.B., Thomas S.A.: The structure of teuflin, a diterpenoid from *Teucrium flavum*;

- x-ray crystallographic and spectroscopic determination. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1915–1917 (1979).
- [24] Savona G., Paternostro M. P., Piozzi F., Hanson J. R., Hitchcock P. B., Thomas S.A.: Teuflidin, A Norclerodane Diterpenoid from *Teucrium flavum*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1080–1083 (1978).
- [25] Barrachina M. D., Bello R., Martinez-Cuesta M. A., Esplugues J., Primo-Yúfera E.: Antiinflammatory activity and effects on isolated smooth muscle of extracts from different *Teucrium* species. *Phytotherapy Research*, 9, 368–371 (1995).
- [26] Bello R., Barrachina M. D., Martinez-Cuesta M. A., Esplugues J., Primo-Yúfera E.: Evaluation of the acute toxicity, analgesic and CNS activities of different species of *Teucrium* genus. *Phytotherapy Research*, 9, 277–280 (1995).
- [27] Calatayud S., Bello R., Beltran B., Primo-Yúfera E., Esplugues J.: Cardiovascular effects of the methanol and dichloromethanol extracts from *Teucrium flavum* L.. *Phytotherapy Research*, 12, 68–69 (1998).
- [28] Dall'Acqua S., Cervellati R., Loi MCandInnocenti G.: Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chemistry*, 106, 745–749 (2008).
- [29] Maccioni S., Baldini R., Tebano M., Cioni P. L., Flamini G.: Essential oil of *Teucrium scorodonia* L. subsp. *scorodonia* from Italy. *Food Chemistry*, 104, 1393–1395 (2007).
- [30] Baher Z. F., Mirza M.: Volatile constituents of *Teucrium flavum* L. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 106–107 (2003).
- [31] Kovacevic N. N., Lakusic B.S., Ristic M.S.: Composition of the Essentials oils of seven *Teucrium* species from Serbia and Montenegro. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 163–165 (2001).
- [32] Bellomaria B., Arnold Nand Valentini G.: Essential oil of *Teucrium flavum* subsp. *hellenicum* from Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 131–133 (1998).
- [33] Menichini F., Conforti F., Rigano D., Formisano C., Piozzi F., Senatore F.: Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumor activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry*, 115, 679–686 (2009).

- [34] Bini Maleci L., Pinetti A., Servettaz O.: Micromorphological and phytochemical characters of the two subspecies of *Teucrium flavum* (Labiatae) from the Italian flora. *Flora*, 190, 237–242 (1995).
- [35] NIST 05, Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH). National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg (2005).
- [36] Giampieri L., Bucchini A., Fraternali D., Cara P., Ricci D., Epifano F., et al: Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium massiliense* L. *Journal of Essential Oil Research*, 20, 446–449 (2008).
- [37] Murray K. E., Huelin F.E., Davenport J.B.: Occurrence of farnesene in the natural coating of apples. *Nature*, 204, 80 (1964).
- [38] Versini G., Franco M. A., Moser S., Barchetti P., Manca G.: Characterisation of apple distillates from native varieties of Sardinia island and comparison with other Italian products. *Food Chemistry*, 113, 1176–1183 (2009).
- [39] Murray K. E.: alfa-Farnesene: Isolation from the natural coating of apples. *Australian Journal of Chemistry*, 22, 197–204 (1969).
- [40] Ziegler E., Ziegler H.: Flavouring: Production, Composition, Applications and Regulations. Wiley-VCH, Weinheim, 369 (1998).
- [41] Mookherjee B. D., Trenkle R. W., Chant B. J., Ouwerkerk A.V., Kamath V., Mussinan C.J.: Use of isomeric farnesene product-by-process for augmenting or enhancing the aroma or taste of foodstuffs, chewing gums, medicinal products and toothpastes. US Patent 4446125 (1984).
- [42] Bini Maleci L., Pinetti A., Servettaz O.: Micromorphological and Phytochemical Research on *Teucrium massiliense* L. in Harley R. M., Reynolds T.: *Advances in Labiate Science*, Royal Botanic Gardens, Kew, 349–355 (1992).
- [43] Kanasawud P., Crouzet J. C.: Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1238–1242 (1990).
- [44] Gunata Y. Z., Bayonove C. L., Baumes R. L., Cordonnier R.E.: The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography*, 331, 83–90 (1985).

- [45] Maggi F., Bílek T., Lucarini D., Papa F., Sagratini G., Vittori S.: *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* (Lamiaceae) from central Italy: A new source of a mushroom-like flavor. *Food Chemistry*, 113, 216–221 (2009).
- [46] Young J. C., Chu C.L.G., Lu X. W., Zhu H.H.: Ester variability in apple varieties as determined by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8086–8093 (2004).
- [47] Arthur C., Pawliszyn J.: Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145–2148 (1990).
- [48] Cavaleiro C., Salgueiro L.R., Miguel M.G., Proença da Cunha A.: Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the volatile components of *Teucrium lusitanicum* and *Teucrium algarbiensis*. *Journal of Chromatography A*, 1033, 187–190 (2004).
- [49] Coll J., Tandrón Y.: Isolation and structure elucidation of three neoclerodane diterpenes from *Teucrium fruticans* L. (LABIATAE). *Phytochemistry*, 66, 2298–2303 (2005).
- [50] El-Shazly A. M., Hussein K. T.: Chemical analysis and biological activities of the essential oil of *Teucrium leuocladum* Boiss. (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 665–674 (2004).
- [51] Husson F., Thomas M., Kermasha S., Belin J.M.: Effect of linoleic acid induction on the production of 1-octen-3-ol by the lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities of *Penicillium camemberti*. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 19, 363–369 (2002).
- [52] Lord H., Pawliszyn J.: Microextraction of drugs. *Journal of Chromatography A*, 902, 17–63 (2000).
- [53] Maggi F., Bílek T., Cristalli G., Papa F., Sagratini G., Vittori S.: Comparison of the fruit-like aroma of *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* by hydrodistillation and solid-phase micro-extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2505–2518 (2009).
- [54] Ram M. S., Seitz L. M.: Use of an autosampler for dynamic headspace extraction of volatile compounds from grains and effect of added water on the extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4202–4208 (1999).

- [55] Sagratini G., Manães J., Giardina` D., Damiani P., Pico` Y.: Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1147, 135–143 (2007).
- [56] Saito Y., Nakao Y., Imaizumi N., Morishima Y., Kiso Y., Jinno K.: Miniaturized solid-phase extraction as a sample preparation technique for the determination of phtalates in water. *Anaytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 81–86 (2002).
- [57] Saroglou V., Arfan M., Shabir A., Hadjipavlou-Litina D., Skaltsa H.: Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium royleanum* Wall. ex Benth growing in Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 154–157 (2007).
- [58] SLAVÍK B. et al.: Květena České republiky, sv. 6., Praha: Academia, 554-709 (2000).
- [59] Lee J. J., Jin Y. R., Lee J. H., Yu J. Y., Han X. H., Oh K. W., Hong J. T., Kim T.J., Yun Y.P.: Antiplatelet activity of carnosic acid, a phenolic diterpene from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*, 73, 121-127 (2007).
- [60] Hubík J., Dušek J., Spilková J., Šícha J.: Obecná Farmakognosie 2., Sekundární látky, Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 297s (1989).
- [61] Hubík J., Dušek J., Spilková J.: Farmakognosie 1., Obecná část a primární látky, Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 87 s (1989).
- [62] Paula de Oliveira A., Santin J. R., Lemos M., Klein Júnior L. C., Couto A.G., Meyre da Silva Bittencourt C., Filho V.C., Faloni de Andrade S.:Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 63, 1230-1237 (2011).
- [63] Shekarchi M., Hajimehdipoor H., Saeidnia S., Gohari A.R., Hamedani M.P.: Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacognosy Magazine*, 8, 37–41 (2012).
- [64] Makito, T., Furuta A., Fujii H., Nakagawa T., Wakushima H., Saito K., Kano Y.: Effect of oral treatment of *Perilla frutescens* and its constituents on type-I allergy in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24, 1206-1209 (2001).

- [65] Yang J. H., Son K.H., Son J.K., Chang H.W.: Anti-allergic activity of an ethanol extract from *Salviae miltiorrhiza*. *Archives of Pharmacal Research*, 31, 1597–1603 (2008).
- [66] Inoue T., Sugimoto Y., Masuda H., Kamei C.: Antiallergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha piperita* L. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25, 256–259 (2002).
- [67] Interaminense L. F., Jucá D. M., Magalhães P. J., Leal-Cardoso J. H., Duarte G. P., Lahlou S.: Pharmacological evidence of calcium-channel blockade by essential oil of *Ocimum gratissimum* and its main constituent, eugenol, in isolated aortic rings from DOCA-salt hypertensive rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21, 497–506 (2007).
- [68] Samec D., Gruz J., Strnad M., Kremer D., Kosalec I., Grubesić R. J., Karlović K., Lucic A., Piljac-Zegarac J.: Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L. antioxidant capacity). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 113–119 (2010).
- [69] Kremer D., Müller I. D., Dunkić V., Vitali D., Stabentheiner E., Oberländer A., Bezić N., Kosalec I.: Chemical traits and antimicrobial activity of endemic *Teucrium arduini* L. from Mt Biokovo (Croatia). *Central European Journal of Biology*, 7, 941–947 (2012).
- [70] Bello R., Beltrán B., Moreno L., Calatayud S., Primo-Yúfera E., Esplugues J.: Evaluation of the analgesic and CNS actions of different fractions from the methanol extract of *Teucrium flavum* L. *Phytotherapy Research*, 12, 65–67 (1998).
- [71] Kouzi S. A., McMurtry R. J. Nelson S. D.: Hepatotoxicity of germander (*Teucrium chamaedrys* L.) and one of its constituent neoclerodane diterpenes teucrin A in the mouse. *Chemical Research in Toxicology*, 7, 850–856 (1994).
- [72] Ali N., Ali Shah S. W.: Antispasmodic activity of *Teucrium stocksianum* Boss. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 171–174 (2011).
- [73] Mou M., Zhang Q., Kang W., Pi K., Chen Q., Yao R.: Chemical constituents and bioactivity of *Teucrium pilosum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 34, 2189–2193 (2009).

- [74] Rajabalian S.: Methanolic extract of *Teucrium polium* L. potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines. *Experimental Oncology*, 30, 133–138 (2008).
- [75] Panovska T. K., Kulevanova S., Gjorgoski I., Bogdanouva M., Petrushevska G.: Hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of *Teucrium polium* L. against carbontetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Acta Pharmaceutica*, 57, 241–248 (2007).
- [76] Darabpour E., Motamedi H., Nejad S. M. S.: Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 124–127 (2010).
- [77] Vukovic N.: Chemical composition and antimicrobial activity of *Teucrium arduini* essential oil and cirsimarin from Montenegro. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 1244–1250 (2011).
- [78] Poon W. T., Chau T. L., Lai C. K., Tse K. Y., Chan Y. C., Leung K. S., Chan Y. W.: Hepatitis induced by *Teucrium viscidum*. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 46, 819–822 (2008).
- [79] Kaurinovic B., Popovic M., Vlaisavljevic S., Raseta M.: Antioxidant Activities of *Melittis melissophyllum* L. (Lamiaceae). *Molecules*, 16, 3152–3167 (2011).
- [80] Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2009, Praha: Grada, 3968s, CD-ROM (2009).
- [81] Chemie přírodních látek II. aneb ...to nejlepší z přírody... [Online], http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/1111.ppt [cit. 21. 8. 2013]
- [82] Sigma-Aldrich: Product Directory Home (2013), chemické vzorce [Online], <http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html> [cit. 20. 8. 2013]
- [83] Hess D.: Fyziologie rostlin. Praha: Academia, 348s (1983)

- [84] De Cuyper M., Bulte J. W. M.: *Physics and Chemistry Basis of Biotechnology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 334 s (2001).
- [85] Chaintreau A.: Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity – review. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 136-148 (2001).
- [86] Pino A. J., Almora K., Marbot R.: Volatile components of papaya (*Carica papaya* L., Maradol variety) fruit. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 492–496 (2003).
- [87] Vijayanand P., Rao J. M. L., Narasimham P.: Volatile flavour components of jamun fruit (*Syzygium cumini* L). *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 47–49 (2001).
- [88] Churáček J.: *Analytická separace látek*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 384s, (1990).
- [89] Štulík K.: *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 264s (2004).
- [90] Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 132 s (2003).
- [91] Modey W. K., Mulholland D.A., Raynoranalyt M.W.: Analytical Supercritical Fluid Extraction of Natural Products. *Phytochemical Analysis*, 7, 1–15 (1996).
- [92] Lang Q., Wai CH. M.: Supercritical fluid extraction in herbal and natural produkt studies – a practical review. *Talanta*, 53, 771-782 (2001).
- [93] Papamichail I., Louli V., Magoulas K.: Supercritical fluid extraction of celery seed oil. *Journal of Supercritical Fluids*, 18, 213–226 (2000).
- [94] De Fátima Alpendurada M.: Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 889, 3–14 (2000).
- [95] Poliak M., Kochman M., Gordin A., Amirav A.: A Comparison of SnifProbe and SPME for Aroma Sampling. *Chromatographia*, 64, 487–493 (2006).
- [96] Pawliszyn J.: (1997). *Solid phase microextraction – theory and practice*. New York: Wiley-VCH, 264 s, (1997).

- [97] Pawliszyn J., Pawliszyn B., Pawliszyn M.: Solid Phase Microextraction (SPME). *The Chemical Educator*, 2, 1–7 (1997).
- [98] Jusman, Setiaji B., Triyono, Syoufian A.: Fractionation Of Medium Chain Fatty Acid Ethyl Esters From Virgin Coconut Oil Via Transesterification and Distillation Under Reduced Pressure. *International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS*, 13, 60–64 (2013).
- [99] Cahyono E., Pranowo H. D., Muchalal, Triyono.: Analysis Of The Enantiomers Ratio Of Citronellal From Indonesian Citronella Oil Using Enantioselective Gas Chromatography. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Science*, 9, 62–66 (2013).
- [100] Lin L., Zhuang M., Lei F., Yang B., Zhao M.: GC/MS analysis of volatiles obtained by headspace solid-phase microextraction and simultaneous-distillation extraction from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf and stem. *Food Chemistry*, 136, 555–562 (2013).
- [101] Chen Q., Li P., He J., Zhang Z., Liu J.: Supercritical fluid extraction for identification and determination of volatile metabolites from *Angelica dahurica* by GC-MS. *Journal of Separation Science*, 31, 3218-3224 (2008).
- [102] Nur Aimi R., Abu Bakar F., Dzulkifly M. H.: Determination of volatile compounds in fresh and fermented *Nipa* sap (*Nypa fruticans*) using static headspace gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *International Food Research Journal*, 20, 369–376 (2013).
- [103] Tholl D., Boland W., Hansel A., Loreto F., Röse U. S., Schnitzler J. P.: Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, 45, 540–560 (2006).
- [104] Abu-Lafi S., Odeh I., Dewik H., Qabajah M., Imam A., Dembitsky V. M., Hanus L. O.: Natural compounds of Palestine flora. Comparison analysis by static headspace and steam distillation GC-MS of semivolatile secondary metabolites from leaves of cultivated Palestinian *Majorana syriaca*. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic*, 151, 21–29 (2007).
- [105] Belliardo F., Bicchi C., Cordero C., Liberto E., Rubiolo P., Sgorbini B.: Headspace-Solid-Phase Microextraction in the Analysis of the Volatile

- Fraction of Aromatic and Medicinal Plants. *Journal of Chromatographic Science*, 44, 416–429 (2006).
- [106] Kamal K. Pande, Pankaj Sah, Lata Pande, Bharat Pande, Atul Pukači, Stuti Sah.: Dynamic Headspace GC-MS Study of Essential Oil from *Coriandrum sativum* L. Fruits. *Natural Products Research Bulletin*, 1, 7–11 (2012).
- [107] Anees Ahmad, Abbas F. M. Alkarkhi, Sufia Hena, Lim Han Khim: Extraction, Separation and Identification of Chemical Ingredients of *Elephantopus Scaber* L. Using Factorial Design of Experiment. *International journal of chemistry*, 1, 36–49 (2009).
- [108] Plynová chromatografie (online),
http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf
[cit. 21. 8. 2013]
- [109] Xiao Q., Yu C., Xing J., Hu B.: Comparison of headspace and direct single-drop microextraction and headspace solid-phase microextraction for the measurement of volatile sulfur compounds in beer and beverage by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1125, 133–137 (2006).
- [110] Hallyday D., Resnick R., Walker J.: Fyzika. Brno: Vutium, 1254 s (2000).
- [111] Müller L., Górecki T., Pawliszin J.: Solid-phase Microextraction in Analysis of Pollutants in the Field. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, ISBN 0471 976709, 1-16 [Online],
http://matematicas.udea.edu.co/~carlopez/SPME_on_the-field.pdf. [cit. 15. 8. 2013],
- [112] Sigma-Aldrich: Mikroextrakce na tuhou fázi SPME.(1998) [Online],
<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15720/11.pdf>. [cit. 15. 8. 2013]
- [113] Sigma-Aldrich: Solid Phase Microextraction, theory and optimization condition.(1998) [Online],
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf>. [cit. 15. 8. 2013]
- [114] Lord H., Pawliszin J.: Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 873,153–193 (2000).

- [115] Kataoka H., Lord H. L., Pawliszyn J.: Application of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 35–62 (2000).
- [116] Sommer L. et al.: *Základy analytické chemie II*. Brno: Vutium, 347 s (2000).
- [117] Clement R. E.: *Gas Chromatography – Biochemical, Biomedical, and Clinical Applications*. New York: Wiley-Interscience Publication-John Wiley & Sons, 393 s (1990).
- [118] Suchánek M., Plzák Z., Šubrt P., Koruna I.: Validace analytických metod. Kvalimetrie: řada příruček pro laboratoře. 7. Praha: Eurachem-ČR, 137 s (1997).
- [119] Hendl J.: *Přehled statistických metod zpracování dat*. Praha: Portál, 584 s (2004).
- [120] Validační program pro statistické zpracování analytických dat [online], <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/validace.pdf> [cit. 16. 8. 2013].
- [121] Dvořáková M., Valterová I., Vaňek T.: Monoterpeny v rostlinách. *Chemické Listy*, 105, 839–845 (2011).
- [122] Zachař P., Sýkora D.: Plynová chromatografie (online), <http://www.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf> [cit. 21. 8. 2013].
- [123] Jahodář L.: *Farmakobotanika, semenné rostliny*. Praha: Karolium, 258 s (2006).
- [124] Jahodář L.: Rostlinná hypoglykemika. *Československá farmacie*, 42, 251–259 (1993).
- [125] Petersen M., Simmonds M. S. J.: Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 121–125 (2003).
- [126] Somova L. O., Nadar A., Rammanan P., Shode F. O.: Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*, 10, 115–121 (2003).

- [127] Capecka E., Mareczek A., Leja M.: Antioxidant activity of fresh and dry herba of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93, 223–226 (2005).
- [128] Shin T. Y., Kim S. H., Suk K., Ha J. H., Kim I, et al.: Anti-allergic effects of *Lycopus lucidus* on mast cell mediated allergy model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209, 255–262 (2005).
- [129] Ismaili H.: In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 31–36 (2004).
- [130] Singh S., Majumdar D. K., Rehan H. M. S.: Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holybasil) and its possible mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 54, 19–26 (1996).
- [131] Lai P. K., Roy J.: Antimicrobial and Chemopreventive Properties of Herbs and Spices. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1451–1460 (2004).
- [132] Tan B. K. H., Vanitha J.: Immunomodulatory and Antimicrobial Effects of Some Traditional Chinese Medicinal Herbs: A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1423–1430 (2004).
- [133] Kwon Y. I., Vattem D. A., Shetty K.: Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15, 107–118 (2006).
- [134] Esmaeili M. A., Yazdanparast R.: Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 27–30 (2004).
- [135] Al-Hader A. A., Hasan Z. A., Aqel M. B.: Hyperglycemic and insulin release inhibitory effects of *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 43, 217–221 (1994).
- [136] Bakirel T., Bakirel U., Keles O. U., Ulgen S. G., Yardibi H.: In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 64–73 (2008).
- [137] Hilaly J. E., Lyoussi B.: Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 109–113 (2002).

- [138] El-Bardai S., Wibo M., Hamaide M. C., et al.: Characterisation of marrubenol, a diterpene extracted from *Marrubium vulgare*, as an L-type calcium channel blocker. *British Journal of Pharmacology*, 140, 1211–1216 (2003).
- [139] Lahlou S., Carneiro-Leao R. F. L., Leal-Cardoso J. H.: Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt-hypertensive rats. *Phytomedicine*, 9, 715–720 (2002).
- [140] Chenni A., Yahia D. A., Boukourt F. O., et al.: Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 207–213 (2007).
- [141] Singh S., Majumdar D. K.: Evaluation of the gastric antiulcer activity of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holy Basil). *Journal of Ethnopharmacology*, 65, 13–19 (1999).
- [142] Ballabeni V., Tognolini M., Chiavarini M., et al.: Novel antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from *Lavandula hybrida* Reverchon „grosso“. *Phytomedicine*, 11, 596–601 (2004).
- [143] Karmazín M., Hubík J., Dušek J. Seznam léčiv rostlinného původu. Praha: Avicenum, 234 s (1984).
- [144] Mac Gillivray B., Pawliszyn J.: Headspace Solid-Phase Microextraction versus Purge and Trap for the Determination of Substituted Benzene Compounds in Water. *Journal of Chromatographic Science*, 32, 317–322 (1994).
- [145] Rasanen I., Viinamäki J., Vuori E., Ojanperä I.: Headspace In-Tube Extraction Gas Chromatography – Mass Spectrometry for the Analysis of Hydroxylic Methyl-Derivatized and Volatile Organic Compounds in Blood and Urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 34, 113–121 (2010).
- [146] Hook G. L., Jackson Lepage C., Miller S. I., Smith P.A.: Dynamic solid phase microextraction for sampling of airborne sarin with gas chromatography-mass spectrometry for rapid field detection and quantification. *Journal of Separation Science*, 27, 1017–1022 (2004).
- [147] Taylor A. J.: Food Flavour Technology. Blackwell Publishing, 316 s (2002).

- [148] Semenov S. N., Koziel J.A., Pawliszyn J.: Kinetics of solid-phase extraction and solid-phase microextraction in thin adsorbent layer with saturation sorption isotherm. *Journal of Chromatography A*, 873, 39–51 (2000).
- [149] Velíšek J.: *Chemie potravin 2*. Tábor: Osis, 328 s (1999).
- [150] Sigma-Aldrich: SPME Applications Guide. (2001) [Online], <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/8652.Par.001.File.tmp/8652.pdf>. [cit. 16. 8.2013]
- [151] Augusto F., Valente A. L. P.: Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in analytical chemistry*, 21, 428–438 (2002).
- [152] VŠCHT.cz, SPME [Online], http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM_SPME_1007.pdf. [cit. 25. 8. 2013]
- [153] Gas Chromatography [Online], <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>. [cit. 25. 8. 2013]
- [154] *Fytochemické metody* [Online], <https://docs.faf.cuni.cz/KFBE/?path=fytochemick%c3%a9+metody+gf226>. [cit. 20.8. 2013]
- [155] Sagratini G., Maggi F., Bílek T., Papa F., Vittori S.: Analysis of the volatile compounds of *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* (Lamiaceae) by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with flame ionisation and mass spectrometric detection. *Natural Product Research*, 26, 1339–1347 (2012).

8. PŘÍLOHA - AUTORSKÉ PUBLIKACE

Maggi F., Bílek T., Lucarini D., Papa F., Sagratini G., Vittori S.: *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* (Lamiaceae) from central Italy: A new source of a mushroom-like flavor. *Food Chemistry*, 113, 216–221 (2009).

Maggi F., Bílek T., Cristalli G., Papa F., Sagratini G., Vittori S.: Comparison of the fruit-like aroma of *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* by hydrodistillation and solid-phase micro-extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2505–2518 (2009).

Sagratini G., Maggi F., Bílek T., Papa F., Vittori S.: Analysis of the volatile compounds of *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* (Lamiaceae) by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with flame ionisation and mass spectrometric detection. *Natural Product Research*, 26, 1339–1347 (2012).

