

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Antimikrobiální působení silic z vybraných léčivých rostlin
používaných v českém lidovém léčitelství**

Diplomová práce

Bc. Šárka Pausarová

Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antimikrobiální působení silic z vybraných léčivých rostlin používaných v českém lidovém léčitelství " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušily autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Pavlovi Novému, Ph.D. za cenné rady, metodickou a odbornou pomoc při zpracování mé práce. Dále bych ráda poděkovala rodině, kamarádům a zejména mému snoubenci za všestrannou podporu v průběhu studia.

Antimikrobiální působení silic z vybraných léčivých rostlin používaných v českém lidovém léčitelství

Souhrn

Příznivé biologické účinky mnoha rostlin jsou tradičně využívány v lidovém léčitelství k léčbě různých onemocnění. To platí i pro léčbu mikrobiálních infekcí, přičemž u řady rostlin bývá antimikrobiální účinek dáván do souvislosti s obsahem silic.

Cílem této práce bylo zanalyzovat chemické složení a ověřit antimikrobiální aktivitu silic *Aristolocha clematitis*, *Sisymbrium officinale* a *Astragalus glycyphyllos*, u kterých je v literatuře zmiňován obsah silic, ale jejich složení či antimikrobiální účinky nebyly dosud popsány.

Antimikrobiální aktivita byla testována bujónovou mikrodiluční metodou *in vitro*. Byly testovány silice získané hydrodestilací z usušené nadzemní části vybraných druhů rostlin. Antimikrobiální aktivita byla testovaná na zástupcích grampozitivních (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*), a gramnegativních (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakterií a na jedné kvasince (*Hanseniaspora uvarum*). Chemické složení silic bylo zanalyzováno pomocí plynové chromatografie.

Pomocí chemické analýzy bylo zjištěno složení a procentuální zastoupení silic. Hlavními složkami *A. clematitis* byl caryophyllen (15,28 %), bornyl acetát (7,12 %), β -cadinen (5,64 %) a camphor (4,74 %). U silice *S. officinale* to byl hexahydrofarnesyl aceton (52,27 %) a trans- β -ionon (19,14 %). A v případě *A. glycyphyllos* byly nejvíce zastoupenými sloučeninami phytol (12,79%), hexahydrofarnesyl aceton (10,94 %) a trans- β -ionon (10,49 %). Podle dostupných zdrojů se v případě *A. clematitis* a *A. glycyphyllos* jedná o první analýzu složení jejich silic. Jejich antimikrobiální účinek se v testovaném koncentračním rozmezí od 4 do 512 μ l/ml nepodařilo potvrdit.

Klíčová slova: antibakteriální, antifungální, baktericidní, éterický olej, silice

Antimicrobial effect of essential oils from selected medicinal plants used in traditional Czech medicine

Summary

The beneficial biological effects of many plants have been traditionally used in folk medicine to treat various diseases. This also applies to the treatment of microbial infections, whereas the antimicrobial effect of many plants is often attributed to their essential oil content.

The aim of this work was to analyse the chemical composition and to verify the antimicrobial activity of essential oils of *Aristolochia clematitis*, *Sisymbrium officinale* and *Astragalus glycyphyllos*, for which the essential oil content is mentioned in the literature, but the composition or antimicrobial effects have not been described so far.

Antimicrobial activity was tested by the broth microdilution method *in vitro*. Essential oils obtained by hydrodistillation from the dried aerial part of selected plant species were analysed. The antimicrobial activity was tested against the representatives of gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*) and gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria and one yeast (*Hanseniaspora uvarum*). The chemical composition of the essential oils was analysed by gas chromatography.

The composition and percentage of essential oils were determined by chemical analysis. The main constituents of *A. clematitis* were caryophyllene (15.28%), bornyl acetate (7.12%), β cadinene (5.64%) and camphor (4.74%). For *S. officinale* essential oil, it was hexahydrofarnesyl acetone (52.27%) and trans- β -ionone (19.14%). In the case of *A. glycyphyllos*, phytol (12.79%), hexahydrofarnesyl acetone (10.94%) and trans- β -ionone (10.49%) were the most abundant compounds. According to available sources, this is the first analysis of *A. clematitis* and *A. glycyphyllos* essential oil composition. Their antimicrobial effect could not be confirmed in the tested concentration range from 4 to 512 μ l/ml.

Keywords: antibacterial, antifungal, bactericidal, essential oil

Obsah

1	Úvod	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Antimikrobiální aktivita	11
3.2	Silice	11
3.2.1	Využití silic	11
3.2.1.1	Zemědělství	11
3.2.1.2	Potravinářství	13
3.2.2	Složení silic	14
3.2.2.1	Faktory ovlivňující složení a obsah	15
3.2.3	Mechanismus účinku	16
3.2.4	Získávání silic	17
3.2.4.1	Tradiční metody	18
3.2.4.2	Nové metody	21
3.2.5	Analýza silic	22
3.2.5.1	Analýzy složení silic	22
3.2.5.2	Testování antimikrobiální aktivity	24
3.2.6	Léčivé rostliny s předpokládanou antimikrobiální aktivitou	26
3.2.6.1	Podražec křovištní (<i>Aristolochia clematitis</i> L.)	26
3.2.6.2	Hulevník lékařský (<i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop.)	29
3.2.6.3	Kozinec sladkolistý (<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.)	30
4	Metodika	33
4.1	Použité pomůcky a přístroje	33
4.2	Použité chemikálie	33
4.3	Mikroorganismy	33
4.4	Rostlinný materiál	34
4.5	Extrakce silic	34
4.6	Testování antimikrobiální aktivity	35
4.6.1	Příprava kultivačních médií	35
4.6.2	Příprava zásobních roztoků silic	35
4.6.3	Příprava zásobního inokula	36
4.6.4	Příprava kontrolních antibiotik	36
4.6.5	Příprava inokula pro testování	36
4.6.6	Příprava mikrotitrační destičky, její zaočkování a vyhodnocení MIC	36
4.7	Analýza chemického složení silic	38

5	Výsledky	40
5.1	Extrakce silic	40
5.2	Hustota silic	40
5.3	Antimikrobiální aktivita.....	40
5.4	Chemické složení.....	41
6	Diskuze	44
6.1	Podražec křovištní (<i>Aristolochia clematitis</i> L.)	44
6.2	Hulevník lékařský (<i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop.)	45
6.3	Kozinec sladkolistý (<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.)	46
7	Závěr.....	47
8	Literatura	48
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	58
10	Seznam obrázků.....	59
11	Seznam tabulek.....	59
13	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Dlouho předtím, než lidstvo objevilo existenci mikroorganismů, bylo dobře známo, že některé rostliny mají léčivý potenciál. Již od starověku člověk používal rostliny k léčbě běžných infekčních onemocnění a některé z těchto tradičních léčiv jsou dodnes součástí obvyklé léčby některých onemocnění. Například použití brusinkové šťávy (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) k léčbě infekcí močových cest nebo použití silice kajeputu střídavolistého (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) k léčbě akné a dalších infekčních kožních onemocnění. (Ríos & Recio 2005)

V současné době je pozorován trend většího zájmu o používání přírodních látek ve všech odvětvích lidské činnosti. Nejedná se jen o farmaceutický průmysl, ale i potravinářský, kosmetický aj. To dává prostor k využití stávajících znalostí o antimikrobiální aktivitě silic a zkoumání nových aromatických a léčivých rostlin, jako možných zdrojů nových antimikrobiálně působících látek. Kromě toho je stále větším problémem tzv. antibiotická rezistence mikroorganismů. Denně jsme vystaveni kontaktu s mikroorganismy, běžně se vyskytují v životním prostředí a potravinách a mohou způsobit vážná až smrtelná onemocnění. V případě antibiotické rezistence by silice mohly sloužit jako pomocný terapeutický prostředek, možná i jako alternativa antibiotik.

Stále je řada rostlin, u kterých nebylo dostatečně prozkoumáno složení silic a jejich antimikrobiální aktivita. Proto se tato práce zaměřuje na testování antimikrobiální aktivity a složení silic podražce křovištního (*Aristolochia clematitis* L.), hulevníku lékařského (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.) a kozince sladkolistého (*Astragalus glycyphyllos* L.).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je vybrat vhodné druhy siličnatých rostlin (dosud vůbec nebo nedostatečně prozkoumaných) a ověřit antimikrobiální aktivitu jejich silic.

Hypotéza: Z literatury je známo mnoho silic s antimikrobiální aktivitou. Lze předpokládat, že i silice z námi vybraných rostlin budou vykazovat antimikrobiální aktivitu.

3 Literární rešerše

3.1 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita je schopnost látky inhibovat růst mikroorganismu, popř. usmrtit daný mikroorganismus. Antimikrobiálními účinky se rozumí působení proti bakteriím, plísním, kvasinkám a virům, a zahrnují tedy účinky antibakteriální, antimykotické a antivirové. Tuto aktivitu lze vyjádřit pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zabraňuje růstu mikroorganismů, nebo minimální baktericidní koncentrace (MBC), což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky potřebná k usmrcení bakterií za určitou dobu. (Balouiri et al. 2016)

Antimikrobiální aktivitu vykazuje velké množství látek jako např. organické a anorganické kyseliny, dusitany, peroxid vodíku, alkaloidy, fenolické látky, silice atd.

3.2 Silice

Silice, jinak také éterické oleje, jsou těkavé, přírodní, komplexní sloučeniny, které se vyznačují silnou vůní a produkují je aromatické rostliny jako sekundární metabolity. Jsou známé pro své antiseptické účinky, tj. baktericidní, virucidní a fungicidní, a léčivé vlastnosti. Tyto vlastnosti se využívají při aromatizaci a konzervaci potravin. Ve farmaceutickém průmyslu jsou využívány jako antimikrobiální, analgetické, sedativní, protizánětlivé, spasmolytické a lokálně anestetické prostředky. (Bakkali et al. 2008)

Éterické oleje jsou kapalné, průhledné a zřídka barevné látky, rozpustné v tucích a v organických rozpouštědlech. Mohou být syntetizovány všemi částmi rostlin, tj. pupeny, květy, listy, stonky, větvičkami, semeny, plody, kořeny, dřevem nebo kůrou. V rostlinách jsou uloženy v sekrečních buňkách, dutinách, kanálech, epidermálních buňkách nebo žlázových trichomech. Jejich složení se může značně lišit mezi jednotlivými druhy a odrůdami aromatických rostlin. Složení se může dále lišit i v rámci jedné odrůdy z různých zeměpisných oblastí. (Bakkali et al. 2008; Soares de Oliveira et al. 2020)

V přírodě hrají éterické oleje důležitou roli v ochraně rostlin jako antibakteriální, antivirové, protiplísňové, insekticidní látky. Jsou syntetizovány také jako obrana proti herbivorům. Mohou přitahovat některé druhy hmyzu a podporovat tak šíření pylu a semen nebo odpuzovat nežádoucí druhy. (Reyes-Jurado et al. 2015)

3.2.1 Využití silic

Silice mají široké využití napříč obory. Díky jejich výrazné vůni jsou používány při výrobě parfémů a kosmetiky a jsou základem aromaterapie. Antimikrobiální aktivita hraje hlavní roli při použití ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu a zemědělství.

3.2.1.1 Zemědělství

Praktické využití éterických olejů v zemědělství má široký potenciál. Jedná se zejména o přírodní insekticidy, herbicidy, fungicidy a repelenty, které by mohly být účinnou alternativou syntetických přípravků na ochranu proti škůdcům.

Historie ukazuje, že nadměrné používání syntetických insekticidů vedlo k mnoha problémům, které se v době jejich zavedení nepředpokládaly: akutní a chronické otravy zemědělských pracovníků, a dokonce i spotřebitelů, otravy ryb, ptáků a dalších volně žijících živočichů, narušení přirozené biologické rovnováhy, rozsáhlé kontaminace podzemních vod, která potenciálně ohrožuje zdraví lidí a životního prostředí, a vývoj rezistence populací škůdců vůči pesticidům. Reakce na tyto problémy bylo zavedení regulačních opatření, kterými byly zakázány nebo přísně omezeny neškodlivější přípravky a vytvoření politiky nahrazující rizikové chemické látky těmi, u nichž bylo prokázáno, že představují menší rizika pro lidské zdraví a životní prostředí. To vedlo k zájmu o objevování a vývoj alternativních přípravků na ochranu proti škůdcům na bázi éterických olejů, které mají nižší zdravotní a environmentální dopady. (Isman 2005)

Ve studiích byla prokázána účinnost silic z eukalyptu (*Eucalyptus nicholii* Maiden & Blakely), cypřišku lawsonova (*Chamaecyparis lawsoniana* (A.Murray bis) Parl.), rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis* L.) a bílého cedru (*Thuja occidentalis* L.) na inhibici klíčení některých významných druhů plevelů a jejich potenciální možné využití jako herbicidů. (Ramezani et al., 2013)

Účinná aplikace éterických olejů byla prokázána také v případě ochrany v průběhu skladování. Posklizňové choroby způsobují velké ztráty během přepravy a skladování. Vyšší obsah vody, složení živin a pH většiny produktů podléhajících rychlé zkáze umožňují růst řady mikroorganismů. Celosvětové posklizňové ztráty rychle se kazících produktů způsobené plísněmi se pohybují mezi 10 a 50 %. (Tripathi et al. 2008)

Byla prokázána účinná ochrana éterického oleje z tymiánu (*Thymus vulgaris* L.) proti posklizňové hnilobě způsobené *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata* a *Colletrichum gloeosporioides*. Pozitivní výsledky ve studiích vykazoval také éterický olej z citronové trávy (*Cymbopogon citratus* (hort. ex DC.) Stapf), Tea tree (*Melaleuca* spp.), hřebíčku (*Eugenia caryophyllata* Thunb.), oregana (*Origanum vulgare* L.) a lípie (*Lippia javanica* Spreng.), které byly testovány proti různým houbovým patogenům. Byly testovány různé metody aplikace jako jsou postřik, máčení nebo fumigace. Hlavní výhodou éterických olejů je jejich bioaktivita během vypařování, což je vlastnost, která je činí atraktivními jako možné fumiganty pro ochranu skladovaných produktů. (Sivakumar & Bautista-Baños 2014)

Nedávné výzkumy rovněž prokázaly účinnost proti škůdcům na rostlinách. Éterický olej z kmínu (*Cuminum cyminum* L.), anýzu (*Pimpinella anisum* L.), oregana (*Origanum syriacum* var. *Bevanii* (Holmes) Ietsw.) a eukalyptu (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) byly účinné jako fumiganty proti mšici bavlníkové (*Aphis gossypii* Glover, 1877) a svilušce rumělkové (*Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval, 1867)). (Isman 2000)

Éterické oleje mají potenciál pro uplatnění nejen v rostlinné výrobě, ale také v živočišné produkci jako přírodní repelenty. Což jsou látky, které působí lokálně nebo na dálku, a odpuzují členovce a zamezují tedy kontaktu s kůží a případnému kousnutí. Bylo prokázáno, že velké množství éterických olejů extrahovaných z různých čeledí má vysokou repelentní účinnost vůči druhům členovců. Mezi rostlinami produkujícími éterické oleje byly hojně studovány některé rody, jako například voňatka (*Cymbopogon* spp.), blahovičnick (*Eucalyptus* spp.) a bazalka (*Ocimum* spp.) Éterický olej z citronové trávy (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) smíchaný s vanilinem poskytoval účinnou ochranu po dobu 6 h proti druhům *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 a *Anopheles dirus* Peyton and

Harrison, 1979, což jsou výsledky srovnatelné s hodnotami zjištěnými při použití 25 % DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzanmidu). DEET je syntetická látka, která je v současnosti nejpoužívanější aktivní složkou repelentů proti hmyzu. (Nerio et al. 2010)

Potenciál pro využití éterických olejů jako veterinárních prostředků proti významným ektoparazitům z řad členovců je rovněž studován. Jejich účinnost se projevila nejen po ponoření a fyzickém kontaktu s ošetřenými povrchy, ale také po vystavení parám éterických olejů. To naznačuje, že způsob jejich účinku je spíše neurotoxický než pouze mechanický. Těkvavá povaha éterických olejů však může být překážkou pro jejich použití, protože jejich insekticidní nebo akaricidní účinnost bude pravděpodobně relativně krátkodobá. (Ellse & Wall 2014)

Byl prokázán také insekticidní účinek éterických olejů z jalovce (*Juniperus oxycedrus* L.), hřebíčku (*Eugenia caryophyllata*), koriandru (*Coriandrum sativum* L.), křenu (*Armoracia rusticana* G.Gaertn., B.Mey. & Scherb.), hořčice (*Brassica juncea* (L.) Czern.), levandule (*Lavandula angustifolia* Mill.) a tymiánu (*Thymus vulgaris*) na čmelíka kuřího (*Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778)), což je krvesající parazit drůbeže. Dále bylo prokázáno, že silice z listů skořicovníku (*Cinnamomum zeylanicum* Garcin ex Blume) a z hřebíčku (*Eugenia caryophyllata*) mají vysokou akaricidní účinnost proti *Psoroptes cuniculi* (Delafond, 1859) u králíků. Aplikace těchto silic výrazně snižuje úroveň ekzoriace, strupovitosti a početnosti roztočů a jejich účinek je srovnatelný s působením konvenčního přípravku Acacerulen®. U silic je rovněž potvrzena akaricidní účinnost proti klíšťatům, vším a blechám. (Ellse & Wall 2014) Insekticidní účinky silic byly testovány také na mouše domácí (*Musca domestica* L.), kde 21 silic z 34 testovaných vykazovalo pozitivní výsledek. (Pavela 2008)

3.2.1.2 Potravinářství

Navzdory modernímu zdokonalování hygieny porážek a technik výroby potravin je bezpečnost potravin stále nejdůležitějším problémem veřejného zdraví. Odhaduje se, že až 30 % lidí v průmyslově vyspělých zemích trpí každoročně onemocněním přenášeným potravinami. Proto je třeba hledat nové metody snižování nebo eliminace patogenů přenášených potravinami a případně prozkoumat jejich využití v kombinaci se stávajícími metodami. Světová zdravotnická organizace nedávno vyzvala k celosvětovému snížení spotřeby soli, aby se snížil výskyt srdečně-cévních onemocnění. Pokud se sníží obsah soli ve zpracovaných potravinách, je možné, že k zachování bezpečnosti potravin bude zapotřebí dalších přídatných látek. Stejný trend zaznamenává i obsah cukru v potravinách, který stejně jako sůl má význam v konzervaci potravin. Existuje tedy prostor pro nové metody zajištění bezpečnosti potravin, jednou z takových možností je použití esenciálních olejů jako antibakteriálních přísad. (Burt 2004; Hyldgaard et al. 2012)

Lze předpokládat, že by mohlo být v budoucnu použití éterických olejů pro potravinářské aplikace významně vyšší. Nárůst užívání by mohl být v různých aplikacích jako např. konzervační látky, roztoky na mytí ovoce a zeleniny, bioaktivní složky obalových materiálů a jedlých filmů.

Byla zjištěna synergická antimikrobiální aktivita éterických olejů, pokud byly použity v kombinaci. Synergický účinek vykazuje například kombinace karvakrolu a thymolu. Kombinace éterických olejů by proto mohly snížit množství potřebné pro účinnou konzervaci, aby se snížily náklady a potenciální dopady na sensorickou kvalitu. Dále byl zjištěn synergický

efekt i s jinými konzervačními látkami jako např. chlorid sodný, dusitan sodný, nisin a konzervačními postupy např. mírné tepelné ošetření a vysoký hydrostatický tlak. (Burt 2004; Calo et al. 2015)

Praktické využití éterických olejů bylo testováno proti *Escherichia coli* O157:H7 a *Salmonella Hadar* v jablečné šťávě. Mezi sloučeniny, které byly vůči *E. coli* a *S. Hadar* nejaktivnější, patřily karvakrol, geraniol, citral, éterický olej z listů skořice, oregana a citronové trávy. Kromě ovoce a zeleniny byly antimikrobiální účinky éterických olejů hodnoceny také u masných výrobků. Byla hodnocena antimikrobiální aktivita éterického oleje z bobkového listu (*Laurus nobilis* L.) v čerstvých toskánských klobásách skladovaných 14 dní při 7 °C. Klobásy byly ošetřeny dávkou 0,05 g/100 g nebo 0,1 g/100 g a jejich trvanlivost byla porovnávána s neošetřenými kontrolními vzorky. Éterický olej dokázal snížit populaci celkových koliformních bakterií téměř o 3 log CFU/g a prodloužit trvanlivost výrobku o dva dny. Další éterické oleje, které vykazují antimikrobiální účinky v mase a masných výrobcích jsou éterické oleje z koriandru, hřebíčku, oregana a tymiánu. (Burt 2004; da Silveira et al. 2014)

V současnosti probíhá velký rozvoj v oblasti aktivních obalů. Podle Nařízení Komise (EU) č. 450/2009 se rozumí: „aktivními materiály a předměty“ materiály a předměty, které mají prodloužit životnost nebo zachovat či zlepšit stav balených potravin. Jsou navrženy tak, aby záměrně obsahovaly složky, které uvolňují nebo absorbují látky do nebo z balených potravin nebo prostředí, které potraviny obklopuje.

Ve studii byl testován aktivního obal tvořený z polyethylenové fólie s obsahem skořicového éterického oleje a s přidavkem skořicového aldehydu o koncentraci 4 % (w/w), který úspěšně inhiboval růst hub (*Penicillium islandicum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium nalgiovense*, *Eurotium repens*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii* a *Zigosaccharomyces rouxii*) a bakterií (*Bacillus cereus*). *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* byly inhibovány při vyšší koncentraci účinné látky (8 % w/w). *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis* a *Pseudomonas aeruginosa* byly inhibovány při koncentraci nad 10 % (w/w). (Ribeiro-Santos et al. 2017)

Další alternativou aktivních obalů jsou jedlé nátěry s obsahem éterických olejů, které by umožnili lepší údržnost potravin bez nutnosti použít další obalový materiál. V současné době se v laboratorním měřítku studují nové aplikace těchto bioaktivních obalů. Z aplikací lze uvést například povlaky na ořechy. (Sánchez-González et al. 2011)

3.2.2 Složení silic

Éterické oleje jsou velmi složité přírodní směsi, které mohou obsahovat asi 20-60 složek ve značně rozdílných koncentracích. Vyznačují se dvěma nebo třemi hlavními složkami v poměrně vysokých koncentracích (20-70 %) ve srovnání s ostatními složkami přítomnými ve stopovém množství. Například karvakrol (30 %) a thymol (27 %) jsou hlavními složkami silice *Origanum compactum*. (Bakkali et al. 2008)

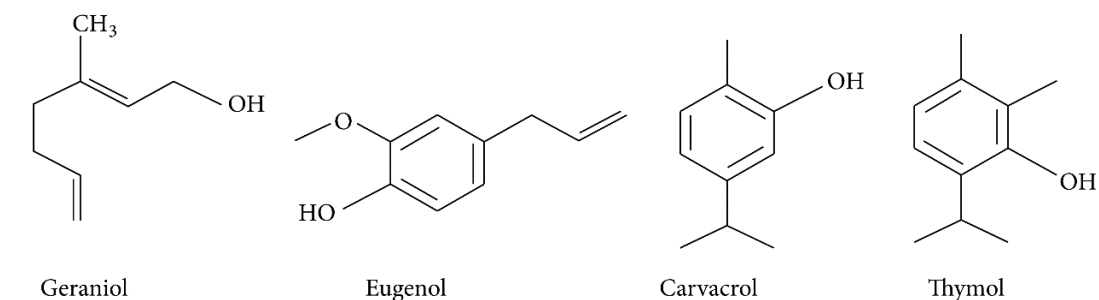
Éterické oleje jsou směsí více než 300 různých sloučenin, které jsou těkavé s nízkou molekulovou hmotností okolo 300 Da. Tyto sloučeniny jsou syntetizovány v cytoplasmě a plastidech rostlinných buněk z prekurzorů jako jsou kyselina malonová, mevalonová a methyl-D-erytrol-4-fosfát (MEP). Rostliny je následně ukládají do žlázových trichomů, sekrečních

utin, pryskyřičných kanálek nebo epidermálních buněk. (Bhavaniramy et al. 2019; da Silva et al. 2021)

Hlavními obsahovými složkami jsou terpeny, terpenoidy a aromatické sloučeniny odvozené od fenylypropanu. Terpeny jsou organické polymery tvořené základní jednotkou isoprenem, systematickým názvem 2-methylbuta-1,3-dienem, což je nenasycený uhlovodík se sumárním vzorcem C_5H_8 . Podle počtu izoprenových jednotek můžeme terpeny dělit na monoterpeny ($C_{10}H_{16}$) a seskviterpeny ($C_{15}H_{24}$), diterpeny ($C_{20}H_{32}$), triterpeny ($C_{30}H_{40}$) atd. Strukturně mohou terpeny tvořit alifatické, cyklické i bicyklické sloučeniny. Příklady terpenů jsou p-cymen, limonen, terpinen, sabinen a pinen. (Bakkali et al. 2008)

Terpenoidy jsou terpeny, které byly biochemicky modifikovány prostřednictvím enzymů, a došlo tak k adici molekuly kyslíku a přesunu nebo odtržení methylové skupiny. Terpenoidy mohou tedy tvořit alkoholy, estery, aldehydy, ketony, ethery, fenoly a epoxidy. Příklady terpenoidů jsou: thymol, karvakrol, linalool, linalyl acetát, citronellal, piperiton, mentol a geraniol. (Bakkali et al. 2008; Hyldgaard et al. 2012)

Aromatické sloučeniny odvozené od fenylypropanu tvoří poměrně malou část silic a ty, které byly nejdůležitěji studovány, jsou eugenol, isoeugenol, vanilin, safrol a cinnamaldehyd. Hlavními rostlinnými zdroji těchto látek jsou anýz, skořice, hřebíček, fenykl, muškátový oříšek, petržel, badyán a estragon. (Bakkali et al. 2008; Hyldgaard et al. 2012)



Obrázek 1 Příklady chemických sloučenin obsažených v silicích

3.2.2.1 Faktory ovlivňující složení a obsah

Faktory, které ovlivňují obsah a složení éterických olejů můžeme rozdělit na exogenní a endogenní. Exogenní faktory neboli faktory ovlivněné životním prostředím, jako je světlo, srážky, místo pěstování a půda, mohou způsobovat kvalitativní i kvantitativní změny těkavých látek v éterických olejích. Na druhou stranu endogenní faktory jsou úzce spjaty s anatomickými a fyziologickými vlastnostmi rostlin, které souvisejí s rozdíly mezi různými částmi rostliny a s geneticky podmíněnými faktory. (Barra 2009)

Ve studiích se ukázalo, že světlo je zodpovědné za zvyšování koncentrace monoterpenů a aromatických sloučenin odvozených od fenylypropanu v *Ocimum basilicum L.* Obecně jsou tyto výsledky v souladu s pozorováním, že mnoho enzymů sekundárních drah je závislých na UVB záření. (Johnson et al. 1999)

Mezi geografické faktory ovlivňující složení a obsah éterických olejů jsou zeměpisná šířka a nadmořská výška. Bylo zjištěno, že se éterické oleje významně lišily u rostlin rostoucích v nadmořské výšce 200-900 m a u rostlin rostoucích v nadmořské výšce 0-100 m. (Barra 2009; Satta et al. 2011)

S rozdílnou zeměpisnou šířkou souvisí sezónní výkyvy jako např. střídání ročního období. U některých druhů se složení silice mění s ročním obdobím, a proto může mít správná doba sklizně velký význam z agronomického a ekonomického hlediska. U motaru přímořského (*Crithmum maritimum* L.) se ukázalo, že v období květu je dominantní složkou sabinen, zatímco po zbytek roku je hlavní složkou γ -terpinen. U řebříčku obecného (*Achillea millefolium* L.) byly seskviterpenové uhlovodíky dominantní složkou esenciálního oleje během vegetace, zatímco v období květu byly hlavní složkou oleje monoterpenové uhlovodíky. Kromě měsíčních a ročních výkyvů nebo změn v závislosti na vegetačním období nebo období květu rostliny mohou existovat také denní výkyvy, které zřejmě souvisejí s aktivitou opylovačů. (Figueiredo et al. 2008)

Prokázala se také závislost na charakteru půdy, zkoumán byl zejména vliv pH. Ve studii zabývající se rozdíly v chemickém složení éterických olejů *Erygium campestre* L. rostoucího v alkalické a kyselé půdě, zjistili, že distribuce terpenů je jasně ovlivněna pH půdy. Populace rostoucí v kyselé půdě obsahovala výrazně větší množství myrcenu a výrazně menší množství β -curcumenu. (Palá-Paúl et al. 2008; Barra 2009)

Endogenní faktory souvisejí s místem produkce a akumulace éterického oleje v rostlině, stářím rostliny a genetickými faktory. Složení éterických olejů tedy závisí na tom, jaká část rostliny je použita: květy, zelené části (listy a stonky), kůra, dřevo, celé plody, perikarp nebo pouze semena, případně kořeny. Například u čeledi hluchavkovitých se éterické oleje nacházejí v nadzemních částech rostlin, ale u rodu citrus z čeledi routovitých se éterické oleje nacházejí ve slupkách a listech. Bylo prokázáno, že u řebříčku (*Achillea ptarmica* L.) byly monoterpeny nalezeny ve velmi malém množství v silicích ze zelených částí a kořenů, zatímco vysoké množství bylo nalezeno v éterickém oleji z květů. (Barra 2009; Calo et al. 2015)

Co se týká vlivu genetických faktorů na složení éterických olejů, nejnovější pokroky v této oblasti zaznamenalo využití RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), což je technika založená na PCR. Cílem této metody je dát "genetickou" odpověď na chemické rozdíly prokázané u stejných druhů rostlin pěstovaných v různých podmínkách. Vysoká korelace mezi genetickými výsledky a těkavými složkami byla zjištěna při analýze éterického oleje z bazalky (*Ocimum gratissimum* L.). Byly rozlišeny tři chemotypy (eugenolový typ, geraniolový typ, thymolový typ) a výsledky RAPD byly v souladu s analyzovanými sekundárními produkty. (Vieira et al. 2001; Barra 2009)

3.2.3 Mechanismus účinku

Antimikrobiální aktivita éterických olejů, podobně jako u všech přírodních extraktů, závisí na jejich chemickém složení a množství jednotlivých složek. Antimikrobiální aktivitu éterických olejů nelze popsat jedním konkrétním mechanismem. (Nazzaro et al. 2013)

Obecně platí, že gramnegativní bakterie bývají vůči antimikrobiální aktivitě éterických olejů odolnější než grampozitivní bakterie, a to v důsledku rozdílů ve složení buněčné stěny. Buněčná struktura gramnegativních bakterií je složitější a skládá se z tenké vrstvy peptidoglykanu pokryté vnější membránou složenou z lipopolysacharidu hydrofilního charakteru, která funguje jako selektivně propustná bariéra. Vnější membrána omezuje difúzi hydrofobních sloučenin z éterických olejů a zabraňuje tak akumulaci bioaktivních látek v buněčné membráně. Buněčná stěna grampozitivních bakterií je tvořena přibližně z 90 až 95 %

peptidoglykanem, který umožňuje éterickým olejům pronikat a působit na cytoplazmatickou membránu, čímž se zvyšuje antimikrobiální účinnost. (Alizadeh Behbahani et al. 2019; da Silva et al. 2021)

Aktivita éterických olejů může ovlivňovat jak vnější obal buňky, tak cytoplazmu. Hydrofobnost, která je pro éterické oleje typická, je zodpovědná za narušení bakteriálních struktur, které vede ke zvýšené propustnosti v důsledku neschopnosti oddělit éterické oleje od membrány bakteriální buňky. Bariéra propustnosti, kterou zajišťují buněčné membrány, je nepostradatelná pro mnoho buněčných funkcí, včetně udržování energetického stavu buňky, membránově vázaných procesů přenosu energie, transportu rozpuštěných látek a regulace metabolismu. Buněčná membrána je také nezbytná pro udržení turgoru. Toxické účinky na strukturu a funkci membrán se obecně používají k vysvětlení antimikrobiální aktivity éterických olejů. Mechanismy účinku éterických olejů totiž zahrnují degradaci buněčné stěny, poškození cytoplazmatické membrány, koagulaci cytoplazmy, poškození membránových proteinů, zvýšení permeability vedoucí k úniku buněčného obsahu, snížení protonové hybné síly, snížení intracelulárního obsahu ATP prostřednictvím snížené syntézy ATP a zvýšené hydrolýzy a snížení membránového potenciálu prostřednictvím zvýšené membránové permeability. (Lambert et al. 2001; Knobloch et al. 2011; Nazzaro et al. 2013)

Použití éterického oleje z oregána v kombinaci s ozářením *L. monocytogenes* a *S. aureus* vedlo k výraznějšímu snížení jejich intracelulárních hladin ATP. K poklesu intracelulárního ATP mohou přispívat i další intracelulární děje, například mohlo dojít ke ztrátě anorganického fosfátu průchodem narušenou membránou nebo k narušení protonové hybné síly a ke změnám v rovnováze některých základních iontů, jako jsou K^+ a H^+ . Některé éterické oleje, zejména bohaté na fenolické látky, jsou schopny se vnořit do fosfolipidové dvojvrstvy bakteriálních buněčných stěn, kde se vážou na proteiny a brání jim v plnění jejich běžných funkcí. (Juven et al. 1994; Ultee et al. 1999; Caillet & Lacroix 2006; Nazzaro et al. 2013)

Různé složky éterických olejů mohou působit na proteiny přítomné v bakteriích a mohou ovlivňovat buněčné dělení. Například cinnamaldehyd je schopen inhibovat dělení buněk u *B. cereus*. Bakteriální buněčné dělení je regulováno FtsZ, prokaryotickým homologem tubulinu. FtsZ se v místě buněčného dělení sestavuje do Z-kruhu; cinnamaldehyd může *in vitro* snížit reakci sestavování a svazování FtsZ. Kromě toho je polymerace FtsZ závislá na GTP, která je taktéž inhibována cinnamaldehydem. (Domadia et al. 2007; Nazzaro et al. 2013)

3.2.4 Získávání silic

Esenciální oleje lze získat z několika rostlin s různými částmi různými extrakčními metodami. Výroba éterických olejů a metoda použitá pro extrakci éterických olejů obvykle závisí na použitém botanickém materiálu. Dalším zvažovaným faktorem je stav a forma materiálu. Metoda extrakce je jedním z hlavních faktorů, které určují kvalitu esenciálního oleje. Nevhodný postup extrakce může vést k poškození nebo změně chemického složení esenciálního oleje. (Tongnuanchan & Benjakul 2014)

3.2.4.1 Tradiční metody

Lisování za studena

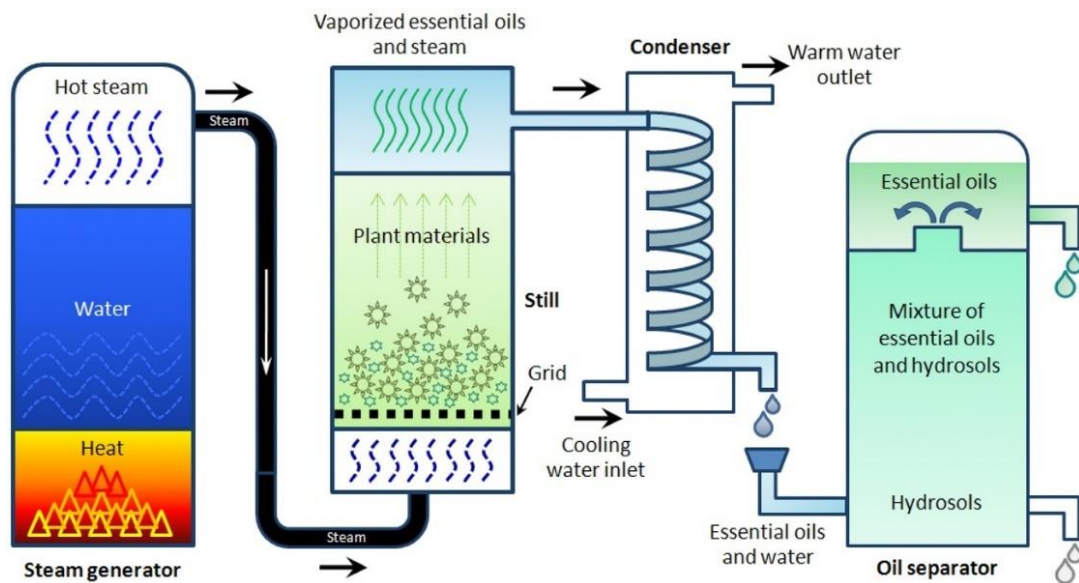
Nejstarší používaná metoda pro získávání éterických olejů je lisování za studena. Výhodou této metody je malá nebo žádná tvorba tepla během procesu. Na druhou stranu tato metoda poskytuje nízké výtěžky. Používá se hlavně pro izolaci olejů ze slupek citrusových plodů vzhledem k relativní tepelné stabilitě aldehydů v nich obsažených. (Lambert et al. 2001; Doosselaere 2013)

Destilace

Tradičním způsobem izolace éterických olejů z rostlinného materiálu je destilace. Při destilaci se z rostlin vystavených působení vroucí vody nebo páry uvolňují éterické oleje odpařováním. Získání éterického oleje je postaveno na principu destilací dvou nemísitelných kapalin, a to vody a éterického oleje. Složky esenciálního oleje se tedy odpařují při teplotě blízké teplotě vody. Nepřímé chlazení vodou kondenzuje směs par vody a oleje, z kondenzátoru vytéká destilát do separátoru, kde se olej odděluje od vody. (Reyes-Jurado et al. 2014)

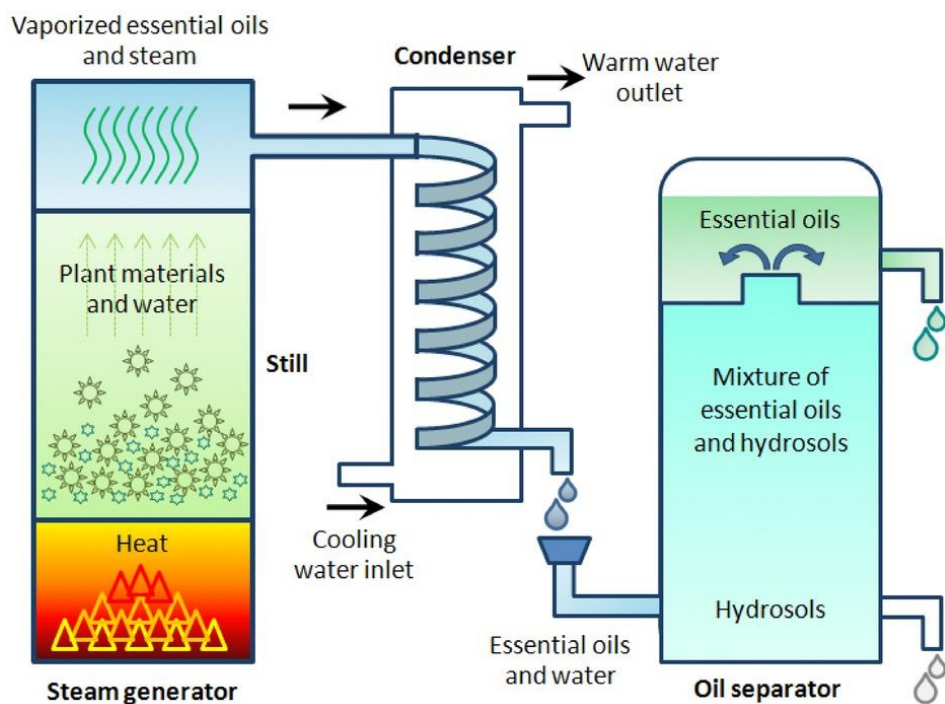
V rámci destilace můžeme rozlišovat několik technologických variant. Hlavním technologickým rozdílem, který je základem metod, jako destilace vodní parou, hydrodestilace a hydrodifuze, je skupenství vody použité pro destilace a její přívod k destilovanému materiálu. (Dima & Dima 2015)

Destilace vodní parou je nejpoužívanější metodou extrakce éterických olejů. Podíl éterických olejů extrahovaných destilací s vodní parou je 93 % a zbývajících 7 % lze dále extrahovat jinými metodami. Při tomto postupu se do samotné destilační nádoby neumísťuje žádná voda. Místo toho je do nádoby vedena pára z vnějšího zdroje viz Obrázek 2. Použité teplo je hlavní příčinou rozpadu buněčné struktury rostlinného materiálu. V důsledku toho se z rostlinného materiálu uvolňují éterické oleje. Teplota zahřívání musí být dostatečná, aby došlo k rozpadu rostlinného materiálu a uvolnění aromatické sloučeniny. Vznikající směs odpařené vody a oleje prochází spirálou obvykle chlazenou tekoucí vodou, kde pára kondenzuje. Směs zkondenzované vody a éterického oleje se shromažďuje a odděluje dekantací. (Perineau et al. 1992; Reverchon & Senatore 1992; Babu & Kaul 2005; Masango 2005; Chemat & Boutekedjiret 2015)



Obrázek 2 Schéma destilace vodní parou (Tongnuanchan & Benjakul 2014)

Hydrodestilace je nejjednodušší z procesů, který se používá k extrakci éterických olejů již po staletí. Rostlinný materiál je v nádobě téměř celý ponořen ve vodě. Voda se vaří pomocí vnějšího zdroje tepla a esenciální oleje spolu s párou kondenzují a oddělují se. Schéma hydrodestilace je zobrazeno na Obrázek 3. K hydrodestilaci se běžně využívá Clavengerova aparatura, která se skládá z varní baňky, chladiče, kondenzátoru a třísměrného ventilu, který umožňuje cirkulaci vody ve fázi destilace nebo vypuštění vody a silice při ukončení destilace (Başer & Buchbauer 2010). Nevýhody hydrodestilace spočívají v tom, že proces destilace je pomalý, a proto se spotřebuje více energii na ohřev. Dále může dojít v případě velké intenzity ohřevu k zuhelnatění rostlinného materiálu ve spodní části nádoby. Dlouhodobý kontakt éterických olejů s horkou vodou může způsobit hydrolyzu některých složek éterického oleje, například estery mohou hydrolyzovat na kyseliny a alkoholy. Výhodou hydrodestilace jsou poměrně vysoké výtěžky éterického oleje a dobrá výtěžnost složek. Zároveň je jednodušší a rychlejší než destilace vodní parou. (Tongnuanchan & Benjakul 2014; Cook & Lanaras 2016)



Obrázek 3 Hydrodestilace (Tongnuanchan & Benjakul 2014)

Poslední zmíněnou destilační technikou byla hydrodifuze, což je typ parní destilace, která se liší způsobem vstupu páry do nádoby destilačního přístroje. Při hydrodifuzi se pára přivádí z horní části rostlinného materiálu, zatímco při metodě parní destilace se pára přivádí ze spodní části. Tento proces lze rovněž provozovat za nízkého tlaku nebo ve vakuu a snížit teplotu páry na méně než 100 °C. Metoda hydrodifuze je lepší než parní destilace, protože doba zpracování je kratší a výtěžnost éterického oleje je vyšší při menším množství použité páry. (Tongnuanchan & Benjakul 2014)

Extrakce rozpouštědlem

Další variantou získávání éterických olejů je extrakce rozpouštědlem. Nepochopitelný charakter éterických olejů umožňuje jejich extrakci organickými rozpouštědly. Principem extrakce rozpouštědlem je rozdělení rozpuštěné látky mezi dvě nemísitelné kapalně fáze, které jsou ve vzájemném kontaktu. Při tomto procesu se látka přenáší z matrice pomocí kapaliny, v níž je látka rozpustná. Pokud je extrahovatelnou složkou pevná látka, jako je tomu v případě rostlinných materiálů, jedná se o formu vyluhování. V běžné praxi se rozpouštědlo smíchá s rostlinným materiálem a poté se zahřeje, aby se extrahoval esenciální olej. Následně je zfiltrován a filtrát je zahuštěn odpařením rozpouštědla. K extrakci lze použít různá rozpouštědla včetně acetonu, hexanu, petroletheru, methanolu nebo ethanolu. Extrakty získané organickým rozpouštědlem obsahují rezidua, která by mohla kontaminovat potraviny, do nichž se přidávají. To ohrožuje bezpečnost produktů extrahovaných touto technikou. Není tedy možné je používat pro potravinářské nebo farmaceutické účely. Nevýhody rozpouštědlové extrakce jsou také použití organických rozpouštědel ve velkých objemech a dlouhá doba extrakce. (Tongnuanchan & Benjakul 2014; Asbahani et al. 2015; Reyes-Jurado et al. 2015; Zhang et al. 2018)

Soxhletova extrakce je variantou extrakce rozpouštědlem. Je to automatická kontinuální extrakční metoda s vysokou extrakční účinností, která vyžaduje méně času a méně spotřeby

rozpouštědla. Vysoká teplota a dlouhá doba extrakce při Soxhletově extrakci zvyšují možnosti tepelné degradace termolabilních složek. Při Soxhletově extrakci se rostlinný prášek umístí do celulózového náprstku v extrakční komoře, která je umístěna na sběrné baňce pod zpětným chladičem. Do baňky se přidá vhodné rozpouštědlo a sestava se zahřívá pod zpětným chladičem. (Seidel 2006; Zhang et al. 2018)

3.2.4.2 Nové metody

Kromě tradičních metod získávání éterických olejů jsou stále více používány nové separační metody, které snižují náklady na energii a spotřebu organických rozpouštědel. Mezi tyto nové metody patří mikrovlnná extrakce, extrakce ultrazvukem a superkritická fluidní extrakce. (Reyes-Jurado et al. 2015)

Mikrovlnná extrakce

Mikrovlnná extrakce využívá mikrovlnné záření jako zdroj ohřevu směsi rozpouštědla a vzorku. Vzhledem ke zvláštním účinkům mikrovln na látky, konkrétně dipólové rotaci a iontové vodivosti, je ohřev mikrovlnami okamžitý, což vede k celkovému zrychlení extrakce. Jednou z výhod mikrovlnného ohřevu je narušení slabých vodíkových vazeb, které podporuje dipólová rotace molekul. (Camel 2001; Reyes-Jurado et al. 2015)

V posledních letech byly použity mikrovlny pro extrakci několika éterických olejů. Prokázalo se, že éterické oleje extrahované touto metodou po dobu 30 min nebo méně byly srovnatelné, a to jak z kvalitativního, tak z kvantitativního hlediska, s éterickými oleji získanými po více než dvojnásobku času vybranými tradičními technikami, jako je hydrodesilace nebo Soxhletova extrakce. Pokroky v mikrovlnné extrakci vedly k vývoji několika technik, jako je mikrovlnná extrakce rozpouštědlem, vakuová mikrovlnná hydrodestilace, mikrovlnná hydrodestilace, mikrovlnná extrakce bez rozpouštědel a další. (Tomaniová et al. 1998; Flamini et al. 2007; Bendahou et al. 2008; Golmakani & Rezaei 2008; Bousbia et al. 2009; Zill-E-Huma et al. 2011)

Ultrazvuková extrakce

Ultrazvuková extrakce nazývaná také sonikace využívá při extrakci energii ultrazvukových vln. Zvýšení účinnosti extrakce organických sloučenin ultrazvukem se připisuje jevu zvanému kavitace, který vzniká v rozpouštědle průchodem ultrazvukové vlny. Při aplikaci ultrazvuku vznikají v důsledku lokálního poklesu tlaku kavitační bubliny. Zvýšení tlaku a teploty způsobené kompresí vede ke kolapsu bublin, výsledná "rázová vlna" prochází rozpouštědlem, a tím dochází k urychlení rozpouštění a difúzi rozpuštěné látky. Výhody ultrazvuková extrakce jsou zejména zkrácení doby extrakce, snížení teploty, snížení objemu rozpouštědla a zvýšení výtěžnosti extraktu ve srovnání s konvenčními metodami. Tato metoda je také vhodná pro extrakci termolabilních a nestabilních sloučenin, což je výhodou právě při extrakci mnoha přírodních produktů (Pingret et al. 2013; Barba et al. 2016; Chemat et al. 2017)

Superkritická fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce se stala nejpoužívanější metodou pro extrakci a izolaci éterických olejů z aromatických rostlin. Tato technika umožňuje účinnou a rychlou extrakci, použití nízké teploty, eliminaci čistícího kroku a nevyžaduje použití organických rozpouštědel. Superkritická fluidní extrakce využívá jako extrakční rozpouštědlo superkritickou kapalinu. Superkritická kapalina má podobnou rozpustnost jako kapalina a podobnou difuzivitu jako plyn. Proto může rozpouštět širokou škálu přírodních produktů. Její solvatační vlastnosti se dramaticky mění v blízkosti kritických bodů v důsledku malých změn tlaku a teploty. (Zhang et al. 2018; Yousefi et al. 2018)

V současné době se z různých praktických důvodů více než 90 % procesů superkritické fluidní extrakce provádí pomocí CO₂. Kromě toho, že CO₂ má poměrně nízkou kritickou teplotu (32 °C) a tlak (7,4 MPa), je nehořlavý, nevybušný, netoxický, dostupný za nízkou cenu a vysoké čistoty a snadno odstranitelný z extraktů. Kromě toho má CO₂ nízké povrchové napětí a viskozitu, ale dvakrát až třikrát vyšší difuzivitu než jiné kapaliny. V nadkritické oblasti vykazuje CO₂ polaritu podobnou pentanu, a je tedy vhodný pro extrakci lipofilních látek. Hlavní nevýhodou CO₂ je, že postrádá polaritu potřebnou k extrakci polárních látek. (Yamini et al. 2008; Yousefi et al. 2019)

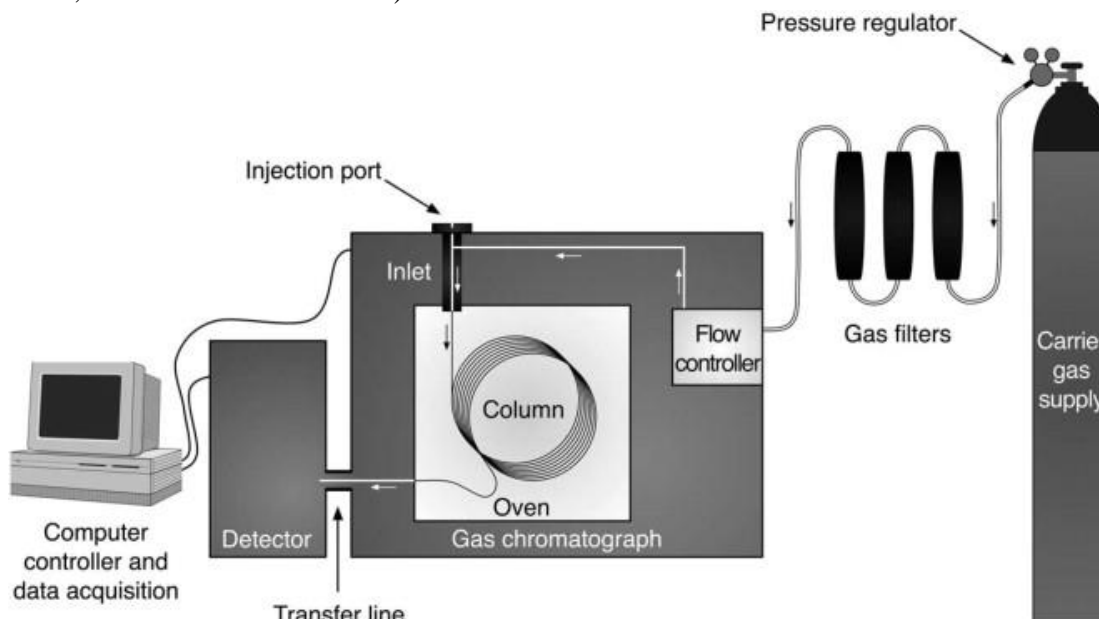
3.2.5 Analýza silic

Analýzou éterických olejů můžeme zjišťovat důležité informace o jejich složení a účincích. Tyto informace nám umožňují využít éterické oleje v různých aplikacích, ať už se jedná o zdravotnictví, zemědělství či potravinářský průmysl. Pomocí analytických metod můžeme stanovit chemické složení éterických olejů a zjistit také množství jednotlivých sloučenin v nich zastoupených. Pomocí mikrobiologických metod můžeme zjistit informace ohledně antimikrobiální aktivity. U éterických olejů můžeme analyzovat také insekticidní, antivirovou, antioxidační a protinádorovou aktivitu.

3.2.5.1 Analýzy složení silic

V analýze chemického složení silic se nejčastěji využívá plynová chromatografie (GC) zejména proto, že se éterické oleje svou povahou pohybují od těkavých po polotěkavé sloučeniny s malou molekulovou hmotností. Systém plynové chromatografie se skládá ze dvou fází: inertního plynu nazývaného mobilní fáze a nemísitelné stacionární fáze umístěné v koloně. Analyty jsou během procesu rozdělovány mezi mobilní a stacionární fázi v závislosti na jejich relativní afinitě k oběma fázím. Proto jsou sloučeniny s vyšší afinitou ve stacionární fázi zadržovány déle a eluují se později než ostatní. Tato afinita v případě plynové chromatografie závisí na charakteru stacionární fáze. Pro analýzu éterických olejů se používají středně polární nebo nepolární stacionární fáze např. OV-17 (50% diphenyl, 50% dimethylpolysiloxan), HP-5 (5% phenyl-methylpolysiloxan) a DB-1 (100% dimethylpolysiloxan). K analýze éterických olejů se nejčastěji využívají kapilární chromatografické kolony s délkou 25 nebo 30 m, vnitřním průměrem 0,25 mm a tloušťkou stacionární fáze 0,25 μm. Jako mobilní fáze se využívá inertní plyn např. dusík nebo helium. Před samotnou analýzou se nastavují parametry jako průtok mobilní fáze, nástřikový objem, což je objem vzorku, který bude vpraven do přístroje přes tzv.

injektor, teplota nástřikového prostoru a teplota kolony. Tyto parametry mohou významně ovlivnit kvalitu a výsledky analýzy. (Tiziana Baratta et al. n.d.; Blázquez et al. 2003; Cai et al. 2014; Ruiz-Matute et al. 2018)



Obrázek 4 Schéma plynové chromatografie (Stauffer et al. 2008)

Analýza na plynovém chromatografu probíhá tak, že daný nástřikový objem vzorku je jehlou autosampleru nabrán a nastříknut do injektoru. Injektor je vyhřívaná komora obsahující skleněnou vložku, kde jsou sloučeniny odpařeny a proudem inertního nosného plynu vhaněny do kolony. Tento prostor je uzavřen pryžovou přepážkou, která je perforována pomocí jehly při nástřiku. Nejběžnější způsoby nástřiku jsou split/splitless. V režimu split je ventil otevřený a umožňuje do kolony dávkovat jen určitý poměr nastříkovaného vzorku. Tento přístup se využívá především u koncentrovaných vzorků. Naopak režim splitless, kdy se celý nastříkovaný objem přenáší na kolonu, je určen pro vzorky s nízkou koncentrací. Následně se vzorek unášený nosným plynem dostává na kolonu, kde dojde k separaci. Teplota kolony při separaci může být stálá nebo naprogramovaná na určitý teplotní gradient. Na výstupu z kolony se nachází detektor, kde dochází k záznamu signálu. V případě plynové chromatografie je výstupem analýzy chromatogram. (Ruiz-Matute et al. 2018)

V případě analýzy éterických olejů se ve spojení s plynovou chromatografií využívají hlavně dva typy detektorů, a to plamenově-ionizační (FID) a hmotnostní detektor (MS). U plamenově-ionizačního detektoru vzniká plamen spalováním vodíku ve vzduchu. Mezi plamenem a elektrodou se přivádí napětí 100-300 V, které vytváří nízký proud. Když se sloučeniny pohybující s nosným plynem dosáhnou plamene, jsou ionizovány a poté se měří nárůst proudu. Tento detektor je velmi citlivý a má široký lineární rozsah. (Ruiz-Matute et al. 2018)

Hmotnostní detektor poskytuje měření poměru hmotnosti a náboje (m/z) produkovaných iontů, přičemž pro každou sloučeninu se získá charakteristický graf (hmotnostní spektrum). Hmotnostní detektor se skládá ze tří hlavních částí: iontového zdroje, který produkuje ionty z každé sloučeniny, hmotnostního analyzátoru, který odděluje ionty s různým poměrem m/z , a detektoru, který ionty shromažďuje. (Ruiz-Matute et al. 2018)

Pro analýzu éterických olejů se v poslední době využívá také dvourozměrná plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Výhodou této metody je oddělení překrývajících se píků

v důsledku separace vzorků ve dvou různých kolonách, tj. analyty podléhají dvěma různým separačním mechanismům v jednom běhu. (dos Santos et al. 2019)

3.2.5.2 Testování antimikrobiální aktivity

V 60. letech 20. století byly objeveny téměř všechny skupiny důležitých antibiotik jako tetracykliny, cefalosporiny, aminoglykosidy a makrolidy. V současnosti se potýkáme s problémem, že tyto sloučeniny ztrácí svou účinnost kvůli nárůstu mikrobiální rezistence. Z tohoto důvodu je objevování nových antimikrobiálních látek důležitým cílem. Přírodní produkty jsou i dnes jedním z hlavních zdrojů nových léčiv. Pocházejí z prokaryotických bakterií, eukaryotických mikroorganismů, rostlin a různých živočišných druhů. Mikrobiální a rostlinné produkty zaujímají hlavní část dosud objevených antimikrobiálních sloučenin. (Bérdy 2005; Balouiri et al. 2016)

3.2.5.2.1 Difúzní metody

Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda vyvinutá v roce 1940 je oficiální metodou používanou v mnoha klinických mikrobiologických laboratořích pro rutinní testování antimikrobiální aktivity. V současné době je Institutem pro klinické a laboratorní standardy (CLSI) publikováno mnoho přijatých a schválených standardů pro testování bakterií a kvasinek. Ačkoliv ne všechny rychle se množící bakterie lze touto metodou přesně testovat, byla provedena standardizace pro testování některých rychle se množících bakteriálních patogenů s použitím specifických kultivačních médií, různých inkubačních podmínek a interpretačních kritérií pro inhibiční zóny. (Balouiri et al. 2016)

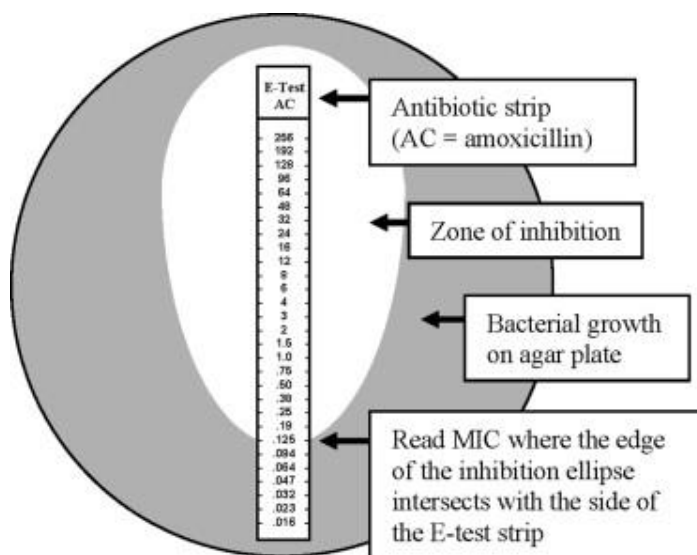
V prvním kroku diskové difúzní metody se Petriho misky s agarem zaočkují standardizovaným inokulem testovaného mikroorganismu. Poté se na povrch agaru umístí disky o průměru asi 6 mm, které obsahují testovanou sloučeninu v požadované koncentraci. Obecně platí, že antimikrobiální látka difunduje do agaru a inhibuje klíčení a růst testovaného mikroorganismu a poté se měří průměry inhibičních zón. (Klančnik et al. 2010; Balouiri et al. 2016)

Metoda diskové difúze na agaru není vhodná pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), protože není možné kvantifikovat množství antimikrobiální látky difundující do agarového média. Nicméně disková difúzní metoda má oproti jiným metodám mnoho výhod: jednoduchost, nízkou cenu, možnost testovat obrovské množství mikroorganismů a antimikrobiálních látek a snadnou interpretaci poskytnutých výsledků. (Balouiri et al. 2016)

Gradientová difúzní metoda – Etest

Gradientová difúzní metoda kombinuje princip ředících metod s principem difúzních metod za účelem stanovení hodnoty MIC. Je založena na možnosti vytvoření koncentračního gradientu testované antimikrobiální látky v agarovém médiu. Etest® (BioMérieux) je komerční verzí této techniky. Při tomto postupu se na povrch agaru, který se napřed naočkuje testovaným mikroorganismem, nanese proužek napuštěný rostoucím koncentračním gradientem

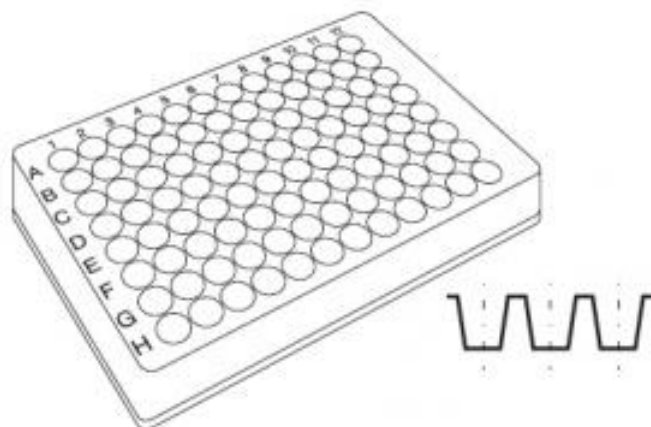
antimikrobiální látky od jednoho konce k druhému. Tato metoda se používá pro stanovení MIC antibiotik, antimykotik. Hodnota MIC se stanoví v průsečíku proužku a elipsy inhibice růstu viz Obrázek 5. Je jednoduchá na provedení, proto se rutinně používá. Nevýhodou je vyšší cena při pořizování komerčních setů pro testování minimální inhibiční koncentrace daných látek. (Balouiri et al. 2016)



Obrázek 5 Stanovení minimální inhibiční koncentrace pomocí Etestu (LeCorn et al. 2007)

3.2.5.2.2 Diluční metody

Bujónová mikro- nebo makrodiluční metoda je jednou ze základních metod testování antimikrobiální aktivity. Postup zahrnuje přípravu dvojnásobných ředění antimikrobiální látky (např. 1, 2, 4, 8, 16 a 32 $\mu\text{g/ml}$) v tekutém růstovém médiu dávkovaném do zkumavek o minimálním objemu 2 ml (makrodiluce) nebo s menšími objemy pomocí 96jamkové mikrotitrační destičky (mikrodiluce) viz Obrázek 6. Poté se každá zkumavka nebo jamka naočkuje mikrobiálním inokulem připraveným ve stejném médiu po naředění standardizované mikrobiální suspenze upravené na 0,5 McFarlandovy stupnice. Po promíchání jamek se inokulované zkumavky nebo 96 jamková mikrotitrační destička inkubují za vhodných podmínek v závislosti na testovaném mikroorganismu. (Balouiri et al. 2016)



Obrázek 6 Mikrotitrační destička (GAMA 2022)

Minimální inhibiční koncentrace je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která zcela inhibuje viditelný růst mikroorganismu v kultivačním médiu. Na rozdíl od mikrodiluční metody jsou hlavními nevýhodami makrodiluční metody zdlouhavá ruční práce, riziko chyb při přípravě antimikrobiálních roztoků pro každý test a poměrně velké množství potřebných činidel a prostoru. Hlavní výhodou mikrodiluční metody je tedy lepší reprodukovatelnost a úspora činidel, prostoru a času, ke které dochází díky miniaturizaci testu. Nicméně konečný výsledek je významně ovlivněn postupem, který musí být pečlivě kontrolován, má-li být dosaženo reprodukovatelných výsledků. Pro usnadnění odečítání mikrodilučních testů a zaznamenávání výsledků MIC mohou sloužit některé zobrazovací techniky, které mají schopnost přesně rozeznat nárůst v jamkách. Kromě toho bylo vyvinuto několik kolorimetrických metod založených na použití barviv např. tetrazoliové soli, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) a 2,3-bis {2-methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino)karbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxid} (XTT). (Balouiri et al. 2016)

Stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC) nebo minimální fungicidní koncentrace (MFC) je nejběžnějším odhadem baktericidní nebo fungicidní aktivity. MBC je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky potřebná k usmrcení 99,9 % konečného inokula po inkubaci po dobu 24 h za standardizovaných podmínek. MBC lze stanovit po bujónové makrodiluční nebo mikrodiluční subkultivaci vzorku z jamek nebo zkumavek, po které následuje inkubace na povrchu neselektivních agarů pro stanovení počtu přežívajících buněk (CFU/ml) po 24 h inkubace. (Balouiri et al. 2016)

3.2.6 Léčivé rostliny s předpokládanou antimikrobiální aktivitou

3.2.6.1 Podražec křovištní (*Aristolochia clematitis* L.)

Podražec křovištní je rostlina z čeledi podražcovitých. Je to vytrvalá bylina s plazivým oddenkem a nevětvenou lodyhou, která může dorůst výšky až jednoho metru, se střídavými, srdčitými listy, které jsou na bázi hluboce vykrojené na dlouhých řapících. Květy mají žlutou barvu a vyrůstají po dvou až třech v úžlabní lati. Po odkvetení se tvoří tobolka. (Janča et al. 1994)



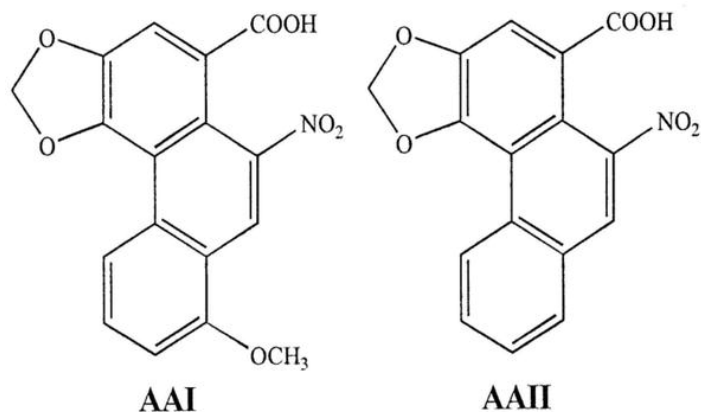
Obrázek 7 Podražec křovištní (*Aristolochia clematitis* L.) (Wikipedie 2022)

Původně se tento druh vyskytoval v jižní Evropě a na jihu střední Evropy, což zahrnuje i oblast jižní Moravy. Druhotně byl zavlečen i do severnějších oblastí jako např. do Polska a Německa. V České republice se tedy vyskytuje hlavně na jižní Moravě, jeho výskyt sleduje oblast pěstování vinné révy. Oblasti výskytu jsou charakteristické teplejším podnebím, jsou to okraje lesů, světlé háje, vinice a houští (Janča et al. 1994).

Období květu je od konce května do července. A právě v tomto období dochází k sběru kvetoucí natě kvůli obsahu žádoucích látek (Janča et al. 1994). Rostlina údajně obsahuje aristolochové kyseliny, alkaloid aristolochin, silici, hořčiny, třísloviny, barviva, minerální látky (Janča et al. 1994).

V souvislosti s obsahem aristolochových kyselin jsou zástupci rodu podražec (*Aristolochia*) zodpovědní za výskyt nefropatie způsobené právě těmito kyselinami. Jedná se o progresivní renální intersticiální fibrózu často spojenou s karcinomem močového měchýře. Tato choroba způsobená příjmem kyseliny aristolochové byla původně hlášena v Belgii u skupiny více než 100 pacientů po užívání tablet na hubnutí obsahujících čínskou bylinu *Aristolochia fangchi* Y.C.Wu ex L.D.Chow & S.M.Hwang. (Debelle et al. 2008)

Aristolochové kyseliny jsou skupinou nitrofenanthrenových karboxylových kyselin, které se vyskytují v bylinách rodu *Aristolochia* a které Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IRAC) klasifikuje jako karcinogen skupiny 1. Jsou také prokázány nefrotoxiny a mutageny. (Arlt et al. 2007; Chan et al. 2016)



Obrázek 8 Chemická struktura kyseliny aristolochové I (AAI) a II (AAII) (Lamari & Negache 2021)

Kyselina aristolochová souvisí rovněž s tzv. Balkánskou endemickou nefropatií, což je chronická intersticiální fibróza ledvin s pomalou progresí do konečného stadia onemocnění ledvin a malignity močového měchýře, která je typická pro některé venkovské oblasti Bulharska, Bosny, Chorvatska, Rumunska a Srbska podél povodí Dunaje. (Arlt et al. 2007)

Provedené výzkumy ukazují, že v těchto oblastech jsou rostliny rodu *Aristolochia* jako např. *A. clematitis* rozšířené plevele. Jejich rozkladem pak dochází ke kontaminaci půdy aristolochovými kyselinami. Plodiny pěstované na polích v těchto oblastech jsou schopné tyto aristolochové kyseliny absorbovat a akumulovat je ve svých jedlých částech. Byla potvrzena přítomnost kyseliny aristolochové v kukuřici, zrna pšenice a ve vzorcích půdy. Je tedy možné, že přítomnost aristolochových kyselin v jedlých částech plodin pocházejících z kontaminované půdy by mohla být jednou z hlavních cest, kterými je člověk vystaven působení aristolochových kyselin. (Chan et al. 2016)

Druhy rodu *Aristolochia* byly v etnobotanických studiích často uváděny jako významné léčivé rostliny. V Evropě se o druzích aristolochie zmiňoval již řecký učenec Dioskoridés. Kyselina aristolochová a extrakty získané z *A. clematitis* byly dříve povoleny k použití proti abscesům, ekzémům a jiným dlouhotrvajícím kožním onemocněním a jako nespecifický stimulant imunitního systému. V roce 1982 byly ale staženy kvůli podezření na karcinogenní účinky. Příslušníci rodu mají dlouhou historii léčebného využití v Evropě, Asii, Africe a Střední Americe (Martinez et al. 2002; Heinrich et al. 2009). Vzhledem k jejímu hojnému výskytu v jižní Evropě je používána v alternativní medicíně. Byly používány čerstvé listy na infikované rány jako nálev nebo odvar, při abscesech, vředech, ekzémech a revmatických onemocněních v humánní i veterinární medicíně v Rumunsku. Nadzemní část se používala při infekci ran v Kosovu a Srbsku, podobně jako odvar z kořene v Bulharsku nebo oddenek v Itálii. (Bartha et al. 2019)

U *A. clematitis* byla prokázána účinnost methanolových, hexanových a ethylacetátových extraktů z listů, které vykazovaly účinnost proti *S. aureus* ve vyšší koncentraci (2 mg/ml). Nejúčinnější antimikrobiální aktivita proti kmenům *S. aureus* byla zjištěna v případě extraktů z plodů. Za antimikrobiální aktivitu druhu *A. clematitis* mohou být pravděpodobně zodpovědné trísloviny, fenolové sloučeniny a saponiny. Tyto sloučeniny mohou být v polárních a nepolárních rozpouštědlech rozpouštěny v různých koncentracích, a proto se v jednotlivých extraktech mohou nacházet v různých koncentracích, což vede k různým

antimikrobiálním účinkům. (Abbouyi & Maliki n.d.; Košťálová et al. n.d.; Benmehdi et al. 2017; Bartha et al. 2019)

Silice některých druhů rodu *Aristolochia* vykazovaly antibakteriální a antimykotické účinky proti různým mikroorganismům, například *Aristolochia indica* L. proti *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus megaterium*, *E. coli*, *Salmonella typhi* a *Vibrio cholerae*, *Aristolochia bracteolata* Lam. proti *Aspergillus flavus* a *Botrytis cinerea* nebo *Aristolochia trilobita* L., *Aristolochia brevipes* Benth., *Aristolochia monticola* Brandegea a *Aristolochia kristolochia* proti *S. aureus*. (Camporese et al. 2003; Murillo-Alvarez et al. 2008; Kuo et al. 2012; Thambidurai et al. 2015)

3.2.6.2 Hulevník lékařský (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.)

Hulevník lékařský latinsky *Sisymbrium officinale* je rostlina z čeledi brukvovitých. Je to jednoletá rostlina, dorůstající výšky cca 50 cm. „Lodyhu má tuhou, přímou, listnatou, rozestále prutovitě větvenou, štětinatě chlupatou, s chlupy přitisknutými nazpět. Listy jsou peřenosečné, s 1 až 3 páry vejčitých až kopinatých, nazpět obrácených úkrojků. Koncové úkrojky splývají ve větší. Nejvyšší listy jsou střelovité.“ Hulevník kvete žlutě, po odkvetení se tvoří šešule. (Janča et al. 1994)



Obrázek 9 Hulevník lékařský (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.) (Botany.cz 2022a)

Hulevník lékařský je častý plevelný druh. Vyskytuje se hojně, můžeme ho najít u cest, na rumišťích, skládkách, návsích a na březích řek. Vhodné podmínky pro růst jsou na vlhkých, vysychavých, živných, kamenitých, písčítých i hlinitých půdách. (Janča et al. 1994)

Sběr je prováděn v období od května do srpna, kdy se sbírá kvetoucí nať. (Pignatti et al. 2017)

Uvádí se, že nadzemní část rostliny obsahuje sirnou, ostře chutnající hořčinu, flavonoidy, třísloviny, silice, organické kyseliny, malé množství alkaloidů, sliz, pantosan a pektin. (Janča et al. 1994)

Ve středomoří se květy a listy hulevníku běžně používají jako tradiční léčivá rostlina k léčbě bolestí v krku, kašle a chrapotu. Tradičně je zde využívána zpěváky a herci pro léčbu problémů s hlasem (Politi et al. 2008; di Sotto et al. 2010; Blažević et al. 2010a). Tyto vlastnosti jsou historicky doloženy: ve Francii Ludvíka XIV. byla rostlina pro svou účinnost při léčbě afonie pojmenována "herbe au chantre", což ve volném překladu znamená kantorská bylina. (di Sotto et al. 2010)

V lidovém léčitelství se hulevník využívá také jako močopudný prostředek, na léčbu průjmů a pro podporu hojení ran. (Janča et al. 1994)

Ačkoli je *S. officinale* hojně využíváno v tradiční medicíně, studie o jeho biologické aktivitě jsou velmi omezené. Některé extrakty ze *S. officinale* vykazovaly mírnou antioxidační aktivitu (Pieroni et al. 2002) a byl zaznamenán silný inhibiční účinek proti střevní produkci sirovodíku nebo metanthiolu, dvou toxických sloučenin zodpovědných za patologii tlustého střeva a jater. (Arakawa et al. 2000)

Vzhledem k tradičnímu využití *S. officinale* při léčbě zánětlivých onemocnění, byl ve studiích prokázán *in vitro* potenciál inhibovat produkci prozánětlivého mediátoru oxidu dusnatého. (Amodeo et al. 2019)

Bylo zkoumáno i možné využití *S. officinale* jako alternativy listové zeleniny. Výsledky ukázaly, že tento druh lze úspěšně pěstovat ve skleníku s podobnými nutričními složkami i kvalitativními parametry, jako je obsah dusičnanů, chlorofylu a cukru, jako u ostatní běžné komerční listové zeleniny. Navíc má dobrou koncentraci kyseliny askorbové, vyšší než běžná listová zelenina. (Guarise et al. 2019)

Pomocí difúzní metody byla ve studii autorů Blažević et al. (2010) potvrzena antimikrobiální aktivita *S. officinale* proti grampozitivním, gramnegativním bakteriím, plísním a kvasinkám, jako např. *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Enterobacter sakazakii* a *Aspergillus niger*.

3.2.6.3 Kozinec sladkolistý (*Astragalus glycyphyllos* L.)

Kozinec sladkolistý latinsky *Astragalus glycyphyllos* je rostlina čeledi bobovitých. Jedná se o trvalou rostlinu dorůstající výšky až 1 m s hranatou lodyhou, která je polehavá až plazivá. Listy jsou dlouhé 10 až 20 cm se 4 až 7 jařmy. Lístky jsou široce eliptické nebo vejčité. Květy jsou v hustých hroznech se zvonkovitým kalichem žluté nebo bledé barvy. Po odkvetení se vytvoří plody, kterým jsou lusky. (Janča et al. 1994)



Obrázek 10 Kozinec sladkolistý (*Astragalus glycyphyllos* L.) (Botany.cz 2022b)

Vyskytuje se v celé Evropě, mimo Skandinávii a ostrovy v Severním a Středozezemním moři. Dále se také vyskytuje v západní a střední Asii a zasahuje až na Sibiř. (Smejkal et al. 1995)

„Kozinec je rostlina křovin a světlých lesů a jejich okrajů. Vyžaduje půdy vlhké, výhřevné, živné, neutrální nebo zásadité, humózní.“ (Janča et al. 1994)

Předmětem sběru může být buď kvetoucí nať nebo kořen. Pro kvetoucí nať je nejvhodnější doba sběru v létě a v případě kořene je prováděn sběr na jaře nebo na podzim. (Janča et al. 1994)

Rostlina obsahuje určitá množství alkaloidů, flavonoidy, vitamin C, olej, třísloviny, aminokyseliny, řadu mikroprvků, silice, proteiny, sacharózu, pryskyřice, saponiny, jako např. glycyrrhizin, a kaučuk. (Janča et al. 1994)

A právě saponiny jsou látky, které jsou v *A. glycyphyllos* nejvíce zkoumány a jejichž biologická aktivita je hojně studována. Jsou zkoumány jejich neuroprotektivní, protinádorová a imunomodulační aktivita. (Shkondrov et al. 2020; Mihaylova et al. 2022)

Látky obsažené v kozinci mají diuretické, diaforetické, antihypertenzivní a sedativní účinky. V případě vnějšího užití při aplikaci na pokožku hlavy můžou snižovat vypadávání vlasů. Pomáhá také při žaludečních potížích nebo při krvácivých průjmech. (Janča et al. 1994)

V Bulharsku je *A. glycyphyllos* hojně využíván jako antihypertenzivum, diuretikum, protizánětlivý a protinádorový prostředek. Bylina se podává jako infuze při srdeční nedostatečnosti, zánětu ledvin, zvýšeném arteriálním a žilním krevním tlaku, tachykardii, jako pomocná léčba při nádorových onemocněních. Ve Francii se *A. glycyphyllos* používá jako zvláčňující, diuretický a osvěžující prostředek. Lidé na Kavkaze používají listy a semena tohoto druhu v případech močových kamenů, oligurie, skrofulózy, dermatitidy a jako projímadlo. Podél řeky Volhy se rostlina používá k léčbě nervových onemocnění. V Bělorusku se odvar z jejich nadzemních částí používá vnitřně k léčbě leukorey, uteroptózy, žaludečních onemocnění

a úplavice; lokálně při plísňových infekcích vlasové pokožky. Podobný odvar z byliny se na Ukrajině používá jako projímadlo, diuretikum, expektorans, proti pohlavním chorobám, revmatismu a dermatitidě. (Lysiuk, 2016, Georgieva et al., 2021)

Příbuzné druhy *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. a *membranaceus* var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao jsou významnými bylinami v tradiční čínské medicíně. Tyto druhy jsou původní v Číně, Koreji, Mongolsku a na Sibiři a komerčně se pěstují v severní Číně a Koreji. (Butkute et al. 2018)

4 Metodika

Úkolem této diplomové práce bylo získání silic z vybraných druhů rostlin, testování antimikrobiální aktivity éterických olejů a analýza jeho složení.

4.1 Použité pomůcky a přístroje

Homogenizace vzorků proběhla na nožovém mlýnu GRINDOMIX GM 200 (Retsch, Praha, CZ), následně byla provedena destilace silic z rostlinného materiálu pomocí Clavengerovy aparatury (Merci, Brno, CZ).

Pro testování antimikrobiální aktivity byla připravená média sterilována v autoklávu Tuttnauer 3850EL (Tuttnauer, Breda, NL). K určení pH pufovcích roztoků byl použit stolní pH metr pH 50 (XS, Carpi, IT). K přípravě inokula pro testování antimikrobiální aktivity silic byl použit denzitometr DEN-1B (Biosan, Riga, LT) a veškerá práce probíhala v laminárním boxu (Merci, Brno, CZ). K následné inkubaci byl využit inkubátor (Mettler, Schwabach, DE).

Kvalitativní analýza vzorků silic byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 7890A GC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C MSD (Agilent, Santa Clara, CA, USA) a kvantitativní analýza byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 7890A GC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) s plamenově ionizačním detektorem.

4.2 Použité chemikálie

- Demineralizovaná voda
- Hexan (VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, CZ)
- Ethanol 96%, 70% (VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, CZ)
- Kyselina chlorovodíková 36% (VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, CZ)
- Hydroxid sodný 40% (VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, CZ)
- Tween (VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, CZ)
- Dimethyl sulfoxid (VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, CZ)
- Tetracyklin (Sigma-Aldrich, Praha, CZ)
- Tioconazol (Sigma-Aldrich, Praha, CZ)
- Chlorid sodný (Penta, Praha, CZ)
- Chlorid draselný (Penta, Praha, CZ)
- Trizma base (Sigma-Aldrich, Praha, CZ)
- Müeller-Hinton bujón (MHB) (Oxoid, Basingstoke, UK)
- Sabouraud Dextrose bujón (SDB) (Oxoid, Basingstoke, UK)
- Standardy (Sigma-Aldrich, Praha, CZ) viz Tabulka 8

4.3 Mikroorganismy

Testy antimikrobiální aktivity byly provedeny na zástupcích gramnegativních (*Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) grampozitivních bakterií (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Enterococcus faecalis* ATCC 51299; *Bacillus*

cereus ATCC 11778) a na jedné kvasince (*Hanseniaspora uvarum* DSM 26650). Pro testování byly využity standardní sbírkové kmeny ze sbírky ATCC (American Type Culture Collection) a DSM (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

4.4 Rostlinný materiál

Po předchozím prostudování herbářů a vědecké literatury, byly vytypovány rostliny rostoucí na území České republiky, u kterých byl v literatuře naznačen nebo uveden obsah silic. A zároveň nebylo dostatečně prozkoumáno složení a biologická aktivita. Následně byl proveden sběr v období, které bylo uvedeno v herbáři jako nejvhodnější pro daný rostlinný druh a obsah žádoucích látek. Ze souboru vytypovaných rostlin se v dostatečném množství podařilo nasbírat podražec křovištní (*Aristolochia clematitis*), hulevník lékařský (*Sisymbrium officinale*) a kozinec sladkolistý (*Astragalus glycyphyllos*). Informace o datumu a lokalitě sběru viz Tabulka 1.

Předmětem sběru byla ve všech případech kvetoucí nať, tedy nadzemní část rostliny, která byla následně usušena. Podmínky sušení byly zvoleny tak, aby nedošlo k ovlivnění obsahu éterických olejů. Sušení tedy probíhalo ve stínu při pokojové teplotě.

Tabulka 1 Druh, datum a lokalita sběru

Druh	Datum sběru	Lokalita sběru
<i>A. clematitis</i>	27.7. 2021	Hrušky, okr. Břeclav, travnatý násep hlavní silnice Břeclav-Hodonín
<i>S. officinale</i>	12.6. 2021	Hořovice, okr. Beroun, modře značená turistická stezka od železničního nádraží k rybníku Lázeňský pod nádražím
<i>A. glycyphyllos</i>	27.7. 2021	Brod nad Dyjí, okr. Břeclav, 1. terasa směrem od Brodu nad Dyjí

4.5 Extrakce silic

Před samotnou extrakcí a homogenizací byly usušené rostliny důkladně zkontrolovány, aby byly k extrakci použity jen zdravé části rostlin a aby nedošlo k současné extrakci jiného rostlinného druhu, což by mohlo zkreslit výsledky experimentu, např. složení silice.

Sušené byliny byly zhomogenizovány v nožovém mlýnku. Otáčky a doba homogenizace byla vhodně upravena podle vlastností rostlinného materiálu.

Pro extrakci byla použita hydrodestilace Clavengerovou aparaturou s 11 varnou baňkou. Do varné baňky byl navážen zhomogenizovaný rostlinný materiál a v poměru 1:10 doplněn destilovanou vodou, což odpovídá cca 50 g rostlinného materiálu a 500 ml destilované vody. Varná baňka byla umístěna do topného hnízda a nasazena na Clavengerovu aparaturu. Zpětný chladič byl připojen na přívod a odvod vody, aparatury byla naplněna destilovanou vodou a vypouštěcí kohout byl nastaven tak, aby v aparatuře mohla cirkulovat voda, tedy aby voda zkondenzovaná v chladiči mohla unikat zpět do varné baňky. Následně proběhla destilace po

dobu 3 hodin. Byl udržován mírný var, aby se zamezilo ztrátě nejtěkavějších složek éterického oleje.

Vzhledem k nízké výtěžnosti silic byly silice z aparatury vytěženy pomocí hexanu. Po ukončení destilace a vychladnutí aparatury byl 1 ml hexanu napipetován do aparatury, kde došlo k smísení silice s hexanem a následné vypuštění do mikrozkuhavky. Vzhledem k tomu, že byla vypuštěna hexanová fáze s částí destilované vody, následovalo ještě odebrání hexanové fáze s rozpuštěnou silicí do skleněné vialky.

Pro získání čisté silice muselo dojít k odpaření rozpouštědla. Vialky se silicí rozpuštěnou v hexanu byly umístěny do laminárního boxu. Odpařování rozpouštědla bylo kontrolováno vážením, kdy byl sledován váhový úbytek v určených časových intervalech. Ve fázi, kdy začaly být váhové úbytky minimální oproti předchozím vážením, došlo k zastavení odpařování. Tento postup byl zvolen kvůli tomu, že kromě rozpouštědla by mohlo v případě delší doby odpařování dojít ke ztrátám nejtěkavějších složek silice. Před dalšími fázemi experimentu byly vialky skladovány při 4 °C.

Hustota silic byla stanovena gravimetricky.

4.6 Testování antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita silic byla testována pomocí mikrodiluční metody *in vitro*. Z důvodu velmi malého objemu získaných silic byly v některých případech počty provedených testů zredukovány (ze standardních tří nezávisle provedených testování) tak, aby bylo možno prověřit účinnost silic proti širšímu spektru mikroorganismů.

4.6.1 Příprava kultivačních médií

Pro testování antimikrobiální aktivity pomocí mikrodiluční metody bylo zapotřebí připravit kultivační media. Pro kultivaci bakterií byl použit pufrovaný MHB a pro kultivaci kvasinky SDB, které byly připraveny podle návodu výrobce a sterilizováno v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut.

4.6.2 Příprava zásobních roztoků silic

Pro testování antimikrobiální aktivity byly připraveny zásobní roztoky silic. Po odpaření hexanu bylo odebráno 1 µl mikrostríkačkou příslušné množství silice a rozpuštěno v roztoku 96% ethanolu a Tweenu v poměru 2:1. Výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 51,2 µl/ml. Takto připravený roztok byl důkladně zvortexován a rozpipetován do mikrozkuhovek. Do každé mikrozkuhoveky bylo napipetováno 12,5 µl zásobního roztoku o koncentraci 51,2 µl/ml a takto připravené vzorky byly skladovány při -20°C.

Před každým novým testem byl ze zásobního vzorku silice připraven vzorek k pipetování do mikrotitrační destičky. Tento vzorek byl připraven tak, že bylo k 12,5 µl zásobního roztoku silice napipetováno 1237,5 µl MHB pro testování bakterií nebo SDB pro testování kvasinek. Takto byl připraven roztok silice o koncentraci 512 µl/ml, což byla nejvyšší koncentrace použitá pro testování citlivosti vybraných mikroorganismů.

4.6.3 Příprava zásobního inokula

Před samotným zahájením testu byla založena zásobní inokula testovaných mikroorganismů a následně používána na všechny následující testování. Do sterilních 15 ml zkumavek bylo pipetou sterilně odeberáno 10 ml MHB nebo SDB a stříkačkou zaočkováno příslušnými mikroorganismy. Inokula byla kultivována v inkubátoru při 37 °C v případě bakterií a 25 °C v případě kvasinek po dobu 24 hodin a následně skladována v lednici při 4 °C.

4.6.4 Příprava kontrolních antibiotik

Kontrolní antibiotikum bylo připravováno před každým testováním jako kontrola aktivity mikroorganismů. Pro testování *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* a *B. cereus* byl použit tetracyklin o čistotě 88 %, rozpuštěný v 96% ethanolu. Pro testování *H. uvarum* byl použit Tioconazol o čistotě 96,5 % rozpuštěný v DMSO. Počáteční koncentrace antibiotik byla stanovena pro *P. aeruginosa* a *E. faecalis* 32 µg/ml, *S. aureus* a *E. coli* 16 µg/ml, *B. cereus* 1 µg/ml a *H. uvarum* 4 µg/ml. Navážka antibiotika byla přepočtena dle čistoty daného antibiotika dle informací od výrobce. V rozpouštědle byla vždy připravena koncentrace 100x vyšší a následně byl roztok zředěn v poměru 1:100 v kultivačním médiu na koncentraci požadovanou pro testování. Tak bylo zajištěno, že maximální obsah rozpouštědla v kultivačním médiu nepřesáhne 1 % a nedojde k ovlivnění výsledků.

4.6.5 Příprava inokula pro testování

Před každým nezávislým testem bylo nutno připravit čerstvé inokulum před plánovaným zaočkováním mikrotitrační destičky. Pro tento účel bylo sterilně napipetováno 5 ml MHB v případě bakterií nebo SDB v případě kvasinek do 10 ml zkumavky a stříkačkou zaočkováno pár kapkami inokula potřebných mikroorganismů. Byla provedena kultivace v inkubátoru při teplotě 37 °C v případě bakterií a při 25 °C v případě kvasinek.

Pro přípravu inokula pro zaočkování mikrotitrační destičky těsně před zaočkováním bylo do 15 ml zkumavky napipetováno 10 ml MHB nebo SDB média a stříkačkou zaočkováno inokulem připraveným z předchozího dne. Množství inokula je určeno změnou denzity, která by se pro požadovanou koncentraci měla zvýšit o 0,5 McFarland zákalového standardu, což by mělo odpovídat koncentraci 1–2 x 10⁸ CFU/ml.

Takto připravené inokulum bylo přímo použito pro zaočkování mikrotitrační destičky pomocí inokulačního „ježka“, čímž bylo dosaženo předepsané koncentrace (CLSI, 2012) inokula v jamkách mikrotitrační destičky (5 x 10⁵ CFU/ml pro bakterie; 5 x 10³ CFU/ml pro kvasinku).

4.6.6 Příprava mikrotitrační destičky, její zaočkování a vyhodnocení MIC

Mikrotitrační destička byla před každým testem řádně označena. Na jedné mikrotitrační destičce byly testovány dvě silice nebo silice a antibiotikum ve třech opakováních a vždy bylo testováno 8 koncentračních hladin viz Tabulka 2. Jako kultivační médium byl použit pufrovaný MHB pro bakterie a SDB pro kvasinky. Do 1. sloupečku vyjma rohových jamek bylo napipetováno 100 µl média, které sloužilo jako kontrola nárůstu. Do 12. sloupečku vyjma rohových jamek bylo taktéž napipetováno 100 µl média, které v průběhu zaočkování zůstalo

nezaočkované a sloužilo jako kontrola čistoty kultivačního média. Rohové jamky se nepoužívají z důvodu nestandardního chování při testování např. dochází k rychlejšímu vysychání média.

Tabulka 2 Ředící řady testů v µg/ml

Silice	Tetracyklin (32 µg/ml)	Tetracyklin (16 µg/ml)	Tetracyklin (1 µg/ml)	Tioconazol (4 µg/ml)
512	32	16	1	4
256	16	8	0,5	2
128	8	4	0,25	1
64	4	2	0,125	0,5
32	2	1	0,0625	0,25
16	1	0,5	0,03125	0,125
8	0,5	0,25	0,015625	0,0625
4	0,25	0,125	0,0078125	0,03125

V případě mikrotitrační destičky s testováním dvou silic bylo do první jamky v 3., 4. a 5. sloupečku napipetováno 200 µl roztoku silice číslo 1 o koncentraci 512 µl/ml a do 8., 9. a 10. jamky bylo napipetováno 200 µl roztoku silice číslo 2 o koncentraci 512 µl/ml. Do zbytku jamek bylo napipetováno 100 µl média. Následně bylo provedeno ředění tak, že se z první jamky v 3., 4., 5., 8., 9. a 10. sloupečku odebralo multikanálovou pipetou 100 µl a přeneseno se do jamky druhého řádku, následně se promíchalo a opět přeneslo 100 µl do jamek třetího řádku. Takto se postupovalo až do posledního řádku, kde se odebralo 100 µl, které byly vypuštěny do odpadu.

Tabulka 3 Schéma mikrotitrační destičky při testování dvou silic

		Silice č. 1					Silice č. 2						
Opakování		1.	2.	3.			1.	2.	3.				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X		512 μl/ml	512 μl/ml	512 μl/ml			512 μl/ml	512 μl/ml	512 μl/ml			X
B	Kontrola nárůstu		256 μl/ml	256 μl/ml	256 μl/ml			256 μl/ml	256 μl/ml	256 μl/ml			Kontrola čistoty
C			128 μl/ml	128 μl/ml	128 μl/ml			128 μl/ml	128 μl/ml	128 μl/ml			
D			64 μl/ml	64 μl/ml	64 μl/ml			64 μl/ml	64 μl/ml	64 μl/ml			
E			32 μl/ml	32 μl/ml	32 μl/ml			32 μl/ml	32 μl/ml	32 μl/ml			
F			16 μl/ml	16 μl/ml	16 μl/ml			16 μl/ml	16 μl/ml	16 μl/ml			
G			8 μl/ml	8 μl/ml	8 μl/ml			8 μl/ml	8 μl/ml	8 μl/ml			
H	X		4 μl/ml	4 μl/ml	4 μl/ml			4 μl/ml	4 μl/ml	4 μl/ml			X

V případě mikrotitrační destičky s testováním silice a antibiotika bylo do první jamky v 3., 4. a 5. sloupečku napipetováno 200 μl roztoku silice číslo 3 o koncentraci 512 μl/ml a do 8., 9. a 10. jamky bylo napipetováno 200 μl roztoku Tetracyklinu nebo Tioconazolu o koncentraci určené pro testování mikroorganismů. Dále bylo postupováno jako u přípravy mikrotitrační destičky s testováním dvou silic.

Toto uspořádání bylo zvoleno i z toho důvodu, že v případě silic může dojít k transferu těkavých látek ze silice v mikrotitrační jamce do jamky vedlejší (Novy et al. 2014). V případě antimikrobiálního působení těkavých látek by tedy mohlo dojít k inhibici jak v jamce s určitou koncentrací silice, tak i v jamce sousední, kde se nachází jen zaočkované médium. V tomto případě bychom mohli sledovat inhibiční zónu i v jamkách 2., 6., 7. a 11. sloupce, jinak tyto sloupce sloužily jako další kontrola nárůstu.

Zaočkování mikrotitračních destiček bylo provedeno pomocí inokulačního „ježka“ (inokulátoru s jehlami), který se ponořil do připraveného inokula nalitého do Petriho misky a přenesl do kultivačního média v jamkách mikrotitrační destičky. Všechny jamky byly takto 2x zaočkovány kromě jamek v 12. sloupci, které sloužily jako kontrola čistoty média. Po každé fázi zaočkování byl inokulátor sterilizován namočením v etanolu a ožehnutím nad kahanem. Zaočkové destičky se nechaly kultivovat v inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin v případě bakterií a při 25 °C v po dobu 48 hodin v případě kvasinek.

Vyhodnocení testování antimikrobiální aktivity mikrodiluční metodou probíhalo vizuálně. Jako minimální inhibiční koncentrace byla brána nejnižší koncentrace, která inhibovala viditelný nárůst mikroorganismů.

4.7 Analýza chemického složení silic

Pro analýzu složení pomocí plynové chromatografie byly připraveny vzorky rozpuštěním 0,2 μl silice v 200 μl hexanu ve vialce s inzertem a PTFE septem. Takto připravené vzorky byly

měřeny na plynovém chromatografu Agilent 7890A s hmotnostním detektorem typu kvadrupól Agilent 5975C. Parametry analýzy jsou zaznamenány viz Tabulka 4.

Detekce na hmotnostním spektrometru byla provedena v režimu full-scan s ionizační energií elektronů nastavenou na 70 eV.

Identifikaci složek éterických olejů byla provedena pomocí porovnání hmotnostních spekter a Kovatsových retenčních indexů s knihovnou spekter Národního institutu pro standardy a technologie (NIST17, USA) jakož i s literaturou (Adams, 2007). U 11 vybraných látek byla identifikace potvrzena pomocí autentických chemických standardů (viz Tabulka 8)

Zjištění relativních procentuálních obsahů složek éterických olejů bylo provedeno pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A s plamenově ionizačním detektorem. Analýza na plynovém chromatografu byla provedena za stejných podmínek jako identifikace složení viz Tabulka 4.

Tabulka 4 Parametry chemické analýzy

Typ stacionární fáze	HP-5MS
Rozměry kolony	(30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)
Objem nástřiku	1 μl
Režim nástřiku	Split (12:1)
Teplota inletu	250 °C (GC-MS); 300 °C (GC-FID)
Nosný plyn	Helium
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Teplotní gradient	3 min 60 °C, zvyšování teploty 3 °C/min, 10 min 231 °C
Celkový čas analýzy	70 min

5 Výsledky

5.1 Extrakce silic

Hydrodestilací pomocí Clavengerovy aparatury bylo získáno od 2,7 do 10,4 mg silice, s výtěžností od 0,001 do 0,0044 %. Silice *A. clematitidis* byla čirá, měla žlutohnědou barvu a charakteristickou vůni rozdílnou od zbylých dvou silic. Z rostliny *S. officinale* byla vydestilována žlutá silice s vůní po seně a trávě, která měla při pokojové teplotě tuhou konzistenci. Z *A. glycyphyllos* bylo destilací získána čirá silice žluté barvy, která měla vůni stejně jako *S. officinale* po seně a trávě. Nejvyšší obsah silice byl zjištěn u *A. clematitidis* naopak nejnižší množství bylo vydestilováno z *A. glycyphyllos* viz Tabulka 5.

Tabulka 5 Hmotnost sušeného materiálu, množství vydestilované silice a výtěžnost

Silice	Hmotnost sušeného materiálu	Množství Vydestilované silice	Výtěžnost silic (w/w)
<i>Aristolochia clematitidis</i>	235,56 g	10,4 mg	0,0044 %
<i>Sisymbrium officinale</i>	286,91 g	7,3 mg	0,0025 %
<i>Astragalus glycyphyllos</i>	262,86 g	2,7 mg	0,0010 %

5.2 Hustota silic

Z naměřených objemů a hmotností byla vypočtena hustota jednotlivých silic viz Tabulka 6. Nejvyšší hustotu měla silice z *A. clematitidis*. Nejnižší hustota byla zjištěna u *A. glycyphyllos*.

Tabulka 6 Hustota silic

Silice	Hustota (kg/m ³)
<i>Aristolochia clematitidis</i>	1000
<i>Sisymbrium officinale</i>	760
<i>Astragalus glycyphyllos</i>	700

5.3 Antimikrobiální aktivita

U rostlin *A. clematitidis*, *S. officinale* a *A. glycyphyllos* nebyla prokázána antimikrobiální aktivita v testovaném rozmezí koncentrací 4–512 μ l/ml.

Účinnost antibiotik tetracyklin a tioconazol vůči námi vybraným kmenům ATTC odpovídala koncentracím udávaných dle CLSI (2012). Výsledky testů jsou uvedeny viz Tabulka 7.

Tabulka 7 Minimální inhibiční koncentrace (MIC).

	MIC (µg/ml)					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>H. uvarum</i> *
<i>Aristolochia clematitis</i>	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>Sisymbrium officinale</i>	>512	>512	>512	>512	>512	>512
<i>Astragalus glycyphyllos</i> *	>512	n.t.	>512	>512	>512	n.t.
Tetracyklin	0,5	16	0,06	2	8	n.t.
Tioconazol	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0,25

n.t – nebylo testováno, * - bylo testováno jen v jednom nezávislém testu

5.4 Chemické složení

Celkem bylo v silici *A. clematitis* zastoupeno 33 složek z toho 30 bylo identifikováno, což v procentuálním zastoupení činí 94,91 %. Mezi nejzastoupenější složky v silici patřil caryophyllen (15,28 %), bornyl acetát (7,12 %), β -cadinen (5,64 %), camphor (4,74 %), eucalyptol (4,44%) a nerolidol (4,20 %). Ostatní složky jsou zastoupeny v procentuálním množství pod 4 %.

V silici *S. officinale* byly nalezeny celkem 6 složek z toho 4 byly identifikovány. Z nich byly nejvíce zastoupené hexahydrofarnesyl aceton (52,27 %) a trans- β -ionon (19,14 %).

V poslední analyzované silici z *A. glycyphyllos* bylo analýzou zjištěno 19 složek z toho 14 bylo identifikováno. K nejzastoupenějším složkám patřily phytol (12,79%), hexahydrofarnesyl aceton (10,94 %) a trans- β -ionon (10,49 %).

Ve všech testovaných vzorcích se objevila kontaminace diethyl ftalátem, kyselinou ftalovou nebo jejími deriváty, ftaláty jsou běžnými složkami plastů, kde fungují jako změkčovadla. Kontaminace těmito látkami se nám nepodařilo vysvětlit, možnými variantami byla kontaminace z mikrozumavek, popřípadě jiného plastového laboratorního materiálu.

Tabulka 8 Chemické složení silic

Identifikovaná látka	RI	RI (lit.)	Zastoupení v %			Ident.
			A. <i>clematitis</i>	S. <i>officinale</i>	A. <i>glycyphyllos</i>	
α -Pinene	937	939	2,41	-	-	MS, RI, S
Camphene	952	953	2,22	-	-	MS, RI, S
Octen-3-ol	980	978 ⁶	-	-	2,55	MS, RI
β -Pinene	979	980	0,87	-	-	MS, RI, S
D-Limonene	1031	1031	2,22	-	-	MS, RI, S
Eucalyptol	1041	1033	4,44	-	-	MS, RI, S
cis- β -Ocimene	1051	1040	1,50	-	-	MS, RI
Linalool	1099	1098	-	-	6,10	MS, RI, S
Nonanal	1104	1102 ¹⁶	-	-	2,36	MS, RI
Camphor	1145	1143	4,74	-	-	MS, RI, S
Myrtenol	1195	1191 ²	1,05	-	-	MS, RI
Isopentyl hexanoate	1253	1244 ¹⁰	1,16	-	-	MS, RI
Geraniol	1257	1255 ²	-	-	4,12	MS, RI
Bornyl acetate	1286	1285	7,12	-	-	MS, RI
Thymol	1293	1290 ²	-	5,54	-	MS, RI
α -Cubebene	1351	1351 ¹	1,46	-	-	MS, RI
Copaene	1377	1376	2,93	-	-	MS, RI
Neidentifikovaná látka I*	1390	-	-	8,43	-	-
β -Elemene	1392	1391 ²	2,38	-	-	MS, RI
Isocaryophyllene	1406	1411 ³	3,85	-	-	MS, RI
Caryophyllene	1419	1418	15,28	-	-	MS, RI, S
β -Copaene	1437	1432 ⁴	0,27	-	-	MS, RI
Dihydropseudoionone	1454	1451 ¹⁸	-	7,67	-	MS, RI
Geranyl acetone	1454	1455 ⁴	-	-	8,37	MS, RI
Humulene	1454	1454	2,16	-	-	MS, RI, S
Dodecanol	1475	1469 ⁵	-	-	3,69	MS, RI
γ -Muurolene	1477	1477 ⁶	3,27	-	-	MS, RI
Germacrene D	1481	1480	3,86	-	-	MS, RI
trans- β -Ionone	1486	1485	-	19,14	10,49	MS, RI
β -Eudesmene	1486	1485 ²	3,72	-	-	MS, RI
α -Selinene	1494	1499 ⁷	3,49	-	-	MS, RI
β -Curcumene	1509	1506 ⁸	2,18	-	-	MS, RI
γ -Cadinene	1514	1513 ²	2,38	-	-	MS, RI
Neidentifikovaná látka II*	1524	-	-	-	2,47	-

Identifikovaná látka	RI	RI (lit.)	Zastoupení v %			Ident.
			A. <i>clematitis</i>	S. <i>officinale</i>	A. <i>glycyphyllos</i>	
β-Cadinene	1524	1521 ⁹	5,64	-	-	MS, RI
Nerolidol	1565	1564	4,20	-	1,69	MS, RI
Caryophyllene oxide	1582	1581	1,70	-	-	MS, RI
Neidentifikovaná látka III*	1585	-	0,97	-	-	
α-Cadinol	1654	1653	3,31	-	-	MS, RI
Neidentifikovaná látka IV*	1663	-	-	-	2,44	-
n-Hexyl salicylate	1676	1683 ¹¹	-	-	7,95	MS, RI
2-Pentadecanol ^{P*}	1716	-	-	-	1,94	-
Geranyl caproate	1755	1755 ¹⁵	1,16	-	-	MS, RI
α-Hexyl cinnamaldehyde	1760	1745	-	-	5,76	MS, RI
Neidentifikovaná látka V*	1761	-	-	-	3,08	-
2-Ethylhexyl salicylate	1804	1816 ¹⁷	-	-	4,77	MS, RI
Hexahydrofarnesyl acetone	1846	1837 ¹²	2,30	52,27	10,94	MS, RI
Neidentifikovaná látka VI*	1879	-	-	-	2,04	-
Farnesyl acetone	1918	1911 ¹³	-	-	6,47	MS, RI
Neidentifikovaná látka VII*	1952	-	2,38	-	-	-
Neidentifikovaná látka VIII*	2095	-	174	-	-	-
Phytol	2112	2106 ¹⁴	1,62	-	12,79	MS, RI, S
Neidentifikovaná látka IX*	2196	-	-	6,96	-	-
Identifikováno celkem			94,91	84,62	85,48	

Ident. – identifikace, MS – porovnání hmotnostních spekter s těmi, která jsou uvedena v knihovně hmotnostních spekter NIST 17, RI – naměřené hodnoty retenčních indexů; RI (lit.) – retenční indexy uváděné v literatuře (Adams et al., 2007), S – identifikace pomocí standardu, ^P – předběžná identifikace, * – hmotnostní spektra sloučenin přiložená v příloze ¹ – (Adams et al. 2011), ² – (Adams 2000), ³ – (Jian-Yu et al. 2012), ⁴ – (Adams et al. 2005), ⁵ – (Saroglou et al. 2007), ⁶ – (Adams 1998), ⁷ – (Singh et al. 2005), ⁸ – (Slavkovska et al. 2005), ⁹ – (Ferraz et al. 2005), ¹⁰ – (Maia et al. 2000), ¹¹ – (Radulovic et al. 2010), ¹² – (Basta et al. 2007), ¹³ – (Tigrine-Kordjani et al. 2006), ¹⁴ – (Tzakou et al. 2006), ¹⁵ – (Shellie & Marriott 2003), ¹⁶ – (Adams 1999), ¹⁷ – (Andriamaharavo, 214), ¹⁸ – (Zhao et al. 2008),

6 Diskuze

Mnoho druhů rostlin je tradičně využíváno pro své léčivé schopnosti, mnohdy ale tyto rostliny nejsou dostatečně prostudovány. Proto je tato práce zaměřena na zkoumání antimikrobiální aktivity a složení silic několika druhů léčivých rostlin. Byl zkoumán podražec křovištní (*Aristolochia clematitis*), hulevník lékařský (*Sisymbrium officinale*) a kozinec sladkolistý (*Astragalus glycyphyllos*). Zmínky z herbářů (Janča & Zentrich, 1994) o přítomnosti silic v užívaných částech těchto bylin byly sice potvrzeny, nicméně silice byly obsaženy pouze ve stopovém množství. Podle dostupných informací byla u *A. clematitis* testována antimikrobiální aktivita jen u hexanových, methanolových, chloroformových, butanolových, ethylacetátových a vodných extraktů (Bartha et al. 2019). Složení silice zatím nebylo dosud testováno. V případě *S. officinale* bylo testováno chemické složení a antimikrobiální aktivita silic ve studii autorů Blažević et al. (2010). U *A. glycyphyllos* byly zatím k testování antimikrobiální aktivity použity jen ethanolové extrakty (Butkutė et al. 2017). A složení silic pomocí GC-MS zatím nebylo analyzováno. Testován byl jen celkový obsah fenolických látek a flavonoidů (Butkute et al. 2018). Přesto, že několik silic z příbuzných druhů vykazovalo antimikrobiální aktivitu v našem případě se ji nepodařilo prokázat.

6.1 Podražec křovištní (*Aristolochia clematitis* L.)

Výtěžnost silice *A. clematitis* ze sušené nadzemní části pomocí hydrodestilace byla 0,0044 %. Silice měla žlutohnědou barvu a charakteristickou vůni. Získávání silic pomocí hydrodestilace u *A. clematitis* nebylo zatím publikováno. V práci Li et al. (2013) byla provedena hydrodestilace *Aristolochia delavayi* Franch. s výtěžností 0,9 %, což je výrazně vyšší výtěžnost než u našeho pokusu. Hydrodestilací nadzemní části *Aristolochia mollissima* Hance byla získána silice s výtěžností 0,15 %. (Yu et al. 2007) Hydrodestilací byla získána i silice *Aristolochia gibertii* Hook., u které po dobu 6–7 h probíhala zvlášť hydrodestilace stonků a listů s výtěžností 0,03 % u stonků a 0,1 % u listů. (Priestap et al. 2002) Jak je vidět, napříč studiemi se výtěžnost silic u jednotlivých rostlin rodu *Aristolochia* velmi liší. Výtěžnost může být ovlivněna klimatickými a geografickými podmínkami, fyziologickým stádiem, chemotypem, půdními podmínkami, dostupností živin, stresovými podmínkami, podmínkami sušení a dobou destilace.

Chemické složení silice *A. clematitis* nebylo dosud testováno. Mezi hlavní složky silice v této práci patřil caryophyllen (15,28 %), bornyl acetát (7,12 %), které byly ve vyšším obsahu zastoupeny i u silic z příbuzných druhů z rodu *Aristolochia*. Porovnání kvalitativního složení silice s příbuzným druhem *A. mollissima* se shodovalo v 17 z 30 identifikovaných sloučenin. Obě silice mají caryophyllen a bornyl acetát ve vyšším procentuálním zastoupení u ostatních sloučenin se zastoupení výrazně lišilo. (Yu et al. 2007) S *Aristolochia argentina* se v kvalitativním porovnání shodovaly v 13 z 30 identifikovaných složek. Jediným společným rysem, co se týká procentuálního zastoupení sloučenin *A. clematitis* a *argentina* je vyšší obsah caryophyllenu (Priestap et al. 2003). *A. delavayi* se kvalitativně shodovala se silicí *A. clematitis* v 11 sloučeninách, při kvantitativním porovnání se ale procentuální zastoupení lišilo ve všech shodujících se látkách.

Caryophylen, jako nejzastoupenější sloučenina v námi analyzované silici (15,28 %), má podle studií antimikrobiální účinek na *S. aureus* a *Streptococcus mutans* a výrazné antifungální účinky. (Dahham et al. 2015; Yoo & Jwa 2018) Ve studii Jagannath et al. (2012) byl testována antimikrobiální účinek silice z *Heracleum regens* s nejzastoupenější složkou Bornyl acetátem v nadpolovičním zastoupení (51,2 %). U této silice byla potvrzena antibakteriální aktivita v koncentraci 2,25 mg/ml u *Bacillus subtilis* a *Klebsiella pneumoniae*.

V těchto studiích oproti našemu testování byly použity jiné metody, jiné koncentrace nebo testované mikroorganismy. V případě testování účinku caryophylenu na biofilm *Streptococcus mutans* byla testována 20× vyšší koncentrace a při testování silice s bornyl acetátem byla účinná koncentrace bornyl acetátu až 350× větší než v případě našeho testování. (Jagannath et al. 2012; Yoo & Jwa 2018)

Ačkoliv tyto sloučeniny vykazují samostatně antimikrobiální aktivitu, v silici je jejich zastoupení a koncentrace daleko nižší než v případě výše zmíněných studiích. Tyto sloučeniny se v silici vyskytují v kombinaci s mnoha dalšími látkami, které mohou jejich antimikrobiální aktivitu ovlivňovat ať už synergicky nebo antagonisticky. Proto nelze automaticky předpokládat, že obsahe několika antimikrobiálně aktivních sloučenin zajistí antimikrobiální účinek silice.

6.2 Hulevník lékařský (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.)

V literatuře byla popsána izolace silice *S. officinale* ze sušeného rostlinného materiálu s výtěžností 0,035 % (Blažević et al. 2010a). V porovnání s námi zjištěnou výtěžností 0,0025 % je pozorován velmi významný rozdíl. Stejným postupem hydrodestilace a extrakce pomocí směsi penthan:ether (1:1), sloužícím k zachycení vydestilované silice, byly získávána také silice *Aurinia sinuata* (L.) Griseb. z čeledi *Brassicaceae* (Blažević et al. 2010b). Výtěžnost silice může být ovlivněna mnoha vlivy jako např. klimatickými a geografickými podmínkami, fyziologickým stádiem, chemotypem, půdními podmínkami, dostupností živin atd.

Při porovnání chemického složení silice *S. officinale* s výsledky studie Blažević et al. (2010a) se shodovala jen jedna ze 4 námi identifikovaných a to trans- β -ionone (19,14 %). Navíc oproti námi identifikovaným čtyřem sloučeninám bylo ve studii identifikováno daleko více látek. Stejný výsledek byl zjištěn i u chemického složení příbuzné *A. sinuata*, kde byla taktéž shoda jen s jednou látkou.

Blažević et al. (2010a) oproti našim výsledkům zaznamenal ve své studii antimikrobiální aktivitu silice hulevníku diskovou difúzní metodou při koncentraci 10 mg/ml, což je víc jak 19× vyšší koncentrace, než byla počáteční koncentrace testovaná v našem případě. Nejvyšší antimikrobiální aktivitu zaznamenal u *S. aureus*, *B. cereus*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio alginolyticus* a *Candida albicans*.

V dalších studiích, kde byly testovány antimikrobiální účinky příbuzných druhů z čeledi *Brassicaceae*, byly použity buď jiné části rostlin, jiné metody získávání silic např. extrakce, anebo byly použity jiné metody testování antimikrobiální aktivity a jiné koncentrace. U *Erysimum corinthium* Boiss. byla použita přibližně 2× vyšší koncentrace a to 1 mg/ml (Al-Gendy et al. 2010). U *A. sinuata* byla použita přibližně stejná nejvyšší koncentrace (Blažević et al. 2010b), ale chemické složení se významně lišilo od námi testované silice. U obou studií byla pozorována antimikrobiální aktivita u některých z testovaných mikroorganismů.

6.3 Kozinec sladkolistý (*Astragalus glycyphyllos* L.)

U druhu *A. glycyphyllos* bylo hydrodestilací získáno 0,001 % silice. V literatuře byly pomocí hydrodestilace získány silice z plodu příbuzného druhu *Astragalus alopecurus* Pall. s výtěžností 1,5 % (w/w) a z květů, listů a stonků *Astragalus hamzaoglui* Ketenoglu & Menemen s výtěžností 0,08 %, 0,06 % a 0,05 % (v/w) (Yilmaz İskender et al. 2013; Ghahari et al. 2018). Vzhledem k tomu, že jsou výsledky hydrodestilace uvedeny v objemových procentech nebo je destilována jiná část rostliny než v našem případě, nelze tyto hodnoty s přesností porovnávat. Ale lze určit, že námi získaná výtěžnost byla řádově nejnižší. Výtěžnost může být ovlivněna mnoha již zmíněnými faktory.

Chemické složení silice *A. glycyphyllos* nebylo dosud v literatuře popsáno. Složení se kvalitativně podobalo složení silice *A. hamzaoglui* v 7 z 14 identifikovaných sloučenin (linalool, geraniol, trans- β -ionone, geranyl aceton, nerolidol, hexahydrofarnesyl aceton, phytol), přičemž kvantitativně se v obou silicích k hlavním složkám řadil phytol. (Yilmaz İskender et al. 2013). V případě *A. alopecurus* se složení shodovalo jen ve 3 z 14 případů (nonanal, nerolidol, hexahydrofarnesyl aceton). Co se týká procentuálního zastoupení se silice obsahem jednotlivých složek lišily, u silice *A. glycyphyllos* byl nejvíce zastoupen phytol (12,14 %), u *A. alopecurus* to byl α -pinene (18,41 %) (Ghahari et al. 2018).

U *A. hamzaoglui* byla testována také antimikrobiální aktivita, ve studii byla testována pomocí difúzních method, a to jamkové difúzní metody V případě *A. hamzaoglui* byla účinná koncentrace 10000 $\mu\text{g/ml}$, která vykazovala antimikrobiální aktivitu proti *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Mycobacterium smegmatis* a *Saccharomyces cerevisiae*. Tato koncentrace je 19 \times vyšší než v našem experimentu. (Yilmaz İskender et al. 2013) U *A. alopecurus* byla testována minimální inhibiční koncentrace. Ta byla testována v koncentračním rozmezí 100–0,8 $\mu\text{g/ml}$ a jednu z nejvyšších pozitivních antimikrobiálních aktivit vykazoval *S. aureus* (MIC 50 $\mu\text{g/ml}$). Dále byly testované plísně jako *Pyricularia oryzae* (MIC 25 $\mu\text{g/ml}$), *Botrytis cinerea* (MIC 50 $\mu\text{g/ml}$) a další, na které silice také působila inhibičně. (Ghahari et al. 2018) Důvodem neúčinnosti naší testované silice je pravděpodobně velký rozdíl ve složení silic.

7 Závěr

V této práci bylo poprvé analyzováno chemické složení silic *A. clematitis* a *A. glycyphyllos*. Celkem bylo v silici *A. clematitis* identifikováno 30 sloučenin, což v procentuálním zastoupení činí 94,91 %. V silici z *A. glycyphyllos* bylo identifikováno 14 složek, které činí 85,48 % z celkového procentuálního zastoupení silice. Zároveň byla u těchto silic poprvé testována antimikrobiální aktivita silic pomocí mikrodiluční metody *in vitro*.

V této práci nebyla prokázána antimikrobiální aktivita ani u jedné ze tří silic v testovaném koncentračním rozmezí (4–512 $\mu\text{l/ml}$). Je ale možné, že v případě testování vyšší koncentrace by u některé ze silic mohl být zaznamenán antimikrobiální účinek. Zejména u silice *A. clematitis*, kde bylo úspěšně testováno antimikrobiální působení silic z jiných druhů rodu *Aristolochia*, které vykazovaly podobné chemické složení s námi testovanou silicí.

Z odborné literatury byl zaznamenán možný potenciál pro působení silic *A. clematitis*, *S. officinale* a *A. glycyphyllos* jako antimikrobiální činidla, v této práci se tato hypotéza nepodařila prokázat.

8 Literatura

- Abbouyi A el, Maliki S el. (n.d.). Antioxidant effect of extract of rhizomes from *Aristolochia clematitis*. Available from <https://www.researchgate.net/publication/355167570> (accessed March 25, 2022).
- Adams RP. 1998. The leaf essential oils and chemotaxonomy of *Juniperus* sect. *Juniperus*. *Biochemical Systematics and Ecology* **26**:637–645. Pergamon.
- Adams RP. 1999. Systematics of multi-seeded eastern hemisphere *Juniperus* based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerprinting. *Biochemical Systematics and Ecology* **27**:709–725. Pergamon.
- Adams RP. 2000. Systematics of *Juniperus* section *Juniperus* based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochemical Systematics and Ecology* **28**:515–528. Pergamon.
- Adams RP, Beauchamp PS, Dev V, Dutz SM. 2011. New Natural Products Isolated from One-Seeded *Juniperus* of the Southwestern United States: Isolation and Occurrence of 2-Ethenyl-3-Methyl Phenol and Its Derivatives. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2007.9699247> **19**:146–152. Taylor & Francis Group. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2007.9699247> (accessed April 9, 2022).
- Adams RP, Morris JA, Pandey RN, Schwarzbach AE. 2005. Cryptic speciation between *Juniperus deltoides* and *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean. *Biochemical Systematics and Ecology* **33**:771–787. Pergamon.
- Al-Gendy AA, El-gindi OD, Hafez AS, Ateya AM. 2010. Glucosinolates, volatile constituents and biological activities of *Erysimum corinthium* Boiss. (Brassicaceae). *Food Chemistry* **118**:519–524. Elsevier.
- Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Falah F. 2019. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial Pathogenesis* **136**:103716. Academic Press.
- Amodeo V, Marrelli M, Pontieri V, Cassano R, Trombino S, Conforti F, Statti G. 2019. *Chenopodium album* L. and *Sisymbrium officinale* (L.) Scop.: Phytochemical Content and In Vitro Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential. *Plants* 2019, Vol. 8, Page 505 **8**:505. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Available from <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/11/505/htm> (accessed March 25, 2022).
- Arakawa T, Ishikawa Y, Ushida K. 2000. Volatile Sulfur Production by Pig Cecal Bacteria in Batch Culture and Screening Inhibitors of Sulfate Reducing Bacteria. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **46**:193–198. Center for Academic Publications Japan.
- Arlt VM, Stiborová M, vom brocke J, Simões ML, Lord GM, Nortier JI, Hollstein M, Phillips DH, Schmeiser HH. 2007. Aristolochic acid mutagenesis: molecular clues to the aetiology of Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer. *Carcinogenesis* **28**:2253–2261. Oxford Academic. Available from <https://academic.oup.com/carcin/article/28/11/2253/2476209> (accessed March 24, 2022).
- Asbahani A el et al. 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* **483**:220–243. Elsevier.
- Babu KGD, Kaul VK. 2005. Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) distilled by different distillation techniques. *Flavour and Fragrance Journal* **20**:222–231. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ffj.1414> (accessed February 21, 2022).
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**:446–475.

- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **6**:71–79. Elsevier.
- Barba FJ, Zhu Z, Koubaa M, Sant'Ana AS, Orlie V. 2016. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology* **49**:96–109. Elsevier.
- Barra A. 2009. Factors Affecting Chemical Variability of Essential Oils: A Review of Recent Developments: <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400827> **4**:1147–1154. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA. Available from <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1934578X0900400827> (accessed February 5, 2022).
- Bartha GS, Tóth G, Horváth P, Kiss E, Papp N, Kerényi M. 2019. Analysis of aristolochic acids and evaluation of antibacterial activity of *Aristolochia clematitis* L. *Biologia Futura* **70**:323–329. Akadémiai Kiadó. Available from <https://akjournals.com/view/journals/019/70/4/article-p323.xml> (accessed November 1, 2021).
- Basta A, Tzakou O, Couladis M, Yannitsaros A. 2007. Essential oil composition of *Prasium majus* L. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal* **22**:347–349. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ffj.1802> (accessed April 9, 2022).
- Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert JM, Bernardini AF, Costa J. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry* **106**:132–139. Elsevier.
- Benmehdi H, Behilil A, Memmou F, Amrouche A. 2017. Free radical scavenging activity, kinetic behaviour and phytochemical constituents of *Aristolochia clematitis* L. roots. *Arabian Journal of Chemistry* **10**:S1402–S1408. Elsevier.
- Bérdy J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics* 2005 **58**:1–26. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/ja20051> (accessed February 27, 2022).
- Bhavaniramya S, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D. 2019. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology* **2**:49–55. Elsevier.
- Blažević I, Radonić A, Mastelić J, Zekić M, Skočibušić M, Maravić A. 2010a. Hedge mustard (*Sisymbrium officinale*): Chemical diversity of volatiles and their antimicrobial activity. *Chemistry and Biodiversity* **7**:2023–2034.
- Blažević I, Radonić A, Mastelić J, Zekić M, Skočibušić M, Maravić A. 2010b. Glucosinolates, glycosidically bound volatiles and antimicrobial activity of *Aurinia sinuata* (Brassicaceae). *Food Chemistry* **121**:1020–1028. Elsevier.
- Blázquez MA, Pérez I, Boira H. 2003. Essential oil analysis of *Teucrium libanitis* and *T. turredanum* by GC and GC-MS. *Flavour and Fragrance Journal* **18**:497–501.
- Botany.cz, 2022a. Hulevník lékařský. [image] Available at: <https://botany.cz/cs/sisymbrium-officinale/> (accessed 14 April 2022).
- Botany.cz, 2022b. Kozinec sladkolistý. [image] Available at: <https://botany.cz/cs/astragalus-glycyphyllos/> (accessed 14 April 2022).
- Bousbia N, Vian MA, Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F. 2009. A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering* **90**:409–413. Elsevier.
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology* **94**:223–253.

- Butkute B, Dagilyte A, Benetis R, Padarauskas A, Cesevičienė J, Olšauskaite V, Lemežiene N. 2018. Mineral and Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Herbal Material from Two Temperate Astragalus Species. *BioMed Research International* **2018**. Hindawi Limited.
- Butkutė B, Padarauskas A, Cesevičienė J, Pavilionis A, Taujenis L, Lemežienė N. 2017. Perennial legumes as a source of ingredients for healthy food: proximate, mineral and phytoestrogen composition and antibacterial activity. *Journal of Food Science and Technology* **54**:2661–2669. Springer India. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-017-2703-8> (accessed April 9, 2022).
- Cai X, Mai RZ, Zou JJ, Zhang HY, Zeng XL, Zheng RR, Wang CY. 2014. Analysis of aroma-active compounds in three sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars by GC-olfactometry and GC-MS. *Journal of Zhejiang University: Science B* **15**:638–648. Zhejiang University Press. Available from <https://link.springer.com/article/10.1631/jzus.B1400058> (accessed February 27, 2022).
- Caillet S, Lacroix M. 2006. Effect of Gamma Radiation and Oregano Essential Oil on Murein and ATP Concentration of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **69**:2961–2969. Allen Press. Available from <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/69/12/2961/172124/Effect-of-Gamma-Radiation-and-Oregano-Essential> (accessed February 7, 2022).
- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control* **54**:111–119. Elsevier.
- Camel V. 2001. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst* **126**:1182–1193. The Royal Society of Chemistry. Available from <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2001/an/b008243k> (accessed February 21, 2022).
- Camporese A, Balick MJ, Arvigo R, Esposito RG, Morsellino N, de Simone F, Tubaro A. 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology* **87**:103–107. Elsevier.
- Chan W, Pavlović NM, Li W, Chan CK, Liu J, Deng K, Wang Y, Milosavljević B, Kostić EN. 2016. Quantitation of Aristolochic Acids in Corn, Wheat Grain, and Soil Samples Collected in Serbia: Identifying a Novel Exposure Pathway in the Etiology of Balkan Endemic Nephropathy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**:5928–5934. American Chemical Society. Available from <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.6b02203> (accessed March 24, 2022).
- Chemat F, Boutekedjiret C. 2015. Extraction // Steam Distillation. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.11557-4. Elsevier.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* **34**:540–560. Elsevier.
- Cook CM, Lanaras T. 2016. Essential Oils: Isolation, Production and Uses. *Encyclopedia of Food and Health*:552–557. Academic Press.
- da Silva BD, Bernardes PC, Pinheiro PF, Fantuzzi E, Roberto CD. 2021. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science* **176**:108463. Elsevier.
- da Silveira SM, Luciano FB, Fronza N, Cunha A, Scheuermann GN, Vieira CRW. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards

- foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. *LWT - Food Science and Technology* **59**:86–93. Academic Press.
- Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, Ahamed MBK, Ezzat MO, Majid ASA, Majid AMSA. 2015. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 11808-11829 **20**:11808–11829. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Available from <https://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/11808/htm> (accessed April 7, 2022).
- Debelle FD, Vanherweghem JL, Nortier JL. 2008. Aristolochic acid nephropathy: A worldwide problem. *Kidney International* **74**:158–169. Elsevier. Available from <http://www.kidney-international.org/article/S0085253815532791/fulltext> (accessed March 24, 2022).
- di Sotto A, Vitalone A, Nicoletti M, Piccin A, Mazzanti G. 2010. Pharmacological and phytochemical study on a *Sisymbrium officinale* Scop. extract. *Journal of Ethnopharmacology* **127**:731–736.
- Dima C, Dima S. 2015. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science* **5**:29–35. Elsevier.
- Domadia P, Swarup S, Bhunia A, Sivaraman J, Dasgupta D. 2007. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology* **74**:831–840. Elsevier.
- Doosselaere P van. 2013. Production of Oils. *Edible Oil Processing*:55–96. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118535202.ch3> (accessed February 10, 2022).
- dos Santos AL, Polidoro A dos S, Cardoso CAL, Batistote M, do Carmo Vieira M, Jacques RA, Caramão EB. 2019. GC \times GC/qMS analyses of *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg essential oils and their antioxidant and antimicrobial activity. *Natural Product Research* **33**:593–597. Taylor and Francis Ltd. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2017.1399383> (accessed February 27, 2022).
- Ellse L, Wall R. 2014. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. *Medical and Veterinary Entomology* **28**:233–243. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mve.12033> (accessed February 1, 2022).
- Ferraz ABF, Limberger RP, Bordignon SAL, von Poser GL, Henriques AT. 2005. Essential oil composition of six *Hypericum* species from southern Brazil. *Flavour and Fragrance Journal* **20**:335–339. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ffj.1435> (accessed April 9, 2022).
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* **23**:213–226.
- Flamini G, Tebano M, Cioni PL, Ceccarini L, Ricci AS, Longo I. 2007. Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *Journal of Chromatography A* **1143**:36–40. Elsevier.
- GAMA, 2022. Mikrotitrační destička. [image] Available at: <https://www.gama.cz/katalog/mikrotitracni-desticka-p> (accessed 14 April 2022).
- Georgieva A, Popov G, Shkondrov A, Toshkova R, Krasteva I, Kondeva-Burdina M, Manov V. 2021. Antiproliferative and antitumour activity of saponins from *Astragalus*

- glycyphyllos on myeloid Graffi tumour. *Journal of Ethnopharmacology* **267**:113519. Elsevier.
- Ghahari S, Alinezhad H, Nematzadeh GA, Tajbakhsh M, Baharfar R. 2018. Phytochemical, Antioxidant and Biological Activities of the Essential Oil of *Astragalus alopecurus* Pall. Fruits from Northern Iran. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1438927> **21**:103–115. Taylor & Francis. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2018.1438927> (accessed April 10, 2022).
- Golmakani MT, Rezaei K. 2008. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* Boiss. *European Journal of Lipid Science and Technology* **110**:448–454. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ejlt.200700239> (accessed February 22, 2022).
- Guarise M, Borgonovo G, Bassoli A, Ferrante A. 2019. Evaluation of Two Wild Populations of Hedge Mustard (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.) as a Potential Leafy Vegetable. *Horticulturae* 2019, Vol. 5, Page 13 **5**:13. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Available from <https://www.mdpi.com/2311-7524/5/1/13/htm> (accessed March 25, 2022).
- Heinrich M, Chan J, Wanke S, Neinhuis C, Simmonds MSJ. 2009. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2—A global assessment based on bibliographic sources. *Journal of Ethnopharmacology* **125**:108–144. Elsevier.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* **3**:12. Frontiers Research Foundation.
- Isman MB. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* **19**:603–608. Elsevier.
- Isman MB. 2005. BOTANICAL INSECTICIDES, DETERRENTS, AND REPELLENTS IN MODERN AGRICULTURE AND AN INCREASINGLY REGULATED WORLD. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146> **51**:45–66. Annual Reviews. Available from <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146> (accessed February 1, 2022).
- Jagannath N, Ramakrishnaiah H, Krishna V, Gowda PJ. 2012. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Heracleum rigens*: <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700737> **7**:943–946. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA. Available from <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1934578X1200700737> (accessed April 7, 2022).
- Johnson CB, Kirby J, Naxakis G, Pearson S. 1999. Substantial UV-B-mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry* **51**:507–510. Pergamon.
- Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* **76**:626–631. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x> (accessed February 7, 2022).
- Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* **81**:121–126. Elsevier.

- Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N. 2011. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. <https://doi.org/10.1080/10412905.1989.9697767> 1:119–128. Taylor & Francis Group . Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1989.9697767> (accessed February 7, 2022).
- Košťálová D, Hrochová V, Pronayová N, Leško J. (n.d.). Constituents of *Aristolochia clematitis*.
- Kuo PC, Li YC, Wu TS. 2012. Chemical Constituents and Pharmacology of the *Aristolochia* (馬兜鈴 *mǎdōu líng*) species. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2:249–266. Elsevier.
- Lamari Z, Negache H. 2021. Analysis of *Aristolochia longa* L. Medicinal Plant from Algeria. Trace Elements and Their Effects on Human Health and Diseases DOI: 10.5772/INTECHOPEN.95298. IntechOpen. Available from <https://www.intechopen.com/chapters/74448> (accessed March 24, 2022).
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91:453–462. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x> (accessed February 7, 2022).
- LeCorn DW, Vertucci FJ, Rojas MF, Progulske-Fox A, Bélanger M. 2007. In Vitro Activity of Amoxicillin, Clindamycin, Doxycycline, Metronidazole, and Moxifloxacin Against Oral *Actinomyces*. *Journal of Endodontics* 33:557–560. Elsevier. Available from <http://www.jendodon.com/article/S0099239907001008/fulltext> (accessed February 28, 2022).
- Li ZJ, Njateng GSS, He WJ, Zhang HX, Gu JL, Chen SN, Du ZZ. 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the edible aromatic plant *Aristolochia delavayi*. *Chemistry and Biodiversity* 10:2032–2041.
- Maia JGS, Andrade EHA, Zoghbi MDGB. 2000. Volatile Constituents of the Leaves, Fruits and Flowers of Cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* 13:227–232. Academic Press.
- Martinez MCM, Nortier J, Vereerstraeten P, Vanherweghem JL. 2002. Progression rate of Chinese herb nephropathy: impact of *Aristolochia fangchi* ingested dose. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17:408–412. Oxford Academic. Available from <https://academic.oup.com/ndt/article/17/3/408/1807585> (accessed March 24, 2022).
- Masango P. 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production* 13:833–839. Elsevier.
- Mihaylova R, Shkondrov A, Aluani D, Ionkova I, Tzankova V, Krasteva I. 2022. In vitro antitumour and immunomodulating activity of saponins from *Astragalus glycyphyllos*. <http://mc.manuscriptcentral.com/tbeq> 35:1948–1955. Taylor & Francis. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2022.2041485> (accessed March 28, 2022).
- Murillo-Alvarez JI, Encarnación DR, Franzblau SG. 2008. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Some Medicinal Plants from Baja California Sur (Mexico). <http://dx.doi.org/10.1076/phbi.39.6.445.5877> 39:445–449. Taylor & Francis. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1076/phbi.39.6.445.5877> (accessed March 25, 2022).
- Nazzaro F, Fratianni F, de Martino L, Coppola R, de Feo V. 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* 2013, Vol. 6, Pages 1451–1474 6:1451–1474. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Available from <https://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1451/htm> (accessed February 7, 2022).

- Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* **101**:372–378. Elsevier.
- Novy P, Kloucek P, Rondevaldova J, Havlik J, Kourimska L, Kokoska L. 2014. Thymoquinone vapor significantly affects the results of *Staphylococcus aureus* sensitivity tests using the standard broth microdilution method. *Fitoterapia* **94**:102–107. Elsevier.
- Palá-Paúl J, Usano-Aleman J, Soria AC, Pérez-Alonso MJ, Brophy JJ. 2008. Essential oil composition of *Eryngium campestre* L. growing in different soil types. A preliminary study. *Natural Product Communications* **3**:1121–1126. Natural Product Incorporation.
- Pavela R. 2008. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). *Phytotherapy Research* **22**:274–278.
- Perineau F, Ganou L, Vilarem G. 1992. Studying production of lovage essential oils in a hydrodistillation pilot unit equipped with a cohobation system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **53**:165–171. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jctb.280530210> (accessed February 21, 2022).
- Pieroni A, Janiak V, Dürr CM, Lüdeke S, Trachsel E, Heinrich M. 2002. In vitro antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic Albanians in southern Italy. *Phytotherapy Research* **16**:467–473. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.1243> (accessed March 25, 2022).
- Pignatti S, Guarino R, la Rosa M. 2017. *Flora d'Italia*, 2nd Edn, Vol. 1-4. Edagricole. Available from <https://iris.unipa.it/handle/10447/252935> (accessed March 20, 2022).
- Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Chemat F. 2013. CHAPTER 3:Ultrasound-assisted Extraction. *RSC Green Chemistry*:89–112. Royal Society of Chemistry. Available from <https://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849736060-00089/978-1-84973-606-0> (accessed February 22, 2022).
- Politi M, Braca A, Altinier G, Sosa S, ... KN-... L y, 2008 undefined. 2008. Different approaches to study the traditional remedy of 'hierba del canto', *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. *redalyc.org* **7**. Available from <https://www.redalyc.org/pdf/856/85670107.pdf> (accessed March 20, 2022).
- Priestap HA, van Baren CM, Leo Lira P di, Prado HJ, Neugebauer M, Mayer R, Bandoni AL. 2002. Essential oils from aerial parts of *Aristolochia gibertii* Hook. *Flavour and Fragrance Journal* **17**:69–71.
- Priestap HA, van Baren CM, Lira PDL, Coussio JD, Bandoni AL. 2003. Volatile constituents of *Aristolochia* Argentina. *Phytochemistry* **63**:221–225. Elsevier Ltd. Available from www.elsevier.com/locate/phytochem (accessed April 6, 2022).
- Radulovic N, Blagojevic P, Palic R. 2010. Comparative Study of the Leaf Volatiles of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. and *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae). *Molecules* 2010, Vol. 15, Pages 6168-6185 **15**:6168–6185. Molecular Diversity Preservation International. Available from <https://www.mdpi.com/1420-3049/15/9/6168/htm> (accessed April 9, 2022).
- Reverchon E, Senatore F. 1992. Isolation of rosemary oil: Comparison between hydrodistillation and supercritical CO₂ extraction. *Flavour and Fragrance Journal* **7**:227–230. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ffj.2730070411> (accessed February 21, 2022).
- Reyes-Jurado F, Franco-Vega A, Ramírez-Corona N, Palou E, López-Malo A. 2014. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews* 2014 7:3 **7**:275–297. Springer. Available from

- <https://link.springer.com/article/10.1007/s12393-014-9099-2> (accessed February 10, 2022).
- Reyes-Jurado F, Franco-Vega A, Ramírez-Corona N, Palou E, López-Malo A. 2015. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews* **7**:275–297. Springer New York LLC.
- Ribeiro-Santos R, Andrade M, Melo NR de, Sanches-Silva A. 2017. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology* **61**:132–140. Elsevier.
- Ríos JL, Recio MC. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **100**:80–84. Elsevier.
- Ruiz-Matute AI, Rodríguez-Sánchez S, Sanz ML, Soria AC. 2018. Chromatographic Technique: Gas Chromatography (GC). *Modern Techniques for Food Authentication*:415–458. Academic Press.
- Sánchez-González L, Vargas M, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M. 2011. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews* **3**:1–16. Springer. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s12393-010-9031-3> (accessed February 3, 2022).
- Saroglou V, Marin PD, Rancic A, Veljic M, Skaltsa H. 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochemical Systematics and Ecology* **35**:146–152. Pergamon.
- Satta M, Tuberoso CIG, Angioni A, Pirisi FM, Cabras P. 2011. Analysis of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1999.9712002> **11**:711–715. Taylor & Francis Group . Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1999.9712002> (accessed February 7, 2022).
- Seidel V. 2006. Initial and Bulk Extraction. *Natural Products Isolation*:27–46. Humana Press. Available from <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-955-9:27> (accessed March 6, 2022).
- Shellie RA, Marriott PJ. 2003. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry analysis of *Pelargonium graveolens* essential oil using rapid scanning quadrupole mass spectrometry. *Analyst* **128**:879–883. The Royal Society of Chemistry. Available from <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2003/an/b304371a> (accessed April 12, 2022).
- Shkondrov A, Krasteva I, Bucar F, Kunert O, Kondeva-Burdina M, Ionkova I. 2020. A new tetracyclic saponin from *Astragalus glycyphyllos* L. and its neuroprotective and hMAO-B inhibiting activity. *Natural Product Research* **34**:511–517. Taylor and Francis Ltd. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2018.1491040> (accessed March 28, 2022).
- Singh G, Marimuthu P, de Heluani CS, Catalan CAN. 2005. Antioxidant and Biocidal Activities of *Carum nigrum* (Seed) Essential Oil, Oleoresin, and Their Selected Components†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:174–181. American Chemical Society . Available from <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0518610> (accessed April 9, 2022).
- Sivakumar D, Bautista-Baños S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection* **64**:27–37. Elsevier.
- Slavkovska V, Couladis M, Bojovic S, Tzakou O, Pavlovic M, Lakusic B, Jancic R. 2005. Essential oil and its systematic significance in species of *Micromeria* Bentham from Serbia & Montenegro. *Plant Systematics and Evolution* **255**:1–15. Springer.

- Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00606-005-0303-y> (accessed April 9, 2022).
- Soares de Oliveira MA, Melo Coutinho HD, Jardelino de Lacerda Neto L, Castro de Oliveira LC, Bezerra da Cunha FA. 2020. Repellent activity of essential oils against culicids: A review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **18**:100328. Elsevier.
- Stauffer E, Dolan JA, Newman R. 2008. Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*:235–293. Academic Press.
- Thambidurai P, Moorthy K, Punitha T, Vinodhini R, Mickymaray S, Shonga A, Tomass Z, Thajuddin N. 2015. Efficacy of different solvent extracts of *Aristolochia krisagathra* and *Thottea ponmudiana* for potential antimicrobial activity. *Journal of Pharmacy Research* **9**:19–31. Available from www.jprsolutions.info (accessed March 25, 2022).
- Tigrine-Kordjani N, Meklati BY, Chemat F. 2006. Analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the essential oil of *Zygophyllum album* L., an aromatic and medicinal plant growing in Algeria. *International Journal of Aromatherapy* **16**:187–191. No longer published by Elsevier.
- Tiziana Baratta M, Dorman HJD, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JÂG, Ruberto G. (n.d.). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(1998070)13:4.
- Tomaniová M, Hajšlová J, Pavelka J, Kocourek V, Holadová K, Klímová I. 1998. Microwave-assisted solvent extraction — a new method for isolation of polynuclear aromatic hydrocarbons from plants. *Journal of Chromatography A* **827**:21–29. Elsevier.
- Tongnuanchan P, Benjakul S. 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* **79**:R1231–R1249. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1750-3841.12492> (accessed February 8, 2022).
- Tripathi P, Dubey NK, Shukla AK. 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**:39–46. Springer. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-007-9435-2> (accessed January 31, 2022).
- Tzakou O, Said A, Farag A, Rashed K. 2006. Volatile constituents of *Ailanthus excelsa* Roxb. *Flavour and Fragrance Journal* **21**:899–901. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ffj.1739> (accessed April 9, 2022).
- Ultee A, Kets EPW, Smid EJ. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4606–4610. American Society for Microbiology. Available from <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.65.10.4606-4610.1999> (accessed February 7, 2022).
- Vieira RF, Grayer RJ, Paton A, Simon JE. 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**:287–304. Pergamon.
- Wikipedie, 2022. Podražec křovištní. [image] Available at: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Podra%C5%BEec_k%C5%99ovi%C5%A1tn%C3%AD> (accessed 14 April 2022).
- Yamini Y, Khajeh M, Ghasemi E, Mirza M, Javidnia K. 2008. Comparison of essential oil compositions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry* **108**:341–346. Elsevier.
- Yilmaz İskender N, Kahriman N, Tosun G, Terzioğlu S, Karaoğlu ŞA, Yayli N. 2013. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Aerial Parts of *Astragalus hamzaoglu* Extracted by Hydrodistillation and Microwave

- Distillation. *Nat. Prod* **7**:177–183. Available from www.acgpubs.org/RNP (accessed April 10, 2022).
- Yoo HJ, Jwa SK. 2018. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. *Archives of Oral Biology* **88**:42–46. Pergamon.
- Yousefi M, Afshari R, Sadeghi M, Salari R. 2018. Measurement of methanol and ethanol contents in most commonly used herbal distillates produced by three famous brands. *Iranian Journal of Public Health* **47**:901–907. *Iranian Journal of Public Health*.
- Yousefi M, Rahimi-Nasrabadi M, Pourmortazavi SM, Wysokowski M, Jesionowski T, Ehrlich H, Mirsadeghi S. 2019. Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **118**:182–193. Elsevier.
- Yu JQ, Liao ZX, Cai XQ, Lei JC, Zou GL. 2007. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **23**:162–167. Elsevier.
- Zhang QW, Lin LG, Ye WC. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)* **13**:1–26. BioMed Central Ltd. Available from <https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13020-018-0177-x> (accessed February 10, 2022).
- Zhao Y, Li J, Xu Y, Duan H, Fan W, Zhao G. 2008. Extraction, preparation and identification of volatile compounds in Changyu XO Brandy. *Chinese Journal of Chromatography* **26**:212–222. No longer published by Elsevier.
- Zill-E-Huma, Abert-Vian M, Elmaataoui M, Chemat F. 2011. A novel idea in food extraction field: Study of vacuum microwave hydrodiffusion technique for by-products extraction. *Journal of Food Engineering* **105**:351–360. Elsevier.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ATP – Adenosintrifosfát

CFU – Kolonie tvořící jednotku

DEET – N,N-diethyl-3-methylbenzanmidu

FID – Plamenově-ionizační detektor

GC – Plynová chromatografie

GTP – Guanosintrifosfát

MBC – Minimální baktericidní koncentrace

MHB – Müeller-Hinton bujón

MIC – Minimální inhibiční koncentrace

MS – Hmotnostní detektor

PCR – Polymerázová řetězová reakce

RAPD – Náhodná amplifikace polymorfni DNA

SDB – Sabouraud Dextrose bujón

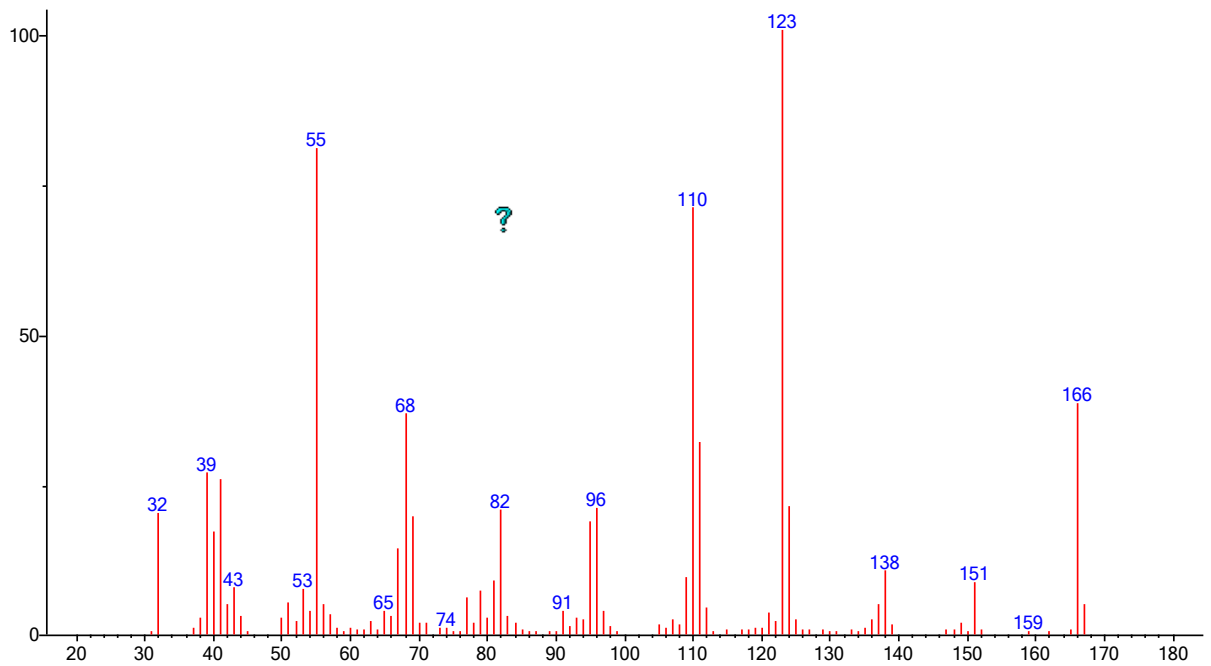
10 Seznam obrázků

Obrázek 1 Příklady chemických sloučenin obsažených v silicích	15
Obrázek 2 Schéma destilace vodní parou (Tongnuanchan & Benjakul 2014)	19
Obrázek 3 Hydrodestilace (Tongnuanchan & Benjakul 2014).....	20
Obrázek 4 Schéma plynové chromatografie (Stauffer et al. 2008).....	23
Obrázek 5 Stanovení minimální inhibiční koncentrace pomocí Etestu (LeCorn et al. 2007) ..	25
Obrázek 6 Mikrotitrační destička (GAMA 2022).....	25
Obrázek 7 Podražec křovištní (<i>Aristolochia clematidis</i> L.) (Wikipedie 2022)	27
Obrázek 8 Chemická struktura kyseliny aristolochové I (AAI) a II (AAII) (Lamari & Negache 2021)	28
Obrázek 9 Hulevník lékařský (<i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop.) (Botany.cz 2022a)	29
Obrázek 10 Kozinec sladkolistý (<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.) (Botany.cz 2022b)	31

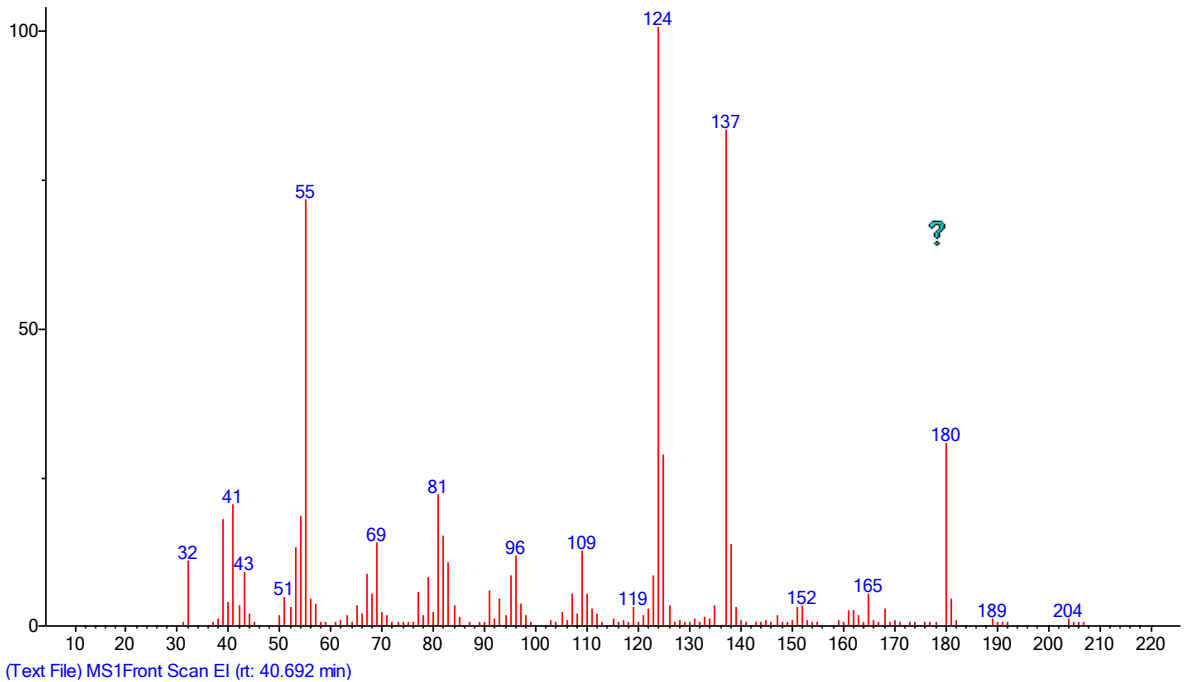
11 Seznam tabulek

Tabulka 1 Druh, datum a lokalita sběru.....	34
Tabulka 2 Ředící řady testů v $\mu\text{g/ml}$	37
Tabulka 3 Schéma mikrotitrační destičky při testování dvou silic.....	38
Tabulka 4 Parametry chemické analýzy	39
Tabulka 5 Hmotnost sušeného materiálu, množství vydestilované silice a výtěžnost	40
Tabulka 6 Hustota silic	40
Tabulka 7 Minimální inhibiční koncentrace (MIC).....	41
Tabulka 8 Chemické složení silic	42

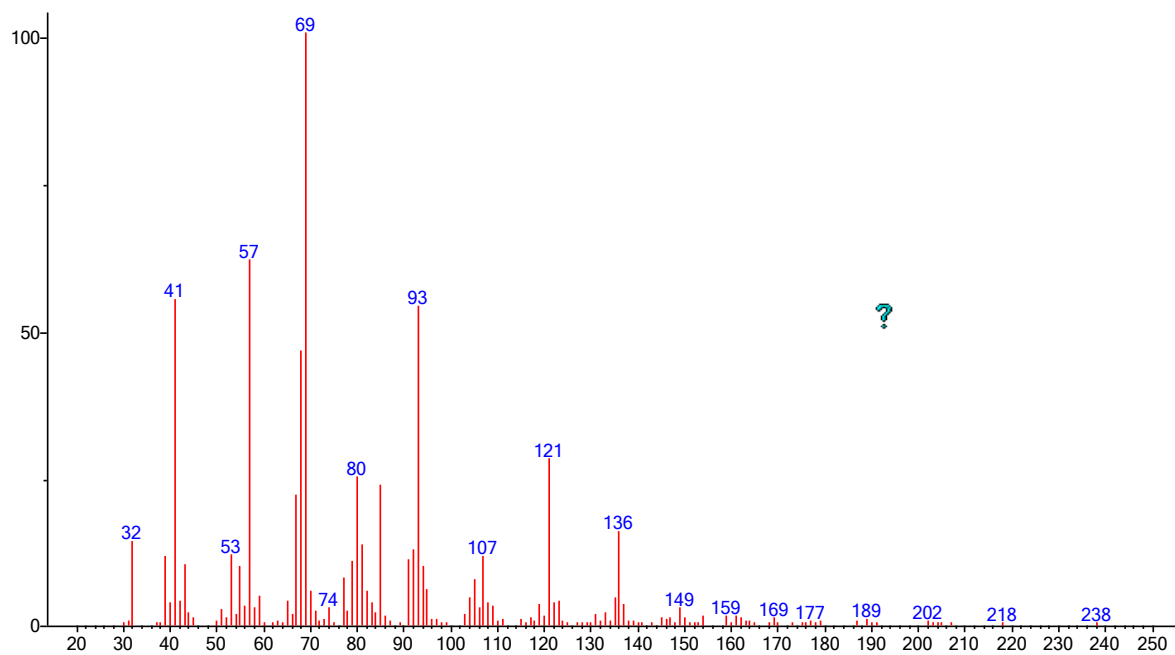
13 Samostatné přílohy



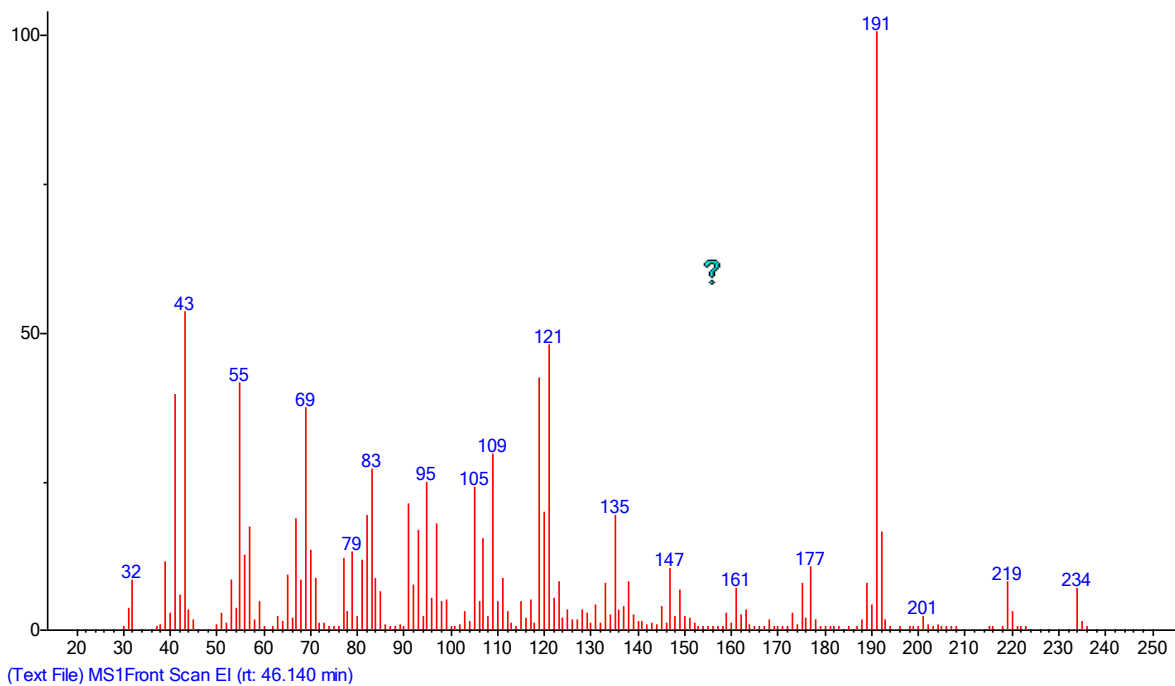
Hmotnostní spektrum 1 Neidentifikovaná látka I - *S. officinale*



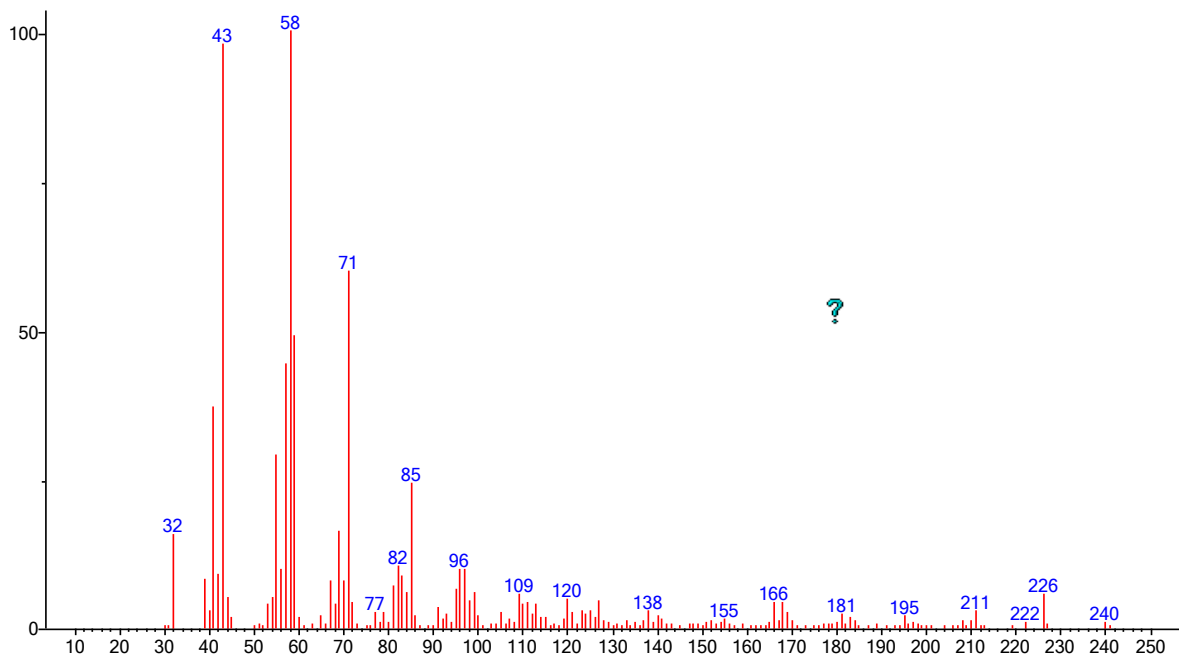
Hmotnostní spektrum 2 Neidentifikovaná látka II - *A. glycyphyllos*



Hmotnostní spektrum 3 Neidentifikovaná látka III - *A. clematitis*

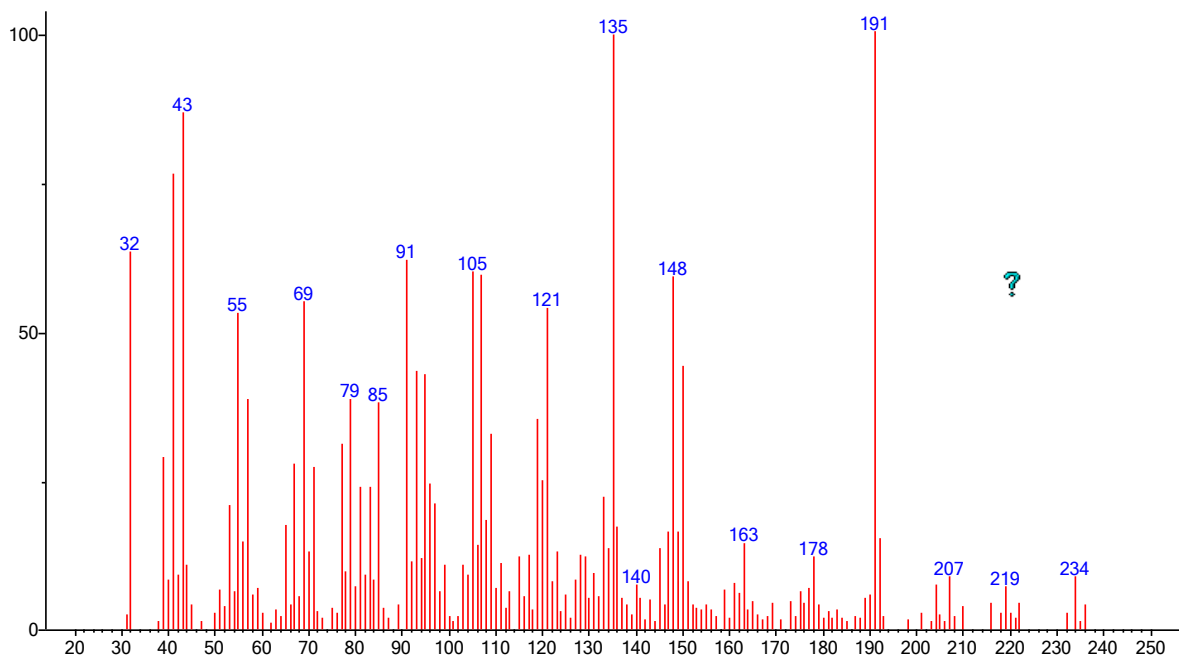


Hmotnostní spektrum 4 Neidentifikovaná látka IV - *A. glycyphyllos*



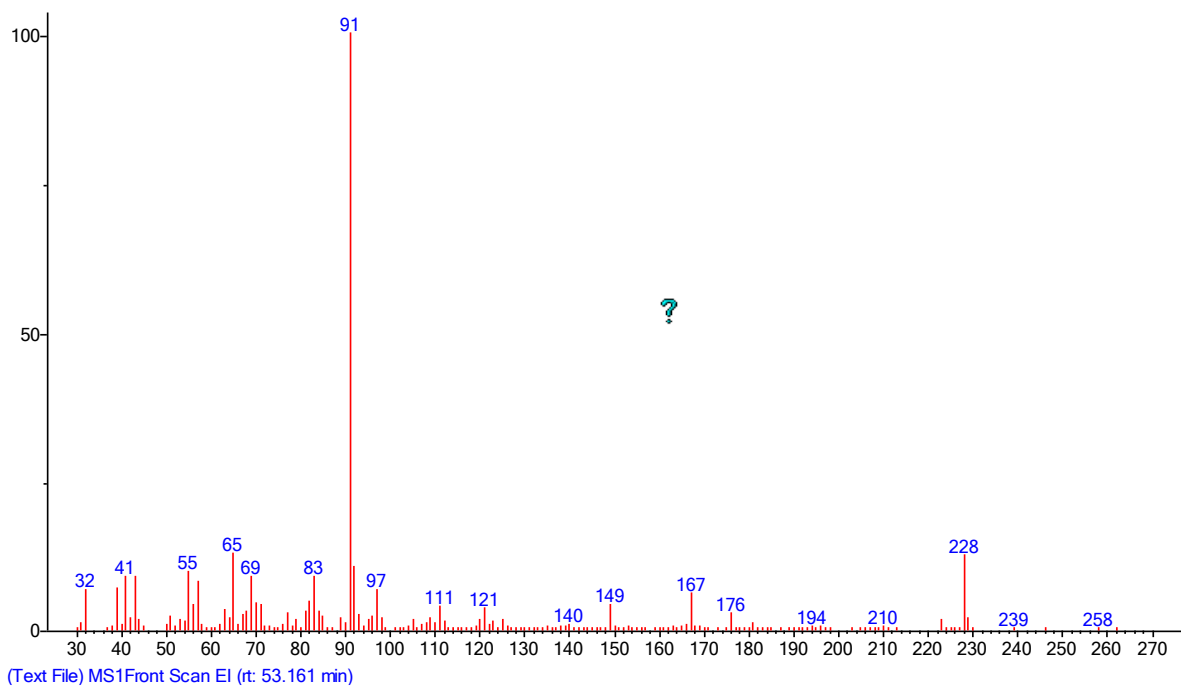
(Text File) MS1Front Scan EI (rt: 46.881 min)

Hmotnostní spektrum 5 Předběžně identifikovaná látka 2-pentadecanol - *A. glycyphyllos*

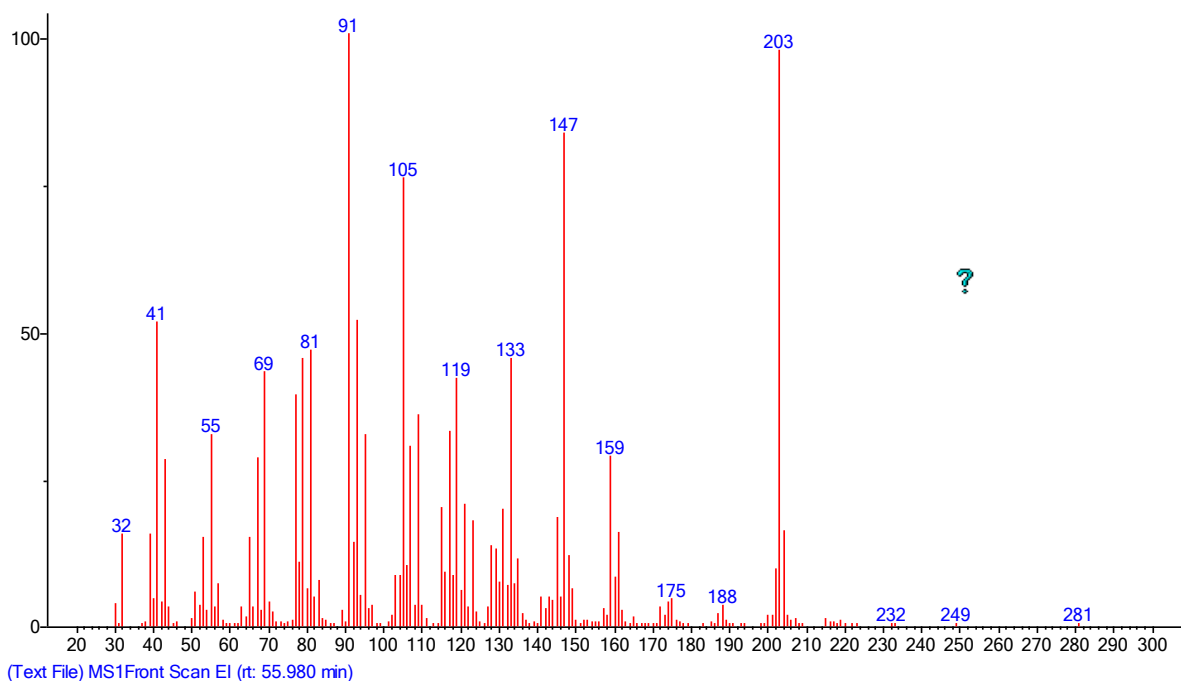


(Text File) MS1Front Scan EI (rt: 47.279 min)

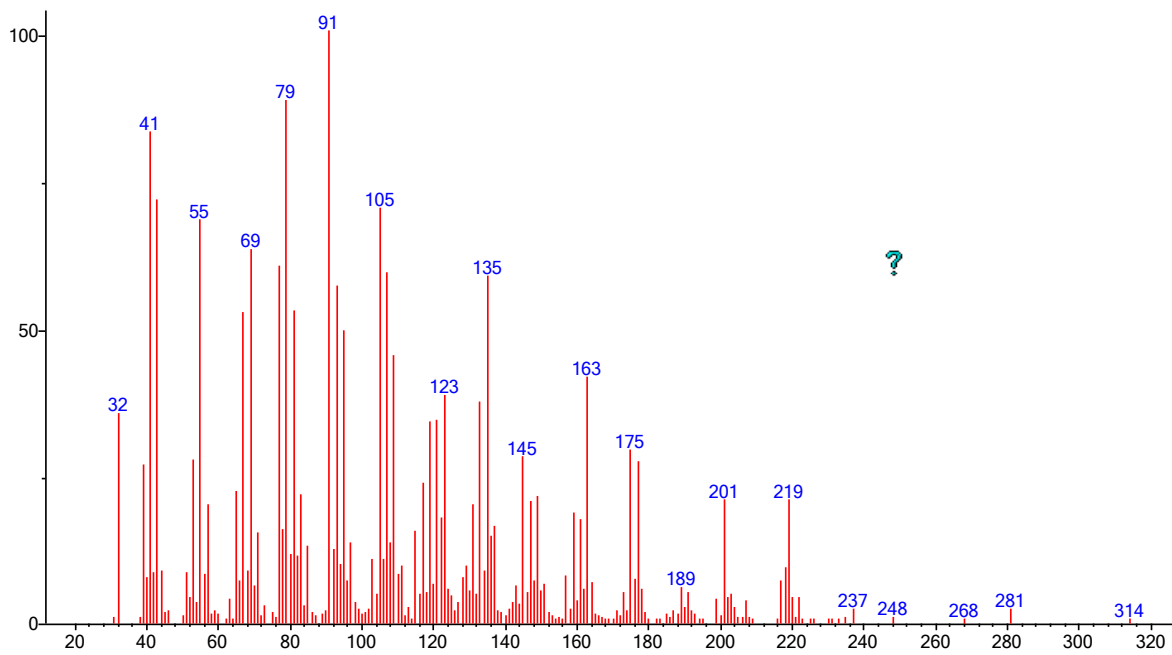
Hmotnostní spektrum 6 Neidentifikovaná látka V - *A. glycyphyllos*



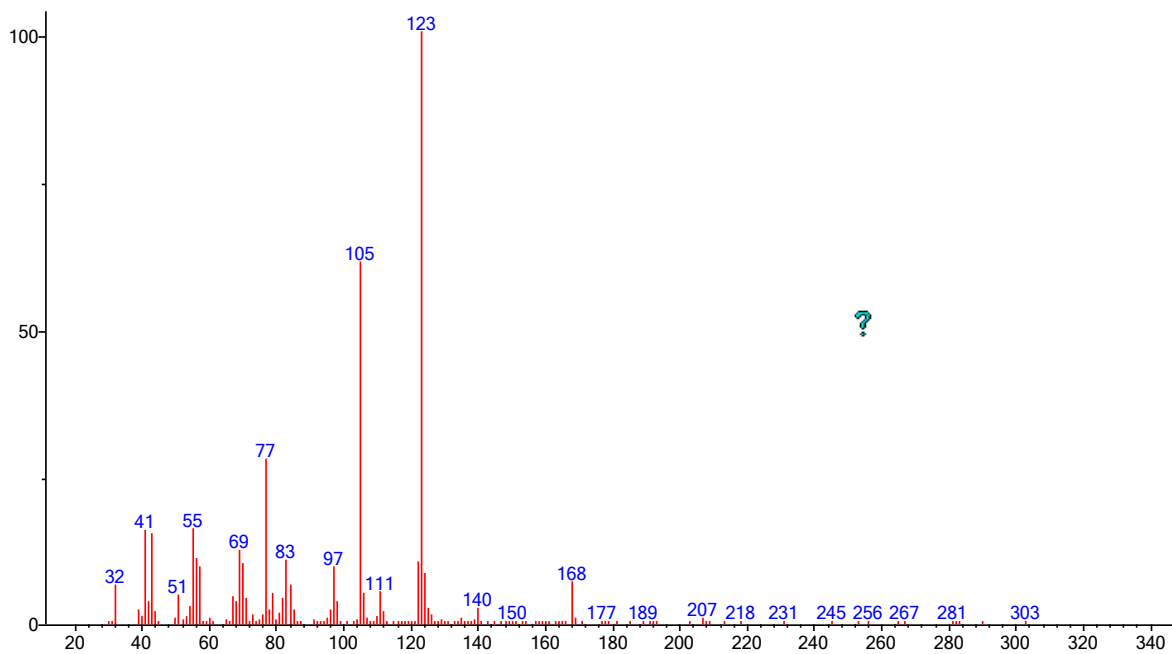
Hmotnostní spektrum 7 Neidentifikovaná látka VI - *A. glycyphyllos*



Hmotnostní spektrum 8 Neidentifikovaná látka VII - *A. clematitis*



Hmotnostní spektrum 9 Neidentifikovaná látka VIII - *A. clematitis*



Hmotnostní spektrum 10 Neidentifikovaná látka IX - *S. officinale*