

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Vysokotlaké extrakce máty peprné

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Edita Zatloukalová

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Pavlína Baizová, Ph.D.

Olomouc 2016

Souhrn

V teoretické části této práce je popsána máta, její původ, výskyt a základní znaky některých jejích druhů. Dále jsou popsány fenolické látky, jejich výskyt, význam a základní rozdělení. Tato část je také věnována vysokotlakým extrakčním technikám a plynové chromatografii, kterými lze analyzovat fenolické látky v rostlinách.

Experimentální část se zabývá porovnáním účinnosti metod čištění extraktů máty od chlorofylu. Dále je porovnán obsah fenolických kyselin v jednotlivých částech máty peprné a srovnán s jinými druhy. Extrakty byly připraveny zrychlenou extrakcí podporovanou tlakem, jako rozpouštědlo byl použit methanol. Vzorby byly analyzovány pomocí plynové chromatografie.

Summary

Theoretical part of this thesis deals with the description of mentha, its origin, occurrence and basic features of some of its species. Afterwards, there is a description of phenols, their occurrence, purpose and basic distribution. This part of the thesis is dedicated also to the description of high pressure extraction methods and gas chromatography. Both of these methods are used for the analyses of the presence of phenols in the plants.

Experimental part compares the efficiency of the methods used for cleaning of mentha extracts from chlorophyll. The presence of phenolic acids in different parts of the plant of mentha piperita (peppermint) is detected and then compared to other species. The extracts are prepared with pressurized solvent extraction with methanol as the solvent. The samples were analysed with gas chromatography.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavlíny Baizové, Ph.D. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že je práce prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

podpis

Chtěla bych poděkovat RNDr. Pavlíně Baizové, Ph.D. za vedení, cenné rady, připomínky, čas, ochotu a obětavost, které mi během mé práce věnovala. Poděkování rovněž patří Doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za jeho pomoc a rady při GC analýze vzorků.

Poděkovat bych také chtěla mé rodině za pochopení, podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

Obsah

1 Úvod	1
2 Teoretická část.....	2
2.1 Máta	2
2.1.1 Máta peprná.....	2
2.1.2 Máta klasnatá.....	3
2.1.3 Máta citrónová.....	3
2.1.4 Máta marocká.....	4
2.2 Fenolické látky.....	4
2.2.1 Základní rozdělení.....	4
2.2.2 Fenolické kyseliny.....	5
2.2.3 Metody stanovení a studia fenolických látek	6
2.3 Vysokotlaké extrakce.....	7
2.3.1 Superkritická fluidní extrakce	7
2.3.2 Zrychlená extrakce rozpouštědlem.....	9
2.4 Plynová chromatografie	11
2.5 Hmotnostní spektrometrie.....	14
3 Experimentální část	16
3.1 Přístrojové vybavení	16
3.2 Chemikálie	16
3.3 Vzorky	17
3.4 Pracovní postup.....	17
3.4.1 Příprava extraktů	17
3.4.2 Stanovení obsahu chlorofylu a účinnosti přečištění.....	18
3.4.3 Příprava roztoků standardů.....	18
3.4.4 SPE extrakce	18
4 Výsledky a diskuze.....	20
4.1 Stanovení obsahu chlorofylu a účinnosti přečištění.....	20
4.2 Stanovení obsahu fenolických kyselin.....	23
4.2.1 SPE extrakce	23
4.2.2 SPE extrakce – vliv kyselého prostředí.....	28
4.2.3 SPE extrakce vzorků máty	29
5 Závěr.....	36

Seznam použité literatury	37
Příloha 1 – Chromatogramy kyselin benzoové a salicylové vzorků listů máty peprné.....	I
Příloha 2 – Chromatogramy kyselin vanilové a <i>p</i> -kumarové vzorků listů máty peprné	II
Příloha 3 – Chromatogramy kyselin 2,4-dihydroxybenzoové a protokatechové vzorků listů máty peprné	III
Příloha 4 – Chromatogramy kyselin syringové a ferulové vzorků listů máty peprné	IV
Příloha 5 – Chromatogramy kyselin gallové a kávové vzorků listů máty peprné.....	V
Příloha 6 – Chromatogramy kyseliny sinapové vzorků listů máty peprné.....	VI

1 Úvod

Máta je oblíbenou bylinkou pro svou svěží vůni, chuť a barvu. Používá se pro přípravu teplých i studených nápojů a pro zpestření jídel. Jedním z nejrozšířenějších druhů je máta peprná, která vznikla křížením z máty klasnaté. Máta má blahodárné účinky na lidský organismus, např. podporuje trávení a pomáhá proti bolestem v krku.

Jednou složkou účinných látek obsažených v mátě jsou fenolické kyseliny, které působí jako antioxidanty, tzn. snižují riziko vzniku rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění. Máta obsahuje především kyselinu kávovou, ferulovou a kumarovou.

Cílem této práce je srovnat účinnost přečištění extraktů mát od chlorofylu vytřepáním do rozpouštědel (diethyletheru, hexanu, dichlormethanu) a použitím extrakčních kolonek. Dalším cílem je zjistit množství fenolických kyselin v listech, stoncích, kořenech a květech máty peprné a srovnat je s obsahem těchto kyselin u jiných druhů mát.

2 Teoretická část

2.1 Máta

Množství druhů máty je nespočetné, všechny patří do čeledi hluchavkovitých. Pravá máta peprná ve středověku ještě neexistovala, poprvé byla nalezena r. 1696 na jednom poli u anglického Mitchamu,^{1,2} na němž se pěstovala máta klasnatá. Jiné druhy máty byly využívány již v antice, lékařsky se využívaly především formy máty klasnaté. Máta byla klasifikována jako hřejivá a vysušující, čímž se podle středověkých představ hodila především k posílení trávení. Její léčebné využití se stále rozšiřovalo, máta byla často doporučována při problémech s dásněmi, ale i při ucpaní jater a sleziny. Jakmile se objevila máta peprná, získala rychle na významu. Zpočátku byla stejně jako máta rolní používána proti žaludečním křečím, nadýmání, bolestem v krku, kašli a zevně při bolestech hlavy a vředech.¹

Botanický název *Mentha* byl odvozen od řecké nymfy Minthe. Bůh podsvětí Hádes podvedl svou manželku Persefonu s krásnou nymfou Minthe. Jeho tchýně, bohyně Demeter, Háda potrestala tím, že krásnou Minthe roztrhala na tisíce kousků. Z každého na jaře vyrostla voňavá máta.²

Máta je kultivovaná v celém světě. Příjemně aromatická bylinka má široké uplatnění při vaření, přípravě osvěžujících nápojů a v léčitelství, kde se sbírají listy několikrát do roka vždy před rozkvetem nebo se sbírá kvetoucí nať. Menthol obsažený v mátě působí chladivě, odstraňuje křeče, podporuje prokrvení, dezinfikuje a snižuje citlivost vůči bolesti. Preventivně lze mátu použít při žlučnickových a jaterních chorobách. Éterický mátový olej pomáhá při bolestech hlavy. Zevně lze máty použít v koupeli při nervových onemocněních, revmatismu a kožních vyrážkách.¹⁻⁴

Máta obsahuje 1 – 2,5 % silic, které jsou složené z alkoholů, tríslovin, hořčin a flavonoidů, fenylylkarbonových kyselin, pentacyklických triterpenů a flavonidů. Jsou to zejména menthol, menthon, methylacetát, cineol, menthofuran, kyselina kávová, kyselina kumarová, kyselina ferulová, kyselina rozmarýnová, apigenin, diametin, luteolin, xanthomikrol a gardenin D a B.^{3,5}

2.1.1 Máta peprná

Máta peprná (*Mentha piperita*) je vypěstovaný kříženec máty vodní a klasnaté, je to vytrvalá rostlina. Má fialové až světle růžové květy uspořádané v dlouhých lichoklasech, listy jsou podélně vejčité, zašpičatělé, na okraji pilovité, s dlouhým řapíkem, křížmostojné, někdy

s červeným nádechem. Lodyha je lysá nebo roztroušeně chlupatá, čtyřhranná. Vyrůstá do výšky 40 – 90 cm. Netvoří semena a množí se postranními výhonky, dělením trsů nebo řízky z výběžků. Celá rostlina silně aromaticky voní a kvete od července do září. Má ráda slunná stanoviště a lehčí, humózní, nevápnité půdy s dostatkem vláhy a vysokým obsahem živin. Pepř v jejím názvu souvisí s ostrou pepřnou chutí.

Účinnost máty pepřné je prokázána při křečovitých potížích v horní části zažívacího ústrojí a ve žlučových cestách, při dráždivém žaludku, příznivě ovlivňuje činnost slinivky břišní, mírně snižuje krevní tlak, pomáhá při onemocněních z nachlazení a zánětech ústní sliznice, uvolňuje nadýmání. Máta pepřná má vyšší obsah mentholu než ostatní druhy mát.^{1–3}

2.1.2 Máta klasnatá

Máta klasnatá (*Mentha spicata*) je zcela mrazuvzdorná vytrvalá bylina. Má jemně nafialovělé drobné květy, které tvoří úzké na bázi přetrhané klasy vyrůstající nad horními lodyžními listy. Korunní lístky mají světle růžovou až fialovou barvu. Lodyha je čtyřhranná. Oddenek může být chlupatý a z většiny je uložen v zemi, výběžky jsou lysé. Vyrůstá do výšky 40 – 50 cm a kvete od července do září. Má ráda sušší, slunné místo s dobře propustnou zemínou. Její aroma je mírné, neagresivní. Může se s ní nahradit bazalka, tzn. hodí se do všech jídel s rajčaty.^{4, 6, 7, 10}



Obr. 1 Máta pepřná¹³



Obr. 2 Máta klasnatá¹⁴

2.1.3 Máta citrónová

Máta citrónová (*Mentha piperita var. citrata*) je vyšlechtěná z máty pepřné. Tvoří menší keříky tmavě zelené barvy, které mohou mít fialové až načervenalé okraje listů nebo vrcholky rostlin. Je hladká, bez chloupků, listy má lesklé, dorůstá do výšky 20 – 80 cm. Malé listy

vyrůstají v létě do koncových oválných květenství ve formě klasu. Má pronikavou citrónovou vůni.^{8,9}

2.1.4 Máta marocká

Máta marocká (*Mentha spicata Maroccan*) pochází ze severní Afriky, má příjemnou sladce mentholovou vůni. Listy jsou na stonku křížmostojné, přisedlé nebo s krátkými řapíky, široké se zoubkovitým okrajem. V arabských zemích je oblíbený povzbuzující zelený čaj s příměsí asi 5 % máty marocké, u nás se prodává pod názvem Tuareg.^{10, 11, 12}



Obr. 3 Máta citrónová¹⁵



Obr. 4 Máta marocká¹⁶

2.2 Fenolické látky

Fenolické látky jsou přírodní antioxidanty, které omezují aktivitu kyslíkových radikálů. V rostlinné říši jsou velmi rozšířené a nachází se ve všech vegetativních částech rostlin, např. kořeny, listy, plody. Obsah fenolických látek se v těchto částech významně liší, záleží také na druhu rostliny, stupni zralosti, době a způsobu skladování. Různé vlastnosti a odlišnosti ve struktuře určují senzorycké vlastnosti. Fenolické látky se používají jako účinné složky léčivých rostlin, snižují riziko rakovinových onemocnění, koronárních chorob a působí proti virům. V řadě fyziologických procesů mají důležitou roli, jako strukturní nebo impregnační látky, signální molekuly a mohou sloužit jako přenašeče elektronů, podílet se na lákání opylovačů nebo chránit rostlinu před UV zářením.¹⁷⁻²²


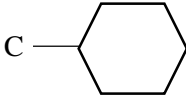
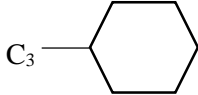
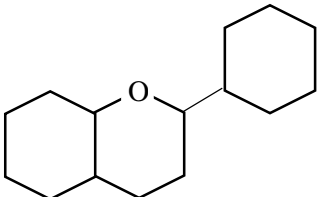
2.2.1 Základní rozdělení

Rostlinné fenolické látky představují pestré skupině organických sloučenin, které mají velmi rozmanitou chemickou strukturu. Základním kritériem je přítomnost volného nebo vázaného fenolového hydroxyly. V rostlinách se fenolické látky vyskytují ve formě monomeru

buď jako volné, nebo vázané se sacharidy. Nejčastěji jsou to sacharidy jednoduché např. hexózy a pentózy, méně pak disacharidy a oligosacharidy. Chemické spojení je ve formě glykosidů, v menší míře může být sacharid vázaný esterově, tato vazba se vyskytuje u fenolkarboxylových sloučenin.¹⁷

Fenolické látky dělíme do čtyř základních skupin, jednoduché fenoly, fenolkarboxylové kyseliny, fenypropanoidy a flavonoidy. Jednoduché fenoly obsahují ve své struktuře cyklický C₆ řetězec, který bývá často substituován methylovými skupinami. Tyto látky se v rostlinné říši příliš nevyskytují, typickým zástupcem je hydrochinon. Fenolkarboxylové kyseliny obsahují ve své struktuře skelet C₆-C₁, patří sem deriváty kyseliny benzoové. Tyto látky se v rostlinách vyskytují poměrně běžně, často jako třísloviny. Fenypropanoidy mají ve své struktuře aromatický C₆ kruh s navázaným C₃ řetězcem. Do této skupiny řadíme např. deriváty kyseliny skořicové, kumariny a polymerní lignin. Flavonoidy mají základní strukturu odvozenou od heterocyklického flavonu, která je složena ze dvou částí, první je řetězec C₆-C₃ a druhou je cyklický C₆ řetězec s navázaným atomem kyslíku. K flavonoidům patří anthokyany, flavon a flavonoly. V rostlinách jsou tyto látky velice rozšířené.^{20, 21, 23}

Tab. 1: Uhlíkaté skelety základních skupin fenolických látek²⁰

Skupina	Uhlíkatý skelet
Jednoduché fenoly	
Fenolkarboxylové kyseliny	
Fenypropanoidy	
Flavonoidy	

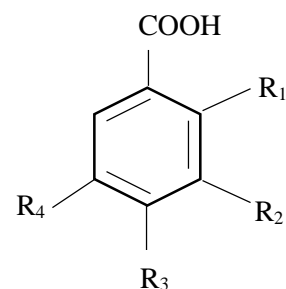
2.2.2 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny hrají v rostlinné říši důležitou roli, chrání rostlinu před chorobami a působí jako bakteriostatika a fungicidy. Patří sem kyseliny, které jsou odvozené od kyselin

benzoové (fenolkarboxylové kyseliny) a skořicové (fenylpropanoidy). Kvůli násobné vazbě v C₃ řetězci mohou látky odvozené od kyseliny skořicové existovat jako *cis*- a *trans*-izomery. Tyto látky se v rostlinách vyskytují převážně v *trans*-formě, působením UV záření mohou přejít na *cis*-formu.^{18, 21} Mezi deriváty kyseliny benzoové patří např. kyselina gallová, vanilová a syringová. Ke skořicovým kyselinám řadíme např. kyselinu kávovou, kumarovou a ferulovou.²²

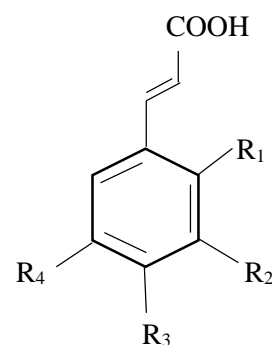
Tab. 2: Struktura některých derivátů kyseliny benzoové

Název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Protokatechová	H	H	OH	OH
Gallová	H	OH	OH	OH
Salicylová	OH	H	H	H
Vanilová	H	OCH ₃	OH	H
Syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃



Tab. 3: Struktura některých derivátů kyseliny skořicové

Název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Kávová	H	OH	OH	H
<i>o</i> -Kumarová	OH	H	H	H
<i>m</i> -Kumarová	H	OH	H	H
<i>p</i> -Kumarová	H	H	OH	H
Ferulová	H	OCH ₃	OH	H
Sinapová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃



2.2.3 Metody stanovení a studia fenolických látek

Vzorové postupy se mohou lišit vzhledem k velkému množství fenolických látek a s ohledem na polaritu, kyselost, počet aromatických kruhů a hydroxylových skupin, koncentraci a složitost matrice. Fenolické látky se vyskytují ve třech základních typech matric, v potravinách, rostlinách a kapalných vzorcích. Příprava vzorku má velký význam pro spolehlivost analýzy. Obecně platí, že pevné vzorky se vysuší, pomelou a homogenizují, kapalné se zfiltrují nebo odstředí a poté se rovnou vstříkují do separačního systému, nebo jsou analyty izolovány pomocí dalších technik.

Pro rostlinné materiály je hlavním krokem izolace extrakce, nejčastěji se používají extrakce kapalina-kapalina a kapalina-pevná látka, pro čisté extrakty lze použít i superkritickou

fluidní extrakci. Tyto metody jsou jednoduché, účinné a univerzální. Běžně používaná extrakční rozpouštědla jsou alkoholy (methanol, ethanol), ethylacetát, aceton a diethylether, pro velmi polární kyseliny se používají směsi aceton-voda nebo alkohol-voda. K odstranění nežádoucích nepolárních látek jako jsou vosky, tuky, chlorofyl aj., je vhodná extrakce s méně polárním rozpouštědlem např. chloroformem, hexanem, dichlormethanem a benzenem. Použit lze také kolonky SPE s C₁₈ sorbentem.

Fenolické látky můžeme stanovit např. chromatografií na tenké vrstvě, plynovou chromatografií, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, kapilární elektroforézou a spektrofotometrií.²⁴

2.3 Vysokotlaké extrakce

Extrakce je metoda, kterou se získávají látky z různých především přírodních materiálů. Jedná se o separační metodu, kde sledovaná látka přechází z jedné složky (pevné, kapalné, plynné) do druhé (pevné, kapalné). Z pohledu fyzikální chemie se jedná o přechod složky mezi fázovým rozhraním dvou nemísitelných kapalin, v širším analytickém pohledu jsou však jako extrakce pojmenovány i mnohé další metody, kde je složka převáděna mezi fázovým rozhraním, i když principiálně jde např. o adsorpci nebo absorpci.

Přechod částice mezi fázemi je způsoben interakcemi mezi molekulami rozpouštědla a molekulami rozpuštěné látky. Volbou rozpouštědla můžeme ovlivnit selektivitu, která je dána silami působícími při rozpouštění.

V dnešní době je snaha nahradit klasické extrakční techniky, jako je extrakce v Soxhletově extraktoru, extrakce ultrazvukem nebo vytřepávací extrakční technika, novými technikami, mezi které řadíme zejména extrakci a mikroextrakci pevnou fází a nadkritickou fluidní extrakci. Jejich cílem je snížit množství rozpouštědla, dobu extrakce a minimalizovat produkci odpadu.^{25–28}

2.3.1 Superkritická fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce (Supercritical Fluid Extraction – SFE) je účinná izolační metoda, která eliminovala některé nedostatky kapalinové extrakce kapalin a pevných látek.²⁹ Využívá vlastností superkritických tekutin (SCF), tj. tekutin, které mají teplotu a tlak vyšší, než je jejich kritická teplota T_c a kritický tlak p_c .³⁰ Tyto vlastnosti jsou vhodné pro extrakci nepolárních organických látek z tuhých matric, např. k oddělení éterických olejů a jejich derivátů, a produkují vysoce kvalitní esenciální oleje.³¹

Nejčastěji se jako rozpouštědlo používá oxid uhličitý, který je netoxický, nehořlavý, snadno dostupný v přijatelné čistotě i ceně, málo reaktivní a snadno se u něj dosahuje kritických hodnot (31,3 °C; 7,43 MPa).³⁰ Změnami teploty a tlaku v extraktoru lze měnit jeho rozpouštěcí sílu a řídit tak selektivitu extrakce.²⁵ Jeho jedinou nevýhodou je nepolární povaha a z toho vyplývající nedostatečná solvatační schopnost při extrakci polárních analytů.²⁸ Tento problém se dá vyřešit přidavkem vhodné polární látky – modifikátoru (např.: methanol, ethanol, aceton, acetonitril apod.).³⁰ Modifikátor se přidává statickou nebo dynamickou metodou. U statické metody se modifikátor přidá na počátku extrakce přímo do patrony se vzorkem. V případě dynamického provedení se modifikátor přivádí ke vzorku kontinuálně, současně se superkritickým oxidem uhličitým, takže je jeho koncentrace během celého procesu konstantní.

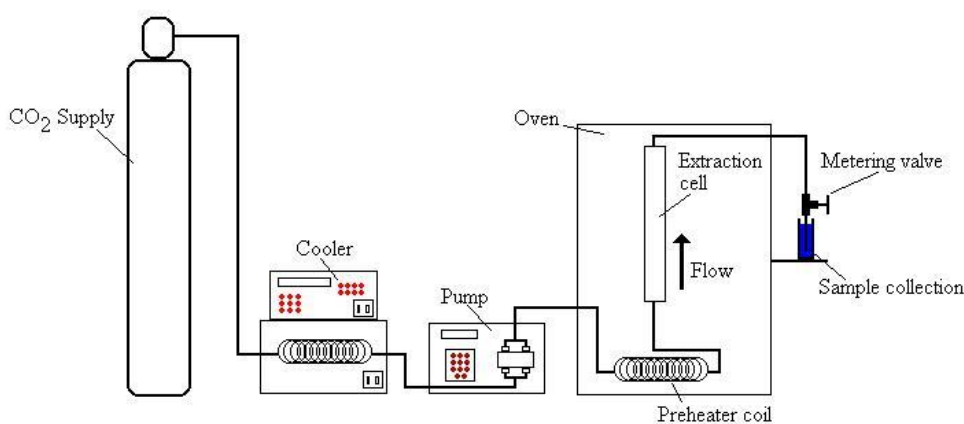
Pro extrakci polárních látek se používají superkritické tekutiny s vysokou solvatační schopností, jako je oxid dusný, amoniak a methanol. Jejich použití je však omezeno některými negativními vlastnostmi, např. superkritický amoniak je vhodným rozpouštědlem polárních analytů, ale obtížně se čerpá, je silně korozivní, chemicky reaktivní a nebezpečný pro běžné použití. Superkritický methanol má zase vysokou kritickou teplotu ($T_C = 240\text{ °C}$).²⁸

Tab. 4: Kritické parametry nejčastěji používaných superkritických tekutin^{28, 32}

Tekutina	T_C [°C]	p_C [MPa]
CO ₂	31	7,4
N ₂ O	36	7,2
NH ₃	132	11,2
Methanol	240	7,8
CClF ₃	29	3,8
Ethan	32	4,8
Ethylen	10	5,1
Ethanol	240	6,1
Aceton	235	4,6

Systém SFE obsahuje čerpadlo, oxid uhličitý, tlakové cely naplněné vzorkem a prostředky pro udržení tlaku v systému a sběrných nádobkách. Kapalina je čerpána do vyhřívané zóny, následně přechází do extrakční nádoby, kde prostupuje do pevné matrice a cílových analytů, které mají být extrahovány. Rozpuštěné složky jsou za nižšího tlaku přeneseny z extrakční cely do separátoru. Oxid uhličitý se poté ochladí, stlačí a recykluje, nebo je vypuštěn do atmosféry.³¹

Záchyt analytu lze provést dvojím způsobem, off-line nebo on-line. Při off-line provedení, tj. bez přímého spojení s analytickou jednotkou, je analyt zachycen v záchytné jednotce a poté zvlášť analyzován vhodnou metodou. U provedení on-line, tj. v přímém spojení s analytickou jednotkou, je extraktor přímo připojen k přístroji, který provádí analýzu. Výhodou tohoto provedení je, že odpadá manipulace s extraktem, což významně omezí ztráty a zvýší citlivost metody. Zařízení je možné přímo spojit například s plynovou chromatografií (SFE - GC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (SFE – HPLC) nebo superkritickou fluidní chromatografií (SFE – SFC).^{25, 28}



Obr. 5 Schématický diagram systému SFE³³

2.3.2 Zrychlená extrakce rozpouštědlem

Pro metodu zrychlené extrakce rozpouštědlem (Accelerated Solvent Extraction – ASE) se používá mnoho názvů a zkratk, nejpoužívanější jsou zrychlená extrakce podporovaná tlakem (Pressurized Solvent Extraction – PSE), fluidní extrakce podporovaná tlakem (Pressurized Fluid Extraction – PFE), vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (High-pressure Solvent Extraction – HPSE) a kapalinová extrakce podporovaná tlakem (Pressurized Liquid Extraction – PLE).^{34, 35}

Jedná se o extrakci tuhých matric organickým rozpouštědlem za zvýšené teploty (50 – 200 °C), která je nad bodem varu rozpouštědla, a vysokého tlaku (10 – 15 MPa).

Optimalizací některých parametrů se může vytvořit vhodná extrakční metoda pro sledovaný analyt z daného materiálu. Lze optimalizovat tyto parametry: teplota, tlak, typ, objem a průtok rozpouštědla, množství a skladba vzorku, extrakční doba a počet cyklů.³⁶

Vyšší teplota způsobuje lepší pronikavost extrakčního rozpouštědla a také vyšší difúzi a desorpční rychlost analytu z matrice do rozpouštědla (např. při změně teploty z 50 °C na

150 °C se desorpční rychlost zvýší téměř 13krát), klesá také viskozita a povrchové napětí rozpouštědla. Tyto změny zlepšují kontakt analytu s rozpouštědlem a způsobují rychlejší průběh než klasické extrakce.^{28, 36, 37, 38}

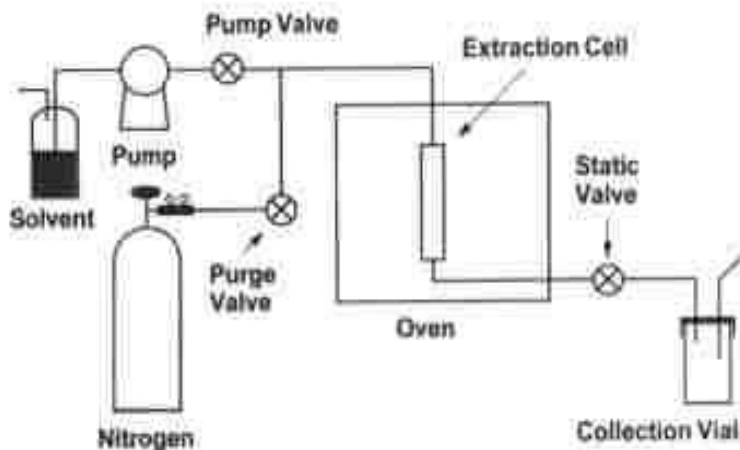
Mnoho organických rozpouštědel má nízkou teplotu varu, což je jedno z omezení klasických extrakčních technik. Vyšší tlak tedy udržuje rozpouštědlo v kapalném stavu a také jej zatlačuje do pórů matrice.³⁸

Pro PSE se používá celá řada rozpouštědel, často jsou to i ty, které nemají účinnost při běžných extrakčních metodách.²⁸ Extrakční rozpouštědlo musí být schopné rozpustit sledované analyty a zároveň minimalizovat koextrakci dalších látek z matrice vzorku. Také je vhodné, aby rozpouštědlo bylo co nejvíce slučitelné s rozpouštědly používanými v pozdějších krocích (čištění, zkoncentrování analytu).

Analyzované vzorky potřebují často před vlastní extrakcí upravit. Jedním z kroků je prosetí nebo rozemletí vzorku, čím budou menší jednotlivé části vzorku, tím snadněji se budou extrahovat do rozpouštědla. Dalším krokem je sušení vzorku, protože jakákoli vlhkost vzorku může snížit účinnost extrakce. Obvykle se provádí přidavkem látky zachycující vlhkost (např.: síran sodný, infuzoriová hlínka, celulóza a písek), jinou možností je použití vakuové pece, sublimačního sušení nebo lyofylizace.³⁶

PSE má menší spotřebu rozpouštědel, její výtěžnost je srovnatelná se Soxhletovou metodou, ale opakovatelnost je větší.³⁷ Obvykle se dosáhne větší výtěžnosti, pokud se použije kratší doba extrakce a několik cyklů, v porovnání s dlouhou dobou extrakce a jednoho cyklu.³⁹

PSE se provádí ve statickém nebo dynamickém modu. Většina aplikací používá statického modu, kdy se vzorek vloží do extrakční cely z nerezové oceli, do které se následně přičerpá rozpouštědlo o stanovené teplotě a tlaku. Tyto podmínky se udržují konstantní několik minut, aby se všechny analyty uvolnily do rozpouštědla. Po uplynutí stanovené doby následuje vypuštění extrakčního rozpouštědla do sběrné vialky, propláchnutí systému malým množstvím rozpouštědla a pročištění inertním plynem (nejčastěji dusíkem). Celý proces trvá 15 – 20 minut. V dynamickém modu proudí rozpouštědlo o dané teplotě, tlaku a průtoku kontinuálně přes vzorek po stanovenou dobu.^{36, 40}



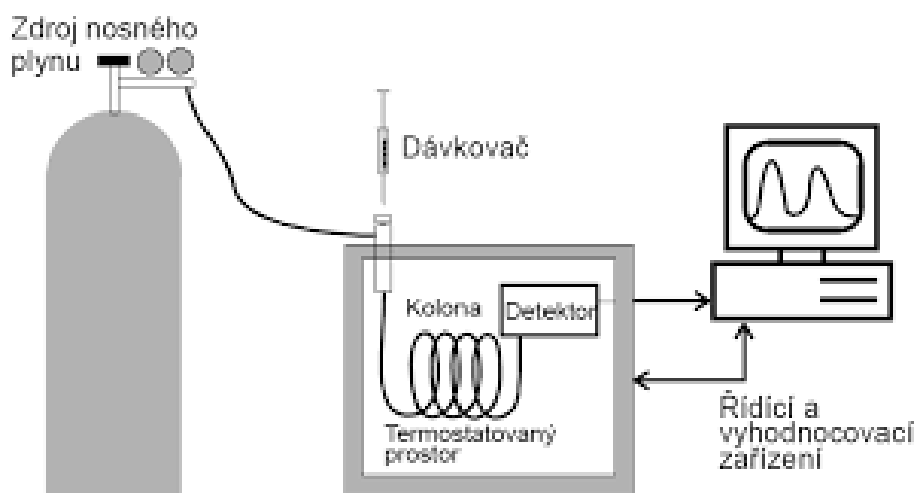
Obr. 6 Schématický diagram systému PSE⁴¹

2.4 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (Gas chromatography – GC) je analytická separační metoda, která má výsadní postavení v analýze těkavých látek. Lze analyzovat látky od nejlehčích plynů až po homologické polymery, buňky či viry s přihlédnutím k izotopové, izomerní, chirální nebo iontové povaze, tvaru a velikosti.⁴²

Složky směsi se dělí mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, stacionární (nepohyblivou) a mobilní (proudící), na základě jejich rozdílné afinity. V plynové chromatografii je mobilní fází plyn, nejčastěji se používají dusík, vodík, argon a helium. Stacionární fází je kapalná (plynová rozdělovací chromatografie – GLC) nebo pevná látka (plynová adsorpční chromatografie – GSC).^{43, 44}

Z tlakové lahve je odebírán nosný plyn, který po průchodu regulátory toku a průtoku přichází do nástřikové komory, která je vyhřívána, aby byl vzorek ihned zplyněn. Vzorek se nastříkne do nástřikové komory (injektoru), která je umístěna v termostatu, tam se odpaří a je unášen pohybem mobilní fáze do kolony. Složky vzorku se sorbují na stacionární fázi na začátku kolony, poté jsou desorbovány čerstvým nosným plynem a unášeny mezi částicemi stacionární fáze. Tento proces se stále opakuje. K postupné separaci dochází díky zadržetí složek směsi na stacionární fázi, tzn., že každá složka prostupuje jinou rychlostí. Složky postupně vycházejí z kolony a vstupují do detektoru, ten stanovuje okamžitou koncentraci látek v nosném plynu. Signál z detektoru vede přes zesilovač, je registrován zapisovačem a zpracován integrátorem. Výsledný grafický záznam se nazývá chromatograf a znázorňuje závislost signálu detektoru na čase.^{25, 45}



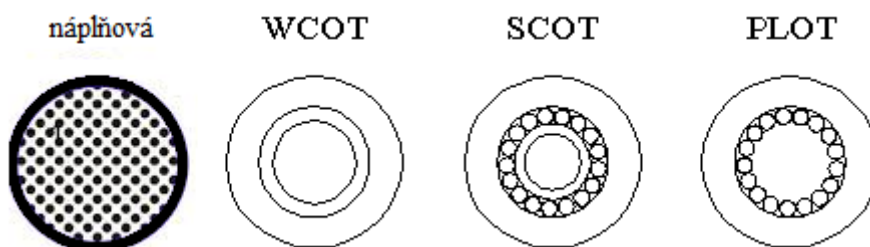
Obr. 7 Schéma plynového chromatografu⁴⁶

Nosný plyn nemá přímý vliv na separaci. Jeho úkolem je unášet vzorek kolonou a jeho druh je určen potřebou inertního chování vůči složkám vzorku. Při výběru hraje také roli potřeba netoxicity, cena, bezpečnost práce, ale také druh kolony a detektoru.

Regulátor toku a průtoku zajišťuje stálý nebo programově měnící se průtok nosného plynu. Stanoveného průtoku lze docílit i při teplotních změnách během separace.

Vzorky se nastříkují pomocí injekčních stříkaček, které mají objem 0,1 – 10 μl , přes septum. Plynné vzorky se nastříkují plynotěsnými injekčními stříkačkami, nebo obtokovými dávkovacími kohouty. Aby se zabránilo kondenzaci vzorku, musí být teplota dávkovače minimálně o 50 $^{\circ}\text{C}$ vyšší, než je bod varu nejméně těkavé složky vzorku. Základní metodou je nástřik do kolony (*on column*). U náplňových kolon se dávkuje 1 – 10 μl , u kapilárních kolon od průměru 0,25 mm se používají jemné nástřikovací jehly pro objem vzorku 0,2 – 2 μl . Vzorek se rychle nastříkne a na stěně kolony vytvoří kapalný film. Aby došlo k jeho odpaření, tak se po 30 – 60 s prudce zvýší teplota kolony. Další možností je nástřik pomocí děliče toku (*split injection*) vhodný pro tenčí kapilární kolony, které mají malou kapacitu, a koncentrované vzorky. Z nastřikovaného množství se tak do kolony dostane jen definovaný zlomek (0,1 – 10 %) často v rozmezí 0,1 – 2 μl . Nástřik bez děliče toku (*splitless injection*) je vhodný pro větší objemy (0,5 – 5 μl) vzorků stopové analýzy. Do odpařovací trubice se vzorek dávkuje pomalu a nechá se odpařovat asi 60 s, poté se opláchne septum. Použitím rozpouštědla, které má vyšší teplotu varu a které kondenzuje v hlavě kolony a vytváří v ní kapalný film, se zabrání rozšiřování zón způsobené dlouhou dobou vstupování vzorku. V rozpouštědle jsou zachyceny analyty, poté se provede oplach septa a zvýší se teplota kolony. Tato metoda se nazývá Grobova.

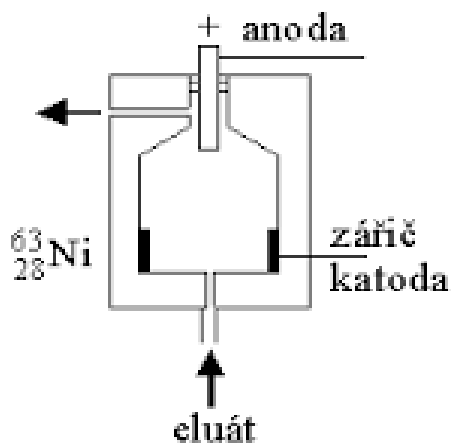
Separace složek nastává v koloně. V plynové chromatografii se používají dva druhy, náplňové a kapilární. Náplňové kolony jsou ocelové nebo skleněné trubice stočené do spirály s vnitřním průměrem 2 – 4 mm a délkou 1 – 6 m, vyšší účinnosti separace při stejné délce lze dosáhnout použitím mikronáplňové kolony, částice náplně mají průměr 10 μm a méně. Kapilární kolony se vyrábí z taveného křemene s vnitřním průměrem 0,1 – 0,6 mm, tloušťkou stacionární fáze 0,25 – 5 μm a délkou 15 – 60 m, pro zvýšení mechanické odolnosti jsou potaženy polyimidem. Rozlišují se tři typy kapilárních kolon podle uložení mobilní fáze. WCOT (Wall Coated Open Tubular) kolony mají mobilní fázi přímo na vnitřním povrchu kapiláry. Kolony SCOT (Support Coated Open Tubular) a PLOT (Porous Layer Open Tubular) mají vnitřní povrch kapiláry pokryt vrstvičkou sorbentu nebo porézního materiálu se zachycenou mobilní fází.^{25, 47}



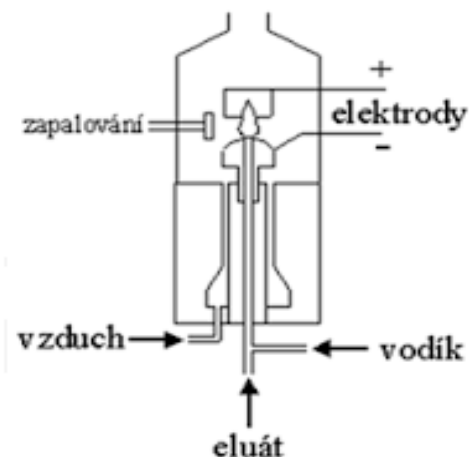
Obr. 8 Průřezy náplňové a kapilárních kolon^{48, 49}

Sledovaná vlastnost plynu vycházejícího z kolony musí záviset na druhu a koncentraci složek, odezva detektoru by měla být lineární funkce obsahu analytu. Detektor musí mít nízké detekční limity a vysokou selektivitu pro stanovované analyty. Detektory se dělí na selektivní, např. detektor elektronového záchytu, a univerzální, např. plamenově ionizační detektor nebo hmotnostní spektrometr. V měrné cele detektoru elektronového záchytu (Electron Capture Detector – ECD) je umístěna fólie s β -zářičem, nejčastěji izotopem ^{63}Ni , který emituje rychlé elektrony. Tyto elektrony ionizují nosný plyn a vznikají pomalé elektrony. Mezi anodou, tj. stěnou detektoru, a katodou prochází díky pomalým elektronům elektrický proud. Analyt vystupující z kolony zachycuje tyto pomalé elektrony a tím snižuje procházející proud. Tento detektor je vhodný pro organické látky s elektronegativními funkčními skupinami, např. pro halogeny a nitroskupiny, málo citlivý je pak pro alkoholy, aminy a uhlovodíky. Plamenově ionizační detektor (Flame Ionization Detector – FID) je tvořen uzemněným hořákem, kde je spalována směs vzduchu a vodíku a kam je přiváděn i plyn z kolony. Naproti němu je umístěna kovová elektroda, na kterou je vloženo napětí (asi 300 V). Pokud plamenem prochází pouze

nosný plyn, je počet vzniklých nabitých částic zanedbatelný a proud, který vzniká mezi elektrodou a hořákem je nízký. Přítomnost analytu zvýší ionizaci a tím se zvýší i vodivost prostředí. Tento detektor poskytuje odezvu na většinu organických látek, není vhodný pro anorganické látky.^{25, 47}



Obr. 9 Schéma ECD detektoru⁵⁰



Obr. 10 Schéma FID detektoru⁵⁰

Analyzují-li se málo těkavé látky, je potřeba je před nadávkováním derivatizovat, tzn. převést na těkavé látky. Reakce analytu s vhodným derivatizačním činidlem musí probíhat s přesnou stereochemií, rychle, kvantitativně a výsledný produkt musí být stabilní. Je dobré, když dané derivatizační činidlo specificky reaguje s danou skupinou látek.⁴⁷

Plynová chromatografie ovlivňuje chemický výzkum v oblasti chemie, biologie a medicíny. Pomáhá řešit řadu problémů v oblasti ochrany životního prostředí, čistoty a metabolizace léčiv, kontroly jakosti potravin, řeší některé otázky kriminalistiky, vesmírného programu a řídí některé chemické výroby.⁴²

2.5 Hmotnostní spektrometrie

V hmotnostní spektrometrii (Mass Spectrometry – MS) jsou analyzované látky ionizovány a rozštěpeny na fragmenty, které se liší poměrem hmotnosti a náboje m/z . Pro danou látku jsou charakteristické vzniklé fragmenty a jejich zastoupení. Během ionizace molekuly obvykle dochází k ionizaci molekuly a vzniku molekulárního iontu o jednotkovém náboji a rozpadu molekulárního iontu na fragmentový ion a elektroneutrální částici.

Procesy v hmotnostním spektrometru probíhají ve vysokém vakuu ($10^{-4} - 10^{-8}$ Pa), aby mezi vzniklými ionty nedocházelo k vzájemným reakcím. Vzorek je vnášen do zdroje iontů,

kde je zplyněn a ionizován. Vzniklé fragmenty jsou urychleny elektrickým polem, rychlost fragmentů závisí na jejich poměru m/z . Po průchodu hmotnostním analyzátozem dopadají postupně jednotlivé fragmenty na detektor. Závislost relativní intenzity iontového proudu na poměru m/z se nazývá hmotnostní spektrum.

Kombinace plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem patří dnes k nejprogresivnějším analytickým metodám.^{25, 47, 51}

3 Experimentální část

3.1 Přístrojové vybavení

- Vysokotlaký extraktor *one* PSE, Applied Separations Inc., Allentown, PA, USA
- Centrifuga HETTICH EBA 20
- UV/Vis spektrometr Lambda 25, PerkinElmer, USA – řízený počítačem s programem Wavelength, verze 2.85.04., VERKON, Brandýs nad Labem – Stará Boleslav, Česká republika
- Ultrazvuková lázeň K-10LM, Kraitex, Podhájská, Slovenská republika
- Laboratorní třepačka Heidolph Vibramax 100, VERKON, Brandýs nad Labem – Stará Boleslav, Česká republika
- Kolonky Strata SPE C18 – E, Phenomenex, Torrance, Kalifornie, USA
- Kolonky ISOLUTE SLE+, Biotage, Uppsala, Švédsko
- Plynový chromatograf Agilent 6890 s hmotnostním detektorem 5973N, Agilent, Palo Alto, USA, nosný plyn – Helium, rychlost průtoku 0,9 ml/min (50 °C – 2 min – 10 °C/min – 300 °C – 15 min), nástřik – 1 µl vzorku (280 °C), dávkovací puls – 12 s, 140 kPa, rozsah měření 29 – 520 m/z

3.2 Chemikálie

- Methylalkohol p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Diethylether p.a., BC Chemservis, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika
- Hexan p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika
- Dichlormethan p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Pyridin p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Silylační činidlo *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA), Buchs, Švýcarská konfederace
- Standardy fenolických kyselin:
 - kyselina ferulová, Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
 - kyselina kávová, Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
 - kyselina syringová, Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
 - kyselina sinapová, Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
 - kyselina vanilová, Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika

kyselina gallová, Lachema, Brno, Česká republika

kyselina protokatechová, Dr. Theodor Schuchardt

kyselina 2,4-dihydroxybenzoová, Hopkin and Williams, Swansea, UK

kyselina *p*-kumarová, Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika

kyselina benzoová, Lach-Ner, Neratovice, Česká republika

kyselina salicylová, PENTA, Chrudim, Česká republika

- Kyselina trifluoroctová p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika

3.3 Vzorky

- Máta klasnatá (list, stonek, kořen), pěstovaná v Olomouci, sběr srpen 2015, sušená na vzduchu
- Máta peprná (list, stonek, kořen, květ), pěstovaná v Olomouci – Droždíně, sběr srpen 2015, sušená na vzduchu
- Máta citrónová (list, stonek), pěstovaná v Olomouci, sběr srpen 2015, sušená na vzduchu
- Máta marocká (list, stonek), pěstovaná v Olomouci, sběr srpen 2015, sušená na vzduchu

3.4 Pracovní postup

3.4.1 Příprava extraktů

Byl navážen 1 g vzorku máty. Vzorek byl vložen do patrony, která byla umístěna do termostatu vysokotlakého extraktoru *one* PSE. Vzorek byl 10 min extrahován methanolem při teplotě 100 °C a tlaku 10 MPa. Extrakty byly proudem dusíku vysušeny do sucha. Odparky byly pomocí ultrazvukové lázně rozpuštěny v 15 ml destilované vody a doplněny destilovanou vodou na 25 ml. Celkem bylo připraveno třicet extraktů, patnáct z listů a patnáct ze stonků máty klasnaté.

Stejným postupem, ale s navázkou 0,1 g, bylo připraveno devatenáct extraktů, dva z listů, dva ze stonků a dva z kořenů máty klasnaté, dva z listů a dva ze stonků máty marocké, jeden z listů a jeden ze stonků máty citrónové, dva z listů, dva ze stonků, dva z kořenů a jeden z květů máty peprné.

3.4.2 Stanovení obsahu chlorofylu a účinnosti přečištění

Pro stanovení obsahu chlorofylu bylo použito třicet extraktů z máty klasnaté s navázkou 1 g vzorku. Vzorky byly rozděleny do pěti sérií po šesti, vždy tři vzorky z listů a tři ze stonků. Přečištění vzorků bylo provedeno rozpouštědly, diethyletherem, hexanem a dichlormethanem, a dvěma kolonkami, Strata SPE C18 – E a ISOLUTE SLE+.

Vysušené extrakty byly rozpuštěny v 10 ml destilované vody a doplněny do 25 ml. Vzorky listů byly 10krát zředěny. Takto připraveným roztokům byla změřena absorbance při vlnových délkách 642 a 660 nm proti destilované vodě.

Pro sledování účinnosti odstranění chlorofylu z vodného roztoku extrakcí do rozpouštědla byly použity tři série vzorků. Bylo odebráno 10 ml roztoku a bylo přidáno 10 ml rozpouštědla (diethylether, hexan, dichlormethan). Vzorky byly 10 minut třepány při laboratorní teplotě na třepače a poté 2 minuty centrifugovány na 4 000 otáček. Byla změřena absorbance vodné fáze při vlnových délkách 642 a 660 nm proti destilované vodě.

Pro sledování účinnosti odstranění chlorofylu za použití SPE (extrakce pevnou fází) byly použity 2 série. Na kolonku ISOLUTE SLE+ bylo nanášeno 10 ml vzorku, po 5 minutách byla z kolonky vypuštěna vodná fáze, které byla změřena absorbance při vlnových délkách 642 a 660 nm proti destilované vodě.

Kolonka Strata SPE C18 – E byla promyta 2 ml methanolu a 2 ml destilované vody, poté bylo na kolonku nanášeno 10 ml vzorku. Byla změřena absorbance přečištěné vodné fáze při vlnových délkách 642 a 660 nm proti destilované vodě.

3.4.3 Příprava roztoků standardů

Byly připraveny methanolvé roztoky standardů fenolických kyselin: kyseliny benzoové, salicylové, vanilové, *p*-kumarové, 2,4-dihydroxybenzoové, protokatechové, syringové, ferulové, gallové, kávové a sinapové o koncentraci 1mg/ml.

Z roztoků standardů byly připraveny roztoky, které obsahovaly 10 µg a 50 µg každého standardu. Roztoky byly odpařeny do sucha a před analýzou upraveny derivatizací.

3.4.4 SPE extrakce

Bylo připraveno 20 ml vodného roztoku, který obsahoval směs 50 µg každého standardu. Roztok byl rozdělen na dva podíly (10 ml). Jeden podíl (10 ml) byl nanášeno na kolonku ISOLUTE SLE+, po projití vodné fáze byla kolonka promyta 2 ml methanolu. Druhý podíl byl nanášeno na kolonku Strata SPE C18 – E, která byla předtím promyta 2 ml methanolu

a 2 ml destilované vody, po projití vodné fáze byla kolonka vysušena a promyta 2 ml methanolu. Takto připravené vzorky, vodná a methanolová fáze po projití kolonkou ISOLUTE SLE+ a vodná a methanolová fáze po projití kolonkou Strata SPE C18 – E, byly proudem dusíku vysušeny do sucha, rozpuštěny v 1 ml methanolu. Pro další postup bylo odebráno 100 µl vzorků a vysušeno proudem dusíku do sucha. Vzorky byly derivatizovány a poté byla provedena analýza na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí.

3.4.4.1 SPE extrakce – vliv kyselého prostředí

Bylo připraveno 10 ml vodného roztoku, který obsahoval směs 50 µg každého standardu a 50 µl kyseliny trifluoroctové. Takto připravený roztok byl nanesen na kolonku Strata SPE C18 – E, která byla předtím promyta 2 ml methanolu a 2 ml destilované vody, po projití vodné fáze byla kolonka vysušena a promyta 2 ml methanolu. Vodná a methanolová fáze po projití kolonkou byly odpařeny proudem dusíku do sucha a derivatizovány, poté byla provedena analýza na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí.

3.4.4.2 SPE extrakce vzorků máty

Kolonky Strata SPE C18 – E byly promyty 2 ml methanolu a 2 ml destilované vody. Na kolonky byly nanесeny vodné roztoky standardů, dva z listů, dva ze stonků a dva z kořenů máty klasnaté, dva z listů a dva ze stonků máty marocké, jeden z listů a jeden ze stonků máty citrónové, dva z listů, dva ze stonků, dva z kořenů a jeden z květů máty peprné. Po projití vodné fáze byly kolonky vysušeny a promyty 2 ml methanolu. Methanolové fáze a neupravené vzorky standardů byly proudem dusíku odpařeny do sucha, derivatizovány a analyzovány na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí.

3.4.4.3 Derivatizace

Do vialky s odparkem bylo přidáno 75 µl pyridinu a 75 µl silylačního činidla *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA). Směs byla zahřívána 30 minut na 80 °C, po ochlazení bylo ke směsi přidáno 850 µl hexanu.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Stanovení obsahu chlorofylu a účinnosti přečištění

Vzorky byly extrahovány vysokotlakou extrakcí na přístroji *one* PSE. První série byla vytřepána do diethyletheru, druhá do hexanu, třetí do dichlormethanu, čtvrtá byla přečištěna kolonkou ISOLUTE SLE+ a pátá série byla přečištěna kolonkou Strata SPE C18 – E. Účinnost přečištění byla porovnána pomocí změření absorbance na UV/Vis spektrometru. Celkový obsah chlorofylu byl vypočítán podle vztahu:

$$\text{Obsah chlorofylu [mg/l]} = 7,12 \cdot A_1 (660 \text{ nm}) + 16,8 \cdot A_2 (642 \text{ nm})^{52}$$

U vzorků, které byly 10krát zředěny, byl výsledek obsahu chlorofylu vynásoben 10.

V tabulkách 5 – 9 jsou porovnány naměřené hodnoty absorbancí u jednotlivých vzorků před a po přečištění.

Tab. 5: Naměřené absorbance a celkový obsah chlorofylu před a po vytřepání do diethyletheru

Vzorek	A ₁ (660 nm)		A ₂ (642 nm)		Obsah chlorofylu (mg/l)	
	nepřečištěný	přečištěný	nepřečištěný	přečištěný	nepřečištěný	přečištěný
List 1	0,8454	0,5017	0,5626	0,2908	154,7093	8,4575
List 2	0,8039	0,5743	0,8525	0,3458	200,4577	9,8985
List 3	0,9040	0,4698	0,6976	0,3144	181,5616	8,6269
Stonek 1	0,9823	0,4677	0,9501	0,4427	22,9557	10,7674
Stonek 2	0,8468	0,3531	0,8327	0,3417	20,0186	8,2546
Stonek 3	0,8624	0,3106	0,8572	0,2828	20,5413	6,9625

Tab. 6: Naměřené absorbance a celkový obsah chlorofylu před a po vytřepání do hexanu

Vzorek	A ₁ (660 nm)		A ₂ (642 nm)		Obsah chlorofylu (mg/l)	
	nepřečištěný	přečištěný	nepřečištěný	přečištěný	nepřečištěný	přečištěný
List 1	0,3020	0,2221	0,2559	0,1765	64,4936	45,4655
List 2	0,3422	0,1949	0,2986	0,1564	74,5294	40,1521
List 3	0,3485	0,1569	0,3029	0,1134	75,7004	30,2225
Stonek 1	1,0827	0,7323	1,0717	0,7232	25,7134	17,3637
Stonek 2	0,9655	0,4571	0,9361	0,4369	22,6008	10,5945
Stonek 3	0,8520	0,5428	0,8322	0,5257	20,0472	12,6965

Tab. 7: Naměřené absorbance a celkový obsah chlorofylu před a po vytřepání do dichlormethanu

Vzorek	A ₁ (660 nm)		A ₂ (642 nm)		Obsah chlorofylu (mg/l)	
	nepřečištěný	přečištěný	nepřečištěný	přečištěný	nepřečištěný	přečištěný
List 1	0,3943	0,3328	0,3385	0,2036	84,9422	5,7900
List 2	0,4061	0,4506	0,3405	0,2482	86,1183	7,3780
List 3	0,3892	0,2598	0,3369	0,1455	84,3102	4,2942
Stonek 1	0,9702	0,1775	0,9442	0,1482	22,7704	3,7536
Stonek 2	1,0292	0,1236	1,0079	0,0933	24,2606	2,4475
Stonek 3	1,0506	0,0957	1,0015	0,0645	24,3055	1,7650

Tab. 8: Naměřené absorbance a celkový obsah chlorofylu před a po projití kolonkou ISOLUTE SLE+

Vzorek	A ₁ (660 nm)		A ₂ (642 nm)		Obsah chlorofylu (mg/l)	
	nepřečištěný	přečištěný	nepřečištěný	přečištěný	nepřečištěný	přečištěný
List 1	0,4080	0,3753	0,3841	0,2646	93,5784	7,1174
List 2	0,4399	0,6351	0,4058	0,4462	99,4953	12,1807
List 3	0,5836	0,3635	0,5672	0,2539	136,8419	6,8536
Stonek 1	0,8310	0,1936	0,8402	0,2053	20,0321	4,8275
Stonek 2	0,7153	0,1752	0,7378	0,1669	17,4880	4,0513
Stonek 3	0,5381	0,1528	0,5416	0,1527	12,9302	3,6502

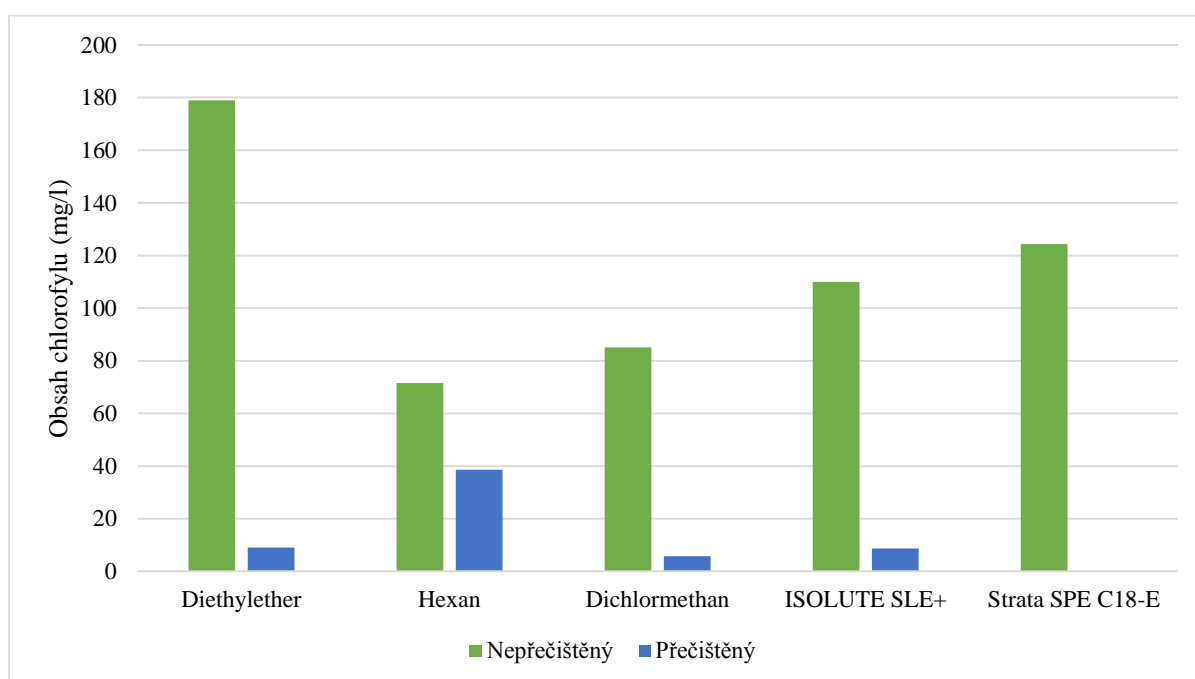
Tab. 9: Naměřené absorbance a celkový obsah chlorofylu před a po projití kolonkou Strata SPE C18 – E

Vzorek	A ₁ (660 nm)		A ₂ (642 nm)		Obsah chlorofylu (mg/l)	
	nepřečištěný	přečištěný	nepřečištěný	přečištěný	nepřečištěný	přečištěný
List 1	0,5561	0,0165	0,4951	0,0074	122,7711	0,2418
List 2	0,6021	0,0159	0,5464	0,0067	134,6647	0,2258
List 3	0,5082	0,0112	0,4733	0,0043	115,6982	0,1520
Stonek 1	0,8540	0	0,8570	0	20,4781	0
Stonek 2	0,8651	0	0,8833	0,0020	20,9990	0,0336
Stonek 3	0,8264	0	0,8332	0,0030	19,8817	0,0504

Tab. 10: Porovnání průměrných hodnot obsahu chlorofylu přečištěných a nepřečištěných vzorků listů máty a vypočtená procenta účinnosti odstranění chlorofylu

Přečištění	Obsah chlorofylu (mg/l)		Účinnost (%)
	nepřečištěný	přečištěný	
Diethylether	178,9095 ±23	8,9943 ±0,8	94,97
Hexan	71,5745 ±6	38,6134 ±8	46,05
Dichlormethan	85,1236 ±0,9	5,8207 ±2	93,16
ISOLUTE SLE+	109,9719 ±24	8,7172 ±3	92,07
Strata SPE C18 – E	124,3780 ±10	0,2065 ±0,05	99,83

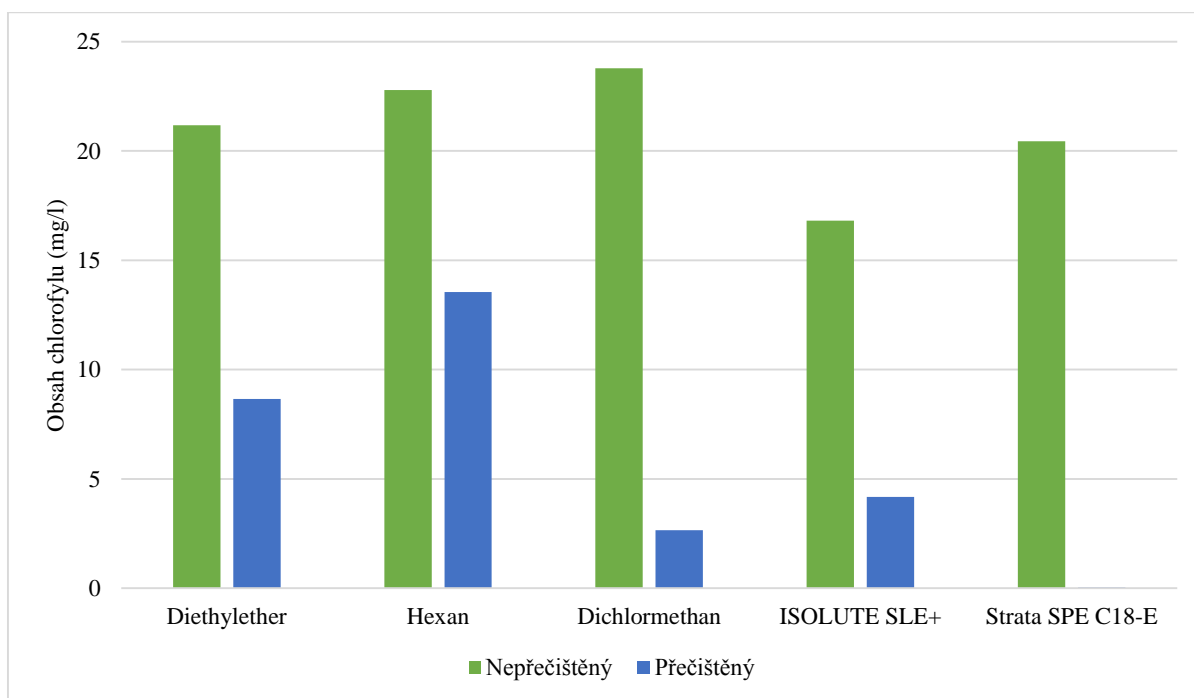
Graf 1: Porovnání obsahu chlorofylu u nepřečištěných a přečištěných vzorků listů



Tab. 11: Porovnání průměrných hodnot obsahu chlorofylu přečištěných a nepřečištěných vzorků stonků máty a vypočtená procenta účinnosti odstranění chlorofylu

Přečištění	Obsah chlorofylu (mg/l)		Účinnost (%)
	nepřečištěný	přečištěný	
Diethylether	21,1718 ±2	8,6615 ±2	59,09
Hexan	22,7871 ±3	13,5516 ±4	40,53
Dichlormethan	23,7788 ±0,9	2,6554 ±1	88,83
ISOLUTE SLE+	16,8168 ±4	4,1763 ±0,6	75,17
Strata SPE C18 – E	20,4529 ±0,6	0,0280 ±0,03	99,86

Graf 2: Porovnání obsahu chlorofylu u nepřečištěných a přečištěných vzorků stonků



Z naměřených hodnot vyplývá, že nejlepšího přečištění chlorofylu vytřepáním do rozpouštědla bylo dosaženo diethyletherem, nejhoršího pak hexanem. Lepšího přečištění kolonkou bylo dosaženo použitím Strata SPE C18 – E, tato kolonka má vyšší účinnost přečištění než jakého lze dosáhnout vytřepáním vzorku do diethyletheru, proto byla použita při dalším postupu.

4.2 Stanovení obsahu fenolických kyselin

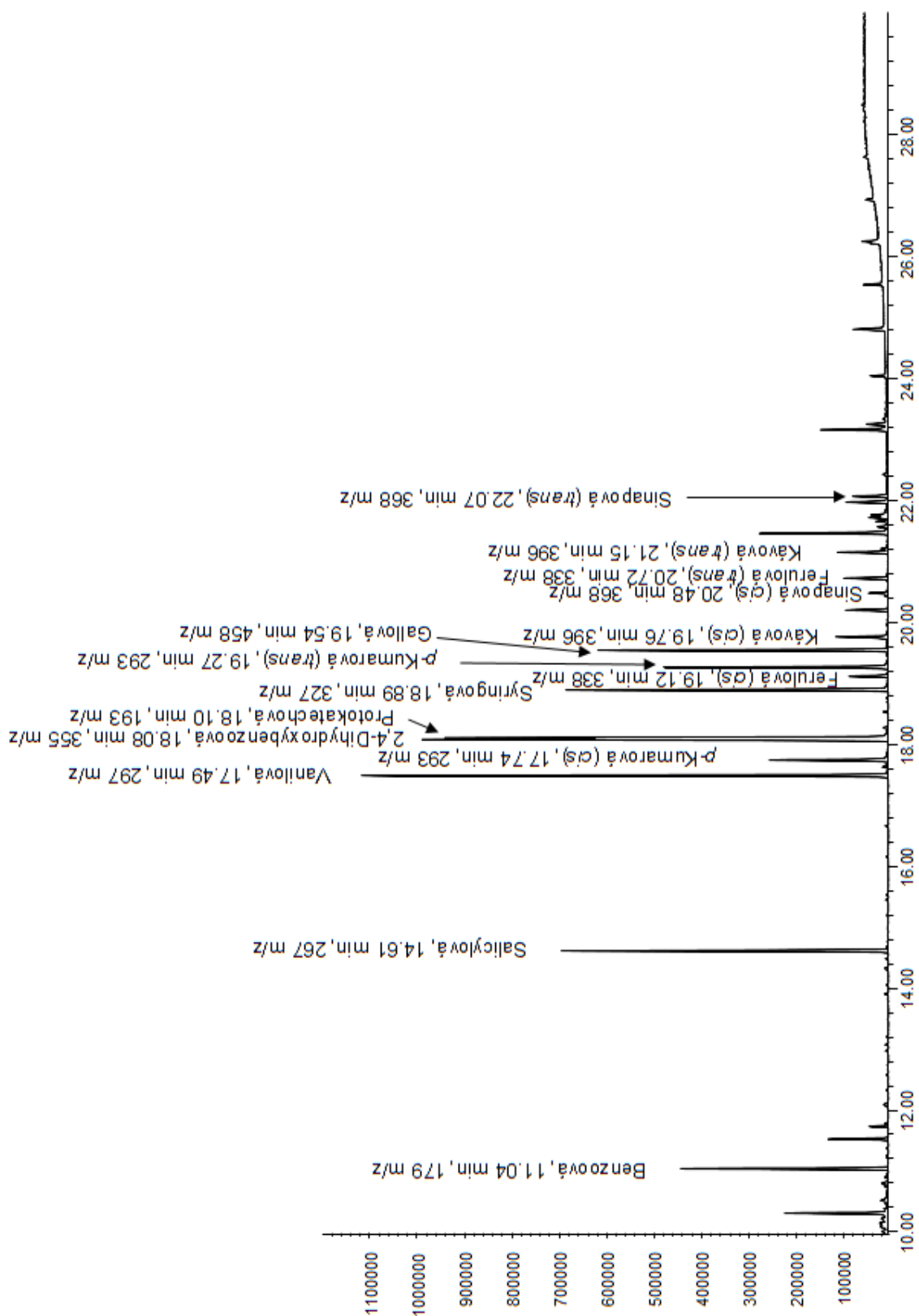
4.2.1 SPE extrakce

Vodné roztoky standardů byly přefiltrovány přes kolonky ISOLUTE SLE+ a Strata SPE C18 – E, poté byly kolonky promyty methanolem. Vzorky byly měřeny plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Bylo porovnáno množství fenolických kyselin ve vodné a methanolvé fázi, jejich identifikace byla provedena porovnáním se standardy a jejich množství srovnáním obsahů ploch píků.

V tabulce 12 jsou uvedeny retenční časy a ionty fenolických kyselin určeny k identifikaci. V tabulkách 13 a 14 jsou uvedené naměřené hodnoty obsahů ploch píků jednotlivých fenolických kyselin.

Tab. 12: Retenční časy a fragmenty použité k identifikaci fenolických kyselin

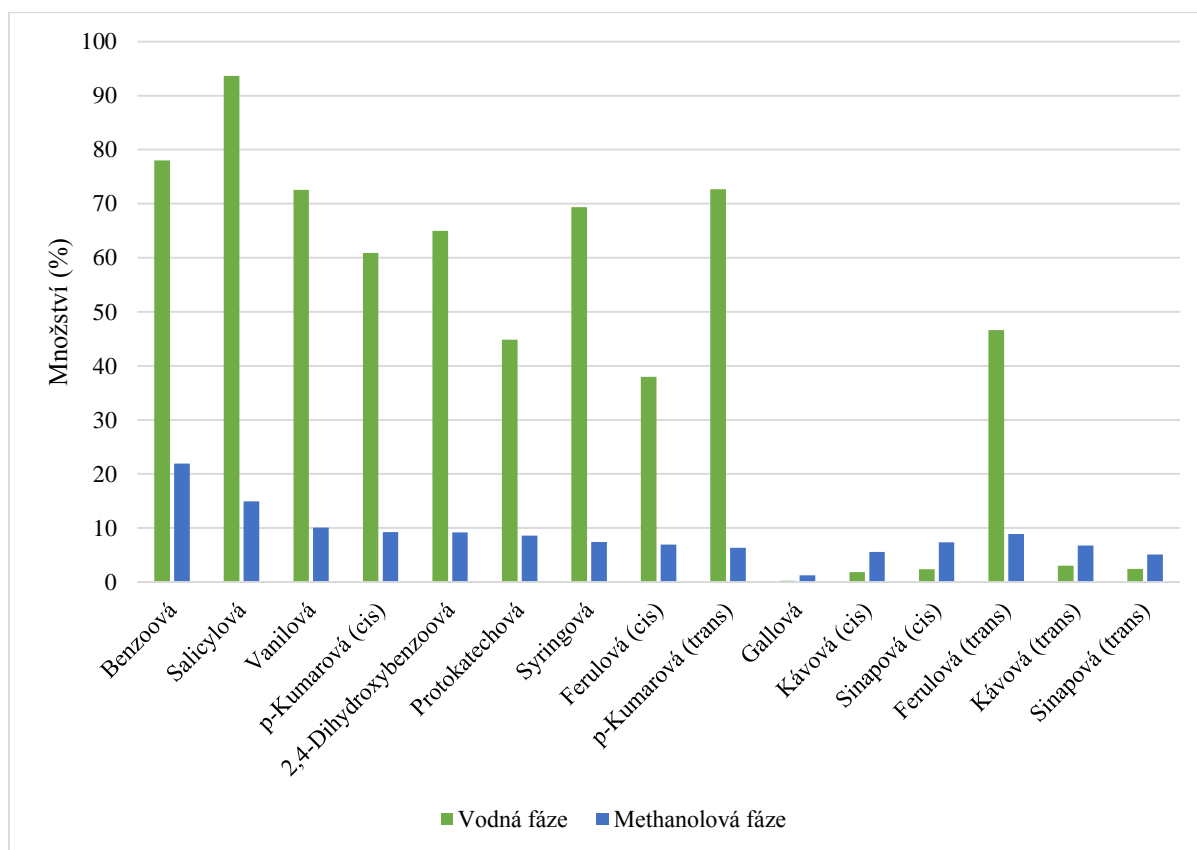
Kyselina	Retenční čas	
	t_R (min)	Ion (m/z)
Benzoová	11,04	179
Salicylová	14,61	267
Vanilová	17,49	297
<i>p</i> -Kumarová (<i>cis</i>)	17,74	293
2,4-Dihydroxybenzoová	18,08	355
Protokatechová	18,10	193
Syringová	18,89	327
Ferulová (<i>cis</i>)	19,12	338
<i>p</i> -Kumarová (<i>trans</i>)	19,27	293
Gallová	19,54	458
Kávová (<i>cis</i>)	19,76	396
Sinapová (<i>cis</i>)	20,48	368
Ferulová (<i>trans</i>)	20,72	338
Kávová (<i>trans</i>)	21,15	396
Sinapová (<i>trans</i>)	22,07	368



Obr. 11 Chromatogram standardů fenolických kyselin

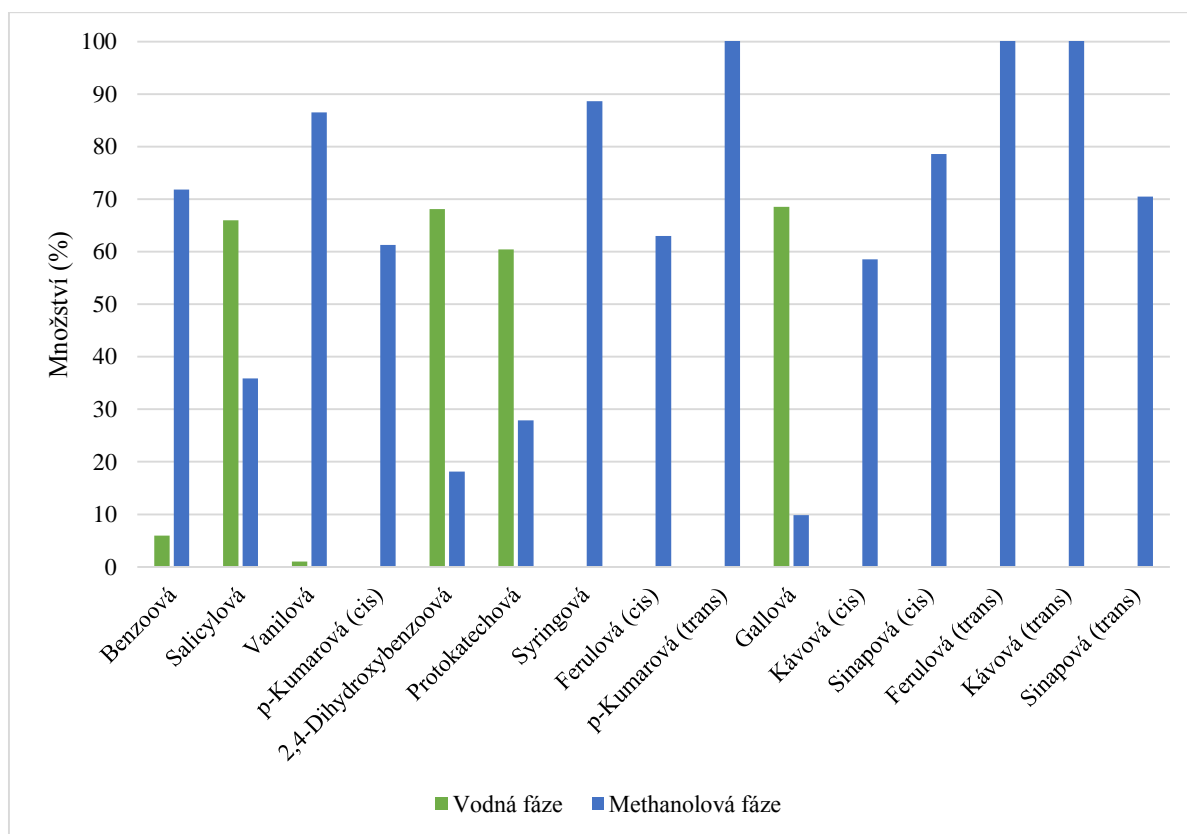
Tab. 13: Obsahy ploch píků fenolických kyselin po projití kolonkou ISOLUT SLE+

Kyselina	Neupravený	Vodná	Methanolová	Množství (%)	
	standard	fáze	fáze	voda	methanol
Benzoová	1736274	1354644	380800	78,02	21,93
Salicylová	3687392	2516857	401842	93,65	14,95
Vanilová	1873340	1359660	188322	72,58	10,05
<i>p</i> -Kumarová (<i>cis</i>)	369303	224920	34094	60,90	9,23
2,4-Dihydroxybenzoová	5489470	3568432	505903	65,01	9,22
Protokatechová	2861884	1282836	245926	44,82	8,59
Syringová	1093848	758428	81096	69,34	7,41
Ferulová (<i>cis</i>)	153690	58339	10651	37,96	6,93
<i>p</i> -Kumarová (<i>trans</i>)	836332	607644	53027	72,66	6,34
Gallová	1057791	2911	13207	0,28	1,25
Kávoová (<i>cis</i>)	239982	4415	13322	1,84	5,55
Sinapová (<i>cis</i>)	80876	1929	5935	2,39	7,34
Ferulová (<i>trans</i>)	181886	84776	16200	46,64	8,91
Kávoová (<i>trans</i>)	251107	7670	16980	3,05	6,76
Sinapová (<i>trans</i>)	144755	3510	7389	2,42	5,10

Graf 3: Porovnání množství fenolických kyselin po projití kolonkou ISOLUTE SLE+

Tab. 14: Obsahy ploch píků fenolických kyselin po projití kolonkou Strata SPE C18 – E

Kyselina	Neupravený	Vodná	Methanolová	Množství (%)	
	standard	fáze	fáze	voda	methanol
Benzoová	1736274	103450	1247311	5,96	71,84
Salicylová	3687392	1773937	963417	66,01	35,85
Vanilová	1873340	19466	1620457	1,04	86,50
<i>p</i> -Kumarová (<i>cis</i>)	369303	0	226347	0	61,29
2,4-Dihydroxybenzoová	5489470	3739815	995826	68,13	18,14
Protokatechová	2861884	1729426	798609	60,43	27,91
Syringová	1093848	0	969369	0	88,62
Ferulová (<i>cis</i>)	153690	0	96825	0	63,00
<i>p</i> -Kumarová (<i>trans</i>)	836332	231	864924	0,03	103,42
Gallová	1057791	725156	104082	68,55	9,84
Kávoová (<i>cis</i>)	239982	0	140532	0	58,56
Sinapová (<i>cis</i>)	80876	0	63545	0	78,57
Ferulová (<i>trans</i>)	181886	0	193016	0	106,12
Kávoová (<i>trans</i>)	251107	0	267489	0	106,52
Sinapová (<i>trans</i>)	144755	0	102038	0	70,49

Graf 4: Porovnání množství fenolických kyselin po projití kolonkou Strata SPE C18 – E

Z uvedených hodnot vyplývá, že nejvíce fenolických kyselin odvozených od kyseliny benzoové bylo ve vodné fázi po promytí kolonky ISOLUTE SLE+. Nejvíce derivátů odvozených od kyseliny skořicové se nacházelo v methanolové fázi po promytí kolonky Strata SPE C18 – E, kde se zároveň v průměru nacházelo nejvíce fenolických kyselin, proto byla pro další analýzy vybrána tato fáze.

4.2.2 SPE extrakce – vliv kyselého prostředí

Aby byl zvýšen obsah kyseliny salicylové v methanolové fázi, byl vodný roztok standardů okyselen kyselinou trifluoroctovou.

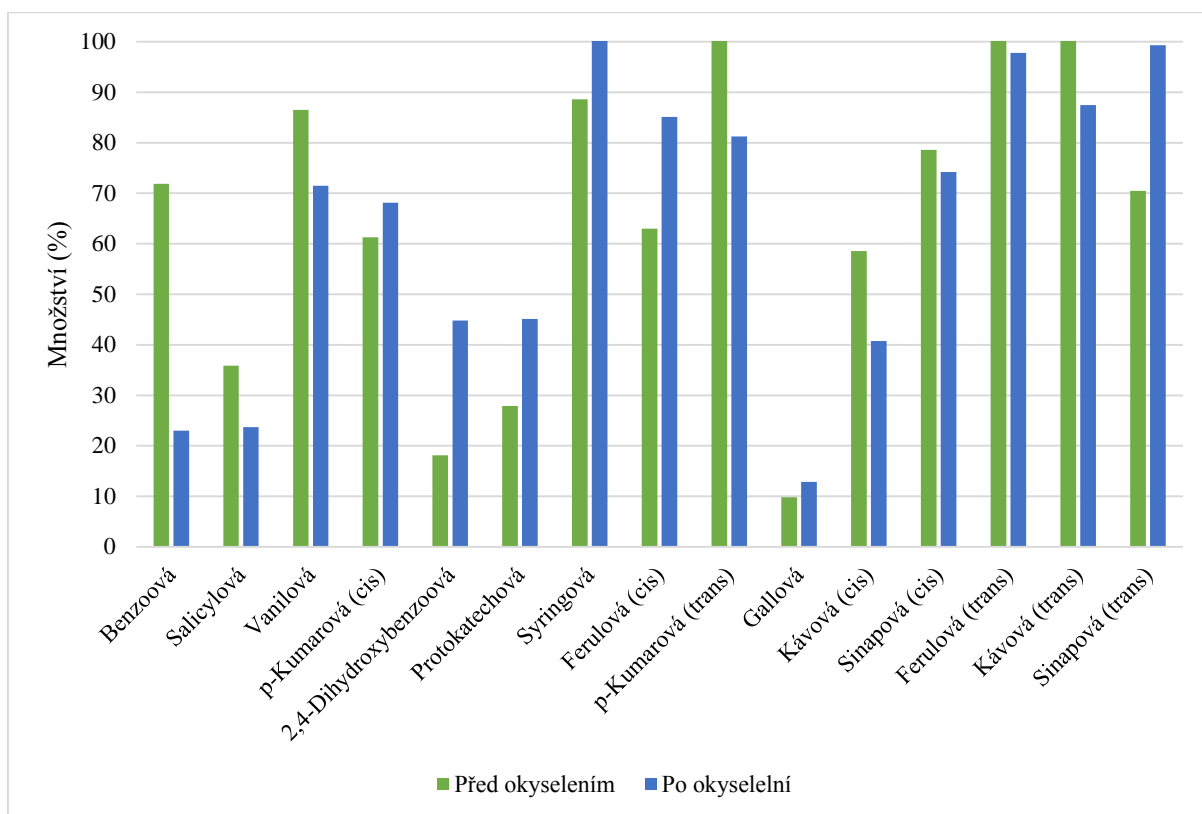
Tab. 15: Obsahy ploch píků fenolických kyselin po okyselení

Kyselina	Neupravený standard	Methanolová fáze	Množství (%)
Benzoová	24253149	5576600	22,99
Salicylová	36645469	8695496	23,73
Vanilová	42079060	30069358	71,46
<i>p</i> -Kumarová (<i>cis</i>)	900540	613606	68,14
2,4-Dihydroxybenzoová	61380056	27512247	44,82
Protokatechová	26825056	12104711	45,12
Syringová	11021587	11388125	103,33
Ferulová (<i>cis</i>)	580378	493880	85,10
<i>p</i> -Kumarová (<i>trans</i>)	26822935	21788340	81,23
Gallová	12553778	1617665	12,89
Kávová (<i>cis</i>)	452913	184411	40,72
Sinapová (<i>cis</i>)	663305	492395	74,23
Ferulová (<i>trans</i>)	4520832	4420469	97,78
Kávová (<i>trans</i>)	9327072	8155606	87,44
Sinapová (<i>trans</i>)	5829048	5790131	99,33

Z uvedených hodnot vyplývá, že množství některých kyselin, např. kyseliny syringové, vzrostlo, u některých, např. kyseliny vanilové, množství kleslo. Množství kyseliny salicylové kleslo a i celková výtěžnost kyselin mírně klesla, proto se u další analýzy okyselení vynechalo.

Rozdíl množství fenolických kyselin v methanolové fázi před a po okyselení je patrný z grafu 5.

Graf 5: Srovnání množství fenolických kyselin v methanolové fázi před a po okyselení



4.2.3 SPE extrakce vzorků máty

Vzorky máty byly měřeny plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Bylo porovnáno množství fenolických kyselin, jejich identifikace byla provedena porovnáním se standardy a jejich množství srovnáním obsahů ploch píků.

V tabulce 12 jsou uvedeny retenční časy a ionty fenolických kyselin určeny k identifikaci. Chromatogramy jednotlivých kyselin ve vzorku listů máty pepřné jsou uvedeny v příloze.

Bylo zjištěno, že kolonka Strata SPE C18 – E zadržovala část množství fenolických kyselin. Deriváty odvozené od kyseliny benzoové byly zadržovány víc (průměrná ztráta 52,46 %), než deriváty odvozené od kyseliny skořicové (průměrná ztráta 19,52 %).

Tab. 16: Obsahy ploch píků neupravených standardů a standardů po projití kolonkou (10 µg)

Kyselina	Neupravený standard	Po projití kolonkou	Ztráta (%)
Benzoová	6408995	2795839	56,38
Salicylová	9765574	3236028	66,86
Vanilová	4656111	4255721	8,60
<i>p</i> -Kumarová (<i>cis</i>)	6194	15195	–
2,4-Dihydroxybenzoová	17105023	3651930	78,65
Protokatechová	8496256	3333424	60,77
Syringová	3305319	2998197	9,29
Ferulová (<i>cis</i>)	252851	210634	16,70
<i>p</i> -Kumarová (<i>trans</i>)	2968751	2598513	12,47
Gallová	3931632	529713	86,53
Kávoá (<i>cis</i>)	211176	133516	36,78
Sinapová (<i>cis</i>)	305608	225033	26,37
Ferulová (<i>trans</i>)	1330213	1051953	20,92
Kávoá (<i>trans</i>)	2461102	2006753	18,46
Sinapová (<i>trans</i>)	795244	702636	11,65

Tab. 17: Obsahy ploch píků neupravených standardů a standardů po projití kolonkou (50 µg)

Kyselina	Neupravený standard	Po projití kolonkou	Ztráta (%)
Benzoová	31929531	18465683	42,17
Salicylová	48148254	19485890	59,53
Vanilová	24666154	20731997	15,95
<i>p</i> -Kumarová (<i>cis</i>)	11657	157440	–
2,4-Dihydroxybenzoová	86313504	19025537	77,96
Protokatechová	40487679	13465476	66,74
Syringová	17205921	14533731	15,53
Ferulová (<i>cis</i>)	1332893	1235331	7,32
<i>p</i> -Kumarová (<i>trans</i>)	15377499	12785774	16,85
Gallová	18498664	1936838	89,53
Kávoá (<i>cis</i>)	1119758	846980,5	24,36
Sinapová (<i>cis</i>)	1519142	1176700	22,54
Ferulová (<i>trans</i>)	7089400	5853613	17,43
Kávoá (<i>trans</i>)	13625484	11060135	18,83
Sinapová (<i>trans</i>)	6386772	4938140	22,68

Naměřené obsahy píků ze vzorků máč byly porovnány s obsahy píků neupravených standardů (10 µg). Bylo vypočítáno průměrné množství fenolických kyselin v jednotlivých vzorcích, tzn. v 0,1 g, přičemž byly zohledněny ztráty při extrakci na kolonce Strat SPE C18 – E. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 18 – 20.

Tab. 18: Průměrné množství (µg) fenolických kyselin v máčě pepřné

Kyselina	List	Stonek	Kořen	Květ
Benzoová	8,9947 ±4	3,4968 ±0,4	5,3533 ±3	0,1258
Salicylová	2,2465 ±1	0,2585 ±0,03	0,1838 ±0,05	0
Vanilová	1,1059 ±0,2	0,2501 ±0,1	0,2489 ±0,02	0,0078
<i>p</i> -Kumarová (<i>cis</i>)	108,7416 ±3	27,2648 ±17	28,4149 ±5	0
2,4-Dihydroxybenzoová	0,1969 ±0,06	0,3655 ±0,1	0,4025 ±0,06	0,1185
Protokatechová	2,4322 ±0,3	0,7221 ±0,3	1,0904 ±0,07	0
Syringová	3,4915 ±0,2	0,3414 ±0,3	0,5148 ±0,09	0
Ferulová (<i>cis</i>)	3,0256 ±0,1	0,7936 ±0,7	1,0491 ±0,5	0
<i>p</i> -Kumarová (<i>trans</i>)	3,6109 ±0,8	1,1303 ±0,07	0,9505 ±0,03	0,2057
Gallová	2,1422 ±3	0,9870 ±0,4	0,7575 ±1	0
Kávoá (<i>cis</i>)	109,4849 ±61	17,4124 ±12	23,7532 ±8	0,0858
Sinapová (<i>cis</i>)	0,4355 ±0,1	0,1581 ±0,1	0,0348 ±0,05	0
Ferulová (<i>trans</i>)	7,8762 ±2	0,4552 ±0,3	0,5449 ±0,1	0,0000
Kávoá (<i>trans</i>)	225,6915 ±52	17,3922 ±14	33,8410 ±6	0,2322
Sinapová (<i>trans</i>)	2,7112 ±0,08	0,1939 ±0,1	0,0855 ±0,01	0

Tab. 19: Průměrné množství (μg) fenolických kyselin v mátě klasnaté

Kyselina	List	Stonek	Kořen
Benzoová	3,3406 \pm 0,9	3,6967 \pm 2	2,3398 \pm 0,8
Salicylová	2,4717 \pm 2	0,7023 \pm 0,3	0,2179 \pm 0,05
Vanilová	1,6448 \pm 0,5	0,9373 \pm 0,3	0,1831 \pm 0,09
<i>p</i> -Kumarová (<i>cis</i>)	197,1355 \pm 51	63,0360 \pm 8	0,2340 \pm 0,1
2,4-Dihydroxybenzoová	1,2181 \pm 0,3	0,5443 \pm 0,03	0,3806 \pm 0,04
Protokatechová	5,4290 \pm 1	2,3470 \pm 0,4	0,4504 \pm 0,03
Syringová	2,3022 \pm 0,2	3,2329 \pm 0,2	0,9277 \pm 0,8
Ferulová (<i>cis</i>)	2,6100 \pm 0,5	1,4968 \pm 0,4	0,4747 \pm 0,03
<i>p</i> -Kumarová (<i>trans</i>)	4,7960 \pm 0,5	1,4975 \pm 0,007	0,9816 \pm 0,4
Gallová	0,7478 \pm 0,8	1,1047 \pm 0,2	0,3156 \pm 0,09
Kávová (<i>cis</i>)	13,9242 \pm 0,2	23,1335 \pm 7	4,7459 \pm 0,7
Sinapová (<i>cis</i>)	0,2020 \pm 0,3	0	0,1656 \pm 0,2
Ferulová (<i>trans</i>)	6,0538 \pm 0,4	0,5709 \pm 0,008	1,3738 \pm 0,4
Kávová (<i>trans</i>)	80,7561 \pm 3	21,7575 \pm 0,2	28,8733 \pm 2
Sinapová (<i>trans</i>)	0,9088 \pm 1	0,0313 \pm 0,03	0,5298 \pm 0,3

Tab. 20: Průměrné množství (μg) fenolických kyselin v mátě citrónové a marocké

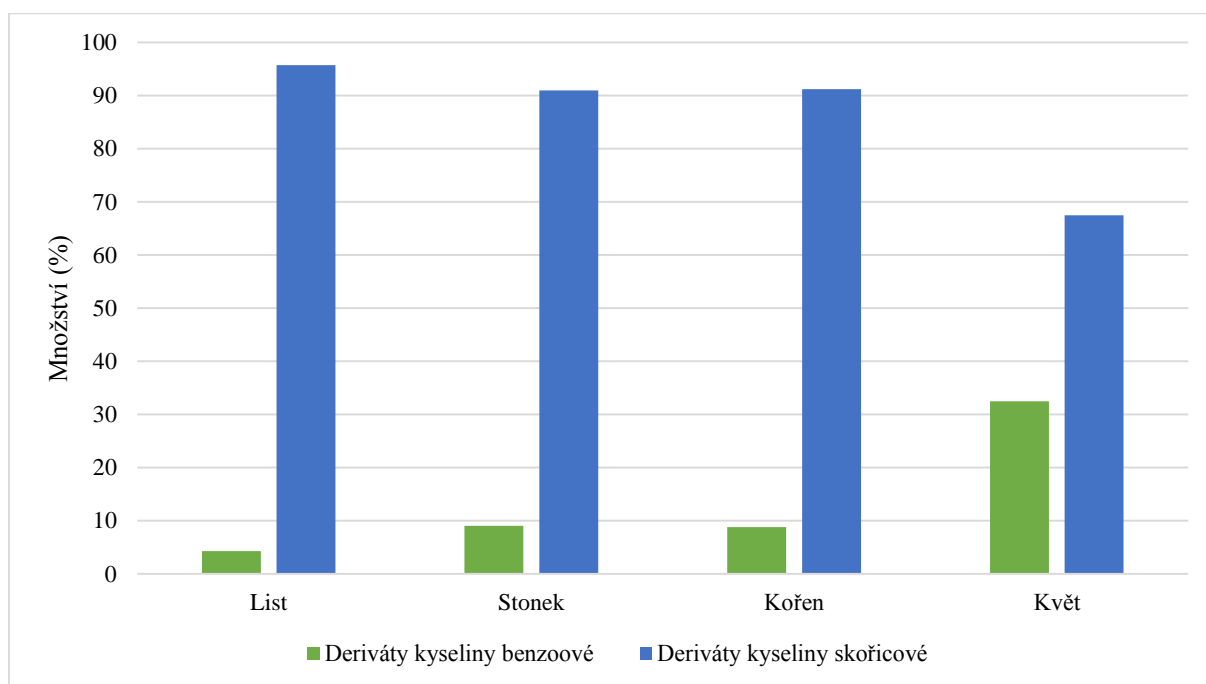
Kyselina	Máta citrónová		Máta marocká	
	list	stonek	list	stonek
Benzoová	4,8570	8,7484	3,3213 \pm 1	4,1526 \pm 0,7
Salicylová	0,8107	1,3082	1,8683 \pm 0,01	2,4296 \pm 0,6
Vanilová	0,7581	0,6900	1,0826 \pm 0,05	5,5922 \pm 5
<i>p</i> -Kumarová (<i>cis</i>)	74,1321	37,4313	108,0309 \pm 144	169,9316 \pm 107
2,4-Dihydroxybenzoová	1,1577	0,8559	0,6344 \pm 0,9	1,5937 \pm 1
Protokatechová	4,3598	3,0909	4,6195 \pm 0,6	6,4854 \pm 4
Syringová	1,5542	2,3870	2,3367 \pm 0,3	6,2547 \pm 6
Ferulová (<i>cis</i>)	3,3527	3,0434	7,6823 \pm 0,8	4,4792 \pm 3
<i>p</i> -Kumarová (<i>trans</i>)	1,1940	0,6241	3,2254 \pm 0,7	1,6735 \pm 0,8
Gallová	0,3475	0	1,7278 \pm 0,6	2,6626 \pm 3
Kávová (<i>cis</i>)	45,5531	40,1957	62,1415 \pm 8	145,9216 \pm 170
Sinapová (<i>cis</i>)	0,0391	0	0,3416 \pm 0,2	0,0772 \pm 0,07
Ferulová (<i>trans</i>)	1,7151	0,6875	8,2285 \pm 2	1,1687 \pm 0,2
Kávová (<i>trans</i>)	99,3058	37,6251	180,4017 \pm 20	63,6775 \pm 3
Sinapová (<i>trans</i>)	0,0043	0,0390	1,5794 \pm 0,8	0,3158 \pm 0,2

Z uvedených hodnot vyplývá, že ve vzorcích máty peprné bylo obsaženo více kyselin odvozených od kyseliny skořicové, nejvíce pak kyseliny kávové (*trans*).

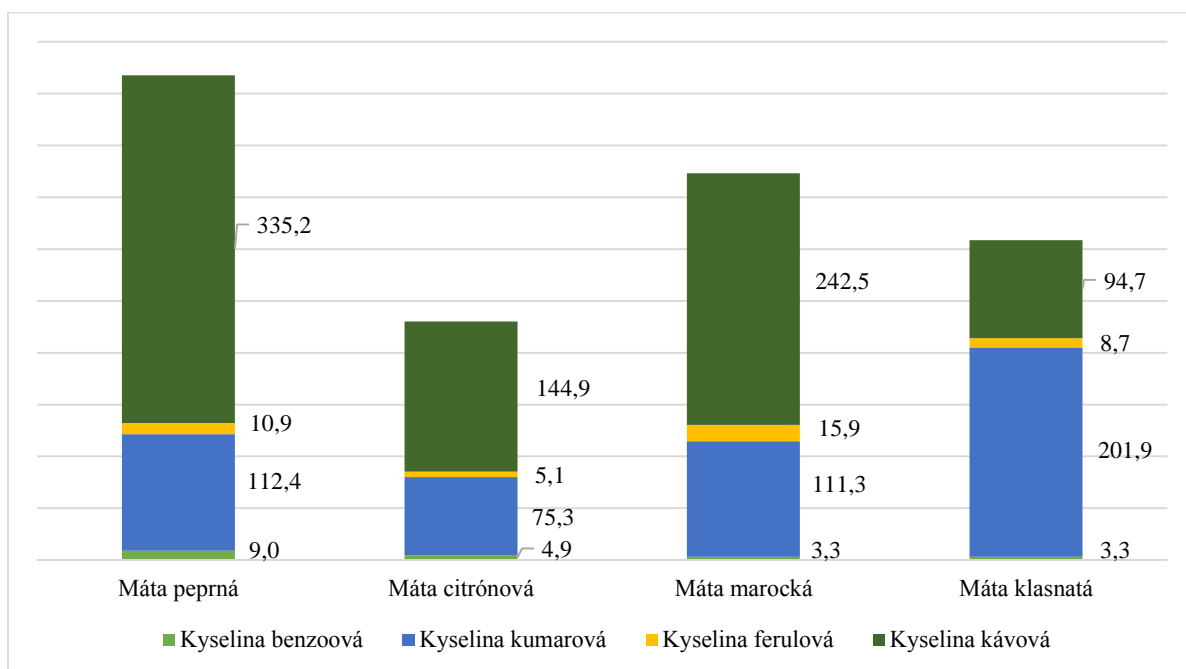
V grafu 6 jsou porovnána celková množství derivátů kyseliny benzoové a skořicové v různých částech máty peprné, hodnoty jsou uvedeny v procentech vzhledem k celkovému množství fenolických kyselin ve vzorku. Nejvíce těchto kyselin bylo obsaženo v listech, nejméně ve květech.

V grafech 7 – 9 je porovnáno, jak se liší množství fenolických kyselin v jednotlivých částech rostlin v ostatních druzích mát vzhledem k mátě peprné. Byly vybrány čtyři nejvíce zastoupené kyseliny (benzoová, kumarová, ferulová a kávová). Z výsledků také vyplývá, že nejvíce fenolických kyselin v listech a stoncích obsahuje máta marocká, na druhém místě je máta peprná, poté máta klasnatá a nakonec máta citrónová. Všechny druhy obsahují více fenolických kyselin odvozených od kyseliny skořicové.

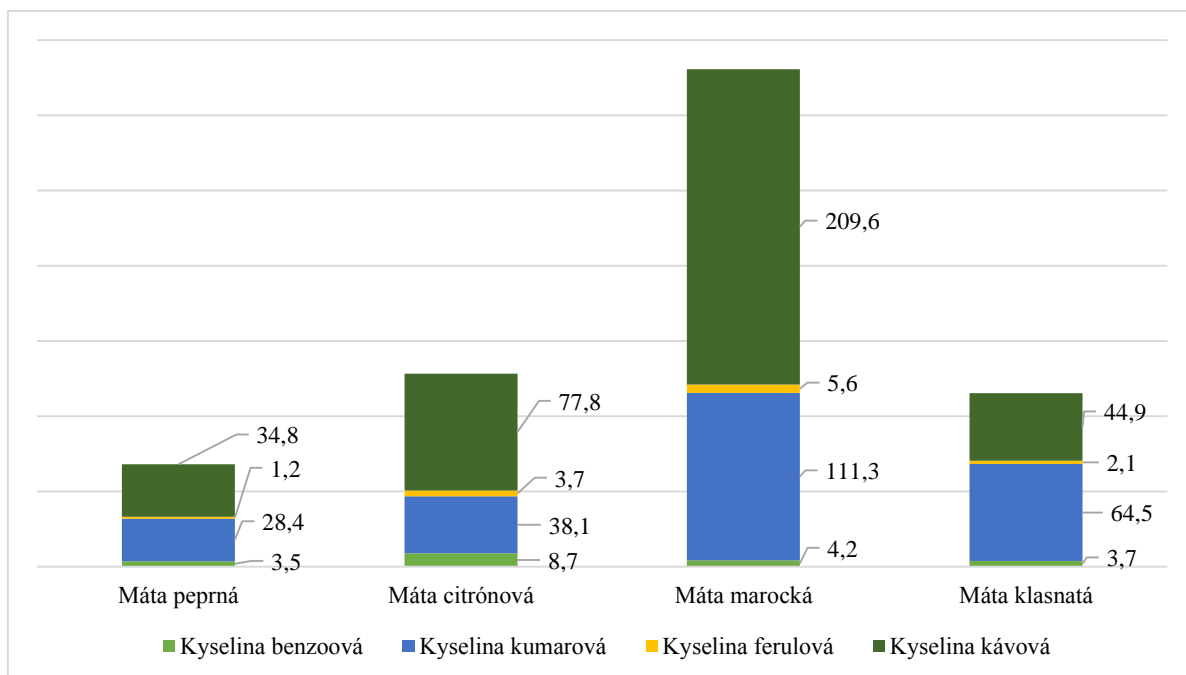
Graf 6: Porovnání množství obsahu fenolických kyselin ve vzorcích máty peprné



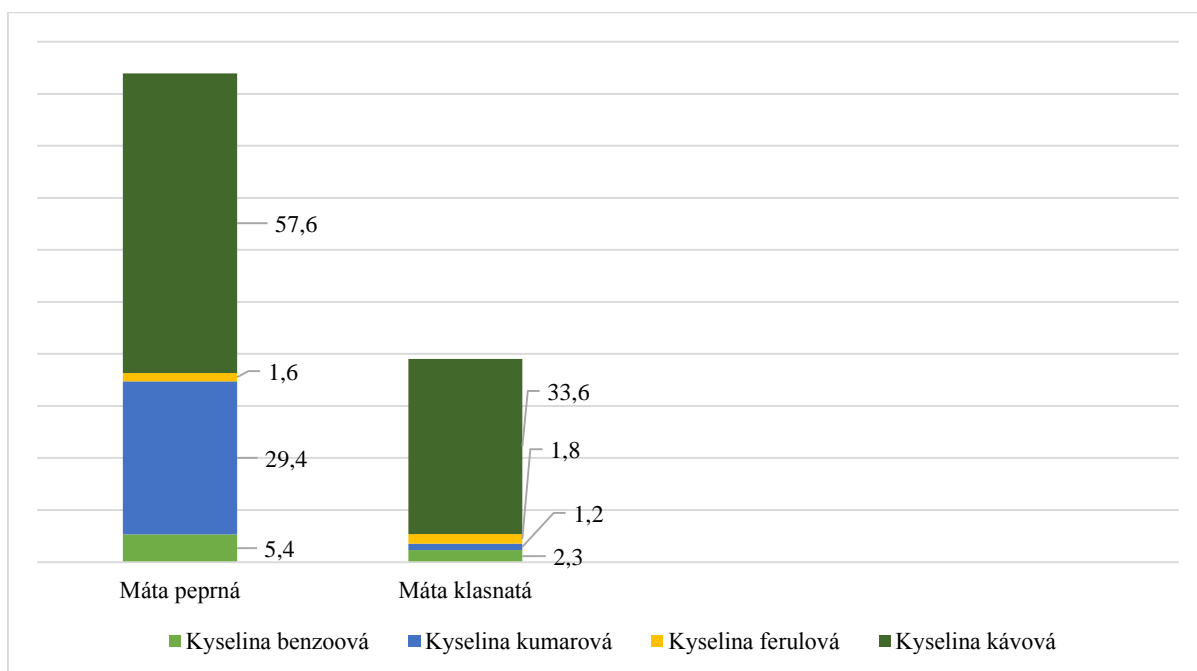
Graf 7: Porovnání zastoupení množství vybraných fenolických kyselin v listech (μg)



Graf 8: Porovnání zastoupení množství vybraných fenolických kyselin ve stoncích (μg)



Graf 9: Porovnání zastoupení množství vybraných fenolických kyselin v kořenech (μg)



5 Závěr

Nejprve bylo porovnáno, které rozpouštědlo (diethylether, hexan, dichlormethan) nebo kolonka (ISOLUTE SLE+, Strata SPE C18 – E) dokáže odstranit z extraktů vzorků máty nejvíce nečistot a chlorofylu. Vzorky byly proměřeny na UV/Vis spektrometru. Bylo zjištěno, že z rozpouštědel se nejlepšího přečištění dosáhlo vytřepáním do diethyletheru, z kolonek byla účinnější Strata SPE C18 – E, kterou se dosáhlo lepších výsledků než s diethyletherem.

Cílem této práce bylo porovnat množství fenolických kyselin v různých částech máty peprné a srovnáním s jinými druhy (mátou citrónovou, klasnatou a marockou). Extrakty vzorků byly přečištěny kolonkou Strata SPE C18 – E a analyzovány na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí. Z naměřených hodnot vyplývá, že nejvíce byly v mátách obsaženy deriváty kyseliny skořicové, zejména kyselina kávová, kumarová a ferulová. Máta peprná obsahovala nejvíce fenolických kyselin v listech. Ze všech srovnávaných druhů obsahovala nejvíce fenolických kyselin máta marocká, máta peprná byla na druhém místě.

Seznam použité literatury

1. Mayer J. G., Uehleke B, Saum K.: *Bylinky z klášterní lékárny*. KNIŽNÍ KLUB, Praha 2015.
2. Beiser R.: *Čaje z bylinek a ovoce*. IKAR, Praha 2012.
3. <http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/130-mentha-piperita-mata-peprna>, 2. 3. 2016
4. <http://www.nalok.cz/farmy/ekofarma-redhost/mata-klasnata>, 2. 3. 2016
5. <http://liberherbarum.net/Minor/CZ/PN0114.htm>, 12. 3. 2016
6. <http://www.katalog-rostlin.cz/bylinky/Mentha-spicata-Mata-klasnata.html>, 12. 3. 2016
7. <http://www.magazinzahrada.cz/atlas-rostlin/bylinky-a-lecive-rostliny/mata-klasnata.html>, 12. 3. 2016
8. <http://www.zivebylinky.cz/cz-detail-928081-citronova-mata-mentha-piperita-var-citrata.html>, 12. 3. 2016
9. <http://www.justnahrin.cz/bylina/mata-citronova>, 12. 3. 2016
10. http://www.salviaparadise.cz/herbar-rostlin-mata-marocka-nana-c-736_1011.html, 12. 3. 2016
11. <http://www.vegetalismus.cz/marocka-mata>, 12. 3. 2016
12. <http://www.zivebylinky.cz/cz-detail-915015-marocka-mata-mentha-x-spicata-maroccan.html>, 12. 3. 2016
13. <http://www.magazinzahrada.cz/atlas-rostlin/bylinky-a-lecive-rostliny/mata-peprna.html>, staženo dne 2. 4. 2016
14. <http://www.zahradnictvikrulichovi.cz/prodej/Mentha-spicata---Brundall-----mata-klasnata>, staženo dne 2. 4. 2016
15. <http://www.kotvicnikovafarma.cz/product/mata-citronova-mentha-piperita-vcitrata-citron-jaro-2015-33/>, staženo dne 2. 4. 2016
16. <http://www.duhovamedicina.cz/prodej/bylinne-caje/marocka-mata/>, staženo dne 2. 4. 2016
17. Blažej A., Šutý L.: *Rastlinné fenolové zlučeny*. ALFA, Bratislava 1973.
18. Lampart-Szczapa E., Siger A., Trojanowska K., Nogala-Kalucka M., Malecka M., Pacholek B.: *Nahrung Food* **47**, 286 (2003).
19. Ryan D., Antolovich M., Prenzler P, Robards K, Lavee S.: *Scientia Horticulturae* **92**, 147 (2002).
20. Luštinec J., Žárský V.: *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. Karolinum, Praha 2005.
21. Hess D.: *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha 1983.

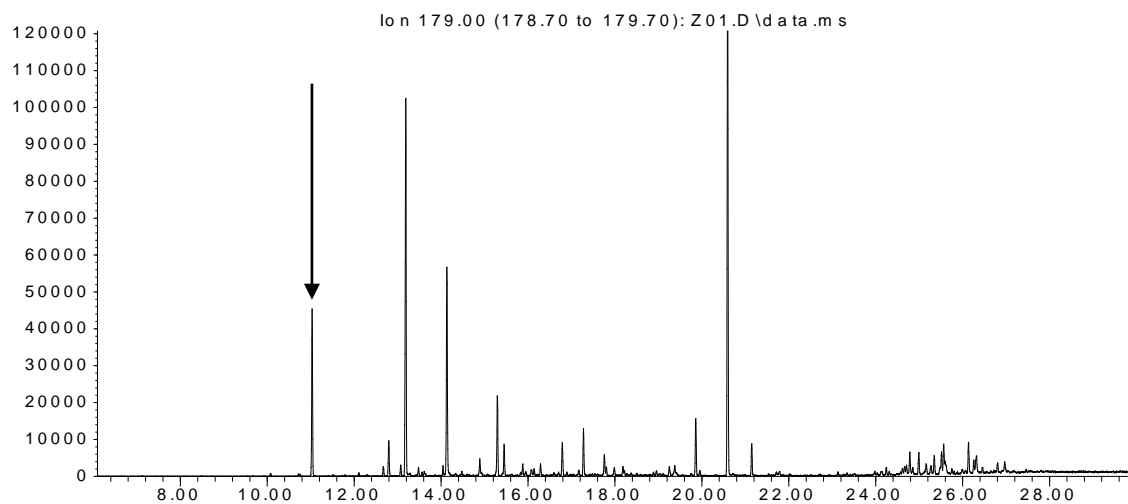
22. Marčaníková K., Beňová B.: Chem. Listy **104**, 27 (2010).
23. Velíšek J.: *Chemie potravin 3*. Osis, Tábor 2002.
24. Stalikas C. D.: J. Sep. Sci. **30**, 3268 (2007).
25. Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava 2003.
26. Eisner A., Kurečková K., Ventura K.: Chem. Listy **94**, 235 (2000).
27. Churáček J.: *Analytická separace látek*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1990.
28. Frnková P.: *Specifické extrakce přírodních vzorků*. Disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2004.
29. Bielská L.: *Využití metody superkritické fluidní extrakce k extrakci organických polutantů*. Diplomová práce, Masarykova Univerzita, Brno 2008.
30. Kurečková K., Ventura K., Eisner A., Adam M.: Chem. Listy **95**, 415 (2001).
31. Sapkale G. N., Patil S. M., Surwase U. S., Bhatbhage P. K.: Int. J. Chem. Sci. **8**, 729 (2010).
32. http://is.muni.cz/th/77987/prif_m/superkriticke_kapaliny.pdf, staženo dne 5. 12. 2014
33. http://en.wikipedia.org/wiki/Supercritical_fluid_extraction#mediaviewer/File:SFESchematic.jpg, staženo dne 15. 11. 2014
34. Chytilová A.: *Vysokotlaké extrakce antioxidantů ze zeleného čaje*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2011.
35. https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/teorie_pse.pdf, staženo dne 26. 11. 2014
36. <http://soubory.vfu.cz/fvhe/tlakova-extrakce/>, staženo dne 27. 11. 2014
37. http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2012/01/KA-2340_4_8up_extrakce2.pdf, staženo dne 27. 11. 2014
38. Hofler F., Richter B., Felix D.: *Accelerated Solvent extraction*, Dionex Corporation, U.S.A., LPN0639-01 20 M 8/95.
39. Kociánová V.: *Organohalogenové sloučeniny – kontaminanty životního prostředí*. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Brno 2013.
40. Buldini P. L., Ricci L., Sharma J. L.: Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *Journal of Chromatography A*, **975** (2002).
41. <http://www.cyberlipid.org/extract/extr0009.htm>, staženo dne 27. 11. 2014
42. Janák J.: Chem. Listy **105**, 285 (2011).
43. Sobotníková J., Bosáková Z., Čabala R., Coufal P., Pacáková V., Štulík K.: Chem. Listy **104**, 1226 (2010).

44. http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf, staženo dne 8. 4. 2016
45. <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>, staženo 8. 4. 2016
46. http://chemie.ocikvideni.cz/ZS/11_chromatografie.pdf, staženo 10. 4. 2016
47. L. Sommer, a kol.: *Základy analytické chemie II*. VUTIUM (2000).
48. http://upkoo.vscht.cz/files/uzel/0023451/P6-Chromatograficke_stanoveni_topn%C3%BDch_plynu.pdf, staženo 6. 4. 2016
49. <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>, staženo dne 8. 4. 2016
50. https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52965, staženo dne 8. 4. 2016
51. Opekarek F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Karolinum, Praha 2010.
52. Davídek J.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*, SNTL, Praha 1981.

Příloha 1 – Chromatogramy kyselin benzoové a salicylové vzorků listů máty peprné

Máta peprná (list) – kyselina benzoová

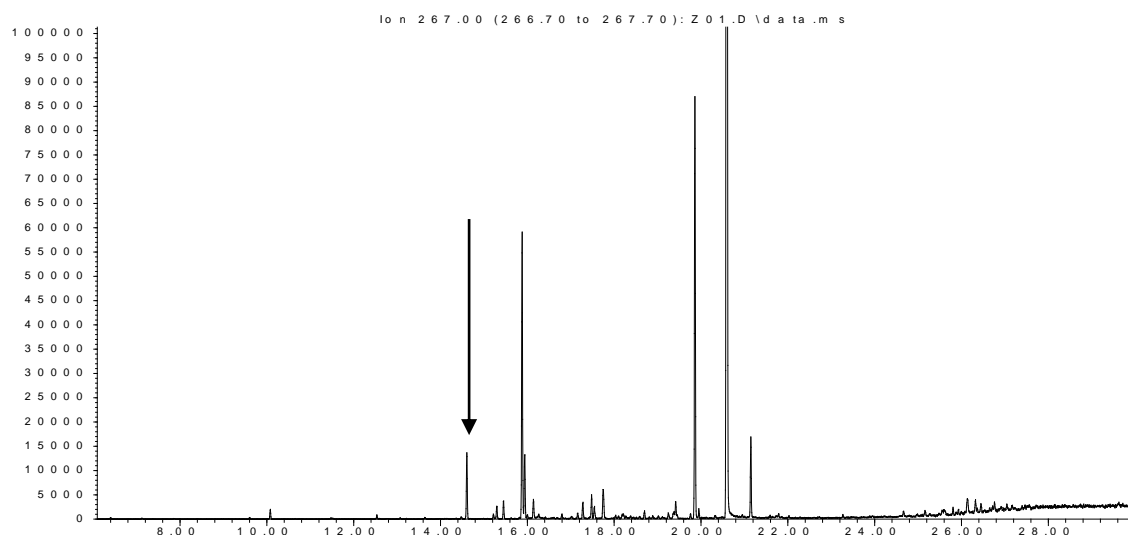
Abundance



Time -->

Máta peprná (list) – kyselina salicylová

Abundance

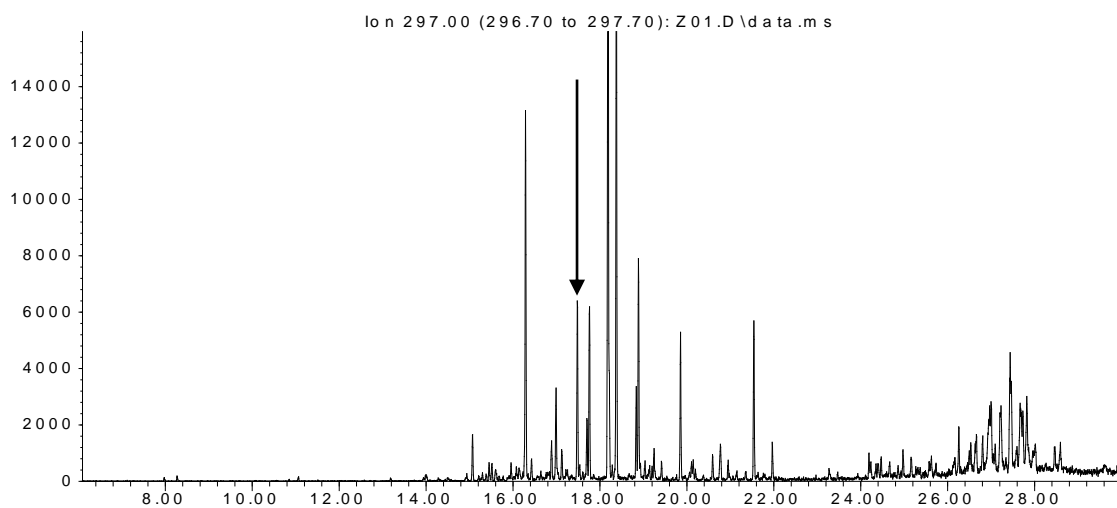


Time -->

Příloha 2 – Chromatogramy kyselin vanilové a *p*-kumarové vzorků listů máty peprné

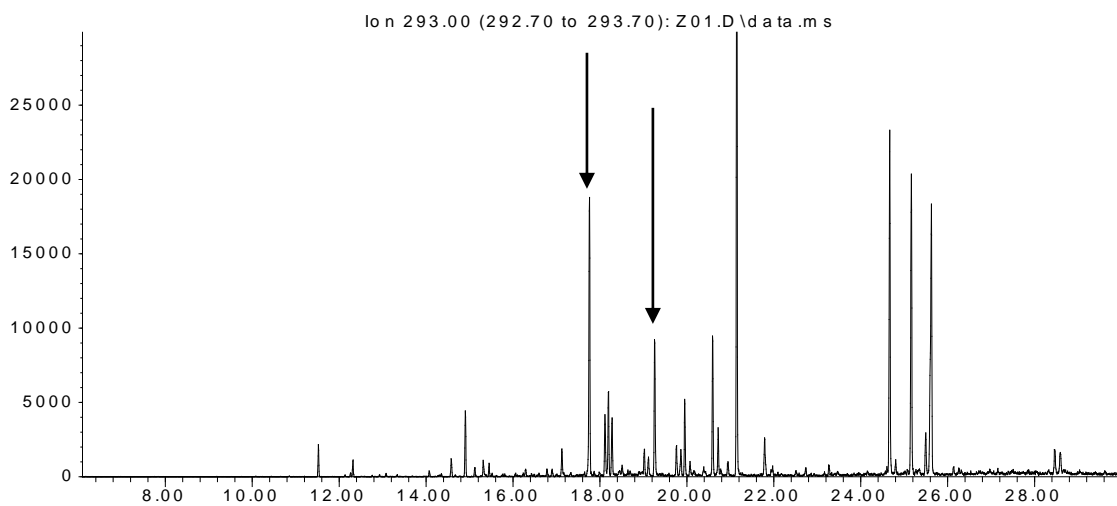
Máta peprná (list) – kyselina vanilová

Abundance



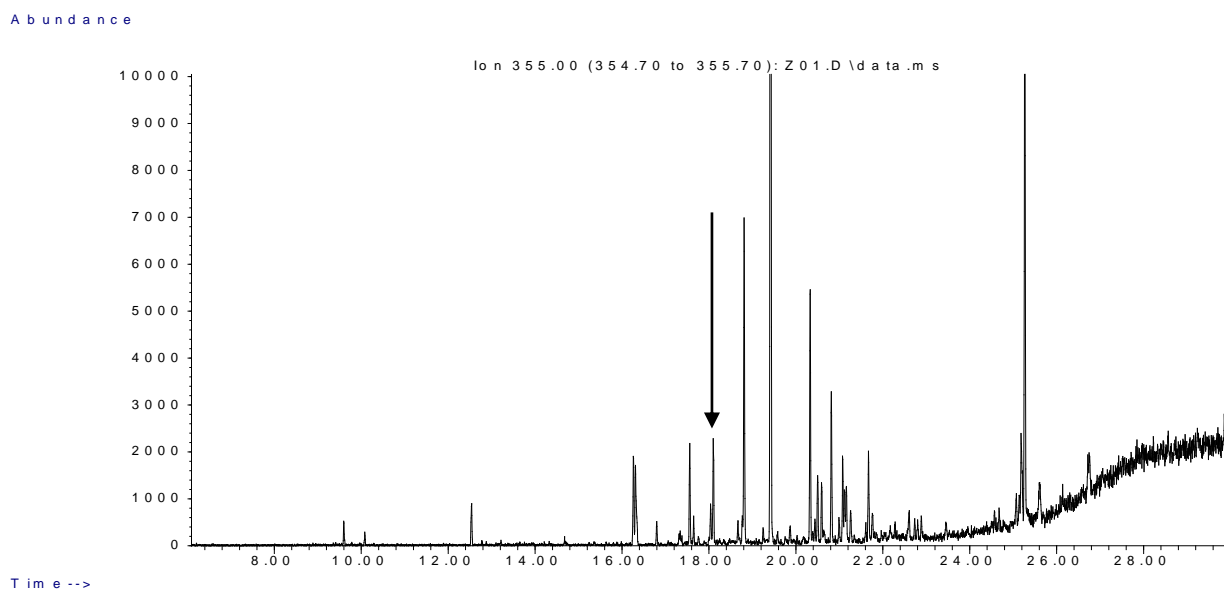
Máta peprná (list) – kyselina *p*-kumarová (vlevo *cis*-forma, vpravo *trans*-forma)

Abundance

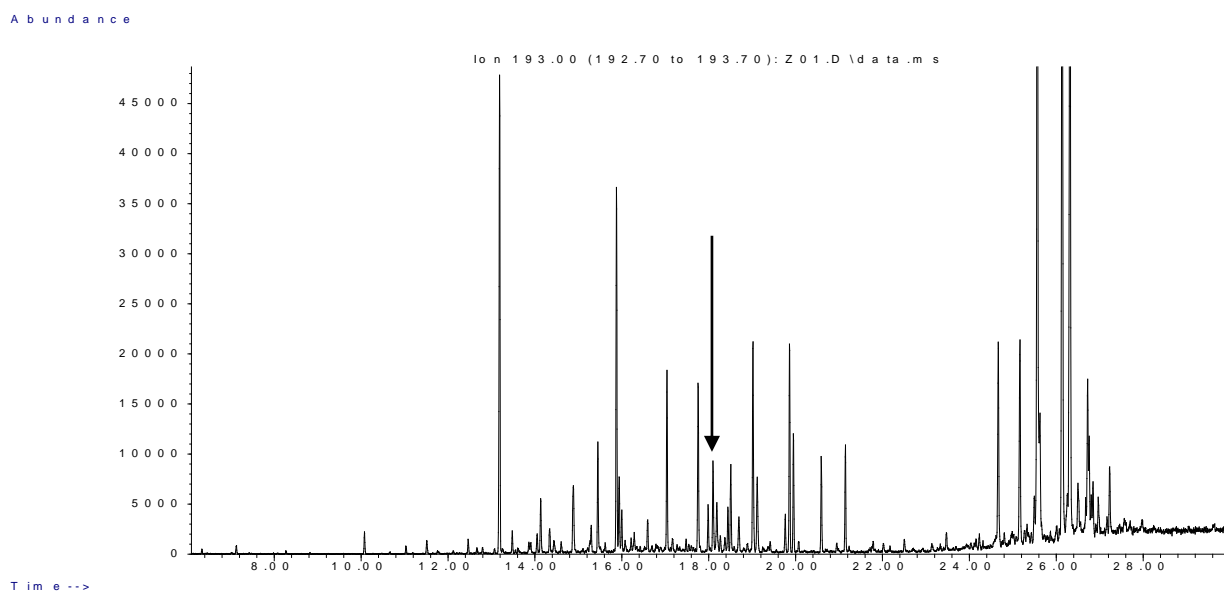


Příloha 3 – Chromatogramy kyselin 2,4-dihydroxybenzoové a protokatechové vzorků listů máty peprné

Máta peprná (list) – kyselina 2,4-dihydroxybenzoová



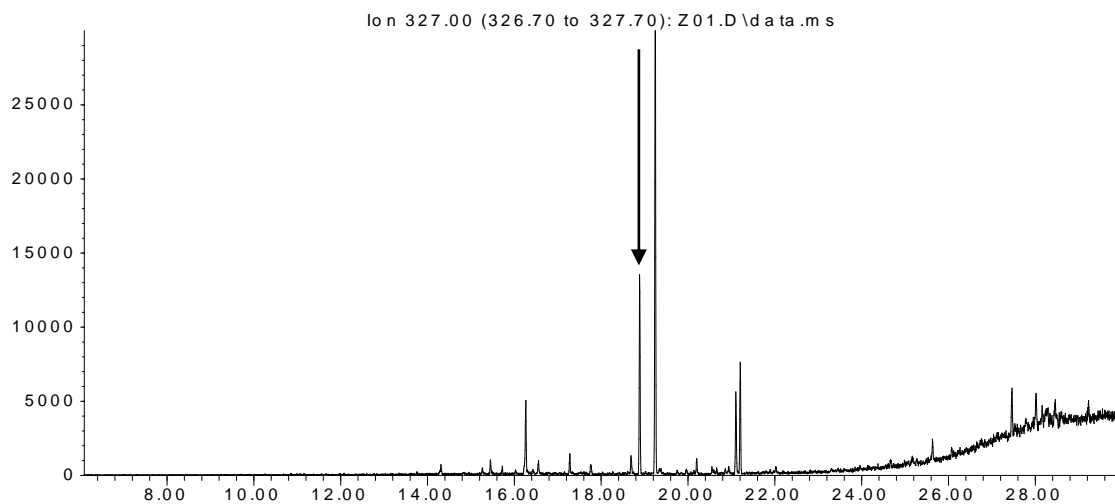
Máta peprná (list) – kyselina protokatechová



Příloha 4 – Chromatogramy kyselin syringové a ferulové vzorků listů máty peprné

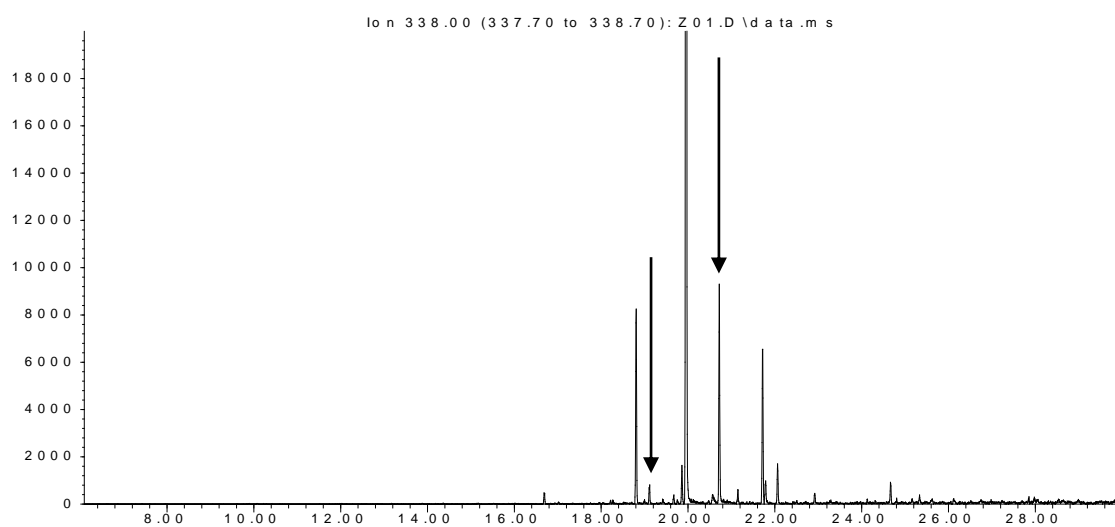
Máta peprná (list) – kyselina syringová

Abundance



Máta peprná (list) – kyselina ferulová (vlevo *cis*-forma, vpravo *trans*-forma)

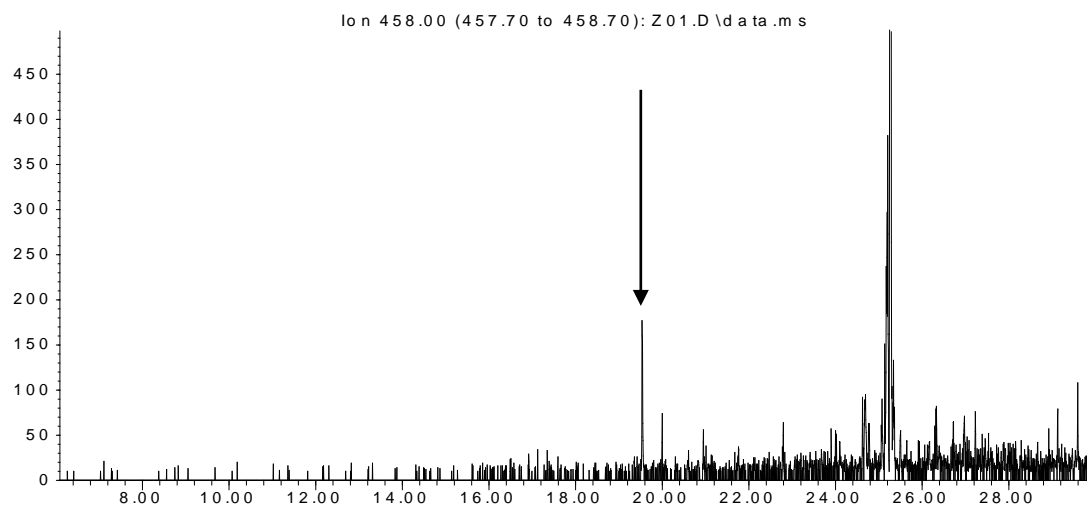
Abundance



Příloha 5 – Chromatogramy kyselin gallové a kávové vzorků listů máty peprné

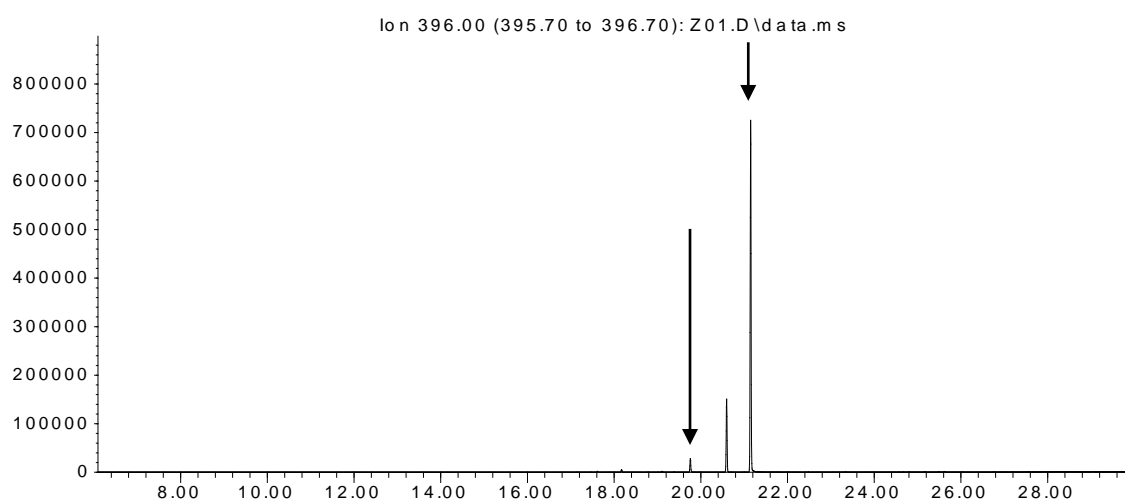
Máta peprná (list) – kyselina gallová

Abundance



Máta peprná (list) – kyselina kávová (vlevo *cis*-forma, vpravo *trans*-forma)

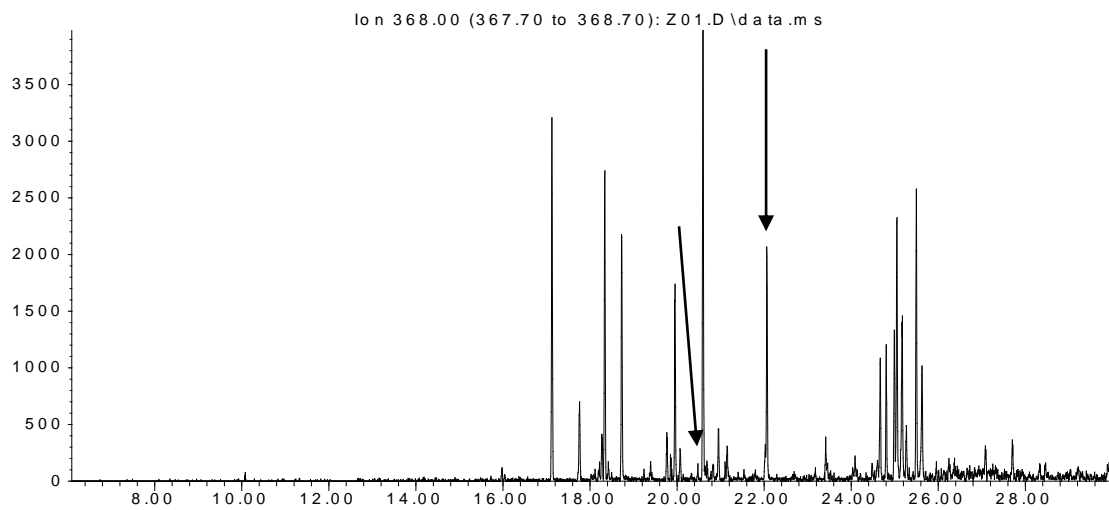
Abundance



Příloha 6 – Chromatogramy kyseliny sinapové vzorků listů máty peprné

Máta peprná (list) – kyselina sinapová (vlevo *cis*-forma, vpravo *trans*-forma)

Abundance



Time -->