



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OBSAHOVÉ LÁTKY KMÍNOVÉ SILICE

SUBSTANCES PRESENT IN CUMIN OILS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Renáta Suchánková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zdeněk Svoboda

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1587/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Renáta Suchánková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Zdeněk Svoboda**

Název bakalářské práce:

Obsahové látky kmínové silice

Zadání bakalářské práce:

1)Zpracování literární rešerše na téma:

- a)Kmín kořený (Carum Carvi) a jeho využití
- b)Složení kmínové silice a možnosti jejího využití

2)Experimentální část:

- a)Identifikace a stanovení obsahových látek v kmínových silicích metodou GC–MS
- b)Porovnání obsahových látek v různých kmínových silicích

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Renáta Suchánková
student(ka)

Ing. Zdeněk Svoboda
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Bakalářská práce je věnována významným látkám v kmínové silici. Stanovení látek jsem prováděla v laboratořích brněnského pracoviště Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. Je rozdělena na teoretickou a experimentální část s výsledky a jejich diskuzí.

Teoretická část popisuje kmín kořený (*Carum carvi*), jeho využití a dále složení kmínové silice včetně možnosti jejího využití.

Praktická část se zabývá identifikací a stanovením obsahových látek v kmínových silicích pomocí metody plynové chromatografie a hmotnostní spektrofotometrie (GC-MS). Zahrnuje také porovnání obsahových látek v různých kmínových silicích.

ABSTRACT

The bachelor thesis is devoted to important substances in caraway oil. The determination of substances was performed in the laboratories of the Brno Institute of Brewing and Malting, a.s. It is divided into theoretical and experimental part with results and their discussion.

The theoretical part describes caraway (*Carum carvi*), its use and composition of caraway oil, including the possibility of its use.

The practical part deals with the identification and determination of content substances in caraway essential oils by the method of gas chromatography and mass spectrophotometry (GC-MS). It also includes a comparison of the content of different caraway essential oils.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Kmín kořený, kmínová silice, GC-MS.

KEY WORDS:

Caraway seeds, caraway oil, GC-MS.

SUCHÁNKOVÁ, Renáta. *Obsahové látky kmínové silice*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124184>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Zdeněk Svoboda.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím uvedených pramenů a literatury. Bakalářská práce patří majetku Fakulty chemické VUT v Brně a ke komerčním účelům může být použita pouze se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkanem FCH VUT.

.....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji panu Zdeňkovi Svobodovi, vedoucímu mé bakalářské práce, a paní RNDr. Renatě Mikulíkové, Ph.D. za trpělivost, veškerou pomoc, cenné rady a připomínky, které mi v průběhu psaní poskytli. Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1918.

OBSAH:

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Historie kmínu.....	8
2.2	Popis rostliny.....	8
2.3	Agroekologické požadavky.....	8
2.4	Technologie pěstování.....	8
2.5	Choroby kmínu.....	9
2.5.1	Ochrana kmínu před chorobami	9
2.5.1.1	Fungicidní ošetření	9
2.5.1.2	Biologické ošetření.....	9
2.6	Škůdci kmínu.....	9
2.6.1	Plochuška kmínová (<i>Depressaria daucella</i>).....	9
2.6.2	Vlnovník kmínový (<i>Aceria carvi</i>)	10
2.7	Sklizeň kmínu.....	10
2.8	Kvalita kmínu.....	10
2.9	Obsahové látky.....	12
2.9.1	Majoritní látky kmínové silice.....	12
2.9.1.1	Minoritní látky kmínové silice	15
2.9.2	Využití kmínové silice.....	16
2.10	Využití a účinky kmínu	16
2.11	Zajímavosti o kmínu.....	17
2.12	Metody stanovení obsahu kmínové silice a jejího složení	17
2.12.1	Analýza silice	17
2.12.1.1	Stanovení obsahu kmínové silice	17
2.12.1.2	Stanovení obsahových látek v kmínové silici.....	19
3	CÍL PRÁCE.....	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1	Materiál	22
4.2	Pomůcky a příslušenství	22
4.3	Chemikálie.....	22
4.4	Pracovní postup	23
4.4.1	Příprava standardních roztoků	23

4.4.1.1	Karvon a limonen	23
4.4.1.2	α -pinen, β -pinen, 1,8-cineol, linalool	23
4.4.2	Příprava kmínové silice	23
4.4.2.1	Ředění kmínové silice	23
4.4.3	Kvalitativní stanovení.....	24
4.4.3.1	Nastavení parametrů GC-MS metody	24
4.5	Identifikace	24
4.6	Validace měření.....	26
4.6.1	Mez detekce (LOD).....	26
4.6.2	Mez stanovení (LOQ).....	26
4.6.3	Opakovatelnost měření.....	26
4.6.3.1	Průměr plochy píku	27
4.6.3.2	Směrodatná odchylka	27
4.6.3.3	Relativní standardní nejistota	27
4.6.3.4	Rozšířená relativní standardní nejistota.....	27
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	28
5.1	Obsahové látky kmínové silice.....	28
6	ZÁVĚR.....	31
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	32
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	35
9	SEZNAM PŘÍLOH.....	35
10	PŘÍLOHY	36

1 ÚVOD

Kmín kořený (*Carum carvi* L.) se řadí mezi nejstarší rostliny, které se používají v lékařství i v kulinářství jako koření.

Patří mezi žádané tržní plodiny a v českých zemích je jeho pěstování dlouholetou tradicí. V České republice bylo roku 1996 založeno sdružení „Český kmín“, které zajišťuje kvalitu při pěstování českých odrůd kmínu (Kepron, Rekord a Prochan) a tím i vysokou úroveň v českém kmínařství. [1]

Kmín kořený pochází ze Střední a Malé Asie a jeho plody byly objeveny při archeologických výzkumech z 3. tisíciletí před naším letopočtem. První semena kmínu byla nalezena v 5000 let starých sedimentech jezera ve Švýcarsku. [2]

Dnes je kmín rozšířen po celém světě, v Evropě (kromě Středozeří), v severozápadní Africe, ve střední Asii, v severním Íránu, severozápadní Číně, Mongolsku, Afghánistánu, na Kavkaze, Dálném východě a na Sibiři. [2]

Na našem území se vyskytuje na různých stanovištích i jako planá rostlina. Nejvíce roste v oblasti podhůří a pahorkatin, na divokých loukách, pastvinách, mezích, na kamenitých svazích, ale i na mezích a okrajích cest, převážně na vlhčích půdách bohatých na živiny.

Semena kmínu se využívají v potravinářském průmyslu při výrobě pekařských a cukrářských výrobků, do zeleninových a masových konzerv a při výrobě likérů. Uplatnění nacházíme i ve farmaceutickém a kosmetickém odvětví. Ze semen kmínu se získávají cenné etherické oleje nazývané silice.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Historie kmínu

Kmín kořený roste téměř v celé Evropě (kromě Středomoří), v severozápadní Africe, na Kavkaze, ve Střední Asii, Afghánistánu, Mongolsku, severozápadní Číně a pravděpodobně pochází z Malé a Střední Asie. Jedná se o nejstarší rostlinu používanou jako koření i v lékařství. Kmínové plody byly objeveny při archeologických výzkumech z 3. tisíciletí před naším letopočtem. Již staří Arabové, Egypťané, Římané a Řekové používali kmín k dochucování pokrmů a oblíbený byl i olej, který byl lisovaný ze semen. [2]

2.2 Popis rostliny

Kmín kořený (*Carum carvi* L.) je fakultativně dvouletá bylina z čeledi *Apiaceae* (miříkovité) s křovitým kořenem. V jižní Evropě se vyskytuje jako jednoletá bylina, častěji je nacházena ve dvouleté formě. Rostliny dorůstají do výšky až 100 cm. Lodyhy jsou přímé, obloukovitě vystoupavé, hladké až jemně rýhované. Květenství je ploché a tvořeno 8 až 11 okolíky s 15 až 18 květy. [2]

Listy kmínu příjemně voní, jsou drobně dělené a připomínají listy kapradiny. [3]

Plody kmínu mají elipsovité až vejčité tvar dvounažky, zatímco semínka jsou měsíčkovitě prohnutá, zašpičatělá a s 5 vystouplými žebry. [2]

2.3 Agroekologické požadavky

Kmín kořený roste na loukách, pastvinách, travnatých plochách, mezích, v příkopech. Pro pěstování jsou nejvhodnější semiaridní půdy, což jsou půdy střední a lehčí s dostatečným množstvím vápna a humusu. Vhodné jsou půdy kryté před větrem a neutrální půdní reakcí s pH 6-7,5. K pěstování se nehodí půdy zamokřené, těžké, velmi mělké, písčité, vysychavé a velmi zaplevelené. U nás se rostlina planě vyskytuje zejména v oblasti pahorkatin a podhůří, méně v nížinách a horských oblastech. Kmín je rostlina, která je velmi náročná na světlo, vodu a nenáročná na teplo. V prvním roce potřebuje kmín vodu nejvíce v srpnu a v druhém roce zejména v oblasti růstu od konce dubna do konce května. V době kvetení prodlužují dlouhodobé srážky kvetení, dochází k nerovnoměrnému dozrávání, což má za následek snížení kvality jeho produkce. [2]

2.4 Technologie pěstování

Vysévání kmínu je do hloubky 1,5 až 2 cm do řádků s rozpětím 12,5 až 30 cm. Pozemek před setím kmínu hnojíme fosforečnými hnojivy v množství 40 až 50 kg na jeden hektar před koncem vegetace na podzim v prvním roce. Dusík se aplikuje děleně, kdy první 2/3 celkové dávky se dodají kmínu při výsevu, před setím ve formě ledkové nebo formou síranu amonného. Pokud jsou porosty velmi řídké, což odpovídá méně než 100 rostlin na m², nebo nedostatečně vyvinuté, přihnojujeme ledkovou formou. Při výsevu kmínu v teplejších oblastech je třeba nejpozději do konce dubna. Při pozdějším výsevu (červen, červenec) dojde ke snížení výnosu. [2]

2.5 Choroby kmínu

Choroby kmínu se mohou vyskytovat kvůli špatnému zdravotnímu stavu osiva, při rotaci plodin, v přehoustlých porostech, průběhu povětrnostních podmínek. Při nízkých teplotách a vyšší četnosti srážek se vyskytují choroby hub rodu *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Mycocentrospora*, *Pythium* a bakteriózy. Za suchých a teplých podmínek postihují kmín houby rodu *Ascochyta*, *Erysiphe*, *Phoma* a *Septoria*. [4]

Nejčastější choroby kmínu: [4]

- hnědá hniloba stonků a spála květů kmínu (*Mycocentrospora acerina*)
- bílá hniloba kmínu (*Sclerotinia sclerotiorum*)
- padlí kmínu (*Erysiphe heraclei*)
- bakteriální spála kmínu (*Pseudomonas syringae* pv *apii*)

2.5.1 Ochrana kmínu před chorobami

Existuje několik způsobů jak kmín chránit před různými chorobami. Je nutné vysetí kvalitního a zdravého osiva na půdu nezamořenou sklerocií nebo na pozemky, které by byly v blízkosti remízků a příkopů, kde by se vyskytovaly divoce rostoucí rostliny (okoličnaté) z čeledi *Apiaceae*. [4]

2.5.1.1 Fungicidní ošetření

Fungicidní ošetření se provádí před kvetením proti hnědé pruhovitosti a bakteriolýze, v průběhu kvetení a dokvétání proti askosporové infekci způsobené bílou hnilobou u rostlin a askochytou či fomou. Lze ho použít i proti padlí po odkvětu. Mezi fungicidní přípravky patří Kuprikol, ve kterém je účinná látka oxichlorid měďnatý. V přípravku Champion 50WP je obsažen hydroxid měďnatý a používá se zejména na hnědou skvrnitost kmínu. [4]

2.5.1.2 Biologické ošetření

Při biologickém ošetření se aplikuje bioagens buď na osivo nebo do půdy během setí, aby v průběhu hibernace redukovala klíčivost v půdě. Patří sem přípravky Gliorex, Polymix a Clonoplus. [4]

2.6 Škůdci kmínu

Největší škody na kmínu páchá plochuška kmínová (*Depressaria daucella*) a vlnovník kmínový (*Aceria carvi*). Mezi další škůdce kmínu se řadí různé druhy mšic, nejvíce nebezpečná je dutilka topolová (*Pemphigus bursarius*), obaleči z rodu *Cnephasia*, křísi, ploštice, třásněnky a truběnký. Mšice ničí květenství i kořeny a na jejich hubení není registrován žádný insekticid. V zimě napadají kmín nejčastěji myši a hraboši. [2], [4], [5]

2.6.1 Plochuška kmínová (*Depressaria daucella*)

Plochuška kmínová je housenka nenápadného motýla s rozpětím křídel až 2,5 cm. Na jaře se dospělí jedinci páří a samičky kladou vajíčka na stopky květů. Po 10 dnech se z nich líhnou housenky, které se vyvíjí 5-6 týdnů. Před kuklením opustí chodbičky a přemísťují se do okolíku, kde ožirají květy a také nažky. Noví dospělci se objevují v červenci a srpnu a hledají místo na přezimování. Některé z nich žijí

skryté a je tedy obtížné je zahubit, navíc nálety motýlů mají během sezóny několik vrcholů. Používají se organofosfátové, pyrethroidní, biologické přípravky, a to ihned při objevení prvního výskytu housenek. [2], [6]

2.6.2 Vlnovník kmínový (*Aceria carvi*)

Vlnovník kmínový je roztoč se dvěma páry noh a velikosti 0,2 mm. Kmín napadá v obou letech vegetace a během prvního roku pěstování nejsou vidět žádné známky poškození rostliny. Přenáší se pasivně vzduchem. Po přezimování se dospělci rozmnožují v dubnu. Před vstupem rostliny do fáze generativní se mohou listy deformovat, případně vytvořit žlutou mozaiku. Napadení rostliny se projeví nejvíce na okolicích, které nenesou nažky, ale hálky. Přípravek na ochranu porostů je Sanmite 20WP a jeho aplikace se doporučuje při zakládání nových porostů v době dozrávání a sklizně kmínu v okolí.

[2], [4], [6]

2.7 Sklizeň kmínu

Dozrávání kmínu probíhá v teplejších oblastech koncem června a v mírnějších polohách během července. Sklízí se v případě, pokud jsou dvě třetiny okolíků zralých. Rostliny žloutnou, listy jsou hnědé a semeno tvrdé. Aby nedošlo k poškození kvality nažek, nedoporučuje se sklizeň oddalovat. Pokud se sklizeň provede předčasně, pektinové látky zabrání oddělení jednotlivých nažek. Sklizení se provádí žacími stroji nebo kombajny na velkých plochách, je však nutné, aby byla semena v okolíku řádně vyzrálá. Zmenšení ztrát docílíme při sklizni časně zrána, večer a případně v noci. Žací stroj seká rostliny a váže do snopků po 15-20 kusech, které musí proschnout. Mláčení kmínu probíhá na mlátičkách s lištovými bubny, nesmí dojít k porušení nažky. Následně se semena čistí a třídí, uskladňují se na sýpce nebo se balí do obalů podle požadavků zákazníka. Během skladování je nutné zabránit nežádoucí kontaminaci, protože semena kmínu mohou snadno zplesnivět, zapáchat nebo se zapařit. Je také nutné chránit kmín před škůdci a vyvarovat se vlhku, protože semena kmínu ve vlhku hořknou. [2], [5]

2.8 Kvalita kmínu

Pro potravinářský průmysl kvalitu kmínu stanovuje vyhláška č. 419/2000 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a po úpravě zákonem č. 316/2004 Sb. Tento zákon určuje požadavky na smyslovou, fyzikální a chemickou jakost. Fyzikální a chemické hodnoty se nařizují podle technické normy ČSN ISO 5561, která platí od roku 1997. [2]

Tabulka 1: Požadavky na kmín celý, tmavý a světlý podle ČSN ISO 5561 [2]

Kmín tmavý s tvorbou plodů v 2. roce	Kmín tmavý jsou téměř zralé plody (dvounažky) <i>Carum carvi</i> L. Plody se po sušení mlácením rozdělí na dvě nažky. Nažky jsou dlouhé 4-6 mm, srpovitého tvaru, s pěti podélnými světle žlutými až okrovými žebry. Povrch mezi žebry je hnědý.	
Kmín světlý s tvorbou plodů v 1. roce	Kmín světlý vykazuje stejné znaky jako kmín tmavý. Nažky jsou poněkud menší a světlejší.	
Vůně a chuť	Chuť kmínu musí být typická a aromatická. Výrobek musí být bez cizích pachů a příchutí včetně zatumlosti. Vůně tmavého kmínu je výraznější než u kmínu světlého.	
Napadení hmyzem, plísněmi apod.	Kmín nesmí obsahovat živý hmyz, plísně a musí být v podstatě prostý od mrtvého hmyzu, částic hmyzu a znečištění způsobeného hlodavci, viditelných pouhým okem. Pokud je zvětšení větší než desetinásobné, musí být tato skutečnost uvedena v protokolu o zkoušce. Kmín tmavý a světlý nesmí být napaden houbou <i>Sclerotinia</i> .	
Příměsi	Pro účely této normy se za příměsi považují	všechny části rostlin kmínu tmavého nebo kmínu světlého kromě semen
		všechny ostatní příměsi živočišného, rostlinného nebo minerálního původu
	Celkový obsah příměsí v kmínu tmavém a světlém, stanovený podle metody uvedené v ISO 927 nesmí být vyšší než 1% (mm/mm)	
Chemické požadavky		
Vlastnosti	Kmín tmavý dvouletý	Kmín světlý jednoletý
Vlhkost	nejvýše 13 %	nejvýše 12 %
Celkový popel	nejvýše 8 %	nejvýše 9 %
Popel nerozpustný v kyselině	nejvýše 1,5 % v sušině	nejvýše 2 % v sušině
Silice, % v sušině, nejméně	nejméně 2,5 % v sušině	nejméně 1,5 % v sušině
Obsah silic musí být stanoven ihned po rozemletí		

V České republice se kvalita názek kmínu pro farmaceutický průmysl řídí podle Českého lékopisu z roku 2009.

Tabulka 2: *Carvi fructus* – plod kmínu (Český lékopis 2009) [2]

Droga	Obsah silice**	Obsah vody*	Celkový obsah popela
<i>Carvi fructus</i> (usušená nažka druhu <i>Carum carvi</i> L.)	min. 30,0 ml/kg bezvodé drogy	max. 100,0 ml/kg	max. 7,0 %

*obsah vody = procentuální podíl vody ve zkoušené látce, stanovuje se destilací

**obsah silice se přepočítává na bezvodou drogu nebo na vysušenou drogu

2.9 Obsahové látky

Nejvýznamnějšími složkami kmínu jsou silice v obsahu 3-7%. [2]

Silice se také nazývají etherické oleje. Jedná se o složité směsi těkavých látek zastoupených v přírodních rostlinných materiálech, které se mohou získávat z různých částí rostlin (např. květ, stonky, semena, kořen). U kmínu se silice získávají ze semen. [7]

Majoritními látkami jsou (*R*)-(+)-*limonen* a (*R*)-(-)-*karvon*. V procesu dozrávání dochází ke zvýšení obsahu karvonu, zatímco podíl limonenu klesá. Obsahuje i jiné terpeny: α -*felandren*, α -*pinen*, *dihydrokarvyl*, *1,8-cineol*, *linalool*. Dále je přítomen olej (10-18 %), proteiny (20 %), sacharidy, flavonoidy, β -karoten a minerální látky (vápník, hořčík, draslík, fosfor). [2]

2.9.1 Majoritní látky kmínové silice

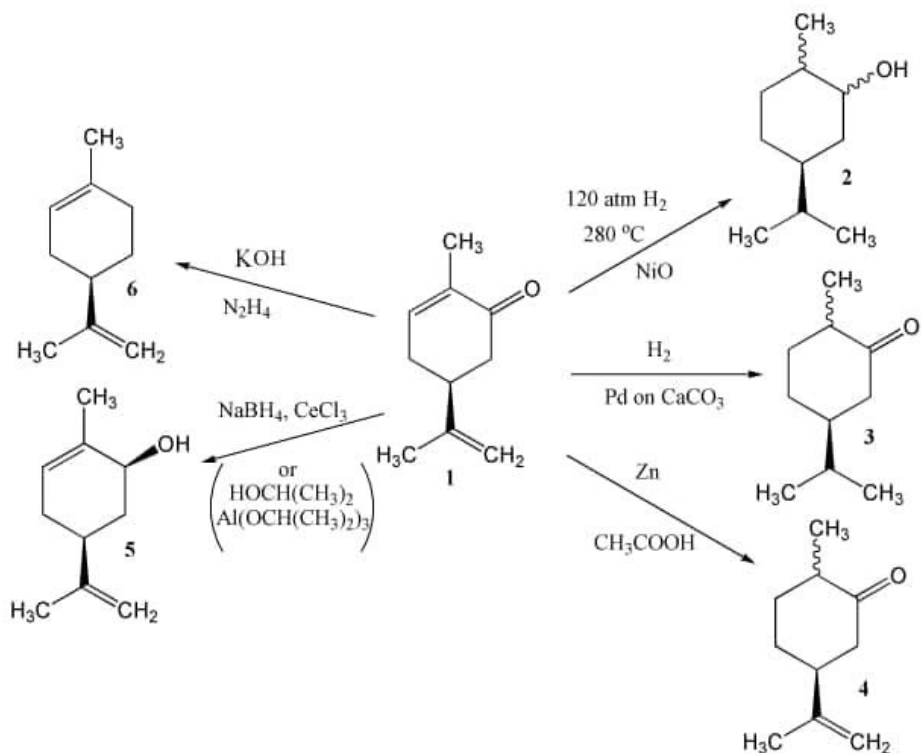
(*R*)-(-)-*karvon*

Chemický název karvonu je 2-methyl-5-(1-methylenyl)-cyklohexen-1-on. Řadí se do skupiny modifikovaných terpenů (monoterpenoidů), což jsou látky obsahující kyslíkovou skupinu nebo jim chybí skupina methylová. Je to bezbarvá olejovitá kapalina s charakteristickou chutí a vůní po mátě, nerozpustná ve studené vodě a částečně rozpustná v horké vodě. Kromě kmínové silice, kde zaujímá 55 %, se vyskytuje i v mnoha jiných například v levanduli, zázvoru, pomerančích, mandarinkách, citrónu, eukalyptu, černém rybízu, anýzu, jalovci a ve všech druzích máty. [8], [9].

Karvon je velmi reaktivní látka, mohou zde probíhat redukce, oxidace, konjugace.

1. Redukce karvonu

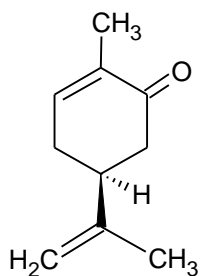
Karvon poskytuje tři dvojně vazby schopné redukce, přičemž konečné produkty závisí na podmínkách reakce a použitých redukčních činidlech. Produktem katalytické hydrogenace může vzniknout karvomenthol nebo karvomenthon. Redukcí zinku v prostředí kyseliny octové se karvon redukuje na dihydrokarvon. V kombinaci borohydridu sodného s chloridem ceritým nebo v prostředí izoproperoxidu hlinitého s propan-2-olem je výsledným produktem karveol. Wolf-Kižnerovou redukcí za přítomnosti hydroxidu draselného a hydrazinu vzniká limonen. [10]



- Kde je
- 1 karvon
 - 2 karvomenthol
 - 3 karvomenthon
 - 4 dihydrokarvol
 - 5 karveol
 - 6 limonen

Obrázek 1: Redukce karvonu [10]

2. Oxidace karvonu probíhá v přítomnosti hydroxidu barnatého, za současné oxidace vzduchem či kyslíkem za vzniku diketonu, s reakcí s peroxidem vodíku se získá epoxid, případně může být oxidován ozonem nebo manganistanem draselným. [10]

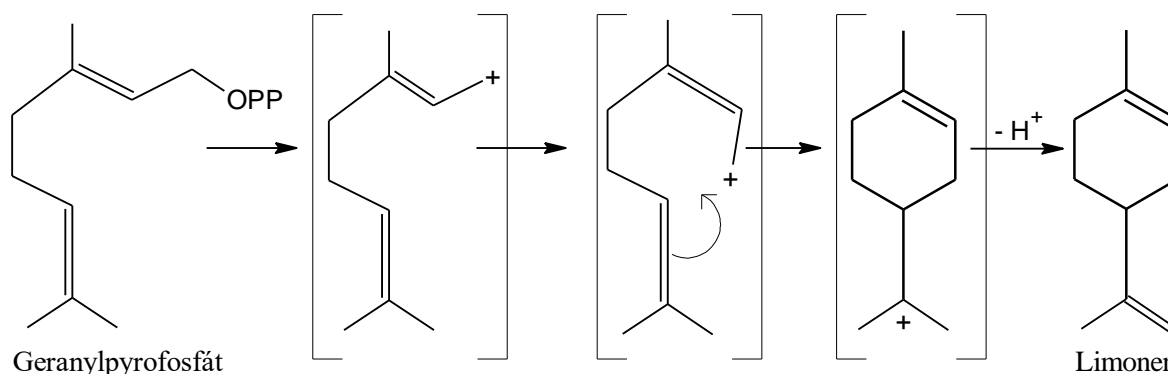


Obrázek 2: Strukturální vzorec (*R*)-(-)-karvonu

(R)-(+)-limonen

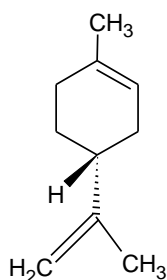
Chemický název limonenu je *(R)*-4-isopropenyl-1-methyl-1-cyklohexen. Jedná se o uhlovodík, který patří do skupiny cyklických terpenů, monoterpenů. Monoterpeny obsahují v molekule dvě isoprenové jednotky. V křemíkové silici zaujímá limonen asi 44 %. Používá se jako prekurzor v syntéze karvonu, slouží jako činidlo pro rozpouštění polystyrenu, může být použit v kosmetických výrobcích, léčivech nebo v repelentních a insekticidních přípravcích. [10], [11]

Biosyntéza limonenu probíhá v přírodě z geranylpyrofosfátu. Nejprve dojde k odštěpení fosfátu a vzniku karbokationu. Nerylkarbokation se zacyklí a při následné dehydrogenaci z kationtu vzniká limonen. [12]



Obrázek 3: Biosyntéza limonenu [12]

Limonen tvoří dva enantiomery, *(R)* a *(S)*, častěji se vyskytuje v *(R)*-formě. Limonen je látka charakteristické vůně po pomerančích, je hlavní složkou oleje z kůry citrusových plodů a jeho pryskyřice charakterizují řadu jehličnatých stromů (smrk, cedr, borovice, modřín) a listnatých stromů (červený a stříbrný javor). [13]

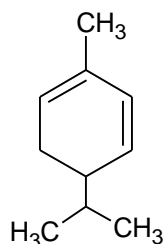


Obrázek 4: Strukturální vzorec *(R)*-(+)-limonenu

2.9.1.1 Minoritní látky kmínové silice

α -felandren

Chemicky se nazývá 5-isopropyl-2-methyl-1,3-cyklohexadien. Bezbarvá kapalná látka řazená mezi deriváty monoterpenů. Vyznačuje se přítomností v citrusových silicích, v mandarinkách a citrónu. [7]



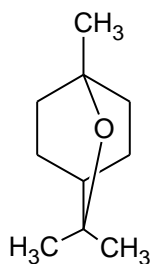
Obrázek 5: Strukturální vzorec *α -felandrenu*

1,8-cineol

Známý pod synonymem eukalyptol. Je látka nerozpustná ve vodě, ve velkých dávkách toxická, spadá do třídy monoterpenoidů a cyklických etherů.

Má osvěžující, kafrovou a kořenovou vůni. Obsahuje silice v listech mnoha rostlin (bobkový list, bazalka pravá, šalvěj lékařská, rozmarýna lékařská). [14]

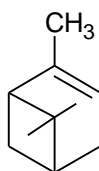
Využívá se jako ochucovadlo v sirupech proti kašli, jako aroma ve žvýkačkách, ve výrobcích kosmetického průmyslu (parfémy, mýdla, šampony, ústní vody, kloktadla, pasty). [15]



Obrázek 6: Strukturální vzorec *1,8-cineolu*

α -pinen

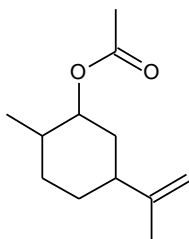
Organická, nasycená, cyklická látka ze třídy terpenů, reaktivní díky přítomnosti čtyřčlenného kruhu a dvojně vazby. Přítomen v silicích bergamotu, mandarinky, citrónu, grapefruitu. [7]



Obrázek 7: Strukturální vzorec *α -pinenu*

Dihydrokarvyl-acetát

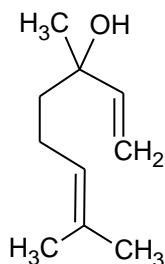
Nasycený derivát karvonu. Čirá, bezbarvá kapalina se sladkou, květinovou vůní po růžích a podobající se příchuti máty. Vyskytuje se v celeru a olejích vyrobených z máty. Připravuje se acetylací dihydrokarveolu. [16]



Obrázek 8: Strukturální vzorec *dihydrokarvyl-acetátu*

Linalool

Alifatický, nasycený monoterpen. Bezbarvá kapalina, nerozpustná ve vodě, mísí se s ethanolem a etherem. Vůni připomíná bergamot a zápach je bez kafrových či terpenických tónů. Synteticky lze připravit z myrcenu nebo dehydrolinaloolu. Častěji se vyskytuje v L-formě. Linalool je hlavní antimikrobiální složka levandulových etherických olejů. Připravují se z něj kosmetické výrobky, mýdla, detergenty a může se dočasně použít i jako potravinářská příchut', případně aromatické koření ananasu, broskve, čokolády. Najdeme ho v listech, květinách, kořenech. [17]



Obrázek 9: Strukturální vzorec *linaloolu*

2.9.2 Využití kmínové silice

Silice se často využívají na výrobu likérů, destilátů, u mýdel na parfemaci, v ústních vodách a k lékařským účelům. [18], [19]

2.10 Využití a účinky kmínu

Vůně kmínu je velmi aromatická, chuť lehce pálivá a s příchutí citrónu. [20]

Ze semen lze získat 14-16 % mastného oleje pro odvětví technické výroby. Po zpracování semen nebo vyextrahování oleje je vhodným krmivem pro skot, pro které je možno použít i kmínové slámy nebo jako stelivo. V době kvetení kmínu obsahuje rostlina med a slouží také na čištění polí od plevelů. [5]

V kuchyni se používá k dochucování pokrmů, polévek, omáček, salátů, masa, při pečení, zavařování zeleniny. Kmín je nezbytnou součástí v každé domácnosti, velmi oblíbený je v indické kuchyni. Z kmínové silice lze vyrobit kmínový likér, zvaný kmínka. [18]

V lidovém léčitelství napomáhá proti nadýmání a křečím v trávicím traktu, zklidňuje žaludek, podporuje činnost jater, žlučníku, odbourává bolest hlavy a migrénu, aktivuje proudění lymfatického systému, podporuje trávení mléka u kojenců a u žen podporuje laktaci. Po medikaci antibiotik nebo při výskytu kvasinek nebo plísní ve střevech dokáže obnovit mikroflóru střev. [21]

2.11 Zajímavosti o kmínu

V Norsku je kořen kmínu oblíbená zelenina jako petržel a mrkev. [3]

České odrůdy kmínu (Rekord, Prochan, Kepron) jsou neopadavé a také díky vysokému obsahu silic jsou na evropském i světovém trhu velice žádanou plodinou. V Nizozemí je odrůdou v této kategorii Bleija. [1]

2.12 Metody stanovení obsahu kmínové silice a jejího složení

Silice lze získat třemi hlavními způsoby, případně jejich kombinacemi. Nejčastěji se destilují materiály s vodní parou a dělením vrstvy silice z destilátu zejména u silic získaných ze dřeva, kořenů, listů, semen a stonků. Dále se mohou extrahovat nepolárními rozpouštědly například petroletherem nebo extrakce freony s oxidem uhličitým při nadkritických tlacích. Třetí způsob je lisování a dělení vrstvy silice z oplodí u citrusů. Silice obsahují velký podíl monoterpenových a seskviterpenových uhlovodíků. Chuť a vůni obsahují kyslíkaté látky převážně alkoholy, aldehydy, ketony a estery, protože silice tento význam nemají. Terpenové a seskviterpenové uhlovodíky způsobují zhoršení kvality silic kvůli omezené rozpustnosti silic ve zředěném ethanolu a dochází k oxidaci nebo polymeraci. Silice, které neobsahují monoterpenové uhlovodíky, se jmenují deterpenované a vykazují sensorické vlastnosti původní silice a nepodléhají autooxidaci. [7]

Silice v kmínu nacházíme buď pouze v určitém místě rostliny (květ, lodyha, list, plod) nebo v celém vnitřním prostoru. Silici můžeme izolovat pomocí metody destilace s vodní parou, extrakcí za přítomnosti organického rozpouštědla a lisováním. [22]

2.12.1 Analýza silice

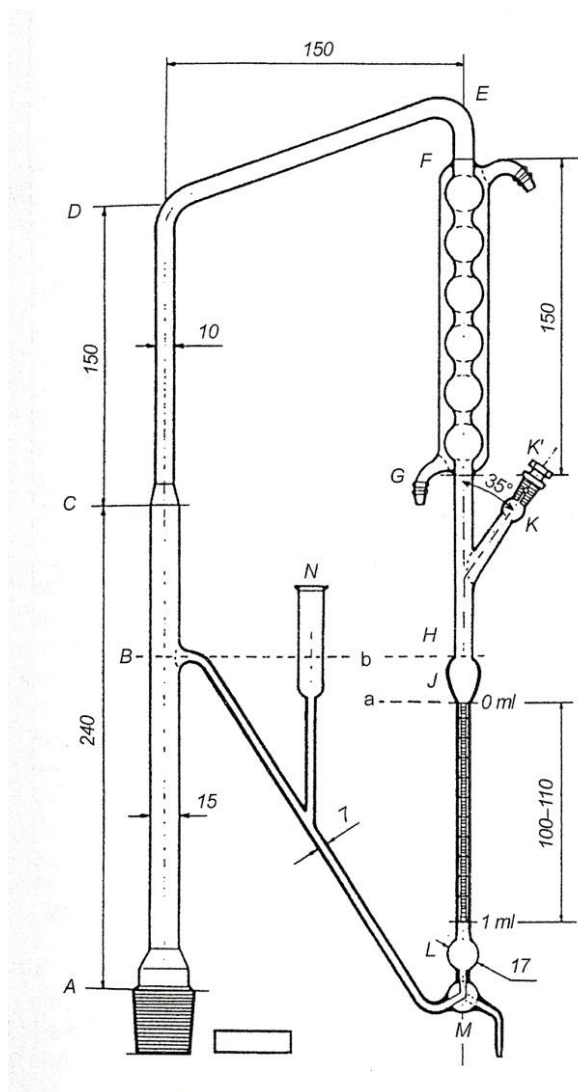
Při analyzování kmínové silice je nejprve nutné stanovit její obsah pomocí destilace s vodní parou nebo superkritickou extrakcí oxidu uhličitého. Poté se provádí stanovení obsahových látek v kmínové silici metodou plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem.

2.12.1.1 Stanovení obsahu kmínové silice

2.12.1.1.1 Destilace s vodní parou

Destilace je rozdělovací metoda závislá na různém složení kapaliny a z ní zkondenzované páry. Během procesu se při získání silic poškodí jemné složky silic. Je to nešetrná metoda, ale díky jednoduchosti, stabilním výsledkům a nízkým provozním nákladům se stala nejčastěji používanou. Silice je nutné izolovat ve speciálních přístrojích, kde dochází k navázání silic s vodní parou a po ochlazení znovu

zkapalní. Silice se zadrží na vodní hladině v rozšířeném místě přístroje (obrázek 10, místo J) a po propuštění do kapiláry lze odečíst objem a oddělit silici pro kvalitativní stanovení. [23]



Obrázek 10: Přístroj na stanovení obsahu silic v rostlinných drogách [24]

2.12.1.1.2 Superkritická extrakce CO₂

Superkritická extrakce oxidem uhličitým je separační metoda závislá na rozpouštění dané složky v rozpouštědle v superkritickém stavu. Superkritický stav kapaliny znamená, že je tekutina velmi pohyblivá a schopná se rozpouštět jako kapalná rozpouštědla. U oxidu uhličitého je kritická teplota 31°C, to znamená, že nad tuto teplotu nelze plyn postupným zvyšováním tlaku zkapalnit. V superkritickém stavu má velmi stlačitelný plyn řadu vlastností, se stoupající hustotou má vyšší rozpouštěcí schopnost, kterou lze ovlivnit změnou tlaku či teploty. Teplota extrakce probíhá při 40-50°C a tlaku 100-300 bar. V průběhu extrakce nedochází k uvolňování tepla ani k chemickým dějům. [25]

Výhody extrakce:

1. lze ji použít na citlivé látky, protože zde dochází k šetrným tepelným zákrokům.
2. výsledné produkty neobsahují zbytky rozpouštědla a vykazují největší čistotu, díky tomu nachází široké uplatnění v potravinářském i farmaceutickém průmyslu. [26]

2.12.1.2 Stanovení obsahových látek v kmínové silici

2.12.1.2.1 Plynová chromatografie

Separační metoda probíhající v kapilární či náplňové koloně. Kolona obsahuje stacionární fázi (sorbent) a mobilní fázi (nosný plyn, inertní plyn). Stacionární fázi je buď pevná látka (Plynová adsorbční chromatografie), nebo kapalina (Rozdělovací plynová chromatografie). Mezi adsorbenty patří aktivní uhlí, silikagel, molekulová síta. U rozdělovací plynové chromatografie tvoří stacionární fázi kapalinový film ukotvený na inertním nosiči či vnitřní stěně kapiláry. Mobilní fázi je inertní plyn sloužící k transportu analytů a měl by se co nejvíce chovat jako ideální plyn. Nosný plyn se volí podle použitého detektoru. U plamenově ionizačního detektoru se může využít vodík nebo helium. U tepelně vodivostního detektoru se volí helium, které má velmi blízko k ideálnímu chování plynu, nevýhodou je vysoká cena. U detektoru elektronového záchytu se používá dusík nebo směs argonu a methanu. U nosných plynů je nutné dodržovat vysokou čistotu, protože v případě nečistot by docházelo k nežádoucím interakcím mezi analytem a sorbentem. [27]

Do vyhřívaného nástřikového bloku se septem (injektor) se dávkuje vzorek, který je nutno rychle dopravit do kolony. Kapalně vzorky se ihned zplyňují. Nástřiková teplota by měla být vyšší o 50 °C než bod varu daného analytu. Existuje dávkování s děličem toku (pro vysoce koncentrované vzorky u kvalitativní analýzy) nebo bez děliče toku (pro zředěné vzorky u kvantitativního stanovení) a přímé dávkování na kolonu (u látek, které se za bodem varu rozkládají). Kapilární kolony mají stacionární fázi ukotvenou na vnitřní straně kapiláry o průměru 100-700 μm , délce 15-100 m, tloušťka nanesené vrstvy stacionární fáze je 0,1-10 μm . Vyrábějí se z křemene potaženého polyimidem nebo u kovových kolon tvoří křemen vnitřní stěnu. Náplňové kolony mají průměr 2-5 mm v délce od desítek centimetrů až do několika metrů a vyrábí se ze skla nebo nerezové oceli. [27]

Detektory v plynové chromatografii se volí podle aplikace a cíle stanovení, liší se principem, uspořádáním komponentů, selektivitou, citlivostí a mezí detekce. [27]

Typy detektorů [27]:

Tepelně vodivostní detektor

- Je univerzální.
- Zahřáté těleso je ochlazováno okolním prostředím odvádějícím teplo. Ochlazení vlákna závisí na tom, jaká látka prochází. Pokud pouze nosný plyn ochlazování je rovnoměrné, v případě, že nosný plyn obsahuje eluovanou látku, mění se teplota i elektrický odpor vlákna.
- Nevýhoda tepelně vodivostního detektoru je nižší citlivost než u jiných detektorů, dále není specifický a nedestruktivní.

Plamenový ionizační detektor

- Plyn se z kolony přivádí do kyslíko-vodíkového plamene, kde vznikají nabitě částice, v elektrickém poli vzniká elektrický proud.
- Používá se téměř u všech organických látek, kromě formaldehydu a chloridu uhličitého, nevhodný je pro anorganické plyny a páry.

Detektor elektronového záchytu

- Selektivní, ionizační a citlivý detektor na halogeny.
- Ionizačním zdrojem je tritium nebo ^{63}Ni , emitující částice β .
- β -záření inaktivuje dusík (nosný plyn), což způsobí vznik konstantního proudu pomalých elektronů, které vychytávají halogeny a snižují ionizaci. Intenzita snížení proudu odpovídá koncentraci elektronegativních atomů.

Hmotnostně spektrometrický detektor

- Citlivý, univerzální detektor pro identifikaci analyzovaných složek směsi.
- Fragmentují a ionizují se zde organické látky a výsledné spektrum vykazuje intenzitu jednotlivých iontů.
- K vyhodnocení záznamu z hmotnostního detektoru se používá knihovna hmotnostních spekter.
- Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie se řadí mezi nejpokrokovější analytické techniky dnešní doby.

2.12.1.2.2 Hmotnostní spektrometrie

Analytická metoda slouží k převedení molekul na ionty, které se pomocí hmotnostního spektrometru rozlišují podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. [28]

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, který převádí neutrální molekuly analytu na nabitě částice, hmotnostního analyzátoru sloužícího k dělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje, z detektoru, jenž detekuje ionty po rozdělení podle hmotnosti a náboje a určuje relativní četnosti jednotlivých iontů.

Dále sestává z vakuového systému, iontové optiky (pro rychlejší průběh a fokusaci iontů) a počítače pro ovládání, ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat a také na porovnání spekter s knihovnou. [28]

Ke vzniku hmotnostního spektra je zapotřebí nejdříve vytvoření iontů, jejich separace a detekce. Tyto děje probíhají v oblasti nízkých tlaků-ve vakuu. Tvar hmotnostních spekter odpovídá jednak způsobu ionizace látky i separaci iontů. Pro ionizaci molekul je nejčastěji využita hodnota 70 eV (ionizační energie elektronů). Nejbohatší a nejrozšířenější knihovnu spekter má separace v kvadrupólovém analyzátoru. [29]

Mezi výhody patří vysoká citlivost, selektivita, univerzálnost, malá spotřeba vzorku, kvantitativní analýza (odezva závisí na koncentraci) i kvalitativní analýza (elementární složení a strukturní informace). [29]

2.12.1.2.3 Spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Kombinace GC-MS je velmi účinná měřící technika umožňující získat hmotnostní spektra jednotlivých látek po plynově-chromatografickém rozdělení. [29]

Použití aplikace GC-MS je v dopingové kontrole, v soudní analýze (toxikologie), v průmyslu při speciální analýze složitých směsí [29]

Kombinace GC-MS byla použita v experimentální části bakalářské práce.

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je zpracování literární rešerše o kmínu kořeném (*Carum carvi*) a identifikace a stanovení obsahových látek v kmínové silici. Analýzy silic byly provedeny metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

Pro analýzu kmínové silice byly použity zakoupené vzorky kmínu v různých obchodních řetězcích v různém cenovém rozpětí. Celkem bylo analyzováno 5 vzorků kmínu.

4.2 Pomůcky a příslušenství

- Plynový chromatograf TRACE GC ULTRA 2000 (Thermo Finnigan, USA)
- Hmotnostní spektrometr TRACE DSQ (Thermo Finnigan, USA)
- Kapilární kolona DB-5MS (60 mm x 0,25 mm x 0,25 μ m) (J&W Scientific, USA)
- Tlaková láhev Helium – čistota 5,5 (Siad, ČR)
- Analytické váhy GE 512 – OCE (Sartorius, Hamburg Německo)
- Chladnička (Liebherr, Německo)
- Chlazený laboratorní mlýnek (IKA, Německo)
- Laboratorní sklo: odměrné baňky (5 ml, 10 ml), kádinky (50 ml),
vialky (2 ml), víčka se septy
pipety dělené (1 ml, 10 ml), mikropipety (10 μ l)
- Pasteurova pipeta
- Automatická pipeta
- Špičky
- Mikropipeta
- Destilace vodní parou

4.3 Chemikálie

Tabulka 3: Přehled použitých standardních aromatických látek

Název chemikálie	Sumární vzorec	Registrační číslo CAS	Molární hmotnost [g/mol]	Výrobce	Země původu
(R)-(+)-Limonen	C ₁₀ H ₁₆	5989-27-5	136,24	Sigma-Aldrich	Švýcarsko
(-)-Karvon	C ₁₀ H ₁₄ O	6485-40-1	150,22	Sigma-Aldrich	Izrael
1,8-cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	470-82-6	154,25	Sigma-Aldrich	USA
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	78-70-6	154,25	Sigma-Aldrich	Švýcarsko
(-)- α -pinen	C ₁₀ H ₁₆	7785-26-4	136,23	Sigma-Aldrich	USA
(-)- β -pinen	C ₁₀ H ₁₆	127-91-3	136,23	Sigma-Aldrich	Švýcarsko
n-hexan	C ₆ H ₁₄	110-54-3	86,18	Merck	neuveveno

Z výše uvedených aromatických látek byly připraveny standardní roztoky rozpuštěním v hexanu o koncentraci asi 1 mg/ml.

4.4 Pracovní postup

4.4.1 Příprava standardních roztoků

4.4.1.1 Karvon a limonen

Do dvou 10 ml zkumavek bylo napipetováno 8 ml hexanu, poté bylo pod hladinu pomocí mikropipety nadávkováno 5 μ l karvonu, respektive 5 μ l limonenu a baňky byly hexanem doplněny po rysku a obsah baňky byl promíchán. Takto připravené standardní roztoky byly před analýzou vhodně naředěny do 2 ml vialek a uzavřeny víčkem se septem.

4.4.1.2 α -pinen, β -pinen, 1,8-cineol, linalool

Do čtyř 10 ml zkumavek bylo napipetováno 8 ml hexanu a pomocí mikropipety nadávkováno 10 μ l jednotlivé standardní látky a baňky byly hexanem doplněny po rysku a obsah byl promíchán. Takto připravené standardní roztoky byly před analýzou vhodně naředěny do 2 ml vialek a uzavřeny víčkem se septem.

4.4.2 Příprava kmínové silice

Vzorky kmínu byly před destilací s vodní parou pomlety na chlazeném laboratorním mlýnku. Do 500 ml destilační baňky bylo naváženo 10,0 g mletého kmínu a přidáno 200 ml destilované vody. Směs v destilační baňce byla vložena do topného hnízda a připojena na destilační aparaturu s vodní parou. Destilace s vodní parou s uvedeným množstvím kmínu probíhala podle Českého lékopisu (1997) po dobu 90 minut. [30]

Po skončení destilace byla vydestilovaná silice odebрана do 2 ml ependorfovy vialky. Vzorek ve vialce byl centrifugován 5 minut při 12 000 ot./min, poté byla odebrána čistá silice. Před vlastní analýzou byla kmínová silice vhodně naředěna do 2 ml vialek, které byly uzavřeny víčkem se septem a poté byla analyzována metodu plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

4.4.2.1 Ředění kmínové silice

Pro stanovení majoritních složek v kmínové silici, tedy karvonu a limonenu, byl vzorek naředěn hexanem 10 000x a pro stanovení minoritních složek byl vzorek naředěn hexanem 1 000x.

4.4.3 Kvalitativní stanovení

Standardní roztoky karvonu, limonenu, α -pinenu, β -pinenu, 1,8-cineolu, linaloolu a vzorky kmínové silice byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. GC-MS je řízena přes počítač softwarem Xcalibur, kde je zapsána sekvence pořadí analýz vzorků. Je nutné zadat název vzorku, pořadí vzorků v držáku autosampleru a metoda GC-MS analýzy vzorků a nastavit parametry sekvence. Následně se automaticky spustí měření.

4.4.3.1 Nastavení parametrů GC-MS metody

Tabulka 4: Parametry GC-MS metody

Parametr sekvence	Hodnota
Teplota kapilární kolony	50°C/ 30 s
Teplotní program	5°C/1 min do 150°C/ 5 min
Průtok nosného plynu helia	1,5 ml/min
Teplota injektoru	250°C splitless 1 min
Teplota transfer zóny	200°C
Teplota iontového zdroje	200°C
Energie elektronové ionizace	70 eV
Hmotnostní detektor	Full scan 20-450

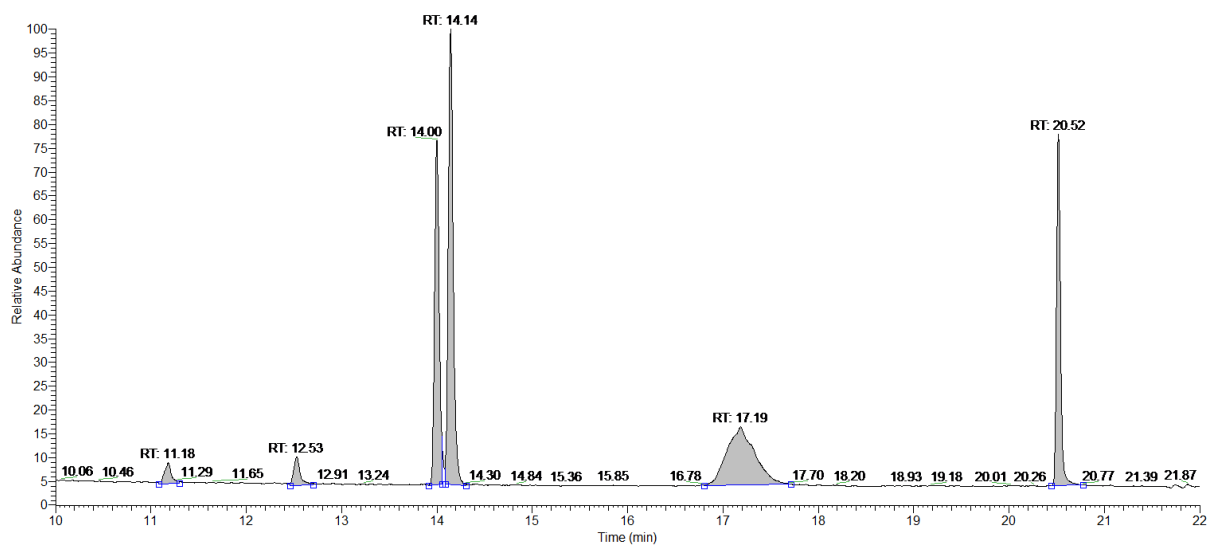
4.5 Identifikace

Výsledkem analýzy je chromatogram a hmotnostní spektrum. Integrované plochy píků byly následně vyexportovány do Excelu. Obsah jednotlivých složek silice byl vyjádřen jako jejich relativní procentuální zastoupení vztahené na plochy píků.

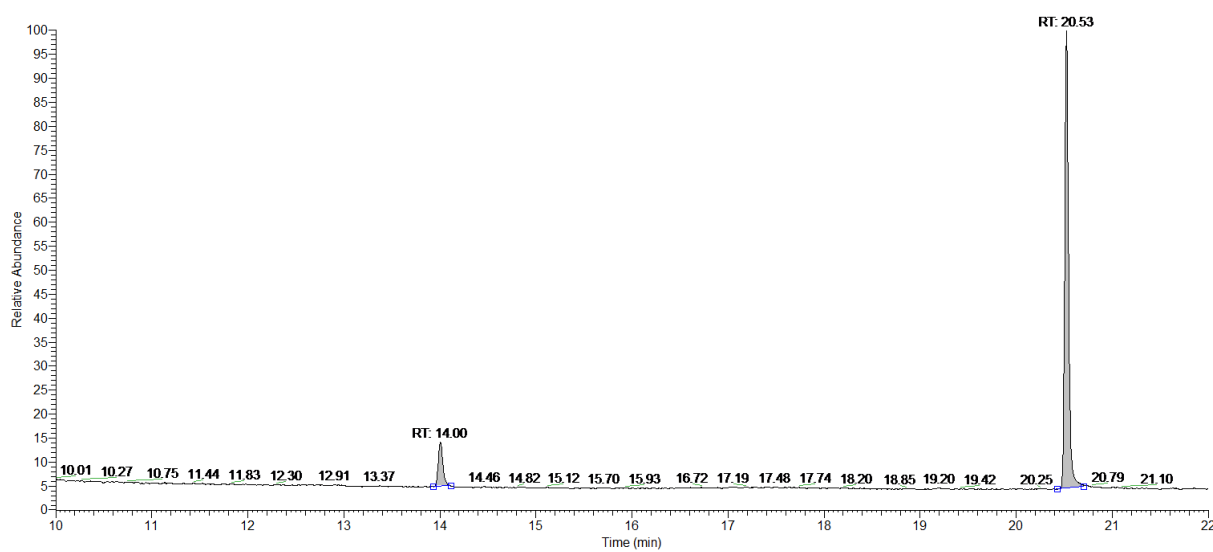
Tabulka 5: Retenční časy analyzovaných látek

Název standardu	Retenční čas [min]
α -pinen	11,18
β -pinen	12,53
Limonen	14,00
Eukalyptol	14,14
Linalool	17,19
Karvon	20,52

Z chromatogramu byly odečteny retenční časy analyzovaných látek (obrázek 11 a 12). Pomocí retenčního času byla provedena identifikace na základě hmotnostního spektra, která jsou uvedena v přílohách.



Obrázek 11: Chromatogram směšného standardu analyzovaných látek



Obrázek 12: Chromatogram vzorku kmínové silice

4.6 Validace měření

4.6.1 Mez detekce (LOD)

Mez detekce odpovídá množství analytu, pro který je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu

Rovnice 4.1

$$LOD = \frac{3 \cdot hn}{hs}$$

Kde je hn šum na základní linii
 hs výška píku

4.6.2 Mez stanovení (LOQ)

Mez stanovení odpovídá množství analytu, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení.

Rovnice 4.2

$$LOQ = \frac{10 \cdot hn}{hs}$$

Kde je hn šum na základní linii
 hs výška píku

4.6.3 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost měření zahrnuje analýzu měření za podmínek stejného pracovního postupu, personálu, měřicího procesu v krátkém časovém intervalu.

Příprava analytů:

Pro stanovení opakovatelnosti měření bylo připraveno 5 směsných standardů do 10 ml odměrných baněk. Každý směsný standard obsahoval po 100 μ l naředěného standardu karvonu, limonenu, alfa a beta pinenu, eukalyptolu, linaloolu a doplněny hexanem po rysku. Z připravených směsí byl napipetován 1 ml do vialek. K měření byla použita i vialka s 10 μ l 1000x naředěné kmínové silice a vialka s hexanem. Do softwaru Xcalibur byla zadána sekvence vzorků a automaticky spuštěna analýza. V rámci opakovatelnosti měření byly u standardních směsí vypočítány průměrné plochy píků, směrodatné odchylky, relativní standardní nejistoty a rozšířené relativní standardní nejistoty.

4.6.3.1 Průměr plochy píku

Průměr plochy píku je definován vztahem:

Rovnice 4.3

$$\bar{A} = \frac{\sum A_i}{n}$$

Kde je Σ součet
 A_i plocha píku
 n počet měření

4.6.3.2 Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka vykazuje míru přesnosti série paralelních výsledků a je definována vztahem [31]:

Rovnice 4.4

$$s = \sqrt{\frac{\sum (A_i - \bar{A})^2}{(n-1)}}$$

Kde je Σ součet
 A_i plocha píku
 \bar{A} průměr plochy píku
 n počet měření

4.6.3.3 Relativní standardní nejistota

Relativní standardní nejistota výsledku měření je vyjádřena ze směrodatné odchylky vztahem:

Rovnice 4.5

$$RSD = \frac{s}{\bar{A}} \cdot 100$$

Kde je s směrodatná odchylka
 \bar{A} průměr plochy píku

4.6.3.4 Rozšířená relativní standardní nejistota

Rozšířená relativní standardní nejistota pokrývající přibližně z 95% interval spolehlivosti je součinem standardní nejistoty měření a koeficientu rozšíření $k=2$ a vypočítá se podle vzorce:

Rovnice 4.6

$$U_{95} = 2 \cdot RSD$$

Kde je RSD relativní standardní nejistota

Tabulka 6: Vypočítané hodnoty opakovatelnosti měření standardních směsí

Standardní směs	Relativní standardní nejistota [%]	Rozšířená relativní standardní nejistota [%]
α -pinen	9,43	18,86
β -pinen	7,34	14,67
Limonen	10,39	20,78
Eukalyptol	7,68	15,36
Linalool	4,79	9,59
Karvon	1,40	2,80

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Byla provedena analýza 5 vzorků kmínu. Ze vzorků byly pomocí destilace vodní parou vydestilovány kmínové silice, které byly vhodně naředěny a zanalyzovány metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Analýza každého vzorku byla provedena dvakrát. Bylo sledováno procentuální zastoupení majoritních a minoritních látek obsažených v kmínové silici.

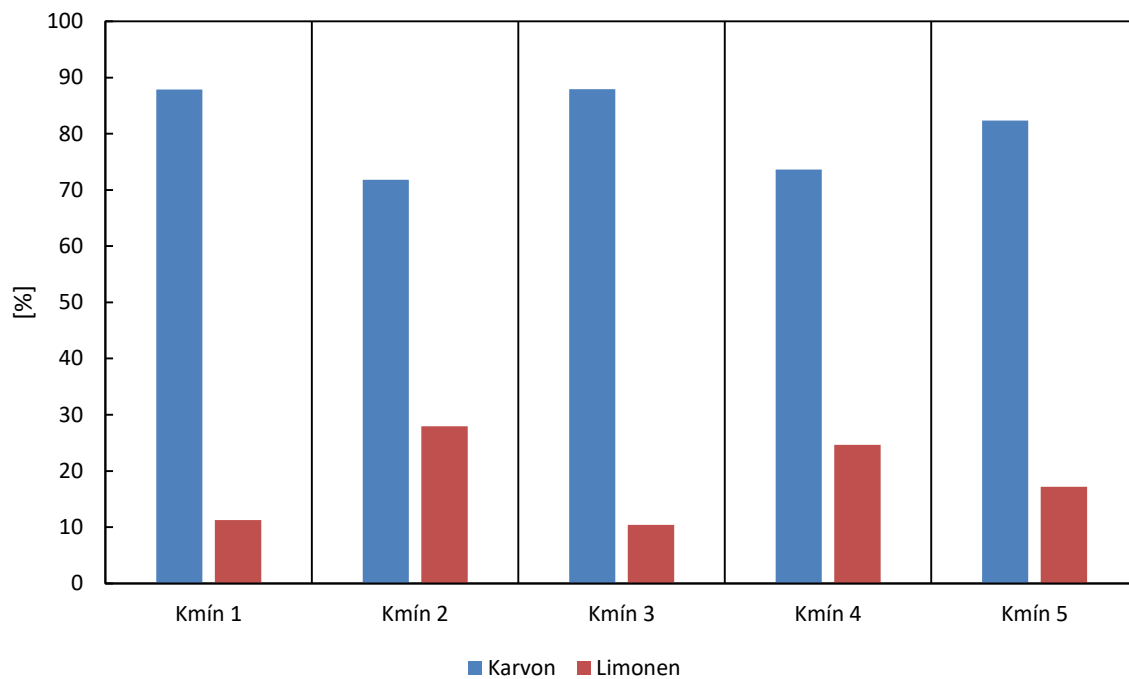
5.1 Obsahové látky kmínové silice

Z analyzovaných vzorků vyplývá, že kmínová silice obsahuje dvě majoritní složky – karvon a limonen a minoritní složky α -pinen, β -pinen, eukalyptol a linalool (tabulka 7).

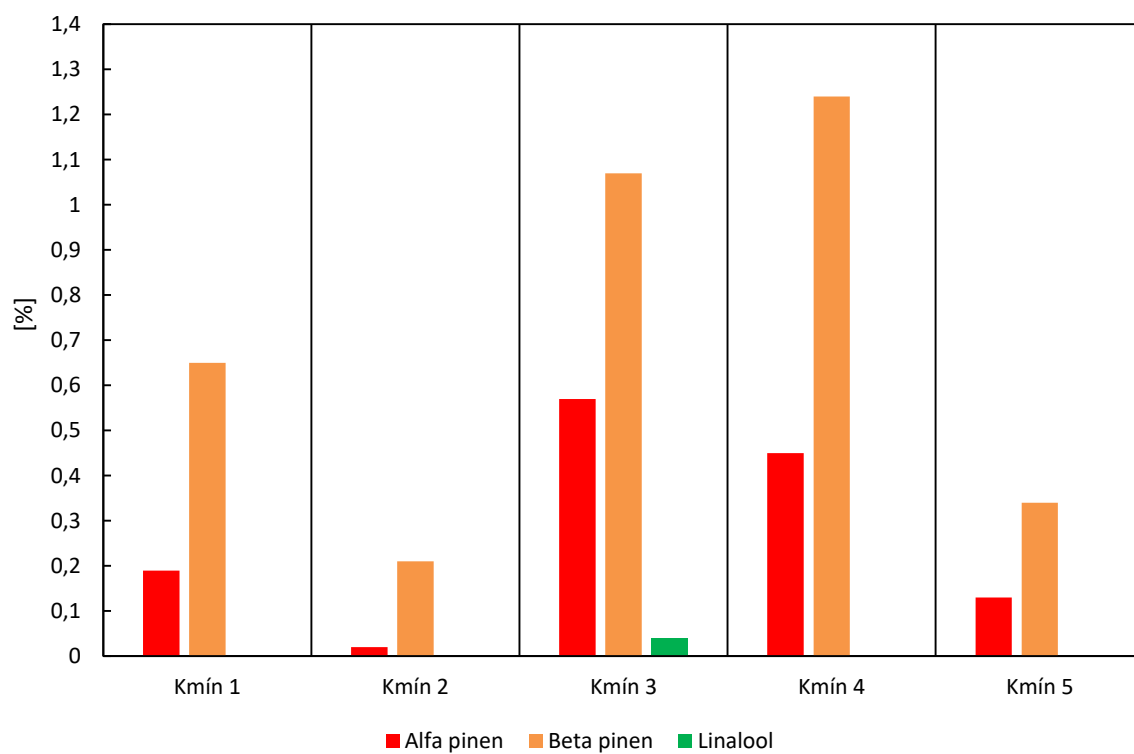
Tabulka 7: Výsledky analýzy vzorků kmínu

Vzorek	Zastoupení analytu (průměrné hodnoty) [%]					
	α -pinen	β -pinen	Limonen	Eukalyptol	Linalool	Karvon
KMÍN 1	0,19	0,65	11,27	<0,01	N	87,90
KMÍN 2	0,02	0,21	27,95	<0,01	N	71,82
KMÍN 3	0,57	1,07	10,40	<0,01	0,04	87,91
KMÍN 4	0,45	1,24	24,66	<0,01	N	73,65
KMÍN 5	0,13	0,34	17,20	<0,01	N	82,33

Poznámka: N-nedetkováno



Graf 1: Obsah majoritných složek kmínu



Graf 2: Obsah minoritných složek kmínu

V našich vzorcích kmínové silice nebyly při stanovení majoritních složek ve výsledcích přítomny významné rozdíly (graf 1), zatímco u minoritních látek byl rozptyl hodnot větší (graf 2). Ve vzorku kmínu 2 bylo zastoupeno nejméně α -pinenu a β -pinenu, u vzorku kmínu 4 byl naopak obsah β -pinenu největší. Kmín 3 obsahoval navíc linalool, který u ostatních vzorků nebyl detekován.

Zastoupení jednotlivých složek v kmínové silici je závislé jak na použité surovině, tak na druhu extrakce silice ze vzorků. [32]

V naší práci jsme pro získání silice využili destilaci vodní parou. Při tomto způsobu extrakce byly nejvíce zastoupenými složkami karvon (71,82 % až 87,91 %) a limonen (10,40 % až 27,95 %). Podobné výsledky pro silici destilovanou vodní parou uvádí ve své práci András obsah karvonu asi 76 % a obsah limonenu asi 24 %. [32]

EL-Hattabi analyzoval kmínovou silici, destilovanou vodní parou, metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a jako nejvíce zastoupené složky identifikoval karvon (63,7 %) a limonen (28,8 %). [33]

Destilaci vodní parou využil pro extrakci silice z kmínu i Raal a po analýze silic metodou plynové chromatografie uvádí obsah karvonu 44,5 % až 95,9 % a limonenu 1,5 % až 51,3 %, tyto výsledky, narozdíl od našich, vykazují větší rozptyl obsahu majoritních složek kmínové silice. [34]

Sedláková ve své práci využila pro získání silice superkritickou fluidní extrakci a v takto získaných silicích byl obsah karvonu 26,34 % až 69,92 % a limonenu 30,8 % až 73,66 %, András pro tento typ extrakce uvádí obsah karvonu 38 % až 66 % a limonenu 25 % až 62 %. [32], [35]

Ve všech vzorcích kmínu v naší práci byly detekovány minoritní složky, a to α -pinen v množství od 0,13 % až 0,57 % a β -pinenu, který byl zastoupen v množství od 0,21 % do 1,07 %. Linalool byl detekován pouze v jednom analyzovaném vzorku, a to v kmínu 3 v množství 0,04 %. Množství eukalyptolu bylo velmi nízké, hodnota byla nižší než mez stanovení 0,01 %, tudíž látka nebyla zahrnuta do dat v Grafu 2.

Raal stanovil obsah α -pinenu 0 až 0,2 % a obsah linaloolu také na 0 až 0,2 %. [34]

Laribi analyzoval olej ze semen z tuniského a německého kmínu pomocí GC-MS. Kmín z Tuniska obsahoval $0,09 \pm 0,06$ % α -pinenu, $0,03 \pm 0,00$ % β -pinenu a $0,02 \pm 0,00$ % linaloolu. V oleji ze semen německého kmínu bylo detekováno $0,16 \pm 0,01$ % α -pinenu, $0,25 \pm 0,08$ % β -pinenu a $0,07 \pm 0,01$ % linaloolu, tyto výsledky jsou srovnatelné s námi naměřenými daty. [36]

Abou El-Soud provedla analýzu kmínového oleje metodou GC a GC-MS a stanovila množství α -pinenu na 0,3 %, β -pinenu na 0,1 % a linaloolu na 0,7 %. [37]

6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo identifikovat a stanovit obsahové látky v kmínových silicích metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Teoretická část práce pojednávala o historii, charakteristice, technologii pěstování a sklizni, využití kmínu, o škůdcích a chorobách, které kmín postihuje, dále o kmínové silici, obsahových látkách a metodě stanovení.

V experimentální části bylo použito 5 náhodně zakoupených vzorků mletého kmínu v různých potravinových řetězcích v České republice. Ze vzorků byly pomocí destilace vodní parou vydestilovány kmínové silice, které byly vhodně naředěny a analyzovány metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. U vzorků byly detekovány majoritní látky (limonen, karvon) a minoritní látky (α -pinen, β -pinen, eukalyptol, linalool).

Nejvýznamnější obsahovou složkou kmínu kořenného jsou silice, které jsou zastoupeny v množství od 3 do 7 %. Majoritní složkou kmínové silice je nositel aroma kmínu karvon, který by měl mít podle normy ČSN ISO 5561 obsah nejméně 50 %. Zbývající zastoupení silice zaujímají limonen a jiné terpeny (α -pinen, β -pinen, eukalyptol, linalool, dihydrokarvyl-acetát, α -felandren).

Kmín se v České republice pěstuje kvůli nažkám-plodu kmínu a jeho kvalita se pro farmaceutický průmysl řídí podle Českého lékopisu z roku 2009, který definuje kmínový plod – *Carvi fructus* jako celou usušenou nažku druhu *Carum carvi* L., kmín kořenný (*Apiaceae*) charakteristického aroma po karvonu a obsahu silice minimálně 30 ml/kg bezvodé drogy.

Kmínová silice se využívá v potravinářském, kosmetickém průmyslu a k lékařským účelům.

Z naměřených výsledků je patrné, že největší množství karvonu 87,91 % a nejmenší množství limonenu 10,40 % obsahoval vzorek kmín 3. Téměř stejné hodnoty vykazoval vzorek kmín 1, kde byl obsah karvonu 87,90 % a obsah limonenu 11,27 %. Podle normy ČSN ISO 5561 splňují všechny námi analyzované vzorky minimální množství karvonu, což odpovídá hodnotě 50 %. Naše hodnoty obsahových látek kmínové silice se shodují s literaturou a korelují.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KAMENÍK, Josef, 2001. Sdružení Český kmín. *Uroda.cz* [online]. [cit. 2020-02-10].
Dostupné z: <https://www.uroda.cz/sdruzeni-cesky-kmin/>
- [2] RŮŽIČKOVÁ, Gabriela. *Léčivé a kořeninové rostliny z čeledi miříkovité*. Olomouc: Petr Baštan, 2012. ISBN 978-80-87091-37-1.
- [3] SMALL, Ernest, 1997. *Velká kniha koření, bylin a aromatických rostlin*. 2006. Ottawa: VOLVOX GLOBATOR. ISBN 80-7207-462-8.
- [4] ONDRÁČKOVÁ, Eliška, Choroby a škůdci kmínu: Fungicidní pokusy v roce 2016. *Český kmín* [online]. [cit. 2020-02-13].
Dostupné z: http://ceskykmin.cz/images/phocadownload/Choroby_a_skudci_kminu_Ondrackova.pdf
- [5] PÍŠAŘÍK, Jaroslav a Jaroslav HYŽÍK. *Pěstování kmínu a jiných siličnatých rostlin*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1953.
- [6] NOVÁK, Václav. *Úspěšná produkce kmínu*. Praha: Ústav vědeckotechnických informací Československé akademie zemědělské, 1969. Metodiky pro zavádění výsledků výzkumu do praxe.
- [7] VELÍŠEK, Jan, 2002. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS. ISBN 80-866-5901-1.
- [8] (R)-(-)-Carvone 98%. In: *Www.sigmaaldrich.com* [online]. [cit. 2020-02-20]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/124931>
- [9] KRATOCHVIL, František. Karvon. *Epikutánní testy* [online]. Brno [cit. 2020-02-20]. Dostupné z: <http://www.epitesty.cz/pasports/C%20035.pdf>
- [10] Carvone. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2020-02-20]. Dostupné z: <https://cs.qwe.wiki/wiki/Carvone?fbclid=IwAR1w5gOR01L0uYcEwZfqGZB16UoOzoivXn1yOtaxfqOdPvv1C8SvnSZ3YZQ>
- [11] (R)-(+)-Limonene 97%. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2020-02-20].
Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/183164?lang=en®ion=CZ>
- [12] Monoterpene, 2018. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2020-02-20]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Monoterpene>
- [13] D-Limonene. *PubChem: National Center for Biotechnology Information* [online]. USA [cit. 2020-02-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440917>
- [14] Eukalyptol, 2020. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2020-02-20]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Eukalyptol#cite_ref-2
- [15] LEWIS, Richard J., Sr. 1997. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary 13th Edition*. New York: John Wiley & Sons. Inc. 472 s. ISBN 978-0471292050.
- [16] (-)-DIHYDROCARVYL ACETATE, 2017. *ChemicalBook: CAS DataBase* [online]. [cit. 2020-02-20].
Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1154579.htm

- [17] Linalool, 2017. *ChemicalBook: CAS DataBase* [online]. [cit. 2020-02-20].
Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB5347184_EN.htm
- [18] ČERNÝ, Emil. *Kmín, anýz, fenykl a koriandr: jejich význam národohospodářský, zemědělský a léčebný, popis pěstování a upotřebení*. Praha: A. Neubert, 1918, 48 s. Rolníkova knihovna, Sv. 54
- [19] Habán M., Černá K. a Dančák K., 2001. *Koreninové rostliny*. ÚVTIP-NOI. Nitra.
ISBN 80-85330-95-4.
- [20] IBURG, Anne, 2004. *Lexikon koření: původ, chuť, použití, recepty*. Čestlice: Rebo Productions CZ.
ISBN 80-723-4375-0.
- [21] MLČOCH, Zbyněk, 2015. Kmín kořený - účinky, co léčí, použití, užívání, využití pro zdraví.
Bylinkyprovsechny.cz [online]. [cit. 2020-02-20].
Dostupné z: <https://www.bylinkyprovsechny.cz/byliny-kere-stromy/byliny/981-kmin-korennny-ucinky-co-leci-pouziti-uzivani-vyuziti-pro-zdravi>
- [22] SVOBODA, Zdeněk, Renata MIKULÍKOVÁ, Helena PLUHÁČKOVÁ, Sylvie BĚLÁKOVÁ a Kristýna BENEŠOVÁ, 2016. Analýza rostlinných silic využitelných pro fortifikaci potravinářských výrobků. *Kvasný průmysl*. **2016**(5), 4. DOI: 10.18832/kp201602.
- [23] BOŠKO, Rastislav, 2015. *Variabilita obsahu silic u vybraných druhů léčivých, aromatických a koreninových rostlin* [online]. Brno [cit. 2020-02-20]. 14 s. Dostupné z: <https://theses.cz/id/1tf2ss/?info>.
Bakalářská práce. Mendelova univerzita. Vedoucí práce Ing. Helena Pluháčková, Ph.D.
- [24] ČESKÝ LÉKOPIS, 2009 (ČL 2009) Pharmacopea Bohemica MMIX(PH.B.MMIX), 2009:1. díl. Evropská část. Grada Publishing, a.s., Praha, 1176 s. ISBN: 978-80-247-2994-7
- [25] Metoda superkritické extrakce, 2010. *Flavekotrade.cz* [online]. Pardubice [cit. 2020-02-21].
Dostupné z: <https://www.flavekotrade.cz/flavekotrade/metoda-superkriticke-extrakce.htm>
- [26] Přednosti superkritické extrakce, 2010. *Flavekotrade.cz* [online]. Pardubice [cit. 2020-02-21].
Dostupné z: <https://www.flavekotrade.cz/flavekotrade/superkriticka-extrakce/prednosti-superkriticke-extrakce.htm>
- [27] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [28] HOLČAPEK, Michal, ed. *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS): sborník přednášek kurzu HPLC/MS pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Marci a Univerzitou Pardubice 5.-7.11.2001, Kongresová hala Univerzity Pardubice*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-390-8.
- [29] VŘEŠŤÁL, Jan, ed. *Hmotnostní spektrometrie*. 2. dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2283-3.
- [30] PISKAČ, Pavel, Marie PROKOPCOVÁ a Šárka CHALUPOVÁ, 1997. Carvi fructus: Kmínový plod. *Český lékopis 1997* [online]. [cit. 2020-03-11].
Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Carvifructus.htm
- [31] HENDL, Jan. 2004. *Přehled statistických metod zpracování dat: analýza a metaanalýza dat*. 1. vyd. Praha: Portál, 583 s. ISBN 80-717-8820-1.

[32] ANDRAS, Csaba Dezso, Rozalia Veronika SALAMON, Imola BARABAS, Irina VOLF a Alexandru SZEPE, 2015. INFLUENCE OF EXTRACTION METHODS ON CARAWAY (*Carum carvi* L.) ESSENTIAL OIL YIELD AND CARVONE/LIMONENE RATIO. *Environmental Engineering and Management Journal* [online]. **14**(2), 341-347 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.30638/eej.2015.034.

ISSN 1582-9596. Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/274006235_INFLUENCE_OF_EXTRACTION_METHODS_ON_CARAWAY_Carum_carvi_L_ESSENTIAL_OIL_YIELD_AND_CARVONELIMONENE_RATIO

[33] HATTABI ET AL., EL, 2016. *Evaluation of Corrosion Inhibition of Carbon Steel in 1M HCl medium by essential oil of seed Carum Carvi* [online]. 3162-3178 [cit. 2020-07-06]. ISSN 2028-2508.

Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/308355187_Evaluation_of_Corrosion_Inhibition_of_Carbon_Steel_in_1M_HCl_medium_by_essential_oil_of_seed_Carum_Carvi

[34] RAAL, Ain, Elmar ARAK a Anne ORAV, 2012. The content and composition of the essential oil Found in *Carum carvi* L. commercial fruits obtained from different countries. *Journal of Essential Oil Research* [online]. **24**(1), 53-59 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1080/10412905.2012.646016.

ISSN 1041-2905. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2012.646016>

[35] SEDLÁKOVÁ, J., B. KOCOURKOVÁ, L. LOJKOVÁ a V. KUBÁŇ, 2011. The essential oil content in caraway species (*Carum carvi* L.). *Horticultural Science* [online]. **30**(2), 73-79

[cit. 2020-07-06]. DOI: 10.17221/3818-HORTSCI. ISSN 0862867X.

[36] LARIBI, Bochra, Karima KOUKI, Taoufik BETTAIEB, Abdelaziz MOUGOU a Brahim MARZOUK, 2012. Comparative GC Analysis of Seed Essential Oils from Tunisian and German Caraway (*Carum carvi* L.) Ecotypes. *Pharmacognosy Communications* [online]. 52-57

[cit. 2020-07-08]. Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/283422266_Comparative_GC_Analysis_of_Seed_Essential_Oils_from_Tunisian_and_German_Caraway_Carum_carvi_L_Ecotypes

[37] Abou El-Soud, Neveen H. et al., 2014. *Renoprotective effects of Caraway (Carum carvi L.) essential oil in streptozotocin induced diabetic rats* [online]. In: *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 4(02), s. 027-033 [cit. 2020-07-08]. DOI: 10.7324/JAPS.2014.40205. ISSN 2231-3354.

Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/280720515_Renoprotective_effects_of_Caraway_Carum_carvi_L_essential_oil_in_streptozotocin_induced_diabetic_rats

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

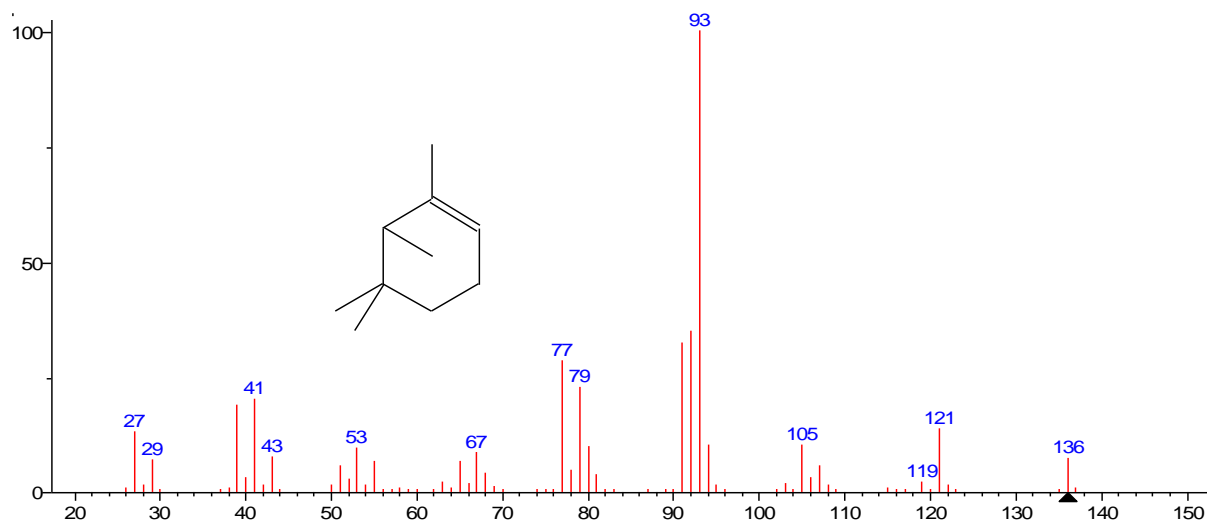
R	optická izomerie
S	optická izomerie
RT	retenční čas
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
apod.	a podobně
např.	například

9 SEZNAM PŘÍLOH

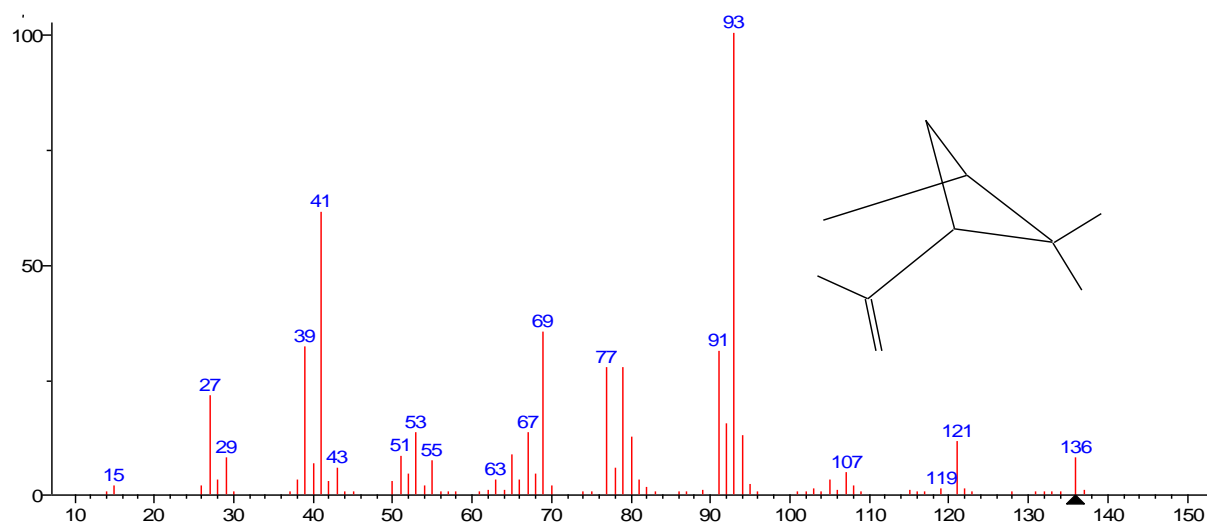
- Příloha 1: Hmotnostní spektrum α -pinenu
- Příloha 2: Hmotnostní spektrum β -pinenu
- Příloha 3: Hmotnostní spektrum limonenu
- Příloha 4: Hmotnostní spektrum eukalyptolu
- Příloha 5: Hmotnostní spektrum linaloolu
- Příloha 6: Hmotnostní spektrum karvonu

10 PŘÍLOHY

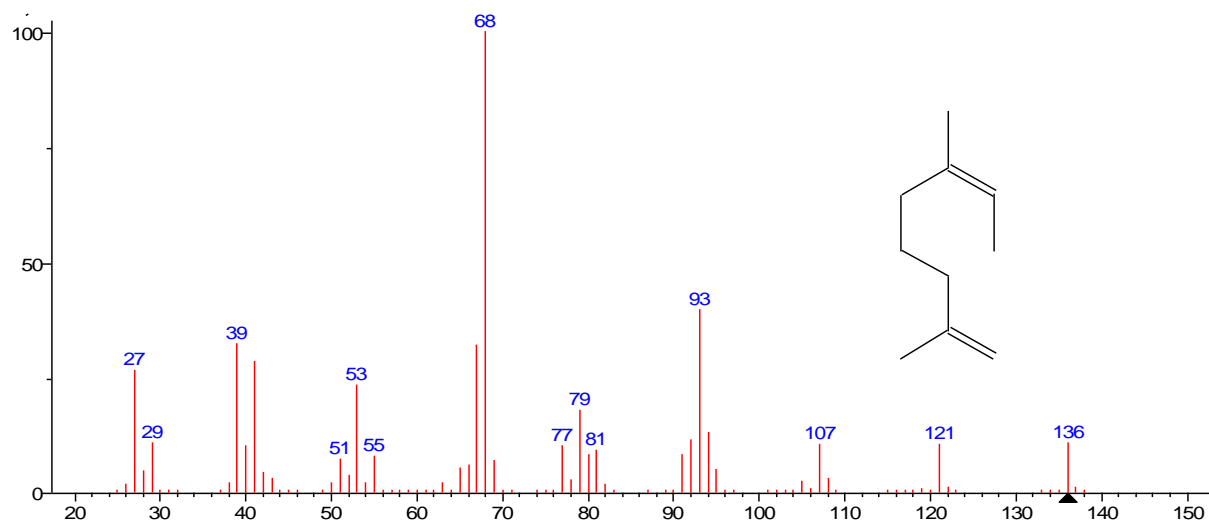
Příloha 1: Hmotnostní spektrum α -pinenu



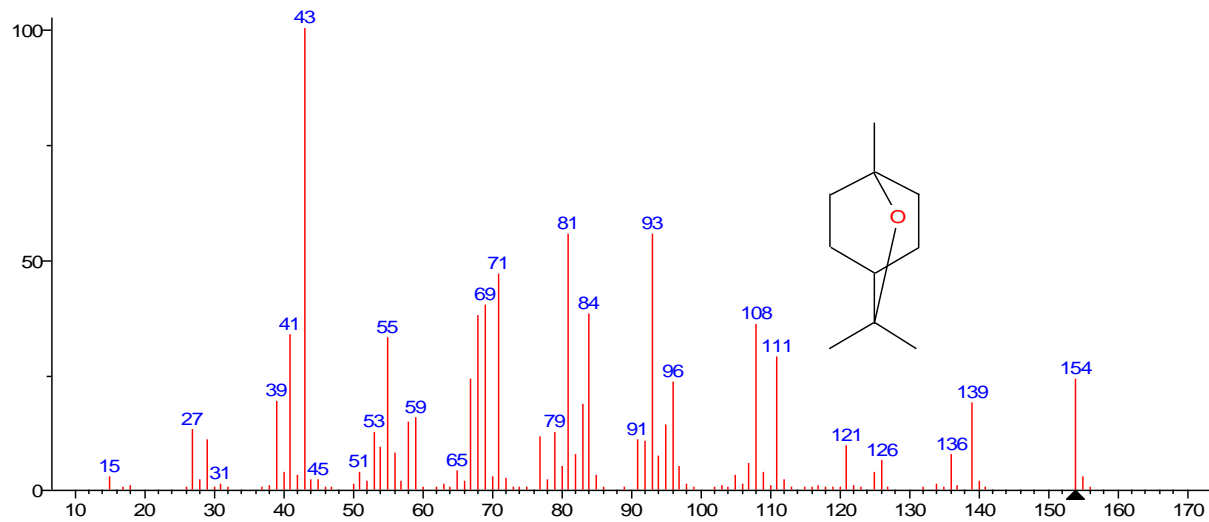
Příloha 2: Hmotnostní spektrum β -pinenu



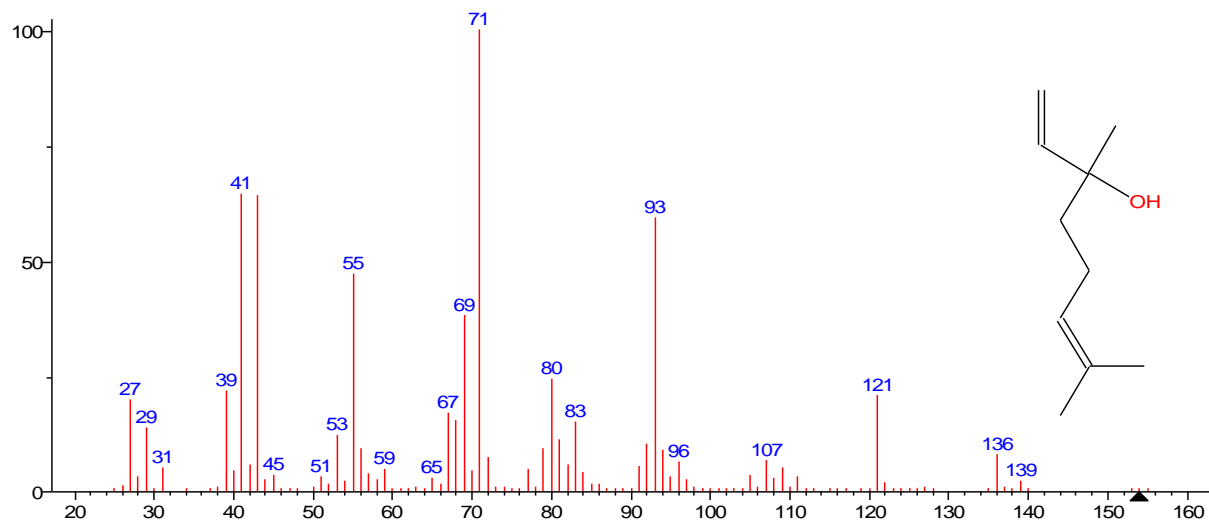
Příloha 3: Hmotnostní spektrum limonenu



Příloha 4: Hmotnostní spektrum eukalyptolu



Příloha 5: Hmotnostní spektrum linaloolu



Příloha 6: Hmotnostní spektrum karvonu

