

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality zemědělských produktů**



**Použití elektronického nosu pro identifikaci těkavých látek  
z odpadních produktů aromatických rostlin**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Miloň Malina**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.**

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Použití elektronického nosu pro identifikaci těkavých látek z odpadních produktů aromatických rostlin" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. 4. 2016

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Ing Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za velkou ochotu, odborný dohled, cenné zkušenosti a především pozitivní energii vloženou do této práce. Rovněž bych chtěl poděkovat Mgr. Petru Maršíkovi, Ph.D. za ochotu a nadšení při tvorbě algoritmu na zpracování dat pro tuto práci. Nakonec bych chtěl také poděkovat své rodině za obrovskou podporu během studia, bez jejíž pomoci by to nebylo možné.

# Použití elektronického nosu pro identifikaci těkavých látek z odpadních produktů aromatických rostlin

## Souhrn

Cílem práce bylo vyvinout jednoduchou a levnou metodu pro hodnocení obsahu hodnotných těkavých látek v odpadních produktech aromatických rostlin za využití prototypu elektronického nosu sestaveného na České zemědělské univerzitě. Literární rešerše se zabývá současnou problematikou využívání silic, možností jejich produkce a shrnuje poznatky o v současné době využívaných elektronických nosech. V metodice byla popsána funkce a konstrukce využitého prototypu elektronického nosu. Testování prototypu elektronického nosu probíhalo měřeními standardů obsahových látek silic (anizol, karvakrol,  $\beta$ -pinen,  $\beta$ -citronelol, karvon) a modelových odpadních materiálů (oregano, meduňka, anýz, kmín, jehličí borovice kleč). Naměřené hodnoty byly využity pro vypracování kvantitativní a kvalitativní analýzy, které sloužily k posouzení funkčnosti elektronického nosu. Hypotézou pro tuto práci bylo tvrzení, že elektronický nos, který byl vyvinut na České zemědělské univerzitě, je možné využít k hodnocení obsahu a rozpoznání hodnotných těkavých látek obsažených v odpadních produktech aromatických rostlin. Kvantitativní analýza ukázala, že některé senzory jsou schopné dobře reagovat na změnu v koncentraci měřené látky. Kvalitativní analýza dokázala, že elektronický nos je schopen odlišit různé látky a dovede rozpoznat již dříve naměřenou látku mezi ostatními. Elektronický nos i přes nižší kvalitu použitých součástí a celkově nízké náklady na jeho vytvoření prokázal velký potenciál pro posuzování obsahu a identifikaci těkavých látek. Do budoucna je ovšem nutné provést několik změn a vylepšení, především co se týká programu na zpracování naměřených dat.

**Klíčová slova:** elektronický nos, odpadní produkty aromatických rostlin, identifikace těkavých látek, senzory, silice

# Identification of volatile compounds from waste products of aromatic plants with electronic nose

## Summary

The goal of this work was to develop a simple and inexpensive method for evaluating the content of valuable volatile substances in the waste products of aromatic plants based on using of electronic nose prototype constructed in the Czech University of Life Sciences. A literature review engaged the current issue of the use of essential oils, possibilities for production and summarizes information about the currently utilized electronic noses. The methodology described functions and structures of used prototype of electronic nose. Testing of the prototype of the electronic nose have been done by measurement of the substances standards contained in essential oils (anisole, carvacrol,  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -citronellol, carvone) and model waste materials (oregano, lemon balm, anise, caraway, mountain pine needles). The measured values were used to make quantitative and qualitative analyzes which were used to assess the functioning of the electronic nose. The hypothesis of this work was to claim that the electronic nose, which was developed at the Czech University of Life Sciences, can be used for evaluation and recognition of valuable volatile substances contained in waste products of aromatic plants. Quantitative analysis showed that some of the sensors are able to respond well to a change in concentration of the measured substance. Qualitative analysis showed that the electronic nose is capable of distinguishing between different materials and can identify previously measured material among others. Electronic nose despite the lower quality of the components used and the overall low cost of its construction have demonstrated great potential for assessing the content and identification of volatile compounds. Conclusion is that there are several changes and improvements, especially in the software for measured data processing, that have to be made in the future.

**Keywords:** electronic nose, waste products of aromatic plants, identification of volatile compounds, sensors, essential oils

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Vnímání pachů</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2 Definice pachu</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3 Analytické možnosti detekce pachů</b> .....	<b>12</b>
3.3.1 Hmotnostní spektrometrie .....	12
3.3.2 Plynová chromatografie .....	13
3.3.3 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie .....	15
<b>3.4 Typy senzorů elektronických nosů</b> .....	<b>16</b>
3.4.1 Piezoelektrické senzory .....	16
3.4.2 Senzory s polovodiči na bázi oxidů kovů .....	16
3.4.3 Senzory s vodivými polymery .....	17
3.4.4 Tranzistory s chemickým senzorem (ChemFET) .....	17
3.4.5 Senzory s vláknovou optikou .....	17
3.4.6 Neselektivní senzory .....	18
<b>3.5 Možnosti využití elektronického nosu pro posuzování silic</b> .....	<b>18</b>
<b>3.6 Přírodní těkavé látky – silice</b> .....	<b>19</b>
3.6.1 Ekologická role .....	19
3.6.2 Způsoby získávání silic a jejich výroba .....	20
3.6.3 Možnosti komerčního využití .....	26
3.6.4 Využití odpadů pro produkci cenných látek .....	29
3.6.5 Chemické složení silic .....	30
<b>4 Materiál a metody</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Konstrukce elektronického nosu</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 Měřené látky</b> .....	<b>34</b>
4.2.1 Standardy.....	34
4.2.2 Modelové odpadní vzorky .....	34
4.2.3 Příprava vzorků .....	35
<b>4.3 Optimalizace metody měření</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4 Fáze měření</b> .....	<b>37</b>
<b>4.5 Postup měření a zpracování výsledků</b> .....	<b>38</b>
4.5.1 Kvantitativní analýza .....	38
4.5.2 Kvalitativní analýza.....	38

<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>39</b>
5.1.1	Kvantitativní analýza .....	39
5.1.2	Kvalitativní analýza.....	42
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury</b> .....	<b>53</b>

# 1 Úvod

V současné době vyspělá společnost v rámci trvale udržitelného rozvoje preferuje recyklaci, využívání sekundárních zdrojů a využití odpadů oproti spotřebě zdrojů primárních surovin. Velké množství výrobních technologií se snaží být bezodpadních anebo s minimální produkcí odpadu, který není možné dále využít. V našem případě se jedná o využívání odpadních materiálů z aromatických rostlin pro produkci vonných silic.

Silice jsou aromatické látky, jejichž průmyslové využití se v poslední době stalo trendem a nahrazuje využívání umělých chemických látek pro výrobu parfémů, dodávání vůně výrobkům a pro mnoho jiných účelů. Velké množství silic se vyrábí z rostlinných materiálů, které jsou odpadem z primární produkce. Tyto odpady jsou často kompostovány, spalovány, nebo likvidovány jinými způsoby, přičemž mohou obsahovat aromatické látky, jejichž potenciál zůstává nevyužit. Pro zjištění, zdali odpadní rostlinný materiál obsahuje aromatické látky, je možno využít přístroj zvaný elektronický nos.

Elektronický nos je zařízení fungující na principu využití chemických senzorů pro rozeznávání konkrétních těkavých látek ve vzorku. První elektronický nos se dostal na trh v roce 1982 a od té doby jeho vývoj prošel dlouhou cestou až do dnešních podob. V současné době jsou elektronické nosy využívány v mnoha různých oborech, jako je například potravinářství, zdravotnictví a ekologie.

Elektronický nos využívaný pro tuto diplomovou práci je prototyp vytvořený na Technické fakultě České zemědělské univerzity. Oproti profesionálním komerčně využívaným elektronickým nosům je tento přístroj sestaven z levných a jednoduše dostupných součástí. Cílem práce je zjistit, zdali je možné takto sestavený elektronický nos využít k posuzování obsahu cenných těkavých látek v odpadních materiálech z rostlinné produkce.



## **2 Hypotéza a cíle práce**

### **Hypotéza**

Elektronický nos, který byl vyvinut na České zemědělské univerzitě, je možné využít k hodnocení obsahu a rozpoznání hodnotných těkavých látek obsažených v odpadních produktech aromatických rostlin.

### **Cíle práce**

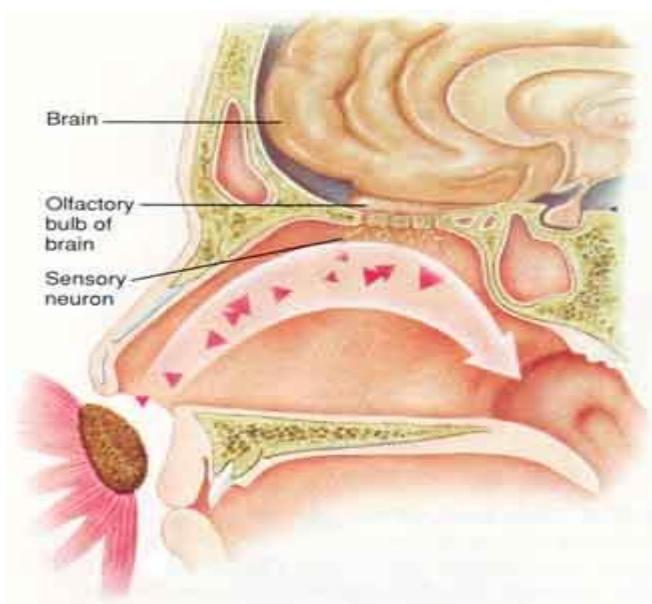
Cílem teoretické části práce bylo shrnout současné informace o problematice elektronických nosů, silic a možností jejich využití. Cílem experimentální části práce bylo vyvinout jednoduchou a levnou metodu pro hodnocení obsahu hodnotných těkavých látek v odpadních produktech aromatických rostlin, založenou na principu elektronického nosu.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Vnímání pachů

Čich, vývojově nejstarší specifické smyslové ústrojí, je přítomné v různé formě u všech živočišných skupin. Zprostředkuje chemické informace z vnějšího prostředí a výrazně ovlivňuje emoční stavy a chování individua. Princip smyslového vnímání stejně jako u chuti je na bázi chemie, a proto se řadí mezi chemické smysly. Celý systém vnímání pachů je podle vědců řízen 18 různými členy extrémně velké skupiny genů. U člověka bylo nalezeno 347 funkčních receptorových genů, tyto údaje jsou variabilní mezi jednotlivci. Každý olfaktorický receptor v nose vyjadřuje pouze jeden funkční receptor pachu. Díky těmto smyslům monitorujeme okolní prostředí, např. dýcháním testujeme kvalitu ovzduší kolem nás a čich nás informuje o potencionálním nebezpečí (Auterská, 2010).

Chemická detekce senzorkým systémem funguje za určitých podmínek. Například molekuly pachu musí být dostatečně malé (menší než 300-400 relativní molekulové hmotnosti) a těkavé, aby dosáhly k nosu a tam se rozpustily v hlenu. Jsme vybaveni přirozenou schopností rozeznat špatný (nelibý) pach od dobrého. Lidský čichový orgán se skládá ze dvou základních částí: čichových buněk (čichové receptory) v nosní sliznici a čichového centra v mozku viz. obrázek 1.



Obr. 1 Řez nosní dutinou

Zdroj: <http://odour.webnode.cz/news/co-vime-o-cichu-/>

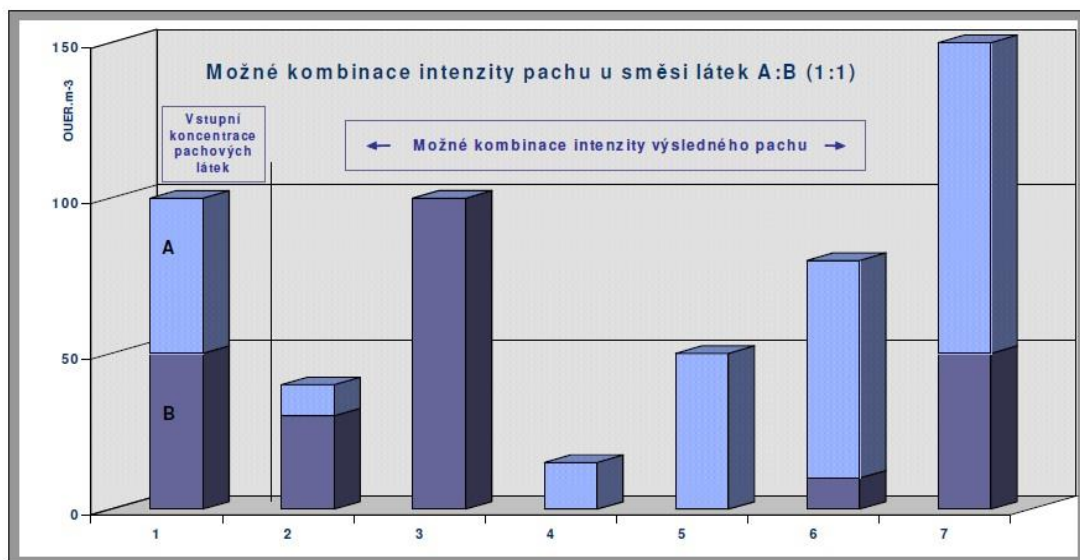
Citlivost člověka k intenzitě pachu je závislá na použité chemické látce nebo směsi více látek. Člověk je vybaven čichem rozpoznávajícím velmi nepatrná množství látek různých charakterů, které není možné rozpoznat ani nejjemnější chemickou analýzou. Citlivost k pachům se mezi pohlavími i individuálně velmi liší. Odhaduje se, že netrénovaný člověk dokáže rozeznat asi 4 000 pachů a trénovaný až 10 000 pachů. Zdá se ale, že zdravý jedinec je schopný rozlišit 10 000 až 40 000 různých pachů, ženy obvykle více než muži. Nejlépe na tom jsou profesionální odborníci na testování voňavek nebo míšení whisky - dovedou rozlišovat až 100 000 vůní. Ke schopnosti rozlišovat pachy bohužel neexistuje slovník názvů, který by jednotlivé druhy popisoval (Auterská, 2010; Rychlíková, 2006).

### 3.2 Definice pachu

Mezinárodní norma definuje pach takto: Pach je organoleptická (smyslová) vlastnost, která je vnímána čichovým orgánem po vdechnutí určitého objemu látky. [ISO 5492] Pachová látka — je látka, která stimuluje lidský čichový systém tak, že je vnímán pach. Všechny pachy jsou tvořeny jednou nebo směsí více sloučenin. V obou případech můžeme stanovit jednotlivé koncentrace látek obsažených v plynu, ale tyto výsledky obvykle nevypovídají o typu pachu a jeho intenzitě (Auterská, 2006).

Jednotlivé látky tvořící směs se mezi sebou vzájemně ovlivňují, kombinují a vzniká tak proměnný charakter pachu pro různé koncentrace látek ve směsi a pro proměnné složení směsi např. působením větru. Z důvodu velkého množství a kombinací látek směsi nebylo doposud možné vytvořit databázi jednotlivých směsí pachu.

Jedním z hlavních důvodů omezujících možnost analytického stanovení pachu je právě vliv jednotlivých chemických látek ve směsi, kde ovlivňují proměnlivý charakter pachu. Chemické látky se ve směsi vzájemně ovlivňují a tyto jevy nejsou zatím uspokojivě popsány. Významný vliv na kvalitu a intenzitu pachu má právě zastoupení všech chemických látek ve vzorku. Látky se chovají rozdílně. Některé zvyšují intenzitu pachu tak, že se vzájemně intenzity jednotlivých pachů sčítají, jiné násobí, některé se mezi sebou maskují, viz obrázek 2. (Auterská, 2006; TESO, 2007).



Obr. 2 Možné hodnoty intenzity pachu při smíšení dvou chemických látek o stejné koncentraci  
Zdroj: (TESO, 2007)

### 3.3 Analytické možnosti detekce pachů

#### 3.3.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která se využívá převážně ke zkoumání organických látek. Tato metoda je založena na interakci mezi ionty a elektrickými nebo magnetickými poli. Poskytuje informace o elementárním, kvalitativním a kvantitativním složení vzorku, o jeho struktuře, složení povrchu a izotopických poměrech atomů ve vzorku. Pro tuto metodu se využívá přístroj zvaný hmotnostní spektrometr (Holčapek, 2002).

V Praxi se můžeme setkat s využitím hmotnostní spektrometrie při rozeznávání těkavých látek například u elektronických nosů od společnosti Gerstel, které jsou založeny na využití chemických senzorů na principu hmotnostní spektrometrie. (Ghent and Leuven, n.d.)

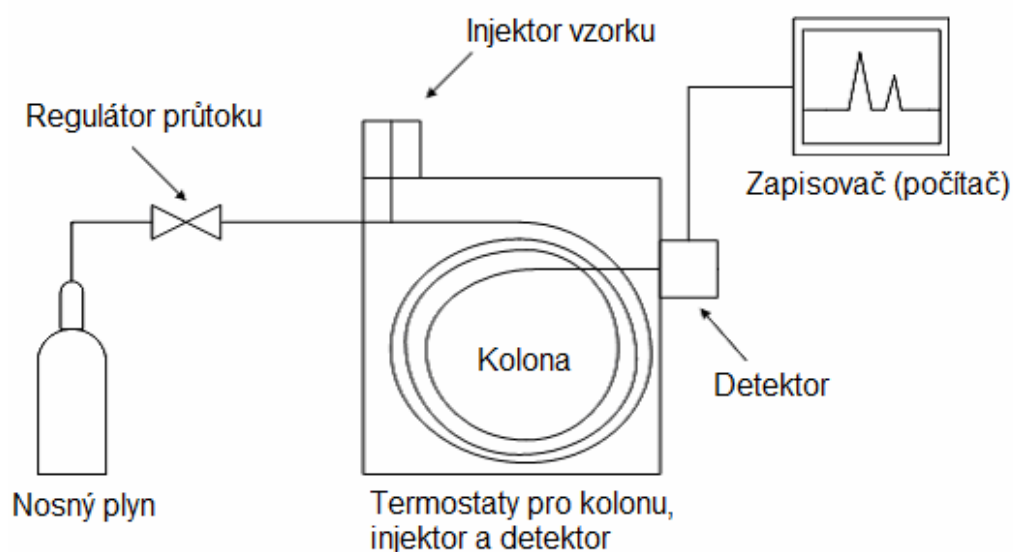
Hmotnostní spektrometr je iontově – optické zařízení rozlišující ionty podle jejich poměru  $m/z$ , kde  $m$  je relativní molekulová hmotnost vzniklého iontu a  $z$  je počet nábojů vzniklého iontu. Spektrometr se skládá z těchto částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor (Poustka, 2007; Settle, 1997).

Princip hmotnostní spektrometrie:

- 1) Tvorba iontů (ionizace) – Převodění neutrálních molekul analytu na nabitě částice (ionty). Ionizační techniky dělíme na tvrdé (např.: Elektronová ionizace) a měkké (např.: Laserová desorpce)
- 2) Filtrace iontů (hmotnostní analýza) – Třídění iontů podle hmotnosti za vysokého vakua.
- 3) Měření četnosti iontů v závislosti na  $m/z$  – Poskytnutí dat pro výpočet hojnosti iontu v reálném čase.
- 4) Hmotnostní spektrum – Výstup naměřených hodnot ve formě grafu nebo tabulky (Holčapek, 2002; Settle, 1997).

### 3.3.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je účinná a velmi využívaná separační metoda. Velkou výhodou této metody je její rychlost, přesnost a možnost kombinace s dalšími analytickými spektrálními metodami jako např.: hmotnostní, infračervená. Dalšími výhodami je citlivost této metody. Ke stanovení se mohou využívat velmi malé množství látky s nízkou čistotou (Settle, 1997; Zachař and Sýkora, 2002).



Obr. 3 Plynová chromatografie

Zdroj: [http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem\\_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf](http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf)

V praxi se plynová chromatografie využívá například u elektronických nosů typu Heracles od společnosti Alpha MOS. (Antoce and Namolosanu, 2011)



*Obr. 4 Elektronický nos typu Heracles od firmy Alpha MOS*

*Zdroj: <http://www.alpha-mos.com/analytical-instruments/heracles-electronic-nose.php>*

Metoda je založena na principu rozdělení složek vzorku na dvě fáze. Mobilní (pohyblivou) a Stacionární (nepohyblivou).

Stacionární fáze se vyskytuje v chromatografické koloně. Plynová chromatografie bývá rozdělena na dva systémy:

Plyn – pevná látka (GSC), zde se využívá aktivní uhlí, oxid hlinitý, silikagel apod.

Plyn – kapalina (GLC), zde se využívají polyestery, polysiloxany, polyethylenglykoly apod.

Mobilní fáze je představována nosným plynem. Volba konkrétního nosného plynu je založena na parametrech jako např.: cena, účinnost, viskozita, typ detektoru, reaktivita apod. Obvykle se jako nosné plyny využívají: dusík, vodík, helium, argon. Průtok a tlak nosného plynu kolonou a detektorem je ovládán regulátorem průtoku (Ševčík, 2004).

Vzorek analyzované látky vstupuje do plynového chromatografu přes injektor. Nástřik látky se provádí speciální injekční stříkačkou. V injektoru díky vysoké teplotě dochází k odpaření vzorku a smícháním s nosným plynem. Smíchaný nosný plyn s parami vzorku pokračuje do kolony, viz obrázek 3.

Kolony jsou tvořeny trubicemi o průměru 0,5-2 mm s délkou od centimetrů až po desítky metrů. Stacionární fáze se nachází uvnitř kolon. Náplň kolon způsobuje, že jednotlivé složky jsou pohlcovány a poté nosným plynem opět vyplachovány. Nosný plyn unáší postupně jednotlivé složky vzorku ke konci kolony a dělicí proces se stále opakuje. Každá složka vzorku prochází kolonou svojí vlastní rychlostí na základě její distribuční konstanty  $K_D = c_s/c_m$ , kde  $c_s$  a  $c_m$  označují rovnovážné koncentrace složky ve stacionární a mobilní fázi. Látky postupně vycházejí z kolony podle jejich distribučních konstant a vstupují do detektoru (Zachař and Sýkora, 2002).

Teplota detektoru musí být vyšší, než teplota vstupujících plynů, aby se zabránilo kondenzaci. V plynové chromatografii se využívá různých typů detektorů, např.: Tepelně vodivostní detektor, Detektor elektronového záchytu, Plamenově ionizační detektor apod. Koncentrace separovaných látek v nosném plynu je měřena detektorem, který odesílá zjištěné hodnoty do počítače. Výsledkem je grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase. Takto získaný záznam se nazývá chromatogram, z nich je možno vyhodnotit retenční parametry jednotlivých signálů, plochy a výšky píků atd. Podle polohy píků je možné vyslovit předpoklad o identitě látky (Settle, 1997; Ševčík, 2004).

### 3.3.3 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Spojením plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie je možno dosáhnout velice dobrých analytických výsledků. Spojení těchto dvou systémů se nazývá GC/MS systém (gass chromatography/mass spectrometry). Při spojení separační a spektrální techniky se nejprve směs látek rozdělí a poté se získávají strukturní informace o jednotlivých sloučeninách. V praxi se toto spojení provádí nahrazením detektoru v plynovém chromatografu hmotnostním spektrometrem. Díky tomuto spojení je možno identifikovat složky neznámé směsi nebo částečně odvodit jejich struktury. Nevýhodou tohoto spojení může být nemožnost stanovení málo těkavých sloučenin bez chemické deprivatizace (Holčapek, 1998; Settle, 1997).



Obr. 5 GC/MS systém od firmy Gerstel

Zdroj: <http://www.gerstelus.com/product-categories/mps-for-gc/>

### 3.4 Typy senzorů elektronických nosů

#### 3.4.1 Piezoelektrické senzory

Pracují na principu využití změny frekvence kmitajícího piezoelektrického krystalu, na jehož povrch se navázala specifická látka. Krystalem je obvykle křemen, na který jsou napojeny zlaté elektrody. Elektrody střídavým proudem nutí krystal oscilovat určitou frekvencí. Pokud se na povrch naváže zkoumaná látka, tak vyvolá změnu frekvence oscilace krystalu. Dělí se na senzory BAW (bulk acoustic wave) a SAW (surface acoustic wave). BAW senzory jsou silnější (8mm) než senzory SAW (2mm). Nevýhodou těchto senzorů je jejich vysoká cena. Oproti ostatním senzorům mají ale lepší vlastnosti, např.: stabilita, citlivost, rozsah pracovních teplot, selektivita (James, Scott, Ali, and O'Hare, 2005).

#### 3.4.2 Senzory s polovodiči na bázi oxidů kovů

Na základě oxidačně-chemických reakcí na tenkém oxidovém filmu vznikajících působením molekul zkoumané látky. Chemické reakce se projevují změnami ve vodivosti senzoru. V první oxidační fázi se kyslík ze vzorku absorbuje, volné elektrony jsou zachyceny a zvýší se vodivost snímače. Ve druhé redukční fázi reaguje absorbovaný kyslík s těkavými organickými sloučeninami ze vzorku. Změna vodivosti je závislá na reakci kyslíku s těkavými



sloučeninami na snímací ploše a na velikosti kovových zrn ve snímací ploše. Pro umožnění těchto reakcí je nutno senzor přehřát, citlivost senzoru je závislá na jeho teplotě. Tyto senzory byly použity u prvních elektronických nosů. Dělí se na senzory MOS (metal oxide semiconductors) a MOSFET (metal oxide semiconductor field effect transistors), běžně se tyto dva typy u elektronických nosů používají zároveň. Senzory s polovodiči na bázi oxidů kovů patří mezi nejvyužívanější v technologii elektronických nosů (James et al., 2005; Röck, Barsan, and Weimar, 2008).

### 3.4.3 **Senzory s vodivými polymery**

Princip v podstatě stejný jako u senzorů s polovodiči na bázi kovů. Fungují tak, že senzor z polymerového kompozitu je vystaven výparům vzorku. Tyto páry pronikají do polymeru a ten se jejich působením roztahuje. Zvětšení polymeru působením těchto par způsobuje zvýšení odporu kompozitu. Tyto senzory jsou citlivější, ale více náchylné k ovlivnění výsledků vzdušnou vlhkostí (Arshak, Moore, Lyons, Harris, and Clifford, 2004).

### 3.4.4 **Tranzistory s chemickým senzorem (ChemFET)**

Na základě látky přijaté na řídicí elektrodě dochází k zesílení tranzistorů. Zkoumaná látka musí proniknout do povrchové vrstvy elektrody, a proto mají ChemFET senzory delší dobu odezvy oproti ostatním senzorům. V podstatě se jedná konstrukčně o MOSFET senzory, ale náboj se zde aplikuje na řídicí elektrodu chemickým procesem. Výhodou tranzistorů je snadná možnost jejich integrace do elektrických obvodů, naopak nevýhodou může být úzký okruh výrobců těchto tranzistorů (Arshak et al., 2004).

### 3.4.5 **Senzory s vláknovou optikou**

Fluorescenční techniky obvykle pracují na principu reakcí mezi optickými vlákny potaženými fluorescenční látkou a vzorkem zkoumané látky. Tyto reakce mění optické vlastnosti barviva, jako například změna spektra, intenzity nebo změna vlnové délky. Tyto změny jsou poté využity jako vstupní informace pro zpracování výsledného zhodnocení testované látky. Citlivost závisí na typu použitého fluorescenčního barviva a typu polymeru

použitého na podporu barviva. Výhodou optických senzorů je velmi rychlá odezva v časech kratších než 10 sekund a odolnost vůči elektromagnetickému záření. Nevýhodou je složité propojení elektroniky se softwarem a nízká životnost senzorů (Arshak et al., 2004; James et al., 2005).

#### 3.4.6 Neselektivní senzory

Elektronické nosy jsou schopny používat i neselektivní senzory jako např.: plynový chromatograf, hmotnostní spektrometr a jiné. Rozdílem oproti ostatním senzorům je příjem informací o zkoumané látce z tvaru výstupního signálu senzoru (Bílek, 2000).

### 3.5 Možnosti využití elektronického nosu pro posuzování silic

Elektronický nos je zařízení určené k detekci a rozpoznání pachů. Cílem vývoje elektronických nosů je napodobení a dokonce v některých ohledech i překonání lidského nosu. Lidský čichový orgán využívá smyslových buněk na sliznici a nervového centra v mozku. U elektronického nosu jsou smyslové buňky zastoupeny chemickými senzory a nervové centrum je zde zastoupeno počítačem. Smyslovými buňkami lidského nosu nazýváme receptory, kterých je velké množství a každý reaguje na konkrétní pach. U elektronického nosu je pouze malé množství chemických senzorů, jejichž odezva na určité látky vytváří specifické spektrum signálu pro každý konkrétní druh pachu. Elektronický nos funguje tak, že vyhodnotí zkoumaný vzorek a data z tohoto měření si uloží do databáze. Je nutné nejprve vytvořit co největší databázi konkrétních pachů a poté je možné přístroj využívat k detekci nebo rozpoznání pachů (Haddad, Medhanie, Roth, Harel, and Sobel, 2010; Röck et al., 2008).

Elektronické nosy jsou využitelné v obrovském množství různých odvětví, například:

- Potravinářství - kontrola kvality potravin, jejich skladování a kontaminace.
- Zdravotnictví - detekce nebezpečných a škodlivých bakterií, detekce rakoviny.
- Prevence kriminality - detekce bomb na letištích, pašování drog.
- Ochrana životního prostředí - detekce těkavých znečišťujících látek v ovzduší.

(Röck et al., 2008)

Tato diplomová práce je zaměřena na využití elektronického nosu k detekci a identifikaci vonných silic v rostlinných materiálech.

Výhodou elektronického nosu, oproti klasickému testování pachových látek školenými dobrovolníky při trojúhelníkovém testu, nebo při použití plynové chromatografie, je schopnost rozeznávat konkrétní silice v nízkých koncentracích a to i na pozadí silnějších vůní, jak dokázali ve své práci Andrea Branca a kolektiv (2003). Pokud má elektronický nos ve své databázi standardy konkrétních silic, je možné ho využívat jako nástroj pro hledání, posuzování množství a určování druhů silic v rostlinném materiálu.

### **3.6 Přírodní těkavé látky – silice**

#### **3.6.1 Ekologická role**

Chemické látky vytvářené přírodou mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin. Primární metabolity jsou univerzální pro celou rostlinnou a živočišnou říši, jsou to látky zajišťující výživu a základní metabolické funkce. Dělí se na 4 podskupiny a to jsou bílkoviny, sacharidy, nukleové kyseliny a lipidy. Pouze malá skupina primárních metabolitů, zejména jednoduché lipidy, se může objevit v silicích (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

Od primárního metabolismu se odvíjí biosyntéza látek, označovaných jako sekundární metabolity. Sekundární metabolity se vyskytují u všech druhů, ale liší se na základě taxonomické příslušnosti a podle období růstu. Sekundárními metabolity rostliny ovlivňují ekologické interakce mezi rostlinou a prostředím. Mohou to být látky jako terpeny, glykosidy, fenoly, alkaloidy a jiné. Silice jsou nejčastěji tvořeny terpeny, především monoterpenickými uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, estery a dalšími. Rostlina využívá silice pro mnoho účelů, záleží na konkrétní situaci, době růstu a jiným vnějším vlivům. Nejčastěji bývají využity jako obranný prostředek proti mikroorganismům (viry a bakterie) a býložravcům, pro přilákání přirozených nepřátel těchto býložravců nebo hmyzu schopného rostlinu opylovat, ale do určité míry také k odstraňování xenobiotik obsažených v půdě jako kontaminující látky (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009; Musilová, Uhlík, Macková, and Macek, 2012).

Jako příklad můžeme uvést situaci, kdy je rostlina napadena hmyzem. Útok hmyzu na rostlinu se projevuje rychlou změnou ve složení jejích silic a tím vysílá varovný signál pro okolní rostliny. Sousední rostliny jsou touto informací nuceny také změnit složení svých silic. Díky tomu se hmyz dostane u dalších rostlin do kontaktu s chemicky modifikovaným materiálem, který již nemusí vyhovovat jejich stravovacím návykům a nutí je opustit lokalitu a hledat jinde (Reyes-Jurado, Franco-Vega, Ramírez-Corona, Palou, and López-Malo, 2014; Wink, 1988).

### 3.6.2 Způsoby získávání silic a jejich výroba

#### Rozdělení procesů získávání silic

Způsoby získávání vonných silic je možné v základu rozdělit do tří kategorií podle jejich využití na:

#### **Průmyslové procesy**

Tyto procesy získávání silic se využívají pro produkci silic ve velkých množstvích a jsou určeny pro komerční účely. Nejpoužívanějšími metodami extrakce jsou různé druhy destilací nebo lisování za studena. Produkty průmyslových procesů jsou využity v různých průmyslových odvětvích, jako například potravinářství, kosmetika, farmacie a jiné. Další metodou je Superkritická fluidní extrakce v tlakové nádobě za použití oxidu uhličitého jako extrakčního činidla. Produkt této metody je extrakt, který je složením velmi podobný silici a je velice vhodný pro další využití a to z důvodu nepřítomnosti kapalného rozpouštědla. (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

## **Laboratorní procesy**

Následující metody se využívají především pro zachycení malého množství těkavých látek z aromatických rostlin pro využití ve výzkumných laboratořích a pro stanovení obsahu silic v rostlinném materiálu určeném pro průmyslové využití. Nejčastěji využívaným zařízením je oběhové destilační zařízení, tzv. Clevengerův aparát, který postupem času prošel mnoha modifikacemi. Další možností je využití mikrovlnné extrakce, tato metoda má výhodu menší časové náročnosti (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

## **Metody mikrovzorkování**

Využití metod mikrovzorkování se stává nezbytným, pokud máme k dispozici pouze velmi malé množství rostlinného materiálu, který je zásadní pro chemotaxonomické šetření a kontrolní rozbor. Dále se využívá v lékařství a šlechtění rostlin určených k produkci koření. Mezi tyto metody řadíme například: Přímý odběr vzorků ze sekrečních struktur, mikrodestilace, mikroextrakce na pevné fázi (SPME) a jiné (Handa, Khanuja, Longo, and Rakesh, 2008; Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

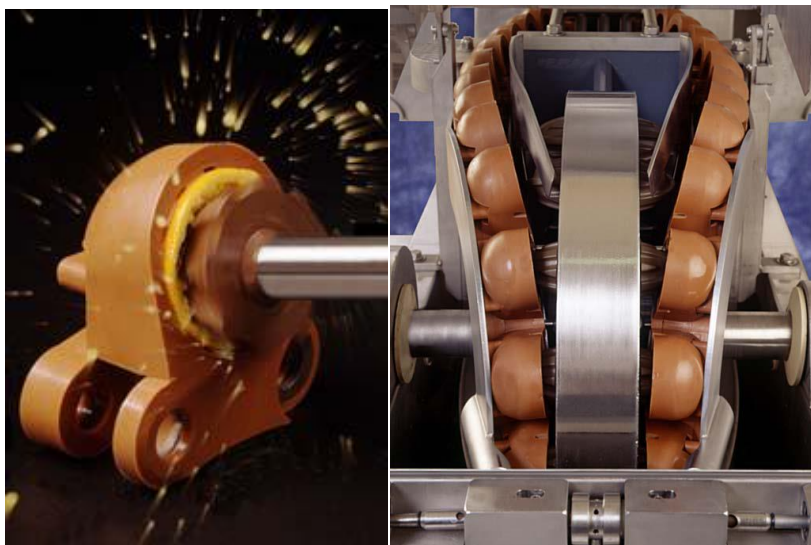
## **Metody získávání silic pro průmyslové účely**

V dnešní době se na produkci vonných silic pro průmyslové účely používají různé metody. Některé z nich jsou již léty prověřené, ale mají své nevýhody, a proto vznikají i nové metody, využívající současné technologie (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

## **Lisování za studena**

Nejstarší z těchto metod je lisování za studena. Tato metoda se využívala mnohem dříve, než lidé objevili proces destilace. Velkou výhodou tohoto procesu je technická nenáročnost, díky možnosti využívat pouze jednoduché a snadno dostupné nástroje ze dřeva nebo kamene. Další výhodou je, že v průběhu procesu není třeba přidávat žádné teplo, lisování se provádí za teploty okolí. Nevýhodou je malá výtěžnost aromatických látek a jejich nízká čistota (Reyes-Jurado et al., 2014).

Pro lisování za studena se téměř výhradně používají citrusové plody, konkrétně kůra těchto plodů, protože nejvyšší množství silic se vyskytuje v oblasti těsně pod kůrou, buňky šťávy také obsahují silice, ale již v menším množství a mají jiné složení. Důvodem k lisování citrusové kůry za studena je relativně nízká tepelná stabilita aldehydů v nich obsažených a jejich snadná degradace na zapáchající karboxylové sloučeniny (Handa et al., 2008).



Obr. 6 Průmyslový extraktor In Line

Zdroj: <http://www.schiercompany.com/Page12.html>

V současné době je nepoužívanější extraktor „In Line“ od společnosti Food Machinery Corporation (FMC). Velkou výhodou těchto extraktorů je současná separace ovocné šťávy a silic v jednom kroku. Přístroj funguje tak, že ovoce je umístěno do pevné spodní nádoby a nad ním je zrcadlově umístěna druhá pohyblivá nádoba. Pohyblivá nádoba se přesune k ovoci a ve stejnou chvíli je ve spodní části plodu nožem vyříznut otvor. Tlakem na ovoce vyteče spodním otvorem šťáva a z povrchu je vylisována silice, které je odnesena proudem vody. Nakonec se voda od oleje oddělí na odstředivce. V poslední době je lisování za studena využíváno pro výrobu silic v kvalitě bio, které jsou obvykle uváděny na trh jako speciální produkty a mají vyšší cenu (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

## **Destilace**

Destilace je nejpopulárnější a nejvyužívanější způsob pro výrobu silic po celém světě. Princip destilace aromatických rostlin je založen na odpařování silic z buněčných struktur rostlin v přítomnosti vlhkosti za vysoké teploty. Poté se směs ochladí, aby bylo možné oddělit olej z vody na základě nemísitelnosti kapalin o jiné hustotě.

Rozlišujeme tři způsoby destilace a to: vodní destilace, destilace vodou a parou a přímá parní destilace. Volba konkrétního způsobu destilace je závislá na vlastnostech materiálu. Volíme podle následujících kritérií: citlivost silic na působení vody a tepla, těkavost silic a rozpustnost silic ve vodě. Většina silic pro komerční využití jsou prakticky nerozpustné ve vodě a poměrně odolné vůči teplu a proto jsou vhodné pro zpracování destilací vodní parou (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

Silice jsou směsí různých vonných chemikálií, které mají bod varu v rozmezí od 150 °C do 300 °C. Pro uvolnění silic z rostliny je nutné podrobit rostlinný materiál zvýšené teplotě za přítomnosti vodní páry. Pro změnu kapalně fáze na plynnou je potřeba přivést teplo, které pochází z kondenzace páry (Handa et al., 2008).

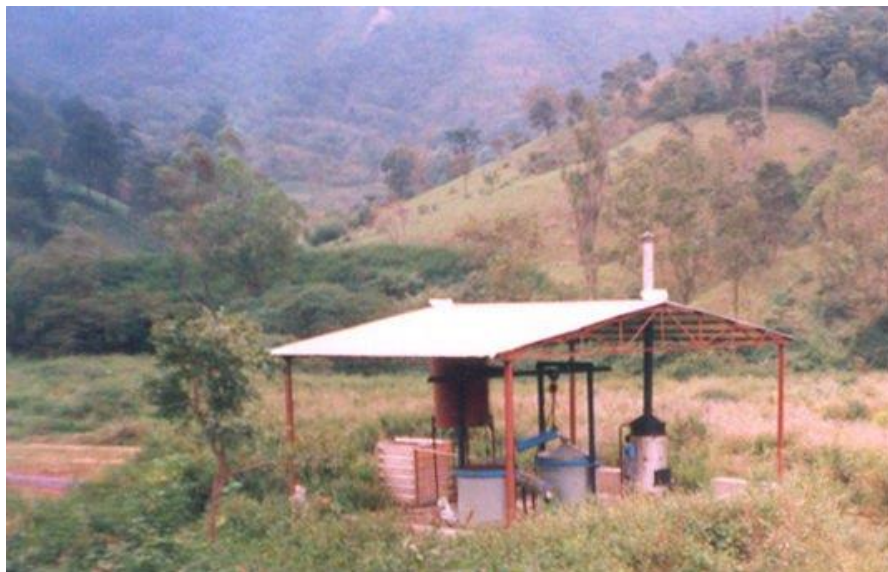
Dále budou popsány jednotlivé druhy destilace pro produkci vonných silic:

### **Vodní destilace**

Vodní destilace je nejjednodušší a nejstarší proces pro získání silice z rostlin. Od destilace parou se liší především tím, že rostlinný materiál je téměř celý pokrytý vodou, která je umístěna na zdroji tepla. Důležitým faktorem je dostatečné množství vody pro celý proces destilace, jinak může dojít k přehřátí materiálu a jeho zuhelnatění. Metoda je založena na přivedení vody k varu a převedení silic do kondenzátoru s parou, která vzniká díky varu vody. Výhodou této metody je jednoduchost vybavení a procesu a proto bývá využívána především malovýrobci. Tato metoda je vhodná především pro materiály, které mají tendenci se seskupovat do neproniknutelné hmoty během průchodu vodní páry (Handa et al., 2008; Reyes-Jurado et al., 2014).

## Destilace vodou a parou

Tato metoda vznikla pro odstranění některých nevýhod vodní destilace a je řešena několika modifikacemi destilační jednotky. Hlavní modifikací je přítomnost mřížového roštu, pro zamezení kontaktu rostlinného materiálu se dnem, které je rozpáleno pecí. Pro tuto metodu se využívají destilační jednotky zvané „Field distillation unit“ (FDU), které se skládají z nádrží z nerezové ocele s perforovanou mřížkou a jsou přímo připojeny k cihlové peci. Hladina vody je udržována pod mříží a pára z vroucí vody prochází skrz rostlinný materiál. Silice jsou odpařovány a odnášeny do kondenzačního potrubí chlazeného vodou. Kondenzát je pak oddělen od silic v odlučovači oleje. Výhodou těchto jednotek je jejich jednoduchá konstrukce a vytápění pecí pomocí dostupných surovin, proto jsou „FDU“ vhodné pro odlehlejší oblasti, kde je surovina k dispozici. Doba destilace v těchto jednotkách je asi 6-8 hodin a pojmu 100 – 2000 kg rostlinného materiálu (Handa et al., 2008).



Obr. 7 „FDU“ jednotka v Indii

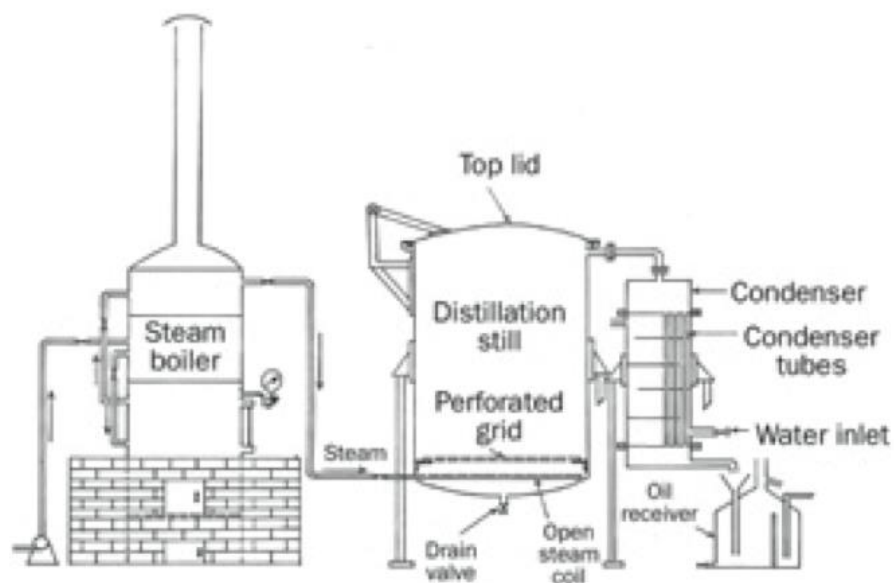
Zdroj: [http://in107567697.trustpass.alibaba.com/product/111807217-101441054/Field Distillation Units FDU in Mild Steel.html](http://in107567697.trustpass.alibaba.com/product/111807217-101441054/Field%20Distillation%20Units%20FDU%20in%20Mild%20Steel.html)



## Přímá destilace parou

Rozdíl mezi přímou destilací parou a ostatními metodami je v tom, že pára je produkována mimo nádrž v samostatném parním generátoru nebo kotli. Rostlinný materiál je uložen na perforovaném roštu stejně jako u destilace vodou a parou. Na rozdíl od „FDU“ reaktorů pracujících v atmosférickém tlaku a s teplotou maximálně 100 °C mají moderní tlakové kotle možnost produkovat mnohem vyšší teploty a nemají omezení pro v generování páry. Použití vysokotlaké páry u moderních parních destilačních jednotek umožňuje mnohem rychlejší a úplnou destilaci silic.

Použití vysokotlaké páry je vhodné, pokud máme k dispozici více reaktorů, pro destilaci silic s vysokou teplotou varu a pro materiály s vysokou odolností, jako jsou kořeny dřeviny jako santalové či cedrové dřevo. Rostlinný materiál je u těchto reaktorů silně ztuhnut na perforovanou mřížku a pára generovaná v samostatném kotli je vedena přes destilační nádrž parní cívku. Pára obsahující silice je kondenzována v trubkovém kondenzátoru a nakonec oddělena v olejovém separátoru. Kapacita generátoru je 1 až 3 tuny. Náklady na pohonné hmoty jsou nižší díky vyššímu tepelnému výnosu, pořizovací cena je ale vyšší a dostupná pouze pro velké producenty (Handa et al., 2008; Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).



Obr. 8 Princip přímé destilace parou

Zdroj: <http://headsheartsandtails.blogspot.cz/2011/09/classic-techniques-vs-advanced.html>

## **Superkritická fluidní extrakce**

Ve druhé polovině 20. století se začal zvyšovat zájem o možnosti využití superkritických tekutin jako alternativního rozpouštědla pro extrakci silic z rostlin. Hlavním důvodem zájmu byla možnost provádět extrakce při teplotě okolního prostředí, čímž předcházíme vzniku tepelné denaturace substance. Tekutina v superkritickém stavu, má vlastnosti kapaliny i plynu a tohoto stavu je dosaženo zahříváním a stlačováním nad kritickou teplotu a tlak. Každá tekutina může ve vhodných podmínkách dosáhnout nadkritického stavu, ale pouze ty, které mají kritickou teplotu blízko teploty okolí, se dají využít jako alternativní rozpouštědlo pro extrakci. Nejatraktivnějším rozpouštědlem pro tyto účely se jeví oxid uhličitý, z důvodu jeho toxicity, hořlavosti a pořizovacích nákladů (Handa et al., 2008).

Extrakce superkritickým oxidem uhličitým je separační proces využívající schopností tekutiny v superkritickém stavu. Rozpouštěcí schopnost oxidu uhličitého je možno ovlivnit změnou tlaku a teploty. Většina extrakcí probíhá při tlaku 100-300 bar a teplotě 40-50 °C. Za těchto podmínek je možné získat z extrahovaného materiálu přibližně 95% substance (Handa et al., 2008; Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

### **3.6.3 Možnosti komerčního využití**

Vonné silice se využívají v mnoha různých průmyslových odvětvích, ale hlavní spotřebitelé jsou průmysl potravinářský, farmaceutický a kosmetický. V období po druhé světové válce se rozmohlo nahrazování přírodních vonných látek syntetickými chemikáliemi, které byly považovány za budoucnost pro tyto aplikace. Rychlý rozvoj výroby a použití těchto chemikálií přinesl otázky o jejich bezpečnosti pro člověka a přírodu. Ve velkém množství produktů obsahujících tyto chemikálie byly objeveny škodlivé látky, které byly nahrazeny novými, bezpečnějšími. V poslední době se ale rozmohl trend, který je možné označit jako „Návrat k přírodě“. Výrobci začali na svých produktech zdůrazňovat obsah přírodních látek a silně vzrostla poptávka po takzvaných ekologických výrobcích.

Tyto výrobky obsahují látky z ekologického pěstování rostlin bez použití pesticidů, herbicidů, umělých hnojiv a dalších chemických látek široce používaných v zemědělství. Výrobky obsahující silice z ekologického pěstování patří mezi nadstandardní zboží a prodávají

se ve speciálních obchodech, nebo speciálních odděleních supermarketů. Tomu také odpovídá jejich cena, která výrazně převyšuje cenu stejných výrobků, u kterých nebyly použity přírodní látky z ekologického pěstování. Velká poptávka po ekologických výrobcích, která se každý rok navyšuje, znamená slibně vypadající budoucnost pro průmysl na výrobu silic (Burt, 2004; Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

### **Potravinářský průmysl**

Nejvyšší spotřeba silic je v potravinářském průmyslu pro dodávání chutě a vůně výrobkům a to zejména u nealkoholických nápojů. Využívá se především několika hlavních druhů silic a to: pomeranč, citrón, grep, mandarinka, zázvor, skořice, hřebíček a máta peprná. Podobné druhy silic se využívají cukrářství, pekařství a u mléčných výrobků, avšak rozsah druhů použitých silic může být širší a zahrnují i některé ovocné výrobky. Pikantní silice jsou velmi využívané pro výrobu „chipsů“ a podobných slaných výrobků. Dalším významným odběratelem silic je odvětví na výrobu alkoholických nápojů, kde se využívá například zázvor pro výrobu zázvorového piva, máte peprná na mátový likér, bylinné oleje pro různé ochucené likéry a mnoho dalších. Dalšími velkými odběrateli vonných silic jsou rychlá občerstvení a výrobci konzervovaných jídel, ačkoliv zde se využívají především pikantní a bylinné chutě. Důležité silice jsou především koriandr, pepř, nové koření, bobkový list, zázvor, bazalka, oregano, kopr, fenykl a další. Množství využívaných silic jsou velmi malá a dodržují se přísné podmínky jejich dávkování, aby nepřekročily koncentrace bezpečné pro vnitřní použití. Překročení limitů dávkování může pro člověka představovat vážná zdravotní rizika. Řada silic byla registrována evropskou komisí pro využití jako aromatické látky v potravinách. Registrované příchutě představují látky, které nejsou zdravotním rizikem pro spotřebitele. Látky, které byly registrovány evropskou komisí, jsou také součástí seznamu všech přídavků do potravin ve Spojených státech (EAFUS, 2007), což znamená, že jsou považovány FDA (Food and Drug Administration) za obecně bezpečné (Burt, 2004).

## **Farmaceutický průmysl**

Farmaceutický průmysl je jedním z odvětví, kde se ve větším množství využívají vonné silice. Například silice z máty peprné a fenyklu se používá v zubních pastách a mnoha jiných přípravcích. Dalším příkladem mohou být eukalyptové a kafrové silice, které našly využití ve volně prodejných lécích proti kašli, analgetikách, inhalátorech, mastech nebo v zubním lékařství. Vonné silice se také používají v mnoha lécích, kde slouží k neutralizaci nepříjemných chutí. V současné době se taky zkoumá vliv určitých druhů silic na rakovinu a další závažné zdravotní problémy (Bakkali, Averbeck, Averbeck, and Idaomar, 2008).

Velké množství rozmanitých druhů silic je také využíváno v alternativní medicíně nebo u přírodní léčby pomocí aromaterapie. Aromaterapie je léčebná metoda vyvinuta Egypťany již před 6000 lety. Je založena na vlivech aromatických látek na lidské tělo a především se zde využívají antiseptické, antibakteriální, antivirové, antioxidační, analgetické a sedativní účinky různých silic. Aromaterapeutické praktiky můžeme rozdělit na terapii klinickou, estetickou, holistickou a způsoby aplikace na masáž, koupel, obklady, inhalaci a odpařování. Aromaterapii je možno definovat jako cílené využívání silic pro udržení, podporu a zlepšení fyzické, psychologické a duševní pohody (Cooke and Ernst, 2000; Gao, Wang, Wei, and Li, 2009; Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

## **Kosmetický průmysl**

V kosmetickém průmyslu se mohou vonné silice využívat jako bioaktivní složky pro různé druhy tekutých mýdel, šamponů, tělová mléka, krémy a mnoho dalších. Výrobci kladou důraz na propagaci zlepšení nálady a stavu spotřebitelů díky silicím obsažených v jejich produktech. Odvětví výroby produktů obsahujících přírodní silice se velmi rychle rozvíjí a v podstatě se jedná o návrat k tomu, co bylo běžnou praxí ve středověkých a starověkých časech.

Ve velkém se v kosmetickém průmyslu silice využívají především na výrobu parfémů. V minulosti bylo běžné pro výrobu parfémů využívat silic z přírodních materiálů, ale s příchodem moderních metod byly postupně vytlačeny vonnými chemikáliemi. Ve 20. století bylo naprosto běžné vyrábět parfémy s téměř nulovým obsahem přírodních vonných látek, až v posledních letech se vrací trend využívání přírodních vonných silic a zvláště bývají

zdůrazňovány silice získané z ekologického pěstování rostlin. Jako klasické rostliny, které se využívají pro výrobu silic pro kosmetický průmysl, může být označena například růže, levandule, vanilka a mnoho dalších (Aburjai and Natsheh, 2003; Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

#### 3.6.4 Využití odpadů pro produkci cenných látek

Evropská i celosvětová environmentální politika podporuje odklon od skládkování odpadů snahou odpady zpracovávat v různých zařízeních. Separovaný organický odpad bývá obvykle zpracován kompostováním, spalováním, anaerobní digescí nebo různými kombinacemi jmenovaných metod. Během těchto procesů se uvolňuje velké množství cenných a využitelných látek, jejichž potenciál je nevyužit (Font, Artola, and Sanchez, 2011).

Velkým zdrojem využitelných organických odpadních materiálů jsou odpady ze supermarketů, gastronomických podniků a celkově potravinářského průmyslu. V těchto odvětvích se využívá především materiál, který nemá dostatečnou jakost k uvedení na trh pro jeho primární využití nebo potraviny, jimž vypršelo doporučené datum spotřeby. Jako příklad můžeme uvést balené koření s prošlou dobou trvanlivosti. Tento rostlinný materiál se jeví jako ideální pro získání vonné silice. V České republice se v praxi zcela běžně využívá odpadního kmínu pro produkci silice karvonu a dalších. Tyto praktické postupy bohužel nejsou nikde publikovány (Klouček, 2016).

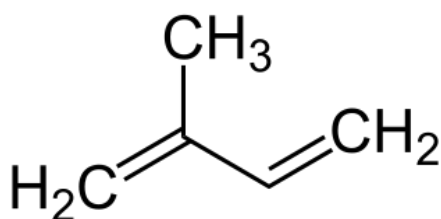
Například u citrusových plodů, jako je pomeranč, citron, mandarinka, grep a limetka, tvoří slupka (odpadní materiál) 50% hmotnosti plodu. Celosvětová produkce citrusů se pohybuje kolem 95 milionů tun, z nichž je zpracováno 31,2 milionu tun. Ročně tedy vzniká 15,6 milionu tun odpadu, který může být dále zpracován a využit pro různé účely. Tento druh odpadů můžeme využít jako krmivo pro dobytek, na produkci pektinu, enzymů, produkci bioplynu, fermentační substrát, na produkci bioethanolu nebo na produkci silic. Transformace odpadů z citrusových plodů a maximální využití jejich potenciálu by mohlo zvýšit konkurenceschopnost firem zabývajících se tímto odvětvím (Lin et al., 2013).

Dalším příkladem může být využití zbytků vzniklých při výrobě nábytku z cedrového dřeva. Pro nábytek je využito pouze dřevo a odpadní zbytky cedrového stromu jako jsou větve, kořeny, pařezy a piliny se využívají pro výrobu vonných silic. Ve Francii mezi městy Bordeaux a Biarritz existuje pro papírový průmysl velice důležitá borovicová oblast. Jehličí a větvičky

místních stromů se dříve buď spalovaly, nebo nechaly shnít. Dnes je odpadní materiál z těchto vysoce kvalitních stromů využíván k výrobě velmi drahé a oblíbené borovicové silice (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

### 3.6.5 Chemické složení silic

Silice jsou složité směsi různých látek. V malém množství mohou být složeny z primárních metabolitů, obvykle lipidů, ale hlavní složkou silic jsou sekundární metabolity. V silicích se obvykle vyskytují sekundární metabolity jako terpenoidy, alkaloidy, polyketidy a šikimáty. Zdaleka nejdůležitější skupinou jsou terpenoidy. Z chemického hlediska se terpenoidy skládají z izoprenů, což je 2-metylbuta-1,3-dien. Dále je dělíme podle počtu izoprenových jednotek v řetězci. Pouze hemiterpenoidy, monoterpenoidy a seskviterpenoidy jsou dostatečně těkavé na to, aby byly obsaženy v silicích (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009; Sacchetti et al., 2005).



Obr. 7 Izopren

Zdroj: <http://www.wikiwand.com/de/Isopren>

Hemiterpenoidy obsahují jednu izoprenovou jednotku a na ni mohou být navázány alkoholy, estery a aldehydu. Nejčastěji oxiduje na prenil. Estery jako prenyl acetát dávají silicím ovocný nádech a přítomnost thioesterů přispívají k vůni galbanum.

Monoterpenoidy obsahují dvě izoprenové jednotky a jejím hlavním prekurzorem je geranyl pyrofosfát. Díky různým substitucím a reakcím se mezi monoterpenoidy řadí velké množství složek silic, jako například geraniol, citral,  $\alpha,\beta$  – pinen, myrcen, citronelol, karvon a mnoho dalších.

Seskviterpenoidy obsahují tři izoprenové jednotky a hlavním znakem je farnesol. Mají vyšší bod varu a jsou méně těkavé oproti monoterpenoidům. Z tohoto důvodu se na vůni silic podílejí v menším měřítku a jsou to silice jako například santalol, selinen, humulen a jiné (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009; Sacchetti et al., 2005).

V praktické části diplomové práce je využíván elektronický nos pro hledání konkrétních složek silic v rostlinném materiálu. Hledány byly silice anisol,  $\beta$ -pinen, karvon, karvakrol a  $\beta$ -citronelol v kmínu, meduňce, anýzu a oreganu. Dále bude popsáno chemické složení těchto rostlinných materiálů.

### **Karvon**

Monoterpenoid ketonu karvonu se dělí na dva druhy a to (R) - (-) - a (S) - (+)-. Hlavní složkou silice kmínu je (S) - (+)- karvon a využívá se především v potravinářském průmyslu. Silice mátových listů ale obsahují z 50% (R) - (-) karvon, který se používá v ústních vodách, zubních pastách atd. (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

### **$\beta$ -pinen**

Monoterpenoid vyskytující se především v pryskyřici borovice, po které má i specifickou vůni. Průmyslově se využívá především při výrobě alkoholu, konkrétně Ginu. Dále se může vyskytovat v rozmarýně, bazalce, oreganu a růži (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009).

### **$\beta$ -citronelol**

Acyklický monoterpenoid  $\beta$ -citronelol je jednou z nejvyužívanějších silic v parfumerii. Dále je dobře využitelný jako repelent proti hmyzu a jako ochucovadlo v potravinářském průmyslu. Citronová tráva obsahuje kolem 50% této silice, dále se vyskytuje v růžích a pelargoniích (de Sousa et al., 2006).

### **Anisol**

Anisol se často vyrábí synteticky Williamsonovou etherovou syntézou, vzniká reakcí brommethanu s fenolátem sodným. Silice má vůni anýzu a využívá se v parfémtech, lékárenství a jako postřik proti hmyzu (Hiers and Hager, 1929).

### **Karvakrol**

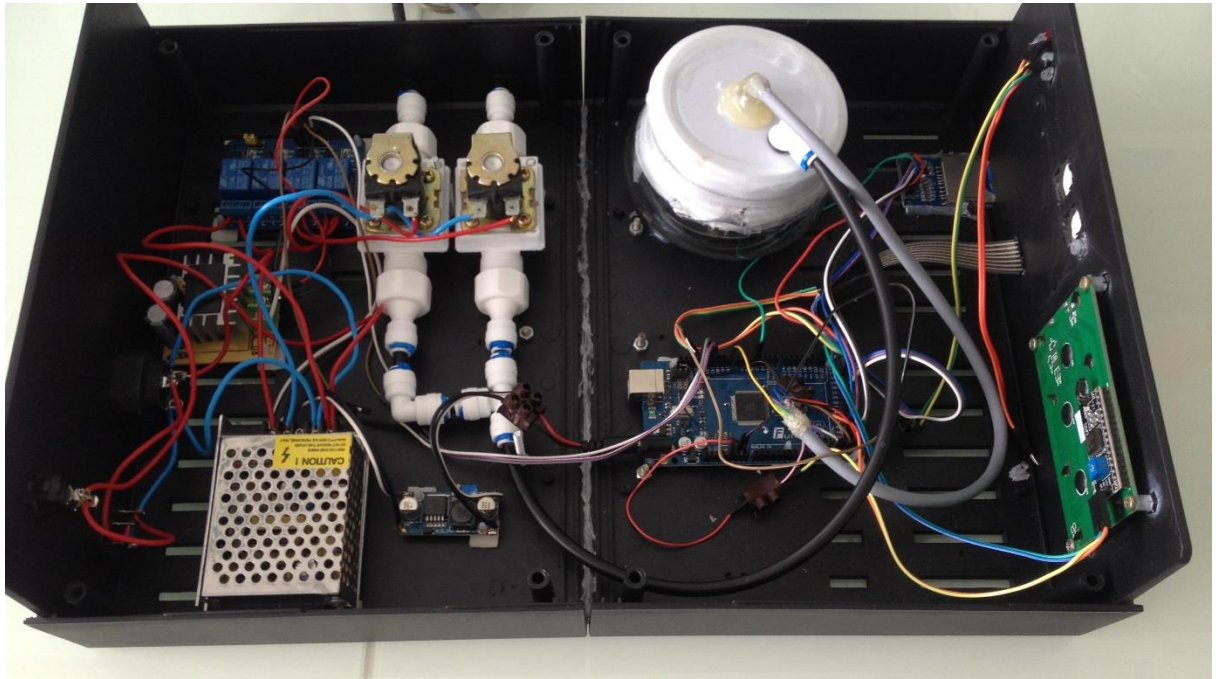
Monoterpenoidní alkohol, který se vyskytuje především v oreganu, tymiánu, řeřiše a majoránce. Využívá se především v potravinářském průmyslu a jako inhibitor růstu některých bakterií (Husnu Can Baser and Buchbauer, 2009; Ultee, Slump, Steging, and Smid, 2000).

## 4 Materiál a metody

Elektronický nos využitý pro tuto diplomovou práci byl zapůjčen z technické fakulty ČZU. Jedná se o zařízení, které bylo nově vyvinuto v rámci diplomové práce Bc. Lukáše Maršána.

### 4.1 Konstrukce elektronického nosu

Elektronický nos se skládá z následujících částí:



Obr. 9 Elektronický nos

#### Platforma Arduino

Hlavní řídicí součástí elektronického nosu je platforma Arduino Mega 2560, která obsahuje 53 digitálních vstupně-výstupních portů. Na platformě se nachází AVR mikroprocesor ATmega2560 od firmy Atmel. Mikroprocesor je vybaven 256 kB flash pamětí, 8 kB RAM pamětí a 4 kB EEPROM pamětí. Platforma je napájena 7-12V adaptérem nebo přes USB port. Na platformu jsou připojeny další periferie jako klávesnice, čtečka SD karet, LCD displej, relátka a chemické senzory.



## Chemické senzory

Pro konstrukci elektronického nosu byly vybrány senzory, u kterých je předpokladem vysoká citlivost na organické látky obsažené v rostlinných silicích. Proto byly vybrány senzory citlivé na: metan, propan, butan, etanol, těkavé organické sloučeniny jako aceton, amoniak, formaldehyd a nečistoty z ovzduší. Každý senzor má jinou odezvu na specifické látky.

Senzory jsou umístěny v utěsněné skleněné nádobě, do které se přivádí vzorek. Nádoba obsahuje 7 plynových senzorů a jeden tepelný. Dále budou popsány jednotlivé senzory.

Figaro TGS813 – citlivost na propan, butan, jejich směsi a butan

Figaro TGS822 – citlivost na organické výpary rozpouštědel jako je etanol

Parallax MQ-4 – vysoká citlivost na metan a zemní plyn, nižší citlivost na alkohol a kouř

Figaro TGS2600 – detekce nečistot ve vzduchu – vodík a oxid uhelnatý

Figaro TGS2602 – citlivost na chloroform, etylbenzen, aceton, formaldehyd a páchnoucí plyny sirovodík a amoniak

Figaro TGS2611 – citlivost na metan

## Klávesnice

Jako vnější ovládání elektronického nosu slouží maticová klávesnice 4x3. Slouží k zadávání a potvrzování čísla vzorku, nastavení doby vakuace, spouštění čisticí sekvence a pro spuštění nebo přerušování měřícího procesu.



Obr. 10 Elektronický nos – čelní strana

## **LCD displej**

LCD displej je zabudován vedle klávesnice a slouží k zobrazení povelů, informací a průběhu měření. Zobrazovací rozsah displeje jsou 4 řádky a 20 znaků.

## **Čtečka SD karet**

Čtečka SD karet je připojena k mikroprocesoru přes sériové rozhraní (SPI) a umožňuje čtení a zápis na SD kartu.

## **Napájení**

Zařízení je potřeba připojit k síťovému napětí 230 V/50 Hz. Uvnitř zařízení je umístěn spínaný zdroj Meanwell S-25-12, který má výstupní napětí 12 V a je využíván k napájení elektromagnetických ventilů, které oddělují měřící komoru, vývěvu a vzorkovnici.

## **4.2 Měřené látky**

Pro účel práce bylo zapotřebí nejdříve vytvořit databázi standardů hledaných látek a poté změřit odpadní vzorky, ve kterých hledáme již naměřené složky silice.

### **4.2.1 Standardy**

**Anizol** – Výrobce Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99\%$

**Karvon** – Výrobce Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99\%$

**Karvakrol** – Výrobce Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99\%$

**$\beta$  – Pinen** – Výrobce Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99\%$

**$\beta$  – Citronelol** – Výrobce Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99\%$

### **4.2.2 Modelové odpadní vzorky**

**Kmín** – Výrobce Orient

**Oregano** – Výrobce Vitana

**Meduňka** – Produkce Katedry rostlinné výroby, ČZU, sklizeň 2015

**Anýz** – Vitana

**Jehličí borovice kleč** – areál ČZU

### 4.2.3 Příprava vzorků

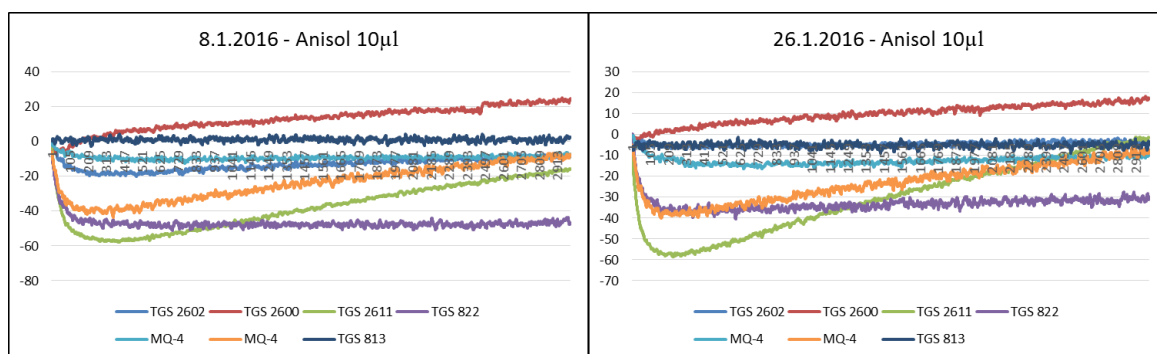
Pro přípravu odpadních vzorků bylo nutné nejdříve materiál namlít na menší části z důvodu lepšího uvolňování těkavých látek. Materiály jako meduňka a oregano byly rozemlety v ruce, kmín a anýz bylo nutné namlít v elektrickém mlýnku. Namletý vzorek byl navážen na analytických vahách, navážka všech vzorů byla 0,5g.

### 4.3 Optimalizace metody měření

Používaný elektronický nos byl nově vyvinut a nebyl nikdy odzkoušený. Z tohoto důvodu bylo prvním úkolem otestovat jeho možnosti a vytvořit optimální postup měření. Před stanovením optimální metody měření bylo nutné provést několik úprav a změn v nastavení. Zde jsou uvedeny některé z nich.

#### Slepé a kontrolní vzorky

Na začátku každé série měření bylo nejdříve provedeno měření slepého vzorku (prázdna vzorkovnice) a poté byl změřen kontrolní vzorek (anisol). Jako kontrolní vzorek byl vybrán anisol z důvodu již známých správných výsledků a možnosti rychlého ověření funkčnosti přístroje a správnosti měření. Na obrázku č. 9 jsou vedle sebe dva kontrolní vzorky anisolu, každý měřený na počátku série měření v jiný den.



Obr. 11 Měření kontrolních vzorků anisolu v různé dny

## Těsnost systému

U systému byla během prvních měření zjištěna nízká těsnost. Netěsnostmi byl způsoben nedostatečný podtlak v systému, který téměř znemožňoval nasávání vzorku do měřící komory. Hlavními zdroji netěsností byla určena dvě místa. Spoje mezi ventily a hadičkami a víko měřící komory. Spoje mezi ventily a hadičkami byly utaženy přes závitové matice pomocí klíče. Netěsnost u víka měřící komory byla vyřešena několikanásobným obtažením spoje pomocí parafilmu. Po vyřešení těchto netěsností se podtlak v systému dostal na dostatečnou úroveň potřebnou k měření, ale stav rozhodně nebyl považován za dokonale těsný.

## Úprava víka od vzorkovnice

Původní víko od vzorkovnice bylo uzavřené a vedla z něj pouze hadička odsávající látky uvolněné ze vzorku. Později, kvůli nebezpečí poškození přístroje během fáze čištění, bylo vytvořeno nové víko s nasáváním přes uhlíkový filtr, které je na obrázku 10. Uhlíkový filtr byl zkonstruován z důvodu možné kontaminace vzorku jinými těkavými látkami z ovzduší laboratoře. Použití víka s nasáváním přes filtr nemělo žádný výrazný vliv na výsledky měření ve srovnání s využitím uzavřeného víka.



*Obr. 12 Víko vzorkovnice s nasáváním přes uhlíkový filtr*

#### 4.4 Fáze měření

Zde je shrnut používaný postup měření do několika bodů:

1. Kapalným vzorkem se odebere pipetou z nádoby, nanese se na připravený čtverec z buničiny o rozměrech 2x2 cm a vloží se do vzorkovnice. Pevný vzorek se naváží a vloží do vzorkovnice.
2. Do vzorkovnice se vloží magnetické míchadélko a umístí se na střed plochy elektromagnetické míchačky.
3. Míchání vzorku trvá 5 minut, během této doby se ze vzorku uvolňují těkavé látky a naplňují vzorkovnici.
4. Po uplynutí 5 minut míchání se zapne fáze měření, ve které dochází nejdříve pomocí vývěvy k 30 vteřinové vakuaci měřicí komory. Poté se otevře ventil a pomocí podtlaku jsou výpary nasávy do měřicí komory.
5. Ventil se uzavře a v měřicí komoře probíhá měření po dobu 5 minut. Nejdříve se zapíše hodnota teploty v měřicí komoře, poté je zapsána vstupní hodnota – blank a dále jsou hodnoty ukládány o frekvenci 10 měření za 1 vteřinu.
6. Poté se provádí čištění systému a to proplachováním vzduchem, který je nasáván pomocí podtlaku z vývěvy. Během čištění se střídavě otevírají a zavírají ventily a doba čištění je 60 vteřin.
7. Poté se může měření opakovat. Měření jednoho vzorku bylo opakováno 5x pro kvalitativní a 3x pro kvantitativní analýzu.

## 4.5 Postup měření a zpracování výsledků

### 4.5.1 Kvantitativní analýza

Pro kvantitativní analýzu byla jako měřená látka zvolen standard anisolu. Vzorky byly měřeny v koncentracích 0,3, 1, 3, 10 a 30  $\mu\text{l}$  na dávku a každá koncentrace byla naměřena 3x. Výstupní hodnoty z měření senzorů byly nejdříve převedeny na relativní hodnoty, kde nulu představuje první naměřená hodnota od blanku. Relativní hodnoty byly dále zprůměrovány po deseti řádcích. Z průměrných hodnot poté byly vybrány hodnoty v časech 1, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240 a 300 sekund od počátku měření. Dále byly zprůměrovány hodnoty z daných časů pro všechny koncentrace a tyto hodnoty byly vloženy do tabulek pro každý senzor zvlášť. Pro tabulky představující jednotlivé senzory byl spočten korelační koeficient vyjadřující závislost mezi koncentrací vzorku a naměřenou hodnotou.

### 4.5.2 Kvalitativní analýza

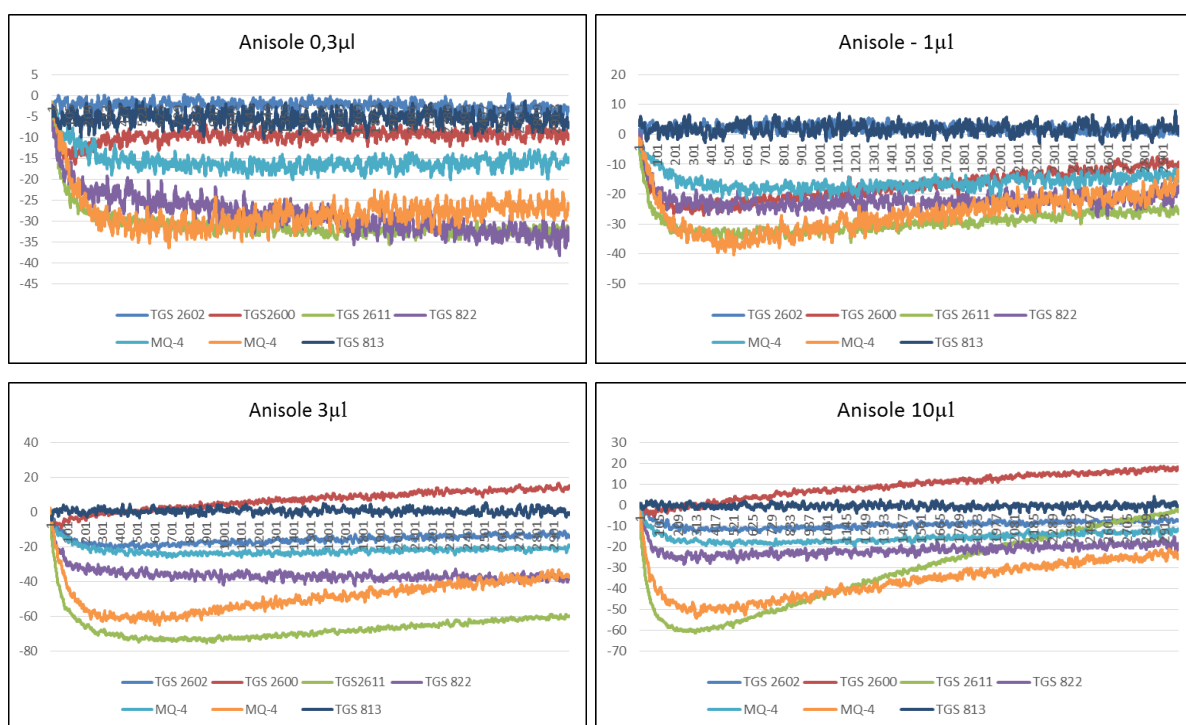
Pro kvalitativní analýzu byly nejdříve naměřeny standardy 5 různých silic a to: karvon, karvakrol,  $\beta$  – pinen, anisol a  $\beta$  – citronelol. Standardy byly měřeny v koncentracích 10  $\mu\text{l}$  a každá látka byla naměřena 5x. Po naměření standardů byly naměřeny modelové odpadní vzorky a to: anýz, meduňka, oregano, kmín a jehličí borovice kleč. Všechny vzorky byly měřeny 5x. U prvních 4 odpadních vzorků byla navážka 0,5g, pouze u jehličí byla navážka 0,7g.

## 5 Výsledky

Tato kvantitativní a kvalitativní analýza si neklade za cíl prokázat stoprocentní funkčnost použitého přístroje. Z důvodu nedostatečného množství času a malého množství naměřených koncentrací se jedná spíše o orientační shrnutí současných výsledků.

### 5.1.1 Kvantitativní analýza

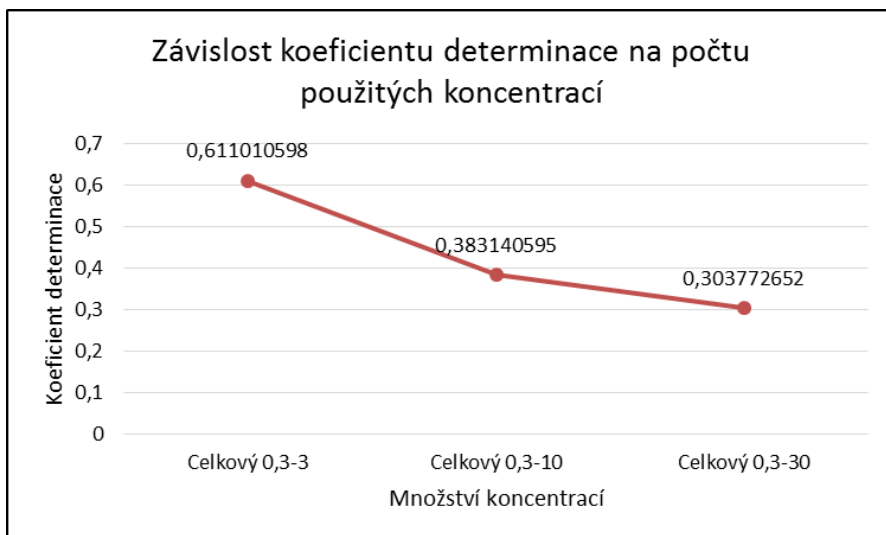
Na obrázku 13 jsou vidět rozdíly v grafickém spektru mezi různými koncentracemi. Dále je z obrázku 13 patrné, že při zvyšující se koncentraci měřené látky se signál stává ostřejší. Koncentrace 0,3 $\mu$ l se viditelně pohybuje lehce nad mezí detekce.



Obr. 13 Grafické znázornění naměřených vzorků anisolu v různých koncentracích

Naměřené hodnoty byly zaneseny do tabulek, pro každý senzor samostatně a byly spočteny koeficienty korelace a determinace.

Ze zpracování naměřených hodnot byla vyřazena všechna měření o koncentraci 10 a 30  $\mu$ l a to z důvodu předpokládaného plného nasycení objemu vzorkovací nádoby. Hodnoty z těchto měření již na první pohled nebyly lineární oproti ostatním měřením a výrazně snižovaly výsledné koeficienty determinace, jak je patrné z obrázku 14.



Obr. 14 Závislost celkového koeficientu determinace na přidaných koncentracích měření

Celkový průměrný koeficient determinace ze všech měření a senzorů byl 0,611. Jak je patrné z tabulky 1, tak senzorem s nejlepším koeficientem byl Figaro TGS 2611 s hodnotou 0,9311 a naopak nejhorším byl senzor TGS 822 s hodnotou 0,119.

<i>Senzor</i>	<i>Koeficient determinace</i>
TGS 2600	0.889
TGS 2602	0.537
TGS 2611	<b>0.931</b>
TGS 822	<b>0.119</b>
MQ-4 1	0.738
MQ-4 2	0.895
TGS 813	0.169

Tab. 1 Průměrné hodnoty koeficientu determinace pro jednotlivé senzory

U senzoru TGS 813 je podle grafů patrné, že nereaguje na žádnou složku anisolu a u všech měření se jeho hodnoty pohybují kolem nuly. Senzor TGS 822 měl odezvu u všech měření velice podobnou a zřejmě se nijak nemění s narůstající koncentrací vzorku. Senzor TGS 2600 měl odezvu velice nestabilní a prokázal se i při měření jiných vzorků jako nespolehlivý, příčinou by mohla být porucha nebo vysoké opotřebení. Pokud z měření vyloučíme tyto tři senzory, tak se celkový koeficient determinace změní z původní hodnoty 0,611 na 0,863.



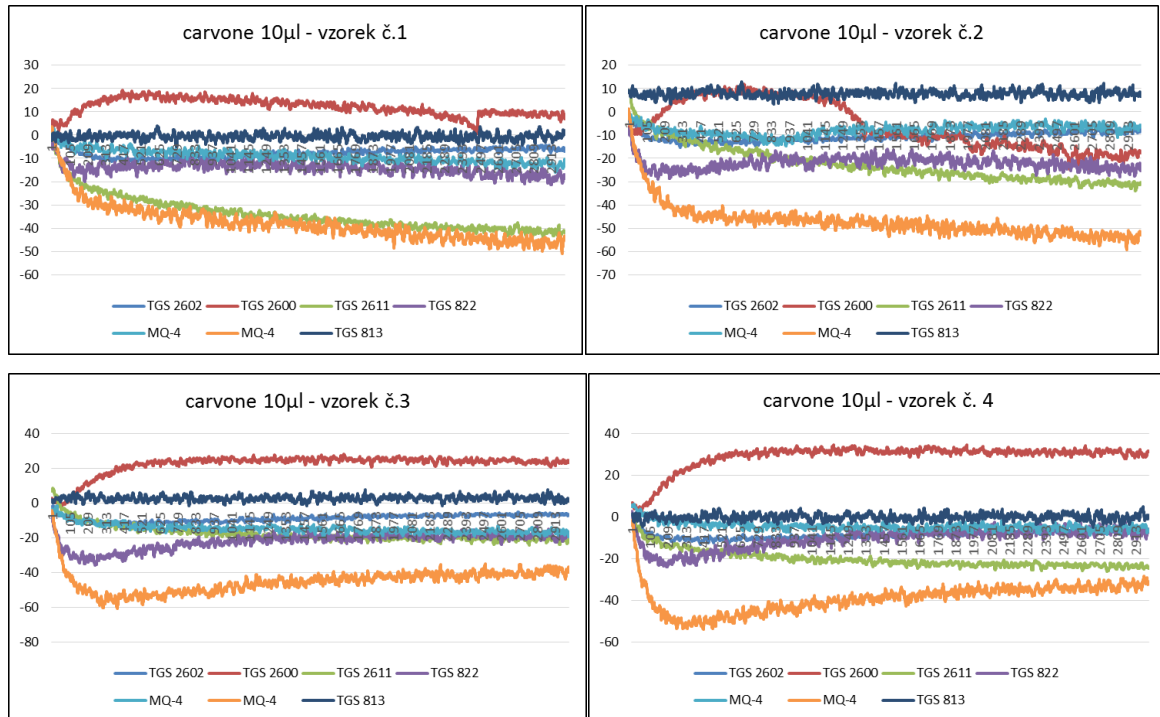
Průměrné koeficienty determinace se také měnily v závislosti na čase měření, i když rozdíly nejsou nijak zásadní, jak je vidět v tabulce 2. Nejhorší hodnoty byly v časech 1 a 299 sekund, tedy na začátku a konci měření. Nejlepší hodnoty koeficientu byly mezi časy 120 – 240 sekund. Pokud by byly vyřazeny hodnoty ze začátku a konce měření například u senzoru s nejlepším průměrným koeficientem determinace, tedy TGS 2611, změnila by se jeho hodnota z 0,931 na 0,979. Zároveň u tohoto čidla byl naměřen nejlepší koeficient determinace a to v čase 60' s hodnotou 0,999.

<i>Měření v čase</i>	TGS 2602	TGS 2600	TGS 2611	TGS 822	MQ-4	MQ-4	TGS 813	<i>Průměrný koeficient determinace</i>
1	0.65417	0.334877	0.720224	0.244721	0.951775	0.997984	0.001177	<b>0.558</b>
10	0.899801	0.336585	0.976353	0.191234	0.906126	0.961821	0.235917	0.644
20	0.893873	0.317546	0.994925	0.11662	0.676162	0.981578	0.167889	0.593
40	0.938975	0.378483	0.999477	0.128474	0.623395	0.997077	0.396441	0.637
60	0.910639	0.366213	<b>0.999998</b>	0.088001	0.583345	0.99984	0.088214	0.577
120	0.913884	0.508005	0.975283	0.077766	0.691344	0.96088	0.192323	0.617
180	0.885007	0.714348	0.969999	0.134998	0.751599	0.897432	0.163849	<b>0.645</b>
240	0.938558	0.93745	0.937606	0.028328	0.782186	0.71605	0.146758	0.641
299	0.967651	0.937606	0.806477	0.057263	0.673623	0.540623	0.126841	0.587

*Tab. 2 Průměrné koeficienty determinace v závislosti na čase*

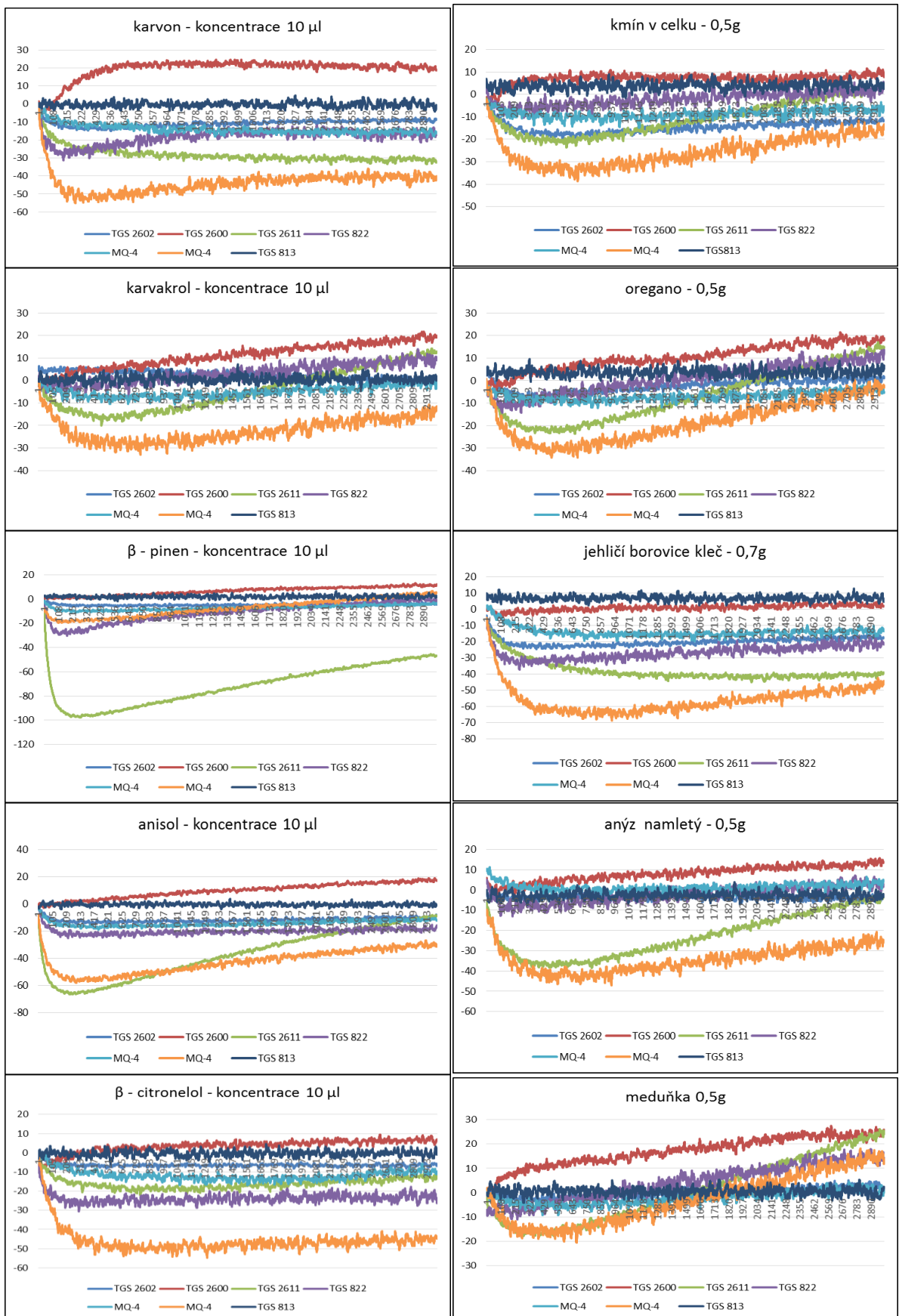
### 5.1.2 Kvalitativní analýza

Ve většině případů byla první dvě měření ovlivněna měřením předchozí látky, a proto nebyla použita pro vytvoření naměřeného standardu. Hodnoty se většinou stabilizovaly až od třetího vzorku, jak je vidět na obrázku 15.



Obr. 15 Stabilizace měřených hodnot

Jak je viditelné na obrázku 16, tak každý vzorek nebo látka vytvořila specifické grafické spektrum, kde lze na první pohled poznat, že jsou mezi vzorky rozdíly.



Obr. 16 Grafické zobrazení vybraných grafů pro každý měřený vzorek

V následujících třech tabulkách jsou shrnuty výsledky všech měření pro kvalitativní analýzu ve formě srovnání procentuální shody průměrné hodnoty ze třech měření dané látky a jednotlivých měření, z kterých se průměr skládal.

Porovnání shody naměřených hodnot standardů

	anizol	$\beta$ - pinen	$\beta$ - citronelol	karvon	karvakrol
anizol 10	97.59%	94.94%	67.43%	78.39%	84.25%
anizol 11	99.19%	94.87%	83.52%	82.00%	88.72%
anizol 12	97.47%	95.03%	76.06%	83.96%	86.43%
průměr	<b>98.08%</b>	94.95%	75.67%	81.45%	86.47%

	$\beta$ - pinen	anizol	$\beta$ - citronelol	karvon	karvakrol
$\beta$ - pinen 10	98.91%	94.60%	64.32%	75.55%	82.23%
$\beta$ - pinen 11	99.04%	95.28%	81.93%	81.21%	84.36%
$\beta$ - pinen 12	99.23%	93.82%	73.36%	84.74%	83.97%
průměr	<b>99.06%</b>	94.57%	73.20%	80.50%	83.52%

	$\beta$ - citronelol	$\beta$ - pinen	anizol	karvon	karvakrol
$\beta$ - citronelol 15	90.07%	81.93%	83.52%	81.88%	83.88%
$\beta$ - citronelol 16	91.62%	73.36%	76.06%	82.65%	82.33%
$\beta$ - citronelol 17	94.17%	81.11%	83.75%	73.85%	85.08%
průměr	<b>91.95%</b>	78.80%	81.11%	88.21%	86.61%

	karvon	anizol	$\beta$ - pinen	$\beta$ - citronelol	karvakrol
karvon 5	92.66%	82.59%	80.23%	71.21%	73.63%
karvon 6	96.73%	81.37%	80.66%	81.88%	81.22%
karvon 7	92.68%	79.60%	82.50%	82.65%	84.00%
průměr	<b>94.02%</b>	81.19%	81.13%	78.58%	79.62%

	karvakrol	anizol	$\beta$ - pinen	$\beta$ - citronelol	karvon
karvakrol 4	88.26%	90.65%	87.83%	74.27%	82.88%
karvakrol 6	93.18%	90.47%	87.51%	83.88%	83.27%
karvakrol 7	89.87%	91.27%	87.70%	82.33%	81.80%
průměr	90.43%	<b>90.80%</b>	87.68%	80.16%	82.65%

Tab. 3 Porovnání shody naměřených hodnot standardů

V tabulce 3 jsou vyznačeny průměry s nejvyšší shodou. Pro všechny standardní látky kromě karvakrolu byla nejvyšší shoda s průměrnou hodnotou stejného standardu. U karvakrolu byla ovšem nejvyšší shoda s průměrem pouze o 0,4% vyšší, než shoda se stejným standardem.

Porovnání shody naměřených hodnot odpadních materiálů

	anýz	jehličí borovice	kmín	meduňka	oregano
anýz 15	90.59%	78.85%	82.14%	84.72%	84.15%
anýz 16	96.32%	85.19%	89.86%	92.84%	92.26%
anýz 17	92.97%	89.14%	90.81%	95.14%	95.11%
průměr	<b>93.29%</b>	84.40%	87.61%	90.90%	90.51%

	jehličí borovice	anýz	kmín	meduňka	oregano
jehličí borovice 4	93.09%	85.29%	91.10%	83.65%	86.63%
jehličí borovice 5	97.12%	87.11%	92.77%	89.30%	93.05%
jehličí borovice 6	96.34%	86.10%	90.36%	88.21%	90.91%
průměr	<b>95.52%</b>	86.17%	91.41%	87.05%	90.20%

	kmín	anýz	jehličí borovice	meduňka	oregano
kmín 9	98.44%	91.07%	90.84%	90.29%	91.98%
kmín 10	99.23%	89.87%	91.80%	89.61%	91.09%
kmín 11	98.51%	89.46%	92.29%	89.57%	91.22%
průměr	<b>98.73%</b>	90.13%	91.64%	89.82%	91.43%

	meduňka	anýz	jehličí borovice	kmín	oregano
meduňka 8	96.64%	94.60%	87.88%	90.69%	95.38%
meduňka 9	97.32%	91.44%	88.26%	89.53%	94.69%
meduňka 11	96.28%	92.11%	86.17%	88.81%	93.85%
průměr	<b>96.75%</b>	92.72%	87.43%	89.68%	94.64%

	oregano	anýz	jehličí borovice	kmín	meduňka
oregano 4	96.03%	92.69%	89.44%	90.14%	95.22%
oregano 5	96.62%	92.93%	91.12%	91.66%	93.12%
oregano 6	96.57%	90.07%	90.73%	90.96%	93.83%
průměr	<b>96.41%</b>	91.90%	90.43%	90.92%	94.05%

Tab. 4 Porovnání shody naměřených hodnot odpadních materiálů

V tabulce 4 jsou vyznačeny průměry s nejvyšší shodou. Pro všechny odpadní materiály byla nejvyšší shoda s průměrnou hodnotou stejného odpadního materiálu.

Porovnání shody naměřených hodnot mezi standardy a odpadními látkami

	anýz	jehličí borovice	kmín	meduňka	oregano
anizol 10	94.83%	86.26%	91.86%	91.74%	91.76%
anizol 11	94.50%	84.73%	90.03%	89.61%	89.90%
anizol 12	92.62%	82.54%	87.57%	87.15%	87.43%
průměr	<b>93.99%</b>	84.51%	89.82%	89.50%	89.70%

	anýz	jehličí borovice	kmín	meduňka	oregano
β - pinen 10	91.88%	85.54%	89.72%	88.18%	89.16%
β - pinen 11	91.39%	85.14%	89.69%	87.25%	88.33%
β - pinen 12	91.34%	84.91%	89.35%	87.14%	88.13%
průměr	<b>91.54%</b>	85.20%	89.59%	87.52%	88.54%

	anýz	jehličí borovice	kmín	meduňka	oregano
β - citronelol 15	85.73%	86.93%	85.85%	85.81%	87.77%
β - citronelol 16	80.41%	80.27%	80.21%	82.33%	82.09%
β - citronelol 17	87.99%	87.72%	86.16%	89.32%	90.94%
průměr	84.71%	84.97%	84.07%	85.82%	<b>86.93%</b>

	anýz	jehličí borovice	kmín	meduňka	oregano
karvon 5	82.11%	85.27%	83.31%	83.15%	82.62%
karvon 6	86.05%	90.41%	88.02%	85.79%	87.18%
karvon 7	85.44%	92.49%	89.52%	84.94%	87.05%
průměr	84.53%	<b>89.39%</b>	86.95%	84.63%	85.62%

	anýz	jehličí borovice	kmín	meduňka	oregano
karvakrol 4	84.79%	72.22%	76.28%	77.97%	78.04%
karvakrol 6	90.18%	78.97%	82.77%	87.70%	85.81%
karvakrol 7	91.01%	84.56%	87.06%	91.56%	91.49%
průměr	<b>88.66%</b>	78.58%	82.04%	85.74%	85.11%

Tab. 5 Porovnání shody naměřených hodnot mezi standardy a odpadními materiály

V tabulce 5 jsou vyznačeny průměry s nejvyšší shodou.

## 6 Diskuze

Výsledky této práce slouží především jako úvodní seznámení s používaným prototypem elektronického nosu. V současné době má tento prototyp několik software i hardware vad, které by se měly v budoucnu odstranit.

Z počátku se tvorba této práce potýkala s velkými problémy. Prototyp nebyl během jeho konstruování testován, a proto se uvedení přístroje do provozuschopného stavu stalo hlavní náplní prvního měsíce měření a pokusů. Během této doby byla naměřená data nepoužitelná pro účely této práce, ale byla využita spíše jako ukazatel změn při provádění různých opatření nutných pro uvedení přístroje do využitelného stavu. Všechny tyto změny probíhaly z důvodu pátrání po příčině na první pohled špatných výsledku z měření.

Za předpokladu, že se vzorek nedostane ze vzorkovací nádoby do komory se senzory kvůli nedostatečnému podtlaku v systému, bylo provedeno utažení spojů a utěsnění systému potrubí pro zvýšení podtlaku v systému. Ke zvýšení podtlaku následně skutečně došlo, nicméně k úplnému vyřešení problému ne. I tak ale těsnost systému v současnosti není dokonalá a v budoucnosti bude jistě nutné tento problém vyřešit. Především výměnou komory se senzory, nebo alespoň opatřením lepšího víka.

Dalším předpokládaným důvodem nepřesných měření bylo míchání těkavých látek ze vzorku se znečišťujícími látkami v prostředí laboratoře, kde v době měření probíhala destilace česnekové silice. Za tímto účelem bylo vytvořeno nové víko pro vzorkovací nádobu s nasáváním okolního vzduchu přes vyrobený uhlíkový filtr. Ani tímto opatřením nebylo dosaženo výrazně lepších výsledků.

Problém byl nakonec nalezen v ovládacím programu arduino. Nesprávné nastavení v ovládacím programu zapříčinilo nepřístup testovaných těkavých látek do vzorkovací nádoby, a proto byly vždy měřeny velmi nízké koncentrace látek v komoře se senzory. Po odhalení a vyřešení těchto problémů byla započata měření pro tuto práci. Nejdříve byla naměřeny vzorky pro kvantitativní a poté pro kvalitativní analýzu.

Prototyp elektronického nosu použitý pro tuto práci využívá 7 různých chemických senzorů, z nichž 5 bylo typu Figaro TGS a dva stejné senzory Parallax MQ-4, což je důležité z důvodu zvýšení účinnosti senzorů a kvůli možnosti, že se dva stejné senzory mohou chovat velice odlišně, jak uvádí ve své práci Tang a kolektiv (2010). V jejich práci byl využit prototyp elektronického nosu velmi podobné konstrukce, kde bylo pro měření použito osm senzorů

značky Figaro, přičemž dva z nich TGS 2602 a TGS 822 obsahuje i elektronický nos využitý pro tuto práci. Z osmi senzorů, které byly využity pro přístroj z práce Tanga a kolektivu (2010) tvořilo dokonce šest senzorů tři dvojice stejných senzorů. V práci od Miao, Luo, Wang, & Li, (2016) byl využit elektronický nos domácí konstrukce obsahující všechny Figaro TGS senzory využitě pro tuto práci, přičemž dohromady použili 16 senzorů typu Figaro TGS, z nichž dva senzory byly použity dvakrát ze stejných důvodů, které uvedl Tang a kolektiv (2010). Naproti tomu v práci od Sanaeifar, Mohtasebi, Ghasemi-Varnamkhasti, & Ahmadi (2016) bylo využito šest rozdílných chemických senzorů typu Parallax MQ. Profesionální elektronické nosy dostupné na trhu, jako třeba Fox 4000, který použil Zhu, Seburg, Tsai, Puech, & Mifsud, (2004), využívají více senzorů, v tomto případě 18. Čím větší množství senzorů elektronický nos obsahuje, tím detailnější vznikne datové spektrum z naměřených hodnot a výsledky jsou o to přesnější. Prototyp elektronického nosu využívaný pro tuto práci se svými sedmi chemickými senzory tím pádem nemůže podávat tak kvalitní výsledky, jako profesionální elektronické nosy, kde je využito větší množství senzorů, více senzorů se opakuje a především jejich kvalita je na vyšší úrovni než u na trhu volně dostupných chemických senzorů. Na druhou stranu cena senzorů použitých u profesionálních elektronických nosů je výrazně vyšší a výsledky z našeho prototypu nejsou významně horší.

Měření vzorků probíhalo při pokojové teplotě cca 22 °C v laboratořích České zemědělské univerzity, naproti tomu ve studii od Sanaeifar a kolektiv (2016) byla teplota v místnosti 25 °C a v práci Tanga a kolektivu (2010) probíhalo měření dokonce při teplotě 24 – 28 °C. Těžko určit, jestli rozdílné teploty v laboratořích oproti zmíněným pracím měly zásadní vliv na rozdílné výsledky. Důležité je, aby teplota v místnosti byla konstantní a měření v různých dnech probíhala ve stejných podmínkách.

Doba měření vzorku v komoře se senzory byla 300 sekund, což se ukázalo jako dostatečné, dokonce nadměrné, protože většina hlavních změn v odezvě čidel proběhla během prvních 60 sekund, jak je patrné z grafů jednotlivých měření. Například Novák, Zambori-Nemeth, Horváth, Seregely, & Kaffka (2003) ve své práci měli dobu měření senzory pouze 60 sekund. Po měření vzorku proběhla fáze čištění, během které byl střídavě vháněn odsáván vzduch z komory se senzory po dobu 60 sekund. V práci od Novák a kolektiv (2003) byla doba čištění nastavena na 75 sekund a probíhala tak, že skrz nádobu se senzory proudil pod tlakem vzduch. Fáze čištění u použitého prototypu rozhodně není dostatečná a to ne kvůli nedostatečné době čištění, ale proto, že vzduch neproudí skrz nádobu, ale pouze dovnitř a zase ven. Důkazem



nedostatečného pročištění jsou evidentně nesprávná první dvě měření po změně měřené látky, kdy na senzorech ještě pravděpodobně ulpívají zbytky molekul z předchozí látky a míchají se s látkou novou. Do budoucna by se u prototypu měl tento problém vyřešit a komora se senzory upravit tak, aby mohl čistící plyn proudit skrz, jako u Nováka a kolektivu (2003).

Pro měření potřebná ke zpracování kvantitativní analýzy byl jako testovací vzorek využit standard anizolu od společnosti Sigma Aldrich s čistotou  $\geq 99\%$ . Testování probíhalo v koncentracích 0,3, 1, 3, 10 a 30  $\mu\text{l}$  na dávku, každá koncentrace byla naměřena 3x a poté byly naměřené hodnoty zprůměrovány. Nižší koncentrace nebylo možné naměřit z důvodu dosažení hranice stanovující mez detekce. Elektronický nos pro kvantitativní analýzu byl využit také ve studii Zhu a kolektiv (2004), zde byl ovšem použit profesionální elektronický nos typu Fox 4000 od firmy Alpha MOS, který využívá 18 chemických senzorů. Jako testovaný materiál byl využit vzorek umělé příchuti malin v koncentracích 1, 2, 3, 4 a 5 mg/ml, přičemž každá koncentrace byla naměřena 4x.

Během zpracování našich výsledků se ukázalo, že při koncentracích 10 a 30  $\mu\text{l}$  na dávku nejsou výsledky lineární a snižují výsledný koeficient determinace. Důvodem tohoto jevu může být plné nasycení vzduchu v komoře se senzory nebo zcela nasycené senzory těkavou látkou. Pro stanovení, v jakých koncentracích je prototyp schopen provádět kvantitativní analýzu, by bylo potřeba provést další měření, což ale není předmětem této práce. V tuto chvíli je možné prohlásit, že přístroj je schopen provádět kvantitativní analýzu v rozpětí 0,3 až 3  $\mu\text{l}$  na dávku.

Celkový průměrný koeficient determinace byl 0,611, přičemž se zjistilo, že několik senzorů není možné využít pro kvantitativní analýzu kvůli jejich nelineárním výsledkům. Při odebrání 3 senzorů s nejhorsími výsledky se celkový koeficient determinace zlepšil na 0,863. Pro kvantitativní analýzu jsou nejvhodnější data ze senzoru TGS 2611, který dosahoval celkového průměrného koeficientu determinace 0,931, přičemž v čase 60 vteřin se dostal na hodnotu 0,999998. Dalším vhodným senzorem se jeví MQ-4 2 s celkovým koeficientem determinace 0,8948.

Profesionální nos Fox 4000, který využil Zhu a kolektiv (2004) měl výsledný koeficient determinace 0,99535, avšak byl využit pouze v malém rozsahu koncentrací. Naopak Di Natale a kolektiv (2000) ve své práci využívá pro kvantitativní analýzu složek červeného vína kombinaci elektronického nosu a jazyku. Jejich nos využíval osmi chemických senzorů, jejichž měření bylo ovlivněno obsahem alkoholu ve vínu. Výsledkem je, že korelační koeficienty

s nejhorší úspěšností pocházely z měření elektronického nosu. Kvalitních výsledků bylo dosaženo až při kombinaci měření z elektronického nosu i jazyku.

Kvantitativní analýza prokázala dobrý potenciál pro určování množství obsažené látky ve vzorku, nicméně testována byla pouze jedna látka, a to anizol v rozpětí 0,3 až 3  $\mu$ l na dávku. Do budoucna bude nutné otestovat více látek a větší spektrum koncentrací.

Pro kvalitativní analýzu byly využity standardy (anizol, karvakrol, karvon,  $\beta$ -pinen,  $\beta$ -citronelol) a modelové odpadní materiály (kmín, oregano, meduňka, anýz, jehličí borovice kleč), přičemž každý vzorek byl měřen 5x a poté z průměru těchto měření byl vytvořen standard pro danou látku. Nízkonákladový prototyp elektronického nosu pro kvalitativní analýzu využili ve své práci také Tang a kolektiv (2010), kde jako testovaný materiál byly využity vzorky banánu, citronu, liči a longanu. Každý vzorek byl naměřen také 5x, ale navíc stejnou proceduru opakovali i druhý den měření, poté vytvořili z průměru standard pro danou látku. Zhu a kolektiv (2004) ve své studii využili profesionální elektronický nos Fox 4000 od společnosti Alpha MOS také pro kvalitativní analýzu. Jako měřené látky zde byly využity vzorky umělých příchutí maliny a třešně a přírodní příchutě jahody, pomeranče, ananasu a rybízu. Pro každý druh ovoce byl stejně jako v předchozích případech vytvořen standard, tentokrát ale pouze ze třech měření.

Grafy vytvořené z naměřených dat ukázaly velké rozdíly v průběhu odezvy jednotlivých senzorů pro různé látky. Pro vyhodnocení naměřených dat byl vytvořen algoritmus, porovnávající odchylky testované látky od zprůměrovaných standardů. Algoritmus ukázal, že nejvyšší procentuální shoda se stejnou látkou oproti ostatním materiálům vyšla ve 28 z 30 případů, což udává úspěšnost 93,33%. Měření pro kvalitativní analýzu v práci od Tang a kolektiv (2010) byla zpracována pomocí jimi vytvořeného algoritmu v programu LabVIEW a porovnána pomocí PCA analýzy. Úspěšnost rozpoznání již dříve naměřené látky byla v tomto případě 95% a jak Tang a kolektiv (2010) uvádí, problém vznikl při rozpoznání longanu od liči, což jsou svojí vůní velice podobné druhy ovoce, zde byla úspěšnost pouze 70%. Naproti tomu Zhu a kolektiv (2004) ve své práci využívající profesionální elektronický nos použili pro zpracování naměřených dat program Alpha Soft dodaný s jejich přístrojem a pro vyhodnocení použili PCA analýzu, podle které byla úspěšnost identifikace mezi různými druhy ovocných příchutí 96%.

Úspěšnost rozpoznávání již dříve měřených látek prototypu elektronického nosu využitého v této práci nebyla výrazně nižší než v měření provedeného na podobném prototypu elektronického nosu od Tang a kolektiv (2010) a dokonce ani o mnoho horší než úspěšnost profesionálního elektronického Fox 4000 využitého v práci Zhu a kolektiv (2004), což se dá považovat za velký úspěch. A stejně jako uvádí ve své práci Tang a kolektiv (2010) by bylo do budoucni vhodné vybavit elektronický nos dalšími senzory citlivými na jiné látky, jelikož díky většímu množství sensorů vznikne pro každou látku specifičtější spektrum a zvýší se úspěšnost identifikace.

Dalším úkolem kvalitativní analýzy bylo objevit hlavní složku silice v modelovém odpadním materiálu. V tomto případě se podařilo prokázat anizol jako hlavní složku anýzu. U dalších měřených materiálů se nepodařilo jednoznačně určit hlavní složku testovaného materiálu. Důvodem neprůkazných výsledků by mohl být algoritmus používaný pro porovnávání dat z naměřených vzorků. V době zpracování výsledků byl algoritmus na počátku svého vývoje a nebyl ještě zcela schopen porovnávat jemné odchylky mezi jednotlivými vzorky.

Podobným pokusem se zabýval ve své práci také Novák a kolektiv (2003), kde byl využit elektronický nos se šesti různými chemickými senzory pro analýzu složení různých druhů oregana. V této práci byly vzorky oregana nejdříve podrobeny analýze na plynovém chromatografu, pro zjištění obsahu jednotlivých silic ve vzorku a poté byly změřeny pomocí elektronického nosu. Naměřená data byla zpracována pomocí PCA analýzy a elektronický nos se 100% úspěšností rozpoznal hlavní složku měřeného oregana. Další silice obsažené ve vzorku v menším množství již nebylo možné porovnat s výsledky z plynového chromatografu. Novák a kolektiv (2003) svojí prací tedy prokázali, že elektronický nos je schopen identifikovat hlavní složku silice rostlinného materiálu s takovou přesností, která je budoucím cílem pro prototyp elektronického nosu využitého v této práci.

## 7 Závěr

Cílem práce bylo otestovat, zdali je možné využít prototyp elektronického nosu, sestaveného na České zemědělské univerzitě, k identifikaci a hodnocení obsahu hodnotných těkavých látek v testovaných modelových odpadních materiálech.

V kvantitativní analýze bylo odhaleno, které senzory se nejlépe hodí k hodnocení změny koncentrací měřených látek. Z testování vyšel nejlépe senzor Figaro TGS 2611 s koeficientem determinace 0,931.

V kvalitativní analýze bylo prokázáno, že prototyp je schopen správně identifikovat již dříve měřenou látku mezi jinými s úspěšností 93,33%. Identifikace hlavní složky silice v modelových vzorcích odpadního materiálu se podařilo u vzorku anýzu. U ostatních materiálů nebyly výsledky průkazné, což mohlo být zapříčiněno algoritmem pro zpracování naměřených dat, jelikož v době měření byl na počátku svého vývoje.

Elektronický nos rozhodně prokázal dobrý potenciál v plnění vytyčených cílů a výsledky měření jsou velkým příslibem do budoucna. V současnosti je přístroj stále ve fázi vývoje a tato práce by měla být hlavním podkladem pro budoucí vylepšení a odstranění zjištěných chyb.

## 8 Seznam literatury

- Aburjai, T., Natsheh, F. M. 2003. *Plants Used in Cosmetics*. Wiley Interscience. 17 (April). 987–1000.
- Antoce, A. O., Namolosanu, I. 2011. Rapid and Precise discrimination of wines by means of an electronic nose based on gas-chromatography. *Revista de Chimie*. 62 . 593–595. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79959882547&partnerID=tZOtx3y1>
- Arshak, K., Moore, E., Lyons, G. M., Harris, J., Clifford, S. 2004. A review of gas sensors employed in electronic nose applications. *Sensor Review*. 24 (MAY). 181–198.
- Auterská, P. 2006. Co víme o pachových látkách. . p. 1–19. Praha. Retrieved from <http://www.odour.cz/>
- Auterská, P. 2010. Co víme o čichu. . Praha. Retrieved from <http://www.odour.cz/>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46 . 446–475.
- Bílek, K. 2000. Strojové vnímání pachů. *Automa*. 1 (1). 18. Retrieved from [http://www.odbornecasopisy.cz/index.php?id\\_document=27557](http://www.odbornecasopisy.cz/index.php?id_document=27557)
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94 . 223–253.
- Cooke, B., Ernst, E. 2000. Aromatherapy : a systematic review. . (August 1999). 493–496.
- De Sousa, D. P., Gonçalves, J. C. R., Quintans-Júnior, L., Cruz, J. S., Araújo, D. A. M., de Almeida, R. N. 2006. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neuroscience Letters*. 401 . 231–235.
- Di Natale, C., Paolesse, R., MacAgnano, A., Mantini, A., D'Amico, A., Ubigli, M., ... Vlasov, Y. 2000. Application of a combined artificial olfaction and taste system to the quantification of relevant compounds in red wine. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 69 . 342–347.
- Font, X., Artola, A., Sanchez, A. 2011. Detection, composition and treatment of volatile organic compounds from waste treatment plants. *Sensors*. 11 . 4043–4059.
- Gao, X., Wang, W., Wei, S., Li, W. 2009. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza radix and its bioactive compounds. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*. 34 (October 2006). 2695–2700.
- Ghent, C., Leuven, K. U. (n.d.) Spectrometry-Based Electronic Classification of Commercial Coffee Blends. . 585–588.

- Haddad, R., Medhanie, A., Roth, Y., Harel, D., Sobel, N. 2010. Predicting odor pleasantness with an electronic nose. *PLoS Computational Biology*. 6 (4).
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D. 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. p. 239–259. Trieste. INTERNATIONAL CENTRE FOR SCIENCE AND HIGH TECHNOLOGY Trieste,.
- Hiers, G. S., Hager, F. D. 1929. Organic synthesis - Anisole. *Organic Syntheses*. 9 (September). 12.
- Holčapek, M. 1998. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické Listy*. 92 . 278–286.
- Holčapek, M. 2002. Experimentální metody strukturálního výzkumu Hmotnostní spektrometrie. . p. 1–79. Praha. Retrieved from [http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek\\_EMSV\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf)
- Husnu Can Baser, K., Buchbauer, G. (Eds.) 2009. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. p. 991. Eskisehir, Turkey. CRC Press. ISBN: 9781420063158.
- James, D., Scott, S. M., Ali, Z., O'Hare, W. T. 2005. Chemical sensors for electronic nose systems. *Microchimica Acta*. 149 . 1–17.
- Klouček, P. 2016. *Využití odpadního kmínu k produkci vonných silic*. Praha.
- Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. a, Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H., ... Luque, R. 2013. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*. 6 (February 2016). 426–464.
- Miao, J., Luo, Z., Wang, Y., Li, G. 2016. Comparison and data fusion of an electronic nose and near-infrared reflectance spectroscopy for the discrimination of ginsengs. *Anal. Methods*. 8 (JANUARY). 1265–1273.
- Musilová, L., Uhlík, O., Macková, M., Macek, T. 2012. Úloha sekundárních metabolitů rostlin v bakteriální degradaci oragnických xenobiotik. *Chemické Listy*. 106 (106). 1029–1033.
- Novák, I., Zambori-Nemeth, E., Horváth, H., Seregely, Z., Kaffka, K. 2003. Study of essential oil components in different *Origanum* species by GC and sensory analysis. *Acta Alimentaria*. 32 (2). 141–150.
- Poustka, J. 2007. *Princip MS a výstup měření*. . Praha. VŠCHT. Retrieved from [http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM\\_MS\\_PRINCIP\\_A\\_IONIZACE\\_102007.pdf](http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM_MS_PRINCIP_A_IONIZACE_102007.pdf)
- Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., López-Malo, A. 2014. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews*. (July 2015).

- Röck, F., Barsan, N., Weimar, U. 2008. Electronic nose: current status and future trends. *Chemical Reviews*. 108 . 705–725. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr068121q>
- Rychlíková, E. 2006. Je pachová zátěž problém? . Kolín. Retrieved from [http://www.cschi.cz/odour/files/czech/2006\\_Olsanka\\_Rychlikova.pdf](http://www.cschi.cz/odour/files/czech/2006_Olsanka_Rychlikova.pdf)
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 91 . 621–632.
- Sanaeifar, A., Mohtasebi, S. S., Ghasemi-Varnamkhasi, M., Ahmadi, H. 2016. Application of MOS based electronic nose for the prediction of banana quality properties. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*. 82 (March). 105–114.
- Settle, F. 1997. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry* (F. Settle, Ed.). Prentice Hall.
- Ševčík, J. 2004. *Plynová Chromatografie a její aplikace v organické analýze*. p. 1–40. Praha. Retrieved from [https://web.natur.cuni.cz/~sevcik/plyn\\_chrom.pdf](https://web.natur.cuni.cz/~sevcik/plyn_chrom.pdf)
- Tang, K.-T., Chiu, S.-W., Pan, C.-H., Hsieh, H.-Y., Liang, Y.-S., Liu, S.-C. 2010. Development of a portable electronic nose system for the detection and classification of fruity odors. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 10 . 9179–93.
- TESO 2007. *Zpracování a zhodnocení provedených autorizovaných stanovení koncentrací pachových látek ze zdroje znečišťování ovzduší*. p. 4–5. Praha. Retrieved from <http://www.odour.cz/>
- Ultee, a, Slump, R. a, Steging, G., Smid, E. J. 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*. 63 (5). 620–624.
- Wink, M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*. 75 (July). 225–233.
- Zachář, P., Sýkora, D. 2002. *Plynová chromatografie*. Vol. 5. p. 1–16. Praha. Retrieved from <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>
- Zhu, L., Seburg, R. a., Tsai, E., Puech, S., Mifsud, J. C. 2004. Flavor analysis in a pharmaceutical oral solution formulation using an electronic-nose. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 34 . 453–461.