

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Chromatografická analýza rostlin a produktů
spojených s výrobou absintu a testování odpadů z výroby
jako možného zdroje biopesticidů

Diplomová práce

Bc. Jan Bednář

Školitel: Prof. Ing. Jan Tříška, CSc.

České Budějovice 2020

Bednář, J., 2020: Chromatografická analýza rostlin a produktů spojených s výrobou absintu a testování odpadů z výroby jako možného zdroje biopesticidů. [Chromatography analysis of herbs and products associated to absinth production and testing production wastes as potential source of biopesticides. Mg. Thesis, in Czech] - 66 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This thesis deals with the analysis of herbs traditionally used for the absinth production: *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare* and *Artemisia absinthium*. The suitable GC-MS methods were developed and validated and they were used for the determination of the volatile substances content in essential oils and dried herbs which are available at the Czech market. Another aim of this study was to determine the content of *t*-anethole and β -thujone during the distillation of absinth in both laboratory and industrial scale. Finally, distillation residues were tested on *Spodoptera littoralis* larvae for potential pesticidal effects at VÚRV.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 22. 5. 2020

Jan Bednář

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěl poděkovat mnoha lidem, kteří mi byli nejrůznějšími způsoby nápomocni při tvorbě této diplomové práce. Na samém začátku stál pan Martin Žufánek, jehož práce mě přivedla k zájmu o absinth. Dále bych chtěl poděkovat doktorce Naděždě Vrchotové za pomoc se zvládnutí kapalinové chromatografie, doktoru Petru Kotasovi za pomoc se statistickými analýzami, docentu Romanu Pavelovi a jeho týmu zejména za provedení pokusů ověřujících pesticidní potenciál. Zvláště bych pak chtěl poděkovat svému školiteli profesoru Janu Třískovi, a to nejen za pomoc při přípravě této diplomové práce, ale i za šanci, jež jsem od něj před několika lety dostal a bez které bych možná ve studiu chemie vůbec nepokračoval. V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat svojí rodině a blízkým, kteří mi studium umožnili a po celou dobu mě v něm podporovali.

OBSAH

| | |
|--|----------|
| CÍLE PRÁCE | 1 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST | 2 |
| 1.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL | 2 |
| 1.1.1 <i>Bedrník anýz (Pimpinella anisum)</i> | 2 |
| 1.1.2 <i>Fenykl obecný (Foeniculum vulgare)</i> | 3 |
| 1.1.3 <i>Pelyněk pravý (Artemisia absinthium)</i> | 4 |
| 1.2 ANALÝZA TERPENŮ | 5 |
| 1.3 BOTANICKÉ PESTICIDY | 5 |
| 1.4 ABSINTH | 5 |
| 2 MATERIÁLY A METODY | 7 |
| 2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ČINIDLA | 7 |
| 2.2 INSTRUMENTÁLNÍ VYBAVENÍ | 8 |
| 2.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ STANDARDŮ | 9 |
| 2.4 PODMÍNKY CHROMATOGRAFICKÝCH SEPARACÍ A NASTAVENÍ DETEKTORŮ | 11 |
| 2.4.1 GC-MS | 11 |
| 2.4.2 LC-MS/PDA | 12 |
| 2.5 VALIDACE GC-MS METOD | 13 |
| 2.5.1 <i>Mez detekce a stanovitelnosti</i> | 13 |
| 2.5.2 <i>Linearita, správnost a přesnost</i> | 13 |
| 2.6 PŘÍPRAVA VZORKŮ K MĚŘENÍ | 14 |
| 2.6.1 VÝBĚR EXTRAKČNÍHO ČINIDLA | 14 |
| 2.6.2 <i>Extrakce rostlinného materiálu od různých dodavatelů</i> | 14 |
| 2.6.3 <i>Příprava vzorků esenciálních olejů od různých výrobců</i> | 14 |
| 2.6.4 <i>Ethanolová destilace</i> | 15 |
| 2.7 TEST PESTICIDNÍHO POTENCIÁLU DESTILAČNÍCH ZBYTKŮ | 15 |
| 2.7.1 <i>Testované roztoky</i> | 15 |
| 2.7.2 <i>Testovaný hmyz</i> | 16 |
| 2.7.3 <i>Test akutní toxicity</i> | 16 |
| 2.7.4 <i>Test ovlivnění vývoje</i> | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 2.8 STATISTICKÁ VYHODNOCENÍ..... | 16 |
| 2.8.1 Kalibrační křivka α -thujonu..... | 16 |
| 2.8.2 Porovnání obsahů terpenických látek | 17 |
| 2.8.3 Pesticidní potenciál | 17 |
| 3 VÝSLEDKY | 18 |
| 3.1 OPTIMALIZACE GC METOD | 18 |
| 3.1.1 Měření standardů..... | 18 |
| 3.1.2 Test kalibračních křivek a vnitřních standardů..... | 19 |
| 3.2 VALIDACE KALIBRAČNÍCH KŘIVEK GC-MS | 22 |
| 3.2.1 Meze detekce a meze stanovitelnosti | 22 |
| 3.2.2 Linearita | 22 |
| 3.2.3 Správnost a přesnost | 24 |
| 3.2.4 Rozsah | 24 |
| 3.3 VÝBĚR EXTRAČNÍHO ČINIDLA | 24 |
| 3.4 POROVNÁNÍ OBSAHU TERPENICKÝCH LÁTEK V ESENCIÁLNÍCH OLEJÍCH OD RŮZNÝCH VÝROBCŮ | 25 |
| 3.4.1 Anýzové esenciální oleje..... | 25 |
| 3.4.2 Fenyklové esenciální oleje | 26 |
| 3.4.3 Pelyňkové esenciální oleje | 27 |
| 3.5 POROVNÁNÍ OBSAHU TERPENICKÝCH LÁTEK V SUŠENÝCH ROSTLINÁCH OD RŮZNÝCH DODAVATELŮ..... | 29 |
| 3.5.1 Anýzové extrakty..... | 29 |
| 3.5.2 Fenyklové extrakty..... | 31 |
| 3.5.3 Pelyňkové extrakty..... | 34 |
| 3.6 PRŮTAHOVÁ DESTILACE..... | 37 |
| 3.6.1 Frakce..... | 37 |
| 3.6.2 Destilační zbytek | 40 |
| 3.7 TESTY PESTICIDNÍHO POTENCIÁLU | 41 |
| 3.7.1 Test ovlivnění vývoje | 41 |
| 4 DISKUZE | 44 |
| 4.1 VALIDACE KALIBRAČNÍCH KŘIVEK – GC/MS | 44 |
| 4.2 VOLBA EXTRAČNÍHO ČINIDLA | 45 |
| 4.3 OBSAH TERPENICKÝCH LÁTEK | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.1 <i>Bedrník anýz</i> | 45 |
| 4.3.2 <i>Fenykl obecný</i> | 46 |
| 4.3.3 <i>Pelyněk pravý</i> | 46 |
| 4.4 OBSAH <i>T</i> -ANETHOLU A β -THUJONU VE FRAKCIÓNĚ..... | 48 |
| 4.5 DESTILAČNÍ ZBYTKY..... | 49 |
| 5 ZÁVĚR | 50 |
| 6 LITERATURA | 52 |
| 7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ | 58 |

CÍLE PRÁCE

Literární přehled stanovení obsahových látek v rostlinách používaných pro přípravu absintu. Studium složení obsahových látek pomocí chromatografických metod v rostlinných extraktech a produktech spojených s výrobou absintu. Při studiu složení obsahových látek aplikovat jak necílenou, tak cílenou analýzu. Výsledky zpracovat pomocí statistických metod. Otestovat odpady z produkce absintu na jejich možný pesticidní potenciál.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Rostlinný materiál

1.1.1 Bedrník anýz (*Pimpinella anisum*)

Bedrník anýz (také známý jako anýz vonný) je jednoletá rostlina patřící do čeledi miříkovitých kvetoucí v průběhu července a srpna. Plodem jsou dvounažky.¹ Jedná se o teplomilnou rostlinu s původem v Asii a Egyptě. V současnosti je pěstován zejména ve Středomoří, západní Africe a střední Americe.² Drogou je plod, který má charakteristický pach po anetolu.³

Minimální obsah silice v droze je Českým lékopisem stanoven na 20 ml/kg. Stanovení obsahu silic se provádí pomocí přesně definované destilace s vodní parou³. Dominantní složkou anýzové silice je *t*-anetol. Dle Českého lékopisu musí být složení silice následovné: linalool < 1,5 %, estragol 0,5 – 5 %, α -terpineol < 1,2 %, *c*-anetol 0,1 – 0,4 %, *t*-anetol 87 - 94 %, anisaldehyd 0,1 – 1,4 %, pseudoisoeugenyl-2-methylbutanoát 0,3 – 2,0 %.³ Publikovaná jsou však i odlišná složení esenciálního oleje^{4,5,6}.

Anýz byl využíván jako koření i léčivo již před 3500 let v Egyptě.² Pro léčebné účely se využívá zejména ve formě nálevu, a to pro podporu vykašlávání a trávení.¹ Od 16. století byl anýzový olej využíván také k trávení myši a později také holubů.¹ Začátkem tisíciletí bylo zjištěno, že anýzový esenciální olej je možné využít v zemědělství např.: proti mšici bavlníkové (*Aphis gossypii*) a sviluškám (*Tetranychus spp.*).⁷



Obr. 1: Bedrník anýz¹

1.1.2 Fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*)

Fenykl obecný je teplomilná dvouletá rostlina patřící do čeledi miříkovitých. Jejím plodem je dvounažka.¹ Fenykl obecný má původ ve Středozeří² a současný areál jeho pěstování se přibližně kryje s oblastmi, kde je pěstována réva vinná.¹ Drogou je plod, který je sbírán obvykle v srpnu druhého roku po výsadbě. Ideální podmínky pro sběr jsou ráno za rosy.¹

Český lékopis uvádí dvě odrůdy: *vulgare* a *dulce*. Odrůda *dulce* je označována jako fenykl obecný sladký. Stanovení obsahu silic se provádí pomocí přesně definované destilace s vodní parou. Minimální obsah silice v droze var. *vulgare* je stanoven na 40 ml/kg, pro

var. *dulce* je to 20ml/kg. Odlišné jsou i požadavky na zastoupení sledovaných látek. Pro var. *vulgare* je vyžadován minimálně 60% obsah *t*-anetolu a 15% obsah fenchonu v silici. Pro var. *dulce* vyžadován minimálně 80% obsah anetolu a maximálně 10,0 % estragolu a 7,5 % fenchonu v silici. Pro esenciální olej fenyklu jsou limity nastaveny následovně: α -pinen 1,0 – 10,0 %, limonen 0,9 – 5,0 %, fenchon 12,0 – 25,0 %, estragol < 6,0 %, *c*-anetol < 0,5 %, *t*-anetol 55,0 – 75,0 % a anisaldehyd < 2,0 %, dále platí, že poměr α -pinenu a limonenu je větší než 1,0.² V publikacích jsou dále zmiňovány dva hlavní chemotypy fenyklu obecného dle dominantní látky esenciálního oleje, a to *t*-anetolový a estragolový chemotyp.⁸

Fenykl obecný je užíván zejména ve formě nálevu pro tlumení nadýmání a křečí trávicího ústrojí, dále může být také využit pro omývání očí, či podporu vykašlávání hlenů.
herbář, léčivky Insekticidní efekt esenciálního oleje fenyklu obecného byl ověřen např.: proti larvám komárů *Culex quinquefasciatus*, housenkám blýskavky *Spodoptera littoralis* a dospělcům mouchy *Musca domestica*.⁹



Obr. 2: Fenykl obecný¹

1.1.3 Pelyněk pravý (*Artemisia absinthium*)

Pelyněk obecný je vytrvalá rostlina s vícečetným oddenkem.¹ Původními oblastmi výskytu byla západní Asie, jižní Evropa a severní Afrika. Dnes je rozšířen po celé Evropě, Severní a Jižní Americe a Novém Zélandu. Roste zejména na skalnatých stráních, podél cest, v blízkosti lidských sídel, etc. Kvete od června do srpna.¹ Drogou jsou usušené přízemní listy a kvetoucí málo olistěné vrcholky.

Minimální obsah silice v droze je Českým lékopisem stanoven na 2 ml/kg. Stanovení obsahu silice se provádí pomocí přesně definované destilace s vodní parou. Lékopis neuvádí požadavky na složení silice.³

Z literatury je známa celá řada chemotypů. Přehledový článek Sources of variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil uvádí 17 dominantních látek, které mohou být přítomny v esenciálních olejích. Zastoupení jednotlivých látek definuje celou řadu chemotypů a to jak „čisté“ chemotypy (např.: β -tujonový, *c*-epoxyocimenový, sabinyl-acetátový, etc.), tak směsné chemotypy (např.: β -tujon + sabinyl acetátový, *c*-epoxyocimen + chrysentenyl-acetát + sabinyl-acetátový, etc.).¹⁰ Pokud jsou v esenciálním oleji přítomny tujon, tak je převládající formou β -tujon, ale existují i výjimky s převládající α -tujon formou.¹¹ Příčiny tohoto fenoménu nejsou dosud přesvědčivě vysvětleny. Výše jmenovaný článek uvádí několik faktorů, které variabilitu mohou ovlivňovat, a to: podnebí, lokalita, genotyp, sezóna, část rostliny, fenologická fáze, etc. Hodnocení jednotlivých analytických prací je pak znesnadněno tím, že řada z nich podrobněji nepopisuje použitý rostlinný materiál či využívá odlišné extrakční metody.¹⁰ Kromě terpenů obsahuje pelyněk ještě další biologicky aktivní látky, mezi které patří i laktony absinthin, anabsinthin a artemisetin, které by ve větší míře měly přispívat k extrémně hořké chuti pelyňku pravého. Změny v obsahu těchto látek byly zatím zkoumány a potvrzeny pouze s ohledem na fenologickou fázi rostliny.¹²

Pelyněk pravý se používal hojně již ve starověku. Využíván může být ve formě nálevu (vodného) či tinktury (ethanolové) zejména pro podporu zažívání, tlumení křečí či zevně k dezinfekci ran. Důraz je kladen na nepřekračování doporučené denní dávky (3 g sušené drogy) a nevhodnost dlouhodobého užívání.^{1, 2} Pelyněk pravý se také využívá pro přípravu



Obr. 3: Pelyněk pravý¹

řady alkoholických nápojů, což je podrobněji rozvedeno v 1.4. Insekticidní účinky pelyňkových extraktů jsou známy např.: proti sviluškám, mšicím, molicím, bělásku zelnému a dalším.⁷

1.2 Analýza terpenů

Pro analýzu terpenů je v dnešní době ve většině případů využíván plynový chromatograf ve spojení s plamenově ionizačním detektorem (s výhodou pro kvantifikaci), nebo hmotnostním detektorem (s výhodou pro identifikaci látek). Pro chromatografickou separaci je nejčastěji využívána 30 m kolona s vnitřním průměrem 0,25 mm a tloušťkou filmu 0,25 μm (5% fenyl, 95% dimethylpolysiloxan). Kvůli množství izomerů, které mají jen nepatrně odlišné retenční časy, je obvykle volena metoda s nízkou počáteční teplotou (40-70 °C) a pozvolným nárůstem teploty (jednotky °C/min), aby bylo dosaženo dostatečné specifické metody.^{13, 14, 15, 16}

1.3 Botanické pesticidy

Pesticidy obecně jsou látky, které jsou využívány k omezení populací nežádoucích druhů organismů.¹⁷ Zejména v průběhu 20. století došlo k velkému nárůstu spotřeby syntetických pesticidů. Rozvoj analytických metod a lékařství pomohl odhalit celou řadu nepříznivých vedlejších efektů na přírodní prostředí včetně lidského zdraví.^{17, 18} Navzdory tomu, že nejstarší historické zmínky o využití botanických pesticidů jsou již několik tisíciletí staré, k jejich masivnějšímu využití v zemědělství dochází až v posledních dekádách.¹⁹ Hlavními výhodami biopesticidů může být menší zátěž pro životní prostředí a zároveň snížená tvorba rezistence u cílových organismů.¹⁷ Rostlinné extrakty mohou působit na celou řadu škůdců nejrůznějšími způsoby. Jedním z typů rostlinných produktů, kterým je věnována zvýšená pozornost, jsou právě esenciální oleje. Jejich účinnost již byla ověřena řadou prací a některé z nich jsou již používány na komerční bázi. Přesto zde zbývá ještě značný prostor pro další výzkum.^{19, 17} Účinnost esenciálních olejů proti vybraným škůdcům již byla v minulosti ověřena jak u bedrníku anýzu^{20, 21} tak i fenyklu obecného^{9, 22} a pelyňku pravého^{7, 16, 23}

1.4 Absinth

Absinth je jedním z alkoholických nápojů při jejichž výrobě je používán pelyněk pravý. Produkty označované na trhu jako absinth, je v současnosti možné rozdělit do dvou hlavních typů.²⁴

První varianta vychází z originálních převážně Švýcarských a Francouzských receptů z 19. století. Tyto recepty jsou založeny na maceraci semen fenyklu obecného, semen bedrníku anýzu, nati pelyňku pravého a případně ještě dalších rostlin ve vodném ethanolu o typické koncentraci 50 - 70 %. Následně je tato směs destilována a ve vzniklém čirém destilátu jsou macerovány barvicí byliny (zejména pelyněk pontský), které jsou zodpovědné za zelené zbarvení absintu. Destilát je poté zředěn vodou na obvyklých 60 - 70 % ethanolu. Před konzumací je destilát ředěn ledovou vodou v různém poměru (1:1 - 1:7).²⁵ Protože látky zodpovědné za hořkost pelyňku (absinthin, anabsinthin...) zůstávají v průběhu destilace ve varné nádobě, je hořkost nápoje mírná s dominantní anetholovou chutí a vůní.²⁴

Druhá varianta je vyráběna zejména v České republice, kde nikdy nedošlo k zákazu výroby absintu, ale kde také chyběly zkušenosti s výrobou tohoto nápoje tradičními postupy. Způsob výroby, který zde převládl, spočívá obvykle ve smíchání rostlinných extraktů s ethanolem požadované koncentrace (obvykle 50 - 70 %), přidání umělých barviv a případně karamelu. Při tomto způsobu výroby nedojde k oddělení hořkých pelyňkových látek destilací, a tak je výsledný nápoj charakteristický zejména vysokou hořkostí, anethol obvykle chybí úplně, nebo je přítomen jen v minimálním množství. Tento nápoj nebývá před konzumací ředěn vodou.^{24, 25}

V současnosti je produkce absintu povolena v celé EU.²⁶ V posledních dvou dekádách dochází k renesanci ve výrobě tohoto nápoje, a to i v České republice. Jediným specifickým opatřením, které se dotýká výroby absintu, je Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1334/2008, které stanovuje maximální obsah α a β -thujonu v alkoholických nápojích na 35 mg/kg. Tato látka byla v minulosti označována za původce nemoci absintismu, která postihovala pijáky absintu.²⁷ To počátkem 20. století vedlo k zákazu výroby absintu ve většině evropských států.²⁵ Moderní výzkumy ukázaly, že koncentrace thujonu v dobových produktech nemohla být taková, aby docházelo ke spouštění popisovaných příznaků.²⁶ Negativní projevy u pacientů tak pravděpodobně souvisely s nadměrnou konzumací alkoholických nápojů jako takových.²⁷

Spolu se zvýšeným zájmem o produkci absintu po zrušení všeobecného zákazu vyvstala řada aktuálních otázek týkajících se například kvantity a kvality aromatických látek používaných rostlinách¹², procesu výroby²⁴ či sensorického hodnocení²⁴.

2 MATERIÁLY A METODY

2.1 Použité chemikálie a činidla

Seznam používaných standardů:

Tab. I: Výrobci a čistota použitých standardů.

| Látka | Výrobce | Čistota [%] |
|---------------------------|---------------|-------------|
| <i>t</i> -Anethol | Sigma-Aldrich | 99,5 |
| <i>p</i> -Anisaldehyd | Sigma-Aldrich | 98 |
| Borneol | Sigma-Aldrich | 99,0 |
| <i>p</i> -Cymen | Sigma-Aldrich | 99,5 |
| Estragol | Extrasynthese | 97 |
| Eukalyptol | Sigma-Aldrich | 99 |
| Ethylbenzen | Fluka | 99 |
| Fenchon | Extrasynthese | 98 |
| Geraniol | Sigma-Aldrich | 98 |
| α -Humulen | Sigma-Aldrich | 95,0 |
| Chrysanthenol | Extrasynthese | ? |
| Kafr | Sigma-Aldrich | 99 |
| Kamfen | Supelco | ? |
| 3-Karen | Sigma-Aldrich | 98,5 |
| Karvakrol | Extrasynthese | 98 |
| Karvon | Sigma-Aldrich | 98 |
| <i>t</i> -Karyofylen | Sigma-Aldrich | 98,5 |
| <i>t</i> -Karyofylen oxid | Sigma-Aldrich | 98,5 |
| Limonen | Sigma-Aldrich | 97 |
| Linalool | Extrasynthese | 96,5 |
| Menthol | Sigma-Aldrich | 99 |
| Menthon | Sigma-Aldrich | 97,0 |
| Myrcen | Sigma-Aldrich | 90 |
| Myrtenyl-acetát | Sigma-Aldrich | 95 |
| Piperitenon oxid | extrahován | ? |

| | | |
|----------------------------|---------------|----------------------------------|
| α -Phellandren | Sigma-Aldrich | 95 |
| α -Pinen | Sigma-Aldrich | 98 |
| β -Pinen | Sigma-Aldrich | 99,0 |
| Sabinen hydrát | Sigma-Aldrich | 97,0 |
| Sabinyl-acetát | Extrasynthese | 90 |
| γ -Terpinen | Extrasynthese | 97 |
| α + β -Thujon | Sigma-Aldrich | α – 90-98, β – 2-10 |
| <i>l</i> -Tetradecen | Sigma-Aldrich | 99,8 |
| Terpinen-4-ol | Extrasynthese | 95 |
| α -Terpineol | Sigma-Aldrich | 60,0-85,0 |
| Terpinolen | Extrasynthese | 95 |
| Thymol | Extrasynthese | 99 |

Ostatní:

Methanol, methyl-*tert*-butyléter, ethanol, hexan, deionizovaná voda, dusík z generátoru, helium 5.0 (Messer).

2.2 Instrumentální vybavení

GC-MS: Trace 1310, ISQ, Thermo Fischer Scientific

LC-MS: LCQ-Fleet, Thermo Fischer Scientific

GC kolona: Rxi-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, Restek

HPLC kolona: Luna 3 μ C₁₈ 100 A, Phenomenex

HPLC předkolona:p/N: AJO-9000, Phenomenex

Generátor dusíku: Peak Scientific NM32LA

Analytické váhy: Sartorius 1712

Sada mikropipet s nastavitelným objemem Eppendorf Research Plus

Centrifuga 5810R, Eppendorf

Ultrazvuková lázeň Sonorex digiplus, Bandelin

Třepačka

Topné hnízdo LTHS 2000 ml

Triakový regulátor výkonu

Software:

Sada nástrojů MS Office

Statistica 13

Canoco 5.10

BioStat 5.9.8.5

Xcalibur 2.2 SP1.48

Xcalibur 4.2.47

2.3 Příprava roztoků standardů

Zásobní roztoky standardů pro identifikaci látek byly připraveny odpipetováním 1998 μl hexanu a 2 μl standardu. U tuhých standardů byly přesně odváženy přibližně 2 mg a naředěny 1998 μl hexanu. Pro měření byly tyto zásobní roztoky ještě dále zředěny a to 1:99 (10 μl zásobního roztoku + 990 μl hexanu). Tímto způsobem byly připraveny roztoky všech standardů uvedených v Tab. I.

Způsob přípravy zásobních roztoků pro testování průběhu kalibračních křivek vybraných látek je uveden v Tab. II.

Tab. II: Způsob přípravy zásobních roztoků pro testy průběhu kalibračních křivek.

| Látka | Navážka [mg] | Objem hexanu [μl] | Koncentrace zásobního roztoku [mg/ml] |
|------------------------|--------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| $\alpha+\beta$ -Thujon | 15,2 | 2947 | 5 |
| <i>t</i> -Anethol | 17,8 | 3542 | 5 |
| α -Pinen | 13,0 | 2548 | 5 |
| Fenchon | 14,9 | 2920 | 5 |
| Menthol | 13,5 | 2673 | 5 |
| Kafr | 18,0 | 3564 | 5 |

Ze zásobních roztoků uvedených v Tab. II byl připraven směsný pracovní roztok (SPR). Z každého zásobního roztoku byly odpipetovány 2 ml (6×2 ml) a přidáno 8 ml hexanu. Koncentrace takto připraveného roztoku byla 0,5 mg/ml od každé látky.

Zásobní roztoky látek určených ke kvantifikaci obsahu daných látek v neznámých vzorcích byly připraveny dle Tab. III.

Tab. III: Způsob přípravy zásobních roztoků určených pro kvantifikaci.

| Látka | Navážka [mg] | Odměrná baňka [μl] | Koncentrace zásobního roztoku* [mg/ml] |
|-------------------|--------------|-----------------------|---|
| α -Thujon* | 153,8 | 5000 | 1,4 |
| <i>t</i> -Anethol | 74,0 | 5000 | 30,6 |

* Se započtením naměřeného poměru α a β -thujonu viz 3.1.1

Ze zásobního roztoku α -thujonu a *t*-anetholu byl připraven směsný kalibrační roztok (SKR) následujícím způsobem: ze zásobního roztoku α -thujonu bylo odpipetováno 3571 μl a ze zásobního roztoku *t*-anetholu 3268 μl do odměrné baňky o objemu 10 ml. Baňka byla poté doplněná po rysku hexanem. Takto připravený roztok měl koncentraci α -thujonu 0,5 mg/ml a *t*-anetholu 10 mg/ml.

Zásobní roztoky vnitřních standardů byly připraveny dle Tab. IV.

Tab. IV: Způsob přípravy zásobních roztoků vnitřních standardů.

| Látka | Navážka [mg] | Odměrná baňka [μl] | Koncentrace zásobního roztoku [mg/ml] |
|----------------------|--------------|-----------------------|--|
| <i>I</i> -Tetradecen | 157,6 | 5000 | 31,52 |
| Ethylbenzen | 3,0 | 5000 | 0,60 |

Ze zásobního roztoku *I*-tetradecenu a ethylbenzenu byl připraven směsný roztok interních standardů (SIS) následujícím způsobem: ze zásobního roztoku *I*-tetradecenu bylo odpipetováno 3965 μl a ze zásobního roztoku ethylbenzenu 4167 μl do odměrné baňky o objemu 25 ml. Tato baňka byla poté doplněná po rysku hexanem. Takto připravený roztok měl koncentraci *I*-tetradecenu 5 mg/ml a ethylbenzenu 0,1 mg/ml.

Způsob ředění směsného pracovního roztoku na jednotlivé koncentrační úrovně pro testování průběhu kalibračních křivek je popsán v Tab. V.

Tab. V: Ředění směsného pracovního roztoku na jednotlivých koncentračních úrovních.

| Koncentrační úroveň | Objem SPR [μl] | Objem SIS [μl] | Objem hexanu [μl] | Výsledná koncentrace [μg/ml] |
|------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|------------------------------------|
|------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|------------------------------------|

| | | | | |
|----------------|-----|----|-----|-----|
| K ₁ | 0,2 | 50 | 950 | 0,1 |
| K ₂ | 1 | 50 | 949 | 0,5 |
| K ₃ | 4 | 50 | 946 | 2 |
| K ₄ | 20 | 50 | 930 | 10 |
| K ₅ | 60 | 50 | 890 | 30 |
| K ₆ | 150 | 50 | 800 | 75 |
| K ₇ | 300 | 50 | 650 | 150 |

Způsob ředění směsného kalibračního roztoku na jednotlivé koncentrační úrovně pro kvantifikaci obsahu daných látek v neznámých vzorcích byl připraven dle Tab. VI.

Tab. VI: Ředění směsného kalibračního roztoku na jednotlivých koncentračních úrovních.

| Koncentrační úroveň | Objem SKR [μl] | Objem SIS [μl] | Objem hexanu [μl] | Výsledná koncentrace α-thujonu [μg/ml] | Výsledná koncentrace t-anetholu [μg/ml] |
|---------------------|----------------|----------------|-------------------|--|---|
| K ₁ | 0,2 | 100 | 900 | 0,1 | 2,0 |
| K ₂ | 1 | 100 | 899 | 0,5 | 10,0 |
| K ₃ | 4 | 100 | 896 | 2 | 40,0 |
| K ₄ | 20 | 100 | 880 | 10 | 200,0 |
| K ₅ | 60 | 100 | 840 | 30 | 600,0 |
| K ₆ | 150 | 100 | 750 | 75 | 1500,0 |
| K ₇ | 300 | 100 | 600 | 150 | 3000,0 |

2.4 Podmínky chromatografických separací a nastavení detektorů

2.4.1 GC-MS

Jako nosný plyn bylo používáno helium. Jeho průtok byl nastaven na 1 ml/min. Teplota lineru byla 250 °C, iontového zdroje 200 °C a teplota transfer line 270 °C.

Pro měření celkového spektra přítomných těkavých látek byla používán následující metoda (CHM-kval): nástřik 1 μl, splitless, počáteční teplota 40 °C byla držena 5 minut, poté teplota narůstala rychlostí 3 °C/min do 150 °C, následně teplota stoupala rychlostí 10 °C/min až do 310 °C, tato teplota byla držena 4 minuty, pro ionizaci byl používán

emisní proud 50 μA a energie 70 eV, signál hmotnostního detektoru byl snímán od 3. minuty až do konce analýzy, a to v rozsahu 50-600 m/z.

Pro stanovení obsahu thujonů a *t*-anetholu byla používána následující metoda (CHM-kvant): nástřik 0,5 μl , split 1:20, počáteční teplota 70 $^{\circ}\text{C}$ byla držena 19 minut, poté teplota narůstala rychlostí 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 90 $^{\circ}\text{C}$, následně teplota stoupala rychlostí 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ až do 130 $^{\circ}\text{C}$ tato teplota byla držena 8 minut, následně teplota stoupala rychlostí 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ až do 240 $^{\circ}\text{C}$, finálně teplota stoupala rychlostí 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na 300 $^{\circ}\text{C}$ a tato teplota byla držena 2 minuty. Podmínky ionizace a nastavení hmotnostního detektoru v jednotlivých časech shrnuje Tab. VII.

Tab. VII: Podmínky ionizace, časová okna a rozsah snímaných iontů.

| Čas [min] | Ionty [m/z] | Energie [eV] | Emisní proud [μA] |
|-----------|-------------|--------------|--------------------------------|
| 3,40 | 91, 106 | 70 | 50 |
| 3,70 | 50-200 | 70 | 50 |
| 15,20 | 95,110 | 70 | 50 |
| 15,80 | 50-300 | 70 | 50 |
| 16,50 | 95,110 | 70 | 50 |
| 17,00 | 50-300 | 70 | 50 |
| 29,35 | 50-300 | 70 | 5 |
| 29,65 | 50-600 | 70 | 50 |
| 33,00 | 50-300 | 70 | 5 |
| 33,40 | 50-600 | 70 | 50 |

2.4.2 LC-MS/PDA

Teplota autosampleru byla nastavena na 20 $^{\circ}\text{C}$ a teplota kolony na 35 $^{\circ}\text{C}$. Nástřikováno bylo 10 μl metodou částečně plněné smyčky. PDA detektor snímal po celou dobu analýzy, a to v rozsahu 200 - 600 nm po 1 nm při 20 Hz. Pro tvorbu iontů byla použita APCI ionizace. MS detektor snímal od 2. minuty až do konce analýzy a to v pozitivním (150 – 1000 m/z) i negativním (110 – 2000) módu. Pro fragmentaci byla použita technika CID, izolační šířka Δ m/z 1 a normalizovaná kolizní energie byla nastavena na 35 %.

Použité mobilní fáze: A – 5% acetonitril s 0,1 % kyseliny mravenčí, B – 80% acetonitril s 0,1 % kyseliny mravenčí. Eluční gradient shrnuje Tab. VIII.

Tab. VIII: Použitý eluční gradient.

| Čas [min] | A [%] | B [%] |
|-----------|-------|-------|
| 0 | 100 | 0 |
| 20 | 70 | 30 |
| 25 | 60 | 40 |
| 30 | 40 | 60 |
| 31 | 100 | 0 |
| 35 | 100 | 0 |

2.5 Validace GC-MS metod

2.5.1 Mez detekce a stanovitelnosti

Pro stanovení meze detekce a stanovitelnosti CHM-kval byl použit směsný pracovní roztok šesti monoterpenů (viz. 2.3 Tab. V) a to na třech koncentračních úrovních K1, K2 a K3 ve třech opakováních. Z naměřených hodnot výšky signálu a šumu základní linie byla poté vypočtena průměrná mez detekce jako trojnásobek výšky signálu k šumu základní linie a průměrná mez stanovitelnosti jako desetinásobek výšky signálu k šumu základní linie.

2.5.2 Linearita, správnost a přesnost

Pro hodnocení linearity, správnosti a přesnosti CHM-kvant byly připraveny kalibrační roztoky dle 2.3 Tab. VI, a to v šesti opakováních. Tři opakování byla použita ke konstrukci kalibračních křivek a výpočet koeficientu determinace. Zbylá tři byla použita pro výpočet QC koeficientu, správnosti (jako výtěžnosti) a přesnosti (jako relativní směrodatné odchylky). Rozsah kalibrační křivky byl stanoven na základě výše uvedených kritérií, ve kterých byly vypočtené hodnoty v souladu s limity uvedenými v literatuře.

2.6 Příprava vzorků k měření

2.6.1 Výběr extrakčního činidla

Pro test extrakčních činidel bylo přesně odváženo po přibližně 0,5 g sušených semen bedrníku anýzu, sušených semen fenyklu obecného a sušené drcené nati pelyňku pravého do 7 ml vialky. Poté bylo k rostlinné matrici přidáno 5 ml příslušného rozpouštědla (hexan, MTBE a 96% ethanol) s ISTDs. *Pro urychlení extrakce byla použita ultrazvuková lázeň po dobu 20 minut.* Po ultrazvukové sonikaci byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při 3500 rpm a 20 °C. Z každé vialky byly poté pomocí Pasteurovy skleněné pipety odebrány přibližně 2 ml supernatantu a uzavřeny do 4 ml vialky. Pro měření na GC-MS bylo odpipetováno 200 µl extraktu do 250 µl insertu. Extrakce byla provedena ve třech opakováních pro každé rozpouštědlo.

2.6.2 Extrakce rostlinného materiálu od různých dodavatelů

Pro porovnání obsahových látek v sušených semenech bedrníku anýzu a fenyklu obecného a sušené drcené nati pelyňku pravého od různých dodavatelů bylo do 7 ml vialky odváženo přibližně přesně 0,5 g rostlinné matrice – vždy pouze jeden druh od jednoho dodavatele do jedné vialky. Poté bylo k rostlinné matrici přidáno 6 ml 96% ethanolu s ISTDs v případě pelyňku pravého a 5 ml 96% ethanolu s ISTDs v případě fenyklu obecného a bedrníku anýzu. Vialky byly poté třepány při 150 ot/min po dobu 12 h. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při 3500 rpm a 20 °C. Z každé vialky byly poté pomocí Pasteurovy skleněné pipety odebrány přibližně 2 ml supernatantu a uzavřeny do 4 ml vialky. Extrakce byla provedena ve třech opakováních pro každý druh a dodavatele. Pro měření na GC-MS bylo odpipetováno 900 µl extraktu do 2 ml vialky. Následně bylo k extraktu přidáno 100 µl SIS.

2.6.3 Příprava vzorků esenciálních olejů od různých výrobců

Pro stanovení složení vzorků esenciálních olejů od různých výrobců na GC-MS byly z každého vzorku odpipetovány 4 µl do 996 µl hexanu s ISTDs. Pro měření byl tento roztok dále zředěn v poměru 1 : 99 (10 µl roztoku vzorku a 990 µl hexanu).

2.6.4 Ethanolová destilace

Pro destilaci sušených semen bedrníku anýzu, sušených semen fenyklu obecného a sušené drcené nati pelyňku pravého od vybraných dodavatelů bylo přibližně odváženo 20 g daného rostlinného vzorku do 2 l varné baňky. Do baňky bylo následně přidáno 0,5 l vody z řádu a 0,5 l 96% ethanolu. Stejným způsobem bylo postupováno i v případě průtahové destilace směsi všech tří druhů jen s tím rozdílem, že bylo odváženo přibližně 20 g od každého druhu. Pro vlastní průtahovou destilaci byla použita jednoduchá destilační aparatura skládající se z 2 l varné baňky se zábrusem, zábrusovým destilačním nástavcem s chladičem a zábrusovým rtuťovým teploměrem (50–200 °C). K ohřevu varné baňky bylo použito topné hnízdo o objemu 2 l, které bylo zapojeno do elektrické sítě přes triakový regulátor výkonu. Triakový regulátor umožňuje přesně řídit výkon topného hnízda bez výkyvů, což je důležité pro plynulý průběh destilace. Během destilace byly odebrány 4 ml vzorky destilátu po každých 50 ml. Po odebrání vzorku byla zaznamenána teplota par jdoucích do chladiče. Destilace byla ukončena po oddestilování 650 ml. Destilační zbytek byl po ochlazení přefiltrován přes filtrační papír a převeden do lahve příslušné velikosti. Vzorky destilátu byly uloženy při 4 °C a destilační zbytky při -18 °C. Průtahová destilace bedrníku anýzu, fenyklu obecného a pelyňku pravého byla provedena jen u vzorku od jednoho výrobce a v jednom opakování. Dále byly destilovány 2 směsi bedrníku anýzu (20 g), fenyklu obecného (20 g) a pelyňku pravého (20 g) od různých dodavatelů označené jako Mix A a Mix B ve dvou opakováních pro každou směs. U destilačních zbytků směsí byla stanovena sušina pomocí lyofilizace. 3 x 1 ml destilačního zbytku z každého opakování byl lyofilizován po dobu 5 dní. Každá vialka byla přesně zvážena prázdná, s roztokem a po lyofilizaci.

2.7 Test pesticidního potenciálu destilačních zbytků

2.7.1 Testované roztoky

Pesticidní potenciál byl testován u destilačních zbytků po destilaci směsí bedrníku anýzu, fenyklu obecného a pelyňku pravého, viz 2.6.4. Pro test pesticidního potenciálu byly destilační zbytky ze dvou opakování spojeny (Mix A1 + Mix A2, Mix B1 + Mix B2). Destilační zbytky byly poté zředěny vodou z řádu do 6 koncentračních úrovní: 0; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 % původního roztoku.

2.7.2 Testovaný hmyz

Pesticidního potenciálu destilačních zbytků byl testován na čerstvě vylíhlých housenkách druhu *Spodoptera littoralis*. Tento druh je chován na VÚRV při 25 ± 1 °C a je krmen speciální umělou výživou (Stonefly Industries, Bryan, TX, USA).

2.7.3 Test akutní toxicity

Pro test akutní toxicity bylo umístěno vždy po 10 housenkách do Petriho misky. Poté byl na povrch každé housenky aplikován 1 μ l roztoku destilačního zbytku dané koncentrační úrovně. Pro každou koncentrační úroveň byla provedena 3 opakování. Po 24 h byl test vyhodnocen spočtením živých a mrtvých housenek.

2.7.4 Test ovlivnění vývoje

Pro test ovlivnění vývoje bylo umístěno vždy po 10 housenkách do Petriho misky spolu s potravou. Potrava byla připravena rozmícháním 3,3 g suché směsi (Stonefly Industries, Bryan, TX, USA) s 10 ml roztoku destilačního zbytku dané koncentrační úrovně. Pro každou koncentrační úroveň byla provedena 3 opakování. Po 14 dnech byly všechny živé housenky zváženy.

2.8 Statistická vyhodnocení

2.8.1 Kalibrační křivka α -thujonu

Vhodnost použití polynomu druhého řádu pro vyjádření průběhu kalibrační křivky α -thujonu byla otestována pomocí F-testu. Porovnávány byla sumy čtverců odchylek modelů s ohledem na složitost modelu.²⁸

$$F = \frac{\frac{SS1 - SS2}{DF1 - DF2}}{DF2}$$

SS1- suma čtverců odchylek jednoduššího modelu
SS2- suma čtverců odchylek složitějšího modelu
DF1- počet stupňů volnosti jednoduššího modelu
DF2- počet stupňů volnosti složitějšího modelu

Výpočet hodnoty testového kritéria byl proveden v MS Excel. Dosažená hladina významnosti byla vypočtena pomocí statistické kalkulačky v programu Statistika.

2.8.2 Porovnání obsahů terpenických látek

Kvantitativní porovnání celkového obsahu terpenických látek mezi srovnatelnými matricemi (EO, sušená rostlina) bylo provedeno pomocí ANOVA testů v programu Statistika. U dat byla provedena logaritmická transformace. Homogenita variance byla ověřena pomocí Bartel, Cochran C a Hartley testu. Porovnání normalizovaného obsahu terpenických látek bylo provedeno pomocí PCA a RDA testů v programu Canoco.

2.8.3 Pesticidní potenciál

Porovnání hmotnosti larev bylo provedeno v programu Statistika pomocí jednocestné ANOVY. Homogenita variance byla ověřena pomocí Bartel, Cochran C a Hartley testu. Tukey post hoc test byl použit k separaci odlišných skupin. Výpočet LC_{50} byl proveden na VÚRV v programu BioStat.

3 VÝSLEDKY

3.1 Optimalizace GC metod

3.1.1 Měření standardů

GC metody byly postupně optimalizovány pro nejlepší možnou separaci píků měřených látek. Retenční časy standardů byly naměřeny za použití GC metody CHM-kval. Naměřené retenční časy jsou shrnuty v Tab. IX.

Tab. IX: Retenční časy standardů při použití metody pro stanovení celkového profilu těkavých látek.

| Látka | RT [min] | Látka | RT [min] |
|-----------------------|----------|---------------------------|----------|
| α -Pinen | 11,60 | Chrysanthenol | 23,19 |
| Kamfen | 12,39 | Borneol | 23,79 |
| β -Pinen | 13,83 | Menthol | 24,10 |
| Myrcen | 14,62 | Terpinen-4-ol | 24,16 |
| α -Phellandren | 15,38 | α -Terpineol | 24,89 |
| 3-Karen | 15,46 | Estragol | 25,04 |
| <i>p</i> -Cymen | 16,36 | Karvon | 27,15 |
| Limonen | 16,58 | Geraniol | 27,56 |
| Eucalyptol | 16,72 | <i>p</i> -Anisaldehyd | 27,64 |
| γ -Terpinen | 18,10 | <i>t</i> -Anethol | 29,14 |
| Sabinen hydrát | 18,76 | Sabinylní-acetát | 29,30 |
| Terpinolen | 19,44 | Thymol | 29,46 |
| Fenchon | 19,58 | Karvakrol | 29,84 |
| Linalool | 20,30 | Myrtenyl-acetát | 30,77 |
| α -Thujon | 20,44 | Piperitenon oxid | 32,47 |
| β -Thujon | 21,00 | <i>t</i> -Karyofylen | 34,78 |
| Kafr | 22,44 | α -Humulen | 36,31 |
| Menthon | 22,96 | <i>t</i> -Karyofylen oxid | 41,34 |

Retenční časy vybraných standardů naměřených za použití GC metody CHM-kvant jsou shrnuty v Tab. X.

Tab. X: Retenční vybraných standardů při použití metody pro stanovení obsahu α -thujonu, β -thujonu a *t*-anetholu.

| Látka | RT [min] |
|----------------------|----------|
| Ethylbenzen | 3,51 |
| α -Thujon | 15,55 |
| β -Thujon | 16,76 |
| <i>t</i> -Anethol | 29,55 |
| <i>l</i> -Tetradecen | 33,11 |

Na základě ploch píků α -thujon a β -thujon bylo zpřesněno poměrné zastoupení těchto látek ve standardu (Sigma-Aldrich) a to na 96,95 : 3,05 (α -thujon : β -thujon).

3.1.2 Test kalibračních křivek a vnitřních standardů

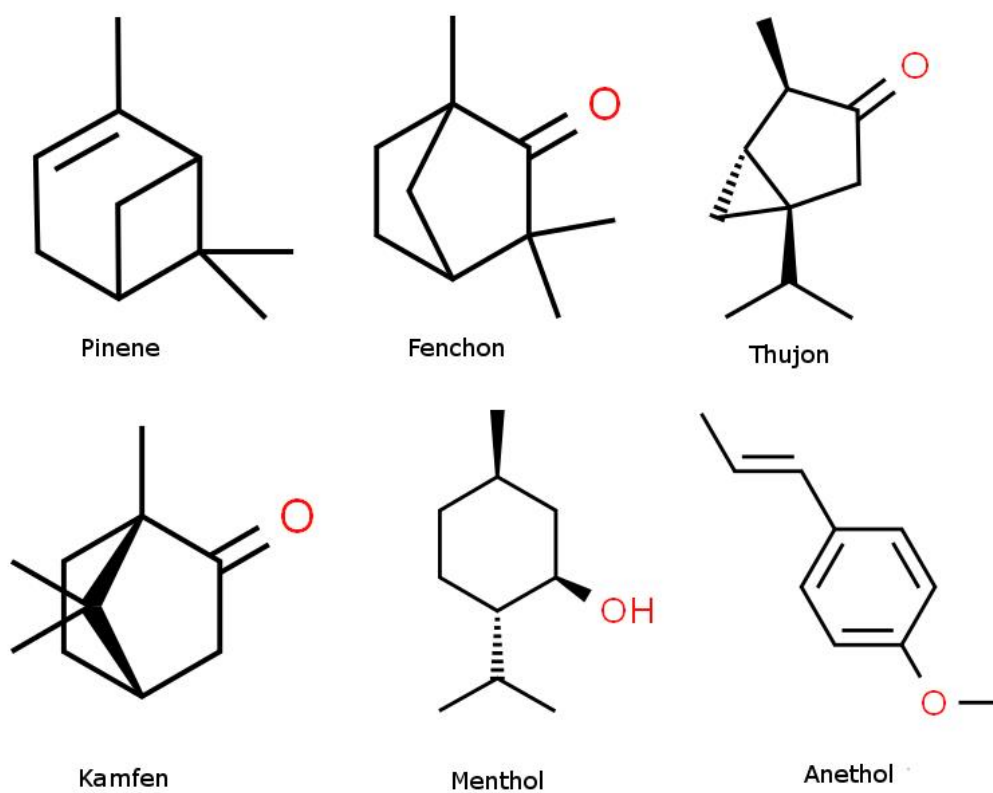
Pro výběr interního standardu bylo vytipováno několik látek. Vhodný retenční čas, kdy nedocházelo ke koelucím, měly pouze tři z nich – hexanal, ethylbenzen a *l*-tetradecen. *l*-Tetradecen byl na základě RT vybrán jako interní standard pro *t*-anethol. Pro thujony byl vybrán ethylbenzen na základě nižší RSD pro poměr α -thujon/ISTD při 10 x opakovaném měření stejného roztoku, viz Tab. XI.

Tab. XI: Relativní směrodatné odchylky naměřené při desetkrát opakovaném měření stejného roztoku po přepočtení ploch píků na vnitřní standard.

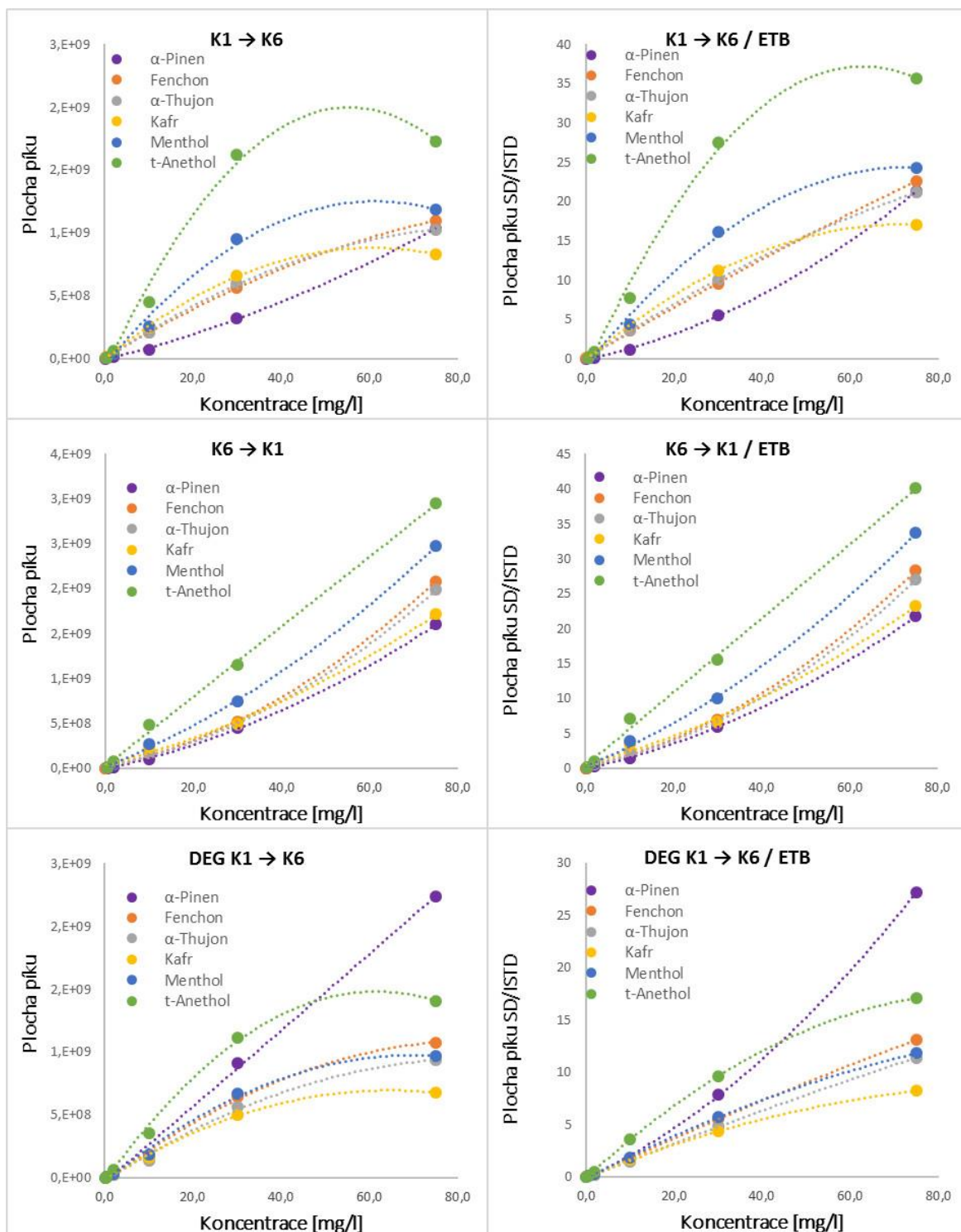
| Opakování | α -Thujon / ETB | α -Thujon / Hexanal | <i>t</i> -Anethol / 1-TETR |
|----------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| RSD [%] | 1,76 | 3,15 | 2,19 |

První testy měření kalibračních roztoků pro *t*-anethol a α -thujon vedly ke zjištění, že tyto látky mají odlišné průběhy kalibračních křivek. K lepšímu pochopení problému bylo vybráno šest monoterpenů, viz Obr. 4. V prvním případě byly kalibrační roztoky připraveny přesně dle 2.3 Tab. V. Ve druhém případě byl do každé vialky přidán 1 μ l diethylen glykolu. Kalibrační křivka bez přídavku diethylen glykolu byla měřena dvakrát: od

nejnižší koncentrace analytů po nejvyšší a opačně. Kalibrační křivka s přidaným diethylenglykolem byla měřena pouze od nejnižší po nejvyšší koncentraci. Výsledky měření jsou znázorněny na Obr. 5.



Obr. 4: Strukturální vzorce vybraných monoterpenů.



Obr. 5: Kalibrační křivky α -pinenu, fenchonu, α -thujonu, kafru, mentholu a *t*-anetholu (s a bez přepočtu na ISTD - ETB) aproximované pomocí polynomů druhého řádu. Kalibrační křivka s přidavkem diethylenglykolu je označena DEG. Kalibrační křivka měřená od nejnižší po nejvyšší koncentraci je označena K1 → K6. Kalibrační křivka měřená od nejvyšší po nejnižší koncentraci je označena K6 → K1.

3.2 Validace kalibračních křivek GC-MS

3.2.1 Meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměrné hodnoty naměřených poměrů výšek signálů a šumů ze třech opakování na koncentračních úrovních na koncentračních úrovních K₁-K₃ pro 6 vybraných monoterpenů pro metodu CHM-kval jsou uvedené v Tab. XII spolu s vypočtenou průměrnou hodnotou meze detekce a stanovitelnosti.

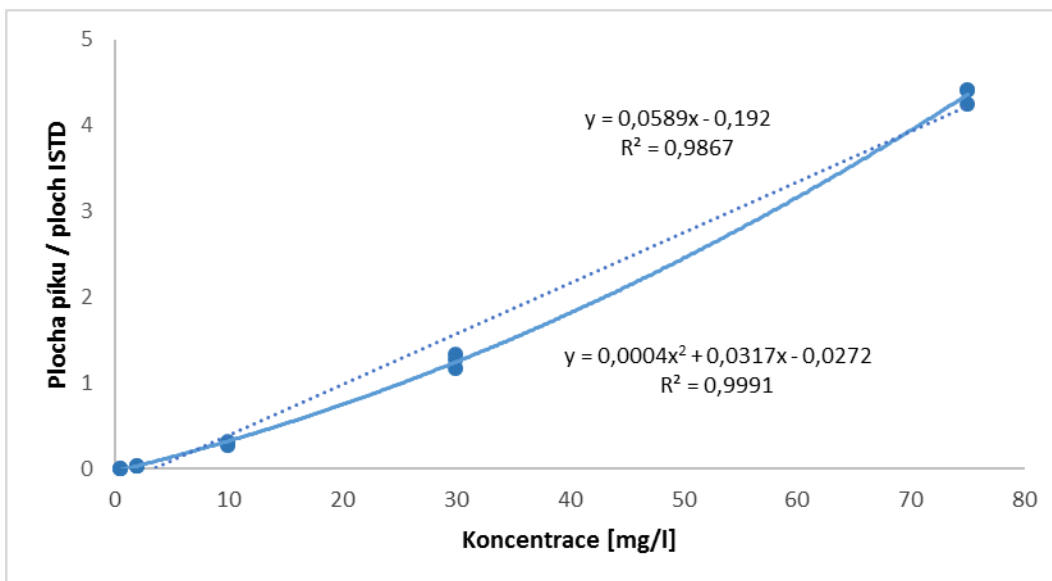
Tab. XII: Průměrné poměry výšky signálů analytů a výšek šumů základní linie.

| | Koncentrace [mg/l] | 0,1 | 0,5 | 2 |
|-------------------------------------|--------------------|------|------|------|
| S/N | alpha-Pinen | 3,8 | 10,0 | 57,7 |
| | Fenchon | 3,4 | 15,0 | 53,3 |
| | α -Thujon | 2,8 | 10,5 | 58,3 |
| | Camphor | 3,0 | 15,0 | 72,0 |
| | Menthol | 2,8 | 8,3 | 52,0 |
| | <i>t</i> -Anethol | 2,5 | 17,5 | 95,0 |
| Průměrná mez detekce [mg/l] | | 0,15 | | |
| Průměrná mez stanovitelnosti [mg/l] | | 0,36 | | |

Pro metodu CHM-kvant (SIM mód) bylo pouze ověřeno, že i nejnižší kalibrační úroveň α -thujonu se nachází nad limitem kvantifikace, což bylo splněno. Průměrná hodnota S/N ze tří opakování pro koncentraci 0,1 mg/l byla 18,3.

3.2.2 Linearita

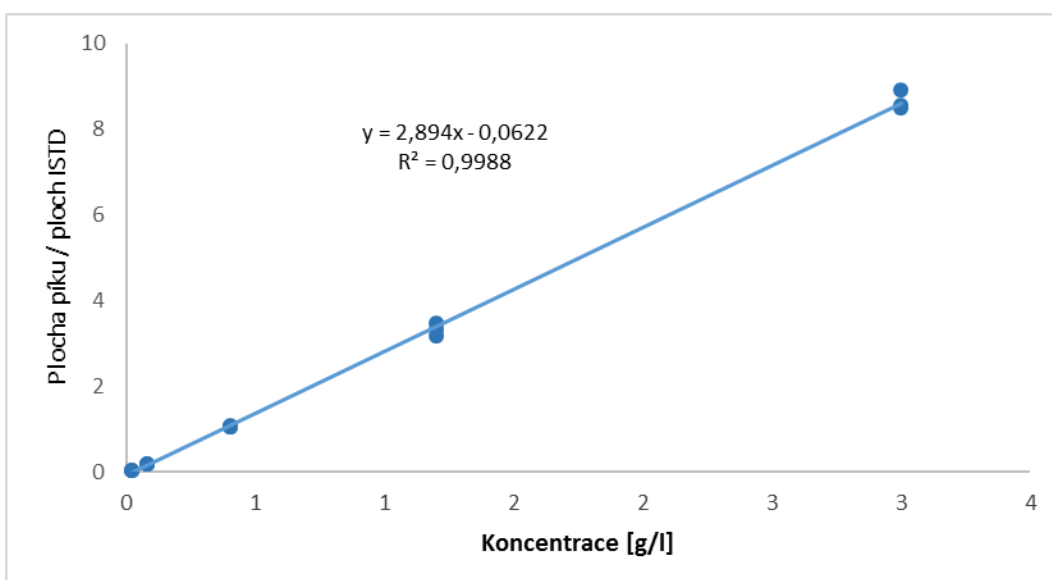
Pro stanovení linearity byly připraveny kalibrační roztoky α -thujonu a *t*-anetholu dle 2.3. Tab. VI na koncentračních úrovních K₂-K₆ ve třech opakováních. Průběh kalibračních křivek α -thujonu aproximovaných pomocí polynomu prvního a druhého řádu je znázorněn na Obr. 6. Průběh kalibrační křivky *t*-anetholu aproximované pomocí polynomu prvního řádu je znázorněn na Obr. 7.



Obr. 6: Kalibrační křivka α -thujonu aproximovaná pomocí polynomu prvního a druhého řádu s vyobrazenými regresními rovnicemi a koeficientem determinace.

Vhodnost použití polynomu druhého řádu pro kalibrační křivku α -thujonu byla ověřena pomocí F-testu sumy čtverců odchylek obou modelů (polynom prvního a druhého řádu) – $F = 860,94$; $p < 0,0001$; $df = 13; 12$.

Pro kalibrační křivku α -thujonu byla dosažená hodnota koeficientu determinace 0,9991 a 4,4 % pro QC koeficient.



Obr. 7: Kalibrační křivka t -anetholu aproximovaná pomocí polynomu prvního řádu s vyobrazenou regresní rovnicí a koeficientem determinace.

Pro kalibrační křivku *t*-anetholu byla dosažená hodnota koeficientu determinace 0,9988 a 4,3 % pro QC koeficient.

3.2.3 Správnost a přesnost

Pro stanovení linearit byly připraveny kalibrační roztoky α -thujonu a *t*-anetholu dle 2.3. Tab. VI na koncentračních úrovních K₂-K₆ ve třech opakováních. Dosažené hodnoty správnosti a přesnosti vypočtené ze 3 opakováních měření pro každou koncentrační úroveň jsou zaznamenány v Tab. XIII pro α -thujon a Tab. XIV pro *t*-anethol.

Tab. XIII: Hodnocení správnosti a přesnosti na jednotlivých koncentračních úrovních pro α -thujon. Hodnoty přesahující přijatelné rozmezí²⁹ jsou zvýrazněny červeně.

| | | | | | |
|---------------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Teoretická koncentrace [mg/l] | 0,5 | 2 | 10 | 30 | 75 |
| Vypočtená koncentrace - průměr [mg/l] | 1,2 | 2,0 | 9,6 | 28,4 | 71,3 |
| Správnost – průměr [%] | 231,6 | 102,0 | 95,6 | 94,7 | 95,0 |
| Přesnost (RSD) [%] | 3,4 | 2,1 | 5,3 | 3,8 | 4,0 |

*Tab. XIV: Hodnocení správnosti a přesnosti na jednotlivých koncentračních úrovních pro *t*-anethol. Hodnoty přesahující přijatelné rozmezí²⁹ jsou zvýrazněny červeně.*

| | | | | | |
|--------------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Teoretická koncentrace [g/l] | 0,02 | 0,08 | 0,4 | 1,2 | 3 |
| Vypočtená koncentrace - průměr [g/l] | 0,04 | 0,09 | 0,42 | 1,16 | 2,86 |
| Správnost - průměr [%] | 181,1 | 110,7 | 105,7 | 96,4 | 95,5 |
| Přesnost (RSD) [%] | 2,3 | 0,2 | 9,6 | 16,4 | 7,8 |

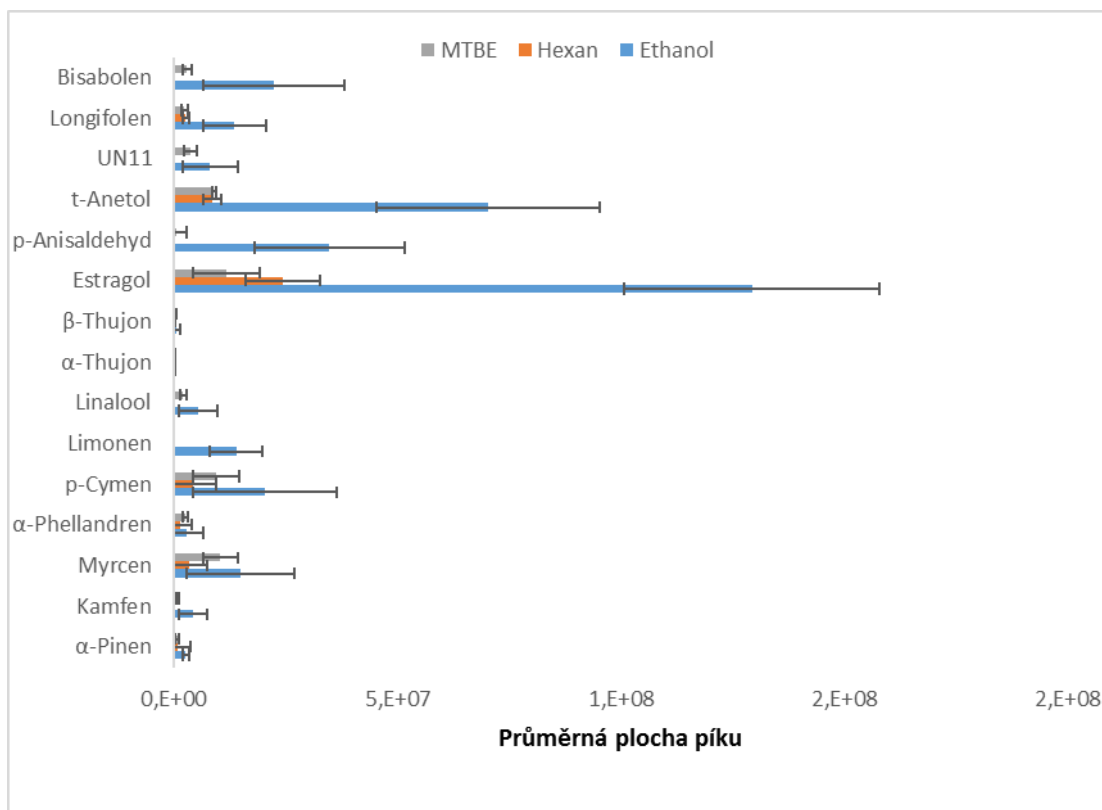
3.2.4 Rozsah

Po srovnání dosažených hodnot validačních charakteristik uvedených v 3.2.2 a 3.2.3 s literaturou^{29, 30} je možné konstatovat, že kalibrační křivka α -thujonu byla úspěšně validována v rozsahu 2 – 75 mg/l. Kalibrační křivka *t*-anetholu v rozsahu 0,08 – 3 g/l nespĺňovala pouze kritérium přesnosti.

3.3 Výběr extrakčního činidla

Kritérii pro výběr extrakčního činidla byla výtěžnost extrakce (hodnoceno porovnáním ploch pík analytů) a počet extrahovaných látek nad detekčním limitem. Ve sledovaném

časovém úseku 3,00 – 38,50 bylo u obou kritérií dosaženo nejlepšího výsledku u 96% ethanolu - ethanol 15 látek, MTBE 14 látek a hexan 9 látek. Srovnání ploch píků analytů viz Obr. 8.

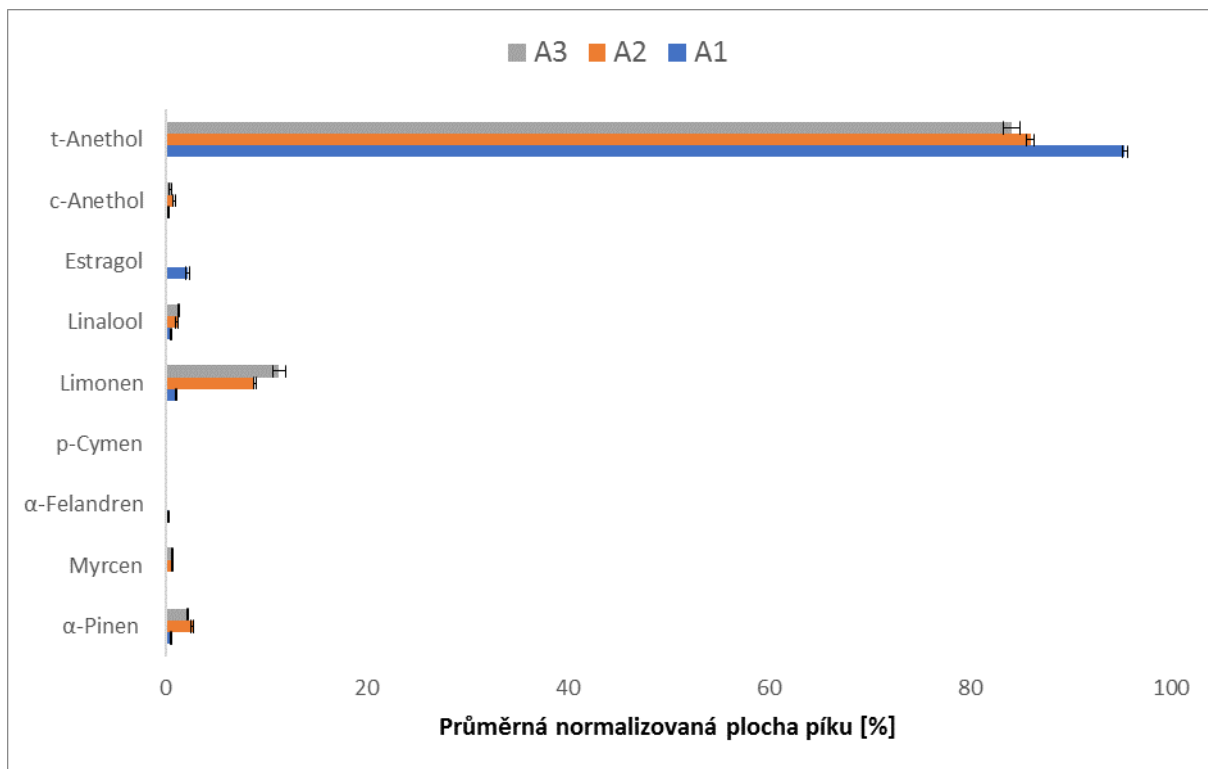


Obr. 8: Srovnání průměrných ploch píků analytů při použití různých extrakčních činidel. Chybové úsečky vyznačují \pm dvojnásobek výběrové směrodatné odchylky.

3.4 Porovnání obsahu terpenických látek v esenciálních olejích od různých výrobců

3.4.1 Anýzové esenciální oleje

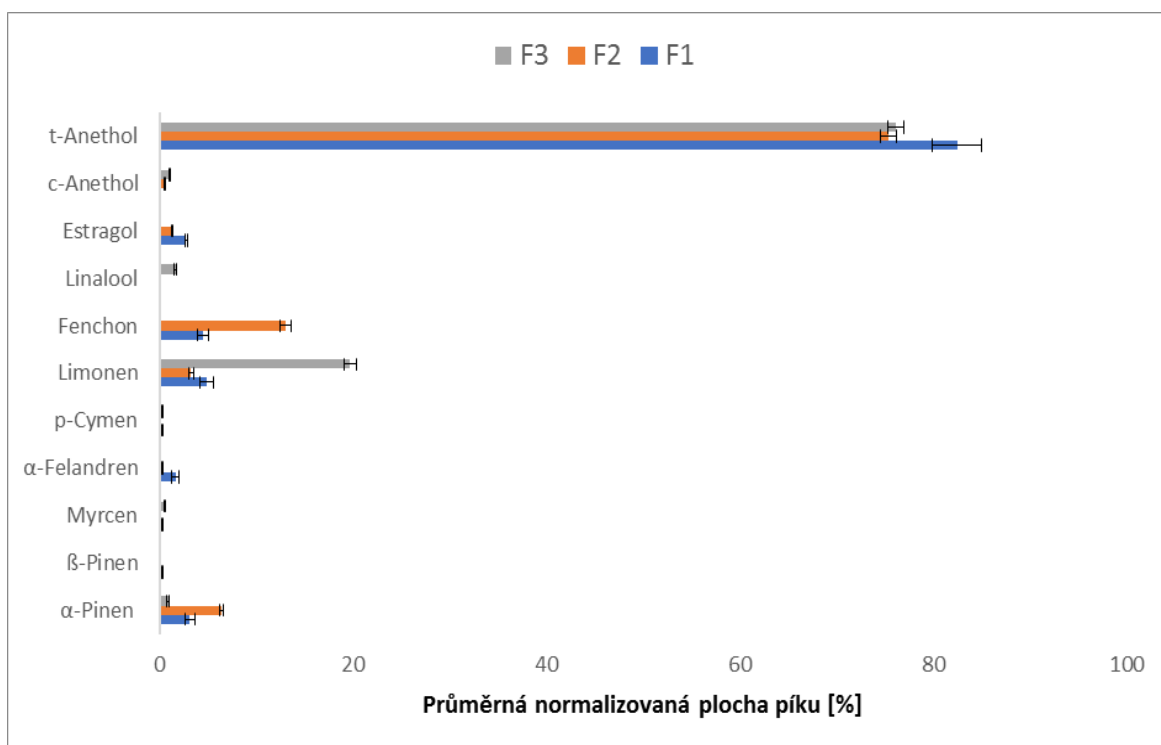
Anýzové esenciální oleje od tří různých výrobců (A1, A2 a A3) byly analyzovány metodou CH-kval. Nalezeno bylo 9 látek a z nich se 9 podařilo určit pomocí standardů a knihovny spekter NIST. Naměřené hodnoty normalizovaných ploch analytů jsou graficky shrnuty v Obr. 9. Pomocí RDA analýzy byly zjištěny průkazné rozdíly ve složení mezi jednotlivými výrobci (pseudo-F= 1360, p= 0,002), celková vysvětlená variabilita modelu byla 97,71 %.



Obr. 9: Srovnání průměrných normalizovaných ploch píků analytů pro anýzový EO od tří různých výrobců. Chybové úsečky vyznačují \pm dvojnásobek výběrové směrodatné odchylky.

3.4.2 Fenyklové esenciální oleje

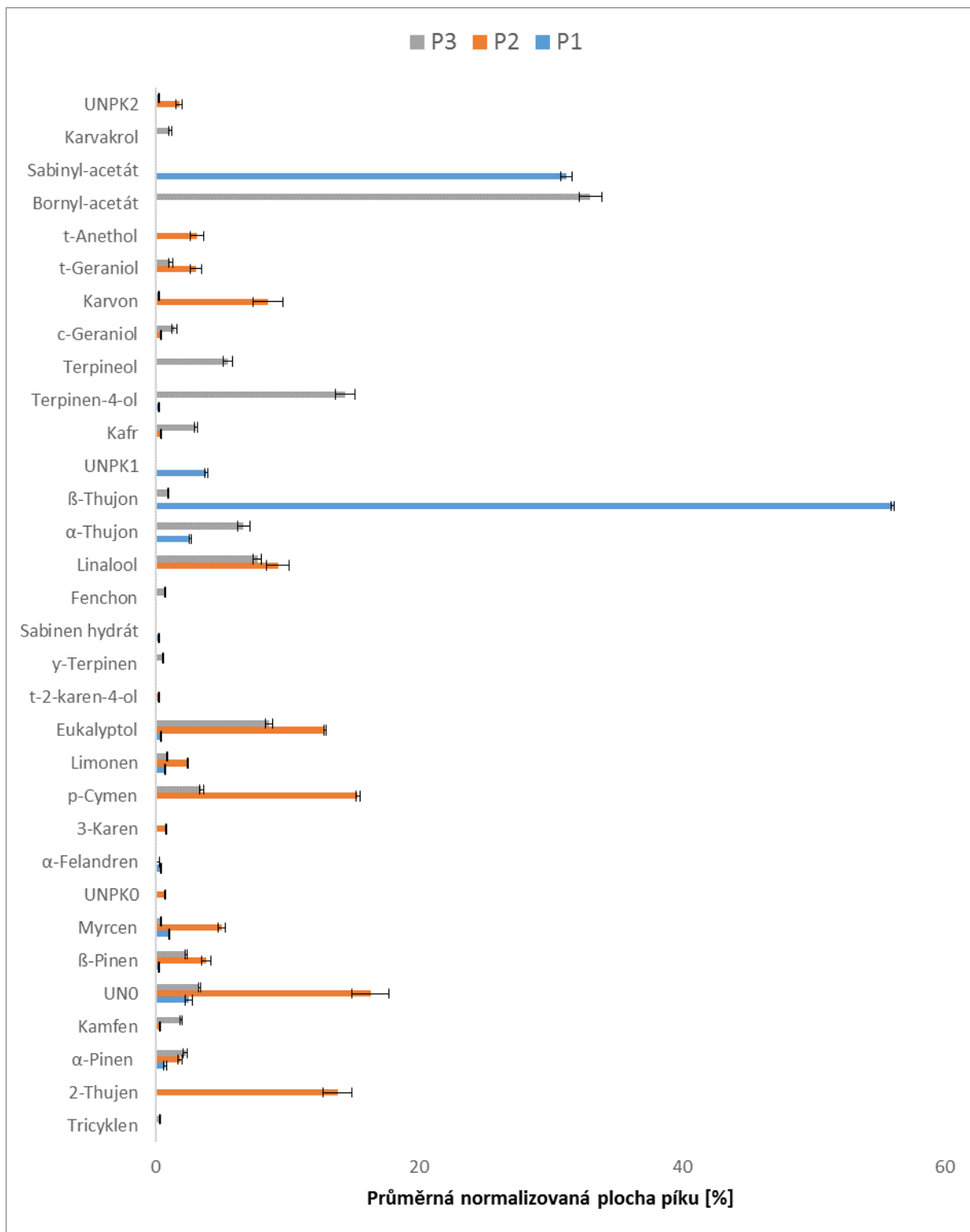
Fenyklové esenciální oleje od tří různých výrobců (F1, F2 a F3) byly analyzovány metodou CH-kval. Nalezeno bylo 11 látek a z nich se 11 podařilo určit pomocí standardů a knihovny spekter NIST. Naměřené hodnoty normalizovaných ploch analytů jsou graficky shrnuty v Obr. 10. Pomocí RDA analýzy byly zjištěny průkazné rozdíly ve složení mezi jednotlivými výrobci (pseudo-F= 402, p= 0,002), celková vysvětlená variabilita modelu byla 99,01 %.



Obr. 10: Srovnání průměrných normalizovaných ploch píků analytů pro fenyklový EO od tří různých výrobců. Chybové úsečky vyznačují \pm dvojnásobek výběrové směrodatné odchylky.

3.4.3 Pelyňkové esenciální oleje

Pelyňkové esenciální oleje od tří různých výrobců (P1, P2 a P3) byly analyzovány metodou CH-kval. Nalezeno bylo 32 látek a z nich se 28 podařilo určit pomocí standardů a knihovny spekter NIST. Naměřené hodnoty normalizovaných ploch analytů jsou graficky shrnuty v Obr. 11. Pomocí RDA analýzy byly zjištěny průkazné rozdíly ve složení mezi jednotlivými výrobci (pseudo-F= 869, p= 0,002), celková vysvětlená variabilita modelu byla 99,54 %.

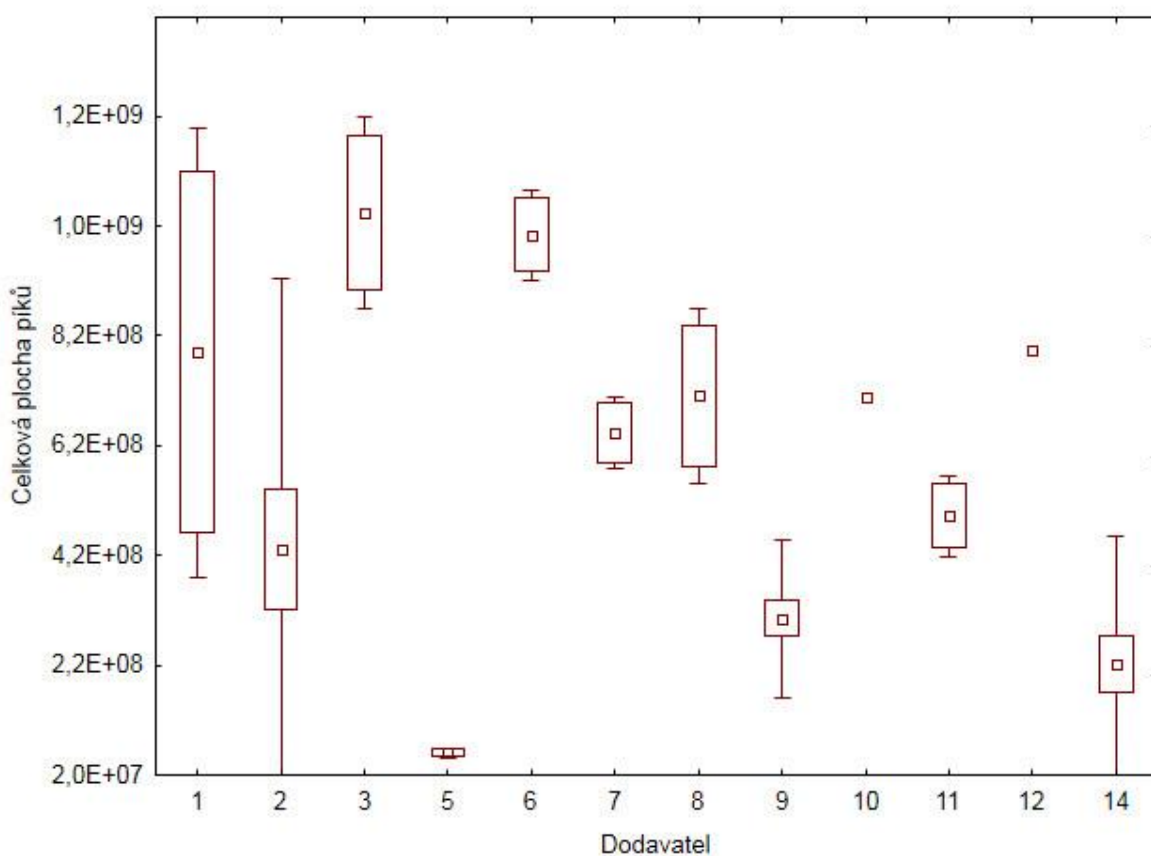


Obr. 11: Srovnání průměrných normalizovaných ploch píků analytů pro pelyňkový EO od tří různých výrobců. Chybové úsečky vyznačují \pm dvojnásobek výběrové směrodatné odchylky.

3.5 Porovnání obsahu terpenických látek v sušených rostlinách od různých dodavatelů

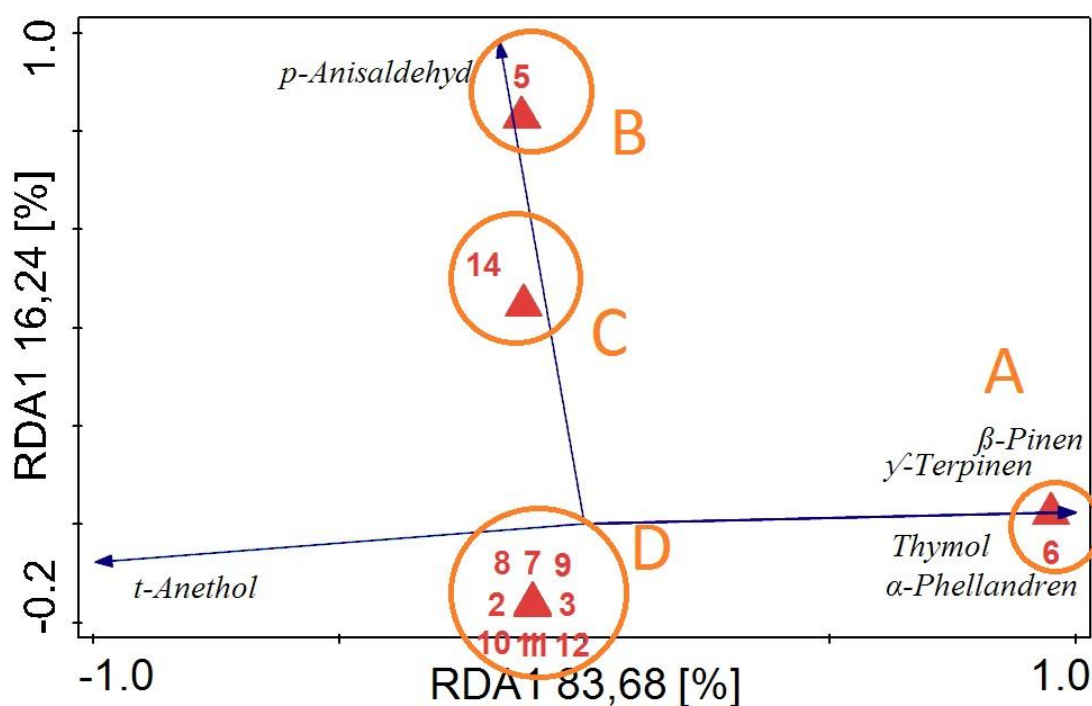
3.5.1 Anýzové extrakty

Ethanolové extrakty semen anýzu od dvanácti různých dodavatelů (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14) byly analyzovány metodou CH-kval. Nalezeno bylo 6 látek a z nich se 6 podařilo určit pomocí standardů a knihovny spekter NIST. Grafické porovnání součtů ploch všech analytů je uvedeno na Obr. 12. Celkové plochy píků se mezi dodavateli průkazně odlišovaly ($F= 179,1$; $p<0,0001$; $df= 1;11$). Tukey post hoc testu ukázal, že nejmenší obsah sledovaných látek měl anýz od dodavatele č. 5. a naopak nejvyšší obsah těchto látek byl u dodavatelů č. 1, 3 a 6.

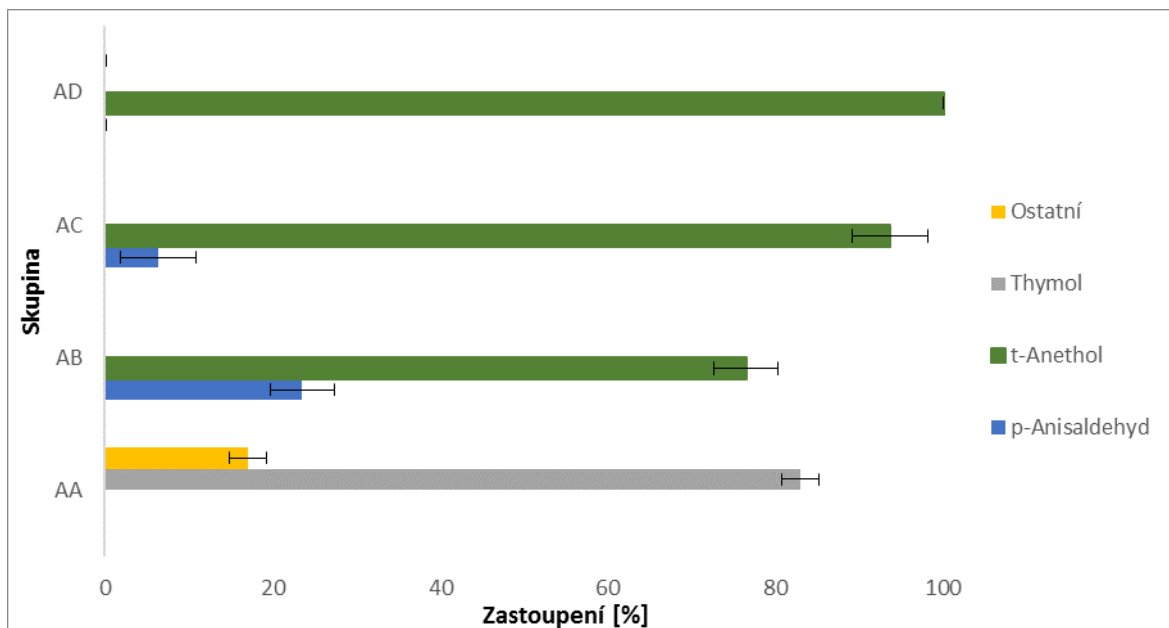


Obr. 12: Srovnání celkové plochy píků analytů pro ethanolový extrakt semen anýzu od 12 různých dodavatelů. Bod udává průměrnou hodnotu, box dvojnásobek směrodatné odchylky a chybové úsečky 95% konfidenční interval.

RDA analýza normalizovaných ploch analytů ukázala průkazný rozdíl v poměrných zastoupeních jednotlivých analytů mezi dodavateli (pseudo-F= 2041, p= 0,001), celková vysvětlená variabilita modelu byla 99,88 %. Na základě následných RDA analýz s postupným výběrem dodavatelů a naměřených dat, byly vybrány skupiny vzorků s podobným složením analyzovaných látek a skupiny analytů, které skupiny odlišují. Výsledky RDA analýzy s vybranými skupinami látek a dodavatelů jsou na Obr. 13. Srovnání průměrných normalizovaných ploch píků skupin analytů ve skupinách dodavatelů je znázorněno na Obr. 14.



Obr. 13: Grafické znázornění výsledku RDA testů naměřených normalizovaných ploch analytů pro ethanolové extrakty semen anýzu od 12 různých dodavatelů se zvýrazněnými skupinami dodavatelů (oranžová), které byly odlišeny na základě naměřených dat a RDA testů.



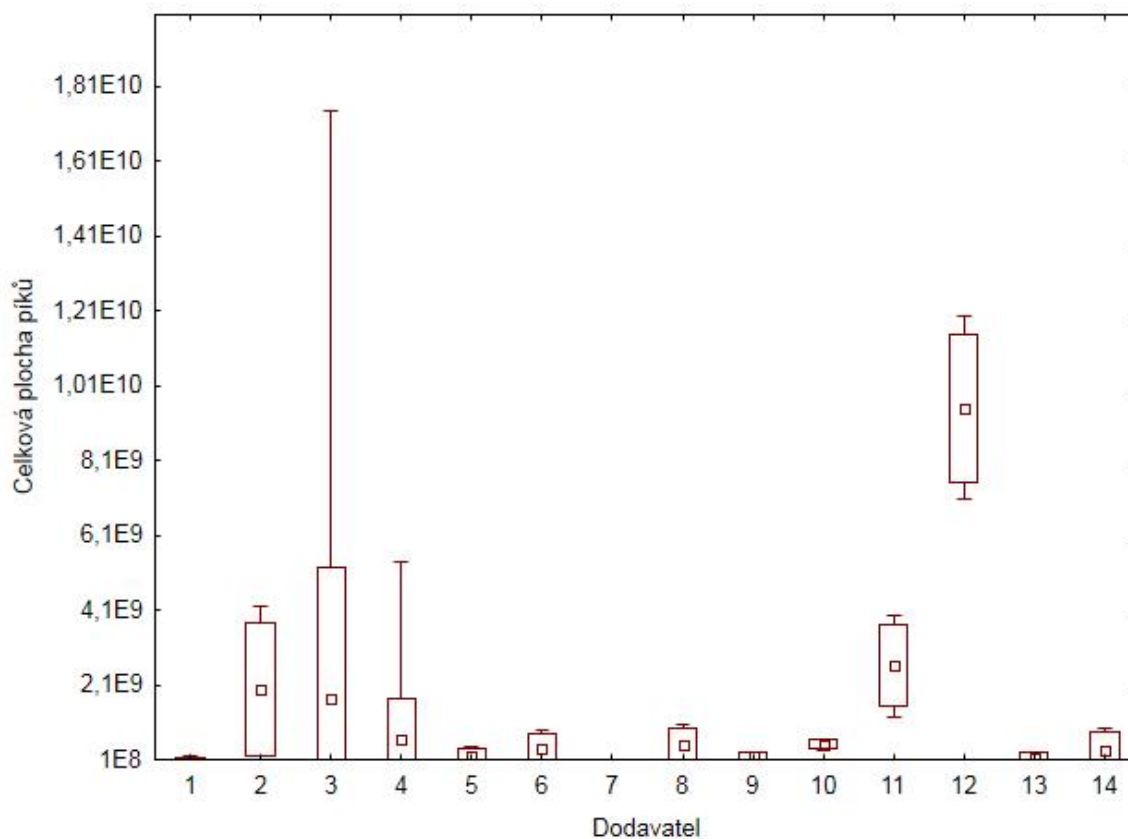
Obr. 14: Rozdělení dodavatelů sušených semen anýzu do skupin podle klíčových skupin analytů na základě naměřených dat a jejich RDA analýz. Chybové úsečky vyznačují $\pm 2 \times$ směrodatnou odchylku.

Klíčové látky pro rozdělení dodavatelů do skupin byly: thymol, *t*-anethol, *p*-anisaldehyd a ostatní (β -pinen, α -felandren a γ -terpinen). Dodavatelé byli rozděleni následovně: AA – 6; AB – 5; AC – 14; AD – 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14. Na základě naměřených dat a provedených analýz je možné konstatovat, že u skupiny dodavatelů AD byl v extraktu přítomen téměř 100% *t*-anethol. Skupiny AB (dodavatel č. 5) a AC (dodavatel č. 14) se od sebe odlišovaly různým poměrem *t*-anetholu a *p*-anisaldehydu. Naprosto odlišné složení měla skupina AA (dodavatel č. 6), kde byl dominantní látkou thymol doprovázený β -pinenem, α -felandrenem a γ -terpinenem.

3.5.2 Fenyklové extrakty

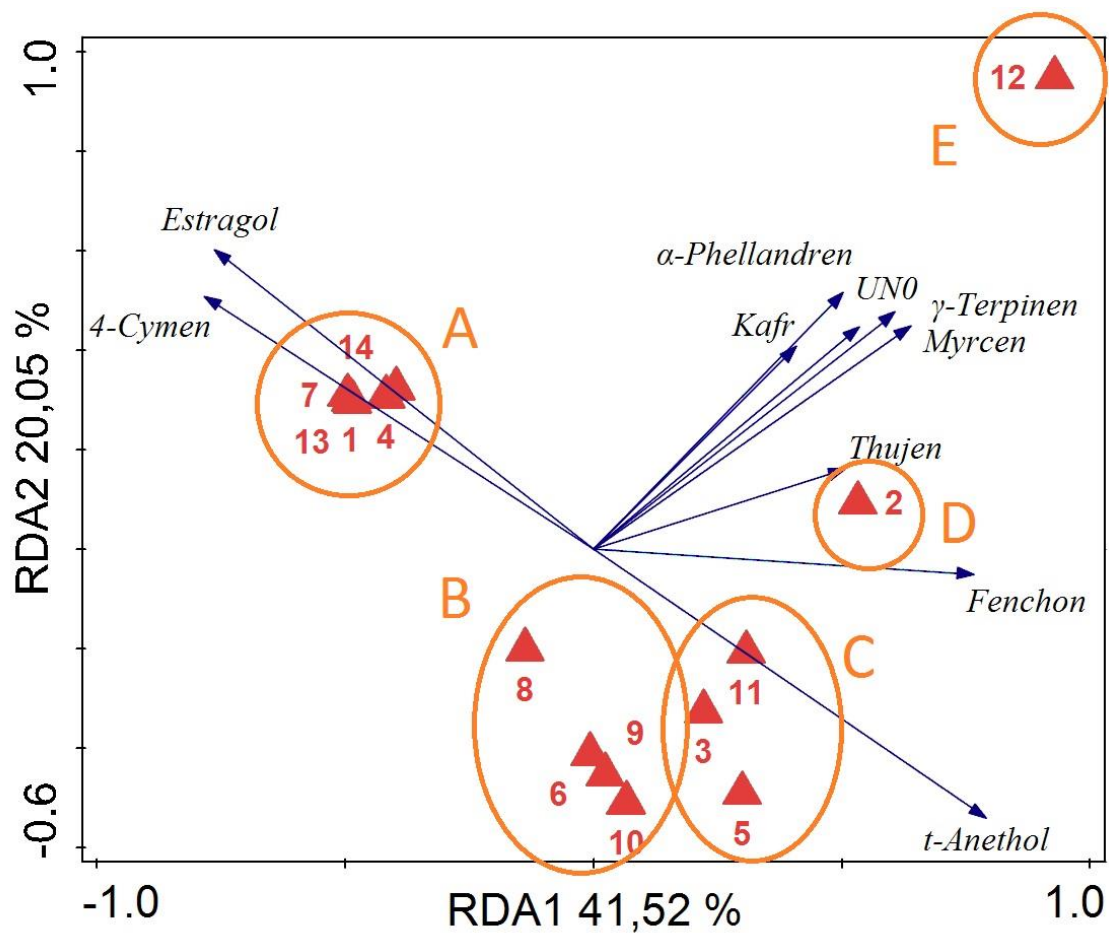
Ethanolové extrakty semen fenyklu od čtrnácti různých dodavatelů (1 - 14) byly analyzovány metodou CH-kval. Nalezeno bylo 10 látek a z nich se 9 podařilo určit pomocí standardů a knihovny spekter NIST. Grafické porovnání součtů ploch všech analytů je uvedeno na Obr. 15. Celkové plochy pík se mezi dodavateli průkazně odlišovaly ($F=19,45$; $p<0,0001$; $df=1;13$). Tukey post hoc test ukázal, že nejvyšší obsah sledovaných

látek měl fenykl od dodavatele č. 12. a naopak nejnižší u dodavatelů č. 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13 a 14.

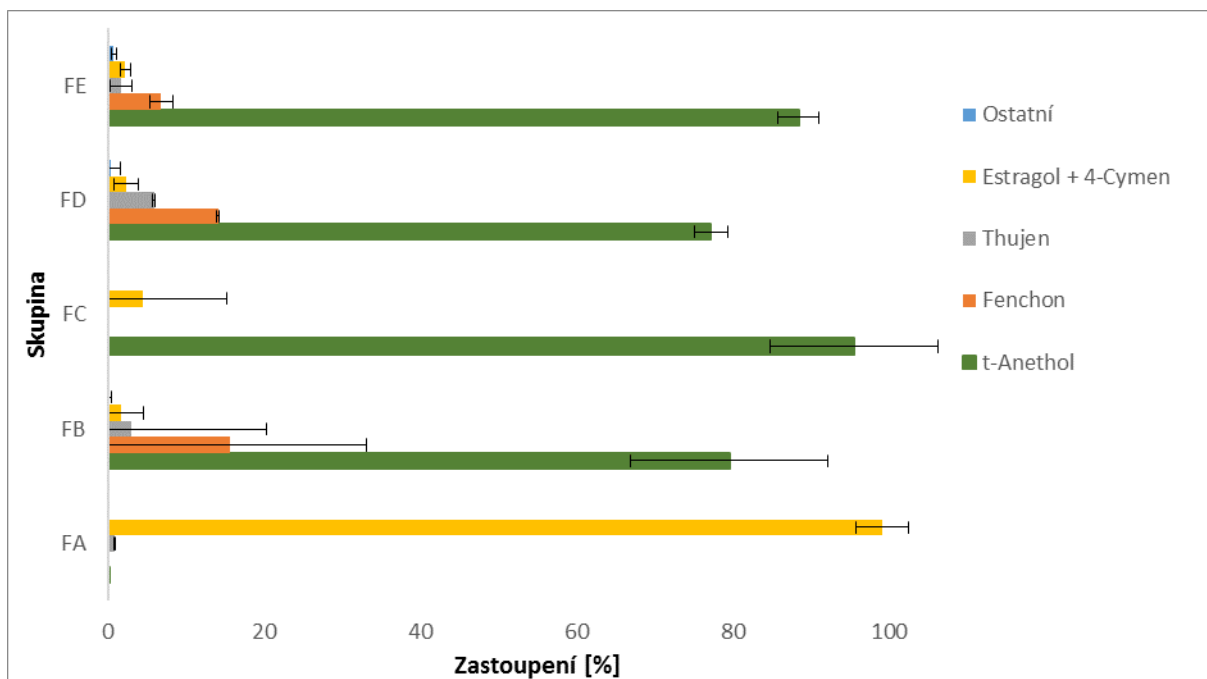


Obr. 15: Srovnání celkové plochy píkú analytů pro ethanolový extrakt semen fenyku od 14 různých dodavatelů. Bod udává průměrnou hodnotu, box dvojnásobek směrodatné odchylky a chybové úsečky 95% konfidenční interval.

RDA analýza normalizovaných ploch analytů ukázala průkazný rozdíl v poměrných zastoupeních jednotlivých analytů mezi dodavateli (pseudo-F= 6,1, p= 0,001), celková vysvětlená variabilita modelu byla 62,74 %. Na základě následných RDA analýz s postupným výběrem dodavatelů a naměřených dat, byly vybrány skupiny vzorků s podobným složením analyzovaných látek a skupiny analytů, které skupiny odlišují. Výsledky RDA analýzy s vybranými skupinami látek a dodavatelů jsou na Obr. 16. Srovnání průměrných normalizovaných ploch píkú skupin analytů ve skupinách dodavatelů je znázorněno na Obr. 17.



Obr. 16: Grafické znázornění výsledku RDA testů naměřených normalizovaných ploch analytů pro ethanolové extrakty semen fenyklu od 14 různých dodavatelů se zvýrazněnými skupinami dodavatelů (oranžová), které byly odlišeny na základě naměřených dat a RDA testů.



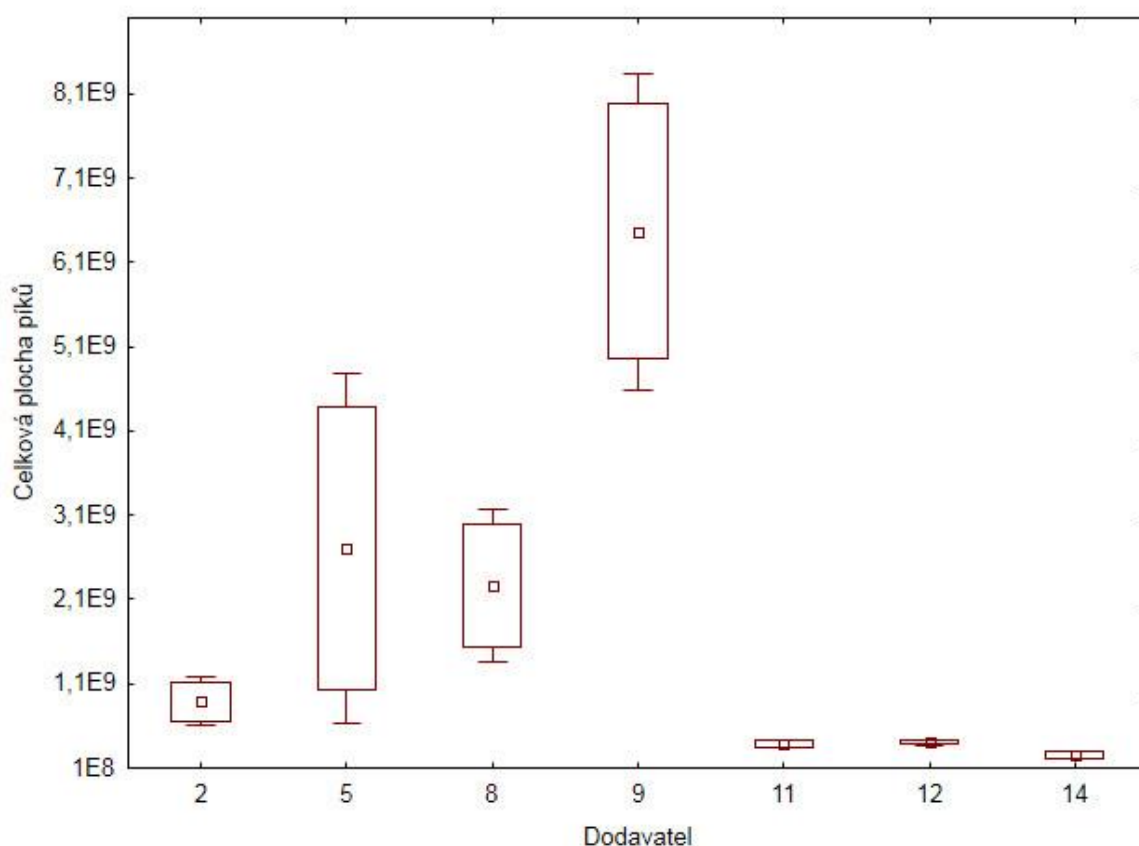
Obr. 17: Rozdělení dodavatelů sušených semen fenyklu obecného do skupin podle klíčových skupin analytů na základě naměřených dat a jejich RDA analýz. Chybové úsečky vyznačují $\pm 2 \times$ směrodatnou odchylku.

Klíčové látky pro rozdělení dodavatelů do skupin byly: *t*-anethol, fenchon, thujen, estragol s 4-cymenem a ostatní (UN0, myrcen, α -felandren, γ -terpinen kafr). Dodavatelé byli rozděleni následovně: FA – 1, 4, 7, 13, 14; FB – 6, 8, 9, 10; FC – 3, 5, 11; FD – 2; FE - 12. Na základě naměřených dat a provedených analýz je možné konstatovat, že u skupiny dodavatelů FA byl v extraktu dominantní látkou estragol spolu s 4-cymenem. U skupiny FB, FC, FD a FE byl dominantní látkou *t*-anethol. Skupina FC se odlišovala zejména absencí fenchonu a thujenu, skupiny FB, FD a FE se pak odlišovaly různými poměry obsahu těchto dvou látek.

3.5.3 Pelyňkové extrakty

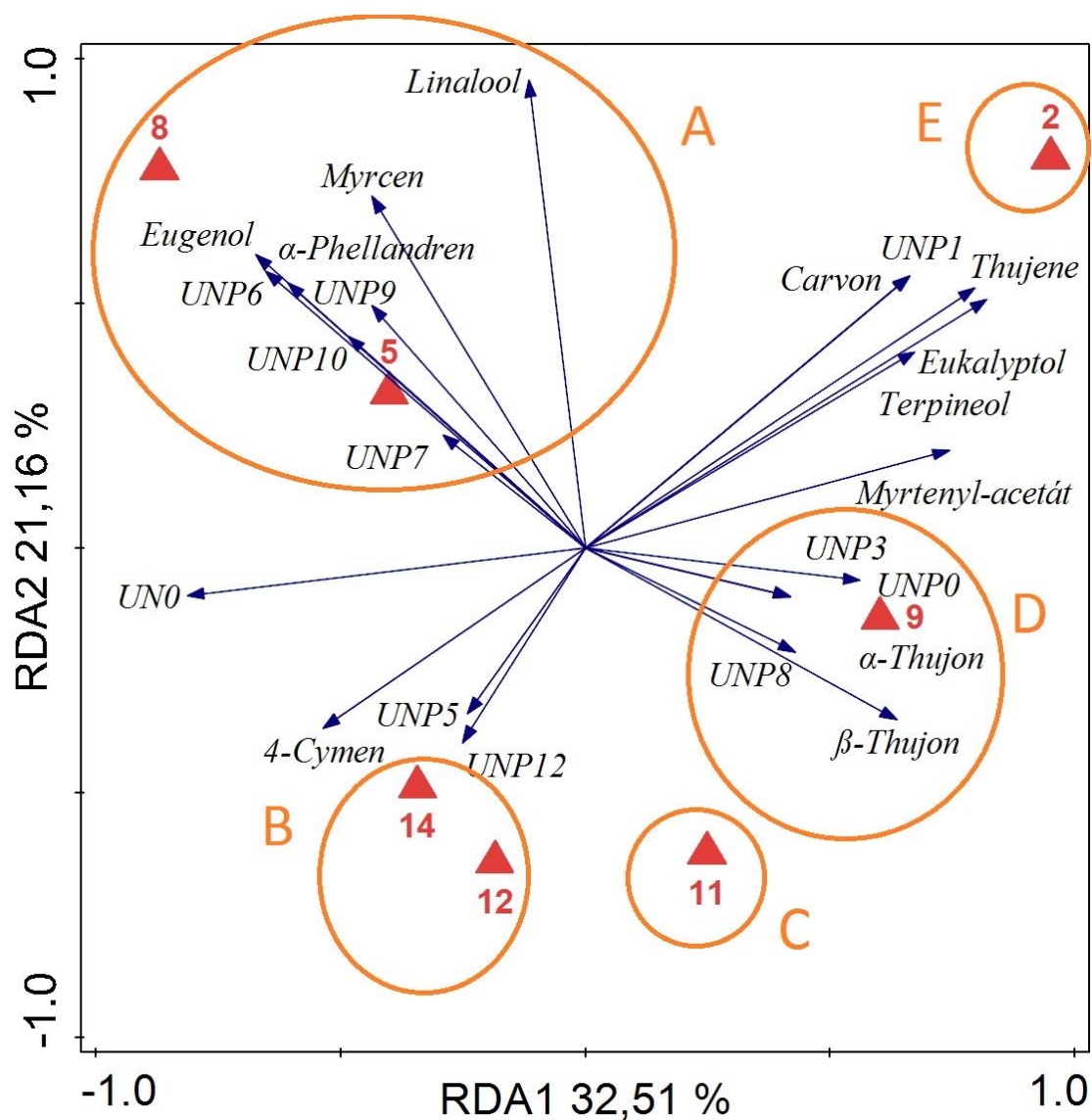
Ethanolové extrakty drcené natě pelyňku sedmi různých dodavatelů (2, 5, 8, 9, 11, 12, 14) byly analyzovány metodou CH-kval. Nalezeno bylo 24 látek a z nich se 12 podařilo určit pomocí standardů a knihovny spekter NIST. Grafické porovnání součtů ploch všech analytů je uvedeno na Obr. 18. Celkové plochy píků se mezi dodavateli průkazně odlišovaly ($F = 196,70$; $p < 0,0001$; $df = 1;6$). Tukey post hoc test ukázal, že nejvyšší obsah

sledovaných látek měl pelyněk od dodavatele č. 9. a naopak nejnižší u dodavatelů č. 11, 12, 14.

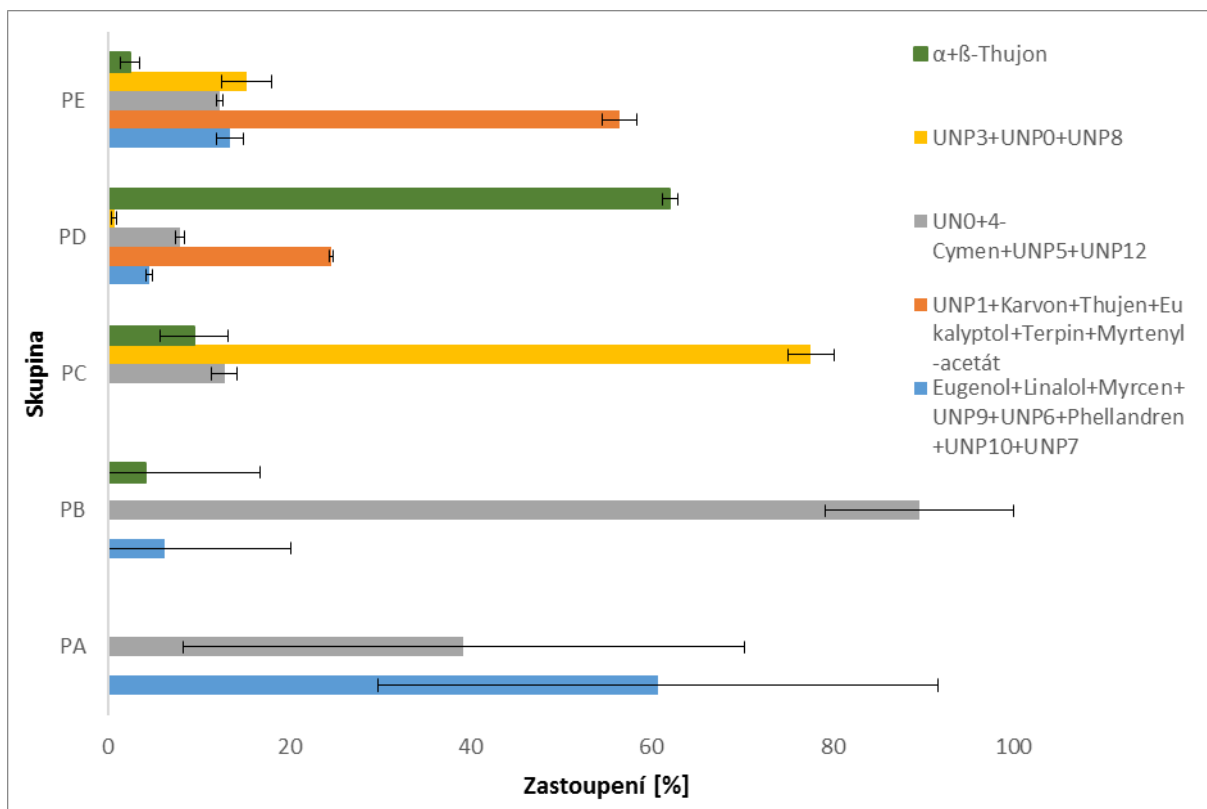


Obr. 18: Srovnání celkové plochy píkú analytů pro ethanolový extrakt natě pelyňku od 7 různých dodavatelů. Bod udává průměrnou hodnotu, box dvojnásobek směrodatné odchylky a chybové úsečky 95% konfidenční interval.

RDA analýza normalizovaných ploch analytů ukázala průkazný rozdíl v poměrných zastoupeních jednotlivých analytů mezi dodavateli (pseudo-F= 30,6, p= 0,001), celková vysvětlená variabilita modelu byla 89,88 %. Na základě následných RDA analýz s postupným výběrem dodavatelů a naměřených dat, byly vybrány skupiny vzorků s podobným složením analyzovaných látek a skupiny analytů, které skupiny odlišují. Výsledky RDA analýzy s vybranými skupinami látek a dodavatelů jsou na Obr. 19. Srovnání průměrných normalizovaných ploch píkú skupin analytů ve skupinách dodavatelů je znázorněno na Obr. 20.



Obr. 19: Grafické znázornění výsledku RDA testů naměřených normalizovaných ploch analytů pro ethanolové extrakty natě pelyňku od 7 různých dodavatelů se zvýrazněnými skupinami dodavatelů (oranžová), které byly odlišeny na základě naměřených dat a RDA testů.



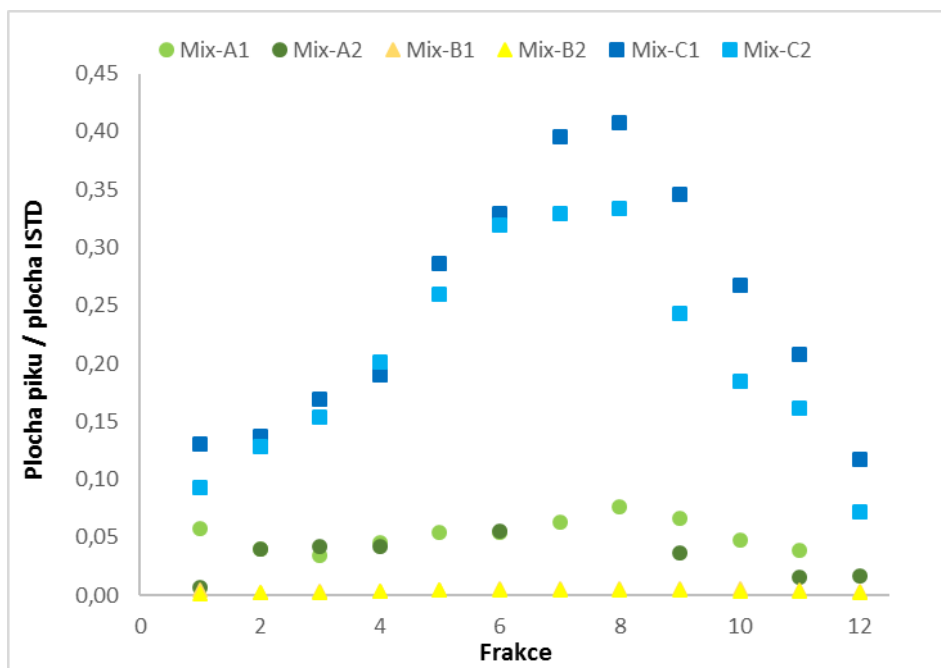
Obr. 20: Rozdělení dodavatelů sušených semen pelyňku pravého do skupin podle klíčových skupin analytů na základě naměřených dat a jejich RDA analýz. Chybové úsečky vyznačují $\pm 2 \times$ směrodatnou odchylku.

Klíčové látky pro rozdělení dodavatelů do skupin byly: $\alpha + \beta$ -thujon, UNP3 + UNP0+UNP8, cymen + UN0 + UNP5 + UNP12, karvon + thujen + eukalyptol + terpinen + myrtenyl-acetát + UNP1 + eugenol + limonen + myrcen + phellandren + UNP9 + UNP6 + UNP10 + UNP7. Dodavatelé byly rozděleni následovně: PA – 5,8; PB – 12, 14; PC – 11; PD – 9; PE - 2. Na základě naměřených dat a provedených analýz je možné konstatovat, že u skupiny dodavatelů PA byl dominantními látkami myrcen a UN, u skupiny PB 4-cymen a UN0, u skupiny PC UNP0, u skupiny PD β -thujon a u skupiny PE UNP1.

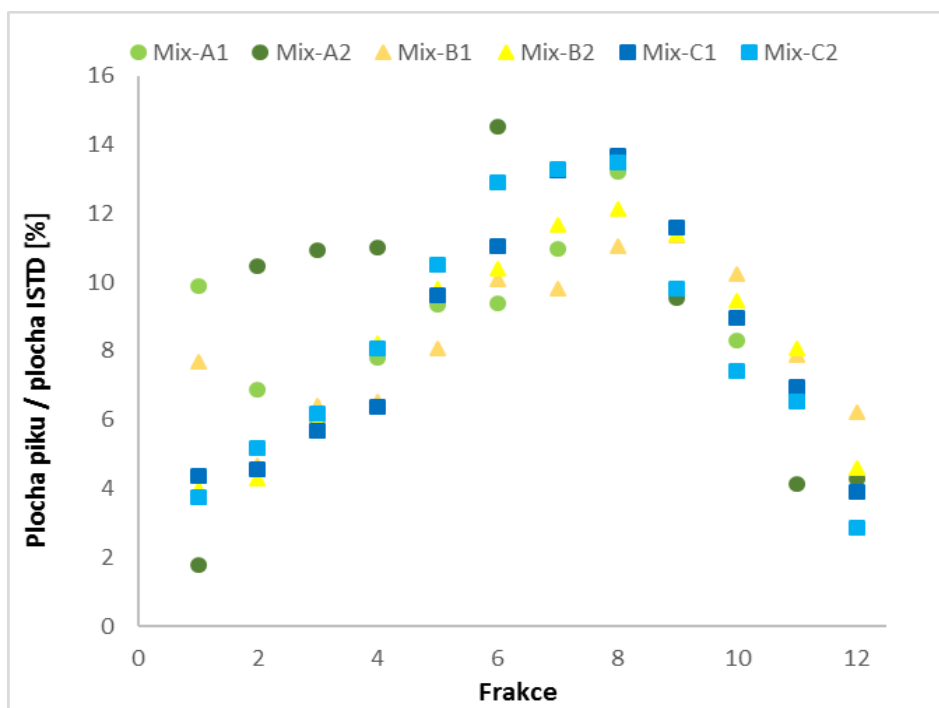
3.6 Průtahová destilace

3.6.1 Frakce

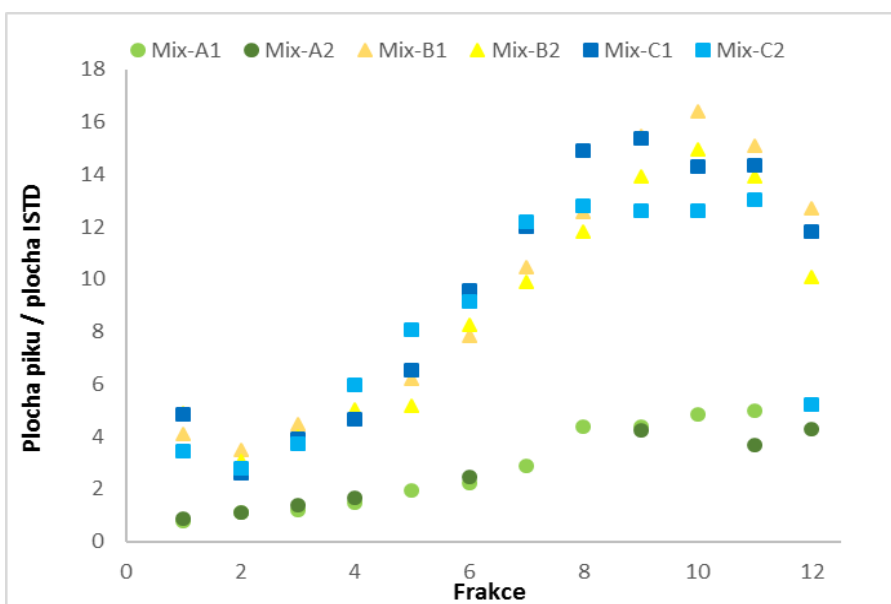
Výsledky měření obsahu β -thujonu a *t*-anetholu v jednotlivých frakcích destilátů připravených v laboratoři (Mix A, Mix B) a v průmyslovém měřítku (Mix C) jsou zobrazeny na Obr. 21 – 24.



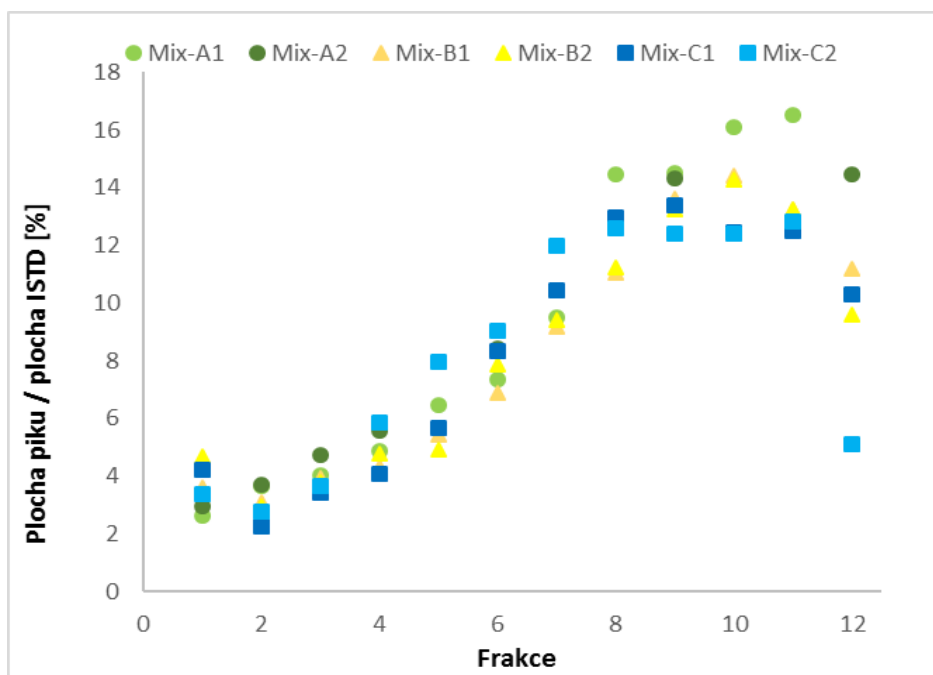
Obr. 21: Průběh absolutního množství β -thujonu v jednotlivých frakcích v průběhu destilace pro 3 různé sady bylin (A, B, C). Pro každou sadu bylin byla destilace provedena dvakrát (1, 2).



Obr. 22: Průběh relativního zastoupení β -thujonu v jednotlivých frakcích v průběhu destilace pro 3 různé sady bylin (A, B, C). Pro každou sadu bylin byla destilace provedena dvakrát (1, 2).



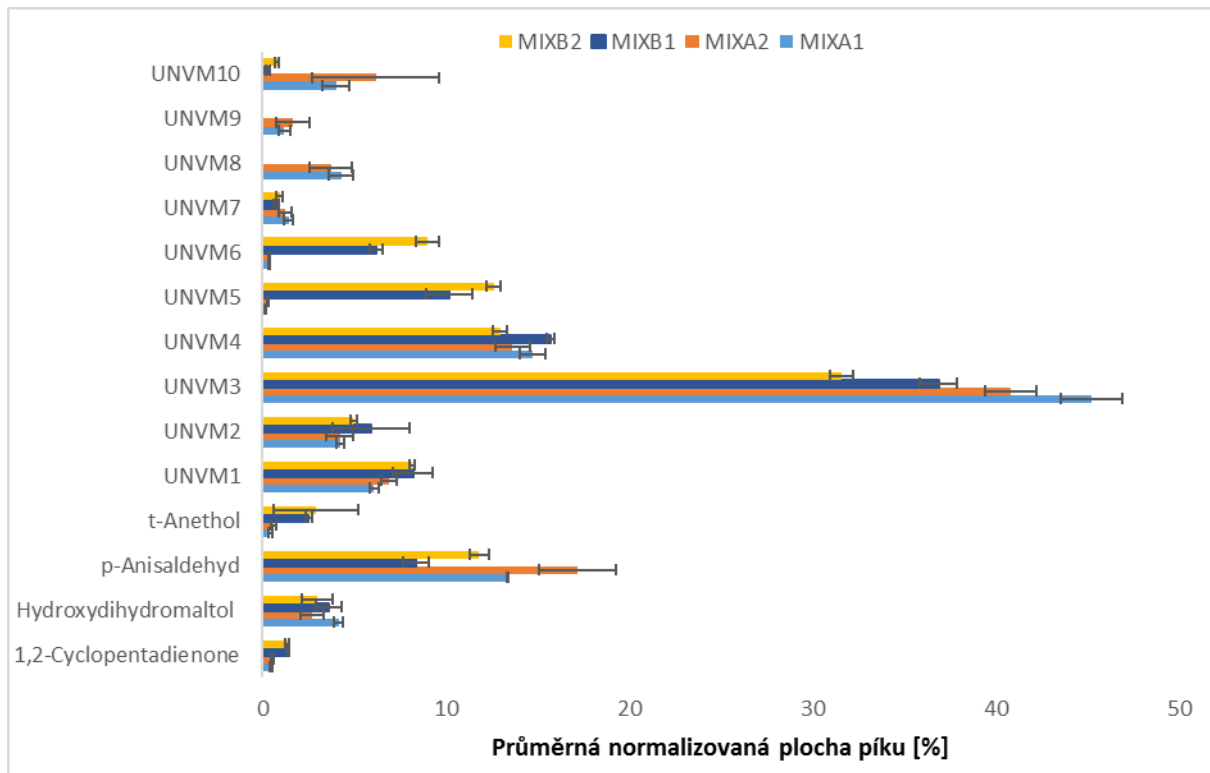
Obr. 23: Průběh absolutního množství *t*-anetholu v jednotlivých frakcích v průběhu destilace pro 3 různé sady bylin (A, B, C). Pro každou sadu bylin byla destilace provedena dvakrát (1, 2).



Obr. 24: Průběh relativního množství *t*-anetholu v jednotlivých frakcích v průběhu destilace pro 3 různé sady bylin (A, B, C). Pro každou sadu bylin byla destilace provedena dvakrát (1, 2).

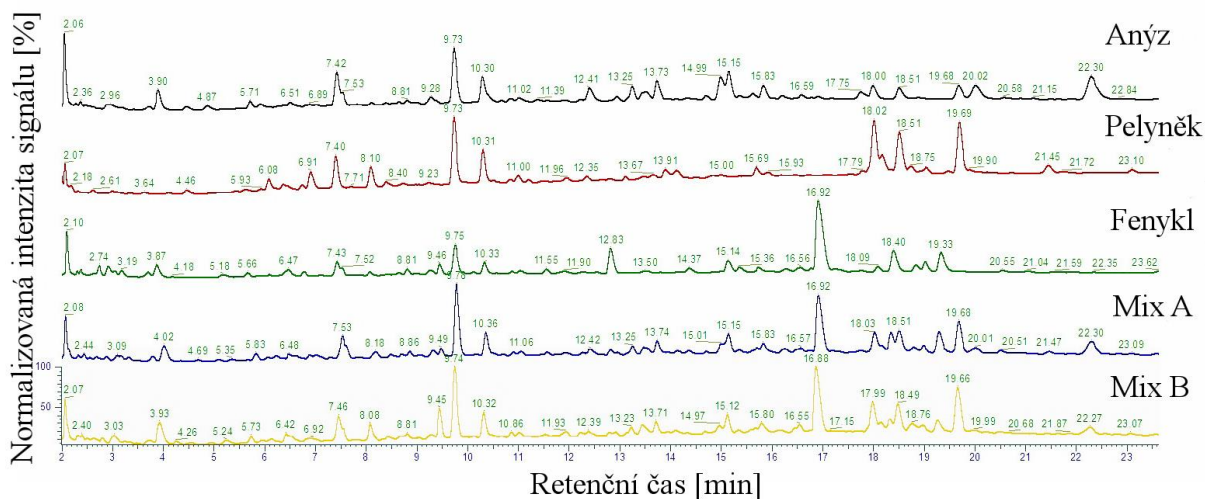
3.6.2 Destilační zbytek

Výsledky analýzy destilačních zbytků pomocí plynového chromatografu a metody CHM-kval jsou zaznamenány na Obr. 25.



Obr. 25: Srovnání průměrných normalizovaných ploch píků analytů v destilačních zbytcích pro 2 sady bylin. Chybové úsečky vyznačují \pm dvojnásobek výběrové směrodatné odchylky.

Ilustrační grafické záznamy chromatogramů získaných analýzou jedno druhových i směsných destilačních zbytků pomocí kapalinového chromatografu a metody popsané v 2.4.2 jsou zaznamenány na Obr. 26.



Obr. 26: Chromatogramy získané měřením destilačního zbytku anýzu, fenyklu, pelyňku a dvou jejich směsí pomocí HPLC-DAD.

Průměrné hodnoty sušiny stanovené po pětidenní lyofilizaci jsou uvedeny v Tab. XV.

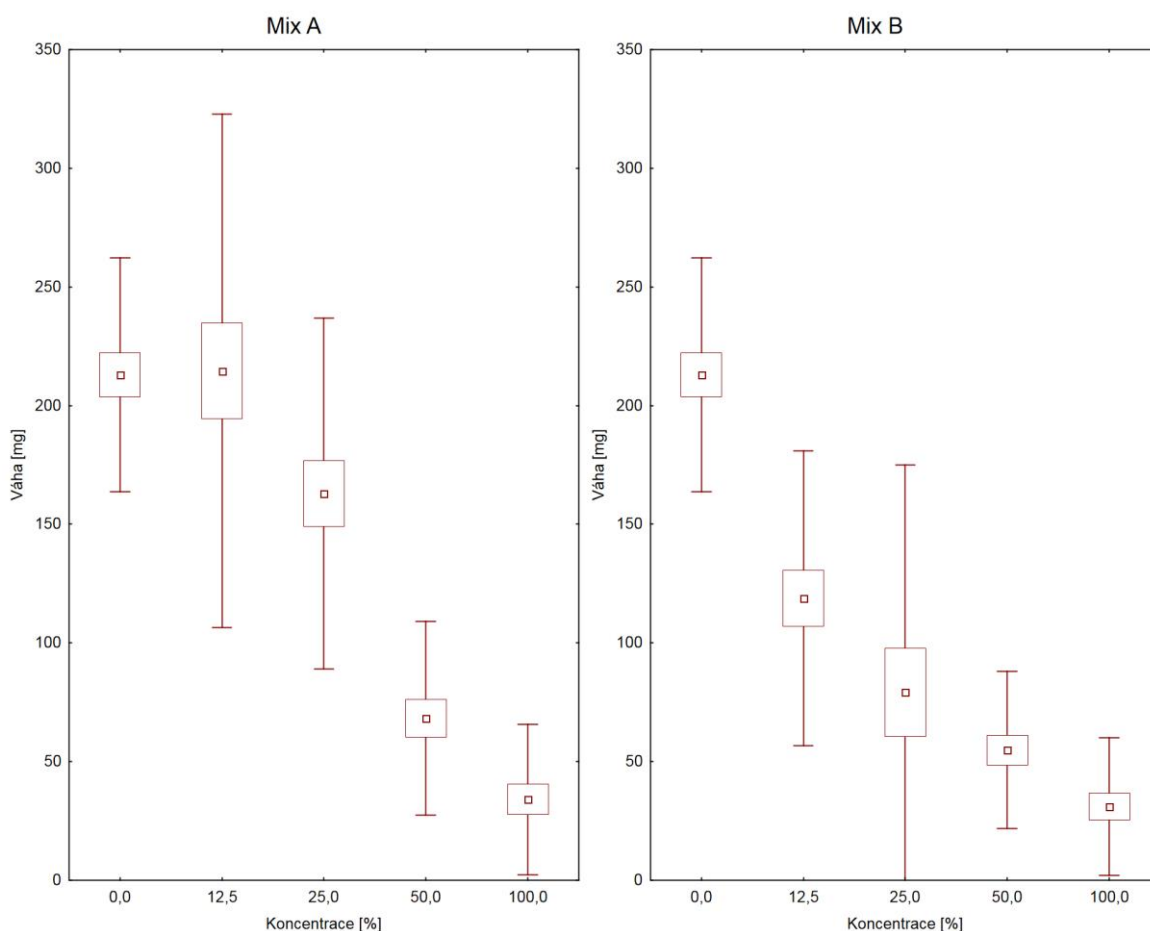
Tab. XV: Výsledky stanovení sušiny v destilačních zbytcích stanovené pomocí lyofilizace.

| | Sušina [mg/g] | RSD [%] |
|--------|---------------|---------|
| Mix-A1 | 72,2 | 1,8 |
| Mix-A2 | 64,3 | 0,7 |
| Mix-B1 | 68,1 | 1,1 |
| Mix-B2 | 70,2 | 0,4 |

3.7 Testy pesticidního potenciálu

3.7.1 Test ovlivnění vývoje

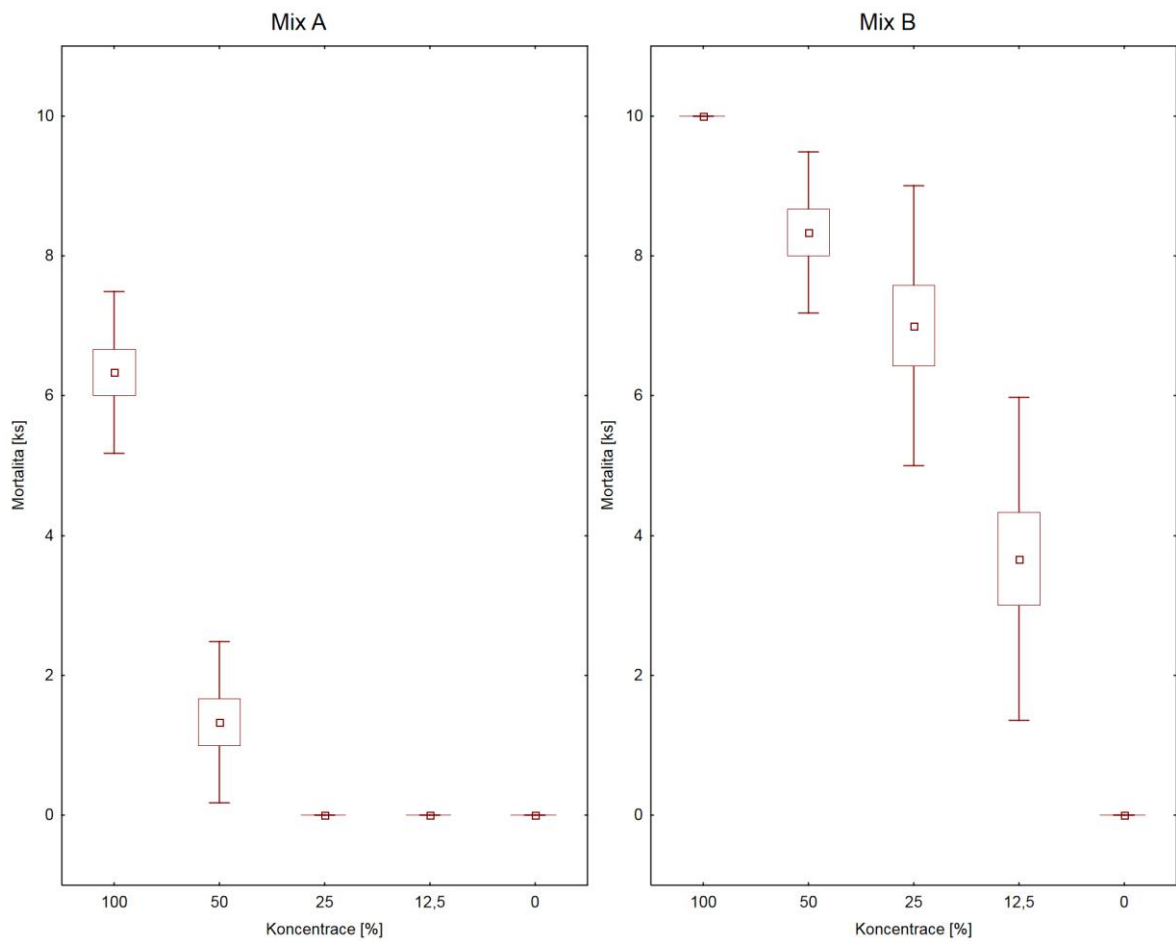
Čtrnáctidenní test ovlivnění vývoje housenek *Spodoptera littoralis* krmených stravou obohacenou o zbytky po destilaci v různých koncentracích přines významné rozdíly v hmotnosti housenek – Mix A ($F= 169,49$; $p<0,0001$; $df= 1;4$), Mix B ($F= 173,05$; $p<0,0001$; $df= 1;4$). S výjimkou koncentrace 12,5 % u Mix A byla na všech koncentračních úrovních u obou mixů váha housenek významně nižší oproti kontrole a stejně tak i mezi různými koncentračními úrovněmi. Výsledky pokusu jsou graficky shrnuty na Obr. 27.



Obr. 27: Hmotnost housenek po 14 dnech konzumace stravy obohacené o roztok destilačního zbytku dané koncentrace. Bod udává průměrnou hodnotu, box 95% konfidenční interval a chybové úsečky dvojnásobek směrodatné odchylky.

Test akutní toxicity prokázal významné rozdíly v mortalitě housenek v závislosti na koncentraci destilačního zbytku – Mix A ($F=169,50$; $p<0,0001$; $df=1;4$), Mix B ($F=89,56$; $p<0,0001$; $df=1;4$). K významnému nárůstu mortality v porovnání s kontrolou došlo u 50 a 100 % koncentrace Mixu A. Dále mortalita u 100 % koncentrace byla průkazně vyšší než u koncentrace 50 %. Mortalita u Mixu B pak byl průkazně vyšší oproti kontrole na všech koncentračních úrovních. Průkazné rozdíly mezi koncentračními úrovněmi nebyly zaznamenány pouze mezi koncentracemi 25 a 50 % a také 50 a 100 %. Rozdíl mezi koncentrací 25 a 100 % byl průkazný. Výsledky pokusu jsou graficky shrnuty na Obr. 28.

Na základě naměřených dat bylo možné vypočítat hodnotu LC_{50} pro oba mixy: $LC_{50MixA} = 75,5 \pm 8,8 \%$ ($CI_{95} = 62,3-97,8 \%$); $LC_{50MixB} = 16,9 \pm 2,7 \%$ ($CI_{95} = 11,6-1,7 \%$).



Obr. 28: Mortalita housenek 24 hodin po aplikaci 1 μ l roztoku destilačního zbytku o dané koncentraci. Bod udává průměrnou hodnotu, box dvojnásobek směrodatné odchylky a chybové úsečky 95% konfidenční interval.

4 DISKUZE

4.1 Validace kalibračních křivek – GC/MS

Validace kalibračních křivek byla provedena v souladu s doporučeními FDA³¹. Navzdory tomu, že pro stanovení terpenů pomocí plynového chromatografu bývá uváděna lineární závislost^{13, 15} a to i přímo pro α -thujon³² (ve spojení s FID detektorem), se na daném GC/MS systému nepodařilo v koncentračním rozsahu 0,1-75 mg/l zaznamenat lineární průběh u žádného z šesti testovaných analytů - α -pinenu, fenchonu, α -thujonu, kafru, mentholu a *t*-anetholu. Otestován byl vliv diethylenglykolu jako protektantu³³, ale jeho přídavek se pozitivně projevil pouze v případě α -pinenu. Rovněž přepočtení dle přidaného vnitřního standardu (ethylbenzen) nevedl k linearizaci kalibračních křivek, viz 3.1.2 Obr. 5. Zároveň se již v minulosti při měření na daném GC/MS systému vyskytly analyty, jež bylo nutné stanovovat pomocí polynomiální kalibrační křivky.³⁴ Kalibrační křivka α -thujonu byla na základě těchto zjištění aproximována v koncentračním rozsahu 0,5 – 75 mg/l pomocí polynomu druhého řádu, viz 3.2.2 Obr. 6. Toto řešení je v souladu s doporučením FDA³¹ a již bylo publikováno v literatuře.²⁸ Vhodnost tohoto řešení byla ověřena statistickou analýzou²⁸, viz 3.2.2. Kalibrační křivka *t*-anetholu byla v koncentračním rozsahu 0,08 – 3 g/l aproximována polynomem 1. stupně, viz 3.2.2 Obr. 7.

Na základě měření směsi α -pinenu, fenchonu, α -thujonu, kafru, mentholu a *t*-anetholu byla stanovena průměrná mez detekce (0,15 mg/l) a mez stanovitelnosti (0,36 mg/l). V literatuře uvedená mez detekce u GC/FID systému pro α -thujon (0,1 mg/l)³² byla v těsné shodě s námi naměřenou hodnotou.

Kritériím pro stanovení linearity uvedeným v literatuře³⁰ bylo v daném koncentračním rozsahu vyhověno u obou analytů. Kritériím pro stanovení správnosti a přesnosti uvedeným v literatuře²⁹ bylo vyhověno u α -thujonu v rozsahu 2 - 75 mg/l. U *t*-anetholu byla hodnota správnosti přijatelná v rozsahu 0,08 – 3 g/l, ale přesnost pouze u koncentrací 0,02 a 0,08 g/l. Vysvětlením této skutečnosti může být příliš vysoká koncentrace analytu, kdy ke snížení signálu MS detektoru bylo nutné snížit emisní proud (z 50 mA na 5 mA). S ohledem na velký rozsah koncentrací, které bylo zapotřebí stanovit v jedné analýze (α -thujon 2 – 75 mg, *t*-anethol 80 – 3000 mg/l) byla kalibrační křivka *t*-anetholu v rozsahu 0,08 – 3 g/l považována za vyhovující.

4.2 Volba extrakčního činidla

Z testovaných extrakčních činidel se jako nejlepší volba z hlediska počtu i množství extrahovaných látek pro analýzu na plynovém chromatografu ukázal 96% ethanol, viz 3.3 Obr. 8. Vzhledem k tomu, že jednotlivé terpeny se mohou značně odlišovat polaritou svých funkčních skupin³⁵, se volba středně polárního rozpouštědla jeví optimální (výhodná). Další výhodou tohoto extrakčního činidla je, že extrakty mohou být bez převádění měřeny na GC i HPLC systémech.

4.3 Obsah terpenických látek

4.3.1 Bedrník anýz

V zakoupených anýzových esenciálních olejích bylo nalezeno a identifikováno celkem 9 látek. Dominantní látkou byl ve všech třech vzorcích *t*-anethol s více než 80% zastoupením, což je pro anýz typické, stejně jako kvantitativní a kvalitativní variabilita v zastoupení minoritních složek.^{4, 6, 14, 36} Celkově je možné konstatovat, že EO od všech tří výrobců si byly vzájemně podobné z kvalitativního i kvantitativního hlediska.

Ve vzorcích sušených semen anýzu bylo nalezeno a identifikováno celkem 6 látek. Dominantní látkou byl *t*-anethol s výjimkou dodavatele č. 6, kde byl dominantní složkou extraktu thymol, který se běžně vyskytuje jako dominantní složka EO u tymiánu obecného³⁷. V literatuře se nepodařilo dohledat jinou studii provedenou na bedrníku anýzu, která by popisovala obdobné zastoupení thymolu. Pro vyloučení možnosti kontaminace vzorku během přípravy byla extrakce zopakována a však se stejným výsledkem. Detailní prohlídka semen odhalila, že se ve skutečnosti jedná o semena tymiánu obecného, viz obr 29. Analýza extraktů semen bedrníku anýzu ukázala, že mezi jednotlivými dodavateli jsou statisticky významné rozdíly, a to zejména pokud jde o celkové množství terpenických látek, viz 3.5.1 Obr. 12. Rozdíly ve složení terpenických látek byly rovněž statisticky prokázány (viz 3.5.1 Obr. 13 a 14), ale je otázkou, nakolik by byly významné při praktickém využití.



Obr. 29: Semena bedrníku anýzu (vpravo) ve srovnání se semeny tymiánu obecného (vlevo) na milimetrovém papíře.

4.3.2 Fenykl obecný

V zakoupených fenyklových esenciálních olejích bylo nalezeno a identifikováno 11 látek. U všech tří výrobců byl dominantní složkou esenciálních olejů *t*-anethol, jednalo se tedy o anetholový chemotyp⁸. Celkově je možné konstatovat, že EO od všech tří výrobců si byly vzájemně podobné z kvalitativního i kvantitativního hlediska.

Ve vzorcích sušených semen fenyklu bylo nalezeno 10 látek a 9 identifikováno. Vzorky od dodavatelů č. 2, 3, 6, 8, 9, 10, 11 a 12 náležely k anetholovému chemotypu a vzorky od dodavatelů č. 1, 4, 7, 13 a 14 náležely k estragolovému chemotypu⁸. Analýza extraktů semen fenyklu obecného ukázala, že mezi jednotlivými dodavateli jsou statisticky významné rozdíly v celkovém množství terpenických látek, viz 3.5.2 Obr. 15. Největší rozdíl ve složení terpenických látek byl způsoben příslušností k anetholovému / estragolovému chemotypu, ovšem i v rámci jednoho chemotypu byly rozdíly ve složení statisticky významné (viz 3.5.2 Obr. 16 a 17).

4.3.3 Pelyněk pravý

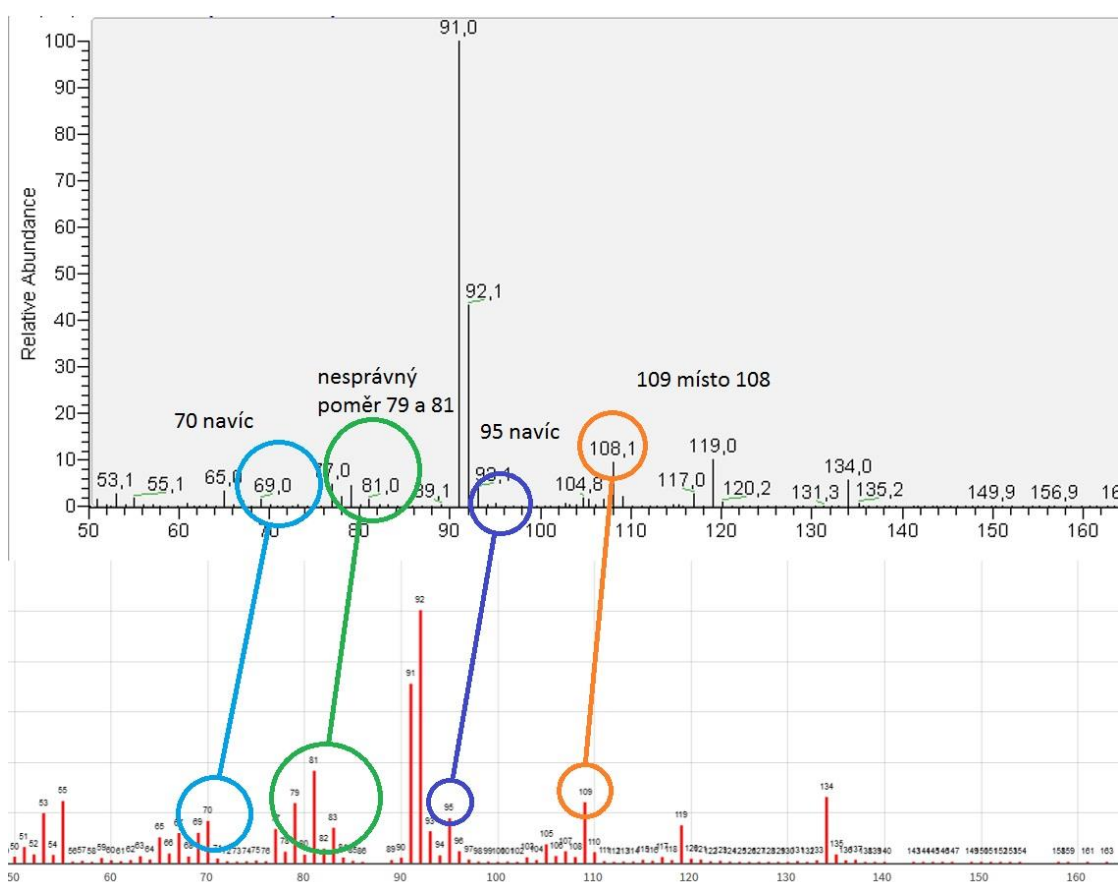
V zakoupených pelyňkových esenciálních olejích bylo nalezeno 32 látek a identifikováno jich bylo 28.

Vzorek od výrobce P1 měl dominantní podíl β -thujonu následovaného sabinyl-acetátem. Tento chemotyp byl v literatuře popsán opakovaně.^{10, 38, 12, 39, 40} Během identifikace látek byly objeveny nesrovnalosti mezi námi naměřeným rozpadovým spektrem sabinyl-acetátu a spektrem uváděným v online databázi NIST.⁴¹ Rozdílné byly jak poměry některých hmot (79 x 81 m/z), tak i reportované hmotnostní píky (70, 95, 109 m/z). Největší nesrovnalosti jsou znázorněny na Obr. 30.

Vzorek od výrobce P2 neobsahoval žádný thujon a dominantními látkami spektra byly karvon, linalool, eukalyptol, cymen, 2-thujen a neidentifikovaná látka UN0. Podobný profil nebyl publikován v žádném z nalezených článků.^{10, 11, 12, 16, 38, 39, 40, 42}

Vzorek od výrobce P3 měl dominantní podíl bornyl-acetátu a málo obvyklý poměr α a β -thujonu (přibližně 7 % : 1 %). Více než 20% zastoupení bornyl-acetátu bylo publikováno v kořenech pelyňku pravého⁴³ a semenech⁴⁴. Vyšší podíl zastoupení α -thujonu oproti β -thujonu (15,08 % : 0,34 %) byl již také publikován.¹¹

Rozdíly ve složení mezi výrobci P1, P2 a P3 byly značné a odrážejí vysokou variabilitu ve složení terpenických látek pelyňku pravého.¹⁰



Obr. 30: Srovnání námi naměřeného (nahore) hmotnostního spektra sabinylního acetátu a hmotnostního spektra uvedeného v databázi NIST⁴¹ naměřená pomocí plynového chromatografu s elektronovou ionizací.

Ve vzorcích sušené nati pelyňku pravého bylo nalezeno 24 látek a 12 z nich bylo identifikováno. Na základě analýzy naměřených dat, bylo 7 dodavatelů rozděleno do 5 skupiny podle složení terpenických látek. Ve skupině PA byl dominantní látkou myrcen

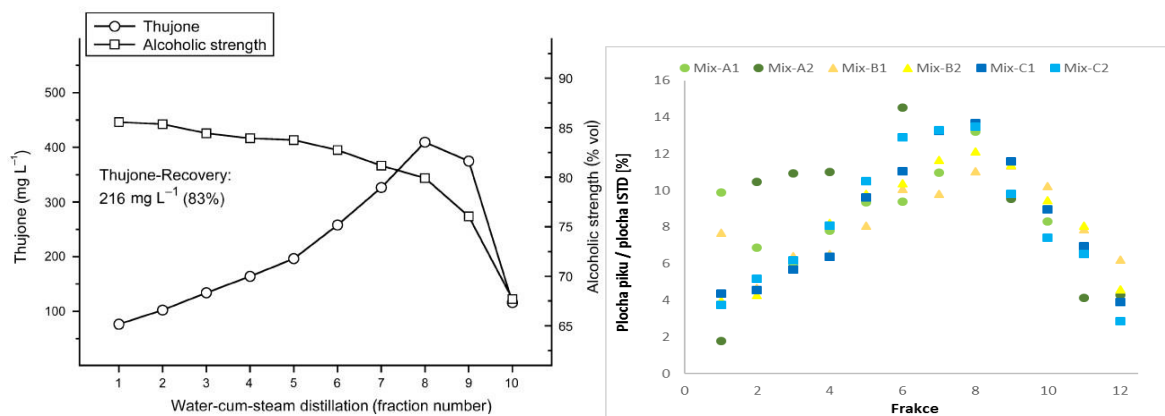
následovaný neznámou látkou UN0. Ve skupině PB byl dominantní látkou 4-cymen a opět neznámá látka UN0. U skupiny PC byly dominantní neznámé látky UNP0 a UNP8. Skupina PD byla charakterizována vysokým obsahem β -thujonu. Ve skupině E byla dominantní neznámá látka UNP1. Analýzy tak potvrdily, že u pelyňku pravého existuje velmi vysoká variabilita v množství a složení terpenických látek. Tato variabilita je způsobena velkým počtem odlišných chemotypů a dále může být prohlubována způsobem pěstování, sběru a uskladnění¹⁰. Pro praktické využití je tak nezbytné věnovat velkou pozornost výběru konkrétního rostlinného materiálu či extraktů.

4.4 Obsah *t*-anetholu a β -thujonu ve frakcích

Analýza jednotlivých frakcí u laboratorně i průmyslově připraveného absintu potvrdila, že absolutní množství *t*-anetholu i β -thujonu závisí na volbě konkrétního rostlinného materiálu a jeho množství, které bohužel u průmyslových vzorků nebylo známé (výrobní tajemství), viz 3.6.1 Obr. 21 a 23. Naopak shoda napříč všemi vzorky byla u relativních zastoupení velmi dobrá 3.6.1 Obr. 22 a 24. Odlišný průběh zastoupení β -thujonu a *t*-anetholu by mohl mít příčiny v absolutních množstvích obou látek, a bodech varu (β -thujonu – 201 °C a *t*-anethol 234 °C).

Obsah *t*-anetholu v průběhu ethanolové destilace dosud nebyl publikován, a tak není možné naše data porovnat s jinými. Námi naměřená data mohou najít uplatnění v praxi při výrobě absintu.

Obsahem thujonu v průběhu destilace, se věnuje článek: *Behaviour of thujone during distillation and possible concentration ranges in pre-ban absinthe* od autorů Dirka W Lachenmeiera and Thomase Kuballa. Nejlépe porovnatelná s našimi pokusy byla destilace směsi 60% ethanolu a čistého α -thujonu⁴⁵. Porovnání grafických výsledků tohoto pokusu spolu našimi výsledky je zaznamenáno na Obr. 31. Ze srovnání je patrné, že u našich výsledků, bylo maximální koncentrace dosaženo v 6/12 – 8/12 na rozdíl od Lachenmeier, Kuballa 2007, kde bylo dosaženo maximální koncentrace v 8/10 a 9/10.⁴⁵ Domníváme se, že rozdíl může být způsoben přítomností dalších těkavých látek ve směsi. Toto zjištění může mít velký význam při praktickém řízení odběru frakcí během výroby absintu. U *t*-anetholu nebylo v koncentračním rozsahu 0,02 a 0,08 g/l vyhověno kritériu přesnosti, proto není možné metodu doporučit k přesnému stanovení obsahu *t*-anetholu.



Obr. 31: Obsah thujonu v průběhu destilace provedené Lachenmeierem a Kuballou 2007⁴⁵ (vlevo) a námi (vpravo).

4.5 Destilační zbytky

Analýzy provedené na destilačních zbytcích pomocí plynové i kapalinové chromatografie ukázaly na přítomnost mnoha látek, viz 3.6.2 Obr. 25 a 26. Identifikaci byla zaměřena zejména na potenciálně bioaktivní látky zmiňované v literatuře při extrakcích polárními činidly např.: laktony¹², lignany¹², flavonoidy^{12, 46}, fenoly⁴⁶, antokiany⁴⁶, glukosidy^{46, 47}, etc. Bohužel se však žádné z vytipovaných látek nepodařilo spolehlivě identifikovat.

Pesticidní efekt pro housenky *Spodoptera littoralis* se podařilo prokázat u obou testovaných destilačních zbytků. Prokázán byl jak přímý letální účinek při aplikaci na pokožku housenky ($LC_{50\text{MixA}} = 75,5 \pm 8,8 \%$, $LC_{50\text{MixB}} = 16,9 \pm 2,7 \%$), tak i snížení hmotnosti housenek při konzumaci stravy obohacené o destilační zbytky již od 25% koncentrace u Mixu A a 12,5% koncentrace u Mixu B. Dosažené hodnoty pesticidních efektů jsou obtížně porovnatelné s výsledky běžně uváděnými v literatuře, neboť se jedná o velmi specifický způsob přípravy extraktu a zároveň se nepodařilo identifikovat jejich složení.

Vzhledem k dosaženým výsledkům by bylo vhodné v práci pokračovat, a to podrobnou analýzou složení destilačních zbytků, separací destilačních zbytků do různých frakcí a otestování jejich pesticidního potenciálu.

5 ZÁVĚR

V teoretické části práce byly shrnuty poznatky týkající se bedrníku anýzu, fenyklu obecného a pelyňku pravého ve vztahu k výrobě absintu a pesticidnímu potenciálu odpadu z jeho výroby.

Prvním krokem v praktické části byla optimalizace GC metod a naměření retenčních časů a fragmentačních spekter dostupných standardů terpenů. Průběh kalibračních křivek byl otestován pro šest vybraných terpenů. Bylo zjištěno, že ve zvoleném koncentračním rozsahu vykazují kalibrace nelineární průběh, který je nesterjnoměrně ovlivněn pořadím, ve kterém byly vzorky měřeny. Vliv přídavku protektantu (diethylenglykolu) byl zjevný pouze v případě α -pinenu. Validace analytické metody pro stanovení α a β -thujonu byla úspěšná v koncentračním rozsahu 2 – 75 mg/l. Metodu je tak možné využít pro stanovení maximálního povoleného obsahu α a β -thujonu, které je na území EU 35 mg/kg. Validace analytické metody pro stanovení obsahu *t*-anetholu nebyla v koncentračním rozsahu 0,08 - 3 g/l úspěšná, neboť nesplňovala kritérium přesnosti. Tuto metodu tak nelze doporučit ke stanovení přesného obsahu *t*-anetholu.

Z trojice testovaných extrakčních činidel (hexan, MTBE, ethanol) vykazoval nejlepší vlastnosti pro analýzu látek na plynovém chromatografu 96% ethanol.

Z testování obsahu těkavých látek u zakoupených esenciálních olejů a sušeného rostlinného materiálu vyplynulo, že vzorky bedrníku anýzu vykazovaly nejnižší variabilitu ve složení a však stále ještě statisticky významnou. Vzorky fenyklu obecného bylo dle obsahu dominantních látek možné rozdělit na dva hlavní chemotypy – estragolový a *t*-anetholový. Ovšem i v rámci jednoho chemotypu existovaly statisticky významné rozdíly. Zdaleka nejvyšší variabilitu vykazovaly vzorky pelyňku obecného, a to jak esenciální oleje, tak sušený rostlinný materiál. Mezi dominantní látky v různých skupinách patřil: myrcen, 4-cymen, β -thujon, karvon, bornyl-acetát, sabinyl-acetát a některé další neznámé látky. U sabinyl-acetátu byly nalezeny nesrovnalosti mezi naměřeným a publikovaným fragmentačním spektrem. Provedené analýzy ukázaly, že pro praktické využití může mít výběr konkrétního rostlinného materiálu velký význam, a to zejména u pelyňku pravého.

Měření obsahu *t*-anetholu a β -thujonu ve frakcích v průběhu destilace ukázalo dobrou shodu mezi laboratorním a průmyslovým měřítkem v relativním zastoupení sledovaných látek, a to navzdory rozdílům v absolutním zastoupení. Díky srovnání laboratorního a

průmyslového měřítka jsou námi naměřená data robustní a mohou tak upravit některé dříve publikované údaje.

Nový potenciální zdroj botanického pesticidu – odpad z výroby absinthu – byl úspěšně otestován na housenkách *Spodoptera littoralis* na VÚRV. Prokázán byl jak přímý letální účinek při aplikaci na pokožku housenky ($LC_{50\text{MixA}} = 75,5 \pm 8,8 \%$, $LC_{50\text{MixB}} = 16,9 \pm 2,7 \%$), tak i snížení hmotnosti housenek při konzumaci stravy obohacené o destilační zbytky, a to již od 25% koncentrace u Mixu A a 12,5% koncentrace u Mixu B.

6 LITERATURA

1. **Janca, J., Zentrich J. A.**, *Herbář léčivých rostlin*, díl I-VII, 1. vydání. Praha: Eminent (1994). ISBN 80-85876-02-7
2. *Encyklopedie přírodní medicíny: zdraví z přírody*. Praha: Česká media Amercom (2000).
3. *Český lékopis 2009* Praha: Grada, 2009.
4. **Tabanca, N. et al.** Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography A* **1117**, 194–205 (2006).
5. **Ullah, H., Honermeier, B.** Fruit yield, essential oil concentration and composition of three anise cultivars (*Pimpinella anisum L.*) in relation to sowing date, sowing rate and locations. *Industrial Crops and Products* **42**, 489–499 (2013).
6. **Ullah, H., Mahmood, A., Honermeier B.**, Essential oil and composition of anise (*Pimpinella anisum L.*) with varying seed rates and row spacing. *Pakistan Journal of Botany.*, **46(5)**, 1859-1864, 2014.
7. **Pavela, R.**, *Rostlinné insekticidy – Hubíme hmyz bez chemie*. Praha: Grada Publishing, (2006). ISBN 978-80-247-6401-6
8. **Barazani, O. et al.** Chemotypic differentiation in indigenous populations of *Foeniculum vulgare var. vulgare* in Israel. *Biochemical Systematics and Ecology* **30**, 721–731 (2002).
9. **Pavela, R., Žabka, M., Bednář, J., Tříška, J., Vrchotová, N.** New knowledge for yield, composition and insecticidal activity of essential oils obtained from the aerial parts or seeds of fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*). *Industrial Crops and Products* **83**, 275–282 (2016).

10. **Nguyen, H. T., Németh, Z. É.** Sources of variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **3**, 143–150 (2016).
11. **Riahi, L. et al.** Effect of environmental conditions on chemical polymorphism and biological activities among *Artemisia absinthium* L. essential oil provenances grown in Tunisia. *Industrial Crops and Products* **66**, 96–102 (2015).
12. **Bach, B. et al.** A new chemical tool for absinthe producers, quantification of α/β -thujone and the bitter components in *Artemisia absinthium*. *Food Chemistry* **213**, 813–817 (2016).
13. **Carro, M. D., Ianni, C., Magi, E.** Determination of Terpenoids in Plant Leaves by GC-MS: Development of the Method and Application to *Ocimum basilicum* and *Nicotiana langsdorffii*. *Analytical Letters* **46**, 630–639 (2013).
14. **Orav, A., Raal, A., Arak, E.** Essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. fruits from various European countries. *Natural Product Research* **22**, 227–232 (2008).
15. **Musharraf, S. G., Uddin, J., Siddiqui, A. J., Akram, M. I.** Quantification of aroma constituents of mango sap from different Pakistan mango cultivars using gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry* **196**, 1355–1360 (2016).
16. **Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Kolodziejczyk, P. P.** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* **69**, 1732–1738 (2008).
17. **Seiber, J. N., Coats, J., Duke, S. O. & Gross, A. D.** Pest management with biopesticides. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering* **5**, 295 (2018).
18. **Stoate, C. et al.** Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management* **63**, 337–365 (2001).

- 19. Roman, P.** History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects – a review. *Plant Protection Science* **52**, 229–241 (2016).
- 20. Al-Bayati, F. A.** Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **116**, 403–406 (2008).
- 21. Tepe, A. S., Tepe, B.** Traditional use, biological activity potential and toxicity of *Pimpinella species*. *Industrial Crops and Products* **69**, 153–166 (2015).
- 22. Dua A., Garg, G., Mahajan R.,** Polyphenols, flavonoids and antimicrobial properties of methanolic extract of fennel (*Foeniculum vulgare Miller*). *Journal of Experimental Biology*, , 3(4), 203-208 (2013).
- 23. Ali, S. I., Gopalakrishnan, B., Venkatesalu, V.** Chicory (*Cichorium intybus*) and wormwood (*Artemisia absinthium*) extracts exhibit strong larvicidal activity against mosquito vectors of malaria, dengue fever, and filariasis. *Parasitology International* **67**, 781–786 (2018).
- 24. Lachenmeier, D. W.** Assessing the authenticity of absinthe using sensory evaluation and HPTLC analysis of the bitter principle absinthin. *Food Research International* **40**, 167–175 (2007).
- 25. Lachenmeier, D. W., Walch, S. G., Padosch, S. A., Kröner, L. U.** Absinthe—A Review. *Food Science and Nutrition* **46**, 365–377 (2006).
- 26. Lachenmeier, D. W. et al.** Chemical Composition of Vintage Preban Absinthe with Special Reference to Thujone, Fenchone, Pinocamphone, Methanol, Copper, and Antimony Concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 3073–3081 (2008).
- 27. Lachenmeier, D. W., Emmert, J., Kuballa, T. & Sartor, G.** Thujone—Cause of absinthism? *Forensic Science International* **158**, 1–8 (2006).

- 28. Carrieri, M. et al.** Quantitative determination of the 1,3-butadiene urinary metabolite 1,2-dihydroxybutyl mercapturic acid by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry using polynomial calibration curves. *Journal of Chromatography B* **877**, 1388–1393 (2009).
- 29. Communities, Association of Analytical.** Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Appendix F, p. 9. [Online] 2012. [cit. 2019-11-26]
- 30. Massart, D. L.** *Handbook of chemometrics and qualimetrics*. New York: Elsevier (1998). ISBN 0444828532
- 31. U.S. Department of Health and Human Services,** Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology (1996).
- 32. Emmert J., Sartor G., Sporer F., Gummersbach J.** Determination of α -/ β -Thujone and Related Terpenes in Absinthe using Solid Phase Extraction and Gas Chromatography *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **19**, 352–356 (2004).
- 33. Anastassiades, M., Maštovská, K., Lehotay, S. J.** Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* **1015**, 163–184 (2003).
- 34. Bednář, J.** Optimalizace GC/MS metody stanovení silyl derivátů lignanů. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, bakalářská práce. Vedoucí práce Prof. Ing. Jan Tříška, CSc. (2016)
- 35. Jiang, Z., Kempinski, C., Chappell, J.** Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology* **1**, 345–358 (2016).
- 36. Ullah, H., Honermeier, B.** Fruit yield, essential oil concentration and composition of three anise cultivars (*Pimpinella anisum L.*) in relation to sowing date, sowing rate and locations. *Industrial Crops and Products* **42**, 489–499 (2013).

- 37. Senatore, F.** Influence of Harvesting Time on Yield and Composition of the Essential Oil of a Thyme (*Thymus pulegioides* L.) Growing Wild in Campania (Southern Italy). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1327–1332 (1996).
- 38. Orav A., Raal A., Arak E., Muurisep M., Kailas T.** Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry* **55**, 155-165 (2006).
- 39. Blagojević, P., Radulović, N., Palić, R., Stojanović, G.** Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4780–4789 (2006).
- 40. Riahi, L. et al.** Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. *Industrial Crops and Products* **46**, 290–296 (2013).
- 41. National Institute of Standards and Technology** [online], NIST WebBook Chemie, SRD 69, [cit. 16.5.2019]. Dostupne z: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C3536547&Mask=200>
- 42. Rizvi A. H. S., Lin T., Zeng X.** Chemical composition of essential oil obtained from (*Artemisia absinthium* L.) grown under the climate condition of Skarbu Baltistan of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany.*, **50(2)**, 599-604, 2018.
- 43. Llorens-Molina, J. A. & Vacas, S.** Seasonal variations in essential oil of aerial parts and roots of an *Artemisia absinthium* L. population from a Spanish area with supramediterranean climate (Teruel, Spain). *Journal of Essential Oil Research* **27**, 395–405 (2015).
- 44. Pino, J. A., Rosado, A. & Fuentes, V.** Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research* **9**, 87–89 (1997).

45. Lachenmeier, D. W. & Kuballa, T. Behaviour of thujone during distillation and possible concentration ranges in pre-ban absinthe. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**, 2147–2151 (2007).

46. Farzaneh, V., Gominho, J., Pereira, H., Carvalho, I. S. Screening of the Antioxidant and Enzyme Inhibition Potentials of Portuguese *Pimpinella anisum L.* Seeds by GC-MS. *Food Analytical Methods* **11**, 2645–2656 (2018).

47. Ishikawa, T., Fujimatu, E., Kitajima, J. Water-Soluble Constituents of Anise: New Glucosides of Anethole Glycol and Its Related Compounds. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **50**, 1460–1466 (2002).

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|------------------|---|
| ANOVA | Analysis of variance – Analýza rozptylu |
| CI ₉₅ | 95% interval spolehlivosti |
| CID | Collision-induced dissociation - Kolizně indukovaná disociace |
| D | Detected - Detekováno |
| df | Degrese of freedom - Stupeň volnosti |
| EO | Esenciální olej |
| ETB | Ethylbenzen |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FDA | Food and drug agency |
| FID | Flame ionization detector - Plamenově ionizační detektor |
| GC | Gas chromatography – Plynová chromatografie |
| HPLC | High performace liquid chromatography – Vysoce účinná kapalinová chromatografie |
| CHM-kval | GC chromatografická metoda pro stanovení kvality |
| CHM-kvant | GC chromatografická metoda pro stanovení kvantity |
| ISQ | Ion single quadrupole – Jednoduchý kvadrupól |
| ISTD | Internal standard – Vnitřní standard |
| LC ₅₀ | Lethal concentration – Střední smrtná koncentrace |
| LOD | Limit of detection – Mez detekce |
| LOQ | Limit of quantification – Mez stanovitelnosti |
| MS | Mass spectrometry – Hmotnostní spektrometrie |
| MTBE | Methyl - <i>tert</i> -butylether |
| NA | Not analyzed – Nebylo analyzováno |
| ND | Not determind – Nebylo určeno |
| NR | Not reported - Nebylo uvedeno |
| p | Probability - Pravděpodobnost |
| PCA | Principal Component Analysis - Analýza hlavních komponent |
| R ² | Coefficient of determination – Koeficient determinace |
| RDA | Redundancy analysis – Redundanční analýza |
| SIM | Single ion monitoring – Měření jediného iontu |
| SKR | Směsný kalibrační roztok |

| | |
|------|---|
| SPR | Směsný pracovní roztok |
| ST | Standard |
| TETR | 1-Tetradecen |
| TIC | Total ion chromatogram – Měření všech hmot (celkového iontového proudu) v daném rozsahu |
| UN | Unknown – neznámá látka |
| UV | Ultra violet – Ultrafialové záření |
| VÚRV | Výzkumný ústav rostlinné výroby |