

# Silice čajovníku

Bc. Adéla Prívarová

---

Diplomová práce  
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Prívarová**  
Osobní číslo: **T20138**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Silice čajovníku**

## Zásady pro vypracování

Student rozpracuje tyto okruhy teoretického základu:

1. Popíše biologii čajovníku.
2. Rozebere velkoobjemové izolační techniky pro získání silic.
3. Kriticky zhodnotí chemické složení a fyzikální vlastnosti silice z čajovníku
4. Z dostupných informací popíše použití a biologické vlastnosti.

V praktické části bude student provádět následné úkony:

1. Porovná komerční vzorky čajovníku optickými metodami.
2. Zanalyzuje vzorky pomocí plynové chromatografie s dostupnými detektory.
3. Naměřená data porovná s literárními a objektivně je vyhodnotí.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] Tea Tree: The Genus Melaleuca, (Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles); Ian Southwell, Robert Lowe, ISBN 0-203-34323-9, CRC Press, 1999.  
[2] Tea Tree Oil, Julia Lawless, ISBN 0-7225-3032-3, Thorsons, 1994.  
[3] Tea tree oil: contact allergy and chemical composition, Anton C. de Groot, Erich Schmidt, Contact Dermatitis, 75, 129–143, 2016.  
[4] Chemical Composition and Oil Concentration of Tea Tree Leaf Oil Grown in South Africa During a One-Year Vegetative Cycle, Maria de Figueiredo, J. Essent. Oil Res., 18, 52-53 (Special Edition 2006).

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Ondřej Rudolf, Ph.D.**  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Tato práce se věnuje silicím čajovníkového oleje. Stěžejní část teoretické části popisuje biologické účinky a chemické složení čajovníkového oleje s důrazem na primární aktivní sloučeninu terpinen-4-ol. S ohledem na chemické složení byla zmíněná také norma ISO 4730, která určuje koncentrační limity čajovníkových silic. Dále se práce věnuje falšování tea tree oleje a možným autentifikačním metodám. Závěrem jsou popsány konvenční a moderní izolační metody a s tím související studie, které pojednávají o složení čajovníkového oleje.

V praktické části je popsána a vyhodnocená analýza pro kvalitativní a kvantitativní evaluaci komerčních vzorků čajovníkového oleje. Jako primární identifikační metody byly zvoleny plynová chromatografie s FID detektorem a kombinovaná plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Z analýzy vyplývá, že většinové zastoupení v oleji tvoří složky terpinen-4-ol (24,3–48,6 %),  $\gamma$ -terpinen (12,5–27,4 %) a  $\alpha$ -terpinen (7,4–13,5 %). Hmotnostní spektrometrie umožnila především identifikaci složek, které nebylo možné určit plynovou chromatografií, jako  $\alpha$ -thujen, viridifloren nebo aromadendren. Naměřené hodnoty byly srovnány mezi sebou, s literárními zdroji a ISO 4730 normou.

Jako doprovodné metody slouží refraktometrická metoda pro stanovení indexu lomu a stanovení maximální absorbance pomocí UV-VIS spektrometrie.

Klíčová slova: čajovníkový olej, esenciální olej, silice čajovníku, *Melaleuca alternifolia*, terpinen-4-ol, parní destilace, extrakce, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, index lomu, absorbance, ISO 4730

## ABSTRACT

This diploma thesis deals with tea tree essential oil. The main part of theoretical part describes its biological activities and chemical composition with the emphasis on primary active compound terpinene-4-ol. With regard to the chemical composition, the ISO 4730 standard, which determines the concentration limits of tea tree essential oils, was also mentioned. The work also deals with the adulteration and possible authentication methods. Finally, conventional and modern isolation methods and related studies are described, which also discuss the composition of tea tree oil.

The practical part describes and evaluates the analysis for qualitative and quantitative evaluation of commercial tea tree oil samples. Gas chromatography with FID detector

and combined gas chromatography with a mass detector were chosen as the primary identification methods. The analysis shows that the majority of the oil consists of terpinene-4-ol (24,3–48,6 %),  $\gamma$ -terpinene (12,5–27,4 %) a  $\alpha$ -terpinene (7,4–13,5 %). In particular, mass spectrometry made it possible to identify components which could not be determined by gas chromatography, such as  $\alpha$ -thujene, viridiflorene or aromadendrene. The measured values were compared with each other, with literature sources and the ISO 4730 standard. The refractometric method for determining the refractive index and determining the maximum absorbance by UV-VIS spectrometry serves as accompanying methods.

Keywords: tea tree oil, essential oil, terpinene-4-ol, *Melaleuca alternifolia*, steam distillation, extraction, gas chromatography, mass spectrometry, refractive index, absorbance, ISO 4730

Ráda bych tímto poděkovala především vedoucímu své diplomové práce panu Ing. Ondřeji Rudolfovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a nedocenitelné rady v průběhu měření dat i psaní práce. Dále patří mé díky doc. Mgr. Robertu Víchovu, Ph.D. z Ústavu chemie FT UTB ve Zlíně za vstřícný přístup při laboratorním měření.

Velké díky chci vyjádřit své rodině a příteli, kteří mi byli po celou dobu tou největší oporou.

„Člověk přišel na tento svět proto, aby tady byl, pracoval a žil. Jen moudrý se snaží náš svět postrčit dál, posunout výš. A jen hlupák mu v tom brání.“

- Jan Werich

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI A VYUŽITÍ ČAJOVNÍKOVÉHO OLEJE</b> .....	<b>13</b>
1.1    BIOLOGICKÁ AKTIVITA .....	15
1.1.1    Antimikrobní účinky .....	16
1.1.2    Antivirové účinky .....	17
1.1.3    Protizánětlivé účinky .....	17
<b>2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI SILIC ČAJOVNÍKU</b> .....	<b>18</b>
<b>3 FALŠOVÁNÍ OLEJE ČAJOVNÍKU</b> .....	<b>22</b>
<b>4 IZOLAČNÍ TECHNIKY PRO ZÍSKÁNÍ SILIC</b> .....	<b>25</b>
4.1    KONVENČNÍ METODY IZOLACE .....	25
4.1.1    Lisování za studena .....	26
4.1.2    Destilace .....	27
4.1.3    Extrakce rozpouštědlem .....	29
4.2    MODERNÍ METODY IZOLACE .....	32
4.2.1    Superkritická extrakce oxidem uhličitým .....	33
4.2.2    Tlaková extrakce horkou vodou .....	33
4.2.3    Ultrazvuková extrakce .....	34
4.2.4    Mikrovlnná extrakce .....	34
4.3    VELKOOBJEMOVÉ IZOLAČNÍ TECHNIKY .....	35
4.4    VYBRANÉ STUDIE ANALÝZY ČAJOVNÍKOVÉHO OLEJE .....	36
<b>ANALÝZA ÉTERICKÝCH OLEJŮ</b> .....	<b>41</b>
4.5    PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE .....	41
4.6    HMO TNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .....	43
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>45</b>
<b>5 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>46</b>
<b>6 ANALÝZA ČAJOVNÍKOVÉHO OLEJE</b> .....	<b>47</b>
6.1    VZORKY ČAJOVNÍKOVÉHO OLEJE .....	47
6.2    PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE .....	47
6.2.1    Použité přístroje, vybavení a chemikálie .....	48
6.2.2    Metody měření .....	49
6.2.3    Výsledky a diskuze .....	50
6.3    HMO TNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .....	60
6.3.1    Použité přístroje, vybavení a chemikálie .....	60
6.3.2    Metody měření .....	61
6.3.3    Výsledky a diskuze .....	61



6.4	INDEX LOMU.....	67
6.4.1	Použité přístroje, vybavení a chemikálie .....	67
6.4.2	Postup měření.....	68
6.4.3	Výsledky a diskuze .....	69
6.5	ABSORBANCE V UV SPEKTRU .....	70
6.5.1	Použité přístroje, vybavení a chemikálie .....	70
6.5.2	Postup měření.....	71
6.5.3	Výsledky a diskuze .....	71
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>87</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>89</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>91</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>92</b>

## ÚVOD

Tato práce se věnuje vlastnostem, způsobu získávání a využití čajovníkového oleje získaného z rostliny *Melaleuca alternifolia*. K přednostem čajovníkového oleje, které stojí za zmínku ihned v úvodu, patří účinky proti bakteriím, virům i plísním.

Rod *Melaleuca* obsahuje mnoho individuálních druhů, mezi které řadíme také rostlinu *Melaleuca alternifolia*. Zpracováním primárně této rostliny dochází k produkci tea tree oleje neboli čajovníkového oleje. Čajovníkový olej se označuje jako olej z *Melaleuca*, olej typu terpinen-4-ol, právě tento monoterpenoid je jeho majoritní složkou. Kromě terpinen-4-olu jsou dalšími majoritními složkami  $\alpha$ -terpinen,  $\gamma$ -terpinen a  $\alpha$ -terpineol.

S postupným objevem prospěšných vlastností a využití tohoto oleje došlo k expanzi endemické australské rostliny do dalších oblastí, jako jsou Spojené státy americké, Zimbabwe, Nový Zéland, Čína nebo Indie. Samotný generický název tea tree vznikl při výpravě v 18. století po Austrálii pod velením kapitána Jamese Cooka. Účastníci výpravy si všimli, že domorodí lidé užívali listy této rostliny jako alternativu pro čaj, z čehož byl odvozen dnešní název. Čajovníkový olej ale nemá s čajem určeným ke konzumaci žádnou spojitost, jedná se pouze o shodu jmen. Přítomný přírodovědec, sir Joseph Banks, při příležitosti výpravy sesbíral vzorky rostliny a kvůli podobnému překladu místních označení pojmenoval známé rody *Leptospermum*, *Melaleuca*, *Kunzea* a *Baeckea* společným názvem tea tree [1, s. 1] [2, s. 3] [3, s. 1109]. Použití stejného lidového názvu pro taxonomicky odlišné druhy může vést k záměně autentického čajovníkového oleje, a to i přes jejich pozoruhodnou odlišnost co se týče botanických, chemických vlastností a geografického umístění.

Teoretická část práce se zabývá biologickými účinky a využitím čajovníkového oleje. Dále bylo popsáno jeho chemické složení, kde je kladen důraz na rozdílné chemotypy a ISO 4730 normu, která definuje složení čajovníkového oleje pro komerční účely. Pozornost je věnována také falšování tea tree oleje, které s sebou nese neoprávněné klamání zákazníka, a také možná zdravotní rizika v podobě dermatitid a vzniklých alergií. Mezi primární autentifikační metody pro ověření pravosti esenciálního oleje patří plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, a dále stanovení hustoty, indexu lomu a optické stáčivosti. Jako sekundární doplňkové metody slouží organoleptické hodnocení a genetická identifikace.

V závěru teoretické části jsou popsány konvenční izolační metody, jako parní destilace, hydrodestilace a listování. Z důvodu nutné modernizace získávání esenciálních olejů byly

popsány také moderní izolační metody, jako ultrazvuková a mikrovlnná extrakce, které výrazně snižují provozní náklady a dopady na životní prostředí.

Cílem práce je kvalitativní a kvantitativní stanovení silic komerčních vzorků čajovníkového oleje pomocí GC a GC-MS analýzy. Jako doplňkové identifikační metody slouží refraktometrická metoda pro stanovení indexu lomu a stanovení maximální absorbance pomocí UV-VIS spektrometrie. Pro evaluaci byly zakoupeny vzorky čtrnácti výrobců, od firmy Franchise Bewit s. r. o. byl vzorek obdržen darem.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI A VYUŽITÍ ČAJOVNÍKOVÉHO OLEJE

Čajovník úzkolistý, nebo také kajeput střídavolistý, latinsky *Melaleuca alternifolia*, patří do extenzivní botanické rodiny myrtovité [1, s. 12] [2, s. 2]. *M. alternifolia* je vysoký keř, případně nízký strom, typický svou hustou korunou, který dorůstá do výšky 5 až 8 metrů. Na komerčních plantážích je však tato rostlina pěstovaná v podobě nízko rostoucích hustých keřů, tak aby se docílilo co nejhustějšího porostu listů za účelem maximalizované produkce čajovníkového oleje [1, s. 63]. Na obrázku 1 [4, s. 1] je vyobrazen kajeput střídavolistý jako volně rostoucí rostlina, která nápadně připomíná nízký strom s dřevnatým kmenem. Na obrázku 2 [5, s. 1] je znázorněn kajeput střídavolistý pěstovaný na plantážích, kde má již podobu nižšího keře.



Obrázek 1 Volně rostoucí *Melaleuca alternifolia* [4, s. 1]



Obrázek 2 *Melaleuca alternifolia* na plantáži [5, s. 1]

Esenciální olej se získává parní destilací listů a koncových větví *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca linariifolia* a *Melaleuca dissitiflora*, jakožto i dalších druhů *Melaleuca* za předpokladu, že získaný olej splňuje požadavky dané mezinárodní normou ISO 4730:2014, která je popsána níže v kapitole 2 [6, s. 6]. Tato ISO norma byla v roce 2017 nově vydána, nebyl ale umožněn přístup k plné verzi [7, s. 2]. V aktualizované normě se již nenachází *Melaleuca dissitiflora* jako možný zdroj esenciálního oleje, důvody jsou dále uvedeny v kapitole 3.

Prvotní studie biologických vlastností silic čajovníku započaly již ve 20. letech 20. století v Technologickém muzeu aplikovaných věd v Sydney. Penfold a Grant uvedli, že se jedná o netoxické antiseptikum, které nezpůsobuje topické iritace. Ve třicátých letech nadále narůstala popularita oleje, čemuž dopomohla vydaná zpráva o medicínské a dentální aplikaci Ti-trolu z roku 1936. Název Ti-trol označuje ve vodě rozpustnou směs čistého oleje, který byl dále produkován jako antiseptický roztok Melasol vyráběný společností Australian Essential Oils Ltd. [1, s. 169]. V diplomové práci se označuje čajovníkový olej také zkratkou TTO (tea tree oil).

## 1.1 Biologická aktivita

Na biologické aktivitě čajovníkového oleje se podílí zejména majoritní složka terpinen-4-ol, která vykazuje silné antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Jedná se o potentní baktericidní agens, který vykazuje také antifungální účinky [8, s. 2]. Olej má širokospektrální antimikrobiální účinky proti bakteriálním, virovým, plísňovým a protozoálním infekcím postihující kůži a děložní a orální sliznici [9, s. 1223, 1228]. Esenciální olej urychluje proces hojení ran a vykazuje aktivitu proti rakovině kůže. Několik studií navrhlo použití čajovníkového oleje pro léčbu akné vulgaris, seboroické dermatitidy a chronické gingivitidy, neboli zánětu dásní [10, s. 784]. Díky těmto účinkům se v monografii Evropské lékové agentury olej popisuje jako vhodná léčba malých povrchových ran a kousnutí hmyzem, malých vředů (furunkly a mírné akné), svědění a podráždění a mírnějších zánětů sliznice dutiny ústní. TTO se podává v mnoha formulacích včetně čistého oleje, mastí a roztoků. Je také součástí čisticích prostředků, detergentů a aviváží. Kromě bohatého kosmetického využití se čajovníkový olej používá také v aromaterapii kožních onemocnění, onemocnění dýchacího ústrojí (astma, bronchitida, sinusitida, tuberkulóza, černý kašel), urogenitálních onemocnění (vaginální kandidóza, cystitida, genitální pruritus), dále také při léčbě infekčních onemocnění [11, s. 129, 130].

Co se týče toxických účinků čajovníkového oleje, může být TTO potenciálně toxický ve vyšších dávkách. Byla pozorována orální otrava u dětí i dospělých, při podpůrné léčbě ale pacienti reagují z pravidla bez zjevných následků. V literatuře nebyla hlášena žádná lidská úmrtí způsobená TTO. Orální LD<sub>50</sub> u krysího modelu pro TTO je 1,9 až 2,6 ml · kg<sup>-1</sup>, při podání 1,9 ml · kg<sup>-1</sup> TTO se dostavily letargické a ataxické projevy [12, s. 59] [13, s. 6]. Při kožní aplikaci na králičím modelu byla stanovena hodnota LD<sub>50</sub> 5,0 ml · kg<sup>-1</sup> [13, s. 6]. Lokální topická aplikace oleje může při vyšších koncentracích způsobit nežádoucí reakce. Paralelně s častým používáním TTO byly hlášeny nežádoucí účinky včetně podráždění kůže, erytému, alergické kontaktní dermatitidy, systémové kontaktní dermatitidy nebo onemocnění lineárním imunoglobulinem A [10, s. 758]. Lineární onemocnění IgA, známé také jako bulózní dermatitida s lineárním imunoglobulinem A, je autoimunitní onemocnění charakterizované subepidermálními bulami s IgA autoprotilátkami namířenými proti několika různým antigenům v zóně bazální membrány. Jeho imunopatologická charakteristika spočívá v přítomnosti kontinuálního lineárního depozita IgA podél zóny bazální membrány, tento jev je jasně viditelný při přímé imunofluorescenci [14, s. 38]. Perrett a spol. studovali vznik tohoto onemocnění jako odpověď na kontaktní dermatitidu

vyvolanou čajovníkovým olejem [15, s. 167]. TTO je označován jako mírný senzibilizátor a jeho senzibilizující účinky může zvýraznit předcházející podráždění kůže nebo oxidace oleje. Olej skladovaný delší dobu v otevřené lahvi podléhá procesu stárnutí, jehož výsledkem je fotooxidace oleje vedoucí ke vzniku degradačních produktů jako jsou peroxidy, epoxidy a endoperoxidy, které jsou silnými senzibilizátory. Expozice na vzduchu vede k trojnásobnému zvýšení senzibilizační účinnosti, k čemuž napomáhá také autooxidace  $\alpha$ -terpinenu na allylové epoxidy a další oxidační produkty [11, s. 818]

### 1.1.1 Antimikrobní účinky

Široká škála esenciálních olejů je známá svými antimikrobiálními účinky v souvislosti s aktivními monoterpenovými konstituenty ve svém složení. TTO je z historického hlediska široce používané topické antiseptikum, které se vyskytuje v kosmetických a farmaceutických přípravcích určených pro zevní použití jako primární antimikrobiální složka, případně jako konzervační komponent. Široké antimikrobiální spektrum působení se připisuje zejména složce terpinen-4-ol. Při examinaci bakterie *Escherichia coli* pomocí elektronové mikroskopie byl pozorován úbytek celulárního elektrodenzního materiálu a koagulace cytoplasmatických konstituentů po expozici TTO. Tyto děje byly pozorovány sekundárně po buněčné smrti bakterie. TTO také stimuluje únik buněčných draselných iontů a inhibuje respiraci *E. coli* v buněčných suspenzích, což poukazuje na letální účinek spojený s poškozením cytoplasmatické membrány mikroorganismů. Letální účinky jsou také výsledkem inhibice metabolických dějů lokalizovaných v membráně a ztráty chemiosmotické kontroly, tedy narušení kaskády oxidoreduktáz. Antibakteriální účinky TTO spočívají ve schopnosti inhibovat buněčné respirační pochody a také ve schopnosti zvyšovat membránovou permeabilitu v bakteriálních buňkách [16, s. 171–172].

Jsou známé hodnoty minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace TTO v souvislosti s *E. coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. MIC a MBC pro *E. coli*, a také *S. aureus*, jsou 0,25 % a 0,5 %. Tyto hodnoty jsou v souvislosti s kvasinkou *C. albicans* dvakrát nižší, 0,125 % a 0,25 %. Hodnoty jsou uvedené v objemovém zlomku (v/v) [16, s. 172].

Terpinen-4-ol je účinnou složkou proti meticilin-rezistentní bakterii *S. aureus* (MSRA) a koagulasa-negativnímu *Staphylococcus epidermidis*. Studie ukázala, že 10% roztok TTO má antibakteriální účinky na *S. aureus* srovnatelné s účinky topického antibiotika mupirocinu. Topický oplach 5% TTO je účinný při odstranění MRSA z kůže a dodatečně



zavedení solubilizátoru do systému vedlo k podstatnému zvýšení bakteriostatické aktivity. Směs 0,5 % TTO, 5 % solubilizátoru polysorbát 80, neboli Tween 90, a 0,3 % syntetického konzervačního prostředku zajišťuje mikrobiologickou stabilitu tělového balzámu v souladu s Americko-Evropským lékopisem AEP. TTO je účinný také proti bakteriím, které se nacházejí v dutině ústní a zapříčiňují vznik zubního povlaku [10, s. 785], [17, str. 55].

### 1.1.2 Antivirové účinky

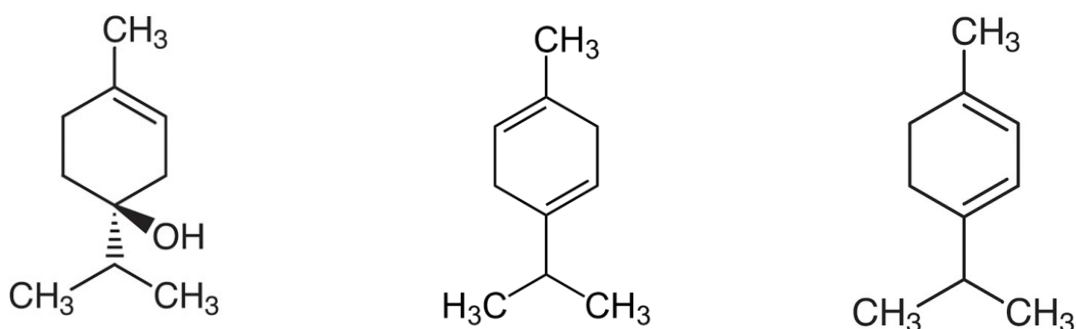
Schnitzler a spol. [18] prokázali silnou virucidní aktivitu TTO proti viru herpes simplex 1 (HSV-1) a HSV-2. V první fázi došlo ke stavení cytotoxicity, která byla hodnocena standardním testem barvení a absorpce neutrálního červeného barviva.  $TC_{50}$  byla stanovena při koncentraci 0,006 %. Antivirová aktivita proti viru HSV-1 a HSV-2 byla testována *in vitro* za použití testu redukce plaku neboli biofilmu. Inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  čajovníkového oleje při tvorbě plaků viru herpes simplex byla 0,00009 % a 0,0008 %. Pro srovnání  $IC_{50}$  eukalyptového oleje byla v tomto případě 0,009 % a 0,008 % pro HSV-1 a HSV-2 v daném pořadí. Je tedy zřejmé, že TTO vykazuje o řád vyšší úroveň virucidní aktivity proti danému viru. Při ošetření viru herpes simplex éterickým olejem došlo k výraznému snížení tvorby plaku, což naznačuje, že TTO ovlivňuje životaschopnost viru před nebo během procesu absorpce do hostitelské buňky, nikoli už však po průniku [18, s. 1]. Randomizovaná placebem kontrolovaná studie navíc prokázala, že TTO může být levnější potenciální variantou pro léčbu recidivující herpes labialis. TTO se prokázal jako účinný činitel při léčbě bradavic na ruce způsobených lidským papilomavirem (HPV) tím, že usnadňuje úplnou reepitelizaci infikovaných oblastí [10, s. 785].

### 1.1.3 Protizánětlivé účinky

Protizánětlivé účinky čajovníkového oleje jsou částečně podloženy skutečností, že přídavek TTO k neutrofilům aktivovaným lipopolysacharidy inhibuje uvolňování superoxidu přibližně o 85 %. Koncentrace přidaného TTO byla 0,05 % [19, s. 620]. Superoxid je velice reaktivní forma kyslíku, která při reakci s radikálem oxidu dusnatého tvoří peroxynitrit. Ten vzniká při rozvoji zánětu a jeho úkolem je likvidace patogenů. Peroxynitrity však způsobují okamžitou smrt všech živých tkání a buněk ve vzdálenosti do 10  $\mu\text{m}$  v řádu milisekund. Poškozují tak DNA, bílkoviny, lipidy, včetně buňky, která peroxynitrit vyprodukovala, a jedná se o krajní prostředek obranného mechanismu organismu [20, s. 2].

## 2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI SILIC ČAJOVNÍKU

Olej z čajovníku obsahuje přes sto chemických látek, většina z nich jsou monoterpeny, seskviterpeny a také aromatické sloučeniny. Jako monoterpeny označujeme acyklické, monocyklické nebo bicyklické C<sub>10</sub> isoprenoidy. Isoprenoidy jsou sekundární rostlinné metabolity strukturně odvozené od isoprenu, uplatňují se při procesu růstu, reprodukci, při přenosech signálů a obranných mechanismech. Protože jsou monoterpeny těkavé, lze je snadno identifikovat a také jednoduše izolovat pomocí destilace vodní parou jako tzv. rostlinné silice [21, s. 839]. Monoterpeny – terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpinen, 1,8-cineol, *p*-cymen,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -pinen, limonen, sabinen a terpineoly tvoří 80–90 % oleje. Monoterpen *p*-cymen obsahuje jako jediný ve své struktuře benzenové jádro. Na obrázku 3 [22, s. 1] [22, s. 1] [24, s. 1] jsou k vidění tři nejhojněji zastoupené terpeny v čajovníkové silici – (+)-terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinen a  $\alpha$ -terpinen. Aktivní enantiomer (+)-terpinen-4-ol stáčí rovinu polarizovaného světla doprava, je tedy pravotočivý dextro-izomer [25, s. 1623]



Obrázek 3 Nejhojněji zastoupené terpeny – (+)-terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinen,  $\alpha$ -terpinen [22, s. 1] [23, s. 1] [24, s. 1]

Přirozený obsah terpenů se může značně lišit v závislosti na použité populaci sklizně, klimatu, maceraci listů, stáří listů a délce destilace. Minimální a maximální povolené koncentrace jednotlivých složek podle normy ISO 4730:2004 jsou uvedené v tabulce 1 [6, s. 6]. Podle tabulky je patrné, že největší zastoupení v komerčních olejích má složka terpinen-4-ol v rozmezí 30–48 %. Cyklický terciární alkohol, monoterpen, terpinen-4-ol je hlavní bioaktivní složkou čajovníkového oleje [6, s. 1]. Aktuálně platná ISO 4730 norma z roku 2017 je uvedena v tabulce 2 [7, s. 2] a je patrné, že koncentrační intervaly některých sloučenin se zúžily a zejména na přípustné minimální koncentrace se kladou větší nároky. Nezměněné koncentrační rozmezí je ponecháno u terpinolenu, *p*-cymenu, limonenu,

sabinenu, viridiflorolu a globulolu. U ostatních sloučenin došlo k přísnějším přípustným parametrům. Koncentrační interval terpinen-4-olu byl zúžen nejmarkantněji, o celých pět procent. V případě  $\gamma$ -terpinenu byl posunuta hranice minimální koncentrace z 10 % na 14 %. S aktuální ISO normou z roku 2017 byly srovnávané naměřené hodnoty v praktické části diplomové práce.

Tabulka 1 Povolené koncentrace složek dle ISO 4730:2004 [6, s. 1]

<b>Složka</b>	<b>Minimální koncentrace [%]</b>	<b>Maximální koncentrace [%]</b>
Terpinen-4-ol	30	48
$\gamma$ -Terpinen	10	28
$\alpha$ -Terpinen	5	13
$\alpha$ -Terpineol	1,5	8
Terpinolen	1,5	5
$\alpha$ -Pinen	1	6
<i>p</i> -Cymen	0,5	8
Limonen	0,5	1,5
1,8-Cineol	Stopové množství	15
Sabinen	Stopové množství	3,5
Aromadendren	Stopové množství	3
$\delta$ -Cadinen	Stopové množství	3
Viridifloren	Stopové množství	3
Viridiflorol	Stopové množství	1
Globulol	Stopové množství	1

Tabulka 2 Povolené koncentrace složek dle ISO 4730:2017 [7, s. 2]

<b>Složka</b>	<b>Minimální koncentrace [%]</b>	<b>Maximální koncentrace [%]</b>
Terpinen-4-ol	35,0	48,0
$\gamma$ -Terpinen	14,0	28,0
$\alpha$ -Terpinen	6,0	12,0
$\alpha$ -Terpineol	2,0	5,0
Terpinolen	1,5	5,0
$\alpha$ -Pinen	1,0	4,0
<i>p</i> -Cymen	0,5	8,0
Limonen	0,5	1,5
1,8-Cineol	Stopové množství	10,0
Sabinen	Stopové množství	3,5
Aromadendren	0,2	3,0
$\delta$ -Cadinen	0,2	3,0
Viridifloren	0,1	3,0
Viridiflorol	Stopové množství	1,0
Globulol	Stopové množství	1,0

Zatímco složka terpinen-4-ol vykazuje významné antimikrobiální a protizánětlivé účinky, 1,8-cineol, známější jako eukalyptol, je pravděpodobně nežádoucím alergenem v produktech s obsahem TTO a v samotném oleji. Při delší době skladování dochází ke změnám poměrů složek; hladina cymenu se zvyšuje, naproti tomu hladina terpinen-4-olu se snižuje.

Čajovníkový olej existuje v podobě šesti chemotypů, což jsou oleje s různým chemickým složením. Patří mezi ně terpinen-4-olový chemotyp (typ 1), terpinenový chemotyp (typ 2) a 1,8-cineolový chemotyp (typ 5). U tří zbývajících chemotypů (typy 3, 4 a 6) dominuje složka 1,8-cineol a jsou považované za 1,8-cineolové chemotypy, které se liší koncentracemi přítomného terpinen-4-olu a terpinolenu. V tabulce 3 [11, s. 810] je vypsáno procentuální zastoupení vybraných olejových složek v závislosti na chemotypech. Složení oleje se však může měnit zejména za přítomnosti vzdušného kyslíku, světla, nebo když je olej vystaven nadměrné vlhkosti a vyšším teplotám. Za těchto podmínek oxidují  $\alpha$ -terpinen,  $\gamma$ -terpinen a terpinolen na *p*-cymen. V důsledku toho se hladiny

oxidovaných sloučenin snižují a hladina *p*-cymenu se zvyšuje až desetinásobně. Koncentrace *p*-cymenu je tedy dobrým měřítkem oxidativní degradace čajovníkového oleje [11, s. 811]. Hladina 1,8-cineolu obvykle snižuje žádoucí podíl terpinen-4-olu. Pro účely komerční výroby se využívá terpinen-4-olový chemotyp, který je kvalifikován jako olej z australského čajovníku podle normy ISO 4730, a zároveň je nejrozšířenějším chemotypem v divoké populaci rostlin [10, s. 784] [26, s. 45].

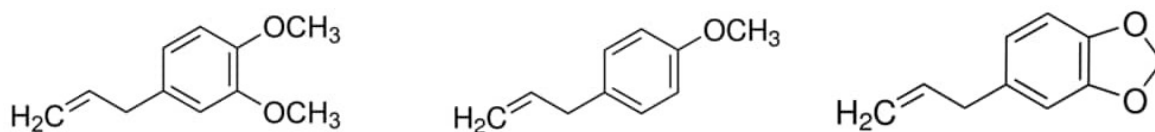
Tabulka 3 Koncentrace vybraných složek v chemotypech čajovníkového oleje [11, s. 810]

<b>Chemotyp</b>	<b>Terpinen-4-ol [%]</b>	<b>1,8-Cineol [%]</b>	<b>Terpinolen [%]</b>
Typ 1	22–40	0–17	2–6
Typ 2	<3	22–44	41–60
Typ 3	10–14	34–46	16–24
Typ 4	6–14	41–63	0–3
Typ 5	<1	72–86	<1
Typ 6	<1	65–80	6–14

### 3 FALŠOVÁNÍ OLEJE ČAJOVNÍKU

Falšování je významným problémem v průmyslu esenciálních olejů, který je poháněn optimalizací zisků použitím levnějších materiálů přidávaných do přírodních esenciálních olejů. Do oleje se za účelem falšování přidávají složky z jiných esenciálních olejů, rostlinné oleje, odpadní produkty získané z jiných esenciálních olejů nebo také esenciální oleje z jiných druhů *Melaleuca* nebo z blízkce příbuzného rodu *Leptospermum*. Mezi možné falzifikáty TTO patří druhy čajovníku známé jako kajuput, niaouli, manuka nebo kanuka, nicméně falšování pomocí těchto druhů není ekonomicky přínosné. Oleje těchto druhů čajovníku jsou relativně drahé a jejich použití by znamenalo jen minimální finanční zisk. K falšování TTO často dochází pomocí ředění syntetickým terpinen-4-olem nebo odpadními produkty z průmyslové výroby eukalyptového oleje bohatého na cineol, a dalších esenciálních olejů jako je borovice nebo bílý kafr [27, s. 4]. Mezi nejčastější oleje přidávané za účelem falsifikace jsou *Cinnamomum camphora*, *Eucalyptus globulus*, *Melaleuca cajuputi*, *Melaleuca leucadendra*, *Melaleuca quinquenervia*, *Pinus massoniana*, *Pinus pinaster* a *Pinus roxburghii*. Esenciální olej z *Melaleuca ericifolia* se získává ve velmi malém množství a prodává se za vyšší cenu ve srovnání s TTO z *Melaleuca alternifolia*, zde se tedy o falšování nejedná. *Melaleuca dissitiflora* je v Evropském lékopisu uvedena jako další možný zdroj TTO, ale podle nejnovějších pokynů ISO normy již není přípustná [28, s. 2, 3]. Důvodem vyřazení *M. dissitiflora* jako možného zdroje pro TTO z normy ISO 2017 je vyšší koncentrace methyl eugenolu. Methyl eugenol je strukturální analog estragolu a safrolu, které při toxikologických testech vyvolávají karcinogenní účinky u hlodavců [27, s. 5]. Methyl eugenol je pod referenčním číslem 102 zanesen v příloze III Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009. Jedná se o látku, kterou lze použít jako kosmetickou přísadu, ale pouze v limitních koncentracích. V parfémcech je jeho limitní koncentrace 0,01 %, v toaletních vodách 0,004 %, ve vonných krémech 0,002 %. V případě leave-on kosmetických přípravků a přípravků pro ústní hygienu je nejvyšší povolená koncentrace methyl eugenolu 0,0002 % a limitní koncentrace v rinse-off kosmetice je 0,001 % [29, s. 107]. Methyl eugenol byl v roce 2002 zařazen na seznam zakázaných látek ve Směrnici Rady 76/768/EHS o sbližování právních předpisů členských států týkajících se kosmetických prostředků z roku 1976 [30, s. 1]. Byl zde zařazen z důvodu potenciálních karcinogenních účinků, roku 2010 byl ale tento dokument zrušen předpisem (ES) č. 1223/2009 a methyl eugenol byl zařazen do regulovaného seznamu sloučenin, které lze používat jako vonné složky [31, s. 464]. Obrázek 4 Obrázek 4 [32, s. 1]

[33, s. 1] [34, s. 1] poukazuje na strukturální podobnost zmíněných sloučenin v následujícím pořadí – methyl eugenol, estragol, safrol.



Obrázek 4 Methyl eugenol, estragol, safrol [32, s. 1] [33, s. 1] [34, s. 1]

Falsifikace TTO s sebou nese pouze ekonomické aspekty a neoprávněné klamání zákazníka, ale také možné bezpečnostní a terapeutické komplikace. Pozitivní testy na kontaktní alergii způsobenou TTO jsou způsobené buď produkty oxidačních procesů nebo právě přítomností neoprávněných složek za účelem falsifikace oleje. Pro autentizaci TTO se využívají organoleptické a fytochemické metody, případně genetická identifikace [27, s. 4, 5]. Před rozvojem moderní chemické analýzy bylo hodnocení aroma primárním prostředkem k ověření pravosti esenciálních olejů. Hodnocení oděru je stále součástí většiny rutinních testů kontroly kvality. Vůně čajovníkového oleje je v monografii WHO popsána jako myristická. Vyznačuje se kořenitým, svěžím a kafrovitým aroma se suchým podtónem podobným senu. Odborníci na organoleptické hodnocení jsou schopni odlišit autentický TTO od jiných esenciálních olejů a od různých chemotypů TTO, některé z méně nápadných způsobů falšování mohou ale přehlédnout. Organoleptické hodnocení proto není vhodné jako samostatná metoda pro autentizaci TTO a musí být kombinováno s vhodnou chemickou metodou pro jednoznačné určení identity. Genetická identifikace taktéž slouží jako doplňující autentifikační metoda. K rozlišení mezi druhy *Melaleuca* a druhy blízké příbuznými slouží oblast chloroplastového genu NADH dehydrogenázy F, *ndhF*. Tato oblast *ndhF* slouží k vytvoření fylogenetického vztahu v rámci jednoho kmene [28, s. 2, 3]. Lékopisné a normativní metody se zaměřují na testování složek neprodleně po parní destilaci, a kromě organoleptického hodnocení zahrnuje hodnocení hustoty, indexu lomu, optické stáčivosti, chromatografii na tenké vrstvě, konvenční plynovou chromatografii, hmotnostní spektrometrii a chirální GC-MS analýzu [27, s. 5]. Evropský lékopis využívá pro autentizaci metodu plynové chromatografie s plamenové ionizačním detektorem. Tato autentizace je založená na relativním procentuálním zastoupením jedenácti terpenových individuí v TTO. Kromě toho se hlavním standardním detekčním systémem plynové chromatografie stala hmotnostní spektrometrie. Pro autentizaci je také možné využít nukleární magnetické resonance, a to pomocí determinace

enantiomerových poměrů terpinen-4-olu a  $\alpha$ -terpineolu za použití činidel pro posun lanthanoidů [27, s. 6].



## 4 IZOLAČNÍ TECHNIKY PRO ZÍSKÁNÍ SILIC

Podstatným krokem zpracování esenciálních olejů (EO) je jejich izolace z rostlinné matrice. K tomuto účelu lze využít různé metody, včetně těch nejběžnějších, jako je vodní destilace, parní destilace, lisování za studena a extrakce rozpouštědlem [35, s. 275].

Přestože se tyto techniky pro izolaci používají již mnoho let, jejich aplikace ukázala řadu nevýhod, jako jsou ztráty některých těkavých sloučenin, nízká účinnost extrakce, degradace nenasycených nebo esterových sloučenin tepelnými nebo hydrolytickými účinky nebo případná stopová množství toxických rozpouštědel v extraktech EO. V důsledku nárůstu nákladů na energii a s příchodem trendu ekologičtějšího smýšlení se průmyslová odvětví zaměřující se na produkci EO orientovala na rozvoj modernějších izolačních metod. V současné době jsou k dispozici nové techniky pro extrakci EO, včetně superkritické kapalinové extrakce, tlakové extrakce horkou vodou, membránové extrakce rozpouštědlem, mikro extrakce na pevné fázi, mikrovlnné a ultrazvukové extrakce. Tyto alternativy ke konvenčním extrakčním postupům mají potenciál zvýšit efektivitu výroby a přispět k ochraně životního prostředí snížením používání neekologických a nákladných rozpouštědel a fosilních energií [35, s. 276].

Také na základě zpracovávané části a typu rostliny se volí vhodná izolační metoda. Na příklad, lisování za studena je v případě zpracování slupek citrusových plodů vhodnější než enfleuráž, protože slupky je nutné narušit a vyvinou na ně tlak, čehož v případě enfleuráže dosáhnou nelze.

Průmysl esenciálních olejů se neomezuje na výrobu a distribuci EO a zdokonalování metod, ani na samotné vytváření a udržování standardů kvality, ale stále více se zabývá vývojem, výrobou a testováním syntetických aromátů a směsí, které si dnes nacházejí cestu do mnoha produktů na trhu [36, s. 13].

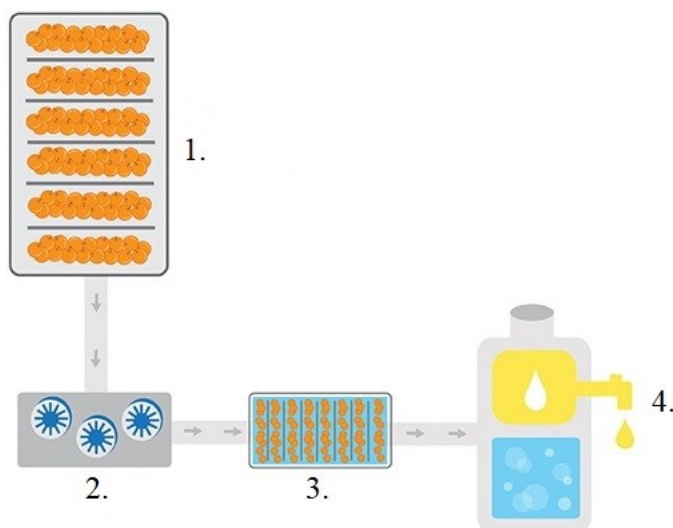
### 4.1 Konvenční metody izolace

Využití konvenčních metod izolace EO sahá již do starověkého Egypta, kde se EO využívaly v lékařství, parfumerii a při balzamování těl. V té době, ani dlouho poté, se ale nemohlo hovořit o velkoobjemové výrobě jako ji známe dnes. Oleje se získávaly především enfleuráží, macerací a lisováním za studena. O mnoho let později, po pádu Římské říše a s příchodem křesťanského ale především muslimského lidského pokrok, byly řemeslné dovednosti a vývoj EO přeneseny do arabského světa, kde se staly ještě sofistikovanějšími.

Ve středověku byly tyto znalosti o vůních převezeny zpět do Evropy křižáky, kteří se vraceli ze Svaté země, a byli dále obohacovány zejména tehdejšími alchymisty. Část dovedností získali Evropané na počátku 8. století, kdy velitel Táriq ibn Zijád a jeho vojsko překonali úžinu poblíž Gibraltaru a dobyli Pyrenejský poloostrov, který se tak dostal pod nadvládu muslimského chalífátu. Tehdejší méně rozvinutá středověká Evropa tak dostala příležitost čerpat z technických a vědeckých znalostí muslimské kultury. V průběhu renesance se používání esenciálních olejů v parfumerii a kosmetice rozšířilo po celém světě [37, s. 1, 2] [38, s. 1].

#### 4.1.1 Lisování za studena

Lisování za studena je nejstarší ze zmíněných izolačních metod. Tato metoda má výhodu minimálního vývinu tepla během procesu, naopak nevýhodou je, že poskytuje nízké výtěžky EO. Většinou se používá pro izolaci olejů z kůry citrusových plodů z důvodu relativní tepelné nestability aldehydů v nich obsažených. Metoda mechanického lisování za studena probíhá tak, že se působením tlaku nebo otěrem naruší olejové žlázy tak, že se olej vymrští a smyje vodní sprškou. EO získané pomocí této metody jsou poměrně stále netěkavé sloučeniny, obsahují také kumariny a rostlinné pigmenty, a proto, pokud je požadován čistý EO, je nutné provést destilaci nad zředěným hydroxidem sodným [35, s. 276]. Vzhledem k nevýhodám byly zkoumány předúpravy pomocí enzymů za účelem zvýšení výtěžnosti EO. Soto a kol. [39, s. 837] využili enzymatickou hydrolýzu k úpravě semen brutnáku lékařského před samotným lisováním za studena. Ve srovnání s kontrolou bez předběžného ošetření enzymem byla výtěžnost vyšší. Za studena lisovaný TTO se vyskytuje na trhu většinou s označením organického původu. Takové produkty jsou obvykle prodávány za vyšší cenu jako prémiové [35, s. 276]. Obrázek 5 [40, s. 1] představuje schéma lisování za studena ve čtyřech základních krocích.



Obrázek 5 Schéma lisování za studena; 1 - Rostlinná matrice postupuje dopravníkem dolů; 2 - Narušení olejových žláz, působení tlakem; 3 - Omývání vodní sprchou, působení tlakem; 4 - Centrifugace vzniklé emulze, EO je separován od vodní fáze, upraveno dle [40, s. 1]

#### 4.1.2 Destilace

Esenciální oleje se obecně nejčastěji získávají pomocí vodní nebo parní destilace z různých částí rostlin, včetně celé rostliny, plodů, listů, kořenů, kůry nebo semen. Použité části rostlin se mohou nacházet v různém stavu čerstvosti, ale důležité je, aby nebyly před izolací tepelně upravovány, a to z důvodu možného snížení výtěžnosti. Povaha sloučenin získaných pomocí destilační metody je těkavá [37, s. 3]. Pro podrobnější popis destilačních metod je tato kapitola dále rozdělena do dvou podkapitol pojednávajících o vodní a parní destilaci. Podkapitola parní destilace bude probrána podrobněji, protože je to izolační metoda užívaná primárně k získávání TTO i ve velkoobjemovém měřítku.

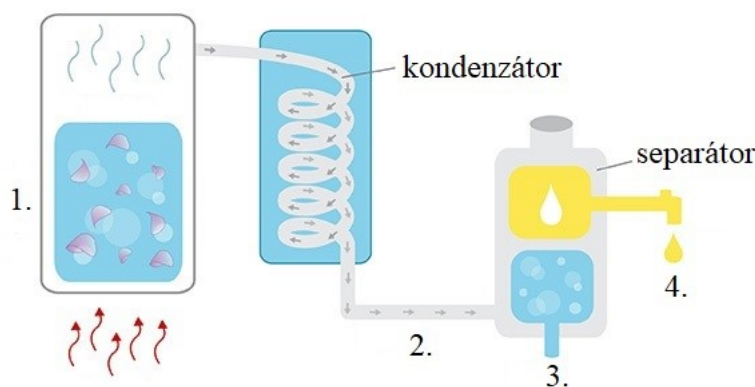
##### Vodní destilace

Při procesu vodní destilace je rostlinný materiál zcela ponořen do vroucí vody. Charakteristickým rysem je, že dochází k přímému kontaktu mezi vroucí vodou a rostlinnou matricí. V tomto se liší parní destilace, kdy je přítomna voda i vyvíjená vodní pára, ale nedochází ke kontaktu mezi vodou a rostlinou. V případě zpracování menších květů je izolace vodní destilací výhodou, protože nedochází k jejich slepení, ke kterému by za přítomnosti páry došlo [41, s. 79].

Obrázek 6 [42, s. 1] odkazuje na schéma vodní destilace. Vlivem horké vody a páry se silice uvolňují z olejových žláz, poté dochází k nepřímému chlazení vodou, čímž vzniklá parní směs vody a oleje kondenzuje. Z kondenzátoru proudí vzniklý destilát do separátoru, kde se

olej z důvodu nižší hustoty automaticky oddělí od destilované vody na povrch [43, s. R1232]. Výsledná vodní fáze obsahuje rostlinné složky rozpustné ve vodě a označuje se jako květinové voda, bylinný destilát nebo hydrosol. I tato část produktu se dále uvádí na kosmetický trh [41, s. 79].

Anandhi a spol. [44] uskutečnili studii, která se zabývala porovnáním výtěžků z různých částí *Melaleuca alternifolia* pomocí izolační metody vodní destilace. Byly porovnávány výtěžky z větviček, listů, kůry, květů, plodů a stonků. Extrakce EO z čajovníku z různých částí rostliny metodou vodní destilace odhalila, že obsah oleje byl nejvyšší v listech (2,30 %) a následovaly květy (2,25 %). Ostatní části jako větvičky a plody zaznamenaly 1, 85% a 0,95% výtěžek, zatímco v kůře nebyl pozorován žádný olej. Důvodem vysoké výtěžnosti z listů je zvýšený výskyt trichomů [44, s. 2].

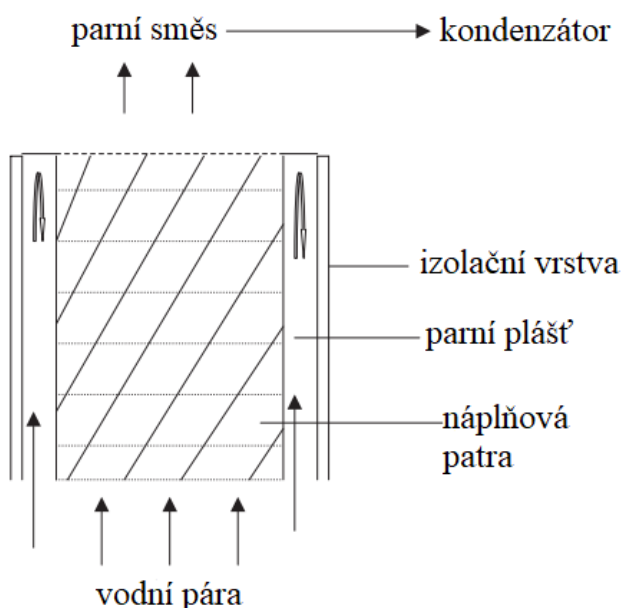


Obrázek 6 Schéma vodní destilace; 1 - Rostlinná matrice ve vroucí vodě; 2 - parní směs proudící kondenzátorem; 3 - oddělená vodní fáze ve formě hydrosolu; 4 - oddělená fáze esenciálního oleje, upraveno dle [42, s. 1]

### Parní destilace

Podíl silic extrahovaných parní destilací je 93 % a zbývajících 7 % zahrnuje jiné izolační metody. Aplikované teplo vodní páry je hlavní příčinou prasknutí a rozpadu buněčné struktury rostlinné matrice. V důsledku toho se z trichomů uvolňují aromatické sloučeniny v podobě silic. Roku 2005 navrhl Masango [45] nový procesní systém a provoz pro parní destilaci EO za účelem zvýšení výtěžku oleje a snížení ztráty polárních sloučenin v odpadní vodě. Systém se skládá ze směsi rostlinného materiálu, která je umístěna nad zdrojem páry. Prochází jím pouze pára a vroucí voda se s materiálem nemíchá. Metoda také řeší jeden z nejobtížnějších problémů, který vyvstává při vodní destilaci, a to stanovení optimálního množství páry potřebné pro destilaci dané hmoty rostlinného materiálu. Návrh procesu vyžaduje, aby náplňovými patry procházelo minimum páry za účelem minimálního obsahu vody v destilátu. Tento minimální průtok páry lze experimentálně stanovit. Teoreticky se

jedná o rychlost průtoku páry, která vyvine pokles tlaku s nejnižším transportem páry přes jednu náplňovou vrstvu rostlinného materiálu. Přijetí nového destilačního přístroje s designem parního pláště vede k zvýšení výtěžku EO, úspoře energie a ekologičtějšímu smýšlení. Konstrukce parního pláště kolony udržuje při destilačním procesu stálou vysokou teplotu. Ke konci destilačního cyklu klesá výtěžek tak nízko, že je neekonomické v destilaci dále pokračovat. Pomocí grafů výnosů je snadné určit hraniční bod destilace [45, s. 833] [43, s. R1232]. Obrázek 7 [46, s. 834] poukazuje na diagram konstrukce kolony. Podrobnější popis parní destilace je probrán v kapitole 4.3.



Obrázek 7 Konstrukce kolony s parním pláštěm, upraveno dle [46, s. 834]

#### 4.1.3 Extrakce rozpouštědlem

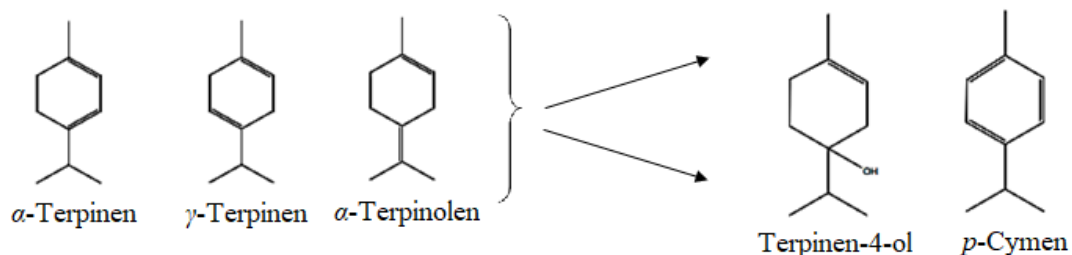
Hydrofobní charakter EO umožňuje extrakci pomocí organických rozpouštědel. Tato extrakce pracuje na principu distribuce rozpuštěné látky mezi dvě nemísitelné kapalné fáze, které jsou ve vzájemném kontaktu. V tomto procesu se látka přenáší z matrice pomocí kapaliny, ve které je daná látka rozpustná [35, s. 277]. Rajantere a spol. [47] zkoumali účinnost zvolených rozpouštědel na výtěžek TTO. Výzkumná práce zahrnovala nepolární rozpouštědla, n-hexan a petrolether, a polární rozpouštědla, ethanol a methanol. Ve studii není zmíněno, která frakce petroletheru byl použita. V případě, že se musí jednat o rozpouštědlo s nízkým bodem varu, předpokládá se, že byla použita frakce nízkomolekulárních alifatických uhlovodíků, většinou pentanu a hexanu. Nejvyšší výtěžek TTO poskytovala extrakce petroletherem, ve srovnání s extrakcí n-hexanem vykázal výtěžek z petroletheru nárůst o 10,42 % a o 35,90 % vyšší ve srovnání s výtěžkem absolutního TTO

z ethanolové a methanolové extrakce [47, s. 1]. V této práci došlo také k porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých složek v závislosti na použitém extrakčním rozpouštědle. Jako referenční standard sloužil zakoupený komerční vzorek, který byl vždy zředěn daným extrakčním rozpouštědlem v poměru 1:10, a následně podroben GC-MS analýze. Pro charakterizaci byly v každém vzorku identifikovány celkem čtyři monoterpenové sloučeniny včetně jejich procentuálního zastoupení. V tabulce 4 [47, s. 31] jsou vypsaná procentuální zastoupení monoterpenů za použití různých extrakčních rozpouštědel. Ve druhém sloupci je zastoupení sloučenin v referenčním standardním vzorku TTO a v posledním sloupci standardní zastoupení podle ISO 4730 normy také v procentech. Primární sloučenina terpinen-4-ol vykazovala nejvyšší koncentraci při extrakci *n*-hexanem a také se nejvíce přiblížila koncentraci této složky v referenčním vzorku TTO. Zároveň je tato koncentrace v souladu s ISO normou. Podobně je tomu v případě 1,8-cineolu a  $\alpha$ -terpineolu. Celkový obsah  $\gamma$ -terpinenu je v případě všech použitých rozpouštědel ve srovnání s referenčním množstvím TTO (20,47 %), a také s jeho množstvím dle ISO normy, velice nízký (1,49–3,28 %). Rajantereš tuto skutečnost odůvodňuje tím, že mohlo dojít ke změně složení během extrakčního procesu za přítomnosti kyslíku a působení UV záření [47, s. 32–33].

Tabulka 4 Zastoupení monoterpenů v závislosti na použitém extrakčním rozpouštědle dle GC-MS analýzy [47, s. 31]

Monoterpeny	Referenční TTO [%]	Extrahovaný TTO [%]				Obsah dle ISO 4730 [%]
		<i>n</i> -Hexan	Petrolether	Ethanol	Methanol	
Terpinen-4-ol	38,44	39,34	28,81	17,22	20,57	30–48
1,8-Cineol	2,22	1,46	0,89	0,85	0,83	St.mn. –15
$\alpha$ -Terpineol	2,90	3,70	2,84	2,17	2,69	1,5–8
$\gamma$ -Terpinen	20,47	1,49	1,07	2,58	3,28	10–28

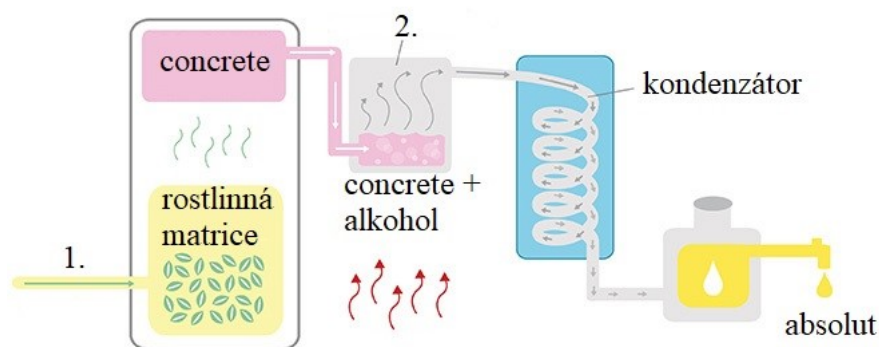
Hladiny  $\alpha$ -terpinenu,  $\gamma$ -terpinenu a  $\alpha$ -terpinolenu klesají díky působení vnějšího prostředí, zatímco hladina *p*-cymenu a terpinen-4-olu se zvyšuje až desetinásobně. Následná hydrolytická konverze a oxidační degradace vede k tvorbě peroxidů, endoperoxidů a epoxidů, které následně snižují obsah  $\gamma$ -terpinenu. To přispívá k nadbytečnému složení terpinen-4-olu a *p*-cymenu. Na obrázku 8 jsou schematicky naznačené konečné produkty hydrolyzy a oxidace TTO [47, s. 33].



Obrázek 8 Konečné produkty hydrolyzy a oxidace složek TTO [47, s. 33]

Co se týče získávání EO v laboratořích, kde se využívá Soxhletův extraktor, je extrakce rozpouštědlem tou nejjednodušší metodou. Hlavní nevýhodou je kontaminace vzorku rozpouštědlem, které musí být zcela odstraněny. Díky snadnému odpařování složek s nízkou molekulovou hmotností dochází ke změnám aromatických vlastností EO, což je nežádoucí především pro aromaterapeutické odvětví. Extrakty získané touto metodou proto nelze považovat za pravé EO, často však obsahují většinu aromatických profilů, které jsou téměř identické se surovinou, ze které byly extrahovány. Další nevýhodou jsou vzniklé odpadní vody, které mohou obsahovat aktivní substance nebezpečné pro životní prostředí. V roce 1990 byl zaveden koncept zelené chemie „Green chemistry“ jejímž cílem je snížení, eliminace nebo použití rozpouštědel šetrnějších k životnímu prostředí. Z toho důvodu se již provádí výzkumy pro vývoj nových ekologičtějších rozpouštědel, ve kterých jsou mimo jiné iontové kapaliny nebo rozpouštědla získávána z biomasy [35, s. 277].

Při tepelném ošetření rozpouštědla a rostlinné matrice vzniká vosková aromatická směs známá jako concrete. Tato směs je dále smíchána s alkoholem, což při zahřátí způsobí uvolnění olejových složek. V kondenzátoru dojde k oddělení složek a ve výsledné fázi vzniká tzv. absolut [35, s. 277]. Obrázek 9 [48, s. 1] je schématem popisované izolační metody.



Obrázek 9 Schéma extrakce rozpouštědlem; 1 - vstup rozpouštědla; 2 - vakuová destilace, odstranění alkoholu, upraveno dle [48, s. 1]

Baker a spol. [49] porovnali metodu rozpouštědlové extrakce a parní destilace z hlediska kvality i kvantity výtěžků *Melaleuca alternifolia*. Zkoumání podrobili rostliny s nízkou i vysokou koncentrací oleje, které byly buď čerstvé (přibližně 50 % sušiny) nebo sušené na vzduchu (přibližně 90 % sušiny). V množství a kvalitě oleje nebyl z hlediska množství sušiny v rostlině žádný významný rozdíl, ať už se jednalo o rostlinu s vysokým nebo nízkým podílem oleje. Extrakce ethanolem poskytla  $48 \text{ mg}_{\text{olej}} \cdot \text{g}_{\text{list}}^{-1}$  pro rostliny s nízkou koncentrací oleje a  $77 \text{ mg}_{\text{olej}} \cdot \text{g}_{\text{list}}^{-1}$  pro rostliny s vysokou koncentrací oleje. Tento výtěžek byl o 14 a 22 % vyšší než množství EO vydestilovaného za 2 hodiny a dále za 6 hodin z identických rostlinných vzorků. Při destilaci z listů s vysokým obsahem oleje byla nižší výtěžnost seskviterpenoidních složek ( $5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  nebo 7 %), zároveň došlo k vyšší výtěžnosti terpinen-4-olu ( $30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  nebo 44 %). Naproti tomu extrakce listů poskytla větší množství seskviterpenoidních složek ( $16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  nebo 20 %). Zvýšený výtěžek z extrakce rozpouštědlem se tedy projevil v nižších podílech klíčových monoterpenoidních složek [49, s. 4042–4043].

## 4.2 Moderní metody izolace

Z důvodu zvyšujících se nákladů na energie a také díky snaze o snížení  $\text{CO}_2$  emisí věnuje chemický, potravinářský i farmaceutický průmysl zvýšenou pozornost vývoji nových separačních technik. Kromě toho je zde snaha o eliminaci určitých nevýhod konvenčních metod, jako jsou ztráty některých těkavých látek, nízká výtěžnost, dlouhá doba extrakce, degradace nenasycených nebo esterových sloučenin prostřednictvím tepelného nebo



hydrolytického působení nebo přítomnost rozpouštědla v extraktu [35, s. 277] [43, s. R1237].

#### 4.2.1 Superkritická extrakce oxidem uhličitým

Superkritická extrakce neboli SFE (Supercritical fluid extraction) je technika používaná pro extrakci rostlinných materiálů, především lipidů a esenciálních olejů. Tato metoda je obvykle rychlejší, selektivnější vůči sloučeninám, které mají být extrahovány, a také šetrnější k životnímu prostředí ve srovnání s tradičními metodami [35, s. 279]. Oxid uhličitý je nejběžněji používanou superkritickou tekutinou. Za zvýšeného tlaku se plynný oxid uhličitý mění na kapalinu, kterou lze využít jako velmi inertní a bezpečné médium k extrakci aromatických sloučenin z rostlinné matrix. Odstraněním kritických podmínek, snížením tlaku, konvertuje kapalný CO<sub>2</sub> zpět do plynného stavu, čímž dojde k absolutnímu odstranění rozpouštědla z esenciálního oleje [43, s. R1237]. Navzdory vysoké rozpustnosti složek EO v superkritickém CO<sub>2</sub> je rychlost extrakce s čistým CO<sub>2</sub> relativně pomalá (80% výtěžnost po 90 minutách extrakce). Rychlost extrakce je ale možné zvýšit kombinací metod - 15-minutová statická extrakce s dichlormethanem následovaná 15-minutovou dynamickou extrakcí s čistým CO<sub>2</sub> odpovídá 4-hodinové hydrodestilaci [50, s. 297]. Rozdíl mezi statickou a dynamickou extrakcí je takový, že v případě extrakce statické je celý systém ponechán v klidu, čímž dochází k ustanovení rovnováhy. Po určité době dojde k přemístění extraktu do sběrné nádoby a celý postup je opakován. Při dynamické extrakci se rozpouštědlo kontinuálně čerpá skrz extrakční celu se vzorkem. Dynamická extrakce SFE je praktikovaná mnohem častěji, jelikož je rostlinná matrix v neustálém kontaktu s čerstvým rozpouštědlem. Typický systém SFE se skládá z vysokotlakého čerpadla, které dodává dostatečný tlak a průtok nadkritické tekutiny bez tlakových pulzů, a dále extrakční cely obsahující vzorek, ve které je udržován zvolený tlak a teplota. Kromě toho je celý systém obstarán ventily, které redukují tlak při vstupu a výstupu do systému [51, s. 14]. Do kapalného CO<sub>2</sub> je možné přidat organické rozpouštědlo neboli kosolvent, který zlepšuje solvatační vlastnosti, v takovém případě je sestava navíc opatřena systémem cylindrů a přídatným čerpadlem [35, s. 279].

#### 4.2.2 Tlaková extrakce horkou vodou

Tlaková extrakce horkou vodou (PHWE), známá také jako subkritická vodní extrakce (SWE), je výkonná technika probíhající při zvýšeném tlaku a teplotách 100–374 °C. Jedná se o teplotní interval vody mezi teplotou varu a kritickou teplotou, kdy se voda nachází

v subkritické stavu. Voda je známá jako polární rozpouštědlo, při zvyšující se teplotě ale dochází k narušení vodíkových můstků a voda ztrácí polární vlastnosti. Subkritickou vodu lze využít jako nepolární rozpouštědlo a nahradit tak některá neekologická rozpouštědla [52, s. 459]. Například rozpustnost benzo[*e*]pyrenu, polycyklického aromatického uhlovodíku, ve vodě je při zvýšené teplotě 350 °C až 25-milionkrát vyšší. Rozpustnost benzenu a alkylbenzenů ve vodě se při zvýšení teploty z 25 °C na 200 °C se zvyšuje asi čtyřicetkrát [53, s. 175].

#### 4.2.3 Ultrazvuková extrakce

Průmyslové využití ultrazvuku je fytofarmaceutickým průmyslem využíváné pro získávání široké škály bylinných extraktů, které zahrnují olejové, proteinové a bioaktivní látky (polyfenoly, antokyany, aromatické sloučeniny, polysacharidy a funkční sloučeniny) [35, s. 279] [54, s. 162]. Ultrazvukem asistovaná extrakce (SAE) se využívá pro izolaci těkavých látek z přírodních produktů za pokojové teploty pomocí organických rozpouštědel, což zkracuje dobu extrakce, snižuje objem použitého rozpouštědla a zvyšuje výtěžnost extraktu ve srovnání s konvenčními metodami. Zvýšená účinnost extrakce organických sloučenin ultrazvukem se připisuje fenoménu kavitace, vzniku dutin v kapalině za lokálního snížení tlaku, který vzniká průchodem ultrazvukové vlny. Při působení ultrazvuku tak dochází ke vzniku a stlačování kavitačních bublin. Zvýšení tlaku a teploty způsobené kompresí vede ke zhroucení bubliny, která produkuje rázovou vlnu. Tato vlna prochází rozpouštědlem a podporuje míchání systému rozpouštědlo-matrice. Ukázalo se také, že sonická energie snadno narušuje olejové žlázy a uvolňuje jejich obsah, čímž se zvyšuje hromadný transport rozpouštědla z kontinuální fáze do rostlinné buňky. Schopnost narušení buňky a přenos extrahované látky jsou dva hlavní parametry, které vedou ke zlepšení účinnosti extrakce pomocí ultrazvuku [35, s. 279].

#### 4.2.4 Mikrovlnná extrakce

Tento druh extrakce využívá mikrovlnné záření jako zdroj ohřevu směsi rozpouštědla a vzorku. Díky účinkům mikrovln na hmotu, rotaci dipólu a iontové vodivosti, je ohřev okamžitý a probíhá uvnitř vzorku, což vede k velmi rychlým extrakcím. Při mikrovlnné extrakci lze získat EO za 30 minut a méně a jak kvalitativně, tak kvantitativně jsou produkty srovnatelné s těmi získanými pomocí tradičních metod, jako je hydrodestilace nebo Soxhletova extrakce. Jednou z výhod mikrovlnného ohřevu je narušení vodíkových vazeb, k čemuž dochází díky rotaci dipólů molekul. Tato metoda se liší od konvenčních metod

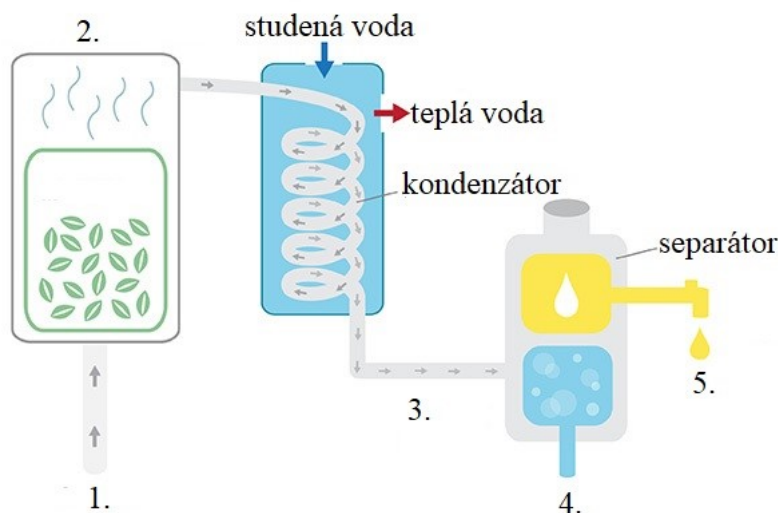
především tím, že v důsledku působení elektromagnetických vln dochází ke změnám ve struktuře buněk. Kromě zkrácené doby extrakce je výhodou také nízký objem použitého rozpouštědla. Zrychlení procesu a vysoký výtěžek extrakce mohou být důsledkem synergické kombinace dvou transportních jevů, kterými jsou tepelný a hmotnostní gradient působící stejným směrem. Tato metoda je především vhodná pro extrakci termolabilních sloučenin [35, s. 278–279].

### 4.3 Velkoobjemové izolační techniky

První záznamy o velkoobjemové výrobě EO na severoamerickém kontinentu se datují k začátku devatenáctého století. V brožůře „150 Years Service to American Health“ vydané nakladatelstvím Schieffelin and Company, New York, z roku 1944, se lze dočíst o nabídce domácích mátových olejů v roce 1805. Jen v několika málo případech však byla výroba EO postavena na skutečně moderních zemědělských a technických základech. Před První světovou válkou velké továrny na EO v New Yorku, Londýně, Lipsku a Grasse používaly k destilaci rostlinný materiál dovezený ze zahraničí [36, s. 12].

V následujícím odstavci je popsán proces sklizně a zpracování čajovníku ve velkoobjemové výrobě. V období zimy, kdy rostlina dosahuje požadované výšky, se provádí sklizeň. Ihned na plantáži jsou rostliny pomocí motorových kombajnů opatřených břitvami nařezané a slisované do sběrných kontejnerů. Tato směs se označuje jako biomasa. Biomasa je přemístěná do velkoobjemových destilačních kontejnerů, které jsou dále transportovány do destilačních zařízení k dalšímu zpracování. Jsou také případy, kdy se sběrný kontejner pouze utěsní a napojí se na přívod vodní páry, čímž se může zahájit přímá extrakce. Kontrolovaná nízkoteplotní pára pod tlakem prochází skrz destilační kontejner směrem nahoru a díky tomu dochází k narušení olejových žláz. Získaný olej se spolu s postupující vodní parou odpařuje a směřuje nahoru potrubím do kondenzační jednotky. V kondenzátoru dojde za pomoci studené vody k ohlazení směsné páry zpět do kapalné formy, která obsahuje silice TTO. Tato kapalina směřuje dále do separační kádě, kde se TTO díky své nižší hustotě přirozeně oddělí od vodní fáze. Po separaci dostatečného množství se olej po dobu 16 hodin ponechá k chlazení. Tento proces se opakuje několikrát za sebou, směs putuje do zásobníku a dále opět do destilačního zařízení až do požadovaného množství získaného TTO. Ochlazený EO je dále vedený potrubím opatřeným minimálně dvěma jemnými filtry, které odstraňují jakékoliv organický a anorganické nečistoty. TTO je skladován ve velkoobjemových zadržovacích nádržích, ze kterých se odebírají vzorky pro testování kvality výrobku. Pokud

vyrobená šarže projde testováním, TTO je dále plněn do zvolených primárních obalů, nejčastěji se jedná o tmavé skleněné lahvičky opatřené víčkem a etiketou. Sekundární obal nejčastěji tvoří papírová krabička [55]. Obrázek 10 [56, s. 1] vyobrazuje schéma procesu parní destilace.



Obrázek 10 Schéma parní destilace; 1 - vstup vodní páry; 2 - parní směs páry a EO; 3 - voda a EO; 4 - květinová voda; 5 - výstup esenciálního oleje, upraveno dle [56, s. 1]

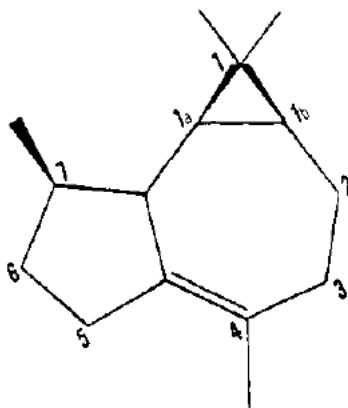
Parní destilace je vhodnou velkoobjemovou metodou nejen proto, že způsobuje minimální změny složení EO během izolace, ale také proto, že pára je snadno dostupná a netoxická, je účinná i při nízkém tlaku a lze ji recyklovat. Umožňuje extrakci oleje při takové konstantní teplotě, aby nedošlo k poškození oleje. Použitím páry za atmosférického tlaku lze olej destilovat při teplotě mírně pod teplotou varu vody. Tlak par dvou nebo vícefázové kapalné směsi, ve které nejsou fáze mísitelné, se rovná součtu parciálních tlaků fází. Pokud se tedy voda vaří při 100 °C, směs vody a jiné těkavé kapaliny, která není rozpustná ve vodě, tj. esenciální olej, bude mít vyšší tlak par než samotná voda, a proto bude směs vřít při nižší teplotě varu vody [1, s. 154–155].

#### 4.4 Vybrané studie analýzy čajovníkového oleje

V průběhu let bylo vydáno mnoho studií na téma složení a výtěžnost čajovníkového esenciálního oleje z hlediska aplikované izolační metody. V této kapitole je vypsán výběr studií v období 70. let 20. století až po současnost.

Již v roce 1978 podrobili Swords a Hunter [57] GC-MS analýze dva komerční vzorky čajovníkového oleje. Před samotnou analýzou došlo k rozdělení frakcí oleje pomocí systémů

rozpouštědel *n*-hexanu, ethyl-acetátu a methanolu na uhlovodíkovou, nealkoholovou kyslíkatou a alkoholovou frakci. Následovala analýza na plynovém chromatografu vybaveném skleněnou polární kolonou Carbowax s FID detektorem doplněnou o hmotnostní spektrometr. Jako hnací plyn bylo použité helium. Naměřená data byla navíc doplněná infračervenou spektroskopií a nukleární magnetickou resonancí. Podařilo se identifikovat 48 sloučenin, z nichž nejhojněji zastoupené byli terpinen-4-ol (29,41 %), 1,8-cineol (16,50 %),  $\gamma$ -terpinen (11,54 %) a *p*-cymen (11,42 %). Kromě toho se podařilo pomocí hmotnostní spektrometrie, infračervené spektroskopie a nukleární magnetické resonance určit strukturu viridiflorenu, kterou vidíme autenticky vyobrazenou na obrázku 11 [57, s. 737].



Obrázek 11 Autentický náčrt struktury viridiflorenu [57, s. 737]

Ve studii z roku 1989 Brophy a spol. [58] publikovali na základě měření 850 vzorků doposud neidentifikované sloučeniny pomocí GC-MS analýzy. Všechny vzorky byly zpracovány pomocí parní destilace a hydrodestilace zralých listů po dobu 4 hodin. Pro analýzu byl použit plynový chromatograf Shimadzu GC6-AMP s celoskleněným splitem a navazující na hmotnostně selektivní detektor. Byly použité následující kolony – FFAP; FSOT FFAP; FSOT BP21 a FSOT BP1. FFAP (Free fatty acid phase) je polární kolona určená pro izolaci methyl esterů mastných kyselin a volných mastných kyselin. Obsahuje polyethylenglykol modifikovaný kyselinou nitrotereftalovou neboli polyethylenglykol-2-nitrotereftlát [59, s. 334]. FSOT FFAP je typ WCOT (wall coated open tubular) kolony, který je vyráběn z taveného oxidu křemičitého s malým množstvím oxidu kovů. Pro zvýšení pevnosti je opatřen vnějším polyamidovým povlakem [60, s. 2]. Taktéž se jednalo o polární typ kolony. Dále byla stanovena teplota tání, optická rotace na polarimetru, IR a NMR spektrum. V rámci hmotnostní spektrometrie byl použit AEI MS

12 hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací (EIMS) a také AEI MS 902 s CIMS chemickou ionizací. V EIMS se k ionizaci používá elektronový paprsek, který rozbíjí molekuly na charakteristické fragmenty. Metoda chemické ionizace CIMS využívá reagenční plyn, který je ionizován elektronovým paprskem a dává tak vzniknout soustavě iontů [61, s. 1–2]. V rámci této studie se podařilo identifikovat 97 sloučenin, z čehož největší množství bylo terpinen-4-olu (40,1 %), dále  $\gamma$ -terpinenu (23,0 %),  $\alpha$ -terpinenu (10,4 %) a *p*-cymenu (2,9 %). Tento výzkum také poprvé zaznamenal *Melaleuca alternifolia* jako zdroj seskviterpenoidů  $\alpha$ -ylangen, bicyklogeracren, palustrol, globulol, rositoliol a spatulenol a dále také monoterpenoidů  $\beta$ -felandren, *trans*- a *cis*-sabinen hydrát a *trans*-piperitol. Brophy a spol. při té příležitosti oponovali Hunterovi a Swordsovi [57] ve věci koncentrací vybraných sloučenin. Typické komerční TTO obsahují mnohem menší množství *p*-cymenu a 1,8-cineolu, a naopak podstatně větší množství  $\alpha$ -terpinenu,  $\gamma$ -terpinenu a terpinolenu.

V roce 1990 analyzoval Kawakami a spol. [62] těkavé složky esenciálních olejů osmi různých klonů množných z jedné mateřské rostliny čajovníku střídavolistého pomocí GC-MS metody. Vzorky esenciálního oleje byly připraveny vždy dvěma metodami – metoda kontinuálního čištění a extrakce (SPE) a extrakce rozpouštědlem za kontinuální destilace vodní parou (SDE). Pro analýzu byl použit Hewlett-Packard model 5890A vybavený Carbowax 20M polární kapilární kolonou a FID detektorem, nosný plyn helium. Na tento chromatograf navazoval VG Trio-2 hmotnostní spektrometr. Pomocí SPE metody byly získány mnohem nižší koncentrace složek. Koncentrace terpinen-4-olu se pohybovaly v intervalu 0,16–3,15 % v rozmezí všech osmi analyzovaných klonů. Dále intervaly koncentrací vybraných sloučenin v rámci osmi analyzovaných klonů:  $\alpha$ -terpinen (0,95–19,82 %); 1,8-cineol (2,57–52,37 %);  $\gamma$ -terpinen (0,99–24,63 %); *p*-cymen (<0,01–9,97 %), terpinen-4-ol (0,16–3,15 %). Izolační metoda SDE poskytla vyšší koncentrace jednotlivých sloučenin:  $\alpha$ -terpinen (0,63–10,37 %); 1,8-cineol (0,54–56,10 %);  $\gamma$ -terpinen (0,94–19,36%); *p*-cymen (0,31–3,82%), terpinen-4-ol (1,07–42,85 %). Složení olejů získaných pomocí SDE se mezi různými vzorky klonů významně lišilo.

De Figueiredo [63] vydala roku 2006 studii týkající se změn chemického složení a koncentrace sloučenin TTO v průběhu jednoho roku na území jižní Afriky. Rostlinný materiál byl sbírán průběžně po celý rok 2004, po sklizni byly zpracované parní destilací a následně podrobeny GC analýze. Jak vyplývá z naměřených výsledků, množství získaného

oleje se pochybovalo v závislosti na měsíci od 1,2 % do 3 %. Pro analýzu byl použitý chromatograf modelu Varian star 3400 Cx vybavený FID detektorem a polární kolonou, jako nosný plyn sloužil vodík. Hodnoty koncentrací měřené po celý rok odpovídaly ISO 4730:1996 normě. V průběhu sezóny docházelo k různým stupňům odchylek v obsahu hlavních složek v koncentrací oleje. Ze všech sledovaných složek se obsah terpinen-4-olu měnil nejmarkantněji. V rámci měsíců byly celkové rozdíly až 9%, v případě  $\gamma$ -terpinenu byly rozdíly mírnější, 2–3 %, a u  $\alpha$ -terpinenu se blížily nule.

Wang a spol. [64] se v roce 2015 zaměřili na hodnocení kvality čerstvě izolovaných vzorků TTO tak jako i komerčních produktů dostupných na trhu. Hodnocení probíhalo pomocí konvenční GC-MS metody, ale bylo také doplněné chirální GC-MS analýzou. Celkem bylo hodnoceno 104 vzorků a ty čerstvě izolované byly získány parní destilací. GC-MS analýza probíhala na modelu Agilent 7890 s kapilární kolonou a hmotnostním detektorem, jako mobilní fáze bylo aplikováno helium. Stejně instrumentální uzpůsobení bylo prezentováno v případě chirální GC-MS analýzy, byla však použita chirální kolona, která je vhodná pro separaci enantiomerů. Konvenční metodou GC-MS se podařilo identifikovat 20 sloučenin, z nichž největší zastoupení měl terpinen-4-ol. Jeho koncentrace v některých komerčních produktech přesahovala maximální koncentraci povolenou ISO 4730 normou. 14 z 57 TTO vzorků neodpovídala alespoň jednomu ISO standardu, i přesto, že analýza proběhla bezprostředně po destilaci. Za většinu pozorovaných odchylek byla pravděpodobně zodpovědná autooxidace. V případě pozorovaných komerčních vzorků nebylo 49 % způsobitelných k prodeji jako „tea tree oil“ na komerčním trhu. Pro chirální analýzu byly použity čtyři chirální složky, tj.  $\alpha$ -pinen, limonen, terpinen-4-ol a  $\alpha$ -terpineol. Chirální analýza založená na těchto čtyřech sondách by mohla být použita k identifikaci nevyhovujících, falšovaných, substituovaných nebo jinak neobvyklých komerčních produktů TTO. Tato analýza velkého množství vzorků umožnila stanovení charakteristického +/- chirálního poměru bez ohledu na dříve publikovaná data.

De Groot a Schmidt [11, s. 810–815] vydali v roce 2016 report na téma kontaktní alergie a chemické složení čajovníkového oleje. Uvedli, že hlavními senzibilizátory jsou askaridol, terpinolen,  $\alpha$ -terpinen, 1,2,4-trihydroxymethan,  $\alpha$ -felandren a limonen. Výtěžek oleje z lístků a konečných větvíček se pohyboval od 1,0 % do 1,8 %. Schmidt provedl samostatnou studii a analyzoval 97 vzorků TTO původem z Austrálie, Vietnamu a Číny v letech 1998–2013. Koncentrace deseti nejhojněji zastoupených sloučenin se pohybovaly v následujících intervalech: terpinolen (0,04–45,7 %), terpinen-4-ol (6,2–44,9 %),  $\gamma$ -terpinen

(3,1–23,0 %), *p*-cymen (0,3–19,4 %), *cis*-sabinen hydrát (<0,01–19,4 %), 1,8-cineol (0,5–18,3 %),  $\alpha$ -terpinen (2,3–11,7 %),  $\alpha$ -pinen (1,8–9,2 %),  $\beta$ -felandren (<0,01–5,2 %), a  $\alpha$ -terpineol (1,9–4,2 %). Velmi vysoká koncentrační hodnota terpinolenu 45,7 % byla naměřena pouze v jednom vzorku původem z Číny; medián všech hodnot byl 3,1 %.

Sevik a spol. [65] publikovali v roce 2021 práci, kde kromě antifungálních vlastností TTO studovali jeho chemické složení pomocí GC-MS analýzy. Pět kilogramů lístků *M. alternifolia* bylo sklizeno v Indii v období od října do listopadu 2020 a bylo ponecháno 15 dní ve stínu. Izolace oleje hydrodestilací trvala pokaždé přibližně šest hodin, dávkovalo se vždy 500 g lístků pro jeden cyklus destilace. Průměrný výtěžek byl stanoven na 0,22 g oleje na 100 g rostlinné matrix, což odpovídá 1,05 % hm. Pro plynovou chromatografii byl zvolený chromatograf Agilent 7890A s polárním kolonou Innowax, jako nosný plyn bylo zvolené helium. Na základě této analýzy byly naměřené následující hodnoty:  $\alpha$ -pinen (21,64 %),  $\gamma$ -terpinen (21,09 %), terpinen-4-ol (17,31 %), limonen (9,37 %) a *p*-cymen (6,54 %). V tomto případě byl ve většinovém zastoupení  $\alpha$ -pinen, terpinen-4-ol byl s ohledem na jeho koncentrační zastoupení až třetí v pořadí. Obsah  $\gamma$ -terpenových uhlovodíků a kyslíkatých monoterpenů je 57,38 % a 14,35 %.



## ANALÝZA ÉTERICKÝCH OLEJŮ

### 4.5 Plynová chromatografie

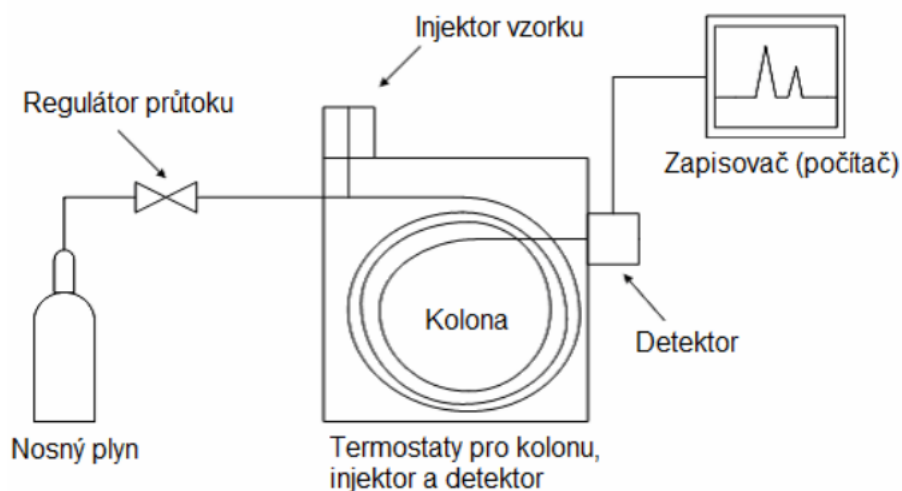
Plynová chromatografie (GC) je analytická metoda, která slouží k dělení jednotlivých sloučenin plynů, kapalin i pevných látek s bodem varu do 400 °C, a následně k jejich stanovení. Princip metody je založen na dělení sloučenin mezi dvě fáze – fázi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). Mobilní fázi je vždy plyn neboli nosný plyn. Jako nosný plyn se často používá helium, dusík, vzduch, vodík nebo jejich směs. Stacionární fázi je buď pevná látka, v tom případě je separační mechanismus adsorpční, nebo kapalina, pak je mechanismus rozdělovací. Postup analýzy a princip metody je následující. Z tlakové láhve je odebírán nosný plyn, který proudí přes redukční ventil a dále do injektoru, kde se k nosnému plynu vstříkuje vzorek pomocí mikrostříkačky. Díky nastavené teplotě dojde v injektoru k okamžitému přechodu vzorku z kapalného stavu do plynného, obvykle se teplota pohybuje od 150 °C do 350 °C. Vzorek spolu s nosným plynem proudí do kolony, která se nachází v termostatu. Na základě různých separačních principů zde dochází k dělení vzorku na jednotlivé složky. Nosný plyn proudí dále do detektoru, kde vzniká odezva, která je vedena na zesilovač. Tyto odezvy je tak možné vyhodnotit přes software a zobrazit na monitor. Obecný princip dělení na stacionární fázi v koloně je následující. Složky vzorku sorbují na počátku fáze a poté opět resorbovány pomocí nosného plynu. Každá složka postupuje spolu s nosným plynem svou charakteristickou rychlostí, která závisí na distribuční konstantě  $K_D$  každé složky.

Rovnice pro výpočet distribuční konstanty je definována jako podíl rovnovážných koncentrací složky ve stacionární fázi  $c_s$  a mobilní fázi  $c_m$ :

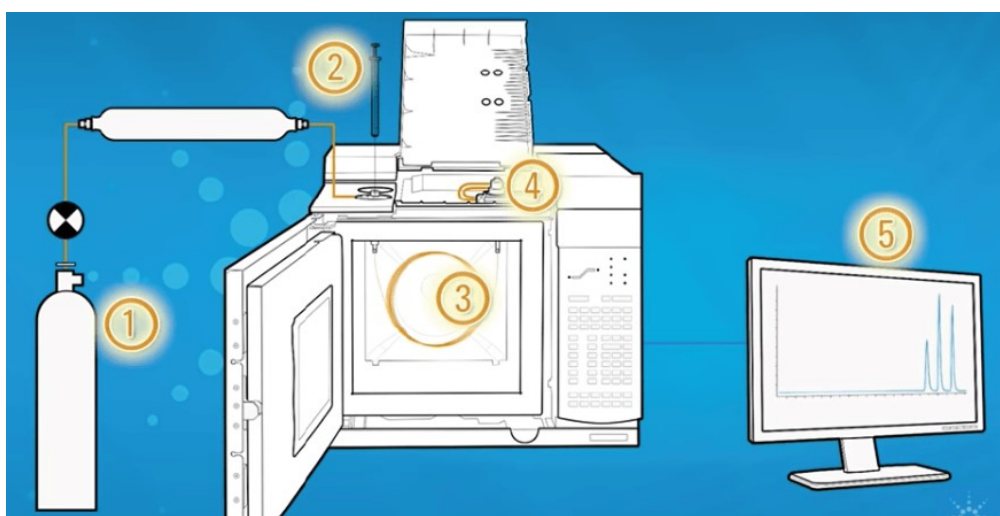
$$K_D = c_s \div c_m$$

Vzestupně podle pořadí narůstajících hodnot  $K_D$  vstupují látky do detektoru, kde vzniká okamžitá odezva na základě druhu použitého detektoru. Grafický záznam představuje závislost odezvy detektoru na čase a označuje se jako chromatogram. Pokud dojde na koloně k optimálnímu rozdělení n-složek, vyobrazí se na chromatogramu n-křivek neboli píků. Poloha píku udává identitu dané složky. Plocha a výška píku odpovídá množství látky ve vzorku a lze tak provést jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu vzorku [66, s. 1–5]. Obrázek 12 [67, s. 1] znázorňuje zjednodušené schéma plynového chromatografu se všemi

výše popsanými náležitostmi, na obrázku 13 [68, s. 1] lze vidět reálné rozmístění komponentů v přístroji.



Obrázek 12 Zjednodušené schéma plynového chromatografu [67, s. 1]



Obrázek 13 Nákres plynového chromatografu; 1-tlaková láhev, 2-injektor, 3-kolona, 4-detektor, 5-vyhodnocovací software [68, s. 1]

Mezi nejrozšířenější detektory patří plamenově ionizační detektor (FID), který byl použitý i při měření vzorků čajovníkového oleje v této práci. Jeho výhodou je schopnost detekovat široké spektrum organických sloučenin v širokém koncentračním intervalu. Tento detektor měří změnu elektrické vodivosti vodíkového plamene. Tyto změny jsou způsobené přítomností eluované látky [66, s. 5]. Toto století přineslo inovaci v plynové chromatografii, kterou je dvou- a třídídimenzionální GC. Ty obsahují dvě, případně tři, kolony a dosahují tak lepší separace některých látek [69, s. 1793].

## 4.6 Hmotnostní spektrometrie

Prvním krokem v hmotnostní spektrometrické analýze sloučenin je produkce plynných iontů sloučeniny, například elektronovou ionizací. Vzniklý molekulární ion většinou podléhá fragmentacím. Protože se jedná o radikálový kation s lichým počtem elektronů, může se fragmentovat za vzniku buď radikálu a iontu se sudým počtem elektronů, nebo molekuly a nového radikálového kationtu. Tyto dva typy iontů mají rozdílné chemické vlastnosti, proto je důležité je umět správně odlišit. Všechny ionty jsou separovány v hmotnostním spektrometru podle jejich poměru hmotnosti a náboje a dále detekovány odpovídajícím detektorem, který umožní vznik hmotnostního spektra, což je závislost odezvy na poměru  $m/z$ , kde  $m$  je hmotnost a  $z$  je náboj iontu [70, s. 1–2]. Při analýze dochází k následujícím pochodům: produkce iontů ze vzorků v ionizačním zdroji, oddělení těchto iontů v hmotnostním analyzátoru podle poměru  $m/z$ , fragmentace iontů a analýza fragmentů, detekce iontů vycházejících z posledního analyzátoru, převod iontů na elektrické signály, zpracování signálů softwarem, kde se pomocí Fourierovy transformace převádí časová oblast signálu do frekvenční oblasti [70, s. 5].

Důležitou součástí přístroje je iontový zdroj, který produkuje ionty v plynné fázi a vznikají tak záporné nebo kladné ionty molekulární,  $M^-$  a  $M^+$ , nebo aduktové,  $[M + H]^+$ ,  $[M - H]^-$  a podobně. Iontové zdroje dělíme podle množství dodané energie do dvou skupin, na „tvrdé“ a „měkké“. Zástupce skupiny „tvrdé“ ionizace je elektronová ionizace. Tato ionizace v plynné fázi se často využívá pro spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Výhodou je vznik bohatých spekter, které umožňují snadnější identifikace analyzované sloučeniny. Další podstatnou částí spektrometru je analyzátor, kde dojde k separaci iontů ve vakuu na základě poměru  $m/z$ . Principem je využití statického nebo dynamického elektrického nebo magnetického pole, případně jejich kombinace. Známe několik druhů analyzátorů. Skenující analyzátory separují kontinuálně v čase a vysílají ionty s určitým ratiem  $m/z$ . Příkladem je kvadrupólový nebo sektorový analyzátor. Další skupinou jsou tzv. průletové analyzátory, které transitují všechny ionty současně do letové trubice. Zde dojde díky rozdílným dobám letu k detektoru k jejich separaci. Existují také analyzátory zachycující ionty v cele či pasti. V neposlední řadě figuruje detektor, který zaznamená signál, který je dále převeden do digitální formy. Detektory lze rozdělit do dvou skupin podle toho, jak zaznamenávají ionty. Existují detektory, které zaznamenají všechny vstupující ionty bez ohledu na velikost  $m/z$ . Takové detektory jsou založené na přímém měření elektrického proudu vznikajícího při srážce s elektrodou. Zde se využívá násobič, který

zesiluje zaznamenaný elektrický proud. Druhá skupina detektorů je schopna zaznamenává ionty ve vztahu k velikosti poměru  $m/z$ , zde můžeme řadit iontově cyklotronovou resonanci nebo orbitrap [71, s. 152–156].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo shrnutí aktuální metodiky izolace a analýzy čajovníkového oleje v praxi. Vybrané komerční vzorky byly podrobené GC-FID a GC-MS analýze a výsledné hodnoty porovnané s normou ISO 4730:2017 s ohledem na povolené koncentrace jednotlivých sloučenin. Z naměřených hodnot byly vybrány charakteristické znaky chromatogramů čajovníkového oleje a odchylky složení vzorků, které jsou diskutovány v jednotlivých kapitolách. Doplňujícími metodami měření byl index lomu a absorbance v ultrafialové oblasti záření.

## 6 ANALÝZA ČAJOVNÍKOVÉHO OLEJE

V průběhu měření bylo analyzováno 15 vzorků čajovníkového oleje, které jsou dostupné na spotřebním trhu. Přístroje, vybavení, chemikálie a vzorky uvedené níže byly použité k GC-FID a GC-MS analýze nebo k naměření indexu lomu a absorpance v ultrafialové oblasti světla.

### 6.1 Vzorky čajovníkového oleje

Za účelem měření bylo zakoupeno 14 vzorků čajovníkového oleje *Melaleuca alternifolia*, firma Bewit poskytla vzorek darem:

Tabulka 5 Vybrané komerční vzorky čajovníkového oleje *Melaleuca alternifolia*

Výrobce	Číslo šarže	Datum spotřeby	Původ
Atok Original	2020111547	25. 4. 2024	Austrálie
Australian Bodycare Continental Aps	00916562	3. 2023	Austrálie
Pharma Activ- Australian Original	viz sekundární obal	12 měsíců po otevření	Austrálie
Bewit Franchise s. r. o.	1000000100050055	viz sekundární obal	Indie
Omega Pharma Bylinná lékárna	L320	6. 2022	viz sekundární obal
Dr. Müller Pharma s. r. o.	viz sekundární obal	viz sekundární obal	viz sekundární obal
Aromaterapie Karel Hádek s. r. o.	210824/013	8. 2023	Austrálie
Nobilis Tilia	L210715	15. 7. 2023	Austrálie
Pajoma	21.6461.04.20	viz sekundární obal	viz sekundární obal
Pharma Activ	102020	23. 10. 2023	Austrálie
Primavera	00012L29	6 měsíců po otevření	Německo
Renovality	092021	22. 9. 2024	Česká republika
Saloos Naturcosmetics s. r. o.	viz sekundární obal	10. 2023	Austrálie
Tierra Verde	viz sekundární obal	09. 2023	Jižní Afrika
Žuli a Žuli	211216T00681	07/2024	Austrálie

### 6.2 Plynová chromatografie

Zmíněné komerční vzorky čajovníkového oleje byly podrobené analýze na plynovém chromatografu DANI Master GC Fast Gas Chromatograph s nepolární kapilární kolonou

Zebtron ZB-5MS a detektorem FID. Vzorky byly zředěné methanolem v poměru 1 500:1. Tento poměr ředění byl zvolen tak, aby odezva na FID detektoru byla odpovídající a nedošlo k jeho vysaturování a tím byl také chromatogram vhodný k identifikaci jednotlivých sloučenin. Každý vzorek byl analyzován pomocí tří metod o různých parametrech měření, které jsou popsány níže v kapitole 6.2.2. Pro diskuzi výsledků byly z důvodu výpovědní hodnoty vybrány výsledky měřené metodou A a C. Pro vyhodnocení naměřených dat byl použit software Clarity DataApex, verze 4.0.3.876.

### 6.2.1 Použité přístroje, vybavení a chemikálie

Laboratorní sklo – vialky (N9 2ml včetně uzávěru a septa)



Obrázek 14 Vialka N9 2 ml

Mikroštrikačka (Hamilton 10, Gastight 1701)



Obrázek 15 Mikroštrikačka, Hamilton 10, Gastight 1701

Automatická pipeta Eppendorf Research, 100–1000  $\mu$ l

Plynový chromatograf DANI Master GC Fast Gas Chromatograph s detektorem FID, výrobce DANI Instruments S.p.A.





Obrázek 16 Plynový chromatograf DANİ Master GC Fast Gas Chromatograph s detektorem FID

Kapilární kolona Zebron™ ZB-5MS, GC kapilární kolona 30 m × 0,25 mm × 0,5 μm, nepolární

Methanol p. a.

### 6.2.2 Metody měření

Každý vzorek byl měřen třemi metodami, které se lišily nastavením chromatografických parametrů na přístroji. V této kapitole jsou metody měření blíže popsány. Všechny metody se shodují v hodnotách objemu nastříkovaného vzorku, 1 μl, a v rychlosti průtoku mobilní fáze, 1 ml · min<sup>-1</sup>.

#### Metoda A

Parametry měření metody A jsou následující: Teplota při nástřiku v injektoru byla nastavena na 200 °C, teplotní gradient byl nastaven od 50 do 230 °C. Teplota se od 50 °C do 120 °C navyšovala rychlostí 6 °C · min<sup>-1</sup>. Dále stoupala teplota rychlostí 15 °C · min<sup>-1</sup> až na 230 °C. Analýza trvala vždy 33,99 minut. Dělič toku mobilní fáze byl v poměru 1:25 s oplachem septa 5 ml · min<sup>-1</sup>. FID detektor byl vyhříván na teplotu 270 °C a odebíraná množství plynů pro plamenově ionizační detektor je pro dusík 25 ml · min<sup>-1</sup>, pro vodík 40 ml · min<sup>-1</sup> a pro vzduch 280 ml · min<sup>-1</sup>.

### Metoda B

Teplota nástřiku v případě metody B byla taktéž nastavena na 200 °C, teplotní gradient byl v rozmezí od 40 °C do 200 °C. První 4 min byla teplota nastavena na 40 °C, poté teplota vystoupala rychlostí 8 °C · min<sup>-1</sup> na 120 °C. Rychlostí ohřevu 15 °C · min<sup>-1</sup> vystoupala teplota až do 200 °C. Celkový čas analýzy byl v tomto případě 28,33 minut. Dělič toku mobilní fáze byl v poměru 1:75 s oplachem septa 5 ml · min<sup>-1</sup>. Detektor udržoval teplotu 240 °C. Množství odebíraných plynů pro FID byla následující: dusík 25 ml · min<sup>-1</sup>, vodík 40 ml · min<sup>-1</sup> a vzduch 280 ml · min<sup>-1</sup>.

### Metoda C

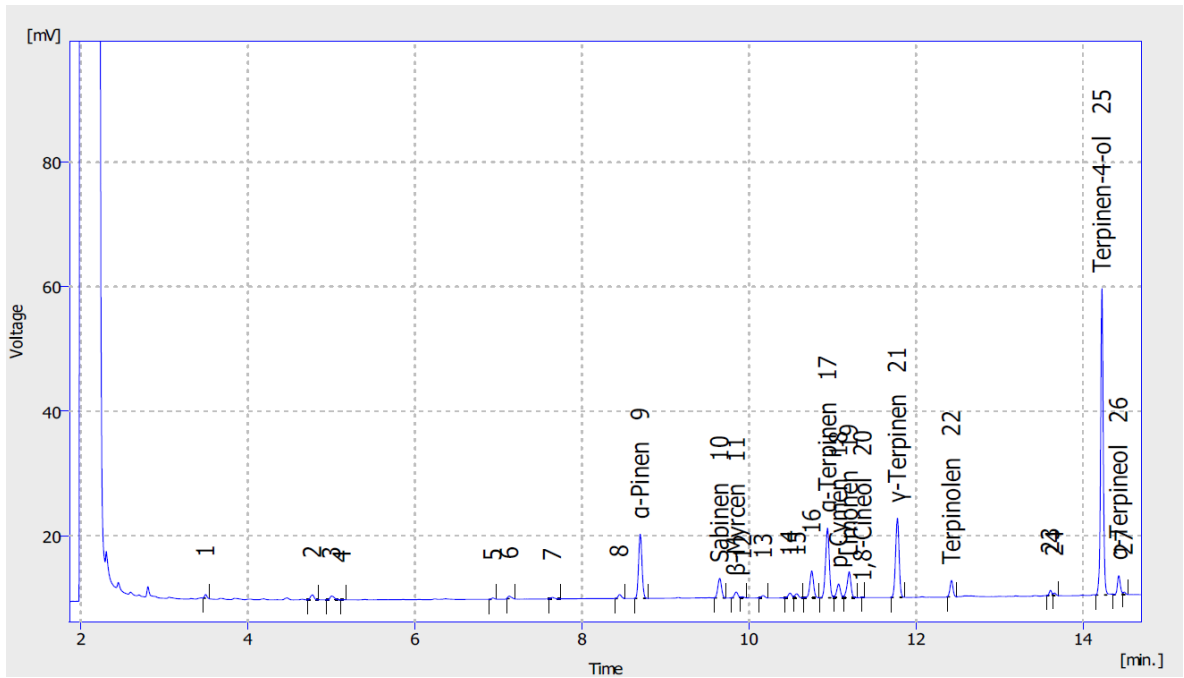
V případě metody C byla teplota nástřiku 220 °C, teplotní gradient se pohyboval od 60 °C do 250 °C. Počátek analýzy byl nastaven na teplotu 60 °C a rychlostí ohřevu 3 °C · min<sup>-1</sup> stoupala teplota až na 250 °C. Doba analýzy byla 63,33 minut. Dělič toku mobilní fáze byl v poměru 1:20 s oplachem septa 5 ml · min<sup>-1</sup>. Detektor byl vyhříván na teplotu 260 °C a množství nosných plynů byly následující: dusík 25 ml · min<sup>-1</sup>, vodík 40 ml · min<sup>-1</sup> a vzduch 280 ml · min<sup>-1</sup>.

### 6.2.3 Výsledky a diskuze

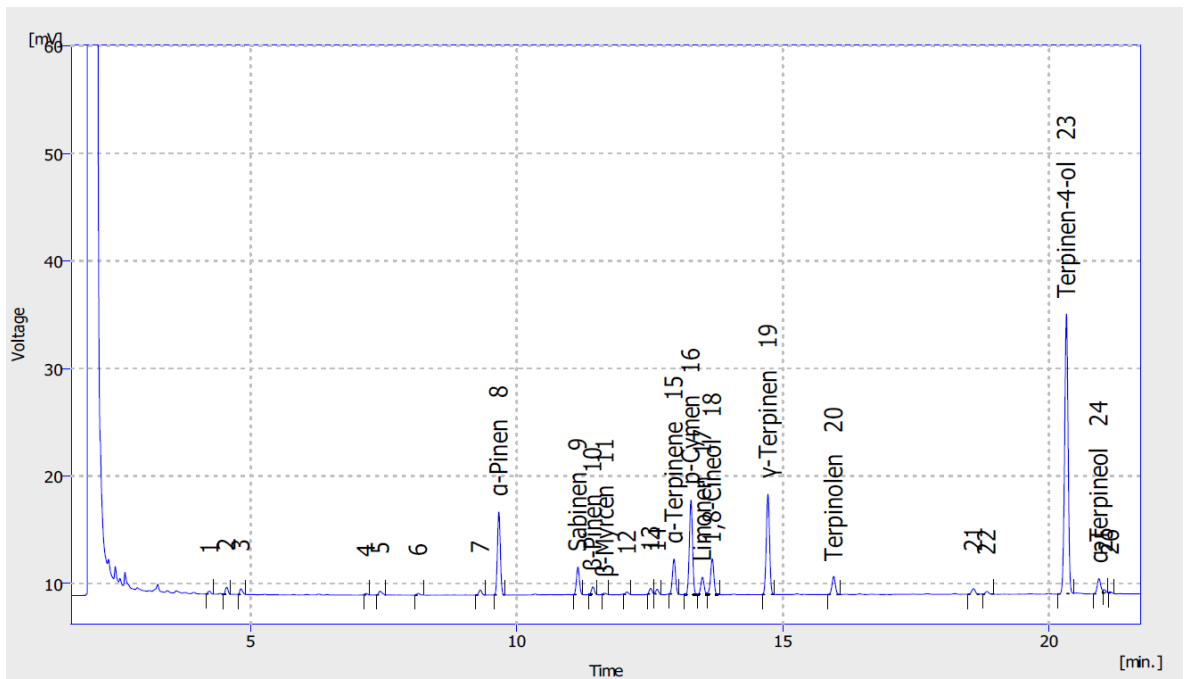
Za účelem prezentace naměřených výsledků byly vybrány chromatogramy tří vzorků, které jsou vyhodnocené také v kapitole 6.3.3, která se týká hmotnostní spektrometrie, konkrétně oleje značky Bewit, Pharma Activ-Australian Original a Renovality. Pro diskuzi výsledků byla zvolena chromatografická metoda A a metoda C, a to z důvodu dostatečných rozdílů v nastavených parametrech měření.

#### **Bewit Franchise s. r. o.**

Výrobce popisuje svůj produkt jako 100% čistý esenciální olej, který má silné, lékařské, kafrové, balzámové a sladkohořké aroma. Olej je původem z Indie a byl získán pomocí parní destilace z větvíček rostliny *Melaleuca alternifolia*. Výrobce udává také výskyt možných alergenů a jejich relativní procentuální zastoupení v esenciálním oleji. Obrázek 17 je výsledný chromatogram vzorku TTO firmy Bewit měřený podle metody A, obrázek 18 představuje chromatogram měřený podle metody C a tabulka 6 udává vyhodnocená data analýzy.



Obrázek 17 Plynový chromatogram pro TTO firmy Bewit, metoda A



Obrázek 18 Plynový chromatogram pro TTO firmy Bewit, metoda C

Tabulka 6 Procentuální zastoupení složek komerčního vzorku TTO firmy Bewit

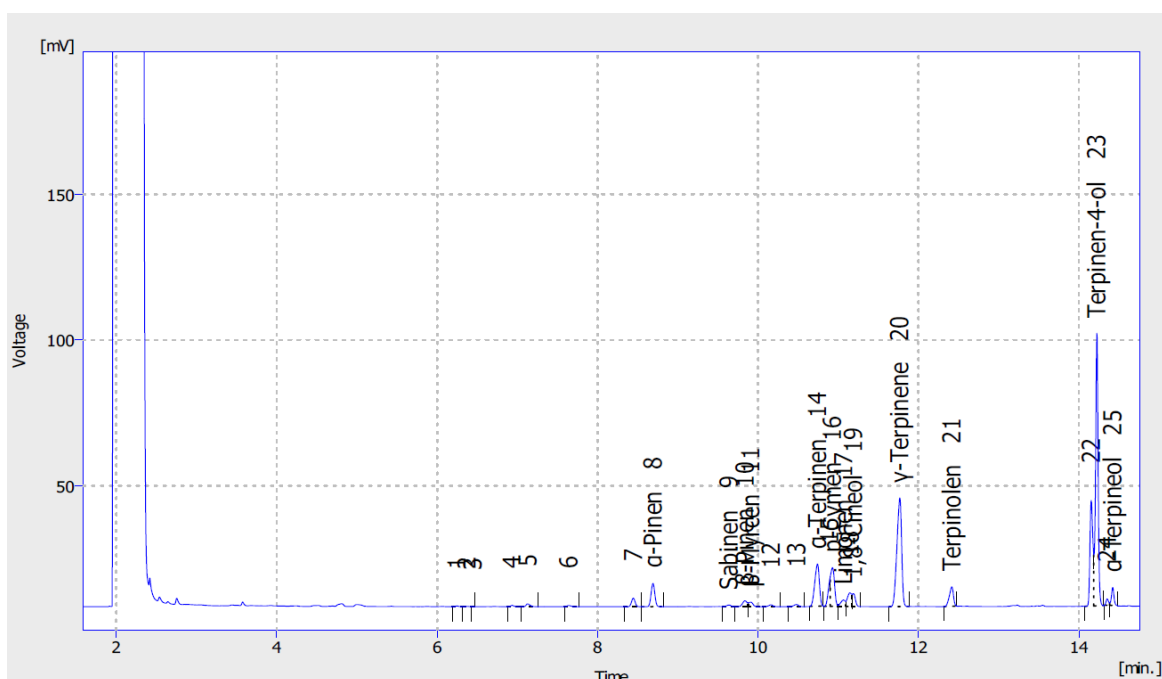
Metoda A				Metoda C			
Složka	Pík	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	Složka	Pík	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]
$\alpha$ -Pinen	9	8,697	9,8	$\alpha$ -Pinen	8	9,663	9,7
Sabinen	10	9,650	3,2	Sabinen	9	11,150	3,2
				$\beta$ -Pinen	10	11,430	0,9
$\beta$ -Myrcen	11	9,847	0,9	$\beta$ -Myrcen	11	11,657	0,1
$\alpha$ -Terpinen	17	10,940	11,5	$\alpha$ -Terpinen	15	12,953	4,3
<i>p</i> -Cymen	18	11,073	2,3	<i>p</i> -Cymen	16	13,273	12,1
Limonen	19	11,200	4,4	Limonen	17	13,490	4,8
1,8-Cineol	20	11,363	tr.	1,8-Cineol	18	13,673	4,8
$\gamma$ -Terpinen	21	11,777	12,5	$\gamma$ -Terpinen	19	14,720	13,1
Terpinolen	22	12,427	2,2	Terpinolen	20	15,953	2,4
Terpinen-4-ol	25	14,227	35,8	Terpinen-4-ol	23	20,327	38,7
$\alpha$ -Terpineol	26	14,427	2,5	$\alpha$ -Terpineol	24	20,937	2,1

V případě metody A se podařilo identifikovat 11 jednotlivých složek, u metody C bylo identifikováno celkem 12 složek. Koncentrace  $\alpha$ -terpinenu a *p*-cymenu a 1,8-cineolu se od sebe v rámci metod poměrně výrazně lišily. Koncentrace  $\alpha$ -terpinenu byla při měření metodou A 11,5 %, zatímco při měření metodou C jen 4,8 %. Koncentrace *p*-cymenu v případě metody A byla 2,3 %, v případě metody C až 12,1 %. Při vyhodnocení chromatogramu pro metodu A byl zaznamenán pík s plochou 0 %, který byl určen jako 1,8-cineol. Byl tak určen z důvodu retenčního času a umístění píku, které je typické pro tuto složku při porovnání s ostatními chromatogramy pro metodu A.

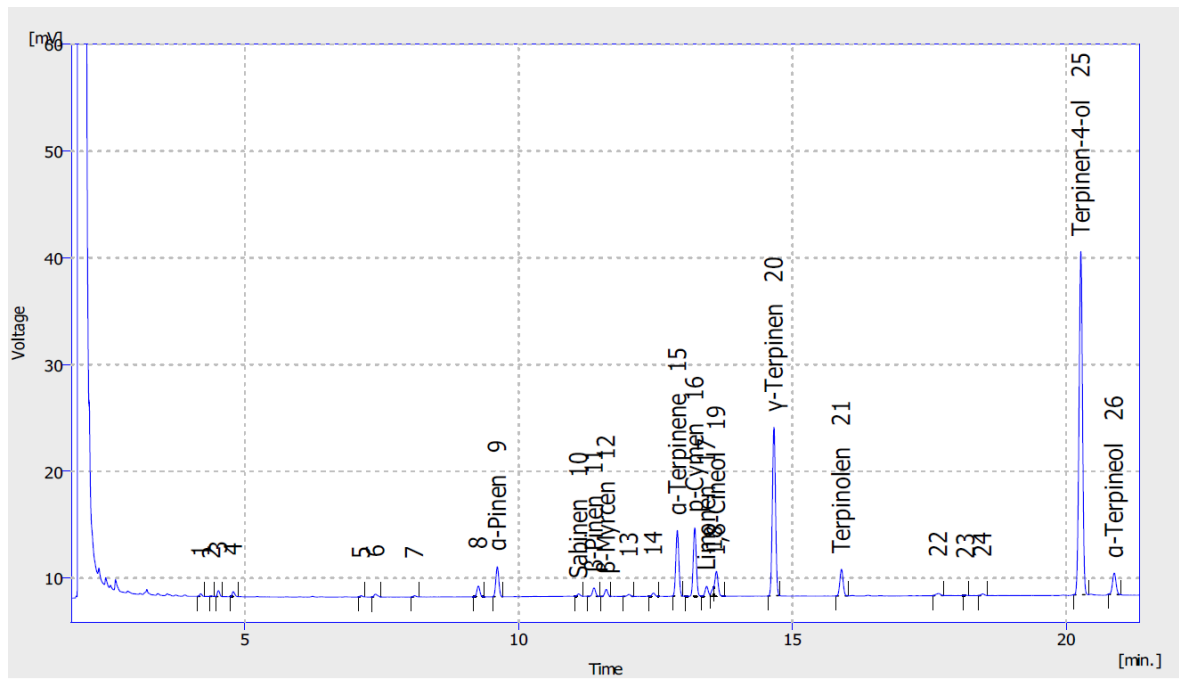
Následující složky nesplňovaly koncentrační limity dané ISO 4730:2017 normou. Koncentrace  $\alpha$ -pinenu (9,8 %; 9,7 %) překračovaly maximální možnou koncentraci 4,0 %. V případě *p*-cymenu tomu bylo taktéž, pouze však při metodě C, kdy byla koncentrace překročena o 4,1 %. Koncentrace limonenu a  $\alpha$ -terpinenu byly překročeny v obou metodách. Naopak nízké koncentrační zastoupení vykazuje  $\gamma$ -terpinen při metodě C, jeho koncentrace byla naměřena na 4,3 %, ISO norma udává minimální koncentraci 6 %.

### Pharma Activ-Australian Original

Vzorek společnosti Pharma Activ řady Australian Original je podle dostupného analytického certifikátu poskytnutého dodavatelem čirá kapalina charakteristického zápachu, původem z Austrálie. Kromě toho jsou v certifikátu dodavatelem poskytnuté údaje o fyzikálních vlastnostech esenciálního oleje jako je relativní hustota při 20 °C (0,885–0,906), index lomu při 20 °C (1,475–1,482), dále optická otáčivost při 20 °C a rozpustnost v ethanolu. Následující obrázek 19 a obrázek 20 představují chromatogramy pro metodu měření A a C a dále následuje tabulka 7, která obsahuje naměřená data, tedy retenční časy a relativní obsah plochy pod křivkou píku v procentech.



Obrázek 19 Plynový chromatogram pro TTO firmy Pharma Activ-Australian Original, metoda A



Obrázek 20 Plynový chromatogram pro TTO firmy Pharma Activ-Australian Original, metoda C

Tabulka 7 Procentuální zastoupení složek komerčního vzorku TTO firmy Pharma Activ-Australian Original

Metoda A				Metoda C			
Složka	Pík	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	Složka	Pík	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]
$\alpha$ -Pinen	8	8,690	3,4	$\alpha$ -Pinen	9	9,610	3,3
Sabinen	9	9,640	0,3	Sabinen	10	11,097	0,3
$\beta$ -Pinen	10	9,837	1,0	$\beta$ -Pinen	11	11,377	1,0
$\beta$ -Myrcen	11	9,910	0,8	$\beta$ -Myrcen	12	11,600	0,8
$\alpha$ -Terpinen	14	10,740	7,6	$\alpha$ -Terpinen	15	12,900	7,4
<i>p</i> -Cymen	16	10,927	6,0	<i>p</i> -Cymen	16	13,217	7,7
Limonen	17	11,067	1,1	Limonen	17	13,433	1,2
1,8-Cineol	19	11,190	1,7	1,8-Cineol	19	13,613	3,0
$\gamma$ -Terpinen	20	11,767	20,2	$\gamma$ -Terpinen	20	14,663	19,7
Terpinolen	21	12,417	3,1	Terpinolen	21	15,897	3,2
-	22	14,153	12,0				
Terpinen-4-ol	23	14,223	27,6	Terpinen-4-ol	25	20,267	44,2
$\alpha$ -Terpineol	25	14,420	1,8	$\alpha$ -Terpineol	26	20,877	2,8

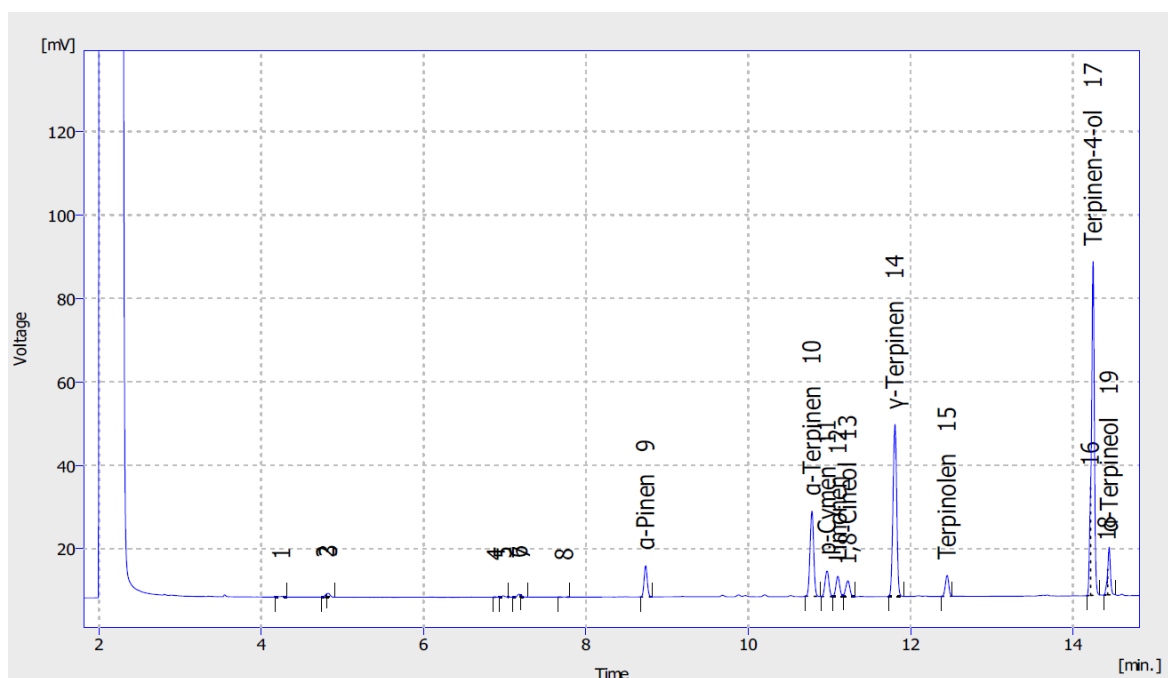
Hodnoty koncentrací jednotlivých analytů se od sebe v rámci metod výrazně neliší, s výjimkou tří složek – 1,8-cineol, terpinen-4-ol a  $\alpha$ -terpineol. Naměřené koncentrace 1,8-cineolu se od sebe v rámci dvou hodnocených metod liší o 1,3 %. Koncentrace sloučeniny  $\alpha$ -terpineol se od sebe liší o 1 %. Nejvýraznější rozdíl nastává u terpinen-4-olu, kdy jeho koncentrace při měření metodou A odpovídá 27,6 %, zatímco při měření metodou C je 44,2 %. V chromatogramu metody A si lze všimnout děleného neidentifikovaného píku číslo 22 s retenčním časem 14,153 a s plochou 12 %. Při sečtení koncentrace 27,6 % terpinen-4-olu a 12% koncentrace této neidentifikované složky dostaneme 39,6 %. Tato hodnota odpovídá zastoupení terpinen-4-olu v TTO a lze tak tvrdit, že došlo při měření k rozdělení píku této složky.

Všechny identifikované látky a jejich koncentrační zastoupení ve vzorku odpovídá aktuální ISO normě s výjimkou dvou – terpinen-4-ol a  $\alpha$ -terpineol. Koncentrace terpinen-4-olu

měřená metodou A (27,6 %) je nižší než udávané koncentrační minimum v ISO normě (35,0 %) a liší se o 7,4 %. Složka  $\alpha$ -terpineol by také nespĺňovala nutné minimální zastoupení ve vzorku, ale pouze o 0,2 %. Koncentrace *p*-cymenu (6,0 %; 7,7 %) odpovídají ISO normě, hodnoty jsou ale výrazně vyšší než v případě ostatních analyzovaných vzorků, čehož si lze všimnout v souhrnné tabulce přílohy P IV.

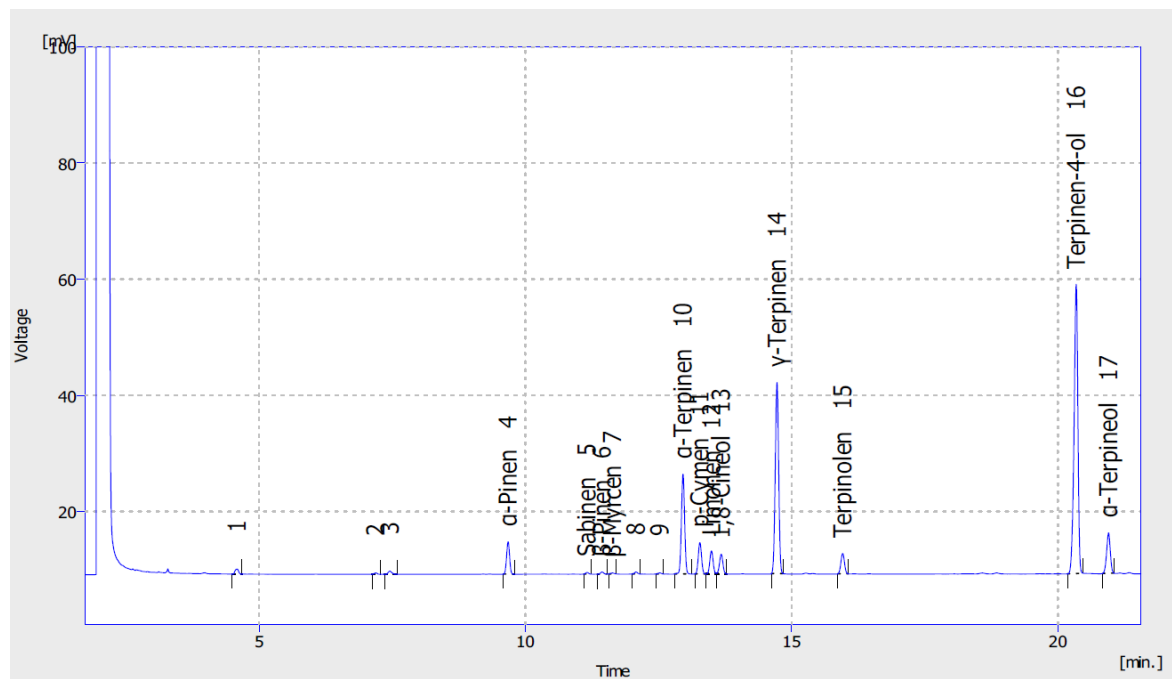
### Renovality

Společnost Renovality uvádí na svých oficiálních webových stránkách, že se jedná o olej z lístků australského stromu *Melaleuca alternifolia*, který má antiseptický a protiplísňový účinek. Udává stupeň komedogenity (0) a doporučený způsob aplikace. V seznamu ingrediencí je kromě *Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Leaf oil – Tea Tree olej* uveden také  $\alpha$ -pinen. Seznam ingrediencí však neuvádí možné alergeny jako je například limonen. Obrázek 21 a obrázek 22 výsledné chromatogramy pro vzorek TTO firmy Renovality, tabulka 8 je vyhodnocením těchto chromatogramů.



Obrázek 21 Plynový chromatogram pro TTO firmy Renovality, metoda A





Obrázek 22 Plynový chromatogram pro TTO firmy Renovality, metoda C

Tabulka 8 Procentuální zastoupení složek komerčního vzorku TTO firmy Renovality

Metoda A				Metoda C			
Složka	Pík	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	Složka	Pík	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]
$\alpha$ -Pinen	9	8,737	3,8	$\alpha$ -Pinen	4	9,677	3,6
				Sabinen	5	11,157	0,2
				$\beta$ -Pinen	6	11,440	1,2
				$\beta$ -Myrcen	7	11,637	0,1
$\alpha$ -Terpinen	10	10,783	12,0	$\alpha$ -Terpinen	10	12,960	12,0
<i>p</i> -Cymen	11	10,970	3,8	<i>p</i> -Cymen	11	13,277	3,8
Limonen	12	11,103	2,9	Limonen	12	13,497	2,8
1,8-Cineol	13	11,227	2,5	1,8-Cineol	13	13,680	2,5
$\gamma$ -Terpinen	14	11,807	24,6	$\gamma$ -Terpinen	14	14,727	24,2
Terpinolen	15	12,450	2,7	Terpinolen	15	15,960	2,7
-	16	14,213	4,4				
Terpinen-4-ol	17	14,250	34,3	Terpinen-4-ol	16	20,343	40,8
-	18	14,423	1,0				
$\alpha$ -Terpineol	19	14,447	4,2	$\alpha$ -Terpineol	17	20,953	5,5

Je zřejmé, že složky sabinen,  $\beta$ -pinen a  $\beta$ -myrcen neposkytly během měření metodou A žádnou výraznou odezvu. Charakteristické píky jsou v chromatogramu (obrázek 21) viditelné v okolí retenčního času desáté minuty, nebyly však z důvodu stopového množství pojmenovány. V případě terpinen-4-olu poskytly metody měření různá koncentrační zastoupení. Metoda A vyhodnotila jeho koncentraci 34,3 %, metoda C pak až 40,8 %. Důvodem mohlo být opět rozdělení píku této složky. V chromatogramu metody A je vyznačen nepojmenovaný pík číslo 16 s retenčním časem 14,312 a procentuálním zastoupením 4,4 %. Při součtu koncentrace terpinen-4-olu 34,3 % a plochy tohoto píku dostaneme 38,7 %, což již odpovídá normálnímu zastoupení terpinen-4-olu v TTO a také se blíží koncentraci při měření metodou C. Také naměřené koncentrace  $\alpha$ -terpineolu se v rámci metod lišily. V chromatogramu metody A lze pozorovat neidentifikovaný pík 18 s retenčním časem 14,423 a plochou 1,0 %. Pokud tuto koncentraci složky přičteme k vyhodnocenému

koncentračnímu zastoupení  $\alpha$ -terpineolu 4,2 %, rovná se výsledná koncentrace  $\alpha$ -terpineolu 5,2 %. Tato hodnota se již blíží koncentraci složky naměřené pomocí metody C 5,5 %.

Při porovnání s ISO 4730:2017 normou představovaly složky limonen a  $\alpha$ -terpineol (metoda C) látky, které byly přítomné v koncentračním nadbytku. Obsah limonenu je povolen pouze do 1,5 %, avšak v případě obou metod byla tato hranice překročena o 1,4 % a o 1 %. V případě metody C analyt  $\alpha$ -terpineol taktéž nesplnil horní hranici ISO normy o 0,5 %, naopak při měření metodou A nebyla splněna spodní koncentrační hranice o 1 %. Koncentrace terpinen-4-olu byla při měření metodou A nižší, než udává aktuální ISO norma. Podle starší ISO 4730:2004 normy by však byly hodnoty vyhovující.

V plynových chromatogramech firmy Atok a Salus, které jsou uvedené v příloze diplomové práce, také pravděpodobně došlo k rozdělení píků. Při analýze vzorku firmy Atok byla koncentrace terpinen-4-olu při metodě A vyhodnocena na 31,4 % a při metodě C na 22,9 %. Chromatogram při metodě A vykazuje vedlejší pík s retenčním časem 14,153 a plochou 4,9 %. Při sečtení uvedené koncentrace 31,4 % a 4,9 % bude výsledná koncentrace terpinen-4-olu 36,3 %. V případě téhož vzorku firmy Atok při měření metodou C byla koncentrace terpinen-4-olu stanovena na 22,9 %. Také zde figuruje vedlejší neidentifikovaný pík, který má retenčním časem 20,167 a plochu 13,6 %. Při sečtení koncentrací 22,9 % a 13,6 % bude výsledná koncentrace terpinen-4-olu 36,6 %. Výsledné koncentrace terpinen-4-olu v obou metodách se sobě již výrazně blíží.

Při měření vzorku firmy Salus pomocí metody A došlo pravděpodobně k rozdělení píků složky terpinen-4-olu a také  $\gamma$ -terpinenu. V příloženém chromatogramu je koncentrace terpinen-4-olu vyhodnocena na 24,3 %, ale i zde se vyskytuje vedlejší nepojmenovaný pík s retenčním časem 14,167 a plochou 10,9 %. Po sečtení těchto procentuálních hodnot je výsledná koncentrace 35,2 %. Koncentrace terpinen-4-olu v TTO firmy Salus naměřená metodou C byla 39,6 %. Nesrovnalosti byly nalezené při koncentracích  $\gamma$ -terpinenu měřených metodou A (15,5 %) a metodou C (23,3 %). V případě metody A lze pozorovat vedlejší pík s retenčním časem 11,787 a plochou 7,8 %. Po sečtení ploch obou píků v metodě A dojdeme k výsledné koncentraci 23,1 %, která se nápadně blíží koncentraci dané složky měřené metodou C.

Všechny chromatogramy mají společnou charakteristiku dvou skupin píků, které se soustřeďují blízko sebe. První skupinu píků tvoří sabinen,  $\beta$ -pinen a  $\beta$ -myrcen. Do druhé

charakteristické skupiny patří  $\alpha$ -terpinen, *p*-cymen, limonen a 1,8-cineol. Tento poznatek může pomoci při identifikaci neznámého vzorku.

V závěru kapitoly 6.3.3 budou diskutovány výsledky GC-FID a GC-MS analýzy s publikovanými studiemi.

### 6.3 Hmotnostní spektrometrie

Pro upřesnění již naměřených hodnot z plynové chromatografie, a také pro identifikaci složek, které přes plynovou chromatografii nebylo možné určit, byla provedena analýza pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem. Měření probíhalo na Shimadzu GC-MS – QP2010 SE s elektronovou ionizací a jak uvádí oficiální stránka výrobce, jedná se o kvadrupólový chromatograf s hmotnostním detektorem nabízející stabilní a nákladově efektivní analýzu i náročnějších sloučenin. Vysoce výkonný kvadrupólový hmotnostní filtr zajišťuje vysokou citlivost v kvalitativní i kvantitativní analýze. Pomocí plynové chromatografie dochází k separaci analytů, které jsou následně podrobeny analýze hmotnostní spektrometrie. Vyhodnocovací software GCMSsolution umožnil vyhodnocení výsledných chromatogramů uvedených dále v kapitole 6.3.3.

#### 6.3.1 Použité přístroje, vybavení a chemikálie

Laboratorní sklo – vialky (N9 2ml včetně uzávěru a septa)

Plynový chromatograf-hmotnostní spektrometr GCMS-QP2010 SE Shimadzu, Japonsko.



Obrázek 23 Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 SE Shimadzu

Automatická pipeta Eppendorf Research, 100–1000  $\mu\text{l}$

Mikrostríkačka (Hamilton 10, Gastight 1701)

Ethyl-acetát a methanol, p. a.

### 6.3.2 Metody měření

Měřené vzorky byly naředěné v poměru 1:1000 v ethyl-acetátu nebo methanolu vysoké čistoty určené pro analýzu. Byly nastavené parametry analýzy a díky možnosti automatického dávkování vzorků ponechané přes noc k měření.

Pro analýzu byly použita chromatografická kolona Equity<sup>TM</sup> s rozměry 30 m  $\times$  0,32 mm  $\times$  1,0  $\mu\text{m}$  od výrobce Supelco. Nastavené parametry měření pro každý vzorek byly následující: teplotní profil na koloně byl 40  $^{\circ}\text{C}$  na počátku po dobu 7 minut poté došlo k ohřevu na 250  $^{\circ}\text{C}$  rychlostí 25  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ , při 250  $^{\circ}\text{C}$  termostat drží teplotu 44,6 minuty; teplota injektoru 250  $^{\circ}\text{C}$ ; nástřiková splitovací technika; splitovací poměr 100:1; tlak 33,5 kPa, celkový průtok 216,2  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; průtok kolonou 2,11  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; plamenový termionizační splitovací detektor; teplota iontového zdroje 200  $^{\circ}\text{C}$ ; teplota interface 250  $^{\circ}\text{C}$ . Chromatogramy byly vyhodnocené pomocí software GCMSsolution a dostupné knihovny hmotnostních spekter.

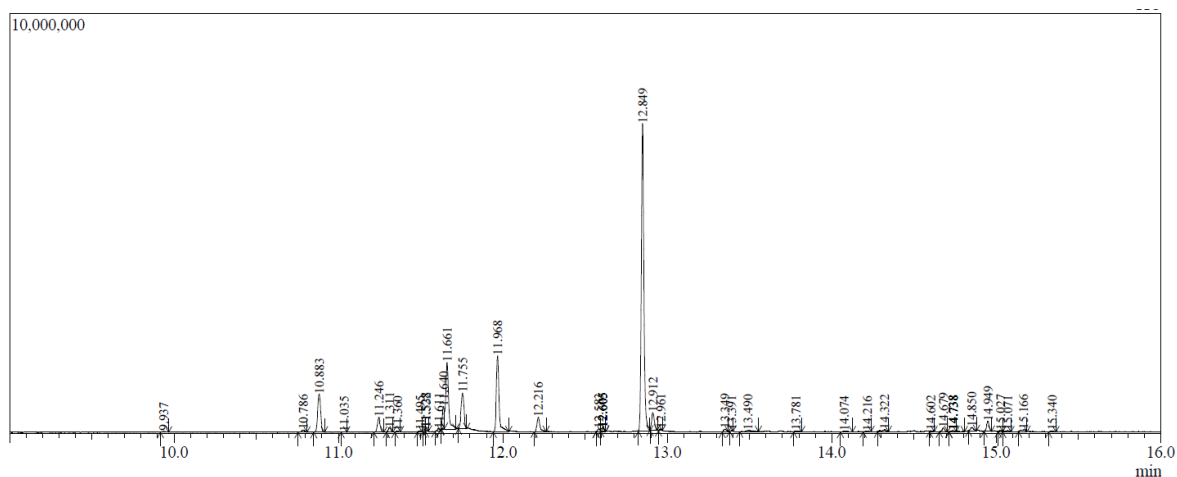
Před konečným vyhodnocením došlo vždy k manuální integraci jednotlivých píků, poté byl manuálně určen počátek a konec píku a došlo k subtrakci okolní baseline pro přesnější identifikaci složky.

### 6.3.3 Výsledky a diskuze

Pro reprezentaci naměřených výsledků byly vybrány tři vzorky firem Bewit, Renovality a Australian Original.

#### **Bewit Franchise s. r. o.**

Obrázek 24 znázorňuje zpracovaný chromatogram vzorku čajovníkového oleje firmy Bewit. Tabulka 9 je souhrnné vyhodnocení chromatogramu, kde jsou zmíněné identifikované složky, jejich retenční čas, plocha píku, tedy poměr látek vůči sobě při daném měření, a pravděpodobnost správnosti určení složky. Bližší popis tohoto TTO je zmíněný v kapitole 6.2.3.



Obrázek 24 Hmotnostní chromatogram vzorku firmy Bewit

Tabulka 9 Vyhodnocení chromatogramu pro vzorek firmy Bewit

Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]	Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]
$\alpha$ -Thujen	10,786	0,43	93	$\beta$ -Terpinol	12,583	0,47	84
$\alpha$ -Pinen	10,883	6,27	98	<i>trans</i> -Pinokarveol	12,605	1,09	94
(+)-Sabinen	11,246	2,29	94	Terpinen-4-ol	12,849	44,33	95
$\beta$ -Pinen	11,311	0,62	89	$\alpha$ -Terpineol	12,912	2,69	94
$\beta$ -Myrcen	11,360	0,12	83	$\gamma$ -Terpineol	12,961	0,19	88
$\alpha$ -Felandren	11,532	0,25	92	Thujol	13,391	0,07	74
$\alpha$ -Terpinen	11,640	2,49	92	(+)-Aromadendren	14,602	0,14	84
<i>p</i> -Cymen	11,661	11,25	95	Humulen	14,679	0,60	91
1,8-Cineol	11,755	5,64	91	Isoaromadendren	14,850	0,61	80
$\gamma$ -Terpinen	11,968	11,35	94	$\delta$ -Kadinen	14,949	1,44	83
$\alpha$ -Terpinolen	12,216	2,27	94				

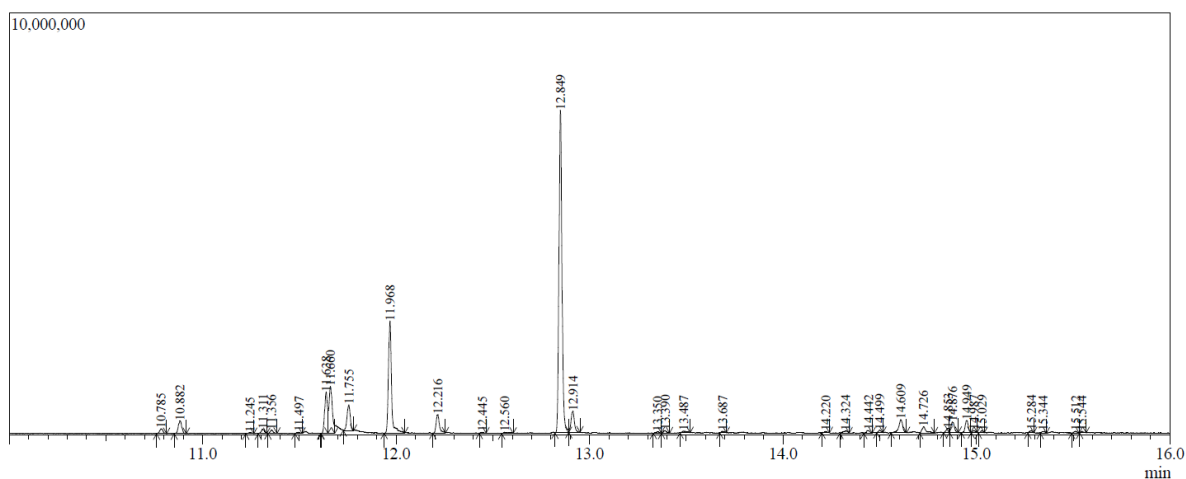
s. p. – spektrální podobnost s knihovnou spekter

Při analýze čajovníkového oleje firmy Bewit bylo rozpoznáno pomocí GC-MS analýzy celkem 22 složek. Koncentrace terpinen-4-olu, jakožto hlavní aktivní složky, je v souladu s ISO 4730:2017 normou, taktéž je tomu v případě 1,8-cineolu, který je degradačním produktem. Zdá se, že mírně zvýšené množství 1,8-cineolu nemělo velký dopad na případné snížení koncentrace terpinen-4-olu. Nápadně zvýšené koncentrace si je možné všimnout

u  $\alpha$ -pinenu a  $p$ -cymenu. Podle ISO normy je mezní koncentrace  $\alpha$ -pinenu 4,00 %, v tomto vzorku je obsažen v 6,27 %. ISO norma dále udává hraniční koncentraci  $p$ -cymenu 8,00 %, zde bylo zjištěno 11,25 %. Naopak nižší koncentrace, než je přípustné byly zjištěny u  $\gamma$ -terpinenu a aromadendrenu. Je ale nutné zmínit, že složka aromadendren byla identifikována jen s 84% spektrální podobností s knihovnou spekter. Tyto odchylky neměly dopad na organoleptické vlastnosti oleje.

### Pharma Activ-Australian Original

Fyzikální vlastnosti esenciálního čajovníkového oleje této firmy byly již popsány v kapitole 6.2.3. Obrázek 25 je výsledný chromatogram čajovníkového oleje dané firmy a tabulka 10 prezentuje jeho data.



Obrázek 25 Hmotnostní chromatogram vzorku firmy Pharma Activ-Australian Original

Tabulka 10 Vyhodnocení chromatogramu pro vzorek firmy  
Pharma Activ-Australian Original

Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]	Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha a [%]	s. p. [%]
$\alpha$ -Thujen	10,785	0,74	96	<i>cis</i> -Sabinen hydrát	12,445	0,13	84
$\alpha$ -Pinen	10,882	1,96	97	Terpinen-4-ol	12,849	42,83	95
(+)-Sabinen	11,245	0,17	86	$\alpha$ -Terpineol	12,914	3,04	93
$\beta$ -Pinen	11,311	0,63	96	Thujol	13,390	0,3	75
$\beta$ -Myrcen	11,356	0,46	91	Isoleden	13,487	0,41	84
$\alpha$ -Terpinen	11,638	5,22	93	(+)-Aromadendren	14,602	2,39	93
<i>p</i> -Cymen	11,660	12,12	92	Viridifloren	14,876	1,64	91
1,8-Cineol	11,755	3,48	86	$\delta$ -Kadinen	14,949	1,60	85
$\gamma$ -Terpinen	11,968	15,14	96	$\beta$ -Kadinen	14,987	0,22	83
$\alpha$ -Terpinolen	12,216	2,73	94				

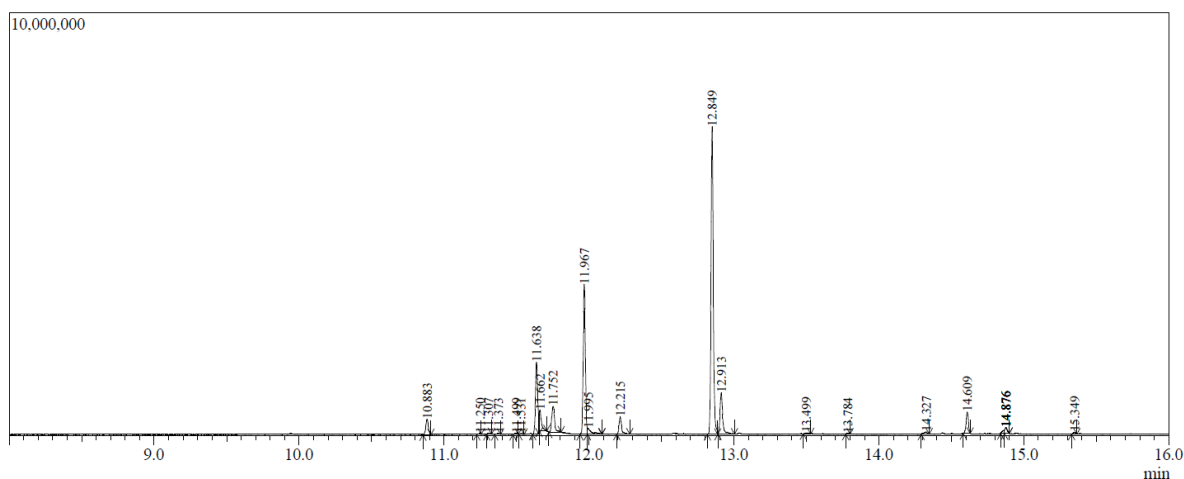
s. p. – spektrální podobnost s knihovnou spekter

Ve vzorku firmy Australian Original bylo určeno celkem 19 složek čajovníkového oleje. Když přihlédneme k ISO normě, kromě *p*-cymenu a  $\delta$ -kadinenu nebyla při vyhodnocování nalezená žádná odchylka v koncentračním zastoupení. Zastoupení *p*-cymenu ve vzorku odpovídalo 12,12 %, kdežto povolený koncentrační interval této složky se rovná 0,5–8,0 %. Dále  $\delta$ -kadinen, který byl ve vzorku z 1,60 %, avšak jeho povolené koncentrace se pohybují od 0,2 % do 3,0 %. Tato složka byla však správně identifikována pouze z 85 %, proto nemá toto tvrzení požadovanou výpovědní hodnotu. Ani v případě tohoto vzorku nebyly ovlivněny organoleptické vlastnosti produktu.

### Renovality

Informace o zakoupeném produktu udávané výrobcem jsou již zmíněné v kapitole 6.2.3. Obrázek 26 představuje hmotnostní chromatogram vzorku esenciálního oleje firmy Renovality v tabulce 11 jsou vypsané identifikované analyty s retenčními časy, poměrovým zastoupením a spektrální podobností.





Obrázek 26 Hmotnostní chromatogram vzorku firmy Renovality

Tabulka 11 Vyhodnocení chromatogramu pro vzorek firmy Renovality

Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]	Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]
$\alpha$ -Pinen	10,883	2,35	96	$\gamma$ -Terpinen	11,967	21,09	96
(+)-Sabinen	11,245	0,12	85	(+)-2-Karen	12,215	2,60	92
$\beta$ -Pinen	11,307	0,16	84	Terpinen-4-ol	12,849	42,10	95
$\alpha$ -Felandren	11,531	0,12	83	$\alpha$ -Terpineol	12,913	6,62	94
$\alpha$ -Terpinen	11,638	9,74	94	(+)-Aromadendren	14,609	3,07	95
<i>p</i> -Cymen	11,662	2,71	82	Viridifloren	14,876	1,29	87
1,8-Cineol	11,752	4,4	84				

s. p. – spektrální podobnost s knihovnou spekter

Při hmotnostní analýze vzorku firmy Renovality bylo určeno 15 analytů. Všechny identifikované složky se pohybují v rámci stanovených koncentrací dle ISO 4730:2017 normy s výjimkou  $\alpha$ -terpineolu a (+)-aromadendrenu. S koncentrací 6,62 % se  $\alpha$ -terpineol nenachází ve daném intervalu 2,0–5,0 %. Koncentrace (+)-aromadendrenu 3,07 % jen mírně překračuje limitní koncentraci danou ISO normou 3,0 %. Obě tyto složky byly určeny správně s pravděpodobností přesahující 90 %.

Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem sloužila především k identifikaci složek čajovníkového oleje, které nebyly pomocí konvenční plynové chromatografie určeny. Důvodem problematického určení pomocí plynové chromatografie mohl být delší retenční čas, a tedy pozdější odezva těchto dodatečně určených složek. Díky ISO normě a literárním

zdrojům bylo jisté, že bylo potřeba tyto složky dodatečně identifikovat. Mezi složky, které byly identifikovány později pomocí GC-MS analýzy byly zařazeny tyto:  $\alpha$ -thujen, *cis*-sabinen hydrát, thujol, isoleden, (+)-aromadendren, isoaromadendren, *trans*pinokarveol, humulen, viridifloren,  $\beta$ -kadinen,  $\beta$ -kadinen,  $\alpha$ -felandren a (+)-2-karen. Naopak známý seskviterpen viridiflorol, který je i podle ISO normy v čajovníkovém oleji obsažen, se nepovedlo identifikovat v žádném z analyzovaných vzorků. Literární zdroje uvádí koncentrační zastoupení viridiflorolu: de Groot a Schmidt (0,08–0,8 %); Shellie (0,06–0,2 %); Brophy (0,1–1,4 %); Southwell (0,3–0,7 %) [11, s. 815] [72, s. 311] [58, s. 1333] [73, s. 16]. Adams [74, s. 568] uvedl retenční čas viridiflorolu 32,58 min při měření pomocí MS. Pro identifikaci viridiflorolu v čajovníkovém oleji lze provést porovnání se standardní látkou, která bude naměřená plynovou chromatografií pomocí metod A, B a C.

Na závěr kapitoly budou naměřené hodnoty diskutované s výsledky dostupných studií zabývajících se GC a GC-MS analýzou čajovníkového oleje.

#### Tabulka 12

Tabulka 12 obsahuje souhrn naměřených dat čtyř publikací, které se zabývaly GC, případně GC-MC analýzou, čajovníkového oleje. V posledním sloupci tabulky jsou vypsané souhrnné koncentrační intervaly v rámci obou hodnocených metod měření vlastních komerčních vzorků. Tato tabulka se zaměřuje pouze na prvních sedm složek s většinovým zastoupením v čajovníkovém oleji podle ISO 4730 normy.

Tabulka 12 Porovnání vlastních a publikovaných výsledků pro GC a GC-MS analýzu

Složka	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	E [%]
Terpinen-4-ol	6,2–44,9	34,9–44,0	40,1	30,1–33,1	24,3–48,6
$\gamma$ -Terpinen	3,1–23,0	21,1–22,5	23,0	6,9–19,2	12,5–27,4
$\alpha$ -Terpinen	2,3–11,7	8,5–10,6	10,4	1,2–10,2	7,4–13,5
$\alpha$ -Terpineol	1,9–4,2	2,4–2,8	2,4	3,4–4,8	1,5–4,6
Terpinolen	0,04–45,7	3,1–3,6	3,1	1,6–3,8	2,2–4,0
<i>p</i> -Cymen	0,3–19,4	2,5–3,2	2,9	2,9–19,9	1,7–12,1
1,8-Cineol	0,5–18,3	2,5–3,2	5,1	5,1–5,4	0,0–5,6

A – De Groot [11], B – Shellie [72], C – Brophy [58], D – Southwell [73], E – vlastní data

Při srovnání vlastních dat s publikovanými hodnotami lze vypořádat následující skutečnosti. Koncentrace terpinen-4-olu z vlastního měření byla s odstupem nejvyšší,

48,6 % této složky bylo naměřeno ve vzorku firmy Nobilis Tilia. Vysoká míra koncentrace této aktivní složky určuje kvalitu esenciálního oleje, a i přesto, že hodnota v tomto případě překračuje aktuální ISO 4730:2017 normu, lze tvrdit, že se jedná o kvalitní produkt. Také v případě  $\gamma$ -terpinenu pocházela nejvyšší naměřená hodnota 27,4 % z vlastního měření a týkala se vzorku slovenské společnosti Ľuli a Ľuli. Vzorek firmy Pharma Activ vykazoval nejvyšší koncentrační hodnoty  $\alpha$ -terpinenu, 13,5 %, zároveň však překročil limitní koncentrace dané ISO normou. Složka  $\alpha$ -terpinen je známá jako antioxidační komponenta čajovníkového oleje, který na vzduchu velmi rychle degraduje na produkty, jako jsou allylové epoxidy, *p*-cymen a peroxid vodíku [75, s. 713]. Další nápadná hodnota je 0,0 % 1,8-cineolu ve vlastním měření. Tato hodnota se týká pouze měření vzorku firmy Bewit metodou A, v případě metody C byla koncentrace této složky 4,8 %, což vyhovuje také ISO normě. Ostatní hodnoty vlastního měření buď spadají do intervalu naměřených dat publikací, nebo se od nich výrazně neodchylují.

## 6.4 Index lomu

Index lomu esenciálních olejů je podstatným charakteristickým znakem určující jejich kvalitu. Tato fyzikální veličina určuje poměr rychlosti šíření světla ve dvou různě opticky hustých prostředích. K měření byl použit analogový refraktometr typu Abbého refraktometru firmy A. Krüss Optronic GmbH s rozsahem měření 1,3000–1,7200. Jako prisma slouží optické sklo a jako zdroj světla LED osvětlení s vlnovou délkou 589 nm. Pro přesnost měření je v technickém listu společnosti uvedený interval  $n \pm 0,0002$ .

### 6.4.1 Použité přístroje, vybavení a chemikálie

Refraktometr A. Krüss Optronic GmbH



Obrázek 27 Refraktometr A. Krüss Optronic GmbH

Temperovací chladič Isotemp, Fischer Scientific

Ethanol (96%, neutrální)

#### **6.4.2 Postup měření**

Pro udržení stálé teploty byl použit temperovací chladič Isotemp firmy Fischer Scientific. Temperovací teplota se v průběhu měření pohybovala v intervalu od 25,3 °C do 25,7 °C. Mezi stěny hranolů byl aplikován vzorek TTO a po vhodném zaostření byl na stupnici dalekohledu odečten index lomu pro vlnovou délku 589 nm. Po každém měření byla plocha hranolů očištěná 96% ethanolem a měření probíhalo proti vodě, jakožto standardu. Každý vzorek byl takto měřen třikrát za sebou, z naměřených hodnot je vypočítaná průměrná hodnota indexu lomu  $n$  pro každý vzorek.

## 6.4.3 Výsledky a diskuze

Tabulka 13 Hodnoty indexu lomu  $n$  komerčních vzorků čajovníkového oleje

Název vzorku	Index lomu $n$ [1]	Průměrná hodnota $n$ [1]	Název vzorku	Index lomu $n$ [1]	Průměrná hodnota $n$ [1]
Atok	1,4734	1,4737 ± 0,0008	Pajoma	1,4739	1,4736 ± 0,0006
	1,4739			1,4735	
	1,4739			1,4735	
Australian Bodycare	1,4749	1,47497 ± 0,00015	Pharma Activ	1,4738	1,4738 ± 0
	1,4750			1,4738	
	1,4750			1,4738	
Pharma Activ- Australian Original	1,4737	1,4736 ± 0,0003	Primavera	1,4745	1,4746 ± 0,0003
	1,4737			1,4747	
	1,4735			1,4746	
Bewit	1,4740	1,47393 ± 0,00015	Renovality	1,4736	1,4736 ± 0,0004
	1,4739			1,4738	
	1,4739			1,4735	
Bylinná lékárna	1,4736	1,47363 ± 0,00015	Salus	1,4741	1,4742 ± 0,0004
	1,4737			1,4743	
	1,4736			1,4741	
Dr. Müller Pharma	1,4733	1,4734 ± 0,0003	Tierra Verde	1,4734	1,4734 ± 0
	1,4734			1,4734	
	1,4735			1,4734	
Karel Hádek	1,4739	1,47393 ± 0,00015	Řuli a Řuli	1,4739	1,47397 ± 0,00015
	1,4739			1,4740	
	1,4740			1,4740	
Nobilis Tilia	1,4741	1,4740 ± 0,0003	Voda (standard)	1,3305	1,3306 ± 0,0003
	1,4739			1,3305	
	1,4740			1,3307	

Index lomu čajovníkového oleje měřený při teplotě 25 °C se pohybuje v intervalu od 1,4750 do 1,4820 [76, s. 1]. Další literární zdroje uvádějí index lomu čajovníkového oleje měřeného při teplotě 20 °C. Sukatta a spol. [77, s. 473] stanovili index lomu TTO jako interval 1,475–1,481. Názor na čajovníkový olej vydaný Evropskou komisí uvádí  $n$  1,475–1,482, neuvádí však teplotu, při které byl index lomu měřený [6, s. 11]. Také ISO 4730:2017 norma uvádí index lomu měřený při 20 °C 1,475–1,482 [7, s. 2]. Z naměřených průměrných hodnot  $n$  uvedených v tabulce 13 lze konstatovat, že se hodnoty pohybují v intervalu 1,4736–1,4750 při teplotním intervalu 25,3–25,7 °C. Zjištěné hodnoty jsou v normě s uvedenými daty z literárních zdrojů a nevyskytovaly se žádné výrazné odchylky.

## 6.5 Absorbance v UV spektru

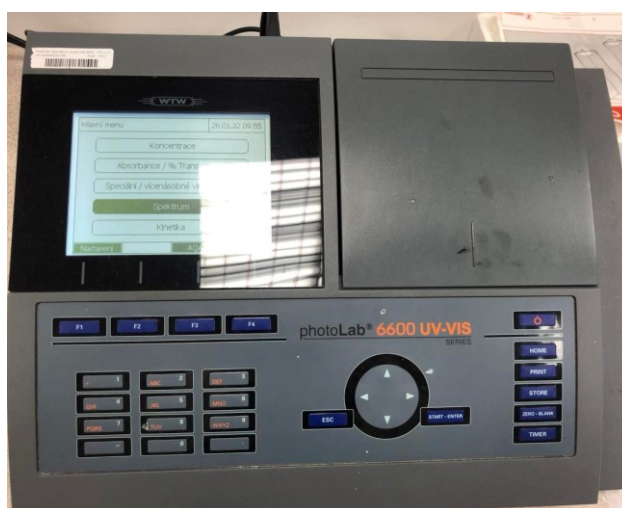
Využití přímého měření absorbance esenciálních olejů pro kvalitativní účely je méně přesná metoda, a proto slouží především jako doplňující charakteristika k GC-MS analýze. Měření absorbance TTO v ultrafialové oblasti slouží také k identifikaci případných nečistot.

### 6.5.1 Použité přístroje, vybavení a chemikálie

Laboratorní sklo (dělené pipety, kádinky)

Mikroštrikačka (Hamilton 10, třída 700 a 1700)

Spektrometr PhotoLab 6600 UV-VIS



Obrázek 28 Spektrometr PhotoLab 6600 UV-VIS

Křemenná kyveta

Ethanol p. a.

Ethanol (96%, neutrální)

### 6.5.2 Postup měření

Na základě literární rešerše byl pro ředění vzorků zvolen ethanol a měřený interval vlnové délky 220–400 nm. Cut-off ethanolu se nachází při vlnové délce 210 nm a tedy sám neabsorbuje světelnou energii ve zvoleném měřeném intervalu. Pro měření byla použita křemenná kyveta, která poskytuje výsledky v celém rozsahu ultrafialové a viditelné oblasti. Pro dosažení odezvy spektrometru v jedné absorpční jednotce byla zvolená 0,2% hm. koncentrace vzorků. Po proměření slepého vzorku rozpouštědla byla spuštěná analýza vzorku.

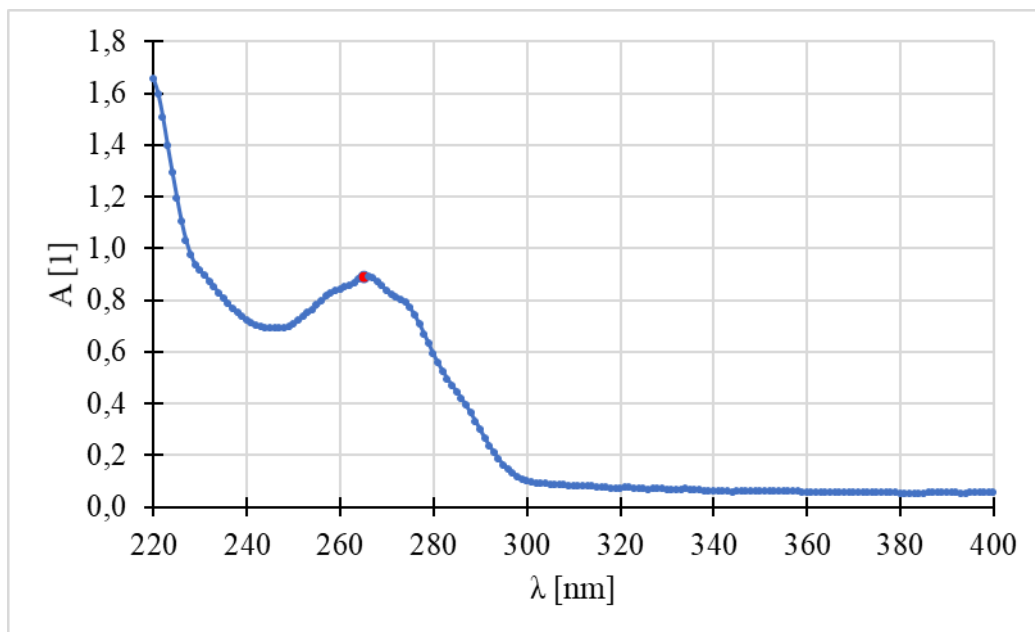
### 6.5.3 Výsledky a diskuze

Tabulka 14 Maximální absorbance při dané vlnové délce pro jednotlivé vzorky TTO

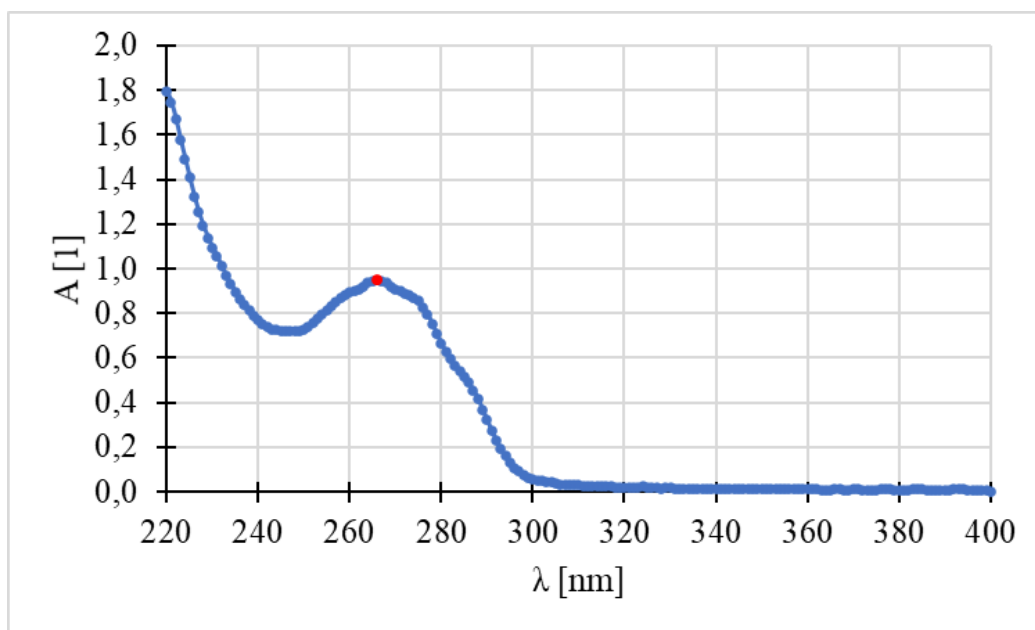
Vzorek	$A_{\max}$ [1]	$\lambda$ [nm]
Atok	266	0,890
Australian Bodycare	266	1,122
Australian Original	266	0,689
Bewit	264	0,627
Bylinná lékárna	266	1,039
Karel Hádek	266	0,950
Nobilis Tilia	264	0,917
Pajoma	264	1,066
Pharma Activ	266	1,105
Primavera	264	1,031
Renovality	266	1,096
Salus	266	0,776
Tierra Verde	266	1,004
Žuli a Žuli	266	0,987

Tabulka 14 odkazuje na maximální absorbanci a odpovídající vlnovou délku vzorků čajovníkového oleje. Průměrná hodnota maximální absorbance je 265,43 a její směrodatná odchylka průměru se studentovým koeficientem zohledňující počet měření je 1,08. Výslednou maximální absorbanci výběru lze zapsat jako  $A_{\max} = (265,4 \pm 1,1)$ .

Pro reprezentaci naměřených dat byla vybrána ze souboru dvě spektra, která představují modus výběru maximální absorbance,  $A_{\max} = 266$ , v intervalu vlnové délky 220–400 nm.



Obrázek 29 UV spektrum komerčního vzorku Atok

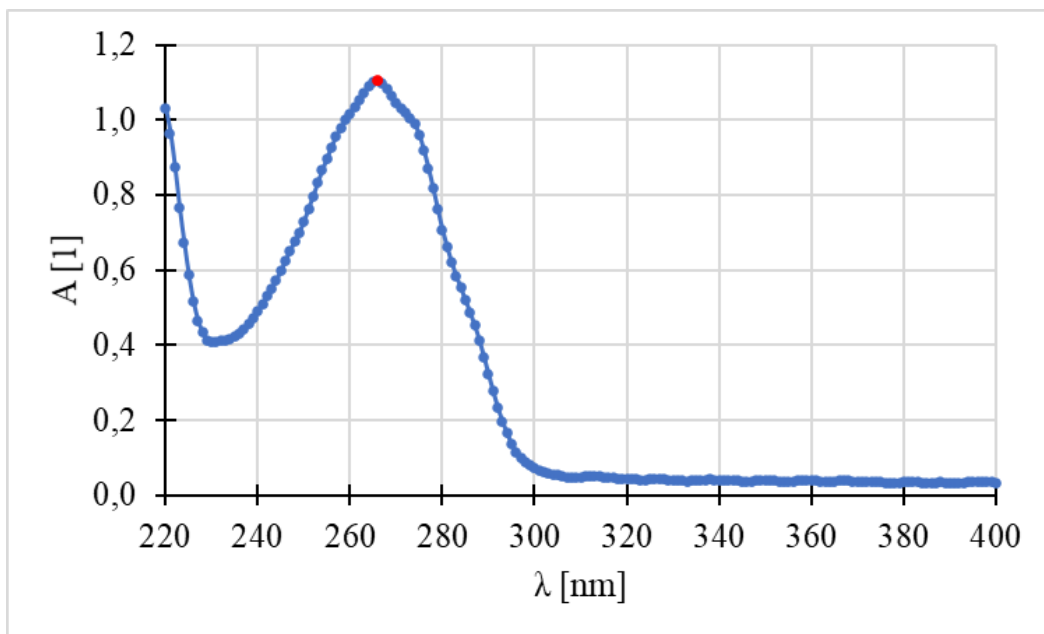


Obrázek 30 UV spektrum komerčního vzorku Karel Hádek

Celkem pět vzorků vykazovalo maximální absorbanci při 266 nm a zároveň nepřesáhli jednu absorpční jednotku. Obrázek 29 odkazuje na spektrum vzorku esenciálního oleje firmy Atok, jehož maximální absorbance byla naměřena při 266 nm. Stejně je tomu tak v případě vzorku firmy Karel Hádek, jehož spektrum je uvedeno na obrázku 30. V obou případech nedošlo k přesahu jedné absorpční jednotky.

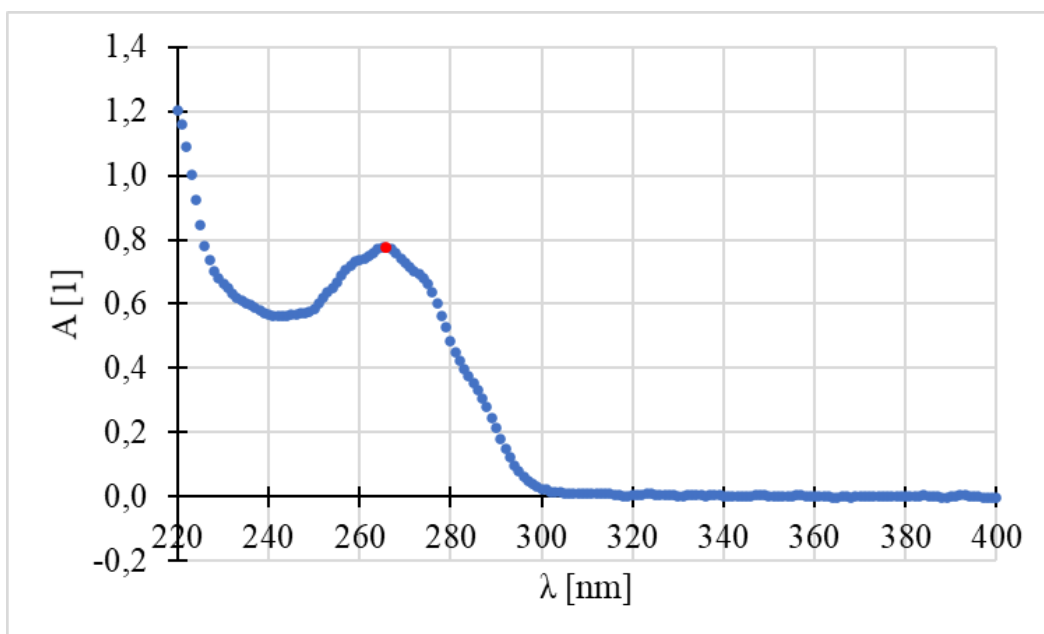


Pět vzorků s maximální vlnovou délkou 266 nm přesahovaly jednu absorpční jednotku. Byly to vzorky Australian Bodycare, Bylinná lékárna, Pharma Activ, Renovality a Tierra Verde. Příkladem je vzorek společnosti Pharma Activ, jehož spektrum vidíme na obrázku 31.



Obrázek 31 UV spektrum komerčního vzorku firmy Pharma Activ

U jednoho ze vzorků byly naměřeny také záporné hodnoty absorpance. Jednalo se o vzorek firmy Salus a záporné hodnoty se projevily ke konci měření. Nejzápornější naměřená hodnota absorpance byla  $-0,004$ . Na obrázku 32 vidíme daný graf závislosti absorpance na vlnové délce. Maximální absorpance byla v tomto případě taktéž 266 nm. Tato skutečnost poukazuje na to, že vzorek absorbuje větší množství světla než slepý vzorek.



Obrázek 32 UV spektrum komerčního vzorku firmy Salus

Z dostupných zdrojů je maximální absorbance TTO v ethanolu 265 nm [78, s. 1]. Maximální absorbance měřeného výběru vzorků je  $A_{\max} = (265,4 \pm 1,1)$  a je proto možné tvrdit, že naměřené hodnoty všech vzorků se od sebe nijak výrazně nelišily a splňují hodnoty nalezené v literatuře. Tato skutečnost naznačuje, že analyzované oleje neobsahují nečistoty.

## ZÁVĚR

Teoretická část práce popisuje biologické účinky a chemické složení čajovníkového oleje *Melaleuca alternifolia* s důrazem na primární aktivní sloučeninu terpinen-4-ol. Čajovníkový olej je charakteristický svými antibakteriálními, antivirovými a protizánětlivými účinky.

S ohledem na chemické složení byla zmíněná ISO 4730 norma, která určuje koncentrační limity čajovníkových silic. Dále se práce věnuje falšování TTO a možným autentifikačním metodám, jako je organoleptické hodnocení, genetická identifikace, GC, MS a fyzikální vlastnosti esenciálního oleje jako index lomu, hustota a optická stáčivost.

V praktické části diplomové práce byla popsána metodika analýzy čajovníkového oleje z 15 komerčních zdrojů na plynovém chromatografu s FID a MS detekcí, Abbého refraktometru a UV-VIS spektrometru. GC-FID a GC-MS analýza sloužily jako primární prostředek k určení kvalitativního a kvantitativního složení vzorků. Jako doplňující metody byly zvoleny index lomu a absorpance světelné energie v ultrafialové oblasti.

U všech vzorků byly identifikované sloučeniny s většinovým zastoupením, a to terpinen-4-ol (24,3 – 48,6 %),  $\alpha$ -terpinen (12,5–27,4 %) a  $\gamma$ -terpinen (7,4–13,5 %). Při analýze složení vzorků čajovníkového oleje byl kladen důraz zejména na obsah hlavní aktivní složky tohoto esenciálního oleje, terpinen-4-ol. Nejvyšší koncentrace terpinen-4-olu byla naměřena ve vzorku firmy Nobilis Tilia (48,6 %), naopak nejnižší ve vzorku firmy Salus (24,3 %).

Vyhodnocování bylo dále zaměřeno na sloučeninu 1,8-cineol neboli eukalyptol, který je nežádoucí součástí degradačních procesů tohoto esenciálního oleje a s jeho stoupající koncentrací klesá hladina aktivního terpinen-4-olu. 1,8-Cineol, který může sloužit jako indikátor oxidace, byl v největším množství nalezen ve vzorku firmy Tierra Verde BIO (5,6 %).

Pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem se podařilo dodatečně identifikovat sloučeniny jako  $\alpha$ -thujen, thujol, aromadendren,  $\delta$ -kadinen nebo isoleden. Tyto sloučeniny neposkytovaly při klasické plynové chromatografii požadovanou odezvu a nebylo je možné porovnat se standardní látkou. Důvodem problematického určení mohl být také delší retenční čas, a tedy pozdější odezva těchto dodatečně určených složek.

Index lomu, který popisuje poměr rychlosti šíření světla ve dvou optických prostředích, byl definován intervalem 1,4736–1,4750. Směrodatné odchylky průměru byly minimální

a výsledky se shodují s literaturou. Maximální absorbance výběru komerčních vzorků odpovídá  $A_{\max} = (265,4 \pm 1,1)$ .

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. SOUTHWELL, I. a LOWE, R. *Tea tree: the genus Melaleuca*. Amsterdam: OPA, 1999. ISBN 9057024179.
2. LAWLESS, J. *Tea Tree Oil: The new guide to one of nature's most remarkable gifts*. 1994. ISBN 0722530323.
3. AVONTO, C., CHITTIBOYINA, A. G., WANG, M., VASQUEZ, Y., RUA D. a KHAN, I. A. In Chemico Evaluation of Tea Tree Essential Oils as Skin Sensitizers: Impact of the Chemical Composition on Aging and Generation of Reactive Species. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2016, 29(7), 1108-1117 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00530
4. Kajeput střídavolistý. *Wikipedia* [online]. 2012 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Kajeput\\_st%C5%99%C3%ADdavolist%C3%BD#/media/Soubor:Melaleuca\\_alternifolia\\_\(Maria\\_Serena\).jpg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Kajeput_st%C5%99%C3%ADdavolist%C3%BD#/media/Soubor:Melaleuca_alternifolia_(Maria_Serena).jpg)
5. Tea Tree in mid-season. *Ultra International B. V.* [online]. [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <http://ultranl.com/products/tea-tree-oil-2/>
6. SCCP (Scientific Committee on Consumer Products). *Opinion on tea tree oil* [online]. Brusel: European Commission, ©2008 [cit. 23. 11. 2021], Dostupné z: [https://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_160.pdf](https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_160.pdf)
7. ISO 4730:2017. *International standard ISO 4730: Essential oil od Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil)*. 3. Švýcarsko: Swedish Intitute for Standards, 2017.
8. SHAPIRA, S., PLEBAN, S., KAZANOV, D., TIROSH, P., ARBER, N. a GOE, A. L. Terpinen-4-ol: A Novel and Promising Therapeutic Agent for Human Gastrointestinal Cancers. *PLOS ONE* [online]. 2016, 11(6) [cit. 2021-11-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0156540
9. MONDELLO, F. In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 51(5), 1223-1229 [cit. 2022-04-18]. ISSN 14602091. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkg202

10. PAZYAR, N. MD, YAGHOOBI, R. MD, BAGHERAMI, R. MD a KAZEROUNI, A. MD. A review of applications of tea tree oil in dermatology. *International Journal of Dermatology* [online]. 2012, (52), 784-790 [cit. 2021-11-12].
11. DE GROOT, A. C. a SCHMIDT E. Tea tree oil: contact allergy and chemical composition. *Contact Dermatitis* [online]. 2016, 75(3), 129-143 [cit. 2022-02-03]. ISSN 01051873. Dostupné z: doi:10.1111/cod.12591
12. CARSON, C. F., HAMMER, K. A. a RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2006, 19(1), 50-62 [cit. 2022-02-10]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.19.1.50-62.2006
13. MERCK LIFE SCIENCE SPOL. S R. O. Bezpečnostní list: Tea Tree Oil. *Sigma-Aldrich* [online]. 3. 3. 2022 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/cs/sds/sigma/smb00386>
14. FORTUNA, G. a MARINKOVICH, P. M. Linear immunoglobulin A bullous dermatosis. *Clinics in Dermatology* [online]. 2012, 30(1), 38-50 [cit. 2022-01-23]. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2011.03.008
15. PERRETT, C. M., EVANS, A. V. a RUSSELL-JONES, R. Tea tree oil dermatitis associated with linear IgA disease. *Clinical and Experimental Dermatology* [online]. 2003, 28(2), 167-170 [cit. 2022-02-03]. ISSN 03076938. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2230.2003.01229.x
16. COX, S. D., MANN, C. M., MARKHAM, J. L., BELL, H. C., GUSTAFSON, J. E., WARMINGTON, J. R., a WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2000, 88(1), 170-175 [cit. 2021-12-07]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x
17. KUNICKA-STYCZYŃSKA, A., SIKORA, M. a KALEMBA, D. Lavender, tea tree and lemon oils as antimicrobials in washing liquids and soft body balms. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2011, 33(1), 53-61 [cit. 2022-03-20]. ISSN 01425463. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-2494.2010.00582.x

18. SCHNITZLER, P., SCHÖN K. a REICHLING J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. In: *Pharmazie* [online]. 56. National Library of Medicine, 2001, s. 1 [cit. 2022-02-02]. Dostupné z: [https://cdn.shopify.com/s/files/1/1410/7814/files/Antiviral\\_activity\\_of\\_Australian\\_tea\\_tree\\_oil\\_and\\_eucalyptus\\_oil\\_against\\_herpes\\_simplex\\_virus\\_in\\_cell\\_culture\\_-\\_PubMed.pdf?v=1621370728](https://cdn.shopify.com/s/files/1/1410/7814/files/Antiviral_activity_of_Australian_tea_tree_oil_and_eucalyptus_oil_against_herpes_simplex_virus_in_cell_culture_-_PubMed.pdf?v=1621370728)
19. HART, P.H., BRAND, C., CARSON, C.F., RILEY, T.V., PRAGER, R.H. a FINLAY-JONES, J.J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research* [online]. 2000, 49(11), 619-626 [cit. 2022-02-11]. ISSN 1023-3830. Dostupné z: doi:10.1007/s000110050639
20. TREBICHAVSKÝ, I. Vznik a ukončení zánětu. *Živa: Rozhled v oboru veškeré přírody* [online]. SSČ AV ČR: Academia, leden 2017, 1/2017, 2-4 [cit. 2022-02-11]. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/vznik-a-ukonceni-zanetu.pdf>
21. DVOŘÁKOVÁ, M., VALTEROVÁ, I. A VANĚK, T. Monoterpeny v rostlinách. *Chemické listy* [online]. 2011, (105), 839-845 [cit. 2022-02-08]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_11\\_839-845.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_11_839-845.pdf)
22. (+) Terpinen-4-ol. In: *TCI Chemicals* [online]. [cit. 2022-04-16]. Dostupné z: <https://www.tcichemicals.com/DE/de/search/?text=%28%2B%29+terpinen-4-ol>
23. Yikrazuul.  $\Gamma$ -terpinen. *Wikipedia* [online]. 2014 [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: [https://de.m.wikipedia.org/wiki/Datei:Gamma\\_Terpinene.svg](https://de.m.wikipedia.org/wiki/Datei:Gamma_Terpinene.svg)
24. Jü. Alpha-Terpinene Structure. *Wikipedia* [online]. 2013 [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: [https://de.wikipedia.org/wiki/%CE%91-Terpinen#/media/Datei:Alpha-Terpinene\\_Structure\\_V.1.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/%CE%91-Terpinen#/media/Datei:Alpha-Terpinene_Structure_V.1.svg)
25. BHATTI, H. N., KHAN, S. S., KHAN, A., RANI, M. AHMAD, V. U. a CHOUDHARY, M. I. Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. *Phytomedicine* [online]. 2014, 21(12), 1597-1626 [cit. 2022-04-16]. ISSN 09447113. Dostupné z: doi:10.1016/j.phymed.2014.05.011

26. BROPHY, J. J., CRAVEN, L. A. a DORAN, J. C. *Melaleucas: their botany, essential oils and uses* [online]. ACIAR, 2013 [cit. 2022-01-23]. ISBN 978 1 922137 52 4. Dostupné z: <https://www.aciar.gov.au/publication/books-and-manuals/melaleucas-their-botany-essential-oils-and-uses>
27. BEJAR, E. Ph.D. *Adulteration of Tea Tree Oil (Melaleuca alternifolia and M. linariifolia)* [online]. 2017, s. 4–6 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/319535839\\_Adulteration\\_of\\_Tea\\_Tree\\_Oil\\_Melaleuca\\_alternifolia\\_and\\_M\\_linariifolia](https://www.researchgate.net/publication/319535839_Adulteration_of_Tea_Tree_Oil_Melaleuca_alternifolia_and_M_linariifolia)
28. GAFNER, S. Ph.D. Tea Tree Oil Laboratory Guidance Document. In: *American Botanical Council* [online]. 2018, s. 1–10 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/328175728\\_Tea\\_Tree\\_Oil\\_Laboratory\\_Guidance\\_Document](https://www.researchgate.net/publication/328175728_Tea_Tree_Oil_Laboratory_Guidance_Document)
29. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 Sb., o kosmetických přípravcích. In: *Sbírka zákonů*. 30. 11 2009, 107 [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=ET>
30. Směrnice Rady 76/768/EHS ze dne 27. července 1976 o sblížení právních předpisů členských států týkajících se kosmetických prostředků. In: *Sbírka zákonů*. 27. 11. 1976, 1 [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=31976L0768>
31. BECERRIL, E., LAMAS, J. P., SANCHEZ-PRADO, L., LLOMPART, M., LORES, M. a GARCIA-JARES, C. Analysis of regulated suspected allergens in waters. *Talanta* [online]. 2010, 83(2), 464-474 [cit. 2022-04-15]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2010.09.038
32. Methyl eugenol. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/w247502>
33. Estragol. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sial/34098>
34. Safrol. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/s9652>



35. REYES-JURADO, F., FRANCO-VEGA, A., RAMÍREZ-CORONA, N., PALOU, E. a LÓPEZ-MALO, A. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews* [online]. 2015, 7(3), 275-297 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1866-7910. Dostupné z: doi:10.1007/s12393-014-9099-2
36. GUENTHER PH. D., E., A. J. HAAGEN-SMIT PH. D. a E. E. LANGENAU B. S. *The essential oils: History, origin in plants production, analysis* [online]. Svazek první. D. van Nostrand Company, 1948 [cit. 2022-03-29].
37. NAEEM, A., ABBAS, T. a MOHSIN ALI, T. *Essential Oils: Brief Background and Uses* [online]. In: Remedy Publications. 2018 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: <http://www.remedypublications.com/open-access/essential-oils-brief-background-and-uses-516.pdf>
38. GLACOVÁ, Denisa Mgr. Muslimské Španělsko. *Encyklopedie migrace* [online]. 2018 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://www.encyclopediaofmigration.org/muslimske-spanelsko/>
39. SOTO, C., CHAMY, R. a ZUNIGA, M. Enzymatic hydrolysis and pressing conditions effect on borage oil extraction by cold pressing. *Food Chemistry* [online]. 2007, 102(3), 834-840 [cit. 2022-03-29]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.014
40. *Cold-press extraction* [online]. 2017 [cit. 2022-03-30]. Dostupné z: <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html#enfleurage>
41. BHADRA, P. a PARIDA, S. *Aromatherapy and its benefits* [online]. New Delhi, India: Renu Publishers, 2021 [cit. 2022-03-30]. ISBN 978-81-940943-7-1. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/350485960\\_AROMATHERAPY\\_AND\\_ITS\\_BENEFITS](https://www.researchgate.net/publication/350485960_AROMATHERAPY_AND_ITS_BENEFITS)
42. Water distillation. *New Directions Aromatics* [online]. 2017 [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html#enfleurage>

43. TONGNUANCHAN, P. a BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* [online]. 2014, 79(7), R1231-R1249 [cit. 2022-03-31]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.12492
44. ANANDHI, S., UCHOI, A. a RAJAMANI, K. Study on Estimation and Seasonal Variation of Essential Oil in Tea Tree by Hydro Distillation Method . *Indian Journal Of Agricultural Research* [online]. 2021, (Of) [cit. 2022-03-31]. ISSN 0976-058X. Dostupné z: doi:10.18805/IJARE.A-571
45. MASANGO, Phineas. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2005, 13(8), 833-839 [cit. 2022-04-01]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2004.02.039
46. Diagram of the new packed bed extraction system developed and tested to improve extraction efficiency and product quality. *Elsevier* [online]. 2005 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0959652604000654?token=6E5E528962B11EA2DA07EE5520BCD50F3DB4D1624D668117369E799472826D22C926816430CFF978134170C66D491FFD&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220401120519>
47. RAJANTEREH, Y. a prof. Dr. MURUGESAN, T. *Extraction of essential oils from tea tree (Melaleuca alternifolia) using Solvent Extraction method* [online]. 2015, 1-7 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: [https://scholar.google.at/scholar?q=Extraction+of+essential+oils+from+Melaleuca+alternifolia+sp.+by+Solvent+Extraction+Method&hl=cs&as\\_sdt=0&as\\_vis=1&oi=scholar](https://scholar.google.at/scholar?q=Extraction+of+essential+oils+from+Melaleuca+alternifolia+sp.+by+Solvent+Extraction+Method&hl=cs&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar)
48. Solvent extraction. *New Directions Aromatics* [online]. 2017 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html#solvent-extraction>
49. BAKER, G., LOWE, R. F. a SOUTHWELL, I. A. Comparison of Oil Recovered from Tea Tree Leaf by Ethanol Extraction and Steam Distillation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, 48(9), 4041-4043 [cit. 2022-04-02]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf0004356

50. HAWTHORNE, S. B., RICKKOLA, M., SCRENIUS, K., HOLM, Y., HILTUNEN, R. a HARTONEN, K. Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants. *Journal of Chromatography A* [online]. 1993, 634(2), 297-308 [cit. 2022-04-20]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(93)83017-M
51. PLUHAŘOVÁ, L. *Využití extrakce přehřátou vodou při analýze různých matric* [online]. Pardubice, 2012 [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: [https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/47600/PluharovaL\\_VyuzitiExtrakce\\_PB\\_2012.pdf?sequence=2](https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/47600/PluharovaL_VyuzitiExtrakce_PB_2012.pdf?sequence=2). Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Petra Bajerová, Ph.D.
52. HAGHIGHI, A. a KHAJENOORI, M. Subcritical Water Extraction. NAKAJIMA, Hironori, ed. *Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling* [online]. InTech, 2013, 2013-07-24 [cit. 2022-04-21]. ISBN 978-953-51-1170-2. Dostupné z: doi:10.5772/54993
53. LI, B., YANG, Y., GAN, Y., EATON, C. D., HE, P. a JONES, A. D. On-line coupling of subcritical water extraction with high-performance liquid chromatography via solid-phase trapping. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, 873(2), 175-184 [cit. 2022-04-21]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(99)01322-9
54. VILKHU, K., MAWSON, R. SIMONS, L. a BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]. 2008, 9(2), 161-169 [cit. 2022-04-21]. ISSN 14668564. Dostupné z: doi:10.1016/j.ifset.2007.04.014
55. How Tea Tree Oil is Made - Cassegrain Kalara Tea Tree Oil. In: Youtube [online]. 25. 8. 2014 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=SKtEwWA47g0>
56. Steam distillation process. *New Directions Aromatics* [online]. 2017 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html#steam-distillation>

57. SWORDS, G. a HUNTER, G. L. K. Composition of Australian tea tree oil (Melaleuca alternifolia). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1978, 26(3), 734-737 [cit. 2022-04-22]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf60217a031
58. BROPHY, J. J., DAVIES, N. W., SOUTHWELL, I. A., STIFF, I. A. a WILLIAMS, L. R. Gas chromatographic quality control for oil of Melaleuca terpinen-4-ol type (Australian tea tree). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1989, 37(5), 1330-1335 [cit. 2022-04-22]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf00089a027
59. OPTIMA FFAP. *Macherey-Nagel* [online]. 334 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: <https://www.mn-net.com/media/pdf/51/5e/04/Catalog-Chromatography-EN.pdf>
60. Gas chromatography. *Simon Fraser University* [online]. 2 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: <http://www.sfu.ca/chemistry/groups/Li/chem316/GasChrom.PDF>
61. LAFONT, R., C. DAUPHIN-VILLEMANT, J. T. WARREN a H. H. REES. Ecdysteroid Chemistry and Biochemistry. *Comprehensive Molecular Insect Science* [online]. 2017, 1–2 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/electron-impact-mass-spectrometry/pdf>
62. KAWAKAMI, M., SACHS, R. M. a SHIBAMOTO, T. Volatile constituents of essential oils obtained from newly developed tea tree (Melaleuca alternifolia) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1990, 38(8), 1657-1661 [cit. 2022-04-22]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf00098a007
63. DE FIGUEIREDO, M. Chemical Composition and Oil Concentration of Tea Tree Leaf Oil Grown in South Africa During a One-Year Vegetative Cycle. *Journal of Essential Oil Research* [online]. 2019, 18(sup1), 52-53 [cit. 2022-04-22]. ISSN 1041-2905. Dostupné z: doi:10.1080/10412905.2006.12067120
64. WANG, M., ZHAO, J., AVULA, B., WANG, Y., CHITTIBOYINA, A. G., PARCHER, J. F. a KHAN, I. A. Quality Evaluation of Terpinen-4-ol-Type Australian Tea Tree Oils and Commercial Products: An Integrated Approach Using Conventional and Chiral GC/MS Combined with Chemometrics. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015, 63(10), 2674-2682 [cit. 2022-04-22]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.5b00147
65. SEVIK, R., AKARCA, G., KILINC, M. a ASCIOGLU, C. Chemical Composition of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) (Maiden & Betche) Cheel Essential Oil and Its Antifungal Effect on Foodborne Molds Isolated from Meat Products. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* [online]. 2021, 24(3), 561-570 [cit. 2022-04-24]. ISSN 0972-060X. Dostupné z: doi:10.1080/0972060X.2021.1942232
66. ZACHAŘ, P. Plynová chromatografie. *VŠCHT* [online]. Praha, 2001 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>
67. Zjednodušené schéma plynového chromatografu. In: *Informační systém Masarykovy univerzity* [online]. [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: Zjednodušené schéma plynového chromatografu
68. NAVARA, V. Plynová chromatografie: základy a principy. In: *HPST Agilent* [online]. 25. 11. 2020 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: <https://hpst.cz/plynova-chromatografie-zaklady-principy#>
69. WATSON, N. E., BAHAGHGHAT, H. D., CUI, K. a SYNOVEC, R. E. Comprehensive Three-Dimensional Gas Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2017, 89(3), 1793–1800 [cit. 2022-04-25]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.6b04112
70. DE HOFFMANN, E. a STROOBANT, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester: John Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
71. FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Česká společnost klinické biochemie: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně* [online]. 3/2012, 152–157 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
72. SHELLIE, R., MARRIOTT, P., ZAPPIA, G., MONDELLO, P. a DUGO, G. Interactive Use of Linear Retention Indices on Polar and Apolar Columns with an MS-Library for Reliable Characterization of Australian Tea Tree and Other *Melaleuca* sp. Oils. *Journal of Essential Oil Research* [online]. 2011, 15(5), 305-312 [cit. 2022-05-08]. ISSN 1041-2905. Dostupné z: doi:10.1080/10412905.2003.9698597
73. SOUTHWELL, I. *P-Cymene and organic peroxides as indicators of oxidation in tea tree oil* [online]. 06/112. Kingston, ACT, 2006 [cit. 2022-05-08]. ISBN

- 1 74151 375 8. ISSN 1440-6845. Dostupné z: <https://www.agrifutures.com.au/wp-content/uploads/publications/06-112.pdf>
74. ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, [online]. 4.1. Allured publishing, 2017, 809 s. [cit. 2022-05-10]. ISBN 978-1-932633-21-4.
75. RUDBÄCK, J., BERGSTRÖM, M. A., BÖRJE, A., NILSSON, U. a KARLBERG, A. A-Terpinene, an Antioxidant in Tea Tree Oil, Autoxidizes Rapidly to Skin Allergens on Air Exposure. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2012, 25(3), 713-721 [cit. 2022-05-08]. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/tx200486f
76. Certificate of Analysis [C.O.A]: Tea Tree Oil. *Aramacs* [online]. Delhi, India [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: [https://www.aramacs.com/wp-content/uploads/2018/msds-coa/tea-tree/tea\\_tree-coa.pdf](https://www.aramacs.com/wp-content/uploads/2018/msds-coa/tea-tree/tea_tree-coa.pdf)
77. SUKATTA, U. a spol. Physico-Chemical Properties, Chemical Composition and In Vitro Antimicrobial and Free Radical-Scavenging Capacity of Tea Tree Essential Oil in Thailand. *Kasetsart Journal - Natural Science* [online]. 01/2011, 473-480 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/237046142\\_Physico-Chemical\\_Properties\\_Chemical\\_Composition\\_and\\_In\\_Vitro\\_Antimicrobial\\_and\\_Free\\_Radical-Scavenging\\_Capacity\\_of\\_Tea\\_Tree\\_Essential\\_Oil\\_in\\_Thailand](https://www.researchgate.net/publication/237046142_Physico-Chemical_Properties_Chemical_Composition_and_In_Vitro_Antimicrobial_and_Free_Radical-Scavenging_Capacity_of_Tea_Tree_Essential_Oil_in_Thailand)
78. 杨欣欣 a 徐云龙. Quantitative determination method for tea tree oil in solution. *Google Patents* [online]. 2006 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/CN1880945A/en>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

- ISO International Organization for Standardization
- TTO Tea tree oil, čajovníkový olej *Melaleuca alternifolia*
- AEP American european pharmacopoeia, Americko-evropský lékopis
- MIC Minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace
- MBC Minimum bactericidal concentration, minimální baktericidní koncentrace
- MRSA Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, methicilin-rezistentní *S. aureus*
- HSV-1 *Herpes simplex virus*, orální herpes typu 1
- HSV-2 *Herpes simplex virus*, genitální herpes typu 2
- TC<sub>50</sub> Toxic concentration, střední toxická koncentrace
- IC<sub>50</sub> Inhibitory concentration, střední inhibiční koncentrace
- HPV Human papillomavirus, lidský papilomavirus
- WHO World Health Organization
- NADH Nikotinamidadenin dinukleotid
- ndhF chloroplast-nikotinamidadenin dinukleotid dehydrogenáza F
- GC Gas chromatography, plynová chromatografie
- MS Mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie
- EO Esenciální olej
- St.mn. Stopové množství
- CO<sub>2</sub> oxid uhličitý
- SFE Superficial fluid extraction, superkritická kapalinová extrakce
- SWE Subkritická vodní extrakce
- PHWE Tlaková extrakce horkou vodou
- s. r. o. Společnost s ručeným omezeným
- p. a. per analysis
- FID Flame ionization detector

IR infračervený

NMR nukleární magnetická resonance

FFAP Free fatty acid phase

FSOT Fused Silica Open Tubular

EIMS Electron Ionization Mass Spectrometry

CIMS Chemical Ionization Mass Spectrometry

SPE Simultaneous Purging and Extraction Method

SDE Simultaneous Steam Distillation and Solvent Extraction Method

p. a. pro analýzu

tr. Traces, stopové množství (<0,1)



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Volně rostoucí <i>Melaleuca alternifolia</i> [4, s. 1] .....	13
Obrázek 2 <i>Melaleuca alternifolia</i> na plantáži [5, s. 1] .....	14
Obrázek 3 Nejhojněji zastoupené terpeny – (+)-terpinen-4-ol, $\gamma$ -terpinen, $\alpha$ -terpinen [22, s. 1] [23, s. 1] [24, s. 1].....	18
Obrázek 4 Methyl eugenol, estragol, safrol [32, s. 1] [33, s. 1] [34, s. 1] .....	23
Obrázek 5 Schéma lisování za studena; 1 - Rostlinná matrice postupuje dopravníkem dolů; 2 - Narušení olejových žláz, působení tlakem; 3 - Omývání vodní sprchou, působení tlakem; 4 - Centrifugace vzniklé emulze, EO je separován od vodní fáze, upraveno dle [40, s. 1] 27	
Obrázek 6 Schéma vodní destilace; 1 - Rostlinná matrice ve vroucí vodě; 2 - parní směs proudící kondenzátorem; 3 - oddělená vodní fáze ve formě hydrosolu; 4 - oddělená fáze esenciálního oleje, upraveno dle [42, s. 1].....	28
Obrázek 7 Konstrukce kolony s parním pláštěm, upraveno dle [46, s. 834] .....	29
Obrázek 8 Konečné produkty hydrolýzy a oxidace složek TTO [47, s. 33].....	31
Obrázek 9 Schéma extrakce rozpouštědlem; 1 - vstup rozpouštědla; 2 - vakuová destilace, odstranění alkoholu, upraveno dle [48, s. 1].....	32
Obrázek 10 Schéma parní destilace; 1 - vstup vodní páry; 2 - parní směs páry a EO; 3 - voda a EO; 4 - květinová voda; 5 - výstup esenciálního oleje, upraveno dle [56, s. 1] .....	36
Obrázek 11 Autentický nákres struktury viridiflorenu [57, s. 737].....	37
Obrázek 12 Zjednodušené schéma plynového chromatografu [67, s. 1].....	42
Obrázek 13 Nákres plynového chromatografu; 1-tlaková láhev, 2-injektor, 3-kolona, 4-detektor, 5-vyhodnocovací software [68, s. 1].....	42
Obrázek 14 Vialka N9 2 ml .....	48
Obrázek 15 Mikrostříkačka, Hamilton 10, Gastight 1701 .....	48
Obrázek 16 Plynový chromatograf DANI Master GC Fast Gas Chromatograph s detektorem FID .....	49
Obrázek 17 Plynový chromatogram pro TTO firmy Bewit, metoda A .....	51
Obrázek 18 Plynový chromatogram pro TTO firmy Bewit, metoda C .....	51
Obrázek 19 Plynový chromatogram pro TTO firmy Pharma Activ-Australian Original, metoda A.....	53
Obrázek 20 Plynový chromatogram pro TTO firmy Pharma Activ-Australian Original, metoda C .....	54
Obrázek 21 Plynový chromatogram pro TTO firmy Renovality, metoda A .....	56
Obrázek 22 Plynový chromatogram pro TTO firmy Renovality, metoda C .....	57
Obrázek 23 Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 SE Shimadzu .....	60
Obrázek 24 Hmotnostní chromatogram vzorku firmy Bewit .....	62
Obrázek 25 Hmotnostní chromatogram vzorku firmy Pharma Activ-Australian Original .	63

---

Obrázek 26 Hmotnostní chromatogram vzorku firmy Renovality .....	65
Obrázek 27 Refraktometr A. Krüss Optronic GmbH .....	68
Obrázek 28 Spektrometr PhotoLab 6600 UV-VIS .....	70
Obrázek 29 UV spektrum komerčního vzorku Atok .....	72
Obrázek 30 UV spektrum komerčního vzorku Karel Hádek.....	72
Obrázek 31 UV spektrum komerčního vzorku firmy Pharma Activ .....	73
Obrázek 32 UV spektrum komerčního vzorku firmy Salus .....	73

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Povolené koncentrace složek dle ISO 4730:2004 [6, s. 1] .....	19
Tabulka 2 Povolené koncentrace složek dle ISO 4730:2017 [7, s. 2] .....	20
Tabulka 3 Koncentrace vybraných složek v chemotypech čajovníkového oleje [11, s. 810] .....	21
Tabulka 4 Zastoupení monoterpenů v závislosti na použitém extrakčním rozpouštědle dle GC-MS analýzy [47, s. 31] .....	30
Tabulka 5 Vybrané komerční vzorky čajovníkového oleje <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	47
Tabulka 6 Procentuální zastoupení složek komerčního vzorku TTO firmy Bewit .....	52
Tabulka 7 Procentuální zastoupení složek komerčního vzorku TTO firmy Pharma Activ-Australian Original .....	55
Tabulka 8 Procentuální zastoupení složek komerčního vzorku TTO firmy Renovality .....	58
Tabulka 9 Vyhodnocení chromatogramu pro vzorek firmy Bewit .....	62
Tabulka 10 Vyhodnocení chromatogramu pro vzorek firmy Pharma Activ-Australian Original .....	64
Tabulka 11 Vyhodnocení chromatogramu pro vzorek firmy Renovality .....	65
Tabulka 12 Porovnání vlastních a publikovaných výsledků pro GC a GC-MS analýzu .....	66
Tabulka 13 Hodnoty indexu lomu $n$ komerčních vzorků čajovníkového oleje .....	69
Tabulka 14 Maximální absorbance při dané vlnové délce pro jednotlivé vzorky TTO .....	71

**SEZNAM PŘÍLOH**

**Příloha P I: Plynové chromatogramy, Atok**

**Příloha P II: Plynové chromatogramy, Australian Bodycare**

**Příloha P III: Plynové chromatogramy, Salus**

**Příloha P IV: Koncentrační zastoupení silic ve vzorcích čajovníkového oleje, GC**

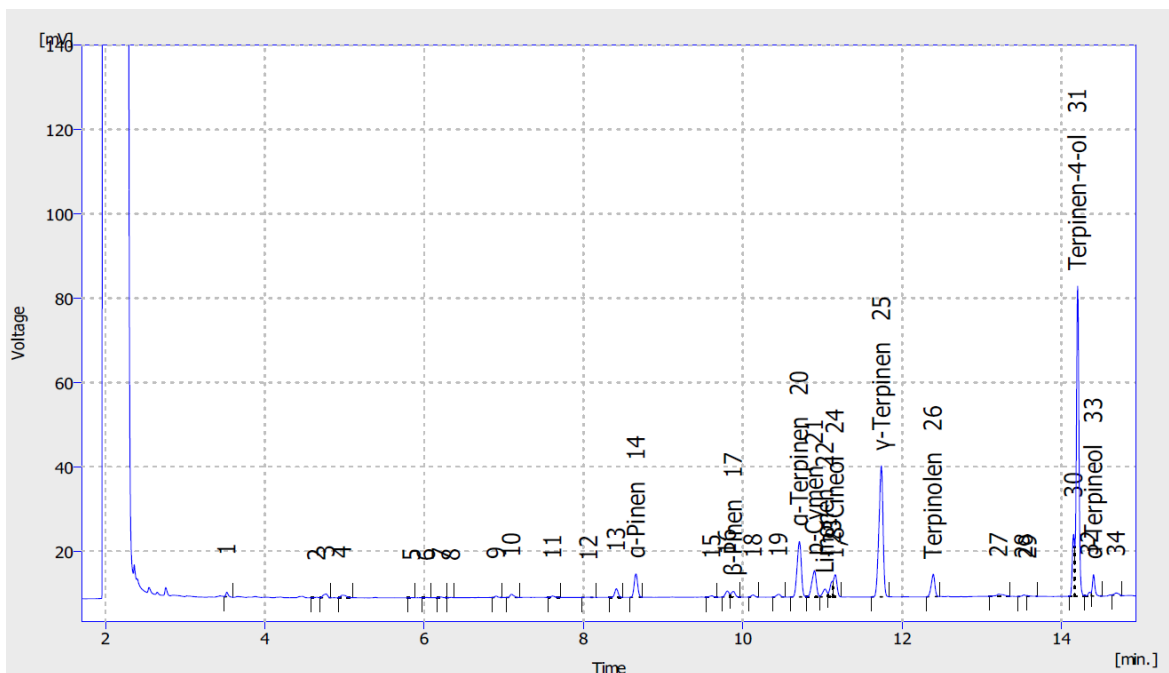
**Příloha P V: Hmotnostní chromatogramy, Atok**

**Příloha P VI: Hmotnostní chromatogramy, Australian Bodycare**

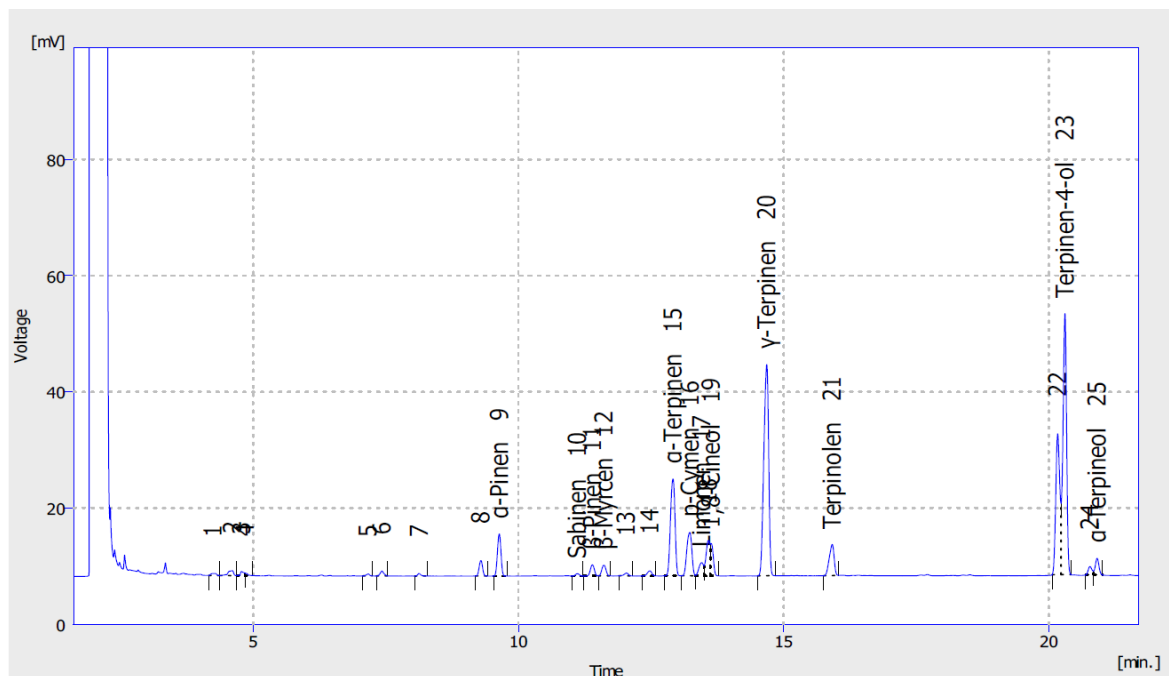
**Příloha P VII: Hmotnostní chromatogramy, Salus**

# PŘÍLOHA P I: PLYNOVÉ CHROMATOGRAMY, ATOK

*Plynový chromatogram pro TTO firmy Atok, metoda A*



*Plynový chromatogram pro TTO firmy Atok, metoda C*

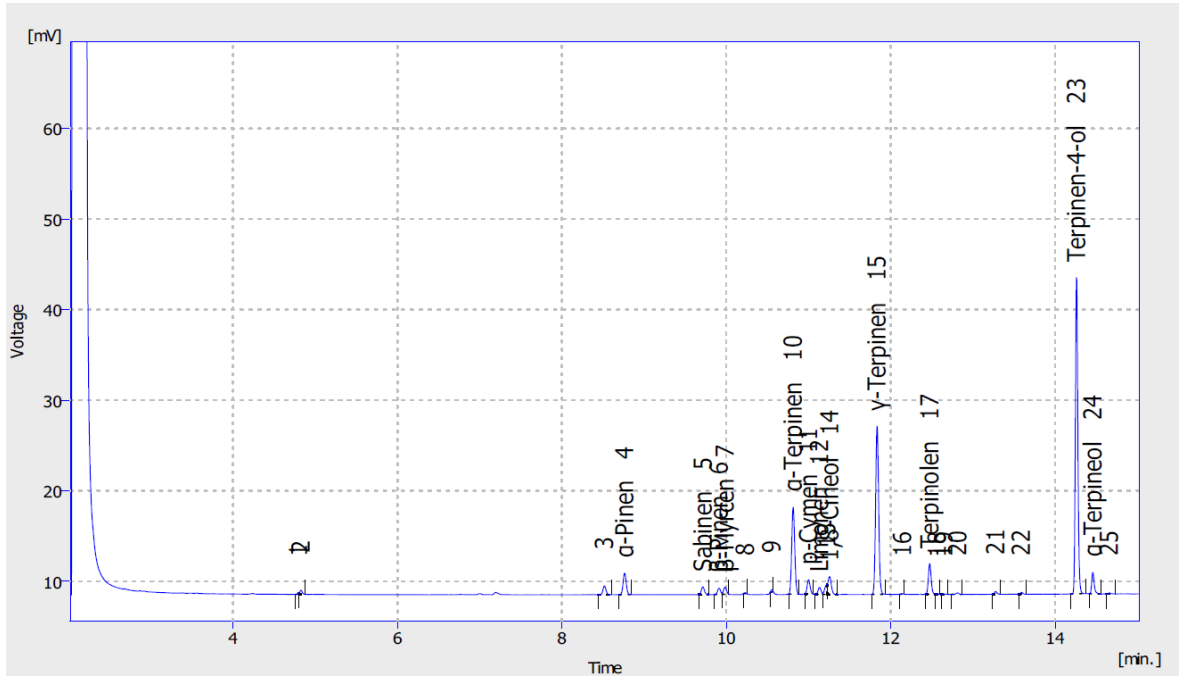


Vyhodnocení GC, Atok, metoda A, C

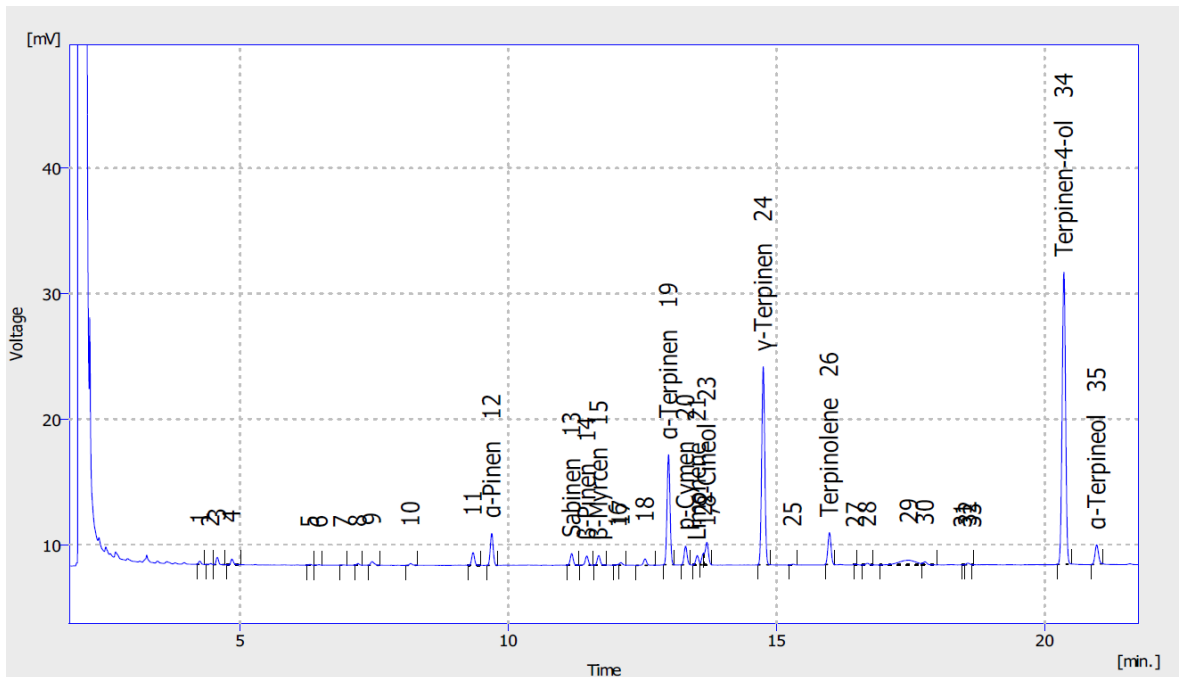
Metoda A				Metoda C			
Složka	Pík	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	Složka	Pík	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]
$\alpha$ -Pinen	14	8,660	3,2	$\alpha$ -Pinen	9	9,640	3,5
				Sabinen	10	11,110	0,2
$\beta$ -Pinen	17	9,880	0,9	$\beta$ -Pinen	11	11,393	1,0
				$\beta$ -Myrcen	12	11,600	1,1
$\alpha$ -Terpinen	20	10,710	9,1	$\alpha$ -Terpinen	15	12,913	10,5
<i>p</i> -Cymen	21	10,900	4,6	<i>p</i> -Cymen	16	13,233	5,2
Limonen	22	11,033	1,3	Limonen	17	13,453	1,4
1,8-Cineol	24	11,160	3,0	1,8-Cineol	19	13,633	2,2
$\gamma$ -Terpinen	25	11,740	21,1	$\gamma$ -Terpinen	20	14,680	24,3
Terpinolen	26	12,390	3,2	Terpinolen	21	15,917	3,6
-	30	14,153	4,9	-	22	20,167	13,6
Terpinen-4-ol	31	14,203	31,4	Terpinen-4-ol	23	20,303	22,9
$\alpha$ -Terpineol	33	14,403	2,1	$\alpha$ -Terpineol	25	20,910	1,5

# PŘÍLOHA P II: PLYNOVÉ CHROMATOGRAMY, AUSTRALIAN BODYCARE

*Plynový chromatogram pro TTO firmy Australian Bodycare, metoda A*



*Plynový chromatogram pro TTO firmy Australian Bodycare, metoda C*



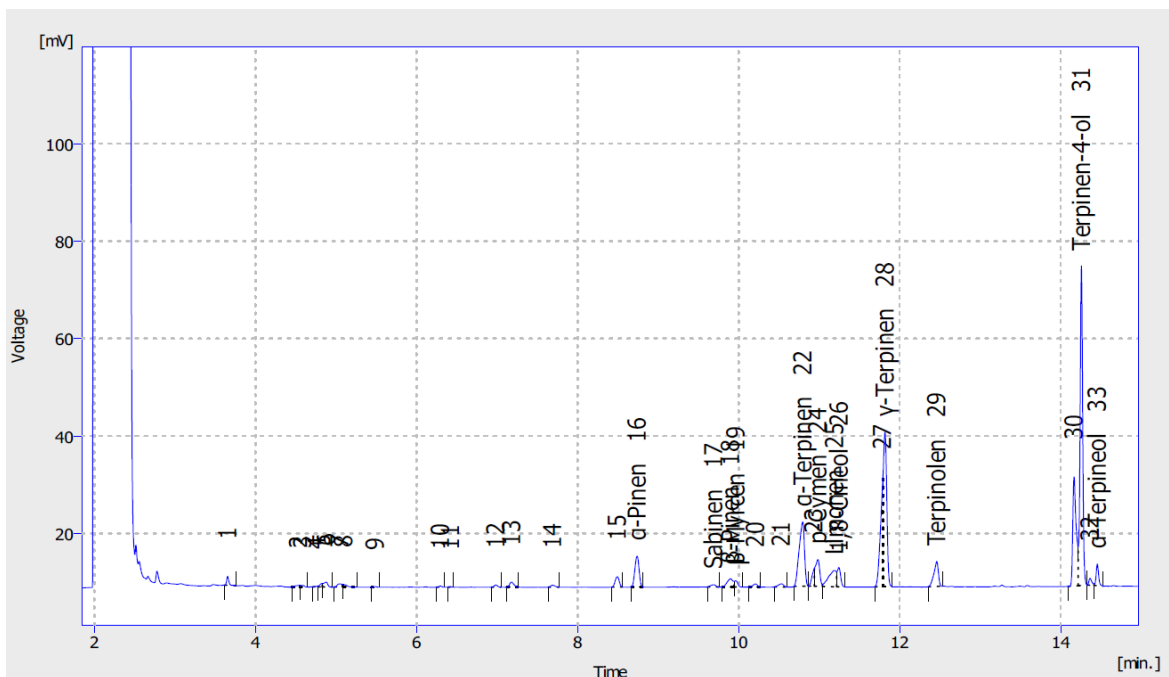
Vyhodnocení GC, Australian Bodycare, metoda A, C

Metoda A				Metoda C			
Složka	Pík	R <sub>r</sub> [min]	Plocha [%]	Složka	Pík	R <sub>r</sub> [min]	Plocha [%]
$\alpha$ -Pinen	4	8,763	3,2	$\alpha$ -Pinen	12	9,693	3,4
Sabinen	5	9,717	1,1	Sabinen	13	11,183	1,2
$\beta$ -Pinen	6	9,913	0,9	$\beta$ -Pinen	14	11,463	1,0
$\beta$ -Myrcen	7	9,987	1,0	$\beta$ -Myrcen	15	11,687	1,1
$\alpha$ -Terpinen	10	10,813	12,3	$\alpha$ -Terpinen	19	12,987	12,0
<i>p</i> -Cymen	11	11,000	2,0	<i>p</i> -Cymen	20	13,307	2,0
Limonen	12	11,133	1,0	Limonen	21	13,523	1,0
1,8-Cineol	14	11,257	2,9	1,8-Cineol	23	13,703	2,8
$\gamma$ -Terpinen	15	11,833	23,8	$\gamma$ -Terpinen	24	14,753	22,5
Terpinolen	17	12,473	4,0	Terpinolen	26	15,987	3,7
Terpinen-4-ol	23	14,260	36,5	Terpinen-4-ol	34	20,360	37,0
$\alpha$ -Terpineol	24	14,460	2,5	$\alpha$ -Terpineol	35	20,970	2,5

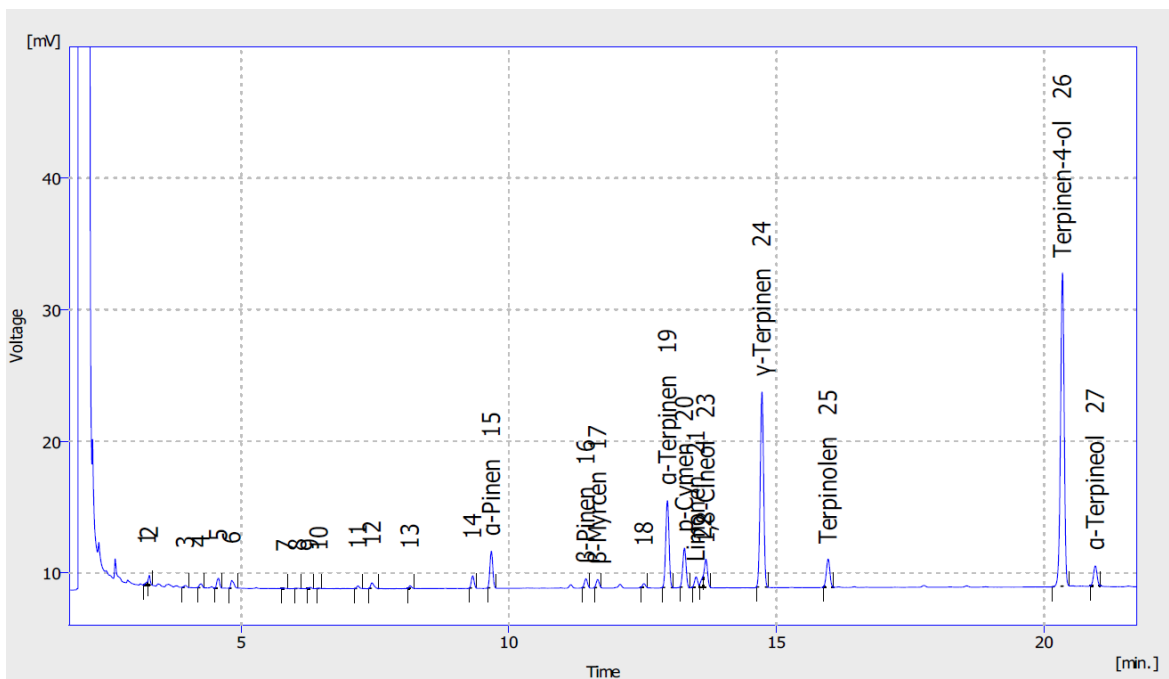


## PŘÍLOHA P III: PLYNOVÉ CHROMATOGRAMY, SALUS

*Plynový chromatogram pro TTO firmy Salus, metoda A*



*Plynový chromatogram pro TTO firmy Salus, metoda C*



Vyhodnocení GC, Salus, metoda A, C

Metoda A				Metoda C			
Složka	Pík	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	Složka	Pík	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]
$\alpha$ -Pinen	16	8,740	3,8	$\alpha$ -Pinen	15	9,673	3,7
Sabinen	17	9,690	0,3				
$\beta$ -Pinen	18	9,900	1,4	$\beta$ -Pinen	16	11,443	0,9
$\beta$ -Myrcen	19	11,967	0,7	$\beta$ -Myrcen	17	11,660	0,8
$\alpha$ -Terpinen	22	10,797	10,1	$\alpha$ -Terpinen	19	12,963	10,0
<i>p</i> -Cymen	24	10,983	3,6	<i>p</i> -Cymen	20	13,283	4,5
Limonen	25	11,193	3,6	Limonen	21	13,500	1,2
1,8-Cineol	26	11,247	2,1	1,8-Cineol	23	13,683	3,3
$\gamma$ -Terpinen	28	11,817	15,5	$\gamma$ -Terpinen	24	14,730	23,3
Terpinolen	29	12,460	3,3	Terpinolen	25	15,967	3,4
-	30	14,167	10,9				
Terpinen-4-ol	31	14,257	24,3	Terpinen-4-ol	26	20,347	39,6
$\alpha$ -Terpineol	33	14,453	1,6	$\alpha$ -Terpineol	27	20,960	2,4

## PŘÍLOHA P IV: KONCENTRAČNÍ ZASTOUPENÍ SILIC VE VZORCÍCH ČAJOVNÍKOVÉHO OLEJE, GC

*Přehled koncentračního zastoupení silice ve vzorcích (1)*

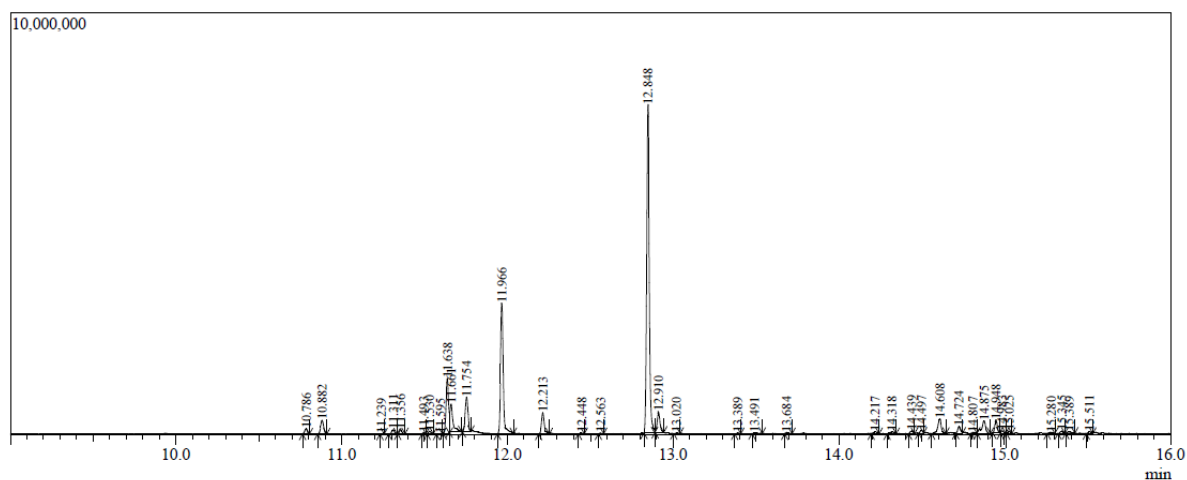
Složka	Atok [%]		Australian Bodycare [%]		Australian Original [%]		Bewit [%]		Bylinná lékárna [%]		Dr. Müller Pharma [%]		Karel Hádek [%]		Nobilis Tilia [%]	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
Terpinen-4-ol	31,4	<b>22,9</b>	36,5	37,0	27,6	44,2	35,8	38,7	41,8	43,2	37,7	39,4	<b>28,1</b>	41,5	48,1	48,6
$\gamma$ -Terpinen	21,1	24,3	23,8	22,5	20,2	19,7	12,5	13,1	21,3	22,7	24,5	25,3	22,6	22,6	18,5	20,4
$\alpha$ -Terpinen	9,1	10,5	12,3	12,0	7,6	7,4	11,5	<b>4,3</b>	10,5	11,5	11,6	11,9	10,5	10,1	7,4	8,1
Terpinolen	3,2	3,6	4,0	3,7	3,1	3,2	2,2	2,4	3,1	3,4	3,7	3,9	3,3	3,5	2,9	3,1
$\alpha$ -Terpineol	2,1	1,5	2,5	2,5	1,8	2,8	2,5	2,1	<b>4,4</b>	<b>4,4</b>	2,6	2,4	1,9	2,5	2,4	2,4
$\alpha$ -Pinen	3,2	3,5	3,2	3,4	3,4	3,3	<b>9,8</b>	<b>9,7</b>	3,5	4,2	3,5	3,5	3,7	3,3	2,4	2,7
<i>p</i> -Cymen	4,6	5,2	2,0	2,0	<b>6,0</b>	<b>7,7</b>	2,3	<b>12,1</b>	2,6	2,8	3,3	3,4	2,3	3,4	3,7	4,2
Limonen	1,3	1,4	1,0	1,0	1,1	1,2	<b>4,4</b>	<b>4,8</b>	2,0	2,1	1,0	1,0	2,4	1,3	1,0	0,9
1,8-Cineol	3,0	2,2	2,9	2,8	1,7	3,0	tr.	<b>4,8</b>	2,0	2,2	2,0	2,5	3,1	<b>4,3</b>	3,7	4,0
Sabinen	-	0,2	1,1	1,2	0,3	0,3	<b>3,2</b>	<b>3,2</b>	0,2	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3	-	0,4
$\beta$ -Pinen	0,9	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	-	0,9	0,6	0,7	0,9	1,0	0,9	1,0	0,7	1,0
$\beta$ -Myrcen	-	1,1	1,0	1,1	0,8	0,8	0,9	0,1	0,5	0,5	1,1	1,0	-	0,9	-	0,9

*Přehled koncentračního zastoupení silice ve vzorcích (2)*

Složka	Pajoma [%]		Primavera [%]		Pharma Activ [%]		Renovality [%]		Salus [%]		Tierra Verde [%]		Žuli a Žuli [%]	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
Terpinen-4-ol	31,1	37,2	35,3	<b>45,9</b>	30,0	37,7	34,3	40,8	<b>24,3</b>	39,6	35,6	35,5	37,5	33,2
$\gamma$ -Terpinen	24,7	24,8	23,6	23,3	26,7	25,5	24,6	24,2	<b>15,5</b>	23,3	19,5	22,3	24,6	27,4
$\alpha$ -Terpinen	12,6	12,8	10,0	9,1	13,5	12,5	12,0	12,0	10,1	10,0	10,0	11,3	11,7	13,3
Terpinolen	3,4	3,5	3,2	3,3	2,9	2,9	2,7	2,7	3,3	3,4	3,3	3,7	2,8	3,0
$\alpha$ -Terpineol	3,3	3,3	2,2	3,6	2,9	3,8	4,2	5,5	1,6	2,4	2,7	2,6	4,6	3,9
$\alpha$ -Pinen	3,8	4,2	3,6	3,2	<b>5,3</b>	4,7	3,8	3,6	3,8	3,7	2,6	2,8	4,7	<b>5,3</b>
<i>p</i> -Cymen	3,1	3,1	4,3	3,8	4,6	4,4	3,8	3,8	3,6	4,5	1,7	2,0	3,4	3,8
Limonen	1,8	1,8	1,2	1,1	<b>3,0</b>	2,8	2,9	2,8	3,6	1,2	1,1	1,2	2,6	3,1
1,8-Cineol	2,0	2,6	4,5	3,5	1,8	2,4	2,5	2,5	2,1	3,3	4,0	5,6	2,3	2,8
Sabinen	0,6	0,6	0,1	-	-	0,2	-	0,2	0,3	-	0,7	0,9	-	0,3
$\beta$ -Pinen	0,7	0,7	0,9	-	-	0,3	--	1,2	1,4	0,9	0,8	-	-	-
$\beta$ -Myrcen	0,8	0,8	1,1	-	-	-		0,1	0,7	0,8	-	-	-	-

# PŘÍLOHA P V: HMOTNOSTNÍ CHROMATOGRAMY, ATOK

Hmotnostní chromatogram pro TTO firmy Atok

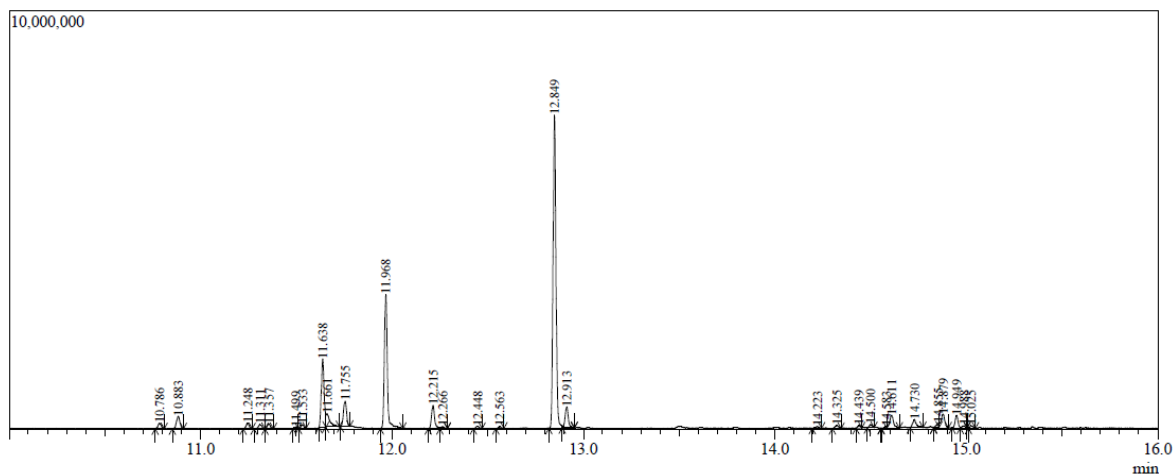


Vyhodnocení GC-MS, Atok

Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]	Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]
$\alpha$ -Thujen	10,786	0,73	96	(+)-2-Karen	12,213	2,99	94
$\alpha$ -Pinen	10,882	2,04	97	<i>cis</i> -Sabinen hydrát	12,448	0,15	76
(+)-Sabinen	11,239	0,07	77	Terpinen-4-ol	12,848	43,13	96
$\beta$ -Pinen	11,311	0,62	94	$\alpha$ -Terpineol	12,910	2,93	95
$\beta$ -Myrcen	11,356	0,52	92	Isoleden	14,217	0,36	85
$\alpha$ -Felandren	11,530	0,34	87	(+)-Aromadendren	14,608	2,66	95
$\alpha$ -Terpinen	11,638	7,09	87	$\alpha$ -Gurjunen	14,724	0,99	88
<i>p</i> -Cymen	11,661	4,51	91	Viridifloren	14,875	2,64	89
1,8-Cineol	11,754	4,82	91	$\delta$ -Kadinen	14,948	1,68	85
$\gamma$ -Terpinen	11,966	17,74	96				

# PŘÍLOHA P VI: HMOTNOSTNÍ CHROMATOGRAMY, AUSTRALIAN BODYCARE

*Hmotnostní chromatogram pro TTO firmy Australian Bodycare*

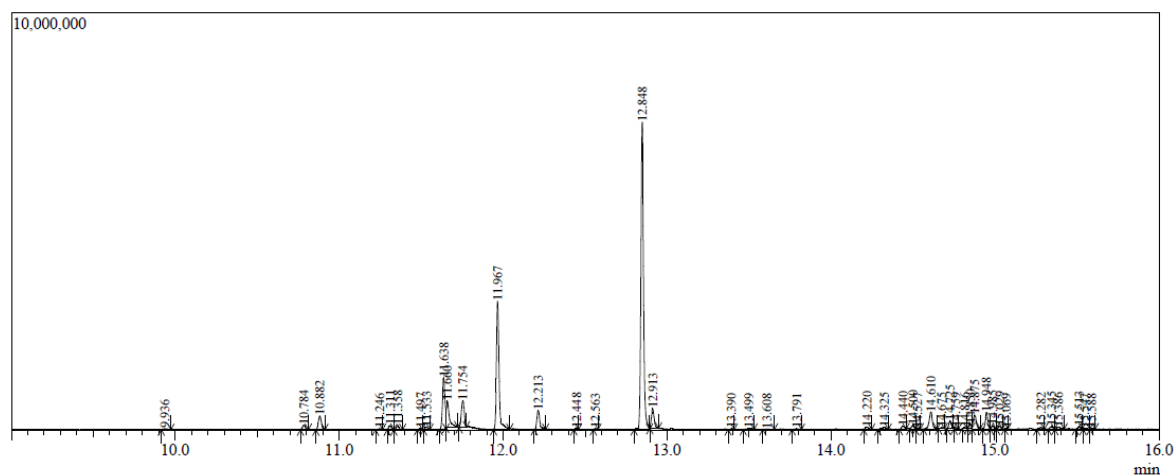


*Vyhodnocení GC-MS, Australian Bodycare*

Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]	Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]
$\alpha$ -Pinen	10,883	1,90	97	$\gamma$ -Terpinen	11,968	17,99	96
(+)-Sabinen	11,248	0,71	93	(+)-2-Karen	12,215	3,42	92
$\beta$ -Pinen	11,311	0,65	86	Terpinen-4-ol	12,849	43,79	95
$\beta$ -Myrcen	11,357	0,69	95	$\alpha$ -Terpineol	12,913	2,89	95
$\alpha$ -Felandren	11,533	0,46	91	(+)-Aromadendren	14,611	2,38	95
$\alpha$ -Terpinen	11,638	8,87	94	Viridifloren	14,879	2,92	87
<i>p</i> -Cymen	11,661	2,28	85	$\delta$ -Kadinen	14,949	1,93	87
1,8-Cineol	11,755	3,56	86				

## PŘÍLOHA P VII: HMOTNOSTNÍ CHROMATOGRAMY, SALUS

*Hmotnostní chromatogram pro TTO firmy Salus*



*Vyhodnocení GC-MS, Salus*

Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]	Složka	R <sub>T</sub> [min]	Plocha [%]	s. p. [%]
$\alpha$ -Thujen	10,784	0,68	95	(+)-2-Karen	12,213	2,87	95
$\alpha$ -Pinen	10,882	2,12	97	<i>cis</i> -Sabinen hydrát	12,448	0,16	81
(+)-Sabinen	11,246	0,16	82	Terpinen-4-ol	12,848	41,30	95
$\beta$ -Pinen	11,311	0,59	94	$\alpha$ -Terpineol	12,913	2,83	95
$\beta$ -Myrcen	11,358	0,61	92	Thujol	13,39	0,10	94
$\alpha$ -Felandren	11,533	0,35	92	Isoleden	14,220	0,40	86
$\alpha$ -Terpinen	11,638	7,04	91	(+)-Aromadenren	14,610	2,99	93
<i>p</i> -Cymen	11,660	4,22	93	$\alpha$ -Gurjunen	14,610	1,12	78
1,8-Cineol	11,754	3,88	90	Viridifloren	14,875	2,23	88
$\gamma$ -Terpinen	11,967	17,24	96	$\delta$ -Kadinen	14,985	0,35	85