

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství

Metodika šetrné extrakce z rostlinné matrice

Certifikovaná metodika

Ing. Helena Pluháčková, Ph.D.

Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.

Ing. Karolína Benešová, Ph.D.

Ing. Zdeněk Svoboda

Ing. Lucie Horáčková

Ing. Rastislav Boško

© Mendelova univerzita v Brně, Brno 2018

ISBN: 978-80-7509-619-7

Dedikace: Předkládaná metodika byla vypracována na Agronomické fakultě Mendelovy univerzity v Brně jako výstup projektu TAČR TE02000177 „Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“ aktivita: CKWP4_08 Vývoj rostlinných extraktů a využití benefitů látek se zdravotně preventivními účinky pro fortifikaci potravinářských výrobků.

Podíl práce jednotlivých autorů na tvorbě metodiky:

Ing. Helena Pluháčková, Ph.D. - vedoucí autorského kolektivu (AF MENDELU) – 35 %

Ing. Sylvie Běláková, Ph.D. (VUPS Brno) – 25 %

Ing. Karolína Benešová, Ph.D. (VUPS Brno) – 10 %

Ing. Zdeněk Svoboda (VUPS Brno) – 20 %

Ing. Lucie Horáčková (AF MENDELU) – 5 %

Ing. Rastislav Boško (AF MENDELU) – 5 %

Oponenti:

Mgr. Jan Říha, Ph.D.

BENTLEY CZECH s.r.o., Počernická 272/96, Malešice, Praha 8

Ing. Viola Kozderová

Ministerstvo zemědělství ČR, Těšnov 65/17, Praha 1

Abstrakt: Poznání biologických procesů v rostlinách, mechanismů tvorby primárních a sekundárních metabolitů na základě poznatků vědy a výzkumu vedou k tomu, že roste zájem o rostlinné látky, které jsou široce využitelné. Konečným cílem při tvorbě metodiky bylo zvolit, vyzkoušet a validovat co nejvhodnější metodu pro tvorbu extraktů silných koncentrátů účinných látek v malém množství solventu tak, aby bylo z matrice získáno maximální množství cílových analytů při současném minimálním podílu nežádoucích balastních látek, a to při dodržení výše uvedených parametrů.

Klíčová slova: extrakce, etanol, rostlinné matrice, silice, složení silic, fenolické látky

Abstract: The understanding of biological processes in plants, creation mechanisms of primary and secondary metabolites gained in the frameworks of scientific research leads to encouraged interest in plant substances that have wide possibilities of use. The final aim of this methodology development was to select, test and validate the most suitable method for the production of strong concentrates of functional substances in small amounts of solvents prepared under above-given parameters in a way that yields maximum amount of target analytes and at the same time minimum ratio of unwanted ballast compounds.

Key words: extraction, ethanol, plant matrix, essential oil, essential oil composition, phenolic compounds

Obsah

1. Cíl metodiky	7
2. Vlastní popis prací spojených s tvorbou metodiky	7
2.1. Úvod.....	7
2.2. Principy možných extrakčních přístupů.....	8
2.3. Rostlinné druhy vybrané pro šetrnou extrakci	9
2.4. Metodika stanovení obsahu a složení silic	10
2.4.1. Analýza silic metodou GC/MS.....	11
2.4.2. Výsledky stanovení obsahu a složení silic v rostlinné matrici a v extraktu	13
2.5. Stanovení obsahu fenolických látek a jejich složek v rostlinné matrici.....	15
2.5.1. Výsledky stanovení obsahu fenolických látek v rostlinné matrici a v extraktu.....	16
3. Srovnání „novosti postupů“ a popis uplatnění metodiky	17
4. Ekonomické aspekty	17
5. Seznam použité a související literatury	18

1. Cíl metodiky

Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny nabývají stále většího významu. Poznání biologických procesů v rostlinách, mechanismů tvorby primárních a sekundárních metabolitů na základě poznatků vědy a výzkumu vedou k tomu, že roste zájem o rostlinné látky, které jsou využitelné ve farmaceutickém, chemickém, potravinářském průmyslu, v kosmetice ale i přímo k léčbě chorob.

Přímo uzdravovací schopnosti ve formě čajů, tinktur, extraktů, silic apod., má ze známých druhů vyšších rostlin, které jsou považovány za léčivé minimálně 20 % zástupců této skupiny. Další rostlinné druhy slouží jako surovinové zdroje pro izolaci jednotlivých obsahových látek a poslední době se zpracovávají do různých výrobků také extrakty z rostlin.

Stěžejním faktorem, na něhož byla při vývoji metodiky kladena důležitost, je šetrnost extrakční metody, která by v extraktu zachovala všechny důležité obsahové látky a zároveň by je stabilizovala.

Jde o to zvolit metodu, která bude:

1. Efektivní z hlediska postupu, časové náročnosti a pracnosti metody.
2. Finančně nenáročná s minimálními požadavky na instrumentaci.
3. Použitelná pro větší množství extrahovaných rostlinných druhů.
4. V neposlední řadě metoda povede k omezení negativního dopadu na životní prostředí, především v oblasti využití toxických organických rozpouštědel a vzniku nebezpečného odpadu.

Konečným cílem při tvorbě metodiky bylo zvolit, vyzkoušet a validovat co nejvhodnější metodu pro tvorbu extraktů silných koncentrátů účinných látek v malém množství solventu tak, aby bylo z matrice získáno maximální množství cílových analytů při současném minimálním podílu nežádoucích balastních látek, a to při dodržení výše uvedených parametrů. Metodika je určena především zpracovatelům léčivých, aromatických a kořeninových rostlin, případně uživatelům extraktů z LAKR pro jejich využití v technologických postupech.

2. Vlastní popis prací spojených s tvorbou metodiky

2.1. Úvod

Předkládaná metodika šetrné extrakce biologicky účinných látek z rostlinného materiálu vychází z výsledků získaných při řešení projektu TAČR TE02000177 „Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“. aktivita: CKWP4_08 Vývoj rostlinných extraktů a využití benefitů látek se zdravotně preventivními účinky pro fortifikaci potravinářských výrobků.

Nejčastěji využívány jsou extrakty ze siličnatých rostlinných druhů. Silice se skládají z velkého počtu chemických sloučenin. Jsou to látky různých biogenetických skupin, většinou s nižší molekulovou hmotností, menším počtem kyslíkatých funkčních skupin a bez glykosidní vazby na cukry (BAŞER, BUCHBAUER, 2010).

Flavonoidní látky jsou důležitou skupinou rostlinných fenolů. V rostlinách hrají důležitou esenciální roli a v lidském těle působí podobně jako vitamíny (AMAKI K. & SAITO E., 2011). Flavonoidy pro všeobecné působení v organismu jsou často označovány jako bioflavonoidy, v rostlinách se vyskytují v buněčné šťávě vakuol. V organismech jsou zřejmě zapojeny do redoxních procesů (TOMKO et al., 1999; VELÍŠEK & HAJŠLOVÁ, 2009, KOVÁCS, 2016).

Výsledky, na jejichž základě byla tato metodika vyvinuta, byly naměřeny v souladu se zásadami dobré laboratorní praxe z reálných vzorků odebraných v letech 2014 až 2016 z lokalit pěstování Žabčice (Polní pokusná stanice AF MENDELU), sběrové druhy byly nasbírány ve vhodných lokalitách v blízkosti stanice. Stanovení obsahových látek, jejich složení a následné stanovení v extraktech bylo provedeno v laboratořích Ústavu pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství (ÚPŠRR) AF MENDELU a Výzkumného ústavu pivovarsko-sladařského (VUPS) v Brně.

2.2. Principy možných extrakčních přístupů.

1. Extrakce kapalným rozpouštědlem za zvýšené teploty. Do této kategorie spadá extrakce dle Soxhleta a různé způsoby přímého vyluhování v horkém rozpouštědle, včetně povaření, zpravidla za stálého míchání. Tyto extrakční postupy jsou často velmi účinné, ale nespádají do kategorie šetrných extrakčních metod. Při zvýšené teplotě se z rostlinné matrice uvolňuje vysoký podíl balastních látek, a naopak může docházet k termálnímu rozkladu extrahovaných analytů. Možnosti použití vody jako netoxického rozpouštědla jsou omezené a extrakce organickým rozpouštědlem s sebou přináší celou řadu problémů s jeho odstraňováním ze systému a recyklací nebo aspoň vhodným způsobem likvidace.
2. Extrakce kapalným rozpouštědlem za normálních teplot (macerace). Tato kategorie extrakcí je bezkonkurenčně nejšetrnější k matrici i analytům a zároveň má nízkou finanční náročnost. Její nevýhodou je zpravidla dlouhý extrakční čas a slabší solvatační schopnosti rozpouštědel za nižších teplot. Ty však zároveň mohou umožňovat při vhodné volbě rozpouštědla či směsi rozpouštědel nastavit extrakční

podmínky tak, aby se extrahovalo co nejvíce žádoucích analytů a spolu s nimi co nejméně balastních látek. Na rozdíl od extrakce za zvýšené teploty neztrácí rozpouštědlo následně solvatační schopnosti a nedochází k vysrážení části rozpuštěných látek z roztoku, což usnadňuje další zpracování. Zároveň je metoda velmi nenáročná na instrumentaci a nijak nelimituje zpracování velkého množství vzorku nebo velkého počtu jednotlivých vzorků.

3. Extrakce instrumentálními metodami. V současné době máme k dispozici velké množství specializovaných, vysoce účinných instrumentálních extrakčních metod: extrakci nadkritickou tekutinou (SFE), extrakci kapalinou s pomocí ultrazvuku nebo mikrovlnného záření (UAE, MAE), extrakci kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE) a řadu dalších metod nebo jejich kombinací (FILLY et al. 2014). Většina těchto metod nejlépe splňuje některý z výše uvedených stěžejních faktorů, ale v daném případě se žádná z nich nenabízí jako univerzálně vhodná. UAE a MAE metody nejsou dostatečně šetrné k matici a analytům. FORNAZI et al. 2012 uvádí, že SFE je velmi ohleduplná k životnímu prostředí, ale možnosti automatizace jsou u této metody omezené a dosud neumožňuje zpracování velkého množství vzorků naráz. PLE má vynikající extrakční účinnost, ale omezenou selektivitu a s požadovanými analyty se koextrahuje velké množství balastních látek. Všechny metody jsou náročné na instrumentaci, bývají pracnější a ekonomicky méně výhodné. Mají omezenější nároky na toxická organická rozpouštědla, ale stále je v určité míře potřebují.

4. Macerace. V současné době se optimalizovaná macerace jeví jako nejvhodnější přístup.

Tato metoda je k matici i extrahovaným látkám nejšetrnější, má nízké nároky z hlediska pracnosti a finančních nákladů, nevyžaduje málo dostupnou instrumentaci, nepůsobuje v matici žádné teplotní změny a generuje malé množství balastních látek. Pro daný účel metoda zároveň umožňuje využít ekologicky nezávadné rozpouštědlo (zkoumány byly směsi ethanol/voda v různých koncentracích) a nevytváří žádný toxický organický odpad, ale pouze přímo využitelné extrakty.

2.3. Rostlinné druhy vybrané pro šetrnou extrakci

Byly vybrány druhy běžné v pěstitelské praxi LAKR a to:

s obsahem silic:

- heřmánek lékařský *Matricaria recutita* L

- máta peprná *Mentha x piperita* Huds.
- meduňka lékařská *Melisa officinalis* L.
- šalvěj lékařská *Salvia officinalis* L.

s obsahem fenolických látek:

- měsíček lékařský, *Calendula officinalis* L.,
- jitrocel kopinatý *Plantago lanceolata* L.,
- bez černý *Sambucus nigra* L.,
- lípa malolistá *Tilia cordata* Mill..

Všechny výše uvedené druhy jsou z analytického hlediska podrobně popsány a patří k nejčastěji využívaným druhům. Jejich monografie jsou součástí Českého lékopisu 2016.

2.4. Metodika stanovení obsahu a složení silic

Optimalizaci stanovení silic v extraktu předcházelo **stanovení obsahu silic v rostlinné matrici**.

Principem destilace je převedení kapaliny v páru, její odvedení s následnou kondenzací. Slouží k dělení nebo čištění směsí na základě odlišných varů jejich složek. Vodní pára za vysokého tlaku prochází rostlinným materiálem a aromatické komponenty jsou z něj extrahovány. Vonné látky jsou parou unášeny do horní části kolony a chladiče, kde spolu s vodou kondenzují silice jsou poté odděleny z vodní hladiny. Je to jedna z velmi používaných metod k separaci. Uplatňuje se při zpracování ropy, ale i při výrobě destilátů v potravinářství.

Destilace vodní parou se používá pro málo těkavé látky, které se nemísí s vodou nebo v ní jsou jen velmi málo rozpustné bez zahřívání na jejich bod varu. V organické syntéze se využívá při čištění látek, které se při teplotě varu rozkládají nebo podléhají jiným nežádoucím změnám. Soustava dvou vzájemně nemísitelných kapalin se destiluje při teplotě nižší, než odpovídá teplotě varu těkavější složky.

Silice byla stanovena podle principu uvedeném v Český lékopisu bez xylenu. Stanovení se provádělo se 40,0 g rozdrcené drogy ve varné baňce o objemu 1000 ml. Droga byla rozdrcena těsně před kvalitativním přenesením do varné baňky. Přidalo se 400 ml destilované vody. Destilace probíhala 2 hodiny – čistý var. Poté se silice odpustila do trubice pod hruškovitou nádobou, kde se na stupnici odečetlo její množství. Silice dále byly uchovávány ve vialkách v mrazničce. Takto připravené silice byly následně analyzovány doporučenými metodami.

2.4 1. Analýza silic metodou GC/MS

Přístroje a zařízení:

- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem. Chromatograf musí být uzpůsoben pro práci s kapilárními kolonami. Ohřev musí umožňovat izotermální i teplotně programovatelný provoz. Chromatograf musí být dále vybaven vhodným vyhodnocovacím zařízením (PC vybavený vhodným profesionálním softwarem).
- Vhodná kapilární kolona pro daný účel (např. SLB-5MS),
- autosampler (např. CombiPal),
- analytické váhy,
- kalibrovaná pipeta (1 ml),
- kalibrované odměrné baňky (10 ml, 25 ml),
- mikrostříkačky (10 µl, 50 µl, 100 µl),
- vialky (10 ml) s víčky se septem,
- helium (čistota min. 5.5).

Chemikálie, roztoky, materiály:

- hexan,
- standardy.

Není-li uvedeno jinak používají se chemikálie čistoty p.a., nebo vyšší.

Pracovní roztok standardů

Do 25 ml odměrné baňky byly na analytických vahách naváženy standardy a baňka byla hexanem doplněna po rysku. Takto připravený pracovní roztok standardů byl použit pro přípravu kalibračních roztoků.

Příprava vzorku

Do 10ml vialky byly nepipetovány 4 ml deionizované vody a 1 ml rostlinného extraktu a poté byla vialka uzavřena víčkem se septem. Takto připravený vzorek byl analyzován metodou statické head-space ve spojení s GC/MS.

Tab. 1 Podmínky statické head-space:

Doba kondicionace vzorku	30 minut
Teplota kondicionace vzorku	60 °C
Teplota HS stříkačky	60 °C
Objem vzorku (plynné fáze)	250 µl

Tab. 2 Podmínky chromatografické analýzy:

Plynový chromatograf	Trace Ultra – Thermo Scientific
Kolona	kapilární kolona SLB-5MS (60m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Nosný plyn	helium – 1,5 ml/min
Teplotní program	50 °C (0,6 min), nárůst 3 °C/min. do 150 °C (10 min), nárůst 10 °C/min. do 200 °C (5 min)
Teplota injektoru	150 °C, splitless: 1 min
Objem vzorku	250 µl
Detektor MS	Trace DSQ – Thermo Scientific
Teplota iontového zdroje	200 °C
Ionizační energie	70 eV
Sken m/z	SIM

Kalibrace

Do 10ml vialky bylo nepipetováno 5 ml deionizované vody a poté byl pod hladinu mikrostříkačkou přidán příslušný objem pracovního roztoku standardů (viz tab.3) a vialka byla uzavřena víčkem se septem. Takto připravené kalibrační roztoky byly použity k měření metodou statické head-space ve spojení s GC/MS.

Tab. 3 Roztoky standardů

Standard	1	2	3
Objem pracovního roztoku standardu (μl)	0,5	1	3

Výpočet a vyhodnocení

Kalibrační křivka a vlastní stanovení analýz metodou vnějšího standardu byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí softwarového programu Xcalibur.

K zastoupení obsahu jednotlivých složek ve vzorku se používá porovnání s vnějším standardem s nástřikem kalibračních vzorků. Tento způsob poskytuje informace o retenčním čase a relativní odezvě pro analyzovanou látku.

Výsledek se uvádí jako aritmetický průměr výsledků dvou nezávisle připravených vzorků.

Výsledky se uvádějí mg/l na 1 desetinné místo.

2.4.2. Výsledky stanovení obsahu a složení silic v rostlinné matrici a v extraktu

Tab. 4 Obsah silic v rostlinných matricích

rostlinný druh	obsah silice v ml.kg vysušené drogy
heřmánek lékařský, <i>Matricaria recutita</i> L.	0,065 ml
máta peprná <i>Mentha x piperita</i> Huds.	0,324ml
meduňka lékařská, <i>Melissa officinalis</i> , L.	0,25 ml
šalvěj lékařská, <i>Salvia officinalis</i> L.	0,205 ml

Obsahy odpovídaly požadavkům Českého lékopisu 2016.

Postup

Rostlinné matrice z těchto siličnatých druhů byly macerovány v potravinářském lihu ve variantách lihovitosti: 40%, 60% a 80%. Macerace proběhla ve skleněných nádobách ve tmě při pravidelném míchání jedenkrát denně po dobu 30dnů. Navážka drogy pro maceraci odpovídala navážce určené pro destilaci vodní parou podle Českého lékopisu 2016. Z takto získaných macerátů se chromatograficky stanovily složky silice.

Výsledky

Tab. 5 Heřmánek lékařský

analyt	v % silice	40% v ml/l	60% v ml/l	80% v ml/l
p-cymen	0,4	-	-	0,17
limonen	0,2	-	-	0,094

farnesene	4,1	-	-	1,7
alfa-bisabolol	1,7	0,00004	0,00006	0,00002
bisabolol oxide A	87,9	4,5	55,2	273,7

Tab. 6 Máta peprná

analyt	v % silice	40% v ml/l	60% v ml/l	80% v ml/l
limonen	7,05	-	-	152,16
eukalyptol	8,19	183,3	168,57	318,53
isopulegol	0,01	-	-	-
menthon	44,23	428,6	871,10	2012,47
menthol	37,54	-	-	-
pulegol	0,03	18,11	-	8,86
karvon	0,01	-	-	-
mentel acetat	2,57	2,81	108,71	

Tab. 7 Meduňka lékařská

analyt	v % silice	40% v ml/l	60% v ml/l	80% v ml/l
limonen	3,9	-	0,0393	0,1684
linalool	0,51	0,0043	0,1548	0,1891
citronellal	43,0	0,0071	0,755	0,4383
citral	45,2	-	0,0272	0,4543
nerol	0,01	-	-	-
geraniol	0,02	-	-	-

Tab. 8 Šalvěj lékařská

analyt	v % silice	40% v ml/l	60% v ml/l	80% v ml/l
cineol	19,4	2,2	6,2	8,3
thujon	30,0	5,7	44,8	70,0
kafr	28	48,9	82,7	89
borneol	5,8	-		
bornyl acetát	5,2	-		-
a-caryophyllen	11,7			0,8

Z experimentálních výsledků hodnocení zachování složek silic u výše sledovaných rostlinných druhů při extrakci je zřejmé že vyšší lihovitost rozpouštědla znamená zachování více složek silice. Mezi jednotlivými druhy jsou v analytech rozdíly u jednotlivých sledovaných druhů. Tyto rozdíly jsou způsobeny mimo jiné způsobem uložení útvarů se silicemi (kanálky, trichomy...), ale také způsobem úpravy rostlinné matrice před vlastní extrakcí - sušení, řezání, vlhkost a pod. Což je nutné při přípravě extraktů respektovat.

2.5. Stanovení obsahu fenolických látek a jejich složek v rostlinné matici

Pro extrakci fenolických látek a flavonoidů byly vybrány pěstovatelné druhy a druhy nejčastěji sbírané.

U **jitrocele kopinatého** (*Plantago lanceolata* L.), kde byl sledován obsah:

- kyseliny chlorogenové,
- kyseliny kávové,
- ver-baskozidu,
- kyseliny ferulové,
- rutinukvercetin.

V **lípě malolisté** (*Tilia cordata* Mill.) Byl sledován obsah:

- kyseliny chlorogenové,
- kyseliny kávové,
- rutinu,
- hyperozidu,
- izo-kvercetrozidu,
- tilirozidu,
- kvercetin,
- kempferolu.

V **měsíčku lékařském** (*Calendula officinalis* L.) byl sledován obsah:

- kyseliny chlorogenové,
- kyseliny kávové,
- kyseliny kumarové,
- rutinu,
- hyperozidu,
- izokvercetrozidu,
- kvercetin,
- kempferolu.

V **bezu černém** (*Sambucus nigra* L.) byl sledován obsah:

- kyseliny chlorogenové,
- kyseliny kávové,
- rutinu,
- hyperozidu,
- izokvercetrozidu,
- kvercetin,
- kempferolu.

Ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, a.s. (VÚPS) byla provedena extrakce fenolických látek z uvedených rostlin a následně byly tyto látky podrobeny chromatografické analýze na kapalinovém chromatografu UPLC s PDA detektorem.

Fenolické látky obsažené ve vybraných druzích byly z homogenizovaných vzorků extrahovány „šetrnou extrakcí“ vodným roztokem 40, 60 a 80% ethanolu.

Pro srovnání výsledků byly celkové (volné, rozpustné esterifikované a nerozpustné, vázané) fenolické látky z drog izolovány v souladu s postupem uvedeným v Českém lékopisu (2009), který byl modifikován. Takto připravené vzorky byly analyzovány na kapalinovém chromatografu WATERS ACQUITY. UPLC gradientovou elucí s detektorem WATERS 2996 PDA.

Mobilní fáze byla tvořena deionizovanou vodou modifikovanou 0,3% kyselinou mravenčí a methanolem. Jako kolona byla použita Ascentis Express C18 150 x 3mm, 2.7µm particle size. Z fenolických látek byly stanoveny kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina ferulová, verbacosid, rutin, quercetin, hyperosid, isokvecitrosid.

2.5.1. Výsledky stanovení obsahu fenolických látek v rostlinné matrici a v extraktu

Tab. 9 Obsahy fenolických látek ve vybraných rostlinných druzích a jejich extraktech

rostlinná matrice	fenolické látky (mg.l ⁻¹)	Extrakt (mg.l ⁻¹)		
		40% ethanolu	60% ethanolu	80% ethanolu
Jitrocel kopinatý	252,3	216,0	123,9	129,3
Měsíček lékařský	364,7	18,5	10,4	10,7
Bez černý	1254,4	162,9	143,1	87,0
Lípa malolistá	171,8	33,6	20,4	17,5

Fenolické látky ve sledovaných druzích byly při extrakci zachovány u druhů: jitrocel kopinatý, měsíček lékařský i u bezu černého při lihovitosti **40 %**.

3. Srovnání „novosti postupů“ a popis uplatnění metodiky

Snahy o kvalitu produktů na bázi léčivých rostlin jsou dlouholeté. Narůstá počet zpracovatelů, kteří léčivé rostliny zpracovávají do potravních doplňků, kosmetických přípravků, různých kořenících směsí, případně do prostředků bytové chemie. Extrakty z léčivých, aromatických a kořeninových rostlin se používají k fortifikaci různých nápojů i piva. Roste počet zpracovatelů, kteří k fortifikaci produktů přidávají extrakty za účelem stabilizace svých produktů. Velmi dobře se trhu uplatňují tinktury (koncentrované extrakty), které mají nejrůznější zdravotní benefity. Extrakty si zpracovatelé vyrábí buď sami, nebo nechávají si je připravovat na zakázku, případně je dovážejí ze zahraničí. Extrakčním činidlem je zpravidla potravinářský etanol různé lihovitosti. V uplatněné metodice se experimentálně potvrdilo, že lihovitost extrakčního činidla je nutno volit podle charakteru rostlinné matrice, která má být extrahována. V případě přípravy extraktů u nichž bude požadováno zachování obsahových látek bude certifikovaná metodika využitelná. Z hlediska perspektivy využívání extraktu jde o nový přístup, který respektuje požadavky na kvalitu konečného produktu.

4. Ekonomické aspekty

Stanovení obsahu sekundárních metabolitů v rostlinné matrici je obecně finančně velmi náročné, a to i za předpokladu se kvantifikace týká malého počtu vzorků. Vzhledem k tomu, že nebyla analytika rostlinných matric určených k extrakci běžnou komerční aktivitou, vycházela cena za stanovení obvykle z dohod mezi laboratoří provádějící analýzu a zadavatelem, který měl zájem na obsahu jednotlivých složek silice, nebo jednotlivých složek fenolických látek. Kalkulace ceny proto není obvyklá a ani srovnatelná mezi případnými různými pracovišti s možnostmi kvantifikace sekundárních metabolitů v extraktech. Zavedení možnosti kvantifikace však představuje plně vybavenou laboratoř. Pořízení nezbytných přístrojů – chromatografy a další představuje statisícové investice s možností přesahu přes milion(y) Kč. Kvalifikovaný odhad nákladů pro pořízení kompletního přístrojového vybavení dosahuje 2,5 mil. Kč včetně nezbytných chemikálií 250 tis. Kč. Přijatelnou možností pro již zavedené laboratoře jsou pak kalkulace ceny zahrnující režijní i mzdové náklady v rozmezí 300-800 Kč /vzorek dle náročnosti postupu. Vzhledem k tomu, že některé kroky lze provádět

souběžně jediným pracovníkem, nedochází ke zvýšení mzdových nákladů ani při analýze většího počtu vzorků. Za předpokladu plného využití vlastního pořízeného vybavení lze tedy dosáhnout úspory v řádu desítek Kč na vzorek (dle náročnosti analýzy). S ekonomickými aspekty pro šetrnou extrakci úzce souvisí "lihové hospodářství" každého producenta extraktů. Při respektování doporučených postupů na lihovitost rozpouštědla dojde k úspoře a šetrnému hospodaření s lihem.

5. Seznam použité a související literatury

AMAKI K. & SAITO E., 2011: *Role of Chlorogenic Acid Quinone and Interaction of Chlorogenic Acid Quinone and Catechins in the Enzymatic Browning of Apple Bioscience*. Biotechnology and Biochemistry, 75(5): 829-832. ISSN 1470-8744.

BAŞER K, BUCHBAUER G., 2010: *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 975 s., ISBN 14-200-6315-4.

BENEŠOVÁ, K. -- PLUHÁČKOVÁ, H. -- BĚLÁKOVÁ, S. -- GRANDA CRUZ, L. Analysis of selected substances with antioxidant effects in medical plants. In *7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis*. 1. vyd. Prague: University of Chemistry and Technology, Prague, 2015, s. 229. ISBN 978-80-7080-934-1

HOHNOVÁ, B. -- PLUHÁČKOVÁ, H. -- VÁGNEROVÁ, L. Pressurized liquid extraction and ultrasound-assisted extraction of silymarin complex from fruits of *Silybum marianum* L. Gaertner. In *23rd International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2017)*. Gumpoldskirchen: book-of-abstracts.com, 2017, s. 214. ISBN 978-3-9504017-7-6.

BOŠKO, R. -- PLUHÁČKOVÁ, H. The optimization of methods for phenolic compounds determination in elderberry (*Sambucus nigra* L.). In *MendelNet 2017: Proceedings of International PhD Students Conference*. Brno: Mendel University in Brno, 2017, s. 514--519. ISBN 978-80-7509-529-9.

BOŠKO, R. -- VÁGNEROVÁ, L. -- PLUHÁČKOVÁ, H. -- ŠOFROVÁ, J. -- SMIROUS, P. The Variability of Caraway (*Carum carvi* L.) Essential Oils. In *MendelNet 2016: Proceedings of International PhD Students Conference*. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2016, s. 30--34. ISBN 978-80-7509-443-8.

FOJTÍKOVÁ, L. -- PLUHÁČKOVÁ, H. Variability of the content and composition of lavender medical (*Lavandula angustifolia* P. MILL.) essential oils of different origin. In *MendelNet 2017: Proceedings of International PhD Students Conference*. Brno: Mendel University in Brno, 2017, s. 532--536. ISBN 978-80-7509-529-9.

BOŠKO, R. -- PLUHÁČKOVÁ, H. -- SVOBODA, Z. Variability of the essential oil content in lavender (*Lavandula angustifolia* P. Mill.). In *MendelNet 2015: Proceedings of*

International PhD Students Conference. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015, s. 23--27. ISBN 978-80-7509-363-9.

KOVÁSC Z., 2016: *Flavonoidy, antokyanidíny*. Databáze online [cit. 2.12.2016]. Dostupné na: www.flavin7.sk/dl/Dokumentumok/flavin7_antocianidiniek_sk.pdf

TOMKO J., KRESÁNEK J., HUBÍK J., SUCHÝ V., FELKLOVÁ M., SIKYTA B. & LIBICKÝ A., 1999: *Farmakognózia, učebnica pre farmaceutické fakulty*. Martin: Osveta, 424 s. ISBN 80-8063-014-3.

VELÍŠEK J. & HAJŠLOVÁ J., 2009: *Chemie potravin 1 + 2*. 3. vydání. Tábor: Osis, 320 s. ISBN 978-80-86659-17-6.

Název: **Metodika šetrné extrakce z rostlinné matrice**

Certifikovaná metodika (osvědčení MZE-17222)

Autoři: Pluháčková Helena, Běláková Sylvie, Benešová Karolína, Svoboda Zdeněk,
Horáčková Lucie, Boško Rastislav

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Publikace neprošla jazykovou úpravou

Vydání: první

Rok: 2018

Počet stran: 20

Náklad: 35 ks

ISBN: 978-80-7509-619-7