

APLIKACE MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ PRO ANALÝZU BYLINNÝCH SILIC

VERONIKA MLEJOVÁ*, PETRA PAVLÍKOVÁ,
PETR DOBIÁŠ, MARTIN ADAM a KAREL
VENTURA

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie, Studentská 573, 532 10 Pardubice
Martin.Adam@upce.cz

Došlo 1.6.09, přijato 23.1.10.

Klíčová slova: mikroextrakce tuhou fází, plynová chromatografie, silice

Úvod

Vonné květiny a jejich silice jsou používány už od dob antiky jako koření nebo vůně, v lékařství jako antimikrobiální látky a k ochraně skladovaných surovin^{1,2}. V současnosti jsou silice testovány jako potenciální látky pro hubení plevele, nebo také k léčení nemocí^{3,4}. Hlavní důvody, které vedou k jejich využívání, jsou poměrně snadné získávání a biodegradace, při které nedochází ke znečišťování životního prostředí. Dále hrají silice významnou roli jako ochrana rostlin proti škůdcům^{1,2,5}. Všechny tyto vlastnosti je předurčují k použití na citlivých místech jako jsou školy, restaurace nebo nemocnice⁶.

Silice jsou sloučeniny těkavých látek, které se obvykle vyskytují pouze v nízkých koncentracích⁷, používaných s velkým úspěchem v aromaterapii společně s konvenční a alternativní medicínou⁸. Do dnešní doby byly silice studovány zejména z hlediska jejich chutě a vůně pro využití v potravinách, nápojích a dalších výrobcích. Avšak v současnosti roste zájem o silice a jejich složky díky jejich relativní nezávadnosti, popularitě u konzumentů a díky možnosti jejich víceúčelového využití^{9,10}. V literatuře se objevuje mnoho zpráv o jejich antimikrobiálních, antimykotických a antioxidačních vlastnostech^{11,12}.

Silice mohou být izolovány různými metodami, např. lisováním, destilací s vodní parou nebo extrakcí do organického rozpouštědla¹³. Nicméně monoterpeny jsou známy svou náchylností k chemickým přeměnám při provádění destilace s vodní parou. Také při klasické extrakci organickým rozpouštědlem dochází ke ztrátám těkavých složek, zejména při odstraňování extrakčního činidla¹⁴. Vzorková-

ní headspace (HS, z prostoru nad vzorkem) je další možností, jak izolovat silice ze vzorku. Tímto postupem se zajistí selektivní extrakce silic bez dalších složek matrice, které by mohly dále komplikovat vlastní stanovení, ke kterému se zpravidla využívá plynové chromatografie¹⁵.

Alternativou výše zmíněných technik je mikroextrakce tuhou fází (SPME, Solid Phase Microextraction), která byla poprvé představena Pawliszynem a spol.^{16,17}. Tato technika redukuje použití organických (toxických) rozpouštědel a podstatně zkracuje dobu extrakce, jelikož umožňuje automatizaci postupu při přípravě vzorku. Významnými znaky SPME jsou jednoduchost, nízké pořizovací a provozní náklady, rychlost a také selektivita a citlivost ve spojení s vhodnou detekční metodou^{18,19}.

Hlavním cílem této studie bylo posoudit vhodnost různých metod, a to mikroextrakce tuhou fází z headspace prostoru (HS-SPME), mikroextrakce tuhou fází ve spojení s hydrodestilací (HD-SPME) a destilace s vodní parou, pro izolaci silic z rostlin a porovnat tyto techniky z různých hledisek mezi sebou.

Experimentální část

Zařízení a chemikálie

Vzorky analyzovaných rostlin, kterými byly máta peprná (*Mentha piperita* L.), levandule lékařská (*Lavandula angustifolia* L.) a šalvěj lékařská (*Salvia officinalis* L.), byly pořízeny u firmy Botanicus s.r.o. (Ostrá, Česká republika). Tyto byliny byly rozděleny na stonky, květy a listy a poté sušeny 24 hodin za laboratorní teploty. Skladovány byly v tmavých prachovnicích za laboratorní teploty. Před analýzou byly zkoumané části nadrceny v třecí misce, aby bylo dosaženo maximálního specifického povrchu.

Standardy jednotlivých silic byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Jednalo se o eukalyptol (98%), kamfor (95%), nerol (97%), borneol (99%), karvakrol (98%), menthon (99%), limonen (99%), α -pinen (99%), 1,4-cineol (98,5%) a α -thujon (96%). Všechny standardy i jejich zásobní roztoky byly skladovány v lednici při 4 °C. K extrakci byl použit 99% *p*-xylen (Merck, Darmstadt, Německo) a xylen p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Česká republika).

Před extrakcí metodou HS-SPME byly vzorky temperovány v termostatu Julabo EC-5 (Julabo Labortechnik, Seelbach, Německo), který má teplotní rozsah –20 °C až +100 °C. Při temperaci a následné extrakci byly vzorky umístěny ve vzorkovacích nádobkách (Supelco, Bellefonte, PA, USA) o objemu 10 ml s víčky se septy potaženými teflonem. K HS-SPME a HD-SPME extrakcím bylo použito vláknů 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS Stable Flex (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Držák pro uchycení vláknů

* Veronika Mlejová získala s touto prací 2. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2009 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

na při manuálním vzorkování rovněž dodala firma Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Pro destilaci s vodní parou bylo použito topné hnízdo LTHS 500, 220 V, 480 W (Brněnská Drutěva v.d., Brno, ČR) a 500ml varná baňka s kulatým dnem a zábrusovým hrdlem. Chladicí systém byl tvořen svislou trubicí opatřenou zábrusem pro připojení na varnou baňku, zahnutou trubicí, svislým kuličkovým chladičem, souborem tvořeným trubicí s postranním ramenem, baňkou hruškovitého tvaru, odměrnou trubicí s rozšířením kulovitého tvaru, třícestným kohoutem a šikmou přípojkou.

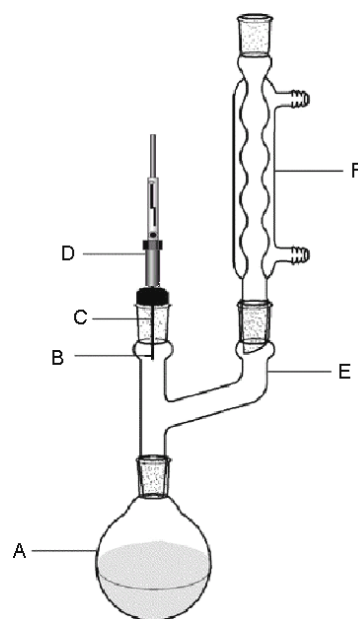
Analýza extraktů získaných jednotlivými extrakčními technikami byla provedena na plynovém chromatografu Hewlett-Packard 5890 (Hewlett Packard, Avondale, USA) vybaveným plamenově-ionizačním detektorem (FID). Separace byla provedena na 25 m dlouhé kapilární koloně Ultra # 2 o průměru 0,32 mm s fenylmethylsilikonem (0,52 μm) jako stacionární fází. Teplotní rozsah kolony je $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $+325\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro desorpci analytů z SPME vlákna byl použit SPME liner o objemu 250 μl .

Pracovní postupy při provedení jednotlivých extrakčních metod

Pro SPME techniku bylo naváženo 0,5 g rozdrčeného a vysušeného vzorku do 10ml vzorkovací nádoby. Nádoby byly uzavřeny víčky se septy potaženými teflonem. Každý vzorek byl před extrakcí temperován při teplotě $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 min. Ihned po temperaci byla při stejné teplotě provedena extrakce. Septum ve víčku bylo propíchnuto jehlou chránící vlákno. Pak následovalo vysunutí vlákna do headspace prostoru nad vzorkem. Hloubka vysunutí jehly činila 2 cm. Po uplynutí doby extrakce (25 min) bylo vlákno zasunuto zpět do jehly. Ta byla vytažena ze vzorkovací nádoby a vsunuta do nástřikového prostoru plynového chromatografu, kde bylo vlákno vysunuto z jehly a byla provedena tepelná desorpce. Vlákno bylo z důvodu dočištění ponecháno v nástřikovém prostoru po dobu 10 min během analýzy. Hloubka zasunutí jehly do nástřikového prostoru činila 2 cm.

V případě spojení techniky HD-SPME bylo 2,5 g vzorku byliny spolu se 75 ml destilované vody zahříváno v destilační baňce o objemu 250 ml. Destilace byla prováděna po dobu 10 min, poté bylo do prostoru destilačního nástavce umístěno SPME vlákno (50/30 μm DVB/CAR/PDMS). Extrakce současně s destilací byla prováděna po dobu 15 min, hloubka vysunutí vlákna do prostoru destilačního nástavce byla 1,4 cm. Po ukončení sorpce byly extrahované sloučeniny analyzovány metodou GC-FID. Vlákno bylo z důvodu dočištění ponecháno v nástřikovém prostoru po dobu 10 min během analýzy při nastavené hloubce vysunutí vlákna 2 cm. Schéma aparatury je znázorněno na obr. 1.

Při destilaci s vodní parou bylo postupováno dle normy ČSN ISO 6571. Do varné baňky bylo odměřeno 300 ml destilované vody. Na baňku byl nasazen chladicí systém. Odměrná trubice a šikmá trubice byly pomocí postranního ramena naplněny destilovanou vodou. Pipetou



Obr. 1. Schéma aparatury pro HD-SPME; A – destilační baňka, B – SPME vlákno, C – jehla SPME vlákna, D – držák SPME vlákna, E – destilační nástavec, F – zpětný chladič

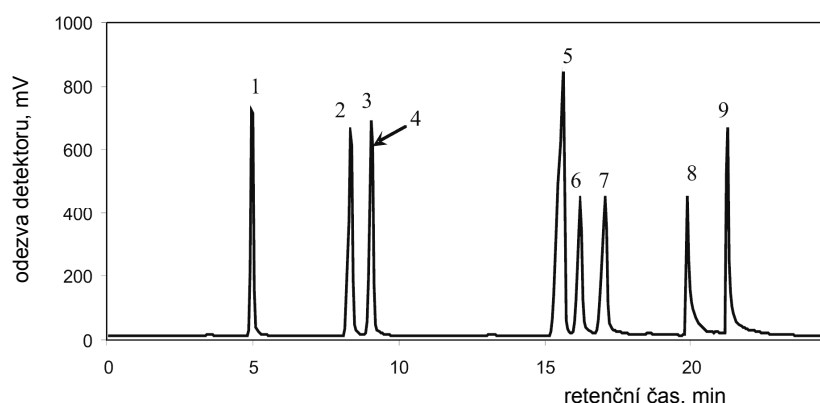
byl postranním ramenem přidán 1 ml *p*-xylynu. Varná baňka byla zahřívána tak, aby rychlost destilace byla 2 až 3 ml min^{-1} . Po 30 min byl zahřev přerušen, trojcestným kohoutem byl *p*-xylen přepuštěn do dělené trubice (horní hladina vyrovnána s nulou) a po ochlazení byl odečten objem *p*-xylynu. Do varné baňky bylo přidáno 20 g rozdrčeného vzorku byliny a znovu spuštěna destilace o rychlosti 2–3 ml min^{-1} , která probíhala 4 h. Po ukončení zahřívání byla aparatura nechána zchladnout a byl odečten objem organické fáze²⁰. K nástřiku do plynového chromatografu byl použit 1 μl zředěného destilátu.

Všechny získané analyty byly separovány na kapilární koloně Ultra # 2. Jako nosný plyn byl použit dusík. Desorbovaný analyt byl veden na kolonu za použití děliče toku 1:10. Analýza extraktů probíhala při teplotě nástřiku $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplotě detektoru $220\text{ }^{\circ}\text{C}$. Přetlak na vstupu do kolony činil 50 kPa. Teplotní program na koloně je uveden v tab. I. Výsledky kvantitativní analýzy byly vyhodnoceny metodou standardního přídatku. Chromatogram směsi standardů hledaných silic je zobrazen na obr. 2.

Tabulka I

Použitý teplotní gradient pro analýzy na plynovém chromatografu

Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Izoterma [min]	Gradient [$^{\circ}\text{C}/\text{min}$]
60	5	2
86	0	20
220	8	0



Obr. 2. Chromatogram směsi standardů získaný GC-FID analýzou; 1 – α -pinen, 2 – 1,4-cineol, 3 – eukalyptol, 4 – limonen, 5 – kamfor, 6 – menthon, 7 – borneol, 8 – nerol, 9 – karvakrol

Výsledky a diskuse

Normovaná metoda pro stanovení silic v bylinách založená na destilaci s vodní parou je metoda náročná nejen na čas, ale vyžaduje i větší množství analyzovaného vzorku. Tyto nevýhody byly později částečně eliminovány aplikací metody SPME využívající sorpci sledovaných složek silic z prostoru headspace. Cílem naší studie bylo pokusit se o kombinaci obou způsobů a využít tak jejich výhod. Bylo však třeba nejprve provést optimalizaci této HD-SPME metody.

Optimalizace HD-SPME metody

Optimalizace podmínek pro metodu HD-SPME byla provedena za účelem docílení co největší účinnosti extrakce. Optimalizovanými faktory byla doba extrakce a hloubka zasunutí vlákna do destilační aparatury. Pro tento účel byl použit květ levandule lékařské v množství 2,5 g. Při této hmotnosti vzorku jsou plochy píků v rámci dané metody dostatečně velké pro správné vyhodnocení chromatogramu a také je tato hmotnost přijatelná v souvislosti s dostatečnou homogenitou vzorků. Konkrétními ukazateli byly plochy píků eukalyptolu, α -thujonu a kamforu.

Optimalizace doby extrakce

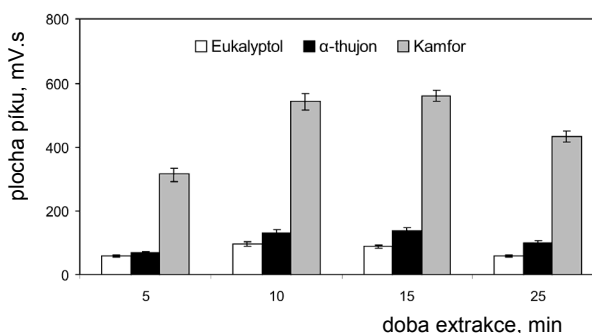
Obecně platí, že s prodlužující se dobou extrakce se zvyšuje množství sorbovaných sloučenin, a to až do dosažení rovnovážného stavu. V případě spojení SPME s destilací s vodní parou však dochází s prodlužující se extrakční dobou ke zvýšení vlivu vodní páry na stacionární fázi. Větší vliv vodní páry na stacionární fázi způsobuje její bobtnání, v důsledku čehož dochází ke snížení množství sorbovaných složek silic.

Při optimalizaci doby extrakce byly zkoušeny časy 5, 10, 15 a 25 min. Výsledky jsou graficky znázorněny na obr. 3, ze kterého vyplývá, že nejvíce α -thujonu a kamforu

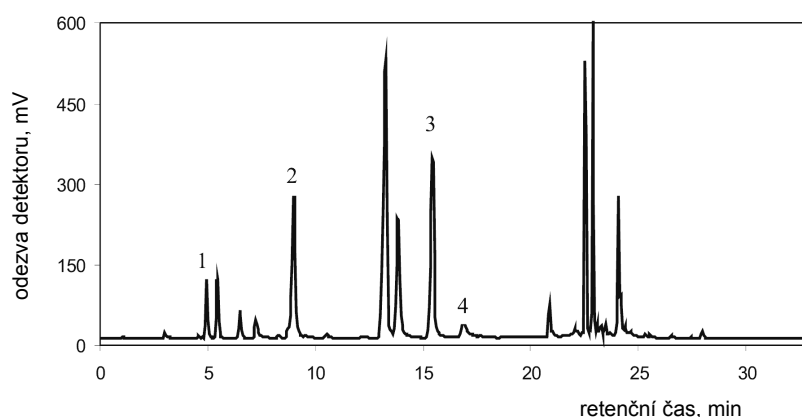
bylo sorbováno při extrakční době 15 min. Při delší době extrakce již nárůst sorbovaných sloučenin pozorován nebyl, naopak docházelo k poklesu velikostí ploch píků sledovaných sloučenin a navíc docházelo i k viditelnému efektu nabobtnání SPME vlákna. Pro další experimenty byl tedy zvolen extrakční čas 15 min.

Volba pozice vlákna v destilačním nástavci

Lze předpokládat, že účinnější sorpce složek silic bude dosaženo v části aparatury s nejvyšší koncentrací, což je horní část destilačního nástavce. V této části bude současně i menší vliv vodní páry na sorpční vlastnosti SPME vlákna. Pro potvrzení této hypotézy byly testovány 3 různé pozice SPME vlákna v destilačním nástavci, které byly upravovány změnou délky vysunutí vlákna. Testovány byly hodnoty 4, 2 a 1,4 cm (nejmenší možná hloubka zasunutí vlákna u použité aparatury). S pomocí GC-FID analýzy extraktů bylo zjištěno, že nejvyšších ploch píků sledovaných sloučenin bylo dosaženo při vysunutí vlákna 1,4 cm, a to pro všechny sledované sloučeniny, tedy pro eukalyptol, α -thujon a kamfor. V případě zasunutí vlákna hlouběji se více uplatňoval vliv vodní páry na stacionární



Obr. 3. Závislost obsahu sledovaných složek silic na době extrakce



Obr. 4. Chromatogram získaný analýzou SPME extraktu šalvěje lékařské; 1 – α -pinen, 2 – limonen, 3 – kamfor, 4 – borneol

Tabulka II
Obsah silic ve 100 g listu šalvěje lékařské

Sloučenina	HS-SPME ^a		HD-SPME ^b		Destilace s vodní parou ^c	
	obsah [mg]	RSD [%] ^d	obsah [mg]	RSD [%]	obsah [mg]	RSD [%]
α -Pinen	11,87	1,94	< LoQ	----	15,37	3,48
Limonen	44,93	7,49	137,84	4,15	72,24	4,58
1,4-Cineol	< LoQ	----	< LoQ	----	1,06	1,54
Kamfor	91,69	0,63	369,77	4,06	131,37	6,84
Borneol	11,39	5,43	37,99	7,78	25,22	4,87

^a 0,5 g vzorku v 10ml nádobce, vlákno 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS, 70 °C, 25 min, ^b 2,5 g + 75 ml vody do 250ml dest. baňky, 15 min, vlákno 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS, ^c 20 g vzorku, 300 ml vody, 1 ml *p*-xyleny jako sběrné rozpouštědlo, destilace 4 h, ^d relativní směrodatná odchylka, $n = 3$

fázi, kdy docházelo k jejímu pozorovatelnému bobtnání. Hloubka zasunutí vlákna 1,4 cm byla tedy použita pro všechny následující experimenty.

SPME a destilace s vodní parou

Pro dosažení správných a reprodukovatelných výsledků u metody HS-SPME stejně jako u metody GC-FID bylo využito našich dřívějších zkušeností²¹. Příklad chromatogramu získaného po analýze SPME extraktu šalvěje lékařské je zobrazen na obr. 4.

Metoda destilace s vodní parou je normovanou metodou a byla provedena dle normy ČSN ISO 6571 (cit. ²⁰). Jedná se o destilaci vodné suspenze vzorku byliny. Destilát je jímán v dělené trubici s daným množstvím *p*-xyleny. Dochází k pohlcení těkavých silic, oddělení organické fáze od vodné a odečtení celkového objemu organické fáze. Podle normy by organickou fází měl být xylene. Pro desti-

laci s vodní parou u vzorků bylin byl použit *p*-xylene, protože u xylenu *p.a.* nedošlo k oddělení píku α -pinenu od píku rozpouštědla a při slepém pokusu bylo patrné, že xylene *p.a.* obsahuje interferující látky.

Porovnání jednotlivých extrakčních metod

Z naměřených výsledků plyne, že kvalitativní i kvantitativní obsah silic ve vzorku se liší v závislosti na zvolené extrakční technice. Je to způsobeno odlišnou citlivostí jednotlivých metod k jednotlivým silicím, která je způsobena odlišnou sorpční schopností rozpouštědla a stacionární fáze a dalšími podmínkami při extrakčních procesech, a také vlastnostmi vybraných silic, např. jejich bodem varu. V tabulkách II, III a IV jsou přehledně znázorněny získané obsahy jednotlivých silic ve vzorcích sušených listů analyzovaných bylin. Některé z výše zmiňovaných silic nejsou v tabulkách přítomny z důvodu zachování

Tabulka III
Obsah silic ve 100 g listu levandule lékařské

Sloučenina	HS-SPME ^a		HD-SPME ^b		Destilace s vodní parou ^c	
	obsah [mg]	RSD [%]	obsah [mg]	RSD [%]	obsah [mg]	RSD [%] ^d
α -Pinen	1,34	5,68	< LoQ	-----	5,69	2,95
Eukalyptol	180,76	8,75	531,59	0,42	312,81	1,78
Kamfor	191,08	2,55	184,54	1,65	247,79	2,01
Borneol	42,67	5,76	68,96	7,70	55,07	7,30

^a 0,5 g vzorku v 10ml nádobce, vlákno 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS, 70 °C, 25 min, ^b 2,5 g + 75 ml vody do 250ml dest. baňky, 15 min, vlákno 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS, ^c 20 g vzorku, 300 ml vody, 1 ml *p*-xylenu jako sběrné rozpouštědlo, destilace 4 h, ^d relativní směrodatná odchylka, *n* = 3

Tabulka IV
Obsah silic ve 100 g listu máty peprné

Sloučenina	HS-SPME ^a		HD-SPME ^b		Destilace s vodní parou ^c	
	obsah [mg]	RSD [%] ^d	obsah [mg]	RSD [%]	obsah [mg]	RSD [%]
α -Pinen	3,64	2,47	< LoQ	-----	3,52	2,10
1,4-Cineol	< LoQ	-----	< LoQ	-----	3,95	2,47
Eukalyptol	53,29	10,15	204,35	12,79	78,23	2,86
Menthon	422,83	9,85	322,51	9,38	476,54	2,74

^a 0,5 g vzorku v 10ml nádobce, vlákno 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS, 70 °C, 25 min, ^b 2,5 g + 75 ml vody do 250ml dest. baňky, 15 min, vlákno 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS, ^c 20 g vzorku, 300 ml vody, 1 ml *p*-xylenu jako sběrné rozpouštědlo, destilace 4 h, ^d relativní směrodatná odchylka, *n* = 3

přehlednosti a proto, že jejich hodnoty se pohybovaly pod mezí kvantifikace.

Ze srovnání mikroextrakčních technik s destilací s vodní parou vyplývá, že pro destilaci je nutné použít větší množství vzorku i extrakčního rozpouštědla, je časově náročná, ale je vhodná pro kvalitativní i kvantitativní analýzu jednotlivých složek silic. Mikroextrakční techniky jsou nenáročné na aparatury a čas, snižují spotřebu organických rozpouštědel a také finanční náklady. Po provedení optimalizace jednotlivých parametrů je možné pomocí HS-SPME stanovit kvalitativní i kvantitativní obsah jednotlivých složek silic. Metoda HD-SPME vykazuje mnohem menší selektivitu než HS-SPME a je také časově náročnější.

Závěr

Mikroextrakce tuhou fází a mikroextrakce tuhou fází ve spojení s destilací s vodní parou byly použity k důkazu i ke stanovení silic ve vzorcích sušených listů těchto bylin – máty peprné (*Mentha piperita* L.), levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* L.) a šalvěje lékařské (*Salvia offi-*

cinalis L.). Analýza extraktů byla provedena plynovou chromatografií s plamenově-ionizační detekcí. Výsledky změřené po analýze extraktů získaných mikroextrakčními technikami byly poté porovnány s výsledky získanými metodou destilace s vodní parou, která je prezentována jako referenční metoda pro stanovení obsahu silic. Byly optimalizovány parametry pro extrakční techniku HD-SPME, kdy bylo zjištěno, že vhodnou dobou extrakce je 15 min při délce vysunutí SPME vlákna 1,4 cm. Tato délka je nejmenší možnou hloubkou zasunutí vlákna u použité aparatury, což je výhodné z hlediska předpokladu, že nejvyšší koncentrace silic je u horní části destilačního nástavce. Zároveň při této délce dochází k nejmenšímu ovlivnění extrakce vodní parou. Podmínky HS-SPME a destilace s vodní parou byly přejaty z literatury, proto nebylo nutné provádět optimalizaci těchto metod. Na základě získaných výsledků a dalších poznatků byly mikroextrakční techniky porovnány jak mezi sebou, tak s normovanou metodou, tedy s destilací s vodní parou. Výsledky ukázaly, že navrhovaná metoda HD-SPME není pro daný účel příliš vhodná, neboť její citlivost i selektivita je ve srovnání s oběma zbývajících metodami horší.

Projekt byl realizován díky finanční podpoře grantových projektů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021627502).

LITERATURA

1. Isman M. B., Machial C. M., v knize: *Naturally Occurring Bioactive Compounds. Advances in Phyto-medicine*. Vol. 3. (Rai M., Carpinella M. C., ed.), Elsevier B. V., Amsterdam 2006.
2. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.: *Food Chem. Toxicol.* 46, 446 (2008).
3. Singh H. P., Batish D. R., Kohli R. K.: *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 239 (2003).
4. Pawar V. C., Thaker V. S.: *Mycoses* 49, 316 (2006).
5. Zygadlo J. A., Grosso N. R.: *Flavour Fragr. J.* 10, 113 (1995).
6. Batish D. R., Singh H. P., Kohli R. K., Kaur S.: *Forest Ecol. Manag.* 256, 2166 (2008).
7. Ye H., Ji J., Deng Ch., Yao N., Li N., Zhang X.: *Chromatographia* 63, 591 (2006).
8. Martí D., Pérez-García M. T., Blanquer A., Villagrasa V., Sanahuja M. A., Moreno L.: *Flavour. Fragr. J.* 22, 201 (2007).
9. Ormancey X., Sisalli S., Coutiere P.: *Parfums, Cosmetics, Actualites* 157, 30 (2001).
10. Sawamura M.: *Aroma Research* 1, 14 (2000).
11. Hirasa K., Takemasa M.: *Spice Science and Technology*. Dekker Inc., New York 1998.
12. Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R.: *Food Chem.* 91, 621 (2005).
13. Sahraoui N., Abert Vian M., Bornard I., Boutekedjiret Ch., Chemat F.: *J. Chromatogr., A* 1210, 229 (2008).
14. Presti M. L., Ragusa S., Trozzi A., Dugo P., Visinoni F., Fazio A., Dugo G., Mondello L.: *J. Sep. Sci.* 28, 273 (2005).
15. Fakhari A. R., Salehi P., Heydari R., Ebrahimi S. N., Haddad P. R.: *J Chromatogr., A* 1098, 14 (2005).
16. Arthur C. L., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 62, 2145 (1990).
17. Pawliszyn J.: *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH, New York 1997.
18. Dugay J., Miege C., Hennion M.-C.: *J. Chromatogr., A* 795, 27 (1998).
19. Zhang Z., Yang M., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 66, 844 (1994).
20. ČSN ISO 6571: *Stanovení obsahu těkavých olejů (silic)* (červen 1995).
21. Adam M., Dobiáš P., Eisner A., Ventura K.: *J. Sep. Sci* 31, 356 (2008).

V. Mlejová, P. Pavlíková, P. Dobiáš, M. Adam, and K. Ventura (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice*): **Application of Various SPME Methods in Analysis of Herbal Essential Oils**

Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and solid-phase microextraction coupled with hydrodistillation (HD-SPME) were used for detection and determination of essential oils in dried leaves of *Mentha piperita* L., *Lavandula angustifolia* L. and *Salvia officinalis* L. The results were compared with those obtained using steam distillation, which is a reference method. The extraction time 15 min and the minimal fibre depth 1.4 cm are suitable for a 50/30 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene/carboxen fibre. The method was compared with HS-SPME and steam distillation.