

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Bc. Martina Barkovská

Univerzita Pardubice
Fakulta Chemicko-technologická

Analýza vybraných biologicky aktivních látek v rakytínku
Diplomová práce

2023

Bc. Martina Barkovská

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Barkovská**
Osobní číslo: **C21408**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Analýza vybraných biologicky aktivních látek v rakytníku**
Téma práce anglicky: **Analysis of selected biologically active compounds in sea buckthorn**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na analýzu významných biologicky aktivních látek obsažených v rakytníku pomocí moderních analytických technik. Především se zabývejte fenolickými látkami a vitamíny C a E. Dále se věnujte metodám pro stanovení antioxidační kapacity přírodních antioxidantů, se zaměřením na látky obsažené v rakytníku.
2. Na základě literární rešerše zvolte vhodné spektrofotometrické metody pro určení celkového obsahu látek s antioxidačními vlastnostmi. Metody použijte pro stanovení antioxidační kapacity vzorků s obsahem rakytníku a pro stanovení celkového obsahu fenolických látek. Výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.
3. Optimalizujte HPLC separaci biologicky aktivních látek obsažených v rakytníku a identifikujte významné fenolické látky. Optimalizovanou HPLC separaci využijte pro analýzu vybraných fenolických látek obsažených ve vzorcích s obsahem rakytníku. Porovnejte a diskutujte obsah a zastoupení fenolických látek v těchto vzorcích.
- 4) Optimalizujte HPLC metodu pro stanovení vitamínu C. Optimalizovanou metodu využijte pro stanovení tohoto vitamínu ve vzorcích obsahujících rakytník a porovnejte výsledky s dalšími analytickými postupy běžně využívanými pro stanovení vitamínu C.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza vybraných biologicky aktivních látek v rakytníku jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2023

Martina Barkovská

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Ing. Lence Česlové, Ph.D. za velkou ochotu při konzultacích a za vedení během zpracování mé diplomové práce. Za spoustu nově přiučených zkušeností v laboratoři, díky odborným radám a nápadům při postupech. Děkuji i celé své rodině a bližším známým, od kterých jsem měla během celého studia obrovskou podporu.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci HPLC metod pro stanovení fenolických látek a vitamínu C ve vzorcích rakytníku řešetlákového. Stanovení bylo v obou případech provedeno v systémech s obrácenými fázemi, ale byly využity různé analytické kolony. Dále byly optimalizovány spektrofotometrické metody pro stanovení antioxidační kapacity a celkového obsahu fenolických látek. Závěrem byly všechny extrakty připravené z různých vzorků obsahující rakytník proměřeny všemi optimalizovanými chromatografickými a spektrofotometrickými metodami.

KLÍČOVÁ SLOVA

rakytník, vitamin C, fenolické látky, antioxidační aktivita, HPLC

TITLE

Analysis of selected biologically active compounds in sea buckthorn

ANNOTATION

This thesis is focused on the optimization of HPLC methods for the determination of phenolic substances and vitamin C in sea buckthorn samples. The determination was carried out in both cases in reversed-phase systems, but different analytical columns were used. Furthermore, spectrophotometric methods were optimized for the determination of antioxidant activity and the summary of the content of phenolic substances. In conclusion, all extracts prepared from different samples containing sea buckthorn were measured by all optimized chromatographic and spectrophotometric methods.

KEYWORDS

sea bukthorn, vitamin C, phenolic substances, antioxidant activity, HPLC

OBSAH

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK

SEZNAM OBRÁZKŮ

SEZNAM TABULEK

ÚVOD.....	- 13 -
1 TEORETICKÁ ČÁST	- 14 -
1.1 Historie využití rakytníku řešetlákového	- 14 -
1.2 Botanický popis.....	- 14 -
1.3 Bioaktivní a výživové látky v rakytníku řešetlákovém.....	- 17 -
1.3.1 Hydrofilní antioxidanty	- 19 -
1.3.2 Lipofilní antioxidanty, vitaminy a provitaminy	- 22 -
1.3.3 Hlavní živiny	- 24 -
1.4 Analýza bioaktivních a výživových látek v rakytníku.....	- 29 -
1.4.1 Předúprava vzorku.....	- 30 -
1.4.2 Extrakce	- 30 -
1.4.3 Příklady studií extrakce bioaktivních látek v rakytníku	- 31 -
1.4.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	- 32 -
1.4.5 Příklady studií separace látek v rakytníku metodou HPLC.....	- 34 -
1.4.6 Kapilární elektroforéza (CE)	- 35 -
1.4.7 Příklady studií separace látek v rakytníku kapilární elektroforézou	- 36 -
1.5 Antioxidační aktivita.....	- 37 -
1.5.1 Metody pro stanovení antioxidační kapacity.....	- 37 -
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 42 -
2.1 Přístroje a zařízení.....	- 42 -
2.2 Použité chemikálie	- 42 -
2.2.1 Chemikálie a rozpouštědla	- 42 -
2.2.2 Standardy	- 43 -
2.2.3 Vzorky rakytníku.....	- 44 -
2.3 Pracovní postupy	- 45 -
2.3.1 Příprava a extrakce vzorků	- 45 -
2.3.2 Spektrofotometrické metody	- 46 -
2.3.3 HPLC analýza.....	- 48 -
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	- 50 -
3.1 Stanovení antioxidační kapacity	- 50 -
3.1.1 Optimalizace metody ABTS.....	- 50 -

3.1.2	Měření antioxidační kapacity metodou ABTS	- 52 -
3.1.3	Měření antioxidační kapacity vitamínu C metodou ABTS	- 53 -
3.1.4	Optimalizace metody DPPH.....	- 55 -
3.1.5	Měření antioxidační kapacity metodou DPPH	- 56 -
3.1.6	Měření antioxidační kapacity vitamínu C metodou DPPH	- 57 -
3.1.7	Optimalizace metody FRAP	- 58 -
3.1.8	Měření antioxidační kapacity metodou FRAP	- 59 -
3.1.9	Měření antioxidační kapacity vitamínu C metodou FRAP	- 60 -
3.2	Stanovení celkového obsahu fenolických látek	- 61 -
3.2.1	Stanovení celkového obsahu fenolických látek ve vzorcích rakytníku.....	- 62 -
3.3	HPLC stanovení fenolických látek ve vzorcích rakytníku.....	- 63 -
3.3.1	Optimalizace separace fenolických látek	- 63 -
3.3.2	Identifikace fenolických látek obsažených ve vzorcích rakytníku	- 65 -
3.4	Stanovení kyseliny askorbové (vitamínu C) ve vzorcích rakytníku	- 67 -
3.4.1	Optimalizace separace	- 67 -
3.5	Kvantifikace kyseliny askorbové ve vzorcích rakytníku	- 68 -
4	ZÁVĚR	- 72 -
5	SEZNAM LITERATURY	- 73 -
6	PŘÍLOHY.....	- 85 -

SEZNAM ZKRATEK

ABTS	2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
C18	Oktadecylsilikagel
CE	Kapilární elektroforéza
CUPRAC	Metoda měření pomocí neocuproinu
DAD	Detektor diodového pole
DPPH	1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl
ECD	Elektrochemická detekce
ESI	Ionizace elektrosprejem
EtAc	Ethylacetát
FRAP	Metoda na principu měření pomocí železitých iontů
GAE	Standard kyselina gallová
GC	Plynová chromatografie
HDL	High density lipoprotein – lipoprotein s vysokou hustotou
HILIC	Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	Low density lipoprotein – lipoprotein s nízkou hustotou
MeOH	Methanol
MS	Hmotnostní spektrometrie
NP	Normální fáze
ORAC	Metoda na principu zhášení kyslíkových radikálů
PAC	Proanthokyanidiny
RP	Reverzní (obrácené) fáze
SFE	Superkritická fluidní extrakce
SPE	Extrakce pevnou fází
SWE	Extrakce nadkritickou vodou
TAA	Celková antioxidační aktivita

TEAC	Celková antioxidační aktivita vztažená ke standardu Troloxu
TPC	Metoda Folin-Ciocalteuova
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazin
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialová oblast
VIS	Viditelná oblast
VLDL	Very low density lipoprotein – lipoprotein s velmi nízkou hustotou

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Hippophae rhamnoides – bobule, listy, větvička	- 17 -
Obrázek 2: Kyselina askorbová (vitamin C)	- 19 -
Obrázek 3: Kyselina gallová	- 21 -
Obrázek 4: Kyselina salicylová	- 21 -
Obrázek 5: Kyselina palmitoolejová	- 26 -
Obrázek 6: SPE-extrakce pevnou fází	- 31 -
Obrázek 7: Vysokoučinná kapalinová chromatografie	- 34 -
Obrázek 8: Kapilární elektroforéza	- 36 -
Obrázek 9: Závislost úbytku absorbance na čase – metoda ABTS	- 51 -
Obrázek 10: Kalibrační křivka – závislost úbytku absorbance na množství standardu Troloxu v dávkovaném objemu – metoda ABTS	- 52 -
Obrázek 11: Antioxidační aktivita fenolických látek ve vzorcích rakytníku – metoda ABTS...	- 53 -
Obrázek 12: Antioxidační aktivita vitaminu C ve vzorcích rakytníku – metoda ABTS....	- 54 -
Obrázek 13: Závislost úbytku absorbance na čase – metoda DPPH	- 55 -
Obrázek 14: Kalibrační křivka – závislost úbytku absorbance na množství standardu Troloxu v dávkovaném objemu – metoda DPPH	- 56 -
Obrázek 15: Antioxidační aktivita fenolických látek ve vzorcích rakytníku – metoda DPPH...	- 56 -
Obrázek 16: Antioxidační aktivita vitaminu C ve vzorcích rakytníku – metoda DPPH....	- 57 -
Obrázek 17: Kalibrační křivka – závislost nárůstu absorbance na množství standardu Troloxu v dávkovaném objemu – metoda FRAP	- 59 -
Obrázek 18: Antioxidační aktivita fenolických látek ve vzorcích rakytníku – metoda FRAP .	- 59 -
Obrázek 19: Antioxidační aktivita vitaminu C ve vzorcích rakytníku– metoda FRAP	- 60 -
Obrázek 20: Kalibrační křivka – závislost nárůstu absorbance na množství kyseliny gallové...	- 61 -
Obrázek 21: Celkový obsah fenolických látek v rakytníkových extraktech připravených pro stanovení fenolických látek	- 62 -
Obrázek 22: Celkový obsah fenolických látek v rakytníkových extraktech pro stanovení vitaminu C.....	- 63 -
Obrázek 23: Optimalizovaná chromatografická separace fenolických látek – vzorek BIO	

rakytníkové šťávy (S1), kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 µm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 µl, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm – vhodný gradient použitý pro další měření..... - 64 -

Obrázek 24: Optimalizovaná chromatografická separace vitamínu C – vzorek mražených bobulí (M1), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 µm), mobilní fáze

MeOH/voda+H₃PO₄ (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 µl, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm - 68 -

Obrázek 25: Separace vitamínu C – vzorek rakytníkový čaj (C3), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 µm), mobilní fáze MeOH/voda+H₃PO₄ (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 µl, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm..... - 69 -

Obrázek 26: Kalibrační křivka – závislost plochy píku na koncentraci vitamínu C..... - 70 -

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Charakteristické znaky jednotlivých druhů rakytníku	- 15 -
Tabulka 2: Celkové obsahy látek v bobulích rakytníku řešetlákového	- 18 -
Tabulka 3: Vybrané cukry ve šťávě či bobulích rakytníku (g/l čerstvé hmotnosti)	- 24 -
Tabulka 4: Mastné kyseliny obsažené v oleji ze semen a dužiny rakytníku (%)	- 26 -
Tabulka 5: Obsah jednotlivých aminokyselin v plodech rakytníku (mg/kg čerstvé hmotnosti)- 28 -	
Tabulka 6: Obsažené organické kyseliny v rakytníkové šťávě (mg/l šťávy)	- 28 -
Tabulka 7: Seznam analyzovaných vzorků	- 44 -
Tabulka 8: Optimalizovaný gradientový program pro separaci fenolických látek	- 49 -
Tabulka 9: Optimalizovaný gradientový program pro separaci vitamínu C	- 49 -
Tabulka 10: Nalezené látky ve vzorku BIO rakytníkové šťávy (S1) v optimalizovaném chromatogramu (obrázek P12).....	- 65 -
Tabulka 11: Návratnost metody testovaná na třech koncentračních hladinách	- 70 -
Tabulka 12: Množství kyseliny askorbové v jednotlivých vzorcích rakytníku.....	- 71 -

ÚVOD

Rakytník řešetlákový (z latinského *Hippophae Rhamnoides* patřící do čeledi *Eleagnaceae*) pochází z velké části z Asie, kde je rozšířen od pobřeží až po horské oblasti a směrem do severozápadní Evropy. Plody druhu *Hippophae* jsou nazývány také jako ovoce třetí generace¹. Tato rostlina s všestrannými vlastnostmi byla používána již od starověku především v tradiční medicíně a dodnes je v každodenním životě široce využívána k výrobě potravin a krmiv. Jeho chuťové a nutriční vlastnosti dělají z rakytníku společně s jeho léčivými účinky také velmi cennou rostlinu pro řadu dalších použití, včetně léčiv či kosmetických produktů². Rakytník řešetlákový je dekorativní trnitý opadavý keř, odolný vůči chladu a suchu, a tím se řadí mezi vhodné rostliny pro rekultivaci půdy, díky své energické vegetativní reprodukci a velmi silnému komplexnímu kořenovému systému se schopností vázat dusík³. Tento keř nebo stromek schopný dosáhnout výšky až 10 metrů má kopinaté čárkovité listy, stříbřité na rubu a šedozelené na straně lícové. Jeho plody jsou kulovité, stopkaté červenooranžové bobule⁴. Prakticky všechny části rakytníku, bobule, listy i oleje z dužiny a semen, jsou bohatým zdrojem různých živin a bioaktivních látek. Jedná se zejména o přírodní antioxidanty, jako je kyselina askorbová (vitamin C), karotenoidy či flavonoidy. Dále jsou obsaženy bílkoviny, řada vitaminů, lipidy (z nichž se převážně jedná o nenasycené mastné kyseliny), minerální látky, cukry, organické kyseliny nebo fytoosteroly⁵. S tímto výjimečným chemickým složením má širokou škálu pozitivních fyziologických, biologických a léčivých účinků. Mezi ně se řadí účinky antioxidační, kardioprotektivní, antiaterogenní, antivirové a antibakteriální, imunomodulační, protirakovinné, antiradiační, protizánětlivé, antidiabetické či dermatologické. Mimo to má také hojivý účinek na akutní a chronické rány^{1,5}. Všechny tyto příznivé účinky ukazují obrovský potenciál plodů rakytníku řešetlákového jako potravinového zdroje⁶.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Historie využití rakytníku řešetlákového

Název této zázračné léčivé rostliny je odvozen ze dvou řeckých slov, a sice *Hippos*, což znamená kůň, a *Pháo* s významem zářící. Již po staletí byl rakytník, díky svým všestranným vlastnostem, využíván v každodenním životě ke spoustě účelům. Bohatou historií má především v oblasti přírodní medicíny. Již kolem roku 900 našeho letopočtu byl rakytník využíván jako léčivý prostředek v Tibetu⁷. Zmínky o tom byly nalezeny v tibetské lékařské klasice *rGyud Bzi*⁸. Pro ty stejné účely je v tradiční čínské medicíně používán více než 1000 let, již od dynastie Tang³. S pěstováním plodů rakytníku pro komerční využití však přišla Čína později. V 80. letech minulého století začala vytvářet plantáže a zabývat se výzkumem této rostliny. Dále bylo založeno až 150 zpracovatelských závodů vyrábějících obrovské množství rakytníkových produktů.

V Řecku byly první zmínky o rakytníku objeveny ve starověkých řeckých spisech od učenců Theophrasta a Dioscorida. Tam začali jednotlivé části rostliny používat k mnoha účelům. Listy a výhonky představovaly především krmivo pro zvířata, což vedlo k lepší kvalitě jejich srsti, která byla jasnější a již na pohled zdravější, a zároveň docházelo k rychlému nárůstu tělesné hmotnosti.

V Rusku měl uplatnění v léčbě gastrointestinálního onemocnění, kožních onemocnění, hepatitidy, astmatu a v prevenci revmatismu. Prvním podnikem určeným pro vývoj rakytníkových produktů, především pro potřeby ruských kosmonautů, byla továrna v Bisku. Produkty byly využívány kosmonauty především ve stravě nebo jako krém chránící před kosmickým zářením. Ve střední Asii a Evropě lidé využívali prakticky všechny části rostliny, plody, listy, kůru či kořeny, a to především v potravinářství a farmaceutickém odvětví a jako doplněk stravy^{7, 8}.

V severní Americe byl pro svůj atraktivní vzhled známý a využíván pouze jako okrasný keř, avšak nyní je tam pro své nutriční a léčivé hodnoty také zkoumán a pozorován^{8,9}.

1.2 Botanický popis

Taxonomický systém rakytníku řešetlákového, jiným jménem také rakytníku úzkolistého je následující: Rakytník spadá do říše *Plantae* (rostliny), oddělení *Mangoliophyta* neboli rostliny krytosemenné, dále do třídy *Rosopsida* (vyšší dvouděložné rostliny), řádu

Rosales (růžotvaré), čeledi *Elaeagnaceae*, jiným názvem hlošovitě a konkrétně patří do rodu *Hippophae*¹⁰.

Rod *Hippophae* je velmi rozšířen od severní Evropy až do celé Asie včetně Himalájí. Tento rod má již šest druhů (tabulka 1) a dohromady deset poddruhů, přičemž nejznámější druh *Hippophae rhamnoides* má rozsah svého rozšíření po celé Evropě i Asii¹¹. Tento druh se dále dělí na 8 poddruhů a sice *Hippophae rhamnoides carpatica* (Rumunsko a okolí), *fluviatilis* (Střední Evropa), *caucasica* (Kavkaz), *mongolica* (Mongolsko, Rusko), *sinensis* (Čína), *rhamnoides* (Pobaltí, Severní Evropa), *turcestanica* (Indie, Turkmenistán a okolí) a *yunnanensis* (Tibet). Zbýlých pět druhů je označeno *Hippophae gyantsensis*, který je rozšířen v Tibetu, *H. goniocarpa* z oblasti Číny, přičemž tento druh má i jeden poddruh *litangensis*, nebo *H. tibetana*. Čtvrtým druhem je *H. salicifolia* a posledním *H. neurocarpa* s jedním poddruhem, a sice *stellatopilosa*. Všechny těchto pět druhů je rozšířeno v asijských zemích. Díky křížení mezi jednotlivými poddruhy vzniklo také poměrně velké množství odrůd s odlišnými vlastnostmi^{12, 13}.

Tabulka 1: Charakteristické znaky jednotlivých druhů rakytníku¹⁴

Druh		
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Velikost keře/stromu	Keř; 2 – 5 m
	Listy	Šupiny spodního povrchu listu bez chloupků
	Semena	Vejčítá, oválná eliptická a protáhlá, světle až tmavě hnědá
	Nadmořská výška	2000 m
	Ovoce	Oranžové nebo mírně načervenalé, kulovité, vejčité nebo elipsoidní, aromatické
	Kůra	Hrubá, hnědá nebo černá, šedozeleňá koruna
<i>Hippophae tibetana</i>	Velikost keře/stromu	Keř; 0,2 – 0,6 m
	Listy	Alternativní a protilehlé, hlavně ve skupinách po třech
	Semena	Eliptická, matně bílá
	Nadmořská výška	5200 m
	Ovoce	Plody, obvykle 15 – 21 g
	Kůra	Starší stonky, tmavě šedé

Tabulka 1: Charakteristické znaky jednotlivých druhů rakytníku¹⁴

<i>Hippophae gyantsensis</i>	Velikost keře/stromu	Keř; 0,2 – 0,6 m
	Listy	Úzké, s bělavým tónem ve spodní části
	Semena	Zploštělá, elipsoidní
	Nadmořská výška	3500 – 5000 m
	Ovoce	Eliptický
Kůra	Větve hnědé nebo našedlé	
<i>Hippophae salicifolia</i>	Velikost keře/stromu	Strom; 4 – 10 m
	Listy	Vrbové listy
	Semena	Široce elipsoidní až vejčitá, rovná
	Nadmořská výška	1500 – 3200 m
	Ovoce	Kulovité, oranžově žluté až zelenohnědé, bez rýh
Kůra	Kůra není bílá	
<i>Hippophae neurocarpa</i>	Velikost keře/stromu	Keř; 0,6 – 3,5 m
	Listy	Okraj plochý a mladé větve jsou hladké
	Semena	Válcová, prohnutá, podélně vroubená, 4 – 6 mm
	Nadmořská výška	3400 – 4400 m
	Ovoce	Hnědé, zakřivené a válcovité, téměř nešťavnaté
Kůra	Listnatý, hřbet vychýlený, štíhlý, nevětvený	
<i>Hippophae litangensis</i>	Velikost keře/stromu	Keř nebo malý strom
	Listy	Alternativní, listová čepel lineární, bílá šupinatá, abaxiálně chlupatá, okraj točený
	Semena	Podélně rýhovaná, rovná
	Nadmořská výška	3700 m
	Ovoce	Žluté nebo červené, válcovité, s 5 – 7 malými hřebeny, 6 – 8 mm
Kůra	Mladé výhonky chlupaté, postranní trny nevětvené	

1.3 Bioaktivní a výživové látky v rakytníku řešetlákovém

Všechny části rakytníku, bobule, listy i kůra (obrázek 1), obsahují velké množství minerálních látek, vitaminů, aminokyselin, mastných kyselin, flavonoidů, rostlinných sterolů a karotenoidních pigmentů. Díky tomuto unikátnímu složení bioaktivních látek se řadí mezi tzv. superpotravinu a je stále více pěstován na různých místech po celém světě⁵. Tyto vysoké obsahy biochemických účinných látek a celkové chemické složení rakytníku jsou poté velmi prospěšné pro zdraví¹⁵.



Obrázek 1: *Hippophae rhamnoides* – bobule, listy, větvička¹⁶

Bobule rakytníku jsou velmi výživné, avšak nedoporučují se syrové, kvůli jejich velké kyselosti a svíravosti. To lze nejlépe potlačit smícháním šťávy se šťávou sladší, tedy např. hroznovou či jablečnou². Nutriční a chemické složení bobulí (tabulka 2) se značně liší v závislosti na poddruhu, původu, klimatických podmínkách, velikosti, doby sklizně a také metodách zpracování. Je potvrzeno, že díky obrovskému množství vitaminů, se právě plody rakytníku řadí mezi nejvýživnější plody všech známých rostlin^{2, 5}. Nachází se zde vitaminy A, C, D, E, K a vitaminy skupiny B (B1, B2 a B6), přičemž nejvíce z nich je obsaženo vitamínu C. Obsah vitamínu C v bobulích rakytníku je udáván dokonce jako 14x větší ve srovnání s pomeranči nebo citróny. Mimo to jsou plody bohaté na různé esenciální aminokyseliny a bílkoviny, jsou dobrým zdrojem minerálních prvků, především draslíku, dále pak železa, vápníku nebo fosforu^{5, 17}.

Tabulka 2: Celkové obsahy látek v bobulích rakytníku řešetlákového¹⁸

Atribut	g/kg čerstvé hmotnosti
Vlhkost (%)	53–86
Celkové sacharidy	291
Celkem olej	20–105
Hrubý protein	11–31
Hrubá vláknina	47,1
Popel	3–18
Vitamin C	0,25–30
Vitamin E	0,03–0,21
Vitamin K	1.10–2.30
Flavonoidy	1,68–10,0
Fytosteroly	13–20
Celkové karotenoidy	0,01–0,40

Velké množství bioaktivních látek a živin jako jsou bílkoviny, minerální látky (K, Ca, Mg), katechiny, vitaminy skupiny B (nejvíce B6), esterifikované steroly, triterpenoly a isoprenoly, je obsaženo i v listech^{5, 19}. I přes to je převážná část listů po sklizni bobulí nevyužitá a je brána jako zemědělský odpad²⁰. Bylo také vědecky dokázáno, že čerstvé listy rakytníku jsou bohatým zdrojem chlorofylu (98,8 mg/100 g), který je ukazatelem kvality zelené zeleniny⁵.

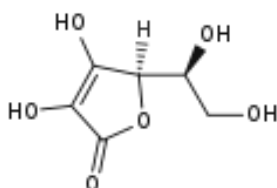
Větvičky jsou rovněž většinou vyhazovány a považovány za odpad, i když by mohly sloužit jako poměrně cenný zdroj bílkovin, sacharidů, mastných kyselin a dalších živin¹⁹. Mimo to má extrakt z větviček vlastnost měnit antikoagulační vlastnosti lidské plazmy, to znamená, že je schopen prodloužit dobu srážení²¹. Díky tomu by se dalo říct, že extrakty z větviček a listů rakytníku řešetlákového by bylo možné využít jako netoxické zdroje prospěšných látek vhodné např. pro kosmetické produkty či doplňky stravy¹⁹.

1.3.1 Hydrofilní antioxidanty

Kyselina askorbová

Tato mikroživina zvaná také vitamin C (obrázek 2) má v rakytníku důležité postavení díky svému velkému množství, které je v rozmezí 1,4 – 30,0 g/kg. Toto velké množství vitaminu C je konkrétně udáváno pětikrát až stokrát vyšší oproti ostatním druhům ovoce a zeleniny, a navíc je obsažen prakticky v celé rostlině, tedy v semenech (1,5 g/kg), ve šťávě z bobulí (11,6 – 13,0 g/kg) i v listech (až 3,7 g/kg)¹⁸.

Jsou zde faktory, které ovlivňují množství obsaženého vitaminu C v jednotlivých částech rakytníku. Jedná se především o původ, zeměpisnou polohu růstu, odlišnou dobu sklizně a s tím související následné zpracování. Jelikož v bobulích není obsažen enzym, který katalyzuje oxidaci kyseliny L-askorbové na kyselinu L-dehydroaskorbovou s rozkladem na neaktivní sloučeniny, tak je v sušených bobulích a výsledných produktech vitamin C velmi dobře zachován. K hlavní ztrátě vitaminu C však dochází při zpracování šťáv vlivem aerobních a anaerobních chemických pochodů. Dobrou stabilitu i vysokou retenci vitaminu C při odšťavňování a následném zpracování vykazovala rakytníková šťáva ve chvíli, kdy došlo ke krátkodobému zahřátí, avšak při dlouhodobém skladování za vyšších teplot (kolem 40 °C) se množství vitaminu v bobulích snížilo až o polovinu. Při krátkodobém skladování (3 – 14 dní) při teplotě 5 °C se obsah vitaminu C téměř neměnil nebo byl snížen maximálně o 10 %. Při teplotě okolí, tedy 25 °C, bylo zjištěno, že se po 7 dnech množství kyseliny askorbové snížilo až o 20 %. Úplně nejlepší stabilita byla studii potvrzena za dlouhodobého skladování (6 – 13 měsíců) při teplotě -20 °C. V těchto případech nebyly pozorovány prakticky žádné změny^{18, 22}.



Obrázek 2: Kyselina askorbová (vitamin C)

Fenolické látky

Fenolické látky jsou sekundární metabolity výhradně rostlinného charakteru, které jsou v rakytníku obsaženy ve všech jeho částech – v plodech, listech i větvičkách. Dělí se na tři základní podskupiny – flavonoidy, fenolické kyseliny a hydrolyzovatelné taniny. Převážně díky nim má právě rakytník mnohé antioxidační a bioaktivní vlastnosti¹⁸.

Flavonoidy jsou hlavní a nejdůležitější podskupinou spadající do fenolických sloučenin v rakytníku. Jejich koncentrace v plodech je několikanásobně vyšší ve srovnání s koncentrací v jiných rostlinách, ve kterých je vysoký obsah flavonoidů udáván, kdy se konkrétně jedná např. o třešň rohovitou, hloh, ostružinu evropskou divoce pěstovanou či psí růži. Výjimkou je ptačí třešň, která obsah flavonoidů v rakytníku ještě převyšuje²³. Flavonoidy se dále dělí na další skupiny, přičemž nejobsáhlejší je skupina flavonolů mezi které patří kvercetin, isorhamnetin, myricetin či kaempferol. Nejdůležitější flavonoly u bobulí a listů rakytníku jsou poté glykosidy isorhamnetinu²⁰ a kvercetinu²⁴. Právě flavonoly se v přírodních matricích převážně vyskytují v glykosylovaných formách. Na příslušný aglykon může být navázána jedna či více různých cukerných jednotek. Většinou se jedná o glukózu, galaktózu či rutinózu, v některých případech pak o xylózu, rhamnózu či arabinózu. Bobule jsou konkrétně velkým zdrojem flavonoidních glykosidů (rutinosid, glukosid, sorforosid-rhamnosid v různých formách) a všech čtyř již zmíněných aglykonů. Až 15krát vyšší koncentrace flavonoidních glykosidů je proti bobulím v listech rakytníku. Mezi zde nejvíce obsažené flavonoidy byly zařazeny rutin, kvercetin, kaempferol a různé formy galaktosidu a glukosidu. Významné množství flavonoidních glykosidů je možné najít také v semenech rostliny¹⁸. Uvádí se, že lze v extraktech dosáhnout zvýšení množství aglykonů, a sice pomocí kyselé hydrolýzy použité při extrakci.

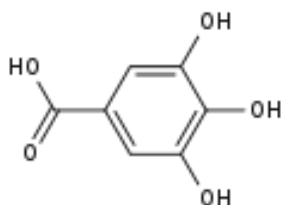
Obsah flavonolů je v bobulích závislý na jejich velikosti, zralosti, kultivaru, klimatu a lokalitě pěstování¹⁸. Je známo, že i v případě listů hrají tyto faktory důležitou roli, přičemž zásadní je mimo to také poloha listů na rostlině.

Tyto všechny obsažené fenolické látky mají poté pro lidské tělo antioxidační funkci, jsou mikrobiálně aktivní k vybraným patogenním mikroorganismům a mají vysokou protizánětlivou a protinádorovou aktivitu²⁰.

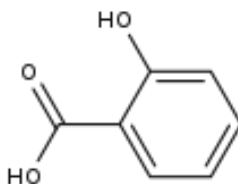
Extrakty z větviček mají podobné, ale spíše nižší množství fenolických látek než extrakty z listů. Výjimku však dělali dvě sloučeniny, a sice katechin a kyselina gallová, která spadá do fenolických kyselin, kdy obsah katechinu byl v extraktu z větviček 7krát vyšší než

v extraktu z listů a kyseliny gallové asi 1,3krát vyšší oproti extraktu z listů¹⁹. Díky vysoké koncentraci proanthokyanidinů (PAC), další skupiny rostlinných fenolů, jsou větvičky rakytníku považovány za cenný zdroj látek v oblasti výživy a medicíny se slibnou antimikrobiální, antidiabetickou, protizánětlivou, antioxidační, kardioprotektivní či protirakovinnou aktivitou^{25, 26}. Ve srovnání s extrakty z listů mají větvičky koncentraci této konkrétní skupiny fenolů 83krát vyšší²⁷.

Fenolické kyseliny jsou důležitou skupinou organických kyselin, které jsou zapojené do imunitního systému rostlin. V rostlinách se vyskytují v různých formách, buď jako volné nebo vázané na cukry, jiné kyseliny či jiné molekuly. Celkem bylo v bobulích rakytníku identifikováno až sedmnáct fenolových kyselin, avšak volné kyseliny pouze v omezeném množství (1,3 – 2,3 %). Nejvíce zastoupenou fenolovou kyselinou je kyselina gallová (obrázek 3), která se v bobulích a listech vyskytuje i ve volné formě. V plodech rakytníku je dále v hojné míře obsažena kyselina salicylová (obrázek 4) s obsahem v rozmezí 21 – 47 mg/kg.



Obrázek 3: Kyselina gallová



Obrázek 4: Kyselina salicylová

V menším množství jsou pak v rostlině obsaženy další fenolické kyseliny, jako kyselina *p*-kumarová, *o*-kumarová, ferulová, vanilová a kávová. Metodou GC/MS byly zjištěny všechny obsažené fenolické kyseliny ve více druzích rakytníku, jejichž celkové množství se pak dohromady pohybovalo v rozmezí hodnot 3570 ± 282 až 4440 ± 405 mg/kg sušených bobulovin^{18, 28}.

Třísloviny (taniny) jsou děleny na dva druhy: kondenzované a hydrolyzovatelné. Nejvíce se vyskytující podskupinou hydrolyzovatelných taninů jsou monomerní typy gallo – a ellagitaninů, mezi něž patří casuarinin, casuarictin, stachyurin, strictinin, isostriktinin nebo hippophaenin B. Kondenzované taniny už nejsou pouze monomerní, ale běžně jsou složeny alespoň ze dvou a více monomerních katechinových nebo epikatechinových jednotek, jinak nazývaných prokyanidiny. Druhá skupina je složena z jednotek galokatechinových či epigalokatechinových a nazývají se prodelfinidiny¹⁸.

Nejvyšší množství kondenzovaných taninů má podle studií extrakt ze semen rakytníku. Po něm následoval s vyšším obsahem taninů stonek, květ a kořen, a nejnižší obsah byl zjištěn v extraktu z listů. Vysoká antioxidační aktivita měřená u extraktu ze semen byla poté připsána právě kondenzovanému taninu, který je ve vysokém množství obsažen v této části rostliny²⁹.

1.3.2 Lipofilní antioxidanty, vitaminy a provitaminy

Karotenoidy

Karotenoidy jsou nejvíce obsaženy v plodech rakytníku. Výskyt jednotlivých karotenoidů a jejich množství jsou závislé na analyzované části bobule, podmínkách pěstování, klimatických podmínkách, době sklizně, genetickém původu nebo metodách analýzy. V různých kultivarech rakytníku řešetlákového bylo zjištěno až 41 derivátů karotenoidů, přičemž mezi hlavní karotenoidy patří β -karoten, zeaxantin, β -kryptoxantin, lutein, γ -karoten a lykopen^{20, 30, 31, 32, 33}. Další deriváty, jako jsou estery zeaxantinu, luteinu a β -kryptoxantinu s různými mastnými kyselinami, byly přítomny v menším množství. Celkové množství karotenoidů v bobulích bylo 115 – 185 mg/kg čerstvé hmotnosti, což odpovídalo 120 – 1425 mg/kg sušiny³⁰, přičemž bylo zjištěno, že hodnota z velké míry závisí na kultivaru. Například v odrůdě Mara z Rumunska byl stanoven obsah karotenoidů pouze 172 mg/kg sušiny³⁴. Mimo plody rakytníku byly karotenoidy nalezeny i v listech s celkovým obsahem 26,3 mg/100 g sušiny¹⁹.

Karotenoidy jsou obsaženy převážně v oleji z dužiny čerstvých bobulí, přičemž jejich množství se pohybuje v rozmezí hodnot 692 – 3420 mg/kg. Celkem bylo v oleji zjištěno až 18 karotenoidů, přičemž lutein tvořil 14 % z celkového množství karotenoidů v rakytníku¹⁸. Právě díky vysokému obsahu karotenoidů je rakytníkový olej ceněným komerčním produktem. Obecně je známo, že dužnaté a ovocné oleje jsou nejbohatším zdrojem karotenoidů (5 – 10 g/kg oleje).

Vitamin E

Vitamin E neboli tokochromanoly se dělí na tokoferoly a tokotrienoly. Tyto bioaktivní látky jsou rozpustné v tucích a mají velký antioxidační účinek a jsou tedy velmi důležité v ochraně před oxidačním stresem organismu. Jejich nedostatek zapříčiňuje postižení řady tkání, jako např. hemolýza nebo defekty ve vyvíjejícím se nervovém systému u dětí¹⁸. Vitamin E se vyskytuje celkem v osmi formách, z nichž jsou čtyři tokoferoly a zbylé čtyři tokotrienoly³⁵. Jednou z těchto forem je α -tokoferol, který se ukládá v tukové tkáni, stejně jako další lipofilní sloučeniny (vitaminy A, D či karotenoidy), a dále ovlivňuje jeho distribuci do jiných tkání a jejich koncentraci v krvi. α -tokoferol je považován za biologicky nejvíce aktivní formu vitamínu E, je výborným antioxidantem a má potenciálně protizánětlivé funkce. Nejčastěji je zabudováván v tenkém střevě do chylomikronů a přes lymfovod dodáván do jater, kde je selektivně zabudován na lipoproteiny s velmi nízkou a lipoproteiny s nízkou hustotou (VLDL, LDL)³⁵. Tuto formu tokoferolu lze v malé míře nalézt i ve větvičkách¹⁹.

Celkové obsahy tokochromanolů v celé rostlině u dvou měřených druhů rakytníku byly 56 – 140 mg/kg a 1,5 – 8,1 mg/kg³⁶. Jejich množství v plodech, jak je tedy vidět, je ovlivněné odrůdou, dále původem, dobou zrání a obdobím sklizně. Při srovnání s ostatními druhy ovoce a zeleniny je rakytník považován za bohatý zdroj tokochromanolů, konkrétně právě α -tokoferolu. Dalším značným zdrojem z ovoce a zeleniny je rajčatový protlak (50 mg/kg), mražený špenát (42 mg/kg), zelené lahvové olivy (38 mg/kg), avokádo, maliny či ostružiny. Jako ještě lepší zdroj α -tokoferolu oproti rakytníku jsou brána některá semena a ořechy, jako např. slunečnicová semínka (350 mg/kg), mandle (250 mg/kg) nebo lískové ořechy (150 mg/kg)³⁷.

Celkový obsah tokoferolů v oleji připraveném z celých bobulí rakytníku řešetlákového se pohyboval v rozmezí 1014 – 1283 mg/kg, přičemž 62 – 68 % z toho byly α -tokoferoly a zbylých 32 – 38 % δ -tokoferoly³⁸. Oleje se liší složením a obsahem volných tokochromanolů v závislosti na přípravě z různých částí bobulí rakytníku. Studiemi bylo potvrzeno, že bezsemenné části bobulí jsou lepšími zdroji α -tokoferolů oproti semenům¹⁸.

Ani v případě semenného oleje tomu není jinak a je v něm nejvíce ze všech izomerů obsažen α -tokoferol. Extrahované množství tohoto izomeru bylo v oleji ze semen 43 – 53 % z celkového množství tokoferolů. I v oleji z dužiny je ze všech izomerů tokoferolu obsažen v největším množství, a to v množství 74–85 % z celkového množství tokoferolů³⁹.

Další formu vitamínu E jsou β -tokoferol, který má antioxidační aktivitu v rozmezí 25 – 50 % kapacity α -tokoferolu, v rozmezí 10 – 35 % antioxidační kapacity γ -tokoferolu a okolo 30 % kapacity α -tokotrienolu⁴⁰.

Tokoferoly je doporučeno konzumovat z hlediska lidského zdraví především z přírodních zdrojů, jako je právě např. rakytník než jejich užívání ve formě syntetické¹⁸.

1.3.3 Hlavní živiny

Sacharidy a jejich deriváty

Sacharidy se řadí mezi hlavní složky sušiny bobulí, jejich celkový obsah je 400 – 600 g/kg sušiny. Obsažené polysacharidy jsou především neškrobového typu. Jedná se konkrétně o hemicelulózu, celulózu, pektin a hydrokoloidy, které jsou společně s ligninem hlavními složkami vlákniny¹⁸.

Obsažené monosacharidy uvnitř bobulí rakytníku řeštlákového jsou kolísavé v poměrně velkém rozmezí (27 – 58 g/kg) a během zrání bobulí se obsah obecně zvyšuje. Ve zralých bobulích patří mezi hlavní obsažené monosacharidy fruktóza, glukóza a xylóza, v případě disacharidů je pak v malém množství obsažena sacharóza (tabulka 3). Tyto monosacharidy hrají i velkou roli při určování sladkosti rakytníkových šťáv. Obsah glukózy a fruktózy v rakytníkových šťávách a džusech je velmi odlišný a pohybuje se v rozmezí 0,6 – 24,2 g/100 ml⁴¹. Prakticky ve všech případech, byl obsah glukózy výrazně vyšší než fruktózy (prakticky dvojnásobný). Kromě glukózy a fruktózy byla detekován i ethyl- β -D-glukopyranosid⁴². Celkový obsah i zde závisí na různých faktorech, jako je původ, druh, doba sklizně či genetické pozadí rostliny. Např. v bobulích původem z Ruska nebo Číny je obsažena glukóza a fruktóza až z 90 % celkového obsahu cukrů, zatímco v bobulích pocházejících z Finska pouze z cca 60 %. Mimo to je obsah cukrů jiný u každého poddruhu, kdy poddruhem s největším množstvím celkových cukrů ve šťávě je *H. rhamnoides sinensis*¹⁸.

Tabulka 3: Vybrané cukry ve šťávě či bobulích rakytníku (g/l čerstvé hmotnosti)^{41, 43, 44}

Komponenty	<i>H. rhamnoides</i>	<i>H. mongolica</i>	<i>H. sinensis</i>
Glukóza	7–21	37–69	39–77
Fruktóza	2–4	12–36	28–64
Sacharóza	0,1–1,1	0,7–1,4	0,3–1,8
Xylóza	13–100	-	-
Celkový cukr	9–25	60–94	69–141

Rakytník je také díky různému složení derivátů sacharidů považován za zajímavé nutraceutikum. Plody jsou rovněž zdrojem cukerných alkoholů, konkrétně mannitolu, sorbitolu, xylitolu nebo také methyl inositolu^{41, 44}.

Obsah vlákniny v bobulích se pohybuje v rozmezí hodnot (60 – 100 g/kg). Tímto vysokým obsahem se vláknina řadí mezi velmi důležité a zdraví prospěšné složky v bobulích. Vláknina je dle studií rozdělena v plodech rakytníku na neutrální detergentní vlákninu (160 – 200 g/kg), kyselou detergentní vlákninu (120 – 145 g/kg), dále kyselý detergentní lignin (50 – 70 g/kg), celulózu (60 – 75 g/kg) a hemicelulózu (45 – 55 g/kg)⁴⁵. Pro příklad je průměrná hodnota obsažené neutrální detergentní vlákniny v rakytníku srovnatelná s obsahem v zelenině. Kyselá detergentní vláknina je pak v obsahu podobná kiwi, vodnímu melounu či borůvce⁴⁶.

Dalším polysacharidem je výše zmíněný pektin, který byl nalezen v dužině bobulí v množství 15 g/kg sušiny a také v jejich slupce s obsahem 5 g/kg sušiny.

Kromě polysacharidů neškrobového typu je v rakytníku obsažen také dietní polysacharid škrob, který je známý svou vysokou stravitelností v tenkém střevě člověka. V rakytníku ho obsahují pouze semena, a to v množství 49 g/kg sušiny⁴⁷.

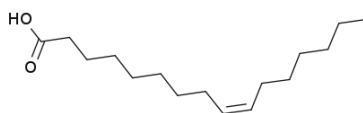
Lipidy a mastné kyseliny

Lipidy se vyskytují prakticky ve všech částech plodu rakytníku, nejvíce v semenech (100 – 160 g/kg), poté v dužině a ve slupce (cca 20 – 105 g/kg). Usušené měkké části vybraných poddruhů rakytníku mohou mít obsah lipidů poměrně vyšší (160 – 350 g/kg sušiny)⁴⁸, v případě některých odrůd rakytníku řešetlakového až 440 g/kg sušiny⁴⁵. Jelikož jsou nejvíce obsaženy v semenech a dužině plodů, tak právě z nich se nejčastěji vyrábí rakytníkový olej. Zatímco u zralých semen je možné získat 8 – 20 % oleje, z usušené dužiny je možné získat až 20 – 25 % oleje⁴⁹.

Olej ze semen obsahuje v největším množství dvě esenciální nenasycené mastné kyseliny, a to kyselinu linolovou (omega-6-mastná kyselina) a kyselinu linolenovou (omega-3-mastná kyselina), které jsou nezbytné pro lidské zdraví. Podíl těchto dvou kyselin v semenech se pohybuje v rozmezí 30–40 % a proto je olej ze semen rakytníku často vyhledávaným zdrojem těchto kyselin¹⁵.

Rakytníkový olej z dužiny obsahuje asi 52 % nenasycených mastných kyselin (kyselina palmitoolejová – 29 %, olejová – 18 %, linolová – 4 % a linolenová – 2 %) a zbytek tvoří nasycené mastné kyseliny, jako je kyselina palmitová (tabulka 4)⁵⁰. Vysoký obsah zmíněné

kyseliny palmitoolejové (omega-7 mastná kyselina, obrázek 5) je pro dužinu typický, avšak z velké části závisí na původu rostliny. Tato mastná kyselina vytváří rozsáhlou část epidermálních lipidů v kůži člověka, a proto je dužinový olej často využíván v kosmetických emulzích⁵¹, protože hydratuje pokožku a dodává jí přirozenou pružnost, takže redukuje tvorbu vrásek¹⁸. Dále je vhodný při místních aplikacích na hojení ran, opruzenin, zánětů a dalších kožních změn, jako jsou popáleniny nebo dokonce dermatitida způsobená ozářením⁵¹. Kyselina palmitoolejová je příznivá k epitelálním tkáním včetně dýchacích či trávicích orgánů, ženských genitálií a vnitřku oka (syndrom suchého oka). Napomáhá i k prevenci a případné léčbě žaludečních vředů. Dále zabraňuje inzulinové rezistenci spojené s obezitou a zvyšuje hladinu HDL cholesterolu při současném snížení hladiny LDL cholesterolu⁵². Studiemi bylo dokázáno, že rakytníkový olej je schopný zlepšit u žen integritu vaginálního epitelu po menopauze⁵³.



Obrázek 5: Kyselina palmitoolejová

Tabulka 4: Mastné kyseliny obsažené v oleji ze semen a dužiny rakytníku (%)¹⁸

Komponenty	Olej ze semen	Olej z dužiny
Kyselina palmitová	6–11	15–40
Kyselina palmitolejová (omega-7)	<0,8 - 5	15–50
Kyselina stearová	2,6	0,55–1,5
Kyselina olejová (omega-9)	15–26	10–26
Kyselina linolová (omega-6)	35–40	4,5–15
Kyselina linolenová (omega-3)	17–35	2,5–10

Kromě mastných kyselin bylo v olejích z rakytníku dále identifikováno minimálně 17 různých typů sterolů, jejichž obsah se pohybuje v rozmezí 1,3 – 2 % v závislosti na odrůdě. Nejvýznamnějším z obsažených sterolů je β -sitosterol, který se v semenech vyskytuje z 57 – 76 % a v dužině ze 61 – 83 %⁵⁴. Společně se steroidními hormony

a cholesterolem jsou steroly v dužině obsaženy v množství 240 – 400 mg/kg bobulí, zatímco v semenech se pohybují v hodnotách 1200 – 1800 mg/kg bobulí³⁹. Oleje z rakytníku jsou lepším zdrojem β -sitosterolu v porovnání s jinými rostlinnými oleji, jako např. panenským olivovým olejem nebo slunečnicovým olejem⁵⁰. Fytosteroly hrají podstatnou roli v případě kardiovaskulárních onemocnění, které jsou způsobené vysokou hladinou cholesterolu (hypercholesterolemií), dále snižují výskyt rakoviny, konkrétně rakoviny prostaty, tlustého střeva a prsu⁵⁴.

Proteiny a aminokyseliny

Obsah bílkovin se opět liší v závislosti na druhu rakytníku. Např. v Indii byl zjištěn obsah bílkovin v bobulích v širokém rozmezí 46 – 129 g/kg sušiny¹⁸, v případě polských odrůd pak 93 g/kg sušiny⁴⁵.

Distribuce bílkovin v jednotlivých částech plodu je značně odlišná. Za nejvyšší zdroj bílkovin jsou považována semena, avšak ještě vyšší obsah mají ostatní části rostliny (listy, kůra, větve, dřevitá zeď)⁵⁵. Například listy rakytníku jsou považovány za cenný zdroj bílkovin v krmivu pro zvířata, ale je možné je využít i pro výživu lidskou¹⁸.

Šťáva z dužiny rakytníku obsahuje 18 volných aminokyselin, přičemž část z nich, konkrétně 8, je nezbytná a důležitá pro výživu člověka (lysin, leucin, isoleucin, valin, methionin, threonin, tryptofan a fenylalanin)⁵⁶. V listech rakytníku zůstává i po jejich usušení velké množství bioaktivních látek, které je složením podobné běžně konzumované zelenině. I listy rakytníku obsahují množství aminokyselin, přičemž jsou, ve srovnání s ostatními rostlinnými materiály, velmi bohaté na arginin a lysin. Proto jsou právě extrakty z listů rakytníku významným zdrojem těchto aminokyselin. Ve větvičkách jsou pak v menším měřítku obsaženy aminokyseliny arginin, prolin a histidin¹⁹.

V plodech rakytníku je nejvíce obsaženou volnou aminokyselinou kyselina asparagová, a dále obsahují prolin, threonin, serin, lysin, valin a další (tabulka 5)¹⁸. Rakytník je tedy díky vysokému obsahu esenciálních a proteinogenních aminokyselin, velmi kvalitní rostlinný zdroj bílkovin⁵⁵.

Tabulka 5: Obsah jednotlivých aminokyselin v plodech rakytníku (mg/kg čerstvé hmotnosti)⁵⁷

Aminokyselina	<i>Hippophae rhamnoides</i>	Aminokyselina	<i>Hippophae rhamnoides</i>
Kyselina asparagová	4266	Glycin	167
Proline	452	Histidin	137
Threonin	368	Tyrosin	134
Serine	281	Arginin	113
Lysin	272	Cystein	33
Valin	218	Methionin	23
Alanin	212	Leucin	19
Fenylalanin	200	Tryptofan	5
Glutamin	194	Celkový	7244
Isoleucin	174		

Organické kyseliny

Obsah organických kyselin, alifatických i alicyklických, ve velké míře závisí na podmínkách pěstování rakytníku (odrůda, klimatické podmínky)⁵⁸. Nejvíce rakytník obsahuje kyselinu jablečnou, chinovou, citrónovou a jantarovou (tabulka 6)¹⁸. U kyseliny jablečné bylo dokázáno, že je schopna chránit kořeny před napadením patogeny⁵⁹. V plodech rakytníku jsou nejvíce zastoupené kyseliny citrónová, vinná, jablečná, šřavelová a chinová⁵.

Tabulka 6: Obsažené organické kyseliny v rakytníkové šťávě (mg/l šťávy)¹⁸

Sloučenina	Šťáva
Kyselina jablečná	11–60
Kyselina chinová	7–49
Kyselina citrónová (% všech kyselin)	0,04–0,3
Kyselina jantarová (% všech kyselin)	0,2–0,6

Minerální prvky

Koncentrace minerálních prvků v rakytníku je opět značně odlišná v závislosti na odrůdě, druhu, místě pěstování, složení půdy, použití hnojiv nebo konkrétní části rostliny¹⁸.

Významný příspěvek k celkovému obsahu minerálních látek mají alkalické kovy, kovy alkalických zemin a fosfor. Jejich obsah klesá v pořadí draslík > vápník > fosfor > hořčík ≈ sodík⁶⁰. Mimo tyto prvky je možné v rakytníku nalézt určité množství mědi, železa, zinku, arsenu nebo manganu. Jejich obsah je však závislý především na části rostliny a jejím zpracováním⁶.

Nejvíce obsaženým prvkem v bobulích i šťávách z rakytníku je tedy draslík, jehož koncentrace se během výroby šťávy dokonce zvýšila, a to asi o 20 %. Naproti tomu je při výrobě šťávy snížen obsah jiných prvků, jako je měď, železo, chrom a molybden, a to minimálně o 50 %⁶¹.

Obsah toxických prvků je velmi nízký. Starší studie odhalily pouze stopové množství kadmia v sušených bobulích. Jednalo se o vzorky z Ruska a Číny s obsahy 0,044 – 0,105 mg/kg a 0,016 – 0,055 mg/kg⁶². Nedávno analyzované rakytníkové šťávy pocházející ze Slovenska vykazovaly pouze velmi nízké obsahy arsenu a olova, a extrémně nízké množství kadmia, až 0,0004 – 0,003 mg/kg¹⁸.

1.4 Analýza bioaktivních a výživových látek v rakytníku

Zdrojem biologicky aktivních látek jsou prakticky všechny části rakytníku (plody, semena, větve, listy, kůra, kořeny). I přesto, že všechny části rostliny obsahují mnoho biologicky aktivních látek, dále zpracovávány jsou pouze semena a slupky. Větve, listy a kůra jsou považovány za odpadní produkty, a i přes vysoký obsah významných bioaktivních látek se dále nevyužívají^{5,19}.

Z bioaktivních látek obsažených v rakytníku jsou nejvíce zastoupeny, a tedy analyzovány nejčastěji flavonoidy jako kvercetin, isorhamnetin, kaempferol, katechin, rutin⁶³, myricetin a resveratrol⁶⁴. přičemž většinou se vyskytují deriváty právě kvercetinu a isorhamnetinu s jednou nebo více cukernými jednotkami²⁴.

Dalšími hojně zastoupenými, a tedy i analyzovanými látkami jsou karotenoidy, které se v rakytníku vyskytují jako volné nebo esterifikované mastné kyseliny, což je v případě xantofylů stabilnější forma. Z volných karotenoidů jsou nejvíce zastoupené zeaxanthin a β -karoten a z esterifikovaných xantofylů je to zeaxanthin, β -kryptoxanthin a lutein⁶⁵. Další

skupinou často analyzovaných látek přítomných v rakytníku jsou tokoferoly, konkrétně α -, β -, γ - a δ tokoferoly.

1.4.1 Předúprava vzorku

Úprava samotného vzorku je velmi důležitým krokem v celém analytickém procesu, protože ovlivňuje kvalitu izolace sledované skupiny analytů od rušivých látek v matrici. Před vlastní analýzou je nutné pevné vzorky nějakým způsobem zhomogenizovat a zvětšit tak jejich povrch pro extrakci stanovovaných látek. Nejčastěji se pevné vzorky homogenizují rozdrcením, nakrájením nebo rozmělněním. Po extrakci se pevný podíl izoluje filtrací či centrifugací⁶⁴.

V některých případech je nutné vzorek před analýzou vysušit. Použitá sušicí metoda má také velký vliv na obsah extrahovaných látek, proto je nutné vybrat tu nejšetrnější, aby nedošlo k degradaci sledovaných látek. Sušení lze provádět při různých teplotách, nejčastěji při pokojové⁶⁶ či mírně zvýšené teplotě. Dále je možné využít lyofilizaci či mikrovlnného sušení, přičemž mikrovlnné sušení je cenově i časově méně náročné než lyofilizace⁶⁷.

1.4.2 Extrakce

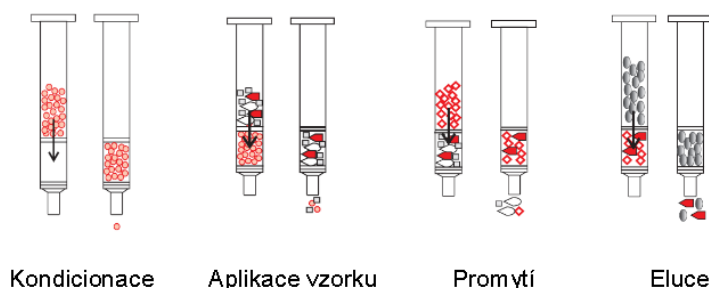
Extrakce je obecně podstatným krokem úpravy před samotnou analýzou, jejímž cílem je získání co nejvyššího výtěžku sledovaných látek⁶⁸. Pro vyšší účinnost a co nejnižší spotřebu organických rozpouštědel jsou používány techniky tzv. zelené chemie⁶⁹. Mezi techniky zelené chemie spadá mikrovlnná extrakce⁶⁷, SFE – extrakce nadkritickou tekutinou, SWE – extrakce nadkritickou vodou^{68, 69}, popřípadě ultrazvuková extrakce⁶³.

Extrakce pevnou fází

Extrakce pevnou fází (SPE) je vhodná především pro selektivní a zároveň rychlou přípravu vzorku. Jedná se o zachycení molekul analytu na tuhém sorbentu, přes který vzorek protéká. Poté je vzorek eluován vhodným rozpouštědlem. Pomocí SPE je možné nejen izolovat a přechistit sledované látky, ale může dojít i k zakoncentrování či výměně rozpouštědel. Metoda je výhodná v porovnání s extrakcí kapalina-kapalina díky nízké spotřebě vzorku a organických rozpouštědel, dobré selektivitě, rychlosti a jednoduchosti.

Pro extrakci se používají extrakční kolonky plněné různými sorbenty většinou na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Částice jsou uzavřeny fritami nejčastěji z polyethylenu, polytetrafluorethylenu nebo oceli.

Postup SPE extrakce se skládá z pěti kroků (obrázek 6), a sice kondicionace kolonky, aplikace vzorku, promytí vzorku pro odstranění matričních látek, sušení vzduchem/inertním plynem a eluce analytu vhodným rozpouštědlem⁷⁰.



Obrázek 6: SPE-extrakce pevnou fází⁷⁰

Extrakce kapalina-kapalina

Jedná se o techniku, která je založena na přechodu rozpuštěné látky z jedné kapalných fáze do druhé, přičemž tyto dvě kapalných fáze jsou vzájemně nemísitelné. Nejčastěji se používá pro oddělení rušících látek od stanovovaného analytu.

Pro extrakci se vybírá rozpouštědlo přibližně stejné polarity jako extrahované látky. Dále musí být rozpustnost extrahované látky v kapalině, do níž chceme extrahovat významně vyšší ve srovnání s kapalinou, ze které ji získáváme. Ve většině případů se extrahuje z vodných roztoků do organických rozpouštědel s vodou nemísitelných⁷¹. Při volbě vhodného extrakčního rozpouštědla je potřeba brát v úvahu čistotu rozpouštědla, finanční náklady, ale i objem vhodný pro extrakci, a to především z ekologického hlediska⁷².

1.4.3 Příklady studií extrakce bioaktivních látek v rakytníku

Rozpouštědla pro extrakci jsou vybírána v závislosti na chemické povaze a polaritě antioxidantů, které jsou extrahovány. Antioxidanty, které jsou rozpustné ve vodě (většina fenolických látek, flavonoidů a antokyanů) jsou extrahovány za pomoci polárních či středně polárních rozpouštědel. Nejčastěji se používá methanol, ethanol, propanol, acetonitril, aceton či jejich vodné roztoky^{68, 69}. Naopak pro extrakci lipofilních antioxidantů (karotenoidů), neboli látek rozpustných v tucích, je nejčastěji jako rozpouštědlo využíván hexan ve směsi s acetonem či ethanol⁷³ nebo může být použita směs ethylacetátu s ethanol⁷⁴ či acetonem⁷⁴.

Pro extrakci fenolických látek obsažených v semenech rakytníku lze využít i extrakci nadkritickou vodou (SWE)⁶⁸. Největší vliv na účinnost této extrakce má teplota, přičemž

výtěžek byl také ovlivněn dobou extrakce a poměrem látky a rozpouštědla. Optimální parametry pro extrakci byly následující: extrakční teplota 120 °C, doba extrakce 36 minut a poměr pevná látka:voda 20:80.

Mikrovlánná extrakce ethanolem z dužiny rakytníku se také jeví jako poměrně vhodná technika pro izolaci fenolických látek⁷⁵. Extrakce byla provedena při teplotě 80 °C a její výtěžnost byla v tomto případě 78,4 %. Dále lze flavonoidy jednoduše, rychle a účinně extrahovat pomocí ultrazvukové extrakce, kdy bylo u extrakce sušených listů rakytníku dosaženo stejných výsledků jako u Soxhletovy extrakce, která je však časově mnohem více náročnější⁶³.

Při stanovení lipofilních antioxidantů, konkrétně karotenoidů v mražených semenech i listech rakytníku se jako vhodné extrakční činidlo ukázala směs petrolether, ethylacetát, methanol v poměru 1:1:1⁶⁵. V jiné studii⁶⁷, byla dosažena výtěžnost až 99,9 % tokochromanolů za použití zmýdelnění a následné extrakce směsí hexan, ethylacetát v poměru 1:1. Tokoferoly a karotenoidy je též možné extrahovat metodou využívající nadkritický CO₂. S přidavkem ethanolu, methanolu nebo 2-propanolu k nadkritickému CO₂ je možné úspěšně extrahovat tyto látky z oleje získaného z prášku bobulí rakytníku. Přídavek daného rozpouštědla ovlivnil polaritu extrakčního činidla a tím i výtěžek extrakce, který byl nejvyšší v případě přídavku methanolu (85,1 % tokoferolů a 71,7 % karotenoidů)⁷⁶.

1.4.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda, která dělí složky směsi na základě jejich rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi. Stacionární fázi je nejčastěji tuhá látka a mobilní fázi je kapalina.

V závislosti na polaritě stacionární a mobilní fáze rozlišujeme dva základní chromatografické systémy, a to chromatografie v systému s normálními fázemi (NP) a chromatografie v systému s obrácenými fázemi (RP). Zatímco v NP-HPLC je stacionární fáze více polární než fáze mobilní, u RP-HPLC je tomu naopak a využívá se nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. RP-HPLC je daleko jednodušší a je při ní dosahováno reprodukovatelných výsledků, a proto se používá mnohem více než NP-HPLC. Jako mobilní fáze obvykle se většinou využívá směs acetonitril/methanol/dichlormethan⁷⁷, n-hexan s 1,4-dioxanem⁶⁷ nebo hexan s 2-propanolem³³.

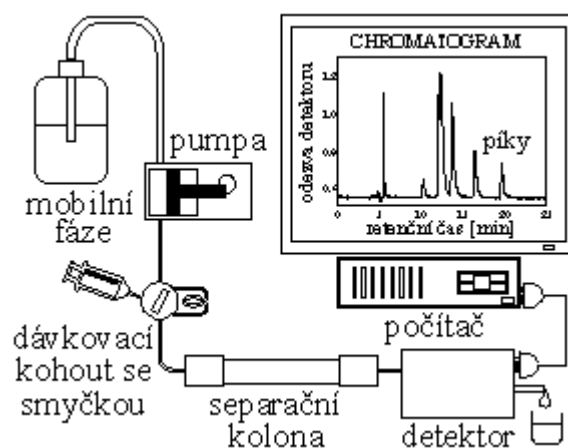
Pro analýzu bioaktivních sloučenin v přírodních matricích, a tedy i v rakytníku je HPLC nejvíce používanou technikou. Většina látek obsažených v rakytníku či jejich metabolitů je

separována s využitím RP-HPLC⁶³, avšak pro některé látky lze využít i NP-HPLC⁷⁸ či chromatografii hydrofilních interakcí (HILIC)⁷⁹. V současné době se stále častěji využívá i ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)¹⁵, kde se pro separaci používají částice o velikosti menší než 2 μm . V závislosti na použitém chromatografickém systému poté vybíráme vhodnou mobilní fázi pro separaci cílových látek. V RP-HPLC se jako mobilní fáze zpravidla využívá kombinace organického rozpouštědla jako je methanol, ethanol či acetonitril s vodou, do které se přidává kyselina mravenčí, octová či fosforečná pro potlačení disociace kyselin obsažených ve vzorku⁸⁰.

Mezi hlavní části chromatografického systému (obrázek 7) patří vysokotlaké čerpadlo, které čerpá mobilní fázi umístěnou v zásobníku. Dále je mobilní fáze vedena přes dávkovací zařízení na kolonu, kde dochází k separaci stanovovaných látek a rozdělené látky jsou detekovány vhodným detektorem. V neposlední řadě je chromatograf vybaven programem pro zpracování a vyhodnocení získaných dat.

Stacionární fáze umístěná v koloně je zpravidla tvořena pravidelnými kulovými částicemi s nízkou distribucí ve velikosti. Čím menší jsou použité částice tím roste účinnost separace a jsou pozorovány úzké píky. V RP-HPLC se nejčastěji používá jako stacionární fáze chemicky modifikovaný silikagel, popřípadě zesítené kopolymery styrenu a divinylbenzenu.

Chromatograf bývá většinou vybaven spektrofotometrickým detektorem, ale v závislosti na aplikacích se může využít fluorescenční, refraktometrický nebo elektrochemický detektor. Detektor se vybírá na základě selektivity pro studované analyty. K detekci látek obsažených v rakytníku se zpravidla používá spektrofotometrický detektor⁴² či hmotnostní spektrometr (MS) s ionizací elektrosprejem (ESI)^{24,81}, popřípadě s ionizací za atmosférického tlaku^{80,82}. Konkrétně pro fenolické látky, tokoferoly a vitamin C se téměř výhradně využívá HPLC se spektrofotometrickou detekcí (UV)^{63, 78, 83, 84}. Při využití spektrofotometrického detektoru s diodovým polem je umožněn záznam celých spekter a zároveň kvantifikace při různých vlnových délkách, odpovídajících absorpčnímu maximu sledovaných látek. Výhodou spojení s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS) je možnost identifikace na základě hmotnostních spekter sledovaných látek^{15, 79, 84}. Pro analýzu flavonoidů a fenolických látek se také ukázala jako velmi vhodná elektrochemická⁸³, nebo fluorimetrická detekce¹⁵, které mají lepší citlivost než UV detekce. Z elektrochemických detektorů je nejvíce využívaným coulometrický detektor^{80, 83, 85} který dosahuje vysoké citlivosti a selektivity analýzy.



Obrázek 7: Vysokoučinná kapalinová chromatografie

V rakytníku jsou i látky, které je možné stanovit metodou plynové chromatografie (GC). Jedná se například o stanovení cukrů, organických kyselin, vitamínu C⁴² nebo mastných kyselin^{65, 82}. Většinou je v těchto případech nutná derivatizace pro zvýšení těkavosti analyzovaných látek. Metoda GC se ukázala jako vhodná a spolehlivá především pro stanovení kyselin a cukrů, hlavně díky ušetření času během přípravy vzorku. Mimo to stačí malé množství vzorku a tím je možné provádět i screening velkého množství vzorků. V případě vitamínu C se však výsledky ukázaly být méně spolehlivé.

1.4.5 Příklady studií separace látek v rakytníku metodou HPLC

Jednoduchou RP-HPLC metodou s UV detekcí založenou na gradientové eluci byly v extraktech z listů rakytníku úspěšně identifikovány a kvantifikovány tři fenolické látky (kaempferol, isorhamnetin a kvercetin-3-galaktosid) s vysokou antioxidační aktivitou. Největších výtěžků bylo dosaženo s využitím SWE při teplotě 150 °C. S touto extrakcí bylo dosaženo větších výtěžků než s využitím Soxhletovy extrakce či macerace, navíc se jedná o jednoduchou a rychlou metodu s nízkou spotřebou rozpouštědel. Stacionární fáze byla kolona C18 s nastavenou gradientovou elucí a průtokem mobilní fáze 0,75 ml/min. Jako vhodná mobilní fáze byla použita směs tvořená vodou s 0,3% kyseliny fosforečné a acetonitrilem s methanolem. Pro detekci látek byla vybrána vlnová délka 370 nm. Tento systém se osvědčil pro umožnění separace maxim jednotlivých sloučenin zároveň s dobrým rozlišením⁸⁶.

V další studii byly analyzovány flavonoidy v listech rakytníku metodou HPLC-UV. Jako mobilní fáze byla tentokrát vybrána a použita směs acetonitrilu a vody s kyselinou

mravenčí. S touto mobilní fází bylo dosaženo lepšího rozlišení oproti směsi methanol:voda s kyselinou mravenčí. Na základě absorpčních maxim pozorovaných flavonoidů byla pro detekci zvolena vlnová délka 360 nm. Celkem bylo identifikováno sedm flavonoidních látek, a to rutin, isoquercetin, isorhamnetin-3-glukosid, kvercetin, kaempferol a isorhamnetin⁸¹.

V dalším z experimentů bylo pomocí HPLC se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí analyzováno složení fenolických látek ve šťávě z plodů rakytníku. Bylo zjištěno, že převládajícími fenolickými látkami jsou flavonoly, kdežto fenolové kyseliny a katechiny jsou obsaženy ve značně menším množství. Dále bylo potvrzeno, že obsažené fenolické látky v rakytníkové šťávě tvoří pouze malé procento antioxidační kapacity (cca 15 %). Hlavním antioxidantem je kyselina askorbová (vitamin C), která vzhledem ke své velmi vysoké koncentraci ovlivňuje antioxidační aktivitu plodů až ze 75 %⁸³.

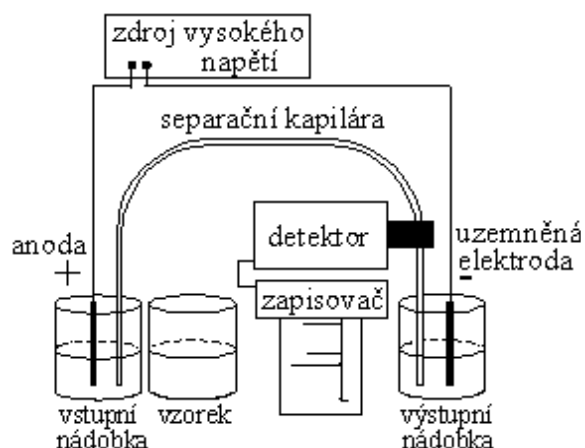
Metodou RP-HPLC byl také stanoven obsah karotenoidů v různých ovocných a zeleninových šťávách (mrkvová, rajčatová, pomerančová a rakytníková). Nejvyšší množství karotenoidů bylo zjištěno právě ve šťávě z plodů rakytníku, přičemž nejvíce byl obsažen lutein (33 %), následovaný zeaxanthinem (27 %), β -karotenem (23 %) a lykopenem (13 %)⁸⁷.

NP-HPLC s fluorescenční detekcí byla oproti tomu využita při analýze tokoferolů v semenech různých poddruhů rakytníku. Mobilní fází byla směs hexanu a diisopropyletheru s vhodným gradientem. U všech poddruhů byly identifikovány čtyři izomery tokoferolu, přitom α -tokoferol a δ -tokoferol byly obsaženy v nejvyšším množství, cca (20 – 50 %). Nejbohatší na tokoferoly byly z analyzovaných poddruhů rakytníku poddruh *Rhamnoides* a *Mongolica*⁷⁸.

1.4.6 Kapilární elektroforéza (CE)

Tato elektromigrační separační technika je založená na rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Délka separační kapiláry je většinou v rozmezí 25 – 100 cm a její vnitřní průměr je 25 – 100 μ m. Kapilára je nejčastěji vyrobena z taveného křemene s ochrannou vrstvou polyimidu, která dodává kapiláře ohebnost.

Oba konce separační kapiláry jsou ponořeny do zásobníku s elektrolytem, do kterého jsou vloženy elektrody a aplikováno napětí 10-30 kV. Díky elektroosmotickému toku jsou všechny nabitě částice nesené ke katodě, kde je umístěn detektor. Kladné částice jsou elektroosmotickým tokem urychlovány, zatímco záporné částice se pohybují proti směru elektroosmotického toku a jsou tedy pomalejší. I přes menší citlivost je tato metoda často využívána pro malou spotřebu vzorku a poměrně vysokou rychlost^{71, 72}.



Obrázek 8: Kapilární elektroforéza

Tato technika se s úspěchem může využít při stanovení bioaktivních sloučenin v různých přírodních matricích. Nejčastějším pufrům je borátový pufr s koncentrací 25 – 200 mM a pH 8 – 11^{64, 88}.

1.4.7 Příklady studií separace látek v rakytníku kapilární elektroforézou

V případě separace látek obsažených v rakytníku si kapilární elektroforéza získala široký zájem. Jedna studie byla věnována separaci a identifikaci fenolických látek v extraktech z rostlinných materiálů. Rostlinným materiálem byly tři různé rostliny, jednou z nich právě rakytník řešetlákový, kdy byla použita metoda kapilární elektroforézy (CE) s UV detekcí. V experimentu byla použita nepokrytá kapilára o délce 75 cm s průměrem 50 μm . Kapilára byla před použitím promyta 1M NaOH, vodou, methanolem a separačním médiem. V této studii byla zkoumána separace polyfenolů ve vodném pufru i nevodných roztocích. Použitým elektrolytem pro vodné prostředí byl tetraboritan sodný a modifikátorem ethanol, díky kterému byl zvýšen obsah fenolických látek, pro nevodné prostředí byla jako pufr použita směs methanolu s acetonitrilem. Pro dělení těchto přírodních látek rozpustných ve vodě se ukázalo jako vhodnější využít metody CE v nevodném prostředí, tedy ve směsi methanolu s acetonitrilem⁸⁸.

Dále byly pomocí CE analyzovány fenolické sloučeniny ve dvou extraktech získaných z rozmělněných a zmražených plodů rakytníku. Pro separaci byla využita kapilára z taveného křemene různé délky. Pro porovnání byly stejné extrakty analyzovány také metodou HPLC a obě metody poskytovaly srovnatelné výsledky. Kapilární elektroforéza je tedy při stanovení a identifikaci látek v rostlinných extraktech vhodnou alternativou k HPLC⁶⁴.

1.5 Antioxidační aktivita

Za antioxidanty jsou považovány látky ovlivňující různými mechanismy proces oxidace lipidů a dalších sloučenin. Reagují s volnými radikály přímo či redukují hydroperoxydy, které vznikly. Dále jsou schopné navázat do komplexů katalyticky působící kovy nebo odstranit přítomný kyslík. Antioxidanty mohou být buď syntetické nebo přírodní. V současné době je trendem nahrazovat syntetické antioxidanty používané v potravinářství za přírodní antioxidanty, které jsou získávány z rostlinných materiálů, a to především z důvodu ochrany zdraví⁸⁹.

Jak již bylo uvedeno výše, látky vykazující antioxidační účinky jsou v rakytníku rozděleny do dvou základních skupin – hydrofilní a lipofilní antioxidanty. Mezi hydrofilní patří kyselina askorbová (vitamin C) a fenolické látky, konkrétně flavonoidy, fenolické kyseliny a taniny. Do lipofilních antioxidantů patří karotenoidy a tokochochromanoly (vitamin E)³³.

1.5.1 Metody pro stanovení antioxidační kapacity

Pro stanovení antioxidační kapacity je možné v literatuře nalézt velké množství metod. Jejich široká škála je dána tím, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit každý jiným mechanismem. Obecně jsou ale rozděleny do dvou základních skupin, a sice na metody založené na eliminaci radikálů, a metody, které posuzují redoxní vlastnosti látek. Pro eliminaci radikálů jsou používány metody ABTS, ORAC nebo DPPH a pro posouzení redoxních vlastností látek to je metoda FRAP⁹⁰.

Druhou možností rozdělení těchto metod je dle jejich mechanismu, kdy prvním typem jsou metody založené na přenosu atomu vodíku, a druhým typem metody založené na přenosu elektronu⁶⁹.

Metoda používající ABTS (metoda TEAC)

Metoda využívající ABTS radikál je jedna z nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační kapacity (TAA). Je založena na testování schopnosti látek nebo celého vzorku zhaset kation-radikál ABTS [2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)]⁹⁰. Zhasení ABTS⁺ je měřeno spektrofotometricky při 734 nm, kdy vlivem působení antioxidantu dochází k poklesu absorbance původně modrozeleného roztoku⁶⁹.

Existují dva postupy, které je možné využít při experimentálním měření. Buď je antioxidant přidáván do reakční směsi s již obsaženým vygenerovaným ABTS⁺, nebo je antioxidant přítomen v reakční směsi již během procesu generování radikálu. Radikál je běžně generován chemickou oxidací ABTS pomocí peroxodisíranu draselného či oxidem manganičitým, nebo oxidací systémem methmyoglobinu s H₂O₂ nebo peroxidázy s H₂O₂^{69, 90}.

Antioxidační aktivita vzorku je poté porovnána s antioxidační aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), což je ve vodě rozpustný analog vitamínu E⁹⁰.

Tato metoda stanovení je výhodná díky své jednoduchosti a rychlosti provedení. Je možné pomocí ní stanovit TAA směsných vzorků i látek různého původu, tedy hydrofilní nebo lipofilní antioxidanty⁹⁰. ABTS metoda byla rovněž s úspěchem využita při přímém spojení s HPLC zahrnutím postkolonové reakce právě s radikálovým kationtem ABTS pro usnadněnou identifikaci antioxidantů ve směsi⁹¹.

Právě metodou ABTS byla v jedné ze studií stanovena antioxidační kapacita olejů ze semen a z dužiny rakytníku. Výsledky testu byly v rozmezí 611 – 799 μmol Troloxu/100 g sušiny semen i dužiny. Nejnižší antioxidační kapacita byla stanovena u oleje ze semen, nejvyšší pak u oleje z dužiny⁹².

Metoda používající DPPH

Tato metoda využívá ke zjištění antioxidační kapacity čistých látek i směsí reakci se stabilním dusíkovým radikálem DPPH^{*} [1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl]. Tento stabilní organický radikál má tmavě fialovou barvu a během reakce s antioxidanty dochází k jeho redukci a vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin)⁹⁰, což se projeví odbarvením roztoku. Míra odbarvení se měří spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm⁹³.

Metoda DPPH je vhodná pro stanovení antioxidantů v zeleninových a ovocných šťávách nebo extraktů. Oproti ABTS testu je radikál DPPH komerčně dostupný a není třeba ho před stanovením generovat. Nevýhodou této metody je však pomalá reakce či inertnost činidla u některých antioxidantů⁹⁴.

Metodou DPPH byla stanovena antioxidační kapacita lyofilizovaných bobulí rakytníku, která byla v rozmezí 13,1 – 86,3 mg Troloxu/g, přičemž antioxidační kapacita závisela na odrůdě, lokalitě, ale i na teplotě⁹⁵. Dále bylo prokázáno, že sušení vzorku lyofilizací je vhodným způsobem pro zachování jeho antioxidační kapacity. V jiné studii byla zjištěna antioxidační kapacita extraktů z bobulí v rozmezí hodnot 1,1 – 4,7 g Troloxu/kg čerstvé hmotnosti, v závislosti na jednotlivých odrůdách⁹⁶. V případě extraktů z listů byl rozsah

naměřených hodnot odrůdy *Hippophae rhamnoides* 19,6 – 54,2 g Trolox/kg. Mezi těmito hodnotami se pak pohyboval zbytek odrůd, kdy nejvíce byly ovlivňovány nejspíše dobou zrání – čím delší doba, tím vyšší hodnota. Při zkoumání listů a nezpracovaných a zpracovaných větví rakytníku byla pozorována antioxidační kapacita různě připravených extraktů v rozmezí hodnot 41,9 – 89,6 mg Trolox/g, přičemž nejvyšší hodnotu 89,6 mg Trolox/g měly listy a nejnižší měly větve. Ethanolový extrakt listů měl vyšší kapacitu než větvi, stejně to platilo i pro extrakt vodný. Obecně se vodné extrakty ukázaly jako výhodnější pro zachování kapacity antioxidantů⁹⁷.

Metoda používající galvinoxyl

Metoda používající galvinoxyl je založena na velmi podobném principu jako DPPH metoda. Látky poskytující vodík redukují stabilní radikál galvinoxyl a změna zbarvení je monitorována spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm⁹⁰.

Metoda ORAC

U metody ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a měří se schopnost antioxidantů ve vzorku zpomalit nebo až zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na monitorování úbytku fluorescence β -fykoerytrinu po napadení radikály.

Jedná se o rychlý, přesný a velmi citlivý test, avšak má jistá omezení při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů, v důsledku nespecifické vazby na protein. Zavedením jiné fluorescenční látky, konkrétně fluoresceinu, se tato metoda stala přesnější⁹⁸.

Metodou ORAC byla stanovena antioxidační kapacita extraktů ze sušených bobulí čtyř různých poddruhů rakytníku⁹⁹. Výsledky se pohybovaly v rozsahu 266 – 369 μmol Trolox/g sušiny, přičemž nejvyšší hodnota antioxidační kapacity byla naměřena u poddruhu *Sinensis* a nejnižší u poddruhu *Turkestanica*. Dále byla tato metoda použita pro zjištění antioxidační kapacity rakytníkových olejů⁹². Výsledky ukázaly, že nejvyšší hodnoty, a tedy lepší antioxidační vlastnosti, vykazoval olej ze semen s hodnotami v rozmezí 7931 – 8509 μmol Trolox/100 g oproti oleji z dužiny s rozmezím hodnot 1548 – 1818 μmol Trolox/100 g.

Metoda FRAP

Metodou FRAP (Ferric reducing antioxidant potential) se měří redukční schopnosti antioxidantů přítomných ve vzorku. Principem stanovení je redukce komplexu Fe^{3+} s TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)) v kyselém prostředí (pH 3,6). Míra modrého zbarvení

roztoku odpovídající vzniku Fe^{2+} -TPTZ komplexu se měří spektrofotometricky při 593 nm^{69,90}.

Tato metoda je vhodná především pro antioxidanty s rychlými reakcemi (cca 4 – 6 minut). Konkrétně se jedná o kyselinu močovou nebo kyselinu askorbovou. Bylo ale zjištěno, že nárůst absorbance některých fenolických látek v MeOH a ve vodě, jako v případě kyseliny kávové se zvyšovaly až po delším čase (v řádu hodin)¹⁰⁰.

Metoda FRAP byla použita pro zjištění antioxidační kapacity odpadního produktu při výrobě šťávy z rakytníku, která se pohybovala v rozmezí 101,4 – 416,7 mg Fe^{2+} /g, vyjádřena jako $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ekvivalent. Nejvyšší antioxidační kapacitu vykazoval vzorek, který byl extrahován pomocí ultrazvukové extrakce¹⁰¹. Tato metoda byla dále využita pro stanovení antioxidační kapacity ethanolových extraktů připravených z různých částí rostliny, a to z kořene, semen, listů i stonku²⁹. Bylo zjištěno, že aktivita extraktů klesá v pořadí semena > kořen > list > stonek. Konkrétní hodnoty byly vyjádřeny jako mg Troloxu na gram sušiny a výsledky byly následující: semena 454 ± 82 mg Troloxu/g, kořeny 311 ± 31 mg Troloxu/g, listy 171 ± 19 mg Troloxu/g a stonek 137 ± 9 mg Troloxu/g. V jiném experimentu byla stanovena antioxidační kapacita extraktů z listů rakytníku, přičemž vzorek byl extrahován třemi různými způsoby. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo u vzorku extrahovaného pomocí SWE (219 – 277 mg Troloxu/g sušiny), poté Soxhletovou extrakcí a nejnižších hodnot bylo dosaženo macerací⁸⁶.

Metoda CUPRAC

Metoda CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity) je principiálně velmi podobná metodě FRAP. Vlivem antioxidantů dochází k redukci chelátu Cu(II)-neocuproninu na chelát Cu(I)-neocuproninu s charakteristickým oranžovočerveným zbarvením, který je stabilní po delší dobu. Výsledná absorbance roztoku je měřena při vlnové délce 450 nm po 30 minutách.

Výhodou tohoto testu v porovnání s FRAP je, že probíhá při pH 7, tedy při fyziologickém pH. Obecně je tato metoda vhodná pro stanovení lipofilních i hydrofilních antioxidantů, a to z důvodu rozpustnosti Cu(II)-neocuproninu v organickém i vodném prostředí^{69,102}.

Antioxidační kapacita odpadního produktu při výrobě šťávy byla také měřena metodou CUPRAC a vyjádřena jako ekvivalent Troloxu na gram sušeného vzorku. Výsledky se pohybovaly v rozmezí 89 – 439 mg Troloxu/g sušiny, přičemž nejvyšší hodnotu opět poskytl vzorek připravený pomocí ultrazvukové extrakce, stejně jako tomu bylo u metody FRAP¹⁰¹. Dále byla tato metoda využita pro měření antioxidační kapacity extraktů

připravených z listů a neopracovaných a opracovaných větví rakytníku. Výsledné hodnoty se pohybovaly v rozmezí 129 – 538 mg Troloxu/g, přičemž u listů byla vyšší aktivita pozorována u ethanolového extraktu oproti vodnému, zatímco v případě větví byla aktivita vyšší u vodného extraktu⁹⁷.

Metoda Folin-Ciocalteuova

Tato metoda slouží pro stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin (TPC) a pro svou jednoduchost je dnes rutinně používaným testem pro stanovení antioxidantů obsažených v zelenině a ovoci⁶⁹. Principem je přenos elektronu v alkalickém prostředí. V reakční směsi dochází v případě přítomnosti fenolických sloučenin k redukci žlutě zbarvené směsi fosfomolybdenanu s fosfowolframem na modře zbarvený produkt. Intenzita zbarvení se monitoruje spektrofotometricky při vlnové délce 700 – 760 nm¹⁰³. Výsledky se udávají zpravidla jako ekvivalentní množství kyseliny gallové jako standardu (GAE).

TPC byl stanoven u odpadního produktu při výrobě šťávy, kde dosahoval hodnot 32,6 mg GAE/g sušiny¹⁰¹. U lyofilizovaných bobulí různých odrůd rakytníku se hodnoty TPC pohybovaly v rozmezí 11,8 – 33,5 mg GAE/g¹⁰⁴. Tato variabilita mohla být způsobena vlivem genetiky a původem, nejvyšší hodnoty poskytly divoce rostoucí bobule, nižší hodnoty pak bobule šlechtěné. Částečně mohly být výsledky ovlivněny i různými extrakčními postupy⁹⁵. V bobulích bylo další studií zjištěno množství fenolických látek v rozmezí 0,70 – 3,62 g GAE/kg, přičemž tato variabilita výsledků byla způsobena různými kultivary. V listech různých kultivarů pak bylo zjištěno trochu vyšší množství, a to 1,88 – 3,72 g GAE/kg⁹⁶. Pravděpodobně byly rozdíly v hodnotách způsobeny rozdílnými lokalitami pěstování, dobou sklizně a také klimatickými podmínkami⁹⁵. Při měření TPC listů a opracovaných i neopracovaných větví byla zjištěna hodnota v rozmezí 25,8 – 75,9 mg GAE/g. Výsledky byly závislé na extrakční technice. V případě listů byla účinnější technikou extrakce ethanolem, zatímco v případě větví byla vyšší antioxidační kapacita u vodného extraktu⁹⁷.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

Pro měření a stanovení antioxidační kapacity v jednotlivých vzorcích rakytníku, byl použit UV/VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2450 (Kyoto, Japonsko) a kyveta S/G/10 s optickou délkou 10 mm (Fisher Scientific, Německo).

Analýza fenolických látek a vitamínu C byla provedena s využitím kapalinového chromatografu Shimadzu, který se skládal ze dvou vysokotlakých čerpadel LC-20AD, ze směšovače mobilní fáze, autosampleru SIL-20A, detektoru s diodovým polem (vše Kyoto, Japonsko) a kolonového termostatu LCO 102 (Ecom, Praha). Pro separaci a identifikaci látek byly použity dvě kolony:

- Ascentis Express C18, rozměry 150 x 3 mm, 2,7 μm částice (Supelco, USA)
- Kinetex Polar C18, rozměry 150 x 3 mm, 2,6 μm částice (Phenomenex, USA)

Při přípravě extraktů byl používán homogenizátor ULTRA TURRAX T 18 (IKA, Německo), centrifuga Centrifuge 5424 Eppendorf (Hamburg, Německo), centrifuga (ThermoFisher Scientific, Německo), třepačka (Heidolph, Německo), ultrazvuková lázeň (Kraintek 12, Slovensko), digitální analytické váhy (Sartorius, Ústí nad Labem) a pH metr (Metrohm 827, Švýcarsko). Deionizovaná voda byla upravena přes čisticí zařízení Mili Q (Merck, Německo).

Vzorky byly pipetovány pomocí automatických mikropipet s nastavitelnými objemy (Biohit, Finsko). Pro přečištění vzorků byl použit skládaný filtrační papír a před HPLC analýzou byly využity stříkačkové filtry s PTFE nebo Nylon membránou a s velikostí pórů 0,45 μm , nebo 0,22 μm (Labicom, ČR).

2.2 Použité chemikálie

2.2.1 Chemikálie a rozpouštědla

Při stanovení antioxidační kapacity a celkového obsahu fenolických látek byl použit radikál DPPH, ABTS diamonná sůl, TPTZ, 2M Folin-Ciocalteuovo činidlo, octan amonný, methanol, Trolox a kyselina gallová (vše Sigma Aldrich, USA), Na_2CO_3 , HCl , FeCl_3 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Lach-Ner, ČR).

Jako mobilní fáze pro separaci kapalinovou chromatografií byl použit methanol čistoty pro HPLC (gradient grade) nebo pro HPLC/MS (Sigma Aldrich, USA) a redestilovaná voda,

kteřá byla upravena pŕes čistící zařídění Mili-Q (Merck, Německo). Pŕi stanovení fenolických látek byla voda okyselena kyselinou mravenı na pH 2,5 a pŕi stanovení vitamínu C byla do vodné mobilní fáze pŕidavana kyselina fosforečná (pH 2,8).

2.2.2 Standardy

Ke spektrofotometrickému stanovení celkového mnozství fenolických látek byla jako standard pouzita kyselina gallová a pro stanovení antioxidační kapacity metodami ABTS, DPPH a FRAP byl pouzit standard Troloxu.

Pro identifikaci a kvantifikaci vitamínu C byla pouzita jako standard kyselina askorbová a pro identifikaci fenolických látek byly pouzity standardy kyseliny ferulové, gallové, salicylové, *p*-hydroxybenzoové, protokatechuove, *p*-kumarové, chlorogenové, kávové a vanilové, dále byl pouzit katechin, epikatechin, rutin, kvercetin, kvercetin-3-glukosid, kaempferol, kaempferol-3-glukosid, kaempferol-3-rutinosid, isorhamnetin-3-O-rutinosid a myricetin.

2.2.3 Vzorky rakytníku

Pro diplomovou práci bylo analyzováno 14 vzorků rakytníku či s obsahem rakytníku. Konkrétní vzorky a jejich podrobné informace jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Seznam analyzovaných vzorků

Označení	Vzorek	Výrobce	Obsah rakytníku [%]
R1	Rakytník ovocná pomazánka	Rakyt – stálé zdraví	40
R2	Rakytník v medu	Rakyt – stálé zdraví	15
R3	Rakytník v medu	MADAMI s.r.o.	30
R4	Rakytník do jogurtu – extra hustý	Rakyt – stálé zdraví	53
E1	Organic sea berry powder	Energy a.s.	100
S1	Bio rakytníková šťáva	MO – Mount Berry	100
M1	Mražené bobule	Varnsdorf, ČR	100
C1	Sušené bobule – čaj	Milota	100
C2	Rakytník sušený – čaj s citronovou trávou	SEVAK star s.r.o.	50
C3	Rakytníkový čaj sáčekový	Apotheke	20
C4	Dětský rakytníkový čaj	LEROS	10
B1	Bylinné kapky rakytník – doplněk stravy	Valdemar Grešík	10
B2	Bylinný elixír rakytník + vitamin C	Maxi Vita HERBAL	0,8
G1	Rakytníček+, Multivitaminové želatinky s rakytníkem	Terezia	3

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava a extrakce vzorků

U pevných vzorků (M1, C1, R1-R4) byl navážený vzorek smíchán se 40 ml 70% methanolu a za pomoci mixeru (M1, C1) nebo třepačky (R1-R4) probíhala extrakce 15 minut. Navážka se lišila podle typu analyzovaného vzorku. U mražených bobulí (M1) byla navážka 5 g, u sušených bobulí (C1) 1 g, u rakytníkových marmelád a medu (R1-R3) to bylo 20 g a u rakytníku do jogurtu (R4) byla navážka 10 g. Po extrakci byly všechny směsi přefiltrovány přes filtrační papír a před chromatografickou analýzou navíc přes stříkačkový filtr.

U kapalných vzorků a pevných vzorků nerozpustných v organickém rozpouštědle byla testována extrakce pomocí ethylacetátu. 10 ml původního vzorku (B2), odstředěné rakytníkové šťávy (S1) či vodného roztoku vzorku (E1, C1-C4, R3 a G1) bylo smícháno se 30 ml ethylacetátu a po 15 minutové extrakci byla směs oddělena s využitím centrifugy (5 min/8000 otáček). Horní organická vrstva byla oddělena a rozpouštědlo bylo vysušeno pomocí dusíku. Poté byly ke každému vzorku přidány 2 ml 50% methanolu a odparek byl rozpuštěn.

V extrahovaných 10 ml byla navážka vzorku E1 0,313 g, vzorku R3 to bylo 15 g a vzorku G1 0,9 g. Vzorky C1 – C4 byly připraveny navážením 2 g čaje a zalitím 250 ml vroucí vody. Po 10 minutách byly přefiltrovány přes filtrační papír a extrahovány.

Vzorek B1 byl analyzován bez úpravy. Všechny extrakty byly před chromatografickou analýzou přefiltrovány přes stříkačkový PTFE filtr.

Při přípravě extraktů vzorků M1, C1, R1-R4 pro stanovení vitamínu C byla extrakce provedena podobným způsobem, pouze pomocí jiného extrakčního činidla, kterým byl 3% roztok kyseliny metafosforečné. Vzorky S1, B1 a B2 byly pouze 10x naředěny extrakčním činidlem a vzorky G1 (0,9 g) a E1 (0,313 g) byly rozpuštěny v 10 ml extrakčního činidla. Všechny vzorky byly i v tomto případě před analýzou přefiltrovány přes 0,45 µm stříkačkový PTFE filtr a podle potřeby naředěny.

2.3.2 Spektrofotometrické metody

2.3.2.1 Optimalizace metody

Pro stanovení antioxidační kapacity extraktů připravených z rakytníkových produktů byla optimalizace provedena s využitím vzorku E1 (Organic sea berry powder). U každé metody byly optimalizované parametry množství vzorku a doba reakce. Pomocí optimalizovaných metod byly stanoveny antioxidační kapacity všech připravených extraktů. Některé extrakty bylo, kvůli velmi vysoké antioxidační kapacitě, nutné naředit.

2.3.2.2 Příprava standardů

Pro kvantifikaci TPC metody byla ze zásobního roztoku kyseliny gallové ($c = 1 \text{ g/l}$ v methanolu) vhodným naředěním připravena kalibrační řada s obsahem 0,005 – 0,035 mg kyseliny gallové v dávkovaném objemu (50 μl).

Standardní roztok Troloxu byl pro metody ABTS, DPPH a FRAP připraven v koncentraci $c = 0,01 \text{ mol/l}$ a vhodným naředěním tohoto zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada v rozmezí 0,05 – 0,1 μmol Troloxu v dávkovaném objemu (50 μl).

2.3.2.3 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Pro stanovení celkového množství fenolických látek byl připraven pracovní roztok smícháním 2 M Folin-Ciocalteuova činidla s destilovanou vodou v poměru 1:20. Byly odebrány 2 ml tohoto naředěného činidla a přidáno 50 μl vzorku. Tato reakční směs byla promíchána a po 5 minutách k ní byl přidán ještě 1 ml 7,5 % Na_2CO_3 . Po 30 minutách byl změřen nárůst absorbance při 750 nm a pomocí naměřené kalibrační křivky byl přepočítán na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

2.3.2.4 Metoda ABTS

10 mg ABTS bylo rozpuštěno v 5 ml destilované vody ($c = 3,6 \text{ mmol/l}$) a bylo přidáno 100 μl $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($c = 0,064 \text{ mol/l}$). Takto připravený roztok byl promíchán a uschován v lednici za nepřístupu světla asi 18 hodin. Poté bylo odpipetováno 2,5 ml do 100ml odměrné baňky a doplněno po rysku destilovanou vodou. Z této reakční směsi byly dále pipetovány 3 ml, k nim přidáno 50 μl vzorku a promícháno. Při měření rychlosti reakce byl při vlnové délce 734 nm měřen úbytek absorbance po 2 minutách do 10 minut, po 5 minutách do 30 minut, po 10 minutách do 60 minut, po 30 minutách do 120 minut a po 60 minutách do 180 minut. Pro změření kalibrační křivky a následné zjištění celkové antioxidační kapacity vzorků byl

stanoven čas měření úbytku absorbance po 60 minutách. Úbytek absorbance vyjádřený v % byl za pomoci kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství standardu Troloxu.

2.3.2.5 Metoda DPPH

Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo naváženo 0,0043 g radikálu DPPH a doplněno po rysku methanolem. Dále byl roztok methanolem naředěn ještě v poměru 1:2 a důkladně promíchán. Z takto připravené reakční směsi byly odebrány 3 ml, přidáno 50 μ l vzorku a opět promícháno. Při měření rychlosti reakce byl měřen úbytek absorbance při vlnové délce 515 nm po 2 minutách do 10 minut, po 5 minutách do 30 minut, po 10 minutách do 60 minut, po 30 minutách do 120 minut a po 60 minutách do 180 minut. Pro změření kalibrační křivky a zjištění celkové antioxidační kapacity vzorků byl stanoven čas měření úbytku absorbance 60 minut. Úbytek absorbance byl vyjádřený v % a pomoci kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství standardu Troloxu.

2.3.2.6 Metoda FRAP

Pro přípravu reakční směsi byly použity vodné roztoky FeCl_3 o koncentraci 20 mmol/l, TPTZ o koncentraci 10 mmol/l, který obsahoval přídavek HCl o koncentraci 40 mmol/l a octanový pufr, jehož koncentrace byla 0,3 mol/l a pH 3,6. Roztoky byly smíchány v poměru FeCl_3 :TPTZ:octanový pufr - 1:1:10. Z této reakční směsi byly odebrány 3 ml a přidáno 50 μ l vzorku. Při vlnové délce 593 nm byl na spektrofotometru měřen nárůst absorbance po 15 minutách od začátku reakce. Za pomoci naměřené kalibrační křivky byl nárůst absorbance přepočítán na ekvivalentní množství standardu Troloxu.

2.3.3 HPLC analýza

2.3.3.1 Optimalizace metody

Optimalizace separace fenolických látek byla provedena na extraktu připraveného ze vzorku bio šťávy a optimalizace separace vitamínu C byla provedena s využitím extraktu připraveného ze vzorku mražených bobulí. Pro stanovení vitamínu C bylo nutné připravit extrakční činidlo, konkrétně 3% roztok kyseliny metafosforečné.

Mezi optimalizované parametry patřil výběr vhodné kolony, mobilní fáze, doba analýzy, gradient a v neposlední řadě ředění vzorků pro kvantifikaci vitamínu C.

2.3.3.2 Příprava standardů

Roztoky standardů pro HPLC analýzu fenolických látek byly připraveny vždy smícháním 40 μ l příslušného standardu ($c = 1$ g/l) s 1 ml rozpouštědla, v našem případě s 50% methanolem.

U vitamínu C byl nejdříve připraven zásobní roztok kyseliny askorbové ($c = 1$ g/l). Postupným ředěním byla připravena kalibrační řada deseti standardních roztoků v koncentračním rozmezí 0,005 – 0,6 mg/ml zásobního roztoku doplněného do 10 ml extrakčním činidlem.

2.3.3.3 Podmínky pro měření

Pro separaci fenolických látek byla vybrána kolona Ascentis Express C18 a jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a vody okyselené kyselinou mravenčí na pH 2,5. Separace probíhala gradientovou elucí s programem uvedeným v tabulce 8. Průtok mobilní fáze byl udržován na 0,4 ml/min a teplota kolony na 30 °C. Dávkované množství vzorku bylo 2 μ l. Pro monitorování separovaných fenolických látek byla vybrána vlnová délka 280 a 320 nm.

Pro separaci vitamínu C byla vybrána kolona Kinetex Polar C18 a jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a vody okyselené kyselinou fosforečnou na pH 2,8. Separace probíhala pomocí gradientové eluce s programem uvedeným v tabulce 9. Teplota kolony byla udržována na 30 °C, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min a dávkované množství bylo 2 μ l a separace byla měřena při vlnové délce 244 nm.

Tabulka 8: Optimalizovaný gradientový program pro separaci fenolických látek

Čas [min]	Methanol [%]
0	10
7	41
13	43
19	70
20	80

Tabulka 9: Optimalizovaný gradientový program pro separaci vitamínu C

Čas [min]	Methanol [%]
0	0
0,5	0
3	80
5	0

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Stanovení antioxidační kapacity

Pro optimalizaci metod pro stanovení antioxidační kapacity rakytníkových extraktů byl zvolen vzorek E1 „Organic sea berry powder“. Proces optimalizace zahrnoval přípravu reakční směsi, zjištění množství vzorku potřebné k analýze a dobu analýzy. Jednotlivými optimalizovanými metodami byla následně stanovena antioxidační kapacita všech připravených extraktů.

Nejdříve byla provedena optimalizace metod ABTS, DPPH a FRAP. Dávkovaný objem reakční směsi byl vždy 3 ml a objem dávkovaného vzorku do připravené reakční směsi byl zvolen u všech tří metod 50 μ l. Množství reakční směsi bylo určeno na základě limitujícího objemu kyvety použité pro měření.

Úbytek absorbance u metod ABTS a DPPH byl vypočítán dle rovnice:

$$\text{úbytek } A (\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} * 100$$

kde A_0 je počáteční absorbance v čase $t = 0$ min a A je absorbance v čase $t = 1$ hodina od počátku reakce.

Míra neboli hodnota celkové antioxidační kapacity, byla vždy vztažena na jednotku konkrétního vzorku, u pevných vzorků na 1 g, u vodných na 1 ml podle rovnice:

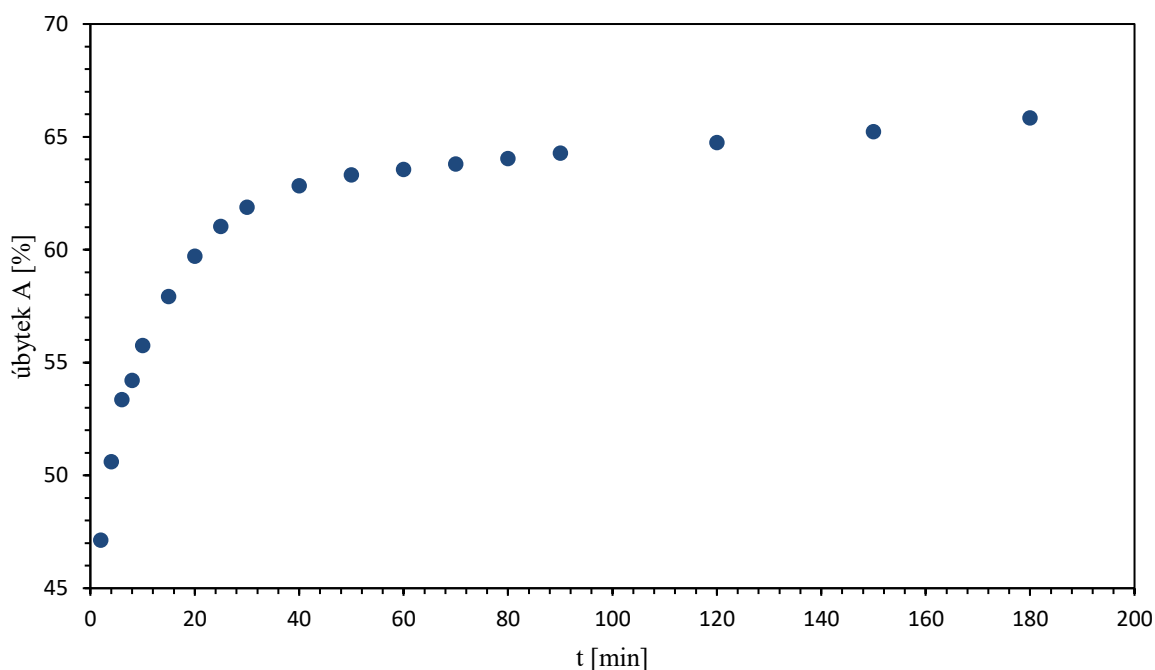
$$TEAC \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{aktivita vzorku } (\mu\text{mol Trolox})}{V (\text{ml})} \cdot F_R$$

přičemž F_R je faktor zahrnující dávkované množství a ředění (u pevných vzorků je místo objemu navážka v gramech – výsledek TEAC je poté v $\mu\text{mol/g}$).

3.1.1 Optimalizace metody ABTS

Nejprve byl zásobní roztok ABTS^{•+} vhodně naředěn, aby absorbance byla okolo hodnoty 0,8. Dále byl přidán vzorek a při vlnové délce 734 nm byl sledován úbytek absorbance v důsledku reakce radikálu se vzorkem. Úbytek byl sledován v daných časových intervalech po dobu 2 hodin: po 2 minutách do 10 minut, po 5 minutách do 30 minut, po 10 minutách do 90 minut a po 30 minutách do 180 minut. Ze závislosti úbytku absorbance na čase byla stanovena

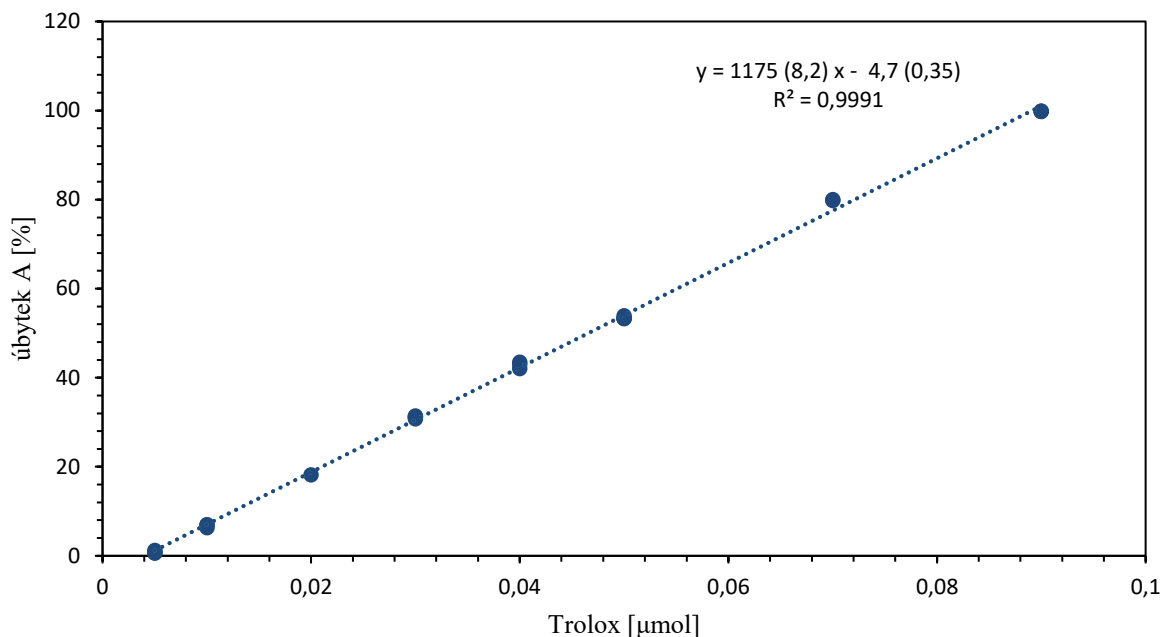
vhodná doba reakce, při kterém již nebyl pozorován strmý pokles absorbance, ale došlo k ustálení pozorované hodnoty. Bylo zjištěno, že pro stanovení antioxidační kapacity vzorku metodou ABTS je vhodný čas měření 1 hodina.



Obrázek 9: Závislost úbytku absorbance na čase – metoda ABTS

Aby bylo možné získané výsledky porovnávat v rámci studií i použitých metod, převádí se úbytek absorbance pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství standardu Troloxu. Kalibrace byla provedena na osmi koncentračních hladinách a každá koncentrace byla proměřena čtyřikrát. V programu QC Expert byla provedena regresní diagnostika a pomocí grafických metod byly odstraněny všechny vlivné body. Významnost absolutního členu lineární závislosti byla testována pomocí Studentova T-testu, a ten se ukázal jako významný.

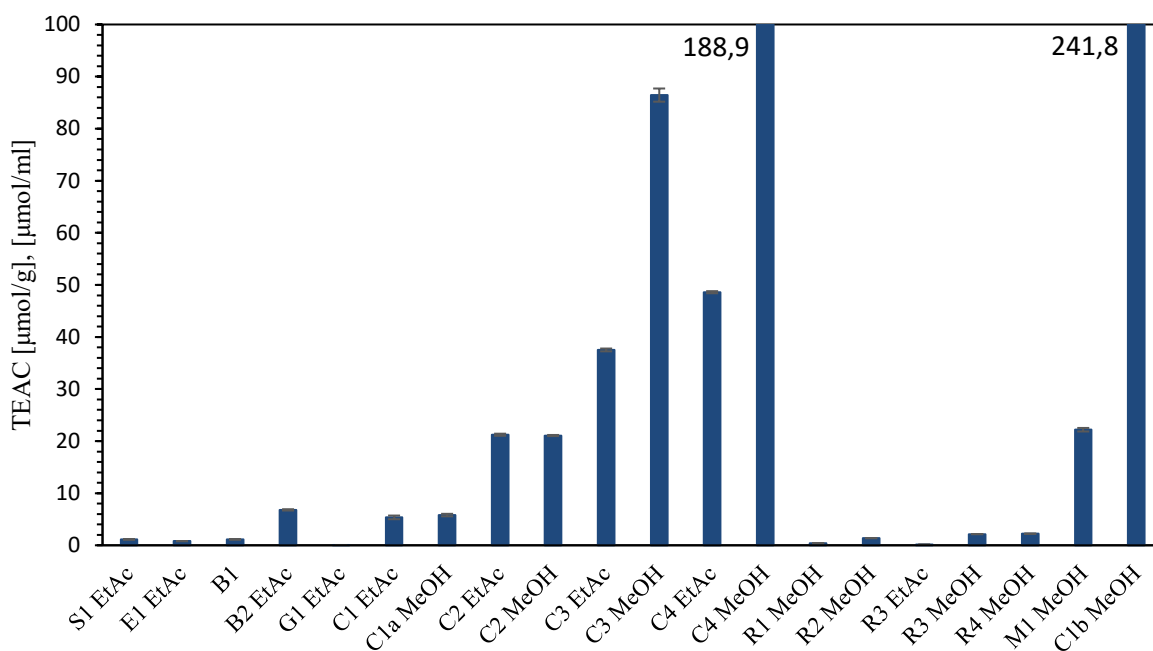
Výsledný koeficient determinace, úsek a směrnice přímky jsou uvedeny na obrázku 10.



Obrázek 10: Kalibrační křivka – závislost úbytku absorbance na množství standardu Troloxu v dávkovaném objemu – metoda ABTS

3.1.2 Měření antioxidační kapacity metodou ABTS

Pro stanovení antioxidační kapacity bylo použito celkem 20 připravených extraktů ze vzorků obsahujících rakytník řešetlákový. Příprava jednotlivých extraktů je uvedena v kapitole 2.3.1. Měření jednotlivých vzorků bylo provedeno pětkrát a jednotlivé úbytky absorbance byly pomocí rovnice kalibrační přímky přepočteny na ekvivalentní množství standardu Trolox (TEAC) v jednom gramu vzorku nebo v jednom mililitru. Hodnoty TEAC pro všechny extrakty jsou uvedeny na obrázku 11 a v tabulce P1 v příloze. Kapalné vzorky byly extrahované ethylacetátem, jsou doplněné zkratkou EtAc, pevné vzorky extrahované 70% methanolem mají zkratku doplněnou MeOH. U vzorků čajů (C1 – C4) byly připraveny dva typy extraktů. Nejprve byly zality horkou vodou a poté byl vodný výluh extrahován ethylacetátem nebo byly rovnou extrahovány 70% methanolem. Vzorek B1 byl v tomto případě proměřen bez jakékoliv extrakce. U vzorku sušených bobulí (C1) byla navíc u extrakce methanolem testována úprava vzorku před extrakcí. Sušené bobule byly extrahovány celé bez úpravy za pomoci třepačky (C1a MeOH) nebo byly extrahovány za pomoci homogenizátoru (C1b MeOH). Takto označené vzorky byly proměřeny i ostatními metodami.



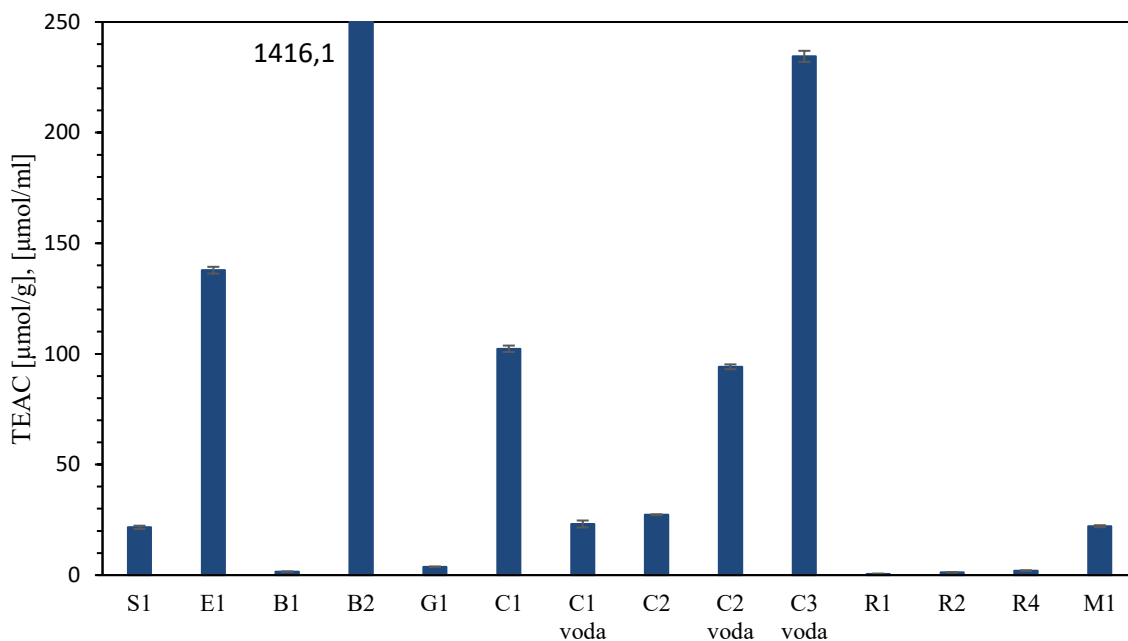
Obrázek 11: Antioxidační aktivita fenolických látek ve vzorcích rakytníku – metoda ABTS

Nejvyšší antioxidační kapacitu vykazoval dětský rakytníkový čaj po extrakci methanolem, a také sušené bobule, které byly extrahovány methanolem po předchozí homogenizaci mixérem (C1b MeOH). Jak je možné si všimnout, vzorky C1 a C2 mají prakticky srovnatelné hodnoty antioxidační kapacity po extrakci ethylacetátem jako po extrakci methanolem. Jiné je to v případě sáčkových čajů (C3 a C4), kdy jejich methanolové extrakty poskytly mnohem vyšší hodnoty TEAC. Pravděpodobně čaje obsahují látky s antioxidačními účinky, které se snadněji extrahují vodným roztokem methanolu. Při porovnání extraktů připravených ze sušených bobulí (C1) je jasně patrné, že účinnost extrakce se zvyšuje při homogenizaci vzorku mixérem, kdy se zvýší povrch vzorku a přístup rozpouštědla k extrahovaným látkám, a tedy i antioxidační kapacita takového extraktu je vyšší. Kromě rakytníkových čajů měl poměrně vysokou antioxidační kapacitu i extrakt připravený z mražených bobulí (M1), kde je nutné brát v úvahu, že výsledek je vztažen k jednomu gramu vzorku bez přepočtu na sušinu. Obsah vody je většinou u bobulí cca 80 %, pokud by se tedy uvažovala pouze sušina, byly by výsledky srovnatelné se sušenými bobulemi.

3.1.3 Měření antioxidační kapacity vitamínu C metodou ABTS

Vitamin C je silný antioxidant, ale jeho rozpustnost v organických rozpouštědlech je minimální nebo značně omezená. Proto pro posouzení antioxidační kapacity rakytníkových

produktů byly rovněž testovány extrakty připravené pomocí horké vody, nebo pomocí 3% kyseliny metafosforečné, která stabilizuje kyselinu askorbovou. Připravené extrakty byly proměřeny stejným způsobem jako extrakty do organických rozpouštědel a z naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty TEAC, které jsou zobrazeny v obrázku 12 a v tabulce P5 v příloze. U vzorků čajů byla pro porovnání extrakce provedena jednak horkou vodou (C1 – C3 voda) a jednak extrakčním činidlem (C1 – C3).

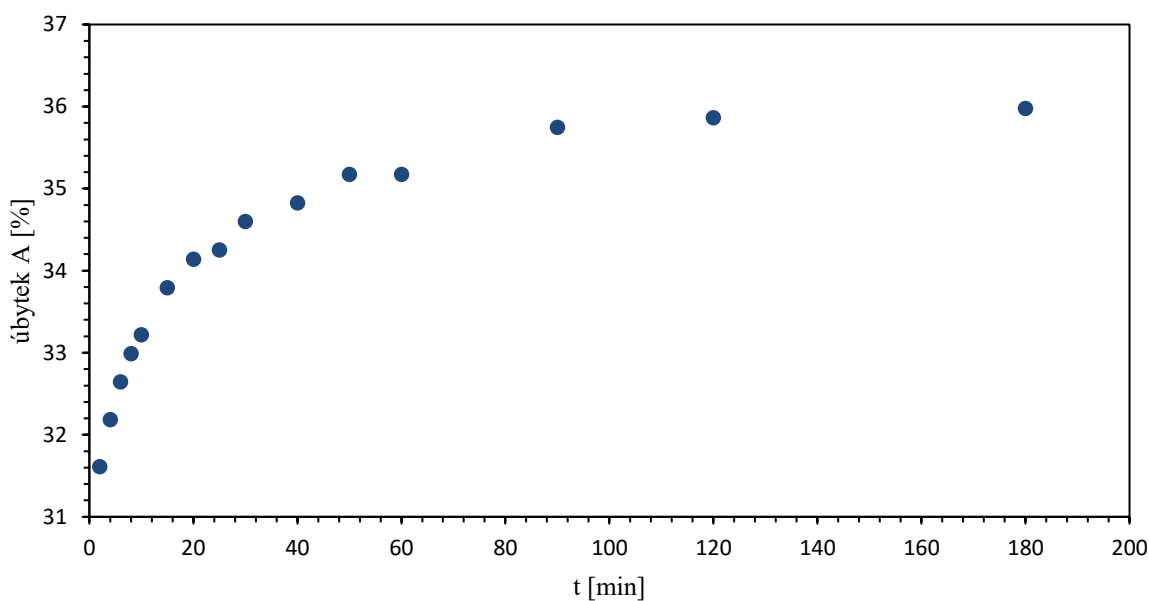


Obrázek 12: Antioxidační aktivita vitamínu C ve vzorcích rakytníku – metoda ABTS

Dle výsledků měl zde významně nejvyšší antioxidační kapacitu vzorek B2, který v případě extrakce do ethylacetátu měl antioxidační kapacitu 100x menší (obrázek 11). To znamená, že hlavním antioxidantem v tomto produktu je právě vitamin C, který dle označení produktu je k rakytníku přidáván. Poměrně vysoké hodnoty TEAC vykazoval i rakytníkový čaj (C3) extrahovaný pouze do vody či rakytníkový extrakt (E1), u kterého byla rovněž pozorována velmi nízká antioxidační kapacita při extrakci do organického rozpouštědla (obrázek 11). Při porovnání antioxidační kapacity čajů je zajímavé, že u sušených bobulí (C1) je vyšší antioxidační kapacita při extrakci činidlem, zatímco u rakytníkového čaje s citrónovou trávou (C2) je vyšší TEAC při extrakci vodou, a to více než dvojnásobně. Pravděpodobně opět z důvodu obsahu látek, které jsou více rozpustné v horké vodě. U vzorků S1 (šťávy) a M1 (mražených bobulí) jsou výsledky antioxidační kapacity prakticky stejné.

3.1.4 Optimalizace metody DPPH

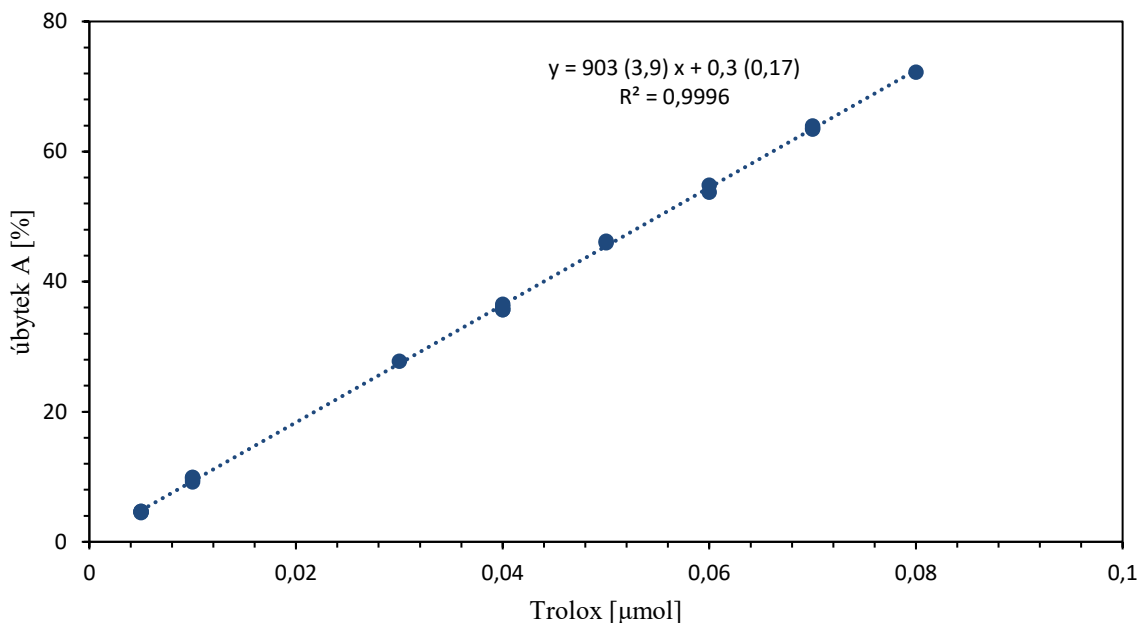
Podle již popsaného postupu byl nejdříve připraven stabilní roztok radikálu DPPH a stejně jako v případě metody ABTS byl měřen vhodný čas reakce postupným monitorováním úbytku absorbance po 2 minutách do 10 minut, po 5 minutách do 30 minut, po 10 minutách do 60 minut, po 30 minutách do 120 minut a po 60 minutách do 180 minut. Měření probíhalo opět až do chvíle, kdy byly úbytky absorbance ustáleny. Pro stanovení antioxidační kapacity extraktů metodou DPPH byl zvolen čas měření 1 hodina, stejně jako u metody ABTS.



Obrázek 13: Závislost úbytku absorbance na čase – metoda DPPH

Pro porovnání výsledků byla opět provedena kalibrace pomocí standardu Troloxu. Bylo připraveno devět kalibračních roztoků, které byly proměřeny celkem čtyřikrát. V programu QC Expert byla provedena regresní diagnostika a pomocí grafických metod byly odstraněny všechny vlivné body. Pomocí Studentova T-testu byla otestována významnost jednotlivých parametrů lineární regrese, kdy úsek byl shledán nevýznamným.

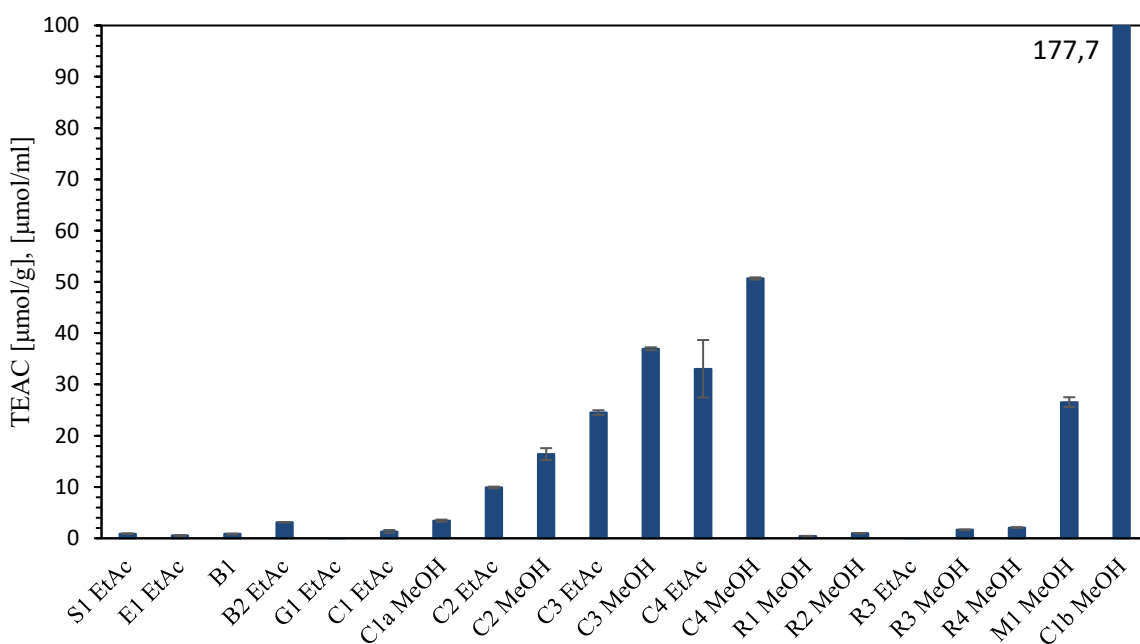
Výsledný úsek, směrnice a koeficient determinace přímky jsou uvedeny na obrázku 14.



Obrázek 14: Kalibrační křivka – závislost úbytku absorbance na množství standardu Troloxu v dávkovaném objemu – metoda DPPH

3.1.5 Měření antioxidační kapacity metodou DPPH

Všechny připravené extrakty byly proměřeny pomocí optimalizované DPPH metody celkem pětkrát. Jednotlivé úbytky byly přepočteny pomocí kalibrační závislosti (obrázek 14) na ekvivalentní množství Troloxu v 1 g nebo v 1 ml vzorku. Vypočtené hodnoty TEAC jsou uvedeny na obrázku 15 a v příloze v tabulce P2.

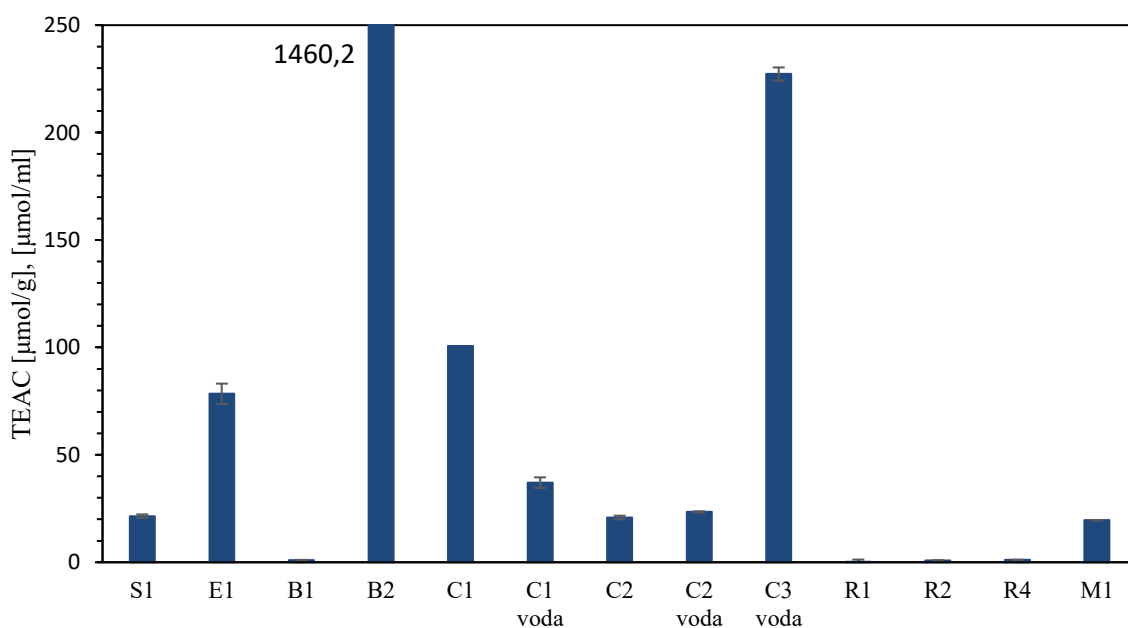


Obrázek 15: Antioxidační aktivita fenolických látek ve vzorcích rakytníku – metoda DPPH

U této metody měl nejvyšší antioxidační kapacitu extrakt připravený ze vzorku sušených bobulí (C1) po homogenizaci pomocí mixéru. Opět měly všechny vzorky čajů (C1 – C4) vyšší antioxidační kapacitu ve srovnání se zbytkem testovaných vzorků. I zde je patrné, že antioxidanty přítomné ve vzorcích se lépe extrahují do vodného roztoku methanolu oproti ethylacetátu, protože methanolové extrakty vykazují vyšší antioxidační kapacitu. Kromě čajů byl testován i vzorek R3 (rakytník v medu), kde byla opět vyšší hodnota TEAC pozorovaná u methanolového extraktu.

3.1.6 Měření antioxidační kapacity vitamínu C metodou DPPH

Extrakty připravené pro stanovení vitamínu C byly rovněž podrobeny testování antioxidační kapacity pomocí metody DPPH. Vzorky byly při dané vlnové délce proměřeny pětkrát. Z naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty TEAC, které jsou uvedeny na obrázku 16 a v příloze v tabulce P6. Protože radikál DPPH se rozpouští v methanolu a celé měření tedy probíhá v methanolickém roztoku, nebylo možné proměřit extrakt vzorku G1 (multivitaminové želatinky) z důvodu jeho vysrážení.



Obrázek 16: Antioxidační aktivita vitamínu C ve vzorcích rakytníku – metoda DPPH

Opět je zde pozorována vysoká hodnota TEAC u vzorku B2, který byl již diskutován u metody ABTS a jeho vysoká antioxidační kapacita je způsobená přidaným vitamínem C. Stejně je tomu i u vodného výluhu rakytníkového čaje (C3). Rakytníkový extrakt (E1) má hodnotu TEAC o trochu nižší ve srovnání u metody ABTS, což je pravděpodobně způsobeno

obsahem antioxidantů, které s DPPH nereagují. Stejná situace nastala zřejmě i u rakytníkového čaje s citrónovou trávou (C2), kde je u DPPH pozorována nižší hodnota TEAC u vodného výluhu oproti ABTS.

3.1.7 Optimalizace metody FRAP

Nejprve byl již popsáním postupem v experimentální části připraven reakční komplex Fe^{3+} -TPTZ. K reakční směsi bylo poté přidáno 50 μl vzorku a na rozdíl od předchozích metod (ABTS a DPPH) byl měřen nárůst absorbance při vlnové délce 593 nm po 15 minutách¹⁰⁵.

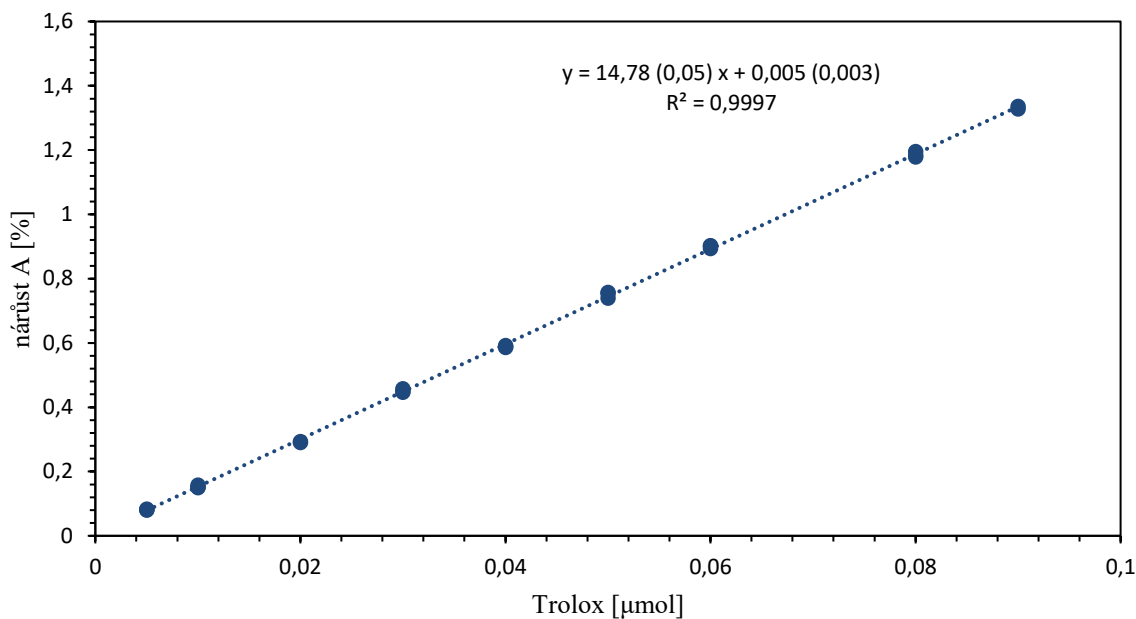
Pro stanovení antioxidační kapacity byla měřením stanovena vhodná doba reakce komplexu se vzorkem 15 minut.

Nárůst absorbance byl vypočítán dle rovnice:

$$\Delta A = A - A_0$$

kde A_0 je počáteční absorbance v čase $t = 0$ min, a A je změřená absorbance v čase $t = 15$ min od počátku reakce.

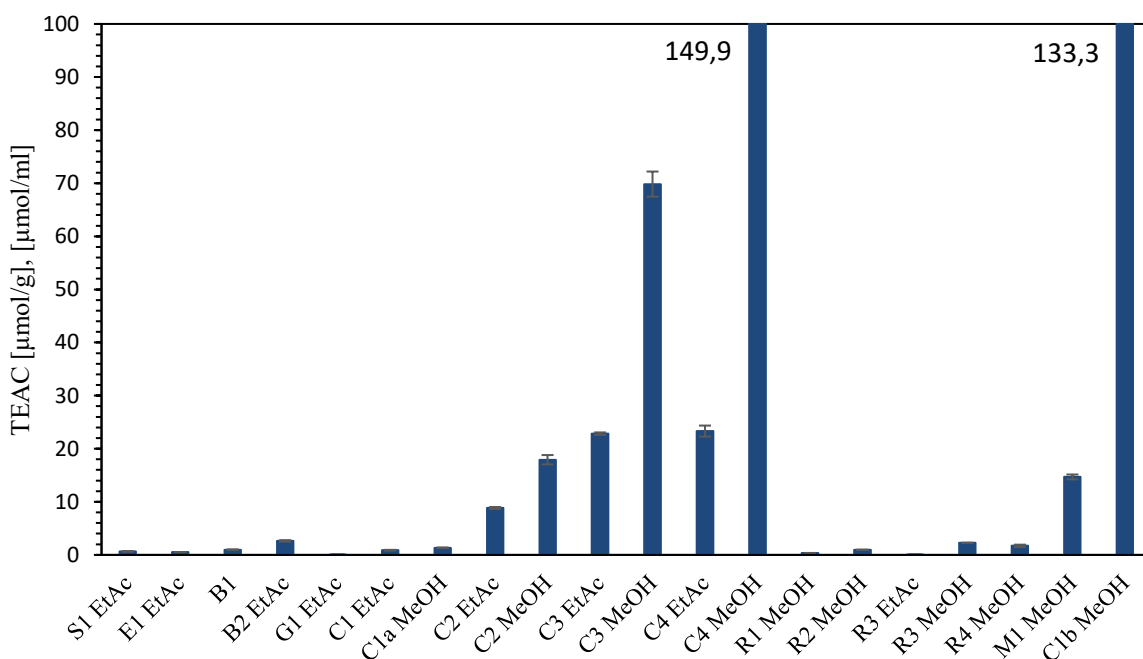
Pro porovnání vzorků byl nárůst absorbance přepočítán pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství standardu Troloxu. Kalibrace byla provedena na devíti koncentračních hladinách a každá koncentrace byla proměřena třikrát. V programu QC Expert byla opět provedena regresní diagnostika, indikace vlivných bodů a testování významnosti parametrů lineární regrese. Absolutní člen se ukázal jako nevýznamný a přímka tedy prochází počátkem. Regresní rovnice spolu se směrodatnými odchylkami směrnice a úseku a koeficientem determinace je zobrazena na obrázku 17.



Obrázek 17: Kalibrační křivka – závislost nárůstu absorbance na množství standardu Troloxu v dávkovaném objemu – metoda FRAP

3.1.8 Měření antioxidační kapacity metodou FRAP

Všechny připravené extrakty byly celkem pětkrát proměřeny pomocí optimalizované metody FRAP. Výsledné vypočtené hodnoty TEAC jsou uvedeny na obrázku 18 a v příloze v tabulce P3.

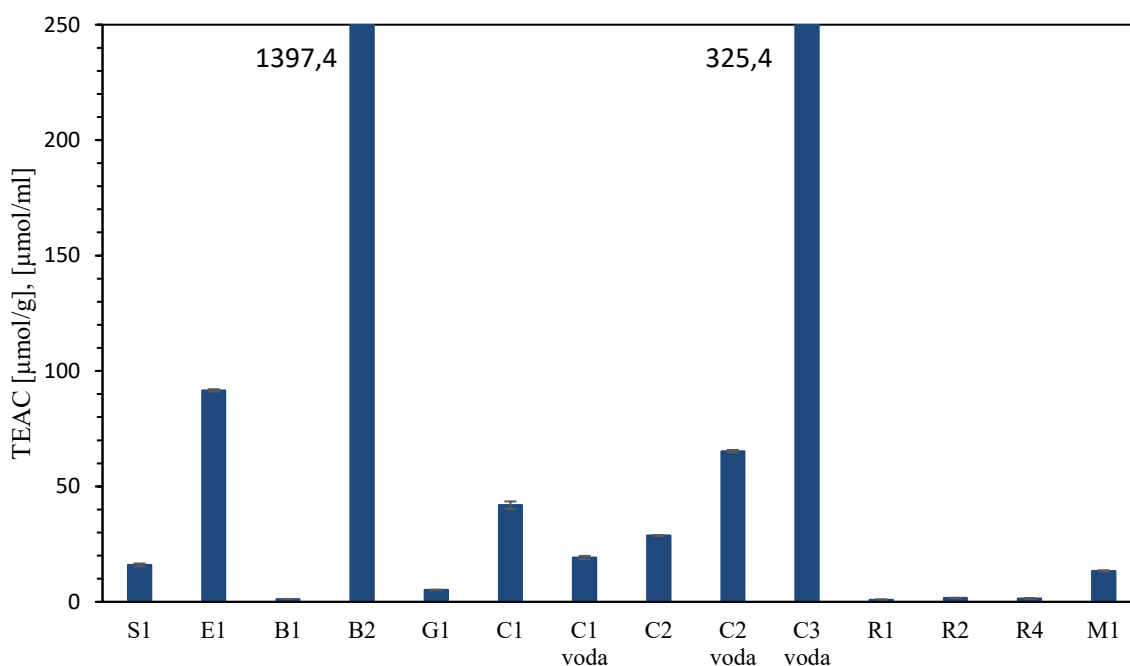


Obrázek 18: Antioxidační aktivita fenolických látek ve vzorcích rakytníku – metoda FRAP

Jak je z obrázků 11, 15 a 18 patrné, naměřené hodnoty pomocí FRAP metody korelují s hodnotami TEAC měřenými metodami ABTS a DPPH. Vysoké hodnoty TEAC byly opět pozorovány u vzorku rakytníkového čaje (C4 MeOH) a sušených bobulí (C1b MeOH). Oproti tomu jsou zde pozorované větší rozdíly mezi extrakty provedenými methanolem a ethylacetátem, především pak u vzorků C3 a C4, kde je rozdíl více než dvojnásobný. Protože se jedná o metodu s odlišným principem a reagují především látky s redukčními schopnostmi, může být tento rozdíl právě způsobem jiným obsahem látek schopných redukovat železitý ion.

3.1.9 Měření antioxidační kapacity vitamínu C metodou FRAP

Postup měření extraktů připravených pro měření obsahu vitamínu C byl stejný jako u extraktů připravených pomocí organických rozpouštědel. Vzorky byly opět proměřeny pětkrát a z naměřených hodnot byly vypočteny hodnoty TEAC, pomocí rovnice lineární regrese znázorněné na obrázku 17. Výsledky jsou prezentovány na obrázku 19 a uvedeny v příloze v tabulce P7.



Obrázek 19: Antioxidační aktivita vitamínu C ve vzorcích rakytníku– metoda FRAP

Nejvyšší antioxidační kapacitu měl jako v předchozích měřeních extrakt vzorku B2 (bylinný elixír), který obsahoval přidávaný vitamín C. U vodného výluhu vzorku čaje (C3) je hodnota TEAC v porovnání s hodnotami u ABTS a DPPH metod daleko vyšší. Vzorek C1 má

opět vyšší kapacitu u extrakce činidlem než u vodného výluhu. U vzorku C2 je rozdíl mezi extrakty přibližně dvojnásobný, stejně jako u ABTS metody. Vyšší antioxidační kapacity dosahuje i rakytníkový extrakt (E1).

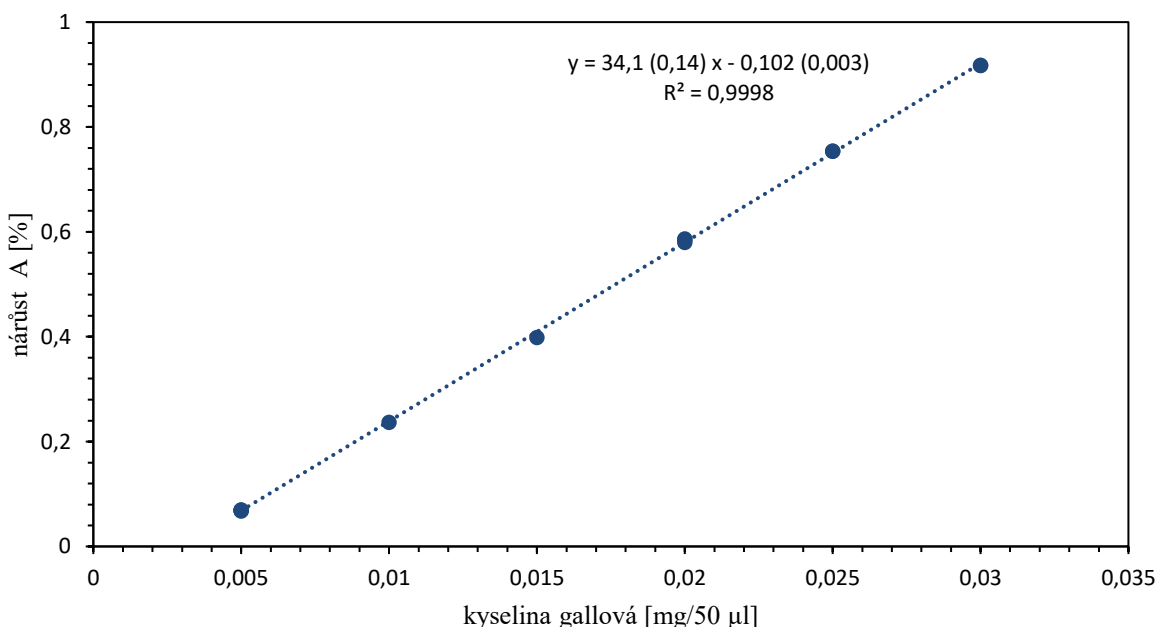
3.2 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Podle postupu bylo pro reakci připraveno Folin-Ciocalteuovo činidlo a po nadávkování 50 μl vzorku a přidání uhličitanu sodného byl monitorován nárůst absorbance při vlnové délce 750 nm. Nárůst absorbance byl vypočítán dle rovnice:

$$\Delta A = A - A_0$$

kde A_0 je počáteční absorbance v čase $t = 0$ min, a A je změřená absorbance v čase $t = 35$ min od počátku reakce.

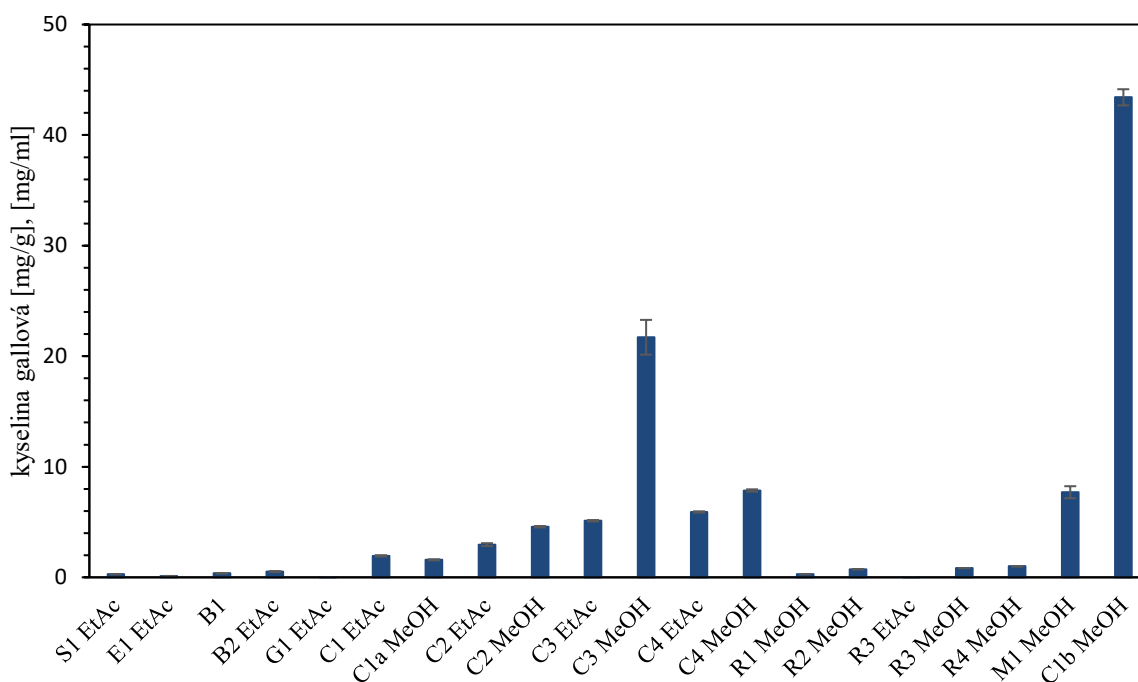
Pro kalibraci metody bylo použito sedm kalibračních roztoků kyseliny gallové v rozmezí koncentrací 0,005 – 0,03 mg v dávkovaném objemu. Jednotlivé kalibrační body byly proměřeny čtyřikrát. V programu QC Expert byla opět provedena regresní diagnostika stejným způsobem jako u všech předchozích metod. Pomocí kalibrační křivky (obrázek 20) byl nárůst absorbance u všech připravených extraktů přepočítán na ekvivalentní množství kyseliny gallové (GAE) v jednom gramu nebo v jednom mililitru vzorku.



Obrázek 20: Kalibrační křivka – závislost nárůstu absorbance na množství kyseliny gallové

3.2.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek ve vzorcích rakytníku

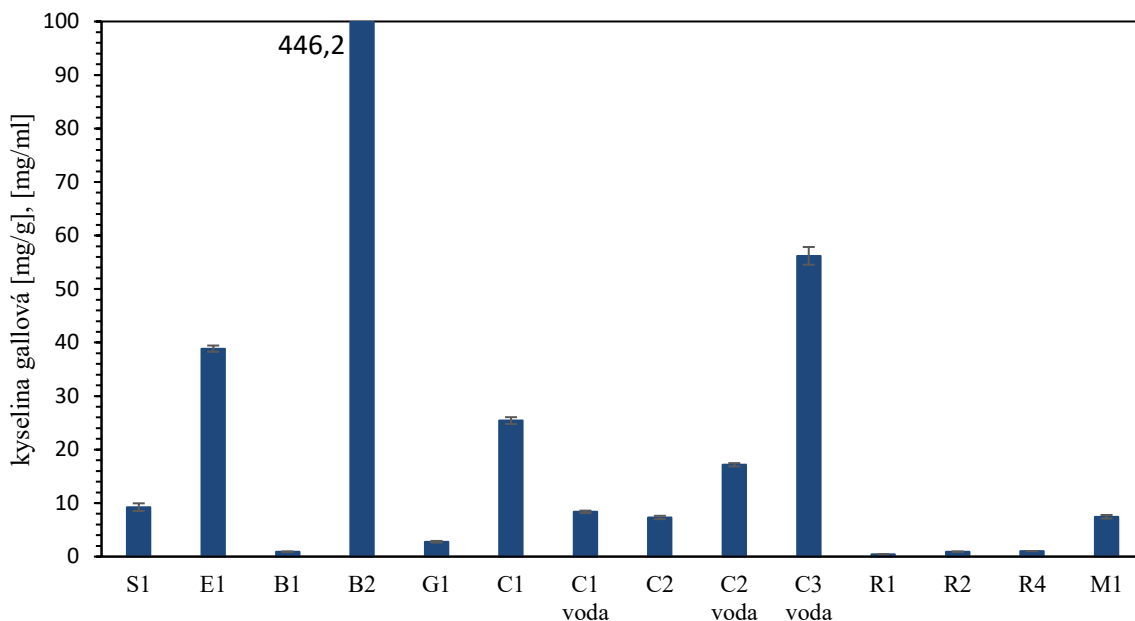
Extraktů připravených pomocí různých organických rozpouštědel byly proměřeny optimalizovanou metodou. Každý vzorek byl proměřen pětkrát. Výsledné hodnoty GAE jsou uvedeny na obrázku 21 a v příloze v tabulce P4.



Obrázek 21: Celkový obsah fenolických látek v rakytníkových extraktech připravených pro stanovení fenolických látek

Celkový obsah fenolických látek kopíruje výsledky získané pomocí metod pro stanovení antioxidační kapacity. Nejvyšších hodnot bylo pozorováno u sušených bobulí (C1), které se extrahovaly methanolem po homogenizaci (C1b MeOH) a poté rakytníkový čaj též extrahovaný methanolem (C3 MeOH). U čajů C1, C2 a C4 lze dle grafu usoudit, že extrakce methanolem nebo ethylacetátem neměla až tak významný vliv na množství fenolických látek.

Kromě extraktů připravených organickými rozpouštědly, byly proměřeny i vodné výluhy čajů a extrakty pro stanovení obsahu vitamínu C (s využitím 3% kyseliny metafosforečné). Výsledné hodnoty GAE jsou uvedeny na obrázku 22 a v tabulce P8 v příloze.



Obrázek 22: Celkový obsah fenolických látek v rakytníkových extraktech pro stanovení vitamínu C

V těchto extraktech byl stanoven vyšší celkový obsah fenolických látek oproti extraktům s organickým rozpouštědlem, což opět koreluje s antioxidační kapacitou. Vitamin C, který je v nejvyšším množství přítomen ve vzorku B2 opět ovlivňuje výsledky této metody, protože rovněž reaguje s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Vysoké hodnoty GAE pak vykazoval i vodný výluh čaje C3, či rakytníkový extrakt E1.

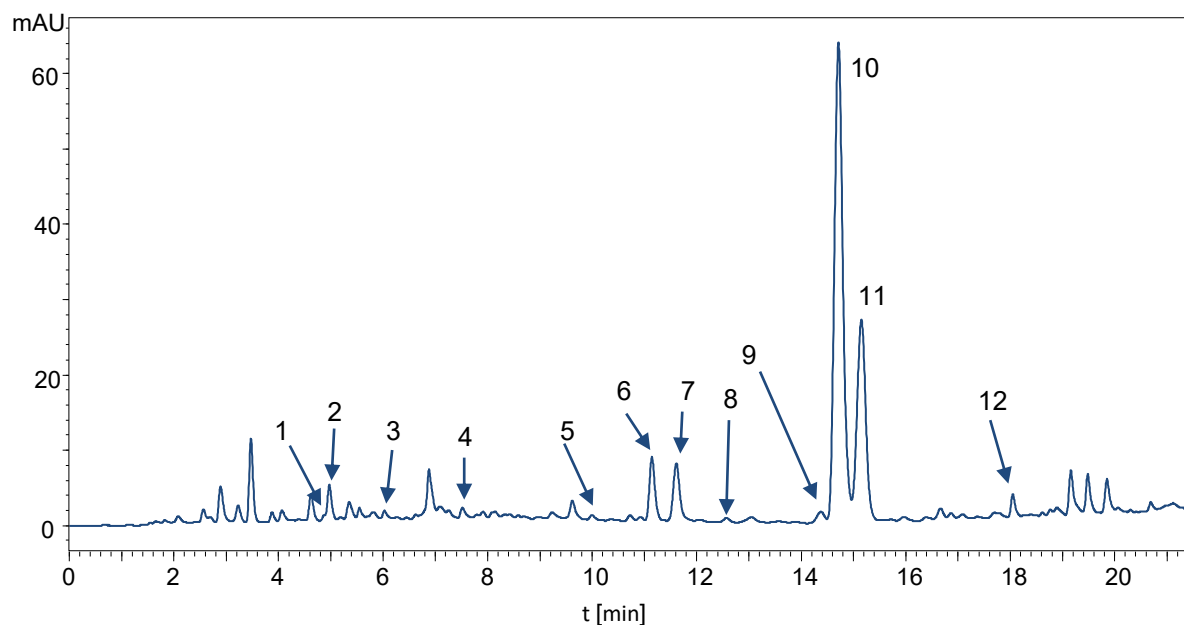
3.3 HPLC stanovení fenolických látek ve vzorcích rakytníku

3.3.1 Optimalizace separace fenolických látek

Separace fenolických látek byla optimalizována na extraktu připraveném z rakytníkové šťávy (S1). K extrakci kapalných vzorků se zpravidla využívá ethylacetát⁸³, proto byl využit i v této práci. Kromě ethylacetátu byl testován také diethylether či jejich směs 1:1. Na základě chromatografických záznamů (obrázek P1 – P3) byl pro extrakci vybrán samotný ethylacetát, který poskytoval nejvyšší výtěžnost sledovaných fenolických látek. Dále byly testovány vzorky mražených či sušených bobulí, které po extrakci 70% methanolem však neobsahovaly velké množství flavonoidních fenolických látek jako tomu bylo u šťávy z rakytníku (obrázek P6). Extrakci fenolických látek nepodpořilo ani okyselení extrakčního rozpouštědla kyselinou mravenčí (0,3 %) jak je vidět na obrázcích P4 – P5 uvedených v příloze.

V rámci optimalizace byly testovány dvě kolony, a to Kinetex Polar C18 plněná modifikovanou oktadecylsilikagelovou stacionární fází a Ascentis Express C18 s klasickou oktadecylsilikagelovou stacionární fází. Optimalizovanými parametry byly dále složení mobilní fáze (methanol a voda s přidavkem 0,1 % či 0,3 % kyseliny mravenčí), počáteční koncentrace organické složky mobilní fáze (v našem případě 10 % methanol) a gradientový program. Teplota kolony, průtok mobilní fáze a objem nástřiku vzorku, zůstaly v rámci optimalizace neměnné. Vlnové délky pro monitorování fenolických látek byly 280 nm a 320 nm.

Na koloně Kinetex Polar C18 se, i přes vyzkoušení velkého množství gradientů (příklady uvedeny na obrázcích P6 – P8), nepodařilo optimalizovat separaci sledovaných fenolických látek s požadovaným rozlišením hlavních flavonoidů. Na koloně Ascentis Express C18 již bylo pozorováno lepší rozlišení sledovaných fenolických látek a vhodnou volbou gradientového programu se podařilo separovat hlavní flavonoidy obsažené v rakytníkové šťávě. Optimalizovaná separace je zobrazena na obrázku 23, některé chromatogramy s testovanými gradientovými programy jsou poté vyobrazeny v příloze (obrázek P9 – P11).



Obrázek 23: Optimalizovaná separace fenolických látek – vzorek BIO rakytníkové šťávy (S1), kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm

3.3.2 Identifikace fenolických látek obsažených ve vzorcích rakytníku

Identifikace fenolických látek byla provedena částečně porovnáním retenčních časů se standardy, které byly k dispozici, avšak přesná identifikace byla pak provedena s využitím spojení s hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem při snímání kladných či záporných iontů. Díky zjištění protonovaných či deprotonovaných molekul u jednotlivých eluovaných píků byly určeny molární hmotnosti sledovaných fenolických látek a na základě porovnání s literaturou^{24, 106, 107} bylo identifikováno 12 fenolických látek obsažených v extraktu z rakytníkové šťávy (tabulka 10).

Tabulka 10: Nalezené látky ve vzorku BIO rakytníkové šťávy (S1) v optimalizovaném chromatogramu (obrázek 23 a obrázek v příloze P12)

Označení	Látka
1	Kyselina kávová
2	Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová
3	Katechin
4	Epikatechin
5	Rutin
6	Isorhamnetin-3-rutinosid
7	Kvercetin-3-glukosid
8	Kvercetin
9	Kaempferol-3-glukosid
10	Isorhamnetin-3-glukosid
11	Isorhamnetin-3-rhamnosylglukosid
12	Isorhamnetin-3-acylo-glukosid-glukosid-7-rhamnosid

Pomocí optimalizované metody pak byly proměřeny všechny připravené extrakty a výsledné chromatogramy jsou i s vyznačenými identifikovanými látkami uvedeny v příloze (obrázek P12 – P30). Při porovnání je již na první pohled vidět, že složení každého vzorku je velmi odlišné. Vzorek šťávy (S1, obrázek P12), na kterém proběhla optimalizace gradientu, obsahoval fenolické látky v poměrně velkém množství. To však nelze říci o dalších vzorcích, jako byl extrakt z rakytníku (E1, obrázek P13), kde je obsah hlavních flavonoidních látek

velmi nízký. Při porovnání bylinných kapek (B1 a B2, obrázek P14 a P15) je ihned vidět, že bylinné kapky B1 obsahují rozhodně více fenolických látek (prakticky všechny, které byly hledány) a také v mnohem vyšším množství, než tomu je u vzorku B2. Ten je však obohacen o vitamín C, takže má vyšší antioxidační kapacitu. U multivitaminové želatinového bonbonu (G1, obrázek P16) je možné pozorovat také většinu hledaných látek, avšak jejich obsah je velmi nízký, protože obsah rakytníku je zde pouhé 3 %. V případě všech čtyř druhů čajů bylo možné nalézt vždy většinu hledaných látek. U sušených bobulí (C1) není znatelný rozdíl mezi extrakty provedenými ethylacetátem nebo methanolem (obrázek P17 – P18). U čaje C2 byly u obou extraktů (obrázek P19 – P20) nalezeny všechny hledané látky, ale při jejich srovnání bylo větší množství látek vyextrahováno methanolem. To stejné platí i pro čaj C3 (obrázek P21 – P22), kdy větší množství látek poskytl methanolvý extrakt. Pro porovnání byl ještě přidán chromatografický záznam separace látek obsažených ve vodném výluhu čaje C3, avšak zde je pozorováno velmi malé množství fenolických látek (obrázek P23). Na rozdíl od ostatních čajů bylo u vzorku C4 větší množství látek vyextrahováno při extrakci ethylacetátem (obrázek P24 – P25). I zde bylo možné nalézt všechny hledané látky. Vzorky rakytníkových pomazánek (R1 a R2) obsahovaly pouze velmi malé množství látek (obrázek P26 – P27), a proto nebyla možná přesná identifikace. Ze vzorků rakytníku v medu (R2 a R3) dopadl lépe vzorek R3 (obrázek P28), který obsahoval větší množství sledovaných látek. Kvalitním produktem byl i rakytník do jogurtu (R4, obrázek P29), kde bylo opět nalezeno téměř všech 12 sledovaných látek, dokonce i ve srovnatelném množství s mraženými bobulemi (M1, obrázek P30).

Celá tato identifikace proběhla pouze na základě shody retenčních časů, mohlo tedy dojít i k určitým nepřesnostem. Tato studie bude dále rozšířena o HPLC/MS analýzu a přesnou kvantifikaci významných fenolických látek, což v rámci této diplomové práce z časových důvodů již nebylo provedeno.

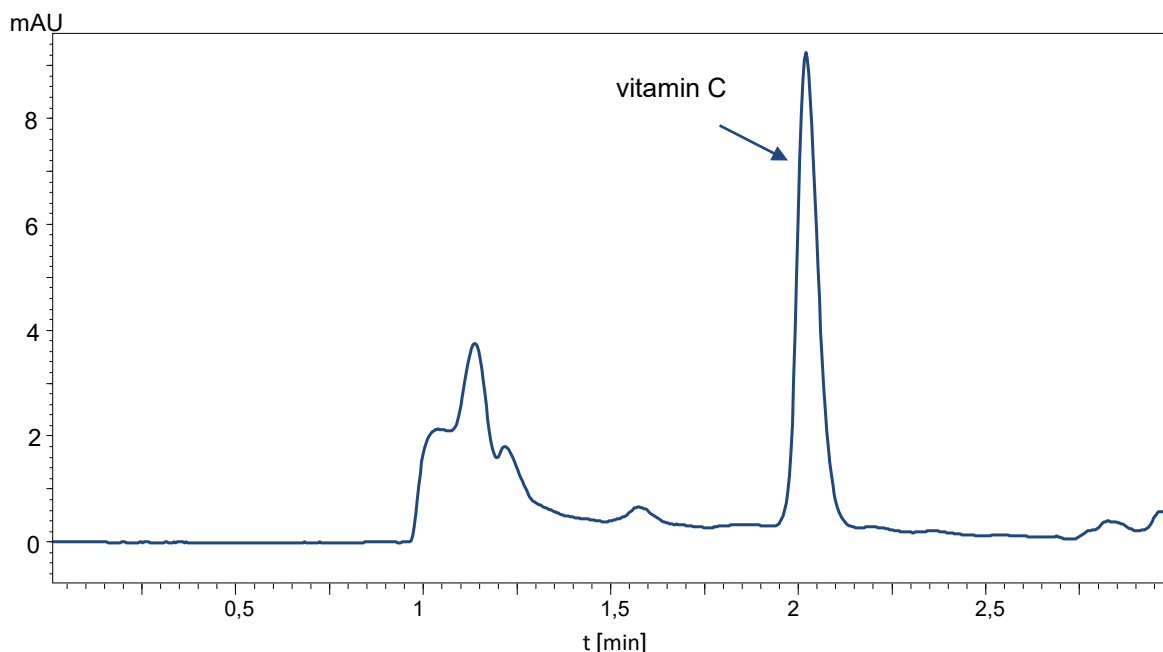
3.4 Stanovení kyseliny askorbové (vitaminu C) ve vzorcích rakytníku

3.4.1 Optimalizace separace

Optimalizace separace byla provedena u extraktu připraveného z mražených bobulí (M1). Pro separaci byla nejprve zvolena klasická oktadecylsilikagelová (C18) stacionární fáze (Ascentis Express C18) a mobilní fáze tvořená methanolem a vodou okyselenou kyselinou fosforečnou na pH 2,8. U klasické C18 stacionární fáze nelze využít k separaci mobilní fázi, která by obsahovala méně organického rozpouštědla než 5 %, protože by jinak došlo ke zhroucení oktadecylových řetězců. Pokud byla zvolena na začátku gradientu mobilní fáze obsahující 5 % methanolu ve vodě, nedocházelo k dostatečnému oddělení vitaminu C od matričních látek. Proto byla vybrána modifikovaná C18 stacionární fáze pro separaci polárních látek (Kinetex Polar C18), kde lze pro separaci používat i čistou vodu. S touto stacionární fází při eluci čistou (okyselenou) vodou již bylo možné oddělit vitamin C od ostatních polárních látek obsažených v extraktu. Optimalizovaný gradientový program je uvedený v experimentální části a výsledná separace u extraktu ze vzorku M1 je zobrazena na obrázku 24.

Tento extrakt byl připraven ještě společně se vzorkem extrahovaných sušených bobulí (C1), avšak ten neposkytoval vhodné množství vitaminu C pro vytvoření kalibrační řady (obrázek P31). U obou vzorků byla vyzkoušena extrakce se 40 ml připraveného extrakčního činidla.

Zvolená optimální vlnová délka pro měření vitaminu C ve všech vzorcích byla 244 nm. Nakonec byl zvýšen i průtok z předchozích nastavených 0,4 ml/min na 0,5 ml/min. Teplota kolony a objem nástřiku vzorku zůstaly stejné, tedy 30°C a 2 µl dávkovací objem.

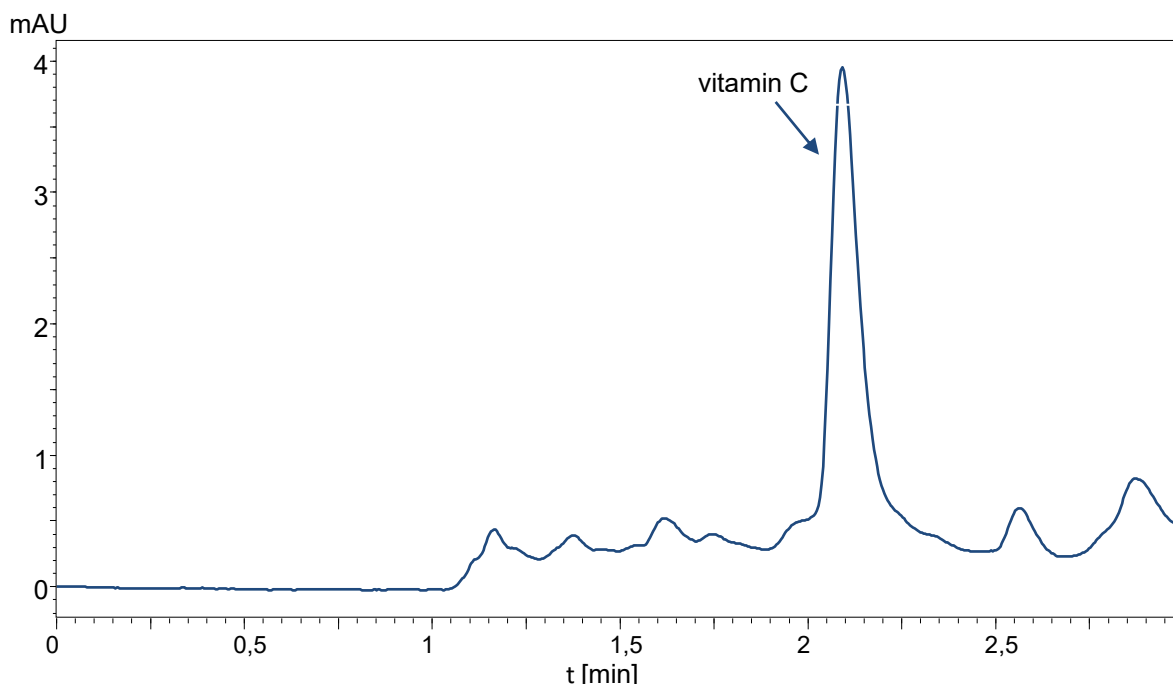


Obrázek 24: Optimalizovaná chromatografická separace vitamínu C – vzorek mražených bobulí (M1), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 µm), mobilní fáze MeOH/voda+H₃PO₄ (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 µl, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm

3.5 Kvantifikace kyseliny askorbové ve vzorcích rakytníku

Optimalizovaná separace byla dále využita pro stanovení množství vitamínu C v jednotlivých extraktech připravených pomocí 3% kyseliny metafosforečné. Na obrázku 25 je uvedena ukázka chromatografické separace při stanovení vitamínu C ve vzorku rakytníkového čaje Apotheke (C3). Všechny zbylé chromatografické záznamy extraktů jsou zobrazeny v příloze (obrázek P32 – P42).

Při porovnání záznamů je možné vidět, že všechny vzorky rakytníku obsahují vitamin C, avšak jeho množství se značně liší. Obsah vitamínu C závisí na mnoha faktorech, především na tom, zda se jedná o 100 % rakytníkový produkt, nebo produkt s obsahem rakytníku. U již zmiňovaného vzorku bylinných kapek (B2) je vitamínu C k produktu přidáván, a proto je jeho obsah velmi vysoký.



Obrázek 25: Separace vitamínu C – vzorek rakytníkový čaj (C3), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+H₃PO₄ (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm

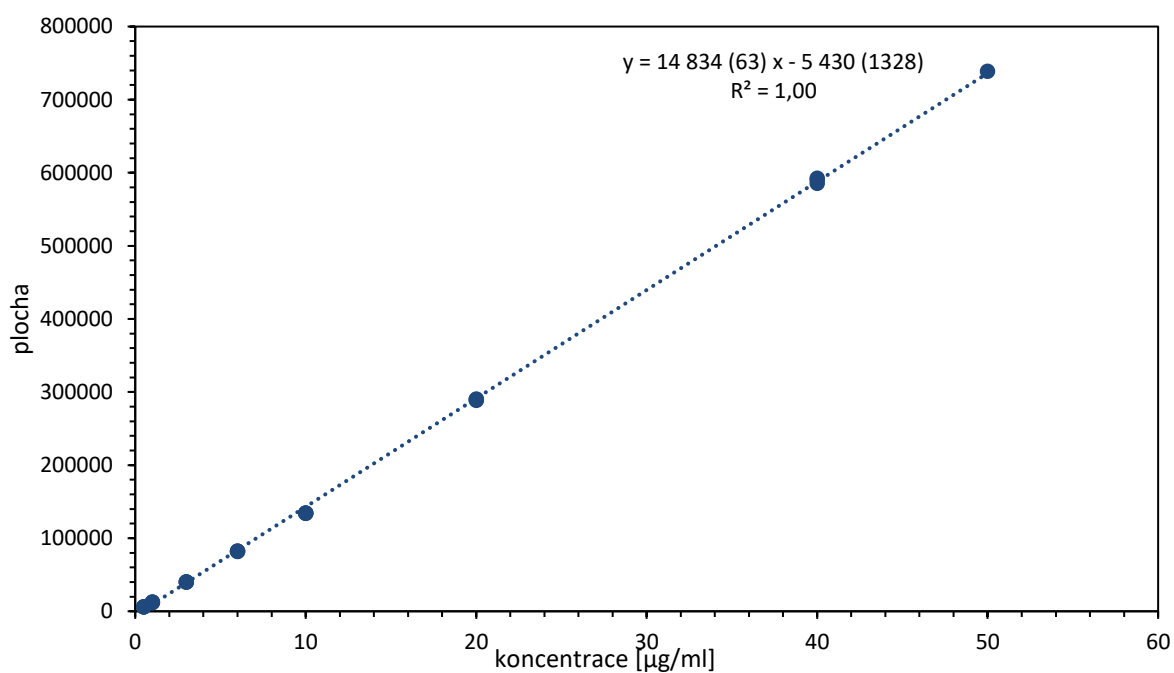
Kvantifikace vitamínu C v jednotlivých extraktech byla provedena metodou kalibrační křivky (obrázek 26). Kalibrace byla provedena na osmi koncentračních hladinách a každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát. V programu QC Expert 2.9 (TriloByte, ČR) byla poté provedena regresní diagnostika a za pomoci grafických testů byly odstraněny všechny vlivné body. Dále byla testována významnost jednotlivých regresních parametrů pomocí Studentova T-testu, přičemž absolutní člen byl vyhodnocen jako významný ($p < 0,05$).

Limit detekce a stanovení byl testován jako trojnásobek či desetinásobek odstupů signálu od šumu a jejich hodnota byla 0,02 mg/l a 0,07 mg/l.

Správnost metody byla také jednou z provedených validačních parametrů. Ta poukazuje na blízkost shody mezi výsledky nezávislých testů a referenčními hodnotami a poté je hodnocena jako návratnost. Pro toto ověření bylo provedeno měření třech různých koncentrací (2, 8 a 45 mg/l), kdy každá byla proměřena třikrát. Kritérium přijatelnosti je zde v rozmezí 80 – 110 %, což je v souladu s validačními parametry¹⁰⁸. Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Návratnost metody testovaná na třech koncentračních hladinách

Koncentrace kyseliny askorbové [µg/ml]	Návratnost [%]
2	106,70
8	102,39
45	99,96



Obrázek 26: Kalibrační křivka – závislost plochy píku na koncentraci vitamínu C

Na základě rovnice lineární regrese uvedené na obrázku 26 byla vypočítána koncentrace vitamínu C v jednotlivých vzorcích, která je uvedena v tabulce 12.

Tabulka 2: Množství kyseliny askorbové v jednotlivých vzorcích rakytníku

Vzorek – označení	Kyselina askorbová [$\mu\text{g/ml}$], [$\mu\text{g/g}$]
R1	$0,874 \pm 0,003$
R2	$3,84 \pm 0,03$
R4	$7,55 \pm 0,05$
E1	$116 \pm 2,9$
S1	$192 \pm 0,6$
M1	$157 \pm 0,2$
C1 voda	$125 \pm 1,2$
C2 voda	$111 \pm 0,03$
C2	$80,9 \pm 0,9$
C3 voda	$331 \pm 8,7$
B1	$0,647 \pm 0,003$
B2	1655 ± 17
G1	$51,03 \pm 4,72$

Podle vypočtených hodnot obsaženého vitamínu C ve všech vzorcích lze usoudit, že absolutně nejvíce vitamínu C bylo ve vzorku bylinných kapek (B2). U tohoto vzorku se to předpokládalo vzhledem k tomu, že v tomto bylinném elixíru byl extra přidán samotný vitamin C. Vysoký obsah, který se více lišil od ostatních, poskytl také vzorek čaje C3 extrahovaný horkou vodou. Čaje C1 a C2 jsou pak obsahem vitamínu C prakticky srovnatelné, a k nim lze dále přirovnat i vzorek E1 – extrakt z rakytníku. Při srovnání vzorku C2 extrahovaného vodou a extrakčním činidlem je možné si všimnout, že větší účinnosti extrakce (dvojnásobné) bylo dosaženo horkou vodou. Extrakty vzorků S1 a M1 se od sebe svým množstvím vitamínu také liší minimálně. To by odpovídalo vzhledem k tomu, že bio šťáva (vzorek S1) je vlastně vyroben z bobulí (vzorek M1). Naprosto nejnižší množství bylo naměřeno ve vzorcích R1 a R2, které byly již staršího data a nebyly otevřené těsně před měřením.

4 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla nejprve optimalizována HPLC separace fenolických látek v rakytníku řešetlákovém. Optimální separace bylo dosaženo na koloně Ascentis Express C18 plněné povrchově porézními částicemi pomocí mobilní fáze skládající se z methanolu a vody okyselené kyselinou mravenčí na pH 2,3. Pomocí optimalizované metody byly proměřeny extrakty připravené z různých vzorků obsahujících rakytník. Fenolické látky byly identifikovány pomocí dostupných standardů a pomocí spojení s hmotnostním spektrometrem.

Dále byla optimalizována HPLC separace vitamínu C. V tomto případě byla pro separaci vybrána kolona Kinetex Polar C18, u které je možné pro separaci využívat 100 % vodné fáze. Pomocí optimalizované separace byly proměřeny všechny připravené extrakty a poté byl vitamín C kvantifikován metodou kalibrační křivky.

Velká část práce byla zaměřena také na přípravu extraktů z jednotlivých vzorků obsahujících rakytník. Experimenty bylo zjištěno, že pro extrakci fenolických látek je nevhodnější ethylacetát nebo 70% methanol. Pro extrakci vitamínu C je však nutné použít vodu, ve které je nejvíce rozpustný nebo 3% roztok kyseliny metafosforečné, která vitamín C stabilizuje.

Kromě chromatografické analýzy byly pro charakterizaci připravených extraktů použity spektrofotometrické metody pro měření antioxidační kapacity (ABTS, DPPH a FRAP) či celkového obsahu fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Antioxidační kapacita jednotlivých extraktů byla značně rozdílná v závislosti na čerstvosti, předchozí úpravě, na celkovém obsahu rakytníku ve vzorcích nebo na způsobu extrakce. Stejně tomu bylo i u celkového obsahu fenolických látek.

5 SEZNAM LITERATURY

- 1 Gâtlan A.M., Gutt G. „Sea Buckthorn in Plant Based Diets. An Analytical Approach of Sea Buckthorn Fruits Composition: Nutritional Value, Applications, and Health Benefits". *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, č. 17 (2021): 8986. <https://doi.org/10.3390/ijerph18178986>.
- 2 Jaśniewska A., Diowksz A. „Wide Spectrum of Active Compounds in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) for Disease Prevention and Food Production". *Antioxidants* 10, č. 8 (2021): 1279. <https://doi.org/10.3390/antiox10081279>.
- 3 Suryakumar G., Gupta A. „Medicinal and Therapeutic Potential of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.)". *Journal of Ethnopharmacology* 138, č. 2 (2011): 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.024>.
- 4 Jirásek R. „Rakytník-nedocenený zdroj biologicky aktivních látek" 2011 (b.r.).
- 5 Christaki E. „*Hippophae Rhamnoides* L. (Sea Buckthorn): a Potential Source of Nutraceuticals". *Food and Public Health* 2 (2012): 69–72. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20120203.02>.
- 6 Bal L. M., Meda V., Naik S. N., Satya S. „Sea Buckthorn Berries: A Potential Source of Valuable Nutrients for Nutraceuticals and Cosmoceuticals". *Food Research International, Exotic Fruits: their Composition, Nutraceutical and Agroindustrial Potential*, 44, č. 7 (2011): 1718–1727. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.002>.
- 7 Olas B. „Sea Buckthorn as a Source of Important Bioactive Compounds in Cardiovascular Diseases". *Food and Chemical Toxicology* 97 (2016): 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.008>.
- 8 Li T. S. C. „Product Development of Sea Buckthorn". Viděno 14. prosinec 2022. <https://hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/v5-393.html>.
- 9 Batool F., Kamal A., Sattar M., Shah A., Ahmed S., Saify Z., et al. „Evaluation of antidepressant-like effects of aqueous extract of sea buckthorn (*hippophae rhamnoides* L. ssp. *turkestanica*) fruits in experimental models of depression". *PAKISTAN JOURNAL OF BOTANY* 43 (2011): 1595–1599.
- 10 Zicha O. „BioLib: Biological library". Viděno 14. prosinec 2022. <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id40443/>.

-
- 11 Piao X., Mohanan P., Anandhapadmanaban G., Ahn J. C., Park J. K., Yang D. C., Kwak G. Y., Wang Y. „Authentication of *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* and ssp. *mongolica* Based on Single Nucleotide Polymorphism at Ribosomal DNA and Their Vitamin Content Analysis". *Plants* 11, č. 14 (2022): 1843. <https://doi.org/10.3390/plants11141843>.
 - 12 Cetkovská J. „Zdravotně významné látky v rakytníku řešetlákovém a jejich využití". Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, (2007), 40 s.
 - 13 Ahani H., Attaran S. „Therapeutic potential of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) in medical sciences". *Cellular, Molecular and Biomedical Reports 2.1*, (2022): 22–32.
 - 14 Kumar A., Kumar P., Sharma A., Sharma D. P., Thakur M. „Scientific Insights to Existing Know-How, Breeding, Genetics, and Biotechnological Interventions Pave the Way for the Adoption of High-Value Underutilized Super Fruit Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.)". *South African Journal of Botany*, Special issue on underutilised fruits and vegetables in the face of climate change, 145 (2022): 348–359. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.11.045>.
 - 15 Teleszko M., Wojdyło A., Rudzińska M., Oszmiański J., Golis T. „Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Bioactive Compounds Content in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, č. 16 (2015): 4120–4129. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00564>.
 - 16 Herbalista. „Rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides*)". *Herbalista.cz* (blog), (2019). <https://www.herbalista.cz/bylinky/rakytnik-resetlakovy-hippophae-rhamnoides/>.
 - 17 Shah R., Idate A., Ugale V., Sharma P. „Comprehensive review on sea buckthorn: Biological activity and its potential uses" 10 (2021): 942–953. <https://doi.org/10.22271/tpi.2021.v10.i5l.6325>.
 - 18 Ciesarová Z., Murkovic M., Cejpek K., Kreps F., Tobolková B., Koplík R., Belajová E., et al. „Why Is Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) so Exceptional? A Review". *Food Research International* 133 (2020): 109-170. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109170>.
 - 19 Kubczak M., Khassenova A. B., Skalski B., Michlewska S., Wielanek M., Skłodowska M., Aralbayeva A. N., et al. „*Hippophae rhamnoides* L. leaf and twig extracts as rich sources of nutrients and bioactive compounds with antioxidant activity". *Scientific Reports* 12 (2022): 1095. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05104-2>.
 - 20 Criste A., Urcan A. C., Bunea A., Furtuna F. R. P., Olah N. K., Madden R. H., Corcionivoschi N. „Phytochemical Composition and Biological Activity of Berries and Leaves from Four

-
- Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Varieties". *Molecules* 25, č. 5 (2020): 1170. <https://doi.org/10.3390/molecules25051170>.
- 21 Skalski B., Kontek B., Lis B., Olas B., Grabarczyk Ł., Stochmal A., Żuchowski J. „Biological properties of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson twig and leaf extracts". *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19 (2019): 148. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2564-y>.
- 22 Gutzeit D., Baleanu G., Winterhalter P., Jerz G. „Vitamin C Content in Sea Buckthorn Berries (*Hippophaë Rhamnoides* L. Ssp. *Rhamnoides*) and Related Products: A Kinetic Study on Storage Stability and the Determination of Processing Effects". *Journal of Food Science* 73, č. 9 (2008): C615–620. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00957.x>.
- 23 Cosmulescu S., Trandafir I., Nour V. „Phenolic acids and flavonoids profiles of extracts from edible wild fruits and their antioxidant properties". *International Journal of Food Properties* 20, č. 12 (2017): 3124–3134. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1274906>.
- 24 Pop R. M., Socaciu C., Pinteana A., Buzoianu A. D., Sanders M. G., Gruppen H., Vincken J. P. „UHPLC/PDA–ESI/MS Analysis of the Main Berry and Leaf Flavonol Glycosides from Different Carpathian *Hippophaë Rhamnoides* L. Varieties". *Phytochemical Analysis* 24, č. 5 (2013): 484–492. <https://doi.org/10.1002/pca.2460>.
- 25 Iglesia R. de la, Milagro F. I., Campión J., Boqué N., Martínez J. A. „Healthy Properties of Proanthocyanidins". *BioFactors* 36, č. 3 (2010): 159–168. <https://doi.org/10.1002/biof.79>.
- 26 Pérez-Jiménez J., Arranz S., Saura-Calixto F. „Proanthocyanidin Content in Foods Is Largely Underestimated in the Literature Data: An Approach to Quantification of the Missing Proanthocyanidins". *Food Research International* 42, č. 10 (2009): 1381–1388. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.002>.
- 27 Sadowska B., Budzyńska A., Stochmal A., Żuchowski J., Różalska B. „Novel Properties of *Hippophae Rhamnoides* L. Twig and Leaf Extracts - Anti-Virulence Action and Synergy with Antifungals Studied in Vitro on *Candida* Spp. Model". *Microbial Pathogenesis* 107 (2017): 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.020>.
- 28 Zadernowski R., Naczka M., Czaplicki S., Rubinskiene M., Szalkiewicz M. „Composition of Phenolic Acids in Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Berries". *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82, č. 3 (2005): 175–179. <https://doi.org/10.1007/s11746-005-5169-1>.

-
- 29 Michel T., Destandau E., Le Floch G., Lucchesi M. E., Elfakir C. „Antimicrobial, Antioxidant and Phytochemical Investigations of Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) Leaf, Stem, Root and Seed". *Food Chemistry* 131, č. 3 (2012): 754–760. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.029>.
- 30 Andersson S. C., Olsson M. E., Johansson E., Rumpunen K. „Carotenoids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries during Ripening and Use of Pheophytin a as a Maturity Marker". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, č. 1 (2009): 250–258. <https://doi.org/10.1021/jf802599f>.
- 31 Kudritskaya S. E., Zagorodskaya L. M., Shishkina E. E. „Carotenoids of the Sea Buckthorn, Variety Obil'naya". *Chemistry of Natural Compounds* 25, č. 6 (1989): 724–725. <https://doi.org/10.1007/BF00598280>.
- 32 Pintea A., Varga A., Stepnowski P., Socaciu C., Culea M., Diehl H. A. „Chromatographic Analysis of Carotenol Fatty Acid Esters in *Physalis Alkekengi* and *Hippophae Rhamnoides*". *Phytochemical Analysis* 16, č. 3 (2005): 188–195. <https://doi.org/10.1002/pca.844>.
- 33 Raffo A., Paoletti F., Antonelli M. „Changes in Sugar, Organic Acid, Flavonol and Carotenoid Composition during Ripening of Berries of Three Seabuckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Cultivars". *European Food Research and Technology* 219, č. 4 (2004): 360–368. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0984-4>.
- 34 Pop E.A., Diaconeasa Z., Fetea F., Bunea A., Dulf F., Pineta A., Socaciu C. „Carotenoids, Tocopherols and Antioxidant Activity of Lipophilic Extracts from Sea Buckthorn Berries (*Hippophae Rhamnoides*), Apricot Pulp and Apricot Kernel (*Prunus Armeniaca*) | Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology". Viděno 5. leden 2023. <https://journals.usamvcluj.ro/index.php/fst/article/view/11425>.
- 35 Hamułka J., Górnicka M., Sulich A., Frąckiewicz J. „Weight Loss Program Is Associated with Decrease α -Tocopherol Status in Obese Adults". *Clinical Nutrition* 38, č. 4 (2019): 1861–1870. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.07.011>.
- 36 Kallio H., Yang B., Peippo P., Tahvonon R., Pan R. „Triacylglycerols, Glycerophospholipids, Tocopherols, and Tocotrienols in Berries and Seeds of Two Subspecies (ssp. *sinensis* and *mongolica*) of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, č. 10 (2002): 3004–3009. <https://doi.org/10.1021/jf011556o>.

-
- 37 Chun J., Lee J., Ye L., Exler J., Eitenmiller R. R. „Tocopherol and Tocotrienol Contents of Raw and Processed Fruits and Vegetables in the United States Diet". *Journal of Food Composition and Analysis* 19, č. 2 (2006): 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.08.001>.
- 38 Zadernowski R., Naczka M., Amarowicz R. „Tocopherols in Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) Berry Oil". *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80, č. 1 (2003): 55–58. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0650-z>.
- 39 Cenkowski S., Yakimishen R., Przybylski R., Muir W. E. „Quality of Extracted Sea Buckthorn Seed and Pulp Oil". *CANADIAN BIOSYSTEMS ENGINEERING* 48 (2006).
- 40 Smida I., Pentelescu C., Pentelescu O., Sweidan A., Oliviero N., Meuric V., Martin B., Colceriu L., Bonnaure-Mallet M., Tamanai-Shacoori Z. „Benefits of Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides*) Pulp Oil-Based Mouthwash on Oral Health". *Journal of Applied Microbiology* 126, č. 5 (2019): 1594–1605. <https://doi.org/10.1111/jam.14210>.
- 41 Yang B. „Sugars, Acids, Ethyl β -D-Glucopyranose and a Methyl Inositol in Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides*) Berries". *Food Chemistry* 112, č. 1 (2009): 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.042>.
- 42 Tiitinen K. M., Yang B., Haraldsson G. G., Jonsdottir S., Kallio H. P. „Fast Analysis of Sugars, Fruit Acids, and Vitamin C in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Varieties". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, č. 7 (2006): 2508–2513. <https://doi.org/10.1021/jf053177r>.
- 43 Tang X., Tigerstedt P. M. A. „Variation of Physical and Chemical Characters within an Elite Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) Breeding Population". *Scientia Horticulturae* 88, č. 3 (2001): 203–214. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00208-9).
- 44 Mäkinen K. K., Söderling E. „A Quantitative Study of Mannitol, Sorbitol, Xylitol, and Xylose in Wild Berries and Commercial Fruits". *Journal of Food Science* 45, č. 2 (1980): 367–371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb02616.x>.
- 45 Biel W., Telesiński A., Jaroszewska A. „Effect of mycorrhization and variety on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn berries". *Journal of Elementology*, č. 2/2018 (2018). <https://doi.org/10.5601/jelem.2017.22.3.1434>.
- 46 Poljšak N., Kreft S., Kočevar Glavač N. „Vegetable Butters and Oils in Skin Wound Healing: Scientific Evidence for New Opportunities in Dermatology". *Phytotherapy Research* 34, č. 2 (2020): 254–269. <https://doi.org/10.1002/ptr.6524>.

-
- 47 Piłat B., Bieniek A., Zadernowski R. „Chemical composition of individual morphological parts of the sea buckthorn fruit (*Hippophae rhamnoides*, L.)." *Producing Sea Buckthorn of High Quality* 29.76.(2014): 79.
- 48 Yang B., Kallio H. „Effects of Harvesting Time on Triacylglycerols and Glycerophospholipids of Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) Berries of Different Origins". *Journal of Food Composition and Analysis* 15, č. 2 (2002): 143–157. <https://doi.org/10.1006/jfca.2001.1041>.
- 49 Pundir S., Garg P., Dwiwedi A., Ali A., Kapoor V. K., Kapoor D., Kulshrestha S., Lal U. R., Negi P. „Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry and Dermatological Effects of *Hippophae Rhamnoides* L.: A Review". *Journal of Ethnopharmacology* 266 (2021): 113434. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113434>.
- 50 Li T. S. C., Beveridge T. H. J., a National Research Council Canada. *Sea Buckthorn (Hippophae Rhamnoides L.): Production and Utilization*. NRC Research Press, (2003).
- 51 Patel Ch. A., Divakar K., Santani D., Solanki H. K., Thakkar J. H. „Remedial Prospective of *Hippophae Rhamnoides* Linn. (Sea Buckthorn)". *International Scholarly Research Notices* 2012 (2012): e436857. <https://doi.org/10.5402/2012/436857>.
- 52 García V. L. „The Omega 7 as a Health Strategy for the Skin and Mucous Membranes", (2019).
- 53 Larmo P. S., Yang B., Hyssälä J., Kallio H. P., Erkkola R. „Effects of Sea Buckthorn Oil Intake on Vaginal Atrophy in Postmenopausal Women: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study". *Maturitas* 79, č. 3 (2014): 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.07.010>.
- 54 Saleem M. „Lupeol, a Novel Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Dietary Triterpene". *Cancer Letters* 285, č. 2 (2009): 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.04.033>.
- 55 Yushipitsina G. G., Chuprova N. A., Repyakh S. M. „Fractionation and Amino Acid Compositon of Proteins of the Woody Verdure of Sea Buckthorn". *Chemistry of Natural Compounds* 24, č. 3 (1988): 348–350. <https://doi.org/10.1007/BF00598585>.
- 56 Dhar P., Tayade A. B., Kumar J., Chaurasia O. P., Srivastava R. B., Singh S. B. „Nutritional Profile of Phytococktail from Trans-Himalayan Plants". *PLOS ONE* 8, č. 12 (2013): e83008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083008>.

-
- 57 Zhang W., et al. „Preliminary study of biochemical constitutions of berry of sea buckthorn growing in Shanxi province and their changing trend". *Proceedings of international symposium on sea buckthorn (H. rhamnoides L.)*, China: Xi'an, (1989).
- 58 Nimchuk Z., Eulgem T., Holt III B. F., Dangel J. L. „Recognition and Response in the Plant Immune System". *Annual Review of Genetics* 37, č. 1 (2003): 579–609. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.142628>.
- 59 Lakshmanan V., Bais H. P. „Factors other than root secreted malic acid that contributes toward *Bacillus subtilis* FB17 colonization on *Arabidopsis* roots". *Plant Signaling & Behavior* 8, č. 11 (2013): e272-277. <https://doi.org/10.4161/psb.27277>.
- 60 Souci S. W., Fachmann W., Kraut H. „Food Composition and Nutrition Tables." *Food Composition and Nutrition Tables.*, č. Ed.6 (2000).
- 61 Gutzeit D., Winterhalter P., Jerz G. „Nutritional Assessment of Processing Effects on Major and Trace Element Content in Sea Buckthorn Juice (*Hippophaë Rhamnoides* L. Ssp. *Rhamnoides*)". *Journal of Food Science* 73, č. 6 (2008): H97–102. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00817.x>.
- 62 Kallio H., Yang B., Tahvonon R., Sandell M. „Composition of sea buckthorn berries of various origins". Editoval Lu Shunguang. *Proceedings of International Workshop on Seabuckthorn 1999* (1999): 17–23.
- 63 Zu Y., Li Ch., Fu Y., Zhao Ch. „Simultaneous Determination of Catechin, Rutin, Quercetin Kaempferol and Isorhamnetin in the Extract of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Leaves by RP-HPLC with DAD". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, č. 3 (2006): 714–719. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.04.052>.
- 64 Gorbatoeva J., Lõugas T., Vokk R., Kaljurand M. „Comparison of the Contents of Various Antioxidants of Sea Buckthorn Berries Using CE". *ELECTROPHORESIS* 28, č. 22 (2007): 4136–4142. <https://doi.org/10.1002/elps.200700362>.
- 65 Pop R. M., Weesepeel Y., Socaciu C., Pintea A., Vincken J. P., Gruppen H. „Carotenoid Composition of Berries and Leaves from Six Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Varieties". *Food Chemistry* 147 (2014): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.083>.

-
- 66 Sajfirtov M., Sovova H. „Solute-Matrix and Solute-Solute Interactions During Supercritical Fluid Extraction of Sea Buckthorn Leaves". *Procedia Engineering*, CHISA 2012, 42 (2012): 1682–1691. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.561>.
- 67 Górnas P., Šně E., Siger A., Segliņa D. „Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Leaves as Valuable Source of Lipophilic Antioxidants: The Effect of Harvest Time, Sex, Drying and Extraction Methods". *Industrial Crops and Products* 60 (2014): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.053>.
- 68 Gong Y., Zhang X., He L., Yan Q., Yuan F., Gao Y. „Optimization of Subcritical Water Extraction Parameters of Antioxidant Polyphenols from Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Seed Residue". *Journal of Food Science and Technology* 52, č. 3 (2015): 1534–1542. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1115-7>.
- 69 Xu D. P., Li Y., Meng X., Zhou T., Zhou Y., Zheng J., Zhang J.-J., Li H.-B. „Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources". *International Journal of Molecular Sciences* 18, č. 1 (2017): 96. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>.
- 70 Borkovcová I., Kostrhounová R. Extrakční metody [online].
- 71 Klouda P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, (2003). 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- 72 Štulík K. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, (2004).
- 73 Strati I. F., Oreopoulou V. „Effect of Extraction Parameters on the Carotenoid Recovery from Tomato Waste". *International Journal of Food Science & Technology* 46, č. 1 (2011): 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02496.x>.
- 74 Ho K. K. H. Y., Ferruzzi M. G., Liceaga A. M., San Martín-González M. F. „Microwave-Assisted Extraction of Lycopene in Tomato Peels: Effect of Extraction Conditions on All-Trans and Cis-Isomer Yields". *LWT - Food Science and Technology* 62, č. 1, Part 1 (2015): 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.061>.
- 75 Patra B. R., Borugadda V. B., Dalai A. K. „Microwave-Assisted Extraction of Sea Buckthorn Pomace and Seed Extracts as a Proactive Antioxidant to Stabilize Edible Oils". *Bioresource Technology Reports* 17 (2022): 100970. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100970>.
- 76 Kagliwal L. D., Pol A. S., Patil S. C., Singhal R. S., Patravale V. B. „Antioxidant-Rich Extract from Dehydrated Seabuckthorn Berries by Supercritical Carbon Dioxide Extraction".

-
- Food and Bioprocess Technology* 5, č. 7 (2012): 2768–2776. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0613-8>.
- 77 Kitrytė V., Povilaitis D., Kraujalienė V., Šulniūtė V., Pukalskas A., Venskutonis P. R. „Fractionation of Sea Buckthorn Pomace and Seeds into Valuable Components by Using High Pressure and Enzyme-Assisted Extraction Methods". *LWT - Food Science and Technology, Fruit & Veg Processing 2016 – towards sustainability*, 85 (2017): 534–538. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.041>.
- 78 Kallio H., Yang B., Peippo P. „Effects of Different Origins and Harvesting Time on Vitamin C, Tocopherols, and Tocotrienols in Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides*) Berries". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, č. 21 (2002): 6136–6142. <https://doi.org/10.1021/jf020421v>.
- 79 Kallio H., Yang W., Liu P., Yang B. „Proanthocyanidins in Wild Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) Berries Analyzed by Reversed-Phase, Normal-Phase, and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with UV and MS Detection". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, č. 31 (2014): 7721–7729. <https://doi.org/10.1021/jf502056f>.
- 80 Guliyev V. B., Gul M., Yildirim A. „*Hippophaë Rhamnoides* L.: Chromatographic Methods to Determine Chemical Composition, Use in Traditional Medicine and Pharmacological Effects". *Journal of Chromatography B, Biomedically Relevant Plant Components: Active Principles and Toxicants*, 812, č. 1 (2004): 291–307. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.047>.
- 81 Dong R., Su J., Nian H., Shen H., Zhai X., Xin H., Qin L., Han T. „Chemical Fingerprint and Quantitative Analysis of Flavonoids for Quality Control of Sea Buckthorn Leaves by HPLC and UHPLC-ESI-QTOF-MS". *Journal of Functional Foods* 37 (2017): 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.019>.
- 82 Giuffrida D., Pinteá A., Dugo P., Torre G., Pop R. M., Mondello L. „Determination of Carotenoids and Their Esters in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) by HPLC-DAD-APCI-MS". *Phytochemical Analysis* 23, č. 3 (2012): 267–273. <https://doi.org/10.1002/pca.1353>.
- 83 Rösch D., Bergmann M., Knorr D., Kroh L.W. „Structure-Antioxidant Efficiency Relationships of Phenolic Compounds and Their Contribution to the Antioxidant Activity of

-
- Sea Buckthorn Juice". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, č. 15 (2003): 4233–4239. <https://doi.org/10.1021/jf0300339>.
- 84 Markkinen N., Laaksonen O., Nahku R., Kuldjärv R., Yang B. „Impact of Lactic Acid Fermentation on Acids, Sugars, and Phenolic Compounds in Black Chokeberry and Sea Buckthorn Juices". *Food Chemistry* 286 (2019): 204–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.189>.
- 85 Achilli G., Cellerino G. P., Gamache P. H., Melzi d'Eril G. V. „Identification and Determination of Phenolic Constituents in Natural Beverages and Plant Extracts by Means of a Coulometric Electrode Array System". *Journal of Chromatography A*, 16th International Symposium on Column Liquid Chromatography, 632, č. 1 (1993): 111–117. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80033-5](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80033-5).
- 86 Kumar M. S. Y., Dutta R., Prasad D., Misra K. „Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Seabuckthorn (*Hippophae Rhamnoides*) Leaves for the Comparative Evaluation of Antioxidant Activity". *Food Chemistry* 127, č. 3 (2011): 1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.088>.
- 87 Müller L., Fröhlich K., Böhm V. „Comparative Antioxidant Activities of Carotenoids Measured by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), ABTS Bleaching Assay (ATEAC), DPPH Assay and Peroxyl Radical Scavenging Assay". *Food Chemistry* 129, č. 1 (2011): 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.045>.
- 88 Vaheer M., Koel M. „Separation of Polyphenolic Compounds Extracted from Plant Matrices Using Capillary Electrophoresis". *Journal of Chromatography A*, 13th International Symposium on Capillary Electro-separation Techniques, 990, č. 1 (2003): 225–230. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)02013-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)02013-7).
- 89 Velišek J., Hajšlová J. *Chemie potravin II*. Rozšířené a přepracované 3. vydání Tábor: OSSIS, (2009).343 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- 90 Paulová H., Bochořáková H., Táborská E. „Metody stanovení antioxidační kapacity in vitro". *Chem. listy*, č. 98 (b.r.) (2004): 174–179.
- 91 Shahidi F., Zhong Y. „Measurement of Antioxidant Activity". *Journal of Functional Foods*, Natural Antioxidants, 18 (2015): 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.
- 92 Zheng L., Shi L. K., Zhao Ch. W., Jin Q. Z., Wang X. G. „Fatty Acid, Phytochemical, Oxidative Stability and in Vitro Antioxidant Property of Sea Buckthorn (*Hippophaë*

-
- Rhamnoides L.) Oils Extracted by Supercritical and Subcritical Technologies". *LWT* 86 (2017): 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.042>.
- 93 Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. „Methods for Testing Antioxidant Activity". *Analyst* 127, č. 1 (2002): 183–198. <https://doi.org/10.1039/B009171P>.
- 94 Prior R. L., Wu X., Schaich K. „Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, č. 10 (2005): 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- 95 Li Y., Li P., Yang K., He Q., Wang Y., Sun Y., He Ch., Xiao P. „Impact of Drying Methods on Phenolic Components and Antioxidant Activity of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries from Different Varieties in China". *Molecules* 26, č. 23 (2021): 7189. <https://doi.org/10.3390/molecules26237189>.
- 96 Sytařová I., Orsavová J., Snopek L., Mlček J., Byczyński Ł., Mišurcová L. „Impact of Phenolic Compounds and Vitamins C and E on Antioxidant Activity of Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) Berries and Leaves of Diverse Ripening Times". *Food Chemistry* 310 (2020): 125784. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125784>.
- 97 Perk A. A., Ceylan F. D., Yanar O., Boztas K., Capanoglu E. „Investigating the Antioxidant Properties and Rutin Content of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Leaves and Branches". *African Journal of Biotechnology* 15, č. 5 (2016): 118–124. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14685>.
- 98 Zulueta A., Esteve M. J., Frígola A. „ORAC and TEAC Assays Comparison to Measure the Antioxidant Capacity of Food Products". *Food Chemistry* 114, č. 1 (2009): 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>.
- 99 Guo R., Guo X., Li T., Fu X., Liu R. H. „Comparative Assessment of Phytochemical Profiles, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) Berries". *Food Chemistry* 221 (2017): 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.063>.
- 100 Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K. „Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, č. 11 (2002): 3122–3128. <https://doi.org/10.1021/jf0116606>.

-
- 101 Luntraru C. M., Apostol L., Oprea O. B., Neagu M., Popescu A. F., Tomescu J. A., Muțescu M., Susman I. E., Gaceu L. „Reclaim and Valorization of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) By-Product: Antioxidant Activity and Chemical Characterization". *Foods* 11, č. 3 (2022): 462. <https://doi.org/10.3390/foods11030462>.
- 102 Özyürek M., Güçlü K., Apak R. „The Main and Modified CUPRAC Methods of Antioxidant Measurement". *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30, č. 4 (2011): 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.016>.
- 103 Nunzia C., Lanorte M. T., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V. „A Reproducible, Rapid and Inexpensive Folin–Ciocalteu Micro-Method in Determining Phenolics of Plant Methanol Extracts". *Microchemical Journal* 91, č. 1 (2009): 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.08.011>.
- 104 Araya-Farias M., Makhlouf J., Ratti C. „Drying of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berry: Impact of Dehydration Methods on Kinetics and Quality". *Drying Technology* 29, č. 3 (2011): 351–359. <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.497590>.
- 105 Otrusínová J. „Analýza fenolických látek obsažených ve vinných hroznech a ve víně", Diplomová práce, (2008).
- 106 Geng Z., Wang J., Zhu L., Yu X., Zhang Q., Li M., Hu B., Yang X. „Metabolomics Provide a Novel Interpretation of the Changes in Flavonoids during Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Drying". *Food Chemistry* 413 (2023): 135598. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135598>.
- 107 Fatima T., Kesari V., Watt I., Wishart D., Todd J. F., Schroeder W. R., Paliyath G., Krishna P. „Metabolite Profiling and Expression Analysis of Flavonoid, Vitamin C and Tocopherol Biosynthesis Genes in the Antioxidant-Rich Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.)". *Phytochemistry* 118 (2015): 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.008>.
- 108 Appendix F. „Guidelines for Standard Method Performance Requirements; Official Methods of Analysis". AOAC INTERNATIONAL (2016). https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf.

6 PŘÍLOHY

6.1 Tabulky

Tabulka P1: Průměrné hodnoty TEAC fenolických látek ve vzorcích rakytníku – metoda ABTS

Označení	TEAC [$\mu\text{mol/ml(g)}$]	Označení	TEAC [$\mu\text{mol/ml(g)}$]
S1 EtAc	1,132 \pm 0,038	C3 MeOH	86,441 \pm 1,265
E1 EtAc	0,802 \pm 0,008	C4 EtAc	48,597 \pm 0,205
B1	1,135 \pm 0,011	C4 MeOH	188,923 \pm 3,184
B2 EtAc	6,805 \pm 0,123	R1 MeOH	0,389 \pm 0,013
G1 EtAc	0,038 \pm 0,0006	R2 MeOH	1,376 \pm 0,018
C1 EtAc	5,358 \pm 0,352	R3 EtAc	0,124 \pm 0,0015
C1 MeOH	5,805 \pm 0,239	R3 MeOH	2,145 \pm 0,018
C2 EtAc	21,228 \pm 0,203	R4 MeOH	2,225 \pm 0,026
C2 MeOH	21,078 \pm 0,110	M1 MeOH	22,194 \pm 0,341
C3 EtAc	37,510 \pm 0,271	C1 MeOH	241,804 \pm 3,549

Tabulka P2: Průměrné hodnoty TEAC fenolických látek ve vzorcích rakytníku – metoda DPPH

Označení	TEAC [$\mu\text{mol/ml(g)}$]	Označení	TEAC [$\mu\text{mol/ml(g)}$]
S1 EtAc	0,904 \pm 0,019	C3 MeOH	36,960 \pm 0,280
E1 EtAc	0,538 \pm 0,009	C4 EtAc	33,057 \pm 5,605
B1	0,851 \pm 0,064	C4 MeOH	50,668 \pm 0,214
B2 EtAc	3,126 \pm 0,022	R1 MeOH	0,465 \pm 0,013
G1 EtAc	0,041 \pm 0,0004	R2 MeOH	0,986 \pm 0,022
C1 EtAc	1,341 \pm 0,275	R3 EtAc	0,023 \pm 0,0002
C1 MeOH	3,435 \pm 0,219	R3 MeOH	1,661 \pm 0,029
C2 EtAc	9,906 \pm 0,158	R4 MeOH	2,095 \pm 0,071
C2 MeOH	16,419 \pm 1,158	M1 MeOH	26,556 \pm 0,955
C3 EtAc	24,507 \pm 0,461	C1 MeOH	177,708 \pm 4,773

Tabulka P3: Průměrné hodnoty TEAC fenolických látek ve vzorcích rakytníku – metoda FRAP

Označení	TEAC [μmol/ml(g)]	Označení	TEAC [μmol/ml(g)]
S1 EtAc	0,650 ± 0,006	C3 MeOH	69,836 ± 2,366
E1 EtAc	0,515 ± 0,029	C4 EtAc	23,318 ± 1,037
B1	0,981 ± 0,010	C4 MeOH	149,889 ± 1,124
B2 EtAc	2,634 ± 0,139	R1 MeOH	0,326 ± 0,042
G1 EtAc	0,034 ± 0,0006	R2 MeOH	0,957 ± 0,006
C1 EtAc	0,879 ± 0,069	R3 EtAc	0,038 ± 0,0009
C1 MeOH	1,335 ± 0,064	R3 MeOH	2,269 ± 0,022
C2 EtAc	8,829 ± 0,183	R4 MeOH	1,712 ± 0,217
C2 MeOH	17,92 ± 0,877	M1 MeOH	14,685 ± 0,460
C3 EtAc	22,837 ± 0,232	C1 MeOH	133,324 ± 2,300

Tabulka P4: Průměrné hodnoty celkového obsahu fenolických látek v extrahovaných vzorcích pro stanovení fenolických látek

Označení	Kys. gallová [mg/ml (g)]	Označení	Kys. gallová [mg/ml (g)]
S1 EtAc	0,289 ± 0,014	C3 MeOH	21,713 ± 1,573
E1 EtAc	0,125 ± 0,0008	C4 EtAc	5,911 ± 0,061
B1	0,371 ± 0,004	C4 MeOH	7,859 ± 0,103
B2 EtAc	0,526 ± 0,006	R1 MeOH	0,289 ± 0,005
G1 EtAc	0,009 ± 0,0004	R2 MeOH	0,735 ± 0,004
C1 EtAc	1,942 ± 0,062	R3 EtAc	0,016 ± 0,0003
C1 MeOH	1,583 ± 0,050	R3 MeOH	0,837 ± 0,005
C2 EtAc	2,958 ± 0,130	R4 MeOH	1,0001 ± 0,010
C2 MeOH	4,577 ± 0,063	M1 MeOH	7,698 ± 0,544
C3 EtAc	5,123 ± 0,061	C1 MeOH	43,416 ± 0,731

Tabulka P5: Průměrné hodnoty TEAC vitamínu C ve vzorcích rakytníku – metoda ABTS

Označení	TEAC [μmol/ml(g)]	Označení	TEAC [μmol/ml(g)]
S1	21,601 ± 0,743	C2	27,283 ± 0,198
E1	137,823 ± 1,522	C2 voda	94,162 ± 1,086
B1	1,565 ± 0,089	C3 voda	234,466 ± 2,507
B2	1416,108 ± 0	R1	0,605 ± 0,069
G1	3,789 ± 0,085	R2	1,318 ± 0,022
C1	102,303 ± 1,455	R4	2,027 ± 0,090
C1 voda	23,120 ± 1,578	M1	22,126 ± 0,440

Tabulka P6: Průměrné hodnoty TEAC vitamínu C v extraktech z rakytníku – metoda DPPH

Označení	TEAC [$\mu\text{mol/ml(g)}$]	Označení	TEAC [$\mu\text{mol/ml(g)}$]
S1	21,477 \pm 0,812	C2	20,826 \pm 0,297
E1	78,400 \pm 4,750	C2 voda	23,438 \pm 3,075
B1	1,054 \pm 0,061	C3 voda	227,256 \pm 0,985
B2	1460,254 \pm 46,048	R1	0,264 \pm 0,014
G1		R2	0,792 \pm 0,072
C1	100,596 \pm 2,460	R4	1,117 \pm 0,014
C1 voda	37,065 \pm 0,853	M1	19,554 \pm 1,444

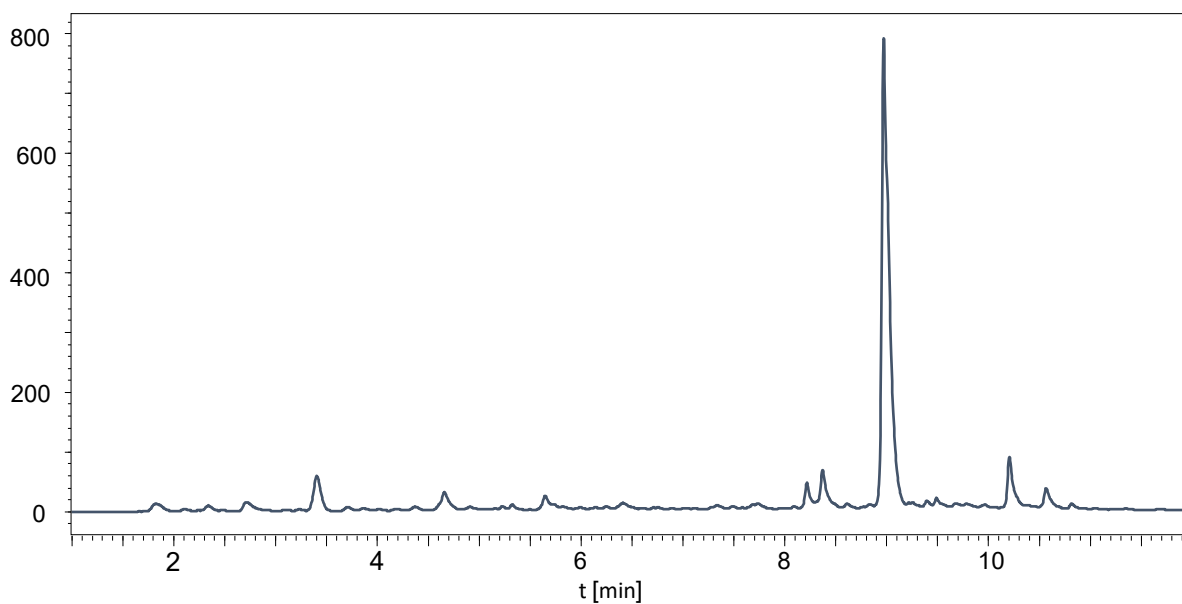
Tabulka P7: Průměrné hodnoty TEAC vitamínu C v extraktech z rakytníku – metoda FRAP

Označení	TEAC [$\mu\text{mol/ml(g)}$]	Označení	TEAC [$\mu\text{mol/ml(g)}$]
S1	15,973 \pm 0,63	C2	28,735 \pm 0,08
E1	91,575 \pm 0,51	C2 voda	65,258 \pm 0,53
B1	1,212 \pm 0,02	C3 voda	325,452 \pm 0,96
B2	1397,402 \pm 32,88	R1	0,930 \pm 0,15
G1	5,154 \pm 0,13	R2	1,666 \pm 0,06
C1	41,901 \pm 1,59	R4	1,460 \pm 0,03
C1 voda	19,197 \pm 0,69	M1	13,405 \pm 0,26

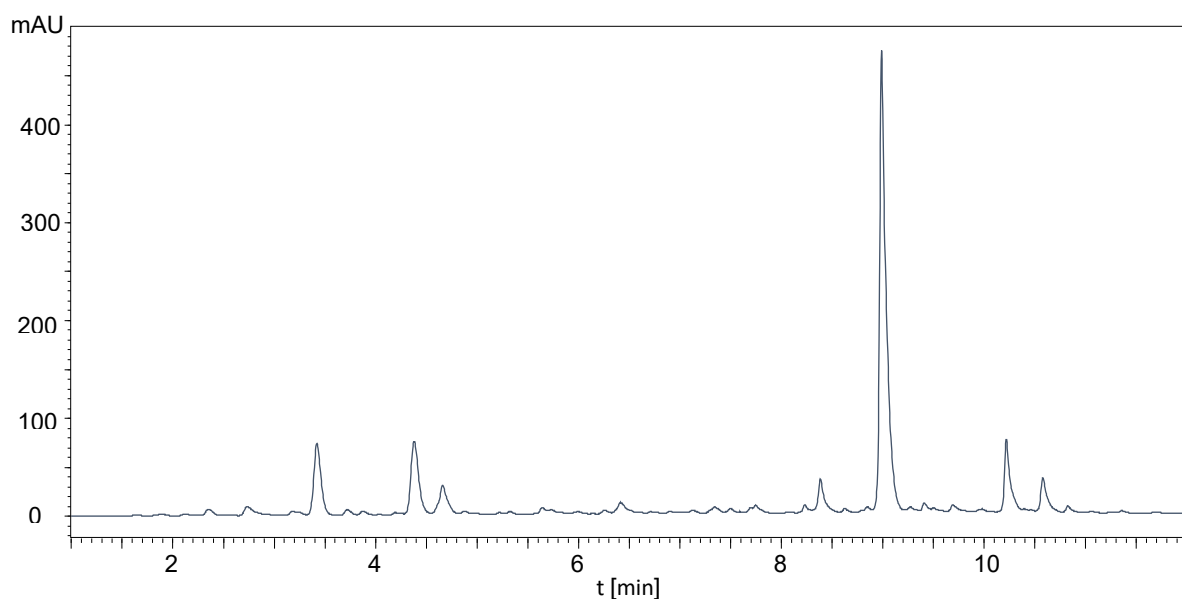
Tabulka P8: Průměrné hodnoty celkového obsahu fenolických látek v extrahovaných vzorcích pro stanovení vitamínu C

Označení	Kys. gallová [mg/ml (g)]	Označení	Kys. gallová [mg/ml (g)]
S1	9,241 \pm 0,717	C2	7,322 \pm 0,305
E1	38,861 \pm 0,584	C2 voda	17,159 \pm 0,311
B1	0,914 \pm 0,044	C3 voda	56,198 \pm 1,661
B2	446,223 \pm 8,226	R1	0,454 \pm 0,010
G1	2,773 \pm 0,154	R2	0,911 \pm 0,017
C1	25,421 \pm 0,633	R4	1,034 \pm 0,010
C1 voda	8,364 \pm 0,229	M1	7,448 \pm 0,332

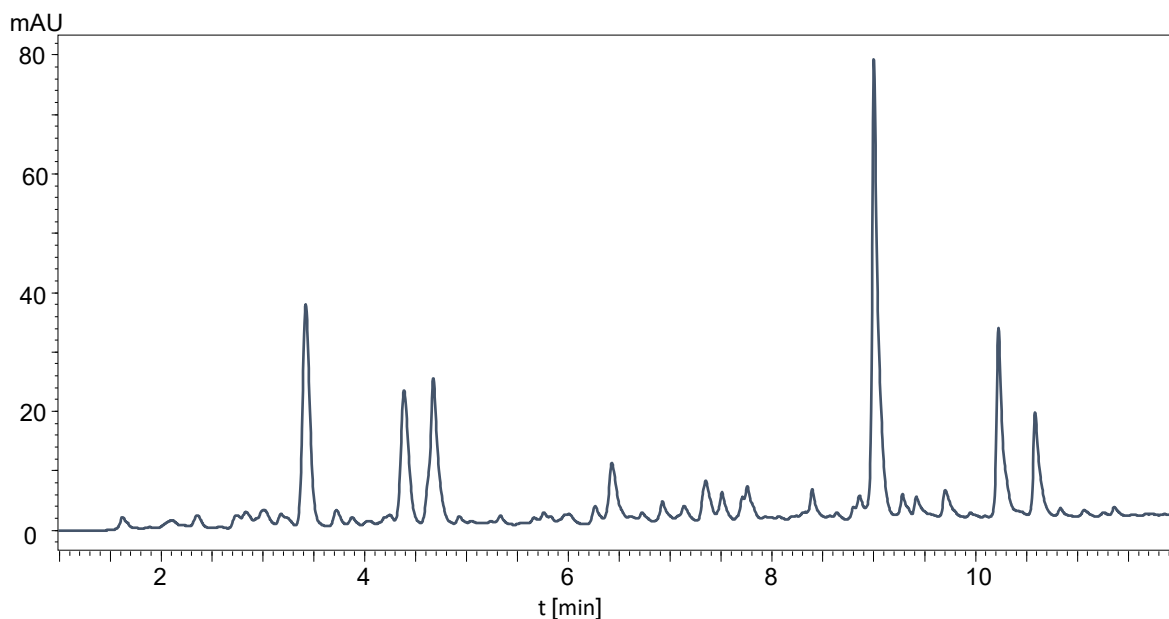
6.2 Obrázky



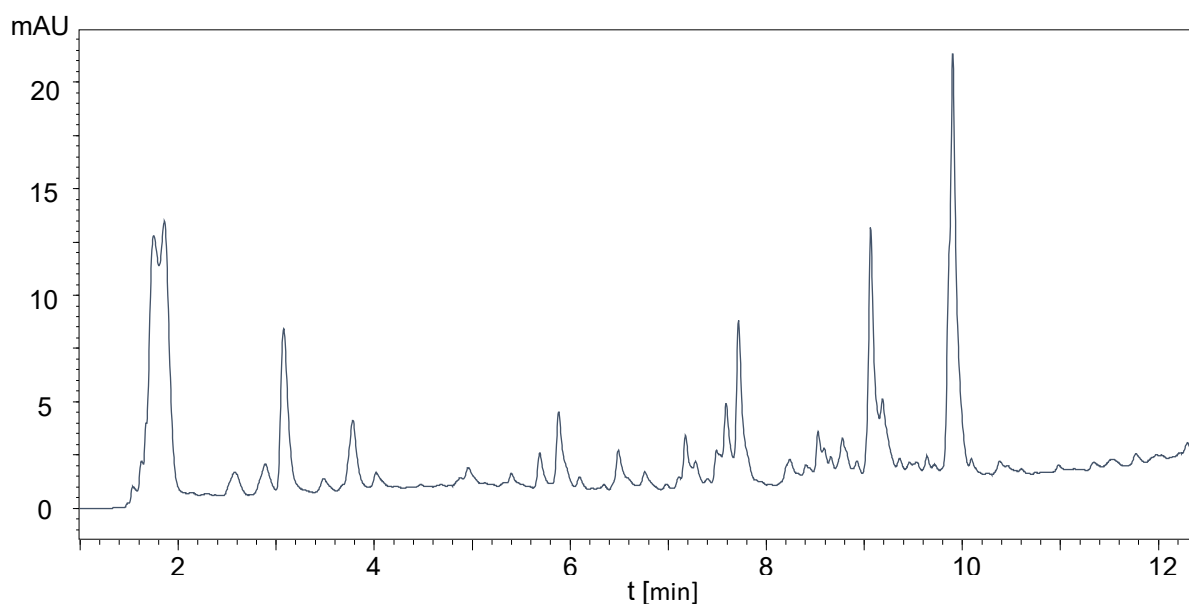
Obrázek P1: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku BIO rakytníkové šťávy (S1) extrahované ethylacetátem, kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 10 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm – vybraný způsob extrakce



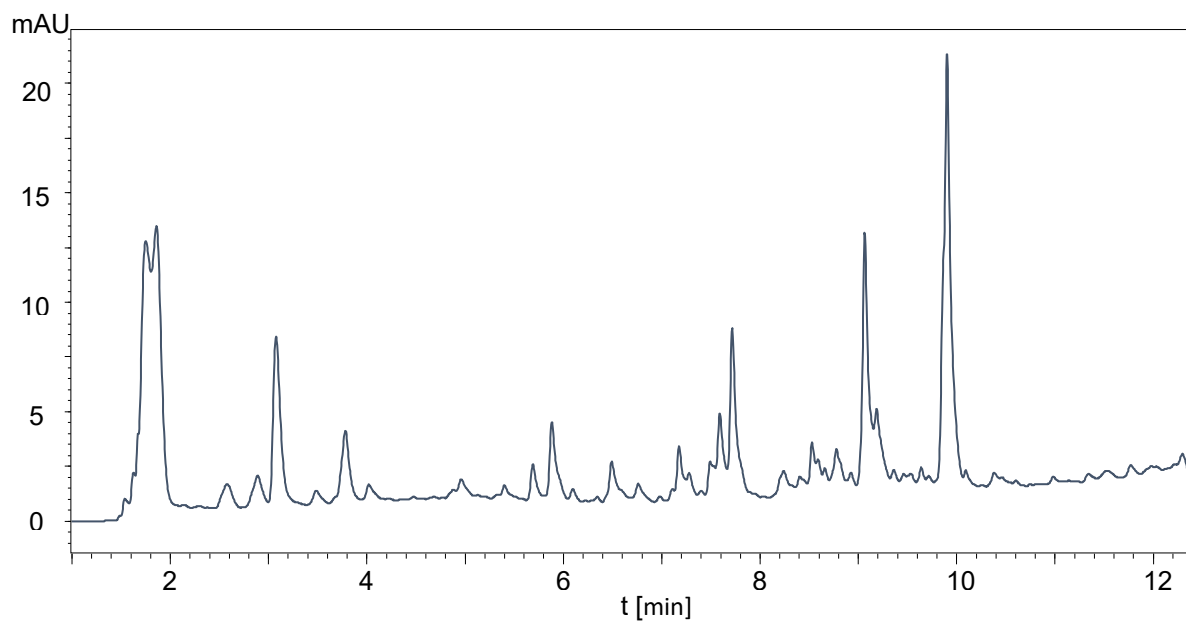
Obrázek P2: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku BIO rakytníkové šťávy (S1) extrahované směsí ethylacetát/diethylether, kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 10 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



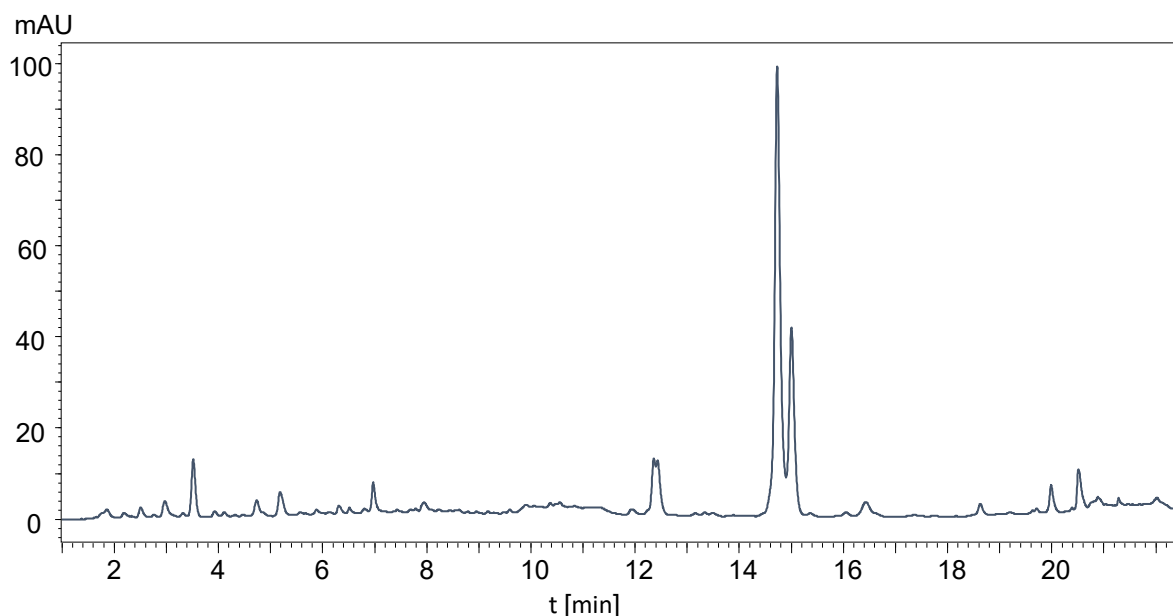
Obrázek P3: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku BIO rakytníkové šťávy (**S1**) extrahované diethyletherem, kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 10 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



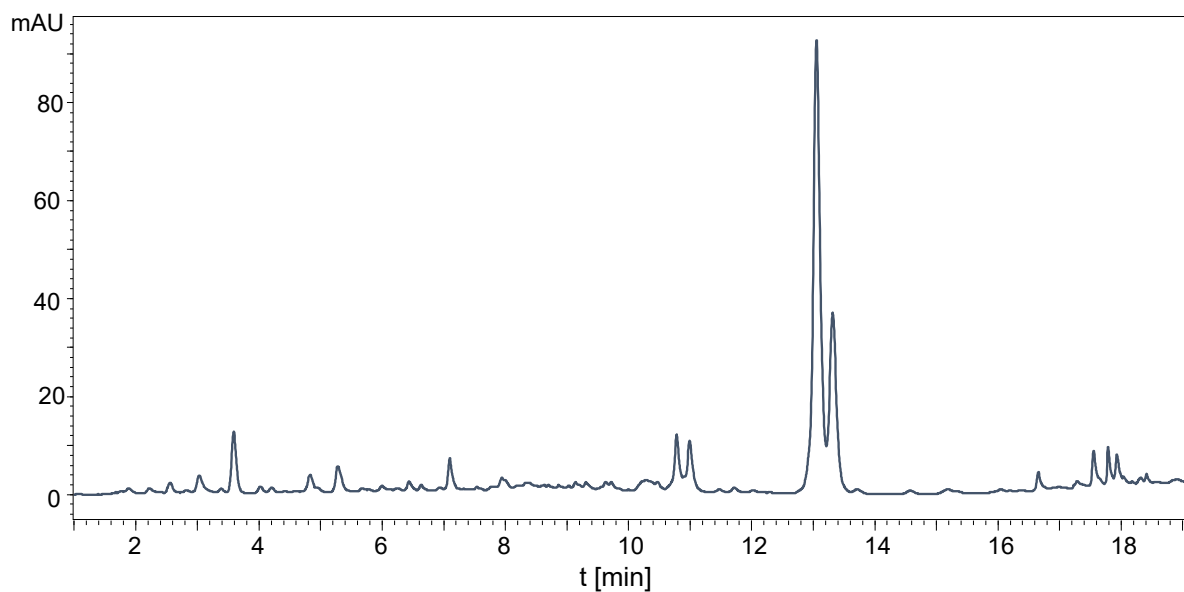
Obrázek P4: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku mražených bobulí (**M1**) extrahovaných 70 % methanolem, kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 10 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



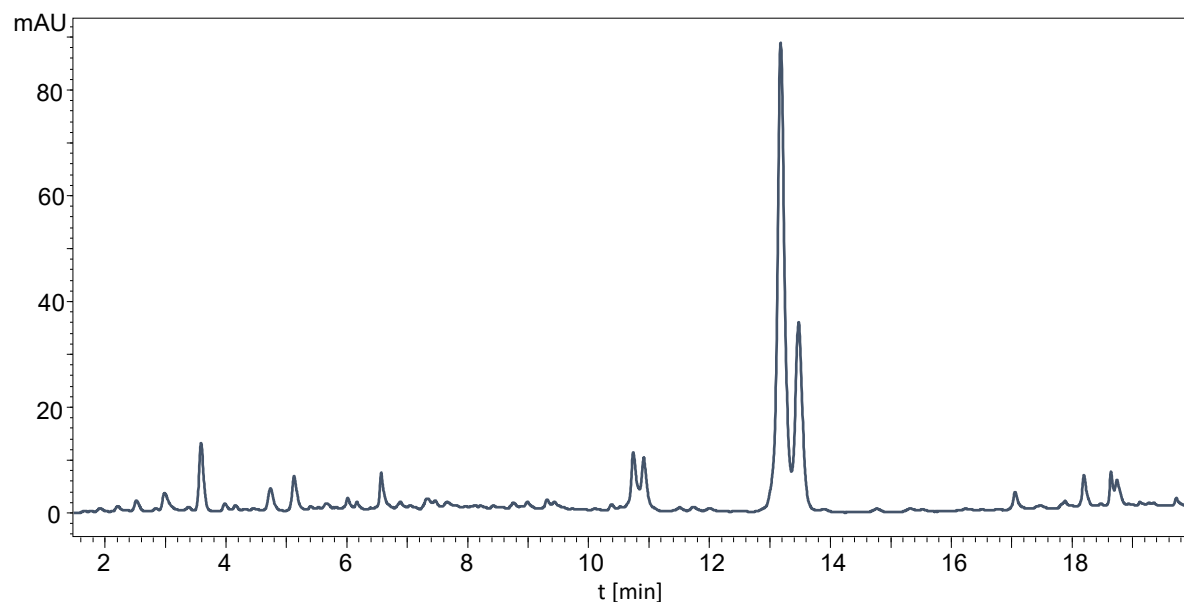
Obrázek P5: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku mražených bobulí (**M1**) extrahovaných 70 % methanolem s přidáním 120 μ l HCOOH, kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 10 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



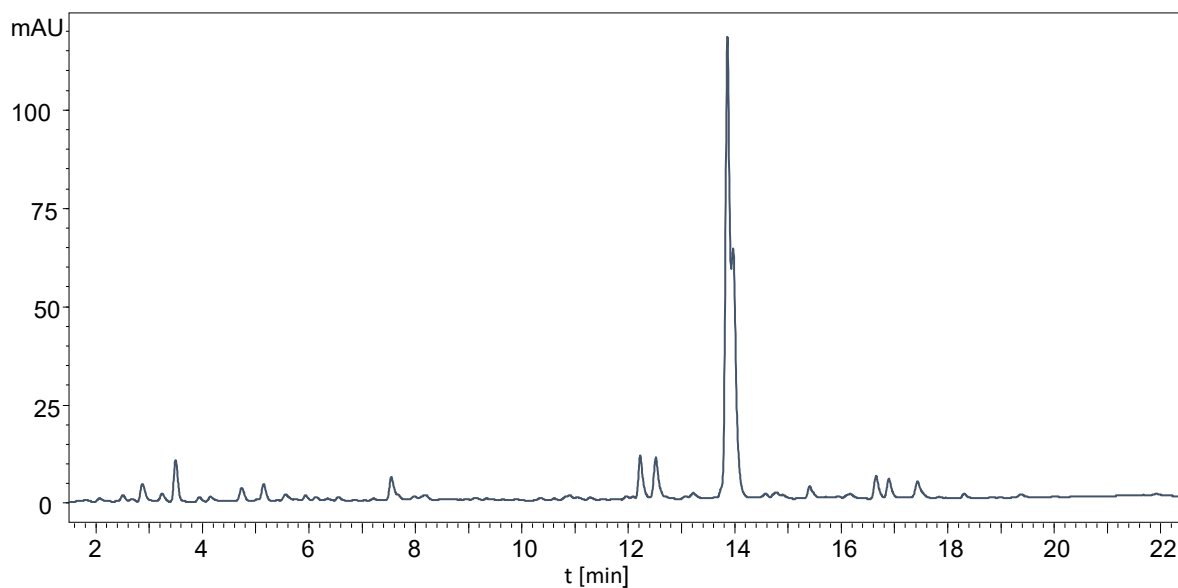
Obrázek P6: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku BIO rakytníkové šťávy (**S1**), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), **testovaný gradient č.3:** 0 min - 10 %, 8 min - 42 %, 16 min - 50 %, 18 min - 60 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



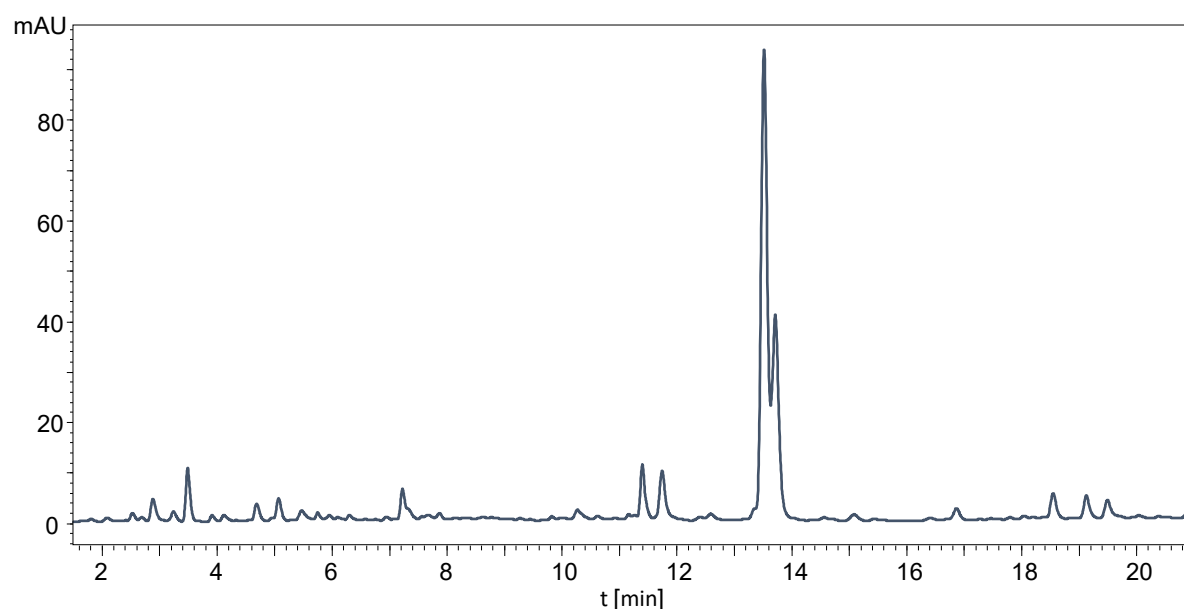
Obrázek P7: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku BIO rakytníkové šťávy (S1), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), **testovaný gradient č.9:** 0 min - 10 %, 5 min - 30 %, 7 min - 46 %, 13 min - 46 %, 15 min - 60 %, 17 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



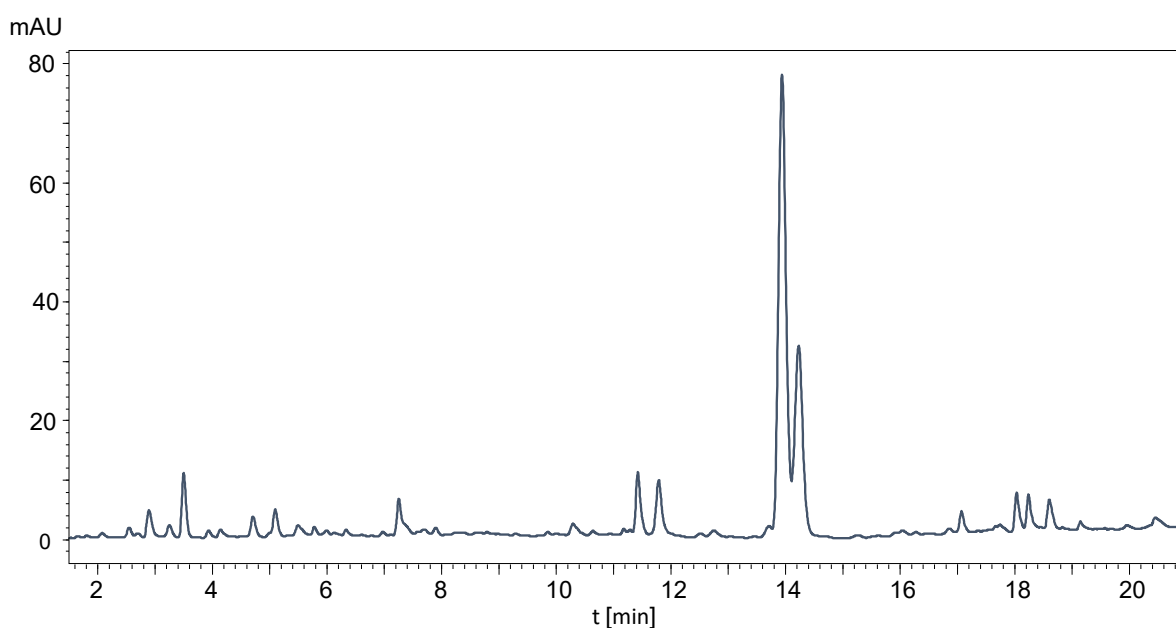
Obrázek P8: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku BIO rakytníkové šťávy (S1), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), **testovaný gradient č.20:** 0 min - 10 %, 7 min - 45 %, 13 min - 46 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



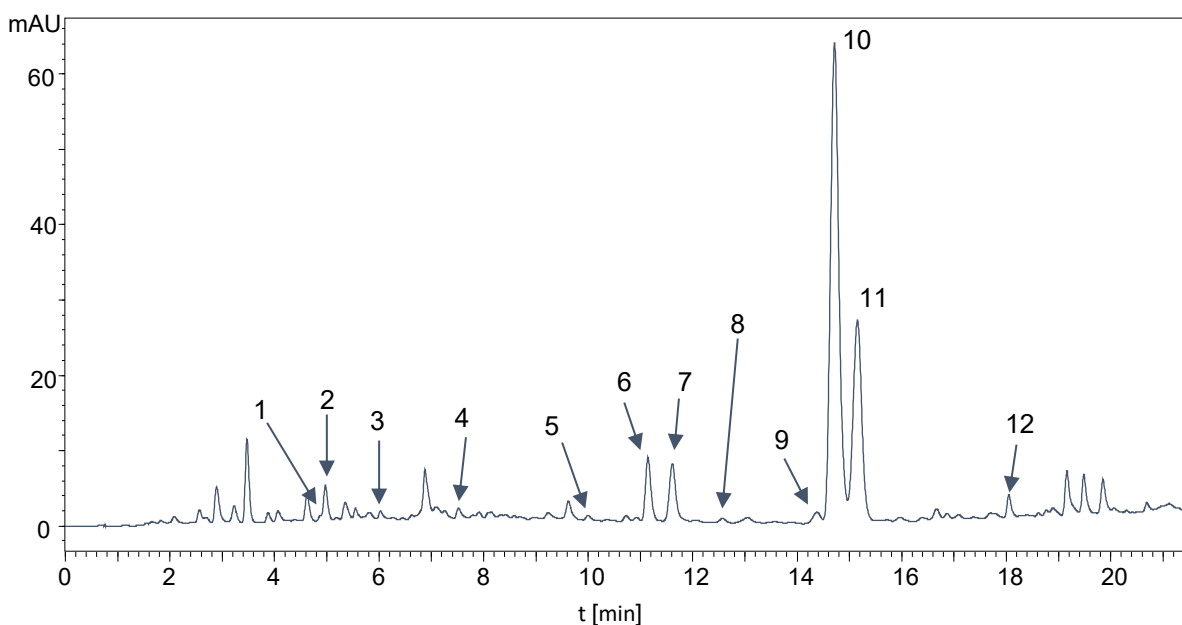
Obrázek P9: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku BIO rakytníkové šťávy (S1), kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), **testovaný gradient č.1:** 0 min - 10 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



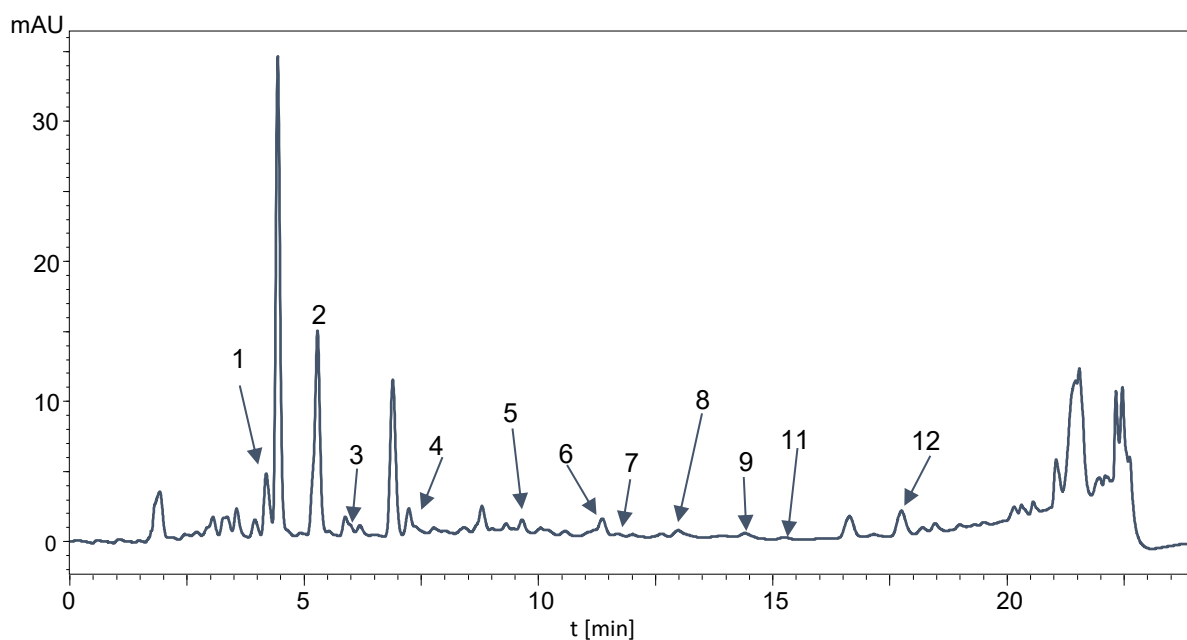
Obrázek P10: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku BIO rakytníkové šťávy (S1), kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), **testovaný gradient č.2:** 0 min - 10 %, 9 min - 45 %, 14 min - 50 %, 20 min - 70 %, 22 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



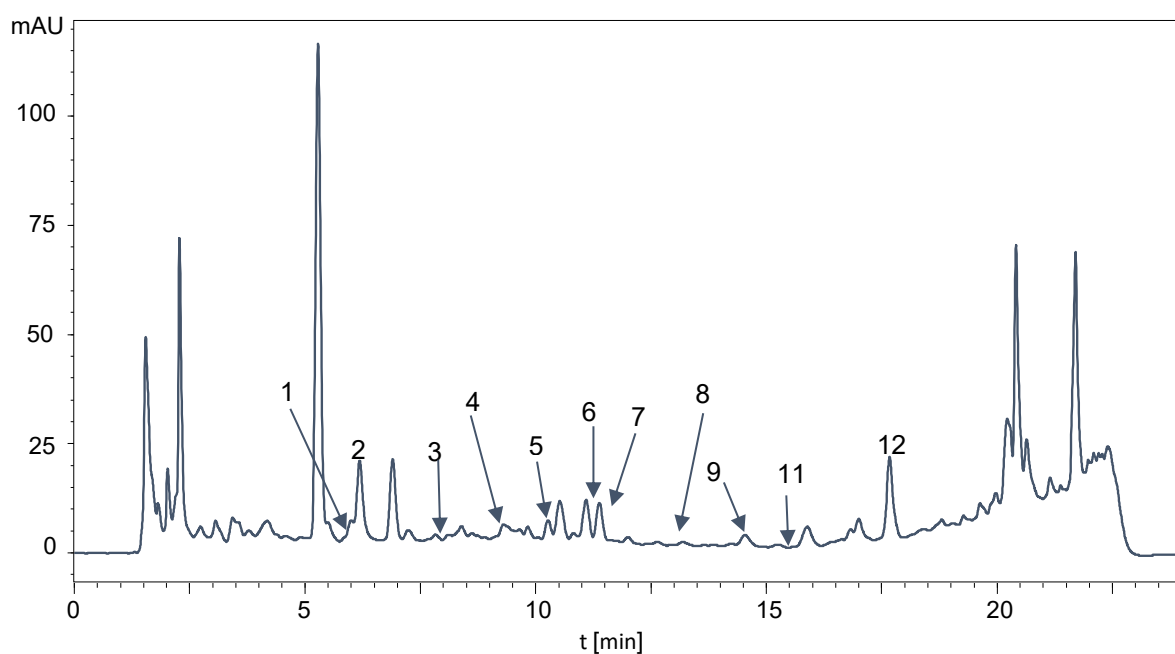
Obrázek P11: Optimalizace separace fenolických látek na vzorku BIO rakytníkové šťávy (S1), kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), **testovaný gradient č.8:** 0 min - 10 %, 9 min - 45 %, 13 min - 45 %, 17 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



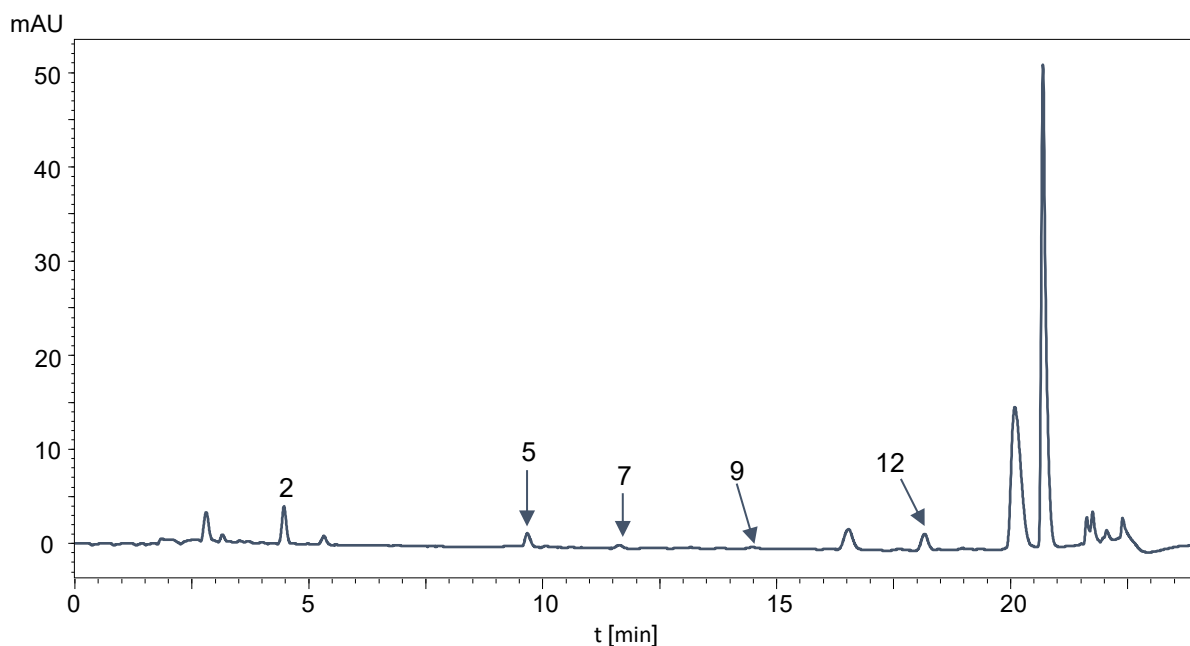
Obrázek P12: Separace fenolických látek – vzorek BIO rakytníková šťáva (S1) extrahovaná EtAc, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



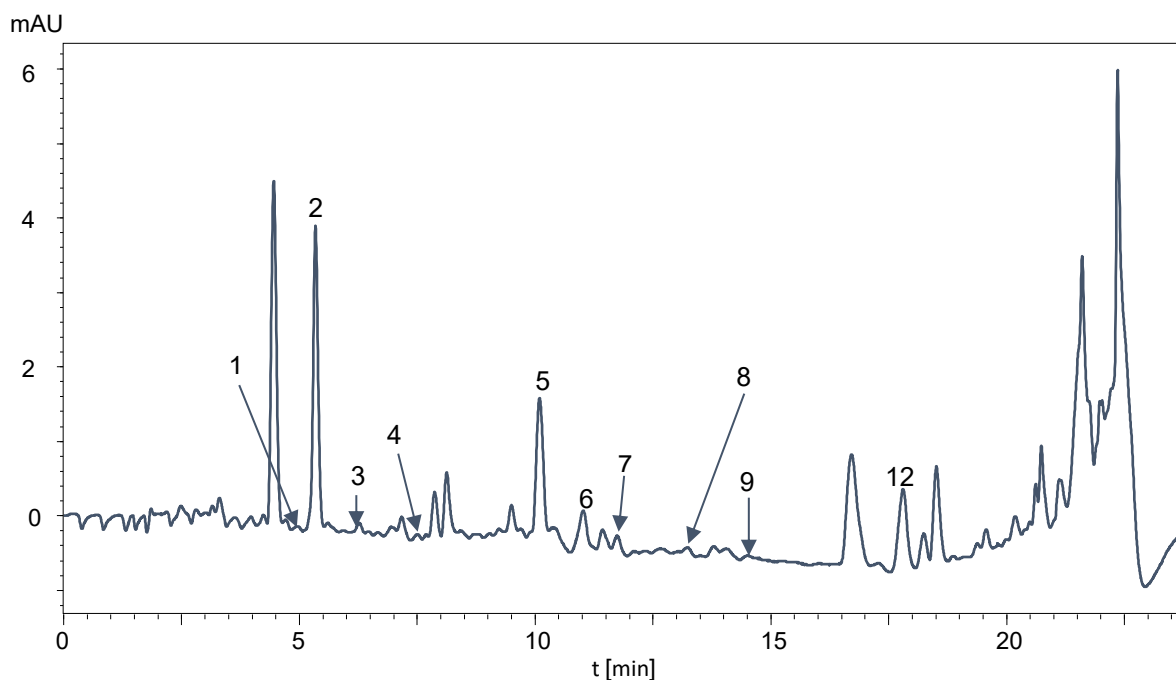
Obrázek P13: Separace fenolických látek – vzorek Organic sea berry powder (**E1**) extrahovaný EtAc, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



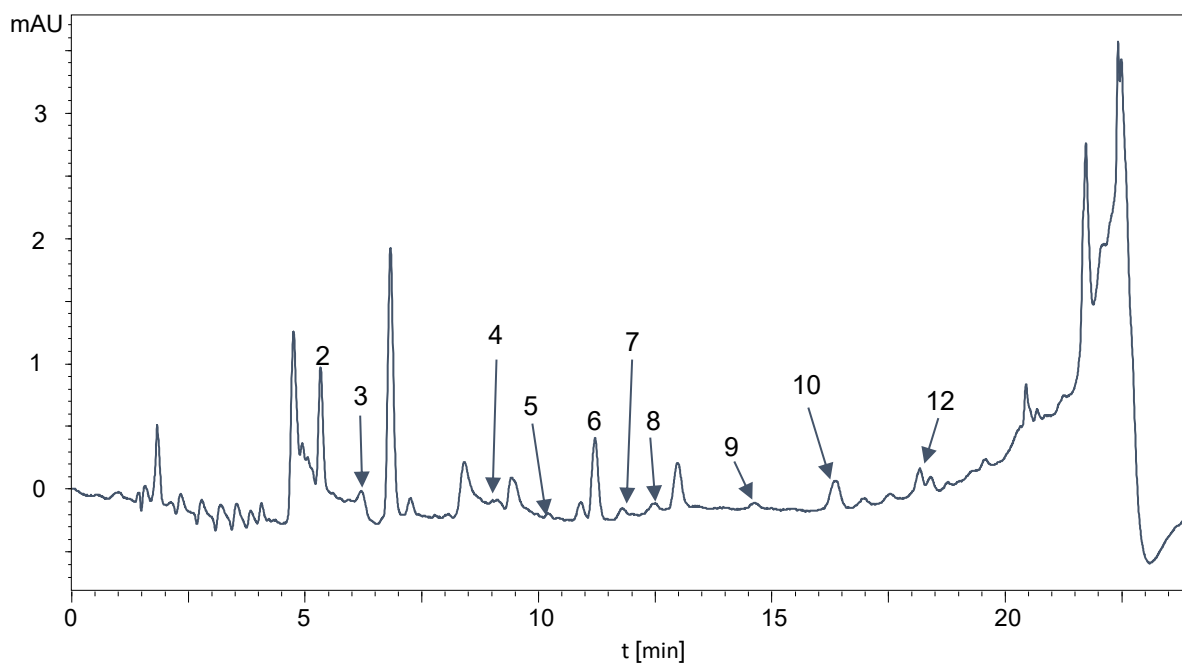
Obrázek P14: Separace fenolických látek – vzorek bylinné kapky rakytník (**B1**) extrahované MeOH, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



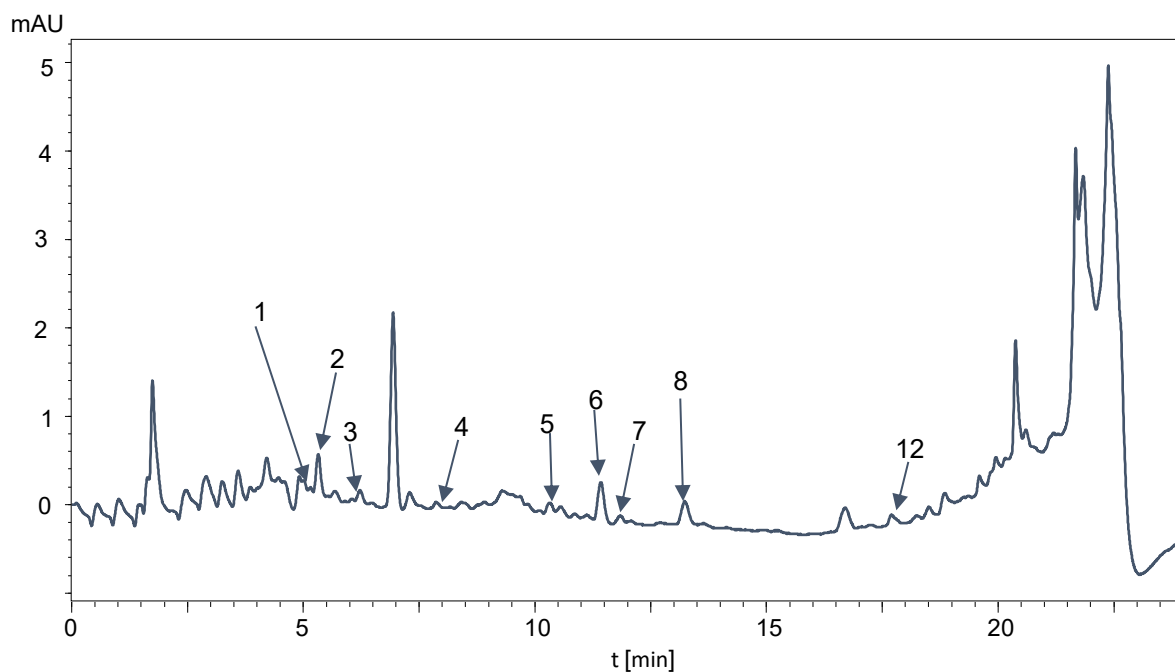
Obrázek P15: Separace fenolických látek – vzorek bylinný elixír rakytník (**B2**) extrahovaný EtAc, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 320 nm



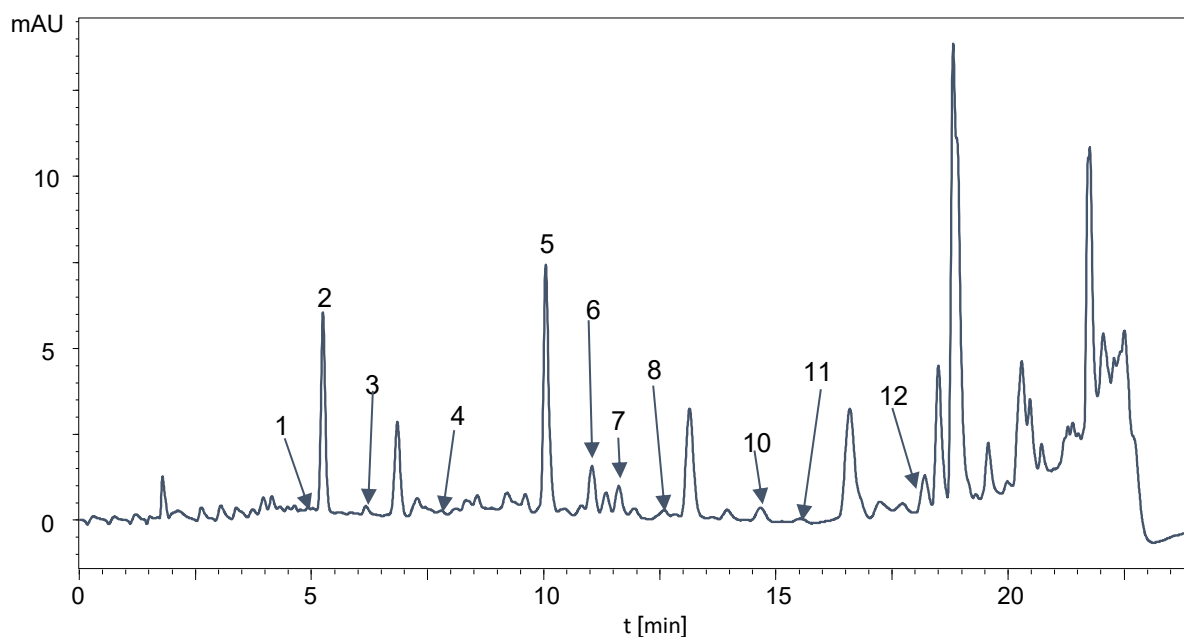
Obrázek P16: Separace fenolických látek – vzorek multivitaminové želatinky s rakytníkem (**G1**) extrahované EtAc, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 320 nm



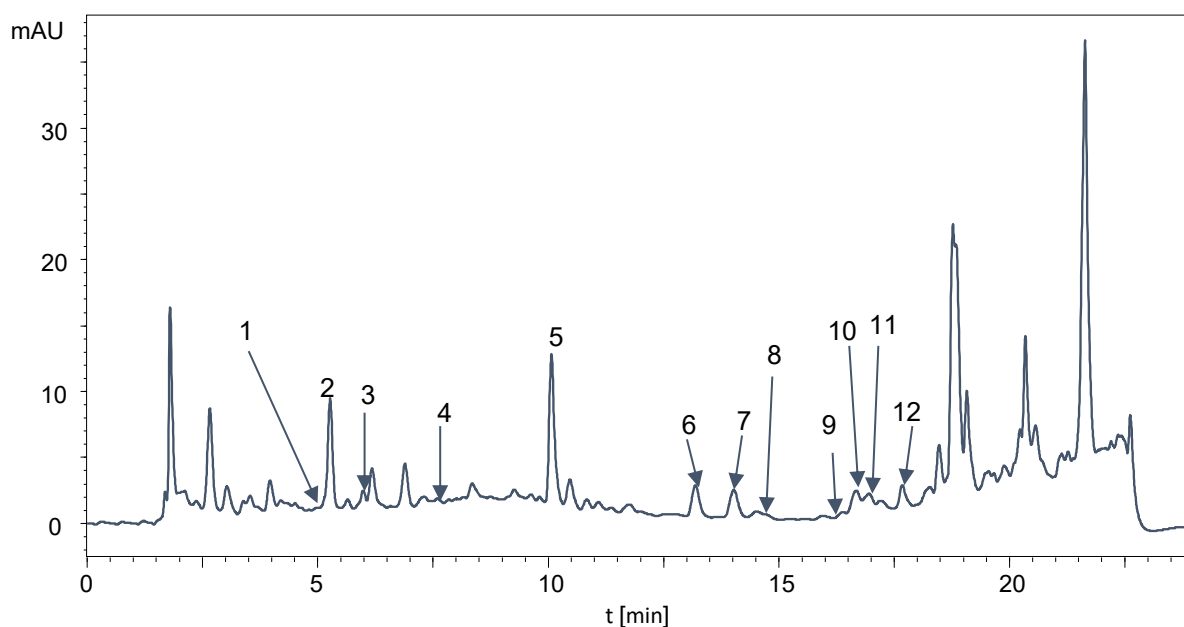
Obrázek P17: Separace fenolických látek – vzorek sušené bobule – čaj (C1) extrahované EtAc, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



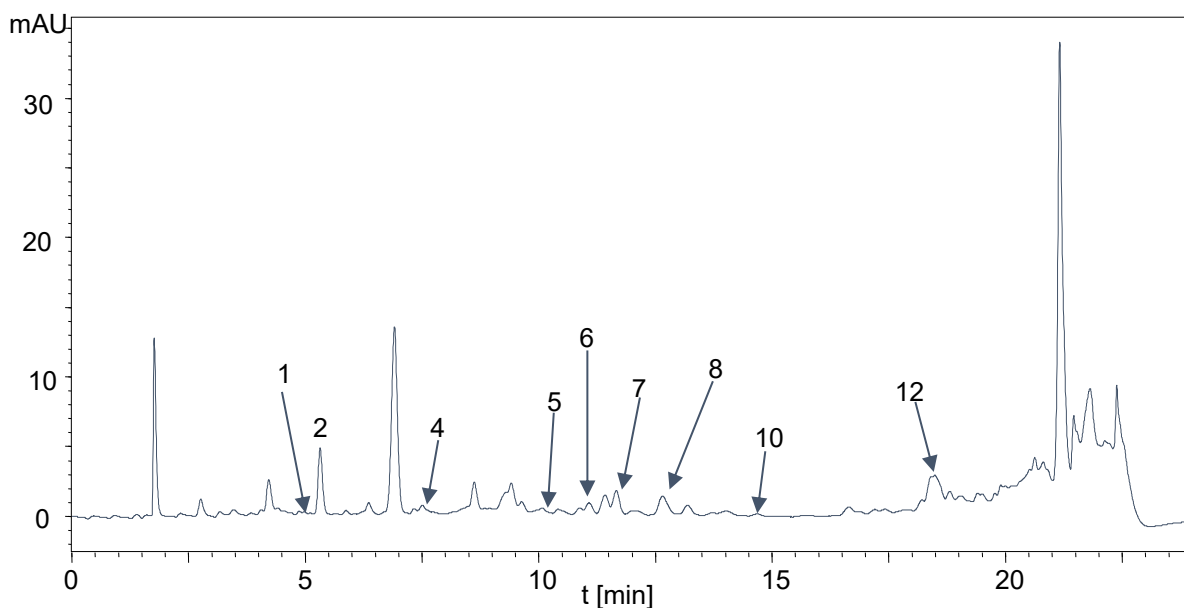
Obrázek P18: Separace fenolických látek – vzorek sušené bobule – čaj (C1) extrahované MeOH, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



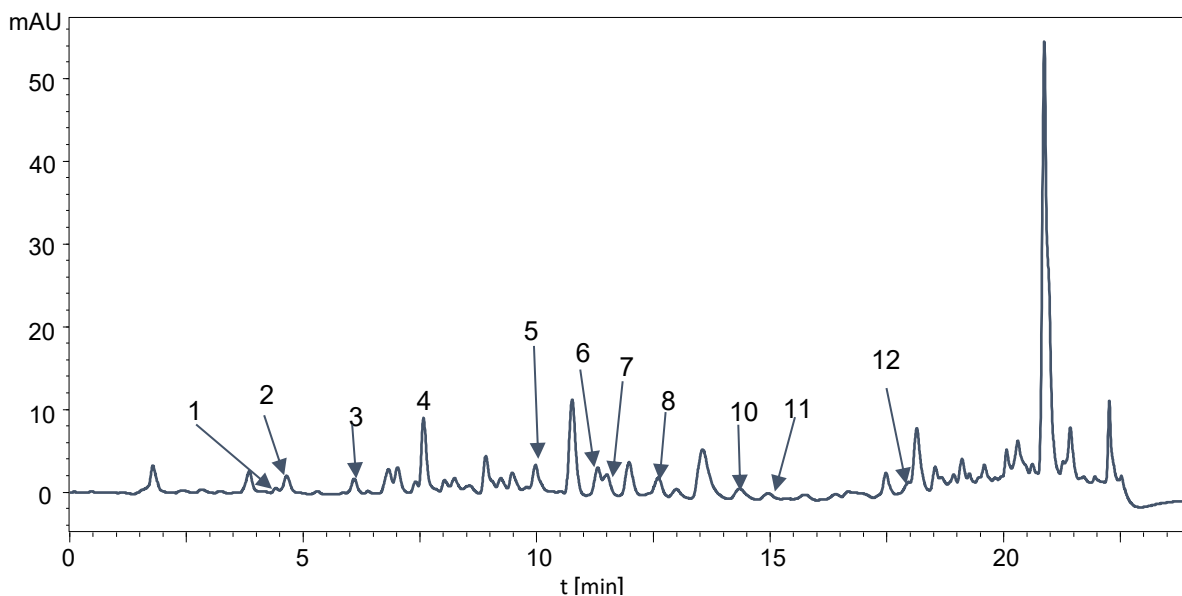
Obrázek P19: Separace fenolických látek – vzorek rakytník sušený – čaj s citronovou trávou (C2) extrahovaný EtAc, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



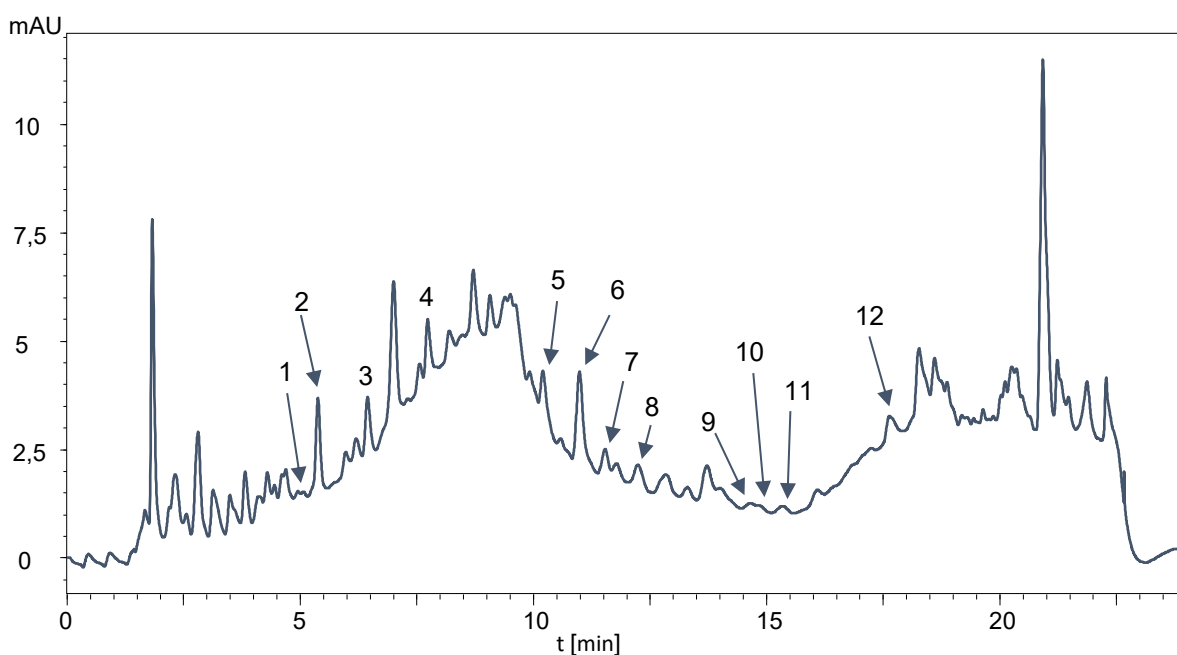
Obrázek P20: Separace fenolických látek – vzorek rakytník sušený – čaj s citronovou trávou (C2) extrahovaný MeOH, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



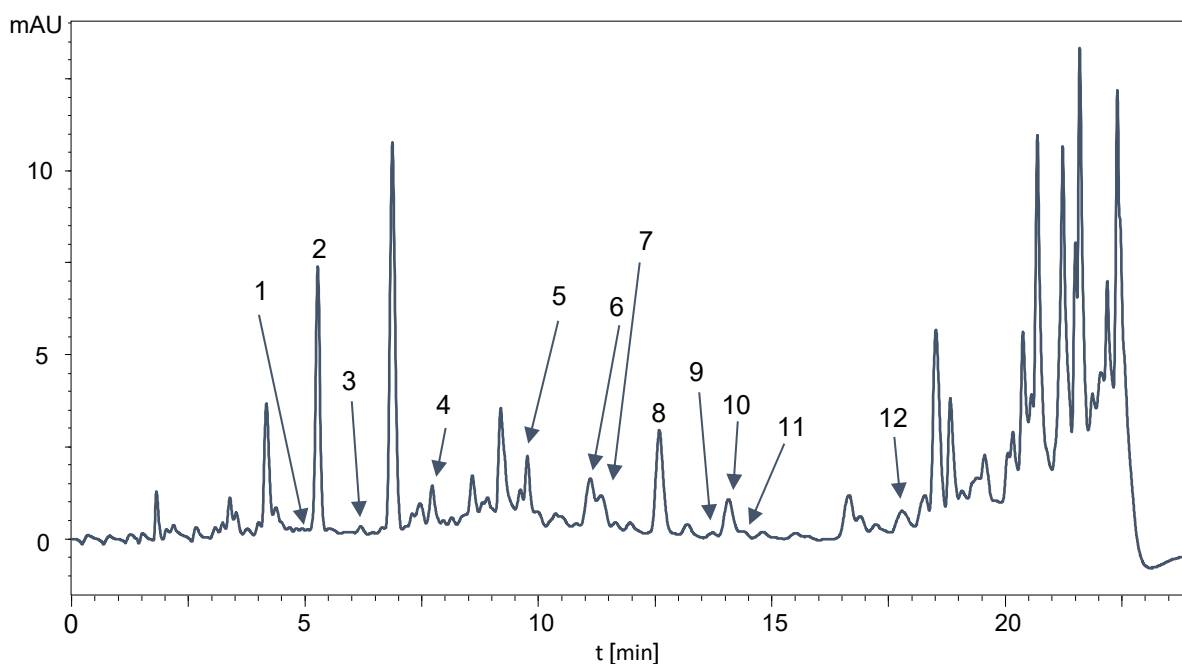
Obrázek P21: Separace fenolických látek – vzorek rakytníkový čaj sáčkový – Apotheke (C3) extrahovaný EtAc, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



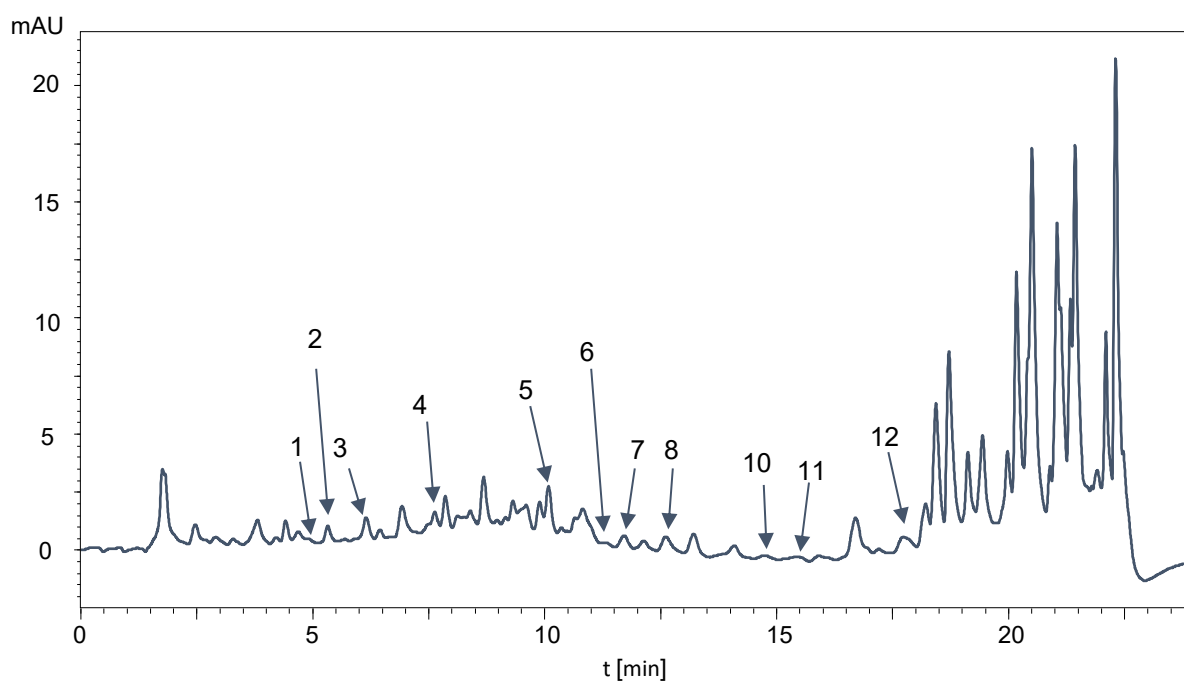
Obrázek P22: Separace fenolických látek – vzorek rakytníkový čaj sáčkový – Apotheke (C3) extrahovaný MeOH, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 320 nm



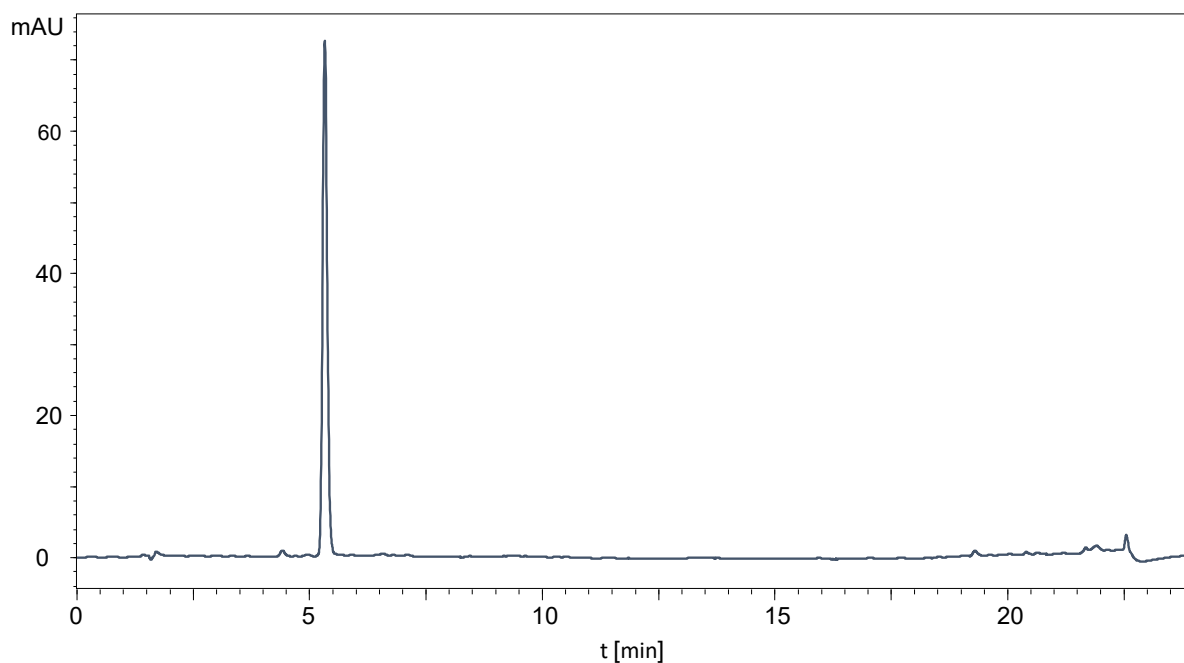
Obrázek P23: Separace fenolických látek – vzorek rakytníkový čaj sáčkový – Apotheke (C3) extrahovaný horkou vodou, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm

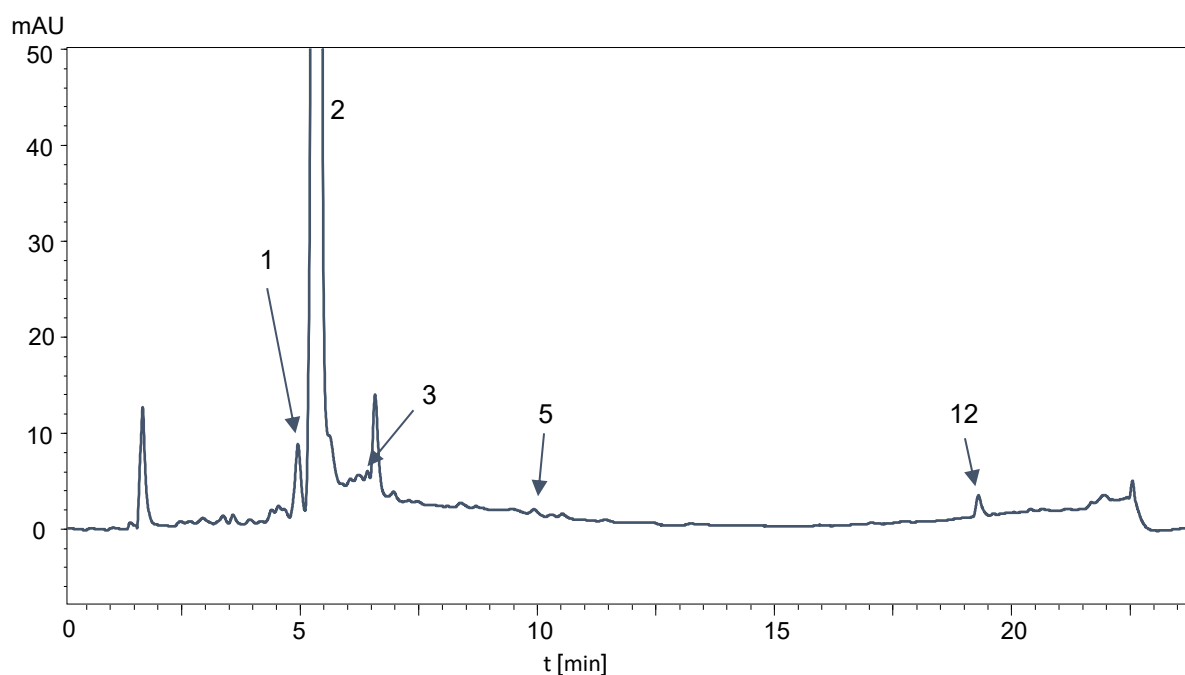


Obrázek P24: Separace fenolických látek – dětský rakytníkový čaj (C4) extrahovaný EtAc, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm

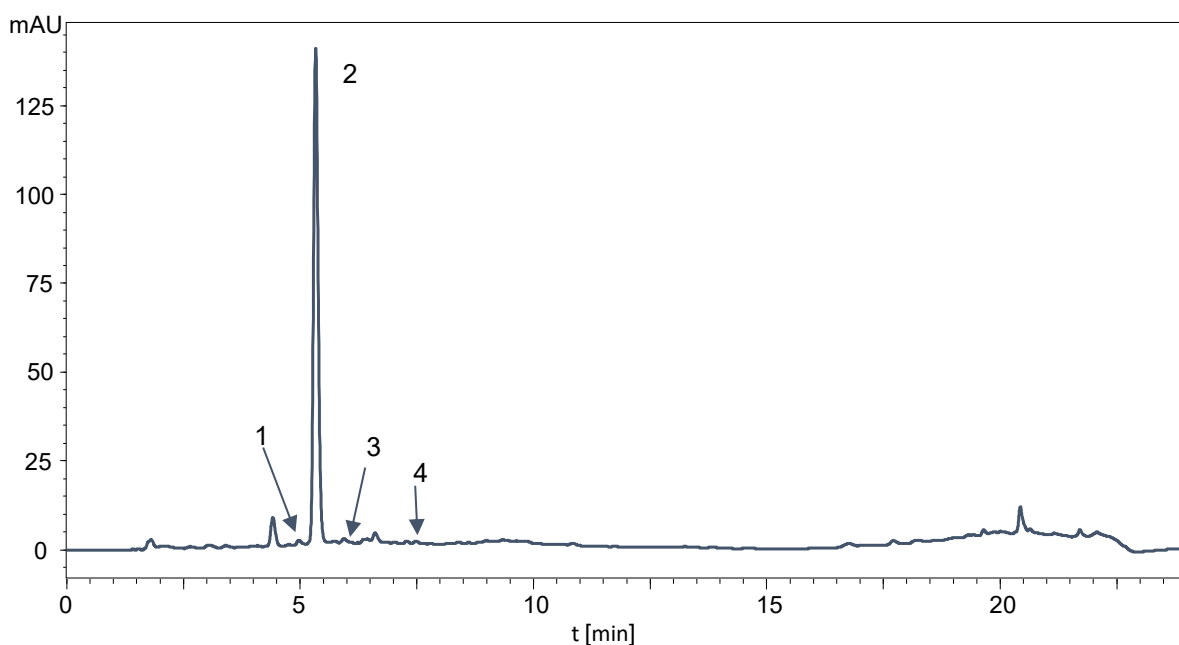


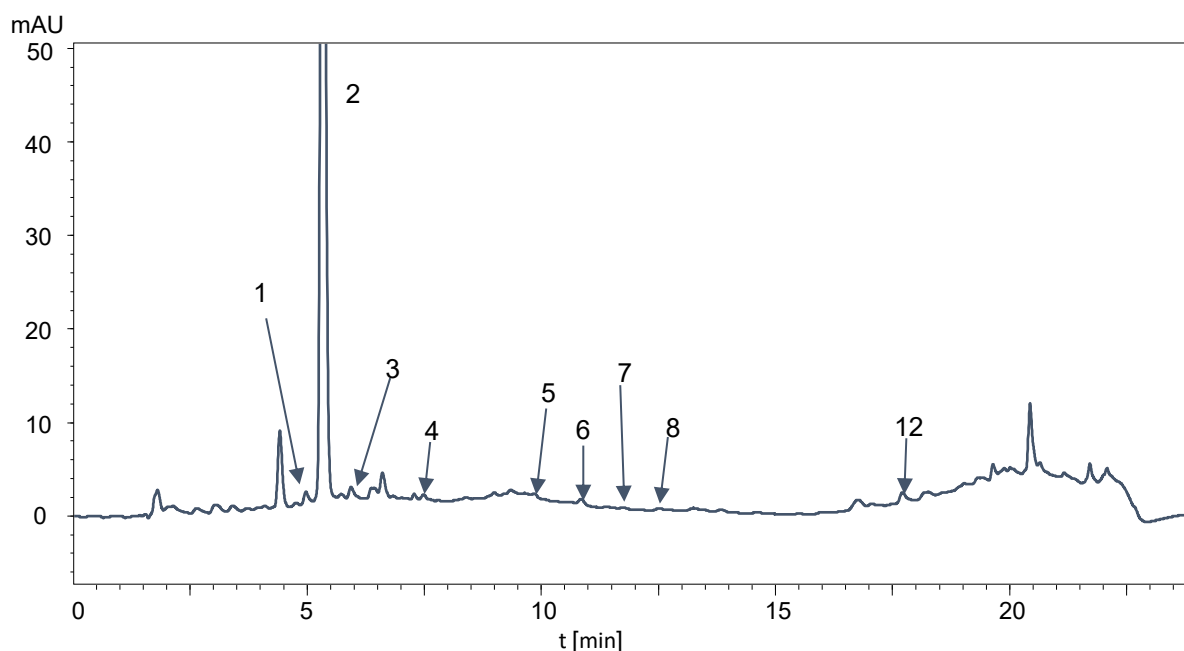
Obrázek P25: Separace fenolických látek – dětský rakytníkový čaj (C4) extrahovaný MeOH, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 320 nm



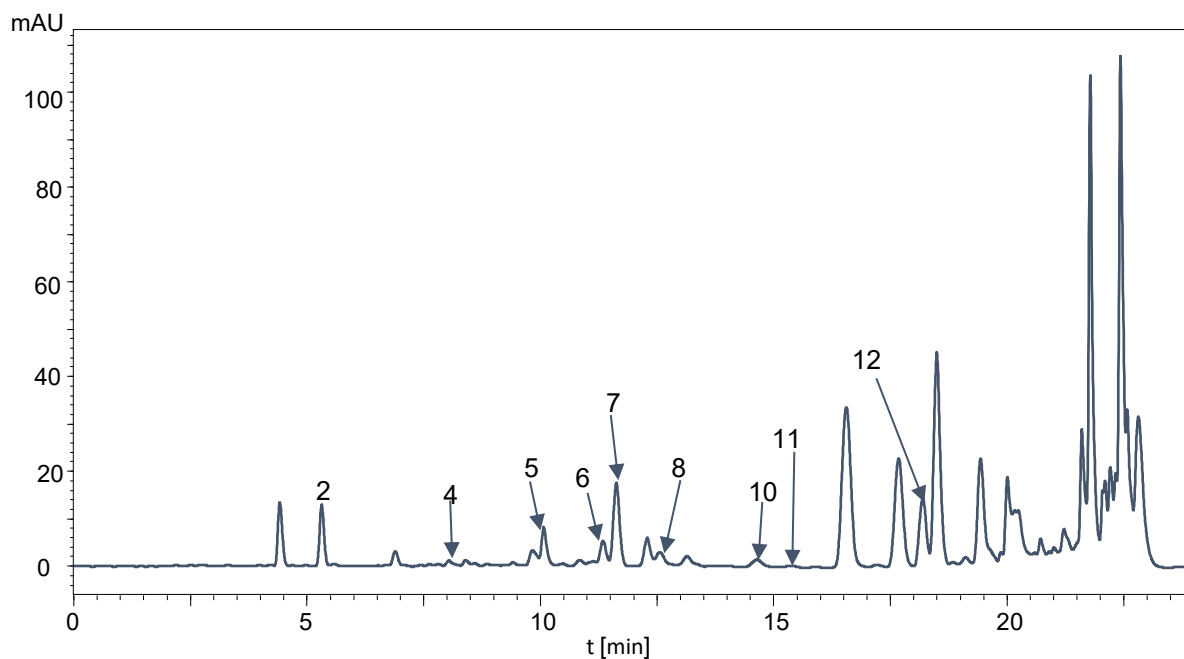


Obrázek P26: Separace fenolických látek – rakytník ovocná pomazánka (**R1**) extrahovaná MeOH, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μm), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 320 nm

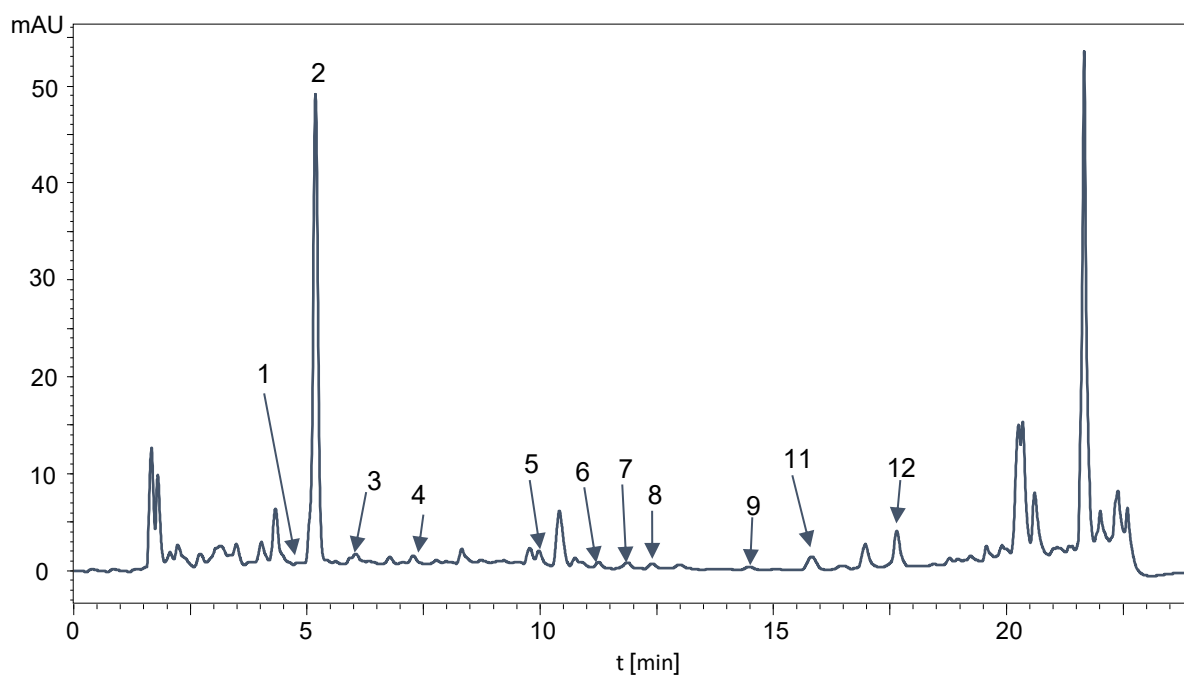




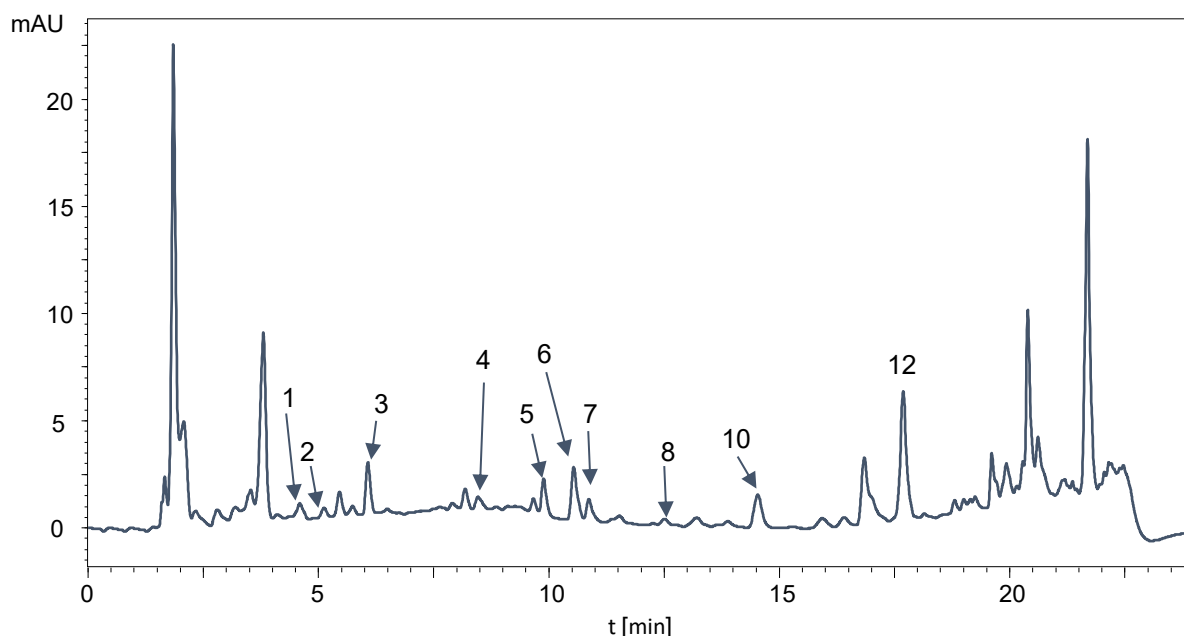
Obrázek P27: Separace fenolických látek – rakytník v medu (**R2**) extrahovaný MeOH, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 320 nm



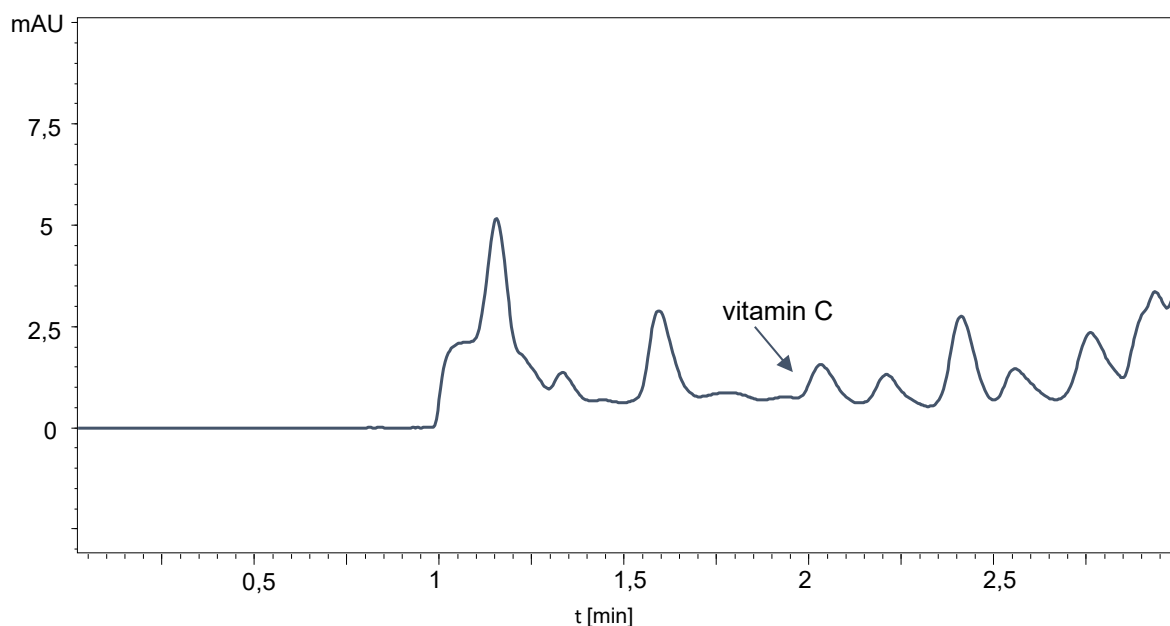
Obrázek P28: Separace fenolických látek – rakytník v medu nový (**R3**) extrahovaný EtAc, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 320 nm



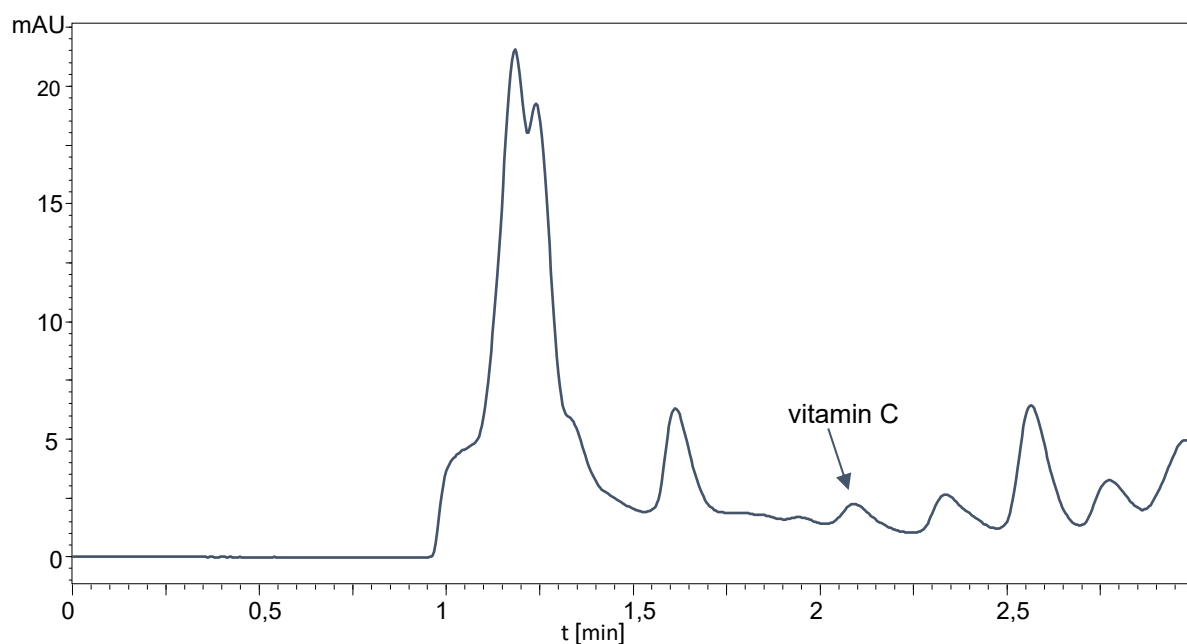
Obrázek P29: Separace fenolických látek – rakytník do jogurtu (R4) extrahovaný MeOH, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



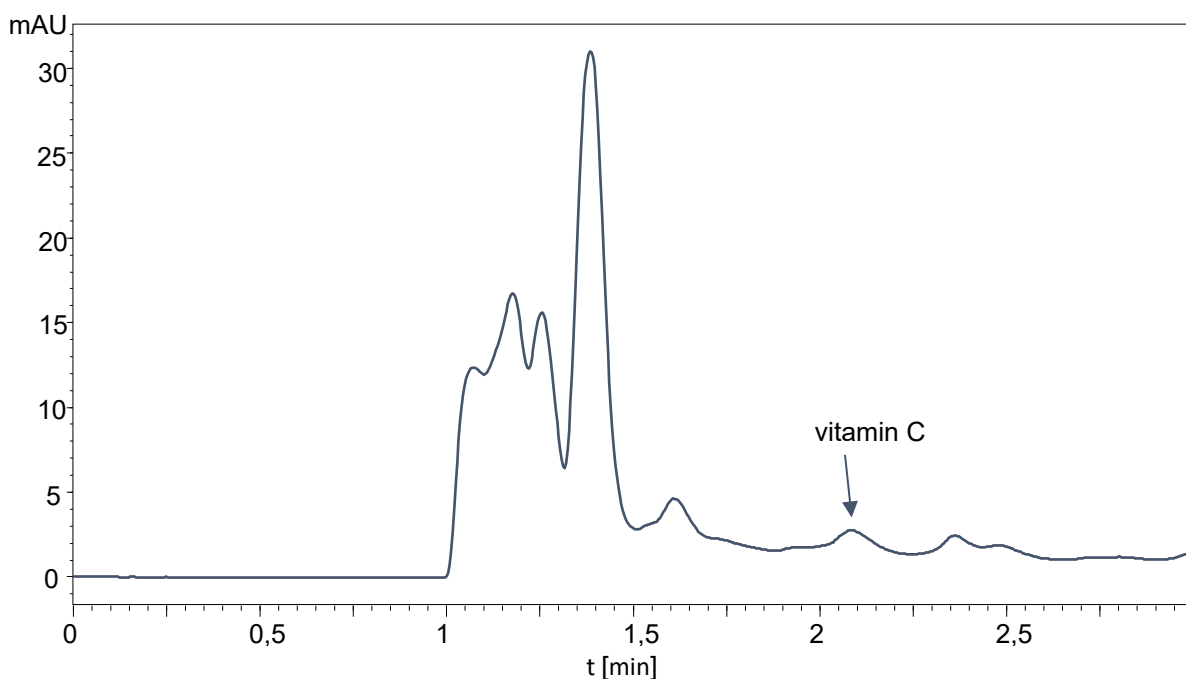
Obrázek P30: Separace fenolických látek – mražené bobule (M1) extrahované MeOH, kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7 μ m), mobilní fáze: MeOH/voda+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min - 10 %, 7 min - 41 %, 13 min - 43 %, 19 min - 70 %, 20 min - 80 % MeOH, průtok: 0,4 ml/min, dávkování 2 μ l, teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm



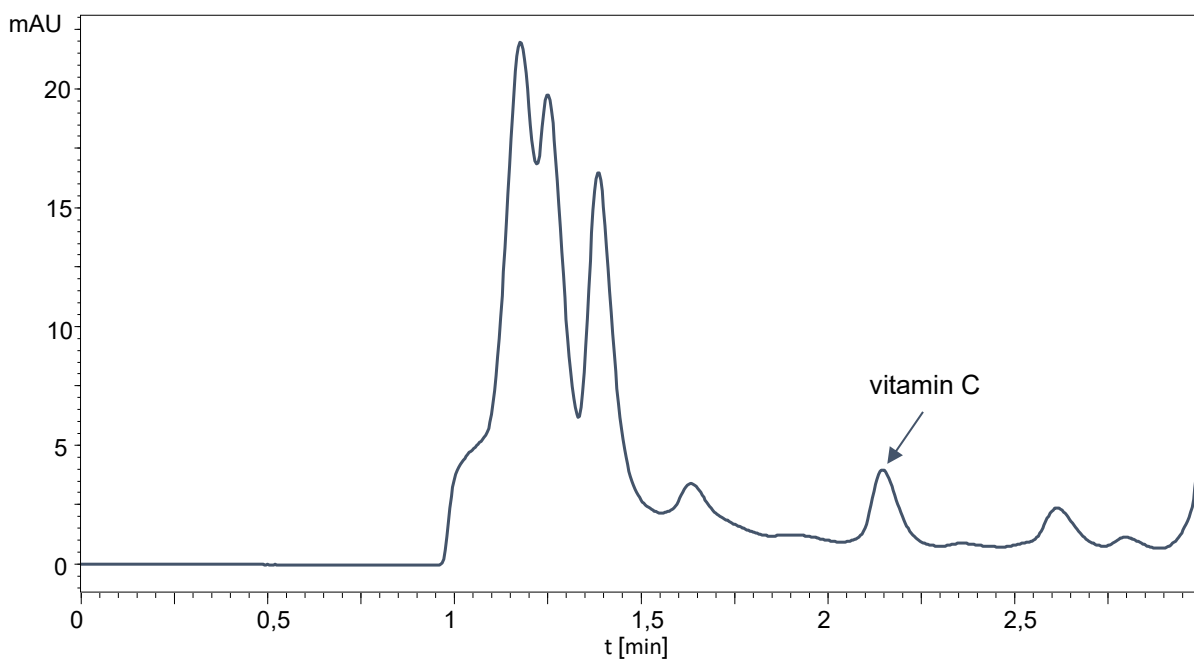
Obrázek P31: Optimalizace separace vitamínu C – vzorek sušených bobulí (C1), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, průtok: 0,5 ml/min, dávkování: 2 μl , teplota kolony 30°C, detekce při 280 nm.



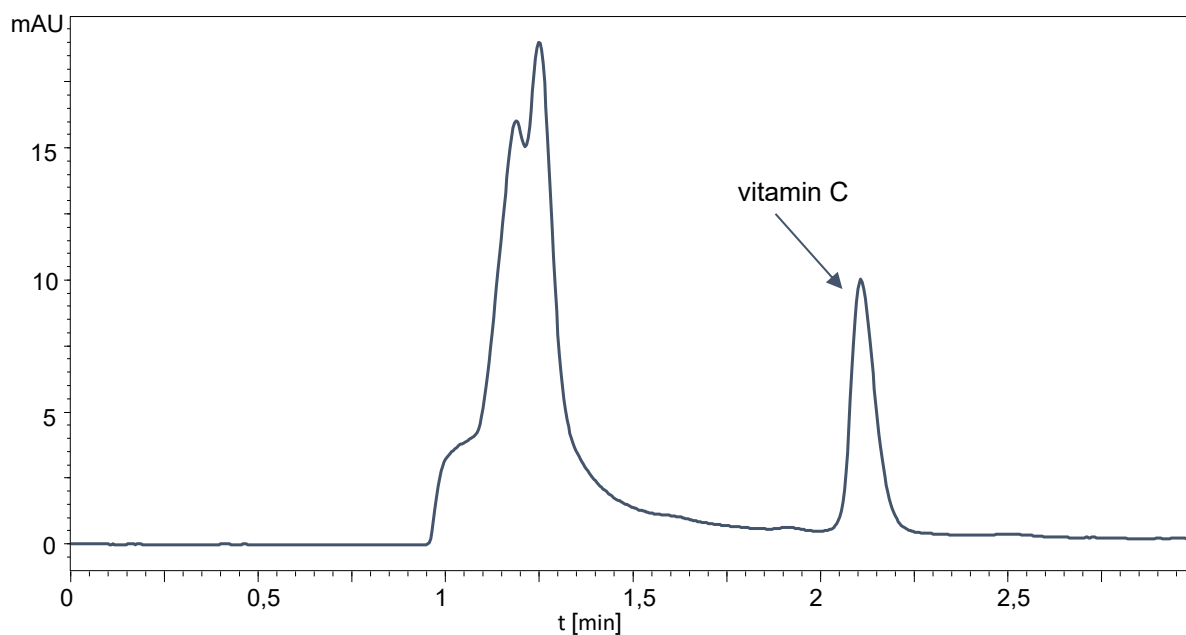
Obrázek P32: Separace vitamínu C – vzorek rakytník ovocná pomazánka (R1), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm



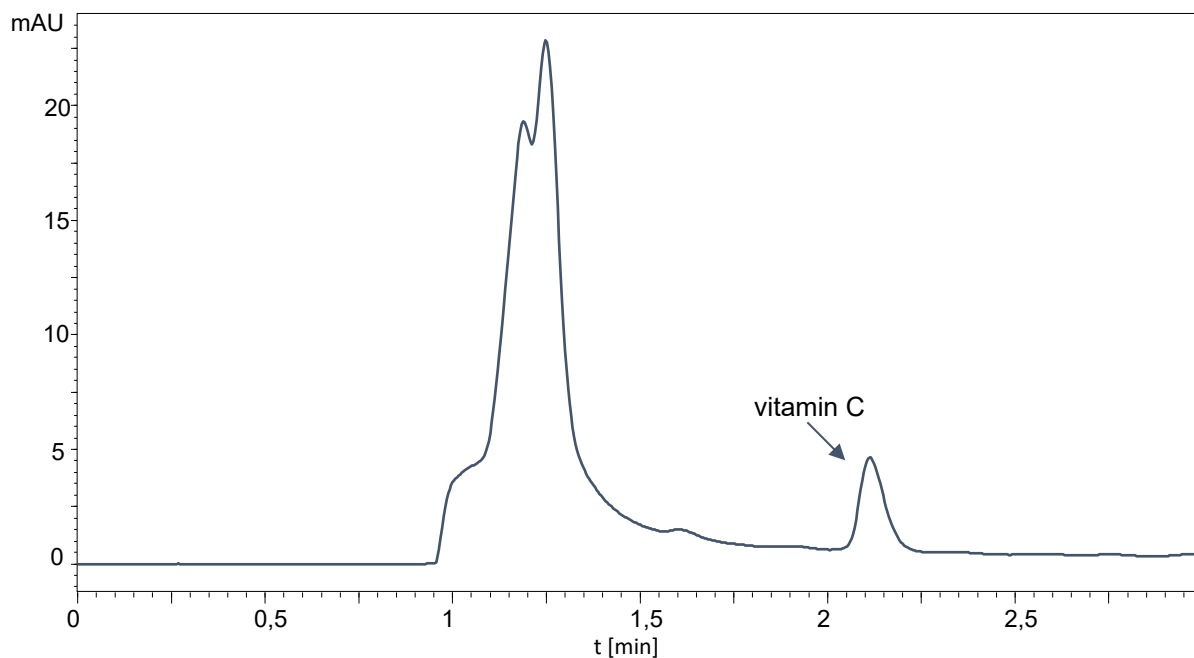
Obrázek P33: Separace vitamínu C – vzorek rakytník v medu (**R2**), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm



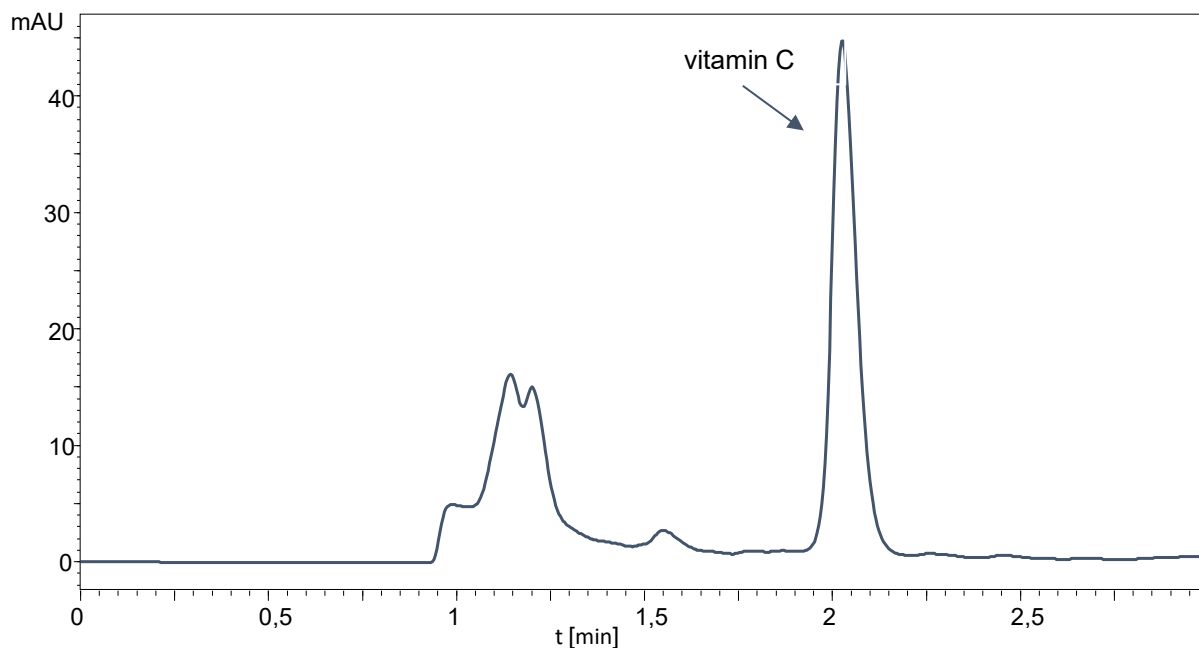
Obrázek P34: Separace vitamínu C – vzorek rakytník do jogurtu (**R4**), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm



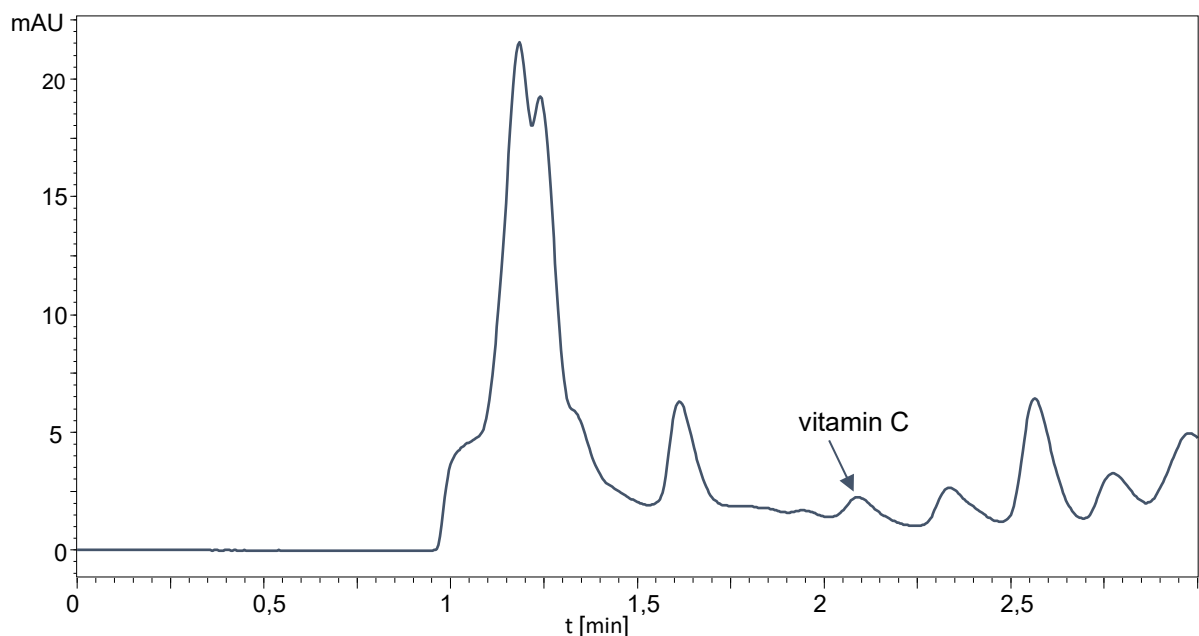
Obrázek P35: Separace vitaminu C – vzorek Organic sea berry powder (**E1**), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm



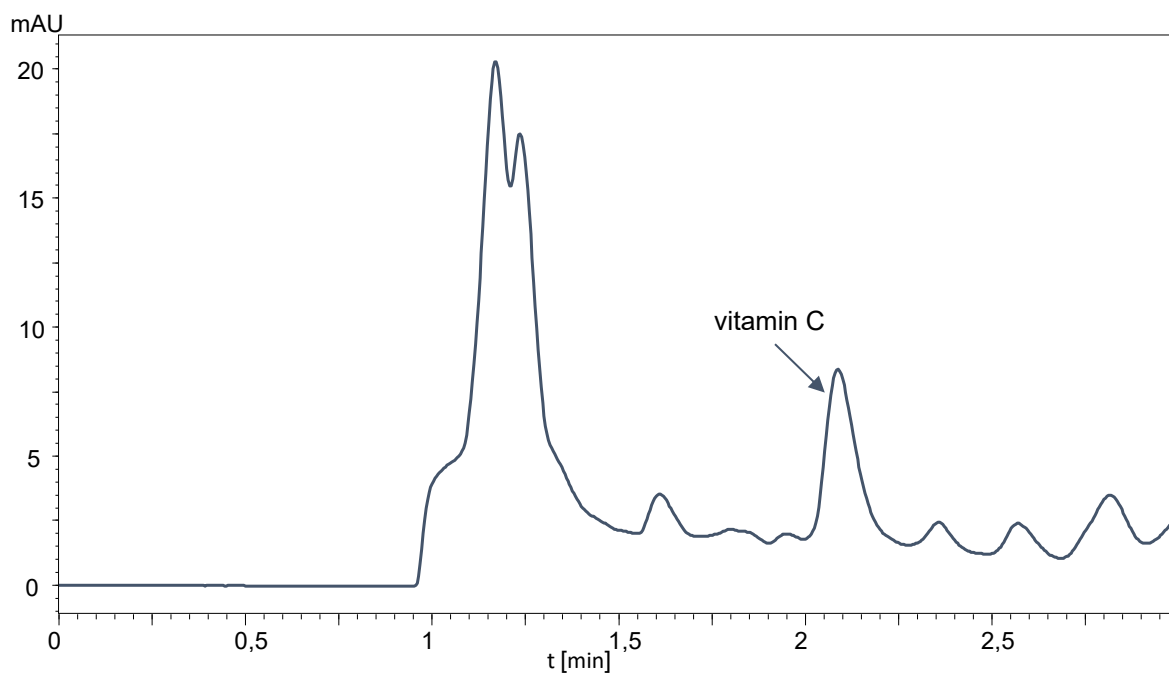
Obrázek P36: Separace vitaminu C – vzorek BIO rakytníková šťáva (**S1**) ředěná, kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm



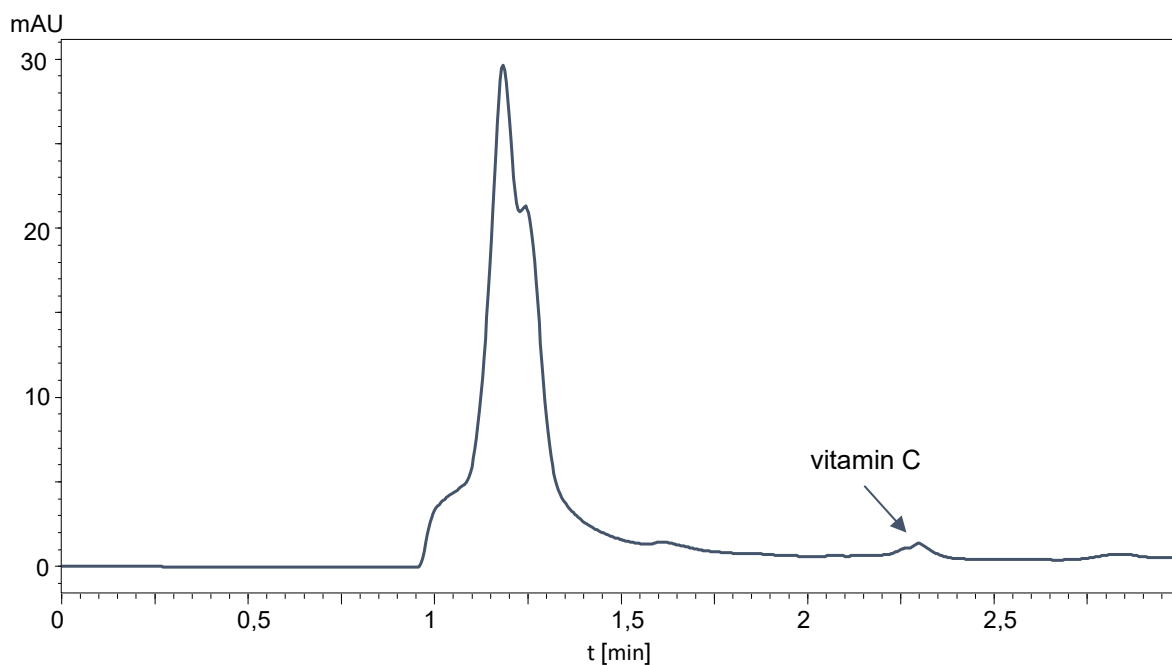
Obrázek P37: Separace vitamínu C – vzorek mražené bobule (M1), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm



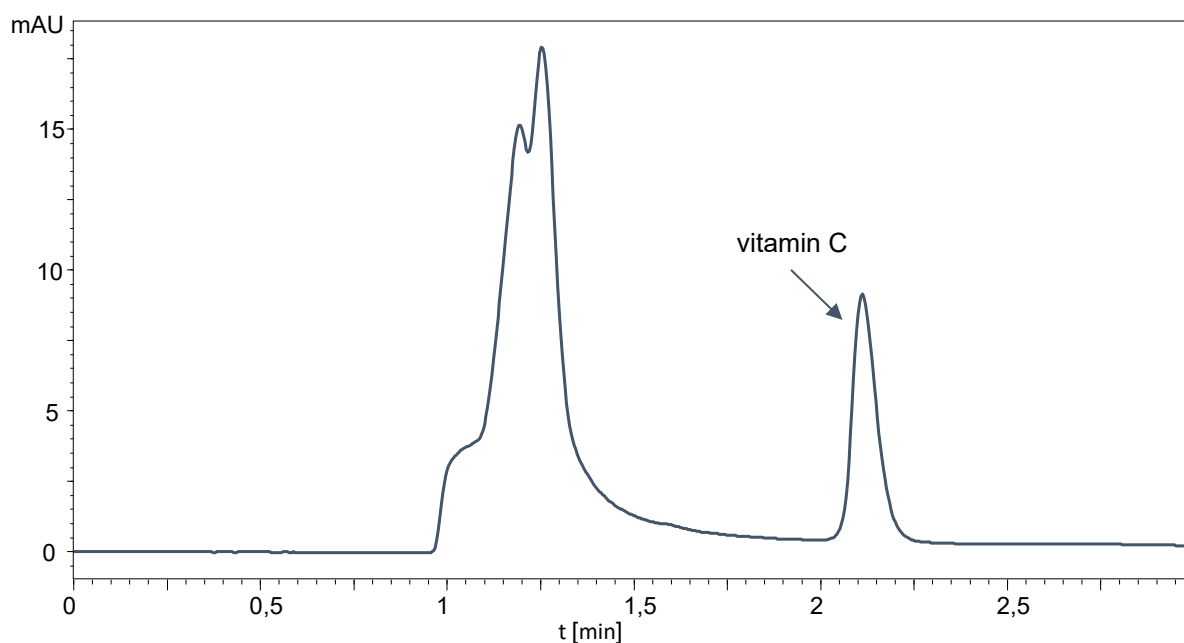
Obrázek P38: Separace vitamínu C – vzorek sušené bobule – čaj (C1), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm



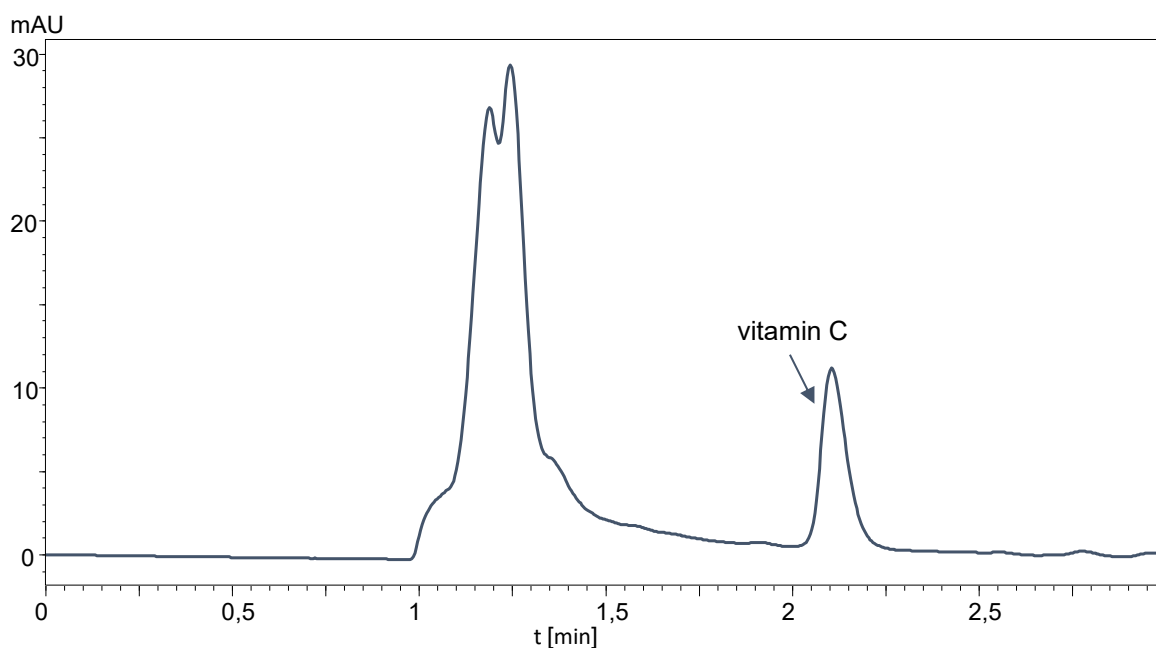
Obrázek P39: Separace vitamínu C – vzorek rakytník sušený – čaj s citronovou trávou (C2), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm



Obrázek P40: Separace vitamínu C – vzorek bylinné kapky rakytník (B1), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm



Obrázek P41: Separace vitamínu C – vzorek bylinný elixír rakytník (**B2**), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm



Obrázek P42: Separace vitamínu C – vzorek multivitaminové želatinky s rakytníkem (**G1**), kolona Kinetex Polar C18 (150 x 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze MeOH/voda+ H_3PO_4 (pH 2,8), gradient: 0 min - 0 %, 0,5 min - 0 %, 3 min - 80 %, 5 min - 0 % MeOH, dávkování: 2 μl , průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony 30°C, detekce při 244 nm