

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Ilona Chalupová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza biologicky aktivních látek v rakytníku řešetlákovém

Ilona Chalupová

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ilona Chalupová**  
Osobní číslo: **C15214**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Analýza biologicky aktivních látek v rakytníku řešetlákovém**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití moderních analytických technik v analýze vybraných biologicky aktivních látek v rakytníku řešetlákovém. Zaměřte se na úpravu vzorku před analýzou a samotnou analýzu pomocí separačních technik v kapalně fázi. Věnujte se rovněž spektrofotometrickým technikám pro sledování antioxidační aktivity.
2. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

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

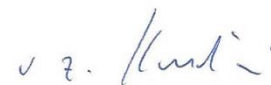
Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 7. 2018

.....

Ilona Chalupová

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, ochotu, trpělivost a cenné rady při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu během mého studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se věnuje analýze biologicky aktivních sloučenin obsažených v rakytníku řešetlákovém. Na začátku je uveden popis, využití, zpracování a chemické složení rakytníku. Dále jsou zmíněny jeho pozitivní účinky na lidský organismus a stručně popsány teoretické základy separačních technik v kapalně fázi a metod sledující antioxidační aktivitu látek. Další část práce je věnována analýze bioaktivních látek rakytníku řešetlákového pomocí kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

rakytník řešetlákový, extrakce, kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza

## **TITLE**

Analysis of biologically active compounds in sea buckthorn

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the analysis of biologically active compounds contained in sea buckthorn. The description, usage, processing and chemical composition of sea buckthorn is given in the beginning of the thesis. In addition, its positive effects on the human organism are mentioned and theoretical basics of liquid phase separation techniques and methods for antioxidant activity of the substances are briefly described. The other part of the thesis is devoted to the analysis of bioactive substances of sea buckthorn by liquid chromatography and capillary electrophoresis.

## **KEYWORDS**

sea buckthorn, extraction, liquid chromatography, capillary electrophoresis

# OBSAH

1	ÚVOD.....	12
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1	Rakytník řešetlákový.....	13
2.1.1	Zpracování a využití .....	14
2.2	Chemické složení .....	15
2.2.1	Vitamin C a další vitaminy .....	15
2.2.2	Tokoferoly a trienoly .....	16
2.2.3	Karotenoidy .....	16
2.2.4	Flavonoidy .....	17
2.2.5	Mastné kyseliny .....	18
2.2.6	Fytosteroly .....	18
2.2.7	Sacharidy .....	18
2.2.8	Organické kyseliny .....	19
2.2.9	Aminokyseliny.....	19
2.2.10	Minerály a další látky .....	19
2.2.11	Olej.....	19
2.3	Pozitivní účinky na lidský organismus .....	20
2.3.1	Ochrana kůže a účinek na sliznice.....	20
2.3.2	Antioxidační účinky.....	21
2.3.3	Antibakteriální, antivirové účinky a vliv na imunitní funkci.....	21
2.3.4	Vliv na kardiovaskulární systém.....	22
2.3.5	Hepatoprotektivní účinky .....	22
2.3.6	Antikarcinogenní účinek.....	23
2.4	Extrakce.....	23
2.4.1	Extrakce tuhé látky kapalinou.....	24
2.4.2	Extrakce z kapaliny do kapaliny .....	25



2.4.3	Extrakce na pevné fázi .....	25
2.5	Kapalinová chromatografie .....	25
2.6	Kapilární elektroforéza .....	27
2.7	Antioxidační aktivita .....	27
2.7.1	Stanovení antioxidační aktivity .....	28
2.7.1.1	Metoda ABTS .....	28
2.7.1.2	Metoda používající DPPH .....	29
2.7.1.3	Metoda používající galvinoxyl .....	29
2.7.1.4	Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace .....	29
2.7.1.5	Metoda ORAC .....	29
2.7.1.6	Metoda FRAP .....	29
2.7.1.7	Metoda CUPRAC .....	30
2.7.1.8	Stanovení celkového obsahu fenolických látek .....	30
2.8	Analýza biologicky aktivních látek v rakytníku .....	30
2.8.1	Úprava vzorku a extrakce látek obsažených v rakytníku .....	30
2.8.1.1	Extrakce polyfenolických látek .....	31
2.8.1.2	Extrakce nepolárních látek .....	33
2.8.1.3	Extrakce více sloučenin rozdílné povahy .....	33
2.8.2	Separace a stanovení látek obsažených v rakytníku .....	35
2.8.2.1	Analýza polyfenolických a jiných polárních látek .....	35
2.8.2.2	Analýza nepolárních látek .....	39
2.8.3	Příklady stanovení antioxidační aktivity látek obsažených v rakytníku .....	41
3	ZÁVĚR .....	43
4	POUŽITÁ LITERATURA .....	44

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1</b> – Trny a listy rakytníku .....	13
<b>Obrázek 2</b> – Plody rakytníku .....	14
<b>Obrázek 3</b> – Tokoferoly .....	16
<b>Obrázek 4</b> – $\beta$ -karoten .....	17
<b>Obrázek 5</b> – Flavan .....	17
<b>Obrázek 6</b> – Soxhletův extraktor .....	24
<b>Obrázek 7</b> – Schéma HPLC .....	26
<b>Obrázek 8</b> – Srovnání výtěžků flavonoidů získaných různými typy extrakce .....	33
<b>Obrázek 9</b> – Chromatogram a UV spektra vzorku dužiny rakytníku .....	36
<b>Obrázek 10</b> – Chromatogram a UV spektra vzorku semen rakytníku .....	37
<b>Obrázek 11</b> – Vliv přidavku kyseliny octové na retenční koeficient .....	38
<b>Obrázek 12</b> – Obsah karotenoidů v různých šťávách .....	40
<b>Obrázek 13</b> – Hodnocení antioxidační aktivity u různých druhů šťáv .....	41
<b>Tabulka 1</b> – Vliv různých faktorů při SWE na výtěžek .....	32
<b>Tabulka 2</b> – Srovnání výtěžků při použití různých rozpouštědel u běžné extrakce .....	32
<b>Tabulka 3</b> – Vliv extrakčních podmínek na výtěžky jednotlivých složek rakytníku .....	35

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ABTS	[2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)]
$\alpha$ -T	$\alpha$ -tokoferol
$\alpha$ -TE	ekvivalenty $\alpha$ -tokoferolu
BHT	butylhydroxytoluen
CA	katechin
CE	kapilární elektroforéza
CUPRAC	metoda stanovení antioxidační aktivity založená na redukci měďnatých komplexů (Cupric reducing antioxidant capacity)
DAD	detektor s diodovým polem
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DPPH	[1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl]
DPPH-H	difenylpikrylhydrazyl
EAE	enzymaticky asistovaná extrakce
ESI	ionizace elektrosprejem
Fe <sup>3+</sup> -TPTZ	Fe <sup>3+</sup> -2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
FRAP	metoda stanovení antioxidační aktivity založená na redukci železitých komplexů (Feric reducing antioxidant potential)
GA	kyselina gallová
GAE	ekvivalent kyseliny gallové
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	isorhamnetin
KA	kaempferol
kys.	kyselina
lat.	latinsky
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
LPSC	metoda chemiluminiscence využívající luminol
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometrie
NP	system s normálními fázemi
ORAC	metoda stanovení antioxidační aktivity založená na zhášení

	fluorescence (Oxygen radical absorbance capacity)
PLE	tlaková kapalinová extrakce
PR	kyselina protokatechinová
QU	kvercetin
RP	system s obrácenými fázemi
RU	rutin
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou
SWE	extrakce nadkritickou vodou
TPC	celkový obsah fenolických látek (Total phenolic content)
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření

# 1 ÚVOD

Rakytník řešetlákový patří do čeledi hlošínovitých a přirozeně se vyskytuje na území Asie a Evropy. Již v dřívějších dobách byl využíván pro vysoký obsah cenných látek v tradiční lidové medicíně a v dnešní době je právem řazen mezi superpotravinu. Při užívání rakytníku a jeho extraktů byly zaznamenány pozitivní léčivé účinky na lidský organismus. Využívá se především pro jeho antioxidační vlastnosti a pro ochranu kůže a sliznic.

Rakytník je opravdu bohatým zdrojem biologicky aktivních látek. Každá část rostliny (plody, semena, listy, ...) je využitelná a něčím cenná. Jeho části v různém zastoupení obsahují vitamíny, tokoferoly a tokotrienoly, karotenoidy, flavonoidy, mastné kyseliny, fytosteroly, sacharidy, organické kyseliny, minerály a další látky. Množství těchto látek se může u jednotlivých rostlin lišit, jelikož je závislé na mnoha faktorech, jako jsou klimatické podmínky, poddruh rostliny, doba sklizně a zralost plodů.

I přes jejich kyselou chuť se bobule rakytníku zpracovávají a vyrábí se z nich mnoho produktů: sirupy, džusy, džemy, a přidávají se do cukrovinek. Listy slouží k výrobě čajů a velice cenný je rakytníkový olej získaný z plodů (ze semen i dužiny). Rakytník našel díky atraktivnímu složení široké využití nejen ve farmaceutickém a v potravinářském průmyslu, ale také v kosmetickém, a to např. při výrobě šampónů, krémů či mýdel.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Rakytník řešetlákový

Rakytník (latinsky Hippophae) se řadí do čeledi hlošinovitých (lat. Elaeagnaceae). Rozlišujeme čtyři základní druhy rakytníku: rakytník řešetlákový (lat. Hippophae rhamnoides L.), rakytník vrbolistý, rakytník tibetský a rakytník žebrovitý. Jednotlivé druhy rakytníku se liší například výškou vzrůstu, nároky na půdu či růstem v jiných nadmořských výškách [1].

Rakytník řešetlákový se řadí mezi keře nebo stromy vysoké obvykle 0,5–6 m, ale může dosahovat výšky až 15 m, zejména u asijských populací, a jeho typickým znakem jsou trny (obrázek 1) na větvích, jejichž množství je však velmi proměnlivé [1; 2]. U mladých výhonků je kůra světlá, hladká a zelenošedá, dvouleté výhony mají kůru šedou až hnědou. S přibývajícím věkem rostliny tmavne a mění se v rozpukanou odlupující se borku [1; 3]. Úzce lineární, celokrajné, stříbřité, šupinaté listy (obrázek 1) jsou na ostnatých větévkách uspořádány střídavě. Rostlina je dvoudomá. Malé, zelenožluté samčí (prašnickové) a samičí (pestíkové) květy jsou tedy umístěny na oddělených rostlinách [1; 4]. Plodem rakytníku je nepravá bobule nebo nepravá peckovice. Zbarvení oválných plodů (obrázek 2) je závislé na obsahu karotenoidů, proto se můžeme setkat s plody běložlutými, žlutými, oranžovými až červenými (obrázek 2) [1].



**Obrázek 1** – Trny a listy rakytníku [Fotoautor: Ilona Chalupová]



**Obrázek 2** – Plody rakytníku [Fotoautor: Ilona Chalupová]

Přirozený areál výskytu rakytníku je poměrně rozlehlý. Zahrnuje západní a jižní Evropu, Skandinávii, Alpy, Apeniny i Karpaty, dále Malou Asii, Kavkaz, pohoří Střední Asie a jižní Sibiře, také Mongolsko, Himaláje, Tibetskou plošinu a Severočínskou hornatinu. Rakytník je velmi odolnou dřevinou s nitrogenními bakteriemi na kořenech, která snáší i silné mrazy a není náročná na půdu [2; 5].

Vědecký název rostliny (*Hippophae rhamnoides* L.) je odvozen od „hippos“ – kůň a „phaes“ – lesk, neboť ve starověkém Řecku krmili rakytníkem koně a ti měli poté lesklou srst [1; 6].

### **2.1.1 Zpracování a využití**

Díky vysokému obsahu vitamínů, minerálních a dalších cenných látek byl rakytník už v 8. stol. n. l. využíván jako léčivo, čemuž je tak dodnes. V dnešní době je na trhu velké množství produktů z rakytníkových plodů. Přípravují se z nich džemy, šťávy, likéry, dezerty, víno, džusy, kompoty a další. Plody jsou sice začerstva kyselé, ovšem když se dosladí, mají příjemnou ovocnou chuť. K léčivým účelům se využívají také masti vyrobené z rakytníku, čaje ze sušených listů, které mají hlavně protivirové účinky, nebo odvar z vysušené kůry, který obsahuje zajímavé množství serotoninu, vápníku a manganu [1; 2; 7].

Význačným produktem je rakytníkový olej, který je pro své žádoucí fyzikální vlastnosti využíván i při výrobě kosmetiky a potravinových doplňků [8]. Olej je především silný absorbent UV-B záření, má regenerační, protizánětlivé a antibakteriální účinky [1; 8].

Rakytník se využívá také jako okrasná dřevina a díky svému kořenovému systému navíc zpevňuje půdu. Ze dřeva se dříve vyráběly kulečnickové koule, hůlky i dýmky [2].

## 2.2 Chemické složení

Vegetativní části rakytníku řešetlákového mají jedinečné chemické složení. Všechny části rostliny (listy, větve, výhonky, kůra, kořeny a plody) jsou považovány za dobrý zdroj biologicky aktivních látek [9; 10]. Koncentrace látek se liší v závislosti na původu, klimatu, způsobu extrakce, doby sklizně [9; 11], poddruhu, zralosti a velikosti plodů [12]. Výzkum a zpracování rakytníku se zaměřuje především na plody, ale také na semena a jejich olej [9]. Rakytník je známý pro svou nutriční hodnotu a příznivý účinek na lidský organismus. Mezi nejvýznamněji zastoupené látky patří flavonoidy, karotenoidy, vitamíny (C, B a K), tokoferoly a trienoly, mastné kyseliny, organické kyseliny (kys.), aminokyseliny, steroly a další [13].

### 2.2.1 Vitamin C a další vitaminy

Vitaminy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, především přírodní složky potravin, ve kterých jsou přítomny v malém množství. Jelikož je člověk až na výjimky nedokáže syntetizovat, je potřeba pro správnou funkci organismu vitaminy tělu dodávat. Díky svým funkcím bývají označovány za exogenní esenciální biokatalyzátory [14; 15].

Přítomnost vitaminů v těle je zásadní, a proto v případě jejich nedostatku dochází k poruchám fyziologických funkcí, jako je růst, vývoj atd. Nedostatek vitamínu v těle je označován jako hypovitaminóza, kdy není vitamin dodáván v dostatečném množství, a může dojít až k avitaminóze, což značí úplný nedostatek vitamínu. Naopak hypervitaminóza představuje stav vyvolaný nadbytečným příjmem lipofilních vitaminů [14; 15]. Vitaminy dělíme do dvou kategorií: na hydrofilní (rozpuštěné ve vodě) a lipofilní (rozpuštěné v tucích). Mezi vitaminy rozpustné v tucích řadíme vitamin A, D, E a K, do skupiny vitaminů rozpustných ve vodě spadají vitaminy B-komplexu a vitamin C [14; 15].

Vitamin C je označení pro všechny sloučeniny vykazující biologickou aktivitu kyseliny askorbové. Jedná se o hlavní hydrofilní antioxidant v plazmě a tkáních. Přílišný nedostatek se projevuje syndromem zvaným skorbut neboli kurděje [14; 15]. Rakytník je známý právě díky neobyčejně vysokému obsahu vitamínu C v plodech [13], jehož koncentrace závisí samozřejmě na odrůdě či přírodních podmínkách [16] a pohybuje se v rozmezí od 360 mg/100 g dokonce až do 2500 mg/100 g [13]. Koncentrace vitamínu C je značně vyšší než v plodech černého rybízu, malinách [17], pomerančích nebo kiwi [13].

Vitamin K hraje významnou roli při srážení krve a formování kostí [15]. Jeho nedostatek může vést k poruchám hemokoagulace [14]. Bobule rakytníku jsou na vitamin K také bohaté [18].

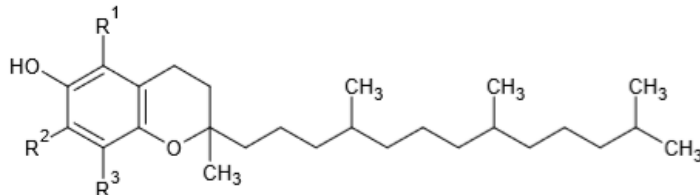


Do skupiny vitaminů B-komplexu spadá thiamin (B<sub>1</sub>), riboflavin (B<sub>2</sub>), niacin, pyridoxin (B<sub>6</sub>), kyselina pantothenová (B<sub>5</sub>), biotin, kyselina listová (folacin) a kobalamin (B<sub>12</sub>) [15]. V rakytníkových plodech se z této skupiny vitaminů nachází vitamin B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> [13; 16].

### 2.2.2 Tokoferoly a trienoly

Vitamin E zahrnuje osm základních derivátů benzopyran-6-olu, jejichž společným základem jsou tokol a tokotrienol. Čtyři deriváty odvozené od tokolu jsou označovány jako tokoferoly (obrázek 3) a čtyři formy odvozené od tokotrienolu se nazývají tokotrienoly. Vzájemně se liší počtem a polohou methylových skupin v chromanovém cyklu, strukturou postranního řetězce (nenasycený u tokotrienolů, nasycený u tokoferolů), a biologickou aktivitou [14].

Vitamin E, zejména  $\alpha$ -tokoferol, je nejdůležitějším lipofilním antioxidantem, který chrání nenasycené lipidy před poškozením reaktivními druhy kyslíku [14]. Ve vyšších dávkách není v zásadě toxický, naopak působí příznivě, a to například snižováním oxidace nízkodenzitního lipoproteinu (LDL), což vede k snížení rizika vzniku aterosklerózy [15]. Dobrým zdrojem tokoferolů jsou semena i dužina plodů rakytníku [19].



**Obrázek 3** – Tokoferoly [vytvořeno v ChemSketch]

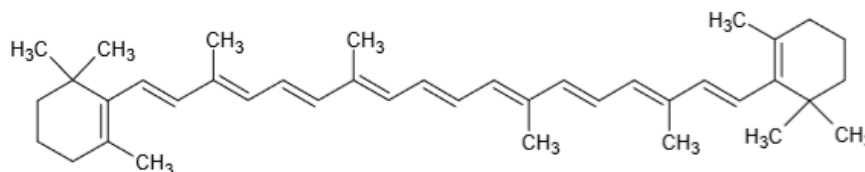
(R<sup>1,2,3</sup> = CH<sub>3</sub>  $\alpha$ -tokoferol; R<sup>1,3</sup> = CH<sub>3</sub> a R<sup>2</sup> = H  $\beta$ -tokoferol;

R<sup>1</sup> = H a R<sup>2,3</sup> = CH<sub>3</sub>  $\gamma$ -tokoferol; R<sup>1,2</sup> = H a R<sup>3</sup> = CH<sub>3</sub>  $\delta$ -tokoferol)

### 2.2.3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou převážně lipofilní žluté, oranžové až červené pigmenty produkované rostlinami. Strukturou se řadí mezi tetraterpeny, které obsahují osm izoprenových jednotek. Jsou rozděleny na dvě základní skupiny: karoteny (uhlovodíky) a xanthofyly (kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů) [15; 20; 21]. Některé z nich vykazují aktivitu vitaminu A a nazývají se provitaminy A. Díky řetězci konjugovaných dvojných vazeb získávají svoji barvu, která je využívána rostlinou pro příjem světla za účelem fotosyntézy, a určité karotenoidy, jako například lykopen, astaxanthin či  $\beta$ -karoten, jsou schopny zhaset volné

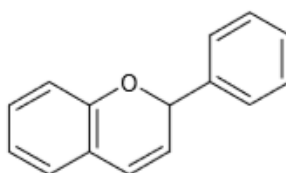
radikály, tudíž vykazují silné antioxidační schopnosti [15; 20]. Hodnoty antioxidační kapacity karotenoidů jsou závislé na jejich strukturních vlastnostech (např. počet dvojných vazeb, navázané funkční skupiny) [22]. Mezi nejvíce zastoupené karotenoidy v plodech rakytníku patří  $\beta$ -karoten (obrázek 4),  $\alpha$ -karoten,  $\gamma$ -karoten, dihydroxy- $\beta$ -karoten, lykopen, zeaxanthin a další [19].



**Obrázek 4** –  $\beta$ -karoten [vytvořeno v ChemSketch]

#### 2.2.4 Flavonoidy

Tato obsáhlá skupina rostlinných fenolů obsahuje ve své struktuře dva benzenové kruhy propojené tříuhlíkovým řetězcem. Flavonoidy jsou odvozeny od *2H*-chromenu (kyslíkatá heterocyklická sloučenina), který je substituován fenylovou skupinou a nese název flavan (obrázek 5). Rozlišujeme tyto základní flavonoidní látky: katechiny, leukoanthokyanidiny, anthokyany, flavanony, flavanonoly, flavony a flavonoly. Jednotlivé struktury se od sebe liší stupněm oxidace a substituce, kdy jsou substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami. Počet a poloha hydroxyskupin ve struktuře flavonoidů určuje sílu antioxidační aktivity. Nejčastěji se vyskytují ve formě glykosidů. Některé flavonoidy vystupují jako přírodní barviva, jiné mají charakteristickou chuť (hořké a trpké látky) nebo biologické účinky. Nejvýznamnější flavonoidní pigmenty jsou flavony a flavonoly zbarvené žlutě a také anthokyany, hlavně červené, fialové a modré barvy [23]. Průměrný obsah flavonoidů se pohybuje okolo 354 mg/100 g čerstvých plodů [13]. Nejvíce se jich nachází v listech, květech a plodech, ale určité množství nalezneme také ve větvích a kůře rakytníku [9; 10]. Hlavními flavonoidy jsou kvercetin, kaempferol, isorhamnetin, myricetin a jejich glykosidy [9; 24].



**Obrázek 5** – Flavan [vytvořeno v ChemSketch]

### 2.2.5 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou nejpodstatnější složkou lipidů a strukturně se jedná převážně o karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Podle nasycení řetězce se dělí na nasycené mastné kyseliny, nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monoenové), nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami (polyenové) a na mastné kyseliny s trojnými vazbami a s různými substituenty [14].

Nasycené (saturované) MK mají většinou lineární nerozvětvený řetězec. Lipidy potravin obsahují především kyselinu palmitovou, stearovou nebo myristovou. Mezi monoenové MK patří například kyselina palmitoolejová či olejová. Kyseliny arachidonová, linolová,  $\alpha$ -linolenová spadají pod polyenové MK, které jsou velmi důležité z hlediska výživy [14].

V semenném oleji rakytníku dominuje kyselina linolová a  $\alpha$ -linolenová, dalšími hlavními kyselinami jsou kyselina olejová, palmitová či stearová. Dužina se slupkou plodů má odlišné složení, které je charakteristické vysokou hladinou kyseliny palmitoolejové, dále také vyšším množstvím kyseliny palmitové a olejové [19].

### 2.2.6 Fytosteroly

Fytosteroly jsou rostlinné lipofilní látky patřící mezi steroidy. Základním steroidem je cholesterol ( $C_{27}$ ), od něhož se další fytosteroly odlišují především uspořádáním postranního řetězce na 24. atomu uhlíku, např.  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, kampesterol. V organismu jsou složkou tukových membrán a lipoproteinů, uplatňují se při transportu lipidů, z cholesterolu se dále syntetizují žlučové kyseliny a steroidní hormony. [14]. Hladina sterolů u rakytníku se pohybuje kolem 0,1–0,2 % v semenech a kolem 0,02–0,04 % v měkkých částech u čerstvých plodů, celkový obsah u některých druhů spadá do rozsahu 350–500 mg/kg [19]. Na fytosteroly je bohatý především rostlinný olej [14].

### 2.2.7 Sacharidy

Sacharidy neboli polyhydroxyaldehydy nebo polyhydroxyketony se dělí podle počtu atomů uhlíku nacházejících se ve struktuře (triosy, tetrosy, pentosy, hexosy atd.), podle funkční skupiny přítomné v molekule (aldosy nebo ketosy) a dle počtu cukerných jednotek vázaných v molekule (monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy a složené sacharidy) [14]. V bobulích rakytníku je přítomna zejména glukóza, fruktóza a xylóza, dále byly zaznamenány nízké koncentrace cukerných alkoholů a to manitolu, sorbitolu a xylitolu [13]. Glukóza a fruktóza tvoří přes 90 % cukrů nacházejících se v rakytníku [25].

### 2.2.8 Organické kyseliny

Mezi významné organické kyseliny obsažené v plodech patří kyselina jablečná se svou charakteristickou kyselou chutí a kyselina chinová [13; 20; 26]. Kyselina jablečná a chinová představují 90 % všech kyselin rakytníku. Trpká chuť bobulí rakytníku je dána poměrem cukrů a kyselin (1 : 1), který je ve srovnání s jinými jedlými druhy ovoce nízký [25].

### 2.2.9 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou stavební jednotkou všech peptidů, bílkovin a jsou součástí také dalších sloučenin, navíc se mohou v potravinách nacházet volně [14]. Uvádí se, že například v listech se nachází 13 aminokyselin a v dřevnatých částech dokonce 17 [9].

### 2.2.10 Minerály a další látky

V rakytníkových plodech, šťávě, semenech i listech se vyskytuje několik chemických prvků. Některé poddruhy mají zajímavé hladiny hořčíku, draslíku, fosforu nebo vápníku. Dále se můžeme setkat i s určitým množstvím Na, Fe, Cu, Zn, Mn a As [10; 13]. Listy obsahují také dávku taninů, především kyseliny ellagové, a kumarinů [12; 16].

### 2.2.11 Olej

Právě oleje jsou nejuznávanějšími produkty rakytníku. Většinou se obsah oleje v semenech pohybuje okolo 10 %, ale může dosahovat až 16 %. Také množství oleje v měkkých částech (dužina a slupka plodu) je vysoké, ale na rozdíl od semenného je jeho obsah ovlivněn několika faktory (poddruh, zralost plodů, velikost plodů atd.). Množství oleje získávaného z těchto čerstvých částí rakytníku se pohybuje od 1,4 % do 13,7 %, ze sušené dužiny u některých poddruhů dokonce kolem 30–34 % [19].

Semenný olej je bohatý na esenciální mastné kyseliny omega-3 ( $\alpha$ -linolenová) a omega-6 (linolová), zatímco olej získaný z dužiny plodu obsahuje značné množství omega-7 mastných kyselin. Rakytníkový olej je jediný olej, který přirozeně poskytuje omega-3 MK a omega-6 MK v poměru 1 : 1 [12; 13].

Typické hodnoty sterolů jsou 2 % v semenném oleji a 1–3 % v oleji z měkkých částí plodu. Značný obsah zaujímá  $\beta$ -sitosterol [12; 13; 27], v semenném oleji také  $\Delta^5$ -avenasterol a kampesterol [27]. Pro olej získaný z dužiny je charakteristická vyšší koncentrace karotenoidů, které udávají oranžovočervenou barvu plodů, a flavonoidů [27]. Obvyklé množství  $\beta$ -karotenu v dužinovém oleji je cca 100–500 mg/100 g a 20–100 mg/100 g v oleji získaného ze semen [19]. V olejích je dále přítomna vysoká koncentrace tokoferolů

( $\alpha$ -tokoferolu,  $\gamma$ -tokoferolu) a tokotrienolů, menší je obsah vitaminů C, K, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> a B<sub>6</sub> [17; 27].

### **2.3 Pozitivní účinky na lidský organismus**

Rakytník řešetlákový lze označit za fascinující rostlinu, jejíž plody byly používány k léčivým a nutričním účelům v Rusku, Evropě a hlavně v Číně řadu staletí [13]. Bobuloviny využívali obyvatelé Střední Asie jako přírodní léčivo především k léčení kožních onemocnění, hypertenze, poruch trávicí soustavy, v Rusku a Himalájích také k léčbě astmatu a revmatu [28]. Využívání plodů má dlouhou historii v tibetské a mongolské medicíně při léčbě kašle, chřipky, žaludečních vředů, poruch sliznic, pro zlepšení krevního oběhu a také pro stimulaci funkce trávicího systému [9; 19]. V padesátých letech v Rusku proběhly první klinické studie o lékařském použití plodů rakytníku, ale Čína byla první zemí, která uznala rakytník řešetlákový jako léčivou rostlinu, a to v roce 1977 [28].

Díky svému fytochemickému složení, které má biologickou a terapeutickou aktivitu, vykazuje rakytník několik pozitivních účinků na zdraví lidského organismu. Jedná se především o antioxidační, kardioprotektivní, anti-aterogenní, antibakteriální, antivirovou, imunomodulační a antikarcinogenní aktivitu [29]. Dále jsou významné hepatoprotektivní účinky a vliv na ochranu kůže [30].

#### **2.3.1 Ochrana kůže a účinek na sliznice**

Jak bylo zmíněno výše, semenný olej rakytníku obsahuje mastné kyseliny a je charakteristický především vysokými hladinami nenasycené linolové a linolenové kyseliny. Pokud jsou tyto esenciální mastné kyseliny užívány v odpovídajícím množství, tak vyživují pokožku, zmírňují atopický ekzém, léčí dermatitidy a udržují pokožku zdravou [8; 29]. Při užívání potravinových doplňků s obsahem oleje ze semen a dužinatých částí plodů získaného extrakcí nadkritickou tekutinou bylo pozorováno zlepšení symptomů atopické dermatitidy [19].

Olej rakytníku má tedy regenerační a protizánětlivé účinky a napomáhá při hojení ran, popálenin a dermatitid zapříčiněných ozářením [19]. Díky přítomnosti flavonoidů jsou listy také využitelné při léčbě ran a popálenin způsobených chemikáliemi [9].

Extrakty rakytníku jsou využívány kvůli pozitivnímu působení na pleť, a to především při boji proti vráskám, vysušené pokožce a jiným příznakům předčasně stárnoucí pleti [29]. Jsou součástí řady kosmetických produktů, například pleťových krémů, tělových mlék či vlasových šamponů [28].

Ochranné a léčivé účinky rostlinného oleje byly pomocí studií na zvířatech i klinických studií prokázány při různých poškozeních slizničních membrán. Podle výsledků pokusů na zvířecích modelech s žaludečními vředy je zřejmé, že olej prospívá při klinické léčbě a prevenci vředů ústní a gastro-duodenální sliznice. Olej získaný z dužinaté části plodu projevil větší efektivitu než olej ze semen plodu. Výsledky několika studií ukazují, že látkami, které působí proti vředům, jsou steroly a steryl-glykosidy [19].

### **2.3.2 Antioxidační účinky**

Karotenoidy, tokoferoly, steroly, lipidy, kyselina askorbová, flavonoidy a triterpeny jsou součástí dužiny plodů rakytníku a vykazují antioxidační aktivitu, která bude popsána níže v textu včetně jejího stanovení [31].

Během laboratorních studií na zvířecích modelech byl dokázán antioxidační efekt, tedy zpomalení oxidačního procesu tím, že při podávání rakytníkového oleje do krmiva zvířat došlo ke snížení hladiny malondialdehydu, zvýšení aktivity superoxid dismutázy a glutathion peroxidázy v játrech a k udržení normální hladiny aspartátaminostransferázy a alaninaminotransferázy [19]. Rakytníkový olej může aktivovat superoxid dismutázu, která vyčytává volné radikály a snižuje oxidaci lipidů [29].

### **2.3.3 Antibakteriální, antivirové účinky a vliv na imunitní funkci**

Také antibakteriální účinky byly u rakytníkových olejů a extraktů prokázány, a to několika studii. Esenciální oleje získané hydrodestilací z různých částí rostliny rakytníku, konkrétně z dužiny, semen a listů, potlačují růst bakterií, které kontaminují potraviny: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Nejvyšší inhibiční účinky byly pozorovány při použití oleje z dužiny plodů. U *Staphylococcus aureus* byla minimální inhibiční koncentrace všech tří esenciálních olejů téměř stejná. U *Escherichia coli* dosahovaly hodnoty minimální inhibiční koncentrace oleje získaného z dužiny a listů dvojnásobné hodnoty proti oleji semennému [31].

Jiná studie porovnávala antibakteriální účinky vodných a hydroalkoholických extraktů z listů rakytníku na pěti bakteriích: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Escherichia coli*. Největší inhibiční zóna při použití vodných extraktů byla pozorována u *Pseudomonas aeruginosa*, naopak nejmenší u *Escherichia coli* (tzn. je více rezistentní než *Pseudomonas aeruginosa*). Hydroalkoholický extrakt z listů měl maximální zónu inhibice u *Bacillus cereus* a minimální u *Escherichia coli* [32].

Vodné a ethanolové extrakty z částí rakytníku řešetlákového mají antibakteriální a antimykotickou aktivitu. Extrakty dokázaly svoji účinnost proti gram pozitivním (např. *Bacillus cereus*, *Enterococcus durans* a *Staphylococcus aureus*), gram negativním (např. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* a *Yersinia enterocolitica*) bakteriím a kvasinkám (*Candida albicans*) [9].

Při studiích aktivních frakcí z listů rakytníku řešetlákového došlo k objevení fytochemického léčiva – Hiporaminu. Extrakt z listů obsahující hydrolyzovatelné taniny vykazuje velmi silnou antivirovou aktivitu [12]. Účinek byl dokázán vůči virům chřipky a herpetickým virům [29].

Účinek semenného oleje na imunitní funkce byl zkoumán především na experimentálních myších [19]. Po aplikaci oleje jehlou do dutiny břišní byla u myší zdokonalena imunitní funkce. Bioaktivní látky v plodech a listech rakytníku posilují odolnost proti onemocněním, obnovují narušený imunitní systém a urychlují zotavení [29].

#### **2.3.4 Vliv na kardiovaskulární systém**

Důležitou roli, kterou mají různé bioaktivní sloučeniny v rakytníkových plodech, listech, olejích na kardiovaskulární systém a kardioprotektivní aktivitu, popsala řada *in vitro* a *in vivo* studií [17]. Pozitivní účinek na kardiovaskulární systém je připisován především přítomnosti flavonoidů, antioxidantů a vitaminů v rakytníku [33]. Kvercetin a izorhamnetin jsou nejdůležitějšími z flavonoidů obsažených v rakytníku [16].

Ochranné působení rakytníku proti kardiovaskulárním onemocněním zahrnuje snížení krevního tlaku, inhibici agregace krevních destiček, inhibici oxidativního stresu a ovlivnění metabolismu lipidů [17]. Flavonoidy vykazují kladný vliv na sílu kontrakce srdečního svalu a srdeční rytmus [16].

Semenný rakytníkový olej díky nenasyceným mastným kyselinám, karotenoidům a flavonoidům působí v prevenci a léčbě aterosklerózy a dyslipidémie, kdy podstatně snižuje hladinu tuků v krvi. To zahrnuje snížení cholesterolu, regulaci krevního tlaku a rozpuštění nahromaděného tuku [29]. Konzumace oleje může snížit hladinu celkového cholesterolu a hladiny LDL v plazmě, zvýšit množství vysokodenzitního lipoproteinu (HDL), inhibovat tvorbu trombů, zpomalovat oxidaci LDL, a tím celkově snížit riziko kardiovaskulárních onemocnění [19].

#### **2.3.5 Hepatoprotektivní účinky**

Především nenasycené mastné kyseliny,  $\alpha$ -tokoferol a  $\beta$ -karoten, látky obsažené v rakytníku, chrání jaterní buňku proti poškození hepatotoxiny, jako je alkohol,

tetrachlormethan nebo acetaminofen, které způsobují onemocnění jater. Rakytník řešetlákový by mohl být také užitečný při prevenci fibrózy jater [16].

Účinky rakytníkového oleje byly zkoumány na myších s poškozenými játry vlivem chloridu uhličitého. Výsledkem experimentu při perorálním podávání oleje bylo snížení sérové hladiny cholesterolu, triacylglycerolů, alkalické fosfatázy, alaninaminotransferázy a aspartátaminotransferázy [28].

Alkoholový extrakt z listů a olej ze semen rakytníku zlepšují poškození jater způsobené chloridem uhličitým. Frakce z listů bohatá na fenolické látky, jako je kyselina gallová, myricetin, kaempferol či izorhamnetin, zvyšuje hladinu antioxidantů, které zabraňují poškození jater oxidací [12].

### **2.3.6 Antikarcinogenní účinek**

Dalším pozitivním efektem rakytníku na lidský organismus je také antikarcinogenní aktivita. Jednou ze sloučenin, které vykazují tuto aktivitu, je kvercetin, který vyvolává apoptózu v rakovinových buňkách. Pozitivní účinek byl zaregistrován při léčbě u pacientů s karcinomem tlustého střeva, prostaty a s leukémií [16]. Díky obsahu vitaminů, především vitaminů A a E, a  $\beta$ -karotenu může mít rakytníkový olej ochranné účinky proti rakovině děložního čípku [28]. Během jiné studie byly využity výtažky z kůry rakytníku řešetlákového, které projevily protinádorovou aktivitu potlačením procesů v nádorových tkáních [9]. Díky vysokému obsahu karotenoidů absorbuje rakytníkový olej UV-B záření (v rozmezí 290–320 nm), a proto může být využit jako přírodní absorbent slunečního záření [8].

## **2.4 Extrakce**

Extrakce je separační metodou, během které jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze. Analyt přechází z jedné fáze do druhé na základě odlišné rozpustnosti v použitém rozpouštědle a dojde k ustavení fázové rovnováhy [34]. Podle způsobu provedení lze extrakci rozdělit na jednostupňovou, vícestupňovou nebo kontinuální. Během jednostupňové extrakce dojde k ustavení jedné fázové rovnováhy (např. protřepáním roztoku s nemísitelným rozpouštědlem v dělicí nálevce), u vícestupňového provedení extrakce se ustavení rovnováhy několikrát opakuje v samostatných krocích. Při kontinuální extrakci jsou fáze v nepřetržitém kontaktu (např. Soxhletova extrakce) [35; 36]. Kontinuální postupy jsou účinnější, ale zároveň časově náročnější a je potřeba většího objemu rozpouštědla [37].

Dle skupenství fází, mezi kterými analyt přechází, rozlišujeme extrakci z pevné fáze do kapaliny, z kapaliny do kapaliny a z kapaliny (nebo plynu) na pevnou fázi [37].



Při extrakci z pevné fáze do kapaliny převádíme stanovovanou látku z pevného vzorku do kapalné fáze. Během extrakce kapalina – kapalina přechází rozpuštěný analyt z jedné kapalné fáze do druhé, kdy jsou obě fáze nemísitelné. Základním principem extrakce na pevné fázi je zachycení analyzované látky při průchodu roztoku přes pevnou fázi [35; 36].

Účinnost extrakce závisí především na polaritě stanovované látky a obou fází, dále také na stupni ionizace nebo na přítomnosti vodíkových vazeb či jiných elektrostatických interakcí [34].

#### 2.4.1 Extrakce tuhé látky kapalinou

Tato metoda závisí na rozpustnosti analytu v rozpouštědle a dá se využít k předběžné úpravě vzorku, kdy se do vhodného rozpouštědla extrahuje složka, kterou potřebujeme analyzovat, nebo k očištění vzorku, kdy se do rozpouštědla extrahuje nežádoucí složka, která je tímto z analyzovaného vzorku odstraněna [38]. Nejčastěji se využívá při analýze biologických a přírodních vzorků [39].

Zejména pro extrakci organických látek se využívá kontinuální způsob extrakce pomocí Soxhletova extraktoru (obrázek 6). Varná baňka Soxhletova extraktoru se naplní rozpouštědlem, které se přivede k varu a jehož páry postupují postranní trubičkou do chladiče, kde zkondenzují a stékají do středové části extraktoru, v níž se nachází vhodně upravený vzorek a probíhá extrakce. Jakmile stoupne hladina rozpouštědla v extrakčním prostoru, přečpne roztok pomocí trubky zpět do varné baňky a celý proces se opakuje. Po ukončení extrakce je rozpouštědlo vydestilováno a v baňce zůstane pouze požadovaná složka [38; 40].



Obrázek 6 – Soxhletův extraktor [41]

Extrahovat pevný vzorek lze také extrakcí nadkritickou tekutinou (SFE), obvykle oxidem uhličitým. Extrakční tekutina je ve stavu nad kritickou teplotou i tlakem. Tento typ extrakce má řadu výhod. Je to metoda rychlá a oxid uhličitý není toxický, nebezpečný ani drahý, navíc lze jeho kritického bodu dosáhnout snadno [37].

#### **2.4.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny**

Extrakce z kapaliny do kapaliny se využívá k předběžné úpravě vzorku a k odstranění látek, které by mohly rušit stanovení [34]. Jedná se o separační metodu, která je založena na ustavení fázové rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Musí být splněna podmínka, že rozpustnost extrahované složky v kapalině, do které se extrahuje, musí být daleko větší než její rozpustnost v kapalině, ze které ji chceme získat. Při volbě rozpouštědla bereme ohled na jeho spotřebu a čistotu, na bezpečnost práce, finanční nákladnost, stránku ekologie a především na to, abychom získali co nejvíce extrahované látky. Elektroneutrální organické látky a anorganické ionty převedené na extrahovatelnou formu chelátů nejčastěji extrahujeme pomocí třepání v dělicí nálevce, kdy je zajištěn dobrý kontakt mezi fázemi [37–40].

#### **2.4.3 Extrakce na pevné fázi**

Během extrakce na pevné fázi přechází roztok se sledovaným analytem přes pevnou fázi, na které dochází k zachycení. Tuhými stacionárními fázemi (sorbenty) jsou fáze polární (např. silikagel a oxid hlinitý), nepolární (např. nepolárně modifikovaný silikagel C<sub>18</sub>) nebo iontomeniče (katex a anex). Obecně probíhá metoda extrakce na pevné fázi ve čtyřech krocích: kondicionace, aplikace vzorku, promytí a eluce analytu. Při kondicionaci je připravena kolonka, poté je zaveden roztok vzorku a analyt je zachycen na tuhé fázi. Následuje odstranění interferentů pomocí promytí kolonky a na závěr je sledovaný analyt vhodným rozpouštědlem vymyt z pevné fáze [35–37].

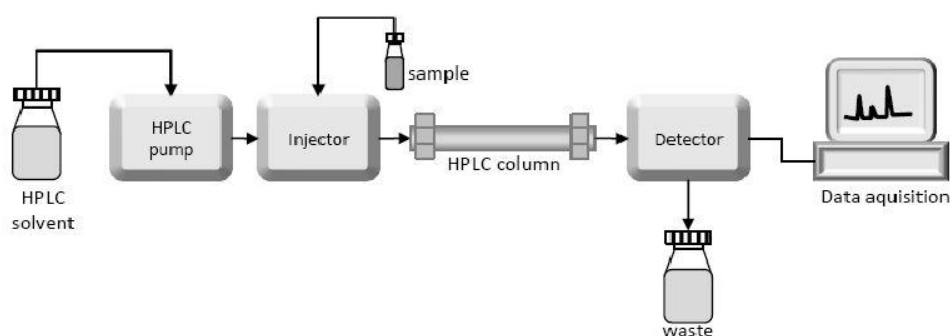
### **2.5 Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie je separační metoda, která k dělení složek směsi využívá rozdílné afinity jednotlivých složek ke dvěma fázím – mobilní a stacionární. Mobilní fází je kapalina a stacionární fází je tuhá látka nebo kapalina zakotvená na nosiči [37; 39; 42].

Kapalinový chromatograf je složen ze zásobníku mobilní fáze, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru systému pro zpracování dat (obrázek 7). Mobilní fáze je u vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) čerpána vysokotlakým čerpadlem [34; 39]. Čerpadla musí být vyrobena z chemicky a mechanicky odolného materiálu (např. z nerezové oceli

nebo titanu) a musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze. Čerpadla pohání mobilní fázi do dávkovacího zařízení umístěného před kolonou, do kterého se dávkuje vzorek. Je možné k dávkování využít také automatické dávkovače, tzv. autosamplery. Objemy kapalného vzorku analyzovaného pomocí HPLC se pohybují v rozmezí od 0,5 do 20  $\mu$ l. Vzorek spolu s mobilní fází následně migruje do kolony, kde dochází k vlastní separaci [34; 39; 42]

Nejčastěji jsou kolony vyrobeny z nerezové oceli, ale mohou být vyrobeny i ze skla nebo plastu. Vnitřní průměr analytických kolon je obvykle do 4,6 mm, délka zpravidla do 25 cm. K docílení co největší účinnosti separace musí být kolona vyplněna stacionární fází homogenně a částice náplně musí mít pravidelný, kulový tvar. Velikost částic je nepřímo úměrná účinnosti separace a přímo úměrná délce kolony. Stacionární fází u HPLC je obvykle chemicky modifikovaný silikagel nebo zesítené kopolymery styrenu a divinylbenzenu. Eluát je dále veden do detektoru, který by měl být selektivní pro analyzované složky a naopak co nejméně citlivý na mobilní fázi. Využívá se specifických vlastností, kterými se separované analyzované látky liší od mobilní fáze. Mezi běžně používané detektory patří spektrofotometrické, refraktometrické, fluorescenční a elektrochemické. Následný signál je zpracován a vyhodnocen počítačem [34; 39; 42].



**Obrázek 7** – Schéma HPLC [43]

Analyzované látky jsou charakterizovány délkou času, který stráví průchodem kolonou neboli retenčním časem, a jejich přítomnost je zobrazena pomocí píků [34].

Podle polaritý mobilní a stacionární fáze rozlišujeme dva základní systémy kapalinové chromatografie. V případě, že je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní, hovoříme o chromatografii v systému s normálními fázemi (NP), je-li naopak stacionární fáze méně polární než mobilní, jedná se o chromatografii v systému s obrácenými fázemi (RP). Chromatografie v systému s obrácenými fázemi se využívá téměř v 85 % všech aplikací díky vyšší rychlosti, jednoduchosti a reprodukovatelnosti [34; 39].

K výhodám HPLC patří především široká oblast použitelnosti, dále také možnost ovlivnění separace pomocí složení mobilní fáze. HPLC je ovšem v porovnání s plynovou chromatografií složitější, pomalejší a méně účinná [39].

## 2.6 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je separační elektromigrační metoda založená na odlišné migraci částic, které nesou elektrický náboj, v elektrickém stejnosměrném poli. Kapilára, v níž probíhá separace, je nejčastěji vyrobena z taveného křemene s polyimidovým povlakem. Ochranná vrstva polyimidu zajišťuje značnou ohebnost kapiláry a také odstraňuje její křehkost. Délka kapilár se obvykle pohybuje v rozmezí od 25 do 100 cm s vnitřním průměrem 25, 50, 75 nebo 100  $\mu\text{m}$  [37–39].

Oba konce kapiláry jsou ponořeny do zásobníku elektrolytu, kterým je naplněna i samotná kapilára. Mezi elektrody, které jsou také vloženy do elektrolytu, se aplikuje napětí 10–30 kV, a tím vznikne elektroosmotický tok kapaliny kapilárou. Analyzovaný vzorek se dávkuje o objemu 10–100 nL do jednoho konce kapiláry, na druhém konci je umístěn detektor. Ionty migrují v separačním elektrolytu směrem k detektoru. Kladně nabitě částice se pohybují rychleji, než je rychlost elektroosmotického toku, anionty pomaleji, a tím se vytváří v kapiláře zóny. Na výsledném záznamu (elektroforegramu) je na základě migračních časů pomocí píků zobrazena kvalita i kvantita analytů. K výhodám této techniky patří její rychlost a malá spotřeba vzorku, naopak nevýhodou je menší citlivost [37–39].

## 2.7 Antioxidační aktivita

V současné době je tělo vystaveno cigaretovému kouři, záření nebo jiným toxinům, což způsobuje produkci reaktivních druhů kyslíku a dusíku, a mohlo by dojít k poškození DNA a k oxidaci lipidů a bílkovin v buňkách, což by případně vedlo až k chronickým či degenerativním onemocněním [29; 44]. Jako antioxidanty označujeme látky, které ovlivňují proces oxidace lipidů a jiných sloučenin různými mechanismy. Buď s volnými radikály zreagují, nebo redukují vzniklé hydroperoxydy, navazují do komplexů katalyticky působící kovy nebo odstraňují přítomný kyslík [20]. Antioxidanty nezastavují oxidaci úplně, ale pouze snižují její rychlost, tím pádem zamezí průběh oxidační reakce jako např. přeměnu polynenasycených mastných kyselin na hydroperoxydy mastných kyselin [14; 15]. Rozeznáváme antioxidanty přírodní (pocházející z rostlinných materiálů) a syntetické [20].

Jak bylo zmíněno výše v textu, několik karotenoidů, např.  $\beta$ -karoten, lykopen nebo zeaxanthin, vykazuje antioxidační aktivitu tím, že zhasí singletový kyslík nebo volné

radikály (v lipidových membránách), a to díky systému konjugovaných vazeb, který obsahují ve své struktuře. Také vitamin E je z hlediska ochrany membrán téměř všech buněk významný, jelikož redukuje volné radikály. Mezi antioxidanty řadíme i kyselinu askorbovou, která může snižovat aktivitu kyslíkových radikálů, a flavonoidy, které mají například schopnost vychytávat dvojmocné kovové kationty kovů (např.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) [15].

Mezi látky vykazující antioxidační účinky tedy řadíme vitamin C, E, karotenoidy a polyfenolické sloučeniny (např. flavonoidy a katechiny). Právě antioxidační aktivita rostlinných fenolických sloučenin je podle několika studií vyšší než u antioxidačních vitaminů [45]. Koncentrace hydrofilních antioxidačních sloučenin (fenolické látky a vitamin C) v plodu klesá zároveň s jeho dozráváním. Naopak lipofilní antioxidanty (karotenoidy a tokoferoly) se během dozrávání v plodech kumulují [22].

### **2.7.1 Stanovení antioxidační aktivity**

Pro stanovení antioxidační aktivity byly vyvinuty hodnotící testy, které rozdělujeme na metody založené na eliminaci radikálů (ABTS, ORAC a DPPH) a metody, jež posuzují redoxní vlastnosti látek (FRAP) [45]. Podle mechanismu můžeme metody klasifikovat do dvou skupin na metody, kde je základním principem přenos atomu vodíku, nebo metody, při kterých dochází k přenosu jednoho elektronu [44].

#### **2.7.1.1 Metoda ABTS**

Tato metoda testuje schopnost antioxidantu přítomného ve vzorku zhaset radikálový kation  $\text{ABTS}^{*+}$  [2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)]. Zhasení radikálu se měří spektrofotometricky na základě změn absorbance. Radikál  $\text{ABTS}^{*+}$  má charakteristickou modrozelenou barvu s maximem absorbance při 734 nm. V případě, že se nachází ve vzorku antioxidant, dochází díky zhasení radikálů ke změně barvy a snížení absorbance, čímž lze kvantifikovat koncentraci přítomného antioxidantu [22; 45; 46]. Antioxidační aktivita vzorku se srovnává s antioxidační aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) [45].

Při experimentálním měření lze využít dva postupy. Antioxidant se přidává do reakční směsi, která již obsahuje vygenerovaný  $\text{ABTS}^{*+}$  [45; 46].  $\text{ABTS}^{*+}$  může být generován s využitím peroxodisíranu draselného ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ),  $\text{MnO}_2$ , peroxidázou s  $\text{H}_2\text{O}_2$  nebo také methmyoglobinem s  $\text{H}_2\text{O}_2$  [45]. Pomocí této metody lze detekovat antioxidační aktivitu hydrofilních i lipofilních antioxidantů [44].

### **2.7.1.2 Metoda používající DPPH**

Ke zjištění antioxidační aktivity se také využívá stabilní dusíkový radikál DPPH<sup>\*</sup> [1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl]. Radikál DPPH má typickou tmavě purpurovou barvu s absorpčním maximem při vlnové délce 515 nm. Antioxidanty redukují radikál za vzniku difenylpikrylhydrazylu (DPPH-H) a dochází ke ztrátě zbarvení, což je detekováno spektrofotometricky. Výhodou této metody oproti ABTS je například lepší dostupnost radikálu, který nemusí být generován před stanovením. Na druhou stranu má i svá omezení, mezi ně patří například fakt, že některé antioxidanty reagují s DPPH pomalu nebo jsou dokonce vůči němu inertní. Test DPPH je často využíván pro sledování antioxidační aktivity ovocných a zeleninových džusů a šťáv [44; 45].

### **2.7.1.3 Metoda používající galvinoxyl**

Další spektrofotometrickou metodou, která je založená na podobném principu jako metoda DPPH, je metoda využívající stabilní radikál galvinoxyl. Látky redukují radikál galvinoxyl tím, že poskytují vodík, a reakce je sledována při vlnové délce 428 nm [45].

### **2.7.1.4 Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace**

Testují se inhibiční účinky antioxidantu na lipidovou peroxidaci, která patří mezi patologické děje v organismu. Principem metod je eliminace kyslíkových radikálů. Testy se provádí s jednoduchými lipidy, ale i v různých složitějších modifikacích, např. sledování lipidové peroxidace na LDL částicích. Využívá se spektrofotometrické detekce [45].

### **2.7.1.5 Metoda ORAC**

Během testu dochází v reakční směsi ke generování kyslíkových radikálů a metoda ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) měří schopnost antioxidantu zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci, resp. schopnost chránit protein před oxidačním poškozením způsobeným peroxylovými radikály. Detekuje se úbytek fluorescence  $\beta$ -fykoerytrinu po napadení radikály. Protein  $\beta$ -fykoerytrin byl pro své nevýhody, zejména kvůli omezení při stanovení antioxidační aktivity polyfenolů, nahrazen jinou fluorescenční látkou, a to fluoresceinem, čímž se metoda ORAC zpřesnila [45; 46]

### **2.7.1.6 Metoda FRAP**

Některé antioxidanty se chovají jako redukční činidla, která oxidanty inaktivují, a metoda FRAP (Ferric reducing antioxidant potential) měří redukční schopnost antioxidantu. Základním principem této metody je redukce komplexu  $\text{Fe}^{3+}$ -2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) ze vzorku na komplex  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ, který je zbarvený modře a má absorpční maximum při 593 nm. Zvýšení absorbance při 593 nm odpovídá množství  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ

a je mírou antioxidační aktivity stanovovaného vzorku. Test FRAP probíhá při hodnotě pH 3,6 a je vhodný pro antioxidanty, které zreagují rychle (do 6 minut), jako je kyselina askorbová, ale dá se použít i u několika polyfenolů (např. kys. tříslová), ovšem zde absorbance narůstá až po několika hodinách. Pomocí metody FRAP nelze detekovat antioxidační aktivitu látek, jejichž mechanismus zhášení radikálu je založen na přenosu atomu vodíku [44; 45; 47].

#### **2.7.1.7 Metoda CUPRAC**

Metoda CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity) se podobá metodě FRAP. Po smíchání chelátu Cu(II)-neocuproninu s antioxidantem dochází k redoxní reakci a k tvorbě tmavě oranžovočerveného chelátu Cu(I)-neocuproninu. Nárůst absorbance se proměřuje při vlnové délce 450 nm. Oproti FRAP probíhá metoda při fyziologickém pH 7. CUPRAC lze aplikovat při stanovení antioxidační aktivity hydrofilních i lipofilních antioxidantů [44].

#### **2.7.1.8 Stanovení celkového obsahu fenolických látek**

Metoda TPC (Total phenolic content) slouží ke kvantitativnímu stanovení fenolických sloučenin. Mechanismem metody je přenos elektronu a reakce probíhá v alkalickém roztoku (při pH 10). Za přítomnosti fenolických látek v reakční směsi dochází k přeměně žlutého molybdotungsto-fosforečného heteropolyaniontového činidla na modrý molybdotungsto-fosfát, který má maximální absorpci v rozmezí 700–760 nm [44].

## **2.8 Analýza biologicky aktivních látek v rakytníku**

Jak bylo zmíněno výše v textu, všechny části rakytníku (plody, semena, listy, větve, kůra, květy, stonky, hlízy i kořeny) jsou zdrojem biologicky aktivních látek [10]. Také semena, slupky i výlisky se zpracovávají pro svá značná množství cenných látek, především antioxidantů [48]. Listy, větve a kůra jsou brány jako odpadní produkty sklizně, ale tento rostlinný materiál obsahuje sloučeniny, jako jsou flavonoidy, karotenoidy nebo nenasycené MK, které by mohly být potencionálně využity (např. jako doplňky stravy) [10].

### **2.8.1 Úprava vzorku a extrakce látek obsažených v rakytníku**

Nejčastěji jsou využívány, extrahovány a analyzovány bioaktivní látky z plodů [18; 24; 25; 49–52], semen [18; 48; 53; 54] a listů [11; 24; 47; 55; 56] rakytníku. Rostlinný materiál je většinou nutné před samotnou extrakcí upravit, abychom zvětšili jeho povrch a tím usnadnili extrakci. Vzorek lze nakrájet, rozdrtit či jinak rozmělnit [18; 27; 51; 52; 55].

Na kvalitu obsahu extrahovaných látek může mít také vliv použitá sušicí metoda [47]. Sušení vzorků můžeme provádět při pokojové teplotě [55], za zvýšené teploty, pomocí

lyofilizace [47; 53] či sušení mikrovlnného [47]. V případě extrakce lipofilních látek z listů rakytníku se jako nejvhodnější jevila metoda mikrovlnného sušení nebo lyofilizace, kdy bylo dosaženo nejmenších ztrát. Sušení mrazem (při -51 °C, pod vakuem) je však oproti tomu mikrovlnnému dražší a časově náročnější. Například na  $\beta$ -karoten má zvyšující se teplota během klasického sušení negativní účinek [47].

Extrakce je velice důležitá z hlediska přípravy vzorku před jeho analýzou. Cílem je získat co největší výtěžek, jehož množství může být ovlivněno extrakční teplotou, tlakem, dobou extrakce, poměrem pevných látek ku rozpouštědlu a dalšími faktory [48].

Pro zvýšení účinnosti extrakce a snížení spotřeby organických rozpouštědel se k extrakci rostlinných materiálů využívají techniky tzv. zelené chemie [44], jako je např. ultrazvuková extrakce [47; 56], mikrovlnná extrakce [18; 56], extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) [18; 27; 44; 53; 55; 57] či poměrně nová metoda extrakce nadkritickou vodou (SWE) [48]. U metody SFE hraje důležitou roli také hustota  $\text{CO}_2$  a povaha i koncentrace použitého přídatku (org. rozpouštědla) [58].

Antioxidanty rozpustné ve vodě se extrahují pomocí vody [25; 48; 51; 52], ethanolu [48; 53; 56], methanolu [11; 48; 52; 54], acetonu [24; 25; 51], acetonitrilu a jejich kombinací [44]. Při extrakci lipofilních antioxidantů se používá jako rozpouštědlo například hexan [18; 27; 47; 48], petrolejový ether [18; 21; 22; 59], benzen a další [44].

### **2.8.1.1 Extrakce polyfenolických látek**

Metoda SWE byla využita při extrakci polyfenolů ze zbytků semen rakytníku. Byl zkoumán vliv extrakční teploty, doby extrakce a poměru vody k pevné složce na výtěžnost extraktu [48]. Při analýze semenných zbytků se nejprve provádí odtučnění pomocí SFE nebo pomocí hexanu v Soxhletově extraktoru [24; 48]. Po zbavení oleje byl prášek extrahován metodou SWE [48].

Bylo zjištěno, že klíčovým parametrem při extrakci je teplota. Při vyšší teplotě jsou rozrušeny vazby, které existují v rostlinné tkáni mezi polyfenoly a proteiny či polysacharidy, nebo je poškozena buněčná stěna rostliny, čímž se zajišťuje lepší rozpustnost polyfenolů v rozpouštědle. Avšak některé polyfenoly jsou tepelně nestabilní a při velmi vysoké teplotě může dojít k polymeraci a výtěžek se pak snižuje. Výtěžnost reakce je ovlivněna také dobou extrakce i poměrem pevné látky a rozpouštědla. Tlak hraje roli v udržování vody v kapalném stavu, aby její páry nezpůsobily korozi zařízení. Podle výsledků experimentu (tabulka 1) lze říci, že metoda SWE je vysoce účinná při extrakci polyfenolů. Jako nejúčinnější se jevila extrakce při extrakční teplotě 120 °C s dobou extrakce 36 min a v poměru voda/pevná látka 30 v/m [48].



**Tabulka 1** – Vliv různých faktorů při SWE na výtěžek [48]

<b>SWE</b>		
<b>Faktor</b>		<b>Výtěžek [mg GAE/g]</b>
Teplota [°C]	80	33,17 ± 0,30
	100	40,06 ± 0,46
	120	<b>44,51 ± 0,44</b>
	140	33,46 ± 0,22
	160	15,84 ± 0,40
	180	11,24 ± 0,24
	Doba [min.]	15
30		27,69 ± 0,12
45		<b>36,45 ± 0,32</b>
60		25,18 ± 0,46
75		10,37 ± 0,06
90		6,04 ± 0,75
Poměr voda / pev. l.		10
	20	37,39 ± 0,09
	30	<b>41,04 ± 0,31</b>
	40	31,53 ± 0,10
	50	19,87 ± 0,02

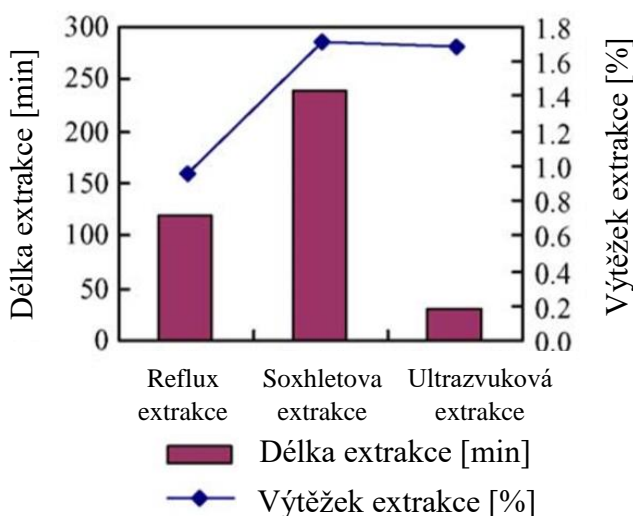
Odtučněný prášek byl také extrahován v běžných rozpouštědlech, jako je voda, methanol či ethanol, v třepačce při 45 °C po dobu 1 hod. Nejvyšších výtěžků bylo dosaženo za použití methanolu, naopak voda jako rozpouštědlo byla nejméně účinná (tabulka 2). Podle kalibrační křivky kyseliny gallové (GA) byl vypočten celkový obsah fenolů a vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové (mg GAE) na 1 g vzorku [48].

**Tabulka 2** – Srovnání výtěžků při použití různých rozpouštědel u běžné extrakce [48]

<b>Běžná extrakce</b>	
<b>Rozpouštědlo</b>	<b>Výtěžek [mg GAE/g]</b>
Voda	8,72 ± 0,29
Methanol	<b>46,30 ± 0,25</b>
Ethanol	35,60 ± 0,50

U vzorků vysušených listů rakytníku byl porovnáván vliv použité metody extrakce (Soxhletova, ultrazvuková a zahřívání pod refluxem) na celkový obsah flavonoidů (obrázek 8), s použitím 75% ethanolu. Jak je patrné z obrázku, zahříváním pod refluxem bylo

dosaženo nejnižších výtěžků. Výtěžnost Soxhletovy extrakce a ultrazvukové extrakce byla podobná, ale rychlejší je extrakce ultrazvukem [56].



**Obrázek 8** – Srovnání výtěžků flavonoidů získaných různými typy extrakce [56]

### 2.8.1.2 *Extrakce nepochárních látek*

Lipofilní sloučeniny (karotenoidy, tokoferoly) jsou nejčastěji extrahovány *n*-hexanem [18; 27; 48], ale můžeme využít také petrolejový ether [18; 21; 22; 59] s přidavkem butylhydroxytoluenu (BHT) [21; 59]. Byly pozorovány hodnoty výtěžků získané ultrazvukovou extrakcí ethanolem a extrakcí *n*-hexanu s přidavkem ethylacetátu z listů rakytníku. Po porovnání můžeme konstatovat, že extrakce lipofilních sloučenin ve vodném roztoku ethanolu je možná, ovšem kvůli lipofilní struktuře bylo dosaženo nižších koncentrací než při využití extrakce *n*-hexanem [47].

Další moderní „zelenou“ metodou je extrakce využívající nadkritický CO<sub>2</sub>, která byla využita při analýze obsahu tokoferolů a karotenoidů v oleji získaného z vysušeného prášku celých bobulí rakytníku. S přidavkem methanolu, ethanolu nebo 2-propanolu k nepolárnímu nadkritickému CO<sub>2</sub> se mění jeho polarita, čímž je ovlivňován výtěžek reakce. Výtěžky byly nejvyšší za použití přidavku methanolu [18].

### 2.8.1.3 *Extrakce více sloučenin rozdílné povahy*

Metodu SFE lze využít také při analýze MK, tokoferolů/tokotrienolů, fytosterolů, flavonoidů, karotenoidů a polyfenolů ze semenného a dužinového oleje rakytníku. Kromě

nejčastěji používaného CO<sub>2</sub> lze jako nadkritickou tekutinu využít například butan nebo propan. Po srovnání výtěžků lze říci, že SFE využívající CO<sub>2</sub> nebo butan mají téměř shodné výsledky [27]. Při extrakci β-sitosterolu [18] či celkového obsahu fytoosterolů [27] pomocí SFE je dosahováno mnohem větších výtěžků oproti klasickým metodám extrakce (např. hexanem).

Pro extrakci většího množství různých látek lze využít postupnou extrakci. Třístupňová extrakce byla aplikována na lyofilizované vzorky výlisků a semen rakytníku. Nejdříve byla provedena extrakce pomocí SFE, poté tlaková kapalinová extrakce (PLE) ethanolem a nakonec enzymaticky asistovaná extrakce (EAE) s využitím celulolytického nebo xylyanolytického enzymu. Pomocí SFE byla získána lipofilní frakce obsahující tokoferoly, PLE poskytla extrakt polárních složek (organické kyseliny, deriváty cukrů, deriváty terpenů, flavonoidní glykosidy) a aplikací metody EAE byly z výlisků a semen uvolněny hydrofilní složky (glukóza, fruktóza a maltóza). Právě díky využití enzymů byla koncentrace cukrů v extraktu vyšší [53].

Vliv různých podmínek na průběh extrakce byl testován také u vzorků listů rakytníku. Použité listy byly usušeny při pokojové teplotě a poté byly rozmělněny. K extrakci lipofilních vitaminů (α-tokoferolu, γ-tokoferolu, vitaminu K<sub>1</sub>) a rostlinných pigmentů (β-karotenu, lykopenu a luteinu) byla využita metoda SFE s přidavkem ethanolu, jehož koncentrace se v CO<sub>2</sub> pohybovala v rozmezí 0–6,9 %. Navíc bylo do ethanolu přidáno malé množství syntetického antioxidantu BHT, a to z důvodu ochrany sloučenin vůči degradaci [55].

Z tabulky 3 lze vyčíst vliv množství přidavku ethanolu na extrakci polárních sloučenin (lutein). Výtěžnost nepolárních vitaminů ovlivněna nebyla. K mírnému zvýšení výtěžku došlo při extrakci při 60 °C a 20 MPa u všech vitaminů. Snížený tlak působil negativně na výtěžek β-karotenu. V případě výtěžků lykopenu byla i přes jeho nepolární charakter vykazována silná spojitost s koncentracemi ethanolu v CO<sub>2</sub> [55].

**Tabulka 3** – Vliv extrakčních podmínek na výtěžky jednotlivých složek rakytníku [55]

<b>Podmínky extrakce</b>						
Tlak [MPa]	28	28	28	28	28	20
Teplota [°C]	40	40	40	40	60	40
Ethanol v CO <sub>2</sub> [hm. %]	0	1,5	4,3	6,9	4,3	4,3
<b>Výtěžky [mg/g listů]</b>						
Extrakt	74,6	77,4	80,1	91,1	86,7	88,9
β-karoten	0,16	0,2	0,18	0,16	0,18	0,14
Lykopen	0,019	0,026	0,040	0,041	0,034	0,036
Lutein	0,025	0,040	0,054	0,063	0,043	0,042
α-tokoferol	3,12	3,49	2,90	3,09	3,81	3,42
γ-tokoferol	0,15	0,19	0,18	0,06*	0,21	0,10*
Vitamin K <sub>1</sub>	0,085	0,083	0,073	0,094	0,100	0,086

\*Příliš nízká hodnota pravděpodobně kvůli analytické chybě.

## 2.8.2 Separace a stanovení látek obsažených v rakytníku

Mezi nejběžnější metody, které se využívají ke stanovení chemických sloučenin rakytníku, patří kapalinová chromatografie. Nejčastěji je používána vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními i obrácenými fázemi [25; 26; 50], ultra-vysokoúčinná (UHPLC) [49] či kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) [51]. K detekci se nejčastěji využívá spektrofotometrický detektor [25] nebo hmotnostní spektrometr (MS) s ionizací elektrosprejem (ESI) [11; 24]. Ze separačních technik v kapalně fázi lze také využít kapilární elektroforézu [52; 58]. Některé z bioaktivních látek lze rovněž stanovit s využitím plynové chromatografie, většinou s využitím derivatizace ke zvýšení těkavosti studovaných látek. Byly popsány experimenty zabývající se stanovením například MK [21; 59], cukrů, organických kyselin i vitamínu C pomocí plynové chromatografie [25].

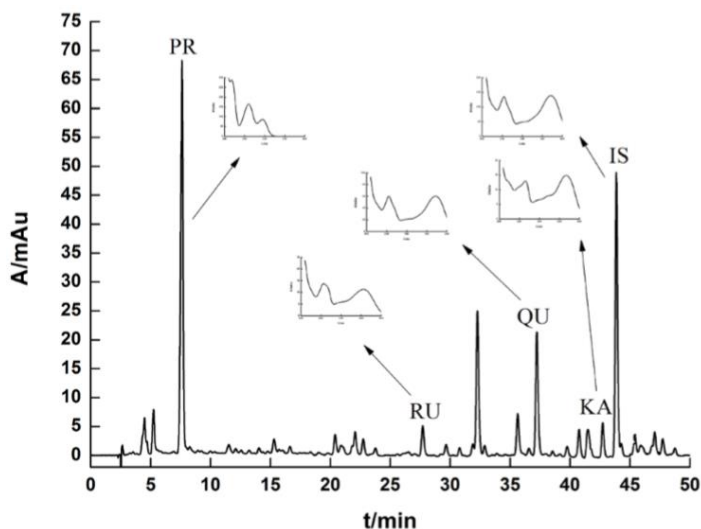
### 2.8.2.1 Analýza polyfenolických a jiných polárních látek

Polyfenolické sloučeniny jsou velkou skupinou bioaktivních látek hojně obsaženou v rakytníku. Analýza se nejčastěji provádí metodou HPLC v systému s obrácenými fázemi [11; 24; 51; 54; 56], UHPLC [11; 24; 49; 51] nebo HILIC [51] ve spojení s detektorem s diodovým polem (DAD) [11; 49; 51; 54; 56] nebo také s hmotnostním spektrometrem [11; 24; 49; 51]. Můžeme také využít fluorescenční detekci [49]. Mezi nejpoužívanější mobilní fáze patří methanol [51; 54], acetonitril [11; 24; 49; 51; 56], aceton [49], ethanol [56] nebo jejich směsi a vodné roztoky [11; 51]. Jako další složku lze přidat kyselinu octovou [24;

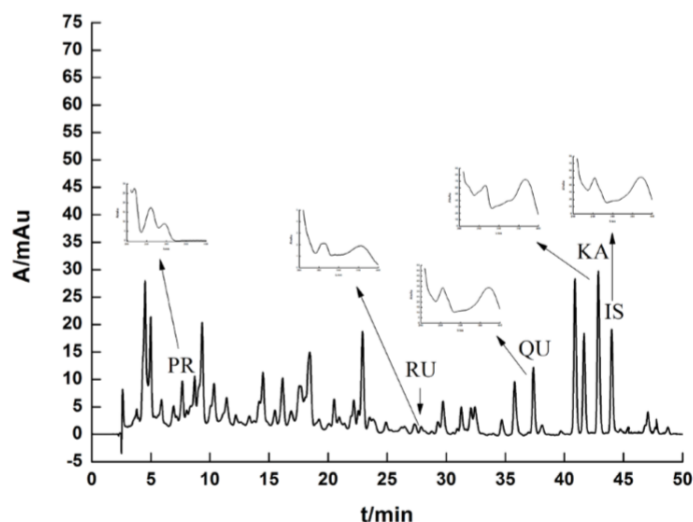
49; 51; 56], kyselinu mravenčí [49; 11; 51] nebo fosforečnou [54]. Nejčastěji využívanou stacionární fází je chemicky vázaný oktadecylsilikagel (C18) [11; 24; 49; 54; 56].

Dominantně jsou v rakytníku zastoupeny flavonoidy, jako je isorhamnetin (IS) [24; 49; 54; 56], kvercetin (QU) [24; 49; 52; 54; 56], kaempferol [49; 54; 56], rutin [11; 54; 56], katechin [51; 52; 56] resveratrol [52] a myricetin [52]. Nejobvyklejšími flavonoly jsou deriváty isorhamnetinu [24; 49] a kvercetinu [24] s mono-, di- a triglykosidovými strukturami [49; 24], například IS-3-sophorosid-7-rhamnosid, QU-3-glukosid, QU-3-rutinosid, IS-3-rutinosid, IS-3-rutinosid-7-glukosid [24], IS-3-O-glukosid-7-O-rhamnosid, QU-3-O-glukosid nebo kaempferol-3-O-glukosid-7-O-rhamnosid [11].

Pět antioxidantních sloučenin s podobnou strukturou: kys. protokatechová (PR), rutin (RU), kvercetin (QU), kaempferol (KA), isorhamnetin (IS); bylo analyzováno pomocí RP-HPLC-DAD z extraktů získaných z dužiny a ze semen rakytníku (obrázek 9 a 10). Během chromatografie byla využívána mobilní fáze methanol/voda s přidávkem 0,4% kys. fosforečné a proměřováno bylo při vlnové délce 280 nm [54].



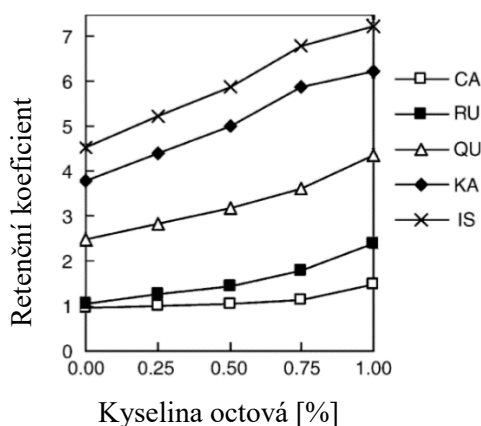
**Obrázek 9** – Chromatogram a UV spektra vzorku dužiny rakytníku [54]



**Obrázek 10** – Chromatogram a UV spektra vzorku semen rakytníku [54]

Během jiného experimentu byly analyzovány metodou HPLC-DAD flavonoidy v listech rakytníku [11; 56]. Při analýze byla použita jako mobilní fáze směs methanol/voda a acetonitril/voda, obsahující kys. mravenčí. Při použití elučního systému acetonitril/voda bylo dosaženo lepšího rozlišení píků sloučenin. Vlnová délka 360 nm byla nejvhodnější k detekci. Testováním rozdílné teploty kolony bylo zjištěno, že při teplotě 30 ° C byla separace analyzovaných složek nejúčinnější [11].

Při analýze RP-HPLC skupiny flavonoidů (katechin – CA, RU, QU, KA, IS) byla použita jako mobilní fáze směs ethanol/acetonitril/voda. Píky CA a RU od sebe ale nebyly separovány, proto byl testován vliv přídavku různých koncentrací kys. octové (obrázek 11). Optimalizací byla nalezena nejvhodnější mobilní fáze: methanol/acetonitril/voda s přídavkem 1% kys. octové, kdy od sebe byly jednotlivé sloučeniny separovány [56]. Přídavek kyseliny mravenčí do mobilní fáze acetonitril/voda může také zlepšit tvar píků látek. Při použití 0,1%, 0,2% a 0,3% kyseliny mravenčí bylo z výsledku patrné, že přídavkem 0,1% kyseliny dosáhneme lepších tvarů eluovaných píků [11].



**Obrázek 11** – Vliv přidavku kyseliny octové na retenční koeficient [56]

Ve významném množství (až 250 mg/100 g) se v plodech rakytníku nachází také proanthokyanidiny, což jsou velmi složité oligomerní a polymerní sloučeniny obsahující podjednotky flavan-3-olu, a tudíž ani jejich analýza není jednoduchá [49; 51]. Analýza těchto látek byla provedena metodou HPLC v systému s normálními fázemi (stacionární fáze: silikagel), HPLC v systému s obrácenými fázemi (stacionární fáze – C18), UHPLC a HILIC. Pro rozdělení proanthokyanidinů podle velikosti je efektivní metoda NP-HPLC, podle izomerů RP-HPLC a podle stupně polymerace HILIC. PAC byly pro rozlišení podle molekulových hmotností analyzovány pomocí NP-UPLC-ESI-MS a HILIC-ESI-MS a podle izomerů prostřednictvím RP-HPLC-ESI-MS. Metoda HILIC-ESI-MS zajistila kvantifikaci dimerů, trimerů a polymerů. Chromatogramy byly zaznamenávány při 280 nm pro fenolické sloučeniny a při 360 nm pro flavonolové glykosidy. Jako jeden z mnoha výsledků byl zaznamenán obsah více než 60 kombinací (epi)katechinů a (epi)galokatechinů [51].

K separaci látek obsažených v rakytníku lze využít také kapilární elektroforézu. Kapilární elektroforéza se vyznačuje svojí větší rychlostí a nižší potřebou vzorku ve srovnání s kapalinovou chromatografií [52; 58]. Kapiláru je nutné před měřením stabilizovat roztokem NaOH a vodou a po každém cyklu analýzy je třeba povrch kapiláry tímto roztokem zregenerovat [52]. Nejčastěji využívaným elektrolytem je borátový pufr (pH 8–11, o koncentraci 25–200 mM). Základní princip separace v případě stanovení polyfenolů je založen na rozdílech v poměru náboje k hmotnosti polyfenolů a na tvorbě komplexů s molekulami tetraborátu. Boráty tedy usnadňují separaci tím, že vytváří komplexy s ortho-dihydroxylovými skupinami flavonoidů nebo s *cis*-dihydroxylovými skupinami cukrů [52; 58].

Při analýze polyfenolů byl první extrakt získaný z rozmělněných plodů s pomocí methanolu a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufru použit při kvantitativní analýze vzorku. Systém CE byl vybaven kapilárou z taveného křemene o délce 70 cm (s účinnou délkou 35 cm) a vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ . Druhý extrakt ze zmražených plodů zhotovený s použitím směsi methanol/voda byl použit při kvalifikaci jednotlivých složek vzorku. Druhý systém používal 60 cm dlouhou kapiláru s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  [52]. Po porovnání výsledků získaných CE a HPLC byla zaznamenána jen malá, ne příliš významná odchylka v úrovních měřených analytů. Pro analýzu chemických sloučenin různých odrůd rostlinných extraktů představuje CE rozumnou alternativu k HPLC [52].

Jiný experiment popisuje využití CE s UV detekcí pro separaci a identifikaci polyfenolických sloučenin z extraktů rostlinných materiálů ze tří různých rostlin, z nichž jednou byl právě rakytník řešetlákový. Nepokrytá kapilára s délkou 75 cm (5 cm pro detektor) a průměrem 50  $\mu\text{m}$  byla propláchnuta 1M NaOH, vodou, methanolem a separačním médiem. Jako elektrolyt byl použit tetraboritan sodný a jako modifikátor ethanol, který zvyšuje výtěžnost sloučenin. K dělení přírodních sloučenin, které jsou ve vodě rozpustné, se využívá také metoda CE v nevodném prostředí. Rozpouštědlem je v tomto případě obvykle směs acetonitrilu a methanolu [58].

Rakytník je bohatý na vitamin C, který lze stanovit pomocí HPLC v systémech s obrácenými fázemi, kde se jako mobilní fáze využívá methanol s fosfátovým pufrem [25; 26] nebo kyselina fosforečná [49]. Pro redukci dehydroxyaskorbové kyseliny na askorbovou se používá dithiothreitol [25; 50] nebo L-cystein [26]. Pro analýzu ve vodě rozpustných vitaminů lze jako eluent použít směs acetonitril / voda / kys. octová [10]. Jako stacionární fáze se nejčastěji využívá C18 kolona [25; 26; 49; 50]. Vitamin C je možné analyzovat také pomocí kapilární elektroforézy [52].

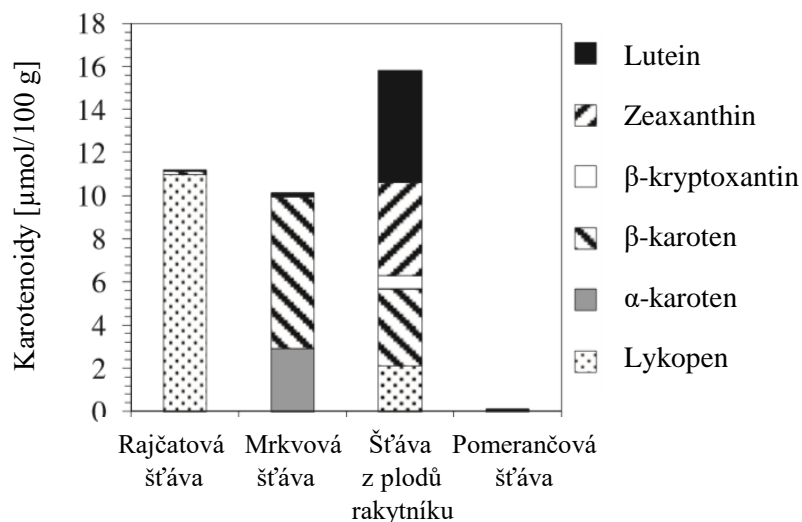
### **2.8.2.2 Analýza nepolárních látek**

Kromě hydrofilních sloučenin je rakytník bohatý také na lipofilní bioaktivní látky, jako jsou karotenoidy, fytosteroly a další [49]. Karotenoidy jsou nejčastěji analyzovány metodou HPLC [21; 22; 59; 60] nebo UHPLC [59] s DAD [21; 22; 59; 60] i hmotnostním spektrometrem [21; 59]. Sloučeniny jsou nejčastěji separovány s využitím stacionární fáze C18 [59] nebo C30 [21; 22; 60]. Jako mobilní fázi lze využít ethylacetát, acetonitril s přidávkem kys. mravenčí či triethylaminu [59], methanol [21] nebo směs methanol/terc-butyl(ethyl)ether/voda [22].



Karotenoidy můžeme v rakytníku najít ve formě volné nebo ve stabilnější formě esterifikované MK (v případě xantofylů). Nejvíce zastoupenými volnými karotenoidy jsou podle studie [59]  $\beta$ -karoten a zeaxanthin. Hlavními esterifikovanými xantofyly jsou zeaxanthin, lutein a  $\beta$ -kryptoxanthin [21; 22; 59]. Identifikací a kvantifikací metodami RP-HPLC-PAD [22; 59] a UHPLC-PAD-ESI-MS bylo zjištěno, že v plodech v rakytníku se nevyskytují esterifikované karotenoidy a listy zase neobsahují chlorofyly [59].

Pomocí metody RP-HPLC byl stanovován celkový obsah karotenoidů ve vzorcích šťáv (rajčatová, mrkvová, pomerančová a z plodů rakytníku) (obrázek 12). Největší množství karotenoidů bylo zaznamenáno u šťavy z plodů rakytníku ( $15,8 \pm 0,8 \mu\text{mol karotenoidů}/100 \text{ g}$ ), kde byl dominantně zastoupen lutein (33 %), zeaxanthin (27 %),  $\beta$ -karoten (23 %) a lykopen (13 %) [60].

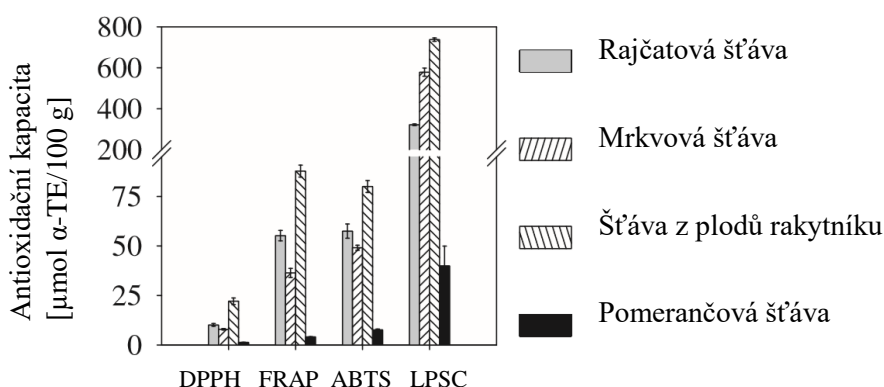


**Obrázek 12** – Obsah karotenoidů v různých šťávách [60]

Při analýze  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, a  $\delta$ - tokoferolů pomocí HPLC lze jako mobilní fázi využít acetonitril/methanol/dichlormethan [53] nebo např. hexan/2-propanol [22] či směs *n*-hexanu a 1,4-dioxanu [47]. U HPLC separace v systému s normálními fázemi je stacionární fází kolony silikagel [22; 60].

### 2.8.3 Příklady stanovení antioxidační aktivity látek obsažených v rakytníku

Cílem studie [60] bylo porovnat hodnoty antioxidačních aktivit získaných různými metodami (FRAP, ABTS, DPPH a LPSC) u několika karotenů a xantofylů. Během metody LPSC byly generovány peroxylové radikály a jako chemiluminiscenční látka byl využit luminol. Byly testovány čtyři vzorky šťáv: rajčatová, mrkvová, pomerančová a z plodů rakytníku. Za použití *n*-hexanu byly připraveny lipofilní extrakty těchto druhů šťáv. Jako standard byl využit  $\alpha$ -tokoferol ( $\alpha$ -T) a antioxidační kapacita byla vyjádřena v  $\mu\text{mol } \alpha\text{-T}$  ekvivalentů ( $\alpha\text{-TE}$ ) na 100 g pro vzorky šťáv.



Obrázek 13 – Hodnocení antioxidační aktivity u různých druhů šťáv [60]

Jak lze vidět na obrázku 13, pro stanovení antioxidační kapacity karotenoidů ve vzorcích šťáv byla nejméně vhodná metoda DPPH, naopak nejvyšších hodnot dosahovaly vzorky testované metodou LPSC. U metod ABTS a FRAP lze pozorovat podobné výsledky. Nejvyšších hodnot antioxidační aktivity dosahoval u každé metody lipofilní extrakt získaný ze šťavy plodů rakytníku řešetlákového, při analýze vzorku metodou LPSC dosahoval až 738  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$  [60].

Antioxidační aktivita byla pomocí metody DPPH hodnocena i u extraktů z plodů rakytníku. Extrakty byly připraveny z vysušených a rozemletých bobulí extrakcí nadkritickým  $\text{CO}_2$ . Antioxidační aktivita byla vyjádřena jako  $\text{EC}_{50}$  (DPPH), což vyjadřuje koncentraci extraktu, která způsobila 50% snížení absorbance DPPH. V práci byla testována účinnost extraktu v závislosti na organickém modifikátoru použitém při extrakci (methanol, ethanol, 2-propanol). Nejvyšší antioxidační aktivita byla pozorována při použití 30% methanolu, kdy došlo ke snížení  $\text{EC}_{50}$  z  $29,0,2 \pm 1,34 \text{ mg/ml}$  na  $18,85 \pm 1,84 \text{ mg/ml}$  [18].

Schopnost rakytníkového oleje vycytávat volné radikály byla hodnocena čtyřmi metodami (ABTS, ORAC, FRAP a DPPH). Díky složení (vyšší obsah tokoferolů/tokotrienolů a fytosterolů) semenný olej vykazoval lepší antioxidační vlastnosti, pokud se jednalo o hodnoty testu ORAC, FRAP a DPPH. Olej získaný z dužiny plodů (vyšší množství polyfenolů, flavonoidů a karotenoidů) ve výsledku ukazoval lepší hodnoty při použití metody ABTS oproti semennému oleji [27].

### 3 ZÁVĚR

Tato práce je zaměřena na analýzu biologicky aktivních látek v rakytníku řešetlákovém. Mezi nejvíce zastoupené účinné látky v rakytníku patří vitamin C, flavonoidy, karotenoidy, tokoferoly a mastné kyseliny. Nejdříve je nutné před samotnou analýzou izolovat stanovované látky v maximálním množství ze vzorku, a to formou extrakce. Nejvíce využívanými metodami extrakce vzorků rakytníku jsou extrakce nadkritickou tekutinou, Soxhletova a ultrazvuková extrakce. Extrakce může být ovlivněna použitým rozpouštědlem, teplotou extrakce, extrakční dobou a tlakem, velikostí částic vzorku nebo poměrem pevné látky a rozpouštědla. Látky hydrofilní povahy jsou nejčastěji extrahovány methanolem a ethanolem. U látek lipofilní povahy se využívají rozpouštědla jako hexan a petrolejový ether. Pro získání co nejvyšších výtěžků jsou tvořeny extrakční směsi.

Kapalinová chromatografie, u většiny látek použitá v systému s obrácenými fázemi, je široce využívána k analýze chemických sloučenin obsažených v rakytníku nejčastěji ve spojení se spektrofotometrickým detektorem nebo hmotnostním spektrometrem. Při analýze polyfenolických a jiných polárních látek lze využít i metodu kapalinové chromatografie hydrofilních interakcí nebo kapilární elektroforézu. Používanými mobilními fázemi je např. acetonitril či methanol s přídavkem kyseliny octové nebo mravenčí. Dominantně zastoupenými polyfenoly jsou isorhamnetin, kvercetin a jejich glykosidy. V případě analýzy nepolárních látek je kromě C18 kolony využívána také kolona se stacionární fází C30. Jako mobilní fáze se používá acetonitril, ethylacetát a další.

U látek s antioxidačními vlastnostmi, jako jsou karotenoidy, můžeme využít spektrofotometrické metody, jako je DPPH, ABTS, FRAP či ORAC. Uvedené metody nejsou selektivní, ale je možné je využít při porovnání antioxidačních vlastností vzorků stejné povahy.

## 4 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BAJER, Jiří. *Rakytník: zázračná rostlina, oranžový poklad...* 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2014, 157 s. ISBN 978-80-204-3385-5.
- [2] Herbář. *BOTANY.CZ* [online]. © 2007-2017 [cit. 2017-12-27]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/hippophae-rhamnoides/>
- [3] ČERVENKA, Martin, Katarína CIGÁNOVÁ a Anna SKALICKÁ. *Klíč k určování dřevin podle pupenů a větviček*. Vyd. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1980, s. 71.
- [4] COOMBES, Allen, Matthew WARD a Renata MENCLOVÁ. *Stromy: [obrazový průvodce k více než 500 druhů stromů z celého světa]*. Vyd. 1. Martin: Osveta, 1996, s. 140. ISBN 80-88824-16-8.
- [5] JAHODÁŘ, Luděk. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2006, s. 123. ISBN 80-246-1225-9.
- [6] KORBELÁŘ, Jaroslav a Zdeněk ENDRIS. *Naše rostliny v lékařství*. 4., rozš. a zcela přeprac. vydání. Praha: Avicenum, 1973, s. 174.
- [7] BEISER, Rudi. *Jedlé rostliny v přírodě*. Vyd. 1. Praha: Knižní klub, 2014, s.142-143. ISBN 978-80-242-4210-1.
- [8] BEVERIDGE, Tom, Thomas LI, B. OOMAH a Allen SMITH. Sea Buckthorn Products: Manufacture and Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1999, 47(9), 3480-3488 [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.1021/jf981331m. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf981331m>
- [9] ŠNĚ, Elga, Ruta GALO BURDA a Dalija SEGLIŇA. Sea Buckthorn Vegetative Parts – A Good Source of Bioactive Compounds. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences* [online]. 2013, 67(2), - [cit. 2017-12-29]. DOI: 10.2478/prolas-2013-0016. ISSN 1407-009x. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/prolas.2013.67.issue-2/prolas-2013-0016/prolas-2013-0016.xml>

- [10] GRADT, Ina, Sascha KÜHN, J.-Thomas MÖRSEL a Galina ZVAIGZNE. Chemical Composition of Sea Buckthorn Leaves, Branches and Bark. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences* [online]. 2017, 71(3), - [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1515/prolas-2017-0035. ISSN 1407-009X. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/prolas.2017.71.issue-3/prolas-2017-0035/prolas-2017-0035.xml>
- [11] DONG, Ruifang, Juan SU, Hua NIAN, Hui SHEN, Xin ZHAI, Hailiang XIN, Luping QIN a Ting HAN. 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* [online]. 2017, 37, 513-522 [cit. 2018-05-21]. DOI: 10.1016/j.jff.2017.08.019. ISSN 17564646. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464617304826>
- [12] SURYAKUMAR, Geetha a Asheesh GUPTA. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2011, 138(2), 268-278 [cit. 2018-01-08]. DOI: 10.1016/j.jep.2011.09.024. ISSN 03788741. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874111006945>
- [13] BAL, Lalit, Venkatesh MEDA, S.N. NAIK a Santosh SATYA. Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals. *Food Research International* [online]. 2011, 44(7), 1718-1727 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.03.002. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911001591>
- [14] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 331 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [15] COMBS, Gerald. *The vitamins: [fundamental aspects in nutrition and health]*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2012, 570 s. ISBN 978-0-12-381980-2.
- [16] KREJCAROVÁ, Jana, Eva STRAKOVÁ, Pavel SUCHÝ, Ivan HERZIG a Kateřina KARÁSKOVÁ. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as a potential source of nutraceuticals and its therapeutic possibilities - a review. *Acta Veterinaria Brno* [online]. 2015, 84(3), 257-268 [cit. 2018-01-08]. DOI: 10.2754/avb201584030257. ISSN 0001-7213. Dostupné z: <http://actavet.vfu.cz/84/3/0257/>

- [17] OLAS, Beata. Sea buckthorn as a source of important bioactive compounds in cardiovascular diseases. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2016, 97, 199-204 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1016/j.fct.2016.09.008. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691516303234>
- [18] KAGLIWAL, Lalit, Anuradha POL, Sushant PATIL, Rekha SINGHAL a Vandana PATRAVALE. Antioxidant-Rich Extract from Dehydrated Seabuckthorn Berries by Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Food and Bioprocess Technology* [online]. b.r. [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1007/s11947-011-0613-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-011-0613-8>
- [19] YANG, Baoru a Heikki KALLIO. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophaë*) lipids. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2002, 13(5), 160-167 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1016/S0924-2244(02)00136-X. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422440200136X>
- [20] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 343 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [21] GIUFFRIDA, Daniele, Adela PINTEA, Paola DUGO, Germana TORRE, Raluca Maria POP a Luigi MONDELLO. Determination of Carotenoids and their Esters in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) by HPLC-DAD-APCI-MS. *Phytochemical Analysis* [online]. 2012, 23(3), 267-273 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1002/pca.1353. ISSN 09580344. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pca.1353>
- [22] POP, Elena Andreea, Zorița M. DIACONEASA, Florinela FETEA, Andrea BUNEA, Francisc DULF, Adela PINTEA a Carmen SOCACIU. 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* [online]. 2015, 72(2), - [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.15835/buasvmcn-fst:11425. ISSN 2344-5300. Dostupné z: <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/fst/article/view/11425>
- [23] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002, 368 s. ISBN 80-866-5903-8.

- [24] POP, Raluca Maria, Carmen SOCACIU, Adela PINTEA, Anca Dana BUZOIANU, Mark Gerardus SANDERS, Harry GRUPPEN a Jean-Paul VINCKEN. UHPLC/PDA-ESI/MS Analysis of the Main Berry and Leaf Flavonol Glycosides from Different Carpathian Hippophaë rhamnoides L. Varieties. *Phytochemical Analysis* [online]. 2013, 24(5), 484-492 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1002/pca.2460. ISSN 09580344. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pca.2460>
- [25] TIITINEN, Katja M., Baoru YANG, Gudmundur G. HARALDSSON, Sigrídur JONSDOTTIR a Heikki P. KALLIO. Fast Analysis of Sugars, Fruit Acids, and Vitamin C in Sea Buckthorn ( Hippophaë rhamnoides L.) Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, 54(7), 2508-2513 [cit. 2018-05-21]. DOI: 10.1021/jf053177r. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf053177r>
- [26] GUTZEIT, D., G. BALEANU, P. WINTERHALTER a G. JERZ. 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* [online]. 2008, 73(9), 615-620 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00957.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2008.00957.x>
- [27] ZHENG, Li, Long-Kai SHI, Chen-Wei ZHAO, Qing-Zhe JIN a Xing-Guo WANG. Fatty acid, phytochemical, oxidative stability and in vitro antioxidant property of sea buckthorn ( Hippophaë rhamnoides L. ) oils extracted by supercritical and subcritical technologies. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2017, 86, 507-513 [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.08.042. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643817306126>
- [28] OLAS, Beata. The beneficial health aspects of sea buckthorn ( Elaeagnus rhamnoides (L.) A.Nelson) oil. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2018, 213, 183-190 [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.1016/j.jep.2017.11.022. ISSN 03788741. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874117332488>
- [29] ZENG, Lei a Huai TANG. The Health Effects of Sea Buckthorn. *Applied Mechanics and Materials* [online]. 2014, 675-677, 1642-1645 [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMM.675-677.1642. ISSN 1662-7482. Dostupné z: [www.scientific.net/AMM.675-677.1642](http://www.scientific.net/AMM.675-677.1642)



<http://www.scientific.net/AMM.675-677.1642>

- [30] BLECHA, Jan. *Rakytník řešetlákový (Hippophae Rhamnoides L.) jako zdroj biochemicky aktivních látek* [online]. Praha, 2012 [cit. 2017-12-29]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/130073159/?lang=cs>. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.
- [31] YUE, Xuan-Feng, Xiao SHANG, Zhi-Juan ZHANG a Yan-Ni ZHANG. Phytochemical composition and antibacterial activity of the essential oils from different parts of sea buckthorn ( Hippophae rhamnoides L.). *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2017, 25(2), 327-332 [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.10.010. ISSN 10219498. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949816301594>
- [32] UPADHYAY, Nitin, M.S. YOGENDRA KUMAR a Asheesh GUPTA. Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2010, 48(12), 3443-3448 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1016/j.fct.2010.09.019. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691510005831>
- [33] XU, Yan-Jun, Meera KAUR, Reshvinder DHILLON, Paramjit TAPPIA a Naranjan DHALLA. Health benefits of sea buckthorn for the prevention of cardiovascular diseases. *Journal of Functional Foods* [online]. 2011, 3(1), 2-12 [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.1016/j.jff.2011.01.001. ISSN 17564646. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464611000028>
- [34] KEALEY, D. a P. HAINES. *Analytical chemistry*. Oxford: BIOS, 2002, 342 s. Instant notes series. ISBN 18-599-6189-4.
- [35] BORKOVCOVÁ, Ivana a Romana KOSTRHOUNOVÁ. *Extrakční metody* [online]. b.r. [cit. 2018-05-28]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/pub-files/realizovane-klicove-aktivity/zs-2013-2014/h3cp1/index/h3cp1---extrakcni-metody--studijni-material-zs-13-14.pdf>
- [36] RIDDELOVÁ, Kateřina. *Izolační a separační metody* [online]. b.r. [cit. 2018-05-28]. Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-6%20LSC\\_SPE\\_2012.pdf](https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-6%20LSC_SPE_2012.pdf)

- [37] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [38] VONDRÁK, Dalibor a Jaroslav VULTERIN. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985, 262 s.
- [39] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 262 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [40] HOLZBECHER, Závěš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 663 s.
- [41] Soxhlet extractor. In: *Chemistry glossary* [online]. b.r. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: [https://www.periodni.com/gallery/soxhlet\\_extractor.png](https://www.periodni.com/gallery/soxhlet_extractor.png)
- [42] BRAITHWAITE, A., F. SMITH a R. STOCK. *Chromatographic methods*. 4th ed. New York: Chapman and Hall, 1985. ISBN 04-122-5890-0.
- [43] Instrumentation of HPLC. In: *Laboratoryinfo.com* [online]. b.r. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/wp-content/uploads/2015/07/High-performance-liquid-chromatography-hplc.jpg>
- [44] XU, Dong-Ping, Ya LI, Xiao MENG, Tong ZHOU, Yue ZHOU, Jie ZHENG, Jiao-Jiao ZHANG a Hua-Bin LI. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, 18(1), 96- [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.3390/ijms18010096. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/1/96>
- [45] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity in vitro. *Chem. listy*. 2004, 98, 174-179.
- [46] ZULUETA, Ana, Maria ESTEVE a Ana FRÍGOLA. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* [online]. 2009, 114(1), 310-316 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.033. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608011047>
- [47] GÓRNAŚ, Paweł, Elga ŚNĚ, Aleksander SIGER a Dalija SEGLIŃA. 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* [online]. 2014, 60, 1-7 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.05.053. ISSN 09266690. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669014003331>
- [48] GONG, Ying, Xiaofei ZHANG, Li HE, Qiuli YAN, Fang YUAN a Yanxiang GAO. Optimization of subcritical water extraction parameters of antioxidant polyphenols from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) seed residue. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2015, (3), 1534-1542 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1007/s13197-013-1115-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-013-1115-7>
- [49] TELESZKO, Mirosława, Aneta WOJDYŁO, Magdalena RUDZIŃSKA, Jan OSZMIAŃSKI a Tomasz GOLIS. Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Bioactive Compounds Content in Sea Buckthorn ( *Hippophaë rhamnoides* L.) Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015, 63(16), 4120-4129 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00564. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b00564>
- [50] KALLIO, Heikki, Baoru YANG a Pekka PEIPPO. 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* [online]. 2002, (21), 6136-6142 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1021/jf020421v. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf020421v>
- [51] KALLIO, Heikki, Wei YANG, Pengzhan LIU a Baoru YANG. 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* [online]. 2014, 62(31), 7721-7729 [cit. 2018-05-21]. DOI: 10.1021/jf502056f. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf502056f>
- [52] GORBATSOVA, Jelena, Tiina LÕUGAS, Raivo VOKK a Mihkel KALJURAND. Comparison of the contents of various antioxidants of sea buckthorn berries using CE. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2007, 28(22), 4136-4142 [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1002/elps.200700362. ISSN 01730835. Dostupné z:

<http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200700362>

- [53] KITRYTĖ, Vaida, Darius POVILAITIS, Vaida KRAUJALIENĖ, Vaida ŠULNIŪTĖ, Audrius PUKALSKAS a Petras VENSKUTONIS. Fractionation of sea buckthorn pomace and seeds into valuable components by using high pressure and enzyme-assisted extraction methods. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2017, 85, 534-538 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.02.041. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643817301421>
- [54] LU, Zhao, Wen E, Upur HALMUART a Tlan SHUGE. High performance liquid chromatography - diode array detector method for the simultaneous determination of five compounds in the pulp and seed of sea buckthorn. *Pharmacognosy Magazine* [online]. 2017, 13(49) [cit. 2018-03-21]. ISSN 0973-1296.
- [55] SAJFRTOV, M. a Helena SOVOVA. Solute-Matrix and Solute-Solute Interactions During Supercritical Fluid Extraction of Sea Buckthorn Leaves. *Procedia Engineering* [online]. 2012, 42, 1682-1691 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.proeng.2012.07.561. ISSN 18777058. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877705812029682>
- [56] ZU, Yuangang, Chunying LI, Yujie FU a Chunjian ZHAO. 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* [online]. 2006, 41(3), 714-719 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.04.052. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073170850600166X>
- [57] VAHER, Merike a Mihkel KOEL. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, 990(1-2), 225-230 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)02013-7. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302020137>
- [58] VAHER, Merike a Mihkel KOEL. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, 990(1-2), 225-230 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1016/S0021-

9673(02)02013-7. ISSN 00219673. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302020137>

- [59] POP, Raluca Maria, Yannick WEESEPOEL, Carmen SOCACIU, Adela PINTEA, Jean-Paul VINCKEN a Harry GRUPPEN. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chemistry* [online]. 2014, 147, 1-9 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.083. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613013484>
- [60] MÜLLER, Lars, Kati FRÖHLICH a Volker BÖHM. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry* [online]. 2011, 129(1), 139-148 [cit. 2018-03-20]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.04.045. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611006108>