

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta tropického zemědělství



Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta tropického
zemědělství**

Chemická analýza bioaktivních složek extraktu z rakytníku

Bakalářská práce

Praha 2018

Vypracovala:

Veronika Pochylá

Vedoucí práce:

Ing. Klára Urbanová, Ph.D.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Veronika Pochylá

Zemědělství tropů a subtropů

Název práce

Chemická analýza bioaktivních složek extraktu z rakytníku

Název anglicky

Chemical analysis of bioactive components of sea buckthorn extract

Cíle práce

Cílem práce je chemická analýza extraktů z plodů rakytníku a identifikace účinných látek. Dále bude sledováno zastoupení jednotlivých složek extraktu různých odrůd rakytníku.

Metodika

Rakytník obsahuje vysoký obsah vitamínu C a mnoho dalších zdraví prospěšných látek. Literární rešerše bude zaměřená na využití, zdravotní a léčebné účinky různých druhů rakytníku, dále pak možnosti extrakce a analýzy účinných látek. Experimentální část je zaměřena na extrakci účinných látek a jejich následnou analýzu z různých odrůd rakytníku. Připravené extrakty budou analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Doporučený rozsah práce
20-30

Klíčová slova

extrakce, rakytník, GC-MS

Doporučené zdroje informací

In-tube extraction and GC-MS analysis of volatile components from wild and cultivated sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *Carpatica*) berry varieties and juice. *Phytochem Anal.* 2013 Jul-Aug;24(4):319-28. doi: 10.1002/pca.2413. Epub 2013 Jan 15.

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL EFFECTS OF SEA BUCKTHORN BERRIES. 2011 JUL; 24(3):345-351

Předběžný termín obhajoby
LS 2017/2018 – FTZ

Vedoucí práce

Ing. Klára Urbanová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra udržitelných technologií

Elektronicky schváleno dne 26. 2. 2018

doc. Ing. Jan Banout, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 26. 2. 2018

doc. Ing. Jan Banout, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 20. 04. 2018

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma „**Chemická analýza bioaktivních složek z plodů rakytníku**“ vypracovala samostatně, veškerý text je v práci původní a originální a všechny použité literární prameny jsem podle pravidel Citační normy FTZ řádně uvedla v referencích.

V Praze dne 20. dubna 2018

.....

Veronika Pochylá

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, Ing. Kláře Urbanové, Ph.D, za její odborné vedení, mimořádnou ochotu, cenné rady a přátelský přístup, který mi poskytla při zpracování této bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala své rodině za podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého vysokoškolského studia.

Abstrakt

Chemická analýza bioaktivních složek z plodů rakytníku

Rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides* L.) je mladá kulturní rostlina, která je oceňována především díky svým bobulím pro jejich vysoký obsah vitaminů, antioxidantů, minerálů a esenciálních olejů s léčivými účinky. Léčivé účinky této rostliny jsou bohatě využívány v kosmetickém průmyslu, ve zdravotnictví a veterinární medicíně.

Esenciální olej z plodů rakytníku řešetlákového byl extrahován pomocí hydrodestilační metody a následně analyzován plynovým chromatografem s hmotnostní detekcí. Výsledkem této analýzy byl chromatogram s jednotlivými píky látek, které byly následně určovány pomocí knihovny v programu MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.07.00. Výzkum se zabýval porovnáním třech odrůd rakytníku řešetlákového a to odrůdou Leikora, Frugana a odrůdou Hergo.

Výsledné látky byly následně porovnávány mezi jednotlivými testovanými odrůdami a také s výzkumy jiných autorů. Byly zjištěny rozdíly v koncentracích jednotlivých obsažených látek u různých odrůd rakytníku řešetlákového. Zastoupení jednotlivých látek u několika odrůd rakytníku řešetlákového se významně lišilo. Zaznamenané látky se u testovaných odrůd objevovaly o několik minut později než u výzkumu dle Yue et al. (2016). Odrůda Leikora a Frugana se svými obsahovými látkami a jejich koncentracemi nejvíce vzájemně podobaly, zatímco odrůda Hergo měla jiné procentuální zastoupení než předchozí dvě odrůdy.

Klíčová slova: Rakytník řešetlákový, *Hippophae rhamnoides*, extrakce, esenciální olej, GC – MS, plynová chromatografie

Author's abstract

Chemical analysis of bioactive components of sea buckthorn extract

Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) is a young cultural plant that is appreciated mainly for its berries and their high content of vitamins, antioxidants, minerals and essential oils with healing effects. The healing effects of this plant are widely used in the cosmetics industry, health care and veterinary medicine sector.

Essential oil of Sea buckthorn berries was extracted by hydrodistillation method and then analyzed by gas chromatograph with mass detection. The result of this analysis was a chromatogram with individual peaks of substances which were determined by using a library in MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.07.00. The research dealt with the comparison of three varieties of sea buckthorn which was a variety Leikora, Frugana and Hergo.

The final substances were then compared between the individual tested varieties and also to the other authors' researches. Differences in the concentrations of individual substances contained in different varieties of sea buckthorn were found. The distribution of individual substances in several varieties of sea buckthorn differs significantly. Recorded substances appeared in tested varieties a few minutes later than in the research by Yue et al. (2016). The Leikora and Frugana varieties were the most closely related to their content and concentrations, whereas the Hergo variety had a different percentage of the previous two varieties.

Key words: Sea buckthorn, *Hippophae rhamnoides*, extraction, essential oil, GC – MS, gas chromatography

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1 Taxonomie	2
2.2 Botanický popis	3
2.3 Rozšíření a výskyt	4
2.4 Původ a historie	6
2.5 Odrůdová skladba	7
2.5.1 Samičí odrůdy použité pro výzkum.....	7
2.5.2 Další běžně pěstované samičí odrůdy	8
2.5.3 Samčí odrůdy	8
2.6 Požadavky na pěstování rakytníku.....	9
2.6.1 Klimatické podmínky	9
2.6.2 Půdní nároky	9
2.6.3 Závlaha a hnojení.....	9
2.6.4 Nemoci a škůdci	10
2.7 Způsoby sklizně rakytníku	11
2.8 Výnos.....	11
2.9 Způsoby zpracování plodů	13
2.9.1 Extrakce šťávy	14
2.9.2 Extrakce oleje.....	15
2.9.3 Extrakce pigmentu	16
2.10 Obsahové látky	16
2.10.1 Vitaminy rozpustné ve vodě	16
2.10.2 Vitamíny rozpustné v tucích	17
2.10.3 Další bioaktivní látky	18
2.10.4 Bioaktivní komponenty v rakytníkovém oleji	19
3. Způsoby rozmnožování rakytníku	20
3.1 Generativní rozmnožování.....	20
3.2 Vegetativní množení	21

3.2.1	Množení kořenovými řízký	21
3.2.2	Očkování	21
3.2.3	Roubování	22
3.2.4	Rozmnožování dřevitými řízký	22
3.2.5	Rozmnožování bylinnými řízký	22
4.	Hydrodestilace – destilace vodní parou	23
5.	Základní rozdělení chromatografických metod	23
5.1	Rozdělení chromatografie podle uspořádání	23
5.2	Rozdělení podle separačního principu.....	24
5.3	Rozdělení podle skupenství fází.....	24
5.3.1	Plynová chromatografie - GC.....	24
5.4	Hmotnostní spektrometr	25
5.5	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí GC-MS.....	25
6.	Cíl práce.....	27
7.	Materiál a metodika	28
7.1	Sběr vzorků	28
7.2	Příprava vzorku	28
7.3	GS-MC analýza	30
8.	Výsledky a diskuse	31
9.	Závěr	39
10.	Seznam použité literatury	41

Seznam tabulek

Tabulka 1: Taxonomické rozdělení rodu Hippophae (Rajchal 2008)	2
Tabulka 2: Zastoupení MK v triacylglycerolech v olejích rakytníku řešetlákového	19
Tabulka 3: Přehled získaných látek u odrůdy Leikora	31
Tabulka 4: Přehled získaných látek u odrůdy Frugana	33
Tabulka 5: Přehled získaných látek u odrůdy Hergo	35

Seznam obrázků

Obrázek 1: Detail plodů rakytníku (Beran 2015).....	4
Obrázek 2: Rozšíření rakytníku řešetlákového v Evropě a Asii (Yang & Kallio 2002).....	5
Obrázek 3: Výsadba sadu rakytníku (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs Ontario 2012).....	12
Obrázek 4: Schéma zpracování plodů rakytníku s výslednými produkty (Koskovac et al. 2017).....	13
Obrázek 5: Plynový chromatogram s hmotnostní detekcí (GC-MS) (Agilent technologies 2014).....	26
Obrázek 6: Hydrodestilační kolona s plody rakytníku (foto: Veronika Pochylá).....	29

Seznam zkratek

°Bx	–	stupeň Brix (poměr hmotnosti cukru a vody)
GC	–	plynová chromatografie (gas chromatography)
GC-MS	–	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (gas chromatography- mass spectrometry)
HTST	–	ošetření vysokou teplotou po krátký čas (high temperature short time)
LC	–	kapalinová chromatografie (layer chromatography)
MK	–	mastná kyselina
MPa	–	megapascal
MS	–	hmotnostní spektrometr (mass spectrometer)
NDR	–	Německá demokratická republika
PC	–	papírová chromatografie (paper chromatography)
SB	–	rakytník řešetlákový (Sea buckthorn)
SCFE	–	extrakce superkritickou tekutinou
SSSR	–	Svaz sovětských socialistických republik
TLC	–	tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)
UV	–	ultrafialové záření (ultra violet)
w/w	–	hmotností zlomek

1. Úvod

„Již dávno není pravda, že rakytník je ten trnitý keř s kyselými plody, které se hodí asi jenom pro ptáky v zimě a k osazení zdevastované půdy, ...“ (Bajer 2014). I přesto, že je rakytník řešetlákový poměrně mladou kulturní plodinou, stále se mu dostává větší a větší pozornosti. Bobule jsou oceňovány hlavně pro jejich vysoký obsah vitaminů, antioxidantů, minerálů a esenciálních olejů s léčivými účinky (Bajer 2014). Plody také obsahují velké množství vitamínu C, který dosahuje vysokých hodnot (695 mg/100 g), jak uvedl Gao et al. (2000). V porovnání s pomerančí (51 mg/100 g) či citróny (49 mg/100 g) je rakytník na vitamin C mnohonásobně bohatší (Christaky 2012). Plody jsou díky jejich bohatému chemickému složení také často využívány pro kosmetické účely. Hlavní složkou rakytníkového oleje jsou tzv. triglyceridy, které obsahují vysoký podíl mastných kyselin, a tak mají blahodárné účinky na udržení hydratace pokožky vytvořením okluzivního filmu na kůži. Kromě plodů se z rakytníku dá využívat dřevo pro jeho vysokou výhřevnost nebo listy například v potravinářství, zdravotnictví a veterinární medicíně (Bajer 2014).

Vzhledem ke své vysoké odolnosti je rakytník využíván k zalesňování polopouští, zasolených půd, dálničních náspů i erozních svahů. Svými kořeny výborně stabilizuje půdu a zabraňuje tím další erozi (Bajer 2014).

V řadě zemí jsou dnes rozvinuty programy na šlechtění nových odrůd, zaměřující se zejména na látky obsažené v plodech, jako je například rutin (Bajer 2014).

2. Literární přehled

2.1 Taxonomie

Rakytník (*Hippophae*) je ovocná dřevina z čeledi hlošínovitých (*Eleagnaceae*), kterou v roce 1971 Arne Rousi rozdělil do devíti poddruhů. Lian et al. (2000) značně přispěl svými poznatky, objevením a spoluurčením nových druhů rakytníku a společně sestavili úplné taxonomické uspořádání (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Taxonomické rozdělení rodu *Hippophae* (Rajchal 2008)

Rozdělení rodu <i>Hippophae</i>	
Druh	Poddruh
<i>Hippophae goniocarpa</i>	
<i>Hippophae gyantsensis</i>	
<i>Hippophae litangensis</i>	
<i>Hippophae neurocarpa</i>	
	i. <i>Subsp. Neurocarpa</i>
	ii. <i>Subsp. Stelatopilosa</i>
<i>Hippophae salicifolia</i>	
<i>Hippophae tibetana</i>	
<i>Hippophae rhamnoides</i>	i. <i>Subsp. Carpatica</i>
	ii. <i>Subsp. Caucasica</i>
	iii. <i>Subsp. Fluviatilis</i>
	iv. <i>Subsp. Mongolka</i>
	v. <i>Subsp. Rhamnoides</i>
	vi. <i>Subsp. Sinensis</i>
	vii. <i>Subsp. Turkestanica</i>
	viii. <i>Subsp. Wolongensis</i>
	ix. <i>Subsp. Yunnanensis</i>

2.2 Botanický popis

Rakytník je zdraví prospěšná ovocná dřevina, která snese velmi variabilní podmínky pro pěstování. Jedná se o dvoudomý opadavý keř dosahující výšky 2-3 m, případně strom o výšce 10-18 m, v závislosti na lokalitě růstu (Bajer 2014).

Celkový habitus je velmi neuspořádaný. Korunu tvoří především široce rozvětvené, trnité větve (Valíček 2007). Koruna je v mladém věku stříbřitě šedá, porostlá drobnými šupinkami. I dřevo rakytníku v průběhu let mění svou barvu od šedé až po tmavě hnědou. Velikost ostnů závisí na odrůdě rakytníku, obvykle se pohybuje v délce od 0,5-5 cm (Valíček & Havelka 2008).

Kořeny rakytníku dosahují hloubky okolo 60-90 cm a tvoří mnoho kořenových výmladků, které usnadňují jeho rozmnožování (Yao & Tigerstedt 1994). Součástí mělce kořenícího kořenového systému jsou symbiotické bakterie schopné poutat vzdušný dusík, a tak obohacují půdu a zlepšují půdní vlastnosti (Dobritsa & Novik 1992).

Kopinaté, celokrajné listy jsou na větvičce uspořádány střídavě. V některých asijských zemích, např. Číně, mohou být uspořádány protistojně. Svrchní strana listu je proti stříbřitě šedému rubu temně zelená a lesklá (Valíček 2007).

Rakytník je dvoudomá a hmyzosubná rostlina. Samčí rostliny mají pupeny značně větší než samičí. Bezkorunné, zelenožluté listy vyrůstají v úžlabí listu, mají nálevkovitý tvar koruny se skrytým pestíkem uvnitř (Valíček 2007). Květy netvoří nektar, což velice snižuje jejich atraktivitu pro hmyz (British Columbia Ministry of Agriculture 2001). Květenství má hroznovitý tvar (Valíček & Havelka 2008).

Tvar a zaoblení plodu se může lehce lišit. Jedná se o kulaté, oválné či „slzičkovité“ peckovice, které mají žlutou, oranžovou až červenou barvu (Obrázek 2). Dužina je zpravidla oranžová, olejovitá s výraznou chutí, která přechází od kyselé, nahořklé až po sladkou (Valíček & Havelka 2008). Plody na rostlině vytrvávají dlouho do zimy (Brickell 2008). Tmavě hnědé, lesklé semeno má elipsovitý tvar s podélnou brázdičkou (Valíček 2007).



Obrázek 1: Detail plodů rakytníku (Beran 2015)

2.3 Rozšíření a výskyt

Původní místo výskytu není známo. Rakytník je velmi rozšířenou rostlinou, která zaujímá velmi značnou část evropského a asijského kontinentu (Valíček & Havelka 2008). V západní Evropě se dodnes vyskytují některé z původních rakytníkových porostů, hlavně v oblasti povodí řek a na mořských pobřežích. Velmi bujně roste v blízkosti horských italských, švýcarských a rakouských řek, výjimkou ale není ani Francie, Anglie, Holandsko, Finsko a sousední státy Německo a Polsko (Bajer 2014).

V Asii se rakytník hojně vyskytuje na území Ruska, a to především v sibiřských oblastech. Dále se pozvolna přesouvá do středu asijského kontinentu, severního Kavkazu, Mongolska až po Čínu (Valíček 2007). Podle Lu (1992) lze původní porosty nalézt také v Bhútánu, Indii v oblasti Himalájí a Nepálu. Z celosvětového hlediska se nejvíce původních, divokých porostů (až 90 %) dodnes nalézá na území Číny. V Čechách se bohužel původní porosty nedochovaly (Bajer 2014).

Na Obrázku 2 je vyobrazeno rozšíření rakytníku řešetlákového v Evropě a Asii.



- *H. rhamnoides* L. subsp. *rhamnoides*
- ◆ *H. rhamnoides* L. subsp. *fluviatilis* Soest
- ✓ *H. rhamnoides* L. subsp. *carpatica* Rousi
- ☆ *H. rhamnoides* L. subsp. *caucasica* Rousi
- * *H. rhamnoides* L. subsp. *mongolica* Rousi
- *H. rhamnoides* L. subsp. *yunnanensis* Rousi
- ⊕ *H. rhamnoides* L. subsp. *gyatsensis* Rousi
- *H. rhamnoides* L. subsp. *sinensis* Rousi
- ⊥ *H. rhamnoides* L. subsp. *turkestanica* Rousi
- ◆ *H. tibetana* Schlecht.
- *H. salicifolia* Don
- ⌒ *H. neurocarpa* Liu et He

Obrázek 2: Rozšíření rakytníku řešetlákového v Evropě a Asii (Yang & Kallio 2002)

2.4 Původ a historie

Rakytník byl bohatě využíván již v čínské, mongolské, tibetské a indické medicíně (Valíček & Havelka 2008). Jméno této významné rostliny se skládá ze dvou řeckých slov – „Hippos“, což znamená kůň, a „Phaes“ neboli lesk. Tento název získal za doby Alexandra Makedonského, který jej využíval jako krmivo pro koně pro krásnou, pevnou a lesklou srst (Górnaš et al. 2016). Nicméně v některé literatuře je tato verze zpochybňována (Albert et al. 2008)

První zmínky o léčivých účincích rakytníku nalezneme v čínské literatuře, zabývající se tradiční medicínou již na počátku našeho letopočtu. Bohatou historií má pěstování rakytníku na území Ruska, přičemž zmínky o jeho pěstování v botanické zahradě v Petrohradu sahají do první poloviny 19. století. První odrůdy rakytníku byly vyšlechtěny v SSSR roku 1934 v Altajské šlechtitelské stanici (Valíček & Havelka 2008).

Značný rozmach šlechtění odrůd rakytníku nastal v SSSR po druhé světové válce. První závod na výrobu a zpracování rakytníkového oleje byl vybudován ve městě Bijsk, které leží na jihozápadní Sibiři v blízkosti pohoří Altaj. Po druhé světové válce zájem o léčivé účinky rakytníku prudce vzrostl a rozšířil se zejména do Číny a Kanady. I v těchto zemích se postupem času začaly rozvíjet programy na šlechtění kulturních odrůd (Bajer 2014).

V současné době je rakytník řešetlákový ve velké míře pěstován především v Rusku, Kanadě a Číně. Z ostatních zemí pak v severovýchodním Německu a Maďarsku. Bohaté kolekce odrůd se nacházejí v Toulouse, Petrohradu, Štrasburku a Turku (Valíček & Havelka 2008).

2.5 Odrůdová skladba

2.5.1 Samičí odrůdy použité pro výzkum

2.5.1.1 Leikora

Leikora je jedna z nejstarších pěstovaných odrůd rakytníku, která byla původně pěstována pro její okrasné přednosti. Do sortimentu byla uvedena v roce 1979 jako první německá odrůda. Leikora má silný a stabilní vzrůst. Velmi rychle se regeneruje po řezu, avšak plodí poté až za tři roky. Termín zrání od poloviny září do poloviny října ji řadí mezi pozdní odrůdy. Plody jsou na větvičce velmi pevně přisedlé, kde vytrvávají až do zimy. Obsah vitamínu C v plodech je 240 mg/100 g, obsah oleje je 4,9 % (Bajer 2014).

2.5.1.2 Frugana

Tato odrůda původně pochází z bývalé NDR. Tvoří poměrně bujně rostoucí, trnitý keř dosahující výšky 4-5 metrů. Plody začínají dozrávat v první polovině září až do října. Plody jsou sytě oranžové, střední hmotnosti (100 plodů váží přibližně 40 g). Tato odrůda vyžaduje větší závlahu hlavně v období po seříznutí, protože větve snadno zasychají. Po seříznutí plodných větví je schopna opět plodit za dva roky (Bajer 2014).

2.5.1.3 Hergo

Tato odrůda též pochází z bývalé NDR a v České republice byla zařazena do Listiny povolených odrůd v roce 1991. S touto samičí odrůdou je bezpodmínečně nutné vysadit odrůdu „Pollmix“ jako opylovače (Sus et al. 2003). Hergo tvoří vzrůstný, trnitý keř. Velmi dobře se po sklizni větévek regeneruje a začne plodit opět druhým rokem. Oranžovo-žluté plody střední velikosti mají vysoký obsah vitamínu C. Tato odrůda je velmi rezistentní vůči napadení rakytníkovou mouchou. Plody dozrávají od poloviny září. Začátkem října u přezrálých plodů dochází ke ztrátě pigmentace a plody se vybělují (Bajer 2014).

2.5.2 Další běžně pěstované samičí odrůdy

2.5.2.1 Elizaveta

Tato odrůda byla vyšlechtěna v roce 1990 a vytváří středně vzrůstný keř s oválnou, řídkou korunou. Odrůda je téměř bez trnů, s ne příliš hustým olistěním. V Rusku se řadí mezi pozdní odrůdy, v našich podmínkách plodí již v srpnu. Plody jsou velké, oválné oranžové bobule se sladkokyselou chutí a příjemným aroma. Bobule této odrůdy obsahují 10-12 % sušiny, 6-9 % cukru, 1,1-1,6 % kyselin a 4-5 % oleje. Tato odrůda se doporučuje pro průmyslové výsadby i pro zahrádkáře (Bajer 2014).

2.5.2.2 Krasavice

Předností této odrůdy je vysoká odolnost na klimatické podmínky. Velmi dobře snáší mráz, netrpí chorobami a po řezu do tříletého dřeva se velmi dobře regeneruje. „Krasavice“ obsahuje vysoký podíl rutinu, 519 mg/100 g plodů, který je proslulý svými účinky na zvýšení pružnosti cév a je výborným antioxidantem (Bajer 2014).

2.5.2.3 Sluníčko

Tato ruská odrůda zrající koncem srpna tvoří široký, středně vysoký keř. Plody jsou svítivě oranžové barvy s jemnou, aromatickou, sladkokyselou chutí. Odrůda má zdravý růst, je odolná a dobře se po řezu regeneruje (Bajer 2014).

2.5.3 Samčí odrůdy

2.5.3.1 Alej

Opylovač bujného vzrůstu s pevnými větvemi pocházející z Ruska je vhodný pro opylování ruských odrůd SB. Vytváří mnoho pylových zrn s perfektní klíčivostí (až 95 %). Opylovač je mrazuvzdorný a dobře roste i v našich podmínkách (Bajer 2014).

2.5.3.2 K+ (Kaplus)

Samčí pylová rostlina s velkou násadou pylových pupenů vytváří velké množství klíčivého pylu. Délka jeho kvetení a vysoká produkce kvalitního pylu pokrývá potřeby pro opylení všech evropských odrůd SB (Bajer 2014).

2.6 Požadavky na pěstování rakytníku

2.6.1 Klimatické podmínky

Rakytník je velmi světlo milná pionýrská dřevina. Vzhledem k rozsáhlému areálu rozšíření je rakytník velmi tolerantní a odolná dřevina snášející teploty až do -50 °C. Dobře také snáší vysoké teploty za předpokladu dostatečného obsahu vody v půdě (Valíček & Havelka 2008).

2.6.2 Půdní nároky

Jelikož je rakytník velmi variabilní a přizpůsobivou rostlinou na klimatické podmínky, je zřejmé, že jedním z hlavních faktorů pro pěstování rakytníku řešetlákového jsou půdní podmínky (Bajer 2014). V přirozeném areálu obsazuje lehké, propustné, písčité půdy. Roste však i na vlhčích stanovištích a rovněž dobře snáší zasolené půdy (Hieke 1978). Nejlépe se rakytníku daří na půdách s vysokým obsahem vápníku, na kterých se i v oblasti přirozeného areálu vyskytuje nejčastěji (Walter 2011). Dostatek dusíku rostlina rovněž zajišťuje za pomoci symbiotických a hlízkovitých bakterií rodu *Frankia* a *Glomus* (Valíček & Havelka 2008). Vyšší obsah fosforu v půdě podporuje množení a růst těchto organismů (Bajer 2014). Na kyselých půdách s hodnotou pH 3-4 nevytváří hlízkovité bakterie, a půdu je pro pěstování potřeba vápnit. Optimální pH půdy je 6,6-7 (Valíček & Havelka 2008).

2.6.3 Závlaha a hnojení

Nároky na závlahu jsou zejména v letních měsících vysoké. Důležité je, aby měla půda dostatek vody i během zakořeňování, jinak by mladé rostlinky mohly zaschnout.

Při nedostatku dostupné vody v půdě dochází k opadu listů i plodů (Valíček & Havelka 2008). Intenzita zavlažování se ale také liší podle oblasti, kde je rakytník pěstován. Obecně se uvádí, že pro dostatečný růst a vývoj rostliny je minimální roční úhrn srážek v rozmezí mezi 400-600 mm (Lu 1992).

Velmi důležitý je také obsah živin v půdě. Ideální obsah fosforu pro pěstování rakytníku se pohybuje v rozmezí 10-50 mg/100 g půdy, obsah draslíku by měl být 250 mg/100 g půdy. Vápníku je v půdě potřeba nejvíce, a to až 1000 mg/100 g půdy a obsah hořčíku je ideálně 100 mg/100 g půdy. Půdu je potřeba kvalitně vyhnojit před setím a sázením. Před výsadbou se do půdy doporučuje zapravit 200-250 kg/ha fosforečných a 150-180 kg/ha draselných hnojiv. Po jarní výsadbě v prvním roce se doporučuje zapravit ještě 46-60 kg/ha dusíkatých hnojiv (Bajer 2014).

Nadměrné hnojení draslíku by mohlo přinést více škody než užítku. Vyšší obsah dusíku nepříznivě ovlivňuje růst a vývoj kořenových hlízek, a snižuje tak aktivitu a životaschopnost aktinomycet po jejich naočkování na kořeny (Montpetit & Lalonde 1987; Bosco et al. 1992).

2.6.4 Nemoci a škůdci

Podle Bajera (2014) u nás rakytník na choroby a škůdce příliš netrpí, protože zde není domácí rostlinou. Výskyt chorob a škůdců je tedy zaviněn především introdukcí spolu s ním. Nejčastější fyziologickou poruchou rakytníku řešetlákového je jeho usychání, které je zapříčiněné nevhodnými pěstebními a půdními podmínkami nebo napadením houbových chorob (Valíček & Havelka 2008).

Fuzariové vadnutí způsobené houbami rodu *Fusarium* a *Verticillum* přináší daleko větší riziko (Li 2002). Houby způsobují žloutnutí a rychlý opad listů, plody se předčasně zabarvují a vadnou. Tato choroba se projevuje i na větvích, které postupně ztrácejí životaschopnost a v následujícím roce částečně nebo plně uvadají. Kůra se z jara začne odchlípnout a zabarvovat do červena. Na plodech se může objevit narůžovělý konidiospór. Mezi další choroby patří endomykóza plodů, která způsobuje uhnívání plodů (Valíček & Havelka 2008).

V našich podmínkách je rovněž výskyt škůdců, stejně jako chorob, minimální. Mezi některé škůdce patří například zelená mšice (*Capithophorus hippophaes*). Samice této mšice jsou světle zelené a nakladou v průměru okolo čtyřiceti vajíček. Vajíčka se líhnou v období rašení pupenů, sají na mladých výhonech rostlinou šťávu, a způsobují tak zkrucování, žloutnutí a následný opad listů. Další, nám ne příliš známí škůdci, jsou rakytníkový mol (*Holcocerus hippophaecolus*) a rakytníková moucha (*Rhagoletis batava*). Tito škůdci likvidují rakytník díky přítomnosti larev a housenek (Valíček & Havelka 2008).

2.7 Způsoby sklizně rakytníku

Většina plodů dozrává v období od září do května, dozrávání se může mírně lišit podle pěstované odrůdy rakytníku a také podle lokality pěstování (British Columbia Ministry of Agriculture 2001). Podle Alberts et al. (2006) není vhodné sklízet plody z keřů podél silnic. Jelikož mají plody příliš krátké stopky a jsou na větvičce téměř přisedlé, je vhodné je sklízet odlamováním malými hrabičkami nebo malířskou špachtlí. U zahrádkářů se sklizeň provádí ručně na počátku botanické zralosti. V období plné zralosti totiž plody změknou a dužina získává specifický zápach, který je způsobený kyselinou máselnou (Valíček & Havelka 2008).

Dosud převládající ruční sklizeň je stále více nahrazována sklizní mechanickou. Na mechanizovanou sklizeň jsou vhodné především některé v Rusku vyšlechtěné odrůdy (Bajer 2014). Při sběru většího množství plodů se doporučuje sklízet celé větvičky pneumatickými nůžkami a umístit plody na větvičkách do lyofilizačního boxu, minimálně po dobu 24 hodin při teplotě -18 °C. Po vyjmutí z lyofilizátoru se plody snadno oklepejí a jsou připraveny ke zpracování (Valíček & Havelka 2008). Podle Bajera (2014) je pro snadné oddělení plodů z větviček ideální teplota -25 °C.

2.8 Výnos

Výnosnost rakytníku závisí na mnoha faktorech, jako je například genotyp, pěstovaná odrůda, oblast pěstování a s tím spojené nároky na prostředí. Důležitým

ukazatelem je také roční úhrn srážek, teplota, množství pěstovaných keřů a čas sklizně plodů (Oliver 2001). Podle Lu (1992) se výnos plodů v přirozených podmínkách pohybuje v rozmezí od 0,75-1,5 t/ha.

Oliver (2001) tvrdí, že v přirozených podmínkách lze dosáhnout výnosu okolo 4-5 t/ha. Podrobná studie zabývající se výnosností rakytníku probíhá v Kanadě. Zatím bylo odhadnuto, že v ovocném sadu, kde se pěstuje 4000 jedinců/ha v poměru 1:6 mezi samcem a samicí, by se výnosnost mohla vyšplhat až na hodnotu 10 t/ha (Oliver 2001). Oproti tomu STAT (2003) uvádí, že pokud by měl ovocný sad s hustotou 1200 rostlin/ha v poměru samci k samicím 1:8, mohla by se výnosnost ještě zvýšit na 20-25 t/ha. Pokud se rakytníky nepěstují v sadech, ale jako větrolamy, výnosnost se zde pohybuje okolo 4-5 t/ha (STAT 2003). Na Obrázku 3 je znázorněna sadová výsadba rakytníku řešetlákového.

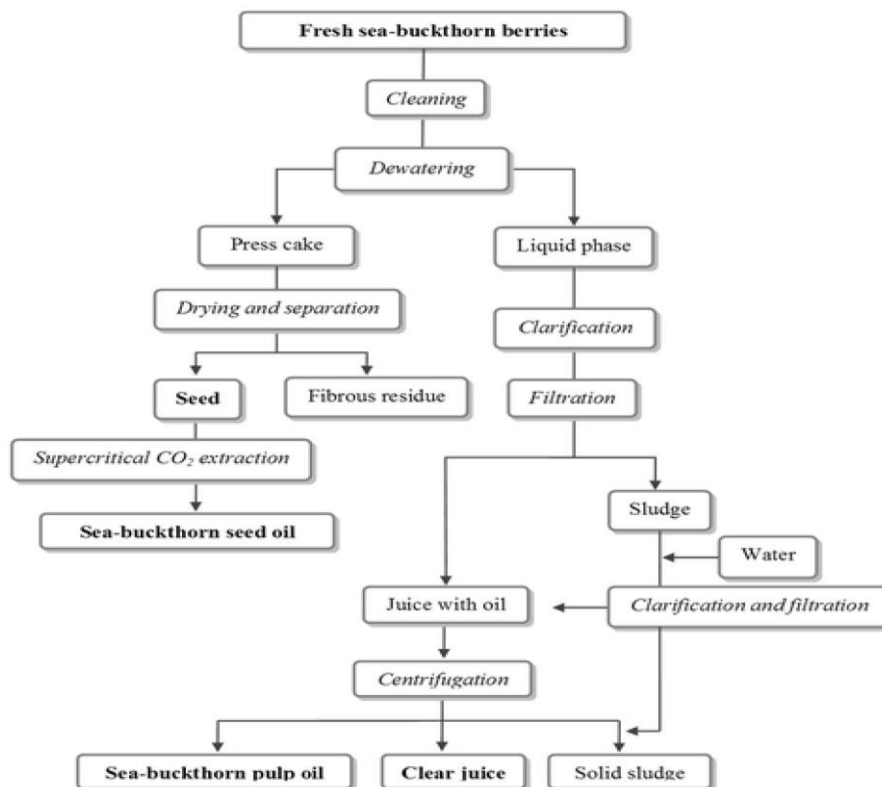


Obrázek 3: Výsadba sadu rakytníku
(Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs Ontario 2012)

2.9 Způsoby zpracování plodů

Zpracování plodů rakytníku začíná již správně provedenou sklizní. Dřívější metody náročné na ruční práci jsou dnes postupně nahrazovány mechanizací. Z mechanizačních metod se nejlépe osvědčily vibrační kombajny (Bajer 2014). Po sklizni je důležité plody protřídit. Poškozené či škůdci napadené plody se vyřazují. Již přetříděné bobule se následně proplachují vodou při teplotě 40 °C (Zhang et al. 1989a), čímž dochází k eliminaci nežádoucích příměsí a mikroorganismů (Liu & Liu 1989).

Podstatnou fází je doprava plodů na místo konečného zpracování, přičemž je bezpodmínečně nutné zajistit ochlazení plodů na teplotu 4-6 °C. Tímto se zamezí následnému rozvoji mikroorganismů, které by mohli dodávku plodů znehodnotit (Li et al. 2003). Je-li potřeba plody uchovat déle než dva dny, je nutné plody zamrazit. Poté lze plody zpracovávat postupně (Li et al. 2003). Možnosti zpracování plodů jsou uvedeny na Obrázku 4 s ukázkou výsledných produktů.



Obrázek 4: Schéma zpracování plodů rakytníku s výslednými produkty (Koskovac et al. 2017)

2.9.1 Extrakce šťávy

Šťávu z plodů lze získat mnoha způsoby. Jedním z nejjednodušších a nejosvědčenějších způsobů je lisování plodů (Bump 1989). Nejčastěji se používá textilní lis, může se také použít pásový nebo šroubový lis (Zhang et al. 1989b). Jestliže čerstvě vylisovanou šťávu necháme stát jeden až dva dny, samovolně se rozdělí na tři fáze – horní plovoucí částicovou fází, střední tekutou fází a sediment. Tento efekt je však pro spotřebitele nežádoucí (Kleinschmidt et al. 1996).

Rakytník obsahuje vysoké množství karotenoidů a proto je šťáva zabarvená do sytě žluté či oranžové barvy (viz Příloha 1). Zabarvení může ovlivňovat přítomnost částic z dužiny či kapičky oleje (Beveridge & Harrison 2001).

Pokud se ve šťávě ponechá olej z dužiny plodů, vytvoří se tak olejová vrstva na povrchu a vznikne olejový kroužek, který na povrchu zůstává i po odstranění šťávy. Vrstvy šťávy se od sebe dají snadno oddělit centrifugací (Beveridge et al. 1999). Vrchní krémová vrstva obsahuje značné množství lipidů, ve střední části je získaná šťáva a ve spodu sediment. Po centrifugaci se vzorek ochladí na 4 °C, kde poté horní vrstva zatuhne a dá se jednoduše oddělit od zbývajících dvou vrstev. Z této svrchní vrstvy se pak vyrábí dužinový olej (Beveridge & Harrison 2001). Drcené bobule či extrahovaná šťáva může být alternativně ošetřena přípravkem obsahujícím pektinmethylesterasu, nebo některým z komerčně dostupných přípravků s hydrolytickými enzymy (Lui & Lui 1989).

Pro účely konzervace je nezbytné, aby byla šťáva sterilizována či pasterizována. Podle Liu a Lui (1989) je nejvhodnější technikou ošetření vysokou teplotou po krátký čas (HTST), což znamená, že se šťáva ohřeje na 89-90 °C po dobu několika málo sekund. Tato metoda se využívá hlavně proto, aby rakytníková šťáva neztrácela či neměnila svou chuť vlivem vysokých teplot po dlouhou dobu. Vitamin C se přílišným zahříváním ničí, proto je podporováno zpracování s uvedenými podmínkami HTST (Zhou & Chen 1989).

Barva šťávy se po 6 měsících při teplotě 15-20 °C může začít zabarvovat do hněda. Pro prodloužení trvanlivosti je nutné šťávu skladovat při teplotě 4 °C mimo dosah slunečního záření (Zhou & Chen 1989). Šťáva obvykle bývá velmi opalescentní

a zakalená, v závislosti na množství suspendovaných pevných látek po centrifugaci. K odstranění zákalu lze použít ultra filtrace (Bock et al. 1990).

2.9.2 Extrakce oleje

Obsah oleje v plodech SB závisí na mnoha faktorech, mezi které patří především pěstovaná odrůda rakytníku, velikost plodu a jejich zralost, klimatické podmínky a doba sklizně plodu (Yang & Kallio 2001a). Ze SB je možno získat dva druhy olejů, olej z dužiny plodů a olej ze semen (Zeb 2006). Olej z dužiny se dá získat pomocí centrifugace, při které se vytvoří hladká, tuková vrstva (Li et al. 2003).

Dříve byla běžnou průmyslovou metodou získávání oleje extrakce pomocí rozpouštědla hexanu (Kumar et al. 2011). Většina organických rozpouštědel bývá toxická. I přes snadné odstranění hexanu ze šťávy zde stále vzniká riziko pozůstatku těchto toxických látek v extrahovaném oleji v podobě těkavých a vznětlivých látek (Johnson & Lusas 1983; Li et al. 2003).

V současnosti se více používá neškodlivá metoda extrakce superkritickou tekutinou (SCFE), například extrahovaným CO₂ (Mikulčák et al. 1985). Olej extrahovaný SCFE metodou splňuje veškerá kritéria a je možno ho využívat ve farmaceutickém průmyslu i v potravinářství (Beveridge et al. 1999). Cosutta et al. (2007) taktéž uvádí, že superkritický CO₂ je významný tím, že je nevýbušný, netoxický a lze jej z produktu beze zbytku odstranit. Kritickou hodnotou CO₂ je teplota 31,04 °C a tlak 7,38 MPa. Díky těmto hodnotám nedochází k degradaci látek obsažených v oleji (Mikulčák et al. 1985; Rizvi et al. 1986).

Pro extrakci metodou SCFE je vhodné extrahovaný materiál předem rozdrtit, aby měl v nádobě, do které proudí kritický CO₂ co možná největší povrch pro styk s rozpouštědlem. Ze zásobní láhve je CO₂ postupně odčerpáván pod požadovaným tlakem do extrakční nádoby s materiálem. Za využití několika kolektorů je tlak po průchodu materiálem postupně snižován. Použitý CO₂ je poté recyklován a vrácen zpět do soustavy, kde po doplnění nádoby opětovně poslouží pro další recyklační cyklus (Šťastová et al. 1996).

2.9.3 Extrakce pigmentu

Rakytníková žluť se získává z nevyužitého odpadního materiálu, který vzniká při centrifugaci, spolu s odpadem po lisování bobulí izolací žlutého pigmentu. Tento pigment se může extrahovat alkoholy, například ethanolem o nízkých koncentracích (Li 2002; Beveridge 2003). Suspenze musí být před extrakcí upravena na 11-13 °Bx. Izolovaná směs se dále suší rozprášením (Li et al. 2003).

Druhou metodou extrakce barviva z odpadních látek je extra superkritickou metodou. Tato metoda využívá tlak, na kterém je závislá. S rostoucím tlakem roste i výnos extrakce (Li 2002; Beveridge 2003).

2.10 Obsahové látky

Rakytník řešetlákový je po staletí sbíraná a pěstovaná léčivá rostlina. Listy jsou významné obsahem vápníku a hořčíku, plody se využívají pro vysoký obsah vitamínu C a rutinu. Významným produktem je také rakytníkový olej, který má baktericidní účinek a je využíván k léčbě popálenin (Bajer 2014).

Jak již popsali Zadernowski et al. (1997), plody jsou složeny z 68 % dužinou, 23 % semenem a 7,75 % slupkou.

V dužině plodu je obsaženo 12,1-17 % sušiny, 1,8-13 % cukru, 1,3-4 % organických kyselin, 0,45 % minerálních látek a 0,021-0,058 % tříslovin (Bajer 2014).

Vitaminy jsou organické látky, přítomné v malých množstvích v potravě, které jsou bezpodmínečně nutné pro růst a zachování životních funkcí živočichů (Kodíček 2007).

2.10.1 Vitaminy rozpustné ve vodě

Vitamin C, také nazývaný jako kyselina askorbová, se v lidském těle netvoří a musí být tedy přijímán v dostatečném množství v potravě (Bajer 2014). Obsah v plodech rakytníku se pohybuje v rozmezí 150-200 mg u asijských divoce rostoucích keřů a 800 mg a výše u porostů v oblasti Alp (Valíček & Havelka 2008). Bajer (2014)

uvádí průměrné hodnoty u kulturních odrůd 360-450 mg/100 g. Zhang et al. (1989a) uvádí hodnoty 513-1676 mg/100 g plodů.

Vitamin C je přítomný i v listech, kde se jeho obsah pohybuje okolo 230-260 mg/100 g. Doporučenou denní dávku vitamínu C pokryje 50-70 g plodů (Bajer 2014)

Thiamin, vitamin B1, má důležitou roli v metabolismu sacharidů. Jeho obsah se pohybuje v rozmezí 0,016-0,035 mg/100 g plodů (Bajer 2014). Valíček a Havelka (2008) však uvádí horní hodnotu až 0,085 mg/100 g plodů.

Riboflavin, vitamin B2, má důležitou roli v oxidačním metabolismu (Bajer 2014). Jeho obsah je 0,03-0,05 mg/100 g plodů (Valíček & Havelka 2008).

Niacin, vitamin B3, zajišťuje přenos vodíku při výměně látek a buněčném dýchání. Jeho obsah je 0,8 mg/100 g plodů (Bajer 2014).

Pyridoxin, vitamin B6, se podílí na metabolismu aminokyselin. Obsah v plodech se pohybuje v rozmezí od 0,05-0,079 mg/100 g plodů (Valíček & Havelka 2008).

Kyselina listová, vitamin B9, je aktivním účastníkem krvetvorby. Je důležitá po úrazech, ale také při nemoci z ozáření. Proto byl rakytník v SSSR v dobách studené války považován za strategickou rostlinu (Bajer 2014). Její obsah je 0,79 mg/100 g plodů (Valíček & Havelka 2008).

2.10.2 Vitamíny rozpustné v tucích

Beta-karoten, provitamin A, se v tenkém střevě a játrech mění na vitamin A. Beta-karotenu je dnes přiznávána vysoká důležitost a v některých zemích, například v Japonsku, obyvatelé ve velkém konzumují preventivní dávky tohoto vitamínu (Bajer 2014). Obsah beta-karotenu se pohybuje od 0,9 do 40 mg/100 g plodů (Valíček & Havelka 2008). Bajer (2014) však uvádí přesnější hodnoty pro oranžové odrůdy 1,8-3,9 mg/100 g plodů, pro červené odrůdy 10,9-18,5 mg/100 g plodů a v rakytníkovém oleji 80-100 mg/100 g oleje. Zhang a Yu (1989) uvádí obsah 2-16,1 mg/100 g plodů.

Vitamin E plní v organismu člověka mnoho rolí, například normalizuje činnost štítné žlázy, podporuje pevnost svalů a má také příznivý vliv na plodnost (Bajer 2014). Jeho obsah je 8-16 mg/100 g plodů (Valíček & Havelka 2008). Bajer (2014) uvádí obsah

vitaminu v oleji dužiny 100-160 mg/100 g oleje a 105-120 mg/100 g oleje ze semen. Kallio et al. (2002a) uvádí 5,6-14 mg/100 g plodů.

Vitamin K1, někdy označovaný jako fylochinon, posiluje stěny krevního řečiště. Obsah je 5 mg/100 g plodů, v oleji pak 200 mg/100 g oleje (Bajer 2014). Jiná literatura uvádí hodnoty v dužině 0,9-1,5 mg/100 g plodů (Valíček & Havelka 2008).

2.10.3 Další bioaktivní látky

Bioflavonoidy, někdy také označované jako vitamin P, jsou velmi různorodou skupinou látek, dosud je popsáno okolo 2000 sloučenin, v některých literaturách se uvádí až 20 000 sloučenin. Do této skupiny patří především rutin, ale také hesperin, hesperidin, eriodictyol a další látky. Pro lidský organismus nejsou nezbytně nutné, ale hrají důležitou roli v posílení imunity (Bajer 2014). Valíček a Havelka (2008) uvádí obsah 100-200 mg/100 g plodů, Bajer (2014) pak 100-2300 mg/100 g plodů. Ranjith (2009) uvádí průměrný obsah 400 mg/100 g plodů.

Vitamín „F“ je pro lidské tělo velmi důležitou látkou, jelikož si ho lidské tělo neumí vytvořit a musí tak být přijímán z potravy. Z chemického hlediska se jedná o kyselinu linoleovou a kyselinu linolenovou (Bajer 2014).

Serotonin, též nazývaný jako hippophain, se nachází v kůře mladých výhonků rakytníku, v menší míře také v plodech. Jeho obsah kolísá od 1,1-2,5 mg/100 g a může se lišit dle pěstované odrůdy (Bajer 2014).

Další látky obsažené v plodech jsou takzvané kumariny v glykosidické formě, které tlumí bolest, ale mají i omamné účinky. Obsah v rakytníkových plodech a listech je 1,1-1,4 mg/100 g (Bajer 2014). Kumariny mimo jiné zabraňují vzniku trombů v cévách (Valíček & Havelka 2008).

Plody rakytníku řešetlákového dále obsahují následující látky: Cholin, Inositol, Beta-cytosterol, betain, triterpenové kyseliny a kyselinu jantarovou (Bajer 2014). Jak uvedl Valíček a Havelka (2008), plody mohou obsahovat také kyselinu jablečnou, kyselinu chinovou, kyselinu kávovou, ale také citronovou, vinnou a šťavelovou.

2.10.4 Bioaktivní komponenty v rakytníkovém oleji

Yin et al. (2005) uvádí, že semenný olej má vyšší obsah nenasycených esenciálních mastných kyselin než olej z dužiny. Chromatografická analýza prokázala obsah 11,4 % nasycených a 8,6 % nenasycených MK (Yin et al. 2005). Olej je z 42 % tvořen kyselinou linolovou a z 39 % kyselinou α -linoleovou. Třetí bohatě zastoupená je kyselina olejová. Další kyseliny obsažené v oleji jsou palmitová, stearová a vakcenová. Složení tryacylglycerolů se v semenech jiných odrůd se téměř neliší (Yang & Kallio 2002b).

Olej z dužiny na rozdíl od semenného oleje obsahuje více nasycených a mononenasycených kyselin. Převážnou většinu všech MK obsaženou v dužinovém oleji tvoří z 38 % nasycená kyselina palmitová. Druhá velmi významná je kyselina palmitolejová (až 43 %). Semenný i dužinový olej má přibližně stejný obsah kyseliny olejové (Yang & Kallio 2001a). Bylo zjištěno, že hodnoty dužinových triacylglycerolů se u jednotlivých poddruhů liší (Yang & Kallio 2002b). Složení jednotlivých látek je znázorněno v následující Tabulce 2.

Tabulka 2: Zastoupení MK v triacylglycerolech v olejích rakytníku řešetlákového

Obsah mastných kyselin v tryacylglycerodech v olejích z rakytníku (<i>Hippophae rhamnoides</i> L.)						
	poddruh					
	<i>Rhamnoides</i>		<i>Sinensis</i>		<i>Mongolica</i>	
	(Yang & Kallio 2001a)		(Yang & Kallio 2001a)		(Kallio et al. 2002)	
	semenný olej	dužinný olej	semenný olej	dužinný olej	semenný olej	dužinný olej
mastná kyselina	% (w/w)	% (w/w)	% (w/w)	% (w/w)	% (w/w)	% (w/w)
palmitová	7,4	27,8	8,7	26,7	8,6	33,9
palmitolejová	-	32,8	-	27,2	-	32,8
stearová	3,0	0,8	2,5	1,3	3,5	1,2
olejová	17,1	17,3	19,4	17,1	17,9	4,6
vakceanová	2,8	9,1	2,2	8,1	2,1	6,4
linolová	39,1	9,0	40,9	12,7	38,6	15,5
α -linoleová	30,6	3,2	26,6	7,1	29,1	5,6

Olej ze semen SB je žluté až oranžové barvy a je schopný silně absorbovat i v UV oblasti záření. Vysoké dienové číslo (3,16), p-adisinidové číslo (34,19) a peroxidové číslo (20,68) způsobuje, že je olej málo odolný vůči oxidaci v důsledku velkého zastoupení nenasycených komponentů (Yang & Kallio 2002b).

3. Způsoby rozmnožování rakytníku

SB se velmi snadno množí semeny i několika různými vegetativními způsoby včetně roubování (Valíček & Havelka 2008).

3.1 Generativní rozmnožování

Rozmnožování semenem je jedním z nejzákladnějších a nejjednodušších způsobů množení SB. Není zde přesně určené období, kdy je vhodné rakytník vysévat. Osivo je vhodné stratifikovat a lze vysévat ihned po sklizni, nebo i po určité době skladování (Paprštein 2009).

Velkou výhodou generativního rozmnožování je získání velkého množství rostlin v krátkém čase. Využívá se hlavně pro ozelenění zdevastované půdy po důlní těžbě, při dálnicích a jako výsadba před zalesňováním půdy (Bajer 2014). Nevýhodou generativního rozmnožování je dvoudomost tohoto druhu, neboť až do období plodnosti nelze rozlišit, zda se jedná o samčí či samičí rostlinu, a není tak zajištěna ani kvalita potomstva. Většina potomstva ze semenáčků (až 80 %) bývá samčího pohlaví (Valíček & Havelka 2008). Bajer (2014) uvádí, že z výsevu je polovina samčích a polovina samičích. Vhodný termín pro výsev je na jaře či na podzim před příchodem mrazíku (konec října-záčátek listopadu). Dřívější výsev se nedoporučuje, protože by mladé semenáčky vyklíčily příliš brzy a pak by pomrzly (Bajer 2014). V případě, že je jaro a léto suché, semenáčky vyžadují zvýšenou závlivu, jinak by docházelo k zasychání semenáčků a procento vzešlých rostlin by bylo velmi nízké (Valíček & Havelka 2008).

Semena se před výsevem musí proprat a dobře oddělit semennou slupku a perikarp. Semena by se po vysušení měla uchovávat v prodyšném obalu a v chladu, kde se jejich klíčivost zachová až po dobu dvou let. Zejména před jarním výsevem se osivo

stratifikuje založením do vlhčího písku či perlitu (Bajer 2014). Pokud se semena nestratifikují, je nutné semena před výsevem namočit alespoň na 24 hodin do vody a pak lehce osušit. Jarní výsev se provádí do hloubky 20 mm, podzimní výsev je hlubší, okolo 50 mm (Paprštein 2009).

První malé rostlinky SB se začínají objevovat sedmý až desátý den po výsevu koncem dubna až května. Mladé rostlinky se musí přistiňovat a zalévat podle potřeby. Pikýrování, při kterém se současně zaštipuje kořen, je nevhodnější ve fázi prvního páru pravých listů (Bajer 2014).

3.2 Vegetativní množení

Vegetativní způsob rozmnožování je jednou ze základních metod, jak zachovat kvalitní vlastnosti odrůd ovocných dřevin. Rostliny se mohou vegetativně rozmnožovat mnoha způsoby, například očkováním, roubováním, kořenovými řízků, bylinnými řízků, dřevitými řízků, množení kořenovými odnožemi nebo mikropropagací (Bajer 2014).

3.2.1 Množení kořenovými řízků

U tohoto způsobu množení je úspěšnost velmi nízká, tj. 3-15 %. Řízků se získávají z kořenů sedmi až osmiletých rostlin. Ideální délka získaného řízků se pohybuje v rozmezí 10-15 cm. Poté se šikmo vysazují do pařeniště či na připravený záhon (Bajer 2014).

3.2.2 Očkování

Očkování se u SB příliš neosvědčilo, jelikož očka špatně přirůstají (Valíček & Havelka 2008). Naopak podle Bajera (2014) je to velmi efektivní způsob množení, který využívá jednotlivá očka. Nejčastěji se vkládají očka do tzv. T řezu nebo na seříznutý bok podnože. Zimní očkování v březnu dosahovalo na jednoletý výhon u dvouletých seříznutých podnoží 50-60 %. Roubování podnoží na jaře dávalo lepší výsledky, úspěšnost byla až 70 % (Bajer 2014).

3.2.3 Roubování

Pro roubování je důležité připravit dvouleté podnože, které mají po seříznutí jednoletý výhon. Roubuje se ve výšce 8-10 cm nad zemí se třemi až čtyřmi očkovitými rouby. Jedním z nejlepších způsobů roubování je anglická kopulace s 60-70% úspěšností (Bajer 2014).

3.2.4 Rozmnožování dřevitými řízký

Výtěžnost této metody je velmi kolísavá, pohybuje se v rozmezí 25-80 %. Samčí řízký zakořeňují velmi obtížně. Materiál na řízký se sbírá z matečného porostu od konce listopadu do poloviny března. Pokud jsou řízký již narašené, nezakoření (Bajer 2014).

3.2.5 Rozmnožování bylinnými řízký

U bylinných řízků je velmi důležité vybrat takové, které nejsou příliš mladé, ale ani dřevnatící. Nejvhodnější je sklizeň od poloviny června do poloviny července (Valíček & Havelka 2008). Metoda zakořeňování bylinných řízků je nejkvalitnější a zaručuje 70-100% úspěšnost. K samotnému zakořeňování se používají stimulanty růstu a řízené mlžení (Bajer 2014).

4. Hydrodestilace – destilace vodní parou

Hydrodestilace je jednoduchou metodou získávání silic z rostlin. Je jednou z nejstarších používaných metod extrakce, která se stále v praxi značně využívá. Rostlinný vzorek je ponořen do vody a zahříván k době varu. Esenciální olej je následně vytažen vodní párou. Destilát poté kondenzuje v kondenzátoru zpět do kapaliny, přičemž esenciální olej je snadno oddělitelný od vody, protože plave na hladině (Retová 2013).

Hydrodestilací je možné destilovat málo těkavé látky, které se nemísí s vodou nebo jsou v ní jen málo rozpustné. Tyto látky není nutné zahřívát na bod varu. Tento způsob destilace je v organické syntéze velmi často užívaný při čištění látek, které se při své teplotě varu a za normálního tlaku rozkládají, případně podléhají jiným nežádoucím změnám (Cídllová 2008).

Některé vonné chemikálie jsou však rozpustné v destilátu a musejí být extrahovány další destilací nebo jinými prostředky. Výhodou destilace je fakt, že teplota oleje nikdy nestoupne na více než 100 °C a zároveň je minimalizován tepelný rozklad (Retová 2013).

Do systému lze vodní páru vhánět z venčí, případně se dá generovat uvnitř aparatury. Pro generování vodní páry uvnitř aparatury se využívá Clevengerova aparatura (Clevenger 1928).

5. Základní rozdělení chromatografických metod

5.1 Rozdělení chromatografie podle uspořádání

Chromatografii lze podle uspořádání dělit na dva způsoby. Prvním je chromatografie v plošném (planárním) uspořádání, která se dále dělí na papírovou chromatografii (PC, paper chromatogramy) a na tenkovrstvou chromatografii (TLC, thin layer chromatogramy). Druhým způsobem je chromatografie v kolonovém (sloupcovém) uspořádání (Nikolová 2014).

5.2 Rozdělení podle separačního principu

Podle separačního principu rozdělujeme chromatografii na tři základní metody. Prvním mechanismem je adsorpční chromatografie, dále rozdělovací (partiční) chromatografie a třetím způsobem je iontová výměna (Nikolová 2014).

5.3 Rozdělení podle skupenství fází

Podle skupenství jednotlivých fází rozdělujeme chromatografii na kapalinovou (LC, liquid chromatography). Při této metodě je mobilní fází kapalina. Druhou metodou je chromatografie plynová (GC, gas chromatography), zde je mobilní fází plyn (Nikolová 2014).

5.3.1 Plynová chromatografie - GC

GC (gas chromatography) je fyzikálně-chemickou separační metodou, využívanou k separaci plynů, kapalin i pevných látek s maximálním bodem varu do 400 °C (Poole 2012).

Metoda plynové chromatografie je metodou instrumentální. Přístroj používaný pro plynovou chromatografii se nazývá plynový chromatogram. Podmínkou pro použití plynové chromatografie je, že látka musí být těkavá a termicky stabilní. Látky netěkavé je potřeba derivatizovat (Nikolová 2014)

Nosný plyn slouží v plynové rozdělovací chromatografii jako transportní médium pro analyzovanou plynou směs. Na rozdíl od kapalinové chromatografie, kde dochází k interakci mezi mobilní fází a analyzovanou směsí, nosný plyn neinteraguje se stacionární fází, ani se složkami anulované směsi. Nejčastěji se jako nosný plyn používá helium, argon, dusík, vodík a oxid uhličitý (Nikolová 2014).

Injektor umožňuje vpravení analyzované látky do plynového chromatografu. Nejčastěji je nástřik vzorku proveden speciálními injekčními stříkačkami přes septum, které tvoří rozhraní vnitřního a vnějšího prostoru chromatografu (Mermet 2004). Někdy bývá před vstupem do kolony zařazen dělič toku, oddělující definovanou část odpařeného vzorku. Jeho využití je vhodné u koncentrovaných vzorků, naopak

nevhodné pro směsi s rozdílnými teplotami varu nebo pro stopovou analýzu (Mikeš 1980). Na charakteru vzorku a jeho vlastnostech závisí teplota, na kterou je dávkovací prostor vyhříván (Čůta 1986).

Uvnitř chromatografu je umístěna chromatografická kolona, ve které se nachází stacionární fáze. Probíhá zde separace. Jsou využívány dva typy kolon a to kolony náplňové a kolony kapilární (Rozman 2013).

5.4 Hmotnostní spektrometr

V plynové chromatografii je často využíván detektor založený na hmotnostní spektrometrii. Hmotnostní spektrometr je složen z ionizační jednotky, z iontového detektoru a separační jednotky dle náboje. K rozpadu molekuly dochází ionizovaným elektronovým paprskem. Ionizované molekuly do hmotnostního spektrometru dále vstupují ve formě ionového paprsku, prochází řadou čoček a tlak v soustavě postupně klesá. Hmotnostní spektrometrie poskytuje strukturální informace o molekulách, což přispívá k jejich identifikaci. Jestliže je při plynové chromatografii používán hmotnostní detektor (MS), musí být z důvodu vyrovnání tlaků mezi vyústěním kolony a hmotnostním detektorem nainstalováno přemostění (Lundanes et al. 2014).

5.5 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí GC-MS

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS – gas chromatography mass spectrometry) patří mezi často používané metody. Analýza látek probíhá díky odlišnému poměru náboje a hmotnosti ionizovaných forem látek v plynné fázi (Rozman 2013). K analýze je využíván hmotnostní spektrometr (MS), který patří mezi univerzální metody. Kombinace separační metody GC a metody MS je podmíněna použitím kapilární plynové chromatografie. Tato metoda se nazývá plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (Poole 2012).

Na Obrázku 5 je vyobrazen plynový chromatogram s hmotnostní detekcí.

GC-MS



Obrázek 5: Plynový chromatogram s hmotnostní detekcí (GC-MS)
(Agilent technologies 2014)

6. Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo na základě vybrané analytické metody zhodnotit obsah jednotlivých účinných bioaktivních látek z extraktu plodů rakytníku řešetlákového a provést identifikaci těchto látek. Dále bylo sledování zastoupení jednotlivých složek extraktu u tří odrůd rakytníku řešetlákového. Zjištěný obsah látek byl porovnáván s výsledky z již publikovaných odborných článků. Dílčím cílem práce bylo vypracování rešerše o využití rakytníku řešetlákového a jeho účinných látkách v plodech a semenech. Na základě výsledků analýzy obsahu účinných látek byly formulovány návrhy a doporučení pro budoucí výzkum.

7. Materiál a metodika

Rakytník obsahuje vysoký obsah vitamínu C a mnoho dalších zdraví prospěšných látek, například rutin. Literární rešerše byla zaměřena na vlastnosti jednotlivých odrůd rakytníku řešetlákového a možnostech zpracování plodů rakytníku, počínaje sklizní až k jednotlivým metodám určujícím obsahové látky v esenciálním oleji z plodů rakytníku.

Experimentální část je zaměřena na extrakci účinných látek a jejich následnou analýzu z různých odrůd rakytníku. Připravené extrakty budou analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

7.1 Sběr vzorků

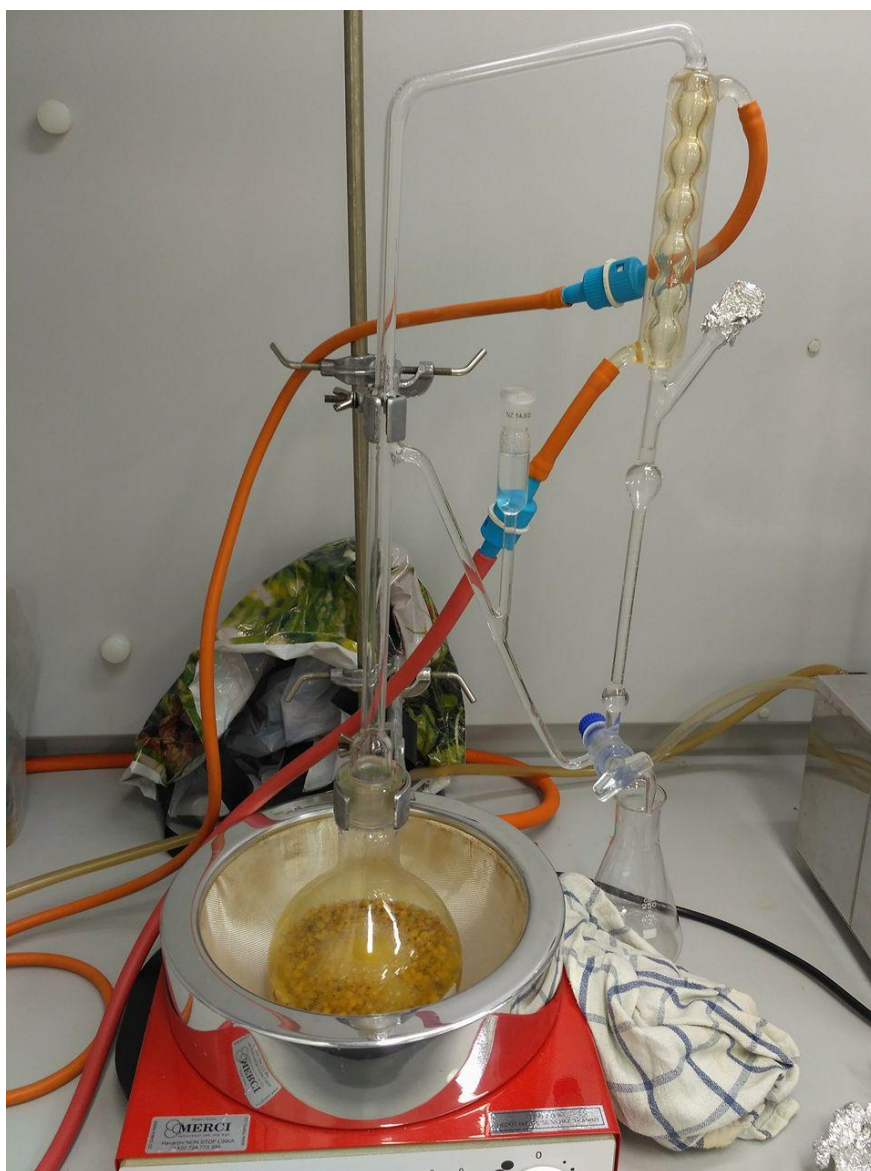
Dva vzorky byly sklizeny z Kotvičnickové farmy v Sedlečku (odrůda Frugana a Hergo) v Plzeňském kraji. Třetí vzorek (odrůda Leikora) byla sklizena v oboře Rekov ve Středočeském kraji. Plody těchto odrůd rakytníku řešetlákového se sklízely s celými větvíčkami.

7.2 Příprava vzorku

Po sklizení vybraných odrůd byly vzorky umístěny do lyofilizačního boxu po dobu čtrnácti dnů. Předpokládalo se vysušení plodů mrazem, které se však nedostavilo. Výhodou využití lyofilizace bylo snadné oddělení jednotlivých bobulí od větvíček, i přestože bývají na plodných letorostech velmi pevně přisedlé. Po zmražení je možné plody zpravidla oddělit bez výraznějšího poškození. Plody byly následně dosoušeny v laboratorních sušárnách, a to po dobu tří až čtyř dnů (v závislosti na velikosti bobulí jednotlivých odrůd) při teplotě 40 °C.

Vysušené plody bylo potřeba rozdrtit v třecí misce s tloučkem. Takto rozdrčená směs byla umístěna do frakční baňky s 500 ml destilované vody a několika varnými kamínky z porézní keramiky. Další fází bylo umístění baňky se vzorkem do topného hnízda a napojení Clevengerovy destilační aparatury. Následně byla směs se vzorkem zahřívána až na bod varu. K aparatuře byla připojena voda za účelem ochlazování

vzniklých vodních par, jejich kondenzaci a navrácení zpět do frakční baňky. Tento hydrodestilační proces probíhal po dobu tří až čtyř hodin. Po odstavení a ochlazení aparatury bylo nutné izolovat extrahovaný esenciální olej. V průběhu experimentu olej utkvěl na stěně Clevengerovy aparatury, a tak bylo aparaturu zapotřebí propláchnout hexanem, aby se olej uvolnil. Uvolněný olej s hexanem byl uložen do baňky a hexan následně odpařen za pomoci vakuové odparky. Po odpaření hexanu byl získán čistý esenciální olej. Na Obrázku 6 je ukázána aparatura hydrodestilační kolony s plody rakytníku.



Obrázek 6: Hydrodestilační kolona s plody rakytníku
(foto: Veronika Pochylá)

U odrůdy Leikora byla navážka suchého vzorku 12 g, ze které byly získány 3 mg esenciálního oleje. Odrůda Frugana byla testována při navážce 23 g, ze které bylo získáno 8 mg esenciálního oleje. U třetí testované odrůdy Hergo byla navážka 22,8 g a výtěžek esenciálního oleje byl 8 mg.

7.3 GS-MC analýza

Každý vzorek byl analyzován třikrát po sobě, celkem bylo provedeno devět měření. Pro testování byl vzorek naředěn hexanem v poměru 1 mg vzorku/1 ml hexanu. Všechny vzorky byly analyzovány plynovým chromatografem s hmotnostní detekcí Agilent Technologies 5977A MSD.

Injekce byly provedeny pomocí autosampleru. Teplota nástřiku (inlet port) byla nastavena na 250 °C. Split mode 1:10. Průtok (flow rate) hnacího plynu – Helia v koloně byl 1 ml/min. Analýza plynovou chromatografií byla provedena pomocí kolony (HP-5MS – 5% fenyl-methyl-siloxan) s rozměry 30 m délky s průměrem 250 µm a silou filmu 0,25 µm. Teplotní program byl nastaven následovně: první dvě minuty byla udržována základní teploty 70 °C, poté se teplota zvyšovala o 10 °C/min, až na konečnou teplotu 300 °C. Přemostění mezi GC a MS (MSD transfer line) mělo teplotu 270 °C. Elektronová energie hmotnostního detektoru byla 70 eV, teplota zdroje (MSD source heater) pak 230 °C. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.07.00. Plocha píků byla získána z elektronické integrace, identifikace látek byla provedena srovnáním jejich hmotnostního spektra s knihovnou spekter NIST verze 2.2. Správnost identifikace byla potvrzena srovnáním naměřených Kovatsových indexů s literárními zdroji. Pro dohledávání jednotlivých indexů byla využita databáze Pherobase.com Zdrojem těchto indexů byly především výsledky Adamse RP z roku 1995 naměřeny na koloně DB-5.

Názvy jednotlivých sloučenin byly ponechány v anglickém jazyce, zejména z důvodu jednoduššího porovnání s cizojazyčnými výzkumy.

8. Výsledky a diskuse

U odrůdy Leikora bylo získáno a úspěšně určeno 56 látek (Tabulka 3). Odrůda Frugana obsahovala 59 látek dohledatelných podle knihovny (Tabulka 4) a u odrůdy Hergo bylo určeno 54 chemických sloučenin (Tabulka 5). Výsledky všech tří měření u jednotlivých odrůd byly zprůměrovány a hodnoty získané z chromatografu (Příloha 2) byly zapsány do tabulek.

Tabulka 3: Přehled získaných látek u odrůdy Leikora

Leikora					
Peak	RT	RI cal	RI lit	Prum %	Název sloučeniny
1	5,6	x	x	0,21	1-Ethylbutyl hydroperoxide
2	5,7	x	x	0,28	2,4-Dimethylpentane
3	8,2	1132	1098	0,37	Nonanal
4	9,4	1187	1173	0,34	Menthol
5	9,6	1199	1195	0,18	Ethyl octanoate
6	10,4	1252	1250	0,89	Isopentyl hexanoate
7	11,2	1305	x	0,17	4-tert-Butylcyclohexyl acetate
8	12,4	1397	1394	1,68	Ethyl decanoate
9	13,1	1450	1442	5,45	Isopentyl benzoate
10	13,2	1460	1453	0,22	Geranyl acetone
11	13,4	1473	1479	0,22	Ethyl-2,4-decadienoate
12	13,7	1501	1501	0,71	Pentadecane
13	14	1519	1502	0,15	2,4-Di-tert-butylphenol
14	14,6	1575	x	13,65	Ethyl dodecenoate
15	14,9	1597	1595	2,39	Ethyl dodecanoate
16	15	1601	1600	0,15	Hexadecane
17	15,2	1618	1611	0,61	Tetradecanal
18	15,3	1630	x	0,6	Isopropyl dodecanoate
19	15,5	1650	x	0,25	Isopentyl decanoate
20	16,1	1702	1700	0,58	Heptadecane
21	16,3	1721	1711	0,29	Pentadecanal
22	16,6	1744	x	0,54	1,3-di-iso-propylnaphthalene
23	16,7	1756	x	0,27	1,3,5-Triisopropylbenzene
24	16,8	1765	x	0,79	2-(Phenylmethylene)octanal
25	16,9	1772	x	1,23	Ethyl tetradecenoate

Tabulka 3: (pokračování)

26	16,9	1777	x	2,53	Ethyl tetradecenoate
27	17,2	1796	x	4,34	Ethyl tetradecanoate
28	17,2	1801	1800	0,26	Octadecane
29	17,5	1825	x	6,01	Hexadecanal
30	17,7	1851	x	0,96	Hexahydrofarnesyl acetone
31	18,4	1913	x	0,88	Homosalate
32	18,5	1929	1927	0,47	Methyl hexadecanoate
33	18,8	1958	1950	0,18	Hexadecenoic acid
34	19	1976	1984	4,58	Hexadecanoic acid
35	19	1979	1990	5,61	Ethyl 9-hexadecenoate
36	19,2	1997	1993	4,88	Ethyl hexadecanoate
37	19,5	2027	2027	2,26	Isopropyl hexadecanoate
38	19,7	2049	x	0,68	3-Methylbutyl tetradecanoate
39	20,2	2102	x	0,86	Heneikosane
40	20,4	2126	2114	2,43	Phytol
41	20,9	2175	2155	0,79	Ethyl octadecenoate
42	20,9	2180	2155	0,52	Ethyl octadecenoate
43	21,1	2201	2200	0,32	Docosane
44	21,8	2280	2270	4,56	Tricosene
45	21,8	2285	2270	1,19	Tricosene
46	22	2304	2300	11,68	Tricosane
47	22,8	2401	2400	0,57	Tetracosane
48	23,5	2480	2485	2,49	Pentacosene
49	23,5	2488	2485	0,25	Pentacosene
50	23,6	2503	2500	5,41	Pentacosane
51	24,4	2604	x	0,22	Hexacosane
52	25	2680	2684	0,3	Heptacosene
53	25,1	2687	2684	0,07	Heptacosene
54	25,2	2701	2700	1,62	Heptacosane
55	25,2	2706	x	0,57	Sterol
56	26,8	2902	2900	0,33	Nonacosane

x – index nebyl dohledán v databázi Pherobase

Tabulka 4: Přehled získaných látek u odrůdy Frugana

Frugana					
Peak	RT	RI cal	RI lit	Prum %	Název sloučeniny
1	5,6	x	x	0,21	1-Ethylbutyl hydroperoxide
2	5,7	x	x	0,24	2,4-Dimethylpentane
3	8,2	1132	1098	1,01	Nonanal
4	9,6	1199	1195	0,41	Ethyl octanoate
5	10,6	1268	1204	0,81	2-Decenal
6	11	1297	x	0,13	Ethyl nonanoate
7	11,1	1301	1299	0,18	Tridecane
8	12,1	1372	x	0,33	1,2-Dihydro-1,1,6-trimethylnaphthalene
9	12,4	1397	1394	1,15	Ethyl decanoate
10	13,1	1450	1442	7,2	Isopentyl benzoate
11	13,2	1460	1453	0,39	Geranyl acetone
12	13,4	1473	x	0,19	Ethyl-2,4-decadienoate
13	13,7	1495	1490	0,35	β -Guaiene
14	13,7	1501	1500	0,63	Pentadecane
15	13,9	1512	1490	0,21	β -Guaiene
16	14	1519	1502	0,82	2,4-Di-tert-butylphenol
17	14,2	1542	1519	0,48	β -Cadinene
18	14,3	1547	1416	0,11	β -copaene
19	14,6	1574	x	6,44	Ethyl dodecenoate
20	14,7	1583	x	0,16	Ethyl dodecenoate
21	14,9	1597	1595	1,12	Ethyl dodecanoate
22	15,1	1613	x	0,19	Alloaromadendrene oxide
23	15,2	1618	1611	2,63	Tetradecanal
24	15,7	1670	1640	0,81	T-Cadinol
25	15,9	1680	1576	0,4	Globulol
26	16,3	1720	1711	0,47	Pentadecanal
27	16,6	1743	x	0,19	1,3-di-iso-propylnaphthalene
28	16,7	1755	1325	2,13	1,3,5-Triisopropylbenzene
29	16,9	1772	x	0,17	Ethyl tetradecenoate
30	16,9	1777	x	0,28	Ethyl tetradecenoate
31	17,2	1796	x	4,3	Ethyl tetradecanoate
32	17,2	1800	1800	0,05	Octadecane
33	17,4	1822	1819	2,66	Hexadecanal
34	17,7	1851	x	1,18	Hexahydrofarnesyl acetone
35	18,2	1901	x	0,22	Nonadecane
36	18,5	1929	1927	0,54	Methyl hexadecanoate

Tabulka 4: (pokračování)

37	18,8	1958	1950	0,1	Hexadecenoic acid
38	19	1975	1984	4,88	Hexadecanoic acid
39	19	1978	1990	13,51	Ethyl 9-hexadecenoate
40	19,2	1997	1993	8,81	Ethyl hexadecanoate
41	19,5	2027	x	0,72	Isopropyl hexadecanoate
42	19,7	2048	x	0,13	3-Methylbutyl tetradecanoate
43	20,2	2101	x	1,17	Heneikosan
44	20,4	2126	2114	2,14	Phytol
45	20,8	2170	2155	0,46	Ethyl octadecenoate
46	20,9	2175	2155	3,61	Ethyl octadecenoate
47	21,1	2201	2200	0,28	Docosane
48	21,8	2279	2270	5,26	Tricosene
49	21,8	2285	2270	0,72	Tricosene
50	22	2302	2300	7,31	Tricosane
51	22,8	2400	2400	0,46	Tetracosane
52	23,5	2480	2485	1,93	Pentacosene
53	23,5	2488	2485	0,29	Pentacosene
54	23,6	2503	2500	5,48	Pentacosane
55	24,4	2601	x	0,18	Hexacosane
56	25	2680	2684	0,13	Heptacosene
57	25,2	2700	2700	2,18	Heptacosane
58	25,9	2800	x	0,08	Octacosane
59	26,8	2902	2900	1,4	Nonacosane

x – index nebyl dohledán v databázi Pherobase

Tabulka 5: Přehled získaných látek u odrůdy Hergo

Hergo					
Peak	RT	RI cal	RI lit	Prum %	Název sloučeniny
1	5,6	x	x	0,16	1-Ethylbutyl hydroperoxide
2	5,7	x	x	0,26	2,4-Dimethylpentane
3	7,5	x	x	1,84	2-Octenal
4	8,2	1132	1098	1,21	Nonanal
5	9,2	1180	1085	0,26	Octanoic acid
6	9,6	1198	1195	4,02	Ethyl octanoate
7	10,3	1248	x	0,23	Ethyl (E)-2-octenoate
8	10,6	1267	1204	1,46	2-Decenal
9	11	1297	1297	0,17	Ethyl nonanoate
10	11,1	1301	1299	0,79	Tridecane
11	12,1	1372	x	0,38	1,2-Dihydro-1,1,6-trimethylnaphthalene
12	12,2	1382	x	0,11	Ethyl 9-decenoate
13	12,4	1397	1394	4,93	Ethyl decanoate
14	13,1	1450	1442	0,94	Isopentyl benzoate
15	13,4	1472	x	0,22	Ethyl-2,4-decadienoate
16	13,7	1501	1500	0,64	Pentadecane
17	13,9	1512	1490	0,2	β -Guaiene
18	14,6	1575	x	5,94	Ethyl dodecenoate
19	14,7	1583	x	0,28	Ethyl dodecenoate
20	14,9	1598	1595	6,7	Ethyl dodecanoate
21	15,2	1618	1611	0,96	Tetradecanal
22	15,5	1650	x	0,2	Isopentyl decanoate
23	16,2	1707	x	3,12	Cycloisolongifolene, 8-oxo-
24	16,3	1720	1711	0,36	Pentadecanal
25	16,7	1756	x	0,2	1,3,5-Triisopropylbenzene
26	16,9	1772	x	1,19	Ethyl tetradecenoate
27	16,9	1777	x	0,33	Ethyl tetradecenoate
28	17,1	1788	1953	0,31	9-Hexadecenoic acid
29	17,2	1797	x	10,81	Ethyl tetradecanoate
30	17,2	1803	x	1,52	E-2-Hexenyl E-2-octenoate
31	17,4	1823	1819	2,12	Hexadecanal
32	17,7	1851	x	1,91	Hexahydrofarnesyl acetone
33	18,2	1901	1900	0,7	Nonadecane
34	18,5	1929	1925	0,47	Methyl hexadecanoate
35	19	1979	x	12,07	Hexadecanoic acid
36	19,2	1999	1993	11,68	Ethyl hexadecanoate

Tabulka 5: (pokračování)

37	19,5	2027	2027	0,71	Isopropyl hexadecanoate
38	20,2	2102	x	1,21	Heneikosan
39	20,4	2126	2114	0,91	Phytol
40	20,8	2170	2155	0,14	Ethyl octadecenoate
41	20,9	2175	2155	0,95	Ethyl octadecenoate
42	21,1	2201	2200	0,71	Docosane
43	21,8	2279	2270	0,89	Tricosene
44	21,8	2285	2270	0,27	Tricosene
45	22	2304	2300	5,68	Tricosane
46	22,8	2400	2400	0,9	Tetracosane
47	23,5	2480	2485	0,31	Pentacosene
48	23,5	2488	2485	0,33	Pentacosene
49	23,6	2503	2500	3,54	Pentacosane
50	24,4	2601	x	0,73	Hexacosane
51	25,2	2701	2684	1,66	Heptacosane
52	25,9	2801	x	0,53	Octacosane
53	26,8	2902	2900	1,39	Nonacosane
54	27,8	3002	3000	0,49	Triacontane

x – index nebyl dohledán v databázi Pherobase

Analýza bioaktivních látek obsažených v plodech rakytníku ukázala přítomnost několika významných látek.

U odrůdy Leikora byly nejhojněji zastoupeny tyto látky: Ethyl dodecanoate (13,65 %), Tricosane (11,68 %), Hexadecanal (6,01 %), Ethyl 9-hexadecenoate (5,61 %), Pentacosane (5,41 %), Ethyl hexadecanoate (4,88 %), Hexanoic acid (4,58 %). Ostatní sloučeniny se vyskytují spíše v malém množství.

U odrůdy Frugana se některé nejčastěji zastoupené látky procentuálně liší. Mezi sloučeniny s nejvyšší koncentrací patří: Ethyl 9-hexadecenoate (13,51 %), Ethyl hexadecanoate (8,81 %), Isopentyl benzoate (7,20 %) a Tricosene (5,26 %), které jsou v porovnání s předchozí odrůdou o několik procent vyšší. Naopak Tricosane (7,31 %) a Ethyl dodecenoate (6,44 %) mají několika procentní ztrátu. Látka Pentacosane (5,48 %) je v této odrůdě téměř shodná s předchozí odrůdou Leikora.

Odrůda Hergo se svým zastoupením látek lišila od odrůdy Leikora a Frugana nejvíce. Mezi látky s nejvyšší koncentrací patřily: Hexadecanoic acid (12,07 %), který

měl ve srovnání s odrůdou Frugana dvojnásobnou koncentraci, zatímco u Leikory se vyskytoval pouze ve stopovém množství. Podobně tomu bylo i s Ethyl hexadecanoate (11,68 %), který měl u odrůdy Frugana o něco nižší koncentraci, ale u odrůdy Leikora opět chyběl. Naopak Ethyl tetradecanoate (10,81 %) měl u této odrůdy oproti oběma předchozím odrůdám o několik procent vyšší koncentraci. Zatímco Ethyl dodecanoate (6,70 %) a Tricosane (5,68 %) byly mnohonásobně vyšší u odrůdy Leikora, hodnoty u odrůdy Hergo jsou srovnatelné s hodnotami u odrůdy Frugana. Ethyl decanoate (4,93 %) je u této odrůdy o několik procent vyšší, zatímco odrůda Leikora a Frugana mají výsledné koncentrace podobné.

Yue et al. (2016) ve svém výzkumu zjistil přítomnost látky Hexadecane, která byla na chromatografu zaznamenána již v 7,85. minutě. Naopak v pokusu se zkoumanou odrůdou Leikora se látka Hexadecane objevila na chromatografu až téměř v 15. minutě. Množství této látky obsažené v plodu sledované odrůdy byl velmi nízký (0,15 %), u zbylých dvou odrůd zcela chyběl. V pokusu Yue et al. (2016) byla koncentrace vyšší (1,12 %).

Další sledovanou látkou byl Heneikosan, který dle Yue et al. (2016) byl zaznamenán v 8. minutě. U pokusů s odrůdami Leiora, Frugana i Hergo byly látky identifikovány až ve 20. minutě. Jejich koncentrace se od sebe výrazně nelišily a pohybovaly se v rozmezí od 0,65-1,21 %. Yue et al. (2016) ve svém výzkumu uvedené procentní zastoupení této látky nevedl.

Další látkou, která byla zjištěna u všech třech zkoumaných odrůd je látka Nonacosane. Látka Nonacosane se u všech zkoumaných odrůd zaznamenala při pokusu v 27. minutě, zatímco u Yue et al. (2016) to bylo již v minutě 13. Její koncentrace se u dvou zkoumaných odrůd (Frugana a Hergo) nelišila (1,39 %), zatímco u odrůdy Leikora měla velmi nízkou koncentraci (0,33 %). Yue et al. (2016) ve svém výzkumu nevedl koncentraci zjištěnou z rakytníkových plodů. Nicméně koncentrace v semenech byla 7,23 %.

Heptacosane byl podle Yue et al. (2016) zaznamenán ve 14. minutě s celkovou koncentrací v plodech 0,95 %. U všech testovaných odrůd byl Heptacosane chromatografem rozpoznán v 25. minutě. Nejvyšší koncentrace byla zjištěna u odrůdy Frugana (2,18 %), poté u odrůdy Leikora (1,62 %) a nejnižší procentuální zastoupení

bylo u odrůdy Hergo (1,39 %). Všechny tři zkoumané odrůdy mají vyšší koncentraci této sloučeniny v porovnání s hodnotami, které naměřil Yue et al. (2016).

Látka Docosane byla dle výzkumu Yue et al. (2016) zaznamenána v 15. minutě s koncentrací 6,54 %. U všech testovaných odrůd se shodně látka Docosane objevila v 21. minutě. U odrůd Leikora a Frugana se koncentrace této látky pohybovala v rozmezí 0,28-0,32 %, zatímco u odrůdy Hergo byla koncentrace o něco vyšší (0,71 %).

Jednou z látek s nejvyšší koncentrací u zkoumaných odrůd byla látka Hexadecanoic acid. Toto potvrzuje i výzkum Yue et al. (2016), kde měla látka také nejvyšší procentuální zastoupení. U odrůdy Leikora a odrůdy Frugana nebylo procento zastoupení tak vysoké (4,58-4,88 %) jako u odrůdy Hergo, u které se koncentrace pohybovala lehce nad 12 %. Výzkum Yue et al. (2016) ukazuje, že tato látka byla nejhojněji zastoupena v dužině plodů (32,88 %) i v semenech (36,64 %).

Dalšími významnými látkami dle výzkumu Yue et al. (2016) byly látky Oleic acid s koncentrací v dužině plodů 9,06 % a 7,70 % v semenech a Dibutyl phthalate s koncentrací oleje v dužině 9,76 % a v semenech 14,72 %. Tyto látky nebyly přítomny ani u jedné zkoumané odrůdy.

Podle výzkumu Socasi et al. (2013), který analyzoval plody rakytníku metodou headspace ITEX/GC-MS, byla jedinou společně určenou látkou látka Nonanal, která byla u zkoumaných odrůd zaznamenána chromatografem v 27. minutě. Koncentrace této látky byla ve výzkumu Socasi et al. (2013) 0,32 % v dužině plodu rakytníku řešetlákového. Obsah ostatních látek se s výzkumem dle Socasi et al. (2013) neshodoval.

9. Závěr

Z výsledků výzkumu vyplynulo, že odrůdy Leikora a Frugana jsou si obsahem látek v esenciálním oleji velmi podobné, nicméně odrůda Hergo se zastoupením obsahových látek výrazně odlišovala. Ranost odrůdy pravděpodobně nemá na rozdílný obsah látek vliv. Rozdíl však může být způsoben termínem sklizně, odlišnými půdními a klimatickými podmínkami, stářím rostliny, případně stresovými faktory. Další pravděpodobnou příčinou rozdílnosti naměřených hodnot mohla být rozdílná navážka suchého vzorku u jednotlivých odrůd.

U testovaných odrůd se jednotlivé obsahové látky na chromatografu zaznamenávaly mnohem později v porovnání s výsledky Yue et al. (2016). Změny v retenčních časech mezi testovanými odrůdami a výzkumem Yue et al. (2016) mohly být zapříčiněny odlišným nastavením kolony a pozvolnějším zvyšováním teploty uvnitř chromatografu.

Na danou problematiku bylo vypracováno jen málo vědeckých prací. Tyto práce se však ve spektru testovaných obsahových látek velmi liší, a je obtížné je mezi sebou porovnávat. Z tohoto důvodu si analýza obsahových látek pomocí MC-GS zaslouží další výzkum.

Další výzkum by měl proběhnout na širším okruhu odrůd, pěstovaných na jedné lokalitě. Sledovány by měly být půdní a klimatické podmínky, expozice, množství srážek a teploty. Rostliny by měly být stejného stáří. Plody by měly být sbírány ihned po dosažení zralosti tak, aby bylo eliminováno zkreslení výsledků chemickými změnami při přezrání plodů.

Pro účely pokusu se jako nejvhodnější jeví výsadba pokusného sadu na několika lokalitách, které budou mít odlišné půdní a klimatické podmínky. Na každé lokalitě by mělo být zastoupeno alespoň 10 nejběžněji pěstovaných odrůd rakytníku. Důležité je dodržet stejnou agrotechniku na všech testovaných plochách. I drobné odchylky, například vyšší dávka hnojiv, mohou způsobit další odchylky v obsahu látek.

Díky obsahovým látkám rakytníku a jejich mnohostrannému využití by tato práce mohla být prvotním impulsem pro budoucí výzkumy, které by mohly být

zaměřeny na důkladnější rozbor obsahových látek, především z hlediska jejich významu například v lékařství a veterinární medicíně.

10. Seznam použité literatury

Agilent technologies. 2018. 5977A Series GC/MSD Systém. Available at https://www.agilent.com/cs/publishingimages/product_7890B_5977A_7693_tray_730x730_lg.png: Accessed 2018-03-20.

Alberts A. Mullen P. Spohn M. 2008. Léčivé stromy a keře. Praha: Beta. 248p.

Bajer J. 2014. Rakytník zázračná rostlina, oranžový poklad Praha: Mladá fronta. 160p.

Beran P. 2015. Pěstujeme rakytník řešetlakový. Available at <https://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/pestujeme-rakytinik-resetlakovy/>: Accessed 2018-03-14.

Beveridge T, Harrison JE. 2001. Microscopic structural components of sea buckthorn (*H. rhamnoides* L.) juice prepared by centrifugation. Lebensm.-Wiss. u. Technol. **34**: 458-461.

Beveridge T, Li TSC, Oomah BD, Smith A. 1999. Sea buckthorn products: Manufacture and composition. J Agric Food Chem. **47**: 3480–3488.

Borecká H. 2017. Moje homemade sirupy. Available at <http://hanaborecka.cz/aktualne-moje-homemade-sirupy/>: Accessed 2018-04-02.

Bock W, Felkenheuer W, Dongowski G, Kroll J, Schweider C, Baars H, Sievert B. 1990. Method for enhanced processing of raw juice from sea buckthorn berries. GDR Patent DD 275 775 A3.

Brickell Ch. 2008. A-Z encyklopedie zahradních rostlin. Praha: knižní klub. 1128p.

Cídlová H. 2003. Laboratorní cvičení z fyzikální chemie. Brno: Masarykova univerzita. 124p.

Clevenger JF. 1928. Apparatus for determination of volatile oil. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **17**: 345-349.

Cossuta D, Simandi B, Hohmann J, Doleschall F, Keve T. 2007. Supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pomace. *J. Sci. Food Agric.* **87**: 2472-2481.

Čůta F. 1986. Instrumentální analýza. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury. 3p.

Dharmananda S. Sea buckthorn, Institute for Traditional Medicine (Portland, Oregon, USA). Available at: <http://www.itmonline.org/arts/seabuckthorn.htm>: Accessed 2018-03-30.

Johnson LA, Lusas EW. 1983. Comparison of alternative solvents for oils extraction, *J Am Oil Chem Soc.* **60**: 229-242.

Kallio H, Yang B, Peippo P, Tahvonen R, Pan R. 2002a. Triacylglycerols, glycerophospholipids, tocopherols, and tocotrienols in berries and seeds of two subspecies (ssp. *sinensis* and *mongolica*) of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*). *J Agric Food Chem* **50**: 3004-3009.

Kleinschmidt T, Siudzinski S, Lange E. 1996. Stabilization of the oil and cloud phases in sea buckthorn juice. *Food Sci. Technol. Abstr.* **63**: 702-705.

Koskovac M, Cupara S, Kipic M, Barjaktarevic A, Milovanovic O, Milovanovic K, Markovic M. 2017. Sea Buckthorn Oil—A Valuable Source for Cosmeceuticals. *Cosmetics* **40**: 1-10.

Kumar R, Kumar GP, Chaurasia OP, Singh SB. 2011. Phytochemical and Pharmacological Profile of Seabuckthorn Oil: A Review. *Research Journal of Medical Plant* **5**: 491-499.

Li TSC, Beveridge THJ, Oomah BD. 2003. *Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides L.): Production and Utilization*. Ottawa: NRC Research Press. 140p.

Liu J, Liu Z. 1989. Research of processing technology for sea buckthorn concentrated juice. *Proc. Int. Symp. On Sea Buckthorn*. China: Xian, p. 314-317.

Lu R. 1992. *Sea buckthorn: A Multipurpose Plant Species for Fragile Mountains*. Kathmandu, Nepal: International Centre for Integrated Mountain Development. 62p.

Lundanes E, Reubsaet L, Greibrokk T. 2014. *Chromatography*. Weinheim: Wiley-VCH. 208p.

Mermet MJ, Kellner R, Otto M, Valcárcel M, Widmer HM. 2004. *Analytical chemistry: a modern approach to analytical science*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH. 1209p.

Mikeš O. 1980. *Laboratorní chromatografické metody*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury. 673p.

Mikulčák J, Klimeš B, Široký J, Šůla V, Zemánek F. 1985. *Chemické tabulky pro střední průmyslové školy chemické a s chemickým zaměřením*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 276p.

Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Ontario. 2012. *Sea Buckthorn*. Available at <http://www.omafra.gov.on.ca/>: Accessed 2018-03-14.

Montpetit D, Lalonde M. 1987. In vitro propagation and subsequent nodulation of the actinorhizal *Hippophae rhamnoides* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **15**: 189-199.

Nikolová I. 2014. Chromatografické metody. Český hydrometeorologický ústav. Ústí nad Labem. 70p.

Paprštein F. 2009. Technologie pěstování a množení rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides* L.): metodika. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský. 29p.

Pherobase. 2003-2018. Database of pheromones and semiochemicals. Available at <http://www.pherobase.com/>: Accessed 2018-04-02.

Poole C. 2012. Gas Chromatography. Amsterdam: Elsevier Science. 753p.

Ranjith A. 2009. Phytochemical investigation on sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries [PhD.]. India: Cochun University of Science and Technology. 222p.

Rozman T. 2013. Plynová chromatografie pro stanovení aldehydů a ketonů. Brno: Masarykova univerzita Ústav chemie. 55p.

Socaci SA, Socaciu C, Tofană M, Rați IV, Pinteaa A. 2013. In-tube Extraction and GC–MS Analysis of Volatile Components from Wild and Cultivated sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *Carpatica*) Berry Varieties and Juice. *Phytochem. Anal.* **24**: 319–328.

STAT. 2003. Domestic Sea Buchthorn Market has a Potential. Available at <https://www.statpub.com>: Accessed 2016-03-09.

Šťastová J, Jež J, Bártlová H, Sovová M. 1996. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂-III. Extraction from sea buckthorn. *Chem Eng Sci.* **51**: 4347-4352.

Valíček P. 2007. Rostliny pro zdravý život. Benešov: Start. 230p.

- Valíček P, Havelka EM. 2008. Rakytník řešetlákový rostlina budoucnosti. Benešov: Start. 86p.
- Yang B, Kallio H. 2002b. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophae*) lipids. Trends Food Sci Tech **13**: 160–167.
- Yang, B, Kallio HP. 2001a. Fatty acid composition of lipids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries of different origins. J Agric Food Chem. **49**: 1939–1947.
- Yin JZ, Wang AQ, Wei W, Lui Y, Shi WH. 2005. Analysis of the operation conditions for supercritical fluid extraction of seed oil. Separ Purif Technol. **43**: 163–167.
- Yue XF, Shang X, Zhang ZJ, Zhang YN. 2016. Phytochemical composition and antibacterial activity of the essential oils from different parts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). Journal of Food and Drug Analysis **25**:327-332.
- Zadernowski R, Nowak-Polakowska H, Lossow B, Nesterowicz J. 1997. Sea buckthorn lipids. J. Food Lipids **4**: 165-172.
- Zeb A. 2004. Chemical and nutritional constituents of sea buckthorn. Pakistan Journal of nutrition **3**:99-106.
- Zeb A. 2006. Anticarcinogenic Potential of Lipids from *Hippophae* – Evidence from Recent Literature. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **7**: 32-34.
- Zhang W, Yan J, Duo J, Ren B, Guo J. 1989a. Preliminary study of biochemical constituents of berry of sea buckthorn growing in Shanxi Province and their changing trend. Proceeding of International Symposium on Sea Buckthorn (*H. rhamnoides* L.). China: Xian, 96-105p.

Zhang Y, Yu N. 1989. Research on the centrifuge technology of sea buckthorn juice and oil. Proceeding of International Symposium on Sea Buckthorn (*H. rhamnoides* L.). China: Xian, 307-310p.

Přílohy

Seznam příloh

Příloha 1: Šťáva z plodů rakytníku řešetlákového II

Příloha 2: Chromatogramy odrůd Leikora (černý), Frugana (červený) a Hergo

(zelený) III

Příloha 1: Šťáva z plodů rakytníku řešetlákového



Příloha 2: Chromatogramy odrůd Leikora (černý), Frugana (červený) a Hergo (zelený)

