VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OPTIMALIZACE EXTRAKCE BIOAKTIVNÍCH LÁTEK Z BYLIN DO RŮZNÝCH DRUHŮ MÉNĚ ZNÁMÝCH OLEJOVÝCH ZÁKLADŮ

OPTIMALIZATION OF THE EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM HERBS INTO DIFFERENT KIND OF OIL BASES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR
Bc. Dalibor Chytil

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR
Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

BRNO 2020

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1433/2019	Akademický rok:	2019/20
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student:	**Bc. Dalibor Chytil**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin		
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie		
Vedoucí práce:	**Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.**		

Název diplomové práce:

Optimalizace extrakce bioaktivních látek z bylin do různých druhů méně známých olejových základů

Zadání diplomové práce:

1. Zpracovat literární rešerši na dané téma
2. Na základě rešerše vybrat vhodné olejové a tukové základy aplikovatelné v kosmetické a farmaceutické oblasti
3. Provést extrakci Kostivalu lékařského a Rakytníku řešetlákového do lipofilních základů za definovaných podmínek
4. Vyvinout a optimalizovat postupy pro stanovení celkových alkaloidů, vybraných fytosterolů, karotenoidů, lipofilních vitaminů a skvalenu
5. Provést analýzy výchozích extrakčních činidel a dále jednotlivých exktraktů z optimalizačních experimentů
6. Statisticky vyhodnotit experimentální data a definovat závěry celého experimentu

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Dalibor Chytil student(ka)	Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá optimalizací postupů pro extrakci bioaktivních látek lipofilního charakteru z plodů rakytníku řešetlákového (*Hippophae Rhamnoides*) do rozdílných druhů olejových základů s využitím jednoduché macerace. Teoretická část pojednává o charakterizaci této byliny, o jejím botanickém zařazení, tradičním použití, chemickém složení a léčivých účincích. Zvýšená pozornost je dále věnována charakterizaci jednotlivých druhů použitých rostlinných olejů. Konkrétně čajovníkový, čajovníkový organic, marakujový, kukui a kiwi olej.

Experimentální část je zaměřena na aplikaci teoretických poznatků. U jednotlivých olejových základů byl stanoven profil celkových a volných mastných kyselin pomocí GC/FID a také základní tuková čísla. Při optimalizaci extrakce byl kladen důraz nejen na vliv použitého extrakčního činidla, ale také na dobu extrakce (1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 a 66 dní). Maceráty byly průběžně podrobeny stanovení vybraných parametrů (celkové množství karotenoidů, celkové množství fytosterolů, lutein, neoxanthin, astaxanthin, stigmasterol, β-sitosterol a vitamin E) s využitím UV-VIS spektroskopie a HPLC/PDA. Stejně tak bylo v průběhu macerace sledováno peroxidové číslo pro posouzení míry oxidační degradace macerátů. Výtěžnost celkových sledovaných parametrů v individuálních olejích se od sebe významně nelišila. Naopak u výtěžnosti jednotlivých vybraných sledovaných parametrů byly pozorovány významné změny. Zároveň statická macerace za námi stanovených podmínek nebyla příliš vhodná pro extrakci vitaminu E, stigmasterolu a celkových fytosterolů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Olejová extrakce, karotenoidy, fytosteroly, vitamin E, lutein, neoxanthin, astaxanthin, stigmasterol, β-sitosterol, macerace, macerát, optimalizace, rakytník řešetlákový, čajovníkový olej, marakujový olej, kukui olej, kiwi olej, ultrafialová viditelná spektroskopie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, plynová chromatografie.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the optimization of processes for extraction of bioactive lipophilic compounds from fruits of sea buckthorn (*Hippophae Rhamnoides*) into various types of plant oil bases using simple maceration. The theoretical part of this thesis deals with the characterization of this herb, its botanical classification, traditional use, chemical composition and medicinal effects. Increased attention is also paid to the characterization of individual types of plant oils used, namely camellia, camellia organic, passionflower, kukui and kiwi oil.

The experimental part of the thesis deals with application of theoretical knowledge. The profile of total and free fatty acids for individual plant oil bases was determined by GC/FID, furthet the basic fat numbers were also determined. When optimizing the extraction, emphasis was placed not only on the effect of the extraction agent used, but also on the extraction time (1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 and 66 days). The macerates were continuously subjected to the determination of selected parameters (total amount of carotenoids, total amount of phytosterols, lutein, neoxanthin, astaxanthin, stigmasterol, β-sitosterol and vitamin E) using UV-VIS spectroscopy and HPLC/PDA. Likewise, the peroxide number was monitored during maceration to assess the degree of oxidative degradation of macerates. The recovery of selected total parameters in individual oils did not differ significantly in most cases. On the contrary, the yield of individual monitored parameters differed significantly. At the same time, static maceration under our conditions was not very suitable for the extraction of vitamin E, stigmasterol and total phytosterols.

KEY WORDS

Oil extraction, carotenoids, fytosterols, vitamin E, lutein, neoxanthin, astaxanthin, stigmasterol, β-sitosterol, maceration, macerate, optimalization, sea buckthorn, camellia oil, passionflower oil, kukui oil, kiwi oil, ultraviolet visible spectroscopy, high performance liquid chromatography, gas chromatography.

CHYTIL, Dalibor. *Optimalizace extrakce bioaktivních látek z bylin do různých druhů méně známých olejových základů.* Brno, 2020. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123856. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování:
Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu diplomové práce Ing. Jaromíru Pořízkovi Ph.D. a konzultantovi Ing. Martinu Szotkovskému za odborné vedení, ochotu, věnovaný čas a cenné rady.

OBSAH

1 ÚVOD 8
2 TEORETICKÁ ČÁST 10
2.1 Biologicky aktivní látky v léčivých rostlinách 10
2.2 *Hippophae Rhamnoides* – Rakytník řešetlákový 21
2.2.1 Tradiční použití 22
2.2.2 Chemické složení 22
2.2.3 Léčivé účinky 26
2.3 Extrakční metody 28
2.3.1 Příprava vzorků bylin pro analýzu lipofilních sloučenin 29
2.3.2 Uchování vzorku po extrakci 30
2.3.3 Macerace 30
2.3.4 Soxhletova extrakce 30
2.3.5 Ultrazvuková extrakce 30
2.3.6 Superkritická fluidní extrakce 31
2.3.7 Subkritická vodní extrakce 31
2.3.8 Extrakce iontovými kapalinami 31
2.4 Méně známé druhy olejů jakožto extrakční činidla 31
2.4.1 Čajovníkový olej 34
2.4.2 Marakujový olej 35
2.4.3 Kukui olej 36
2.4.4 Kiwi olej 38
2.5 Metody vhodné pro charakterizaci rostlinných olejů 39
2.5.1 Stanovení profilu volných a celkových mastných kyselin pomocí GC/FID 39
2.5.2 Stanovení tukových čísel rostlinných olejů 40
2.6 Metody vhodné pro charakterizaci macerátů 42
2.6.1 Stanovení celkového obsahu karotenoidů 42
2.6.2 Stanovení celkového obsahu fytosterolů 43
2.6.3 Stanovení jednotlivých karotenoidů a fytosterolů 43
2.6.4 Stanovení celkového obsahu vitaminu E 44
2.7 Použité instrumentální techniky 44
2.7.1 UV-VIS spektroskopie 44

2.7.2 Chromatografie ... 45
2.7.3 HPLC ... 48
2.7.4 GC ... 49
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 50
3.1 Použité chemikálie ... 50
3.2 Použité pomůcky a přístroje ... 51
3.3 Vzorky rakytníku řešetlákového a rostlinné oleje ... 52
3.4 Charakterizace použitých rostlinných olejů ... 53
3.4.1 Stanovení tukových čísel ... 53
3.4.2 Stanovení profilu volných a celkových mastných kyselin pomocí GC/FID ... 54
3.5 Stanovení výtěžnosti extrakce ... 56
3.5.1 Příprava extraktů ... 56
3.5.2 Stanovení celkového obsahu karotenoidů ... 56
3.5.3 Stanovení celkového obsahu fytosterolů ... 57
3.5.4 Stanovení vybraných karotenoidů a fytosterolů ... 57
3.5.5 Stanovení vitaminu E ... 58
4 VÝSLEDKY A DISKUZE ... 59
4.1 Stanovení tukových čísel rostlinných olejů ... 59
4.2 Stanovení celkových a vázaných MK v rostlinných olejích ... 59
4.3 Stanovení sledovaných parametrů rostlinných olejů před zahájením macerace ... 61
4.4 Studium procesu extrakce rakytníku řešetlákového do olejů ... 61
4.4.1 Stanovení celkového obsahu karotenoidů ... 61
4.4.2 Stanovení celkového obsahu fytosterolů ... 62
4.4.3 Stanovení celkového obsahu vitaminu E ... 64
4.4.4 Stanovení vybraných karotenoidů a fytosterolů ... 65
4.4.5 Zhodnocení vývoje peroxidového čísla macerátů v průběhu celého experimentu 70
4.5 Zhodnocení vlivu rozpouštědla na účinnost macerace ... 71
5 ZÁVĚR ... 73
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ... 75
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK ... 86
8 PŘÍLOHY ... 87

1 ÚVOD

Velké množství epidemiologických studií posledních desítek let jasně prokazuje, že diety s vysokým obsahem potravin rostlinného původu mají přímý vliv na prevenci proti chronickým onemocněním a převážně proti rakovině. Rostliny totiž obsahují velké množství fytochemikálií, jež jsou jejich sekundárními metabolity a jako součást potravinových doplňků mohou podpořit imunitní systém anebo přinášet další fyziologické benefity. V posledních třiceti letech začala v západní medicíně dominovat syntetická léčiva. Do té doby byly zásadní medikamenty přírodního charakteru. Ačkoliv se tyto dva směry zdají být konkurenční, nemusí tomu tak být, jelikož více než 61 % syntetických léčiv uvedených na trh v letech 1981−2002 bylo inspirováno právě z obdob přírodního charakteru. Navzdory velkolepým výsledkům rozvoje nových léků skrze biotechnologie nebo genové inženýrství tedy přírodní léčiva zůstávají i nadále velmi atraktivním zdrojem inspirace pro dnešní vědce. Potenciál může být značný, ze známých 350 000 rostlinných druhů bylo z fytochemického a farmakologického pohledu prozkoumáno stále asi jen 10 % [1–2].

Zároveň s tím přestávají být atraktivní extrakční činidla na ropné bázi, na které se vztahují celosvětově stále přísnější regule. Pozornost se jasně směřuje na obnovitelné a ekologické zdroje, které jsou v současnosti hlouběji zkoumány. Extrakční výtěžnosti jednotlivých typů látek je závislá na jejich polaritě, poměru jednotlivých mastných kyselin a samozřejmě také na obsahu minoritních látek. Luhování bylin do rostlinných olejů však není žádnou novinkou. Už v dávném Řecku byla prováděna macerace různých květů v olivovém oleji za účelem zlepšení jeho kosmetických vlastností. Stejně tak se do rostlinných olejů i živočišných tuků extrahovaly aromatické rostliny, a to nejen kvůli zachování vůně, ale také pro zvýšení jejich trvanlivosti. Tyto historické postupy byly nahrazeny v devatenáctém století právě organickými rozpouštědly na ropné bázi jako benzen nebo hexan [3–6].

Rakytník řešetlákový (*Hippophae Rhamnoides*) je rostlina známá velmi dlouhý čas, přesto má z moderního hlediska stále co nabídnout. Tento druh je hojně rozšířen v Evropě, Asii, Severní i Jižní Americe a přímo u nás je po již dlouhou dobu součástí tradiční medicíny. Nejzásadnější částí rostliny jsou její plody, které se zpracovávají buď do formy ovocné šťávy, případně do formy oleje, ten se nejčastěji lisuje ze semen. Rakytník řešetlákový má vysoký obsah vitamínů (C, K, E), minerálů (vápník, železo, draslík), flavonoidů (isorhamnetin, rutin, quercetin) a také cenných látek lipofilní povahy jako fytosteroly (β-sitosterol, ergosterol) a karotenoidy (β-karoten, lykopen), které pozitivně přispívají k léčbě mnoha onemocnění. Zároveň je tato bylina atraktivní pro kosmetický průmysl pro fortifikaci různých mastí nebo krémů. Díky obsaženým flavonoidům jsou rostlině přisuzovány anti-aterogenní, kardioprotektivní a protirakovinné účinky. Vzhledem k dalším obsaženým sloučeninám jsou prokázané také imunomodulační, protizánětlivé, antibakteriální a antivirové účinky. Olej z rakytníku má pro kůži hojivé účinky a ochraňuje ji před solární radiací [1, 7].

Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací postupů pro extrakci nutričně a medicinálně cenných látek lipofilní povahy z rakytníku řešetlákového do méně známých rostlinných olejů jako je čajovníkový, čajovníkový, marakujový, kukui a kiwi olej. Teoretická část se zaměřuje na shrnutí poznatků o chemickém složení a farmaceutických účincích této léčivé rostliny a rozebírá jednotlivé přírodní oleje, do nichž je extrahovaná. Experimentální část

diplomové práce se zaměřuje na charakterizaci použitých rostlinných olejů z pohledu volných a celkových mastných kyselin pomocí GC/FID. Stejně tak byla sledována základní tuková čísla. Dále se diplomová práce zabývá stanovením vybraných parametrů v macerátech a jejich následnou charakterizací pomocí UV-VIS (ultrafialová-viditelná) spektroskopie a HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie). Zvýšené pozornosti je věnováno vlivu doby extrakce a volby extrakčních činidel (méně známé rostlinné oleje) na vybrané parametry, tedy celkový obsah karotenoidů (TCC), celkový obsah fytosterolů (TPC), obsah vitaminu E, vybraných karotenoidů (lutein, neoxanthin, astaxanthin) a fytosterolů (stigmasterol, β-sitosterol). Navíc je v průběhu celého experimentu pozorováno peroxidové číslo, kvůli zhodnocení možné oxidační degradace macerátů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část diplomové práce stručně shrnuje informace pro pochopení problematiky extrakce účinných složek lipofilního charakteru z rakytníku řešetlákového pomocí méně známých rostlinných olejů. Pro porovnání dále představuje také výsledky zahraničních studií na téma maximalizace extrakčních výtěžků z této či podobných matric.

2.1 Biologicky aktivní látky v léčivých rostlinách

Metabolismus rostlin rozdělujeme na primární a sekundární. Primární zahrnuje metabolismus sacharidů, lipidů, bílkovin a nukleových kyselin, které jsou důležité pro růst, vývoj a jejich reprodukci. V případě sekundárního metabolismu je však situace opačná. Produkované sloučeniny jako jsou např. alkaloidy, fenolické sloučeniny, terpeny, chinony, karotenoidy nebo fytosteroly nejsou pro základní přežití rostliny zcela nezbytné [8]. Plní v rostlině však mnoho dalších důležitých funkcí: obrana před predátory a nepříznivými podmínkami, vábení hmyzu (vonná funkce a barevný význam), antimikrobiální působení, antioxidační funkce anebo modulace hormonálního metabolismu rostliny [9–11]. Sekundární metabolismus ale stále vychází z metabolismu primárního; proto tyto metabolismy často sdílí společné intermediáty a nedá se tak jednoznačně říct, že by nebyl pro celkové přežití rostliny podstatný. Schéma, jak spolu jednotlivé metabolismy souvisí, je uvedeno na *Obr. 1.* Substrátová a reakční specifita u reakcí sekundárního metabolismu bývá však podstatně nižší, proto je častější vznik chemicky a strukturně podobných látek [9–10, 12]. Většina biologicky aktivních látek spadá právě do sekundárního metabolismu [9–13]. V následující shrnující tabulce (*Tabulka 1*) je uvedeno orientační zastoupení jednotlivých sekundárních metabolitů v rostlinné říši [14].

***Tabulka 1**: Orientační zastoupení sekundárních metabolitů vyšších rostlin [14]*

Typ sekundárního metabolitu	**Orientační počet zástupců**
Obsahující dusík	
Alkaloidy	21 000
Neproteinové aminokyseliny (NPAAs)	700
Aminy	100
Kyanogenní glykosidy	60
Glukosináty	100
Alkamidy	150
Lektiny, peptidy, polypeptidy	2000
Neobsahující dusík	
Monoterpeny	2500
Sesquiterpeny	5000
Diterpeny	2500

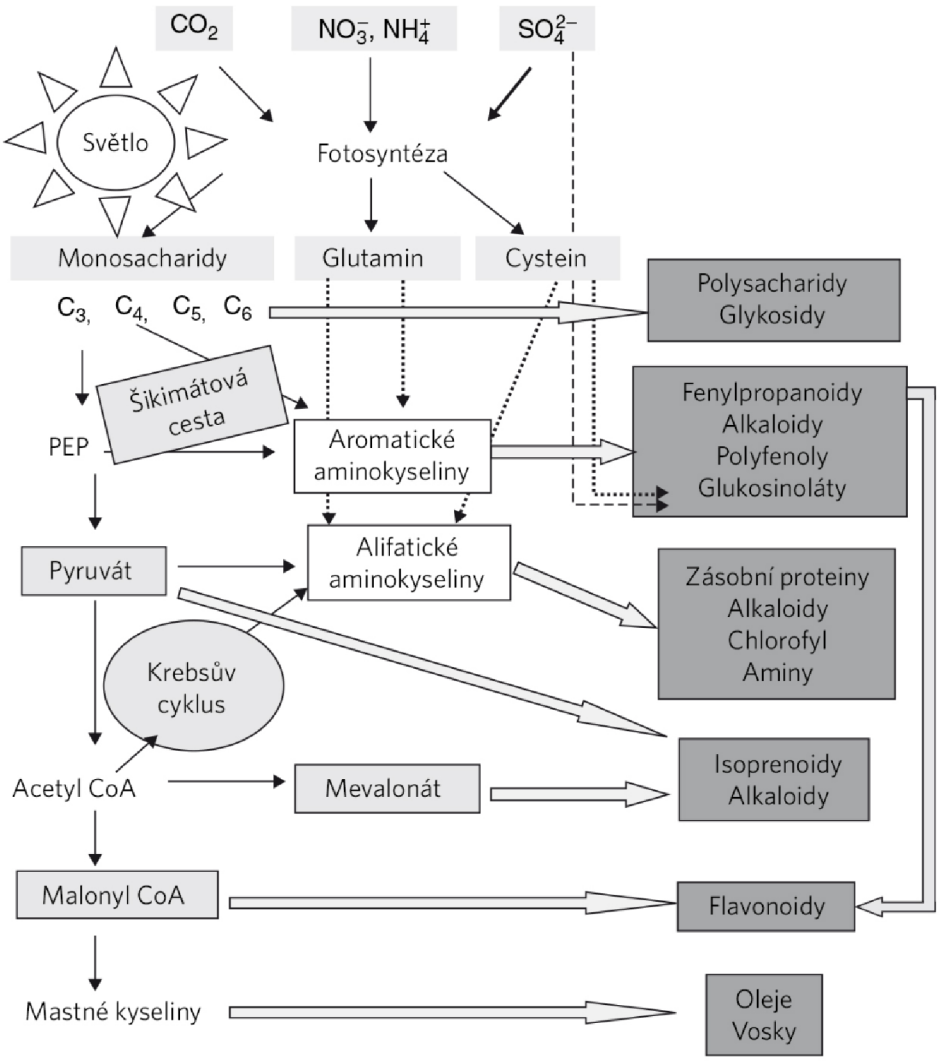
Typ sekundárního metabolitu	Orientační počet zástupců
Triterpeny, steroidy, saponiny	5000
Tetraterpeny	500
Flavonoidy, třísloviny	5000
Fenylpropanoidy, lignin, kumariny, lignany	2000
Polyacetyleny, mastné kyseliny, vosky	1500
Polyketidy	750
Sacharidy, organické kyseliny	200

Léčivé rostliny zpravidla obsahují velké množství biologicky aktivních sloučenin. Sloučeniny, které se v rostlině nachází ve vysokém zastoupení, jsou nazývány hlavními účinnými látkami. Za celkový účinek léčivé byliny jsou však zodpovědné jak hlavní tak i doplňkové účinné substance. Popis rostliny bez vedlejších účinných složek by byl nepřesný. Tyto doplňkové látky totiž mohou základní účinky podporovat nebo naopak zeslabovat a mohou mít zásadní význam pro rozpustnost a resorpci hlavních aktivních látek [9–13].

Samotná biologická aktivita účinných látek byla v posledních letech široce zkoumána. Velké pozornosti bylo věnováno fenolickým sloučeninám a karotenoidům, kvůli jejich hojnému výskytu v lidské stravě. Bylo zjištěno, že mají významné antioxidační vlastnosti, díky kterým mohou pomoci předcházet mnoha onemocněním způsobeným oxidativním stresem, například rakovině, neurodegenerativním poruchám anebo kardiovaskulárním chorobám. Kromě toho tyto sloučeniny modulují aktivitu mnoha enzymů a buněčných receptorů, čímž specificky působí na spoustu dalších nemocí. Stejně tak je množství pozornosti věnováno fytosterolům kvůli jejich schopnosti redukovat LDL cholesterol a tím působit příznivě na zdraví srdce a tepen. A to hlavně vzhledem k tomu, že jsou choroby kardiovaskulárního systému stále hlavní příčinou úmrtí na světě [1, 15–17].

Význam sekundárních metabolitů rostlin pro člověka roste i v terapeutickém použití. Seca a kol. [18] dokládá, že biologicky aktivní látky z bylin, ať už samostatně nebo ve směsi, mohou u mnoha onemocnění pomoci i přesto, že syntetická medikace na ně nezabrala. Hovoří se také o tom, že mohou umocnit efekt léčiva, anebo s ním synergizovat. Například bazalka posvátná neboli tulsi (*Ocimum sanctum*) je bylinou používanou k léčbě kašle, respiračních onemocnění, otrav jedy, impotence nebo artritidě. Při hlubším zkoumání a charakterizaci byliny bylo izolováno několik látek terpenoidní, fenolické a steroidní povahy, které nesly právě tyto efekty [19]. Navíc byl izolován lignan zvaný rabdosin, u kterého byly zjištěny specifické proapoptické efekty vůči některým rakovinovým buněčným liniím a proto se uvažuje o zařazení této látky jakožto centrální struktury pro vývoj léků proti rakovině [20].

Tato práce se zaměřuje na lipofilní biologicky aktivní látky v rostlinách, proto jim je věnováno nejvíce pozornosti.

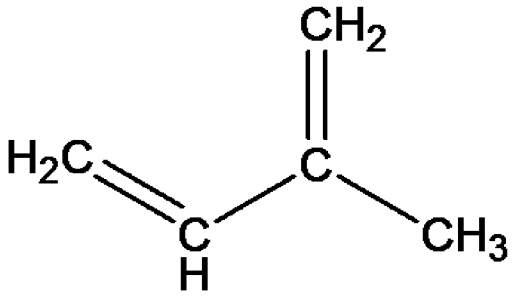


***Obr. 1**: Hlavní skupiny (a podskupiny) sekundárních metabolitů rostlin a jejich vztah k primárnímu metabolismu. Převzato z [13], upraveno.*

Terpeny

Terpeny jsou největší skupinou sekundárních metabolitů zahrnující více než 36 000 látek rozpustných v tucích skládajících se z jedné nebo více pětiuhlíkatých izoprenových jednotek (*Obr. 2*). Ročně je objeveno asi 1000 nových sloučenin, které jsou zařazeny do této skupiny. Mnoho z nich má i multi-cyklické struktury, které se odlišují v rozmanitosti funkčních skupin, avšak většinou neobsahují ve struktuře dusík ani síru. Mnoho terpenů je atraktivních z důvodu použití jako ochucovadel a aromat, pro rostliny často plní funkci atraktantů pro opylovače a obrannou roli proti mikrobům nebo býložravcům. Funkce terpenů je velmi rozsáhlá právě kvůli jejich strukturální rozmanitosti, podílejí se na všech základních rostlinných procesech včetně růstu, vývoje a reprodukce. Díky lyofilitě terpeny také snadno reagují s membránovými proteiny. Podle počtu izoprenových jednotek v jejich struktuře se dělí na hemiterpeny (C5), monoterpeny zahrnující iridoidy (C10), seskviterpeny (C15), diterpeny (C20), sesterterpeny (C25), triterpeny zahrnující také saponiny, steroly a odvozené srdeční glykosidy (C30),

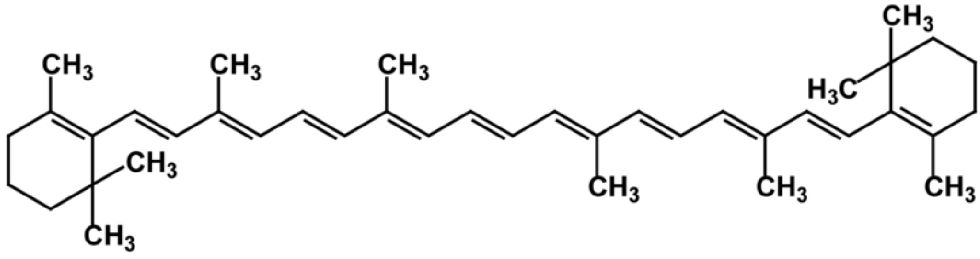
tetraterpeny (C40) zahrnující karotenoidy a v poslední řadě polyterpenoidy obsahující devět a více izoprenových jednotek [8, 10, 21–22].



***Obr. 2**: Isopren [3]*

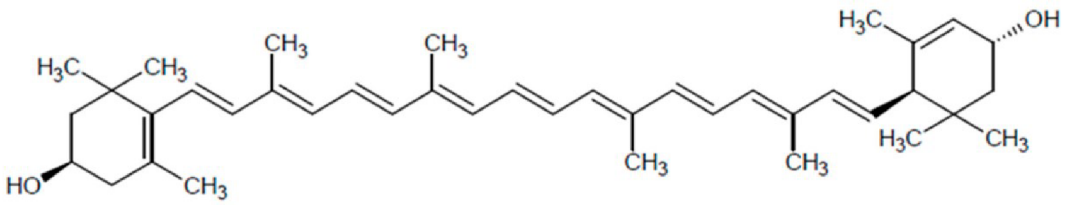
Karotenoidy

Karotenoidy jsou nejznámější a největší skupinou tetraterpenoidů, jsou tedy složeny z osmi jednotek isoprenu. Jedná se o přírodní barviva přítomna nejen v rostlinách, ale také v řasách, houbách, mikroorganismech a v tělech některých ptáků, ryb či hmyzu. Barevné spektrum sahá od žluté po červenou až fialovou. Název je odvozen od β-karotenu (*Obr. 4*), který má charakteristickou žlutooranžovou barvu, tu má například mrkev [2]. Karotenoidy mohou být rozděleny dle struktury do dvou skupin, karoteny a xantofyly. Do skupiny karotenů patří sloučeniny bez heteroatomu, tedy pouze s obsahem vodíku a uhlíku. Jedná se o například již zmíněný β-karoten, dále α-karoten nebo lykopen. Pokud obsahuje sloučenina kyslík jakožto heteroatom, řadí se do skupiny xantofylů, kam patří například lutein (*Obr. 4*), astaxanthin (*Obr.* **5**), zeaxanthin nebo neoxanthin (*Obr. 6*). Karotenoidy není možno u savců syntetizovat in vivo a proto je nutné je přijímat skrze stravu [23].



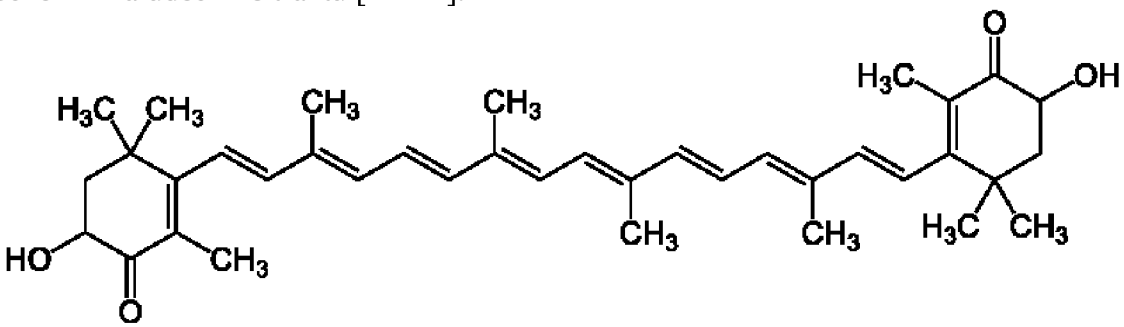
***Obr. 3**: β-karoten [6]*

V rostlinách jsou naopak karotenoidy syntetizovány de novo v téměř všech typech diferenciovaných plastidů a následně uchovávány nejčastěji v chloroplastech nebo chromoplastech. Hrají následně velmi významnou roli ve vývoji a regulaci růstu rostliny (cytokininy, gibereliny), ve fotosyntéze (chlorofyly, plastochinony) a buněčném dýchání (ubichinony). Slouží jako důležitý prekursor pro tvorbu rostlinných fytohormonů a signalizačních molekul [24–25].



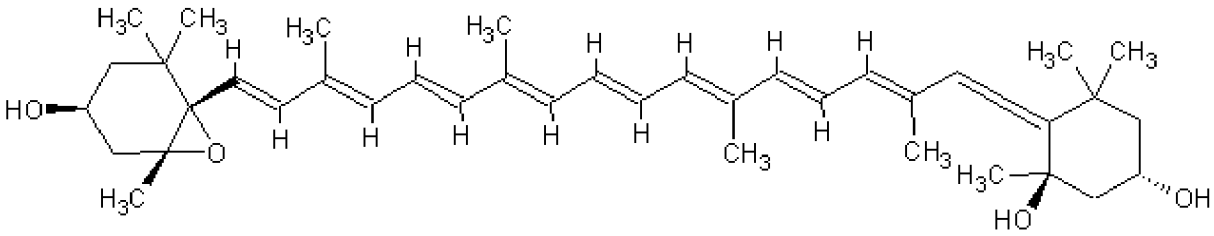
***Obr. 4**: Lutein [6]*

Karotenoidy jsou skupinou bioaktivních látek, která si získala pozornost potravinářských chemiků, nutričních specialistů a mnoha odborníků z potravinářského průmyslu právě kvůli jejich protizánětlivým a antioxidačním vlastnostem. Tím se podílí na prevenci v boji proti onemocněním a zachovává dobré zdraví. Pět typů karotenoidů se díky jejich vlastnostem vyrábí v průmyslovém měřítku, konkrétně β-karoten, lykopen, canthaxanthin, zeaxanthin a astaxanthin. Z rostlin bylo izolováno a popsáno více než 650 karotenoidů, ale jen 60 je jich přítomno v lidské výživě a asi 20 bylo nalezeno v plasmě a tkáních člověka. Pro lidské zdraví jsou důležité nejen jako provitaminy A (β-karoten) nebo velmi silné antioxidanty, ale také pro dobrou kondici oka (lutein, zeaxanthin), podporu imunitní odpovědi (lutein), zdraví kardiovaskulárního systému (astaxanthin, lutein, lykopen), proti rakovině (neoxanthin), anebo onemocněním žaludečního traktu [23–26].



***Obr. 5**: Astaxanthin [6]*

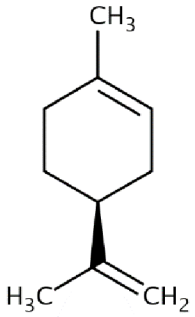
V poslední době se čím dál více uvažuje o roli karotenoidů v nutrikosmetice, což je obor propagující péči o svou pokožku právě skrze braní doplňků stravy, které mají prokázaný efekt na její zdraví. Tento termín byl použit poprvé už roku 1984. Zatímco například β-karoten má tendenci se ukládat do pokožky a podporovat její zlato-žlutou barvu, tak sloučeniny jako lutein a zeaxanthin mají tendenci se ukládat do žluté skvrny (*macula lutea*) a tím ochraňovat sítnici před UV poškozením. Mnoho karotenoidů má vliv na zvýšení elasticity kůže, prohloubení její hydratace a zamezení předčasného stárnutí [27].



***Obr. 6**: Neoxanthin [6]*

Éterické oleje

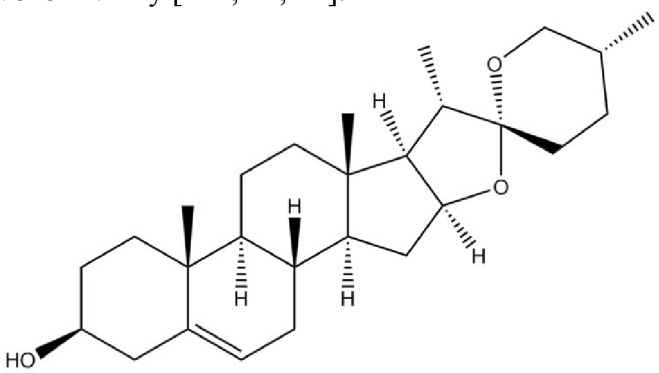
Éterické oleje jsou nejčastěji monoterpenoidní povahy. Vyznačují se charakteristickou, většinou příjemnou vůní a získávají se z čerstvých rostlin destilací vodní parou. Rostlinám samotným slouží primárně k přivábení včel pro opylování. Používají se především v aromaterapii na léčbu revmatismu, infekcí, nachlazení, břišních křečí a také mohou pomáhat zlepšovat chuť k jídlu. Mezi zástupce lze zařadit citral a limonen (*Obr. 7*) vyskytující se například v třezalce tečkované, v citronové slupce anebo v citronové trávě (*Cymbopogon citratus*) [8–10].



***Obr. 7**: Limonen [3]*

Saponiny

Další významnou podskupinou terpenů jsou saponiny. Jsou to látky povahy glykosidů. Dělí se na steroidní a triterpenové. Jedním ze známých steroidních saponinů je diosgenin (*Obr. 8*). Svůj název dostaly dle schopnosti pěnit s vodou podobně jako mýdlo (latinsky *sapo* znamená mýdlo), i když s mýdlem nemají po strukturní stránce nic společného. Mají velký vliv na podporu dýchacího systému a pomáhají proti kašli. Bylo zjištěno, že mají vliv na propustnost buněk tenkého střeva, tím podporují transport živin do jater. Také inhibují trávící enzymy a působí proti degradaci proteinů tím, že s nimi tvoří komplexy. Působí proti otokům a zánětům. Saponiny jsou jedovaté, a proto je třeba hlídat jejich dávkování. Při proniknutí do krevního řečiště ničí červené krvinky [8–9, 11, 21].

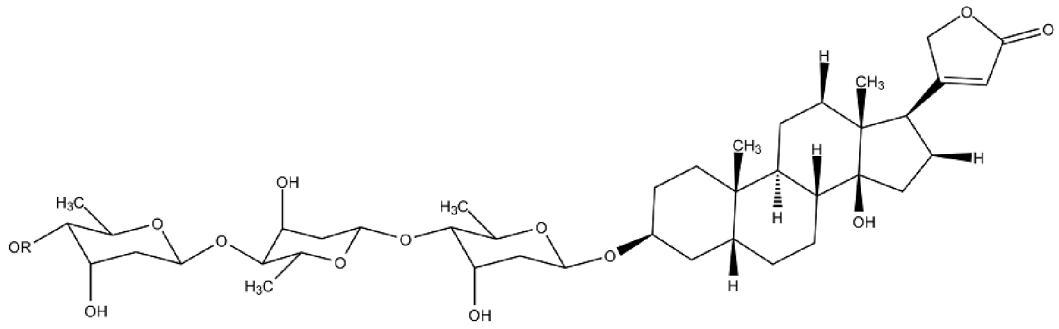


***Obr. 8**: Steroidní saponin diosgenin [8]*

Srdeční glykosidy

Významnou podskupinu terpenů tvoří také srdeční glykosidy. Mají steroidní stavbu buď s pětiúhlíkovým cyklickým uhlovodíkem (cardenolidy), anebo s šestiúhlíkovým laktonovým

kruhem (bufadienolidy). Většina z nich je toxická a ovlivňují kardiovaskulární systém, v minulosti byly hojně používány jako silné neurotoxiny způsobující smrt skrz zástavu srdce a dýchání. V menších dávkách mají však nenahraditelně významný účinek v posilování oslabeného srdečního svalu, čímž se zlepší prokrvení celého organismu, zvláště ledvin. Jsou tedy výborné při prevenci infarktu. Glykosidy byly poprvé objeveny u náprstníku červeného (*Digitalis purpurea*), ten obsahuje přes 30 glykosidů působících na srdce. Jako příklad je možno uvést purpureaglykosid A (*Obr. 9*), primární glykosid, ze kterého mohou po enzymatickém odštěpení jedné molekuly glukosy vznikat sekundární glykosidy jako digitoxin a gitoxin [8–9, 11].

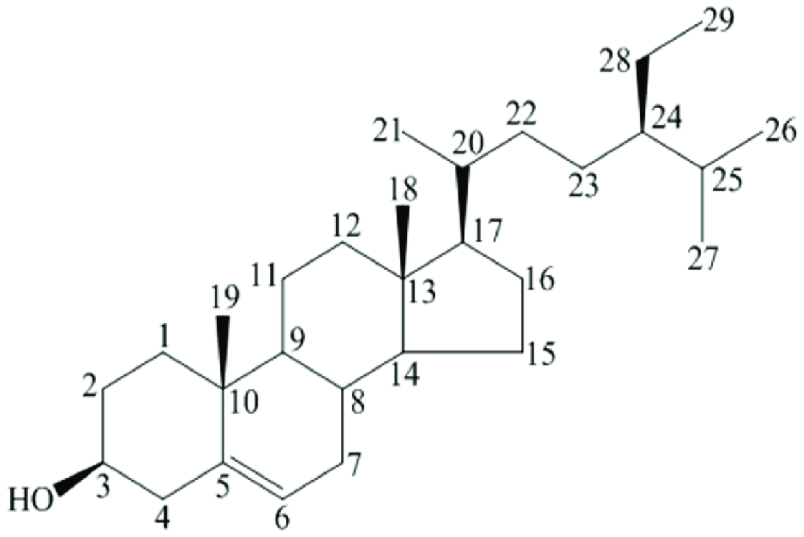


***Obr. 9**: Purpureaglykosid A [8]*

Fytosteroly

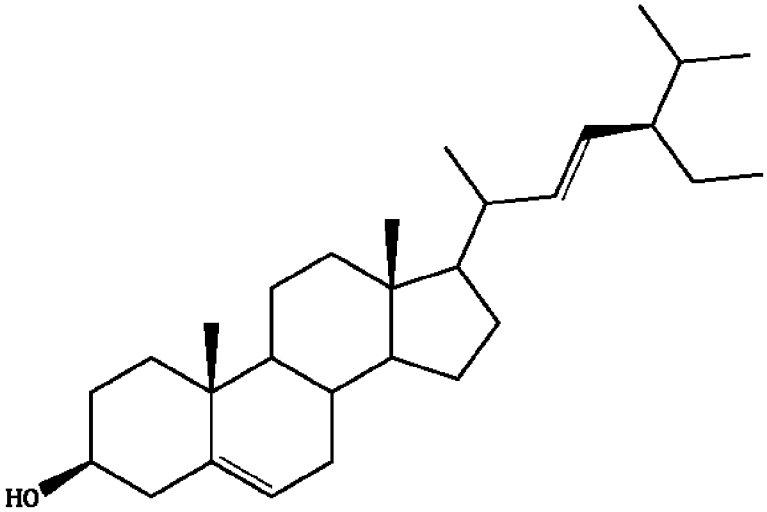
Termín fytosterol se používá pro popis jakéhokoliv sterolu nebo stanolu přítomného v rostlinách. Z hlediska struktury jsou stanoly velmi podobné sterolům, jedná se o jejich redukované formy, tedy nemají žádnou dvojnou vazbu. Oproti živočišné říši, pro kterou je cholesterol jediným finálním produktem biosyntézy sterolů má rostlinná říše více než 200 typů těchto sloučenin. Fytosteroly jsou triterpenoidy strukturně podobné cholesterolu jak v jeho struktuře, tak v jeho funkci. Mají charakteristické steroidní jádro s 3-β-hydroxylovou skupinou a často přítomnou dvojnou vazbou ve skupinách 5 a 6, která se neobjevuje právě u fytostanolů. Z hlediska názvosloví by se daly nazvat jako 4-desmethylsteroly ze skupiny cholestanů a dále by se daly rozdělit do tří kategorií dle další polohy substituovaných methylových skupin. Nejrozšířenější fytosterol (zastoupen ve stravě asi z 50 %) v rostlinné říši je β-sitosterol (*Obr.* **10**), který se od cholesterolu liší přítomností etylové skupiny na uhlíku číslo 24 v postranním řetězci. Ve stejné pozici má například campesterol, jakožto druhý nejrozšířenější sterol (asi 33 %) metylovou skupinu. Mezi další význané steroly patří stigmasterol (*Obr. 11*), campesterol anebo clerosterol [16–17, 28].

Největší výskyt fytosterolů je právě v olejnatých semenech rostlin, ze kterých se získává olej nejčastěji lisováním. Stále je však jejich obsah v olejích velmi malý, asi 0,1−2 % dle jeho typu. Menší množství má například rýžový olej (0,1 %), vyšší množství se vyskytuje v kukuřičném nebo řepkovém oleji (okolo 1 %). Nejčastěji se fytosteroly vyskytují ve vázané nebo v esterové formě. Následně jsou avšak velmi náchylné k degradaci vlivem delší doby skladování semen, vyšších teplot procesu jejich zpracování a předpřípravy či také dalších podmínek rafinace [28].



***Obr. 10**: β-sitosterol [6]*

Z pohledu výživy byly fytosteroly nejvíce studovány díky jejich schopnosti redukovat LDL cholesterol. Při konzumaci 3 g fytosterolů denně se snížila koncentrace LDL cholesterolu o 10 %, čímž se snížilo riziko ischemické choroby srdeční o 20 %. Fytosteroly se totiž váží skrze tenké střevo kompetitivně místo cholesterolu, tím se následně redukuje jeho obsah v krevním řečišti. Navíc mají ochranou funkci před vznikem rakoviny, konkrétně rakoviny prostaty, prsu a tlustého střeva. Dále bylo prokázáno, že pomáhají v léčbě autoimunitních onemocnění jako revmatoidní artritida. Jsou přitom velmi bezpečné i ve vyšším množství. Snad jediná kontraindikace, o které se uvažuje při dlouhodobé konzumaci vyššího množství fytosterolů, je zvýšení krevního tlaku [17, 28].



***Obr. 11**: Stigmasterol [6]*

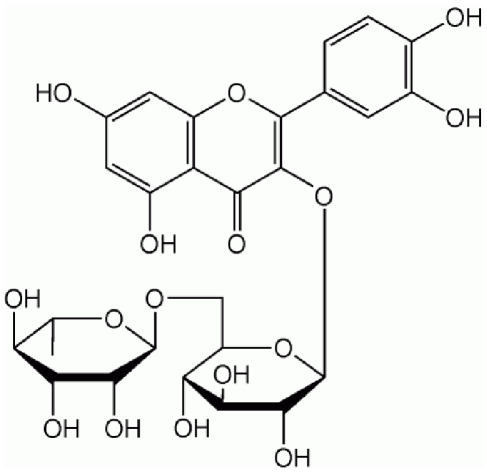
Fytosteroly v kosmetice mají hned několik příznivých efektů pro pokožku. V kosmetice se vyskytují buď volné (v koncentracích do 2 % kvůli jejich menší rozpustnosti), anebo ve formě esterů (vzhledem k neomezené rozpustnosti v koncentracích okolo 5 % a výše). Oproti cholesterolu, který při aplikaci přímo na kůži může vyvolat silné podráždění, působí fytosteroly

a jejich estery protizánětlivě a působí zklidňujícím efektem. Několik klinických studií prokázalo jejich efekt na zrychlení obnovy porušené kožní bariéry, zvýšení produkce kolagenu a kyseliny hyaluronové, zlepšení elasticity kůže, zmírnění její hrubosti nebo protekci před UV zářením [29–30]. Často se tedy používají do opalovacích krémů či do anti-aging produktů. Přidávají se také do šamponů a kondicionérů pro zvýšení přirozeného lesku vlasů a pro jejich lepší česání. Stejně tak dodávají strukturu a lesk produktům dekorativní kosmetiky jako rtěnky, pudry nebo řasenky. Bhattacharya a kol. [31] také dokázali, že se kůže obohacuje o fytosteroly i v případě konzumace produktů s jejich obsahem. Část přijatých fytosterolů je skrze krevní oběh přenášena do pokožky, kde je uložena.

Fenolické sloučeniny

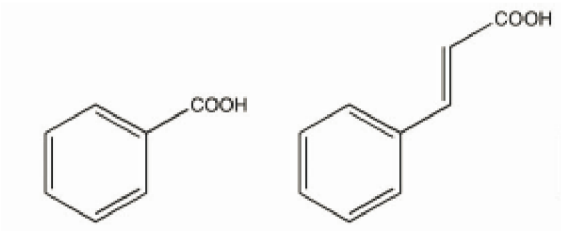
Fenolické sloučeniny obsahují hydroxylovou skupinu přímo vázanou na aromatickém jádře. Fenol (C_6H_5OH) je tedy nejjednodušší sloučeninou spadající do této kategorie. Jsou obsaženy téměř ve všech částech rostlin, což z nich dělá přirozenou složku lidské potravy. Mají spoustu farmakologických účinků, např. antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální, sedativní, antivirové účinky a navíc pomáhají k regeneraci tkání [8, 10–11, 21, 32].

Jsou obrovskou skupinou látek zahrnující více než 10 000 různých sloučenin. Významnou fenolickou sloučeninou obsaženou v rakytníku řešetlákovém a třezalce tečkované je rutin (*Obr.* **12**) s významnou antioxidační aktivitou. Mají mnoho významných podskupin, jako fenolické kyseliny, flavonoidy a třísloviny [11, 21, 9].



***Obr. 12**: Rutin [9]*

Fenolické kyseliny obsahují alespoň jednu karboxylovou skupinu a vyskytují se hlavně ve formě esterů, glykosidů nebo amidů, ve volné formě se objevují vzácně. Rozdělují se na deriváty kyseliny benzoové a skořicové (*Obr. 13*). Mezi deriváty kyseliny skořicové patří například kyselina kávová a kumarová, zatímco mezi deriváty kyseliny benzoové se řadí například kyselina gallová a vanilová. Tyto sloučeniny byly zkoumány hlavně z hlediska jejich schopnosti předcházet oxidativnímu poškození, které může vést až ke kardiovaskulárním chorobám, zánětům anebo rakovině [21, 32–33].

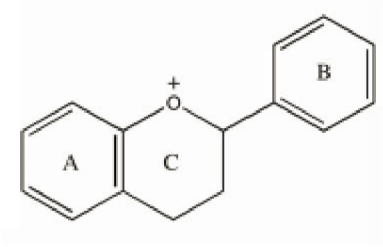


***Obr. 13**: Kyselina benzoová (vlevo) a kyselina skořicová (vpravo) [9]*

Flavonoidy

Flavonoidy jsou významnou skupinou fenolických sloučenin, řadíme zde více než 6 000 sloučenin se zcela charakteristickou základní flavanovou strukturou (*Obr. 14*). Rostliny si je tvoří jako odpověď na mikrobiální infekci. Mají velmi široké biologické aktivity, ty závisí na jejich specifické struktuře. Jsou zodpovědné za typické zbarvení květů a plodů rostlin. Flavonoidy postrádající hydroxylové skupiny mají vyšší aktivitu oproti mikroorganismům [8–10, 32–34].

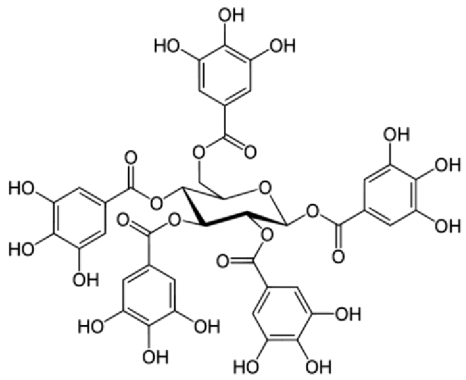
Mezi flavonoidy patří například anthokyany a katechiny s významnou antioxidační aktivitou. Antokyany jsou ve velké míře obsaženy v plodech temnoplodce černoplodého (*Aronia melanocarpa*), katechiny zase v listech čajovníku čínského (*Camellia sinensis*). Pravidelnou konzumací těchto produktů lze dosáhnout prevence převážně kardiovaskulárních onemocnění [8–10, 32–34].



***Obr. 14**: Obecný vzorec flavonoidů [11]*

Třísloviny

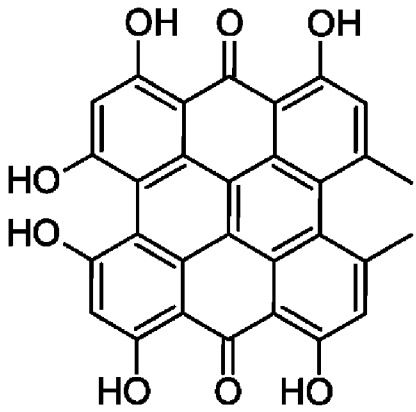
Mezi další významné fenolické sloučeniny patří třísloviny (taniny). Jedná se o složitě rozvětvené a často polymerní sloučeniny s velkou molekulovou hmotností. Mají svíravou a hořkou chuť. Rozdělují se na hydrolyzovatelné a kondenzované. Hydrolyzovatelné třísloviny jsou estery kyseliny gallové a cukrů. Takto vzniklé gallotaniny (*Obr. 15*) mohou dále kondenzovat s katechiny, díky jejichž hydroxylovým skupinám mohou srážet proteiny. Mají široké uplatnění při léčení ran, mírní bolest a zabraňují infekcím. Kromě silné antioxidační aktivity také omezují vylučování žaludečních šťáv a pomáhají při průjmových chorobách. V průmyslu se používají jako barviva a jako přísady při výrobě inkoustu [8–9, 11, 32, 35].



***Obr. 15**: Struktura gallotaninů [7]*

Chinony

Chinony zahrnují hydrochinony, naftochinony a antrachinony. Mohou sloužit jako redoxní reagenty patřící k enzymům nebo mohou interagovat s proteiny obsahující Fe^{2+}/Fe^{3+} redoxní systém, jako cytochromy a hemoglobin. Jedním z důležitých a zároveň zajímavých představitelů je červené barvivo hypericin (*Obr. 16*) z třezalky tečkované, které působí proti depresím [8].



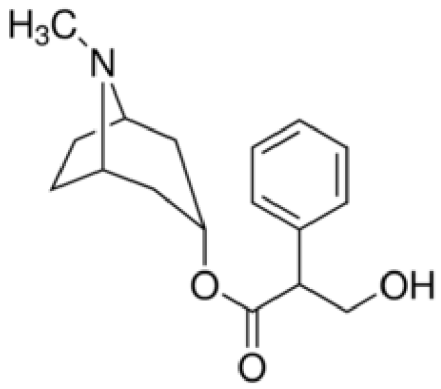
***Obr. 16**: Hypericin [8]*

Alkaloidy

Alkaloidy tvoří strukturně rozmanitou skupinu dusíkatých, převážně heterocyklických sloučenin vyskytujících se ve více než 20 % známých rostlin. Zatím je známo přes 12 000 různých alkaloidů, tvoří tedy rozmanitou skupinu sekundárních metabolitů. Hlavním znakem alkaloidů je výskyt jednoho či více dusíků v molekule. Často jsou zásadité povahy a v rostlinách se často vyskytují jako ve vodě-rozpustné soli organických kyselin. Dle cyklických struktur se dělí na mnoho skupin a podskupin [8–10, 12–13, 35].

Alkaloidy jsou známy hlavně kvůli svým silným fyziologickým a neurologickým účinkům. Tato skupina zahrnuje nejsilnější jedy, neurotoxiny a také psychedelika. Některé se vážou na neuroreceptory, ovlivňují nervový signál; jiné mohou být mutagenní a mohou dokonce způsobit změnu struktury DNA (deoxyribonukleová kyselina). V rostlinách slouží jako ochranné a obranné látky před predátory, viry, bakteriemi a plísněmi. Typickým zástupcem je například halucinogenní atropin (*Obr. 17*) objevující se v rulíku zlomocném (*Atropa belladona*). Do této

skupiny řadíme mnoho substancí obsažených v poživatinách, jako nikotin a kofein. Alkaloidy se převážně nevyskytují v nahosemenných rostlinách, kapradinách, mechu a nižších rostlinách [8–10, 12–13, 35].



***Obr. 17**: Atropin [6]*

2.2 *Hippophae Rhamnoides* – Rakytník řešetlákový

Říše:	rostliny (*Plantae*)
Podříše:	cévnaté rostliny (*Tracheophyta*)
Oddělení:	krytosemenné (*Magnoliophyta*)
Třída:	vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)
Řád:	růžotvaré (*Rosales*)
Čeleď:	hlošinovité (*Elaegnaceae*)
Rod:	rakytník (*Hippophae*)
Druh:	*Hippophae Rhamnoides*

Rakytník řešetlákový (*Hippophae Rhamnoides*) je ekonomicky významnou léčivou rostlinou patřící do čeledi *Elaegnaceae*, která zahrnuje okolo 60 druhů rostoucích převážně na severní polokouli. Jedná se o keř tvořící žlutooranžově zbarvené plody kyselé chuti (*Obr. 18*), které dozrávají od srpna do září a vydrží dlouho do zimy. Keř je asi 3–4 m vysoký, se stříbrnošedými listy a větvičky mají velmi pevné trny. Latinské jméno rodu pochází z Řecka, kde se tradičně přidávali lístky a větvičky této rostliny do krmiva koním pro přibírání na váze a lesklou srst. Název vznikl spojením slov ‚*Hippo*' (znamená kůň) a ‚*phoas*' (znamená záře). Mezi další zástupce rodu *Hyppophae* patří například *H. salicifolia, H. tibetana*, *H. neurocarpa* anebo *H. goniocarpa*. Tyto druhy však nejsou tak podrobně zkoumány jako právě *H. rhamnoides,* který je z rodu nejvýznamnější a má dvanáct poddruhů (ssp.) jako například *carpatica* nebo *mongolica* [2, 36–37].

Rakytník řešetlákový je druhem rozšířeným v chladných oblastech Evropy, Asie, Severní a Jižní Ameriky. Distribuce sahá od Himalájských regionů jako Indie, Nepál a Pákistán až do Ruska, Maďarska, Česka, Švédska, Finska a Velké Británie. Tak rozsáhlý výskyt rostliny odráží a potvrzuje vysokou odolnost a adaptibilitu rostliny na teplotní extrémy (od +43 °C do –45 °C).

Stejně tak se rostlina vyskytuje běžně v nadmořských výškách 2000–3600 metrů nad mořem, dobře toleruje vysoký obsah solí v půdě a sucho. U nás roste převážně na slunných stanovištích bohatých na vápník. [2, 15, 36–37].

***Obr. 18**: Rakytník řešetlákový [2]*

2.2.1 Tradiční použití

V Evropských a Asijských zemích se rostlina poslední staletí používá na potravinářské, farmaceutické a kosmetické aplikace. Je historicky dochováno, že plody rakytníku byly používány v indické a tibetské medicíně již před tisíci lety. Ve střední Asii se listy tradičně používají k léčbě kožních potíží a revmatoidní artritidy. V Mongolsku byl extrakt z listů s větviček používán pro podporu léčby zánětu střev a enterokolitidy lidí a zvířat. V tradiční čínské a tradiční tibetské medicíně se plody používají k léčbě horeček, zánětu jater, onemocnění oběhového systému, abscesů, rýmy, kašle, ischemické choroby srdeční, problémů s trávením, nádorových onemocnění (konkrétně v žaludku a jícnu) a gynekologických problémů [15]. V ruské medicíně se olej ze semen a plodů používá na léčbu chronické dermatitidy, ekzémů, atopie, lupénky, lupusu anebo trombóz. Olej má vyživující, revitalizační a obnovující účinky, proto se z kosmetického hlediska používá na léčbu akné, dermatitidy, suché a svědivé kůže. Osvědčil se rovněž na spáleniny, řezná zranění, kožní vředy a díky obsaženým bioaktivním látkám má vliv na vyhlazování vrásek a proto se používá do produktů bojujícím proti stárnutí pokožky [7, 15].

2.2.2 Chemické složení

Z hlediska obsahu účinných látek jsou nejzajímavější plody rakytníku, které jsou hmotnostně složeny 68 % z dužiny, 23 % ze semene a 9 % ze slupky [1]. Vysušená dužnina obsahuje asi 20−25 % oleje a semeno obsahuje přibližně 8−20 % oleje [6]. Na jejich chemické složení má vliv nespočet faktorů: geografická lokace, sezónní klimatické změny, doba sběru, velikost

plodů a rovněž lokální stav půdy [37]. Plody obsahují řadu biologicky aktivních látek. Velmi významná je jejich antioxidační aktivita a obsah vitaminu C, který je jeden z nejvyšších z celé rostlinné říše. Dále obsahují plody rakytníku fenolické sloučeniny, flavonoidy (např. hyperosid, quercetin, isoquercitrin, quercitrin, amentoflavon, kaempferol, miricetin, isorhamnetin a rutin), organické kyseliny (jako kyselina jablečná, chinová, šťavelová, citronová a vinná), karotenoidy (β-karoten, lykopen, lutein a zeaxantin), fytosteroly (β-sitosterol, 24-methylencykloartanol, erythrodiol, friedenal-3-ol, citrostadienol), minerální látky (Ca, P, Fe, K), vitaminy (A, C, E, K, riboflavin, kyselina listová, thiamin), deriváty kyseliny chinové (kyselina chlorogenová) xanthony, proanthokyanidiny, vitaminy a minerální látky [15, 37, 6, 25].

Mastné kyseliny

Složení mastných kyselin v oleji ze semen a dužniny rakytníku je uvedeno v *Tabulka 2*. Zatímco olej ze semen má majoritní podíl linolové a linoleové kyseliny, olej z dužniny je primárně složen z palmitové a palmitoolejové [4]. Poměry mastných kyselin v olejích se znovu mění dle oblasti pěstování a konkrétních odrůd [25].

***Tabulka 2**: Orientační obsah některých mastných kyselin v semenech a dužině rakytníku [4]*

Mastné kyseliny (Wt%)	***semena***	***dužina***
Palmitová 16:0	7,2	35,5
Palmitoolejová 16:1	LD	38,5
Stearová 18:0	2,6	1,2
Olejová 18:1 n-9	13,6	3,5
11-Oktadekanová 18:1 n-7	2,3	7,3
Linolová 18:2 n-6	36,3	13,5
Linolenová 18:3 n-3	38,5	2,0
Nervonová 24:1	LD	1,3

LD: pod limitem detekce

Karotenoidy

Obsah karotenoidů v rakytníku je primárním parametrem, dle kterého se hodnotí jeho kvalita a tržní cena. Právě karotenoidy jsou zodpovědné za charakteristickou barvu plodů a jsou z velké části zodpovědné za celkovou antioxidační aktivitu rakytníku [1]. Celkový obsah karotenoidů (*Total Carotenoid Content*, TCC) v čerstvých plodech rakytníku se pohybuje v rozmezí 1–120 mg/kg [25]. TCC v oleji z dužniny se pohybuje v rozmezí 1000−5000 mg/kg a v oleji ze semen 200–1000 mg/kg. Podíl karotenoidů v semenech rakytníku totiž zaujímá asi 5−20 % obsahu dužniny. Z tohoto celkového množství karotenoidů zaujímá 15−55 % právě β-karoten, mezi další výrazněji zastoupené karotenoidy patří zeaxanthin anebo lutein [6, 25, 26].

Obsah některých konkrétních karotenoidů v plodech rakytníku, jak ve volné nebo vázané esterové formě, je uveden v *Tabulka 3*, kdy nejvíce zastoupený je z esterů právě zeaxanthin dipalmitát a z volných forem právě β-karoten [27].

***Tabulka 3**: Orientační zastoupení některých karotenoidů v plodech rakytníku řešetlákového [27]*

Identifikované karotenoidy	Koncentrace (mg/100 g suchých plodů)
Lutein	2,1
Zeaxanthin	2,3
β-Cryptoxanthin	1,3
Lykopen	1,6
α-karoten	1,3
β-karoten	7,4
Zeaxanthin dipalmitát	10,7
Zeaxanthin myristát	2,1
Lutein dimyristát	3,1
Lutein palmitát	2,9
β-Cryptoxanthin palmitát	2,2

Fytosteroly

V případě celkového obsahu fytosterolů (*Total Phytosterol Content*, TPC) jasně dominují semena rakytníku, zastoupení se pohybuje okolo 1200−1800 mg/kg a z toho zaujímá 57−76 % právě β-sitosterol a poté 1−5 % stigmasterol, 2−5 % citrostadienol a 2−3 % campesterol. Zajímavostí je, že se tento trend zachoval i při analýze různých poddruhů z jiných geografických a klimatických oblastí sklízených v jiném kalendářním roce [38]. V dužině rakytníku je TPC menší, okolo 240−400 mg/kg. Znovu dominuje β-sitosterol, který je zahrnut asi z 61−83%, z dalších sterolů je výrazněji přítomen také isofucosterol v obsahu okolo 3% z celkového množství fytosterolů. Yang a kol. [38] zkoumali závislost doby sběru na obsahu jednotlivých fytosterolů, kdy od konce srpna do začátku listopadu značně rostl obsah campesterolu a naopak se snižoval obsah jiných fytosterolů jako například stigmasterolu. V plodech rakytníku se TPC pohybuje v rozmezí 340−520 mg/kg [1, 7, 38].

Li a kol. [39] zkoumali zastoupení jednotlivých fytosterolů v oleji ze semen rakytníku při extrakci hexanem (*Tabulka 4*), kromě β-sitosterolu byl ve vyšších množstvích přítomen i sitostanol anebo Δ^5-avenasterol.

***Tabulka 4**: Orientační obsahy některých fytosterolů v oleji ze semen rakytníku [39]*

	Obsah [mg/g]
Campesterol	20,6
Clerosterol	11,9
β-sitosterol	673
Sitostanol	94,3

	Obsah [mg/g]
Δ^5-avenasterol	165,9
24-methylenecycloartanol	76,1
Erithrodiol + citrostadienol	53,1

Fenolické sloučeniny a antioxidační aktivita

Fenolické sloučeniny jsou stěžejní díky své antioxidační aktivitě. Mimo fenolické kyseliny a flavonoidy má v rakytníku na celkovou antioxidační aktivitu vliv rovněž obsah karotenoidů, kondenzovaných taninů, tokoferolů a vitaminu C. Nejvýrazněji zastoupená fenolická kyselina v plodech rakytníku je kyselina salicylová v 55–75 % celkového množství. Většina přítomných fenolických kyselin je ve formě esterů nebo glykosidických vazeb, pouze asi 3 % celkového obsahu je ve formě volné [39−40].

Celkový obsah fenolických sloučenin v suchých plodech rakytníku se pohybuje okolo 3570−4439 mg/kg a mezi nejzastoupenější patří již zmíněná salicylová kyselina, dále p-kumarová kyselina, o-kumarová kyselina, kávová kyselina, syringová kyselina, nebo vanilová kyselina [39]. Celková antioxidační aktivita plodů rakytníku měřena zhášením radikálu DPPH se pohybuje okolo 529 ± 79 mg TE/g, velmi obdobnou antioxidační aktivitu měl také extrakt kořene rakytníku [40].

Vitaminy

Vitaminy jsou pro bylinu velmi důležité biokatalyzátory metabolických procesů, které podstatně urychlují anebo umožňují jejich průběh. Z hlediska vitaminového složení byl primárně zjišťován obsah vitaminu C a vitaminu E (tokoferolů). Tyto vitaminy jsou pro bylinu důležitými antioxidanty. Zadernowski a kol. [41] stanovili obsah celkových volných tokoferolů na 101,4−128,3 mg/100 g oleje z celých plodů rakytníku, kdy α-tokoferol byl obsažen z 62,5−67,9 %, δ-tokoferol byl obsažen z 32,1−37,5 % a byly nalezeny pouze stopy γ-tokoferolu [41]. Důležitým lipofilním vitaminem je také vitamin K, toho bylo nalezeno 1,1−2,3 mg/g v oleji ze semen rakytníku. Pro lidský organismus má úlohu v koagulaci krve [37].

Celkový obsah vitaminu C se u suchých plodů rakytníku rostoucího v Evropě pohybuje okolo 360−2500 mg/100 g. Vysoký obsah vitaminu C je zachován také ve šťávě z rakytníku, asi 75 % původního množství. Rakytník je řazen mezi plodiny s nejvyšším obsahem vitaminu C v přírodě, má přibližně dvanáctkrát více vitaminu C než pomeranč a několikanásobně více než kiwi, jahoda, mrkev či rajče [1].

Minerály

Rakytník obsahuje mnoho minerálních látek, jejich podstatné množství bylo nalezeno asi u 26 prvků. Nejvýrazněji zastoupený je draslík a to jak v plodech, tak v džusu, v množství 9,33−14,84 ppm. Draslík sehrává v našem těle roli pro správnou iontovou rovnováhu a pro zajištění citlivosti tkání. Mezi další podstatné prvky patří železo, molybden, vápník, hořčík, měď, zinek, sodík nebo fosfor. Jejich obsahy výrazně závisí na geografických podmínkách a kvalitě půdy [1,7].

2.2.3 Léčivé účinky

Za nejpodstatnější farmaceutické léčivé účinky rakytníku řešetlákového jsou považovány efekty antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé, schopnosti obnovy tkáně a také úlevy bolesti, což činí z rakytníku plodinu jak pro vnější tak vnitřní medicínu [37]. Dále byly pozorovány kardioprotektivní vlivy, protirakovinové efekty, schopnost posilnit imunitní systém a pomoci s žaludečními vředy, jaterními poruchami, onemocněním mozku a popálenimami [1]. Dle tradiční čínské medicíny je tato rostlina užívána také při nachlazení, chřipkách, ischemické chorobě srdeční, gynekologických problémech, lupénce, lupusu, trombózách, anebo při metabolických poruchách [15]. Za tyto vlastnosti jsou zodpovědné hlavně fenolické sloučeniny, karotenoidy, fytosteroly, dále vitamin C, tokoferoly a doplňkově také minerály. Vzhledem k účinkům se přídavek extraktu rakytníku čím dál více objevuje v různých potravinových doplňcích pro výživu lidí i zvířat. Mezi běžné produkty patří šťávy, pivo, víno, džemy, zavařeniny, kompoty nebo čaj. Dále se rozšiřuje jeho využití v kosmetických přípravcích jako pleťové masky, krémy, masti a další [7, 36].

Antioxidační a imunomodulační účinky

Jelikož je v celé rostlině rakytníku obsaženo mnoho látek antioxidační aktivity, ať už sloučeniny fenolického typu, karotenoidy, vitamin C nebo tokoferoly, má jeho extrakt značnou antioxidační aktivitu a tím je schopný aktivace superoxid dismutázy, která se stará o deaktivaci volných radikálů. Zachovává tedy správnou funkci imunitního systému a eliminuje zmutované a mrtvé buňky a podporuje fagocytózu [15].

Extrakt rakytníku byl zkoumán z pohledu oxidativního stresu vyvolaného chromem, kdy u kontrolní skupiny krys byl prokázán protektivní účinek, následný úbytek váhy a podpora růstu orgánů jako játra, ledviny, slezina a srdce. Obdobně byl zkoumán protektivní vliv u buněk s oxidativním stresem vyvolaným indukovanou hypoxií, kdy se při aplikaci extraktu znovu značně zmírnila cytotoxicita a obsah ROS [42].

Imunomodulační aktivita byla zkoumaná na kontrolní skupině krys s indikovanou artritidou, kdy zánět vyvolán Freundovou injekcí byl značně zmírněn při současném požívání rakytníkového extraktu buď ten stejný den, nebo v době pěti dní před injekcí. Tím by mohl být extrakt účinný při léčbě artritidy [43].

Antikarcinogenní účinky

Hlavní aktivní složkou působící proti rakovině jsou obsažené flavonoidy jako quercetin, které stimulují apoptózu u rakovinových buněk. Nejhlubšího efektu bylo pozorováno u karcinomu střeva, prostaty a u leukemie. Stejně tak bylo prokázáno, že rakytník působí protektivně proti hematologickému poškození při podávání chemoterapie, tento účinek byl připsán katechinu, gallokatechinu, epigallokatechinu a také sterolům z rakytníkového oleje. Navíc představuje rakytníkový olej velmi bohatý zdroj různých doplňkových nutrientů pro celkové posilnění organismu, podporu odstranění škodlivin, podporu hojení tkání a ochrany před infekcí při různých operacích. Při současném ozařování rovněž pomáhá s činnost gastrointestinálního traktu, kdy zvyšuje apetit a navíc také pomáhá správné funkci ledvin a jater [15, 37].

Kardiovaskulární choroby

Zvýšené množství cirkulujících lipidů vede k zánětlivému stavu cév a rozšířené tvorbě cytokinů, což má za následek degradaci vaskulárního endotelu cév. Dále je tím zvýšeno riziko ucpání cév a tedy i infarktu. Rakytník značně snižoval hladinu celkového cholesterolu, LDL (nízkodenzitní lipoprotein) cholesterolu triacylglycerolů, viscerální tuk a rovněž hladiny lektinu v plasmě v porovnání s původně obézními krysami po dobu šestí týdnů [44]. V kontrolní skupině se snížila akumulace lipidů, zatímco vylučování stolicí se zvýšilo, peroxidované formy lipidů v játrech a erytrocytech byly značně sníženy.

V oblasti podpory srdeční funkce byl nejefektivnější právě rakytníkový olej ze semen. Obsažené flavonoidy mají vliv na kontrakci srdečního svalu, jeho posilnění a také podporu menších koronárních tepen, čímž pomáhá také s léčbou vysokého krevního tlaku. Zde se pravděpodobně uplatňuje jeho efekt snížení insulinu (za současného zvýšení senzitivity na insulin) a angiotensinu II. Nejdůležitější flavonoidy mající tyto funkce jsou quercetin a isorhamnetin [37].

Hepatoprotektivní efekt

Játra jsou často ovlivněna mnoha látkami, které zároveň znečišťují životní prostředí, anebo léčivy. To může vést k hepatitidě nebo cirhóze. Rakytník má mnoho prokázaných účinků na podporu funkce jater a také proti jaterním onemocněním. Hepatotoxiny jako etanol, tetrachlormetan nebo acetaminofen způsobují různý stupeň poškození jaterních buněk. Tyto buňky chrání nenasycené mastné kyseliny a také karotenoidy a tokoferoly, primárně β-karoten a α-tokoferol, dále mají flavonoidy prokázaný efekt proti zatučňování jater [37].

Geetha a kol. [45] zkoumali právě hepatoprotektivní účinek rakytníkového extraktu na tetrachormethan (CCl_4) u poškozených jater potkanů albína. Při současném podávání rakytníkového extraktu v dávce 100−200 mg/kg hmotnosti bylo docíleno značné ochrany před nárůstem CCl4 indukované glutamát oxalacetát transferázy, glutamát pyruvát transferázy, alkalické fosfatázy, bilirubinu a stejně tak se zachoval obsah proteinů v séru. Tím je rakytníkový extrakt stejně účinný jako jiná nutraceutika na tyto aplikace [45].

Hojení pokožky a kosmetické aplikace

Kosmeceutika jsou novým trendem péče o pokožku, jedná se o jakési hybridy mezi kosmetikou a farmaceutickým přípravkem, který poskytuje obsah deklarovaných účinných látek působících nejen na hojení pokožky nebo popálenin, ale klidně působících i proti stárnutí kůže. Rakytník řešetlákový zde patří mezi velmi nadějnou rostlinu s mnoha aktivními látkami pro zdraví pokožky. Obsahuje více než 100 využitelných sloučenin jako karotenoidy, vitamíny nebo mastné kyseliny. Samotný rakytníkový olej je už jakýmsi hotovým produktem, který lze přímo aplikovat na poškozenou pokožku. Obsahuje v přírodě vzácně obsaženou palmitolejovou kyselinu, která stimuluje regenerační účinky v epidermis a hojí zranění pokožky jako řezné rány, nekrotická tkáň nebo jizvy. Další obsažené karotenoidy a tokoferoly mají vliv na biosyntézu kolagenu a proliferaci fibroplastů [46].

Stejně tak je rakytník používán pro hojení mnoho kožních nemocí jako atopie, lupénka, různé formy ekzémů, dermatitid, kožních vředů (např. bércové vředy), akné, proleženin, pigmentových skvrn, alergických a zánětlivých procesů na kůži. Stejně tak je účinný na

melanózu, chloasma, xerodermii a velmi se osvědčil na popáleniny, kdy u popálené ovce pomohl za 14 dní značně zvýšit epitelizaci ošetřené tkáně v porovnání s neošetřenou oblastí [47]. Velmi dobře působí rakytníkový olej také na popáleniny od Slunce, pomáhá hojit pokožku poškozenou ozařováním anebo chirurgickými laserovými operacemi. Efekt hojení pokožky se dá prohloubit nejen vnější aplikací, ale rovněž vnitřním užíváním, zde figuruje obsažená palmitolejová kyselina [15].

Kontraindikace a bezpečnost

Nežádoucí účinky nebyly při běžném dávkování vůbec pozorovány. V kontrolní slupině potkanů, kterým byl dáván po dobu 14 dnů vodný extrakt z listů rakytníku 1−2g/kg hmotnosti a nebylo prokázáno žádné poškození vnitřních orgánů, stejně tak nebyly narušeny žádné biochemické a hematologické parametry v porovnání s kontrolní skupinou. Maximální adaptogenní dávka byla určena na 100 mg/kg hmotnosti. Ukazatel akutní toxicity LD_{50} byl určen na 10 g/kg [48].

Upadhyay a kol. [49] zkoumali bezpečnost extraktu z rakytníku, tentokrát z superkritický extrakt z oleje ze semen, který byl užíván vnitřně za účelem hojení popálenin u potkanů po dobu 7 dnů. Nebyla pozorována žádná akutní ani subakutní toxicita, všechny fyziologické, biochemické a hematologické parametry (ALT, AST, močovina anebo kreatinin) byly v pořádku a byla sledována nulová úmrtnost. Z hlediska těchto sledování je tedy extrakt z rakytníku považován za bezpečný a bez vedlejších účinků [49].

2.3 Extrakční metody

Po řádné přípravě vzorku a odstranění nežádoucích substancí, je hlavním faktorem pro získání bioaktivních látek z bylin, právě vhodně zvolená extrakční metoda. Ta se určuje specificky právě dle povahy chemických látek, na které se chceme při extrakci zaměřit. Vhodný extrakční postup by měl být jednoduchý, levný, rychlý, účinný a nejlépe i přístupný k automatizaci. Je třeba mít na paměti, že ačkoliv se při extrakci rozhodneme zaměřit na jistý konkrétní typ sloučenin (jako karotenoidy nebo fytosteroly), nebudou jedinou složkou ve výsledném extraktu. Spolu s nimi se budou extrahovat látky příbuzné, jako sacharidy a proteiny. Tyto nechtěné látky nám mohou přidat další kroky do výsledného procesu, pokud je bude nutno odstranit [50−54].

Pokud extrahujeme složky z pevných materiálů, tak samotnou extrakcí rozumíme desorpci látek z matrice a následné rozpuštění těchto látek v rozpouštědle. Účinnost takové extrakce bude tedy ovlivněna rozpustností extrahovaných látek v rozpouštědle, přechodem hmoty a také matricovými efekty. Vysoká teplota, tlak, nízká viskozita rozpouštědla a malá velikost částic podporuje přenos hmoty. Matricové efekty jsou ze všech tří faktorů nejméně pochopené. Přestože je látka vysoce rozpustná v rozpouštědle, může být neextrahovatelná. V jistých případech je totiž silně uzavřena v pórech matrice anebo silně přiléhá k jejímu povrchu. Volba rozpouštědla je závislá na typu analytu a matrice. Ačkoliv interakce rozpouštědla a analytu jsou dohledatelné, matricové efekty jsou často nepředvídatelné. Neexistuje žádné univerzální rozpouštědlo použitelné pro všechny analyty a matrice [51–54].

Mezi další parametry, které ovlivňují účinnost extrakce, patří [51–53]:

- teplota
- doba extrakce
- počet opakování extrakcí
- typ rozpouštědla
- poměr rozpouštědla a vzorku
- pH

Při dlouhé době extrakce a příliš vysoké teplotě může nastat degradace sloučenin, proto se musí vždy zvážit možná rizika [51−52].

2.3.1 Příprava vzorků bylin pro analýzu lipofilních sloučenin

V případě izolace látek z bylin není příprava vzorku složitá. Vybraná část byliny (případně celá bylina) se v první řadě vždy podrobí homogenizaci. Nehomogenizovaná bylina by se neúplně extrahovala, což by podstatně zhoršilo účinnost extrakce [50]. Vzorek se homogenizuje například drcením anebo mletím. Další úprava závisí na chemickému složení extrahovaných látek. Pokud bychom extrahovali hydrofilní sloučeniny jako například fenolické látky, je vše závislé na jejich polaritě, koncentraci, počtu aromatických kruhů a také hydroxylových skupin. Mnohdy je třeba štěpit glykosidické anebo peptidické vazby ve vzorcích. Pro tento případ se používají silné kyseliny anebo zásady, avšak pro použití do potravinářství je mnohdy lepší využít méně agresivní kyseliny citronové anebo specifické enzymy jako peptidasy či glykosidasy [51–54]. U látek lipofilního charakteru, jako jsou karotenoidy anebo fytosteroly, je třeba znovu narušit rigidní a komplexní buněčné stěny, které značně brání vstupu rozpouštědla do buňky. Podobně tvoří karotenoidy komplex s jinými makromolekulami jako například proteiny anebo mastné kyseliny, to poté značně ztěžuje převod hmoty při extrakci. Z těchto důvodů se kromě již zmíněné fyzikální předúpravy vzorku (pečení, osmotický šok, mletí) využívají znovu chemické metody (kyseliny, zásady, surfaktanty) a enzymatické metody [55].

Extrahovat lze v případě lipofilních sloučenin pouze dehydratovanou, tedy usušenou bylinu. Samozřejmě lze vyjít z čerstvé, anebo zmražené byliny, ale je třeba následně redukovat podíl vody, který by narušil extrakci v tukové fázi a navíc by byl vzorek náchylný na mikrobiální kontaminaci. Sušení může být prováděno studeným nebo horkým vzduchem nebo pomocí lyofilizace. Ve studii Abascallové a kol. [56] se ukázalo, že lyofilizace zachovává větší obsah aktivních sloučenin.

Co se týče potřebného množství byliny pro extrakci, poptávka se liší právě dle požadovaného objemu finálního extraktu, hmotnosti byliny a dalších mnoha parametrů, ale často se volí poměr 1:9, tedy například 10 g byliny se maceruje v 90 g lipofilního rozpouštědla. V neposlední řadě záleží na množství extraktu potřebného pro finální stanovení. Pokud například stanovujeme těkavé silice pomocí plynové chromatografie, bude potřeba jen několik µl, pro spektrofotometrické stanovení karotenoidů je potřeba spíše několik ml [50].

2.3.2 Uchování vzorku po extrakci

Pokud není hotový extrakt ihned analyzován, je třeba ho ochránit před znehodnocením konzervací. V opačném případě by extrakt mohl podléhat degradaci vypařením, difuzí, srážením nebo adsorpcí na tuhém povrchu, fotochemickým, oxidačním, degradačním nebo enzymatickým reakcím [50]. Vzorky lipofilních sloučenin se nejčastěji uchovávají zmražením, zchlazením, v přítomnosti konzervantů nebo v temnu [50, 55].

2.3.3 Macerace

Macerace je jednou z nejjednodušších a nejstarších technik extrakce, byliny jsou uloženy v rozpouštědle při pokojové teplotě po dobu 7–30 dní za občasného míchání. Extrakční systém naložené byliny v rozpouštědle (kterým je často rostlinný nebo živočišný tuk) se nazývá macerátem. Jelikož výtěžky této jednouché (statické) macerace byly velmi nízké, byla tato metoda časem modifikována na dynamickou maceraci anebo turboextrakci, kde se využívá konstantního míchání směsi a také zvýšené teploty pro zvýšení extrahovaného množství sloučenin. Přes malé výtěžky extrakce je však metoda ještě mnohdy využívaná v průmyslu díky snadné aplikovatelnosti v průmyslovém měřítku [51–52].

2.3.4 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce (*Soxhlet extraction,* SE) vychází ze specifické aparatury, která díky boční tubě zajišťuje opakovaný styk čistého rozpouštědla s pevným vzorkem. Dlouhou dobu převyšovala výkon extrakčních technik, díky čemuž byla v minulosti často využívána. Nevýhodou této techniky však byla dlouhá doba extrakce (6–48 h) a také velká spotřeba rozpouštědla, které bylo mnohdy neekologické anebo toxické [51, 53].

S postupem času vznikla automatizovaná Soxhletova extrakce, komerčně nazývána Soxtec. Tato metoda byla schválena jako metoda standardní. Jedná se tedy o hlavní referenční extrakční metodu, pomocí které se určuje účinnost jiných typů extrakcí. Stále je však omezena pouze na termostabilní sloučeniny. Díky automatizaci se snižuje jak doba extrakce, tak spotřeba rozpouštědla [50–51, 53].

2.3.5 Ultrazvuková extrakce

Ultrazvuková extrakce (*Ultrasound extraction*, USE) využívá mechanické energie o frekvencích vyšších než 20 kHz, v jistých případech je využitelná frekvence až 2400 kHz pro jisté komplikované rostlinné matrice. Tato vysokofrekvenční energie může nejen pomoci přenosu hmoty, ale také je schopná narušit buněčné membrány pro snazší uvolnění látky do rozpouštědla. Tato metoda se svojí účinností sice nemůže vyrovnat metodám SFE a SWE, ale s přehledem předbíhá metody konvenční (macerace). Největší výhodou této vysokofrekvenční metody je nízká degradace látek, nízká cena a jednoduchost zařízení. V současné době se o metodě hodně hovoří právě z hlediska potenciální aplikace do potravinářského průmyslu pro extrakci bylin a bylinných olejů, kdy je možné zhotovit velké reaktory s jistým podílem automatizace a mnoho organických rozpouštědel je možno nahradit právě „zelenými“ rozpouštědly [51–52, 57].

2.3.6 Superkritická fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce (*Supercritical fluid extraction*, SFE) je typem extrakce využívající oxid uhličitý v nadkritickém stavu, který se fyzikálními vlastnostmi podobá plynu, ale z pohledu rozpouštěcích vlastností se již blíží kapalině. Oxid uhličitý je levný, netoxický a nehořlavý. Kritického stavu dosahuje již při teplotě 31,1 °C a tlaku 7,38 MPa. Díky tomu lze ochránit termolabilní látky před degradací. Nevýhodou však zůstává drahé vstupní zařízení a také obtížnost aplikace do průmyslu [51–53, 58–59].

2.3.7 Subkritická vodní extrakce

Subkritická vodní extrakce (*Subcritical Water Extraction*, SWE) využívá vodu při vysokých teplotách (40–200°C) a také vysokých tlacích (3,3–20,3 MPa) takovým způsobem, aby zůstal kapalný stav vody. Výhodou této metody je klesající polarita vody s narůstající teplotou, což umožňuje extrakci i nepolárních látek. Přestože není nutno použít organická rozpouštědla, tak v širším měřítku nepřipadá v úvahu použití této techniky do potravinářského průmyslu. Zařízení pro velké obsahy vzorku by mělo velké nároky na těsnění a bezpečnost. Technika se však hojně využívá ve výzkumu, protože jde o metodu rychlou využívající netoxické rozpouštědlo [51–53, 59].

2.3.8 Extrakce iontovými kapalinami

Extrakce iontovými kapalinami za pokojové teploty je jakýmsi propojením fyziky s extrakčními mechanismy, které vnáší do pole separace nové obzory. Jedná se o roztoky solí s nízkou teplotou tání a různou polaritou od polárních až po nepolární rozpouštědla, díky čemuž dokáží nahradit i organická rozpouštědla. A navíc jsou tepelně mnohem více stabilní a mají vysokou viskozitu. Mohou tvořit systémy se dvěma fázemi, jak pro extrakci kapalina-kapalina, tak pro extrakci kapalina-plyn. Klíčové je vnímat iontové kapaliny jako systém velmi komplexní, který nabízí mnoho různých možností a variant pro konkrétní extrakci [60].

2.4 Méně známé druhy olejů jakožto extrakční činidla

Jelikož jsou nyní rozpouštědla na ropné bázi (např. vazelína) striktně regulované po celém světě, pozornost se obrací směrem ekologičtějších a obnovitelných rozpouštědel pro extrakci, purifikaci a formulaci produktů přírodního charakteru. Zcela ideálními rozpouštědly jsou netěkavé organické sloučeniny (VOCs) s vysokou rozpouštěcí silou a bodem vzplanutí, které mají zároveň nízkou toxicitu a minimální dopad na životní prostředí. Získávány by měly být za nízkých nákladů a kromě již zmíněné obnovitelnosti by se měly dát snadno recyklovat. Každopádně jejich alternativou by mohly být rostlinné oleje, které splňují všechny ekologické požadavky. Jsou nedráždivé, netoxické a netěkavé. Dále nabízí mnoho variant matric s různou polaritou, poměrem mastných kyselin a obsahem doplňkových bioaktivních látek. Všechny tyto proměnné mají vliv na extrakční účinnost a rozpouštěcí sílu. Tyto rozpouštědla jsou tedy nazývaná jako „zelená“ (*green solvents*) anebo „bezpečná“ (*safe solvents*) a do dalších let budou stále více růst na významu právě díky jejich obnovitelnosti [4−6, 26].

Známá extrakční činidla na bázi rostlinných olejů jsou například olivový, slunečnicový, anebo řepkový olej. Tato diplomová práce se zaměřuje na některé méně známé druhy

rostlinných olejů, které by mohly být rovnocennou, anebo dokonce zajímavější alternativou z pohledu extrakčních schopností.

Vliv druhu rostlinného oleje na účinnost macerace

Macerace bylin do olejových základů je historicky známou a využívanou metodou pro valorizaci bylinných matric, anebo vedlejších produktů jejich zpracování. Přesto dodnes bylo věnováno pouze velmi málo pozornosti do výzkumu toho, co konkrétně má vliv na rozdílné extrakční účinnosti olejů [61].

Nejvíce pozornosti bylo věnováno extrakci karotenoidů z bylinných matric. Goula a kol. [3] sledovali přechod karotenoidů do slunečnicového a sojového oleje použitím UAE. Bylo zjištěno, že do sojového oleje přešlo o 10% více karotenoidů. Tato účinnost byla přisouzena vyšší viskozitě sojového oleje. Kazuyoshi a kol. [61] sledovali přechod karotenoidů macerací za tepla do MCT oleje, rybího oleje s obsahem omega 3 MK a olivového oleje, znovu byly pozorovány rozdíly mezi extrakčními činidly. Nejvyšší účinnost měl MCT olej a ta byla znovu přisouzena vyšší viskozitě a obecně vyššímu obsahu MK s nižší molekulovou hmotností (převážně C4, C6 a C8). Corbu a kol. [26] pozorovali rozdílný přechod karotenoidů do olivového a slunečnicového oleje (extra virgin i rafinované varianty) použitím UAE a macerace. UAE byla vyhodnocena jako účinnější metoda a všechna použitá rozpouštědla měla obdobnou extrakční výtěžnost.

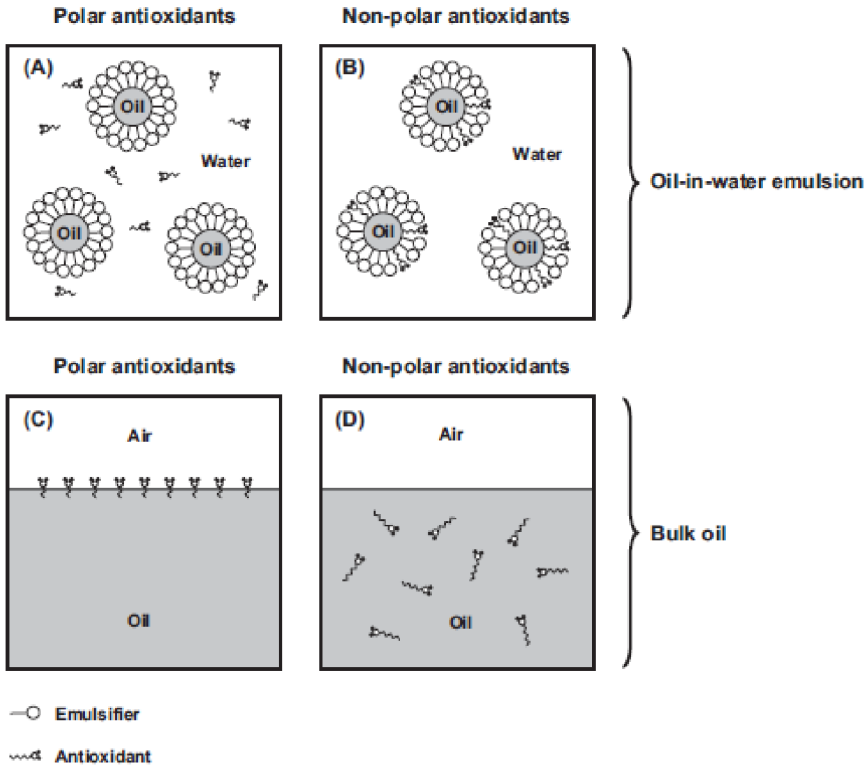
Pro extrakci fytosterolů se se sice tradičně používala macerace, anebo Soxhlet extrakce, ale tyto metody jsou dnes nahrazovány novými ekologickými alternativami. Mezi ty patří UAE, anebo nejvíce rozšířená SFE. Dle Uddina a kol. [62] se jedná o zásadní metodu, která je zároveň účinná a dokáže nahradit extrakci organickými rozpouštědly, které nesedí do konceptu „zelených“ rozpouštědel. Zisk fytosterolů z bylinných matric je přitom závislý na formě fytosterolů (volné, estery, glykosidy), kdy musí být optimalizována volba rozpouštědla, extrakční teplota, příprava rostlinného materiálu a mnoho dalších faktorů. Po extrakci je většinou nutno vzorek saponifikovat pro zisk čisté frakce fytosterolů, které půjdou dobře kvantifikovat [62−63].

Stabilita rostlinných olejů

Rostlinné oleje jsou velmi náchylné k oxidační degradaci, právě v důsledku vysokého stupně nenasycenosti většiny z nich. Čím vyšší poměr kyseliny linolenové, anebo i kyseliny linolové a olejové rostlinný olej obsahuje, tím větší je riziko, že se při nevhodném a dlouhodobém skladování stane v důsledku vysokého peroxidkového čísla nepoživatelným. Tento poznatek by mohl značně komplikovat následné využití získaných extraktů pro potravinářský průmysl [2]. Oproti tomu je známo, že olej tvoří pro obsažené sloučeniny jakousi ochrannou bariéru před působením kyslíku a tím zpomaluje degradaci obsažených složek [3].

Jedna z nejefektivnějších metod stabilizace rostlinných olejů je přídavek antioxidantů. Ty jsou ale dle legislativních nařízení přísně regulovány kvůli vlivu na lidské zdraví. Například BHT (butylovaný hydroxytoluen) je ve vyšších koncentracích karcinogenní. Proto se pozornost obrací na bezpečné karotenoidy, fytosteroly a další antioxidanty běžně přítomné v rostlinných matricích. V tomto směru bylo pozorováno, že pro rostlinné oleje jsou silně protektivní polární antioxidanty a značně prodlužují jejich životnost. Frankel a kol. [64] předpokládal, že je to

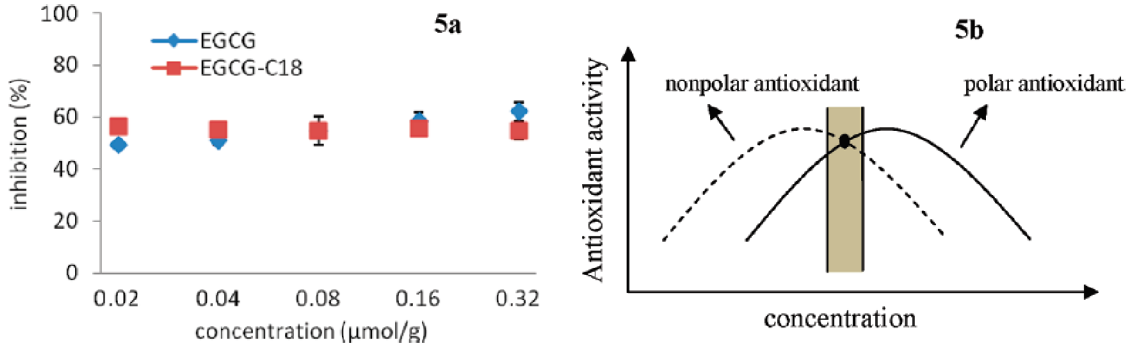
způsobeno mezifázovými jevy, kdy se koncentrují antioxidanty opačné polarity než použité médium na mezifázovém rozhraní, které je považováno za klíčové místo oxidace (*Obr. 19*). Antioxidanty stejné polarity jaké médium se naopak rozprostřou do média, kde nejsou tolik efektivní [64−66]



Obr. 19: *Mezifázový efekt polárního paradoxu v emulzi typu olej ve vodě [65]*

Tento jev byl zaznamenán jako teorie polárního paradoxu (*polar paradox theory*). Ta popisuje paradoxní chování antioxidantů v různých médií a racionalizuje fakt, že polární antioxidanty jsou účinnější v méně polárních rozpouštědlech (právě jako rostlinné oleje) a naopak méně polární antioxidanty jsou účinnější ve více polárních médiích jako emulze typu olej ve vodě (o/v). Tento mechanismus je obzvláště pozorován u velkoobjemových extrakcí [66]. Nové zkoumání však objevilo, že ne všechny antioxidanty se chovají podle tohoto trendu. Tedy hlavní místo oxidace není na rozhraní fází olej-vzduch, jak bylo dříve předpokládáno. Naopak je zásadní místo asociace koloidů vytvořených stopovým množstvím vody v matrici a povrchově aktivních molekul jako například fosfolipidy. Při jistém stupni délky hydrofobního postranního řetězce se totiž systém začne chovat nelineárně (*cut-off* efekt), proto je do budoucna nutno teorii polárního paradoxu více přezkoumat a nalézt nové teorie, které by ho doplnily. Vše je tedy závislé i na koncentračním rozsahu, při kterém lze tuto teorii použít. Například byla srovnávána antioxidační aktivita epigallokatechinu galátu (EGCG) a jeho lipofilního esterového analogu (tetrasterát). Bylo zjištěno, že EGCG byl účinnější při vyšších koncentracích v médiu a tetrasterát naopak při nižší koncentraci v médiu. Chování antioxidantů v rostlinných olejích je naznačeno na *Obr. 20*, s rostoucí koncentrací nepolárního antioxidantu (přerušovaná křivka) postupně roste jeho antioxidační aktivita až do jakési kritické hodnoty, za kterou jeho účinnost dále klesá. Obdobná situace je v případě polárního antioxidantu, který je

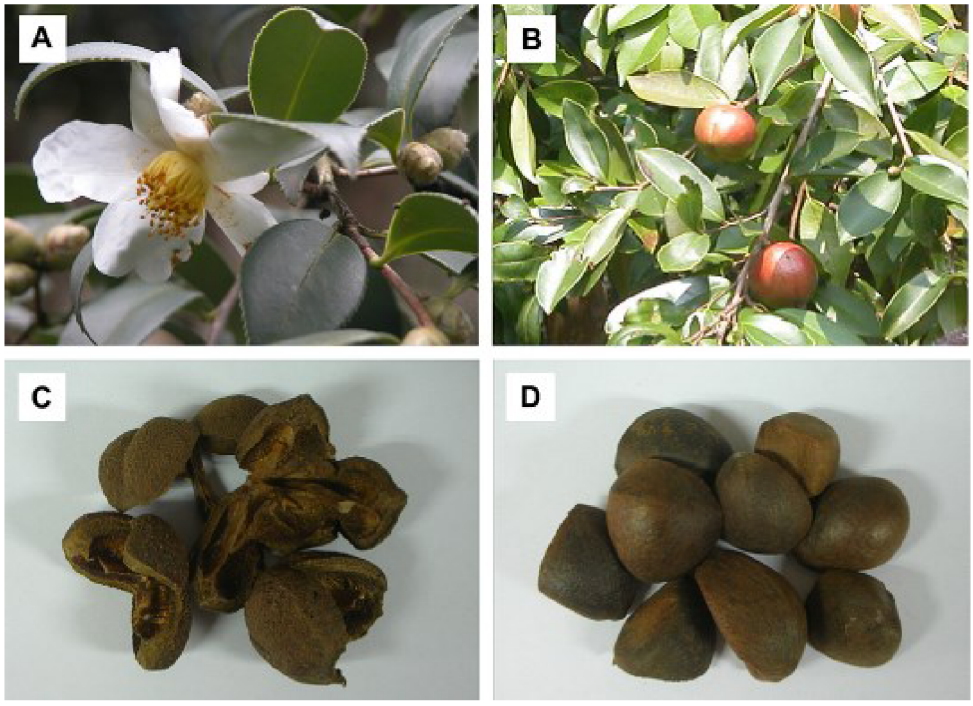
účinnější až při vyšších koncentracích (plná křivka). Nejúčinnějším antioxidačním systémem by tedy mohlo být nalezení průsečíku těchto dvou křivek [65].



Obr. 20: *Teorie polárního paradoxu [65]*

2.4.1 Čajovníkový olej

Ačkoliv je druhů čajovníku spoustu a nejznámějším je právě *Camellia sinensis* neboli čajovník čínský, jehož listy jsou po tisíciletí používány pro přípravu čaje, olej se získává převážně ze semen druhu *Camellia oleifera* anebo v Japonsku také z druhu *Camellia sasanqua*. *C. oleifera* (*Obr. 21*) se vyskytuje ve východní a jihovýchodní Asii, kvete od října do dubna a semena jsou sbírány nejčastěji v září. Roste do výšky až 4,5−6 m a semena jsou trojúhelníkového tvaru rozměru 15−20 mm v průměru. Semeno obsahuje až 60 % oleje, který je tradičně získáván lisováním, anebo extrakcí rozpouštědly. Surový olej není používán ihned, ale je třeba rafinačního procesu [67−68].



Obr. 21: *C. oleifera květy (A), plody (B), oplodí (C) a semena (D) [68]*

Čajovníkový olej obsahuje velké množství kyseliny olejové, asi okolo 80 % (*Tabulka 5*), čímž se značně podobá olivovému oleji. Dále obsahuje menší podíl kyseliny palmitové, stearové, linolové, arachidinové a behenové. Navíc obsahuje velké množství antioxidantů a jiných sloučenin s rozsáhlou biologickou aktivitou. V Asii je běžně používán na vaření kvůli jeho vysokému kouřovému bodu a také je používán v tradiční čínské medicíně pro přípravu kosmetiky [67−68].

Mezi další významné obsahové látky patří tokoferoly, vitaminy skupiny B, fosfor, hořčík, vápník, železo, zinek, selen a navíc mnoho fenolických sloučenin, lignany a saponiny. Výrazněji je zastoupen sesamin, u kterého byla pozorována výrazná antioxidační aktivita a schopnost redukovat LDL cholesterol. V semenech je dále obsaženo mnoho sansaquasaponinu, u kterého byly pozorovány kardioprotektivní účinky, působí proti arytmiím a potlačuje zánětlivou reakci u popálenin v kontrolní skupině krys [67−68]. Oleji jsou připisovány účinky pro snižování krevního tlaku, prevenci vzniku rakoviny, prevenci vzniku chronických ekzémů, uklidnění velmi citlivé pokožky s tendencí k alergiím, příznivé ovlivnění krevní srážlivosti a rovněž inhibiční efekt proti EB viru [68].

***Tabulka 5**: Profil mastných kyselin oleje ze semen čajovníku [68]*

Mastné kyseliny	***Orientační obsah* (Wt%)**
Palmitová 16:0	≤ 7,0
Stearová 18:0	≤ 10,0
Olejová 18:1	73,0−89,0
Linolová 18:2	≤15,0
Arachidinová 20:0	≤2,0
Behenová 22:0	≤3,0

2.4.2 Marakujový olej

Maracuja neboli mučenka jedlá (*Passiflora edulis*) patří do rodu *Passiflora*, který má okolo 600 druhů a je výrazně rozšířen po celé Severní i Jižní Americe, dále je rozšířen v Austrálii, Novém Zélandu, Africe a také v některých oblastech východní Asie. Jedná se o kvetoucí keř, který může dorůst až do výšky deseti metrů a kvete od června do července, kdy plody jsou sbírány od září do listopadu. Jedlý plod (*Obr. 22*) je oválného tvaru asi 6 cm dlouhý, žlutooranžové barvy a je známý pod názvem „*passion fruit*“. Obsahuje mnoho hnědožlutých semen okolo 5−8 mm velkých, ze kterých se lisuje marakujový olej, případně lze použít extrakce rozpouštědly, například hexanem. Novým způsobem pro větší měřítka extrakce je mikrovlnná extrakce, která je několikanásobně rychlejší a šetrnější. Následně je většinou olej rafinován před tím, než je použit [69−70].

***Obr. 22**: Plod a semena maracuji [69]*

Marakujový olej obsahuje velké množství kyseliny linolové (*Tabulka 6*), dále obsahuje kyselinu palmitovou, stearovou, olejovou a malé množství kyseliny myristové a linolenové. Takovým profilem mastných kyselin se nejvíce podobá slunečnicovému oleji. Zájem o marakuju mezi vědci stále roste právě díky jejím skvělým nutričním charakteristikám a exotické chuti, plody jsou levné, velmi bohaté na vitaminy a minerály a také dobře dostupné. Díky tomu jsou populární hlavně v Evropě a USA [69−70].

Olej ze semen maracuje je fytochemicky velmi dobře prozkoumán, kromě vysokého obsahu vitaminu C (30 mg/100 g) a vysokého obsahu tokoferolů (465 ppm) má navíc značný obsah karotenoidů (19,7 mg/100 g) a fytosterolů (209 mg/100 g), kdy z fytosterolů je nejvíce obsažen stigmasterol, β-sitosterol a campesterol. Navíc má olej značnou antioxidační aktivitu, na které se podílí z velké části obsažené fenolické sloučeniny, nejdominantnějšími z nich jsou chlorogenová kyselina, rozmarýnový kyselina a quercetin. Oleji se přidružují příznivé efekty na kardiovaskulární systém a léčbu srdečních komplikací nervové patogeneze, dále olej snižuje krevní tlak a má protizánětlivý a anti karcinogenní efekt. Olej má navíc antibakteriální účinky proti rodům *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus*. Navíc působí proti bolestem a zklidňuje podrážděnou pokožku, tím pádem je přidáván i do kosmetických přípravků [69−71].

***Tabulka 6**: Profil mastných kyselin oleje ze semen marakuje [69]*

Mastné kyseliny	***Orientační obsah* (Wt%)**
Myristová 14:0	≤ 1,0
Palmitová 16:0	4,0−12,0
Stearová 18:0	1−6
Olejová 18:1	5−25
Linolová 18:2	65−75
Linolenová 18:3	≤ 1,0

2.4.3 Kukui olej

Kukui ořech nebo anglicky také „*candlenut*“, tedy svíčkový ořech, je semenem rostliny *Aleurites moluccanus*, která je typická pro Indický a Malajsijský region. Jedná se o 20 m vysoký

strom, který se v současné době vyskytuje v oblastech jihovýchodní Asie (nejvíce v Číně a Indii), dále v Polynésii a na Novém Zélandě. Jeho plody jsou tmavě zelené, mají okolo 6 mm širokou slupku a uvnitř se nacházejí až dvě velmi tvrdé semena vzhledem připomínající kameny (*Obr. 23*). Tyto semena jsou asi tak velká jako vlašské ořechy, jsou nepostradatelným kořením v indonéské a malajské kuchyni, většinou obsahují více než 50 % tuku. Olej se často extrahuje rozpouštědly, anebo je lisován studenou nebo horkou cestou. Horká cesta představuje vyšší výtěžnost, ale získaný olej je poté málo stabilní v důsledku degradace antioxidantů. Po extrakci je olej čištěn a jsou přidávány další přírodní antioxidanty pro jeho stabilizaci, například vitamin C, E, anebo A. Bez této stabilizace by byl olej velmi náchylný na degradaci právě kvůli vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin. Filtrační koláč se využívá jako hnojivo [72−73].

Obr. 23: *Semena kukui [73]*

Olej ze semen kukui má vysoký obsah jak kyseliny linolové, tak kyseliny linolenové (*Tabulka 7*), čímž je velmi náchylný na oxidační degradaci. Kromě toho má vysoký obsah kyseliny olejové a dále menší obsahy kyseliny palmitové a stearové. Oleje lisované z různých regionů se od sebe mohou značně lišit. V oleji z Malajsie, který zkoumal Norulaini a kol. [74] bylo nalezeno minimální množství kyseliny linolenové a tím vyšší množství kyseliny stearové a olejové. Vyextrahovaný olej má velmi silný zápach a proto musí být před dalším použitím dezodorizován, jeho využití je v současné době spíše pro kosmetické a industriální aplikace, jako třeba tvorba mýdla, anebo barvy [72−73].

Z pohledu fytochemického profilu nebyl tento olej tak hluboce zkoumán a tedy ani charakterizován. Avšak jako potrava a léčivo je používán již od starověku. Siddique a kol. [75] zkoumal antioxidační aktivitu extraktu z oleje, za kterou jsou zodpovědné obsažené fenolické sloučeniny a dále tokoferoly, olej obsahuje navíc mnoho nutričně cenných látek. Současné aplikace jsou pro zvlhčení kůže, na suchou a podrážděnou pokožku a bezpečný je stejně tak na dětskou pokožku. Jeho výhodou je to, že nezanechává mastný film a snadno se vstřebává. Uvádí se, že by mohl mít podobné použití jako ricinový olej, tedy do kosmetických přípravků určených na vlasy a dále proti striím. Navíc je olej účinný při léčbě atopie, lupénky a také jako podpora pacientů s chemoterapií a při ozařování [75].

***Tabulka 7**: Profil mastných kyselin oleje ze semen kukui [72]*

Mastné kyseliny	***Orientační obsah* (Wt%)**
Palmitová 16:0	5,0−9,0
Stearová 18:0	2,0−7,0
Olejová 18:1	11,0−35,0
Linolová 18:2	34,0−49,0
Linolenová 18:3	21,0−35,0

2.4.4 Kiwi olej

Kiwi (*Obr. 24)* je plodem *Actinidia chinensis*, což je listnatá rostlina s rozpínavými výhonky, které jsou dlouhé několik metrů a formují bílé nebo růžové květy, jedna rostlina dokáže nést několik stovek oválných plodů, které mají v dozrálém stavu asi velikost vejce. V průměru mají okolo 5 cm a hmotnost může být 60–100 g. V závislosti na stupni zralosti chutná dužina plodu buď kysele, nebo sladce. Roste primárně na území Číny, ale také je hojně rozšířena na Novém Zélandu, ve Francii, USA, Itálii, Španělsku a Japonsku. Největším producentem kiwi je Čína, která zahrnuje 54 % celosvětové produkce a většina plodů je konzumována čerstvá. Avšak velký podíl ovoce jde na výrobu džusů, džemů, sirupů a dalších potravinářských produktů. Za těchto okolností je nutno odstranit semena plodu, která jsou jako vedlejší produkt mnohdy přímo vyřazena jako odpad. Semena tvoří 33–46 g/kg jedlé části plodu a obsahují okolo 28,3 % oleje, ten může být vzhledem k jeho vlastnostem dále využit. Olej je ze semen nejčastěji extrahován pomocí oxidu uhličitého [76−77].

***Obr. 24**: Plod kiwi [77]*

Olej ze semen kiwi má vysoký obsah kyseliny α-linolenové (*Tabulka 8*) a dále má značné obsahy kyseliny linolové a olejové, doplňkově obsahuje kyselinu palmitovou a stearovou. Takto vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin znamená jeho náchylnost na oxidaci. Svým profilem mastných kyselin se může částečně podobat lněnému oleji, který je obdobně oxidačně velmi málo stabilní, Vzhledem k obsahu mastných kyselin, antioxidační aktivitě a nutričních vlastnostech oleje ke semen kiwi je možná jeho role jako doplňku stravy [76−77].

Kiwi olej má dobrou antioxidační aktivitu (FRAP 3,3−132,3 mg TE/kg), značný obsah tokoferolů (0,81 mg/g) a dále celkových fytosterolů (269 mg/100 g), ze kterých je nejvíce obsažen β-sitosterol (251 mg/100 g) a doplňkově také campesterol, stigmasterol, δ-5 avenasterol, δ-7 avenasterol a δ-7 stigmasterol. Deng a kol. [76] dokázal, že olej z kiwi může chránit myši před oxidačním poškozením DNA indukovaným peroxidem vodíku. V kontrolní skupině, které byly podávány různé koncentrace kiwi oleje nebylo nalezeno téměř žádné DNA poškození v porovnání s neléčenou skupinou. Dále je olej z kiwi využíván pro jeho protizánětlivý efekt a pro efekt stimulaci tvorby melaninu. Obsahuje navíc vysoké množství vitaminu C a fenolických sloučenin, převážně flavonoidů [76−77].

***Tabulka 8**: Profil mastných kyselin oleje ze semen kiwi [76]*

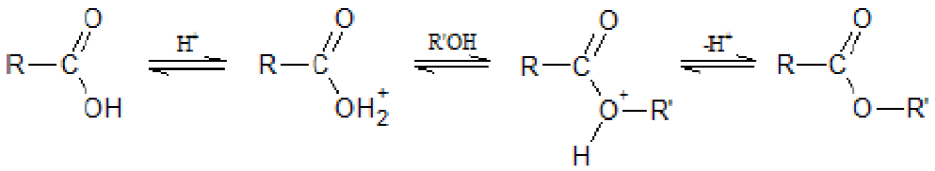
Mastné kyseliny	***Orientační obsah* (Wt%)**
Palmitová 16:0	2,0−7,0
Stearová 18:0	2,0−7,0
Olejová 18:1	10,0−24,0
Linolová 18:2	12,0−22,0
α-Linolenová 18:3	40,0−70,0
γ-Linolenová 18:3	≤ 2,0

2.5 Metody vhodné pro charakterizaci rostlinných olejů

V následujících kapitolách jsou uvedeny některé metody vhodné pro charakterizaci rostlinných olejů jakožto extrakčních činidel. Důraz je kladen na metody použité v této diplomové práci.

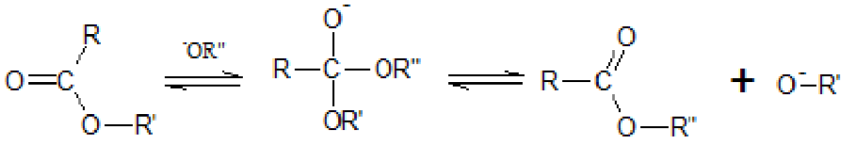
2.5.1 Stanovení profilu volných a celkových mastných kyselin pomocí GC/FID

Stanovení profilu volných a celkových mastných kyselin ve vzorku tuku je tradičním postupem popsaným normami ČSN EN ISO 12966 [78−80] za použití plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem, kdy je nejprve nutno vzorek esterifikovat na velmi těkavé methylestery. Esterifikace může probíhat jak kysele, tak bazicky. V případě kyselé esterifikace (*Obr. 25*) proces probíhá za zvýšené teploty a přebytku bezvodého metanolu za současné přítomnosti kyselých katalyzátorů jako například HCl, H_2SO_4 nebo BF_3, ty musí být opět bezvodé, aby nevznikala původní kyselina [81].



***Obr. 25:** Schéma kyselé esterifikace*

Avšak při kyselé esterifikaci nereagují pouze přítomné volné mastné kyseliny, ale i vázané mastné kyseliny, mechanismem kysele katalyzované transesterifikace. Tato reakce trvá o mnoho déle, tím pádem se proces v případě potřeby po několika minutách přeruší. Druhou možností je esterifikovat bazicky. Za těchto okolností reagují pouze vázané mastné kyseliny, jelikož z těch volných vznikají v bazickém prostředí anionty. Bazická transesterifikace (*Obr.* **26**) probíhá v nadbytku bezvodého metanolu za přítomnosti silné báze jako NaOH nebo KOH, případně amonných solí. Znovu jsou použity bezvodé metanolické roztoky těchto solí [81].



Obr. 26: *Schéma bazicky katalyzované transesterifikace*

Připravené methylestery musí být následně zbaveny přebytečné vody například pomocí bezvodého síranu sodného. Po přečištění jsou následně analyzovány na plynovém chromatografu s FID detekcí [81].

2.5.2 Stanovení tukových čísel rostlinných olejů

Tuková čísla slouží k charakterizaci vlastností oleje a jeho jakosti. Ačkoliv se jedná o poměrně zastaralý způsob charakterizace, má význam dodnes vzhledem k jeho jednoduchosti a robustnosti. Obdobně jde charakterizovat olej také modernějšími metodami jako HPLC nebo GC. Mezi hlavní tuková čísla patří číslo kyselosti, zmýdelnění, esterové, jodové a peroxidové číslo [82−84].

Číslo kyselosti

Číslo kyselosti udává obsah volných mastných kyselin v tuku a vyjadřuje se jako hmotnost KOH v mg potřebné k neutralizaci kyselin v 1 g tuku. Vzorek tuku nebo oleje se rozpustí v etanolu a za horka se titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného na fenolftalein. Jinak by se také dalo říct, že číslo kyselosti je mírou hydrolýzy tuku, ta probíhá zásadněji i při dlouhodobějším skladování tuku. Proto by se u vyšších hodnot čísla kyselosti mohlo předpokládat, že vzorek tuku již nebude tak čerstvý. Pokud je zároveň přítomno vyšší množství kyslíku, bude doprovázena silnou oxidací, jelikož oxidace volných mastných kyselin je rychlejší než oxidace vázaných mastných kyselin [82−83].

Číslo zmýdelnění

Číslo zmýdelnění udává obsah volných i estericky vázaných mastných kyselin v tuku a vyjadřuje se jako hmotnost KOH v mg potřebné k neutralizaci kyselin a hydrolýze (zmýdelnění) jejich esterů v 1 g tuku. Vzorek se zmýdelňuje pod zpětným chladičem s nadbytkem alkoholického roztoku hydroxidu draselného a přebytečný nezreagovaný hydroxid je stanoven zpětnou titrací kyselinou chlorovodíkovou na fenolftalein [82, 84].

Esterové číslo

Esterové číslo udává obsah pouze estericky vázaných mastných kyselin v tuku a udává se jako hmotnost KOH v mg potřebná k neutralizaci estericky vázaných v 1 g tuku. Toto číslo se vypočítá z rozdílu čísla zmýdelnění a čísla kyselosti. Z esterového čísla jde následně spočíst přibližný procentuální obsah glycerolu (1) v tuku [82, 84].

$$\%glycerolu = 0,0547 \cdot \check{C}_e \tag{1}$$

Jodové číslo

Jodové číslo udává hmotnost jodu v gramech, která se může addovat na 100 g tuku. Je měřítkem nenasycenosti tuku, tedy celkového obsahu dvojných vazeb. Dále slouží také k posouzení čistoty tuku a k identifikaci neznámých tuků. Ve stanovení by šly použít i jiné halogeny. Jod reaguje velmi pomalu, ale je používán, protože chlor a brom reagují zase velmi rychle a prudce, vedle adice dochází i k substituci. Proto byl pro tuto reakci zvolen bromid jodný (jodmonobromid), který je přidán v nadbytku a poté je jeho nezreagovaný přebytek převeden na jod přidáním jodidu draselného (2). Jod se následně stanoví titračně thiosíranem sodným (3) na škrobový maz [82, 84].

$$IBr + 2KI \rightarrow KI + KBr + I_2 \tag{2}$$

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6 \tag{3}$$

Peroxidové číslo

Peroxidové číslo udává množství peroxidů v tuku, které jsou schopny oxidovat jodid na jod (4). Je tedy ukazatelem obsahu primárních produktů oxidace. Vyloučený jod se stanoví titračně roztokem thiosíranu sodného obdobně jako u stanovení jodového čísla (5). Peroxidové číslo je následně vyjádřeno v mikrogramech kyslíku v 1 gramu tuku. Metoda je vhodným měřítkem stupně oxidace tuků. Reakci ruší přítomnost látek, které mohou rovněž oxidovat jodid na jod (např. kyslík), anebo redukujících látek jako například antioxidantů. U čerstvých tuků nebo olejů by měla být jeho hodnota velmi nízká [82−83].

Tabelované hodnoty peroxidového čísla jsou: pro čerstvé tuky 0−16, čerstvé rostlinné oleje 8−40, tuky po smažení 40−200, silně oxidované tuky 160−1600 a pro foukané oleje 800−4000 [82].

$$R-O-OH + 2KI + 2CH_3COOH \rightarrow R-OH + I_2 + 2CH_3COOK + H_2O \tag{4}$$

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6 \tag{5}$$

2.6 Metody vhodné pro charakterizaci macerátů

V následujících kapitolách jsou uvedeny některé metody vhodné pro charakterizaci macerátů rakytníku řešetlákového. Důraz je kladen na metody použité v této diplomové práci.

2.6.1 Stanovení celkového obsahu karotenoidů

Celkový obsah karotenoidů (TCC) ve vzorcích rostlinných olejů je tradičně stanovován spektrofotometricky na základě metody *PORIM* [85] a na základě procedury, kterou následně popsal *Rodriguez-Amaya* [25]. Principem je prosté rozpuštění rostlinného oleje (1−2 g) v 10 ml hexanu a následné přečištění vzorku 0,5 % roztokem NaCl, následně lze lehce kvantifikovat pomocí UV-VIS spektroskopie v oblasti 450 nm oproti hexanu v 1 cm skleněné kyvetě. Kalibrační křivka je zhotovena z β-karotenu v koncentračním rozmezí 0,1−3,5 µg/ml. Výsledek je vyjádřen v ekvivalentu mg β-karotenu na 100 g oleje.

Corbu a kol. [26] extrahovali vedlejší produkty zpracování rakytníku řešetlákového do slunečnicového a olivového oleje (rafinované a nerafinované varianty) pomocí jednoduché macerace (20 °C, 10 dní) a ultrazvukové extrakce (35 kHz, 50 min). Celkové karotenoidy byly stanoveny spektrofotometricky dle *Rodriguez-Amaya* (*Tabulka 9*). Ultrazvuková extrakce se zdála být účinnější metodou pro extrakci karotenoidů, stejně tak rostl obsah karotenoidů s rostoucím množstvím rakytníku přidaného do extrakčního média [26].

***Tabulka 9**: Orientační obsah některých mastných kyselin v semenech a dužině rakytníku [26]*

	Celkové karotenoidy (mg/kg)	
	USE	***macerace***
EVO	21,50 ± 0,89	21,50 ± 0,89
EVO + 2,5 % DSB	76,91 ± 1,82	56,57 ± 2,77
EVO + 5,0 % DSB	98,84 ± 3,09	73,69 ± 2,78
EVO + 10,0 % DSB	157,84 ± 6,67	122,28 ± 4,33
EVS	6,30 ± 0,28	6,30 ± 0,28
EVS + 2,5 % DSB	40,77 ± 1,94	45,49 ± 1,42
EVS + 5,0 % DSB	74,79 ± 3,38	56,11 ± 2,06
EVS + 10,0 % DSB	143,93 ± 5,56	121,28 ± 5,51
RS	4,80 ± 0,21	4,80 ± 0,21
RS + 2,5 % DSB	43,41 ± 1,65	38,17 ± 1,56
RS + 5,0 % DSB	82,65 ± 3,35	64,75 ± 2,93
RS + 10,0 % DSB	137,83 ± 6,65	120,34 ± 5,13

USE: ultrazvuková extrakce, EVO: olivový olej extra virgin, EVS: slunečnicový olej extra virgin, RS: slunečnicový olej rafinovaný, DSB: sušený extrakt rakytníku

2.6.2 Stanovení celkového obsahu fytosterolů

Celkový obsah fytosterolů (TPC) ve vzorcích rostlinných olejů se tradičně stanovuje spektrofotometricky dle reakce popsané již v roce 1885 C. Liebermannem [86], která byla následně aplikována pro stanovení cholesterolu Burchardovou kolorimetrickou procedurou [87], nyní se jedná o nejčastější předanalýzu sterolů. Standardně byla využívaná pro klinické stanovení cholesterolů, ale časem se Liebermann-Burchardova reakce začala s velmi uspokojivými výsledky používat také pro kvalitativní a kvantitativní analýzu sterolů rostlinného typu (fytosteroly) a živočišného typu [88]. Stanovení je založena na reakci vzorku rozpuštěného v chloroformu s Liebermann-Burchardovým (LB) reagentem. Ten je směsí anhydridu kyseliny octové a koncentrované kyseliny sírové v poměru 10:1 a připravuje se tím způsobem, že se anhydrid převede do ledové lázně a po kapkách se přidává koncentrovaná kyselina sírová. Do alikvotního podílu vzorku se většinou přidávají 2 ml LB reagentu. Přibližně po 5 minutách je vzniklý modrý, anebo modrozelený barevný komplex kvantifikován pomocí UV-VIS spektroskopie při vlnové délce 625 nm. Kalibrační křivka je většinou sestrojena z kalibračních bodů β-sitosterolu v koncentračním rozmezí 0,02−0,10 mg/ml a TPC jsou následně vyjádřeny v mg/ml [88].

Z dostupných zdrojů Li a kol. [39] stanovovali obsah celkových a jednotlivých fytosterolů v semenech rakytníku (*Tabulka 4*), kdy nejvíce obsažen byl právě β-sitosterol, následován Δ^5-avenasterolem a sitostanolem. Dále Piombo a kol. [71] stanovovali zastoupení jednotlivých fytosterolů v rostlinných olejích ze semen marakuje a kiwi (*Tabulka 10*), kdy znovu dominoval obsah β-sitosterolu, případně stigmasterolu a campesterolu [12].

***Tabulka 10**: Zastoupení celkových a jednotlivých fytosterolů v oleji z kiwi a marakuji [71]*

	Kiwi	**Marakuja**
Celkový obsah fytosterolů [mg/100 g]	269 ± 8,0	209 ± 7,4
Campesterol	7,2 ± 0,8	28,2 ± 1,9
Stigmasterol	7,8 ± 0,8	87,1 ± 3,2
β-sitosterol	251,3 ± 6,2	87,2 ± 3,2
Δ^5-avenasterol	2,7 ± 0,4	6,9 ± 0,9
Δ^7-stigmasterol	10,5 ± 0,9	LD
Δ^7-avenasterol	14,7 ± 1,4	LD

LD: pod limitem detekce

2.6.3 Stanovení jednotlivých karotenoidů a fytosterolů

Stanovení obsahu jednotlivých karotenoidů a fytosterolů se provádí pomocí HPLC s detektorem diodového pole na základě metodiky dříve popsané například Szotkowskim [89]. Získaný extrakt rostlinného oleje je rozpuštěn ve směsi ethylacetátu a acetonitrilu v poměru 3:1 a po přečištění nastříknut na kolonu.

2.6.4 Stanovení celkového obsahu vitaminu E

Celkový obsah vitaminu E je stanovován pomocí HPLC s detektorem diodového pole na základě metodiky popsané Darnetem a kol. [90], kdy je získaný extrakt rostlinného oleje rozpuštěn v diethyletheru a po přečištění nastříknut na kolonu.

Zadernowski a kol. [41] stanovili obsah celkových volných tokoferolů v oleji z celých plodů rakytníku na 101,4−128,3 mg/100 g. Podílově α-tokoferol byl obsažen z 62,5−67,9 %, δ-tokoferol byl obsažen z 32,1−37,5 % a byly nalezeny pouze stopy γ-tokoferolu.

2.7 Použité instrumentální techniky

2.7.1 UV-VIS spektroskopie

UV-VIS spektroskopie (*Ultraviolet-Visible Spectroscopy*) patří mezi optické metody, jejichž principem je interakce elektromagnetického záření s hmotou. U těchto technik je také častým případem uvedení hmoty do excitovaného stavu, kdy při deexcitaci hmota toto záření sama vysílá [91–92].

Podstatou je adsorpce elektromagnetického záření v oblastech spektra 200–400 nm (UV), 400–750 nm (VIS) zředěnými roztoky molekul. Jakmile molekula adsorbuje foton, dochází k excitaci, přijmutím určitého kvanta energie přejde ze základního energetického stavu do vyšší hladiny energie. Excitovaná molekula následně rychle přechází zpět do základního stavu (během 10^{-8} s), zářivá energie se mění v tepelnou a zvyšuje se kinetická energie molekul. Při dopadu záření na povrch tělesa může dojít k pohlcení záření, odrazu anebo k jeho propuštění. V UV-VIS spektroskopii se měří úbytek záření prošlého vzorkem, tuto skutečnost popisuje veličina transmitance (6), kde I_0 je dopadající záření a I_t prošlé záření [91–92]:

$$T = \frac{I_t}{I_0} \tag{6}$$

Hodnota transmitance však závisí na více faktorech, jako jsou vlastnosti absorbující látky, vlnová délka, tloušťka kyvety a koncentrace absorbující látky v roztoku. Míra absorpce se kromě transmitance definuje také veličinou absorbance A, která je záporně vzatým dekadickým logaritmem transmitance. Výsledným používaným vztahem je Lambert-Beerův zákon (7), který vyjadřuje vztah mezi absorbancí a koncentrací látky v roztoku [92]:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \tag{7}$$

kde ε je molární absorpční koeficient, l je optická dráha kyvety a c je koncentrace látky v roztoku.

Lambert-Beerův zákon má však několik omezení, platí, jen pokud je záření monochromatické a pokud jsou měřené roztoky velmi zředěné ($c < 10^{-2}$ mol/dm^3). Ve vyšších koncentracích by již nebyla závislost absorbance na koncentraci lineární [92].

Karotenoidy mají absorpční maxima v oblastech spektra 400−500 nm, kdy naprostá většina nejrozšířenějších karotenoidů (β-karoten, lutein, zeaxanthin, anebo violaxanthin) mají absorpční maxima okolo 450 nm, proto se právě tato vlnová délka používá při stanovení celkového obsahu karotenoidů spektrofotometricky [25].

Fytosteroly absorbují v široké oblasti spektra a mají několik extrakčních maxim, nejvýznamnější je absorpční maximum 625 nm, které značí tmavě modře zbarvený oxidační produkt vzniklý při LB kolorimetrické reakci. Další a méně významné extrakční maxima jsou pozorovány při 389 nm pro tetracyklický kation s benzenovým kruhem a poté při 410 nm pro aromatické sulfonové kyseliny [81].

2.7.2 Chromatografie

Chromatografické metody se z pohledu analytické chemie řadí mezi separační metody, které využívají dělení jednotlivých analytů směsi dle rozdílné distribuce separovaných analytů mezi dvěma fázemi, které jsou nemísitelné, fyzikálně a chemicky odlišné. Jedna z fází je nepohyblivá (stacionární) a druhá je pohyblivá (mobilní). Samotný proces separace probíhá neustále opakujícím se vytvářením rovnováhy na základě fyzikálně-chemických interakcí mezi analytem a mobilní fází, analytem a stacionární fází a také mobilní a stacionární fáze mezi sebou. Jedná se o mechanismy rozpouštění, srážení, chemisorpce, adsorpce, sítový efekt a dále tvorbu komplexů. U typické chromatografické separace je výsledná interakce kombinací výše zmíněných. Celkový čas, který analyt stráví na koloně je dán výslednou afinitou k oběma fázím jednotlivě. Nejvíce se v systému zadržují látky s nejvyšší afinitou ke stacionární fázi. Nejrychleji kolonou naopak vychází složky, které mají nejvyšší afinitu k fázi mobilní [93–94].

Účinnost chromatografické separace

Cílem chromatografické separace je docílit co nejlepších separačních schopností v co nejkratším možném čase. Účinnost kolony se odvozuje na základě co nejlépe separovat složky směsi. Pro tento popis byla zavedena teoretická a bezrozměrná veličina nazvaná počet teoretických pater N (8).

$$N = \frac{V_R^2}{\delta_V^2} = \frac{t_R^2}{\delta_t^2} = \frac{L^2}{\delta_L^2} \tag{8}$$

kde δ_V je směrodatná odchylka objemu, obdobně poté pro odchylky časové a délkové.

Teoretické patro kolony je definováno jako pomyslná část kolony, kde dochází k ustanovení rovnováhy mezi analytem a oběma fázemi kolony. Délka tohoto pomyslného patra je nazvána ekvivalent teoretického patra H (9)

$$H = \frac{L}{N} \tag{9}$$

Počet teoretických pater kolony lze určit i z chromatogramu s využitím šířky plochy píku v základně Y nebo šířky v polovině výšky píku $Y_{1/2}$ (10,11).

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{Y} \right)^2 \qquad N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2 \tag{10), (11}$$

Počet teoretických pater ale není exaktní veličinou, jeho velikost je závislá na retenčním faktoru R složky použité pro výpočet, dále na celkovém stavu stacionární fáze a jejím

opotřebení. Dále ovlivňuje počet teoretických pater délka kolony, rychlost průtoku mobilní fáze, její viskozita a navíc velikost částic stacionární fáze [93–94].

Retenční charakteristiky

Relativní zadržování analytu v koloně a samotnou separaci lze vyjádřit také podle retenčního faktoru R, kdy v koloně délky L migruje zóna látky s retenčním časem t_R. Její rychlost lze poté definovat jako podíl délky kolony a retenčního času látky. Rychlost migrace látky, která je v koloně nezadržovaná lze vyjádřit obdobně podílem délky kolony a t_M neboli mrtvého retenčního času. Retenční faktor je potom vyjádřen jako poměr těchto dvou rychlostí (12).

$$R = \frac{v}{u} = \frac{t_M}{t_R} \tag{12}$$

Retenční objem dané látky je následně definován jako objem mobilní fáze, která proteče kolonou za dobu retenčního času dané látky. Mezi těmito dvěma veličinami poté platí vztah (13).

$$V_R = F_m \cdot t_R \tag{13}$$

kde F_m je objemový průtok mobilní fáze udávaný v ml/min [93–94].

Kolony pro chromatografii

V koloně dochází k vlastnímu rozdělení vzorku na jednotlivé frakce. Od objevu a vývoje chromatografických technik zaznamenaly i kolony intenzivní vývoj. Pro HPLC kolony jsou kladeny nároky na odolnost vůči působení vysokých tlaků (desítky MPa), inertnost vůči působení mobilní fáze a také dokonale hladký vnitřní povrch. Nejpoužívanější materiál kolon je tvrzené sklo v nerezovém pouzdře, anebo samotná nerezová ocel. Po analýzu se využívají náplňové kolony s délkou 10−300 mm a vnitřním průměrem 2,1−5 mm. Částice jsou vyrobeny z odolných materiálů jako silikagel, alumina nebo grafit a mají rozměry 1−10 μm pro analytické a 20−50 μm pro preparativní kolony [93, 96]

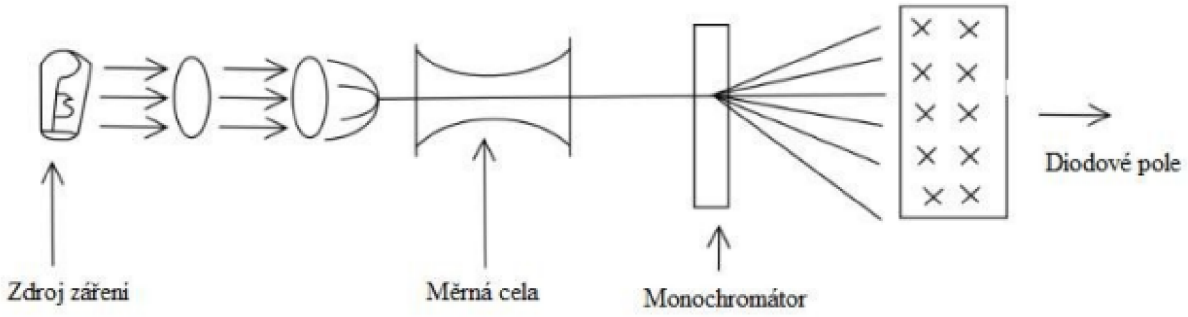
Pro plynovou chromatografii rozeznáváme dva druhy kolon – náplňové a kapilární. Náplňové kolony se vyrábí ze skla anebo kovu (nerezová ocel, hliník, měď nebo nikl), jejich vnitřní průměr je 2−6 mm a délka 1−5 metru. Náplní těchto kolon jsou různé druhy adsorbentů na bázi silikagelů a aktivního uhlí, případně molekulová síta. O mnoho více používané jsou kolony kapilární. Jedná se o skleněné, křemenné, kovové, anebo plastové kapiláry s vnitřním průměrem 100−700 μm a délkou 15−100 m. Stacionární fáze je nanesena na vnitřní straně kapiláry, případně je kapilára stacionární fází naplněna v celém objemu. Kapilára je obohacena polyamidovým potahem pro její zpevnění. Podle charakteru stacionární fáze nanášené na vnitřní stranu kapiláry rozlišujeme kolony s kapalnou stacionární fází WCOT (*Wall-Coated Open tubular*), kolony s kapalnou stacionární fází zakotvenou na vnitřní stěně kapiláry pomocí nosiče SCOT (*Support-Coated Open Tubular*), a kolony s vrstvou pevného aktivního sorbentu PLOT (*Porous-Layer Open Tubular*) [93, 97].

Detektory pro chromatografii

Pro detekci látek při chromatografické analýze byla vyvinuta řada detektorů a jejich použití je závislé na charakteru a vlastnostech separovaných látek. Detektor zaznamenává změny protékající mobilní fáze a převádí ji na elektricky měřitelné veličiny, reaguje buď na koncentraci, nebo na množství látky vstupující do detektoru. Podobně jako na kolony, existují i na detektory jisté požadavky, a to vysoká citlivost, nízký šum, univerzálnost, lehká obsluha, specifita, nízké provozní náklady a také široký lineární rozsah odezvy v závislosti na koncentraci analytu [93–94].

Volba detektoru závisí na povaze analyzovaných látek. Pro kapalinovou chromatografii je nejčastěji využíván detektor spektrofotometrický, refraktometrický, fluorimetrický, vodivostní, ampérometrický anebo hmotností detektor [93, 96].

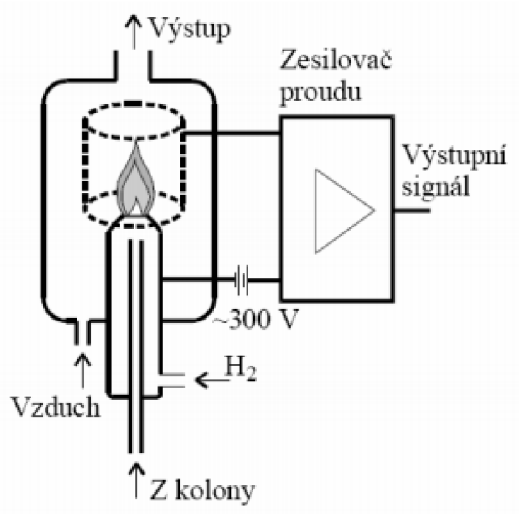
Detektor diodového pole (*Photodiode Array*, PDA) se řadí mezi spektrofotometrické detektory. Jedná se o univerzální detektor, který poskytuje rychlou a lineární odezvu v širokém rozmezí koncentrací. Základní schéma je uvedeno na *Obr. 27*. Hlavní částí detektoru je řada fotodiod, které snímají jednotlivé vlnové délky. V reálném čase lze snímat celé absorpční spektrum látky a tím pádem ji identifikovat [93, 96].



***Obr. 27**: Schéma PDA detektoru [98]*

U plynové chromatografie je používáno mnoho detektorů: tepelně vodivostní, plamenově ionizační, plamenový termoionizační, plamenový fotometrický, detektor elektronového záchytu anebo hmotnostní detektor [97, 97].

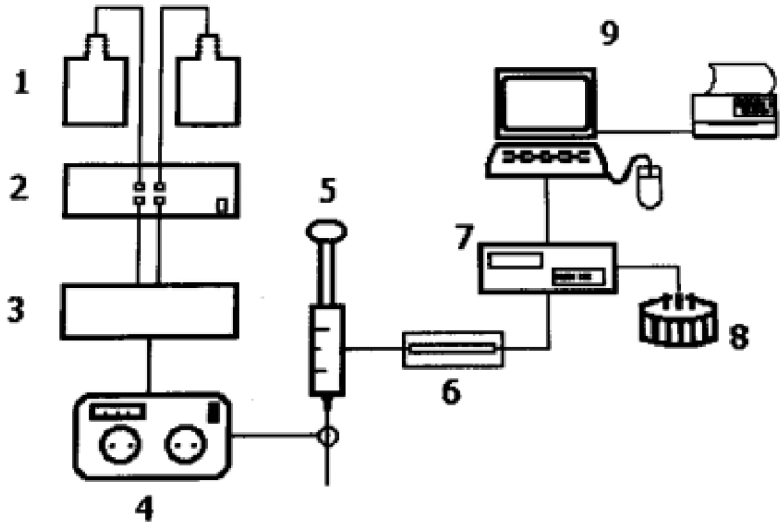
Plamenově ionizační detektor (*Flame ionization detector*, FID) je jedním z nejrozšířenějších detektorů v plynové chromatografii, vzhledem k jeho univerzálnosti pro téměř všechny organické molekuly a navíc díky lineární odezvě v širokém rozmezí koncentrací. Základní schéma je uvedeno na *Obr. 28*. Detektor je tvořen hořákem, v jehož spodní části je přívod nosného plynu, vzduchu, vodíku a přídavného dusíku. Dále jsou zde dvě elektrody, na které je vloženo stále stejnosměrné napětí. Při průchodu samotného nosného plynu je vodivost plynu minimální. Pokud projde nosný plyn s obsaženým analytem, dochází k tvorbě iontových fragment a elektronů, které úměrně koncentraci zvýší vodivost plamene a tím také ionizační proud. Odezva je tedy přímo úměrná koncentraci látky, ale zároveň závisí i na její struktuře [93, 97].



***Obr. 28**: Schéma FID [98]*

2.7.3 HPLC

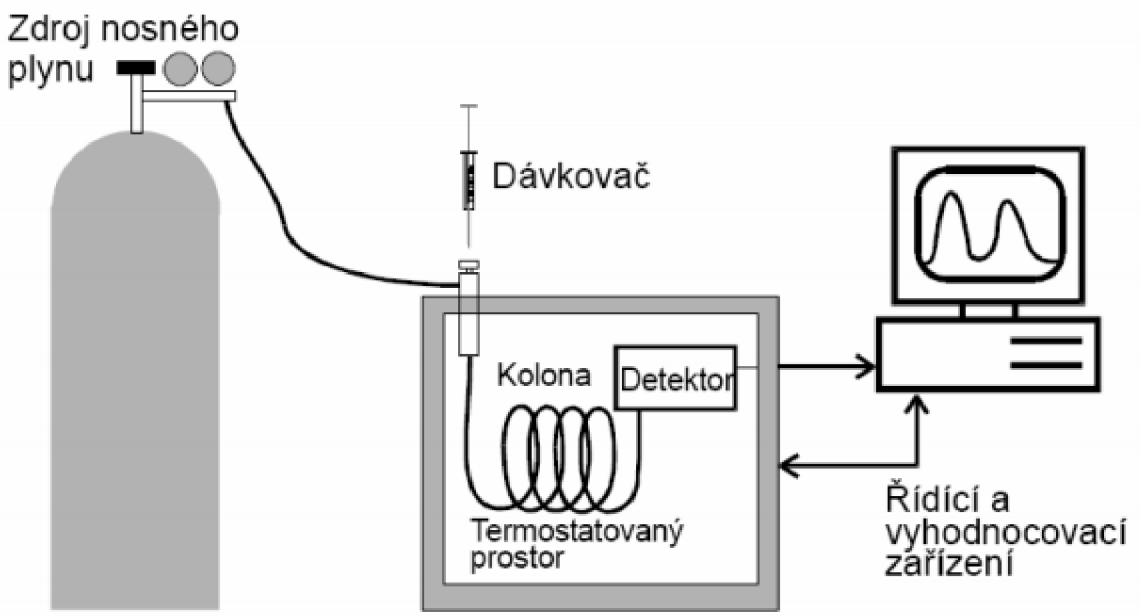
HPLC neboli vysokoúčinní kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography*) je dnes velmi rozšířenou technikou pro separaci složitých směsí analytů. Základní schéma je uvedeno na *Obr. 29*. Mobilní fází je kapalina, která je pod velkým tlakem vháněna čerpadly na kolonu, kde dochází k samotné separaci. Separační proces je založen na afinitě a interakci analytů jak s mobilní, tak stacionární fází. Stacionární fáze může být jak polárního charakteru, tak nepolárního charakteru, přičemž mobilní fáze má opačnou polaritu. Pro analýzu karotenoidů a fytosterolů se převážně využívá uspořádání nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Pro tuto analýzu je potřeba bezpulsní tok, který je zajištěn systémem membránových a pístových čerpadel s možností gradientové eluce [93, 96].



***Obr. 29**: Schéma HPLC: 1) zásobník MF, 2) odplyňovač, 3) směšovač, 4) vysokotlaké čerpadlo, 5) dávkovač vzorku, 6) chromatografická kolona, 7) detektor, 8) sběrač frakcí, 9) datová stanice [99]*

2.7.4 GC

GC neboli plynová chromatografie (*Gas Chromatography*) je velmi rozšířená technika pro separaci látek s nízkým bodem varu. Základní schéma je uvedeno na *Obr. 30*. Mobilní fází je plyn, který musí být naprosto inertní a nijak nereagovat se vzorkem a stacionární fází. Kvůli tomu se používají plyny jako vodík, dusík nebo helium. Separace je tedy založena pouze na interakci analytů se stacionární fází a může probíhat buď za konstantní teploty (izokratická eluce), anebo za proměnlivé teploty (gradientová eluce). Již bylo zmíněno, že u plynové chromatografie se používají náplňové a kapilární kolony. Kapilární kolony dosahují vzhledem k obrovské extrakční ploše vysokých extrakčních účinností, proto jsou preferované. Nevýhodou je možnost analýzy pro analyty s bodem varu pouze do asi 400 °C. Molekuly, které by kvůli příliš vysokému bodu tání nešlo separovat plynovou chromatografií, jsou před analýzou transformovány na deriváty s nižším bodem varu. Klasickým příkladem je převedení mastných kyselin na jejich methylestery [93, 97].



***Obr. 30**: Schéma GC [98]*

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem předložené diplomové práce byla optimalizace postupů pro extrakci bioaktivních látek lipofilního (převážně karotenoidního a steroidního) charakteru z plodů rakytníku řešetlákového (*Hippophae Rhamnoides*) do různých druhů olejových základů. Jako extrakční technika byla kvůli jednoduchosti a snadné aplikovatelnosti do průmyslového měřítka zvolena jednoduchá macerace a byly optimalizovány podmínky doby extrakce pro 5 různých druhů rozpouštědel (rostlinných olejů), které se od sebe navzájem lišily. Výtěžky byly stanoveny pomocí sledování následujících parametrů: celková koncentrace karotenoidů, celková koncentrace fytosterolů, stanovení vybraných obsažených karotenoidů (lutein, astaxanthin a neoxanthin), fytosterolů (β-sitosterol a stigmasterol) a vitaminu E. Dané parametry byly stanoveny pomocí UV-VIS spektroskopie a HPLC/PDA. Současně byla charakterizovaná použitá rozpouštědla na bázi rostlinných olejů (čajovníkový, čajovníkový organic, marakujový, kukui a kiwi olej) z pohledu profilu celkových a volných mastných kyselin (pomocí GC/FID) a tukových čísel. V průběhu extrakce bylo kontinuálně sledováno peroxidové číslo. Veškerá měření byla provedena s ohledem na experimentální možnosti Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně.

3.1 Použité chemikálie

Chemikálie pro stanovení tukových čísel:

Destilovaná voda, FCH VUT
Ethanol (96%), p.a., Lach:ner, ČR
Fenolftalein, LACHEMA, ČR
Hydroxid draselný, p.a., Lach:ner, ČR
Hydroxid sodný, p.a., Lach:ner, ČR
Chlorid sodný, p.a., Lachema, ČR
Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO, USA
Jodid draselný p.a., PENTA, ČR
Jodobromid (98%), ALFA AESAR, GB
Kyselina chlorovodíková (35%), Lach:ner, ČR
Kyselina octová (99%) p.a., K.MARTYČÁK ML CHEMICA, ČR
Škrob rozpustný (podle Lauliera) p.a., Lach:ner, ČR
Thiosíran sodný bezvodý p.a., Lach:ner, ČR

Chemikálie pro spektrofotometrické analýzy:

Anhydrid kyseliny octové, Sigma Aldrich, SRN
β-karoten p.a., Sigma Aldrich, SRN
Destilovaná voda, FCH VUT
Chlorid sodný p. a., PENTA, Česká republika
Síran sodný bezvodý p. a., Lach:ner, Česká republika
Methanol p. a., Lach:ner, Česká republika
Hydroxid sodný p. a., PENTA, Česká republika
Hexan p. a., Lach:ner, Česká republika

Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO, USA
Kyselina sírová (96%), Lach:ner, ČR
Stigmasterol p.a., Sigma Aldrich, SRN

Chemikálie pro HPLC/PDA analýzy:

Acetonitril pro HPLC., Carl ROTH, SRN
Diethylether pro HPLC., Carl ROTH, SRN
Ethylacetát pro HPLC, Carl ROTH, SRN
TrisHCl pro HPLC, Carl ROTH, SRN
Methanol pro HPLC, Carl ROTH, SRN
DL-α-tocopherol acetate p.a., Sigma Aldrich, SRN
Retinyl palmitate p.a., Sigma Aldrich, SRN
β-sitosterol p.a., Sigma Aldrich, SRN
Stigmasterol p.a., Sigma Aldrich, SRN
Astaxanthin p.a., Sigma Aldrich, SRN
Neoxanthin p.a., Sigma Aldrich, SRN
Lutein p.a., Sigma Aldrich, SRN

Chemikálie pro GC/FID analýzu:

Bortrifluorid methanolický roztok 10 %, Sigma Aldrich, SRN
Isooktan p. a., Sigma Aldrich, SRN
Chlorid sodný p. a., PENTA, Česká republika
Destilovaná voda, FCH VUT
Síran sodný bezvodý p. a., Lach:ner, Česká republika
Methanol p. a., Lach:ner, Česká republika
Hydroxid sodný p. a., PENTA, Česká republika
Hexan p. a., Lach:ner, Česká republika
Směsný standard metylesterů mastných kyselin, Supelco™ 37 Component FAME Mix, Sigma Aldrich, SRN

Plyny pro GC/FID analýzu:

Vodík 5.5, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
Vzduch 5.0, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem
Dusík 5.0, SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

3.2 Použité pomůcky a přístroje

Pomůcky:

Běžné laboratorní sklo Simax
Skleněné kyvety pro UV-VIS, Thermo Fischer Scientific, USA
Skleněné vialky o objemu 2 a 4 ml
Plastové 15 ml vialky typu Eppendorf
Automatické pipety 1−100 µl, 0,1−1 ml, 5 ml a 10 ml (Biohit, USA)

Stříkačkové filtry Nylon 0,45 µm, Macherey-Nagel, Německo
Stříkačkové filtry PTFE 0,45 µm, Macherey Nagel, Německo
Plastové centrifugační zkumavky s uzavíráním (VWR International, USA)

Přístroje:

Analytické váhy GR-202 EC (Helago, ČR)
Laboratorní centrifuga EBBA 21 (Hettich, Německo)
Magnetická míchačka IKA Color Squid (IKA, ČR)
Horkovzdušná sušárna Memmert UFE550 (Memmert, Německo)
UV-VIS spektrofotometr Helios Delta 2073 (Spectronic Unicam, USA)
Lednička s mrazničkou (Electrolux, ČR)
Topné hnízdo 100 ml (Brněnská drutěva, ČR)
Vortex MS1 S1, IKA, Německo
PC-pracovní stanice (power profit)
HPLC/PDA sestava: Agilent Infinity 1260 s kolonou Luna Omega C18 Polar (150 x 3 mm; 3 µm), Agilent, USA
HPLC/PDA sestava: Sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA), Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR), Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR, Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR, Vyhodnocovací systém Xcalibur, Kolona Kinetex C18, 5 mm, 4,6 x 150 mm, Phenomenex Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR), Předkolona - C18,AJ0 - 4287, Phenomenex.
Plynový chromatograf TRACE GC 2000, (ThermoQuest Italia S. p. A, Itálie) s plamenově ionizačním detektorem, split/splitless injektorem a s kapilární kolonou DB 23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm

3.3 Vzorky rakytníku řešetlákového a rostlinné oleje

K analýze byla použita jedna odrůda plodů rakytníku řešetlákového (*Hippophae Rhamnoides*), která byla zakoupena v již usušené podobě z webu www.bylinycaje.cz od paní Heleny Vlčkové z Veverské Bítýšky. Usušená bylina byla uchována v papírových sáčcích v temnu do doby zahájení experimentů. Minimální trvanlivost suroviny byla do 22. 10. 2021 a číslo šarže produktu je 191030.

Použité rostlinné oleje (čajovníkový, čajovníkový organic, marakujový, kukui a kiwi) byly objednány z webu https://www.mysticmomentsuk.com a následně uchovány v chladu až do stanovení. Všechny z uvedených olejů byly získány lisováním za studena, kdy čajovníkový organic olej by měl být dle výrobce získáván šetrnější cestou. Původem z Číny je čajovníkový, čajovníkový organic a kiwi olej. Marakujový olej pochází z jižní Afriky a kukui olej z USA. Výrobce také deklaruje orientační hodnoty profilu mastných kyselin (*Tabulka 11*) a také tuková čísla a další charakteristiky (*Tabulka 12)* pro zakoupené oleje. Námi naměřené hodnoty proto byly s deklarovanými srovnány.

***Tabulka 11**: Profil mastných kyselin použitých rostlinných olejů deklarovaný výrobcem (produktové listy)*

	***Orientační obsah mastných kyselin* (Wt%)**				
	Čajovník	Čaj. organic	Marakuja	Kukui	Kiwi
C 16:0	4,2	ND	8,2	7,5	6,2
C 16:1	ND	ND	0,1	ND	ND
C 18:0	3,4	ND	2,9	3,9	3,8
C 18:1	81,5	80,7	18,1	25,2	21,9
C 18:2	8,9	ND	68,2	35,3	17,1
C 18:3	ND	ND	1,4	25,8	49,4
C 20:0	0,5	ND	0,4	ND	ND
C 20:1	ND	ND	0,1	ND	ND
C 22:0	1,5	ND	0,3	ND	ND
C 24:0	ND	ND	0,1	ND	ND

ND: není deklarován

***Tabulka 12**: Jednotlivá tuková čísla a relativní hustota použitých rostlinných olejů deklarovaný výrobcem (produktové listy)*

	Čajovník	Čaj. organic	Marakuja	Kukui	Kiwi
$Č_z$ (mgKOH/g)	189,0	190,0	190	191,0	ND
$Č_k$ (mgKOH/g)	0,05	0,07	0,1	0,1	0,1
$Č_j$ (mg/g)	86,0	87,0	144	158,0	188,0
$Č_p$ (meq O_2/kg)	$\leq 5,0$	$\leq 5,0$	1,3	1,3	4,6
$\rho_{rel,\ 20°C}$ (g/cm^3)	0,913	0,914	0,922	0,923	0,927

3.4 Charakterizace použitých rostlinných olejů

3.4.1 Stanovení tukových čísel

Všechna tuková čísla byla stanovena dle skript praktika analytické chemie z VUT FCH Brno od autora M. Hrstky [82]. Všechna stanovení byla provedena 3x a u všech stanovení byl také proveden slepý pokus, tedy stanovení bez navážky tuku.

Stanovení čísla kyselosti

Do titrační baňky bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo asi 5 g vzorku. Poté bylo do baňky přidáno 100 ml etanolu, byly přidány varné kamínky a obsah baňky byl přiveden k varu na topném hnízdě. Následně byly k roztoku přidány tři kapky fenolftaleinu a obsah

baňky byl ihned za horka titrován standardizovaným odměrným roztokem hydroxidu draselného v etanolu (0,1 mol/dm^3) do růžového zbarvení, které bylo stálé po dobu 30 s.

Stanovení čísla zmýdelnění

Do destilační baňky byly s přesností na čtyři desetinná místa naváženy asi 2 g vzorku. Poté bylo do baňky přidáno 25 ml standardizovaného etanolického roztoku hydroxidu draselného (0,5 mol/dm^3), byly přidány varné kamínky a obsah baňky byl zmýdelňován po dobu asi 30 minut pod zpětným chladičem na topném hnízdě. Následně byly přidány 3 kapky fenolftaleinu a obsah baňky byl za horka titrován standardizovaným odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové (0,5 mol/dm^3) do odbarvení roztoku.

Stanovení jodového čísla podle Hanuše

Do Erlenmayerovy baňky se zábrusem bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo asi 0,4 g vzorku. Poté bylo do baňky přidáno 10 ml chloroformu, 25 ml jodmonobromidového roztoku a baňka byla uzavřena a umístěna na temné místo za teploty místnosti. Zátka baňky byla před uzavřením ovlhčena v nasyceném roztoku jodidu draselného, aby byl zadržen i unikající jod. Vzorek se za občasného promíchání nechal hodinu stát a následně se přidalo 25 ml 10% roztoku jodidu draselného a asi 100 ml destilované vody. Obsah baňky byl titrován standardizovaným odměrným roztokem thiosíranu sodného (0,1 mol/dm^3) do žlutého zbarvení. Následně bylo přidáno 3–5 ml škrobového mazu a vzorek byl titrován do odbarvení vodné fáze.

Stanovení peroxidového čísla

Do Erlenmayerovy baňky se zábrusem byly s přesností na čtyři desetinná místa naváženo asi 3 g vzorku. Poté bylo do baňky přidáno 50 ml směsi kyseliny octové a chloroformu v poměru 3:2 a následně byl přidán 1 ml nasyceného roztoku jodidu draselného. Baňka se promíchala pomalým kroužením a byla ponechána v temnu při teplotě místnosti po dobu 20 minut. Poté bylo ke vzorku přidáno 100 ml destilované vody a obsah baňky byl titrován standardizovaným odměrným roztokem thiosíranu sodného (0,01 mol/dm^3) do žlutého zbarvení. Následně bylo přidáno 3–5 ml škrobového mazu a vzorek byl titrován do odbarvení vodné fáze.

3.4.2 Stanovení profilu volných a celkových mastných kyselin pomocí GC/FID

Stanovení profilu volných a celkových mastných kyselin ve vzorcích rostlinných olejů bylo stanoveno na základě tradičního postupu popsaného normami ČSN EN ISO 12966 [84–86] za použití plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Nejprve je nutno vzorek esterifikovat na velmi těkavé methylestery. Vzhledem k toxicitě bortrifluordu, který byl použit jako katalyzátor, bylo nezbytné celý proces provádět v digestoři a všechno sklo muselo být po jeho použití co nejdříve umyto vodou. Stanovení byla provedena 3x pro každý vzorek.

Kyselá esterifikace volných MK s BF_3 jako katalyzátorem

Do titrační baňky bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo asi 0,1 g vzorku. Poté bylo do baňky přidáno 5 ml metanolického roztoku bortrifluoridu, jakožto katalyzátoru, byly přidány varné kamínky a směs byla přivedena k varu na topném hnízdě. Po třech minutách varu byly do baňky přidány 3 ml isooktanu a var byl ukončen. Po přidání 20 ml nasyceného roztoku

chloridu sodného byla baňka protřepána. Po doplnění baňky roztokem NaCl po hrdlo bylo vyčkáno, až se oddělí fáze a poté byly odebrány asi 2 ml izooktanové horní vrstvy do skleněné vialky objemu 4 ml. K isooktanu bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného pro odstranění zbytkové vlhkosti. Takto připravený vzorek byl pipetován do vialky a analyzován pomocí GC/FID.

Kyselá esterifikace celkových MK s BF_3 jako katalyzátorem

Do titrační baňky bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo asi 0,1 g vzorku. Následně byly přidány varné kamínky, 4 ml standardizovaného metanolického roztoku hydroxidu sodného (0,5 mol/dm^3) a vzorek byl za občasného promíchávání saponifikován na topném hnízdě pod zpětným chladičem. Saponifikace probíhala do vymizení kapek tuku na hladině roztoku, což bylo přibližně 10 minut. Poté bylo do baňky přidáno 5 ml metanolického roztoku bortrifluoridu, jakožto katalyzátoru a směs se nechala vařit po dobu asi dalších 20 minut (celková doba varu 30 min). Dále byly do baňky přidány 3 ml isooktanu a var byl ukončen. Po přidání 20 ml nasyceného roztoku chloridu sodného byla baňka protřepána. Po doplnění baňky roztokem NaCl po hrdlo bylo vyčkáno, až se oddělí fáze a poté byly odebrány asi 2 ml izooktanové horní vrstvy do skleněné vialky objemu 4 ml. K isooktanu bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného pro odstranění zbytkové vlhkosti. Takto připravený vzorek byl pipetován do vialky a analyzován pomocí GC/FID.

Příprava metanolického roztoku NaOH (0,5 mol/dm^3)

Do odměrné baňky byly naváženy 2 g NaOH, které byly rozpuštěny za mírného ohřevu na vodní lázni ve 100 ml metanolu. Takto připravený roztok je možné skladovat v chladničce maximálně po dobu třech měsíců.

Podmínky stanovení volných a celkových MK pomocí GC/FID

Pro analýzu esterifikovaných vzorků byl použit plynový chromatogram TRACE GC s automatickým dávkovačem bez děliče toku. Detekce analytů byla provedena plamenově ionizačním detektorem. Chromatografická analýza probíhala za těchto podmínek:

- Kapilární kolona DB-23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm
- Dávkování autosamplerem bez děliče toku, objem vzorku 1 μl
- Teplota injektoru 250 °C
- Nosný plyn dusík s průtokem 0,5 ml/min
- Teplotním program: 60 °C, 10 min, vzestupný gradient 12 °C/min do 200 °C s výdrží 10 min, vzestupný gradient 5 °C/min do 220 °C s výdrží 15 min, vzestupný gradient 10 °C/min do 240 °C s výdrží 7 min
- Plamenově ionizační detektor (FID), 250 °C, průtok vodíku 35 ml/min, průtok vzduchu 350 ml/min, make-up dusíku 30 ml/min
- Celková doba analýzy: 60 minut

Získaná data byla vyhodnocena v programu TRACE a MS Excell.

3.5 Stanovení výtěžnosti extrakce

3.5.1 Příprava extraktů

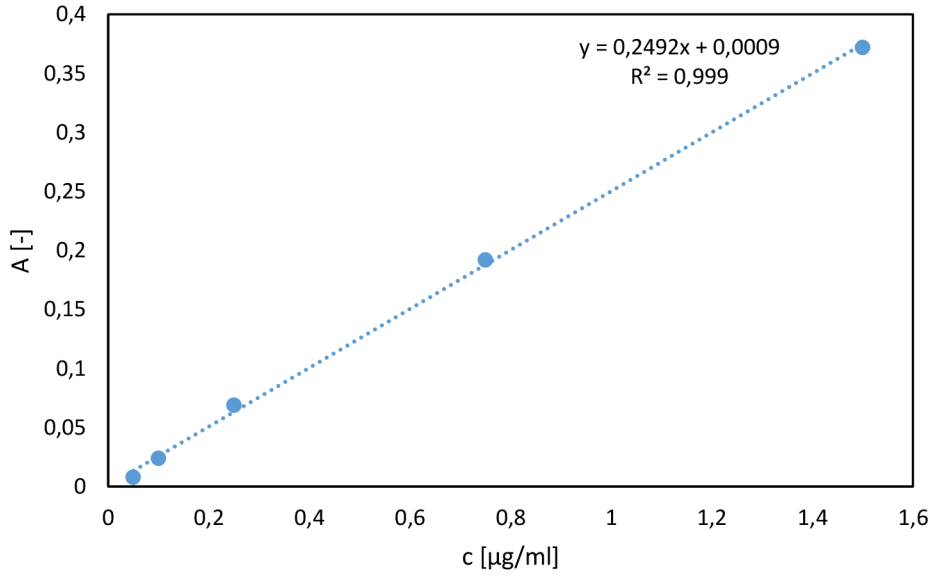
Usušený plod rakytníku řešetlákového byl bez homogenizace navážen na analytických vahách přesně v množství 20 g do Erlenmayerových baněk. K tomuto množství rakytníku bylo přidáno 200 ml rozpouštědla (rostlinný olej). Tato směs byla následně podrobena statické maceraci za nepřístupu světla a při pokojové teplotě po dobu 1, 3, 7, 10, 14, 21 a 66 dní.

V průběhu extrakce bylo vždy odebráno malé množství oleje (celkově asi 3 ml na odběr) pro průběžnou analýzu. Tento odběr byl vždy proveden maximálně opatrně, aby se nenarušil extrakční proces. Díky nehomogenizované formě byliny nebylo takto odebraný průběžný vzorek nutno přečišťovat a rovnou byl rozpuštěn v nepolárních rozpouštědlech a ihned použit pro analýzu lipofilních sloučenin. Extrakční postup byl proveden na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Paralelně byly připraveny vždy dva extrakty.

3.5.2 Stanovení celkového obsahu karotenoidů

Celkový obsah karotenoidů byl stanoven spektrofotometricky na základě metody *PORIM* [85] a na základě procedury, kterou následně popsal *Rodriguez-Amaya* [25]. Do zkumavky byl s přesností na čtyři desetinná místa navážen 1 g vzorku. Ten byl následně rozpuštěn v 10 ml hexanu a přečištěn 0,5 ml 0,5 % roztoku chloridu sodného. Vzorek byl následně vortexován a centrifugován. Následně byla měřena absorbance hexanové vrstvy pomocí UV-VIS spektroskopie v oblasti 450 nm oproti hexanu za použití Helios spektrofotometru v 1 cm skleněné kyvetě.

Stejným způsobem byla připravena kalibrační křivka (*Obr. 31*) s využitím standardního roztoku β-karotenu (3,5 g/l). Bylo připraveno pět roztoků kalibrační řady o v koncentračním rozmezí 0,05−1,5 µg/ml. Z této kalibrační křivky byl zjištěn celkový obsah karotenoidů ve vzorcích. Zjištěná koncentrace byla následně přepočítána na původní navážku vzorku a vyjádřena jako TCC v mg/kg oleje.



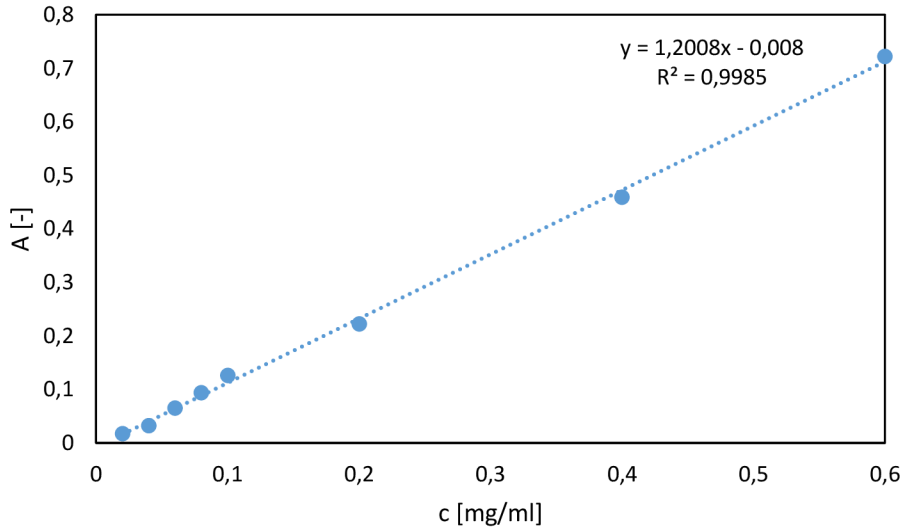
Obr. 31: *Kalibrační křivka standardních roztoků β-karotenu - závislost absorbance při 450 nm na koncentraci*

3.5.3 Stanovení celkového obsahu fytosterolů

Celkový obsah fytosterolů byl stanoven spektrofotometricky dle reakce popsané již v roce 1885 C. Liebermannem [86], která byla následně aplikována pro stanovení sterolů Burchardovou kolorimetrickou procedurou [87]. Do zkumavky bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 0,25 g vzorku. Ten byl následně rozpuštěn v 10 ml chloroformu a do suché zkumavky bylo pipetováno 1 ml tohoto roztoku. K němu byly přidány 2 ml Liebermann-Burchardova činidla a vzorek se nechal asi 5 minut reagovat za teploty místnosti do vzniku modrého barevného komplexu. Následně byla měřena absorbance vzorku pomocí UV-VIS spektroskopie v oblasti 625 nm oproti chloroformu za použití Helios spektrofotometru v 1 cm skleněné kyvetě.

Stejným způsobem byla připravena kalibrační křivka (*Obr. 32*) s využitím standardního roztoku stigmasterolu (1 g/l). Bylo připraveno osm roztoků kalibrační řady o v koncentračním rozmezí 0,02−0,6 mg/ml. Z této kalibrační křivky byl zjištěn celkový obsah fytosterolů ve vzorcích. Zjištěná koncentrace byla následně přepočítána na původní navážku vzorku a vyjádřena jako TPC v mg/kg oleje.

Liebermann-Burchardovo činidlo bylo připraveno za neustálého chlazení. Do 50 ml anhydridu kyseliny octové umístěné v ledové lázni bylo po kapkách přidáváno 5 ml koncentrované kyseliny sírové.



Obr. 32: *Kalibrační křivka standardních roztoků stigmasterolu - závislost absorbance při 625 nm na koncentraci*

3.5.4 Stanovení vybraných karotenoidů a fytosterolů

Stanovení obsahu vybraných karotenoidů (astaxanthin, neoxanthin, lutein) a fytosterolů (β-sitosterol, stigmasterol) bylo provedeno pomocí HPLC s detektorem diodového pole na základě metodiky dříve popsané Szotkowskim [89]. Do zkumavky bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 0,25 g vzorku a ten byl rozpuštěn ve 2 ml směsi ethylacetátu a acetonitrilu chromatografické kvality v poměru 3:1, zfiltrován přes filtr 20 µm, převeden do vialky a analyzován. K chromatografické analýze byla použita HPLC sestava od firmy Thermo Fischer Scientific.

Chromatografická analýza probíhala za těchto podmínek:

- Nepolární kolona C18 o rozměrech 150mm x 4,6 mm x 5 μm
- Dávkování dávkovací smyčkou o objemu 20 μl
- Teplota termostatu při nástřiku 25 °C
- Složení mobilní fáze A: ACN:MeOH:TrisHCl 84:2:14
- Složení mobilní fáze B: MeOH:Ethylacetát 60:40
- Průtok mobilní fáze 1 ml/min
- Gradient mobilní fáze:
  0-13 minut – 100% A → 100 % B
  13-19 minut –100 % B
  19-20 minut –100 % B → 100 % A
  20-25 minut –100 % A
- Detektor diodového pole (PDA)
- Vlnová délka detekce 285 nm (fytosteroly) a 445 nm (karotenoidy)
- Celková doba analýzy: 25 minut

K zpracování získaných chromatogramů a dat byl využit chromatografický software Excalibur a MS Excell.

3.5.5 Stanovení vitaminu E

Stanovení obsahu vitaminu E bylo provedeno pomocí HPLC s detektorem diodového pole na základě metodiky dříve popsané Darnetem a kol. [90]. Do zkumavky bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 0,25 g vzorku a ten byl rozpuštěn v 5 ml diethyletheru chromatografické kvality, zfiltrován přes filtr 20 μm, převeden do vialky a analyzován. K chromatografické analýze byla použita HPLC sestava od firmy Agilent. Chromatografická analýza probíhala za těchto podmínek:

- Nepolární kolona C18 o rozměrech 150mm x 3 mm x 3 μm
- Dávkování dávkovací smyčkou o objemu 5 μl
- Teplota termostatu při nástřiku 30 °C
- Složení mobilní fáze ACN:MeOH 60:40
- Průtok mobilní fáze 1 ml/min
- Detektor diodového pole (PDA)
- Vlnová délka detekce 285 nm (vitamin E) a 330 nm (vitamin A)
- Celková doba analýzy: 35 minut

K zpracování získaných chromatogramů a dat byl využit MS Excell.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole jsou postupně uvedeny a diskutovány výsledky charakterizace použitých rostlinných olejů a následně optimalizace macerace pro získání bioaktivních látek z rakytníku. Pro všechny sledované parametry kromě vybraných karotenoidů, které nebyly v čase zahájení experimentu nalezeny, jsou také probírány průměrné výtěžky od počátku do konce macerace.

Pro jednotlivé rostlinné oleje (extrakční činidla) jsou ve výsledkové části voleny následující zkratky: čajovníkový olej (Č), čajovníkový organic olej (ČO), marakujový olej (M), kukui olej (KU) a kiwi olej (KI).

4.1 Stanovení tukových čísel rostlinných olejů

Každé extrakční činidlo bylo charakterizováno z pohledu tukových čísel. Výsledky kromě čísla peroxidového, kterému je následně věnována samostatná kapitola, jsou uvedeny v *Tabulka 13*. Všechna tuková čísla byla stanovena na počátku experimentu, následně bylo po 66 dnech stanoveno navíc také číslo kyselosti a jodové číslo, pro zhodnocení degradace rostlinných olejů.

Tuková čísla stanovená v rámci experimentů byla v souladu s hodnotami deklarovanými výrobcem (*Tabulka 12*). Po 66 dnech extrakce se číslo kyselosti a číslo jodové lišilo od počátečního stavu jen velmi málo. Významným parametrem stupně nenasycenosti tuku je jodové číslo, nejnižších hodnot 92,71 ± 1,75 mg/g dosahoval čajovníkový organic olej a podobně 94,91 ± 2,27 mg/g čajovníkový olej. Naopak nejvyšší stupeň nenasycenosti 189,68 ± 1,14 mg/g má kiwi olej.

***Tabulka 13**: Jednotlivá tuková čísla použitých rostlinných olejů v mg/g*

	Čajovník	Čaj. organic	Marakuja	Kukui	Kiwi
$Č_{Z0}$	200,20 ± 2,49	203,28 ± 2,73	200,97 ± 2,42	200,84 ± 2,64	196,63 ± 1,32
$Č_{K0}$	0,61 ± 0,05	0,41 ± 0,03	1,26 ± 0,01	1,85 ± 0,07	2,15 ± 0,10
$Č_{K66}$	0,67 ± 0,01	0,83 ± 0,06	1,39 ± 0,09	2,47 ± 0,12	2,66 ± 0,07
$Č_{E}$	199,59 ± 2,44	202,87 ± 2,76	199,71 ± 2,44	198,99 ± 1,40	194,48 ± 2,75
$Č_{J}$	94,91 ± 2,27	92,71 ± 1,75	143,62 ± 0,37	157,30 ± 1,30	189,68 ± 1,14
$Č_{J66}$	91,01 ± 1,20	92,09 ± 0,68	140,96 ± 0,81	155,54 ± 1,23	186,77 ± 0,89

4.2 Stanovení celkových a vázaných MK v rostlinných olejích

Výsledky stanovení celkových MK v rostlinných olejích, které byly využity jako extrakční činidla, jsou znázorněny v *Tabulka 14*. Každé stanovení bylo provedeno celkově 3x. Tyto hodnoty jsou v souladu s hodnotami deklarovanými výrobcem (*Tabulka 11*). Použité rostlinné oleje se liší hlavně v obsahu jednotlivých nenasycených MK (MUFA a PUFA). Mezi vzorky byly oleje s majoritním obsahem kyseliny olejové (čajovníkový a čajovníkový organic), kyseliny linolové (marakujový), kyseliny linolenové (kiwi olej) a s vyváženým obsahem kyseliny olejové, linolové a linolenové (kukui olej).

***Tabulka 14**: Profil celkových mastných kyselin použitých rostlinných olejů*

	***Obsah mastných kyselin* (Wt%)**				
	Čajovník	Čaj. organic	Marakuja	Kukui	Kiwi
C 16:0	6,07 ± 0,12	10,65 ± 0,57	10,91 ± 0,14	10,84 ± 0,10	9,68 ± 0,18
C 16:1	ND	ND	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	ND
C 18:0	2,38 ± 0,34	2,14 ± 0,10	2,81 ± 0,16	4,14 ± 0,03	4,27 ± 0,34
C 18:1	75,97 ± 0,43	77,62 ± 0,96	18,44 ± 0,44	26,22 ± 0,17	22,16 ± 0,53
C 18:2	14,24 ± 0,50	9,25 ± 0,58	66,10 ± 0,64	36,39 ± 0,12	18,16 ± 0,14
C 18:3	ND	ND	1,17 ± 0,05	22,00 ± 0,18	45,59 ± 0,98
C 20:0	0,48 ± 0,06	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	ND	ND
C 22:0	0,86 ± 0,29	0,22 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,13 ± 0,01
Σ SFA	8,45	12,79	13,72	14,97	13,96
Σ MUFA	75,97	77,62	18,44	26,22	22,16
Σ PUFA	14,23	9,25	67,27	58,38	63,75

ND: nebylo detekováno, SFA: nasycené MK, MUFA: mononenasycené MK,

PUFA: polynenasycené MK

Stejně tak byl stanoven profil volných mastných kyselin v rostlinných olejích. Výsledky jsou uvedeny v *Tabulka 15* a jsou velmi obdobné profilu celkových mastných kyselin.

***Tabulka 15**: Profil volných mastných kyselin použitých rostlinných olejů*

	***Obsah mastných kyselin* (Wt%)**				
	Čajovník	Čaj. organic	Marakuja	Kukui	Kiwi
C 16:0	7,16 ± 0,40	12,43 ± 0,61	12,64 ± 0,92	10,62 ± 0,17	10,43 ± 0,14
C 16:1	0,76 ± 0,08	0,28 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,27 ± 0,02	ND
C 18:0	2,11 ± 0,18	1,82 ± 0,09	2,09 ± 0,10	2,84 ± 0,05	2,81 ± 0,06
C 18:1	71,16 ± 1,72	72,76 ± 0,25	15,38 ± 0,64	21,45 ± 0,40	19,37 ± 0,37
C 18:2	18,04 ± 0,13	12,44 ± 0,31	68,27 ± 0,61	34,77 ± 0,34	19,71 ± 0,45
C 18:3	0,77 ± 0,09	0,26 ± 0,01	1,31 ± 0,09	30,05 ± 0,72	47,69 ± 0,94
C 20:0	ND	ND	ND	ND	ND
C 22:0	ND	ND	0,16 ± 0,02	ND	ND
Σ SFA	9,27	14,25	14,88	13,46	13,24
Σ MUFA	71,92	73,04	15,53	21,72	19,37
Σ PUFA	18,81	12,71	69,59	64,82	67,40

ND: nebylo detekováno, SFA: nasycené MK, MUFA: mononenasycené MK

Srovnání testovaných méně známých olejů s běžnými alternativami

Pokud bychom měli z pohledu tukových charakteristik a profilu celkových MK méně známé zkoumané oleje připodobnit k běžně známým olejům, tak čajovníkový olej se nejvíce podobá olivovému oleji. Ten má velmi obdobné jodové číslo (80−88) a stejně tak má nejvýraznější zastoupení kyseliny olejové (55−83 %). Marakujový olej má obdobné charakteristiky jako slunečnicový olej, jehož jodové číslo se pohybuje v rozmezí 118−144 a obsah kyseliny linolové většinou okolo 65 %. Kukui olej by se dal připodobnit k oleji z vlašských ořechů. Ten má jodové číslo 120−155 a obsah kyseliny linolové okolo 50 % za současného obsahu kyseliny linolenové a olejové okolo 12 %. Kiwi olej je podobný lněnému oleji, ten má jodové číslo 136−178 a nejvýraznější obsah kyseliny linolenové, a to 50−55 % [100−104]

4.3 Stanovení sledovaných parametrů rostlinných olejů před zahájením macerace

Oleje se lišily i v základním obsahu sloučenin, na které se při extrakci zaměřujeme. Ve shrnující *Tabulka 16* je uveden profil sledovaných aktivních sloučenin rostlinných olejů v čase zahájení experimentu. Vybrané karotenoidy nebyly na počátku zahájení experimentu detekovány, proto uvedeny nejsou.

***Tabulka 16**: Obsah stanovovaných sloučenin v rostlinných olejích na počátku macerace*

	***Obsah pozorovaných parametrů a sloučenin* (mg/kg)**				
	TCC	TPC	Stigmasterol	β-sitosterol	Vitamin E
Č	0,23 ± 0,01	970,67 ± 12,25	47,70 ± 0,64	495,11 ± 6,00	ND
ČO	0,23 ± 0,01	624,87 ± 19,51	17,69 ± 0,60	399,10 ± 5,63	0,12 ± 0,01
M	0,67 ± 0,02	865,01 ± 10,02	49,79 ± 0,40	515,88 ± 3,75	0,14 ± 0,01
KU	0,67 ± 0,02	832,08 ± 15,22	22,14 ± 0,52	514,95 ± 4,87	0,06 ± 0,01
KI	0,93 ± 0,03	776,37 ± 7,42	120,13 ± 0,96	632,64 ± 8,99	0,63 ± 0,02

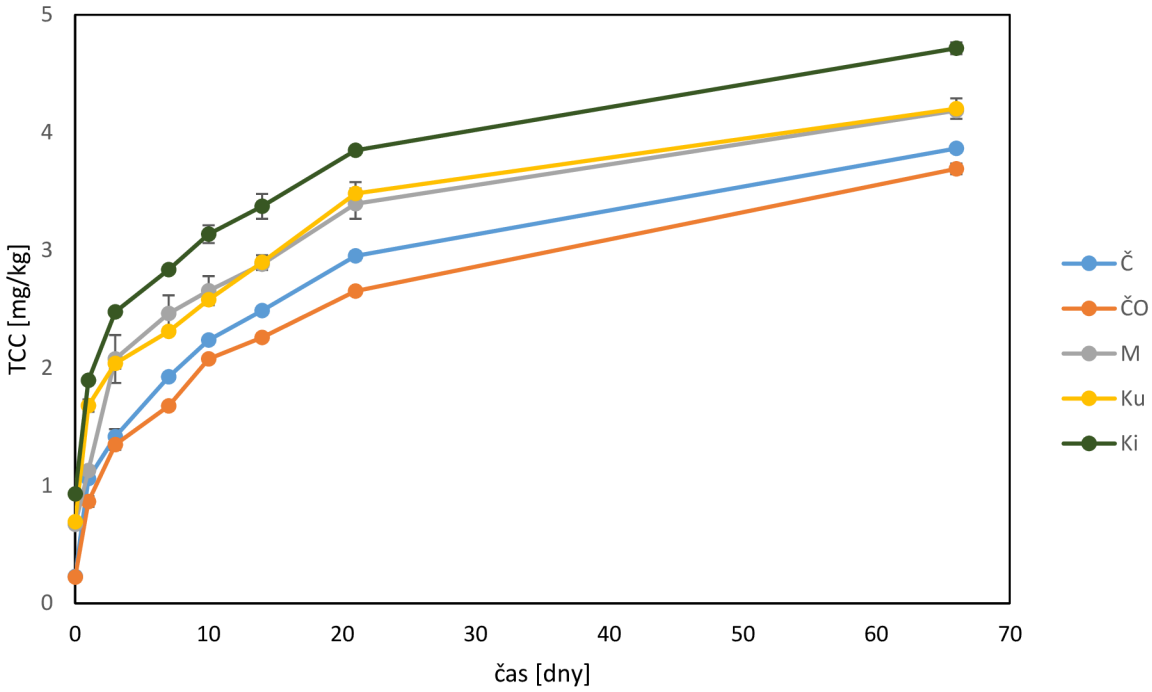
ND: nebylo detekováno

4.4 Studium procesu extrakce rakytníku řešetlákového do olejů

4.4.1 Stanovení celkového obsahu karotenoidů

Výsledky časové závislosti obsahu karotenoidů v macerátech jsou shrnuty na *Obr. 33*. Z výsledků je zřejmé, že doba extrakce má velký vliv na obsah celkových karotenoidů ve finálním produktu. U všech maceračních činidel rostl celkový obsah karotenoidů s časem pro námi pozorované extrakční podmínky více méně logaritmicky. Nejvyšší obsah karotenoidů měl tedy každý z extrakčních systémů v 66 dnu. Pokud bychom chtěli časový parametr více optimalizovat, bylo by vhodné najít čas, po kterém již extrakční výtěžek neroste tak intenzivně. V našem případě se nabízí 21 den, po kterém by se mohla extrakce z důvodu časové úspory zastavit. Jednotlivé výtěžky TCC od počátku extrakce jsou uvedeny v *Tabulka 17*.

Analýzou celkového obsahu karotenoidů bylo zjištěno, že nejúčinnějším extrakčním činidlem je kiwi olej dosahující v 66 dnu extrakčního maxima kolem 4,72 ± 0,05 mg/kg s nárůstem 3,78 mg/kg od počátku extrakce. Je následován čajovníkovým olejem s maximem 3,88 ± 0,03 mg/kg a výtěžkem 3,64 mg/kg. Marakujový a kukui olej jsou více méně podobné účinnosti, extrakční vrchol v 66 dni kolem 4,2 ± 0,08 mg/kg s výtěžkem 3,51 mg/kg. Organic olej z čajovníku se jeví jako nejméně účinný s výtěžkem 3,47 mg/kg.



Obr. 33: *Závislost obsahu celkových karotenoidů na času extrakce*

Tabulka 17*: Shrnutí extrakčního výtežku TCC pro jednotlivé oleje v mg/kg*

Rostlinné oleje	***Počátek extrakce***	***Konec extrakce***	***Výtěžek***
Čajovníkový	0,23 ± 0,01	3,86 ± 0,03	3,64
Čaj. organic	0,23 ± 0,01	3,69 ± 0,04	3,47
Marakujový	0,67 ± 0,02	4,19 ± 0,03	3,52
Kukui	0,69 ± 0,02	4,20 ± 0,08	3,51
Kiwi	0,93 ± 0,03	4,72 ± 0,05	3,79

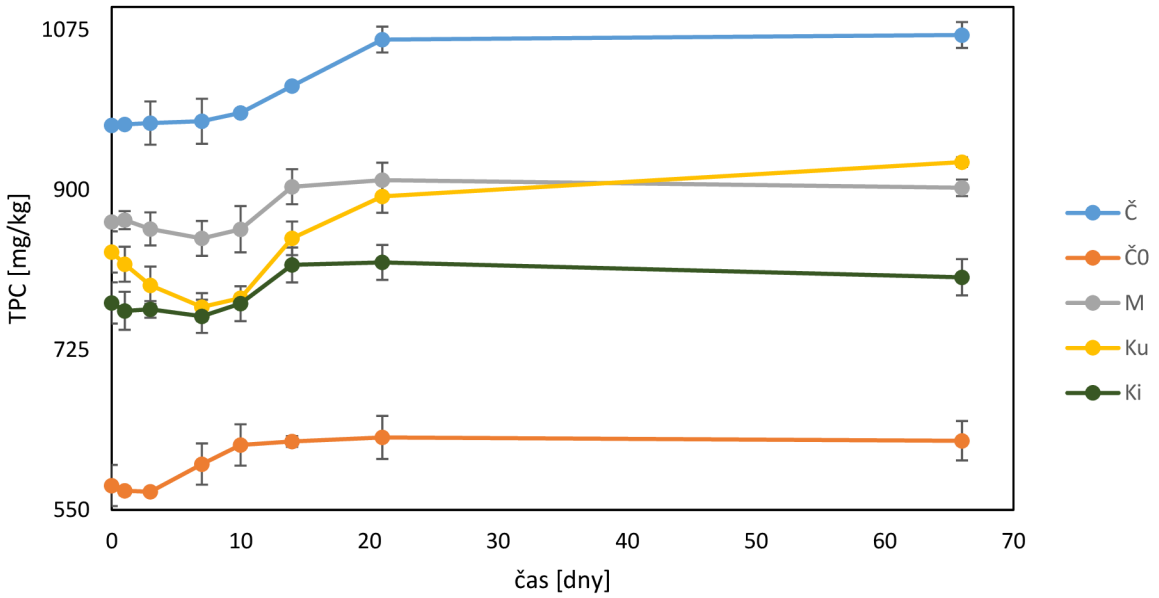
4.4.2 Stanovení celkového obsahu fytosterolů

Výsledky časové závislosti obsahu fytosterolů v macerátech jsou shrnuty na *Obr. 34.* Z výsledků je zřejmé, že se fytosteroly extrahovaly jen velmi málo a v průběhu analýzy docházelo pravděpodobně kontinuálně také k jejich degradaci. U čajovníkového oleje a organic čajovníkového oleje nebyla pozorována degradace TPC, oproti tomu v případě zbylých extrakčních činidel byl v prvních 7−10ti dnech pozorován úbytek celkových fytosterolů. Následně obsah fytosterolů rostl do 21 dne, v 66 dnu extrakce byl TPC u většiny macerátů více

méně obdobný jako při 21 dnu. Jednotlivé výtěžky TCC od počátku extrakce jsou uvedeny v *Tabulka 18*. Nejvyšších výtěžků dosahoval čajovníkový a kukui olej, okolo 98 mg/kg.

Analýzou celkového obsahu fytosterolů bylo zjištěno, že nejúčinnějším extrakčním činidlem je čajovníkový olej dosahující extrakčního maxima v 66 dni 1069,35 ± 14,14 mg/kg a výtěžku 98,67 mg/kg. Po 66 dnech byl také účinným extrakčním činidlem kukui olej s extrakčním maximem 930,36 ± 19,86 mg/kg a výtěžkem 98,29 mg/kg. Byl to jediný olej, u kterého došlo k významnějšímu nárůstu od 21 dne extrakce. U marakujového a kiwi oleje se extrakční výtěžnost od počátku pohybovala na 37,24 mg/kg a 28,06 mg/kg. Čajovníkový organic olej dosahoval v 21 dnech extrakčního maxima 629,26 ± 18,55 mg/kg, následně pak TPC kleslo s výtěžkem na konci extrakce pouze 0,85 mg/kg.

Statická macerace za pokojové teploty tedy není vhodnou metodou pro zisk celkových fytosterolů z rakytníku. Uddin a kol. [63] extrahovali fytosteroly z bylinných matric pomocí metody SFE. Zároveň s tím porovnávali tuto techniku s konvenčními metodami. Zjistili, že je metoda SFE výrazně účinnější a rychlejší než zbylé metody. To by mohlo vysvětlovat nízkou účinnost klasické macerace a nabízet modernější způsoby.



Obr. 34: *Závislost obsahu celkových fytosterolů na času extrakce*

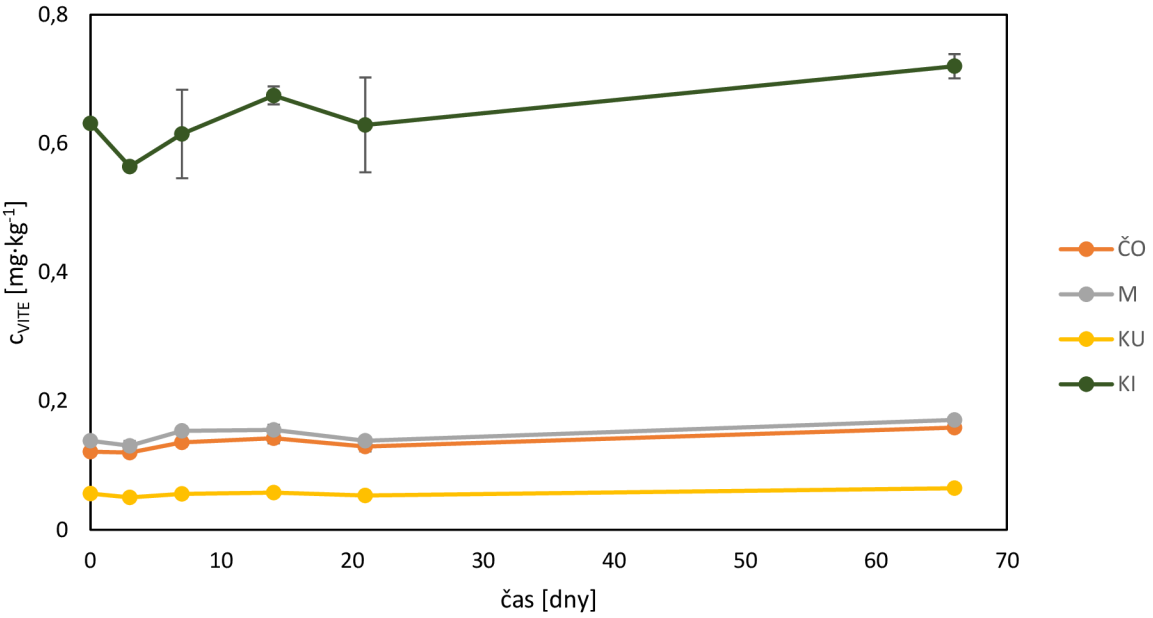
Tabulka 18*: Shrnutí extrakčního výtežku TPC pro jednotlivé oleje v mg/kg*

Rostlinné oleje	***Počátek extrakce***	***Konec extrakce***	***Výtěžek***
Čajovníkový	970,67 ± 12,25	1069,35 ± 14,14	98,67
Čaj. organic	624,87 ± 19,51	625,72 ± 21,54	0,85
Marakujový	865,01 ± 10,02	902,25 ± 9,03	37,24
Kukui	832,08 ± 15,22	930,36 ± 19,86	98,29
Kiwi	776,37 ± 7,42	804,42 ± 5,24	28,06

4.4.3 Stanovení celkového obsahu vitaminu E

Výsledky časové závislosti obsahu vitaminu E v macerátech jsou shrnuty na *Obr. 35*. Z výsledků je zřejmé, že s dobou extrakce se obsah vitaminu E držel na více méně obdobných hladinách a proto nemůžeme hovořit o tom, že by byly oleje vhodným médiem pro jeho extrakci z rakytníku. Podobně jako u celkových fytosterolů, i v tomto případě docházelo v průběhu procesu ke kontinuální degradaci a extrakci vitaminu E. Jednotlivé výtěžky vitaminu E od počátku extrakce jsou uvedeny v *Tabulka 19*.

Analýzou celkového obsahu vitaminu E bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace obsahuje kiwi olej, a to 0,63 ± 0,01 mg/kg v 1 dnu a 0,72 ± 0,02 mg/kg v 66 dnu. Marakujový a čajovníkový organic olej mají více méně podobné obsahy vitaminu E, a to 0,14 ± 0,01 a 0,12 ± 0,01 mg/kg v 1 dnu a 0,16 ± 0,01 a 0,17 ± 0,01 mg/kg v 66 dnu. Obsah vitaminu E v kukui oleji se pohybuje celou dobu extrakce okolo 0,06 mg/kg. V čajovníkovém oleji nebyl detekován žádný vitamin E. Pokud ale vezmeme v potaz jeho peroxidové číslo na počátku i v průběhu extrakce (*Obr. 41*), je jasné, že vitamin E nebude jedinou stabilizační substancí proti oxidačním změnám a významný vliv budou mít antioxidanty jiného typu.



Obr. 35: *Závislost celkového obsahu vitaminu E na času extrakce*

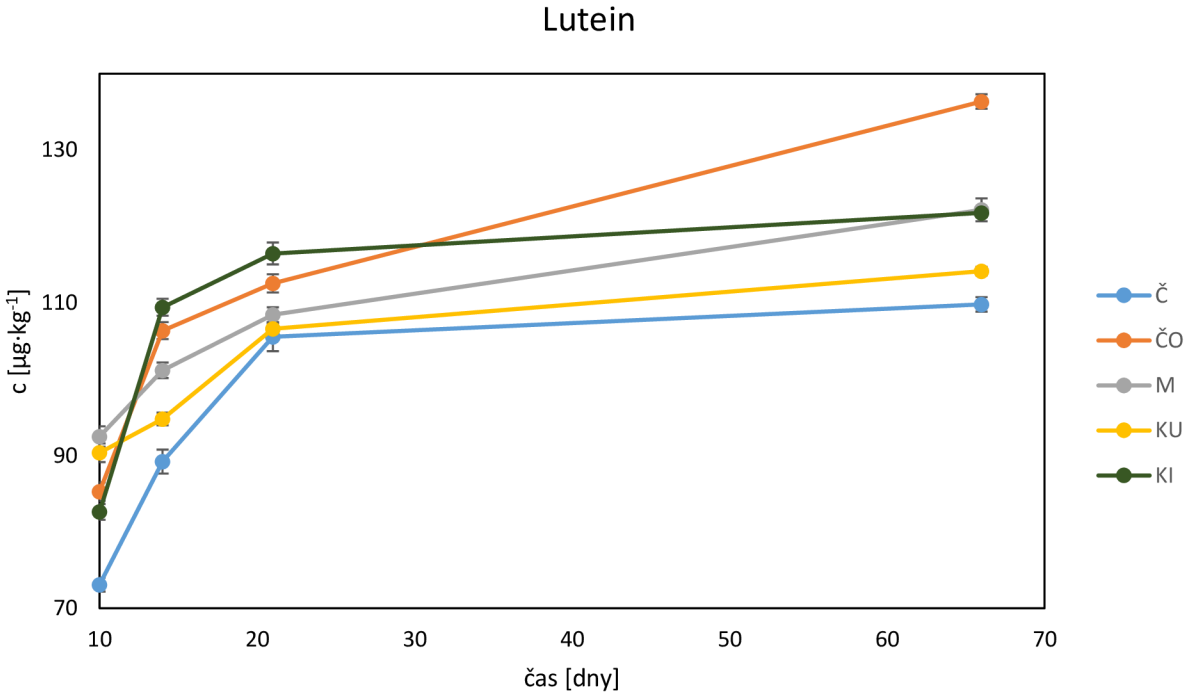
Tabulka 19*: Shrnutí extrakčního výtežku vit E pro jednotlivé oleje v mg/kg*

Rostlinné oleje	***Počátek extrakce***	***Konec extrakce***	***Výtěžek***
Čaj. organic	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,04
Marakujový	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,03
Kukui	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,00
Kiwi	0,63 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,09

Pozn: v čajovníkovém oleji nedetekován obsah vit E

4.4.4 Stanovení vybraných karotenoidů a fytosterolů

Vybrané karotenoidy byly identifikovatelné pomocí HPLC/PDA až od 10 dne, přičemž fytosteroly byly ze spektra patrné již od počátku extrakce. Proto byly extrakční výtěžky stanoveny pouze pro fytosteroly. Z karotenoidů byl stanovován lutein, neoxanthin a astaxanthin. Z fytosterolů byl zjišťován stigmasterol a β-sitosterol. Co se týče karotenoidu β-karotenu, tak u toho byly pozorované pouze jeho oxidované formy, tedy se kvantifikovat nedal. Výsledky časové závislosti obsahu luteinu jsou uvedeny na *Obr. 36*, neoxanthinu na *Obr. 37*, astaxanthinu na *Obr. 38*, stigmasterolu na *Obr. 39* a β-sitosterolu na *Obr. 40*. U všech macerátů rostl obsah jednotlivých karotenoidů s časem pro námi pozorované extrakční podmínky znovu více méně logaritmicky. Nejvyšší obsah karotenoidů měl tedy každý z extrakčních systémů v 66 dnu. Tím jsou výsledky v souladu se stanovením TCC. Pokud bychom chtěli časový parametr více optimalizovat, bylo by vhodné najít čas, po kterém již extrakční výtěžek neroste tak intenzivně. V našem případě by se nabízel 21 den, po kterém by se mohla extrakce z důvodu časové úspory zastavit.

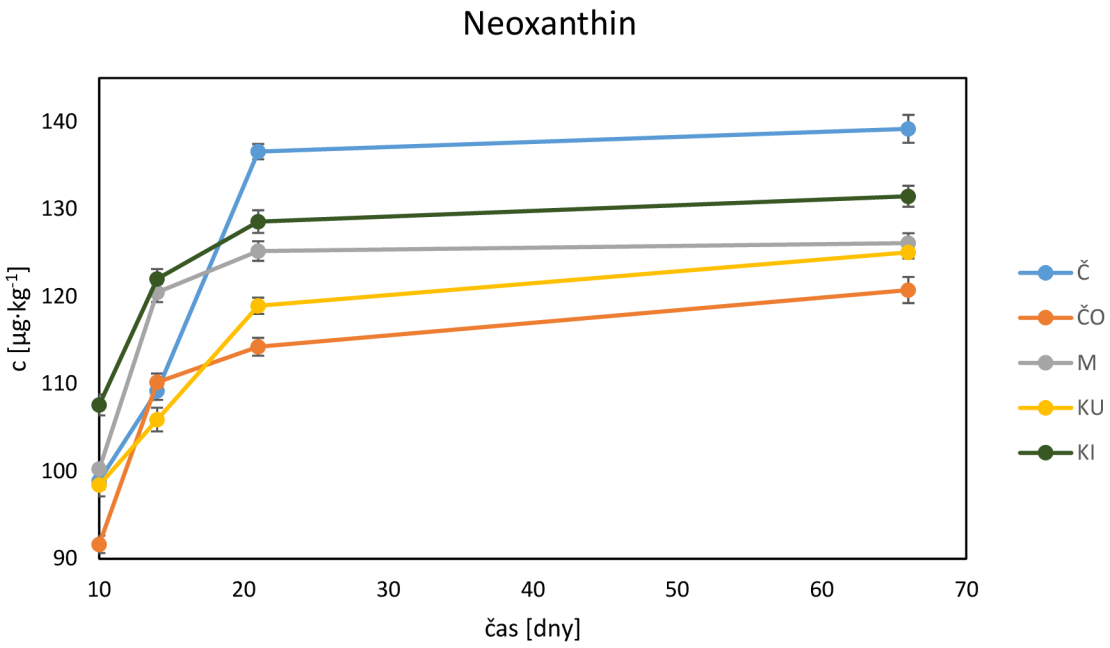


***Obr. 36**: Závislost obsahu luteinu na času extrakce*

Pro každý ze stanovovaných karotenoidů bylo vhodnější jiné rozpouštědlo. Pro zisk luteinu (*Obr. 36*) dosahuje nejvyšší extrakční účinnosti v 66 dnu macerace 136,35 ± 0,95 µg/kg čajovníkový olej organic. V tomto macerátu byl oproti zbylým systémům pozorován značný nárůst luteinu i od 21 do 66 dnu extrakce, tím nenásleduje logaritmický trend. Nejnižší extrakční účinnosti dosahuje v 66 dnu extrakce čajovníkový olej, a to 109,79 ± 0,87 µg/kg.

Komerčně je lutein získáván například extrakcí z okvětních lístků měsíčku lékařského, což je stále velmi využívaná metoda. Ačkoliv existují způsoby chemické syntézy, jsou velmi komplikované a vstupní suroviny drahé a těžko dostupné. Lutein se využívá také v průmyslu jako barvivo a antioxidant. Je spolu s zeaxanthinem přítomný v oční rohovce, kterou chrání

před oxidativním poškozením a stejně tak chrání oko před vznikem šedého zákalu. Působí také proti vzniku kardiovaskulárních onemocnění například tím, že inhibuje oxidaci LDL cholesterolu. Navíc je vzhledem k jeho antioxidační aktivitě doporučován při léčbě diabetické retinopatie [105].



Obr. 37: *Závislost obsahu neoxanthinu na času extrakce*

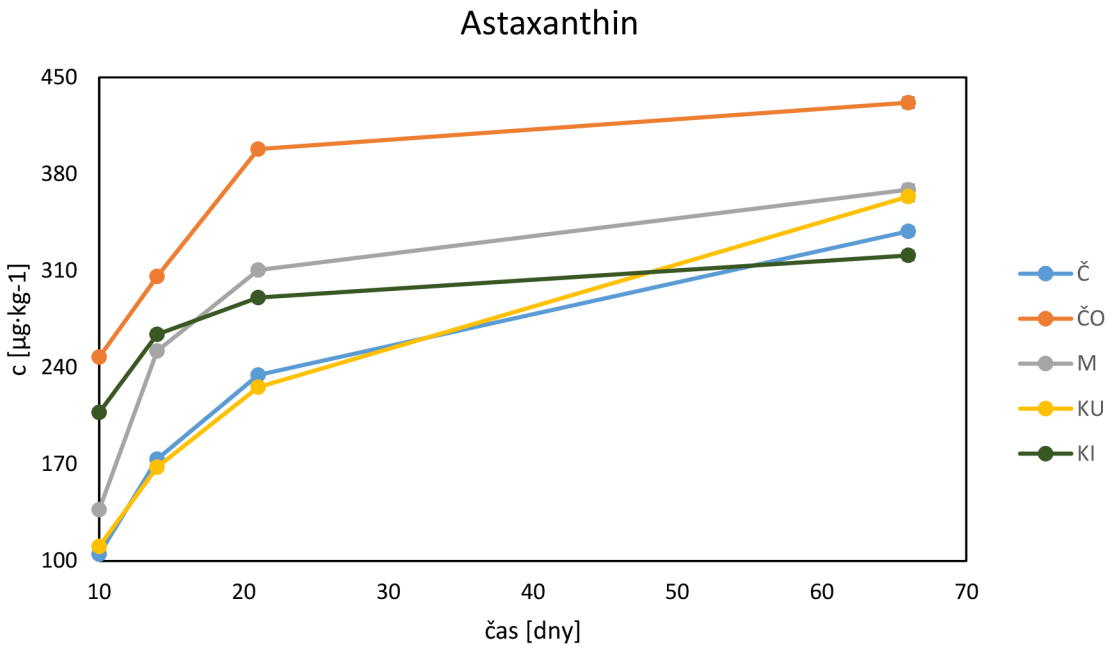
Pro zisk neoxanthinu (*Obr. 37)* se nejvíce osvědčil čajovníkový neorganický olej s extrakční účinností v 66 dnu macerace 139,19 ± 1,59 µg/kg a rozpouštědlo s nejmenší účinností 120,74 ± 1,49 µg/kg byl v 66 dnu čajovníkový organic olej. Obdobně jako u luteinu, i v tomto případě roste obsah karotenoidů nejvýznamněji v prvních dnech extrakce až do 21 dne, od kterého se jeho koncentrace liší už jen málo. V tuto dobu by tedy připadalo v potaz maceraci znovu zastavit pro časovou optimalizaci.

Kotake-Nara a kol. [106] zjistili, že neoxanthin indukuje apoptózu u lidských buněk rakoviny prostaty PC-3 a to nejvýrazněji z 15 sledovaných karotenoidů. Stejně tak má významnou antioxidační aktivitu.

U astaxanthinu (*Obr. 38)* nejvyšší extrakční účinnosti 431,72 ± 3,81 µg/kg po 66 dnech macerace dosahuje čajovníkový organic olej a nejnižší extrakční účinnosti 321,12 ± 3,51 µg/kg po 66 dnech macerace kiwi olej. Nízkých extrakčních výtěžků 338,62 ± 3,21 µg/kg dosahoval také čajovníkový olej, čímž sledujeme obdobný trend jako u luteinu. V případě macerátů čajovníkového a kukui oleje rostl obsah astaxanthinu významně i po 21 dnech, ve zbylých případech by opět bylo z hlediska časové optimalizace dobré extrakci zastavit již po 21 dnech.

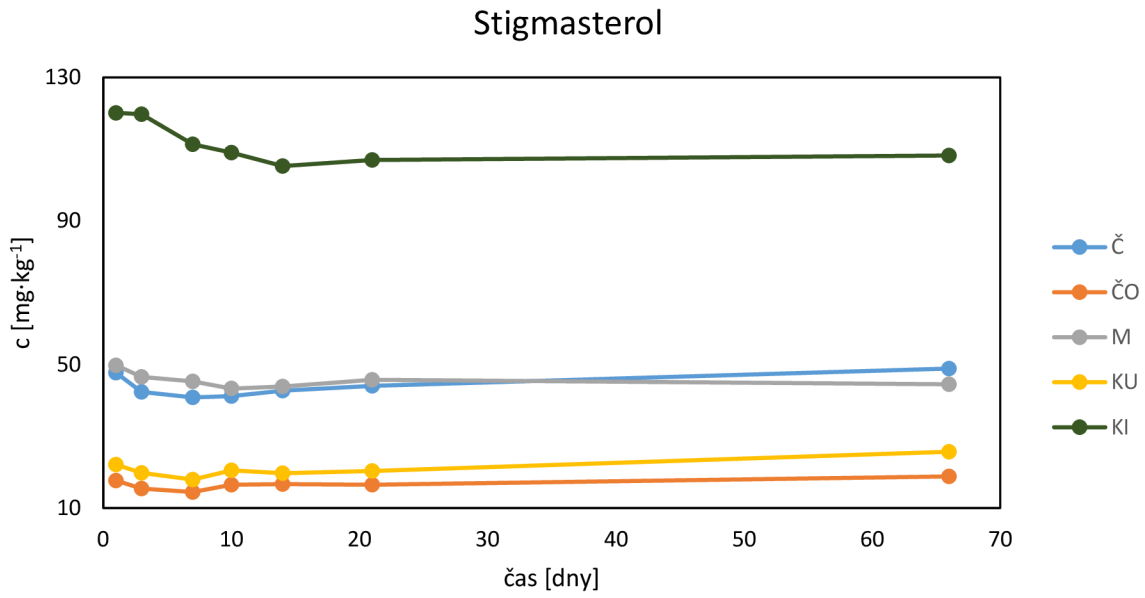
Astaxanthin se získává se z řas, kvasinek anebo korýšů jakožto alternativa k jeho syntetické produkci, která současně dominuje trhu. Stále více ale roste poptávka po přírodních zdrojích astaxanthinu, jedním z důvodů je také vysoká cena syntetické obdoby. Má velmi široké využití v průmyslu jako barvivo a také nutriční složka potravy. Jeho antioxidační aktivita je vyšší než β-karoten anebo α-tokoferol. Je prokázaná jeho účinnost proti různým druhům rakoviny, imunologickým a kardiovaskulárním chorobám. Stejně tak byl zjištěn významný antibakteriální

efekt astaxanthinu na infekce vyvolané *Helicobacter Pylori*, tedy akutní zánět žaludku, žaludeční vředy či rakovina žaludku. Poskytuje tělu ochranu proti UV záření a popáleninám, které také pomáhá hojit [107].



Obr. 38: *Závislost obsahu astaxanthinu na času extrakce*

Stigmasterol a β-sitosterol jsou majoritně obsaženými steroly v rakytníku [38], kdy β-sitosterol je obsažen z 60−80 % a stigmasterol do 5 %. Stanovení jednotlivých fytosterolů pomocí HPLC/PDA přineslo obdobné závěry jako stanovení celkových fytosterolů spektrofotometricky. Tedy, že macerace rakytníku v rostlinných olejích není ideální metodou pro zisk sloučenin sterolového typu, s jistými výjimkami. V průběhu macerace totiž docházelo v prvních dnech u většiny vzorků k degradaci fytosterolů a následně jejich koncentrace významně nerostla. Tím, že byly vybrané fytosteroly detekovány již na počátku extrakce, byla pro každý systém stanovena také extrakční účinnost.



Obr. 39: *Závislost obsahu stigmasterolu na času extrakce*

Pro extrakci stigmasterolu (*Obr. 39*) není vhodné žádné z uvedených rozpouštědel, jelikož jeho obsah v průběhu extrakce více méně stále klesal, což může naznačovat na jeho kontinuální degradaci. Jednotlivé výtěžky od počátku extrakce jsou uvedeny v *Tabulka 20.* Nejvíce stigmasterolu bylo obsaženo v kiwi oleji v čase zahájení experimentů, tedy 120,13 ± 0,96 mg/kg a tato koncentrace následně klesala. Nejméně stigmasterolu bylo obsaženo v čajovníkovém organic oleji, a to 17,69 ± 0,39 mg/kg v čase zahájení experimentů. V průmyslovém měřítku je získáván z mnoha léčivých rostlin a má roli v mnoha metabolických procesech jako intermedián v biosyntéze androgenů, estrogenů, kortikoidů a vitaminu D. Má mnoho farmaceutických využití, mezi které patří působení proti artritidě, proti vysokému cholesterolu, kardiovaskulárním chorobám, proti rakovině různého typu, hypoglykemická aktivita a efekt na štítnou žlázu, antioxidační, antimutagenní, protizánětlivá aktivita a efekt pro ochranu centrální nervové soustavy [108].

Tabulka 20*: Shrnutí extrakčního výtežku stigmasterolu pro jednotlivé oleje v mg/kg*

Rostlinné oleje	***Počátek extrakce***	***Konec extrakce***	***Výtěžek***
Čajovníkový	47,70 ± 0,64	48,87 ± 0,39	1,17
Čaj. organic	17,69 ± 0,60	18,81 ± 0,40	1,12
Marakujový	49,79 ± 0,40	44,45 ± 0,44	-5,34
Kukui	22,14 ± 0,52	25,69 ± 0,28	3,54
Kiwi	120,13 ± 0,96	108,21 ± 0,95	-11,92

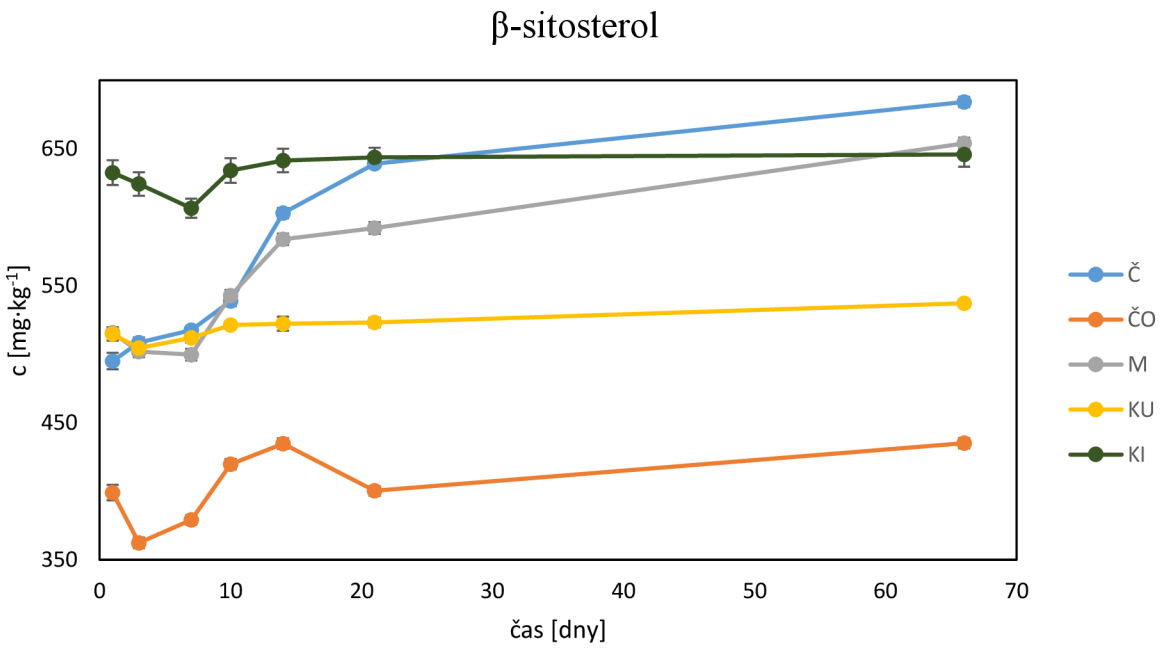
Pro extrakci β-sitosterolu (*Obr. 40*) se osvědčil čajovníkový a dále také marakujový olej. Jednotlivé výtěžky od počátku extrakce jsou uvedeny v *Tabulka 21.* Nejvyšší extrakční účinnosti po 66 dnech macerace 684,21 ± 3,75 mg/kg a výtěžku 189,09 mg/kg dosáhl

čajovníkový olej, kdy razantní nárůst nastal v období mezi 7 a 14 dnem. U marakujového oleje bylo dosaženo extrakčního maxima 653,95 ± 4,12 mg/kg znovu po 66 dnech a výtěžku 138,07 mg/kg. Zbytek rostlinných olejů extrahoval β-sitosterol jen velmi málo a v průběhu procesu docházelo také k mírné degradaci, nejvýrazněji v prvních 7 dnech.

***Tabulka 21**: Shrnutí extrakčního výtežku β-sitosterolu pro jednotlivé oleje v mg/kg*

Rostlinné oleje	***Počátek extrakce***	***Konec extrakce***	***Výtěžek***
Čajovníkový	495,11 ± 6,00	684,21 ± 3,75	189,09
Čaj. organic	399,10 ± 5,63	435,17 ± 3,74	36,07
Marakujový	515,88 ± 3,75	653,95 ± 4,12	138,07
Kukui	514,95 ± 4,87	537,30 ± 2,62	22,35
Kiwi	632,64 ± 8,99	645,91 ± 9,01	13,26

β-sitosterol je v přírodě nejvíce rozšířeným fytosterolem, tedy byl velmi podrobně zkoumán z pohledu farmakologického významu. Má silný protizánětlivý efekt, působí proti mnoha typům rakoviny jako například rakovina prsu (indukuje apoptózu a inhibuje proliferaci buněk), má také chemoprotektivní a chemopreventivní efekty. Dále snižuje cholesterol, má hojivé účinky pro tkáně, imunomodulační, antimutagenní a antithilmentické (hubí parazity) účinky. Působí proti benigní hyperplasii prostaty, má proti diabetický efekt a působí jako neuroprotektant [109].



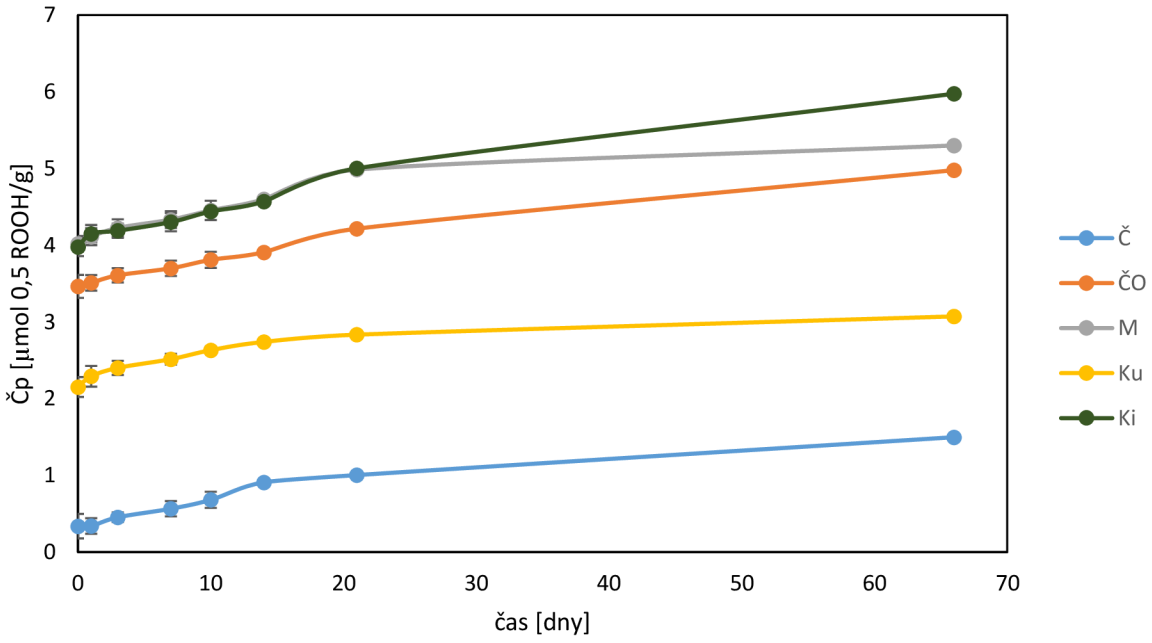
***Obr. 40:** Závislost obsahu β-sitosterolu na času extrakce*

4.4.5 Zhodnocení vývoje peroxidového čísla macerátů v průběhu celého experimentu

Vzhledem k tomu, že rostlinné oleje jsou velmi náchylné na oxidační degradaci, bylo peroxidovému číslu, jakožto ukazateli znehodnocení tuku, věnováno více pozornosti. Bylo sledováno v průběhu celého experimentu. Průběžné hodnoty (časová závislost) peroxidového čísla jsou graficky znázorněny na *Obr. 41*.

Bylo zjištěno, že peroxidové číslo se v průběhu experimentu měnilo relativně málo. I po 66 dnech extrakce stále nebyly maceráty výrazně degradovány natolik, aby je z důvodu oxidační degradace nešlo dále využít (za nepřípustné peroxidové číslo je považována hodnota nad 10 µmol/g [82]). S časem peroxidové číslo u všech macerátů pozvolně rostlo. Nejvíce degradoval olej z kiwi, který obsahuje nejvíce náchylné linolenové kyseliny a nejméně degradoval čajovníkový olej. Po 66 dnech dosáhl kiwi olej peroxidového čísla 5,97 ± 0,05 µmol/g a čajovníkový olej oproti tomu peroxidového čísla 1,50 ± 0,09 µmol/g. Čajovníkový organic olej dosáhl značně vyššího peroxidového čísla než jeho neorganic obdoba, a to 4,98 ± 0,10 µmol/g.

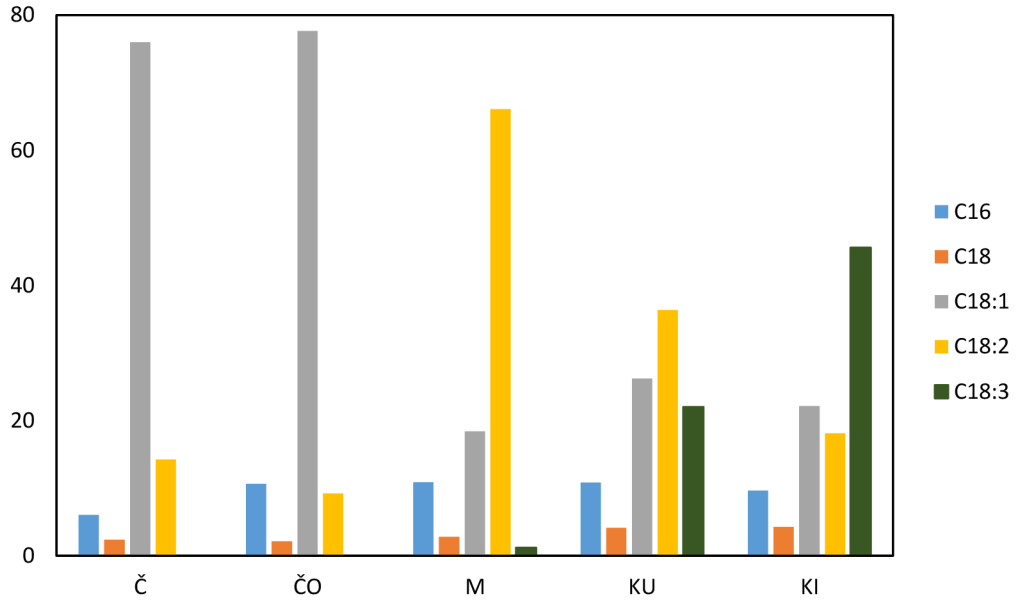
Vzhledem k vysokému obsahu antioxidantů v rakytníku předpokládáme, že rostlinný olej byl bylinou ochráněn před výraznějšími oxidačními změnami. Tuto hypotézu potvrzuje také teorie polárního paradoxu [66], která popisuje paradoxní chování antioxidantů v médiích s jinou polaritou. Říká, že polární antioxidanty jsou více účinné v nepolárních základech a nepolární antioxidanty jsou zase účinnější v základech polárních. Náš experiment tedy tuto teorii potvrzuje. Podobně zkoumal průběh peroxidového čísla při maceraci rakytníku do rostlinných olejů také Corbu a kol. [26] a došli při extrakci rakytníku do olivového a slunečnicového oleje k velmi podobným závěrům.



Obr. 41: *Změna peroxidového čísla rostlinných olejů v čase*

4.5 Zhodnocení vlivu rozpouštědla na účinnost macerace

Cílem této práce bylo zhodnotit, jaký vliv má volba použitého rostlinného oleje na extrakci sledovaných parametrů z rakytníku. Jednotlivé oleje se od sebe totiž liší v základních tukových číslech (*Tabulka 13*), profilu celkových mastných kyselin (*Tabulka 14)* a volných mastných kyselin (*Tabulka 15*). Grafické znázornění profilu zásadních celkových mastných kyselin je uvedeno i na *Obr. 42*. Čajovníkový olej má dominantní zastoupení kyseliny olejové, marakujový kyseliny linolové, kiwi kyseliny linolenové a kukui olej má přibližně vyrovnaný obsah všech těchto nenasycených mastných kyselin. Nejvyššího stupně nenasycenosti dosahuje kiwi olej a nejmenšího stupně nenasycenosti dosahují oleje z čajovníku. Stejně tak se každý rostlinný olej liší v základním zastoupení sledovaných parametrů na počátku macerace (*Tabulka 16*).



Obr. 42: *Profily mastných kyselin použitých olejů*

U stanovení celkových karotenoidů není pozorován žádný významný rozdíl v extrakční účinnosti jednotlivých olejů, jelikož pro všechna použitá rozpouštědla roste jejich koncentrace více méně logaritmicky a výtěžky se pohybují v rozmezí 3,47−3,79 mg/kg. Nejvyšších koncentrací TCC na konci extrakce s nejvyšším výtěžkem od počátku dosahuje kiwi olej, který obsahuje nejvíce kyseliny linoleové. Není ale jisté, že právě profil MK měl vliv na extrakční účinnost, jelikož výtěžek čajovníkového oleje je značně vyšší než u organic obdoby. Z tohoto pohledu tedy nelze jednoznačně říct, že má vliv rozpouštědla významný vliv na zisk celkových karotenoidů.

V případě jednotlivých karotenoidů je již situace odlišná. Jsou pozorovány rozdíly v macerační účinnosti jednotlivých rostlinných olejů. Pro zisk luteinu a astaxanthinu je nejvhodnější čajovníkový organic olej a dobrou extrakční účinnost vykazoval také marakujový olej. Nejnižší extrakční účinnost vykazoval čajovníkový olej. To znovu říká, že na macerační účinnost v tomto případě pravděpodobně nemá profil mastných kyselin oleje a figurují zde jiné vlivy. Pro extrakci neoxanthinu se nejvíce osvědčil čajovníkový olej a nejnižšího extrakčního

výtěžku bylo dosaženo za použití čajovníkového organic oleje. Situace je tedy opačná než v případě luteinu a astaxanthinu.

Fytosteroly se obecně do všech použitých rostlinných olejů extrahovaly jen velmi málo a kontinuálně docházelo také k jejich degradaci, a to hlavně v prvních 7 dnech extrakce, což bylo potvrzeno analýzou celkových fytosterolů. Pro extrakci celkových fytosterolů by bylo vhodné použít jinou extrakční techniku (například SFE), případně pozměnit podmínky procesu. Drobný nárůst celkových fytosterolů po 66 dnech macerace byl pozorován u čajovníkového oleje (98,67 mg/kg) a u kukui oleje (98,29 mg/kg). Ve zbylých macerátech byla jejich koncentrace na počátku a závěru experimentu více méně podobná.

Téměř shodná situace se opakovala u jednotlivých fytosterolů, znovu docházelo k jejich degradaci. Pro extrakci stigmasterolu není vhodný žádný ze sledovaných olejů, kontinuálně jeho koncentrace v macerátech pouze klesala. Pro zisk β-sitosterolu se nejvíce osvědčil čajovníkový olej (extrakční výtěžek 189,09 mg/kg) a také marakujový olej (extrakční výtěžek 138,07 mg/kg). Zbylé oleje dosahovaly nízkých extrakčních účinností. Znovu se prokázalo, že na extrakční účinnost těchto typů látek nemá vliv profil mastných kyselin oleje.

Testovaný extrakční postup s využitím vybraných méně známých druhů olejů nepřinesl zásadní efektivitu pro extrakci vitaminu E z rakytníku. Jeho obsah v průběhu macerace drobně kolísá, ale významně se mezi počátkem a koncem macerace neliší. Znovu by bylo vhodné otestovat jinou metodu pro extrakci vitaminu E z rakytníku, případně změnit podmínky procesu.

Ani jeden ze sledovaných macerátů v průběhu času významně nedegradoval, peroxidové číslo rostlo s časem relativně málo. Je to pravděpodobně způsobeno protektivním efektem ze strany látek extrahovaných z rakytníku. Nejvíce oxidován byl kiwi olej, a to kvůli vysokému obsahu kyseliny linolenové. Naopak nejméně byl degradován čajovníkový olej s nejvyššími obsahy kyseliny olejové. Jev by se také dal vysvětlit pomocí teorie polárního paradoxu [66], která tvrdí, že pro nepolární rozpouštědla jsou vhodné antioxidanty polárního charakteru a pro polární rozpouštědla zase nepolární antioxidanty. To by potvrzoval i fakt, že rakytník obsahuje vysoké koncentrace vitaminu C a také látek fenolické povahy, což jsou silné polární antioxidanty. Tento poznatek protektivního efektu polárních antioxidantů z bylin by mohl být dále využit pro práci s rostlinnými oleji jakožto "zelenými" rozpouštědly. Pokud by se zvolila bylina s vysokým obsahem polárních antioxidantů, celý extrakční systém by byl díky tomu více ochráněn před oxidativní degradací.

5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na optimalizaci vybraných postupů pro extrakci látek lipofilní povahy z plodů rakytníku řešetlákového. Při optimalizaci byl sledován vliv doby macerace a druhu rostlinného oleje jakožto extrakčního činidla na vybrané parametry. Použitá macerační činidla byla charakterizována z pohledu základních tukových čísel a profilu celkových a volných mastných kyselin. Extrakty byly průběžně charakterizovány pomocí UV-VIS spektroskopie a HPLC/PDA. Stejně tak bylo v průběhu macerace pozorováno peroxidové číslo pro zhodnocení oxidační degradace olejů.

Celkově bylo testováno pět rostlinných olejů: čajovníkový, čajovníkový organic, marakujový, kukui a kiwi olej. Účelem bylo zjistit, které rozpouštědlo je vhodnější pro zisk převážně karotenoidních a steroidních sloučenin z matrice, pro využití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Rovněž byla sledována výtěžnost parametrů na době extrakce, a to 1, 3, 5, 7, 14, 21 a 66 dní. Ze získaných výsledků lze konstatovat, že doba extrakce má ve většině případů podstatný vliv na zisk sledovaných sloučenin. Extrakční výtěžnost jednotlivých rozpouštědel se od sebe výrazně nelišila, co se týče stanovení celkových parametrů (TCC a TPC). Naopak byly pozorovány významné rozdíly při extrakci jednotlivých parametrů (primárně lutein, neoxanthin, astaxanthin a β-sitosterol). V případě vitaminu E a stigmasterolu nedocházelo k výraznější extrakci či dokonce v průběhu procesu degradovali.

Jednotlivé rostlinné oleje pro maceraci se lišily v tukových číslech a složení celkových a volných mastných kyselin. Stejně tak bylo v každém oleji na počátku procesu zastoupeno rozdílné množství sledovaných sloučenin. Čajovníkový olej má dominantní zastoupení kyseliny olejové, marakujový olej zase kyseliny linolové, kiwi olej obsahuje nejvíce kyseliny linolenové a kukui olej má více méně vyrovnaný obsah všech těchto nenasycených mastných kyselin. Nejvyššího stupně nenasycenosti dosahuje kiwi olej a nejmenších stupňů nenasycenosti dosahují oleje z čajovníku.

Pro extrakci celkových karotenoidů bychom mohli použít jakékoliv sledované extrakční činidlo, protože u všech rostl TCC s časem více méně logaritmicky. Nejvyššího výtěžku 3,79 mg/kg bylo dosaženo při extrakci do kiwi oleje a nejnižšího výtěžku 3,47 mg/kg extrakcí do čajovníkového oleje organic. Zároveň měly ale tyto oleje nejvyšší (kiwi) a nejnižší (čajovníkový organic) obsah karotenoidů na počátku extrakce. Vzhledem k logaritmickému trendu nárůstu TCC by připadalo v potaz extrakci z důvodů časové úspory zastavit v době, kdy jejich obsah přestává významněji růst. Pro námi sledované podmínky se nabízí 21 den macerace.

Obdobně logaritmicky rostl s časem obsah jednotlivých karotenoidů. Pokud jsme se zaměřili na lutein, neúčinnějším rozpouštědlem byl čajovníkový organic olej s extrakčním maximem 136,35 ± 0,95 μg/kg. Účinnost oleje ale nebyla závislá na specifickém profilu MK, jelikož zároveň nejnižší extrakční účinnosti dosáhl čajovníkový olej s téměř shodným poměrem MK, a to 109,79 ± 0,87 μg/kg. U astaxanthinu byl pozorován stejný trend, nevhodnějším rozpouštědlem byl znovu čajovníkový organic olej s maximem 431,72 ± 3,81 μg/kg. Nejméně účinný byl kiwi olej s minimem 321,12 ± 3,51 μg/kg, stejně tak dosáhl nízkých extrakčních výtěžků 338,62 ± 3,21 čajovníkový olej. Pro neoxanthin byla situace opačná, nejúčinnějším rozpouštědlem byl s maximem 139,19 ± 1,59 μg/kg čajovníkový olej a nejnižší účinnost

120,74 ± 1,49 µg/kg vykazoval čajovníkový organický olej. Znovu se potvrdilo, že extrakční účinnost pravděpodobně nebude závislá na profilu MK olejů.

Fytosteroly se obecně extrahovaly velmi málo a v průběhu analýzy docházelo kontinuálně k jejich degradaci. Vhodnými extrakčními činidly by mohly být oleje z čajovníku a kukui. U čajovníku TPC drobně rostl po celou dobu extrakce a u kukui nastala v prvních dnech degradace a následně prudčejší nárůst od 14 dne procesu. Extrakční výtěžnost obou systémů se pohybovala okolo 98 mg/kg. Čajovníkový organický olej si po celou dobu procesu zachoval obdobné hodnoty TPC. V případě zbylých extrakčních činidel byl v prvních 7−10 dnech pozorován úbytek celkových fytosterolů. Následně obsah fytosterolů rostl do 21 dne, v 66 dnu extrakce byl obsah fytosterolů obdobný jako při 21 dnu. Pro zisk celkových fytosterolů by bylo tedy dobré využít jinou techniku nežli maceraci, například SFE.

Podobně neúčinná byla extrakce stigmasterolu, kdy se jeho obsah po celou dobu macerace držel na obdobných hodnotách anebo spíše degradoval pro všechny pozorované extrakční systémy. U β-sitosterolu se osvědčil čajovníkový olej s výtěžkem 189,09 mg/kg a extrakčním maximem 684,21 ± 3,75 mg/kg, dále byl vhodným rozpouštědlem marakujový olej s výtěžkem 138,07 mg/kg maximem 653,95 ± 4,12 mg/kg. U zbylých rostlinných olejů se β-sitosterol držel po celou dobu procesu na velmi obdobných hodnotách a v prvních 7 dnech spíše degradoval.

Podobně málo účinná byla extrakce vitaminu E, který se držel v průběhu macerace u všech macerátů na stále obdobných hladinách. Nejvyšší množství 0,72 ± 0,02 mg/kg bylo pozorováno v 66 dni v kiwi oleji, zbytek olejů obsahoval pouze 0,06-0,16 mg/kg vitaminu E po celou dobu extrakce U čajovníkového neorganického oleje navíc vitamin E nebyl vůbec stanoven. V přihlédnutí na peroxidové číslo oleje v průběhu experimentu je zřejmé, že vitamin E nebude jedinou stěžejní ochranou před oxidačními změnami. Olej z čajovníku totiž degradoval v čase ze všech nejméně. Zbylé oleje degradovali také velmi málo, což by mohlo být vysvětleno teorií polárního paradoxu, která říká, že jsou pro nepolární rozpouštědla vhodné antioxidanty polárního charakteru a pro polární rozpouštědla zase nepolární antioxidanty.

Tato práce stručně shrnuje dosavadní poznatky týkající se extrakce karotenoidů a fytosterolů z rakytníku řešetlákového. Podává přehledné informace o možném využití „zelených“ rozpouštědel, jakožto alternativních solventů pro extrakci bioaktivních látek z bylinných matric. Práce by mohla sloužit jako metodický materiál využitelný pro další studium a výzkum.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] BAL, Lalit M., 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. 2020-03-10]. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.03.002. ISSN 09639969. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911001591

[2] ZHANG, Yu-Jie, Ren-You GAN, Sha LI, Yue ZHOU, An-Na LI, Dong-Ping XU a Hua-Bin LI. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules* [online]. 2015, 20(12), 21138-21156 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.3390/molecules201219753. ISSN 1420-3049. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1420-3049/20/12/19753

[3] GOULA, Athanasia M., Maria VERVERI, Anna ADAMOPOULOU a Kyriakos KADERIDES. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2017, 34(1), 821-830 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.07.022. ISSN 13504177. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417716302619

[4] LI, Ying, Werner KUNZ a Farid CHEMAT. From Petroleum to Bio-Based Solvents: From Academia to Industry. *Plant Based "Green Chemistry 2.0"* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2019, 2019-07-09, 1(1), 51-87 [cit. 2020-03-11]. Green Chemistry and Sustainable Technology. DOI: 10.1007/978-981-13-3810-6_3. ISBN 978-981-13-3809-0. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3810-6_3

[5] LI, Ying, Kunnitee BUNDEESOMCHOK, Njara RAKOTOMANOMANA, Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER, Romain BOTT, Yong WANG a Farid CHEMAT. Towards a Zero-Waste Biorefinery Using Edible Oils as Solvents for the Green Extraction of Volatile and Non-Volatile Bioactive Compounds from Rosemary. *Antioxidants* [online]. 2019, 8(5), 1-17 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.3390/antiox8050140. ISSN 2076-3921. Dostupné z: https://www.mdpi.com/2076-3921/8/5/140

[6] YARA-VARÓN, Edinson, Ying LI, Mercè BALCELLS, Ramon CANELA-GARAYOA, Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER a Farid CHEMAT. Vegetable Oils as Alternative Solvents for Green Oleo-Extraction, Purification and Formulation of Food and Natural Products. *Molecules* [online]. 2017, 22(9), 1-24 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.3390/molecules22091474. ISSN 1420-3049. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1420-3049/22/9/1474

[7] CHRISTAKI, Efterpi. Hippophae Rhamnoides L. (Sea Buckthorn): a Potential Source of Nutraceuticals. *Food and Public Health* [online]. 2012, 2(3), 69-72 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.5923/j.fph.20120203.02. ISSN 2162-9412. Dostupné z: http://article.sapub.org/10.5923.j.fph.20120203.02.html

[8] WINK, Michael. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines* [online]. 2015, 2(3), 251-286 [cit. 2016-07-30]. DOI: 10.3390/medicines2030251. ISSN 2305-6320. Dostupné z: http://www.mdpi.com/2305-6320/2/3/251/.

[9] SCHONFELDER, Peter a Ingrid SCHONFELDER. *Léčivé rostliny*. 1. Praha: Ottovo nakladatelství, 2010. Ottův průvodce přírodou. ISBN 978-80-7360-588-9.

[10] KENNEDY, D. O. a E. L. WIGHTMAN. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* [online]. 2011, 2(1), 32-50 [cit. 2016-07-30].

DOI: 10.3945/an.110.000117. ISSN 2156-5376. Dostupné z: http://advances.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/an.110.000117.

[11] NJERU, Sospeten Ngoci a Josphat MATASYOH. A Review of some Phytochemicals commonly found in Medicinal Plants. *International Journal of Medicinal Plants* [online]. 2013, 1(105), 135-140 [cit. 2016-07-31]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Sospeter_Njeru2/publication/236258875_A_Review_of_some_Phytochemicals_commonly_found_in_Medicinal_Plants/links/5448c5030cf2f14fb8143cf4.pdf.

[12] GAOSHENG, Hu a Jia JINGMING. Production of Useful Secondary Metabolites Through Regulation of Biosynthetic Pathway in Cell and Tissue Suspension Culture of Medicinal Plants. *Recent Advances in Plant in vitro Culture* [online]. InTech, 2012 [cit. 2016-07-30]. DOI: 10.5772/53038. ISBN 978-953-51-0787-3. Dostupné z: http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/production-of-useful-secondary-metabolites-through-regulation-of-biosynthetic-pathway-in-cell-and-ti.

[13] POSCHENRIEDER, Charlotte, Josep ALLU, Roser TOLR, Merc LLUGANY a Juan BARCEL. Trace Elements and Plant Secondary Metabolism: Quality and Efficacy of Herbal Products. *Trace Elements as Contaminants and Nutrients* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2008, 99-120 [cit. 2016-07-30]. DOI: 10.1002/9780470370124.ch5. ISBN 978-047-0370-124. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/9780470370124.ch5.

[14] WINK, Michael. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism* [online]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010, 40(1), 1-19 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1002/9781444320503.ch1. ISBN 9781444320503. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/9781444320503.ch1

[15] KUMAR, Raj, G. Phani KUMAR, OP CHAURASIA a Shashi BALA SINGH. Phytochemical and Pharmacological Profile of Seabuckthorn Oil: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant* [online]. 2011, 5(5), 491-499 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.3923/rjmp.2011.491.499. ISSN 18193455. Dostupné z: http://www.scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2011.491.499

[16] FERNANDES, P. a J.M.S. CABRAL. Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technology* [online]. 2007, 98(12), 2335-2350 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.10.006. ISSN 09608524. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852406005244

[17] CHAWLA, Rekha, Sivakumar S. a Nitika GOEL. Phytosterol and its esters as novel food ingredients: A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research* [online]. 2016, 35(3), 217-226 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.18805/ajdfr.v3i1.3576. ISSN 0976-0563. Dostupné z: http://arccjournals.com/journal/asian-journal-of-dairy-and-food-research/DR-1020

[18] SECA, Ana M. L. a Diana C. G. A. PINTO. Biological Potential and Medical Use of Secondary Metabolites. *Medicines* [online]. 2019, 6(2), 1-6 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.3390/medicines6020066. ISSN 2305-6320. Dostupné z: https://www.mdpi.com/2305-6320/6/2/66

[19] SINGH, Deepika a Prabir K. CHAUDHURI. A review on phytochemical and pharmacological properties of Holy basil (Ocimum sanctum L.). *Industrial Crops and Products* [online]. 2018, 118(1), 367-382 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.03.048. ISSN 09266690. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669018302711

[20] FLEGKAS, Alexandros, Tanja MILOSEVIĆ IFANTIS, Christina BARDA, Pinelopi SAMARA, Ourania TSITSILONIS a Helen SKALTSA. Antiproliferative Activity of (-)-Rabdosiin Isolated from Ocimum sanctum L. *Medicines* [online]. 2019, 6(1), 1-10 [cit. 2020-

03-11]. DOI: 10.3390/medicines6010037. ISSN 2305-6320. Dostupné z: https://www.mdpi.com/2305-6320/6/1/37

[21] SAXENA, M a J SAXENA. Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* [online]. 2013, 1(6), 168-182 [cit. 2016-07-31]. ISSN 2278- 4136. Dostupné z: http://www.phytojournal.com/vol1Issue6/Issue_march_2013/26.pdf.

[22] ASHOUR, Mohamed, Michael WINK a Jonathan GERSHENZON. Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism* [online]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010, 40(2), 258-303 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1002/9781444320503.ch5. ISBN 9781444320503. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/9781444320503.ch5

[23] LANGI, Panagiota, Sotirios KIOKIAS, Theodoros VARZAKAS a Charalampos PROESTOS. Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries. *Microbial Carotenoids* [online]. New York, NY: Springer New York, 2018, 2018-08-15, 1852(1), 57-71 [cit. 2020-03-11]. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-4939-8742-9_3. ISBN 978-1-4939-8741-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8742-9_3

[24] CAZZONELLI, C. I., N. NISAR, D. HUSSAIN, M. E. CARMODY a B. J. POGSON. Biosynthesis and Regulation of Carotenoids in Plants—Micronutrients, Vitamins and Health Benefits. *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 2010-2-26, 2(1), 117-137 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1007/978-3-642-04670-4_7. ISBN 978-3-642-04669-8. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-04670-4_7

[25] RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. 1. Washington, D. C.: ILSI press, 2001. ISBN 1-57881-072-8.

[26] CORBU, Alexandru R., Andrei ROTARU a Violeta NOUR. Edible vegetable oils enriched with carotenoids extracted from by-products of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides ssp. sinensis): the investigation of some characteristic properties, oxidative stability and the effect on thermal behaviour. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [online]. 2019, 1(1), 1-13 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1007/s10973-019-08875-5. ISSN 1388-6150. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s10973-019-08875-5

[27] ANUNCIATO, Talita Pizza a Pedro Alves DA ROCHA FILHO. Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2012, 11(1), 51-54 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1111/j.1473-2165.2011.00600.x. ISSN 14732130. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1473-2165.2011.00600.x

[28] SUJITH KUMAR, M. S., Ibandalin MAWLONG a Dhiraj SINGH. Phytosterol recovery from oilseeds: Recent advances. *Journal of Food Process Engineering* [online]. 2017, 40(3), 1-9 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1111/jfpe.12466. ISSN 01458876. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/jfpe.12466

[29] MS, Uddin, Sahena FERDOSH, Md. Jahurul HAQUE AKANDA, et al. Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health: a review. *Separation Science and Technology* [online]. 2018, 53(14), 2206-2223 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1080/01496395.2018.1454472. ISSN 0149-6395. Dostupné z: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2018.1454472

[30] CHEN, Xiao-Wei, Shang-De SUN, Guo-Long YANG a Chuan-Guo MA. Engineering phytosterol-based oleogels for potential application as sustainable petrolatum replacement. *RSC Advances* [online]. 2020, 10(1), 244-252 [cit. 2020-03-11]. DOI:

10.1039/C9RA06950J. ISSN 2046-2069. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=C9RA06950J

[31] BHATTACHARYYA, Ashim K., William E. CONNOR a Don S. LIN. The Origin of Plant Sterols in the Skin Surface Lipids in Humans: From Diet to Plasma to Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1983, 80(4), 294-296.

[32] DAI, Jin a Russell J. MUMPER. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* [online]. 2010, 15(10), 7313-7352 [cit. 2016-05-14]. DOI: 10.3390/molecules15107313. ISSN 1420-3049. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1420-3049/15/10/7313/.

[33] KHODDAMI, Ali, Meredith WILKES a Thomas ROBERTS. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* [online]. 2013, 18(3), 2328-2375 [cit. 2016-08-01]. DOI: 10.3390/molecules18022328. ISSN 1420-3049. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1420-3049/18/2/2328/.

[34] KUMAR, Shashank a Abhay K. PANDEY. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* [online]. 2013, 2013(1), 1-16 [cit. 2016-07-31]. DOI: 10.1155/2013/162750. ISSN 1537-744x. Dostupné z: http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/.

[35] HARRINDER, P., S. MAKKAR, P. SIDDHURAJU a K. BECKER. *Plant secondary metabolites*. 1. Totowa, N.J: Humana, 2007. ISBN 978-158-8299-932.

[36] KAPOOR, Deepak N., T. KAUR a G. SINGH. A review on pharmacognostic, phytochemical and pharmacological data of various species of Hippophae (Sea buckthorn). *International Journal of Green Pharmacy* [online]. 2017, 2017-3-3, 11(1), 62-75 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.22377/ijgp.v11i01.874. Dostupné z: https://pdfs.semanticscholar.org/e551/6a2e8a8da03519813c5bf7ec4a501a1ac0c1.pdf?_ga=2.37491108.525779399.1583931917-1885565114.1583931917

[37] KREJCAROVÁ, Jana, Eva STRAKOVÁ, Pavel SUCHÝ, Ivan HERZIG a Kateřina KARÁSKOVÁ. Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) as a potential source of nutraceutics and its therapeutic possibilities - a review. *Acta Veterinaria Brno* [online]. 2015, 84(3), 257-268 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.2754/avb201584030257. ISSN 0001-7213. Dostupné z: https://actavet.vfu.cz/84/3/0257/

[38] YANG, Baoru, Riina M. KARLSSON, Pentti H. OKSMAN a Heikki P. KALLIO. Phytosterols in Sea Buckthorn (Hippophaë rhamnoides L.) Berries: Identification and Effects of Different Origins and Harvesting Times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, 49(11), 5620-5629 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1021/jf010813m. ISSN 0021-8561. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf010813m

[39] ZADERNOWSKI, R., M. NACZK, S. CZAPLICKI, M. RUBINSKIENE a M. SZAŁKIEWICZ. Composition of phenolic acids in sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) berries. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 2005, 82(3), 175-179 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1007/s11746-005-5169-1. ISSN 0003021X. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-005-5169-1

[40] MICHEL, Thomas, Emilie DESTANDAU, Gaëtan LE FLOCH, Marie Elisabeth LUCCHESI a Claire ELFAKIR. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (Hippophaë rhamnoides L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry* [online]. 2012, 131(3), 754-760 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.09.029. ISSN 03088146. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611012866

[41] ZADERNOWSKI, R., M. NACZK a R. AMAROWICZ. Tocopherols in sea buckthorn (Hippophaë rhamnoides L.) berry oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online].

2003, 80(1), 55-58 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1007/s11746-003-0650-z. ISSN 0003021X. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1007/s11746-003-0650-z

[42] SHARMA, Upendra K., Kapil SHARMA, Nandini SHARMA, Abhishek SHARMA, Harsh P. SINGH a Arun K. SINHA. Microwave-Assisted Efficient Extraction of Different Parts of Hippophae rhamnoides for the Comparative Evaluation of Antioxidant Activity and Quantification of Its Phenolic Constituents by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) †. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, 56(2), 374-379 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1021/jf072510j. ISSN 0021-8561. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf072510j

[43] GANJU, Lilly, Yogendra PADWAD, Richa SINGH, et al. Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (Hippophae rhamnoides) leaves. *International Immunopharmacology* [online]. 2005, 5(12), 1675-1684 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.03.017. ISSN 15675769. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576905000901

[44] LEE, Hae-In, Mi-Su KIM, Kyung-Mi LEE, et al. Anti-visceral obesity and antioxidant effects of powdered sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaf tea in diet-induced obese mice. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2011, 49(9), 2370-2376 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.fct.2011.06.049. ISSN 02786915. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691511002936

[45] GEETHA, Suryakumar, Purushothaman JAYAMURTHY, Karan PAL, Shweta PANDEY, Ratan KUMAR a RC SAWHNEY. Hepatoprotective effects of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2008, 88(9), 1592-1597 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1002/jsfa.3255. ISSN 00225142. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.3255

[46] KOSKOVAC, Marijana, Snezana CUPARA, Mihailo KIPIC, Ana BARJAKTAREVIC, Olivera MILOVANOVIC, Ksenija KOJICIC a Marija MARKOVIC. Sea Buckthorn Oil—A Valuable Source for Cosmeceuticals. *Cosmetics* [online]. 2017, 2012-1-1, 4(4), 36-47 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.3390/cosmetics4040040. ISSN 2079-9284. Dostupné z: http://www.mdpi.com/2079-9284/4/4/40

[47] CHIRILA, Elisabeta, Elena OANCEA a Ioana Adina OANCEA. Physico-chemical characterisation of sea buckthorn extracts for cosmetic use. *Analele Universitatii "Ovidius" Constanta - Seria Chimie* [online]. 2014, 25(2), 75-80 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.2478/auoc-2014-0014. ISSN 1223-7221. Dostupné z: https://content.sciendo.com/doi/10.2478/auoc-2014-0014

[48] WANI, Touseef Ahmed, S.M. WANI, Mukhtar AHMAD, Mudasir AHMAD, Adil GANI, F.A. MASOODI a Fatih YILDIZ. Bioactive profile, health benefits and safety evaluation of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.): A review. *Cogent Food & Agriculture* [online]. 2016, 2(1), 18-28 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1080/23311932.2015.1128519. ISSN 2331-1932. Dostupné z: https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2015.1128519

[49] UPADHYAY, N.K., R. KUMAR, S.K. MANDOTRA, R.N. MEENA, M.S. SIDDIQUI, R.C. SAWHNEY a A. GUPTA. Safety and healing efficacy of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed oil on burn wounds in rats. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2009, 47(6), 1146-1153 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.fct.2009.02.002. ISSN 02786915. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691509000684

[50] MITRA, S. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. 1st edition. Hoboken, N.J.: J. Wiley, 2003. ISBN 04-713-2845-6.

[51] KHODDAMI, Ali, Meredith WILKES a Thomas ROBERTS. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* [online]. 2013, 18(3), 2328-2375 [cit. 2016-05-14].

DOI: 10.3390/molecules18022328. ISSN 1420-3049. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1420-3049/18/2/2328/.

[52] DAI, Jin a Russell J. MUMPER. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* [online]. 2010, 15(10), 7313-7352 [cit. 2016-05-14]. DOI: 10.3390/molecules15107313. ISSN 1420-3049. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1420-3049/15/10/7313/.

[53] STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, 30(18), 3268-3295 [cit. 2016-05-14]. DOI: 10.1002/jssc.200700261. ISSN 1615-9306. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700261.

[54] KOCH, M. A., C. SCHERIAU, A. BETZIN, N. HOHMANN a T. F. SHARBEL. Evolution of cryptic gene pools in Hypericum perforatum: the influence of reproductive system and gene flow. *Annals of Botany* [online]. 2013, 111(6), 1083-1094 [cit. 2016-12-04]. DOI: 10.1093/aob/mct065. ISSN 0305-7364. Dostupné z: http://aob.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/aob/mct065.

[55] SAINI, Ramesh Kumar a Young-Soo KEUM. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry* [online]. 2018, 240(1), 90-103 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.07.099. ISSN 03088146. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617312529

[56] ABASCAL, Kathy, Lisa GANORA a Eric YARNELL. The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytotherapy Research* [online]. 2005, 19(8), 655-660 [cit. 2016-05-14]. DOI: 10.1002/ptr.1651. ISSN 0951-418x. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1651.

[57] VILKHU, Kamaljit, Raymond MAWSON, Lloyd SIMONS a Darren BATES. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [online]. 2008, 9(2), 161-169 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.ifset.2007.04.014. ISSN 14668564. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856407001245

[58] IGNAT, Ioana, Irina VOLF a Valentin I. POPA. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* [online]. 2011, 126(4), 1821-1835 [cit. 2016-05-14]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026. ISSN 03088146. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610016353.

[59] AJILA, C.M., S.K. BRAR, M. VERMA, R.D. TYAGI, S. GODBOUT a J.R. VALÉRO. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2010, 31(3), 227-249 [cit. 2016-05-14]. DOI: 10.3109/07388551.2010.513677. ISSN 0738-8551. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2010.513677.

[60] POOLE, Colin F. a Salwa K. POOLE. Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, 1217(16), 2268-2286 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.09.011. ISSN 00219673. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309013478

[61] TERAMUKAI, Kazuyoshi, Shusuke KAKUI, Fumiaki BEPPU, Masashi HOSOKAWA a Kazuo MIYASHITA. Effective extraction of carotenoids from brown seaweeds and vegetable leaves with edible oils. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [online]. 2020, **60**(1), 63-39 [cit. 2020-07-26]. DOI: 10.1016/j.ifset.2020.102302. ISSN 14668564. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856419313335

[62] MS, Uddin, Sahena FERDOSH, Md. Jahurul HAQUE AKANDA, et al. Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health: a review. *Separation Science and Technology* [online]. 2018, **53**(14), 2206-2223 [cit. 2020-07-26]. DOI: 10.1080/01496395.2018.1454472. ISSN 0149-6395. Dostupné z: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2018.1454472

[63] UDDIN, Md. Salim, Md. Zaidul Islam SARKER, Sahena FERDOSH, Md. Jahurul Haque AKANDA, Mst. Sabina EASMIN, Siti Hadijah BT SHAMSUDIN a Kamaruzzaman Bin YUNUS. Phytosterols and their extraction from various plant matrices using supercritical carbon dioxide: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2015, **95**(7), 1385-1394 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1002/jsfa.6833. ISSN 00225142. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6833

[64] FRANKEL, Edwin N., Shu-Wen HUANG, Joseph KANNER a J. Bruce GERMAN. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1994, **42**(5), 1054-1059 [cit. 2020-07-23]. DOI: 10.1021/jf00041a001. ISSN 0021-8561. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00041a001

[65] ZHONG, Ying a Fereidoon SHAHIDI. Antioxidant Behavior in Bulk Oil: Limitations of Polar Paradox Theory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, 60(1), 4-6 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1021/jf204165g. ISSN 0021-8561. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf204165g

[66] LAGUERRE, Mickaël, Christelle BAYRASY, Atikorn PANYA, Jochen WEISS, D. Julian MCCLEMENTS, Jérôme LECOMTE, Eric A. DECKER a Pierre VILLENEUVE. What Makes Good Antioxidants in Lipid-Based Systems? The Next Theories Beyond the Polar Paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2014, 55(2), 183-201 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1080/10408398.2011.650335. ISSN 1040-8398. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.650335

[67] KRIST, Sabine. Tea Seed Oil. *Vegetable Fats and Oils* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, 2020-05-16, , 741-745 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1007/978-3-030-30314-3_115. ISBN 978-3-030-30313-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-30314-3_115

[68] CHAICHAROENPONG, Chanya a Amorn PETSOM. Use of Tea (Camellia oleifera Abel.) Seeds in Human Health. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, 2011, 2011, 1(1), 1115-1122 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1016/B978-0-12-375688-6.10132-X. ISBN 9780123756886. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012375688610132X

[69] LUCARINI, Massimo, Alessandra DURAZZO, Antonio RAFFO, Annalisa GIOVANNINI a Johannes KIEFER. Passion Fruit (Passiflora spp.) Seed Oil. *Fruit Oils: Chemistry and Functionality* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019, 2019-05-09, 1(1), 577-603 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1007/978-3-030-12473-1_29. ISBN 978-3-030-12472-4. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-12473-1_29

[70] KRIST, Sabine. Passion Fruit Seed Oil. *Vegetable Fats and Oils* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, 2020-05-16, 1(1), 535-539 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1007/978-3-030-30314-3_85. ISBN 978-3-030-30313-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-30314-3_85

[71] PIOMBO, Georges, Nathalie BAROUH, Bruno BAREA, Renaud BOULANGER, Pierre BRAT, Michel PINA a Pierre VILLENEUVE. Characterization of the seed oils from kiwi (Actinidia chinensis), passion fruit (Passiflora edulis) and guava (Psidium guajava). *Oléagineux, Corps gras, Lipides* [online]. 2006, 13(2-3), 195-199 [cit. 2020-07-06]. DOI:

10.1051/ocl.2006.0026. ISSN 1258-8210. Dostupné z: http://www.ocl-journal.org/10.1051/ocl.2006.0026

[72] SUBROTO, Erna, Edward WIDJOJOKUSUMO, Bambang VERIANSYAH a Raymond R. TJANDRAWINATA. Supercritical CO2 extraction of candlenut oil: process optimization using Taguchi orthogonal array and physicochemical properties of the oil. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2017, 54(5), 1286-1292 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1007/s13197-017-2542-7. ISSN 0022-1155. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s13197-017-2542-7

[73] KRIST, Sabine. Kukui Oil. *Vegetable Fats and Oils* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, 2020-05-16, 1(1), 405-408 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1007/978-3-030-30314-3_63. ISBN 978-3-030-30313-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-30314-3_63

[74] NORULAINI NA, Nik, Rahmad SETIA BUDI, Omar ANUAR, Md ZAIDUL LS a Mohd OMAR AK. Major chemical constituents of candle nut oil extract using supercritical carbon dioxide. Malaysian J Pharma Sci 2(1):61–72. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2004, 2(1), 61–72 [cit. 2020-07-06]. Dostupné z: http://web.usm.my/mjps/mjps02012004/mjps02012004_6.pdf

[75] SIDDIQUE, Bazlul Mobin, Anees AHMAD, Abbas F.M. ALKARKHI, Mahamad Hakimi IBRAHIM a Mohd OMAR A.K. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Candlenut Oil Extracted by Supercritical CO2. *Journal of Food Science* [online]. 2011, 76(4), C535-C542 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02146.x. ISSN 00221147. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2011.02146.x

[76] DENG, Jianjun, Qingqing LIU, Qi ZHANG, Chao ZHANG, Dan LIU, Daidi FAN a Haixia YANG. Comparative study on composition, physicochemical and antioxidant characteristics of different varieties of kiwifruit seed oil in China. *Food Chemistry* [online]. 2018, 264(1), 411-418 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.05.063. ISSN 03088146. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618308604

[77] KRIST, Sabine. Kiwi Seed Oil. *Vegetable Fats and Oils* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, 2020-05-16, 1(1), 395-398 [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1007/978-3-030-30314-3_61. ISBN 978-3-030-30313-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-30314-3_61

[78] ČSN EN ISO 12966-1 (588767). Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin: Část 1: Směrnice pro moderní plynovou chromatografii methylesterů mastných kyselin. Praha: Český normalizační institut, 2015.

[79] ČSN EN ISO 12966-2 (588767). Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin: Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin. Praha: Český normalizační institut, 2015.

[80] ČSN EN ISO 12966-4 (588767). Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií: Část 4: Metoda kapilární plynové chromatografie. Praha: Český normalizační institut, 2016.

[81] W. CHRISTIE, William. Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis. *AOCS Lipid Library* [online]. 1993, 69-111 [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: https://lipidlibrary.aocs.org/lipid-analysis/selected-topics-in-the-analysis-of-lipids/preparation-of-ester-derivatives-of-fatty-acids-for-chromatographic-analysis

[82] HRSTKA, Miroslav a Lenka SOMROVÁ. PRAKTIKUM Z ANALYTICKÉ CHEMIE POTRAVIN. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ FAKULTA CHEMICKÁ. Brno, 2017.

[83] PARK, Jung-Min a Jin-Man KIM. Monitoring of Used Frying Oils and Frying Times for Frying Chicken Nuggets Using Peroxide Value and Acid Value. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* [online]. 2016, **36**(5), 612-616 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.5851/kosfa.2016.36.5.612. ISSN 1225-8563. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5112423/

[84] GOPINATH, A., Sukumar PUHAN a G. NAGARAJAN. Theoretical modeling of iodine value and saponification value of biodiesel fuels from their fatty acid composition. *Renewable Energy* [online]. 2009, **34**(7), 1806-1811 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1016/j.renene.2008.11.023. ISSN 09601481. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148108004382

[85] KEAT, Ooi Cheng. Carotene content: Methods of test for palm oil and palm oil products. In PORIM methods. *Palm Oil Research Institute of Malaysia* [online]. 1995, 1(5), 43-44 [cit. 2020-07-06]. Dostupné z: http://palmoilis.mpob.gov.my/publications/POTB/58b674c6dbed5-potbv1n5.pdf

[86] LIEBERMANN, C. *Ueber das Oxychinoterpen*. 18. Heidelberg: Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1885, s. 1803-1809.

[87] BURKE, R W, B I DIAMONDSTONE, R A VELAPOLDI a O MENIS. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Clinical Chemistry* [online]. 1974, 20(7), 794-801 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1093/clinchem/20.7.794. ISSN 0009-9147. Dostupné z: https://academic.oup.com/clinchem/article/20/7/794/5677084

[88] ARAÚJO, Larissa B.D.C., Sarah L. SILVA, Marcos A.M. GALVÃO, Magda R.A. FERREIRA, Evani L. ARAÚJO, Karina P. RANDAU a Luiz A.L. SOARES. Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of Acanthospermum hispidum by UV-VIS spectrophotometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2013, 23(5), 736-742 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1590/S0102-695X2013000500004. ISSN 0102695X. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X13700991

[89] SZOTKOWSKI, M.Srovnání metabolické aktivity a potenciálního využití mikrořas a pigmentotvorných kvasinek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 97 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

[90] DARNET, Sylvain, Josilene L. SERRA, Antonio Manoel DA CRUZ RODRIGUES a Luiza H. MELLER DA SILVA. A high-performance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (Euterpe oleracea). *Food Research International* [online]. 2011, 44(7), 2107-2111 [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.12.039. ISSN 09639969. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911000111

[91] IGNAT, Ioana, Irina VOLF a Valentin I. POPA. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* [online]. 2011, 126(4), 1821-1835 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026. ISSN 03088146. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610016353.

[92] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.

[93] SOMMER, L.. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s.

[94] SWADESH, J.. *HPLC: practical and industrial applications*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2001. Analytical chemistry series (CRC Press).

[95] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013.

[96] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd edition. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2010. ISBN 978-0-470-16754-0.

[97] MCNAIR, Harold Monroe a James M. MILLER. *Basic gas chromatography* [online]. 2nd ed. Hoboken: John Wiley, 2009 [cit. 2020-07-08]. ISBN 978-0-470-43954-8. Dostupné z: https://pdfs.semanticscholar.org/0f36/d2eebe9f97e4e90d3a2cec6135f7844535fe.pdf

[98] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.

[99] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

[100] GOPINATH, A., Sukumar PUHAN a G. NAGARAJAN. Theoretical modeling of iodine value and saponification value of biodiesel fuels from their fatty acid composition. *Renewable Energy* [online]. 2009, **34**(7), 1806-1811 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1016/j.renene.2008.11.023. ISSN 09601481. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148108004382

[101] TSAMOURIS, George, Sophia HATZIANTONIOU a Costas DEMETZOS. Lipid Analysis of Greek Walnut Oil (Juglans regia L.). *Zeitschrift für Naturforschung C* [online]. 2002, **57**(1-2), 51-56 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1515/znc-2002-1-209. ISSN 1865-7125. Dostupné z: https://www.degruyter.com/view/journals/znc/57/1-2/article-p51.xml

[102] SILSKA, Grażyna a Magdalena WALKOWIAK. Comparative analysis of fatty acid composition in 84 accessions of flax (Linum usitatissimum L.). *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* [online]. 2019, **13**(3), 118-129 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.26444/jpccr/111889. ISSN 1898-2395. Dostupné z: http://www.journalssystem.com/jpccr/Comparative-analysis-of-fatty-acid-composition-in-84-accessions-of-flax-Linum-usitatissimum,111889,0,2.html

[103] MAGGIO, Rubén M., Teodoro S. KAUFMAN, Michele Del CARLO, Lorenzo CERRETANI, Alessandra BENDINI, Angelo CICHELLI a Dario COMPAGNONE. Monitoring of fatty acid composition in virgin olive oil by Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chemistry* [online]. 2009, **114**(4), 1549-1554 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.11.029. ISSN 03088146. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608013757

[104] CHOWDHURY, K, LA BANU, S KHAN a A LATIF. Studies on the Fatty Acid Composition of Edible Oil. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* [online]. 2008, **42**(3), 311-316 [cit. 2020-07-25]. DOI: 10.3329/bjsir.v42i3.669. ISSN 2224-7157. Dostupné z: https://www.banglajol.info/index.php/BJSIR/article/view/669

[105] HOJNIK, Maša, Mojca ŠKERGET a Željko KNEZ. Extraction of lutein from Marigold flower petals – Experimental kinetics and modelling. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2008, 41(10), 2008-2016 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.11.017. ISSN 00236438. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643807004161

[106] KOTAKE-NARA, Eiichi, Akira ASAI a Akihiko NAGAO. Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Letters* [online]. 2005, 220(1), 75-84 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.07.048. ISSN 03043835. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383504006354

[107] HIGUERA-CIAPARA, I., L. FÉLIX-VALENZUELA a F. M. GOYCOOLEA. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2006, 46(2), 185-196 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1080/10408690590957188. ISSN 1040-8398. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690590957188

[108] KAUR, Navpreet, Jasmine CHAUDHARY, Akash JAIN a Lalit KISHORE. STIGMASTEROL: A COMPREHENSIVE REVIEW. *International journal of pharmaceutical sciences and research* [online]. 2011, 1(2), 2259-2265 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.2(9).2259-65. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Navpreet_Kaur7/publication/264420218_Stigmasterol_A_Comprehensive_Review/links/58b65eda92851c471d43cfb2/Stigmasterol-A-Comprehensive-Review.pdf

[109] SAEIDNIA, Soodabeh. The Story of Beta-sitosterol- A Review. *European Journal of Medicinal Plants* [online]. 2014, 4(5), 590-609 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.9734/EJMP/2014/7764. ISSN 22310894. Dostupné z: http://journalejmp.com/index.php/EJMP/article/download/14372/26430

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS	(2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazol)-6-sulfonát)
ATP	adenosintrifosfát
BHT	butylovaný hydroxytoluen
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DSB	Dried sea buckthorn (sušený rakytník)
EB	Epstein-Barrové (virus mononukleózy)
EGCG	Epigallokatechin galát
EPR	Electron Paramagnetic Resonance (elektronová paramagnetická rezonance)
EVO	Extra virgin olive (oliva nerafinovaná)
EVS	Extra virgin sunflower (slunečnice nerafinovaná)
FC	Folin-Ciocalteův
FID	Flame ionization detector (plamenově ionizační detektor)
FRAP	Ferric reducing antioxidant potential
HPLC	High performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
LB	Liebermann-Burchardovo
LDL	Low density lipoprotein (nízkodenzitní lipoprotein)
MK	Mastná kyselina
MUFA	Monounsaturated fatty acids (mononenasycené mastné kyseliny)
SFA	Saturated fatty acids (nasycené mastné kyseliny)
SFE	Supercritical fluid extraction (superkritická fluidní extrakce)
SWE	Subcritical Water Extraction (subkritická vodní extrakce)
PDA	Photodiode array (pole fotodiod)
PLOT	Porous-Layer Open Tubular (kolony s vrstvou pevného aktivního sorbentu)
PUFA	Polyunsaturated fatty acids (polynenasycené mastné kyseliny)
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktivní formy kyslíku)
RS	Refined sunflower (rafinovaná slunečnice)
SCOT	Support-Coated Open Tubular (kolony s kapalnou stacionární fází zakotvenou na vnitřní stěne kapiláry pomocí nosiše)
TAC	Total Antioxidant Capacity (celková antioxidační aktivita)
TE	Trolox equivalent
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TCC	Total Carotenoid Content (celkové množství karotenoidů)
TPC	Total Phytosterol Content (celkové množství fytosterolů)
USE	Ultrasound Extraction (ultrazvuková extrakce)
UV	Ultraviolet (ultrafialová)
UV-VIS	Ultraviolet-Visible Spectroscopy (spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti)
VOCs	Volatile organic compounds (netěkavé organické sloučeniny)
WCOT	Wall-Coated Open tubular (kolony s kapalnou stacionární fází)

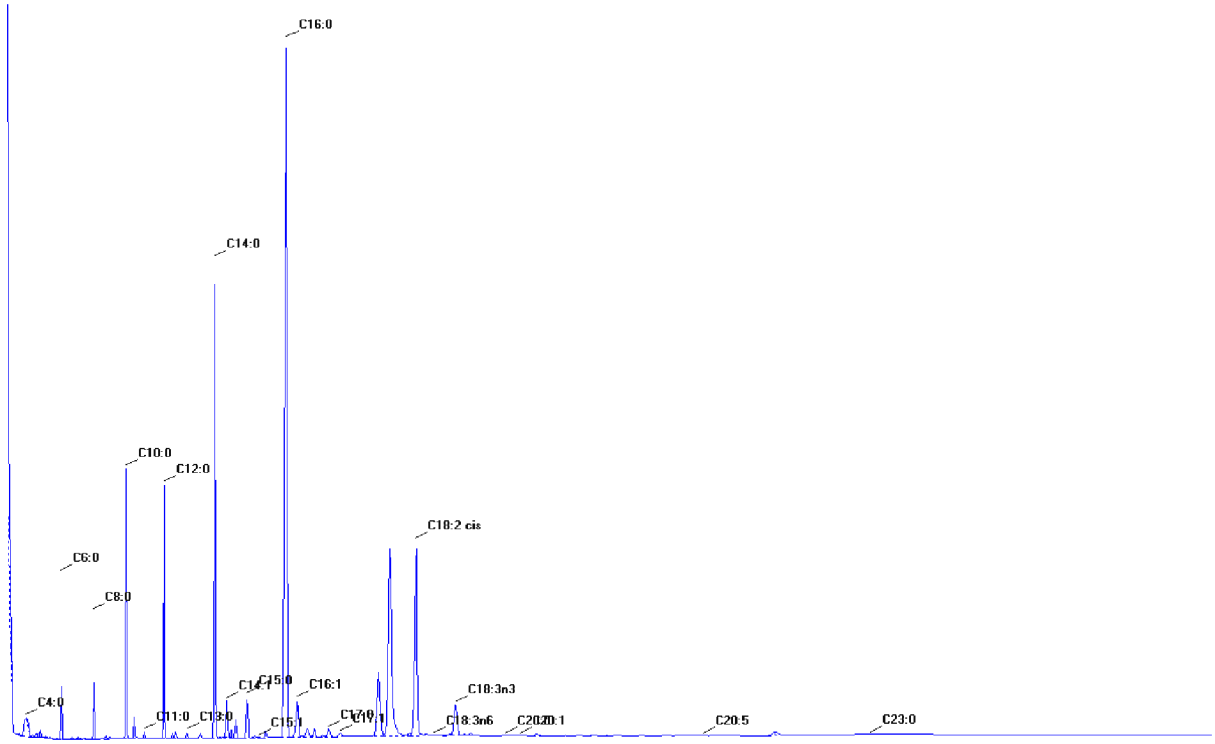
8 PŘÍLOHY

***Tabulka 22**: Standardy použité pro identifikaci a kvantifikaci mastných kyselin*

Název MK	Zkrácený zápis MK	T_R [min]	c_s [mg · ml^{-1}]	P_s [mV · s]	Mr_{MEMK} [g · mol^{-1}]	Mr_{MK} [g · mol^{-1}]
Kyselina máselná	C4:0	**4,35**	0,04	**3125173**	102,133	88,106
Kyselina kapronová	C6:0	**5,59**	0,04	**3194222**	130,187	116,160
Kyselina kaprylová	C8:0	**6,75**	0,04	**4061317**	158,241	144,214
Kyselina kaprinová	C10:0	**7,88**	0,04	**4223169**	186,295	172,268
Kyselina undekanová	C11:0	**8,5**	0,02	**2210409**	200,322	186,295
Kyselina laurová	C12:0	**9,20**	0,04	**4640412**	214,349	200,322
Kyselina tridekanová	C13:0	**10,00**	0,02	**2365835**	228,376	214,349
Kyselina myristová	C14:0	**10,96**	0,04	**4953419**	242,403	228,376
Kyselina myristoolejová	C14:1$^{\Delta 9}$	**11,39**	0,02	**2366989**	240,387	226,360
Kyselina pentadekanová	C15:0	**12,08**	0,02	**2470555**	256,430	242,403
Kyselina *cis*-10-pentadecenová	C15:1$^{\Delta 10}$	**12,59**	0,02	**2447994**	254,414	240,387
Kyselina palmitová	C16:0	**13,41**	0,06	**8071065**	270,457	256,43
Kyselina palmitoolejová	C16:1$^{\Delta 9}$	**13,83**	0,02	**2520590**	268,441	254,414
Kyselina heptadekanová	C17:0	**14,92**	0,02	**2544888**	284,484	270,457
Kyselina *cis*-10-heptadecenová	C17:1$^{\Delta 10}$	**15,40**	0,02	**2489531**	282,468	268,441
Kyselina stearová	C18:0	**16,63**	0,04	**5174886**	298,511	284,484
Kyselina olejová	C18:1$^{\Delta 9}$	**17,06**	0,04	**9238057**	296,495	282,468
Kyselina linolová	C18:2$^{\Delta 9,12}$	**17,96**	0,02	**4897549**	294,479	280,452
Kyselina γ-linolenová	C18:3$^{\Delta 6,9,12}$	**18,62**	0,02	**2376273**	292,463	278,436
Kyselina α-linolenová	C18:3$^{\Delta 9,12,15}$	**19,38**	0,02	**2266846**	292,463	278,436
Kyselina arachová	C20:0	**21,08**	0,04	**4888960**	326,565	312,358
Kyselina *cis*-11-eikosenová	C20:1$^{\Delta 11}$	**21,71**	0,02	**2433557**	322,533	308,506
Kyselina *cis*-11,14-eikosadienová	C20:2$^{\Delta 11,14}$	**23,20**	0,02	**2504386**	322,533	308,506
Kyselina heneikosanová	C21:0	**24,18**	0,02	**4522345**	340,592	326,565
Kyselina *cis*-8,11,14-eikosatrienová	C20:3$^{\Delta 8,11,14}$	**24,99**	0,02	**2016421**	320,517	306,490

Kyselina arachidonová	C20:4$^{\Delta 5,8,11,14}$	**25,55**	0,02	**2213031**	318,501	304,474
Kyselina *cis*-11,14,17-eikosatrienová	C20:3$^{\Delta 11,14,17}$	**25,95**	**0,2**	**17674550**	316,485	302,458
Kyselina behenová	C22:0	**27,68**	0,04	**2046415**	354,619	340,592
Kyselina eikosapentaenová	C20:5	**28,27**	0,02	**4092799**	316,477	302,451
Kyselina eruková	C22:1$^{\Delta 13}$	**29,31**	0,02	**2010098**	352,603	338,576
Kyselina *cis*-13,16-docosadienová	C22:2$^{\Delta 13,16}$	**31,84**	0,02	**1902903**	350,587	336,560
Kyselina trikosanová	C23:0	**33,46**	0,02	**1619779**	368,646	354,619
Kyselina lignocerová	C24:0	**40,90**	**0,4**	**21464940**	382,673	368,646
Kyselina nervonová	C24:1$^{\Delta 15}$	**42,08**	**0,2**	**7602600**	380,657	366,630
Kyselina *cis*-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	C22:6$^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$	**42,64**	**0,2**	**6545812**	342,523	328,496

T_R – retenční čas MEMK, c_s – koncentrace standardů MEMK, P_s – plocha standardů MEMK, Mr_{MEMK} – molekulová hmotnost MEMK, Mr_{MK} – molekulová hmotnost MK



***Obr. 43**: Ukázka chromatogramu GC/FID analýzy čajovníkového oleje*