

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Hana Pospíšilová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza biologicky aktivních látek v plodech kustovnice čínské

Hana Pospíšilová

Bakalářská práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Hana Pospíšilová**
Osobní číslo: **C18070**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Analýza biologicky aktivních látek v plodech kustovnice čínské**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na analýzu významných biologicky aktivních látek obsažených v plodech kustovnice čínské. Věnujte se především způsobům extrakce a dále samotné analýze výsledných extraktů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a jejímu spojení s hmotnostní spektrometrií. Pozornost věnujte rovněž metodám stanovení antioxidační kapacity se zaměřením na látky obsažené v plodech kustovnice.
2. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnotte.
3. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce.

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

Seznam doporučené literatury:

Veškerá dostupná odborná literatura.

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

Datum zadání bakalářské práce: **26. února 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

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

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2021

Hana Pospíšilová

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením biologicky aktivních látek v kustovnici pomocí moderních analytických metod. Na začátku je uveden popis kustovnice čínské a kustovnice cizí, využití a chemické složení kustovnice. Dále jsou zmíněny informace o pozitivních účincích kustovnice na zdraví lidského organismu, stručný popis separace a stanovení látek a informace o metodách sledujících antioxidační aktivitu. Poslední část je věnována analýze biologicky aktivních látek v kustovnici čínské pomocí kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy.

KLÍČOVÁ SLOVA

kustovnice cizí, kustovnice čínská, extrakce, kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza

TITLE

Analysis of biologically active substances in Chinese wolfberry crops

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the determination of biologically active substances in wolfberry using modern analytical methods. In the beginning, there is a description of Chinese wolfberry and foreign wolfberry, their use and chemical composition of. Information on the positive effects of wolfberry on human health, a brief description of the separation and determination of substances, and information on methods for monitoring antioxidant effects are also mentioned. The last part is devoted to the analysis of biologically active substances in the Chinese wolfberry using liquid chromatography and capillary electrophoresis.

KEYWORDS

Barbary wolfberry, Chinese wolfberry, extraction, liquid chromatography, capillary electrophoresis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce paní doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, věnovaný čas, trpělivost a cenné rady při vypracování. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za podporu během celého studia.

OBSAH

Seznam obrázků	9
Seznam zkratek	10
Úvod	12
1 Kustovnice	13
1.1 Obecný popis a druhy	13
1.1.1 Kustovnice čínská (<i>Lycium chinense</i>)	13
1.1.2 Kustovnice cizí (<i>Lycium barbarum</i>)	14
1.1.3 Zpracování a využití kustovnice	14
1.2 Chemické složení plodů kustovnice (goji)	15
1.2.1 Sacharidy	15
1.2.2 Aminokyseliny a proteiny	16
1.2.3 Lipidy	16
1.2.4 Vitaminy	17
1.2.5 Karotenoidy	17
1.2.6 Ostatní sloučeniny	18
1.3 Antioxidanty	18
1.4 Pozitivní účinek goji na lidský organismus	19
1.4.1 Hypoglykemické účinky	20
1.4.2 Hypolipidemické účinky	20
1.4.3 Účinek na sítnici oka a zrak	20
1.4.4 Antiproliferativní účinky	21
1.4.5 Hepatoprotektivní účinky	21
1.4.6 Neuroprotektivní účinky	22
1.4.7 Antibakteriální účinky	22
2 Vybrané metody pro analýzu látek v kustovnici	23
2.1 Stanovení antioxidační aktivity	23
2.1.1 Metoda DPPH	23

2.1.2	Metoda ATBS	24
2.1.3	Metoda FRAP	24
2.1.4	Metoda ORAC	24
2.2	Stanovení celkového obsahu fenolů	25
2.2.1	Metoda dle Folin-Ciocalteu	25
2.3	Extrakce	25
2.3.1	Extrakce z kapaliny do kapaliny	26
2.3.2	Extrakce tuhou fází (metoda SPE)	26
2.3.3	Extrakce tuhé látky kapalinou	27
2.4	Chromatografie	28
2.4.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	28
2.5	Elektroforéza	30
2.5.1	Kapilární elektroforéza	30
3	Analýza biologicky aktivních látek v kustovnici	31
3.1	Úprava vzorku a extrakce látek z kustovnice	31
3.1.1	Extrakce antioxidantů z plodů kustovnice	32
3.2	Separace a stanovení látek z kustovnice	32
3.2.1	Analýza fenolických látek v kustovnici	32
3.2.2	Analýza karotenoidů obsažených v kustovnici	35
3.2.3	Příklady stanovení antioxidační aktivity látek obsažených v kustovnici	36
	Závěr	37
	Použitá literatura	38

SEZNAM OBRÁZKŮ

1	Lycium chinense	13
2	Lycium barbarum	13
3	Plody kustovnice - goji	15
4	Sušené plody kustovnice - goji	15
5	Strukturní vzorec kyseliny L-askorbové.	17
6	Strukturní vzorec Zeaxanthinu.	17
7	Strukturní vzorec betainu.	18
8	Strukturní vzorec kyseliny <i>p</i> -kumarové.	18
9	Strukturní vzorec DPPH.	23
10	Strukturní vzorec ATBS.	24
11	Soxhletův extraktor.	27
12	Schéma separační metody HPLC.	29
13	Chromatogram separace fenolických látek z listů kustovnice čínské	33
14	Strukturní vzorce vybraných látek (kvercetin dihydrát, izorhamnetin, taxifolin, rutin, luteolin, kaemferol).	35

SEZNAM ZKRATEK

DNA	kyselina deoxyribonukleová
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
AH	antioxidant
R [•]	radikál
ATBS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
TEAC	antioxidační kapacita ekvivalentní standardní látce Troloxu (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
FRAP	metoda stanovení antioxidační aktivity založená na redukci železitých komplexů (Feric Reducing Antioxidant Potential)
TPTZ	komplex 2,4,6-tripyridyl-s-triazin
ORAC	metoda založená na absorpci kyslíkových radikálů (Oxygen radical absorbance capacity)
AAPH	2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid
FCM	Folin-Ciocalteuova metoda
SPE	extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
PC	papírová chromatografie (Paper Chromatography)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
UV	ultrafialové záření (UltraViolet)
LBP-s-1	heteropolysacharid obsažený v kůstovnici
LDL	nízkodenzitní lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace (Age-related Macular Degeneration)
LBP	polysacharid <i>L.barbarum</i>
QuEChERS	metoda disperzní extrakce tuhou fází - rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní, bezpečný (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (Ultra-High Performance Liquid Chromatographic)
ELSD	detektor rozptylu světla s odpařováním (Evaporative Light Scattering Detector)
DAD	detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry)

ÚVOD

V posledních letech byl pozorován zájem o tzv. superpotravinu, které obsahují biologicky aktivní látky prospěšné pro lidský organismus. Populárním zástupcem v této oblasti je kustovnice z čeledi lilkovitých rostlin. Známy název „goji“ nebo také „wolfberry“ označuje plody kustovnice čínské (*Lycium chinense*) a kustovnice cizí (*Lycium barbarum*) s přirozeným výskytem v mírných až subtropických částech světa. Plody goji byly využívány v tradiční čínské medicíně, jako léčivý přípravek řadu tisíciletí, bez vykazujících toxických účinků. Goji bylo konzumováno ve formě čerstvého ovoce, dále sušené nebo vařené.

Plody goji jsou bohatým zdrojem biologicky aktivních látek, převážně sacharidů, aminokyselin, lipidů, vitamínů, karotenoidů, minerálních látek, fenolů, polyfenolů a dalších. Pozornost goji získalo především pro vysoký obsah antioxidantů, které zmírňují v těle oxidační stres. Kustovnice čínská vykazuje, kromě antioxidantní aktivity, také řadu pozitivních účinků pro lidský organismus, například: hypoglykemické, hypolipidemické, antiproliferativní, antibakteriální, neuroprotektivní a účinky na oči a zrak.

K analýze biologicky aktivních látek obsažených v kustovnici se používají separační metody. Nejvíce používané jsou kapalinová chromatografie se spektrofotometrickým detektorem nebo hmotnostním spektrometrem a kapilární elektroforéza. Kromě separačních metod lze využít při analýze kustovnice i spektrofotometrické metody, konkrétně ke stanovení antioxidantní aktivity či celkového obsahu polyfenolů.

1 KUSTOVNICE

1.1 Obecný popis a druhy

Kustovnice (*Lycium*) z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) obsahuje přibližně 80 druhů rostlin pocházejících z mírných až subtropických částí světa [1]. Rod *Lycium* pojmenoval Carl Linné v roce 1753. Název pochází ze starověké jižní Anatolské oblasti *Lycia* nebo z latinského slova *lychnus*, což v překladu znamená „světlo“ nebo také „lampa“, pravděpodobně kvůli barvě a tvaru ovoce [2]. Pod názvem „wolfberry“ či „goji“ (godži) jsou označovány plody dvou druhů *Lycia*, kustovnice čínská (*Lycium chinense*) (obr. 1) a kustovnice cizí (*Lycium barbarum*) (obr. 2) [1].



Obrázek 1: *Lycium chinense* [3].



Obrázek 2: *Lycium barbarum* [4].

V následujících podpodkapitolách je uveden podrobnější popis kustovnice čínské (*Lycium chinense*) a kustovnice cizí (*Lycium barbarum*), jejich rozdíly, zpracování a využití.

1.1.1 Kustovnice čínská (*Lycium chinense*)

Lycium chinense je opadavý keř dorůstající výšky 0,5–1 m. Listy jsou kosočtverečné, kopinaté, vždy řapíkaté a obvykle širší než listy kustovnice cizí. Kalich květu je obvykle

rozdělen do 3–5 cípů. Kvete od června do srpna, květy jsou oboupohlavné a opylovány hmyzem [5]. Plody mají červenou barvu a velikost přibližně 1–2 cm. Velikost semen je 2,5–3 mm a jejich počet se liší podle velikosti plodů. Na rozdíl od některých jiných druhů nemá kustovnice čínská trny. Vyskytuje se hlavně v Číně, Tchaj-wanu, Japonsku, Mongolsku, Nepálu, Korei a na některých místech Evropy [1].

1.1.2 Kustovnice cizí (*Lycium barbarum*)

Lycium barbarum je opadavý keř dorůstající do délky 1–2 m. Listy má kopinaté nebo dlouhé eliptické. Kalich květu je obvykle rozdělen do 2 cípů a květ je oboupohlavný. Plody jsou červené nebo oranžové, s podobnou velikostí jako u kustovnice čínské. Semena jsou velká přibližně 2 mm. Vyskytuje se převážně v Číně (Ningxia, Gansu, Qinghai, Xinjiang) [1].

Lycium barbarum a *Lycium chinense* nelze rozeznat podle plodů, ale lze je rozeznat podle tvaru listů, *L. chinense* je má o něco širší a zelenější. Oba druhy rostlin *L. chinense* a *L. barbarum* preferují přímé slunce, ale snášejí i mírný stín. Rostlinám se daří v širokém rozmezí pH půdy, nejlepší jsou pro ně půdy s vysokým podílem písku. Rostliny jsou mrazuvzdorné do -23 °C. Avšak chladné počasí má negativní dopad na kvalitu plodů ovoce [2].

1.1.3 Zpracování a využití kustovnice

Díky vysokému obsahu vitamínů, minerálů a dalších cenných látek bylo *L. barbarum* a *L. chinense* používáno před více než 2500 lety jako bylinný lék v tradiční čínské medicíně. Dnes jsou plody goji (obr. 3 a 4) s oblibou zařazovány mezi tzv. superpotravinu, které obsahují látky s biologickou aktivitou [6].

Goji je v potravinářském průmyslu nejčastěji zastoupeno ve formě sušené a jeho chuť se podobá brusinkám. Plody a listy se konzumují čerstvé, hlavně v asijských zemích a tvoří přísadu řady pokrmů [2]. Z plodů se připravuje pivo, víno, šťávy, čaje, cereálie, tyčinky a další potravinové produkty.

Goji je používáno jako doplněk stravy k prevenci před vznikem rakoviny, onemocnění ledvin, pohlavních orgánů a očí. K léčivým účelům se také používá odvar z kořenové kůry, která obsahuje látky působící antibakteriálně a antipyreticky. Toho se využívá při léčbě zánětů, kožních onemocnění, horečky a kašle [5].

Plody goji mají své uplatnění i v kosmetice, jedním z předních produktů je olej lisovaný za studena nebo různá mýdla a koupelové soli [7]. Kustovnice se využívá také jako okrasná rostlina, díky rozsáhlému kořenovému systému pro stabilizaci půd a písčitých břehů řek [2].



Obrázek 3: Plody kustovnice - goji [8].



Obrázek 4: Sušené plody kustovnice - goji [9].

1.2 Chemické složení plodů kustovnice (goji)

1.2.1 Sacharidy

Sacharidy jsou řazeny mezi nejpočetnější skupinu látek v rostlinách, zvířatech a mikroorganismech. Převážně jsou sacharidy cyklické sloučeniny odvozené od polyhydroxyaldehydů a polyhydroxyketonů s minimálně třemi uhlíkovými atomy. Rozdělují se podle počtu atomů uhlíku ve struktuře např. na triosy, tetrosy nebo podle přítomné funkční skupiny na aldosity, ketosy a dle počtu cukerných jednotek vázaných v molekule na monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy a složené sacharidy. Monosacharidy jsou základní jednotkou složitějších sacharidů a obsahují 3–9 atomů uhlíku. Oligosacharidy jsou složeny ze 2–10 monosacharidových jednotek a polysacharidy z deseti a více monosacharidových jednotek [10].

Goji obsahuje monosacharidy složené převážně z xylózy, glukózy, arabinózy, ramnózy, manózy a galaktózy. Z chemických složek je nejvíce zkoumána skupina ve vodě rozpustných glykokonjugátů, což jsou sacharidy spojené s lipidy glykosidickou vazbou. Podle výzkumů jsou obsaženy v sušeném ovoci z 5–8 % [6]. Polysacharidy extrahované z goji prokázaly pozitivní účinky proti stárnutí, zlepšení krevního oběhu, imunitního systému a při nádorovém onemocnění [11].

1.2.2 Aminokyseliny a proteiny

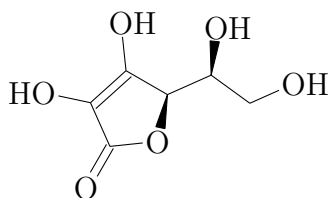
Aminokyseliny patří mezi organické kyseliny obsahující karboxylovou ($-\text{COOH}$) a aminovou ($-\text{NH}_2$) skupinu a rozdělují se na esenciální a neesenciální. Esenciální aminokyseliny jsou do organismu dodávány z potravy. Neesenciální aminokyseliny si živočišný organismus sám syntetizuje. Plody goji obsahují až 18 druhů aminokyselin [11]. Mezi hlavní obsažené a detekované aminokyseliny patří například kyselina glutamová, kyselina asparagová, prolin, alanin, serin, glycin, lysin a tyrosin. Aminokyseliny se podílí na tvorbě bílkovin, neurotransmiterů, hormonů a také na výrobě energie [12]. Aminokyseliny, konkrétně α -aminokyseliny, jsou navzájem spojovány pomocí peptidové vazby za vzniku polypeptidů. Spojením polypeptidů, pomocí peptidové vazby, vznikají molekuly proteinů (bílkovin) [10]. Proteiny se v organismech podílejí na řadě funkcí: obranné (imunoglobuliny), stavební (kolagen), transportní (hemoglobin), katalytické a řídicí například hormony (inzulín) [13].

1.2.3 Lipidy

Lipidy patří do skupiny látek s hydrofóbní povahou, tedy látky nerozpustné v polárních rozpouštědlech (vodě), ale rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Název lipidy označuje převážně látky ze skupiny esterů vyšších mastných kyselin a alkoholů nebo jejich derivátů, jde tedy o takzvané zmýdelnitelné lipidy. Další skupinou látek jsou sloučeniny složené ze zbytku isoprenu označované jako nezmýdelnitelné lipidy. Dle základního složení jsou lipidy děleny na jednoduché (acylglyceroly, vosky), složené (fosfolipidy, glykolipidy, sfingolipidy) a odvozené. Lipidy mají v organismu řadu funkcí. Jsou obsaženy v nervových tkáních, buněčných stěnách a jsou nezbytné pro vstřebávání vitamínů rozpustných v tucích [13].

1.2.4 Vitaminy

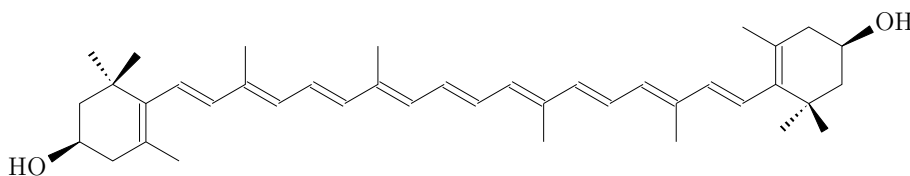
Pojem vitamin označuje nízkomolekulární organické sloučeniny, které jsou součástí rostlin i živočichů a jsou nezbytné pro funkci živých organismů. Rozdělují se podle struktury, funkce a rozpustnosti. Nejčastější rozdělení je podle rozpustnosti na vitaminy rozpustné ve vodě a vitaminy rozpustné v tucích. V organismu jsou vitaminy nezbytné pro růst a reprodukci, většinu z nich je nutno dodávat do organismu potravou nebo pomocí různých doplňků stravy [13]. Plody goji jsou bohaté zejména na vitamin C neboli kyselinu askorbovou (obr. 5). Dále obsahují vitamin B2 (riboflavin), vitamin B3 (kyselina nikotinová a její amid) a vitamin B1 (thiamin) [2]. V listech kustovnice jsou obsaženy vitaminy řady B a vitamin A (retinol) [5].



Obrázek 5: Strukturální vzorec kyseliny L-askorbové.

1.2.5 Karotenoidy

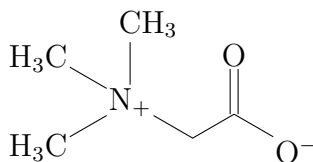
Karotenoidy jsou převážně lipofilní organické látky, řazené do skupiny tetraterpenů s obsahem osmi izoprenových jednotek. Vyskytují se v rostlinách a organismech jako pigmenty (barviva) červené, oranžové a žluté barvy. Rozdělujeme je na dvě základní skupiny: karoteny a xantofyly [13]. V plodech goji bylo detekováno celkem 11 volných karotenoidů a 7 esterů karotenoidů. Převládajícím karotenoidem, který spadá pod skupinu xantofylů, je zeaxanthin (obr. 6), což je žlutý pigment, izomer luteinu a derivát β -karotenu. Zeaxanthin má pozitivní účinek na oční sítnici a chrání makulu (žlutou skvrnu) před degenerací. Ve formě dipalmitátů působí jako ochrana před poškozením jater [6]. Goji obsahuje dále β -karoten, lutein, lykopen, β -kryptozanthin a xantofyl [2].



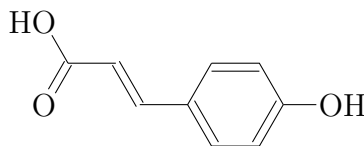
Obrázek 6: Strukturální vzorec Zeaxanthinu.

1.2.6 Ostatní sloučeniny

Plody goji obsahují řadu dalších sloučenin s pozitivními účinky pro lidský organismus. Patří mezi ně například kyselina γ -aminobutanová, trimethylglycin, který je znám pod názvem betain (obrázek 7). Betain přispívá k regulaci homocysteinu v krvi. Dále jsou obsaženy steroidní látky (cholesterol, cholest-7-enol, kampesterol) a fenolické látky z nich je zástupcem například kyselina *p*-kumarová (obrázek 8), která je známá svými antioxidačními vlastnostmi [6]. Plody goji jsou bohaté také na bílkoviny, vlákninu a minerály (železo, vápník, fosfor, draslík, zinek, selen, mangan, kobalt a hořčík) [2].



Obrázek 7: Strukturální vzorec betainu.



Obrázek 8: Strukturální vzorec kyseliny *p*-kumarové.

1.3 Antioxidanty

Řada látek obsažených v kustovnici a popsanych v podkapitole 1.2, má antioxidační účinky, tzn. řadíme tyto látky mezi antioxidanty. Z toho důvodu je tato podkapitola věnována podrobnějšímu popisu antioxidantů.

Antioxidant je látka zpomalující nebo bránící oxidaci jiné látky. Antioxidanty jsou rozděleny na primární, které aktivně inhibují oxidační reakce a sekundární antioxidanty, které inhibují oxidaci nepřímými mechanickými procesy [14]. Dále jsou považovány za inhibitory peroxidace lipidů a díky tomu mají značné uplatnění i v potravinářském průmyslu [15]. Mají funkci konzervačních látek pro prodloužení trvanlivosti a zachování kvality. Závisí to však na mnoha faktorech, například na celkových podmínkách prostředí

(pH, iontová síla) [14]. V medicíně jsou používány pro ochranu lidského organismu před volnými radikály a reaktivním kyslíkem [15]. Výzkumy ukazují, že doplněné antioxidanty mohou mít pozitivní účinky při oxidačních reakcích a působit na lidské tělo protizánětlivě a antikarcinogenně [14]. Neplatí to však pro všechny látky, které se chovají podobně či stejně jako antioxidanty. Například diethylstilbestrol je silným inhibitorem peroxidace lipidů in vitro, avšak in vivo je činidlem poškozujícím DNA s teratogenními účinky [15].

Potraviny obsahují celou řadu antioxidantů, které pozitivně působí in vivo, například karotenoidy, vitaminy, dipeptidy, estrogeny, polyaminy, kyselina fytová, taurin, kreatin a melatonin.

Fenolové a polyfenolové sloučeniny patří mezi nejznámější skupinu antioxidačních látek. Fenoly jsou sloučeniny, které obsahují hydroxy- substituovaný aromatický kruh a jsou rozděleny podle počtu obsažených hydroxyskupin na jednosytné (fenol) a vícesytné (pyrokatechol). Polyfenoly jsou rozděleny podle počtu aromatických kruhů a způsobu vazby mezi aromatickými kruhy na flavonoidy, fenolové kyseliny, stilbeny a lignany [14, 16]. Bohatým zdrojem fenolů a polyfenolů jsou rostliny, které tyto sloučeniny obsahují, například ve formě přítomných tříslovin, kvercetinu, karnosolu, tymolu a kyseliny ellagové [15]. Fenoly a polyfenoly mají pozitivní účinky při léčbě degenerativních onemocnění, kardiovaskulárních chorob a některých druhů rakovin. Výzkumu, který sledoval vztah mezi strukturou fenolů a antioxidační aktivitou prokázal, že nejlepší fenolické antioxidanty jsou takové, které obsahují skupinu donorů elektronů přímo navázaných na aromatický kruh. Dále bylo určeno, že antioxidační aktivita obecně roste se zvyšujícím se počtem fenolových kruhů. To znamená, že polyfenoly jsou účinnější antioxidanty, než monofenoly [14].

1.4 Pozitivní účinek goji na lidský organismus

Plody goji byly používány k léčivým a nutričním účelům řadu staletí, díky vysokému obsahu živin a biologicky aktivním látkám s pozitivním působením na lidský organismus [6, 17]. Plody využívaly převážně obyvatelé asijských zemí. V čínské medicíně má goji dlouhou historii, zejména v léčbě onemocnění očí, ledvin, jater, při chřipce a rakovině. Dále goji vykazuje antioxidační, antibakteriální, imunostimulační, hypoglykemické, antipyretické, neuroprotektivní a hepatoprotektivní účinky [17, 18, 19]. Goji je po staletí prověřenou potravinou bez toxických účinků, avšak mohou se v některých

případech objevit i nežádoucí účinky, například ve formě alergické a anafylaktické reakce. Pozorovaná interakce mezi goji a antikoagulačním lékem warfarinem potvrdila zvýšené krvácení z konečníku a nosu [20]. Jiné ohrožující interakce nejsou v současnosti známy a goji je stále zcela bezpečnou potravinou [21].

1.4.1 Hypoglykemické účinky

Sacharidy jsou nejvíce obsaženou skupinou látek v plodech kustovnice. Pozitivní účinek na snížení hladiny glukózy v krvi je připisován právě polysacharidům, které jsou v sušeném ovoci zastoupeny z 5–8% [22, 23]. Ve studii [24] zaměřené na účinek polysacharidů, byl z plodů *L.barbarum* extrahován a následně detekován heteropolysacharid LBP-s-1. Heteropolysacharid LBP-s-1 byl složen z ramnózy, arabinózy, xylózy, manózy, glukosy, galaktózy a kyseliny galakturonové. Díky experimentům *in vitro* a *in vivo* byly ověřeny hypoglykemické účinky, zmírněním inzulínové rezistence, zvýšením sekrece inzulínu a využití glukózy. Byla podpořena proliferace buněk a zvýšena aktivita klíčových enzymů při metabolismu glukózy. Studie potvrdila, že LBP-s-1 byl i při vysoké dávce netoxický a stal se bezpečným kandidátem pro budoucí léčbu diabetu (cukrovky) [24].

1.4.2 Hypolipidemické účinky

Diabetes mellitus (cukrovka) je v současnosti stále častějším metabolickým onemocněním, které doprovází i následná hyperlipidémie neboli zvýšení hladiny cholesterolu a triglyceridů v krvi. Zvýšená hladina cholesterolu a triglyceridů zvyšuje v krvi hladinu nízkodenzitního lipoproteinu LDL (Low Density Lipoprotein), což následně vede k ateroskleróze a později k srdečnímu infarktu nebo mozkové mrtvici. Biologicky aktivní látky přítomné v kustovnici působí hypolipidemickým účinkem pro organismus, převážně se jedná o polysacharidy, vitamíny a antioxidanty. Testy na hyperlipidemických a diabetických zvířatech potvrdily hypolipidemické účinky po podání extrahovaných látek z plodů kustovnice [22].

1.4.3 Účinek na sítnici oka a zrak

Věkem podmíněná makulární degenerace (AMD) je onemocnění v centrální oblasti sítnice, která má za následek závažné poškození zraku a je hlavní příčinou nevratné ztráty

zraku u lidí starších padesáti let [25]. Příčina onemocnění se připisuje oxidačním procesům iniciovaných světelným zářením a redukcí pigmentu sítnice [26]. Především karotenoidy, konkrétně zeaxanthin a lutein obsažený v plodech goji společně s vitaminy chrání sítnici před poškozením.

Studie zaměřená na degeneraci sítnice a účinnost suplementace plodů goji potvrdila, že po podávání goji dojde ke zvýšení koncentrace zeaxanthinu v sítnici. Dále bylo pozorováno zvýšení optické hustoty pigmentu sítnice, což je hlavní měřítko pro zlepšení funkce sítnice a včasného léčení AMD s pozitivnějším průběhem a dopadem onemocnění na zrakový orgán [27].

1.4.4 Antiproliferativní účinky

Přírodní látky hrají zásadní roli při vývoji mnoha léčiv, včetně léků na rakovinu [28]. Polysacharid *L.barbarum* (LBP) vykazoval antiproliferativní vlastnosti, což jsou pozitivní účinky proti růstu a šíření rakovinných buněk. Podrobnější studie LBP naznačují jeho potencionální využití pro léčbu rakoviny [28, 29].

Karcinom žaludku celosvětově patří mezi nejčastější nádorové onemocnění [30]. Výzkum zabývající se vlivem LBP na rakovinu žaludku potvrdil jeho pozitivní účinek při léčbě v závislosti na použité dávce. Podáváním polysacharidu, došlo ke snížení hmotnosti nádoru a potlačení růstu nádorových buněk v žaludku. LBP dále ovlivňuje syntézu DNA v buňkách rakoviny děložního čípku a zastavuje onkogenní aktivitu. Z výzkumu vyplývá, že mechanismus působení polysacharidu na nádorové buňky je složitý komplex dějů, který je potřeba hlouběji prozkoumat. Dále by mohl výzkum antiproliferativního účinku LBP v budoucnu prokázat pozitivní účinek i u jiných druhů rakovin [29].

1.4.5 Hepatoprotektivní účinky

Hepatotoxiny jsou látky, které poškozují jaterní buňky a následně způsobují onemocnění jater. Mezi hepatotoxiny patří například alkohol, tetrachlormethan, pesticidy a také různé druhy léčiv. Výše zmíněné biologicky aktivní látky obsažené v kustovnici prokazatelně chrání játra před poškozením [31, 32]. Účinky vodného extraktu z plodů kustovnice čínské byly zkoumány na krysách s poškozenými játry vlivem tetrachlormethanu. Výsledkem experimentu při podávání extraktu z plodů kustovnice

bylo snížení hladiny aspartátu, alaninaminotransferázy a alkalické fosfatázy v séru. Tento hepatoprotektivní účinek byl potvrzen následným histologickým pozorováním. Dále se extrakt významně podílel na aktivitě zachycování hydroxidových radikálů, což může na základě výsledků také souviset s hepatoprotektivními účinky [31].

1.4.6 Neuroprotektivní účinky

Ovoce kustovnice čínské je ve východní Asii tradičně používáno zejména proti stárnutí [33]. Nedávné studie popsaly ochranný účinek proti poškození neuronových buněk a paměťových deficitů vyvolaných trymethylcínem, který působí jako silné neurotoxikum [34]. Dále kustovnice čínská významně chrání neurony před toxicitou peptidů [35]. Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění, které způsobuje pokles kognitivních funkcí (myšlení, paměť, pozornost). Příznaky se postupně zhoršují s narůstajícím věkem [36]. V současné době jsou dostupné léky, které mají řadu nežádoucích účinků a nezaměřují se na patogenezu onemocnění. Proto je potřeba hledat nové příznivější potencionální léčiva. Provedené studie prokázaly, že léčba pomocí kustovnice vedla k obnovení prostorového učení a paměťové funkce u myší. Díky prokázaným účinkům je kustovnice čínská potencionálním alternativním léčivem pro léčbu Alzheimerovy choroby [37].

1.4.7 Antibakteriální účinky

Výtažky z listů kustovnice čínské jsou velmi dobrým zdrojem fenolových a polyfenolových sloučenin i jiných, například minerálních látek. Právě fenolové sloučeniny prokázaly účinky proti široké škále antimikrobiálních látek a patogenním mikrobům [38]. V několika studiích bylo pozorováno snížení mikrobiálních populací po aplikaci extraktu z kustovnice [39]. Například obsažená kyselina *p*-hydroxybenzoová účinně inhibovala růst bakterie *Staphylococcus aureus* [40]. Jiná studie potvrdila účinek přítomné kyseliny chlorogenové proti bakteriím: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. Pozorované sloučeniny z kustovnice způsobily zvýšení propustnosti plazmatické membrány patogenních mikroorganismů, což následně vedlo k jejich smrti [41].

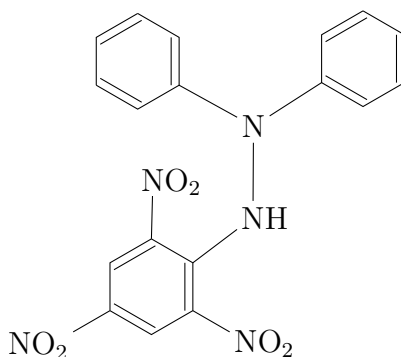
2 VYBRANÉ METODY PRO ANALÝZU LÁTEK V KUSTOVNICI

2.1 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidanty pomáhají chránit organismus před volnými radikály. Pro stanovení antioxidační aktivity byly navrženy metody založené na přímé reakci studované molekuly s radikály nebo reakcemi s přechodnými kovy [42].

2.1.1 Metoda DPPH

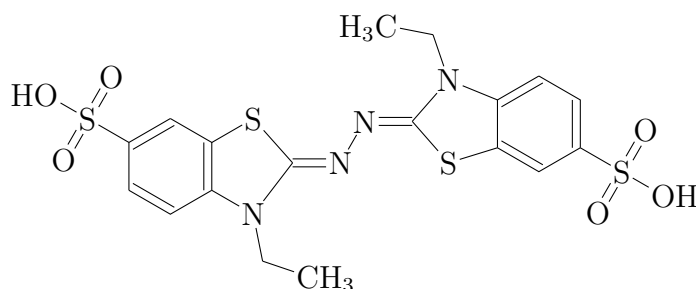
Metoda založená na schopnosti volného radikálu DPPH (2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu) reagovat s donorem vodíku [42]. Při tomto testu se roztok radikálu, který má fialové zbarvení odbarví reakcí s antioxidantem AH [43]. Reakce je sledována spektrofotometricky a absorbance se měří při 515 nm vlnové délky [42]. Jako standardní antioxidant se používá látka nazvaná Trolox a výsledek měření se vyjadřuje jako ekvivalent Troloxu [43]. Níže se nachází zápis radikálové reakce metody DPPH (rovnice 1 a 2) a strukturní vzorec reagující látky DPPH (obr. 9).



Obrázek 9: Strukturní vzorec DPPH.

2.1.2 Metoda ATBS

Metoda ATBS, také označovaná TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), je založena na schopnosti látky nebo vzorku zhaset radikálový kation $\text{ATBS}^{+\cdot}$ z původní modrozelené barvy na bezbarvou formu [42]. Tento radikál vzniká oxidací pomocí peroxodisíranu draselného nebo oxidu manganického [43]. Zhášení radikálu díky antioxidantům je sledováno spektrofotometricky při 734 nm [42]. Výsledná antioxidační aktivita je přepočtena na koncentraci standardu Trolox [43]. Strukturální vzorec ATBS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)] je uveden na obrázku 10.



Obrázek 10: Strukturální vzorec ATBS.

2.1.3 Metoda FRAP

Metoda FRAP (Feric Reducing Antioxidant Potential) stanovuje antioxidační aktivitu pomocí redukce železitých komplexů, například 2,4,6-tripyridyl-s-triazinem (TPTZ) s hexakynoželezitanem draselným $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ nebo chloridem železitým FeCl_3 [42]. Antioxidanty mohou redukovat komplex Fe^{3+} -TPTZ na modrý komplex Fe^{2+} -TPTZ. Monitoruje se intenzita vznikajícího modrého komplexu při absorpenci 593 nm [43, 44]. Tato metoda však není schopna detekovat pomalu reaktivní polyfenolové sloučeniny a thiole [42].

2.1.4 Metoda ORAC

Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) je fluorescenční metoda, která je založená na schopnosti antioxidantů eliminovat kyslíkové a peroxylové radikály. Peroxylový radikál lze indukovat 2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochloridem (AAPH)

[43, 45]. Reakce je detekována pomocí sledování úbytku fluorescence β -fykoerytrinu po ataku radikály [45].

2.2 Stanovení celkového obsahu fenolů

2.2.1 Metoda dle Folin-Ciocalteu

Metoda je založená na chemické redukci směsi oxidů wolframu a molybdenu, pomocí činidla Folin-Ciocalteu. Produkty redukce oxidu kovu mají modré zabarvení, které má širokou absorpci světla s maximem při vlnové délce 765 nm [46]. Standardní látky pro měření mohou být kyselina gallová, kyselina ferulová nebo katechin [43]. Hlavní výhodou je rychlost testování velkého počtu vzorků pro stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin. Nevýhodou metody může být nespecifičnost, kdy metodu může výjimečně ovlivnit jiná nefenolová redukční látka [46].

2.3 Extrakce

Extrakce je separační metoda, která se řídí Nernstovým zákonem. Rozpuštěná látka je rozptýlena mezi dvě navzájem nemísitelné fáze ve stejném poměru za předpokladu konstantní teploty a tlaku [47].

Z toho plyne, že fáze 1 obsahující rozpuštěnou látku S se uvede do kontaktu s druhou navzájem nemísitelnou fází 2, látka S je následně rozdělena mezi dvě fáze následovně:



Rovnovážná konstanta pro reakci se nazývá distribuční konstanta, nebo také rozdělovací koeficient K_D , který je vyjádřen vztahem:

$$K_D = \frac{[S_{\text{fáze2}}]}{[S_{\text{fáze1}}]}. \quad (4)$$

Je-li rozdělovací koeficient dostatečně velký, rozpuštěná látka se přesune z fáze 1 do fáze 2. Pro zahrnutí odchylek při extrakci je používán rozdělovací poměr q [48]

$$q = \frac{c_2}{c_1}. \quad (5)$$

Extrakci lze rozdělit podle způsobu provedení na jednostupňovou (např. protřepávání směsi nemísitelných látek v dělicí nálevce), vícestupňovou a kontinuální. Z hlediska typů extrakčních soustav a podle skupenství obou fází, lze extrakci dělit na: kapalina-kapalina a pevná látka-kapalina. Polarita zvoleného rozpouštědla musí přibližně odpovídat i polaritě extrahované látky. Lipofilní látky lze extrahovat následujícími způsoby: extrakce dle Soxhleta, zrychlená extrakce rozpouštědlem a extrakce kapalina-kapalina. Hydrofilní látky jsou převážně extrahovány pomocí extrakce tuhou fází (SPE, Solid Phase Extraction), díky vysoké selektivitě metody a nízké spotřebě organických rozpouštědel. Dále mohou být extrahovány pomocí metody disperzní extrakce tuhou fází QuEChERS (rychlé, jednoduché, levné, efektivní, robustní a bezpečné - Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) [49].

2.3.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce kapalina-kapalina je někdy nazývána extrakce rozpouštědlem [47]. Je to separační metoda založená na přechodu rozpuštěné látky v kapalině do druhé navzájem nemísitelné kapaliny [50]. Obvykle je rozpouštědlem vodný roztok a vzorek je extrahován do organického nemísitelného rozpouštědla (např. hexan, ether, chloroform). Po ustanovení rovnováhy extrakce je poměr koncentrací rozpuštěné látky v obou fázích konstantní [49]. Mezi faktory ovlivňující rovnováhu patří: úprava pH, přídavek solí, přídavek kovových iontů a přídavek komplexotvorných činidel [51]. Nejčastější způsob provedení extrakce kapalina-kapalina je pomocí třepání v dělicí nálevce [49].

2.3.2 Extrakce tuhou fází (metoda SPE)

Extrakce tuhou fází je separační technika, jejíž princip spočívá v zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, kterým protéká vzorek. SPE metoda závisí na rozdílech afinity různých složek vzorku k sorbentu [47].

Ve srovnání s extrakcí rozpouštědlem je SPE metoda relativně nová technika, která se velmi rychle stala jednou z hlavních metod pro předúpravu i pro přečištění vzorku. Jedná se o vzorky obsahující vysoké množství složek matrice jako jsou soli, proteiny, polymery a dehty [52].

Metoda využívá prakticky identického mechanismu se sorpčním procesem, který tvoří základ kapalinové chromatografické separace [48]. Mezi konkrétní příklady

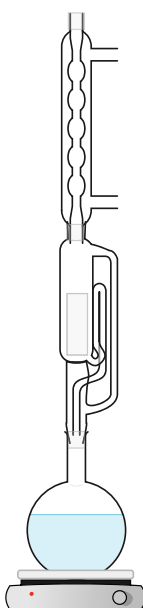
použití metody patří stanovení pesticidů a herbicidů v půdách i vodách. Také stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v pitných vodách nebo stanovení léků v biologických tekutinách [52].

Nejčastěji se při SPE extrakci používají univerzální sorbenty na bázi modifikovaného silikagelu [47]. Obecná SPE metoda má tyto kroky, nejprve příprava kolony (kondicionace rozpouštědlem), dále nanášení vzorku, promývání roztoku (eluce matrice) a v posledním kroku vymytí (eluce analytu) [48].

2.3.3 Extrakce tuhé látky kapalinou

Extrakce z pevné fáze do kapaliny může probíhat jako macerace, při níž se tuhá fáze rozmíchá s rozpouštědlem a po nějaké době se zfiltruje. Při extrakci může být použito horké nebo studené rozpouštědlo a průběh je diskontinuální nebo kontinuální [48].

Extrakce za použití Soxhletova extraktoru (obr. 11) patří mezi nejčastější extrakce tuhé látky kapalinou. Do střední části přístroje je vložena papírová extrakční patrona naplněna vzorkem. Baňka je naplněna vhodným rozpouštědlem, v němž se rozpouští složka, kterou potřebujeme oddělit. Zahříváním baňky vzniklé páry rozpouštědla kondenzují a kapou na vzorek v papírové patroně. Postupně hladina rozpouštědla stoupá v přepadové trubičce, až roztok přeteče do destilační baňky a celý proces se opakuje. V poslední fázi se získaný roztok obsahující jednu nebo více složek nechá odpařit a tím se odstraní použité rozpouštědlo [49, 48].



Obrázek 11: Soxhletův extraktor.

2.4 Chromatografie

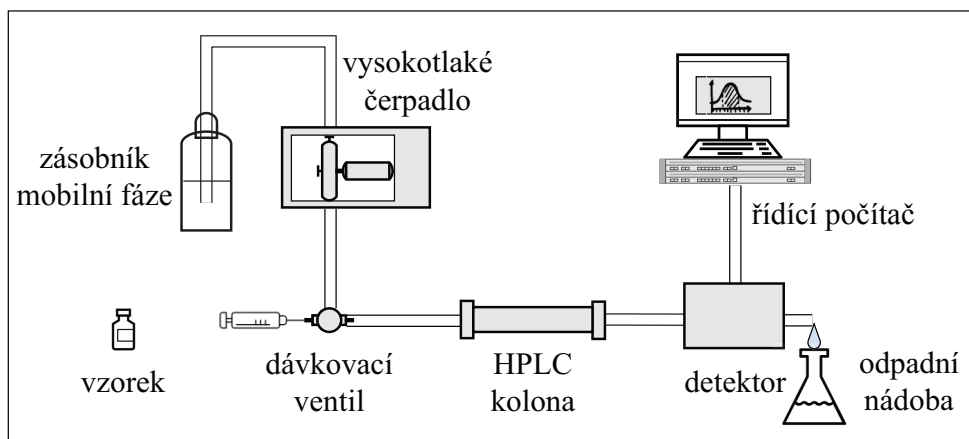
Chromatografie je separační metoda používaná k oddělování složek směsí, které jsou rozděleny mezi fázi nepohyblivou (stacionární) a fázi pohyblivou (mobilní) [52]. Směs látek nadávkovaných do proudu mobilní fáze je unášena přes stacionární fázi, kde dochází k interakcím látky jak s mobilní tak se stacionární fází. Jednotlivé látky migrují mezi stacionární a mobilní fází v závislosti na jejich distribučním koeficientu a dochází k nekonečně rychlému ustavování rovnováhy. Pořadí eluce látek je závislé na afinitě k jednotlivým fázím. Pokud má látka silnou afinitu ke stacionární fázi je silně zadržována a eluuje později, pokud má silnější afinitu k mobilní fázi eluuje dříve [47]. Chromatografii rozdělujeme na několik druhů, nejjednodušší a nejlevnější je papírová chromatografie (PC, Paper Chromatography) a tenkovrstvá chromatografie (TLC, Thin Layer Chromatography). Obě tyto metody jsou nízkonákladové na vybavení a činidla. Pro složitější separaci těkavých a netěkavých látek ve směsi je nejvhodnější plynová chromatografie (GC, Gas Chromatography) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) [52].

2.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je technika používaná pro separaci netěkavých látek ve směsích [52]. Rozdělení směsí je dáno průchodem vzorku přes kolonu obsahující stacionární fázi a tlakovým tokem kapalné mobilní fáze. Přičemž pořadí eluce závisí na síle interakcí separovaných látek jak se stacionární tak mobilní fází [47].

Stacionární fáze je tvořena pevnými adsorbenty, chemicky modifikovanými adsorbenty a iontoměniči [52]. HPLC zařízení se skládá ze zásobníku mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a řídicího počítače. Základní schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie je na obr. 12.

Výběr vhodné mobilní fáze je rozhodující pro celou chromatografickou separaci. Podle polarity použitých fází lze kapalinovou chromatografii klasifikovat na chromatografii v systémech s normálními fázemi a chromatografii v systémech s obrácenými fázemi. Pro separace v systémech s normálními fázemi platí, že mobilní fáze je nepolární (např. hexan) a stacionární fáze je polární. Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi používá mobilní fázi polární (methanol nebo acetonitril s vodou) a stacionární fázi



Obrázek 12: Schéma separační metody HPLC.

nepolární [47]. Rozpouštědla jsou dávkována po odplynění a filtraci pomocí vysokotlakého čerpadla s konstantním průtokem [52].

Kapalné vzorky jsou dávkovány pomocí injekční stříkačky do nerezového dávkovacího ventilu, který se skládá z rotujícího centrálního bloku. V pozici „plnění“ se vzorek nadávkuje do smyčky o různém objemu a mobilní fáze je vedena přímo do kolony. Otočením centrálního bloku do pozice „dávkování“ je vzorek vymýván mobilní fází ze smyčky na kolonu. Vrácení bloku do původní polohy umožňuje analýzu dalšího vzorku [47]. Pro sériové rutinní analýzy jsou používány automatické dávkovače, neboli autosamplery, které jsou řízeny počítačem bez manuální obsluhy [52].

Kolony pro HPLC jsou rovné trubice o délce 5–25 cm vyrobené z nerezové oceli [52]. Kolony jsou plněny stacionární fází, která je na každém konci udržována pomocí tenké frity. Jako stacionární fáze je vhodné použít nemodifikovaný nebo chemicky modifikovaný mikročásticový silikagel (3,5 nebo 10 μm). Částice, které jsou zcela porézní, mohou mít sférický nebo nepravidelný tvar. Je nezbytné, aby rozsah velikostí byl co nejužší, aby byla zajištěna vysoká účinnost a propustnost kolony [47].

Detektor pro HPLC by měl mít rychlou odezvu na rozpuštěné látky, vysokou citlivost a stabilitu provozu [47]. Detektory sledující koncentraci separovaných složek se v HPLC řadí na: spektrofotometrické, fluorescenční, refraktometrické, vodivostní a elektrochemické [52]. Nejčastěji používané detektory jsou spektrofotometrické, které jsou založené na absorpci ultrafialového nebo viditelného záření [47]. Detektor generuje elektrický signál, který může být zesílen a prezentován ve formě chromatogramu [52].

2.5 Elektroforéza

Elektroforéza je separační technika, při které je analyt rozdělován pomocí migrace částic, nesoucí elektrický náboj v elektrickém poli. Elektrické pole je vytvořeno vložením stejnosměrného napětí mezi dvě elektrody.

Elektroforézu lze rozdělit na volnou a zónovou elektroforézu na nosičích. Volná elektroforéza se provádí ve vodném roztoku, kde částice putují k elektrodě s opačnou polaritou. Zónová elektroforéza na nosičích používá nosiče hydrofilní (nerozpustné ve vodě) s co nejmenšími adsorpčními vlastnostmi. Dříve byl jako nosič používán papír, škrob nebo celulóza. Nyní jsou používány převážně gely např. agarózový a polyakrylamidový. Gelová elektroforéza se velmi často používá v oboru biochemie, konkrétně například pro sekventaci DNA [48, 53].

2.5.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza CE (Capillary Electrophoresis) využívá elektrokinetický princip elektroforézy a elektroosmózy k separacím látek uvnitř kapiláry. Přístrojové vybavení pro kapilární elektroforézu obsahuje zdroj elektrického pole, anodovou a katodovou komoru obsahující zásobník roztoku pufru, kapiláru, detektor a vzorek, který chceme analyzovat. Kapilára, ve které probíhá separace je tvořena převážně z křemene a je potažena vrstvou polyimidu. Konce kapiláry se ponoří do zásobníku roztoku pufru. Mezi ponořené elektrody v roztoku pufru je aplikováno napětí a následně vzniká elektroosmotický tok kapaliny kapilárou. Analyzovaný vzorek se dávkuje na jeden konec kapiláry a na druhém konci je umístěn detektor. Výsledkem je elektroforegram, který zaznamená migrační čas látek a pomocí zobrazených píků, je určena kvalita i kvantita analytů. Hlavní výhodou této techniky je možnost odvodu tepla během separace a použití vysokého napětí v rozmezí 25–30 kV, což zvýší separační účinnost a sníží dobu separace [48, 53, 54].

3 ANALÝZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V KUSTOVNICI

Výše v textu bylo zmíněno, že všechny části rostliny kustovnice čínské (kořeny, stonky, listy a plody) obsahují biologicky aktivní látky. Kustovnice je díky těmto látkám, využívána v čínské medicíně jako doplněk stravy, v kosmetických produktech a v potravinářství [6, 7].

Následující podkapitoly popisují úpravu, podmínky a účinné metody, kterými lze biologicky aktivní látky v kustovnici stanovit.

3.1 Úprava vzorku a extrakce látek z kustovnice

Pro analýzu biologicky aktivních látek v kustovnici čínské jsou nejčastěji používány plody nebo listy. Plody i listy je nutné před samotnou extrakcí upravit. Lze použít čerstvé ovoce, které se nakrájí, rozmělní nebo rozdrťí [55]. Nicméně, nejčastěji jsou plody a listy před extrakcí upravovány sušením, při pokojové nebo zvýšené teplotě nebo lyofilizací. Použitá sušicí technika může mít následně vliv na kvalitu obsahu extrahovaných složek. Klasické sušení se zvyšující teplotou má například negativní vliv na obsažený β -karoten a jeho následnou extrakci [56]. Následně jsou sušené plody rozemlety na jemný prášek, například v kulovém mlýně a je provedena extrakce [57].

Výběr vhodného rozpouštědla je založen na chemické podstatě a polaritě extrahovaných sloučenin. Pro extrakci jsou široce používány polární a středně polární rozpouštědla, jako je voda, ethanol, methanol, propanol, aceton a jejich vodné směsi. Další důležitou roli v účinnosti extrakce hraje koncentrace extrakčního rozpouštědla, teplota extrakce, doba extrakce a pH, přičemž použité rozpouštědlo představuje nejvlivnější faktor [44, 58, 59].

Pro potraviny a léčivé rostliny jsou používány extrakce s horkou vodní lázní, macerace a extrakce dle Soxhleta. Nevýhodou těchto extrakcí je vysoká spotřeba organických rozpouštědel, časová náročnost a nižší výtěžky [44, 60]. Cílem extrakce je získat největší výtěžek s použitím ekonomicky nejvýhodnějšího způsobu. Extrakce, které mají sníženou spotřebu organických rozpouštědel jsou například: ultrazvukové extrakce, mikrovlnné extrakce, extrakce za použití pulzního elektrického pole, extrakce se superkritickou tekutinou a další [44].

3.1.1 Extrakce antioxidantů z plodů kustovnice

Antioxidanty lze rozdělit na rozpustné ve vodě a rozpustné v tucích. Antioxidanty rozpustné ve vodě se extrahují například s použitím vody, ethanolu, methanolu a acetonu. Antioxidanty rozpustné v tucích se extrahují například s použitím hexanu, benzenu a dalších organických rozpouštědel [44, 58, 59].

Studie zaměřená na antioxidanty obsažené v plodech goji, testovala několik extrakčních rozpouštědel (methanol, acetonitril, diethylether, směsi organického rozpouštědla a vody v různých poměrech). Bylo zkoumáno, jak adekvátně oddělit antioxidantní sloučeniny v relativně krátkém čase, aby postupy extrakce byly jednoduše proveditelné. Pro stanovení antioxidantů obsažených v plodech goji bylo nejúčinnější extrakční rozpouštědlo – směs methanolu a vody v poměru (80:20) [57].

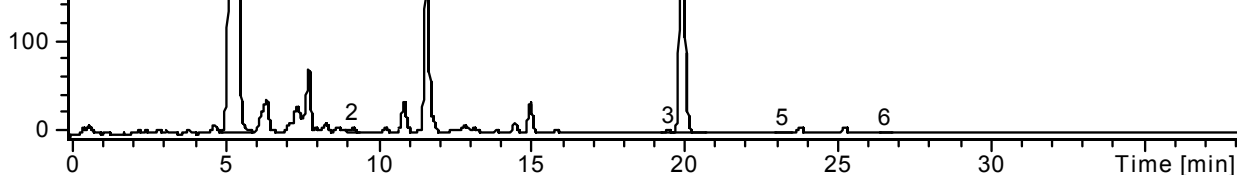
3.2 Separace a stanovení látek z kustovnice

Nejběžnější metodou, která se využívá pro stanovení chemických sloučenin v kustovnici je kapalinová chromatografie. Jedná se převážně o HPLC a ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatographic). Pro detekci je používán například spektrofotometrický detektor (UV), hmotnostní spektrometr (MS) nebo detektor rozptylu světla (ELSD) [57, 61, 62].

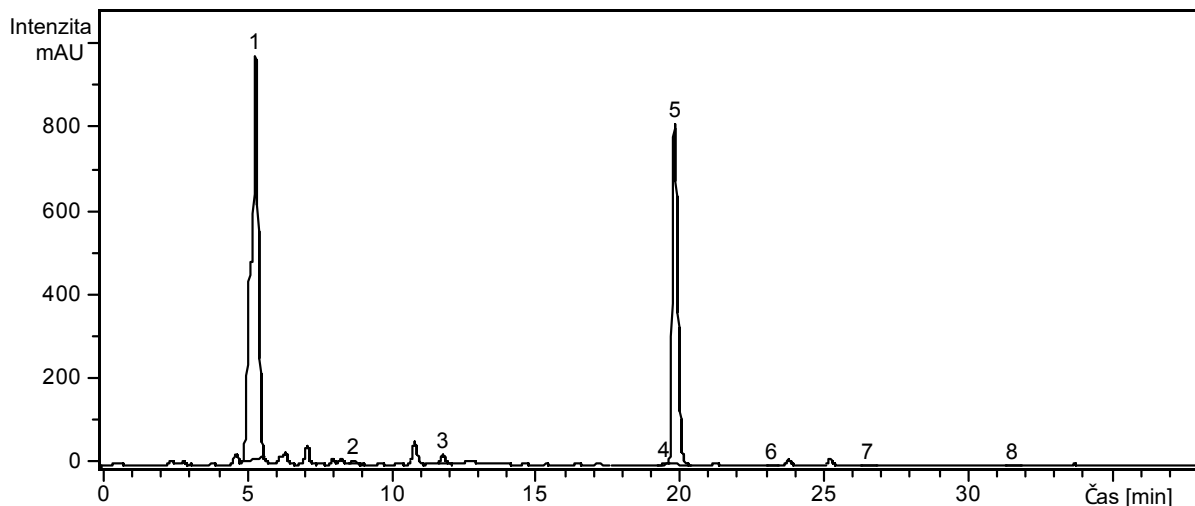
3.2.1 Analýza fenolických látek v kustovnici

Fenolické a polyfenolické sloučeniny patří mezi skupinu biologicky aktivních látek obsažených v kustovnici čínské s prokázanými antioxidantními vlastnostmi pro lidský organismus [61]. Analýza se nejčastěji provádí v systémech s obrácenými fázemi, s použitím UV nebo MS detektoru [63]. Nejpoužívanější mobilní fáze pro separaci polyfenolických sloučenin je methanol, acetonitril, ethanol a další [61]. V plodech i listech kustovnice jsou zastoupeny flavonoidy, jako je například kvercetin, rutin, kaempferol a fenolové kyseliny [63].

V ethanolovém extraktu z listů kustovnice čínské (obr. 13) bylo pomocí HPLC/MS identifikováno osm fenolických sloučenin: kyselina chlorogenová, kyselina *p*-kumarová, kyselina ferulová, isokvercitrin, rutin, kvercitrin, kvercetin a kaempferol. Během chromatografie byla použita mobilní fáze složená z methanolu a 0,1% kyseliny octové.



Notes: Chromatographic conditions as given in the Experimental Section. Identified compounds: 1, Chlorogenic acid; 2, *p*-Coumaric acid; 3, Isoquercitrin; 4, Rutin; 5, Quercitrin; 6, Quercetin
 Obrázek 13: Chromatogram separace fenolických látek z listů kustovnice čínské [63].
 (1) kyselina chlorogenová, (2) kyselina *p*-kumarová, (3) kyselina ferulová, (4) isokvercitrin, (5) rutin,
 (6) kvercitrin, (7) kvercetin a (8) kaempferol



Notes: Chromatographic conditions as given in the Experimental Section. Identified compounds: 1, Chlorogenic acid; 2, *p*-Coumaric acid; 3, Ferulic acid; 4, Isoquercitrin; 5, Rutin; 6, Quercitrin; 7, Quercetin; 8, Kaempferol. (6) kvercitrin, (7) kvercetin a (8) kaempferol

Gentisic, caffeic, chlorogenic, *p*-coumaric, ferulic acids were identified in the ethanolic extract of *L. barbarum*, and chlorogenic and *p*-coumaric acids were quantified ($5899.29 \pm 446 \mu\text{g/g}$, $30.29 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$). Duan *et al.* determined the amount of gentisic acid from *L. barbarum* leave methanolic extracts by using a capillary electrophoresis method [49]. Regarding the presence of caffeic, chlorogenic, *p*-coumaric and ferulic acids, this is the first report that mentions the presence of caffeic and ferulic acids and quantifies chlorogenic and *p*-coumaric acids in *L. barbarum* leaves. Among the identified flavonoid glycosides, rutin is the main flavonoid in *L. barbarum* leaves ($5646.66 \pm 332 \mu\text{g/g}$), as already reported by Dong *et al.* [20] and Duan *et al.* [49] and its amount is lower than those authors stated. One flavonoid aglycone, quercetin, could be quantified ($5.59 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$) and no previous data was found regarding its presence in *L. barbarum* leaves.

Cílem studie [57] byla optimalizace snadné a účinné separace látek s antioxidačními účinky, pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS (Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry). Pro separaci byly testovány různé chemicky vázané stacionární fáze s počtem uhlíků C8 nebo C18. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na koloně s chemicky vázanou oktadecylsilikagelovou stacionární fází a směsné kolony s vrstvou anorganického materiálu.

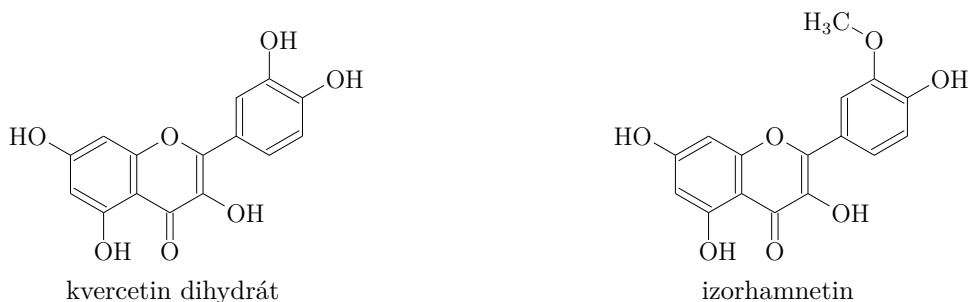
Dále byly testovány těkavé přísady do mobilní fáze (kyselina mravenčí a kyselina octová) v různých koncentracích a použití acetonitrilu nebo methanolu, jako organického rozpouštědla. Ačkoli nebylo dosaženo úplného rozlišení pro všechny píky testovaných analytů, použití 0,25% kyseliny mravenčí poskytlo ve srovnání s jinými roztoky nejlepší výsledky.

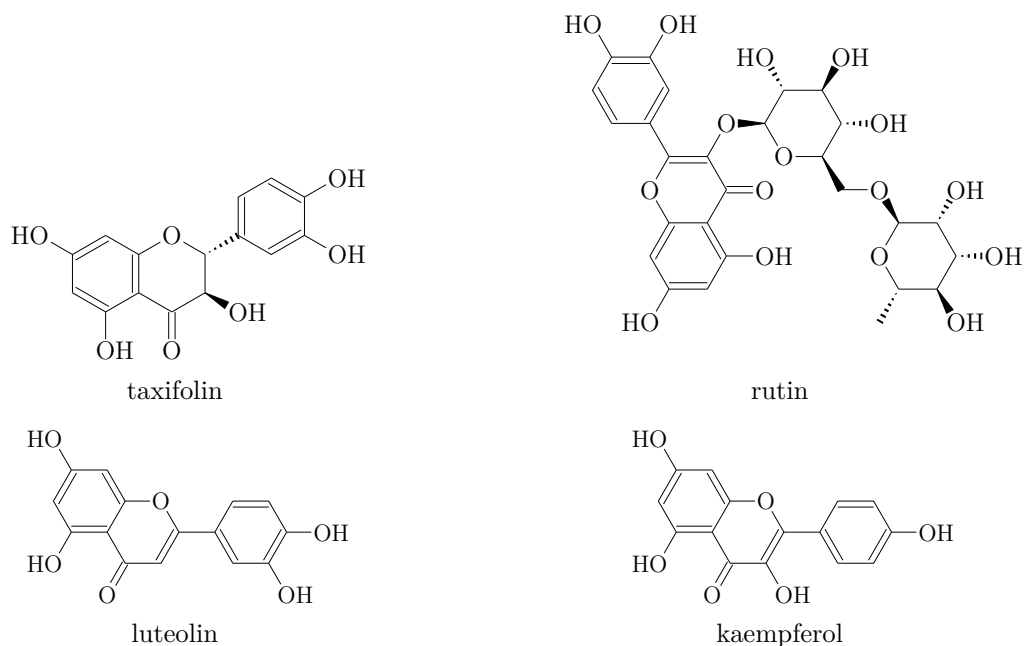
Pomocí LC-MS/MS byly separovány a stanoveny převážně zástupci flavonoidů, flavan-3-olů, fenolových kyselin, karotenoidů, aminokyselin a jejich derivátů. Fenolové kyseliny a flavonoidy byly prokazatelně více zastoupeny než karotenoidy [57].

K separaci fenolických látek obsažených v kustovnici lze využít i kapilární elektroforézu. Kapilární elektroforéza je populární analytická metoda, která se vyznačuje malou spotřebou vzorku, vysokým rozlišením a rychlou analýzou [48, 54].

Ve studii zaměřené na stanovení flavonoidů v plodech goji s využitím kapilární elektroforézy, byly nové kapiláry před měřením stabilizovány promytím pomocí methanolu a dále roztokem hydroxidu sodného, kyselinou chlorovodíkovou a na závěr destilovanou vodou. Při analýze aniontů je zpravidla základním elektrolytem borax (oktahydrát tetraboritanu sodného). Pro dosažení optimální separace flavonoidů byl zde použit borátový pufr o pH 9,0, který byl obohacen přídatkem 10% roztoku methanolu [64].

Pro analýzu flavonoidů byl použit extrakt získaný ze sušených plodů goji. Systém kapilární elektroforézy byl vybaven kapilárou z taveného oxidu křemičitého s účinnou délkou 40 cm a celý experiment se prováděl při teplotě 20 °C. Pomocí kapilární elektroforézy bylo detekováno šest flavonoidů (obrázek 14): kvercetin dihydrát, izorhamnetin, taxifolin, rutin, luteolin a kaempferol. Pro analýzu chemických sloučenin rostlinných extraktů, představuje kapilární elektroforéza alternativu k použití HPLC [64].





Obrázek 14: Strukturální vzorce vybraných látek (kvercetin dihydrát, izorhamnetin, taxifolin, rutin, luteolin, kaempferol).

3.2.2 Analýza karotenoidů obsažených v kustovnici

Kustovnice čínská je bohatým zdrojem karotenoidů, konkrétně se jedná například o β -karoten, zeaxanthin a zeaxanthin dipalmitát [6]. Karotenoidy jsou nejčastěji analyzovány pomocí HPLC metody a detekovány spektrofotometrickým detektorem nebo hmotnostním spektrometrem. Optimální mobilní fáze pro stanovení je například acetonitril a dichlormethan v poměru 42:58 [65], nebo acetonitril a ethanol v poměru 70:30 [66]. Nejčastější stacionární fází představuje chemicky vázaný octadecylsilikagel [57].

Karotenoidy lze snadno detekovat, avšak jejich analýza je v některých ohledech náročná, například z hlediska nestálosti látek. Celkově má skladování, vzorkování, manipulace a doba analýzy rozhodující vliv na celkový výsledek [67]. Velkou pozornost kustovnice získala díky obsaženému karotenoidu zeaxanthin dipalmitátu, který prokázal pozitivní účinky v oblasti očních onemocnění [27].

Právě analýzou tohoto karotenoidu se zabýval Karioti a kol. [68], kteří využili HPLC ve spojení se spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem. Při úpravě vzorku byl použit kapalný dusík, který umožnil snadnější mletí plodů goji. Úpravou pomocí ultrazvuku byly účinně odstraněny polysacharidy. Následně byly karotenoidy extrahovány směsí hexanu a acetonu v poměru (50:50). Celá metoda byla v závěru validována [68].

3.2.3 Příklady stanovení antioxidační aktivity látek obsažených v kustovnici

Porovnáním různých metod stanovení antioxidační aktivity (DPPH, ABTS, ORAC a elektrochemickou metodou) se zabývala studie [57].

Spektrofotometrickou metodou ABTS pro stanovení antioxidační aktivity, byly zaznamenány hodnoty absorbance při 732 nm. Výsledná data byla zpracována pomocí procentuální inhibice:

$$\%A = \frac{[1 - A_{\text{vzorek}}]}{[A_{\text{slepý vzorek}}]} \cdot 100. \quad (6)$$

Výsledek testu byl vyjádřen v μmol vitamínu C, ekvivalentu g^{-1} ke srovnání s kalibrační čarou získanou pro zvolený standard.

Metodou DPPH byla měřena schopnost vychytávání antioxidantů vůči stabilnímu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyllovému radikálu se zaznamenanou hodnotou absorbance při 516 nm. Data byla zpracována pomocí procentuální inhibice, jako v předchozím případě.

Metoda ORAC představovala typický test založený na přenosu vodíku s reakcí mezi antioxidačními sloučeninami a fluoresceinem. Intenzita emise byla zaznamenána v rozmezí 495–700 nm po dobu 45 minut [57].

Dále byla využita elektrochemická metoda využívající k zachytávání OH radikálů elektrochemický senzor, který byl složen z elektrody ze skelného uhlíku potažené polyfenolovým filmem. Kapacita antioxidantů v plodech goji byla hodnocena studiem kinetiky a degradace polyfenolového filmu ve dvou různých konfiguracích. Ve výsledku byl zaznamenán signál vztahující se k redoxnímu systému $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. Intenzita redox signálu je nepřímo úměrná antioxidační síle, která byla odhadnuta jako procento inhibice [57].

Ve studii bylo prokázáno, že při použití různých metod pro stanovení antioxidační aktivity v plodech goji, bylo dosaženo podobných výsledků a tedy obsah v jednotlivých vzorcích je srovnatelný [57]. Celkově jsou plody kustovnice čínské bohatým zdrojem antioxidačních látek. Hodnoty antioxidační kapacity jsou srovnatelné nebo dokonce vyšší, než hodnoty uváděné pro ovoce obecně bohaté na antioxidanty, mezi které patří například jahody, borůvky a další [69].

ZÁVĚR

Práce je zaměřena na analýzu biologicky aktivních látek v kustovnici čínské. Mezi nejvíce zastoupené účinné látky patří polysacharidy, karotenoidy a fenolické sloučeniny. Před samotnou analýzou je důležité látky izolovat v maximálním množství a převážně formou extrakce. Nejčastěji využívanými metodami je extrakce dle Soxhleta, ultrazvuková extrakce, mikrovlnná extrakce a extrakce superkritickou tekutinou. Při extrakci je důležitý výběr vhodného rozpouštědla, které se určuje podle chemické povahy a polaritý extrahovaných látek. Nejčastěji jsou využívány polární a středně polární rozpouštědla, například ethanol, methanol, voda a další. Pro látky lipofilní povahy lze použít například hexan. Extrakci ovlivňuje řada faktorů, mezi které patří: teplota, rozpouštědlo, velikost částic, extrakční doba a tlak.

Pro stanovení a separaci biologicky aktivních látek je oblíbenou metodou kapalinová chromatografie, většinou v systému s obrácenými fázemi. K detekci se zpravidla využívá spektrofotometrický detektor či hmotnostní spektrometr. Pro stanovení fenolických sloučenin pomocí kapalinové chromatografie je používaná mobilní fáze složená převážně z vodného roztoku methanolu nebo acetonitrilu s přísávkem kyseliny octové nebo mravenčí. Používanou stacionární fází je nejčastěji kolona C18. Mezi zástupce separovaných polyfenolů patří například kyselina *p*-kumarová, rutin, kvercitrin, kaempferol a další. Při analýze polyfenolických a jiných polárních látek lze využít i kapilární elektroforézu. Látky vykazující antioxidační účinky jako jsou fenolické, polyfenolické sloučeniny, karotenoidy a flavonoidy je možné stanovit pomocí spektrofotometrických metod, například DPPH, ATBS či ORAC nebo elektrochemickou metodou.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Raymond Chuen-Chung Chang and Kwok-Fai So. *Lycium barbarum and human health*. Springer, 2015.
- [2] Maria Luisa Badenes and David H Byrne. *Fruit breeding*, volume 8. Springer Science & Business Media, 2012.
- [3] AnRo0002. Chinesischer bocksdorn (lycium chinense), [online]. [cit. 12.5.2021]. Dostupné z: <https://rb.gy/2rorz8>.
- [4] Radio Tonreg. Lycium barbarum, [online]. [cit. 12.5.2021]. Dostupné z: <https://rb.gy/jabbw1>.
- [5] Jablonský Ivan and Bajer Jiří. *Rostliny pro posílení organismu a zdraví*. Grada Publishing as, 2007.
- [6] Harunobu Amagase and Norman R Farnsworth. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of lycium barbarum fruit (goji). *Food research international*, 44(7):1702–1717, 2011.
- [7] Carmela Conidi, Enrico Drioli, and Alfredo Cassano. Biologically active compounds from goji (lycium barbarum l.) leaves aqueous extracts: Purification and concentration by membrane processes. *Biomolecules*, 10(6):935, 2020.
- [8] avicmart. Goji berry ningxia, [online]. [cit. 12.5.2021]. Dostupné z: <https://rb.gy/amtjw3>.
- [9] ivabalk. Goji berry dried, [online]. [cit. 12.5.2021]. Dostupné z: <https://rb.gy/oowbkn>.
- [10] Paul M Dewick. *Essentials of organic chemistry: for students of pharmacy, medicinal chemistry and biological chemistry*. John Wiley & Sons, 2006.
- [11] Guihao Yin and Yuli Dang. Optimization of extraction technology of the lycium barbarum polysaccharides by box–behnken statistical design. *Carbohydrate Polymers*, 74(3):603–610, 2008.

- [12] Mingcheng Guo, Tianyu Shi, Yongheng Duan, Juanli Zhu, Jianqiang Li, and Yongsong Cao. Investigation of amino acids in wolfberry fruit (*lycium barbarum*) by solid-phase extraction and liquid chromatography with precolumn derivatization. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42:84–90, 2015.
- [13] N Mallikarjuna Rao. *Medical biochemistry*. New Age International, 2006.
- [14] Brian D Craft, Adrian L Kerrihard, Ryszard Amarowicz, and Ronald B Pegg. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2):148–173, 2012.
- [15] B Halliwell, R Aeschbach, J Löliger, and OI Aruoma. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7):601–617, 1995.
- [16] Gary Williamson and Claudine Manach. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. ii. review of 93 intervention studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1):243S–255S, 2005.
- [17] Wai-Man Tang, Enoch Chan, Ching-Yee Kwok, Yee-Ki Lee, Jian-Hong Wu, Chun-Wai Wan, Robbie Yat-Kan Chan, Peter Hoi-Fu Yu, and Shun-Wan Chan. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *lycium barbarum* fruit. *Inflammopharmacology*, 20(6):307–314, 2012.
- [18] Jiang Cheng, Zhi-Wei Zhou, Hui-Ping Sheng, Lan-Jie He, Xue-Wen Fan, Zhi-Xu He, Tao Sun, Xueji Zhang, Ruan Jin Zhao, Ling Gu, et al. An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of *lycium barbarum* polysaccharides. *Drug design, development and therapy*, 9:33, 2015.
- [19] EJ Llorent-Martínez, ML Fernández-de Córdova, P Ortega-Barrales, and A Ruiz-Medina. Characterization and comparison of the chemical composition of exotic superfoods. *Microchemical Journal*, 110:444–451, 2013.
- [20] H Leung, A Hung, ACF Hui, and TYK Chan. Warfarin overdose due to the possible effects of *lycium barbarum* l. *Food and chemical toxicology*, 46(5):1860–1862, 2008.
- [21] Quetzalihuítl Arroyo-Martínez, Manuel Jiménez Sáenz, Federico Argüelles Arias, and Mileidis San Juan Acosta. *lycium barbarum*: a new hepatotoxic “natural” agent? *Digestive and Liver Disease*, 43(9):749, 2011.

- [22] Qiong Luo, Yizhong Cai, Jun Yan, Mei Sun, and Harold Corke. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from lycium barbarum. *Life sciences*, 76(2):137–149, 2004.
- [23] Bartosz Kulczyński and Anna Gramza-Michałowska. Goji berry (lycium barbarum): composition and health effects—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(2):67–76, 2016.
- [24] Jing Zhu, Wei Liu, Juping Yu, Shan Zou, Jiajia Wang, Wenbing Yao, and Xiangdong Gao. Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of lycium barbarum l. *Carbohydrate polymers*, 98(1):8–16, 2013.
- [25] Emily Y Chew, Michael L Klein, Traci E Clemons, Elvira Agrón, Rinki Ratnapriya, Albert O Edwards, Lars G Fritsche, Anand Swaroop, Gonçalo R Abecasis, Age-Related Eye Disease Study Research Group, et al. No clinically significant association between cfh and arms2 genotypes and response to nutritional supplements: Areds report number 38. *Ophthalmology*, 121(11):2173–2180, 2014.
- [26] Joe G Hollyfield. Age-related macular degeneration: the molecular link between oxidative damage, tissue-specific inflammation and outer retinal disease: the proctor lecture. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(3):1276–1281, 2010.
- [27] Shang Li, Na Liu, Li Lin, Er-Dan Sun, Jian-Da Li, and Peng-Kun Li. Macular pigment and serum zeaxanthin levels with goji berry supplement in early age-related macular degeneration. *International journal of ophthalmology*, 11(6):970, 2018.
- [28] Naoshad Muhammad, Robert Steele, T Scott Isbell, Nancy Philips, and Ratna B Ray. Bitter melon extract inhibits breast cancer growth in preclinical model by inducing autophagic cell death. *Oncotarget*, 8(39):66226, 2017.
- [29] Ying Miao, Bingxiu Xiao, Zhen Jiang, Yanan Guo, Fang Mao, Junwei Zhao, Xia Huang, and Junming Guo. Growth inhibition and cell-cycle arrest of human gastric cancer cells by lycium barbarum polysaccharide. *Medical Oncology*, 27(3):785–790, 2010.
- [30] Yih K Tan and John WL Fielding. Early diagnosis of early gastric cancer. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 18(8):821–829, 2006.

- [31] Ki-Tae Ha, Sang-Ju Yoon, Dall-Yeong Choi, Dong-Wook Kim, June-Ki Kim, and Cheorl-Ho Kim. Protective effect of lycium chinense fruit on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Journal of ethnopharmacology*, 96(3):529–535, 2005.
- [32] Jeffrey F Waring, Robert A Jolly, Rita Ciurlionis, Pek Yee Lum, Jens T Praestgaard, David C Morfitt, Bruno Buratto, Chris Roberts, Eric Schadt, and Roger G Ulrich. Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles. *Toxicology and applied pharmacology*, 175(1):28–42, 2001.
- [33] YANG Xiao, GJ Harry, and KR Pennypacker. Expression of ap-1 transcription factors in rat hippocampus and cerebellum after trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 20(5):761–766, 1999.
- [34] Hyun-Jung Park, Hyun Soo Shim, Woong Ki Choi, Kyung Soo Kim, and Insop Shim. Neuroprotective effect of lycium chinense fruit on trimethyltin-induced learning and memory deficits in the rats. *Experimental neurobiology*, 20(3):137, 2011.
- [35] Man-Shan Yu, Sarana Ka-Yan Leung, Sau-Wan Lai, Chi-Ming Che, Sze-Yong Zee, Kwok-Fai So, Wai-Hung Yuen, and Raymond Chuen-Chung Chang. Neuroprotective effects of anti-aging oriental medicine lycium barbarum against β -amyloid peptide neurotoxicity. *Experimental gerontology*, 40(8-9):716–727, 2005.
- [36] Ya-Hsin Hsiao, Hui-Chi Hung, Shun-Hua Chen, and Po-Wu Gean. Social interaction rescues memory deficit in an animal model of alzheimer’s disease by increasing bdnf-dependent hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 34(49):16207–16219, 2014.
- [37] Minsook Ye, Junghee Moon, Jieun Yang, Hyun Hwa Lim, Seong Bin Hong, Insop Shim, and Hyunsu Bae. The standardized lycium chinense fruit extract protects against alzheimer’s disease in 3xtg-ad mice. *Journal of ethnopharmacology*, 172:85–90, 2015.
- [38] Muthu Thiruvengadam, Bimal Kumar Ghimire, Seung-Hyun Kim, Chang Yeon Yu, Deog-Hwan Oh, Ramachandran Chelliah, Chang Kwon, Yun-Ju Kim, and Ill Min Chung. Assessment of mineral and phenolic profiles and their association with the

- antioxidant, cytotoxic effect, and antimicrobial potential of lycium chinense miller. *Plants*, 9(8):1023, 2020.
- [39] Wei Zheng and Shioh Y Wang. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(11):5165–5170, 2001.
- [40] YaoGuang Liang, QiaoLin Xu, HaiHui Xie, YanYang Zhou, XiaoYi Wei, et al. Chemical constituents from mango seed kernels and their antimicrobial activity. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 18(4):445–448, 2010.
- [41] Zaixiang Lou, Hongxin Wang, Song Zhu, Chaoyang Ma, and Zhouping Wang. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of food science*, 76(6):M398–M403, 2011.
- [42] Jiri Sochor, Marketa Ryvolova, Olga Krystofova, Petr Salas, Jaromir Hubalek, Vojtech Adam, Libuse Trnkova, Ladislav Havel, Miroslava Beklova, Josef Zehnalek, et al. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages. *Molecules*, 15(12):8618–8640, 2010.
- [43] Aurelia Magdalena Pisoschi and Gheorghe Petre Negulescu. Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1(1):106, 2011.
- [44] Dong-Ping Xu, Ya Li, Xiao Meng, Tong Zhou, Yue Zhou, Jie Zheng, Jiao-Jiao Zhang, and Hua-Bin Li. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences*, 18(1):96, 2017.
- [45] Hana Paulovê and Hana Bochořêkovê. Metody stanovenè antioxidantnè aktivity p̄rèrodnèch lètek in vitro. *Chem. listy*, 98:174–179, 2004.
- [46] Marjorie R Rover and Robert C Brown. Quantification of total phenols in bio-oil using the folin–ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104:366–371, 2013.
- [47] F W Fifield. *Principles and practice of analytical chemistry*. British Library, 1995.
- [48] David Harvey. *Modern analytical chemistry*, volume 1. McGraw-Hill New York, 2000.
- [49] Romana BORKOVCOVÁ, Ivana a KOSTRHOUNOVÁ. Extrakční metody, [online]. b.r. [cit. 06.05.2021]. Dostupné z: <https://bit.ly/3h2VI9K>.

- [50] Clifton E Meloan. *Chemical separations: Principles, techniques, and experiments*. Wiley New York, 1999.
- [51] Kateřina RIDDELOVÁ. Izolační a separační metody, [online]. b.r. [cit. 06.05.2021]. Dostupné z: <https://bit.ly/2ULdrK9>.
- [52] D Kealey and PJ Haines. *Analytical chemistry-instant notes*, 2002.
- [53] Jana GOTTWALDOVÁ. Elektroforetické techniky, [online]. b.r. [cit. 12.05.2021]. Dostupné z: <https://bit.ly/3ybQjTP>.
- [54] Paul D Grossman and Joel C Colburn. *Capillary electrophoresis: Theory and practice*. Academic Press, 2012.
- [55] Dario Donno, Gabriele Loris Beccaro, Maria Gabriella Mellano, Alessandro Kim Cerutti, and Giancarlo Bounous. Goji berry fruit (*lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *Journal of functional foods*, 18:1070–1085, 2015.
- [56] A Fratianni, S Niro, MDR Alam, L Cinquanta, M Di Matteo, G Adiletta, and G Panfili. Effect of a physical pre-treatment and drying on carotenoids of goji berries (*lycium barbarum* l.). *LWT*, 92:318–323, 2018.
- [57] Michele Protti, Isacco Gualandi, Roberto Mandrioli, Sergio Zappoli, Domenica Tonelli, and Laura Mercolini. Analytical profiling of selected antioxidants and total antioxidant capacity of goji (*lycium* spp.) berries. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 143:252–260, 2017.
- [58] Tarun Belwal, Praveen Dhyani, Indra D Bhatt, Ranbeer Singh Rawal, and Veena Pande. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *berberis asiatica* fruits using response surface methodology (rsm). *Food chemistry*, 207:115–124, 2016.
- [59] G Sharmila, VS Nikitha, S Ilaiyarasi, K Dhivya, V Rajasekar, N Manoj Kumar, K Muthukumaran, and C Muthukumaran. Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 84:13–21, 2016.

- [60] Jannatul Azmir, Islam Sarker Mohamed Zaidul, MM Rahman, KM Sharif, A Mohamed, F Sahena, MHA Jahurul, K Ghafoor, NAN Norulaini, and AKM Omar. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4):426–436, 2013.
- [61] Sylwia Magiera and Michał Zareba. Chromatographic determination of phenolic acids and flavonoids in lycium barbarum l. and evaluation of antioxidant activity. *Food Analytical Methods*, 8(10):2665–2674, 2015.
- [62] D Montesano, L Cossignani, L Giua, E Urbani, MS Simonetti, and F Blasi. A simple hplc-elsd method for sugar analysis in goji berry. *Journal of chemistry*, 2016, 2016.
- [63] Andrei Mocan, Laurian Vlase, Dan Cristian Vodnar, Cristina Bischin, Daniela Hanganu, Ana-Maria Gheldiu, Radu Oprean, Radu Silaghi-Dumitrescu, and Gianina Crişan. Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of lycium barbarum l. and lycium chinense mill. leaves. *Molecules*, 19(7):10056–10073, 2014.
- [64] Wei-Feng Wang, Jun-Li Yang, and Yan-Ping Shi. Quality evaluation of six bioactive constituents in goji berry based on capillary electrophoresis field amplified sample stacking. *Electrophoresis*, 39(16):2117–2124, 2018.
- [65] Yong Peng, Chen Ma, Yawei Li, Kelvin Sze-Yin Leung, Zhi-Hong Jiang, and Zhongzhen Zhao. Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in lycium fruits (fructus lycii). *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(4):161–164, 2005.
- [66] IR Bungheza, Avramescu Sorin Marius, Neata Marian, Radulescu Georgeta, and Ion Rodica-Mariana. Obtaining of carotenoid extract from lycium chinense and characterization using spectrometrical analysis. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 7(2), 2012.
- [67] Delia B Rodriguez-Amaya et al. A guide to carotenoid analysis in foods. 2001.
- [68] Anastasia Karioti, Maria Camilla Bergonzi, Franco F Vincieri, and Anna Rita Bilia. Validated method for the analysis of goji berry, a rich source of zeaxanthin dipalmitate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(52):12529–12535, 2014.

- [69] Anna Floegel, Dae-Ok Kim, Sang-Jin Chung, Sung I Koo, and Ock K Chun. Comparison of abts/dpph assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich us foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7):1043–1048, 2011.