

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁRSKA PRÁCA

2019

Erika Čillíková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Biologicky aktívne látky v rastline moringa olejodárna (*Moringa oleifera*)

Erika Čillíková

Bakalárska práca

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Erika Čillíková**
Osobní číslo: **C16058**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Biologicky aktivní látky v rostlině moringa olejodárná
(*Moringa oleifera*)**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

Vypracujte literární rešerši:

1. V první části bakalářské práce popište a rozeberte chemické složení částí rostliny moringa olejodárná (*Moringa oleifera*). Dále posuďte význam této rostliny v potravinářství.
2. V druhé části práce popište přípravu vzorku, analytické metody a postupy, použitelné pro stanovení biologicky aktivních látek vyskytujících se v rostlině moringa olejodárná. Zaměřte se hlavně na metody kapalinové a plynové chromatografie.
3. Získané poznatky kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

5. února 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. července 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Věntura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, hlavne so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernici Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práca zverejnená v Univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach dňa 28.6.2019

Erika Čillíková

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som rada poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Tomášovi Hájkovi, Ph.D. za ochotu, trpezlivosť a cenné rady pri vypracovaní mojej bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať svojej rodine a priateľom za podporu počas môjho štúdia.

Anotácia

Táto bakalárska práca sa zaoberá biologicky aktívnymi látkami prítomnými v rastline Moringa olejodárna. V prvej časti sa venuje popisu, spracovaniu, využitiu a chemickému zloženiu tejto rastliny. Ďalej sú v práci stručne popísané separačné techniky a metódy stanovujúce antioxidačnú aktivitu. Ďalšia časť sa venuje analýze bioaktívnych látok vyskytujúcich sa v moringe olejodárnej.

Kľúčové slová

Moringa olejodárna, extrakcia, kvapalinová chromatografia, plynová chromatografia

Title

Biologically active compounds in the plant Moringa oleifera

Annotation

This bachelor thesis deals with biologically active compounds contained in the Moringa oleifera plant. The first part deals with the description, processing, utilization and chemical composition of this plant. In addition, separation techniques and methods for determining antioxidant activity are briefly described. The next part is devoted to the analysis of bioactive compounds occurring in the plant moring oleifera.

Keywords

Moringa oleifera, extraction, liquid chromatography, gas chromatography

OBSAH

1	ÚVOD.....	11
2	MORINGA OLEJODÁRNA.....	12
2.1	Chemické zloženie	12
2.1.1	Aminokyseliny.....	13
2.1.2	Lipidy.....	13
2.1.3	Sacharidy	14
2.1.4	Vitamíny	14
2.1.5	Flavonoidy	15
2.1.6	Karotenoidy	16
2.1.7	Fytosteroly	16
2.1.8	Minerálne látky	17
2.2	Spracovanie a využitie	17
3	STANOVENIE BIOLOGICKY AKTÍVNYCH LÁTKO.....	19
3.1	Extrakcia	19
3.1.1	Extrakcia tuhej látky kvapalinou	19
3.1.2	Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny.....	20
3.2	Chromatografia	20
3.2.1	Plynová chromatografia.....	21
3.2.2	Kvapalinová chromatografia.....	23
3.3	Príprava vzorky na stanovenie antioxidačnej aktivity a antioxidantov.....	24
3.4	Antioxidačná aktivita	25
3.4.1	Antioxidačné testy	26
3.4.1.1	Metóda DPPH	26
3.4.1.2	Metóda ABTS	27
3.4.1.3	Metóda ORAC	27
3.4.2	Stanovenie antioxidačnej aktivity.....	28

3.5	Stanovenie celkových fenolov a flavonoidov	29
3.6	Stanovenie voľných fenolových zlúčenín metódou HPLC-DAD.....	30
3.7	Analýza fenolových zlúčenín metódou UHPLC-ESI-MS/MS	31
3.8	Stanovenie vlákniny	32
3.9	Stanovenie vitamínu C	33
3.10	Stanovenie karotenoidov metódou LC-APCI-MS	34
3.11	Stanovenie mastných kyselín v oleji	36
3.11.1	Extrakcia vzorky semien.....	36
3.11.2	Metóda plynovej chromatografie	36
3.11.3	FTIR analýza.....	38
3.11.4	H-NMR analýza.....	38
4	ZÁVER.....	40
5	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	41

ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK

Obrázok 1 – Moringa olejodárna.....	12
Obrázok 2 – kyselina α -linolénová.....	14
Obrázok 3 – štruktúra rutínu (A) a kvercetínu (B).....	16
Obrázok 4 – β -karotén.....	16
Obrázok 5 – Soxhletov extraktor.....	20
Obrázok 6 – schéma plynového chromatografu.....	22
Obrázok 7 – schéma HPLC.....	23
Obrázok 8 – účinok vychytávania radikálov DPPH antioxidantom (AH).....	27
Obrázok 9 – vplyv hladiny dusíku na celkové fenoly a flavonoidy, T0,T25,T50,T100-vzorky listov hnojené hnojivom s rozdielnym obsahom dusíku.....	30
Obrázok 10 – LC chromatogram karotenoidov extraktu z listov moringy, 1 – all-E-luteoxantín, 2 – 13-Z-luteín, 3 – all-E-luteín, 4 – all-E-zeaxantín, 5 – 15-Z- β -karotén, 6 – all-E- β -karotén, Chl – chlorofyl, # - neznáme vrcholy.....	35
Obrázok 11 – CG analýza oleja moringa.....	37
Obrázok 12 – FTIR spektrum oleja moringa.....	38
Obrázok 13 – H-NMR spektrum oleja moringa.....	39
Tabuľka 1 – hlavné živiny listov, strukov a semien Moringa oleifera.....	13
Tabuľka 2 – stanovenie antioxidačnej aktivity listov moringy metódou ABTS a DPPH.....	28
Tabuľka 3 – antioxidačná aktivita listov moringy metódou ORAC.....	29
Tabuľka 4 – obsah voľných fenolových zlúčenín v listoch moringy určených metódou HPLC-DAD.....	31
Tabuľka 5 – identifikácia a kvantifikácia fenolových zlúčenín metódou UHPLC-MS.....	32
Tabuľka 6 – obsah celkovej (TDF), nerozpustnej (IDF) a rozpustnej (SDF) vlákniny v listoch moringy.....	33
Tabuľka 7 – obsah vitamínu C v surovinách.....	34
Tabuľka 8 – karotenoidné zloženie listov, kvetov a plodov analyzovaných metódou LC-APCI-MS.....	35
Tabuľka 9 – relatívne percento zloženia MK v extrahovanom oleji zo semien moringy.....	37

ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

- AAPH – 2,2-azobis-2-amidinopropán-dichlorid
- ABTS – 2,2-azinobis-3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát
- APCI – chemická ionizácia atmosférickým tlakom
- ATR – zoslabená úplná reflektancia
- DAD – detektor s diódovým poľom
- DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
- DPPH-H – difenylpikrylhydrazyl
- ECD – detektor elektrónového záchytu
- ESI – elektro sprejová ionizácia
- FAME – metylestery mastných kyselín
- FC – kyslý roztok fosforečnanu molybdenového a wolframového
- FID – plameňovo-ionizačný detektor
- FRAP – metóda stanovenia antioxidantnej aktivity založená na redukcii železitých komplexov
- FTIR – infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
- GC – plynová chromatografia
- GLC – chromatografia plyn-kvapalina
- GSC – chromatografia plyn-tuhá látka
- H-NMR – protónová nukleárna magnetická rezonancia
- HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
- IDF – nerozpustná vlákna
- LC – kvapalinová chromatografia
- MK – mastné kyseliny
- MS – hmotnostná spektrometria
- NP – systém s normálnymi fázami
- ORAC – metóda stanovenia antioxidantnej aktivity založená na zhášaní fluorescencie
- RP – systém s obrátenými fázami
- SDF – rozpustná vlákna
- TCD – tepelne-vodivostný detektor
- TEAC – stanovenie antioxidantnej aktivity pomocou Troloxu
- TDF – celková vlákna
- UHPLC – ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

1 ÚVOD

Moringa olejodárna patrí do čeľade moringovité a prirodzene sa vyskytuje v Indii, Pakistane, Bangladéši a Afganistane. V súčasnosti sa pestuje takmer po celom svete a patrí medzi najviac používané liečivé rastliny. Má široké medicínske uplatnenie, ktoré u nás nie je až tak známe, no v tradičnej medicíne sa používa už celé stáročia. Okrem toho sa používa aj v mnohých iných odvetviach, napríklad pri výrobe jedál, ako doplnok stravy, v kozmetike či strojárstve a mnohých iných.

Moringa obsahuje veľké množstvo biologicky aktívnych látok. Každá jej časť obsahuje veľké množstvo antioxidantov, vďaka čomu sú všetky jej časti užitočné a zdravé. Jej časti obsahujú bielkoviny, aminokyseliny, proteíny, sacharidy, vitamíny, mastné kyseliny, minerály, taktiež karotenoidy, fytosteroly, flavonoidy a fenoly ako sekundárne metabolity ktoré podporujú nutričné zloženie tejto rastliny. Ich zastúpenie sa môže v rastlinách líšiť, čo môže byť spôsobené klimatickými podmienkami a oblasťou kde je pestovaná.

Práca sa venuje biologicky aktívnym látkam prítomným v moringe. Tiež stanoveniu týchto biologicky aktívnych látok z vybraných vzoriek z rôznych častí moringy rozličnými separačnými technikami ako je plynová či kvapalinová chromatografia, pred ktorými sa však musí samotná vzorka upraviť vhodnou extrakčnou metódou.

2 MORINGA OLEJODÁRNA

Moringa olejodárna (latinsky oleifera) patrí do čeľade moringovité (Moringaceae). Je to najrýchlejšie rastúci, nenáročný a najbežnejšie pestovaný druh v tropických oblastiach. Je všeobecne označovaný ako zázračná rastlina alebo strom života, v niektorých častiach sveta tiež označovaný ako paličkový strom či strom chrenu. Je opadavý a stálezelený, dosahuje výšku od 5 do 10 m, niekedy až 15 m. Má mohutné, v mladosti hlizovité korene, ktoré s pribúdajúcim vekom drevnatejú. Listy sú 25-60 cm dlhé, trikrát sperené so stopkatými žľazami vylučujúcimi jantárovú tekutinu. Jej kvety sú päťpočetné a obojpohlavné, buď bielej alebo ružovej farby. Plodom je 30-45 cm dlhá a 1,5-3 cm široká jednopuzdrová tobolka [1-5].

Pochádza zo sub-himalájskych oblastí Indie, Pakistanu, Bangladéša a Afganistanu. Pestuje sa po celom indickom subkontinente, Arabskom polostrove, Afrike, Číne ale aj v južných štátoch USA [3-5].



Obrázok 1 – Moringa olejodárna [6]

2.1 Chemické zloženie

Je to rastlina bohatá na množstvo živín ako sú bielkoviny, esenciálne aminokyseliny, minerálne látky, vitamíny a iné bioaktívne zlúčeniny označované ako sekundárne metabolity či fytochemikálie. Rôzne časti moringy obsahujú rozdielne množstvo živín, z ktorých najviac proteínov sa vyskytuje v strukoch. Jej semená zase obsahujú najviac lipidov a listy majú najviac

sacharidov ako aj vlákniny (tabuľka 1). Vďaka veľkému množstvu antioxidantov sú všetky jej časti užitočné a zdravé [3-12].

Tabuľka 1 – hlavné živiny listov, strukov a semien *Moringa oleifera* [13]

živiny	<i>M. oleifera</i> (g/100 g rastliny)		
	listy	struky	semená
proteíny	25,0-30,3	6,7-43,5	29,4-38,3
lipidy	0,1-10,6	0,1-5,1	30,8-41,2
sacharidy	0,1-43,9	0,1-38,2	0,1-21,1
vláknina	0,1-28,5	0,1-27,0	0,1-7,2

Jej listy a semená obsahujú značné množstvo esenciálnych minerálov, vitamínov ako A, C, D, E a B, 16 až 19 aminokyselín tvoriacich proteíny, z toho 10 ich je esenciálnych, a mastných kyselín z ktorých majú hlavné zastúpenie nenasýtené MK. Listy, kvety a struky obsahujú značné množstvo karotenoidov, fytosterolov, celkových fenolov a flavonoidov radených medzi, už spomínané, fotochemikálie podporujúce výživné zloženie tejto rastliny. Naopak moringa ako taká obsahuje relatívne nízke množstvo antinutričných látok ako sú fytáty, saponiny, taníny a oxaláty [3-12].

2.1.1 Aminokyseliny

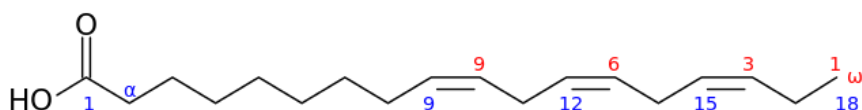
Aminokyseliny sú základnými stavebnými jednotkami všetkých peptidov, bielkovín a tiež sú súčasťou aj ďalších zlúčenín. Taktiež sa môžu v potravinách vyskytovať ako voľné látky. Z hľadiska štruktúry sú to substituované karboxylové kyseliny s aspoň jednou primárnou aminoskupinou a aspoň jednou karboxylovou skupinou. Poznáme 20 základných aminokyselín, všetky sú výhradne α -aminokyseliny vyznačujúce sa optickou aktivitou. Delíme ich na esenciálne, poloesenciálne a neesenciálne [14-16]. Ako už je spomenuté vyššie, listy, struky a semená moringy obsahujú približne 16 až 19 aminokyselín, z ktorých ich je 10 esenciálnych a sú to treonín, tyrozín, metionín, valín, fenylalanín, izoleucín, leucín, hystidín, lyzín a tryptofan [3-12]. Kvety, listy, mladé výhonky a nezrelé struky moringy sú dobrým zdrojom aminokyseliny metionínu [17].

2.1.2 Lipidy

Mastné kyseliny sú najpodstatnejšou zložkou všetkých lipidov. Štruktúrne ide zväčša o karboxylové kyseliny s alifatickým uhl'ovodíkovým reťazcom. Podľa nasýtenia reťazca

sa delia na nasýtené, nenasýtené s jednou dvojitou väzbou (monoenové), nenasýtené s viacerými dvojitými väzbami (polyenové) a masťné kyseliny s trojitými väzbami a rôznymi substituentmi. Lipidy potravín obsahujú hlavne kyselinu myristovú, palmitovú a stearovú. Medzi monoenové MK patrí, asi najviac známa, kyselina palmioolejová či olejová. Kyseliny arachidonová, linolová, α -linolénová patria medzi polyenové MK, ktoré hrajú dôležitú úlohu vo výžive [14, 15].

V listoch moringy sú zastúpené najmä nenasýtené MK, z ktorých má hlavné zastúpenie kyselina α -linolénová (obrázok 2), ktoré dopĺňajú nasýtené v čele s palmitovou kyselinou. Rafinovaný olej zo semien obsahuje kyselinu olejovú, ako najviac zatúpenú nenasýtenú kyselinu, ďalej palmitovú, heptadekanovú, stearovú, arachidonovú, linolovú a α -linolénovú ako iné rastlinné oleje. Pokiaľ ide o zloženie masťných kyselín považuje sa za ekvivalent olivového oleja [17-19].



Obrázok 2 – kyselina α -linolénová [20]

2.1.3 Sacharidy

Sacharidy sú veľmi rozšírené organické zlúčeniny s minimálne tromi alifaticky viazanými atómami uhlíku. Delia sa podľa počtu atómov uhlíkov vyskytujúcich sa v štruktúre (triózy, tetrózy, pentózy, hexózy, atď.), podľa funkčnej skupiny prítomnej v molekule (aldózy a ketózy) a podľa počtu cukorných jednotiek viazaných v molekule (monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy a zložené (konjugované) sacharidy). Slúžia hlavne ako zdroj energie (glukóza, fruktóza), základné stavebné jednotky (celulóza, chitín) a ako zásobné látky pre rastliny (škrob) a živočíchy (glykogén) [14-16].

Moringa obsahuje ramnózu a rafinózu, ktorá bola identifikovaná ako antinutričný cukor, ale je dôležitá pre fermentačný proces pri výrobe nápojov. Jej semená a listy moringy obsahujú arabinózu, xylózu, ramnózu a galaktózu ako najviac zastúpený sacharid [18].

2.1.4 Vitamíny

Vitamíny sú nízkomolekulové organické zlúčeniny, predovšetkým prírodné zložky potravín v ktorých sú prítomné v malých množstvách. Keďže si ich človek nedokáže sám syntetizovať, je potrebné ich do organizmu dodávať pre jeho správnu funkciu. Vďaka svojim funkciám bývajú označované ako exogénne esenciálne biokatalyzátory. Ich prítomnosť v tele je zásadná, keďže v prípade ich nedostatku dochádza k poruchám fyziologických funkcií

ako je rast, vývoj a mnoho iných. Ich nedostatok v tele sa označuje ako hypovitaminóza, ktorá môže prejsť až na avitaminózu, prejavujúcu sa poruchami niektorých biochemických procesov. Naopak hypervitaminóza predstavuje stav vyvolaný nadbytočným príjmom lipofilných vitamínov [14-16, 21].

Delia sa do dvoch kategórii na hydrofilné (rozpuštné vo vode), kde patria vitamíny B- komplexu a vitamín C, a lipofilné (rozpuštné v tukoch) kam radíme vitamín A, D, E a K [14-16, 21].

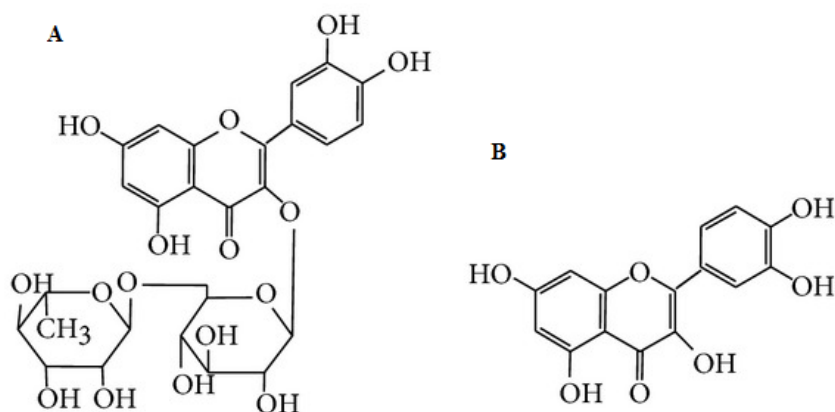
Ako je už uvedené vyššie, moringa je vynikajúcim zdrojom vitamínu C, A, D, E, vitamínov skupiny B, spomedzi ktorých je to tiamín (B1), riboflavín (B2), niacín (B5), pyridoxín (B6), kyselina listová (B9) a kobalamin (B12) [3-12, 17]. Pár zdrojov uvádza že listy moringy obsahujú 7-krát viac vitamínu C ako pomaranč a 4-krát viac vitamínu A ako mrkva [7, 17].

2.1.5 Flavonoidy

Flavonoidy alebo flavonoidné látky sú veľmi rozsiahlou skupinou rastlinných fenolov. Obsahujú v molekule dva benzénové kruhy spojené trojuhlíkovým reťazcom. Ich štruktúra je odvodená od kyslíkatej heterocyklickej zlúčeniny 2H-chroménu, substituovaného v polohe C-2 fenylovou skupinou, nazývanej flavan [16, 22]. Flavonoidy sa delia na katechíny, leukoantokyanidíny, antokyanidíny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, auróny, chalkóny a dihydrochalkóny. Jednotlivé štruktúry sa od seba líšia stupňom oxidácie a substitúcie. Počet a poloha hydroxyskupín vo flavonoidoch určuje silu antioxidačnej aktivity. Vyskytujú sa ako vonné látky, no najčastejšie vo forme glykozidov. Ich význam je odlišný, niektoré sú prírodnými rastlinnými farbivami, iné sú biologicky účinné látky alebo sú dôležité vďaka svojej horkej a trpkkej chuti. Najznámejšie flavonoidné pigmenty sú flavony a flavonoly žltej farby, taktiež antokyany zafarbené na červeno, fialovo a modro [22].

Semená, listy, stonky a korene moringy obsahujú kvercetín, rutín (obrázok 3), kaempferol, apigenín a ich glykozidy. Ich množstvo v extraktoch z rôznych častí je nestále a závisí aj od geografickej polohy, zloženia pôdy a klimatických podmienok.

Vďaka ich vysokej koncentrácii v rôznych častiach moringy zabraňujú oxidácii lipidov a tým tvorbe voľných radikálov, čo môže u človeka spôsobiť poškodenie pečene. [13, 18].

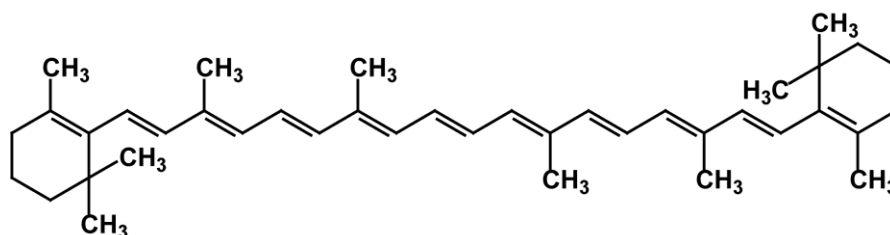


Obrázok 3 – štruktúra rutínu (A) a kvercetínu (B) [23]

2.1.6 Karotenoidy

Karotenoidy sú zväčša lipofilné žlté, oranžové až červenofialové pigmenty vyskytujúce sa v rastlinách, hubách, mikroorganizmoch a živočíchoch. Štruktúrne sa radia medzi tetraterpény obsahujúce osem izoprenových jednotiek. Delia sa na dve hlavné skupiny: karotény (uhl'ovodíky) a xantofyly (kyslíkaté zlúčeniny odvodené od karoténov). Niektoré z nich vykazujú aktivitu vitamínu A a sú označované ako retinoidy. Určité karotenoidy, ako napríklad lykopen či β -karotén (obrázok 4) sú schopné zhášať voľné radikály, teda vykazujú silné antioxidačné schopnosti. Medzi najznámejšie patria karotény obsahujúce 40 uhlíkov a skladajúce sa z ôsmich izoprenových jednotiek [16, 22].

Moringa je jeden z najbohatších prírodných zdrojov provitamínu A [13]. Listy, kvety a struky sú dobrým zdrojom trans-luteínu, β -karoténu a trans-zeaxantínu [3-12, 17].



Obrázok 4 – β -karotén [24]

2.1.7 Fytosteroly

Fytosteroly sú rastlinné lipofilné látky patriace medzi steroly. Základným sterolom je cholesterol (C_{27}), ktorý sa radí medzi zoosteroly a je prítomný v živočíšnych lipidoch. Ďalšie fytosteroly sa od neho odlišujú najmä usporiadaním postranného reťazca na 24. atóme uhlíku.

Vo všeobecnosti sú steroly bezfarebné kryštalické látky označované ako alicyklické alkoholy. V organizme sú neoddeliteľnou zložkou lipoproteínov a tukových membrán, uplatňujú sa pri transporte lipidov. Z cholesterolu sa ďalej syntetizujú žlčové kyseliny a steroidné hormóny. Na fytosteroly sú bohaté najmä oleje rastlinného pôvodu [14-16].

Semená, kvety a kôra moringy sú bohaté na stigmasterol, β -sitosterol a kampasterol ktoré sú nevyhnutné pre produkciu hormónov [13, 17]. Olej pozostáva z rôznych sterolov ako sú kampesterol, stigmasterol β -sitosterol, clerosterol a menšieho množstva 24- metyléncholesterolu, kampestanolu, stigmastanolu a 28-izoavenasterolu [19].

2.1.8 Minerálne látky

Minerály sú anorganické zlúčeniny tiež nazývané popoloviny. Sú integrujúcimi zložkami všetkých živých organizmov a vyskytujú sa vo všetkých potravinách rastlinného a živočíšneho pôvodu. Uplatňujú sa hlavne ako regulátory fyzikálno-chemických pomerov v biologických systémoch. Delia sa na makroelementy (majoritné prvky), minoritné prvky a mikroelementy (stopové prvky) [14-16].

Moringa je bohatým zdrojom Fe, Ca, K, Mg, Zn, Cu a S [3, 4, 7-12]. Jej kvety, listy, mladé výhonky a nezrelé struky sú dobrým zdrojom Ca, Fe a P. Listy majú 4-krát viac vápniku a 2-krát viac proteínu ako mlieko a 3-krát viac draslíku a železa ako banán a špenát [13, 17].

2.2 Spracovanie a využitie

V mnohých krajinách je jednou z najpoužívanějších liečivých rastlín s vysokým obsahom živín a antioxidantov. V tradičnej medicíne sa používa už celé stáročia. Jej výživová hodnota a medicínske prínosy sú v tropických krajinách dobre známe. Mnohí autori uvádzajú že významne prispieva k príjmu niektorých základných živín a fytochemikálii podporujúcich ľudské zdravie. Moringa ako taká bola hodnotená ako prostriedok na liečenie rôznych ochorení ako je diabetes, infekcie, hypertenzia, rakovina, astma a artritída. Nedávne štúdie spojené s moringou dokazujú jej protizápalové, antibakteriálne, antidiabetické, protinádorové, diuretické a antioxidačné účinky [4, 7-9, 11, 25]. Mnohé mimovládne organizácie označili moringu za prirodzenú výživu pre trópy [12].

Každá jej časť vrátane listov, koreňov, kôry, semien, plodov a kvetov je jedlá a obsahuje zlúčeniny podporujúce zdravie ľudí a zvierat. Dajú sa využiť pri výrobe rôznych jedál ako je polievka, sušienky, tuhé cesto amala, chlieb, koláče, jogurty a mnohé iné [2, 3, 7, 8, 25].

Najpoužívanejšou časťou sú listy. Vo veľkej miere sa používajú v boji proti podvýžive u dojčiat a tehotných žien ako aj na zvýšenie produkcie mlieka u dojčiacich matiek. Ako doplnok stravy chráni ľudí pred nedostatkom železa a oxidačným stresom. Taktiež nachádza uplatnenie aj v živočíšnom priemysle ako krmivo pre hospodárske zvieratá ako zdroj bielkovín, antibiotík a antioxidačných zlúčenín [7, 8, 26].

Jej semená v práškovej forme sa používajú ako účinné koagulačné a antimikrobiálne činidlá na odstránenie tvrdosti vody, nežiadúcich chemikálií a biologických kontaminantov vo vode, či v strojárstve na mazanie strojčekov do hodínok. Lisuje sa z nich veľmi jemný Ben olej, ktorý vonia príjemnou arašidovou vôňou a využíva sa pri liečbe artritídy, reumatizmu a hypertenzii. Je stabilnejší ako repkový, sójový a palmový olej a je vhodný na varenie a vyprážanie. Tiež nachádza uplatnenie aj v kozmetike pri výrobe parfumov, výrobkov na starostlivosť o telo a vlasy a ako hydratačný krém na pokožku. Taktiež sa používa ako surovina na výrobu bionafty ako alternatívny zdroj ropy [2, 4, 7, 11, 12, 17, 19].

3 STANOVENIE BIOLOGICKY AKTÍVNYCH LÁTOK

3.1 Extrakcia

Extrakcia patrí medzi separačné metódy, pri ktorej jedna zložka prechádza z jednej fázy do druhej a to buď z kvapaliny do kvapaliny, ktoré sú navzájom nemiešateľné, alebo z tuhej fázy do kvapalnej. Pri extrakcii sa využíva odlišná rozpustnosť jednotlivých zložiek v rôznych rozpúšťadlách. Voľba vhodného rozpúšťadla závisí na znalosti interakcií medzi molekulami rozpustenej látky ako sú disperzné interakcie, interakcie dipól-dipól, indukčné interakcie a tvorba vodíkových mostíkov. Podľa skupenstva fáz, medzi ktorými vzorka prechádza sa rozlišuje extrakcia z tuhej fázy do kvapaliny, z kvapaliny do kvapaliny, z kvapaliny (alebo plynu) na pevnú fázu [27, 28].

3.1.1 Extrakcia tuhej látky kvapalinou

Extrakcia tuhej látky kvapalinou spočíva v pôsobení vhodného rozpúšťadla na vzorku z ktorej sa do rozpúšťadla extrahuje buď nežiadúca alebo stanovovaná zložka z tejto vzorky. Robí sa kontinuálnym alebo diskontinuálnym spôsobom. Na extrakciu pevných anorganických látok sa najčastejšie používa diskontinuálny spôsob, ktorý sa robí trepaním tuhej vzorky s rozpúšťadlom buď ručne alebo v trepúcich strojoch. Na extrakciu hlavne organických látok sa používa jeden z najznámejších kontinuálnych extraktorov nazývaný Soxhletov extraktor. Skladá sa z varnej banky, extrakčného priestoru a spätného chladiča (obrázok 5). Rozdrvená vzorka sa vkladá do priestoru v papierovej extrakčnej patrone. Rozpúšťadlo vo varnej banke vrie, jeho pary kondenzujú v chladiči a odtiaľ stekajú do extrakčného priestoru. Vzniknutý roztok prepadá naspäť do varnej banky a celý proces sa opakuje. Po tomto opakovanom procese je v banke jedna alebo viac zložiek a rozpúšťadlo, ktoré sa odstráni destiláciou. Potom v banke zostane len izolovaná látka [27-30].



Obrázok 5 – Soxhletov extraktor [31]

3.1.2 Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny

Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny sa najčastejšie používa na delenie anorganických látok a je vhodná na izoláciu veľkých aj malých množstiev zložiek. Je založená na ustanovení fázovej rovnováhy medzi dvomi vzájomne nemiešateľnými kvapalinami. Musí byť pri nej splnená podmienka, že rozpustnosť extrahovanej zložky v kvapaline, do ktorej sa extrahuje, musí byť väčšia než jej rozpustnosť v kvapaline, z ktorej ju chceme získať. Na extrakciu z kvapaliny do kvapaliny sa používajú deliace lieviky s krátkou stonkou, kohútikom a zátkou. Sú vhodné na extrakciu s rozpúšťadlom ťažším ako voda. Ak je rozpúšťadlo ľahšie ako voda, používa sa zbrúsená skúmavka u ktorej sa organická časť odsaje pipetou. Lieviky sa premiešavajú prevracaním a skúmavky rotáciou. Vytrepávanie nie je vhodné, lebo niektoré rozpúšťadlá tvoria zle odstrániteľnú emulziu. Táto metóda sa môže robiť jednorazovo alebo mnohonásobne [27-30].

3.2 Chromatografia

Chromatografia je jedna z najpoužívanejších a najvýznamnejších separačných analytických metód, ktorá umožňuje delenie, identifikáciu a stanovenie veľkého počtu anorganických a všetkých organických látok z najrôznejších prírodných či technických zmesí, a to už od desiatok percent až po relatívne nízke koncentrácie v širokom rozsahu relatívnych molekulových hmotností. Je založená na fyzikálno-chemických princípoch, kedy dochádza k postupnému a mnohonásobnému ustáľovaniu rovnováh v separovanej zmesi medzi dvoma

fázami, z ktorých jedna je pohyblivá (mobilná) a druhá nepohyblivá (stacionárna) [27, 29, 30, 32].

Stacionárna fáza je umiestnená v kolóne. Môže sa vyskytovať v rôznych formách, či už ako tuhé čiastočky o veľkosti jednotiek až stoviek mikrometrov alebo ako tenká vrstva kvapaliny nanosená na tuhých časticiach, alebo to môže byť tenký film kvapaliny na vnútornej stene kapiláry. Vo všeobecnosti je označovaná ako sorbent. Mobilná fáza unáša separované látky chromatografickým médiom so stacionárnou fázou a vyskytuje sa buď ako plyn alebo ako kvapalina [27, 30, 32].

Zložky vzorky sú separované na základe ich afinít ku stacionárnej fáze. Čím je afinita vyššia, tým je dlhší aj retenčný čas a zložky sa eluujú neskôr, a tým sú od seba zložky oddelené. Grafickým znázornením závislosti koncentrácie separovaných látok na čase je chromatografická krivka alebo chromatogram [27, 29, 30, 32].

Chromatografické metódy sa rozdeľujú podľa niekoľkých hľadísk:

- Podľa mobilnej fázy:
 - plynová chromatografia (GC)
 - kvapalinová chromatografia (LC)
- Podľa usporiadania stacionárnej fázy:
 - stĺpcová (kolónová) chromatografia
 - chromatografické techniky v plošnom usporiadaní
- Podľa separačného princípu:
 - adsorpčná
 - rozdeľovacia
 - iónovo-výmenná
 - gélová
 - afinitná

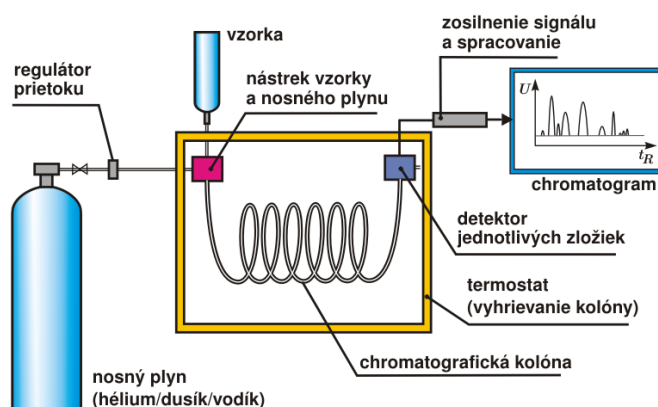
Medzi chromatografické techniky v plošnom usporiadaní sa zaradzuje papierová a tenkovrstvá chromatografia [27, 29, 30, 32].

3.2.1 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia je fyzikálno-chemická separačná metóda umožňujúca kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu plynných vzoriek, poprípade aj kvapalných, ktoré sa dajú pred separáciou previesť na pary. Mobilná fáza je vždy plynná a nazýva sa nosný plyn. Stacionárna fáza môže byť buď tuhá látka alebo kvapalina a podľa toho sa rozlišuje

chromatografia na systém plyn – tuhá látka (GSC) pri ktorom sa zložky delia medzi nosný plyn a tuhý sorbent a na systém plyn – kvapalina (GLC) v ktorom sa zložky delia medzi nosný plyn a stacionárnu kvapalnú fázu zakotvenú na inertnom nosiči. Obe metódy sa líšia v spôsobe separácie keďže v prípade GSC je distribúcia medzi obe fázy založená na princípe adsorpcie alebo sieťového efektu, kdežto u GLC je separácia založená na rozpúšťaní [27, 30].

Prístroj na plynovú chromatografiu sa nazýva plynový chromatograf a skladá sa zo zdroja nosného plynu, zariadenia na reguláciu prietoku nosného plynu, dávkovacieho zariadenia, chromatografickej kolóny, detektoru, termostatu, zosilňovača signálu, zapisovača a chromatogramu (obrázok 6) [27, 29, 30, 32].



Obrázok 6 – schéma plynového chromatografu [33]

Vzorka sa vnáša do dávkovacieho zariadenia vyhrievaného na určitú teplotu a je unášaná kolónou prúdom nosného plynu. Jeho zdrojom je tlaková fľaša s regulátorom tlaku. Najčastejšie sa používa vodík, dusík, hélium, argón a oxid uhličitý. V kolóne je stacionárna fáza a na základe vzájomných interakcií dochádza ku rozdeleniu alebo retencii jednotlivých zložiek a k ich rozdielnej elúcii. Zložky vystupujúce z kolóny sú zaznamenané detektorom, ktorý určuje množstvo zložiek ako funkciu času či objemu pretečeného nosného plynu [27, 29, 32].

Dávkovacie zariadenie slúži na nástrek vzorky do kolóny. Kvapalné vzorky sa dávkujú injekčnou mikrostriekačkou, pričom dávkovač je vyhrievaný na určitú teplotu. Na dávkovanie plynov sa okrem väčších injekčných striekačiek, o objeme niekoľkých mililitrov, používajú aj kapiláry s definovaným objemom [27, 29, 30, 32].

Termostat, v ktorom je umiestnený dávkovač, kolóna a detektor, zaisťuje takú teplotu aby vzorka bola po celý čas v plynnom stave [27, 30, 32].

Ku separácii vzorky dochádza v chromatografickej kolóne. Používajú sa dva typy kolón a to buď náplňové alebo kapilárne. Náplňové sú trubice z nerezovej ocele alebo skla naplnené

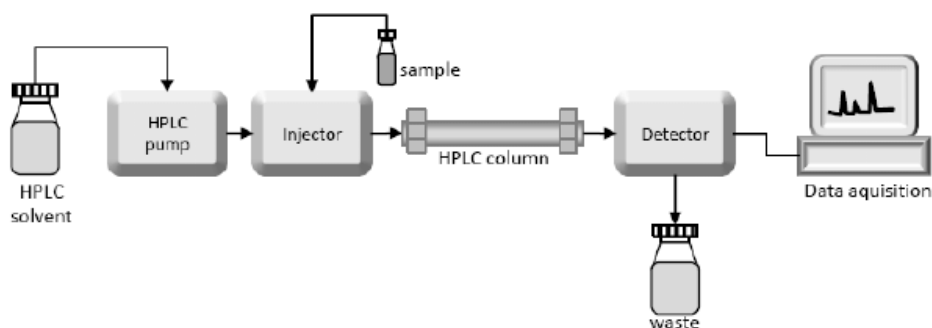
granulovaným materiálom, adsorbentom pre GSC alebo nosičom so zakotvenou kvapalnou fázou pre GLC. Kapilárne kolóny sú tenké kapiláry zhotovené, taktiež ako náplňové, z nerezovej ocele, skla alebo taveného kremeňa v ktorých je stacionárna fáza nanosená priamo na vnútornej stene kapiláry [27, 29, 30, 32].

Na konci kolóny je detektor, ktorý reaguje na prítomnosť látok v nosnom plyne. Vysiela signály, ktorých intenzita je zaznamenávaná v závislosti na čase [29]. Detektor by mal mať dobrú stabilitu signálu, veľkú citlivosť a mal by dostatočne rýchlo reagovať na zmenu zloženia eluentu [32]. Najčastejšie [29] sa používa plameňový ionizačný detektor (FID), tepelne- vodivostný (TCD) a detektor elektrónového záchytu (ECD) [27, 29, 30, 32].

3.2.2 Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia je separačná metóda, ktorá umožňuje delenie všetkých organických, menej prchavých kvapalných aj tuhých látok, rozpustných v bežných organických rozpúšťadlách, vode či zriedených minerálnych kyselinách. Od plynovej chromatografie sa líši tým, že mobilnou fázou je kvapalina a o separácii zložiek nerozhoduje len stacionárna, ktorou je tuhá látka alebo kvapalina zakotvená na nosiči, ale aj mobilná fáza. Delí sa na chromatografiu v otvorenom systéme, kde patrí klasická kvapalinová chromatografia, a chromatografiu v uzavretom systéme kde sa radí vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) [27, 32].

Kvapalinový chromatograf sa vo väčšine častí podobá plynovému. Skladá zo zásobníku mobilnej fázy, dávkovacieho zariadenia, chromatografickej kolóny a detektoru so systémom na spracovanie dát (obrázok 7). U HPLC, líšiacej sa od klasickej vyššou účinnosťou, je mobilná fáza čerpaná vysokotlakovým čerpadlom. Na dávkovanie sa tiež využívajú automatické dávkovače, tzv. autosamplery [27, 30, 32].



Obrázok 7 – schéma HPLC [34]

Najdôležitejšou časťou je kolóna, na ktorej dochádza ku vlastnej separácii. Najčastejšie sú zhotovené z nerezovej ocele alebo zo skla s veľkou mechanickou odolnosťou. Využívajú

sa náplňové kolóny rôznej dĺžky, priemeru a veľkosti častíc. Na dosiahnutie čo najväčšej účinnosti separácie musí byť kolóna vyplnená homogénnou stacionárnou fázou a častice náplne musia mať pravidelný a guľovitý tvar. Veľkosť častíc je nepriamo úmerná účinnosti separácie a priamo úmerná dĺžke kolóny. Stacionárna fáza u HPLC je zvyčajne chemicky modifikovaný silikagél alebo zosietené kopolyméry styrénu a divinylbenzénu [27, 32].

Eluát ďalej postupuje do detektoru. Mal by byť málo citlivý na zmenu zloženia mobilnej fázy a naopak veľmi citlivý na analyzované zložky. Medzi najčastejšie používané detektory patrí spektrofotometrický, fluorimetrický a elektrochemický detektor. Následný signál je spracovaný a vyhodnotený počítačom [27, 32].

Podľa polarít mobilnej a stacionárnej fázy sa rozlišujú dva systémy na systém s normálnymi fázami (NP), kde je stacionárna fáza polárnejšia než mobilná, a na systém s obrátenými fázami (RP), kde stacionárna fáza je menej polárna ako mobilná, s ktorou pracuje aj HPLC. Chromatografia v systéme s obrátenými fázami sa využíva takmer v 85% všetkých aplikácií vďaka vyššej rýchlosti, jednoduchosti a reprodukovateľnosti [30].

3.3 Príprava vzorky na stanovenie antioxidačnej aktivity a antioxidantov

Ako už bolo uvedené vyššie, najviac využívanou časťou z celej rastliny sú listy, ktoré boli použité aj na väčšinu uvedených stanovení. Jednotlivé vzorky listov sa buď použili na analýzu bez ďalšieho upravovania, alebo sa pred samotnou analýzou extrahovali vhodnými rozpúšťadlami, vysušili a takto upravené sa stanovovali. Taktiež použité kvety a semená sa pred stanoveniami extrakčne upravili, aby sa z nich získali vzorky použiteľné na dané analýzy.

Pre analýzu celkových fenolov a flavonoidov a antioxidačné testy sa použili extrakty z vybraných vzoriek listov moringy. Vzorka listov z moringy sa homogenizovala a sušila v konvekčnej peci počas piatich dní pri 45 °C. Vzorky (10 % hmot./obj.) sa podrobili extrakcii s použitím metanolu a etanolového vodného roztoku v pomere 70:30 s pH 2 ako extrakčných rozpúšťadiel, ktoré sú, ako uvádza zdroj, najlepšie rozpúšťadlá na extrakciu antioxidačných zlúčenín z listov moringy. Nakoniec sa extrakty vysušili v sušičke CentriVap pri 50 °C, kde za použitia vákua, tepla a odstredivej sily dochádza k odpareniu rozpúšťadla [35].

Na analýzu fenolových zlúčenín metódou UHPLC-ESI-MS/MS sa vzorky listov najskôr pomleli (10 mg) a extrahovali 1 ml zmesi acetón/voda v pomere 85:15. Zmes sa jednu minútu podrobila homogenizácii, ultrazvukovala sa 15 sekúnd, nechala sa stáť 45 sekúnd a tento postup sa zopakoval trikrát. Extrakt sa vysušil v sušičke CentriVap a rozpustil sa v 150 μ l metanolu, vopred prefiltrovaného, a centrifugovali sa 10 minút [35].

Na stanovenie voľných fenolových zlúčenín metódou HPLC-DAD sa 0,5 g vzorky listov extrahovali 25 ml metanolu a ultrazvukovali 15 minút pri izbovej teplote. Následne sa pevné časti zo vzorky odstránili centrifugáciou. Supernatant sa sušil na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C. Vysušený zvyšok sa rozpustil v 2 ml metanolu a takto pripravený roztok sa skladoval pri -20 °C až do analýzy [36].

Ďalším spôsobom úpravy vzorky listov z moringy použitej na stanovenie vitamínu C sa použilo asi 5 g vzorky ktorá sa pridala do 50 ml metanolu v 250 ml Erlenmayerových bankách, zmes sa miešala a trepala 5 minút a udržiavala sa pri izbovej teplote 48 hodín. Po uplynutí tejto doby sa zmes prefiltrovala a odparila do sucha na vzduchu, taktiež 48 hodín. Takto pripravené extrakty sa použili na danú analýzu [37].

Na kvantifikáciu karotenoidov metódou LC-APCI-MS sa použili čerstvé listy, kvety a nezrelé semená z moringy. Päť gramov týchto listov, kvetov či plodov sa homogenizovalo v chladenom acetóne a extrakcia sa opakovala, až kým sa vzorky neodfarbili (celkový objem 50-100 ml). Extrakty sa potom prefiltrovali cez 0,45 µm membránu. Karotenoidy sa preniesli do 50-100 ml petroléru s teplotou 40-60 °C, obsahujúceho 10% dietyléter (obj./obj.). Stopy acetónu sa potom odstránili opakovaným premytím vodou. Extrakty sa potom sušili vo vákuovej rotačnej odparke pri teplote 35 °C až do úplného vysušenia a potom sa znovu rozpustili v 10 ml acetónu [38].

3.4 Antioxidačná aktivita

Ako antioxidanty sa označujú látky predlžujúce uchovateľnosť potravín tak, že ich chránia pred znehodnotením spôsobeným oxidáciou prítomných tukov a ďalších, ľahko sa oxidujúcich zložiek, ktorá sa prejavuje ich žltnutím. Oxidácia tiež vyvoláva ďalšie zmeny, ktoré negatívne ovplyvňujú ich výživovú, hygienicko-toxikologickú a senzorickú hodnotu (vôňa, chuť, farba). Antioxidanty ovplyvňujú tento proces oxidácie tým, že buď zreagujú s voľnými radikálmi alebo redukujú vzniknuté hydroperoxydy, naväzujú do komplexov katalyticky pôsobiace kovy či odstraňujú prítomný kyslík. Nezastavujú oxidáciu úplne, ale len znižujú jej rýchlosť čím je zabránený priebeh oxidačnej reakcie ako je napríklad premena polynenasýtených mastných kyselín na hydroperoxydy mastných kyselín. Delia sa na antioxidanty prírodné (z rastlinných materiálov) a syntetické [14, 22].

Antioxidačná aktivita rôznych častí moringy je prisudzovaná najmä prítomnosti kyseliny askorbovej, β-karoténu, kvercetínu a fenolovým kyselinám. Tiež izokyanátom, polyfenolom a rutínu prítomným v listoch, tokoferolom, myricetínu a lektínu v semenách, prokyanidínom z kôry a kyseliny palmitovej, fytosterolom z kvetov, ktoré boli považované

za silné antioxidanty. Tiež sa uvádza že kyselina monopalmitová, olejová a triglyceridy prítomné v oleji zo semien vykazujú antioxidantnú aktivitu [17].

Antioxidačné aktivity rôznych extraktov získaných z rôznych častí rastliny boli popísané v niekoľkých štúdiách. Zistilo sa že extrakty z listov v organických rozpúšťadlách ako je metanol či acetón vykazujú antioxidačné aktivity. Ďalšia štúdia uvádza že rôznorodý antioxidačný profil listov zodpovedá kryoprotektívnemu charakteru rastliny [17].

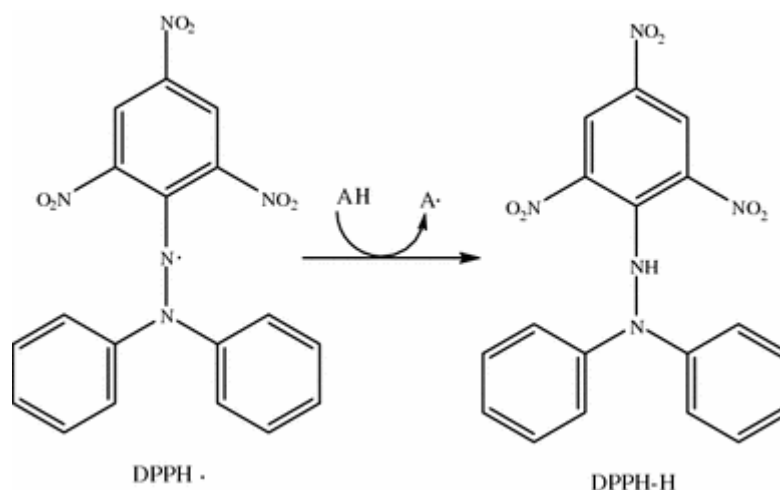
3.4.1 Antioxidačné testy

Na stanovenie antioxidačnej aktivity boli vyvinuté testy, ktoré delíme na metódy založené na eliminácii radikálov – DPPH, ABTS a ORAC a metódy ktoré hodnotia redoxné vlastnosti látok – FRAP. Podľa mechanizmu ich môžeme teda rozdeliť na metódy kde je základným princípom prenos atómu vodíku alebo metódy pri ktorých dochádza ku prenosu jedného elektrónu [39].

Antioxidačná aktivita z výťažkov z listov moringy bola hodnotená za použitia všetkých troch metód založených na eliminácii radikálov a to DPPH, ABTS a ORAC.

3.4.1.1 Metóda DPPH

Je to najstaršia nepriama metóda na stanovenie antioxidačnej aktivity. Používa sa voľný radikál DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Je jedným z mála stabilných organických radikálov dusíku s charakteristickou tmavofialovou farbou a absorpčným maximom pri vlnovej dĺžke 517 nm. Antioxidanty redukujú radikál za vzniku DPPH-H (difenylypikrylhydrazylu) (obrázok 8) a dochádza ku strate zafarbenia, čo je detekované spektrofotometricky. U vzoriek sa radikálová aktivita vyjadruje v ekvivalentoch kyseliny askorbovej alebo v jednotkách štandardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová kyselina). Výhodou tejto metódy oproti ABTS je dobrá dostupnosť radikálu, ktorý nemusí byť detekovaný pred stanovením. Naopak jej nevýhodou je časová náročnosť, keďže niektoré antioxidanty reagujú s DPPH pomaly alebo sú voči nemu inertné. Často sa využíva na sledovanie antioxidačnej aktivity ovocných a zeleninových džúsov a štiav. Tiež môže byť použitá na analýzu farebných alebo zakalených vzoriek s nízkym obsahom antioxidačných zlúčenín [39].



Obrázok 8 – účinok vychytávania radikálov DPPH antioxidantom (AH) [40]

3.4.1.2 Metóda ABTS

Táto metóda testuje schopnosť antioxidantu, ktorý je vo vzorke, zhášať radikálový kation ABTS (2,2-azinobis-3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát). Zhášanie radikálu sa meria spektrofotometricky na základe zmien absorbancie. Tento radikál má typickú modrozelenú farbu s maximom absorbancie pri 734 nm. V prípade, že sa nachádza vo vzorke antioxidant, dochádza ku zmene farby a zníženiu absorbancie, čím sa dá určiť koncentrácia prítomného antioxidantu [39].

Antioxidačná aktivita vzorky sa porovnáva s aktivitou syntetickej látky Trolox. Medzi jej výhody patrí jednoduchosť a rýchlosť testu, taktiež použitie v širokom rozsahu pH. Pomocou tejto metódy sa dá detekovať antioxidačná aktivita hydrofilných aj lipofilných vitamínov [39].

3.4.1.3 Metóda ORAC

Metóda ORAC (oxygen radical absorbance capacity) je založená na meraní vychytávania peroxylového radikálu antioxidantmi prítomnými vo vzorke. Peroxylový radikál je indukovaný AAPH (2,2-azobis-2-amidinopropán-dichlorid) pri 37 °C. Zvyšné peroxylové radikály, ktoré nie sú odstránené antioxidantmi, ďalej oxidujú β-fykoerytrín, čo spôsobí úbytok fluorescenčného signálu. Detekuje sa úbytok fluorescence β-fykoerytrínu po napadnutí radikálmi. Proteín β-fykoerytrín bol pre svoje nevýhody, hlavne kvôli obmedzeniu pri stanovení antioxidačnej aktivity polyfenolov, nahradený fluoresceínom, čím sa táto metóda spresnila. Na vyhodnotenie sa používa buď porovnanie plochy pod krivkou fluorescenčného signálu alebo sa porovnávajú krivky vzoriek s krivkami štandardu, napr. Troloxu. Používa sa na detekciu antioxidačnej aktivity lipofilných aj hydrofilných zlúčenín [39].

3.4.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Na stanovenie antioxidačnej aktivity vzorky listov z moringy sa použila metóda DPPH kde roztok DPPH (150 μM) bol pripravený v 80% metanole, 20 μl tohto metanolového extraktu sa pridalo do jamky na 96-jamkovej platni s viditeľným svetlom a plochým dnom, ktorá obsahovala 200 μl roztoku DPPH. Absorbancia bola odčítaná pri 520 nm po 0, 4, 10, 30, 60 a 90 minútach [36].

Ďalšou z použitých metód na stanovenie antioxidačnej aktivity vzorky listov bola metóda ABTS. Test ABTS sa uskutočnil tak, že 20 μl metanolového extraktu sa zmiešalo s 230 ml roztoku ABTS. Absorbancia bola odčítaná pri 570 nm pri izbovej teplote po 0, 4, 10, 30, 60 a 90 minútach [36].

Pri meraní sa porovnávali vzorky vypestovaných listov (B) za kontrolovaných podmienok, so vzorkami zakúpenými na trhu (CB). Pre oba testy sa vypočítala hodnota TEAC s použitím kalibračnej krivky a výsledky sa vyjadrili ako μmol ekvivalentov Troloxu na gram suchej vzorky (μmol Trolox/g) (tabuľka 2) [36].

Tabuľka 2 – stanovenie antioxidačnej aktivity listov moringy metódou ABTS a DPPH [36]

antioxidačná aktivita	ABTS	DPPH
	TEAC (μmol trolox/g)	
vzorka B1	714,73	646,67
vzorka B2	749,83	688,67
vzorka B3	721,47	638,74
vzorka CB1	730,82	661,22
vzorka CB2	741,25	677,33

U vzoriek listov bola porovnávaná antioxidačná aktivita medzi dvoma metódami, a to ABTS a DPPH. Antioxidačná aktivita získaná týmito metódami bola podobná, aj keď o niečo vyššie hodnoty sa získali použitím metódy ABTS [36].

Na stanovenie antioxidačnej aktivity vzorky listov z moringy sa taktiež použila aj metóda ORAC. Pri ORAC postupe sa použila automatizovaná čítačka platní s 96- jamkovými doštičkami. Analýza sa uskutočnila vo fosfátovom pufre (pH 7,4) pri 37 °C. Peroxylový radikál sa vytvoril s použitím AAPH, ktorý sa pripravil čerstvý pre každý cyklus. Ako substrát sa použil fluoresceín. Fluorescenčné podmienky boli nasledovné: excitácia pri 485 nm a emisia pri 528 nm. Ako štandard sa použil Trolox s kalibračnou krivkou, ktorá bola

lineárna v rozmedzí 0-300 μM . Meranie sa uskutočnilo na štvorici vzoriek, hnojených hnojivom (T) líšiacim sa rozdielnym obsahom hladiny dusíku. Pestovanie listov trvalo 16 týždňov a antioxidačná aktivita vzoriek listov bola hodnotená v 6. a 16. týždni hnojenia. Výsledky boli vyjadrené ako $\mu\text{M TE/mg}$ suchého extraktu (tabuľka 3) [35].

Tabuľka 3 – antioxidačná aktivita listov moringy metódou ORAC [35]

obsah dusíku v hnojive (T)	ORAC ($\mu\text{M TE/mg}$ suchý extrakt)
1. zber	
T0	543
T25	505,1
T50	426,5
T100	394,8
2.zber	
T0	494,4
T25	512,8
T50	453,5
T100	451,5

Hodnoty antioxidačnej aktivity, vybraných vzoriek listov, získaných metódou ORAC sú podobné aj keď s malými rozdielmi, z čoho vyplýva že nižšie hladiny dusíku v listoch majú lepší vplyv na antioxidačnú aktivitu [35].

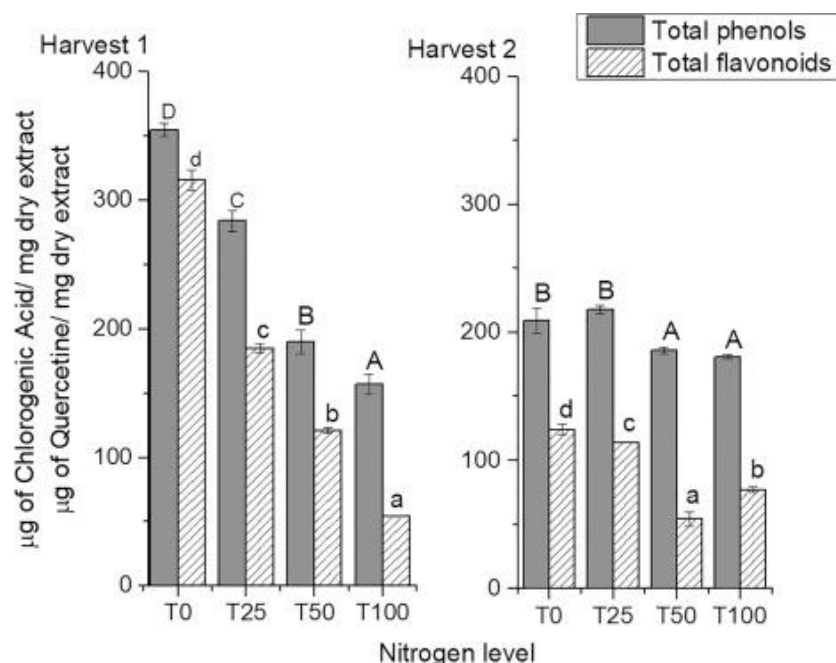
3.5 Stanovenie celkových fenolov a flavonoidov

Celkový obsah fenolov v extrakte z listov moringy sa dá stanoviť kolorimetrickou metódou Folin-Ciocalteua. Fenoly sú najvýznamnejšia a najrozmanitejšia skupina látok s antioxidačným účinkom bežne sa vyskytujúca v rastlinných potravinách. Sú to látky s aromatickým reťazcom s jednou alebo viacerými hydroxylovými skupinami, zahrňujúce ich funkčné deriváty. V rastlinách sa vyskytuje niekoľko tisíc štruktúrne rôznorodých fenolových zlúčenín. Vzhľadom ku ich širokému rozšíreniu a pomerne veľkej koncentrácii v rastlinách sú bežnou súčasťou ľudskej potravy. Najbežnejšími rastlinnými fenolmi sú flavonoidy a fenolové kyseliny [35, 41].

Metóda Folin-Ciocalteua je založená na redukcii žltého FC činidla (kyslý rztok fosforečnanu molybdenového a wolframového) fenolmi na modré reakčné produkty a meranie absorbancie pri 700-760 nm. Vzniknutá modrá farba je spôsobená redukčnými produktmi wolfrámu a molybdénu. Redukčná reakcia je účinnejšia za alkalických podmienok ktoré

poskytuje roztok uhličitanu sodného. Vyhodnotenie sa robí kalibračnou krivkou s použitím kyseliny chlorogenovej ako štandardu (0,1 mg/ml) [35, 41].

Obsah flavonoidov bol stanovený modifikovanou spektrofotometrickou metódou založenou na tvorbe komplexov hliník-flavonoid a ktorej princípom je spektrofotometrická detekcia farebných komplexov Al^{3+} s hydroxylovou a karbonylovou skupinou v alkalickom prostredí. Kalibračná krivka sa pripravila so štandardným roztokom kvercetínu. Pestovanie listov trvalo 16 týždňov a stanovenie celkových fenolov a flavonoidov sa uskutočnilo v 6. a 16. týždni hnojenia vzorky listov moringy [35, 41].



Obrázok 9 – vplyv hladiny dusíku na celkové fenoly a flavonoidy, T0,T25,T50,T100-vzorky listov hnojené hnojivom s rozdielnym obsahom dusíku [35]

Najvyšší obsah stanovovaných zlúčenín mala prvá vzorka znázornená na obrázku 9 vľavo. V prvom zbere sa so zvyšujúcou hladinou dusíku vo vzorkách znižoval obsah celkových fenolov a flavonoidov o dosť výraznejšie ako pri druhom zbere kde sa hodnoty medzi jednotlivými vzorkami listov príliš nemenili (obrázok 9) [35].

3.6 Stanovenie voľných fenolových zlúčenín metódou HPLC-DAD

Na toto stanovenie sa použila metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s detekciou diódovým poľom (HPLC-DAD) s použitím kolóny Zorbax eclipse XDB-C18. K výhodám tejto metódy patrí rýchle stanovenie absorpčného maxima látky, kvantifikácia pík s odlišnými spektrálnymi vlastnosťami v jednej analýze. Je vhodná na veľké organické molekuly a organokovové zlúčeniny, ktoré absorbujú UV/VIS žiarenie. Detektor DAD

je vysoko citlivý pre látky obsahujúce chromofór, má nízku citlivosť odozvy voči zmenám zloženia mobilnej fázy a teploty a ľahko sa obsluhuje [36, 42].

Použitá kolóna na analýzu bola termostaticky regulovaná pri 35 °C a prietok bol nastavený na 1 ml/min. Mobilná fáza sa skladala z rozpúšťadla A, ktoré predstavovalo vodu s 0,1% kyselinou octovou, a rozpúšťadla B predstavujúceho 100% acetonitril. Fenolové kyseliny sa detekovali pri 280 nm a flavonoidy pri 320 nm. Dávkoval sa objem 20 µl. Ako štandard sa použila kyselina gallová, chlorogenová, kávová, elagová, p-kumarová, sinapová, felurová a vanilín, rutín, katechín, morín, kvercetín a kaempferol. Výsledky sa vyjadrili ako µg každej vzorky fenolovej zlúčeniny/g vzorky (tabuľka 4) [36].

Tabuľka 4 – obsah voľných fenolových zlúčenín v listoch moringy určených metódou HPLC-DAD [36]

zlúčenina	vzorka (µg/g)
k. gallová	63,34
k. chlorogenová	180,45
k. kávová	8,94
k. elagová	< LOD
k. p-kumarová	120,37
k. sinapová	< LOD
k. felurová	< LOD
vanilín	79,88
rutín	21,91
katechín	1,21
morín	5,61
kvercetín	27,58
kaempferol	14,71

Ako je vidieť v tabuľke, vzorka vykazovala najvyšší obsah kyseliny chlorogenovej, p- kumarovej, a gallovej, ako aj vanilínu. V tabuľke sa vyskytujú aj zlúčeniny ktorých hodnoty boli pod medzou detekcie označené ako < LOD [36].

3.7 Analýza fenolových zlúčenín metódou UHPLC-ESI-MS/MS

Profil fenolových zlúčenín bol tiež hodnotený ultra-výkonným kvapalinovým chromatografickým (UHPLC) systémom spojeným hmotnostným detektorom s ionizačným elektrosprejom (ESI-MS/MS). Je to ideálna metóda na identifikáciu a kvantifikáciu mnohých

zlúčenín prítomných v biologickej vzorke. V porovnaní s HPLC umožňuje oveľa väčšie prevádzkové tlaky, čím sa aj skrátí čas analýzy bez straty účinnosti [35, 43, 44].

Použitá kolóna bola prevádzkovaná pri teplote 20 až 40 °C so vstrekaným objemom 5 µl. Systém binárnych rozpúšťadiel (prietok 250 µl/min.) pozostával z rozpúšťadla A- voda/kyselina mravčia 99:1 a rozpúšťadla B-acetonitril. Testy boli vyhodnotené kalibračnou závislosťou pri koncentráciách štandardov 4-20 ng (kyselina šikimová, quínová, chlorogenová, 4- hydroxybenzoová, 4- o- caffeoylchinová, rutín, kvercetín a kaempferol). Výsledky sa vyjadrili ako ng/g suchých listov (tabuľka 5) [35].

Tabuľka 5 – identifikácia a kvantifikácia fenolových zlúčenín metódou UHPLC-MS [35]

zlúčenina	vzorka (ng/g)
k. šikimová	51,34
k. 4-hydroxybenzoová	0,09
k. quínová	1433,97
k. chlorogenová	0,71
k. 4-o-caffeoylchinová	2,45
rutín	3,35
kvercetín	18,45
kaempferol	7,31

Metódou UHPLC-MS sa zistilo najvyššie množstvo kyseliny quínovej s dost' veľkým rozdielom hodnôt oproti ostatným zlúčeninám [35].

3.8 Stanovenie vlákniny

Analyzovala sa celková diétna (TDF), rozpustná (SDF) a nerozpustná (IDF) vláknina normovanou metódou AOAC 991,43 [45] kde sa 1 g každej vzorky umiestnil do Erlenmayerovej banky obsahujúcej 50 ml 0,08 M fosfátového pufru s upravenou hodnotou pH na 6. Vzorky sa umiestnili do vodného kúpeľu pri 100 °C, ku každej sa pridalo 0,1 ml termostabilnej α -amylázy a nechali sa inkubovať 30 minút s ručným miešaním každých 5 minút. Následne sa banky rýchlo ochladili a pH vzorky sa upravilo na 7,5. Po pridaní 0,1 ml proteázy (5 mg proteázy v 1 ml fosfátového pufru) sa vzorky inkubovali vo vodnom kúpeli pri 60 °C počas 30 minút. Po ochladení na laboratórnu teplotu sa hodnota pH upravila na 4 a vzorky sa podrobili konečnej inkubácii vo vodnom kúpeli, opäť pri 60 °C počas 30 minút s prídavkom 0,3 ml amyloglukozidázy. Všetky vzorky sa inkubovali 30 minút za konštantného

miešania, po čom nasledovalo pridanie 100 ml etanolu pri izbovej teplote (v pomere vzorka/etanol 1:4) a zmes sa nechala stáť 24 hodín [36].

Vzorka listov sa prefiltrovala a zvyšky sa trikrát premyli 10 ml destilovanej vody. Zvyšky sa umiestnili do pece s teplotou 90 °C po dobu 2 hodín, aby sa vysušili do konštantnej hmotnosti a odvážili sa. Rozpustná vlákna sa vyzrážala po pridaní alkoholu a následne gravimetricky stanovila. Nerozpustná vlákna sa tiež stanovila gravimetricky a celková vlákna bola vypočítaná ako súčet rozpustnej a nerozpustnej. Pri meraní sa porovnávali vzorky vypestovaných listov (B) za kontrolovaných podmienok, so vzorkami zakúpenými na trhu (CB). Výsledky sú vyjadrené v % (tabuľka 6) [36].

Tabuľka 6 – obsah celkovej (TDF), nerozpustnej (IDF) a rozpustnej (SDF) vlákniny v listoch moringy [36]

vzorka	TDF (%)	IDF (%)	SDF (%)
B1	18,06	16,12	1,94
B2	21,05	18,75	2,29
B3	18,22	16,48	1,74
CB1	19,01	17,13	1,88
CB2	20,01	18,15	1,86

Vzorky listov obsahovali najviac celkovej diétnej vlákniny (TDF) s približne rovnakými hodnotami nerozpustnej vlákniny (IDF), ktorej bolo približne 8-krát viac ako rozpustnej (SDF), ktorá mala najmenšie percentuálne zastúpenie. Dané rozdiely v obsahu vláknin súvisia s poveternostnými a pôdnymi podmienkami [36].

3.9 Stanovenie vitamínu C

Na stanovenie vitamínu C sa použila upravená jodometrická metóda ktorej princípom je farebná reakcia medzi škrobovým mazom a roztokom KI + I₂. Stanovenie vitamínu C sa uskutočňuje pomocou dichromanu draselného (K₂Cr₂O₇) v prítomnosti jodidu draselného (KI). Najskôr dochádza ku reakcii dichromanu draselného s vitamínom C (oxidácia) a po spotrebovaní všetkého vitamínu C dochádza ku vzniku jódu a zafarbeniu roztoku [46, 47].

Vzorka z listov moringy sa odvážila na analytických váhach, kvantitatívne vložila do titračnej banky, pridalo sa 10 ml 2 M kyseliny chlorovodíkovej a zriedila sa na 50 ml destilovanou vodou. Roztok sa titroval 0,1 M dichromanom draselným. Počas titrácie sa do roztoku pridal ešte 1 ml 1% roztoku škrobového mazu (čerstvo pripraveného) a 1 ml 0,1 M jodidu draselného. Roztok sa titroval do vzniku perzistentnej modrej. Kvantifikácia obsahu

vitamínu C bola závislá od vzťahu: 1 ml 0,1 M dichromanu draselného je ekvivalentný 0,008806 g vitamínu. Výsledky boli vyjadrené ako mg/100g vzorky (tabuľka 7) [46, 47].

Tabuľka 7 – obsah vitamínu C v surovinách [46]

vzorka	obsah vitamínu C (mg/100g)
listy moringy	38,8
ružový grapefruit	35,359
repa	33,84
červená kapusta	23,706
paradajky	10,201
jablko (golden auriu)	7,016

V porovnaní s ďalšími potravinami uvedenými v tabuľke, najviac vitamínu C obsahovali vzorky listov rastliny Moringa olejodárna [46].

3.10 Stanovenie karotenoidov metódou LC-APCI-MS

Na kvantifikáciu karotenoidov v extraktach zo vzoriek listov, kvetov či plodov sa použila kvapalinová chromatografia (LC) s použitím hmotnostného detektoru s chemickou ionizáciou za atmosférického tlaku (APCI-MS). Je to metóda mäkkej ionizácie, podobná chemickej, pri ktorej sa primárne ióny vyrábajú na rozprašovači rozpúšťadla a využíva reakcie iónovo-molekulových molekúl v plynnej fáze pri atmosférickom tlaku. Jej výhodou je, že umožňuje použitie vysokých prietokov priamo a často bez odvádzania väčšieho podielu objemu do dopadu, ako pri iných ionizačných metódach. Je vhodná pre polárne a relatívne menej polárne tepelne stabilné zlúčeniny s nízkou až strednou molekulovou hmotnosťou. Používa sa v analýze liečiv, nepolárnych lipidov, prírodných zlúčenín, pesticídov či organických zlúčenín. Stretáva sa aj s obmedzeniami a to pri analýze biopolymérov, organokovových zlúčenín, iónových zlúčenín a iných labilných analytov [38, 48].

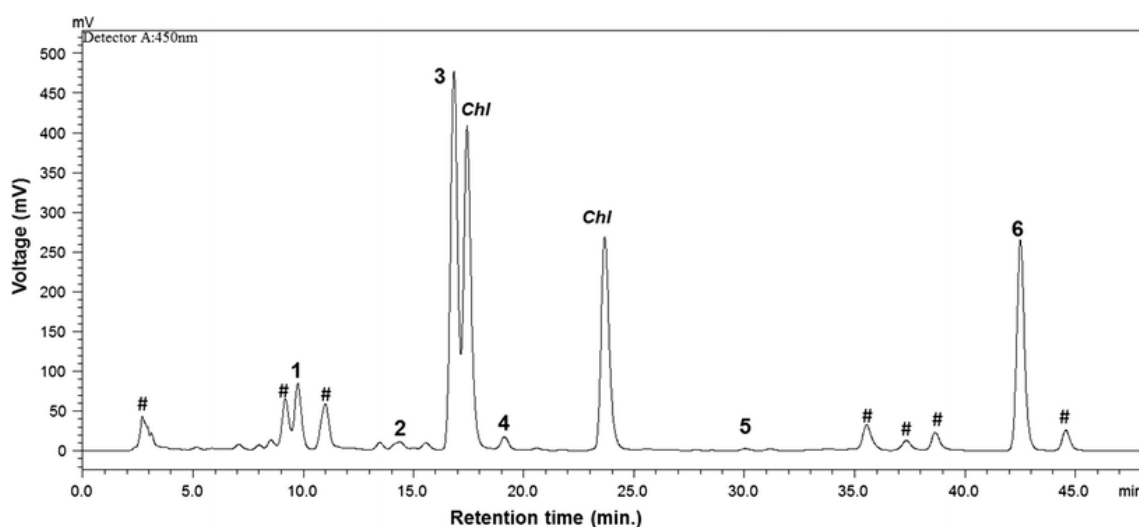
Extrahované vzorky listov, kvetov a plodov boli analyzované pomocou LC-MS pre luteoxantín, 13-Z-luteín, all-E-zeaxantín, 15-Z- β -karotén a all-E- β -karotén. Na chromatografickú separáciu sa použila karotenoidová kolóna YMC C₃₀. Ako mobilná fáza sa použila zmes metanol/metyl-terc-butyléter/voda v pomere 81:15:4 ako rozpúšťadlo A a zmes metanol-terc-butyléter/metanol v pomere 91:9 ako rozpúšťadlo B. Prietok bol nastavený na 1 ml/min. Do systému LC-APCI-MS sa vstrekol objem 20 μ l extraktu.

Spektrá boli zaznamenané pri 200-660 nm. Výsledky sa vyjadrili ako mg/100 g čerstvej hmotnosti (tabuľka 8) [38].

Tabuľka 8 – karotenoidné zloženie listov, kvetov a plodov analyzovaných metódou LC-APCI-MS [38]

karotenoidy	listy (mg/100 g)	kvety (mg/100 g)	plody (mg/100 g)
All-E-luteoxantín	5,2	0,0308	0,1962
13-Z-luteín	2,31	0,0513	0,0835
All-E-luteín	36,88	0,1055	1,5425
All-E-zeaxantín	5,46	0,0791	0,2109
15-Z-p-karotén	0,69	0,134	0,015
All-E- β -karotén	18,27	0,1438	0,9186
celkové karotenoidy	68,81	0,5445	2,9668

Pri porovnaní listov, kvetov a plodov sa zistilo že listy obsahujú mnohonásobne viac celkových karotenoidov ako kvety a plody rastliny moringa olejodárna. Najvyššie hodnoty karotenoidu v listoch, kvetoch a plodoch dosahuje all-E-luteín ako hlavný zástupca karotenoidov v moringe, za ktorým nasleduje druhý najviac zastúpený karotén, a to all-E- β -karotén [38].



Obrázok 10 – LC chromatogram karotenoidov extraktu z listov moringy, 1 – all-E-luteoxantín, 2 – 13-Z-luteín, 3 – all-E-luteín, 4 – all-E-zeaxantín, 5 – 15-Z- β -karotén, 6 – all-E- β -karotén, Chl – chlorofyl, # - neznáme vrcholy [38]

Chromatogram z analýzy listov potvrdzuje najvyšší obsah all-E-luteínu charakterizovaný najvyšším píkcom, ako najviac zastúpeným karotenoidom, s ostatnými píkmi označenými číslami a priradenými ostatným prítomným karotenoidom, s dvomi píkmi chlorofylu označenými Chl a ostatnými neznámymi zlúčeninami (obrázok 10) [38].

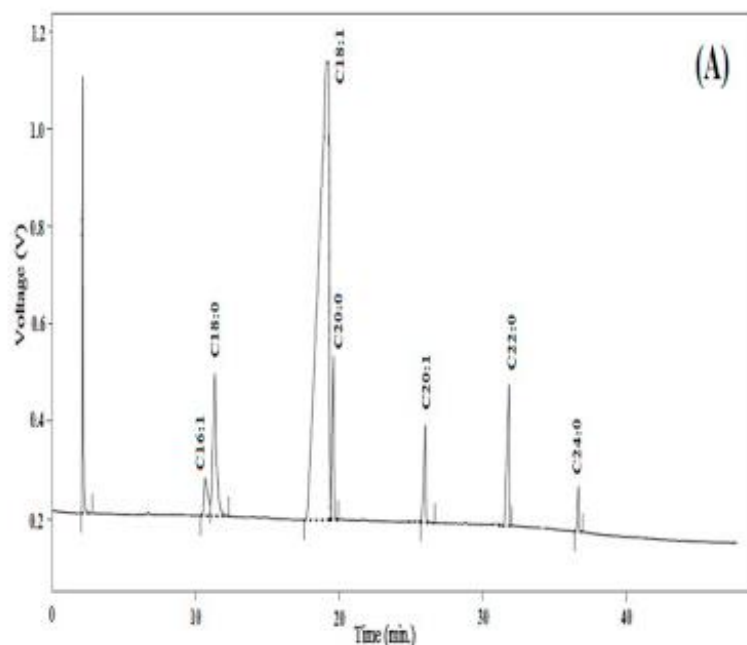
3.11 Stanovenie mastných kyselín v oleji

3.11.1 Extrakcia vzorky semien

Na stanovenie mastných kyselín vo vyextrahovanom oleji sa použila vzorka semien z moringy, ktorá sa najskôr vyčistila aby sa odstránili cudzie materiály a potom sa ponorila do petroléteru na 4 hodiny aby sa zbavila zvyšných nečistôt, ktoré v nej zostali. Nakoniec sa vysušila a rozdrvila na prášok. 10 gramov tohto prášku sa extrahovalo v Soxhletovom extraktore. Ako extrakčné rozpúšťadlo sa použilo 200 ml zmesi chloroform/metanol v pomere 3:1 a zmes sa podrobila viacnásobnej extrakcii až pokým sa z pevného materiálu neodstránil celý olej. Potom sa banka obsahujúca vzorku raz prefiltrovala a roztok sa zahustil na rotačnej odparke aby sa získal olej z moringy, ktorý sa použil na stanovenie mastných kyselín [19].

3.11.2 Metóda plynovej chromatografie

Zloženie mastných kyselín vyextrahovaného oleja zo semien sa určilo pomocou plynovej chromatografie (GC) po derivatizácii na metylestery mastných kyselín (FAME). Približne 1 g extrahovaného oleja sa zmiešal s 0,1 g metoxidu sodného a 10 ml metanolu a zmes sa nechala približne 1 hodinu zahrievať pod spätným chladičom vo vodnom kúpeli pri teplote 80-90 °C. Zmes sa ochladila a vložila do lievika s prídavkom hexánu a premyla sa vodou. Nakoniec sa pridal síran sodný na odstránenie akýchkoľvek stôp vody vo FAME. Separácia a identifikácia FAME sa uskutočnila na plynovom chromatografe s plameňovo-ionizačným detektorom (FID). Množstvo vstrekovanej vzorky bolo 1,0 µl a ako nosný plyn sa použil dusík s prietokom 4,0 ml/min. Teplota dávkovacieho ventilu a detektoru bola nastavená na 270 a 280 °C. FAME boli kvantifikované ako percentá z celkových plôch metylových esterov [19].



Obrázok 11 – CG analýza oleja moringa [19]

Výsledný GC chromatogram extrahovaného oleja ukazuje prítomnosť rôznych mastných kyselín ako je kyselina palmitoolejová, stearová, arachidonová, behenová, gadolejová, lignocerová a olejová, ktorým sú priradené jednotlivé píky a z ktorých najvyšší pík patrí kyseline olejovej, ako najviac zastúpenej a hlavnej nenasýtenej mastnej kyseline vo vyextrahovanom oleji zo semien moringy (obrázok 11) [19].

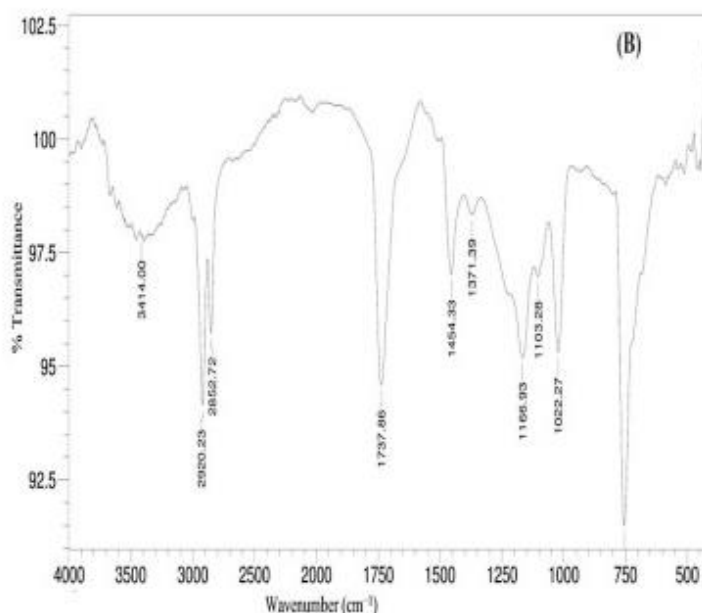
Tabuľka 9 – relatívne percento zloženia MK v extrahovanom oleji zo semien moringy [19]

názov mastnej kyseliny	namerané hodnoty (%)
k. palmitoolejová (C 16:1)	2,2
k. stearová (C 18:0)	7,7
k. olejová (C 18:1)	73,5
k. arachidonová (C 20:0)	4,6
k. gadolejová (C 20:1)	2,9
k. behenová (C 22:0)	4,9
k. lignocerová (C 24:0)	1

Analýzou sa potvrdila prítomnosť rôznych mastných kyselín ako je kyselina stearová (C 18:0), arachidonová (C 20:0), behenová (C 22:0), gadolejová (C:20:1), lignocerová (C:24:0) či palmitoolejová (C 16:1) alebo olejová (C 18:1) s najvyšším percentuálnym zastúpením spomedzi uvedených kyselín (tabuľka 9), ako ukazuje aj výsledný GC chromatogram uvedený na obrázku vyššie [19].

3.11.3 FTIR analýza

Analýza FTIR (infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou) sa použila na odhalenie funkčných skupín prítomných vo vyextrahovanom oleji. Spektrá FTIR extrahovaných olejových vzoriek sa zaznamenávali spektrofotometrom FTIR pomocou vzorkovacej techniky ATR (zoslabenej úplnej reflektancie) v rozsahu vlnočtov $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ [19].



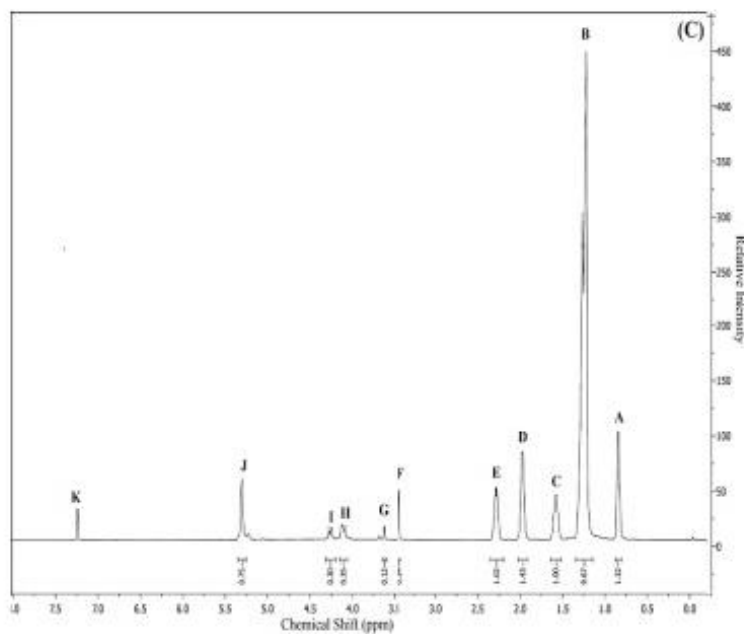
Obrázok 12 – FTIR spektrum oleja moringa [19]

Výsledné spektrum obsahuje píky charakteristické pre jednotlivé funkčné skupiny. Najdlhší pík v oblasti 750 cm^{-1} je typický pre prítomnosť orto-substituentov, pík v oblasti 1737 cm^{-1} ukazuje na prítomnosť esterovej funkčnej skupiny, píky pri 2920 cm^{-1} a 2852 cm^{-1} zase skupinám CH a CH₂ v mastných kyselinách (obrázok 12) [19].

3.11.4 H-NMR analýza

Na štúdium a porovnanie molekulovej štruktúry extrahovaného oleja zo semien moringy sa použila H-NMR (protónová nukleárna magnetická rezonancia). Analýza

extrahovaného oleja z moringy sa uskutočnila s použitím prístroja Agilent 400 MHz NMR Magnet. Vzorka oleja sa rozpustila v deuterovanom chloroforme a spektrá sa zaznamenali v oblasti 0,5-8,0 ppm [19].



Obrázok 13 – H-NMR spektrum oleja moringa [19]

Taktiež spektrum z H-NMR analýzy (obrázok 13) ukazuje výsledné píky priradené jednotlivým skupinám. Najvyšší pík (B) patrí acylovej skupine, pík označený písmenom K patrí použitému rozpúšťadlu, ktorým bol deuterovaný chloroform. Najmenšie píky označené písmenami I a G patria CH₂O skupine tetrahydropyranového kruhu a esterovmu protónu.

Obidve analytické metódy FTIR a H-NMR sa použili na potvrdenie funkčných skupín a štruktúry zložiek prítomných vo vyextrahovanom oleji zo semien moringy olejodárnej [19].

4 ZÁVER

Táto práca je zameraná na analýzu biologicky aktívnych látok vyskytujúcich sa v rastline moringa olejodárna. Medzi najviac zastúpené účinné látky v moringe patria flavonoidy, fenoly, karotenoidy, mastné kyseliny a vitamín C, vyskytujúce sa v rôznych častiach tejto rastliny. Ešte pred samotnou analýzou sa však látky zo vzorky musia izolovať pomocou extrakcie. Pri extrakcii dochádza ku rozseparovaniu látok pri ktorej sa z kvapalnej alebo tuhej zmesi oddelí vyžadovaná zložka rozpúšťaním v extrakčnom rozpúšťadle a využíva sa pri nej rozdielna rozpustnosť jednotlivých zložiek v rôznych rozpúšťadlách. Najviac využívané druhy extrakcie na rôzne časti vzoriek z moringy patrí extrakcia kvapalinou a Soxhletova extrakcia.

Na stanovenie fenolových zlúčenín sa použili separačné techniky v kvapalnej fáze, ako je kvapalinová chromatografia s detekciou diódovým poľom (HPLC-DAD) či ultra-výkonná kvapalinová chromatografia (UHPLC) spojená s hmotnostným detektorom s ionizačným elektrosprejom (ESI-MS/MS). Kde bola mobilná fáza zložená z acetonitrilu a kyseliny mravečej s vodou, či kyseliny octovej. Taktiež sa na stanovenie týchto biologicky aktívnych látok dajú použiť spektrofotometické metódy s použitím FC činidla alebo tvorbe komplexu flavonoidu s hliníkom, kde sa meria absorbancia. Na analýzu karotenoidov sa použila tiež kvapalinová chromatografia ale s použitím hmotnostného detektoru s chemickou ionizáciou za atmosférického tlaku (LC-APCI-MS) kde sa porovnávali obsahy týchto látok vyskytujúcich sa v rôznych častiach moringy a ktorou sa zistilo že najbohatšie na karotenoidy sú jej listy, ktoré mali mnohonásobne vyšší obsah oproti kvetom či plodom. Na stanovenie MK sa použil vyextrahovaný olej zo semien moringy, ktorý sa analyzoval plynovou chromatografiou (GC) kde sa určila kvantifikácia jednotlivých MK zastúpených v tomto oleji, a určila že najviac zastúpenou MK je kyselina olejová. Analýza MK sa urobila aj ďalšími dvomi metódami a to FTIR a H-NMR ktorými sa na základe získaných výsledných spektier určili prítomné funkčné skupiny v mastných kyselinách vyskytujúcich sa vo vyextrahovanom oleji zo semien moringy.

Ako je už v práci uvedené, moringa je výborný zdroj antioxidantov. Na stanovenie antioxidačnej aktivity boli vyvinuté rôzne testy založené na eliminácii radikálov alebo ktoré hodnotia redoxné vlastnosti látok. Na stanovenie antioxidačnej aktivity vo vzorkách listov z moringy sa použili testy ako DPPH, ATBS a ORAC, ktoré sú založené na eliminácii radikálov a spektrofotometrickej detekcii týchto eliminácií. V listoch moringy sa porovnávala antioxidačná aktivita medzi metódou DPPH a ATBS z ktorých vyšla lepšie DPPH metóda.

5 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] ANWAR, Farooq, Sajid LATIF, Muhammad ASHRAF a Anwarul GILANI. *Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses*. Phytotherapy Research. 2007, 21(1), 17-25. DOI: 10.1016/j.jssas.2016.02.002. ISSN 0951418X.
- [2] SÁNCHEZ-MACHADO, Dalia, José NÚÑEZ-GASTÉLUM, Cuauhtémoc REYES-MORENO, Benjamin RAMÍREZ-WONG a Jaime LÓPEZ-CERVANTES. *Nutritional Quality of Edible Parts of Moringa oleifera*. Food Analytical Methods. 2010, 3(3), 175-180. DOI: 10.1007/s12161-009-9106-z. ISSN 1936-9751.
- [3] OYEYINKA, Adewumi a Samson OYEYINKA. *Moringa oleifera as a food fortificant: Recent trends and prospects*. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2018, 17(2), 127-136. DOI: 10.1016/j.jssas.2016.02.002. ISSN 1658077X.
- [4] ANWAR, Farooq a M. BHANGER. *Analytical Characterization of Moringa oleifera Seed Oil Grown in Temperate Regions of Pakistan*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003, 51(22), 6558-6563. DOI: 10.1021/jf0209894. ISSN 0021-8561.
- [5] Herbář. Botany.cz. 2019 [cit. 2019-03-18]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/moringa-oleifera/>
- [6] STARR, Forest. *Moringa oleifera (Kalamungay, drumstick tree)*. In: Biolib.cz. 2007 [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <http://www.starrenvironmental.com/images/image/?q=24882115715>
- [7] FALOWO, Andrew, Felicitas MUKUMBO, Emrobowansan IDAMOKORO, José LORENZO, Anthony AFOLAYAN a Voster MUCHENJE. *Multi-functional application of Moringa oleifera Lam. in nutrition and animal food products: A review*. Food Research International. 2018, 106, 317-334. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.12.079. ISSN 09639969.
- [8] ELWAN, Azhar, Aida SALAMA, Abdelbaset SAYED, Ahmed GHONEIM, Aziza ELSAIED, Fatma IBRAHIM a Mohamed ELNASHARTY. *Biophysical and biochemical roles of Moringa oleifera leaves as radioprotector*. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2018, 140, 142-149. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.06.003. ISSN 00796107.
- [9] TEKAYEV, Muhammetnur, Nuray BOSTANCIERI, Khandakar SAADAT, Mehmet TURKER, Mehmet YUNCU, Hasan ULUSAL, Hulya CICEK a Kaiffee ARMAN. *Effects of Moringa oleifera Lam Extract (MOLE) in the heat shock protein 70 expression and germ cell apoptosis on experimentally induced cryptorchid testes of rats*. Gene. 2019, 688, 140-150. DOI: 10.1016/j.gene.2018.11.091. ISSN 03781119.

- [10] GOPALAKRISHNAN, LakshmiPriya, Kruthi DORIYA a Devarai KUMAR. *Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application*. Food Science and Human Wellness. 2016, 5(2), 49-56. DOI: 10.1016/j.fshw.2016.04.001. ISSN 22134530.
- [11] ZIANI, Borhane, Wahiba RACHED, Khaldoun BACHARI, Maria ALVES, Ricardo CALHELHA, Lillian BARROS a Isabel FERREIRA. *Detailed chemical composition and functional properties of Ammodaucus leucotrichus Cross. & Dur. And Moringa oleifera Lamarck*. Journal of Functional Foods. 2019, 53, 237-247. DOI: 10.1016 / j.jff.2018.12.023. ISSN 17564646.
- [12] WALIA, KAVITA, ANSDEEP KAPOOR a JEFFREY FARBER. *Qualitative Microbiological Risk Assessment of Moringa oleifera Leaf Powder To Be Used To Treat Undernutrition in Infants and Children in Cambodia and India: A Review*. Journal of Food Protection. 2019, 82(3), 513-521. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-252. ISSN 0362-028X.
- [13] BRILHANTE, Raimunda, Jamille SALES, Vandbergue PEREIRA et al. *Research advances on the multiple uses of Moringa oleifera: A sustainable alternative for socially neglected population*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2017, 10(7), 621-630. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.07.002. ISSN 19957645.
- [14] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.*
- [15] DAVÍDEK, Jiří, Gustav JANÍČEK a Jan POKORNÝ. *Chemie potravin. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1983. ISBN 04-815-83.*
- [16] ŠÍCHO, Vladislav, Zdeněk VODRÁŽKA a Blanka KRÁLOVÁ. *Potravinářská biochemie. 2. vyd., dopl. a přeprac. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981.*
- [17] GUPTA, Swati, Rohit JAIN, Sumita KACHHWAHA a S.L. KOTHARI. *Nutritional and medicinal applications of Moringa oleifera Lam.—Review of current status and future possibilities*. Journal of Herbal Medicine. 2018, 11, 1-11. DOI: 10.1016/j.hermed.2017.07.003. ISSN 22108033.
- [18] SAUCEDO-POMPA, S., J.A. TORRES-CASTILLO, C. CASTRO-LÓPEZ, R. ROJAS, E.J. SÁNCHEZ-ALEJO, M. NGANGYO-HEYA a G.C.G. MARTÍNEZ-ÁVILA. *Moringa plants: Bioactive compounds and promising applications in food products*. Food Research International. 2018, 111, 438-450. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.062. ISSN 09639969.

- [19] BHUTADA, Payal R., Ananda J. JADHAV, Dipak V. PINJARI, Parag R. NEMADE a Ratnesh D. JAIN. *Solvent assisted extraction of oil from Moringa oleifera Lam. seeds*. Industrial Crops and Products. 2016, 82, 74-80. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.004. ISSN 09266690.
- [20] Alfa-linolenová kyselina. In: Wikiwand. b.r. [cit. 2019-05-24]. Dostupné z: http://www.wikiwand.com/cs/Omega-3_nenasycen%C3%A9_mastn%C3%A9_kyseliny
- [21] COMBS, Gerald. *The vitamins: [fundamental aspects in nutrition and health]*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-0-12-381980-2.
- [22] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [23] Chemical structures of rutin (RU) and quercetin (QU). In: ResearchGate. b.r. [cit. 2019-06-27]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-rutin-RU-and-quercetin-QU_fig1_266028474
- [24] Beta-carotene. In: Wikimedia. b.r. [cit. 2019-05-24]. Dostupné z: <https://pl.m.wikipedia.org/wiki/Plik:Beta-carotene.png>
- [25] KIM, Youjin, Asha JAJA-CHIMEDZA, Daniel MERRILL, Odete MENDES a Ilya RASKIN. *A 14-day repeated-dose oral toxicological evaluation of an isothiocyanate-enriched hydro-alcoholic extract from Moringa oleifera Lam. seeds in rats*. Toxicology Reports. 2018, 5, 418-426. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.02.012. ISSN 22147500.
- [26] POPOOLA, Jacob a Olawole OBEMBE. *Local knowledge, use pattern and geographical distribution of Moringa oleifera Lam. (Moringaceae) in Nigeria*. Journal of Ethnopharmacology. 2013, 150(2), 682-691. DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.043. ISSN 03788741.
- [27] HOLZBECHER, Závěš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987.
- [28] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [29] VONDRÁK, Dalibor a Jaroslav VULTERIN. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985.

- [30] ZÝKA, Jaroslav. Analytická příručka. 4., uprav. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1988. ISBN (váz.).
- [31] Soxhletov extraktor. In: . b.r. [cit. 2019-06-11]. Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/soxhlet.html>
- [32] ČŮTA, František a Milan POPL. Instrumentální analýza. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.
- [33] Schéma GC. In: Wikibooks. b.r. [cit. 2019-04-26]. Dostupné z: <https://en.wikibooks.org/w/index.php?title=File:SchemaGC.png&filetimestamp=20061029184003>
- [34] Schematic diagram of the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system. In: Researchgate. b.r. [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-the-High-Performance-Liquid-Chromatography-HPLC-system_fig2_236146377
- [35] GUILLÉN-ROMÁN, Cesiah, Ramón GUEVARA-GONZÁLEZ, Nuria ROCHA-GUZMÁN, Adán MERCADO-LUNA a Ma. PÉREZ-PÉREZ. *Effect of nitrogen privation on the phenolics contents, antioxidant and antibacterial activities in Moringa oleifera leaves*. Industrial Crops and Products. 2018, 114, 45-51. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.01.048. ISSN 09266690.
- [36] CUELLAR-NUÑEZ, M.L., I. LUZARDO-OCAMPO, R. CAMPOS-VEGA, M.A. GALLEGOS-CORONA, E. GONZÁLEZ DE MEJÍA a G. LOARCA-PIÑA. *Physicochemical and nutraceutical properties of moringa (Moringa oleifera) leaves and their effects in an in vivo AOM/DSS-induced colorectal carcinogenesis model*. Food Research International. 2018, 105, 159-168. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.11.004. ISSN 09639969.
- [37] MBOKANE, Esau a Ngonidzashe MOYO. *Alterations of haemato-biochemical parameters pre and post-challenge with Aeromonas hydrophila and survival of Oreochromis mossambicus fed Moringa oleifera-based diets*. 2018, 83, 213-222. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.09.017. ISSN 10504648.
- [38] SAINI, Ramesh Kumar, Nandini Prasad SHETTY a Parvatam GIRIDHAR. *Carotenoid content in vegetative and reproductive parts of commercially grown Moringa oleifera Lam. cultivars from India by LC-APCI-MS*. European Food Research and Technology. 2014, 238(6), 971-978. DOI: 10.1007/s00217-014-2174-3. ISSN 1438-2377.

- [39] GÜLÇİN, İlhami. *Antioxidant activity of food constituents: an overview*. Archives of Toxicology. 2012, 86(3), 345-391. DOI: 10.1007/s00204-011-0774-2. ISSN 0340-5761.
- [40] DPPH radicals scavenging effect by an antioxidant (AH). In: Springer.com. b.r. [cit. 2019-06-20]. Dostupné z: https://media.springernature.com/original/springer-static/image/art%3A10.1007%2Fs00204-011-0774-2/MediaObjects/204_2011_774_Fig13_HTML.gif
- [41] BLAINSKI, Andressa, Gisely LOPES a João DE MELLO. *Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Limonium Brasiliense L*. Molecules. 2013, 18(6), 6852-6865. DOI: 10.3390/molecules18066852. ISSN 1420-3049.
- [42] PRAGST, Fritz, Matthias HERZLER a Björn-Thoralf ERXLEBEN. *Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2004, 42(11). DOI: 10.1515/CCLM.2004.251. ISSN 1437-4331.
- [43] SUÁREZ-GARCÍA, Susana, Lluís AROLA, Aïda PASCUAL-SERRANO, Anna AROLA-ARNAL, Gerard ARAGONÈS, Cinta BLADÉ a Manuel SUÁREZ. *Development and validation of a UHPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of mammal lysophosphatidylcholines and lysophosphatidylethanolamines in serum*. Journal of Chromatography B. 2017, 1055-1056, 86-97. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.04.028. ISSN 15700232.
- [44] STRANO-ROSSI, Sabina, Luca ANZILLOTTI, Erika CASTRIGNANÒ, Marialinda FELLI, Giovanni SERPELLONI, Roberto MOLLICA a Marcello CHIAROTTI. *UHPLC-ESI-MS/MS method for direct analysis of drugs of abuse in oral fluid for DUID assessment*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2011, 401(2), 609-624. DOI: 10.1007/s00216-011-5108-y. ISSN 1618-2642.
- [45] AOAC Official Method 991.43 Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. b.r. [cit. 2019-06-28]. Dostupné z: https://acnfp.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/annexg.pdf
- [46] DUMBRAVĂ, Delia, Nicoleta-Gabriela HĂDĂRUGĂ, Camelia MOLDOVAN, Diana-RABA, Mirela POPA a B. RĂDOI. *Antioxidant activity of some fresh vegetables and fruits juices*. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. 2011, 17(2), 163-168. Dostupné

z: https://www.journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/27342L12_Dumbrava_Delia_Vol.17_2__2011_163-168.pdf

[47] DUMBRAVĂ, Delia, Camelia MOLDOVAN, Diana- RABA a Mirela POPA. *Comparative analysis of vitamin C content and antioxidant activity of some fruits extracts*. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. 2012, 18(3), 223-228. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Camelia_Moldovan/publication/268269062_Comparative_analysis_of_vitamin_C_content_and_antioxidant_activity_of_some_fruits_extracts/links/54eb0f510cf2f7aa4d5945f4.pdf

[48] HOLČAPEK, Michal, Robert JIRÁSKO a Miroslav LÍSA. *Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules*. Journal of Chromatography A. 2010, 1217(25), 3908-3921. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.02.049. ISSN 00219673.