

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Mák jako potenciálně významný zdroj vitamínu E

Bakalářská práce

Iveta Albrechtová

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Ing. Barbora Burešová, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mák jako potenciálně významný zdroj vitamínu E" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Barboře Burešové, Ph.D., za odborné vedení, ochotu a pomoc při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

Mák jako potenciálně významný zdroj vitamínu E

Souhrn

Mák setý je řazen mezi nejpěstovanější olejninu na našem území a jeho pěstování je spojováno s dlouhodobou tradicí. Podle způsobu využití je tato plodina dělena na dvě zemědělsky významné skupiny – mák opiový a mák semenný. Mák opiový je zdrojem alkaloidů, díky kterým nachází uplatnění v medicíně a ve farmacii pro analgetické, sedativní a narkotické účinky. Semenný mák slouží k produkci semene a je hojně využíván v potravinářství. Maková semena mají výbornou výživovou hodnotu, protože jsou významným zdrojem lipidů (40,5 %), bílkovin (18 %), sacharidů (26 %), minerálních látek a vitamínů. V makových semenech je ve velké míře zastoupena kyselina linolová, a kromě toho jsou bohatým zdrojem vlákniny, vápníku a hořčíku a vitamínu E.

Vitamin E je souhrnný název pro osm strukturně velmi podobných lipofilních látek ze skupiny tokochromanolů, které jsou charakteristické svou amfipatickou povahou. Ve své struktuře obsahují chromanolový kruh s postranním isoprenoidním řetězcem. Tokochromanoly jsou děleny na tokoferoly a tokotrienoly podle nasycenosti postranního řetězce. Obě tyto skupiny existují ve čtyřech různých formách (α , β , γ , δ) dle pozice a počtu methylových skupin na chromanolovém kruhu. Biosyntéza těchto látek probíhá pouze ve fotosyntetizujících organismech. Hlavní funkcí vitamínu E u rostlin i u člověka jsou jeho antioxidační schopnosti, tedy schopnosti zabraňovat oxidačnímu stresu způsobenému volnými radikály. Antioxidační působení vitamínu E spočívá v zabránění peroxidace lipidů buněčných membrán.

K extrakci lipofilních látek z rostlinné matrice lze využít různých metod, které jsou obecně děleny na metody klasické a moderní. Mezi klasické metody jsou řazeny macerace, Soxhletova extrakce a extrakce na pevnou fázi. K moderním metodám pak ultrazvuková extrakce, mikrovlnná extrakce nebo extrakce superkritickou tekutinou. K vlastnímu analytickému stanovení vitamínu E je možné využít chromatografických metod, při kterých dochází oddělení (separaci) složek obsažených ve vzorku. V praxi jsou nejčastěji využívány plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Klíčová slova: vitamin E, *Papaver somniferum*, tokoferoly, tokotrienoly, HPLC-FLD

Poppy as a potentially significant source of vitamin E

Summary

Poppy is one of the most commonly grown oil crops in the Czech Republic, a country with a long tradition of poppy growing. According to the kind of use, this crop has been classified into two agriculturally significant groups – Opium Poppy and Seed Poppy. The Opium Poppy is a source of alkaloids and therefore it is used in medicine and pharmaceuticals due to its analgesic, sedative and narcotic effects. The Seed Poppy is utilized to produce seeds and is widely used in food industry. Poppy seeds have excellent nutritional value, as they are a significant source of lipids (40,5 %), proteins (18 %), carbohydrates (26 %), mineral substances and vitamins. Poppy seeds contain a large amount of Linoleic acid and they are also rich in fibre, calcium, magnesium and vitamin E.

Vitamin E is an umbrella term for eight structurally very similar lipophilic substances of the tocopherol group that are characterized by their amphipathic nature. Their structure includes a chromanol ring with an isoprenoid side chain. Tocopherols are divided into two groups - tocopherols and tocotrienols, according to side chain saturation. Both groups occur in four different forms (α , β , γ , δ), according to the position and number of methyl groups on the chromanol ring. The biosynthesis of these substances only occurs in photosynthetic organisms. The main function of vitamin E, both in plants and humans, is its antioxidant capacity, i.e. the ability to prevent the oxidative stress caused by free radicals. The antioxidant effect of vitamin E consists in preventing the peroxidation of cell membrane lipids.

Lipophilic substances can be extracted from the plant matrix by various methods. These are generally divided into classic and modern. Classic methods include maceration, Soxhlet extraction and solid phase extraction. Modern methods include ultrasound assisted extraction, microwave assisted extraction and supercritical fluid extraction. The actual analysis of vitamin E can be performed by chromatographic methods which include the separation of components contained in the sample. The methods most commonly used in practice are the Gas Chromatography (GC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Keywords: vitamin E, *Papaver somniferum*, tocopherols, tocotrienols, HPLC-FLD

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce.....	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Mák setý.....	10
3.1.1 Rozdělení máku podle způsobu využití.....	10
3.1.1.1 Mák opiový.....	10
3.1.1.2 Semenný mák.....	12
3.1.2 Botanická charakteristika.....	12
3.1.3 Morfologie semena máku	14
3.1.4 Chemické složení semena máku	14
3.1.4.1 Lipidy.....	14
3.1.4.2 Bílkoviny	15
3.1.4.3 Sacharidy	16
3.1.4.4 Minerální látky.....	17
3.1.4.5 Vitaminy	18
3.2 Vitamin E.....	19
3.2.1 Chemická struktura.....	19
3.2.2 Biosyntéza.....	20
3.2.3 Význam vitamínu E pro rostliny.....	22
3.2.3.1 Oxidační stres	22
3.2.3.2 Antioxidační funkce vitamínu E.....	23
3.2.4 Výskyt u rostlin.....	24
3.2.5 Biologická dostupnost	24
3.2.6 Význam vitamínu E pro člověka	26
3.3 Extrakce lipofilních látek z rostlinné matrice	26
3.3.1 Macerace.....	27
3.3.2 Soxhletova extrakce.....	27
3.3.3 Extrakce na pevnou fázi.....	28
3.3.4 Ultrazvuková extrakce	29
3.3.5 Mikrovlnná extrakce	29
3.3.6 Extrakce pomocí enzymu	30
3.3.7 Extrakce superkritickou tekutinou	30
3.4 Chromatografické metody stanovení lipofilních látek	31
3.4.1 Plynová chromatografie (GC).....	31
3.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	32
3.4.2.1 Mobilní fáze.....	32

3.4.2.2	Kolona.....	32
3.4.2.3	Detektor.....	33
4	Závěr.....	34
5	Literatura.....	35

1 Úvod

Mák setý je starou kulturní plodinou, která byla pro své tišící účinky využívána jako léčivo již ve starověkých civilizacích. Mák je pěstován pro svůj obsah alkaloidů nebo pro svá olejnatá semena. Alkaloidy jsou využívány především v medicíně nebo farmaceutickém průmyslu pro své analgetické a antitusické účinky. Semena máku nacházejí uplatnění zejména v potravinářském průmyslu, kde se využívají pro výrobu řady tradičních pochutin, jako jsou makový závin a makové buchty. Maková semena přitahují pozornost svojí dobrou výživou hodnotou. Jsou zdrojem nenasycených mastných kyselin, bílkovin, minerálních látek, a také lipofilního vitamínu E. Význam vitamínu E v lidské výživě spočívá zejména v jeho antioxidačních vlastnostech. Látkám s antioxidačním potenciálem je přičítána řada příznivých účinků na lidské zdraví, kdy chrání buňky před oxidačním stresem. Mák představuje potenciálně významný zdroj tohoto antioxidantu. Z tohoto důvodu by šlechtění nových odrůd s jeho vyšším obsahem mohlo představovat vhodnou strategii, jak rozšířit trh o funkční potraviny s vysokým obsahem vitamínu E.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je vypracovat literární přehled obecné charakteristiky máku setého a popsat chemické složení semene této plodiny se zaměřením na lipofilní látky, zejména na tokoly a uvést jejich význam pro lidské zdraví. Dále popsat princip extrakce a vlastního analytického stanovení lipofilních látek z matrice semen máku.

3 Literární rešerše

3.1 Mák setý

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je řazen do řádu *Ranunculales* a čeledi *Papaveraceae*, která čítá okolo 40 rodů a 800 druhů (Labanca et al. 2018). Kromě máku setého v České republice rostou i další druhy máku, a to například mák vlčí (*P. rhoeas*), mák pochybný (*P. dubium*) a mák polní (*P. argemone*) (Baranyk 2010).

Mák setý je velmi starou kulturní rostlinou (Baranyk 2010). První nálezy semen divokých forem máku pocházejí, podle archeologických záznamů, z období neolitu a k domestikaci této plodiny pravděpodobně došlo v oblasti západního Středomoří v polovině 6. tisíciletí př. n. l. (Jesus et al. 2021). Nejčastější nálezy máku setého však pochází z oblastí kultur s lineární keramikou a objevují se také v alpské oblasti, což nasvědčuje rozptýlení máku podle vzorce z jihu na sever (Salavert et al. 2018). Na našem území, u Ostrova u Stříbra, byl nalezen mák pocházející z pozdní doby bronzové se stářím asi 2800 let (Český modrý mák 2020). Již starověké civilizace znaly tišící účinky máku a využívaly ho jako léčivo. V Evropě dlouhou dobu nebyly účinky opia známy a mák zde byl pěstován jako zahradní rostlina a pro produkci semen. V 16. století začal lékař Paracelsus používat opium jako lék a k výraznému rozvoji došlo v 19. století, kdy byla opiová tinktura, nazývaná jako laudanum, považována za univerzální lék (Baranyk 2010).

Pěstování máku setého je v České republice dlouhodobou tradicí (Vašák 2010) a po řepce je mák druhou nejvíce pěstovanou olejninou na našem území. Ve sklizňovém roce 2021/22 bylo olejninami oseto 442,3 tis. ha. Z toho největší podíl (77,4 %) tvořila řepka následována mákem (9,9 %), poté sójou (4,4 %) a slunečnicí (4,1 %) (Dvořáková 2021). Osevní plocha máku dosáhla v uvedeném období 43,87 tis. ha. V porovnání s ostatními u nás pěstovanými olejninami jsou výnosy máku relativně nízké. V roce 2021 se výnos pohyboval kolem 0,68 t/ha a celková produkce semene v tomto roce představovala 29 691 t. Pro srovnání výnos řepky olejné dosahoval v tomto roce 2,99 t/ha (Český statistický úřad 2022). Většina produkce semene máku (73 %) je exportována do zahraničí, zejména do Ruska, Rakouska, Polska, na Ukrajinu a do Německa (Konvalina 2014; Šindelková 2020).

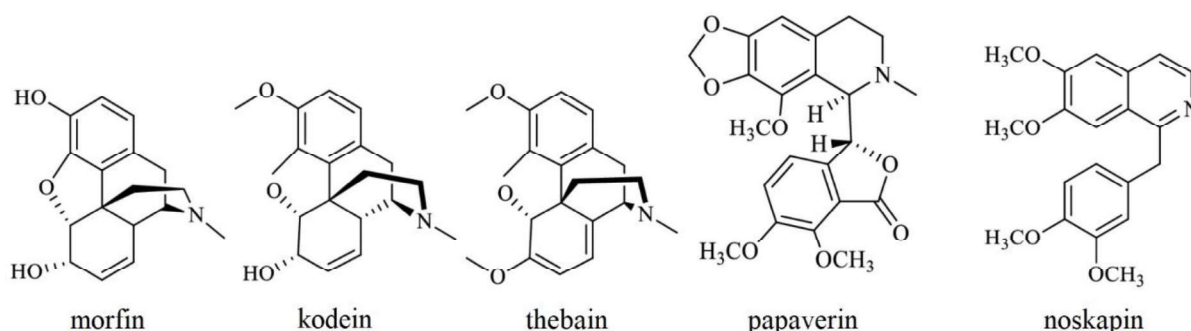
3.1.1 Rozdělení máku podle způsobu využití

Mák je rostlina hojně využívaná v medicíně, potravinářství, ale slouží i k dekoračním účelům. Lisováním lze ze semen získat olej, nebo lze maková semínka konzumovat nezpracovaná (Jesus et al. 2021). Oleje vysoké kvality jsou vhodné pro potravinářský průmysl a kosmetiku (Lančaričová et al. 2016). Podle využití je možné mák dělit do několika skupin, přičemž zemědělsky nejvýznamnější je dělení máku na opiový a semenný (olejný) (Vašák 2010).

3.1.1.1 Mák opiový

Opiový mák je zdrojem alkaloidů ze dvou chemicky rozdílných skupin – fenanthrenových, kam je řazen morfin, kodein nebo thebain a benzylochinolinových, mezi které patří papaverin a noskapin (Obrázek 1) (Beaudoin & Facchini 2014; Sharopov et al.

2018; Hedayati-Moghadam et al. 2022). Alkaloidy jsou sekundárními metabolity, které se nepodílejí na růstu a vývoji rostliny, ale hrají významnou roli při obraných mechanismech rostliny proti býložravcům a patogenům (Hagel & Facchini 2013). Tyto sekundární metabolity jsou hromaděny v různých typech rostlinných buněk a buněčných kompartmentech. Primárním místem akumulace alkaloidů ve zralých rostlinách jsou laticifery (mléčnice) nadzemních orgánů, kde dochází k závěrečným krokům biosyntézy těchto látek ze specifických meziproductů. K mobilizaci a přeměně meziproductů na biologicky aktivní formy alkaloidů dochází až v reakci na stres způsobený biotickými i abiotickými vlivy, čímž je rostlina chráněna před cytotoxickými účinky těchto látek (Ozber & Facchini 2022). Z máku opiového, nejvíce pěstovaného v Asii, je produkován bílý latex (opium), ve kterém jsou alkaloidy obsaženy (Vašák 2010). Opium je získáváno ze zelených makovic. Jakmile je rostlina dostatečně vzrostlá, tobolky nezralých makovic jsou opatrně naříznuty vodorovným řezem. Z řezu vytéká bílý latex, který na vzduchu rychle hnědne. Pro lékařské účely je využíván latex obsahující alespoň 10 % morfinu, který je po seškrábnutí usušen a vytvarován do různých tvarů (Kaboudin & Sohrabi 2021). Vyextrahované a izolované sloučeniny obsažené v opiu nacházejí široké uplatnění ve farmaceutickém průmyslu pro své sedativní, analgetické a narkotické účinky (Sharopov et al. 2018). Z důvodu vysokého obsahu alkaloidů je často pěstování opiového máku zneužíváno i pro výrobu heroinu (Vašák 2010). V globálním měřítku se legální produkce opiového máku řídí podle licencí Úřadu OSN pro drogy a kriminalitu (Presley & Lindsley 2018).



Obrázek 1. Chemická struktura pěti hlavních alkaloidů v opiu (upraveno dle Kaboudini & Sohrabi 2021).

Morfin je medicínsky velmi významnou psychoaktivní látkou a jednou z hlavních složek opia (Devereaux et al. 2018; Kaboudin & Sohrabi 2021). Je lékem první volby při léčbě chronické, středně silné a silné bolesti a je jedním z neúčinnějších klinicky dostupných léků na tlumení silné bolesti spojené s nádorovým onemocněním (Kim et al. 2016; Sharopov et al. 2018). Dlouhodobá léčba morfinem vede k toleranci na analgetický účinek, což omezuje jeho účinnost v klinické praxi (Kim et al. 2016). Morfin je přímým prekurzorem heroinu (Devereaux et al. 2018).

Kodein, přírodní izomer methylovaného morfinu, je považován za druhý hlavní opiový alkaloid (Kaboudin & Sohrabi 2021; Mohammad et al. 2021). V praxi je používán k tlumení mírné až středně silné bolesti, včetně chronické nádorové bolesti. Má antitusické, antistresové a proti průjmové účinky (Pratiwi et al. 2021).

Nejméně zastoupeným hydrofenanthrenovým alkaloidem v opiu je thebain. Od ostatních hlavních opiových alkaloidů je rozdílný tím, že nemá terapeutické ani léčebné využití, ale je klíčovým meziproduktem při syntéze řady opiátových derivátů. Díky tomu je thebain používán jako prekurzor pro průmyslovou výrobu léčiv, mezi které patří např. oxykodon, hydrokodon, nebo naloxon a buprenorfin. Při vysokých dávkách způsobuje křeče a je považován za nejjedovatější alkaloid (Kaboudin & Sohrabi 2021).

Do skupiny benzylochinolinových alkaloidů je řazen papaverin, který je díky nesespecifickým vazodilatačním účinkům již po mnoho let používán jako přímý relaxant hladkého svalstva. Dříve byl využíván k léčbě mozkových vazospasmů, dokud nebyl nahrazen moderními léky. Papaverin je dosud používán lokálně a injekčně k léčbě erektilní dysfunkce a společně s morfinem také ke zvýšení analgetického účinku slabších léčiv, například aspirinu (Hagel & Facchini 2013; Kaboudin & Sohrabi 2021). Přestože je papaverin při dlouhodobém podávání vysokých dávek potenciálně návykový, zejména u kojenců, dětí a starších osob, tak nepodléhá mezinárodní kontrole omamných látek, jako je tomu u ostatních zástupců opiových alkaloidů (Kaboudin & Sohrabi 2021).

Noskapinu dříve nebyly přisuzovány žádné léčebné účinky. Později však byl objeven jeho antitusický účinek a nedávno byla rovněž prokázána protinádorová aktivita (Hagel & Facchini 2013). Díky tomu, že noskapin nemá analgetický potenciál, a tedy ani potenciál ke zneužívání, je široce používán jako prostředek tlumící kašel. Vykazuje minimální nežádoucí a toxické účinky a našel uplatnění jako protinádorové léčivo a léčivo proti mrtvici, neboť je dobře snášenlivý (Kaboudin & Sohrabi 2021).

3.1.1.2 *Semenný mák*

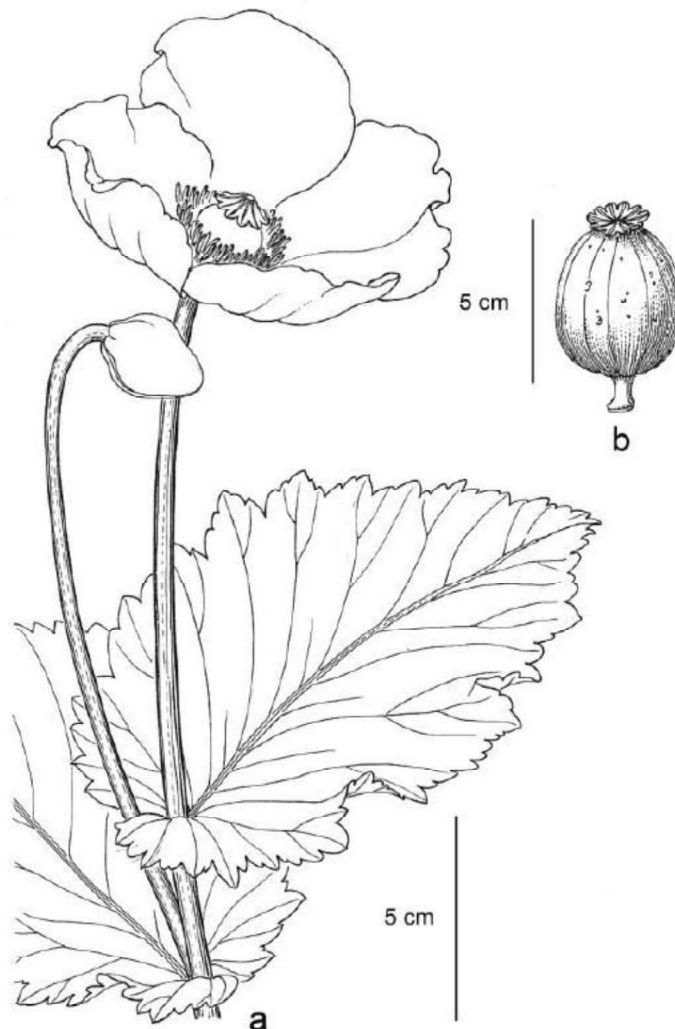
Semenný mák, který je nejvíce pěstovaný v evropských podmínkách, je využíván především v potravinářství. Semena potravinářského máku jsou díky své specifické chuti základem řady pekárenských produktů, a to zejména ve střední Evropě, ale vyskytují se i v jídelníčku obyvatel východních částí tohoto kontinentu (Blahovec 2002). Často jsou semena využívána jako náplň do koláčů a moučníků, ale také slouží jako posyp sladkého a slaného pečiva. Pro většinu slovanských zemí je nejznámější pochutinou makový závin, který má různé způsoby provedení a odlišná pojmenování (Sabolová 2020). Semena jsou nejčastěji modrá, ale mohou mít i žlutou, bílou nebo hnědou barvu (Vašák 2010). Nejvýraznější maková chuť a vůně je typická pro modrosemenné odrůdy, oproti tomu odrůdy s bílými semeny připomínají chuť a vůni vlašské ořechy (Sabolová 2020).

Pěstování máku v České republice je podmíněno Zákonem o návykových látkách 167/1998 Sb., kdy podle § 24 je zakázáno pěstovat odrůdy máku setého, které mohou v sušině z tobolek obsahovat více než 0,8 % morfinu. Výjimku představují odrůdy máku, které slouží pro výzkumné a pokusné účely, nebo pro šlechtění nových odrůd. Pěstitelé máku též mají podle § 29 tohoto zákona ohlašovací povinnost místně příslušnému celnímu úřadu, jakmile celková plocha pěstovaného máku přesáhne 100 m² (Parlament České republiky 2022).

3.1.2 **Botanická charakteristika**

Mák (Obrázek 2a) je jednoletá, až přes 1 m vysoká bylina (Vašák 2010; Jahodář 2018), jejíž kořenová soustava je tvořena hlavním dužnatým kořenem a ten se dále větví do několika

vedlejších kořenů s velkým množstvím kořenových vlásků (Baranyk 2010). Lodyha máku je jednoduchá nebo chudě větvená a řídce pokrytá štětinkami. Počet větví je odrůdovým znakem a je také velmi ovlivňován sponem, ve kterém jsou rostliny pěstovány (Vašák 2010; Jahodář 2018). Výška lodyhy se nejčastěji pohybuje v rozmezí 80–150 cm (Baranyk 2010). Podlouhle vejčité listy jsou většinou přisedlé až objímavé a mají mírně zvlněný až zubovitý okraj. Povrch je pokrytý jemnou voskovou vrstvičkou, jejíž síla kolísá podle kultivaru. Přímé, jednotlivé květy máku mají dva kališní lístky a čtyři korunní plátky, které mohou být různě zbarvené. Některé odrůdy mají květy celé bílé, ve většině případů je však na spodní části korunních plátek nápadná skvrna. Barva skvrny je buď tmavší nebo světlejší ve srovnání se základní barvou květu. Květy bývají v různých odstínech fialové nebo růžové a červené. Plodem máku je tobolka, také nazývaná jako makovice (Obrázek 2b). Tvar a velikost tobolek je odrůdově variabilní a má vliv na množství a velikost semen. Tobolka je buď zcela uzavřená (mák slepák), nebo může mít pod paprsky blizny otvory, kterými se semena mohou sypat na zem (mák hled'ák) (Vašák 2010; Jahodář 2018; Novák & Nováková 2018).



Obrázek 2. Mák setý; a – celá rostlina; b – tobolka (upraveno dle Egan et al. 2012).

3.1.3 Morfologie semena máku

Semena máku se vyvíjejí uvnitř tobolek na lamelách, které rozdělují její vnitřní prostor. Při zralosti se semena uvolňují a zůstávají na dně tobolek. V jedné tobolce může být přes 20 tisíc semen, ale v průměru jich je zhruba 5 tisíc. Zpravidla mají ledvinovitý a mírně zploštělý tvar a dosahují délky 1–1,5 mm. Hmotnost tisíce semen je v rozmezí 0,25–0,75 g.

Povrch semen je drsný s polygonálními vystouplými lištami tvořící síťovitou strukturu (Obrázek 3). Osemení je složeno z pěti vrstev – epidermis, krystalické vrstvy, vláknité, příčné a pigmentové vrstvy. Osemení je velmi tenké, čímž je snadno přístupné vodě. Barva semene je ovlivněna pigmentací, která je v úzkém vztahu se zbarvením korunních lístků. Rostliny s bílou skvrnou na korunních lístcích vyrůstají z bílých, světle žlutých a žlutých semen. Naopak rostliny s barevnou skvrnou pochází z tmavě zbarvených semen. Pro naše odrůdy je typické modré, šedomodré nebo bílé až nažloutlé zbarvení, ale vyskytují se i odrůdy s jiným zbarvením semen. Malý zárodek lokalizovaný uvnitř semene je obklopen vrstvou zásobních látek, nepostradatelných pro výživu a vývoj rostliny (Novák & Nováková 2018).



Obrázek 3. Makové semeno; celé (vlevo), vertikální řez (vpravo) (upraveno dle Watson & Dallwitz 1999).

3.1.4 Chemické složení semena máku

Obecně jsou olejnatá semena máku významným zdrojem lipidů, ale také bílkovin a sacharidů (Bozan & Temelli 2008). Maková semena, a zvláště makový olej přitahují pozornost díky své výborné výživové hodnotě. Kromě základních živin obsahují další zdravé prospěšné látky jako jsou minerální látky nebo antioxidanty, mezi které jsou řazeny také tokoferoly. *In vitro* antioxidační potenciál máku, který by mohl být významný z hlediska prevence patogeneze různých onemocnění, jako je např. hypertenze, nebo rakovina, je aktuálním předmětem výzkumu (Aksoylu Özbek & Günç Ergönül 2020; Muhammad et al. 2021).

3.1.4.1 Lipidy

Lipidy jsou různorodou skupinou látek vymezenou na základě jejich rozpustnosti. Jejich společnou vlastností je nerozpustnost ve vodě, ale rozpustnost v organických rozpouštědlech nemísitelných s vodou. Lipidy jsou obecně děleny na jednoduché, složené a isoprenoidní lipidy. Mezi jednoduché lipidy jsou řazeny tuky a oleje, což jsou chemicky estery nasycených

i nenasycených mastných kyselin a glycerolu a vosky, estery vyšších alifatických mastných kyselin a vyšších jednosytných alkoholů (Waisser & Palát 2001; Gurr et al. 2016). Struktura složených lipidů se od jednoduchých liší tím, že je v ní kromě alkoholu a karboxylových kyselin obsažena ještě další složka, podle které jsou rozlišovány jednotlivé typy složených lipidů. Významnou skupinou jsou fosfolipidy, charakteristické přítomností složky obsahující zbytek kyseliny fosforečné (Sikorski & Kołakowska 2011; Hernandez & Kamal-Eldin 2013). Isoprenoidní lipidy představují rozsáhlou skupinu sloučenin, zahrnující mimo jiné terpeny a steroidy. Přestože se jedná o velmi rozmanité sloučeniny, mají společný strukturní původ. Základem je biosyntéza pětiuhlíkatých stavebních celků tzv. isoprenových jednotek, které se mohou různě kombinovat a tím vzniká široká škála rozmanitých struktur (Sikorski & Kołakowska 2011).

V semenech máku je poměrně vysoký obsah tuku, který se pohybuje mezi 28–53 %. Obsah tuku může kolísat v závislosti na odrůdě, lokalitě, kde je pěstován a dalších podmínkách prostředí (Dąbrowski et al. 2020). Makový olej je převážně složen z polynenasycených mastných kyselin (PUFA), které jsou cennou složkou lidské výživy (Lančaričová et al. 2016). Dominantní je kyselina linolová, jejíž podíl se pohybuje mezi 53–74 %, a která je významná pro syntézu esenciální arachidonové mastné kyseliny. V menší míře jsou v makovém oleji zastoupené kyseliny olejová (13–24 %), palmitová (8–19 %) a stearová s linoleovou (1–2 %) (Aksoylu Özbek & Günc Ergönül 2020; Dąbrowski et al. 2020). Mastné kyseliny se v makovém oleji vyskytují převážně ve formě triacylglycerolů, z nichž nejhojněji je zastoupen trilinoleylglycerol (39,5–43,5 %), následovaný 1,2-dilinoleyl,3-palmitoylglycerolem (23,5–27,1 %) a 1,2-dilinoleyl,3-oleoylglycerolem (12,5–15,1 %) (Dąbrowski et al. 2020).

3.1.4.2 *Bílkoviny*

Bílkoviny neboli proteiny jsou makromolekuly složené z jednoho nebo více polypeptidových řetězců. Každý polypeptid se skládá z řetězce aminokyselin, které jsou spojené peptidovými (amidovými) vazbami. Sekvence aminokyselin v polypeptidovém řetězci je určena genem, který konkrétní polypeptid kóduje. V průběhu syntézy je polypeptidový řetězec skládán do specifické trojrozměrné konformace, která je pro každý protein jedinečná. Proto je možné strukturu proteinu popsat ve čtyřech úrovních – primární, sekundární, terciární a kvarterní, přičemž terciární a kvarterní struktura úzce souvisí s funkcí dané bílkoviny (Walsh 2014; Antony et al. 2022). Primární struktura je tvořena specifickou sekvencí, tedy pořadím jednotlivých aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Sekundární strukturu lze popsat jako lokální prostorovou konformaci primární struktury s výjimkou postranních řetězců aminokyselin. Rozlišovány jsou dva základní typy sekundární struktury, konkrétně α -helix a β -struktura, též známa jako β -skládaný list (Walsh 2014). Sekundární struktura proteinů je udržována pomocí vodíkových vazeb mezi amidovými a C=O skupinami peptidových vazeb. Terciární struktura již označuje trojrozměrné uspořádání všech atomů podílejících se na vzniku polypeptidu. Tvar terciární struktury je určen interakcemi mezi skupinami přítomnými v postranních řetězcích jednotlivých aminokyselin. Mezi nepolárními postranními řetězci aminokyselin se uplatňují interakce hydrofobní, a naopak mezi polárními skupinami postranních řetězců aminokyselin může docházet ke vzniku interakcí hydrofilních. Z tohoto pohledu je významný vznik vodíkových můstků u prostorově blízkých aminokyselin, ale také

iontových vazeb mezi nabitými skupinami kyselých nebo zásaditých aminokyselin. Terciární struktury proteinů jsou navíc stabilizovány disulfidovými můstky mezi vedlejšími řetězci dvou molekul cysteinu (McMurry 2015; Haim et al. 2021). Kvarterní struktura určuje celkové prostorové uspořádání polypeptidových podjednotek v rámci bílkoviny složené ze dvou nebo více polypeptidů (Walsh 2014).

Obsah proteinů v semenech máku se pohybuje v rozmezí 12–24 % celkového obsahu sušiny. Z pohledu zastoupení jednotlivých aminokyselin je typický relativně vysoký obsah kyseliny glutamové (36 %) a asparagové (17 %) a také argininu (20 %) (Muhammad et al. 2021; Melo et al. 2022).

3.1.4.3 *Sacharidy*

Sacharidy jsou molekuly složené z atomů uhlíku, vodíku a kyslíku (Zhang et al. 2021). Jsou považovány za největší a nejrozšířenější skupinu organických molekul na Zemi. Nacházejí se v rostlinných a živočišných tkáních, v bakteriích i houbách (Kurzyna-Szklarek et al. 2022). Sacharidy jsou na základě různé délky opakujících se strukturálních jednotek děleny do třech velkých strukturálních tříd, a to na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy (Quellette & Rawn 2014; Zhang et al. 2021). Monosacharidy, známé také jako jednoduché cukry, obvykle obsahují tři až šest atomů uhlíku. Podle počtu atomů uhlíku v molekule jsou děleny na triosy, tetrosy, pentosy a hexosy (Wrolstad 2012). Vyskytují se jako aldosy nebo ketosy, podle jejich nejvíce oxidované funkční skupiny. Aldosy obsahují aldehydovou funkční skupinu na prvním uhlíku a ketosy ve své struktuře mají karbonylovou funkční skupinu, která je lokalizovaná na druhém uhlíku (Wrolstad 2012; Quellette & Rawn 2014). Mohou existovat jako šestičlenné kruhy (pyranosy) nebo pětičlenné kruhy (furanosy) (Gray et al. 2019). Nejběžnějším monosacharidem je glukosa, která je konečným produktem fotosyntézy a hlavním zdrojem energie pro rostlinné i živočišné organismy. Dalšími známými monosacharidy jsou galaktosa, neboli mléčný cukr a fruktosa, neboli ovocný cukr. Jak galaktosa, tak i fruktosa mají stejný molekulový vzorec jako glukosa, což je činí jejími izomery (Kurzyna-Szklarek et al. 2022). Oligosacharidy nejčastěji obsahují 2–10 monosacharidů. V závislosti na počtu monosacharidových jednotek jsou rozlišovány disacharidy, trisacharidy atd. Polysacharidy obsahují tisíce kovalentně spojených monosacharidových jednotek. Pokud jsou všechny monomerní jednotky stejné, jedná se o homopolysacharidy. Příkladem jsou amyloza a amylopektin ve škrobu, v jejichž struktuře jsou obsaženy pouze monomerní jednotky glukosy. V případě, kdy molekula obsahuje dvě a více odlišných monosacharidových jednotek, jedná se o heteropolysacharidy, jako je například kyselina hyaluronová nebo heparin. V oligo- a polysacharidech jsou monosacharidy vzájemně spojeny glykosidickými vazbami, které vznikají spojením aldehydové nebo ketonové skupiny jednoho monosacharidu a hydroxylové skupiny jiného monosacharidu (Quellette & Rawn 2014).

Mají celou řadu funkcí, z nichž nejvýznamnější je, že slouží jako zásobní molekuly energie. Příkladem je zásobní polysacharid rostlin, škrob, složený ze dvou polymerů – amylosy a amylopektinu v poměru přibližně 1:3 (Wrolstad 2012; Zhang et al. 2021). U živočichů zastává tuto funkci glykogen. Sacharidy plní i strukturální funkci, kdy poskytují oporu buňkám. U rostlin se jedná o celulosu u živočichů potom o chitin (Zhang et al. 2021).

Maková semena obsahují průměrně 26 % sacharidů, z čehož většinu (22 %) tvoří vláknina (Sabolová 2020). Vlákninu lze dělit dle její rozpustnosti na rozpustnou a nerozpustnou. Rozpustná vláknina podléhá v tlustém střevě fermentaci a vytváří gelovitou strukturu. Má přínosný vliv pro lidské zdraví tím, že snižuje hladinu glukosy v krvi, zlepšuje citlivost na inzulin v krvi a snižuje hladinu cholesterolu. Nerozpustná vláknina, která je v tlustém střevě špatně fermentovatelná, trávicím systémem jen prochází. Přesto napomáhá ke zdraví střev tím, že podporuje pravidelnost stolice, zpomaluje vyprazdňování žaludku a může mít projímavý účinek (Ljubicic et al. 2017; Koç et al. 2020).

Rozpustné sacharidy v máku představují pouze 3 % a z toho 1,8 % tvoří cukry (Sabolová 2020).

3.1.4.4 Minerální látky

Minerální látky jsou nezbytné pro správné fungování každého organismu na Zemi. K uspokojení metabolických potřeb lidského organismu je zapotřebí nejméně 49 nutrientů, z nichž 23 je minerálních látek (de la Guardia & Garrigues 2015). Denní příjem minerálních prvků je ve srovnání s ostatními živinami (sacharidy, bílkoviny, lipidy) nízký, ale kvůli jejich nepostradatelnosti musí být stravou pravidelně přijímány (de la Guardia & Garrigues 2015). Podle různých kritérií, jako je jejich množství, biologický a nutriční význam či jejich původ, lze minerální látky rozdělit do rozsáhlých skupin, a to na majoritní minerální prvky – makroelementy a stopové prvky – mikroelementy (Velíšek 2002; Gaur & Agnihotri 2017; Shilpa et al. 2018).

Z pohledu biologického a nutričního významu jsou mezi makroelementy, s denní potřebou vyšší než 100 mg/den, řazeny sodík (Na), draslík (K), vápník (Ca), hořčík (Mg), fosfor (P) a síra (S). K zástupcům mikroelementů, s denní potřebou nižší než 100 mg/den, patří železo (Fe), zinek (Zn), selen (Se), měď (Cu), jód (I), fluor (F), kobalt (Co), chrom (Cr), mangan (Mn) a molybden (Mo) (Gaur & Agnihotri 2017).

Maková semena jsou bohatým zdrojem vápníku, draslíku, hořčíku a sodíku (10 455; 2833; 1528 a 425 mg/kg). Ze stopových prvků je pak v máku obsaženo železo, zinek a měď (47; 40 a 17 mg/kg) (Senila et al. 2020). Vápník hraje klíčovou roli ve struktuře kostí, srážlivosti krve, adhezi krevních destiček, endokrinních i exokrinních sekrečních funkcí a nervosvalové činnosti (Kraft 2015; Shilpa et al. 2018). Draslík je významný z hlediska udržování osmotického tlaku vně i uvnitř buněk, čímž podporuje normální funkci buněk a působí proti zvyšování krevního tlaku způsobeného nadměrným příjmem sodíku. Sodík rovněž ovlivňuje osmotický tlak vně buněk, čímž podobně jako draslík přispívá k jejich normální funkci a dále se podílí na kontraktilitě svalů (de la Guardia & Garrigues 2015). Hořčík se účastní více než 300 enzymatických reakcí. Ovlivňuje metabolismus živin, jako např. syntézu mastných kyselin a proteinů a také se podílí na přenosu nervových impulzů (Shilpa et al. 2018). Železo, jehož snížená absorpce vede k anémii, má zásadní význam pro erythropoézu a tvorbu hemoglobinu v kostní dřeni, neboť je centrálním atomem struktury hemu. Kromě toho je železo složkou hormonů štítné žlázy a celé řady enzymů. (de la Guardia & Garrigues 2015; Gaur & Agnihotri 2017). Zinek je důležitým kofaktorem více než 50 enzymů podílejících se na metabolismu makroživin, ovlivňuje pohlavní dozrávání, funkci imunitního systému a je důležitý pro normální funkci chuťových vjemů (de la Guardia & Garrigues 2015; Shilpa et al. 2018). Měď

je nezbytná pro správné fungování metabolických procesů, stimuluje imunitní systém, a kromě toho může vykazovat i antioxidační účinky (de la Guardia & Garrigues 2015; Gaur & Agnihotri 2017; Gharibzahedi & Jafari 2017).

U máku také může docházet ke kontaminaci těžkými kovy, které se v důsledku toho mohou vyskytovat i v makových semenech (Muhammad et al. 2020). Akumulace těžkých kovů v rostlině může být obecně způsobena během pěstování následkem zavlažování znečištěnou vodou nebo použitím pesticidů a hnojiv (Moghaddam et al. 2020). V ČR / EU jsou pro těžké kovy v semenech potravinářského máku stanoveny následující limity v mg/kg čerstvé hmoty: kadmium 0,8; olovo 1,0; arsen 0,1; rtuť 0,012 (Ministerstvo zemědělství 1997).

3.1.4.5 Vitaminy

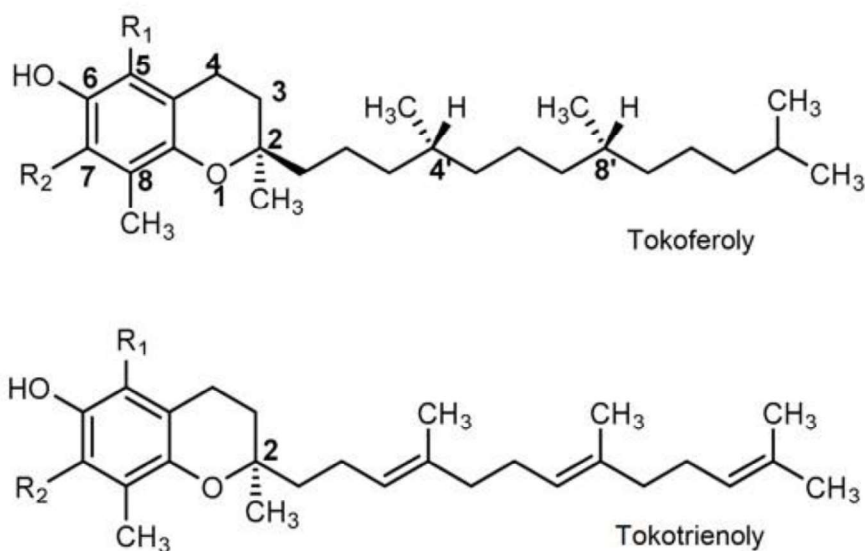
Vitaminy jsou heterogenní organické látky, které mají významný vliv na normální fungování organismu. Kromě toho, že mohou výrazně zvyšovat využitelnost ostatních živin, podílí se na udržování tkáňových struktur. V lidské výživě je známo třináct vitaminů rozdělených do dvou skupin dle jejich rozpustnosti – na hydrofilní vitaminy (rozpuštěné ve vodě) a lipofilní vitaminy (rozpuštěné v tucích). Vitaminy rozpustné ve vodě jsou vitamin C a vitaminy skupiny B, mezi které jsou řazeny thiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), kyselina panthoténová (B5), pyridoxin (B6), biotin (B7), kyselina listová (B9) a kobalamin (B12). V organismu mohou působit jako koenzymy, zásadní pro průběh celé řady biochemických reakcí, například v rámci energetického metabolismu (Shilpa et al. 2018; Yaman et al. 2021). Velice širokou skupinou jsou vitaminy rozpustné v tucích, především díky jejich počtu a rozmanitosti forem. Lipofilní vitaminy jsou klasifikovány v rámci skupin vitaminu A, D, E, K, přičemž každá z nich zahrnuje velké množství homologů a metabolitů a všechny mají různou biologickou dostupnost a účinnost (Fanali et al. 2017). Jejich význam byl prokázán již před více než sto lety, kdy bylo zjištěno, že nemoci jako kurděje nebo křivice, souvisí právě s nedostatkem vitaminů (Shilpa et al. 2018; Yaman et al. 2021).

Mák, respektive maková semena jsou zdrojem vitaminu E, přičemž jeho celkový obsah uváděný v různých studiích se liší v závislosti na použité extrakční metodě, podmínkách prostředí a odrůdě. Dąbrowski et al. (2020) ve své studii uvádí, že olej z makových semen obsahuje 122 mg/kg vitaminu E. Vyšší hodnoty (175 mg/kg) uvádí Melo et al. (2022) a podle autorů Kostadinović Veličkovska et al. (2018) olej z makových semen obsahuje až 182 mg vitaminu E/kg.

3.2 Vitamin E

3.2.1 Chemická struktura

Pod tento souhrnný název bývá řazeno osm různých, strukturně velmi podobných látek, jejichž základní struktura je tvořena chromanolovým cyklem s postranním isoprenoidním řetězcem různě substituovaným methylovými skupinami. Podle nasycenosti postranního řetězce, jsou děleny na tokoferoly a tokotrienoly, souhrnně nazývány jako tokochromanoly (Banks et al. 2010; Lu et al. 2015; Mène-Saffrané 2018). Ve struktuře tokoferolů je plně nasycený boční řetězec, na kterém jsou lokalizována tři chirální centra v poloze C2, C4' a C8' (Obrázek 4). Díky přítomnosti těchto tří chirálních center lze teoreticky od každé formy očekávat celkem osm opticky aktivních stereoisomerů. V přírodě se však vyskytují pouze tokoferoly s konfigurací 2R, 4'R a 8'R, což je způsobeno specificky vedenou biosyntézou těchto látek (Fu et al. 2017). U tokotrienolů se v bočním řetězci vyskytují tři dvojně nekonjugované vazby v polohách C3', C7' a C11' a pouze jedno chirální centrum v pozici C2. V přírodě jsou přirozeně přítomny tokotrienoly výhradně s konfigurací 2R, 3'E a 7'E (Lu et al. 2015; Fu et al. 2017). Podle pozice a počtu methylových skupin na chromanolovém kruhu, jsou rozlišovány čtyři formy tokochromanolů, konkrétně α -, se třemi, β - a γ -, se dvěma a δ -tokoferoly/tkotrienoly s jednou methylovou skupinou (Banks et al. 2010; Mène-Saffrané 2018; Zheng et al. 2020; Almagro et al. 2021). Pouze β - a γ - formy tokoferolů a tokochromanolů lze nazvat izomery, neboť mají stejný sumární vzorec, tedy stejný počet daných atomů, ale jiné strukturní uspořádání těchto atomů v molekule (Azzi 2019).



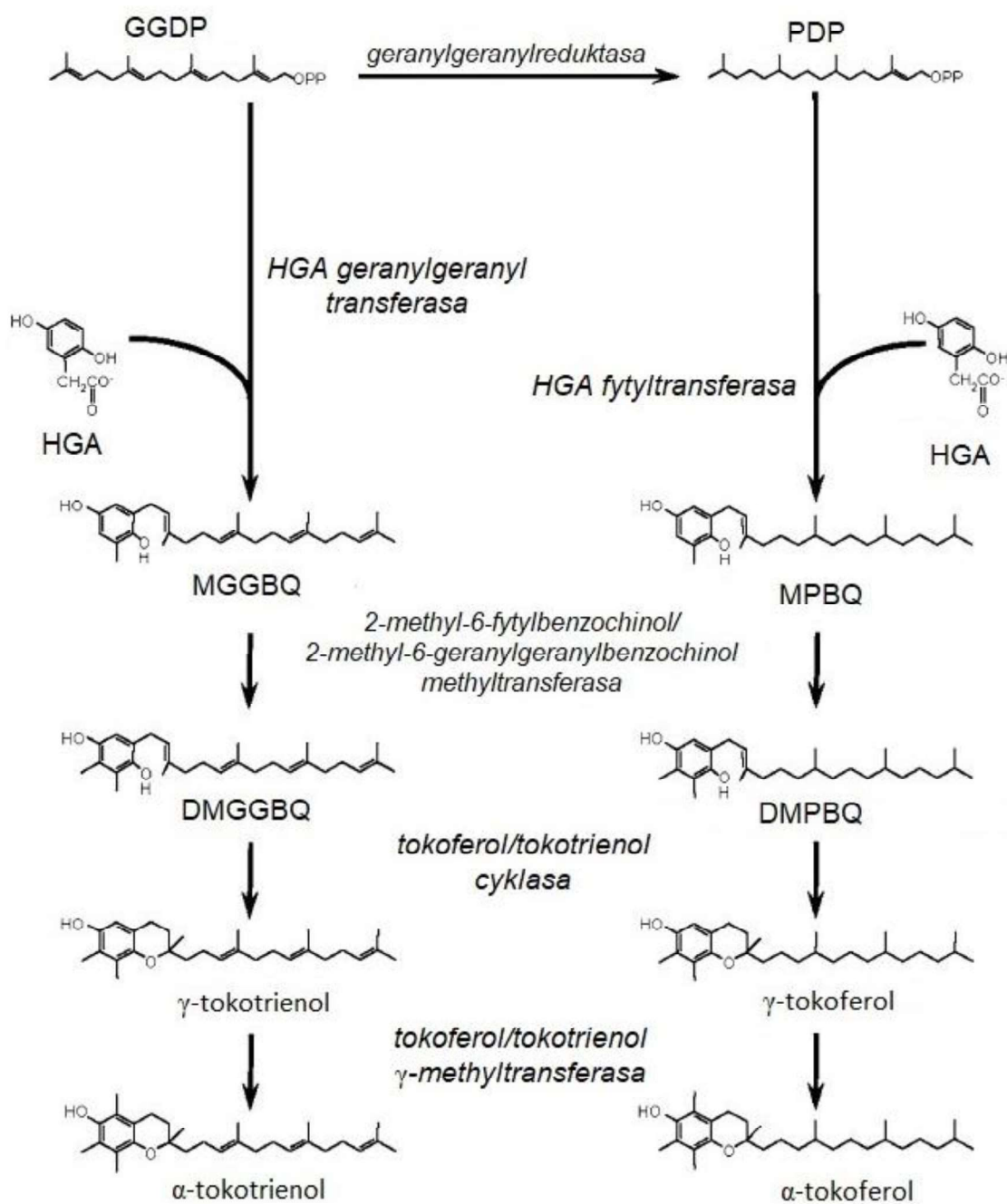
Tokoferoly	Tokotrienoly	R ₁	R ₂
α -tokoferol	α -tokotrienol	CH ₃	CH ₃
β -tokoferol	β -tokotrienol	CH ₃	H
γ -tokoferol	γ -tokotrienol	H	CH ₃
δ -tokoferol	δ -tokotrienol	H	H

Obrázek 4. Chemická struktura tokochromanolů (upraveno dle Fu et al. 2017)

3.2.2 Biosyntéza

Tokoferoly a tokotrienoly jsou syntetizovány rostlinami a jinými fotosyntetizujícími organismy, jako jsou některé kyanobakterie nebo řasy (Almagro et al. 2021).

Syntéza vitaminu E (Obrázek 5) probíhá v plastidech, kde jsou prostřednictvím dvou metabolických cest formovány prekurzory dvou základních částí struktury tokochromanolů. Šikimátovou cestou dochází ke vzniku chromanolového kruhu z homogentisátu (HGA) a v rámci methylerythritolové dráhy je syntetizován isoprenoidový ocas tokotrienolů z geranylgeranyldifosfátu (GGDP) a z fityldifosfátu (PDP) v případě tokoferolů (Muñoz & Munné-Bosch 2019). Biosyntéza je zahájena kondenzací polární aromatické hlavy HGA s různými lipofilními polyprenylpyrofosfáty (GGDP nebo PDP), které určují typ tokochromanolu. Kondenzace je katalyzována třemi typy HGA prenyltransferas (Mène-Saffrané 2018). Kondenzací HGA a PDP vzniká prekurzor pro tvorbu tokoferolů 2-methyl-6-fytyl-1,4-benzochinol, zatímco kondenzace HGA s GGDP vede ke vzniku 2-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzochinolu potřebného pro syntézu tokotrienolů. Tyto vzniklé sloučeniny jsou přímými prekurzory pro δ - a β -tokochromanoly nebo mohou být methylovány methyltransferasou za vzniku 2,3-dimethyl-6-fytyl-1,4-benzochinolu pro tokoferoly a 2,3-dimethyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzochinol pro tokotrienoly. Methyl- i dimethylbenzochinoly jsou následně cyklizovány tokoferolcyklázou a tím transformovány na δ -, respektive γ -tokochromanoly. Posledním krokem syntézy je methylace δ - a γ -forem, působením γ -tokoferolmethyltransferázy za vzniku α - a β -tokochromanolů (Mène-Saffrané 2018; Almagro et al. 2021).



Obrázek 5. Biosyntéza tokoferolů a tokotrienolů (upraveno dle Hunter & Cahoon 2007). DMGGBQ 2,3-dimethyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzochinol; DMPBQ 2,3-dimethyl-6-fityl-1,4-benzochinol; GGDP geranylgeranyldifosfát; HGA homogentisát; PDP fityldifosfát; MGGBQ 2-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzochinol; MPBQ 2-methyl-6-fityl-1,4-benzochinol

3.2.3 Význam vitamínu E pro rostliny

Ke studiu funkcí tokochromanolů či dalších antioxidantů v rostlinách lze použít různé přístupy – exogenní aplikace na úrovni celé rostliny či buňky, studium rozdílu v množství sledovaných antioxidantů před a během studovaného fyziologického procesu nebo za použití mutantů a transgenních linií se změněnou aktivitou enzymů zodpovědných za průběh biosyntézy a tím ovlivněnou hladinou tokochromanolů. Exogenní aplikací tokochromanolů byla zjištěna jejich role při ochraně thylakoidů nebo jiných membrán před oxidačním stresem. Tímto přístupem byla objevena funkce α -tokoferolu při ochraně fotosystému II před singletovým kyslíkem. Druhým přístupem, kdy byla sledována koncentrace tokochromanolů před a během studovaného fyziologického procesu, byl prokázán vliv těchto látek na řadu fyziologických procesů, mezi něž patří klíčení semen, kvetení, stárnutí listů, ale i reakce rostlin na mnohé abiotické stresy (Falk & Munné-Bosch 2010). K radikální změně chápání biologické úlohy tokochromanolů došlo s využitím mutantů a transgenních rostlin, které způsobilo převrat v porozumění fyziologických procesů v rostlinách (Falk & Munné-Bosch 2010; Mène-Saffrané & DellaPenna 2010), neboť umožnilo přímé posouzení funkcí tokoferolů ve fotosyntetizujících organismech. V reakci na různé abiotické faktory, včetně nadměrného působení světla, sucha, toxických kovů či vysokých a nízkých teplot dochází ke zvyšování hladiny tokoferolů v rostlině. Souvislost mezi zvýšenou hladinou tokoferolů v plastidech a oxidačním stresem vedla k předpokladu, že primární funkcí tokoferolů v rostlině je ochrana membrán fotosyntetických pletiv obsahující PUFA před oxidačním stresem (Maeda & DellaPenna 2007).

3.2.3.1 Oxidační stres

Většina živých organismů ke svému přežití potřebuje kyslík, který má tendenci vytvářet volné radikály, přesněji reaktivní formy kyslíku (ROS). Volné radikály jsou z chemického pohledu atomy, molekuly nebo ionty s nepárovým či více nepárovými elektrony ve své valenční vrstvě. Volné radikály jsou schopné krátkodobé existence, ale kvůli snaze získat elektron do své valenční vrstvy, jsou velmi reaktivní. Mohou reagovat jak s jinými volnými radikály, tak i s lipidy buněčných membrán, sacharidy, nukleovými kyselinami i bílkovinami, což může vést k výraznému poškození tkání organismů. Kromě ROS jsou pro organismus významné i reaktivní formy dusíku (RSN) (Pláteník 2009; Lushchak 2014; Poprac et al. 2017). Nejrozšířenějšími ROS a RNS jsou peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($\cdot OH$) a superoxidový radikál ($O_2\cdot^-$), oxid dusnatý ($NO\cdot$) a peroxynitrit ($ONOO\cdot$) (Sinha et al. 2013; Pisoschi et al. 2021).

V živých organismech je za aerobních podmínek více než 90 % spotřebovaného kyslíku redukováno přímo na vodu cytochromoxidasou v mitochondriálním dýchacím řetězci čtyř elektronovým systémem bez uvolnění ROS. Tato činnost je bezprostředně spojena s oxidativní fosforylací za účelem produkce energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP). Méně než 10 % spotřebovaného kyslíku je redukováno na superoxidový radikál a následnou jednoelektronovou redukcí se současným přijetím dvou protonů dochází ke vzniku peroxidu vodíku. Peroxid vodíku sice není volným radikálem, ale díky jeho větší reaktivitě ve srovnání s molekulárním kyslíkem je řazen mezi ROS. V případě, kdy molekula peroxidu vodíku přijme další elektron, dojde k jeho štěpení na hydroxylový aniont a hydroxylový radikál, který je považován za agens

startující oxidační poškození biomolekul organismu. Hydroxylový aniont reaguje s dalším elektronem a protonem, čímž dochází ke vzniku molekuly vody. V organismech k této reakci dochází hlavně díky odebrání atomu vodíku z různých sloučenin – z lipidů, proteinů, aj. a tím dochází k zahájení řetězové reakce (Pláteník 2009; Lushchak 2014).

K oxidačnímu stresu dochází při nerovnováze antioxidantů a prooxidačních agens. Nadbytek prooxidantů vyvolává oxidační stres dvěma způsoby. Buď generováním ROS nebo inhibicí antioxidantních systémů (Mohd Mutalip et al. 2018). Důsledkem obou zmíněných mechanismů dochází k různým změnám biomolekul, které definují patologický stav (Pisoschi et al. 2021). Řada látek, jako jsou například těžké kovy nebo jiná xenobiotika a mnoho dalších exogenních faktorů, jako je UV záření, mohou indukovat nadměrnou tvorbu ROS (Sinha et al. 2013). V organismu jsou ROS běžně vytvářeny v omezeném množství, neboť jsou nezbytné například pro udržení homeostázy buněk, přenos signálů, genovou expresi, rozpoznávání patogenů aj. (Pisoschi et al. 2021). V mitochondriích je rozsah produkce ROS ovlivňován fyziologickými i patologickými podmínkami organismu, přičemž jejich koncentrace je udržována zejména pomocí enzymatického mitochondriálního antioxidantního systému. Jakmile produkce ROS překročí kapacitu mitochondriálních antioxidantů, může dojít k inaktivaci Krebsova cyklu a složek dýchacího řetězce. V důsledku této mitochondriální dysfunkce může docházet k vážným poškozením buněčných struktur i celého organismu (Ciarcià et al. 2022).

Podle intenzity lze oxidační stres charakterizovat jako fyziologický (eustres), kdy v systému mezi produkcí ROS a jejich neutralizací existuje rovnováha, nebo jako toxický oxidační stres (distres), kdy buněčné složky podléhají vážnému oxidačnímu stresu a v konečném důsledku dochází k poškození a ohrožení životaschopnosti buněk (Sinha et al. 2013; Pisoschi et al. 2021).

3.2.3.2 *Antioxidační funkce vitamínu E*

Tokochromanoly jsou přítomny v buněčných membránách, včetně mitochondriálních, kde jako součást antioxidantního systému (Ciarcià et al. 2022) ochraňují membránové lipidy před oxidačním poškozením. Tato ochrana je zprostředkována dvěma mechanismy. U prvního mechanismu dochází k přenosu atomu vodíku z hydroxyly tokochromanolového kruhu na vysoce reaktivní peroxyradikál, čímž dojde k jeho přeměně na méně reaktivní hydroperoxid. Tím dojde k přerušení řetězové radikálové reakce vedoucí k peroxidaci lipidů. Vzniklý, stabilnější tokochromanolový radikál může být zpětně recyklován na odpovídající tokochromanol reakcí s jiným buněčným reduktantem, jako je například askorbát nebo ubichinol (DellaPenna & Mène-Saffrané 2011). Druhým mechanismem je fyzikální zhašení vysoce reaktivního singletového kyslíku pomocí přenosu náboje a tepelného rozptylu uvolněné energie. Tímto způsobem je singletový kyslík navrácen do základního stavu bez poškození struktury tokochromanolu. Singletový kyslík je produktem fotosystému II, proto tyto ochranné mechanismy hrají důležitější roli u rostlin než u živočichů (DellaPenna & Mène-Saffrané 2011).

Hlavním faktorem určujícím antioxidantní účinnost tokochromanolů v homogenních roztocích je přítomnost hydroxylové skupiny v blízkosti chromanolového kruhu, ze které je při substituci uvolňován elektron. Z toho vyplývá, že α -tokochromanoly jsou jako donory vodíku účinnější než β -, γ - a δ -tokochromanoly. Nicméně biologické membrány jsou složeny ze široké

škály složených lipidů s odlišnými polárními skupinami a uhlovodíkovými substituenty, které nejsou v membráně homogenně rozloženy. Proto lze předpokládat, že antioxidační účinnost nezávisí pouze přímo na chemické struktuře, ale také na jiných faktorech, jako je mobilita a přístupnost v buněčné membráně, které jsou do značné míry strukturou ovlivněny, a kromě toho může značnou roli hrát i prostředí, ve kterém k reakcím dochází (Falk & Munné-Bosch 2010).

3.2.4 Výskyt u rostlin

Zatímco tokoferoly jsou přítomny ve všech fotosyntetizujících rostlinách, tokotrienoly se vyskytují pouze u některých druhů rostlin. Stejně tak i když jsou v rostlině přítomny tokoferoly i tokotrienoly, nemusí se nacházet ve stejných tkáních, což může naznačovat jejich rozdílnou funkci (Falk & Munné-Bosch 2010; Mène-Saffrané & DellaPenna 2010). Tokoferoly jsou v rostlině lokalizovány v různých pletivech – v listech, semenech, plodech, stoncích, aj. a to především v plastidech, konkrétně v chloroplastech fotosyntetizujících pletiv, amyloplastech semen a hlíz, leukoplastech okvětních lístků nebo v chromoplastech plodů. Různorodé je také jejich složení i obsah, přičemž v semenech bývá akumulováno až dvakrát více tokoferolů než v listech (Falk & Munné-Bosch 2010; Mène-Saffrané & DellaPenna 2010; Hussain et al. 2013). Semena jsou bohatá na γ -tokoferol, zatímco α -, β - a δ -tokoferol jsou u většiny rostlinných druhů v semenech přítomny ve výrazně nižším množství. V listech a jiných fotosyntetizujících pletivech obecně převládá α -tokoferol. α -tokoferol bývá lokalizován zejména ve vnitřních obalových membránách chloroplastů, v thylakoidních membránách a v některých případech v plastoglobulech (Hussain et al. 2013). Tokotrienoly jsou, ve srovnání s tokoferoly, v rostlině říši rozšířeny méně a jejich přítomnost ve fotosyntetizujících orgánech bývá vzácná. Přesto mohou být různé tokotrienoly přítomny ve významném množství v semenech jednoděložných rostlin (Falk & Munné-Bosch 2010; Mène-Saffrané & DellaPenna 2010).

Mezi hlavní potravinové přírodní zdroje tokoferolů a tokotrienolů patří lipidové frakce semen a ořechů. Jejich ochranná funkce může vysvětlovat jejich vysokou koncentraci ve vysoce nenasyčených jedlých olejích. Tokoferoly jsou přítomny v oleji mandlovém, slunečnicovém nebo lněném. Vysoký podíl tokotrienolů oproti tokoferolům je charakteristický pro palmový olej (45:55), olej z rýžových otrub (30:70) a semena annatto (0:100), která jsou výhradním obsahem tokotrienolů (převážně δ -tokotrienolu) jedinečná. Údaje o přítomnosti tokolů v ovoci a zelenině jsou často rozporuplné. Obecně je to dáno tím, že rostlinné potraviny s nízkým obsahem lipidů obvykle obsahují zanedbatelná množství tokolů, ale jistý vliv může mít i různorodost analytických metod, které se pro jejich stanovení používají. V běžné stravě jsou přijímány především tokoferoly, a to hlavně α - a γ -tokoferol (Peh et al. 2016; Shahidi & de Camargo 2016; Szewczyk et al. 2021). V semenech máku jsou přítomny zejména α - a γ -tokoferoly s převažujícím podílem γ -tokoferolu. Množství α -tokoferolu bývá až desetkrát nižší oproti γ -tokoferolu (Dąbrowski et al. 2020).

3.2.5 Biologická dostupnost

K rozšíření studia metabolismu a nutričních požadavků vitamínu E vedlo popsání faktoru X v rostlinných produktech Evansem a Bishopem v roce 1922, kdy tento faktor vyléčil sterilitu

u potkanů (Clarke et al. 2008). Výzkum spočíval v pozorování potkanů, kteří byli krmeni stravou skládající se z mléčného kaseinu, kukuřičného škrobu a směsi solí a dávek vitamínu A a B. U takto krmených potkanů docházelo k projevům sterility již v první generaci, přičemž základní příčinou pozorovaných poruch reprodukce byl označen neznámý dietní faktor. Po zkrmování zeleného salátu, vojtěšky, pšenice, ovsa, masa a plnotučného mléka (tedy krmiva s obsahem vitamínu E) došlo více či méně k účinnému udržení plodnosti a zabránění sterilitě (Brigelius-Flohé 2021). Další zkoumání vedla k získání značného množství informací o roli tohoto vitamínu nejen ve zdraví člověka, ale i o jeho vlivu na rostlinné organismy (Clarke et al. 2008).

Přestože mají jednotlivé formy vitamínu E podobnou strukturu, liší se jejich biologická dostupnost a způsob jakým jsou v organismu metabolizovány (Shahidi & de Camargo 2016; Szewczyk et al. 2021). Výsledky mnoha studií prokázaly, že živočichové včetně člověka přednostně vstřebávají přírodní stereoizomer RRR- α -tokoferol, a to hlavně díky afinitě α -tokoferolového transportního proteinu (α -TTP) k R formám. Studie zároveň ukázaly, že RRR- α -tokoferol je biologicky neaktivnější a aktivita jiných forem je vyjadřována v ekvivalentu α -tokoferolu v procentech. To představuje pro β -tokoferol 50 %, pro γ -tokoferol 10 %, 3 % pro δ -tokoferol, 30 % pro α -tokotrienol, 8 % pro γ -tokotrienol a 5 % pro β -tokotrienol. Pro γ -tokoferol nebyl ekvivalent stanoven (Szewczyk et al. 2021).

Množství vstřebaného vitamínu E závisí na rozdílech v matici potravin, které tento vitamin dodávají. Je známo, že kyselina retinová, rostlinné steroly, kyselina eikosapentaenová, alkohol a vláknina vstřebávání vitamínu E inhibují. Fragmentace matrice potravin může zvýšit biologickou dostupnost tokochromanolů a jejich přenos do micel. Střevní absorpce vitamínu E úzce souvisí s trávením tuků obsažených ve stravě, pro které je zásadní produkce žlučových kyselin v játrech a tvorba micel (Clarke 2008; Szewczyk et al. 2021).

Ke vstřebávání vitamínu E obsaženého ve formě micel společně s triacylglyceroly a cholesterolem může docházet pasivní difuzí přes membránu enterocytů. Kromě toho klíčovou roli ve střevní absorpci těchto látek hrají transmembránové proteiny (Clarke 2008; Szewczyk et al. 2021). Ve střevních epitelálních buňkách je vitamin E začleněn do vznikajících chylomikronů. V krvi vitamin E následuje lipoproteinový transport ostatních lipidů a je transportován buď do extrahepatálních tkání nebo do jater. Transport vitamínu E probíhá prostřednictvím chylomikronů, lipoproteinů nízké, střední nebo vysoké hustoty. V játrech prochází vitamin E několika třídícími kroky, které vedou různé formy vitamínu E buď ke katabolickým procesům nebo k jejich začlenění do lipoproteinových částic prostřednictvím částečně neznámých mechanismů. α -TTP rozlišuje odlišné formy vitamínu E ve prospěch α -tokoferolu a tím nedochází k jeho nadměrnému katabolismu. S ostatními formami vitamínu E je přednostně nakládáno jako s xenobiotiky a konečné produkty jejich rozkladu (karboxyethyl-hydroxychromany) jsou ve formě sulfátů a glukuronidových konjugátů vyloučeny močí nebo žlučí. Tím je působení jiných homologů než α -tokoferolu v lidském těle omezené, neboť jsou okamžitě metabolizovány a vylučovány (Galli et al. 2017; Szewczyk et al. 2021).

Absorpce tokoferolů a tokotrienolů ve střevech se pohybuje v rozmezí 20–80 % celkového přijatého množství. Úroveň vstřebatelnosti je nižší než u ostatních lipofilních vitaminů a koncentrace tokoferolů a tokotrienolů v plazmě je ovlivněna jejich obsahem ve stravě, absorpcí a metabolismem (Szewczyk et al. 2021).

3.2.6 Význam vitamínu E pro člověka

Stejně jako u rostlin působí i v lidském organismu tokochromanoly jako antioxidanty (Falk & Munné-Bosch 2010). Oxidační stres u lidí může být příčinou patogeneze řady neurodegenerativních a metabolických onemocnění (Ciarcià et al. 2022). Na příklad v ženském reprodukčním systému mohou ROS narušovat raný embryonální vývoj, ovlivňovat oplození oocyty a způsobit inhibici implantace embrya (Mohd Mutalip et al. 2018). U mužů je škodlivé působení ROS spojováno s mužskou neplodností, kdy významně ovlivňují funkci a kvalitu spermií (Zerbinati et al. 2020). Vitamin E má svojí aktivitou (popsanou v podkapitole 3.2.3.2) prospěšné účinky na průběh těhotenství, což úzce souvisí se zdravím novorozenců (Mohd Mutalip et al. 2018), a také proti poruchám reprodukce, kdy zachovává a obnovuje pohyblivost a morfologii spermií (Bisht et al. 2017).

Kromě účinku na plodnost, studie na zvířatech doložily nezbytnost tohoto vitamínu pro vývoj tkání a orgánů, jako jsou mozek, svaly a kosti. Některé z těchto funkcí byly u lidí potvrzeny, jiné jsou stále předmětem zkoumání (Galli et al. 2017). Proto je nutné brát v úvahu i jeho další potenciální role (Falk & Munné-Bosch 2010), jako jsou například jeho antiproliferační, proapoptické, antiangiogenní a protizánětlivé účinky (Clarke et al. 2008; Szewczyk et al. 2021).

3.3 Extrakce lipofilních látek z rostlinné matrice

Extrakce je klasická metoda, kterou se získává čistá sloučenina z původní matrice pomocí různých rozpouštědel. Může být použito jedno nebo kombinace více rozpouštědel, podle charakteru izolované látky. Důležitým rozdílem mezi jednotlivými metodami extrakce jsou čas a množství použitého rozpouštědla potřebné pro extrakci. Dalším významným faktorem je teplota, která ovlivňuje jak rozpustnost sloučeniny, tak schopnost rozpouštědla pronikat do vzorku a tím i výslednou účinnost extrakce. Volba metody extrakce ovlivní její výsledky (Kumar 2016).

Prvním krokem je výběr správného rozpouštědla, případně směsi rozpouštědel. Sladění polaritý zkoumané sloučeniny a extrakčního činidla je důležité pro optimální průběh extrakce. Pro extrakci lipofilních látek jsou vhodná nepolární rozpouštědla, jako je například petroléter nebo hexan. Důležitými faktory při výběru vhodného rozpouštědla jsou toxicita, solubilizační schopnost, selektivita a chemická reaktivita. Rozpouštědlo by mělo být v ideálním případě netoxické a mělo by mít vysokou solubilizační sílu, která určuje schopnost rozpouštět danou látku a převést ji tak z pevné matrice do roztoku. Selektivita je schopnost rozpouštědla rozpouštět určité sloučeniny s podobnou polaritou (Kumar 2016). Při výběru vhodného rozpouštědla mohou pomoci různá měřítka chemických vlastností rozpouštědla a sloučeniny. Pro hodnocení a porovnávání polarit je běžně používán rozdělovací koeficient $\log K_{ow}$. Rozdělovací koeficient stanovuje nejlepší rozpustnost sloučeniny v polárním (vodném) nebo nepolárním (oktanolovém) rozpouštědle. $\log K_{ow}$ je vypočítán podle vztahu:

$$\log K_{ow} = \log \frac{c_{oktanol}}{c_{voda}}$$

Kde $c_{oktanol}$ a c_{voda} jsou změřené koncentrace sloučeniny v obou fázích. Selektivita různých rozpouštědel závisí na charakteru cílových sloučeninách. Například hexanem lze

extrahovat alkany a methylestery bez karboxylových kyselin, zatímco ethanol je vhodný pro extrakci karboxylových kyselin bez alkanů nebo methylesterů (Lefebvre et al. 2021).

Existuje mnoho technik extrakce, které se liší možností a efektivitou jejich využití pro izolaci různých analytů z rozdílných materiálů. Tyto techniky je možné rozdělit do několika skupin podle různých parametrů. Rozdělení může být podle vlastností vzorku, jeho látkového skupenství, viskozity nebo těkavosti (Bielicka-Daszkiwicz 2016). Podle vývoje lze dostupné techniky extrakce rozdělit do dvou skupin na klasické a moderní. U klasických technik, jako jsou extrakce v třepací baňce (macerace), Soxhletova extrakce a extrakce na pevnou fázi (SPE), účinnost extrakce závisí především na typu použitého rozpouštědla a době extrakce (Wilga et al. 2007; Usman et al. 2022). Klasické techniky se snadno provádějí a nevyžadují žádné speciální vybavení (Tzanova et al. 2020). U moderních metod, kam lze zařadit například ultrazvukovou extrakci (UAE), mikrovlnnou extrakci (MAE), extrakci pomocí enzymů (EAE) a extrakci superkritickou tekutinou (SFE), nezávisí účinnost extrakce pouze na druhu použitého rozpouštědla a době extrakce, ale i na dalších různých parametrech, které jsou typické pro danou metodu. V posledních letech bylo vyvinuto mnoho pokročilých a účinných extrakčních metod, které klasické konvenční metody překonávají. Použitím moderních technik lze výrazně zkrátit dobu extrakce, snižovat spotřebu rozpouštědel a současně zvyšovat extrakční účinnost. Tyto nové techniky jsou též známy jako metody „zelené extrakce“ (Wilga et al. 2007; Khongthaw et al. 2023).

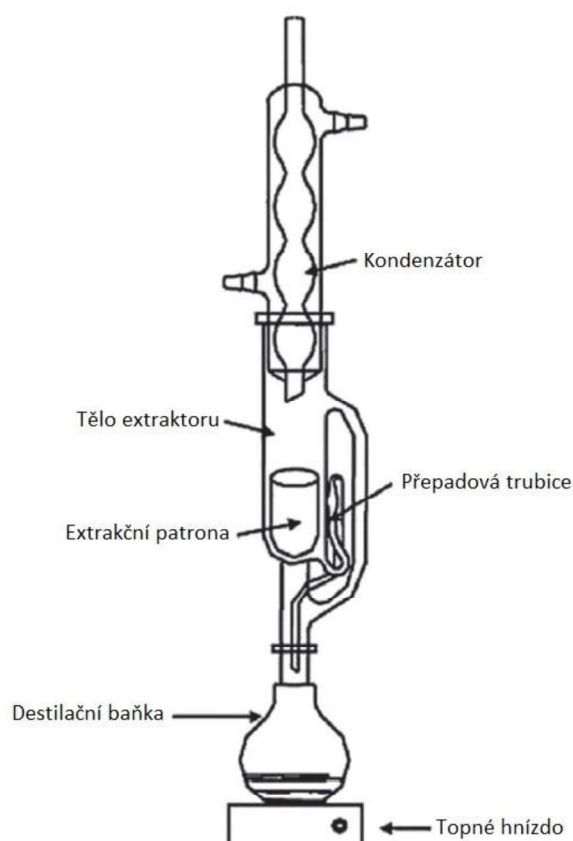
3.3.1 Macerace

Macerace je jednou z nejjednodušších extrakčních metod, při které je využíváno rozpouštědla v kombinaci s teplem a mícháním, čímž dochází ke zlepšení přenosu hmoty a rozpustnosti sloučenin (Picot-Allain et al. 2021; Khongthaw et al. 2023). Při maceraci je rostlinný materiál nejprve rozemletý na malé částice. Tím dojde ke zvětšení povrchu a lepšímu smísení s rozpouštědlem. Následně je homogenní matrice v uzavřené nádobě smíchána s vhodným rozpouštědlem a za občasného protřepání se nechá stát několik dnů při pokojové teplotě. Tímto procesem dochází ke změkčení a rozkladu buněčných stěn, což může značně napomoci uvolňování extrahované látky (Azmir et al. 2013; Khongthaw et al. 2023). Tato metoda se běžně používá pro izolaci netěkavých rostlinných sloučenin, ale své využití nachází i při extrakci termolabilních složek. Nevýhodou této metody je dlouhá doba extrakce, nízká výtěžnost a spotřeba velkého množství rozpouštědel (Zhang et al. 2018; Khongthaw 2023).

3.3.2 Soxhletova extrakce

Jednou z nejstarších a nejpoužívanějších extrakčních metod (Danlami et al. 2014) je extrakce prováděna na Soxhletově přístroji, při které je homogenizovaný vzorek umístěn do extrakční patrony. V destilační baňce dochází k zahřívání extrakčních rozpouštědel. Tím dochází k jejich odpařování a páry rozpouštědel stoupají do kondenzátoru (chladiče), kde kondenzují a odkapávají do extrakční patrony se vzorkem. Když hladina rozpouštědla dosáhne hladiny přepadu, teče rozpouštědlo přepadovou trubicí zpět do destilační baňky (Obrázek 6). Roztok rozpouštědla s sebou odvádí i extrahované rozpouštěné látky, které zůstávají v destilační baňce. Operace se opakuje, dokud není dosaženo úplné extrakce (Danlami et al. 2014; Tzanova et al. 2020; Khongthaw 2023). Soxhletova extrakce je běžně používanou konvenční metodou

k extrakci tepelně stabilních sloučenin z pevných materiálů, například tuků a olejů semenných matric. Jedná se o zásadní zařízení používané ve farmakognozii pro extrakci farmakologicky aktivních sloučenin. Tato metoda je využívána i jako referenční metoda pro hodnocení ostatních extrakčních metod na principu tuhá látka-kapalina (Danlami et al. 2014; Khongthaw 2023). Výhodou Soxhletovy extrakce je její vysoká extrakční účinnost, která vyžaduje méně času a spotřeby rozpouštědel, než je třeba u macerace. Nevýhodou této metody je vysoká teplota zvyšující pravděpodobnost tepelné degradace extrahovaných sloučenin (Zhang et al. 2018).



Obrázek 6. Soxhletova aparatura (upraveno dle Danlami et al. 2014).

3.3.3 Extrakce na pevnou fázi

SPE probíhá na základě adsorpce analytů na pevné sorbenty. Požadovanou chemickou složku lze následně z pevného sorbentu získat elucí vhodným rozpouštědlem. Tímto typem extrakce dochází k důkladnému odstranění chemických složek z kapaliny. Výběr vhodného sorbentu je velmi důležitý a závisí na interakci mezi sorbentem a samotným analytem (Silva et al. 2015; Usman et al. 2022). Důležitým faktorem pro úspěšnou extrakci je výběr elučního rozpouštědla, které zajistí kvantitativní vymytí veškerého množství analytu z pevného sorbentu (Usman et al. 2022). SPE našla využití pro extrakci znečišťujících látek a je považována za vhodnou metodu pro monitorování pesticidů v různých formách matric (Samsidar et al. 2018). Jedná se o relativně levnou, snadnou a opakovatelnou metodu. Nedostatkem SPE je omezená kapacita pevného sorbentu, kdy mohou po extrakci zůstat v extraktu kontaminanty (Silva et

al. 2015). K odstranění malých částic je potřeba po SPE využít filtračních procesů (Usman et al. 2022).

3.3.4 Ultrazvuková extrakce

Ultrazvuk je mechanické vlnění, které překonává frekvenci nad 20 kHz a tím je pro lidské ucho neslyšitelné (Danlami et al. 2014). Je považován za vynikající zdroj energie pro podporu extrakce (Kumar 2016). Extrakce probíhá v ultrazvukové lázni a podobně jako u jiných zvukových vln, dochází i u ultrazvuku k sériím kompresních a nízkotlakých vln. Tyto vlny prochází prostředím média, kde se rozptylují a způsobují akustickou kavitaci. Kavitace je jev, při kterém dochází ke vzniku, růstu a kolapsu mikroskopických bublin (Kumar 2016; Tzanova et al. 2020). Rozpadem těchto bublin je uvolňováno velké množství energie ve formě tepla a tlaku, což může vést k narušení buněčných stěn, degradaci rostlinné matrice a zvýšenému přenosu hmoty, čímž zpravidla dochází k účinnější extrakci cílové sloučeniny (Azmir et al. 2013; Tzanova et al. 2020). Podobně jako u Soxhletovy extrakce existuje u UAE riziko poškození tepelně labilních sloučenin v důsledku působení uvolňovaného tepla, ale díky kratší době průběhu může být tato metoda vhodnou alternativu právě k extrakci Soxhletově (Azmir et al. 2013; Tzanova et al. 2020; Picot-Allain et al. 2021; Khongthaw et al. 2023). UAE představuje jednoduchou, levnou a účinnou metodu pro extrakci široké škály biologicky aktivních látek (organických i anorganických) z rostlinné matrice (Azmir et al. 2013; Manzoor et al. 2019; Tzanova et al. 2020). Kromě zkrácení doby extrakce jsou výhodami UAE nízká spotřeba rozpouštědla a snížení teploty extrakce. Ultrazvuk navíc při extrakci umožňuje účinnější míchání a rychlejší přenos energie a může zvyšovat účinnost extrakce (Azmir et al. 2013; Tzanova et al. 2020). Hlavní nevýhodou této metody je vznik volných radikálů při použití vysoké frekvence ultrazvukových vln. Proto je nutné, aby všechny parametry UAE extrakce byly důkladně optimalizovány, aby se zabránilo tepelné degradaci analyzovaných sloučenin (Tzanova et al. 2020; Khongthaw et al. 2023).

3.3.5 Mikrovlnná extrakce

Při této metodě dochází k extrakci vhodným rozpouštědlem v kombinaci s působením mikrovlnného záření (Kumar 2016). Mikrovlny patří do třídy neionizujícího záření s rozsahem frekvence 300 MHz–300 GHz (Khongthaw et al. 2023). Během MAE dochází k zahřívání rozpouštědla vlivem absorpce mikrovlnného záření dipóly existujícími v rozpouštědle nebo v materiálu vzorku (Kumar 2016). To vede ke vzniku elektrického pole, které způsobuje posun polárních molekul, vytvoření dipólové rotace a iontové vodivosti. Prostřednictvím mechanismů, kterými se molekuly snaží přizpůsobit vzniklému elektrickému poli, je uvolňována energie ve formě tepla, čímž dochází k rychlému zvýšení teploty rozpouštědla. V rostlinné buňce vlivem odpařující se vlhkosti vzniká tlak, který způsobuje prasknutí buněčné stěny a buňka je tak vystavena okolnímu rozpouštědлу. (Manzoor et al. 2019; Picot-Allain et al. 2021; Khongthaw et al. 2023). MAE lze považovat za selektivní metodu pro extrakci organických a organokovových sloučenin, které jsou stabilní při vystavení mikrovlnnému ohřevu. MAE může rychleji extrahovat bioaktivní látky a v porovnání s konvenčními metodami lze dosáhnout lepší výtěžnosti, snížení množství použitých rozpouštědel a nákladů na zpracování (Azmir et al. 2013; Tzanova et al. 2020). Z použití MAE však vyplývají i nevýhody,

kdy při nevhodně nastaveném výkonu mikrovlnného záření dochází k přehřátí, které může vést k rozsáhlé degradaci analytu (Kumar 2016).

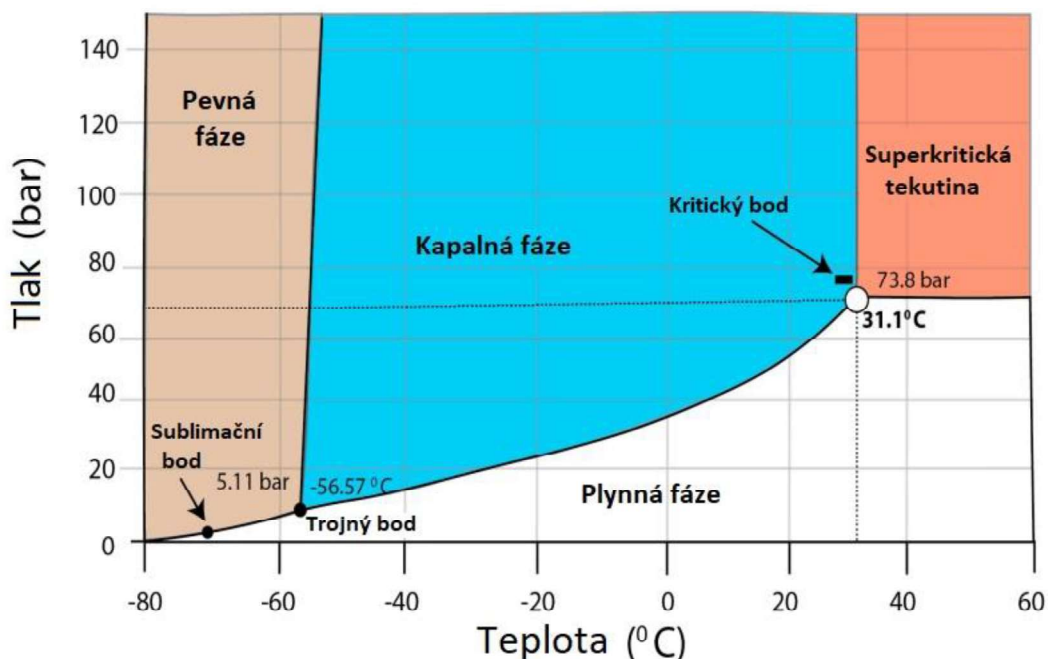
3.3.6 Extrakce pomocí enzymu

EAE je enzymatická předúprava, kdy jsou během extrakčního kroku přidávány specificky hydrolyzující enzymy, například celulasy, α -amylasy, pektinasy apod. (Tzanova et al. 2020). Rostlinné buněčné stěny jsou tvořeny makromolekulami jako jsou zejména polysacharidy, na které mohou být některé fytochemikálie pevně vázány a je tedy obtížné je odstranit tradičními metodami extrakce. Přidáním enzymů do rozpouštědla a jejich hydrolytickým působením na komponenty buněčných stěn, lze dosáhnout uvolnění některých vázaných molekul a zvýšit tak výtěžnost dané metody (Manzoor et al. 2019; Picot-Allain et al. 2021; Khongthaw et al. 2023). Tento způsob extrakce představuje účinnou techniku pro extrakci velké skupiny sekundárních rostlinných metabolitů s antioxidačními vlastnostmi (Tzanova et al. 2020). V řadě studií, v nichž byla srovnávána účinnost různých extrakčních metod, prokázala tato metoda vyšší výtěžnost, rychlejší extrakci a nižší spotřebu energie a rozpouštědla (Manzoor et al. 2019; Picot-Allain et al. 2021; Khongthaw et al. 2023). EAE je ovlivněna řadou faktorů, jako je pH média, teplota, doba zpracování a v neposlední řadě výběr enzymu (Manzoor et al. 2019; Picot-Allain et al. 2021; Khongthaw et al. 2023).

3.3.7 Extrakce superkritickou tekutinou

V závislosti na působení tlaku a teploty mohou látky přecházet do tří různých fází – plynu, kapaliny a pevné látky (Kumar 2016). Specifickým stavem je tzv. trojný bod (Obrázek 7), ve kterém koexistují všechny tři fáze. Nad tímto kritickým bodem se nachází oblast teploty a tlaku, kdy superkritické kapaliny vykazují fyzikální tzv. dualistické vlastnosti podobné jak kapalině, tak plynu (Azmir et al. 2013; Kumar 2016; Tzanova et al. 2020). Superkritická kapalina se chová jako plyn, ale má rozpouštěcí vlastnosti kapaliny (Tzanova et al. 2020). Z těchto vlastností vyplývá princip SFE, který je založen na zvýšení teploty a tlaku rozpouštědla, nad jeho kritickou hodnotu. Vzorek je umístěn do extrakční nádoby, ve které se v průběhu extrakce udržuje stálá teplota a tlak. Poté je extrakční nádoba naplněna superkritickou tekutinou a po rozpuštění obsahových látek vzorku jsou tyto látky odděleny separátorem pevné fáze (Khongthaw et al. 2023). Ideálním rozpouštědlem pro SFE je oxid uhličitý (CO_2). Kritická teplota CO_2 je blízká pokojové teplotě ($31\text{ }^\circ\text{C}$) a jeho nízký kritický tlak (74 barů) (Obrázek 7) nabízí možnost pracovat při mírných tlacích mezi 100 a 450 bary (Azmir et al. 2013). Použití CO_2 jako superkritické tekutiny má řadu podstatných výhod, jako je dobrá solvatace nepolárních analytů, nízké náklady, nízká toxicita CO_2 a získání koncentrované sušiny, díky snadnému odpaření CO_2 (Tzanova et al. 2020). Nevýhodou CO_2 je jeho nízká polarita, která je ideální pro extrakci nepolárních látek, ale činí jej nevhodným pro většinu farmaceutických přípravků. Z tohoto důvodu se k CO_2 mohou přidávat modifikátory (např. dichlormethan), který výrazně zvyšují jeho polaritu. SFE je využívána v oblasti životního prostředí, ve farmaceutickém průmyslu, při analýze polymerů a potravin (Azmir et al. 2013). Velkou nevýhodou této extrakční metody je finanční náročnost při pořizování zařízení (Tzanova et al.

2020). Kromě oxidu uhličitého jsou dalšími používanými rozpouštědly ethylen, dusík, xenon nebo methan (Khongthaw et al. 2023).



Obrázek 7. Trojný bod a superkritická oblast pro CO₂ (upraveno dle Uwineza & Waskiewicz 2020).

3.4 Chromatografické metody stanovení lipofilních látek

Většina vzorků jsou komplexní směsi stovek nebo tisíců chemických látek. K oddělení jednotlivých složek ze složitých směsí je využíváno separačních metod, mezi které je řazena chromatografie, jež je jednou z nejvíce využívaných instrumentálních analytických metod (Vitha 2016). Chromatografie je založena na principu, kdy jsou molekuly dané směsi vneseny mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fázi. K oddělení složek směsi dochází pohybem mobilní fáze, která vzorek unáší přes stacionární fázi. Rozdílná afinita a interakce molekul ve vzorku se stacionární fází vede k jejich separaci. Složky vzorku, které mají silnější interakce se stacionární fází se kolonou pohybují (elují) pomaleji ve srovnání se složkami, které mají ke stacionární fází slabší afinitu. Po separaci lze oddělené složky identifikovat a kvantifikovat (Coskun 2016; Kumar 2016; Vitha 2016). Chromatografické metody lze podle různých kritérií rozdělit do několika skupin. Základní je rozdělení podle povahy mobilní fáze. Pokud je mobilní fáze plynná jedná se o plynovou chromatografii (GC) a v případě kapalně mobilní fáze jde o kapalinovou chromatografii (LC) (Coskun 2016).

3.4.1 Plynová chromatografie (GC)

V plynové chromatografii je mobilní fáze označována jako nosný plyn. Nejvíce používaným plynem je helium, ale lze využít také dusík, argon nebo vodík (Vitha 2016). Díky relativní inertnosti těchto plynů složení mobilní fáze nijak výrazně neovlivňuje separační proces. Analýza je omezena pouze na relativně těkavé a polotěkavé sloučeniny, které jsou při pokojové teplotě buď plynné nebo kapalně, ale s bodem varu nižším, než je teplota, při které

mohou být vzorky vstříkovány do kolony (Laajimi et al. 2022). Operativní teplota je v rozpětí mezi 40–400 °C (Vitha 2016). Základní součásti typického moderního plynového chromatografu jsou zdroj nosného plynu, dávkovač, kolona, termostat, detektor a vyhodnocovací zařízení (Laajimi et al. 2022). GC funguje na principu, kdy inertní plyn kontinuálně proudí z velké plynové lahve přes dávkovač, kolonu a detektor, přičemž průtok nosného plynu je pečlivě regulován. Vzorek je vstříknut do dávkovače, ze kterého je po odpaření přenesen proudem nosného plynu do kolony. Obvykle se využívá kapilární kolona 15–30 cm dlouhá. Vnitřní strana kolony je potažena tenkou vrstvou kapaliny s vysokým bodem varu, ta představuje stacionární fázi. Vzorek je následně rozdělen na jednotlivé složky mezi mobilní a stacionární fázi na základě rozpustnosti v kapalně stacionární fázi a relativních tlaků par. Za kolonou prochází nosný plyn a vzorek detektorem, který generuje elektrický signál (McNair et al. 2019). Používanými detektory v GC jsou například plamenové ionizační detektory, detektory teplené vodivosti, detektor elektronového záchytu a časté je také spojení GC s hmotnostní spektrometrií (Laajimi et al. 2022).

3.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie je jednou z nejrozšířenějších technik pro analýzu chemických směsí (Fanali et al. 2017), pomocí které lze oddělovat, identifikovat a kvantifikovat jednotlivé složky ve směsi (Schieppati et al. 2021). Systém HPLC je obvykle složen z komponentů, jako jsou zásobník mobilních fází, čerpadlo, systém vstříkování vzorku, kolona, detektor a počítač sloužící pro vyhodnocení dat z detektoru (Kumar 2016).

3.4.2.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze jsou většinou tvořeny směsí organických nebo anorganických rozpouštědel, která zajišťují účinnou separaci. Mobilní fáze často obsahují organické rozpouštědlo, jako je například acetonitril nebo methanol a anorganické rozpouštědlo, kterým je nejčastěji voda. Složení mobilní fáze, zejména množství a povaha organického rozpouštědla značně ovlivňuje zachycování (retenci) analytů na fázi stacionární (Schieppati et al. 2021). Mobilní fáze je do systému vhnána při určité průtokové rychlosti (Siddhant et al. 2018). K udržení kontinuálního průtoku mobilní fáze jsou používány systémy čerpadel. Vlastní HPLC analýza začíná vstříknutím vzorku do mobilní fáze, kterou je unášen na kolonu (Kumar 2016). Vstříkování vzorku do proudu mobilní fáze je prováděno buď za pomoci injekční stříkačky nebo řízeným infuzním systémem (Siddhant et al. 2018).

3.4.2.2 Kolona

Použitá kolona je jádrem celé HPLC, neboť v koloně dochází k separaci složek analytu. Kolony používané při HPLC analýze jsou nejčastěji ocelové trubice, uvnitř kterých je uložena stacionární fáze (Kumar 2016). Stacionární fáze je vybírána na základě fyzikálně-chemických vlastností adsorbentu a analytu. Na základě široké škály selektivit, je dostupné velké množství stacionárních fází, přičemž každá má svá specifika. Klasické separační systémy na tzv. normálních fázích jsou založeny na použití polární stacionární fáze, jako je např. čistý oxid křemičitý, které oddělují polární molekuly pomocí mobilních fází o nižší polaritě, než má fáze

stacionární. V současné době jsou převážně využívány systémy HPLC na reverzních fázích, ve kterých se používají nepolární stacionární fáze na bázi modifikovaného oxidu křemičitého. Podle typu kolony a použité mobilní fáze lze pomocí HPLC na reverzních fázích separovat řadu nepolárních až středně polárních analytů. Další významnou roli hraje i pórovitost kolony. Stacionární fáze o malé velikosti částic zabraňují stagnaci mobilní fáze v pórech a zajišťují lepší přenos hmoty, ale na druhou stranu je při jejich použití celý systém vystaven mnohem vyššímu tlaku, což může vést k rychlejšímu opotřebením jeho jednotlivých součástí (Corradini 2010; Schieppati et al. 2021).

3.4.2.3 Detektor

Na konci kolony je umístěn detektor, který detekuje jednotlivé analyty při jejich eluci z kolony. Detektory bývají navrženy tak, aby selektivně a s vysokou citlivostí využívaly specifické fyzikální nebo chemické vlastnosti analytu. Při změně složení mobilní fáze, tedy při eluci analytu generuje detektor elektrický signál úměrný koncentraci eluované molekuly. Odezva detektoru je dále zpracována HPLC softwarem a dojde k vytvoření chromatogramu, což je graf znázorňující závislost intenzity signálu na koncentraci analytu (Siddhant et al. 2018; Schieppati et al. 2021). Často používanými detektory jsou UV-Vis detektory, fluorescenční detektory a elektrochemické detektory (Swartz 2010; Siddhant et al. 2018; Schieppati et al. 2021). UV-Vis detektor je nejběžněji používaným typem, u kterého je princip detekce založen na schopnosti absorpce sledovaných sloučenin v UV (10–380 nm) a viditelné oblasti spektra (380–780 nm). Principem fluorescenčních detektorů je schopnost fluorescence, kdy tyto detektory měří emitované záření, které analyt vyzařuje po absorpci excitačního záření, jehož zdroj je v detektoru umístěn. Předpokladem jejich použití je schopnost fluorescence sledovaných látek, jako je tomu i v případě tokochromanolů. Fluorescenční detektory mohou být až tisíckrát citlivější než UV detektory (Swartz et al. 2010; Schieppati et al. 2021). Stejně jako u GC je i u LC časté spojení s hmotnostní spektrometrií (Swartz 2010), která představuje vysoce citlivou a univerzální metodu detekce (Schieppati et al. 2021).

4 Závěr

Mák setý je druhou nejpěstovanější olejninou pěstovanou v České republice hned po řepce. Podle zemědělského způsobu využití lze mák rozdělit na mák opiový a mák semenný. Mák opiový je zdrojem farmaceuticky využitelných alkaloidů, z nichž nejvýznamnější jsou morfin, kodein a noskapin. Pro ČR je však významnější produkce máku semenného, který zde má dlouholetou tradici a své uplatnění nachází v potravinářství. Pěstování máku je navíc podmíněno legislativně a až na výjimky stanovené zákonem nelze jiný než semenný mák u nás pěstovat.

Z chemického složení makového semene lze vyzdvihnout vysoký obsah tuků, sacharidů, některých minerálních látek a vitaminů. Maková semena jsou díky svému vysokému obsahu lipidů, který se pohybuje v rozmezí 28–53 %, dobrým zdrojem polynenasycených mastných kyselin, nejvíce však linolové kyseliny, která tvoří více než polovinu (53–74 %) obsahu. Ze sacharidů, jejichž podíl na celkovém obsahu v semeni se pohybuje kolem 26 %, lze zmínit vysoký obsah vlákniny, která z nich tvoří 22 %. Z minerálních látek je v semeni vysoký obsah vápníku (10 455 mg/kg) a z vitaminů je v makovém semeni obsažen vitamin E, jehož obsah v makovém oleji se pohybuje v rozmezí 122–182 mg/kg. Přítomnost vitaminu E v máku může úzce souviset právě s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin.

Vitamin E, který zahrnuje čtyři formy tokoferolů a tokotrienolů, je syntetizován výhradně fotosyntetickými organismy. Lidský organismus si jej nedovede sám syntetizovat, a proto je odkázán na jeho příjem z potravy. To z něj činí látku esenciální povahy. Vitamin E má antioxidační účinky, které jsou významné jak pro rostliny, tak i pro člověka. Jeho působení spočívá zejména v ochraně buněčných membrán před poškozením volnými radikály. U rostlin přítomnost těchto látek napomáhá ochraně fotosyntetického aparátu a u lidí má příznivé účinky z pohledu prevence patogeneze nádorových, kardiovaskulárních a jiných onemocnění.

K extrakci lipofilních látek lze použít řadu extrakčních metod. Existují metody klasické a moderní. Výběr vhodné metody extrakce je pro analýzu klíčový, neboť významně ovlivňuje její úspěšnost. Vhodnou extrakční metodou pro lipofilní látky se jeví extrakce superkritickou tekutinou.

Vzhledem k tomu, že tokochromanoly vykazují schopnost fluorescence, by analytická metoda HPLC s fluorescenční detekcí v kombinaci s vhodnou extrakční technikou mohla představovat vhodnou metodu pro stanovení obsahu vitaminu E v různých typech matric, včetně makového semene.

5 Literatura

- Aksoylu Özbek Z, Günç Ergönül P. 2020. Determination of Physicochemical Properties, Fatty Acid, Tocopherol, Sterol, and Phenolic Profiles of Expeller–Pressed Poppy Seed Oils from Turkey. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **97**:591-602.
- Almagro L, Sabater-Jara AB, Belchí-Navarro S, Pedreño MÁ. 2021. Recent trends in the biotechnological production of tocopherols using in vitro cultures. *Phytochemistry Reviews* **20**:1193-1207.
- Antony JV, Koya R, Pournami PN, Nair GG, Balakrishnan JP. 2022. Protein secondary structure assignment using residual networks. *Journal of Molecular Modeling* **28** (262) DOI: 10.1007/s00894-022-05271-z.
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117**:426-436.
- Azzi A. 2019. Tocopherols, tocotrienols and tocomonoenols: Many similar molecules but only one vitamin E. *Redox Biology* **26** (101259) DOI: 10.1016/j.redox.2019.101259.
- Banks R, Speakman JR, Selman C. 2010. Vitamin E supplementation and mammalian lifespan. *Molecular Nutrition & Food Research* **54**:719-725.
- Baranyk P. 2010. Olejniny. Profi Press, Praha.
- Beaudoin GAW, Facchini PJ. 2014. Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta* **240**:19-32.
- Bielicka-Daszkiwicz K. 2016. Extraction techniques based on solid state and connected with liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **39**:477-487.
- Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. 2017. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology* **14**:470-485.
- Blahovec J. 2002. MECHANICS OF POPPY SEEDS. *International Journal of Food Properties* **5**:277-287.
- Bozan B, Temelli F. 2008. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology* **99**:6354-6359.
- Brigelius-Flohé R. 2021. Vitamin E research: Past, now and future. *Free Radical Biology and Medicine* **177**:381-390.
- Ciarcià G, Bianchi S, Tomasello B, Acquaviva R, Malfa GA, Naletova I, La Mantia A, Di Giacomo C. 2022. Vitamin E and Non-Communicable Diseases: A Review. *Biomedicines* **10** (2473) DOI: 10.3390/biomedicines10102473.
- Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. 2008. Vitamin E in Human Health and Disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **45**:417-450.

- Coskun O. 2016. Separation Techniques: Chromatography. Northern Clinics of Istanbul **3**:156-160.
- Corradini D. 2010. Handbook of HPLC. 2nd ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Český modrý mák. 2020. Obecné informace o máku. Český modrý mák. Available from <https://ceskymodrymak.cz/cs/mak/obecne-informace> (accessed July 2022).
- Český statistický úřad. 2022. Veřejná databáze. Český statistický úřad. Available from https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/index.jsf?page=vystup-objekt&z=T&f=TABULKA&skupId=386&katalog=30840&pvo=ZEM02G&pvo=ZEM02G&evo=v1442 !_ZEM02G-celek_1#w= (accessed June 2022).
- Dąbrowski G, Czaplicki S, Konopka I. 2020. Composition and quality of poppy (*Papaver somniferum* L.) seed oil depending on the extraction method. LWT 134 (110167) DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110167.
- Danlami JM, Arsad A, Ahmad Zaini MA, Sulaiman H. 2014. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. Reviews in Chemical Engineering 30:605-626.
- DellaPenna D, Mène-Saffrané L. 2011. Vitamin E. Pages 179-227 in Rébeillé F, Douce R, editors. Biosynthesis of Vitamins in Plants Part B. Elsevier, Amsterdam.
- de la Guardia M, Garrigues S, Guardia MDL. 2015. Handbook of mineral elements in food. 1st edition. John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken.
- Deveraux AL, Mercer SL, Cunningham CW. 2018. Dark Classics in Chemical Neuroscience: Morphine. ACS Chemical Neuroscience **9**:2395-2407.
- Dvořáková M. 2021. Situační a výhledová zpráva: Olejniny. eAGRI. Ministerstvo zemědělství. Available from SVZ_Olejiny_12_2021.pdf (eagri.cz) (accessed February 2023).
- Egan PA, Pendry CA, Shretha S. 2012. Flora of Nepal. Available from <http://www.floraofnepal.org/sys/scripts/accountlibrary/getaccount.php> (accessed April 2023).
- Falk J, Munné-Bosch S. 2010. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. Journal of Experimental Botany **61**:1549-1566.
- Fu J-Y, Htar T-T, De Silva L, Tan D, Chuah L-H. 2017. Chromatographic Separation of Vitamin E Enantiomers. Molecules **22** (233) DOI: 10.3390/molecules22020233.
- Fanali C, D'Orazio G, Fanali S, Gentili A. 2017. Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry **87**:82-97.
- Fanali S, Haddad PR, Poole C, Riekkola M-L, Poole CF. 2017. Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. 2nd ed. Elsevier, Amsterdam.
- Galli F, Azzi A, Birringer M, Cook-Mills JM, Eggersdorfer M, Frank J, Cruciani G, Lorkowski S, Özer NK. 2017. Vitamin E: Emerging aspects and new directions. Free Radical Biology and Medicine **102**:16-36.
- Gaur S, Agnihotri R. 2017. Trace Mineral Micronutrients and Chronic Periodontitis—a Review. Biological Trace Element Research **176**:225-238.

- Gharibzahedi SMT, Jafari SM. 2017. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends in Food Science & Technology* **62**:119-132.
- Gray CJ et al. 2019. Advancing Solutions to the Carbohydrate Sequencing Challenge. *Journal of the American Chemical Society* **141**:14463-14479.
- Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN, Murphy DJ, Michell RH. 2016. *Lipids: biochemistry, biotechnology and health*. Sixth edition. Wiley-Blackwell, Chichester.
- Hagel JM, Facchini PJ. 2013. Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolism: A Century of Discovery and a Brave New World. *Plant and Cell Physiology* **54**:647-672.
- Haim A, Neubacher S, Grossmann TN. 2021. Protein Macrocyclization for Tertiary Structure Stabilization. *ChemBioChem* **22**:2672-2679.
- Hedayati-Moghadam M, Moezi SA, Kazemi T, Sami A, Akram M, Zainab R, Khazdair MR. 2022. The effects of *Papaver somniferum* (Opium poppy) on health, its controversies and consensus evidence. *Toxin Reviews* **41**:1030-1043.
- Hernandez EM, Kamal-Eldin A. 2013. *Processing and nutrition of fats and oils*. WILEY, Somerset.
- Hussain N, Irshad F, Jabeen Z, Shamsi IH, Li Z, Jiang L. 2013. Biosynthesis, Structural, and Functional Attributes of Tocopherols in Planta; Past, Present, and Future Perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:6137-6149.
- Jahodář L. 2018. *Rostliny způsobující otravy*. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, Praha.
- Jesus A, Bonhomme V, Evin A, Ivorra S, Soteras R, Salavert A, Antolín F, Bouby L. 2021. A morphometric approach to track opium poppy domestication. *Scientific Reports* **11** (9778) DOI: 10.1038/s41598-021-88964-4.
- Kaboudin B, Sohrabi M. 2021. Chemistry and synthesis of major opium alkaloids: a comprehensive review. *Journal of the Iranian Chemical Society* **18**:3177-3218.
- Khongthaw B, Chauhan PK, Dulta K, Kumar V, Ighalo JO. 2023. A comparison of conventional and novel phytonutrient extraction techniques from various sources and their potential applications. *Journal of Food Measurement and Characterization* **17**:1317-1342.
- Kim J, Ham S, Hong H, Moon C, Im H-I. 2016. Brain Reward Circuits in Morphine Addiction. *Molecules and Cells* **39**:645-653.
- Koç F, Mills S, Strain C, Ross RP, Stanton C. 2020. The public health rationale for increasing dietary fibre: Health benefits with a focus on gut microbiota. *Nutrition Bulletin* **45**:294-308.
- Konvalina P. 2014. *Pěstování vybraných plodin v ekologickém zemědělství*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

- Kostadinović Veličkovska S et al. 2018. Effect of bioactive compounds on antiradical and antimicrobial activity of extracts and cold-pressed edible oils from nutty fruits from Macedonia. *Journal of Food Measurement and Characterization* **12**:2545-2552.
- Kraft MD. 2015. Phosphorus and Calcium. *Nutrition in Clinical Practice* **30**:21-33.
- Kumar S. 2016. Analytical techniques for natural product research. CABI, Wallingford.
- Kurzyna-Szklarek M, Cybulska J, Zdunek A. 2022. Analysis of the chemical composition of natural carbohydrates – An overview of methods. *Food Chemistry* 394 (133466) DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133466.
- Laajimi H, Galli F, Patience GS, Schieppati D. 2022. Experimental methods in chemical engineering: Gas chromatography-GC. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **100**:3123-3144.
- Labanca F, Ovesnà J, Milella L. 2018. Papaver somniferum L. taxonomy, uses and new insight in poppy alkaloid pathways. *Phytochemistry Reviews* **17**:853-871.
- Lančaričová A, Havrlentová M, Muchová D, Bednářová A. 2016. Oil content and fatty acids composition of poppy seeds cultivated in two localities of Slovakia. *Agriculture (Polnohospodárstvo)* **62**:19-27.
- Lefebvre T, Destandau E, Lesellier E. 2021. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A* 1635 (461770) DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461770.
- Ljubicic M, Saric MM, Rumbak I, Baric IC, Komes D, Satalic Z, Guiné RPF. 2017. Knowledge about dietary fibre and its health benefits: A cross-sectional survey of 2536 residents from across Croatia. *Medical Hypotheses* **105**:25-31.
- Lu D, Yang Y, Li Y, Sun C. 2015. Analysis of Tocopherols and Tocotrienols in Pharmaceuticals and Foods: A Critical Review. *Current Pharmaceutical Analysis* **11**:66-78.
- Lushchak VI. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions* **224**:164-175.
- Maeda H, DellaPenna D. 2007. Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Current Opinion in Plant Biology* **10**:260-265.
- Manzoor MF, Ahmad N, Ahmed Z, Siddique R, Zeng X-A, Rahaman A, Muhammad Aadil R, Wahab A. 2019. Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives. *Journal of Food Biochemistry* 43 (e12974) DOI: 10.1111/jfbc.12974.
- McMurry J. 2015. *Organická chemie. Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, Brno.*
- McNair HM, Miller JM, Snow NH. 2019. *Basic Gas Chromatography*. 3rd ed. Wiley, Newark.
- Melo D, Álvarez-Ortí M, Nunes MA, Espírito Santo L, Machado S, Pardo JE, Oliveira MBPP. 2022. Nutritional and Chemical Characterization of Poppy Seeds, Cold-Pressed Oil, and Cake: Poppy Cake as a High-Fibre and High-Protein Ingredient for Novel Food Production. *Foods* 11 (3027) DOI: 10.3390/foods11193027.

- Mène-Saffrané L. 2018. Vitamin E Biosynthesis and Its Regulation in Plants. *Antioxidants* **7**.
- Mène-Saffrané L, DellaPenna D. 2010. Biosynthesis, regulation and functions of tocopherols in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**:301-309.
- Ministerstvo zemědělství. 1997. *Zákony pro lidi*. AION CS, s.r.o.. Available from <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-329#oddil3> (accessed April 2023).
- Moghaddam M, Mehdizadeh L, Sharifi Z. 2020. Macro- and microelement content and health risk assessment of heavy metals in various herbs of Iran. *Environmental Science and Pollution Research* **27**:12320-12331.
- Mohd Mutalip S, Ab-Rahim S, Rajikin M. 2018. Vitamin E as an Antioxidant in Female Reproductive Health. *Antioxidants* **7** (22) DOI: 10.3390/antiox7020022.
- Muhammad A, Akhtar A, Aslam S, Khan RS, Ahmed Z, Khalid N. 2021. Review on physicochemical, medicinal and nutraceutical properties of poppy seeds: a potential functional food ingredient. *Functional Foods in Health and Disease* **11**:522-547.
- Muñoz P, Munné-Bosch S. 2019. Vitamin E in Plants: Biosynthesis, Transport, and Function. *Trends in Plant Science* **24**:1040-1051.
- Novák J, Nováková H. 2018. *Mák jako potravina a droga: makový receptář*. Aventinum, Praha.
- Ozber N, Facchini PJ. 2022. Phloem-specific localization of benzyloisoquinoline alkaloid metabolism in opium poppy. *Journal of Plant Physiology* **271** (153641) DOI: 10.1016/j.jplph.2022.153641.
- Parlament České republiky. 1998. *Fulsoft.cz - Zákony, judikatura a literatura 2023-2024*. Verlag Dashöfer, nakladatelství, spol. s r. o.. Available from https://www.fulsoft.cz/infozdroje.czu.cz/33/167-1998-sb-zakon-o-navykovych-latkach-a-o-zmene-nekterych-dalsich-zakonu-ve-zneni-ucinnem-k-1-2-2022-uniqueidOhwOuzC33qe_hFd_jrpTgsUdoIGuPecZjQcIwo7p7YCD-vMUnwPlw/# (accessed January 2023).
- Peh HY, Tan WSD, Liao W, Wong WSF. 2016. Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacology & Therapeutics* **162**:152-169.
- Picot-Allain C, Mahomoodally MF, Ak G, Zengin G. 2021. Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science* **40**:144-156.
- Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. 2021. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry* **209** (112891) DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112891.
- Pláteník J. 2009. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi* **11**:30-33.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. 2017. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**:592-607.

- Pratiwi R, Noviana E, Fauziati R, Carrão DB, Gandhi FA, Majid MA, Saputri FA. 2021. A Review of Analytical Methods for Codeine Determination. *Molecules* 26 (800) DOI: 10.3390/molecules26040800.
- Presley CC, Lindsley CW. 2018. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Opium, a Historical Perspective. *ACS Chemical Neuroscience* 9:2503-2518.
- Quellette RJ, Rawn JD. 2014. *Organic Chemistry: Structure, Mechanism, and Synthesis*. Elsevier, Saint Louis.
- Sabolová M. 2020. Role máku ve výživě člověka. *Výživa a potraviny* 19:8-12. Available at <https://www.vyzivaspol.cz/wp-content/uploads/2020/02/mak1.pdf> (accessed November 13, 2022).
- Salavert A, Martin L, Antolín F, Zazzo A. 2018. The opium poppy in Europe: exploring its origin and dispersal during the Neolithic. *Antiquity* 92 (e1) DOI: 10.15184/aqy.2018.154.
- Samsidar A, Siddiquee S, Shaarani SM. 2018. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology* 71:188-201.
- Senila L, Neag E, Cadar O, Kovacs MH, Becze A, Senila M. 2020. Chemical, Nutritional and Antioxidant Characteristics of Different Food Seeds. *Applied Sciences* 10 (1589) DOI: 10.3390/app10051589.
- Schieppati D, Patience NA, Campisi S, Patience GS. 2021. Experimental methods in chemical engineering: High performance liquid chromatography-HPLC. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 99:1663-1682.
- Siddhant M, Smita G, Vaishali J, Ashish J. 2018. HPLC – High Performance Liquid Chromatography & UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatographic System – A Review on Modern Liquid Chromatography. *Indo American journal of Pharmaceutical Sciences* 05:7590-7602.
- Sikorski ZE, Kołakowska A. 2011. *Chemical, biological, and functional aspects of food lipids*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Silva S, Costa EM, Calhau C, Morais RM, Pintado ME. 2015. Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57:3072-3083.
- Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology* 87:1157-1180.
- Shahidi F, de Camargo A. 2016. Tocopherols and Tocotrienols in Common and Emerging Dietary Sources: Occurrence, Applications, and Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences* 17 (1745) DOI: 10.3390/ijms17101745.
- Sharopov F, Valiev A, Gulmurodov I, Sobeh M, Satyal P, Wink M. 2018. Alkaloid Content, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Various Parts of *Papaver somniferum*. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 52:459-463.

- Shilpa C, Kumar VPM, Madhukar A. 2018. A BRIEF REVIEW ON MICRONUTRIENTS. INDO AMERICAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES **5**:5482-5486.
- Szewczyk K, Chojnacka A, Górnicka M. 2021. Tocopherols and Tocotrienols—Bioactive Dietary Compounds; What Is Certain, What Is Doubt?. *International Journal of Molecular Sciences* **22** (6222) DOI: 10.3390/ijms22126222.
- Swartz M. 2010. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **33**:1130-1150.
- Šindelková T. 2020. Situační a výhledová zpráva: Olejniný. eAGRI. Ministerstvo zemědělství. Available from https://eagri.cz/public/web/file/682857/SVZ_Olejniný_12_2020.pdf (accessed June 2022).
- Tzanova M, Atanasov V, Yaneva Z, Ivanova D, Dinev T. 2020. Selectivity of Current Extraction Techniques for Flavonoids from Plant Materials. *Processes* **8** (1222) DOI: 10.3390/pr8101222.
- Usman I, Hussain M, Imran A, Afzaal M, Saeed F, Javed M, Afzal A, Ashfaq I, Al Jbawi E, A. Saewan S. 2022. Traditional and innovative approaches for the extraction of bioactive compounds. *International Journal of Food Properties* **25**:1215-1233.
- Uwineza PA, Waśkiewicz A. 2020. Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. *Molecules* **25** (3847) DOI: 10.3390/molecules25173847.
- Vašák J. 2010. Mák. Powerprint, Praha.
- Velíšek J. 2002. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. OSSIS, Tábor.
- Vitha MF. 2016. *Chromatography: Principles and Instrumentation*. Wiley, Newark.
- Waisser K, Palát K. 2001. *Bioorganická chemie*. 2. přeprac. vyd. Karolinum, Praha.
- Walsh G. 2014. *Proteins: biochemistry and biotechnology*. 2e. John Wiley, Chichester, West Sussex.
- Watson L, Dallwitz MJ. 1999. *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval*. University of New Orleans. New Orleans.
- Wilga J, Wasik A, Namiesnik J. 2007. Comparison of extraction techniques of robenidine from poultry feed samples. *Talanta* **73**:812-819.
- Wrolstad RE. 2012. *Food Carbohydrate Chemistry*. 1st edition. Wiley, Hoboken.
- Yaman M, Çatak J, Uğur H, Gürbüz M, Belli İ, Tanyıldız SN, Yıldırım H, Cengiz S, Yavuz BB, Kişmiroğlu C, Özgür B, Yıldız MC. 2021. The bioaccessibility of water-soluble vitamins: A review. *Trends in Food Science & Technology* **109**:552-563.
- Zerbinati C, Caponecchia L, Fiori C, Sebastianelli A, Salacone P, Ciacciarelli M, Iuliano L. 2020. Alpha- and gamma-tocopherol levels in human semen and their potential functional implications. *Andrologia* **52** (e13543) DOI: 10.1111/and.13543.

- Zhang QW, Lin LG, Ye WC. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* 13 (20) DOI: 10.1186/s13020-018-0177-x.
- Zhang S, Chen KY, Zou X. 2021. Carbohydrate-protein interactions: advances and challenges. *Communications in Information and Systems* **21**:147-163.
- Zheng L, Jin J, Shi L, Huang J, Chang M, Wang X, Zhang H, Jin Q. 2020. Gamma tocopherol, its dimmers, and quinones: Past and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **60**:3916-3930.