

BIOSYNTÉZA A IZOLÁCIA RASTLINNÝCH SAPONÍNŮV

**LENKA TMÁKOVÁ, STANISLAV SEKRETÁR,
JARMILA HLÁŠNIKOVÁ, LENKA VRBIKOVÁ
a ŠTEFAN SCHMIDT**

*Oddelenie potravinárskej technológie, Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
lenka.tmakova@stuba.sk*

Došlo 6.3.14, prijaté 24.4.14.

Kľúčové slová: saponíny, extrakcia, izolácia, rastliny, biosyntéza

Obsah

1. Saponíny
2. Biosyntéza
3. Extrakcia a izolácia
 - 3.1. Problémy spojené s extrakciou a izoláciou saponínov
 - 3.2. Materiály
 - 3.3. Metódy
 - 3.3.1. Extrakcia saponínov
 - 3.3.2. Izolácia saponínov
4. Záver

1. Saponíny

Saponíny sú prírodné látky glykozidickej povahy s vlastnosťami mydla. Nakoľko majú lipofilný aglykón (steroid alebo triterpén) a hydrofilnú časť (cukorná zložka), znižujú povrchové napätie a v i minimálnej koncentrácii silno penia^{1–3}. Pomerne často sa vyskytujú v rastlinách a dodnes boli popísané asi v 100 čeľadiach. Ich obsah v rastlinách závisí od mnohých faktorov: kultivaru, veku, štádia vývinu rastliny alebo klimatických a edafických faktorov. Sú široko rozšírené v rastlinách poľnohospodárskeho významu, najmä v strukovinách. Mnohé z týchto strukovín sú základnými prvkami ľudskej stravy⁴.

Biologická úloha saponínov nie je úplne známa. U rastlín sú všeobecne považované za súčasť obranných systémov v dôsledku antimikrobiálnych, fungicídnych, alelopatických, insekticídnych a moluskocídnych a ďalších aktivít^{5–7}.

Saponíny sú tiež účinnými látkami mnohých fytofarmák. Veľká štruktúrna rozmanitosť saponínov podmie-

ňuje množstvo zaujímavých biologických a farmakologických aktivít zistených u jednotlivých saponínov alebo ich zmesí.

Saponinom boli okrem antikarcinogénnych účinkov^{8–10} vedecky dokázané aj antioxidantné vlastnosti^{11–13}, účinky imunologických pomocných látok^{14,15} a taktiež hemolytické účinky^{14,16}.

Použitie vo forme zmesí sa stretáva s problémami štandardizácie v prípravkoch, kým použitie jednotlivých čistých látok je spojené s ťažkosťami izolácie vzhľadom na štruktúrne množstvo a s polaritou podobných saponínov v rámci jedného druhu⁴.

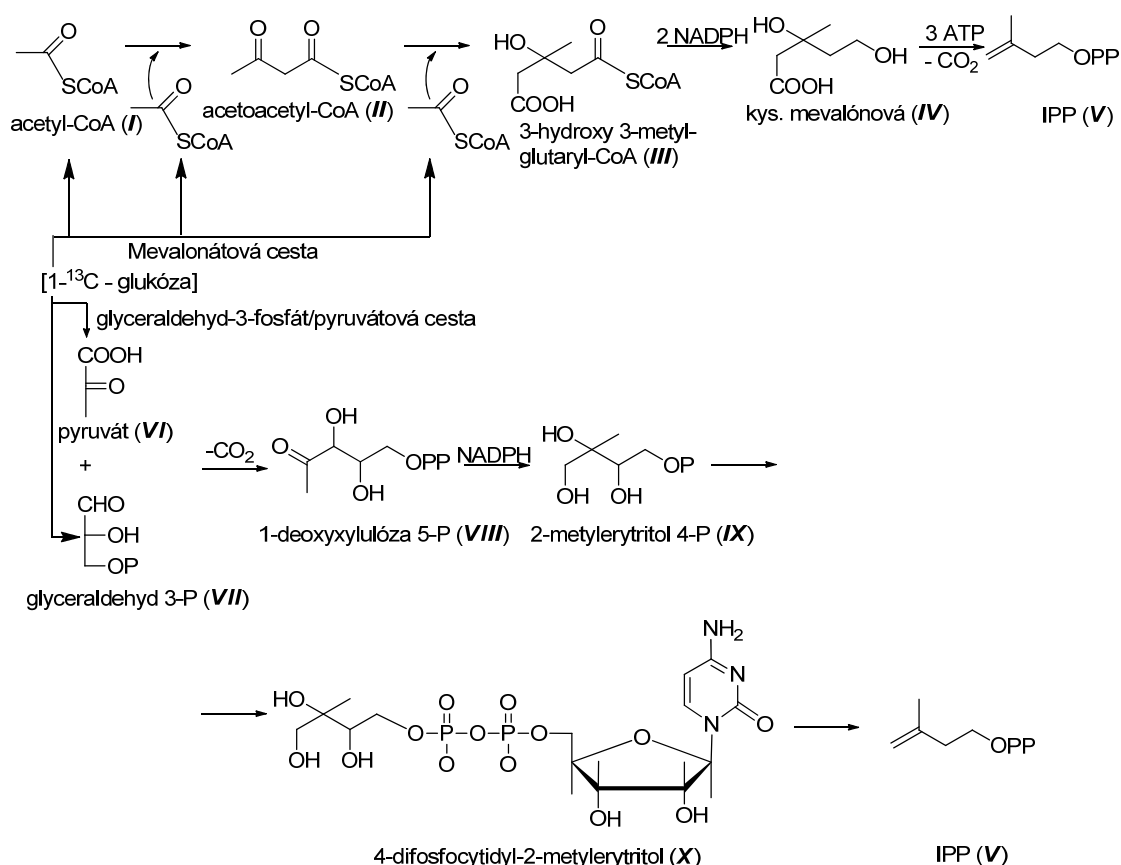
2. Biosyntéza

Základnými cestami vzniku terpenových zlúčenín je mevalonátová cesta a metylerytritolová cesta (obr. 1).

Východiskovou zlúčeninou pre všetky organizmy je molekula glukózy, z ktorej vzniká glyceraldehyd-3-fosfát a následne acetylkoenzým A. Kľúčovým krokom mevalonátovej biosyntetickej cesty je vznik 3-hydroxy-3-metylglutarylkoenzýmu A z troch molekúl acetylkoenzýmu A a jeho redukcia pôsobením 3-hydroxy-3-metylglutarylkoenzým A reduktázy na kyselinu mevalónovú, z ktorej vzniká prvý „izoprenoid“ – izopentenylidifosfát (IPP).

Vznik IPP je možný aj inou biosyntetickou cestou, ktorá nie je, na rozdiel od predchádzajúcej, lokalizovaná v cytozole bunky, ale v plastidoch. Táto tzv. metylerytritolová cesta zahŕňa nasledovné reakcie: adíciu pyruvátu na tiamindifosfát za vzniku hydroxyetyltiamínového derivátu (skrytá C2 jednotka), jeho adíciu na C3 jednotku – glyceraldehyd-3-fosfát za vzniku dihydroxypentyltiamínového derivátu a elimináciu tiamindifosfátu za vzniku prvého C5 medzi produktu 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu, ktorý po redukcii tvorí 2-metylerytritol-4-fosfát. Až v tejto molekule je zašifovaná štruktúra vznikajúceho IPP (cit.^{17–20}).

Účasť izopentenylidifosfátu v biosyntéze izoprenoidov závisí od enzýmovo katalyzovanej reakcie, pri ktorej vzniká pôsobením izopentenylidifosfátizomerázy dimetylalylidifosfát, ktorý pôsobí ako štartér pri polymerizačných reakciách spôsobujúcich predĺženie reťazca. Dimetylalylidifosfát adične reaguje s molekulou izopentenylidifosfátu za vzniku geranylidifosfátu. Pridaním ďalšej IPP jednotky ku geranylidifosfátu vzniká farnezyldifosfát, ktorý následne dimerizuje na skvalén (obr. 2). Skvalén sa oxiduje oxigenázovým systémom na 2,3-epoxid, ktorý cyklizuje na lanosterol prípadne cykloartenol^{4,21}. Iné priestorové poskladanie skvalén-2,3-epoxidu umožňuje aj vznik pentacyklického β -amyrínu (obr. 3). Dôležitou reakciou je premena C30 skeletu lanosterolu na C27 skelet cholesterolu, ktorá zahŕňa stratu troch metylových jednotiek, presun dvojitej väzby a redukciu dvojitej väzby. Poradie týchto zmien

Obr. 1. Biosyntetická dráha vzniku izopentenylidifosfátu z glukózy²⁰

môže byť rôzne v závislosti od organizmov, v ktorých sa uskutočňujú. Bolo izolovaných viacero medziproduktov dokladajúcich rôzne štádia tejto transformácie.

Cholesterol je predchodca veľkej skupiny steroidov, z ktorého sa tvoria steroidné sapogeníny, steroidné alkaloidy, steroidné hormóny, steroidné horčiny, žľožové kyseliny a kardioglykozidy. Cholesterol sa oxiduje na uhlíku C-16, C-22 a C-26. Hydroxylová skupina na C-16 utvára päťčlenný kyslíkatý kruh charakteristický pre furostánové deriváty. Hydroxylová skupina na C-26 môže tvoriť glykozidovú väzbu so sacharidmi alebo utvárať spirostánový kruh.

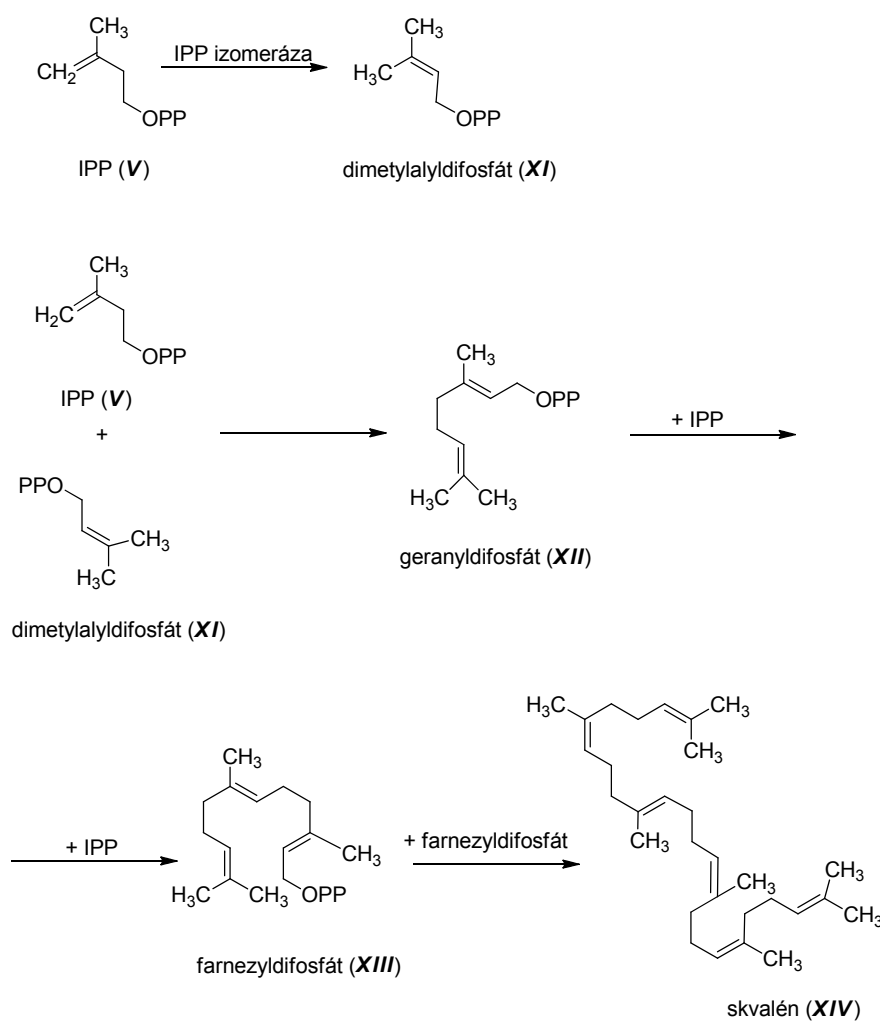
Biosyntéza glykozidov zahŕňa vytvorenie aglykónu a jeho spojenie so sacharidovým zvyškom. Najčastejšie sa na reakciách tohto druhu podieľa uridindifosfoglukóza, ktorá je donorm glukózy v procese transglykozylácie. Transformácia sacharidu pripojeného na nukleotid môže viesť k oxidácii, epimerizácii a ďalším reakciám, čo zapríčiňuje vytvorenie nových sacharidových nukleotidov.

Štruktúrálna pestrosť saponínov sa dáva do súvisu s fylogenetickým vývojom rastlín, resp. vývojom výstavby ich bunkových membrán²².

3. Extrakcia a izolácia

Extrakcia a izolácia saponínov sa považuje za vážny problém, vzhľadom na ich špeciálne štruktúrne znaky. Konvenčné a novšie metódy skúmali metódy extrakcie, ktoré by boli z hľadiska vlastností ekologickejšie, účinnejšie a ekonomickejšie vzhľadom k použitému rozpúšťadlu^{23,24}. Podobne sa diskutuje o tradičných a novších postupoch aj pri metódach izolácie.

Aj keď vo všeobecnosti je ťažké použiť len jednu techniku na izoláciu saponínov, najnovšie znalosti poukazujú na skutočnosť, že vysoko rýchla protiprúdna chromatografia (HSCCC) a detektor rozptylu svetla s odparovaním mobilnej fázy (ELSD) prinášajú separácie s dobrými výsledkami. Zdá sa, že pri použití ELSD absenteje dlhotrvajúci problém detekcie, pretože väčšina saponínov nemá chromofór a tak sa robí iba nešpecifická UV detekcia v rozsahu 200–210 nm.

Obr. 2. Biosyntéza skvalénu⁴

3.1. Problémy spojené s extrakciou a izoláciou saponínov

Extrakcia a izolácia saponínov predstavuje výzvu vzhľadom na štruktúrne rozdiely, vyplývajúce z rôznych substituentov, napr. -OH, -CH₃, alebo -COOH v aglykóne. To je ďalej skomplikované počtom, usporiadaním a orientáciou sacharidových skupín, rovnako ako počtom a druhom cukrových reťazcov pripojených k aglykónu. Všeobecne možno povedať, že saponíny majú vysokú polaritu, nie sú chemicky a tepelne stabilné, sú neprchavé a zvyčajne sa nachádzajú v rastlinách, v nízkych koncentráciách²⁵. Z toho dôvodu je potrebná zvýšená pozornosť pri vykonaní extrakcie (predbežná úprava) použitej pri relatívne miernych podmienkach. Niektoré saponíny sa počas vodnej extrakcie môžu podrobiť enzymatickej hydrolyze, ale môže dôjsť aj k esterifikácii kyslých saponí-

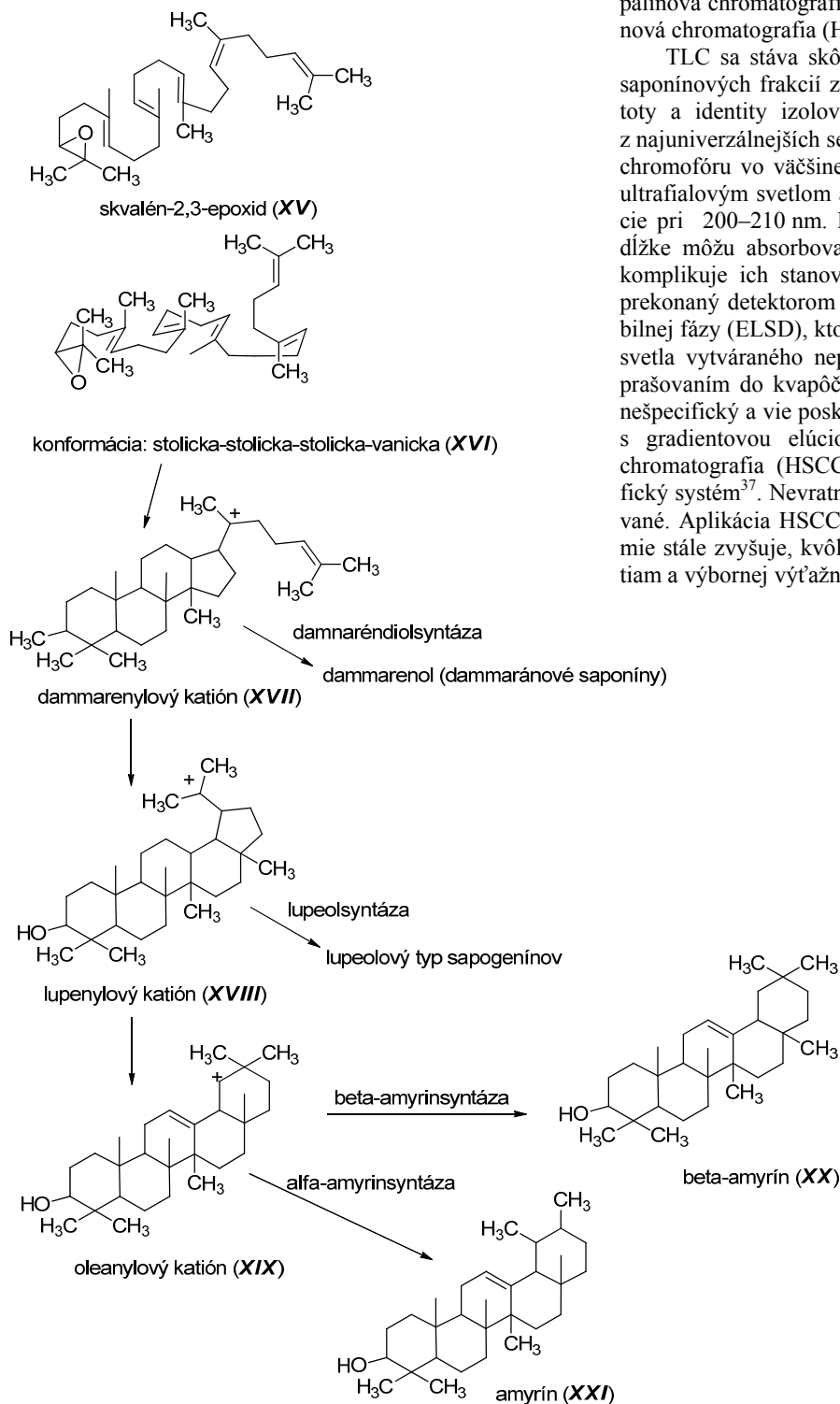
nov pri extrakcii alkoholom. Okrem toho môžu prebiehať aj transacylačné reakcie²⁴.

V minulosti, práca so saponínmi zahrňovala extrakciu rastlinného materiálu za horúca použitím vodných alkoholových roztokov a odparenie alkoholu následnou extrakciou saponínov do butanolu pomocou rozpúšťadla. Problémom pri extrakcii za horúca je to, že nestále formy (napr. acylované formy) sa môžu rozpadáť na zložky, ktorých je viac ako pôvodných saponínov. Okrem toho, extrakcia metanolom môže najmä pri steroidných saponínoch viesť k vzniku metylderivátov, ktoré neboli pôvodne nájdené v rastline²⁶. Na zistenie skutočného zloženia saponínov by bola extrakcia za studena (etanol – voda) lepším riešením. Je potrebné poznamenať, že extrakcia rozpúšťadlom, môže niektoré veľmi polárne saponíny (bidezmozidové a tridezmozidové) ponechať vo vodnej vrstve.

Skutočnosť, že sa saponíny vyskytujú v rastlinách ako zmes štruktúralne podobných zlúčenín s podobnou polaritou, dáva náročnú úlohu na ich oddelenie. Na izoláciu týchto zlúčenín sa zvyčajne používajú viaceré separačné

metódy. Na úplné oddelenie a izoláciu čistých jednotlivých zložiek sa používajú: tenkovrstvová chromatografia (TLC)^{26–32}, kolónová chromatografia (CC), nízkotlaková kvapalinová chromatografia (LPLC), strednetlaková kvapalinová chromatografia (MPLC) a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)^{33–36}.

TLC sa stáva skôr podpornou technikou na analýzu saponínových frakcií z CC. Používa sa na potvrdenie čistoty a identity izolovaných zlúčenín. HPLC je jednou z najuniverzálnejších separačných techník. Avšak absencia chromofóru vo väčšine saponínov brzdí ich detekciu pod ultrafialovým svetlom a umožňuje iba nešpecifické detekcie pri 200–210 nm. Problémom je, že pri tejto vlnovej dĺžke môžu absorbovať aj iné zložky ako saponíny, čo komplikuje ich stanovenie. Tento problém bol nedávno prekonaný detektorom rozptylu svetla s odparovaním mobilnej fázy (ELSD), ktorý umožňuje detekciu rozptýleného svetla vytváraného neprchavými časticami analytov rozprašovaním do kvapôčok. Univerzálny ELSD detektor je nešpecifický a vie poskytnúť stabilnú základnú čiaru spolu s gradientovou elúciou^{26–29}. Vysokorychla protiprúdna chromatografia (HSCCC) má kvapalinový chromatografický systém³⁷. Nevratné adsorpčné účinky sú minimalizované. Aplikácia HSCCC sa v prírodných produktoch chémie stále zvyšuje, kvôli jej vyšším separačným schopnostiam a výbornej výťažnosti^{38–41}.



Obr. 3. Vznik základných typov triterpénových sapogenínov zo skvalénu-2,3-epoxidu⁴

3.2. Materiály

Rastlinný materiál (koreň, stonka-kôra, listy, kvety, plody, cibulky, atď.) sa obvykle suší na vzduchu a potom sa pred extrakciou melie na prášok. Používa sa destilovaná alebo deionizovaná voda a organické rozpúšťadlá, ktoré sú buď analytickej čistoty, alebo destilované v prípade univerzálnych činidiel. Pri extrakcii sa využívajú extrakčné prístroje, prípadne macerácia, extrakcia s využitím mikrovln alebo ultrazvukový kúpeľ. Štandardné chromatografické zariadenia a prístroje sú nevyhnutné pri použití TLC, CC, HSCCC alebo HPLC. Môžu sa použiť aj LC-ELSD, LC-MS, GC-MS, LC-NMR alebo iné kombinované techniky. Na objasnenie štruktúry sa používajú štandardné spektroskopické prístroje.

Na uľahčenie určovania štruktúry sú saponíny hydrolyzované na voľný aglykón a zložku cukrov. Z toho dôvodu je na ovplyvnenie hydrolyzy potrebná kyselina, zásada alebo rôzne enzýmy.

3.3. Metódy

3.3.1. Extrakcia saponínov

Prvý krok pri spracovaní saponínov zahŕňa ich extrakciu z rastlinnej matrice. Extrakčné rozpúšťadlo, extrakčné podmienky (napr. teplota, pH, pomer rozpúšťadla) a vlastnosti mletého materiálu (napr. zloženie a veľkosť častíc) sú hlavnými faktormi, ktoré určujú účinnosť procesu.

Konvenčné metódy extrakcie

Predúprava, ktorá zvyšuje účinnosť extrakcie, zahŕňa sušenie, redukciu veľkosti častíc a zbavenie tuku (použitie lipofilného rozpúšťadla ako je etylacetát alebo *n*-hexán). Zbavenie tuku sa môže uskutočniť aj po extrakcii saponínov. Redukcia veľkosti častíc (mletie) sa zvyčajne vykonáva na zvýšenie účinnosti extrakcie. Efektívnosť separácie sa zlepšuje použitím časti rastliny s najvyššou koncentráciou saponínov.

Extrakcia väčšiny saponínov prebieha na práškovom rastlinnom materiáli (rôzne časti) pomocou metanolu, etanolu, vody alebo vodného alkoholu ako extrakčných roztokov. Nasleduje zbavenie tuku (čím sa odstráni lipofilné látky, zvyčajne s petroléterom a *n*-hexánom), ktoré sa realizuje pred extrakciou, alebo na samom extrakte. Extrakty sa potom rozpustia alebo suspendujú vo vode a pretrepávajú sa s *n*-butanolom nasýteným vodou. Zvyšky *n*-butanolu sa spoja a kvapalina sa odstráni, aby sa získal surový extrakt saponínov, s ktorým možno ďalej pracovať. Niektorí volia vyzrážanie pomocou dietyléru alebo acetónu, iní zaraďujú ešte dialyzačnú fázu pre malé, vo vode rozpustné molekuly, ako sú napríklad cukry^{24,42}.

Novšie metódy extrakcie

Konvenčné metódy extrakcie a purifikácie chemických zložiek z rastlinných pletív predstavujú aj niektoré nevýhody. Vyžadujú si hlavne dlhší extrakčný čas, väčší

rozpúšťací stupeň a majú menšiu účinnosť. Navyše, mnoho prírodných produktov je tepelne nestabilných a môžu sa degradovať počas extrakcie. V porovnaní s tradičnými metódami, novšie metódy majú mnoho výhod, ako je napríklad kratšia doba extrakcie, menej použitého rozpúšťadla a vyššia extrakčná rýchlosť⁴³. Kým tradičné metódy extrakcie sa bežne používajú na výrobu saponínových extraktov, najnovší výskum sa zameriava na technológie, ktoré zlepšujú účinnosť extrakcie a to znížením času extrakcie a spotreby rozpúšťadiel. Extrakcie s využitím mikrovln (MAE)⁴⁴⁻⁴⁹ a ultrazvuku (UAE)⁴⁸⁻⁵⁰ sú relatívne lacné, jednoduché a účinné. Tieto procesy zahŕňajú narušenie vnútornej štruktúry buniek a uvoľnenie intracelulárneho produktu na uľahčenie prenosu hmoty, ktoré je dosiahnuté rýchlym a selektívnym ohrevom suroviny v rozpúšťadle, ktoré je (čiastočne) priepustné pre mikrovlnnú energiu (pri extrakcii MAE)⁴⁴⁻⁴⁷ a pre mechanické účinky akustickej kavitácie (pri extrakcii UAE)⁵⁰.

Laboratórnymi metódami MAE a UAE sa preskúmala extrakcia ginsenosidov zo ženšenu^{45,47}. Maximálny výťažok saponínov sa MAE metódou (7,4 mg/100 mg sušiny ženšenu) dosiahol za 6 min a bol porovnateľný s 8h extrakciou podľa Soxhleta (7,7 mg/100 mg sušiny), 6h extrakciou za tepla s refluxom (6,7 mg/100 mg sušiny) a 2h extrakciou s využitím ultrazvuku (7,6 mg/100 mg sušiny)⁴⁷.

Niektoré príklady dostupných moderných extrakčných metód:

(a) Extrakcia s využitím ultrazvuku: V tejto metóde sa extrakcia vykonáva v ultrazvukovom kúpeli, ktorý umožňuje zmenu amplitúdy a teploty. Pracovná frekvencia je nastavená na hodnotu 33 kHz. Dané množstvo materiálu sa extrahuje 95% EtOH v kónickej banke a vystaví sa určitý čas zvukovým vlnám, pri izbovej teplote. Po extrakcii sa obsah sfiltruje a odparí do sucha.

(b) Superkritická fluidná extrakcia: Používa sa superkritický fluidný extraktor. Vzorky sú extrahované oxidom uhličitým a etanolom, pod pracovným tlakom 25 MPa a teplote 55 °C. Prietok sa často nastavuje na 30 l/h a separačná teplota na 37 °C.

(c) Extrakcia s využitím mikrovln: Použitie mikrovlnnej energie umožňuje rýchle rozpustenie, sušenie a extrakciu organických zlúčenín z komplexných matric. Mikrovlny ohrievajú rozpúšťadlá alebo zmes rozpúšťadiel priamo, priamou interakciou mikrovln s voľnými molekulami vody, prítomnými v žľazách a cievnych systémoch, čo má za následok ďalšie porušenie rastlinných pletív a uvoľnenie zložiek do organického rozpúšťadla. Jeho hlavné výhody sú zníženie objemu rozpúšťadla a spotreby času a tiež zvýšenie priepustnosti vzorky^{44,51-55}. Preto MAE poskytuje alternatívnu metódu ku konvenčným extrakčným metódam v rastlinách. MAE sa vykonáva v uzavretej nádobe prístroja, stroj je vybavený snímačom teploty a má maximálny príkon 800 W.

Prášok zbavený tuku sa zmieša s vybraným rozpúšťadlom (MeOH, EtOH alebo EtOH – H₂O 7:3, *n*-butanol alebo *n*-butanol – voda 1:1) v uzatvorenej fľaštičke a ožaruje sa pri 2450 MHz spravidla 20 min. Teplota rozpúšťadla sa

udržiava pri konštantnej teplote 60 °C za použitia automatického teplotného zariadenia, ponoreného do roztoku obsahujúceho v nádobe. Mikrovlnná energia je obmedzená na 300 W a po ochladení na teplotu miestnosti sa extrakt zhromažďuje a ukladá až do použitia.

3.3.2. Izolácia saponínov

Konvenčné metódy extrakcie rozpúšťadlom, CC a preparatívna TLC, môžu niekedy poskytnúť čisté látky, ale v mnohých prípadoch je zložité izolovať jednotlivé saponíny. Na práškový materiál zbavený tuku sa pôsobí petroléterom a extrahuje sa MeOH v Soxhletovom prístroji po dobu 72 h (cit.^{56,57}) alebo maceráciou s MeOH pri izbovej teplote. Extrakt sa zahusť pod zníženým tlakom a rozdelí sa postupne za použitia *n*-hexánu, etylacetátu (alebo CHCl₃) a *n*-BuOH. *n*-Butanolový rozpustný podiel a vodná časť poskytuje hlavný podiel triterpénových saponínov⁵⁸. Tieto surové extrakty sú použité oddelene na kolónach Diaion HP-20 (polystyrén – divinylbenzénové kopolyméry), ktoré sa premyjú vodou – MeOH v rôznych pomeroch a nakoniec acetónom. Nájdené frakcie s rovnakou štruktúrou sa zmiešajú a oddeľujú na silikagéle stĺpcovou chromatografiou s CHCl₃ – MeOH – H₂O (40:10:1). Nakoniec môžu byť saponínové zlúčeniny oddelené na kolóne HPLC pomocou MeOH – vody ako elučného činidla. Saponíny sa pri TLC detegujú postrekom 10% H₂SO₄ v etanole a Lieberman-Burchardovým činidlom alebo zmesou *p*-anizaldehydu – kyseliny sírovej – kyseliny octovej ľadovej (1:2:100), triterpénové saponíny vytvárajú modrofialové škvrny pri zahrievaní²⁴.

4. Záver

So zvyšujúcim záujmom o životné prostredie sa zvyšuje aj záujem o prírodné povrchovo aktívne látky. Saponíny predstavujú skupinu sekundárnych metabolitov rastlín, ktoré sa v súčasnosti intenzívne študujú z hľadiska obsahových látok a ich účinkov. Je známe, že jedna rastlina môže obsahovať množstvo rôznych saponínov. Veľká štruktúrna rozmanitosť saponínov komplikuje ich izoláciu z rastlinných zdrojov, sú sprevádzané veľmi polárnymi zlúčeninami, ako sú sacharidy a farebné látky (fenolové látky), zriedkavo kryštalizujú a môžu byť hygroskopické.

Na získanie extraktu saponínov sa obvyčajne najviac používa tradičná extrakcia rozpúšťadlom, ale novšie modernejšie štúdie sa zameriavajú na technológie zlepšujúce efektivitu extrakcie znížením extrakčného času a spotrebu rozpúšťadla bez zníženia kvality vzorky.

Práca vznikla za podpory grantov APVV 0850-11 a VEGA 1/0860/13.

LITERATÚRA

- Wang Z.-W., Gu M.-Y., Li G.-Z.: J. Dispersion Sci. Technol. 26, 341 (2005).
- Güclü-Üstündag Ö., Mazza G.: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 47, 231 (2007).
- Hostettmann K., Marston A.: *Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press, Cambridge 1995.
- Mučaji P., Nagy M.: *Saponíny. Výskyt, vlastnosti a možnosti využitia vo farmácii*. Vydavateľstvo Osveťa, Martin 2010.
- Augustin J. M., Kuzina V., Andersen S. V., Bak S.: Phytochemistry 72, 435 (2011).
- Francis G., Kerem Z., Makkar H. P. S., Becker K.: Br. J. Nutr. 88, 587 (2002).
- Sparg S. G., Light M. E., Staden J.: J. Ethnopharmacol. 94, 219 (2004).
- Cheng T.-C., Lu J.-F., Wang J.-S., Lin L.-J., Kuo H.-I., Chen B.-H.: J. Agric. Food Chem. 59, 11319 (2011).
- Man S., Gao W., Zhang Y., Huang L., Liu C.: Fitoterapia 81, 703 (2010).
- Waheed A., Barker J., Barton S. J., Owen C. P., Ahmed S., Carew M. A.: Eur. J. Pharm. Sci. 47, 464 (2012).
- Chan K. W., Khong N. M. H., Iqbal S., Ismail M.: J. Cereal Sci. 57, 480 (2013).
- Dini I., Tenore G. C., Dini A.: Food Chem. 113, 411 (2009).
- Li J., Zu Y.-G., Fu Y.-J., Yang Y.-C., Li S.-M., Li Z.-N., Wink, M.: Innovative Food Sci. Emerging Technol. 11, 637 (2010).
- Sun H., Chen L., Wang J., Wang K., Zhou J.: Int. Immunopharmacol. 11, 2047 (2011).
- Verza S. G., Silveira F., Cibulski S., Kaiser S., Ferreira F., Gosmann G., Roehle P. M., Ortega G. G.: J. Agric. Food Chem. 60, 3113 (2012).
- Hassan S. M., Haq A. U., Byrd J. A., Berhow M. A., Cartwright A. L., Bailey C. A.: Food Chem. 119, 600 (2010).
- Chappell J.: Curr. Opin. Plant Biol. 5, 151 (2002).
- Kirby J., Keasling J.: Annu. Rev. Plant Biol. 60, 335 (2009).
- Trojanowska M. R., Osbourn A. E., Daniels M. J., Threlfall D. R.: Phytochemistry 54, 153 (2000).
- Rohmer M.: Nat. Prod. Rep. 16, 565 (1999).
- Haralampidis K., Trojanowska M., Osbourn A. E.: Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 75, 31 (2002).
- Henry M.: Phytochem. Rev. 4, 89 (2005).
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M.: J. Food Eng. 117, 426 (2013).
- Majinda R. R. T., v knihe: *Natural Products Isolation* (Sarker S. D., Nakar L., ed.), zv. III, kap. 16. Springer, New York 2012.
- Li B., Abliz Z., Tang M., Fu G., Yu S.: J. Chromatogr. A 1101, 53 (2006).
- Oleszek W., Bialy Z.: J. Chromatogr. A 1112, 78 (2006).
- Ha Y. W., Lim S. S., Ha I. J., Na Y.-C., Seo J.-J., Shin

- H., Son S. H., Kim Y. S.: *J. Chromatogr. A* 1151, 37 (2007).
28. Qi X., Ignatova S., Luo G., Liang Q., Jun F. W., Wang Y., Sutherland I.: *J. Chromatogr. A* 1217, 1995 (2010).
 29. Müller A., Ganzera M., Stuppner H.: *J. Chromatogr. A* 1112, 218 (2006).
 30. Adão C. R., Silva B. P., Parente J. P.: *Fitoterapia* 82, 1175 (2011).
 31. Liu P., Lu J.-F., Kang L.-P., Yu H.-S., Zhang L.-J., Song X.-B., Ma B.-P.: *Chin. J. Nat. Med.* 10, 88 (2012).
 32. Patel P. K., Patel M. A., Vyas B. A., Shah D. R., Gandhi T. R.: *J. Ethnopharmacol.* 144, 160 (2012).
 33. Bi L., Tian X., Dou F., Hong L., Tang H., Wang S.: *Fitoterapia* 83, 234 (2012).
 34. He H., Xu J., Xu Y., Zhang C., Wang H., He Y., Wang T., Yuan D.: *J. Ethnopharmacol.* 140, 73 (2012).
 35. Liu Y.-W., Zhu X., Lu Q., Wang J.-Y., Li, W., Wei Y.-Q., Yin X.-X.: *J. Ethnopharmacol.* 139, 194 (2012).
 36. Mostafa A., Sudisha J., El-Sayed M., Ito S.-I., Ikeda T., Yamauchi N., Shigyo M.: *Phytochem. Lett.* 6, 274 (2013).
 37. Ito Y., Conway W. D. (ed.): *High-speed Countercurrent Chromatography*. Wiley, New York 1996.
 38. Du Q., Cheng H., Ito Y.: *J. Chromatogr. A* 921, 331 (2001).
 39. Du Q., Li Z., Ito Y.: *J. Chromatogr. A* 923, 271 (2001).
 40. Du Q., Xia M., Ito Y.: *J. Chromatogr. A* 962, 239 (2002).
 41. Du Q., Cai W., Ito Y.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25, 2515 (2002).
 42. Weng A., Jenett-Siems K., Schmieder P., Bachran D., Bachran C., Görick C., Thakur M., Fuchs H., Melzig M. F.: *J. Chromatogr. B* 878, 713 (2010).
 43. Chen Y., Xie M.-Y., Gong X.-F.: *J. Food Eng.* 81, 162 (2007).
 44. Kwon J.-H., Bélanger J. M. R., Paré J. R. J.: *J. Sci. Food Agric.* 51, 1807 (2003).
 45. Kwon J.-H., Bélanger J. M. R., Paré J. R. J., Yaylayan V. A.: *Food Res. Int.* 36, 491 (2003).
 46. Kwon J.-H., Lee G.-D., Bélanger J. M. R., Paré J. R. J.: *Int. J. Food Sci. Technol.* 38, 615 (2003).
 47. Vongsangnak W., Gua J., Chauvatcharin S., Zhong J.-J.: *Biochem. Eng. J.* 18, 115 (2004).
 48. Wang L., Weller C. L.: *Trends Food Sci. Technol.* 17, 300 (2010).
 49. Cheok C. Y., Salman H. A. K. S., Sulaiman R.: *Food Res. Int.* 59, 16 (2014).
 50. Wu J., Lin L., Chau F.: *Ultrason. Sonochem.* 8, 347 (2001).
 51. Eskilsson C. S., Björklund E.: *J. Chromatogr. A* 902, 227 (2000).
 52. Heng M. Y., Tan S. N., Yong J. W. H., Ong E. S.: *Trends Anal. Chem.* 50, 1 (2013).
 53. Takeuchi T. M., Pereira C. G., Braga M. E. M., Maróstica M. R., Leal P. F., Meireles M. A. A., v knihe: *Extracting Bioactive Compounds for Food Products – Theory and Applications* (Meireles M. A. A., ed.), kap. 4. CRC Press, Boca Raton 2009.
 54. Mandal V., Mandal S. C.: *Biochem. Eng. J.* 50, 63 (2010).
 55. Xu H.-J., Shi X.-W., Ji, X., Du Y.-F., Zhu H., Zhang L.-T.: *Food Chem.* 135, 251 (2012).
 56. Kerem Z., German-Shashoua H., Yarden O.: *J. Sci. Food Agric.* 85, 406 (2005).
 57. Woldemichael G. M., Wink M.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 2327 (2001).
 58. Kuljanabagavad T., Thongphasuk P., Chamulitrat W., Wink M.: *Phytochemistry* 69, 1919 (2008).

L. Tmáková, S. Sekretár, J. Hlásniková, L. Vrbičková, and Š. Schmidt (*Department of Food Science and Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Biosynthesis and Isolation of Plant Saponins**

Saponins are polar compounds occurring in plants; their separation and identification are still problematic. Most of them must be purified by chromatography. The present review deals with theoretical background of biosynthesis and isolation of saponins from plant materials using both conventional and novel techniques. Several extraction techniques have been developed as alternatives to conventional extractions, offering certain advantages.