

O B S A H

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>4</b>
<b>2. CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>6</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>8</b>
3.1. KURKUMÍN A JEHO DERIVÁTY .....	9
3.1.1. Rastlinná droga - <i>Curcuma longa</i> L. ....	9
3.1.2. Všeobecná charakteristika .....	10
3.1.3. Fyzikálne vlastnosti .....	11
3.1.4. Chemická stabilita .....	12
3.1.5. Zlepšenie rozpustnosti vo vode .....	14
3.1.6. Farmakokinetika a toxicita .....	16
3.1.7. Metabolizmus .....	16
3.1.8. Farmakologická aktivita .....	17
3.1.8.1. Antioxidačný účinok .....	17
3.1.8.2. Antiflogistický účinok .....	18
3.1.8.3. Protiinvazívny účinok .....	19
3.1.8.4. Účinky na dýchací, tráviaci a kardiovaskulárny systém .....	19
3.1.8.5. Protirakovinový účinok .....	20
3.1.8.6. Ďalšie účinky .....	22
3.1.9. Kvantifikácia kurkuminoidov .....	23
3.1.10. Extrakcia .....	27
3.2. CHROMATOGRAFICKÉ METÓDY .....	28
3.2.1. Klasifikácia chromatografických metód .....	29
3.2.1.1. Podľa princípu separácie .....	29
3.2.1.2. Podľa typu mobilnej fázy .....	30
3.2.1.3. Podľa spôsobu prevedenia .....	30
3.2.1.4. Podľa vyvíjania chromatogramu .....	31
3.2.1.5. Podľa spôsobu využitia .....	31
3.2.2. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) .....	32
3.2.3. Kvapalinový chromatograf .....	33
3.2.3.1. Chromatografické kolóny .....	35
3.2.3.2. Detektory .....	37
3.3. VALIDÁCIA .....	40
3.3.1. System suitability test .....	40
3.3.1.1. Účinnosť kolóny .....	41
3.3.1.2. Faktor symetrie píku ( $A_s$ ) .....	41
3.3.1.3. Rozlíšenie chromatografických pík ( $R_s$ ) .....	42
3.3.2. Validačné parametre .....	42
3.3.2.1. Linearita .....	42
3.3.2.2. Rozsah .....	42
3.3.2.3. Presnosť .....	42
3.3.2.4. Správnosť .....	43
3.3.2.5. Limit detekcie a kvantifikácie .....	43
3.3.2.6. Selektivita .....	44
3.3.2.7. Robustnosť .....	44
<b>4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>45</b>

4.1. INŠTRUMENTÁLNE VYBAVENIE A POMÔCKY .....	46
4.1.1. Prístrojové vybavenie .....	46
4.1.2. Ďalšie pomôcky .....	46
4.1.3. Chemikálie .....	46
4.2. PRÍPRAVA A ÚPRAVA POUŽÍVANÝCH ROZTOKOV .....	47
4.2.1. Príprava mobilnej fázy .....	47
4.2.2. Príprava pracovných roztokov .....	47
4.2.2.1. Pracovné roztoky k extrakcii .....	47
4.2.2.2. Pracovné roztoky pre linearitu .....	47
4.2.2.3. Pracovné roztoky pre správnosť .....	48
4.2.2.4. Pracovné roztoky pre presnosť a opakovateľnosť nastrieknutia .....	49
4.2.3. Úprava vzoriek pred analýzou .....	49
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>50</b>
5.1. STABILITA .....	51
5.1.1. Stabilita kurkumínu .....	51
5.1.2. Koncentrácia antioxidačnej látky .....	54
5.2. CHROMATOGRAFICKÉ PODMIENKY .....	55
5.2.1. Chromatografický systém .....	55
5.2.2. Vlnová dĺžka detektorov .....	55
5.2.3. Metodika pracovných operácií .....	56
5.2.3.1. Extrakcia kurkuminoidov .....	56
5.2.3.2. Validácia metódy .....	57
5.3. VÝSLEDKY – SPEKTROFOTOMETRICKÝ DETEKTOR .....	59
5.3.1. Extrakcia kurkuminoidov z modelového vzorku .....	59
5.3.2. Linearita .....	61
5.3.3. Správnosť .....	64
5.3.4. Presnosť metódy a opakovateľnosť nastrieknutia .....	65
5.3.5. Limit detekcie a kvantifikácie .....	66
5.3.6. Selektivita .....	66
5.4. VÝSLEDKY – FLUORESCENČNÝ DETEKTOR .....	67
5.4.1. Extrakcia kurkuminoidov z modelového vzorku .....	67
5.4.2. Linearita .....	68
5.4.3. Správnosť .....	72
5.4.4. Presnosť metódy a opakovateľnosť nastrieknutia .....	72
5.4.5. Limit detekcie a kvantifikácie .....	73
5.4.6. Selektivita .....	74
5.5. HODNOTENIE OBSAHU KURKUMINOIDOV V NEZNÁMYCH VZORKÁCH .....	75
<b>6. ZÁVER .....</b>	<b>79</b>
ABSTRAKT .....	82
ABSTRACT .....	83
<b>7. LITERATÚRA .....</b>	<b>84</b>

## **1. ÚVOD**

Pre normálne trávenie a vstrebávanie tukov a vylučovanie niektorých látok (napr. cholesterol, bilirubín) je žlč nesmierne potrebná. Je priebežne produkovaná v pečeni, ale jej uvoľňovaniu do duodena predchádza stimulácia vyprázdenia žlčníku. Žlčník je orgánom, kde je vytvorená žlč uskladňovaná. Prebieha tu tiež zahusťovanie žlče v dôsledku mimoriadne účinnej resorpcie vody. Kontrakciu a následné vyprázdenie žlčníka vyvoláva cholecystokinín – gastrický hormón, ktorý sa uvoľňuje v stene žalúdka a duodena a ovplyvňuje predovšetkým funkciu tráviaceho traktu. Silným podnetom pre uvoľnenie hormónu sú okrem iného tuky v potrave.

Asi 65% suchej hmotnosti žlče tvoria primárne a sekundárne žlčové kyseliny. Primárne vznikajú v pečeni *de novo* z cholesterolu. Sekundárne žlčové kyseliny sú čiastočne dehydroxylované a vracajú sa do pečene enterohepatálnym obehom, potom čo sú resorbované v črevách (aktívne iba z terminálneho ilea). Len malá časť je vylučovaná stolicou.

Slabo alkalické pH je jedným z rozhodujúcich podmienok pre vznik miciel žlčových kyselín. Tieto micely majú hydrofilný obal a hydrofóbne jadro. Hydrofóbne látky vstupujú do micelárneho jadra, avšak sú v dynamickej rovnováhe s okolím. To je dôležité pre vstrebávanie tukov. Keď sa takéto vo vode dobre rozpustné micely dostanú medzi zvlňenia epitelu, lipidy sa z nich uvoľňujú a ľahko prechádzajú cez bunkovú membránu<sup>1</sup>.

Chemické liečivá terapeuticky využívané pri poruchách tvorby žlče nepatria medzi nijak zvlášť často expedované v lekárenskom prostredí. Dodnes pretrváva používanie rôznych čajových zmesí, ktoré sú určené práve pri problémoch gastrointestinálneho traktu. Naznačuje to určitý potenciál prírodných liečiv, ktoré však zväčša nemajú akýsi atest medicíny založenej na dôkazoch. Mnohé z týchto farmaceutických drog je možné získať zberom vo voľnej prírode aj v tuzemských podmienkach. Neplatí to pre drogu *Rhizoma curcumae*, pôvodom z juhovýchodnej Ázie a Indie, tradične užívanej vo svojej domovine kvôli zaujímavým účinkom nielen ako korenie.

Dominantnou na poli kvantifikácie látok je v súčasnosti vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Všetky moderné liekopisy využívajú HPLC k identifikácii, separácii, stanoveniu alebo kontrole čistoty liečiv.

## **2. CIEĽ PRÁCE**

Táto diplomová práca sa zaoberá využitím vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie pri hodnotení obsahu kurkumínových farbív v extrakte.

Najnovší výskum signalizuje, že sú farbivá účinné v prevencii a liečbe celej rady chorôb. Spolu s fyzikálne – chemickými vlastnosťami sa pokúsime spracovať i biologické účinky kurkuminoidov.

Skôr než pristúpime k prevedeniu experimentálnej práce je dôležité relevantné informácie vyhľadať v dostupných vedeckých databázach. Na základe toho potom získané poznatky aplikujeme pri navrhovaní chromatografických podmienok.

Budeme sa snažiť nájsť najvhodnejší spôsob extrakcie kurkumínových farbív, ktoré predstavujú jednu z účinných látok v prípravkoch na zvýšenie tvorby žlče. Pomocou skenovacieho spektrofotometra sa pokúsime zistiť stabilitu kurkumínov pri použití rôznych spôsobov extrakcie.

Spektrum obsahových látok býva v rôznych prípravkoch pomerne široké, takže sa pokúsime deriváty kurkumínu stanoviť čo najselektívnejšie. Následne sa budeme snažiť o optimalizáciu chromatografických podmienok. Na základe dostupných štandardov sa pokúsime metódu zvalidovať. Validácia bude zahŕňať otestovanie niektorých validačných parametrov – linearitu v čo najširšom rozsahu, správnosť, presnosť (opakovateľnosť nastrieknutia), určenie limitu kvantifikácie a limitu detekcie a selektivitu.

### **3. TEORETICKÁ ČASŤ**



### 3.1. Kurkumín a jeho deriváty

Hoci je používanie liečivých rastlín a ich aktívnych zložiek v prevencii a liečbe chorôb založené na skúsenostiach z tradičných medicínálnych systémov, ich použitie v modernej medicíne je limitované nedostatkom vedeckých záznamov. Niekoľko rastlín zaujalo pozornosť vedcov a boli a sú predmetom vedeckého skúmania. Jednou z nich je kurkuma dlhá<sup>2</sup>.

#### 3.1.1. Rastlinná droga - *Curcuma longa* L.

- slov. kurkuma dlhá, čes. kurkuma dlouhá, angl. turmeric
- čeľaď d'umbierovité (*Zingiberaceae*)
- trváca bylina dorastá do 1 m, kultivovaná v juhovýchodnej Ázii (Jáva, južná Čína) a Indii
- *Rhizoma curcumae* (kurkumový podzemok) je vlastnou farmaceutickou drogou<sup>3</sup>

Vykopávajú sa primárne (hlavné) a sekundárne (bočné) podzemky a pretože majú hrubú vrstvu krycieho pletiva, ktorá sťažuje sušenie, obaria sa horúcou vodou. Škrob zmazovanie a droga dostáva typickú rohovitú konzistenciu. Až potom sa sušia. Žlté farbivá vystúpia zo sekrečných buniek do okolitého pletiva.

Drogu tvoria pomerne ťažké a tvrdé kusy veľkosti orecha (primárne podzemky – *Curcuma rotunda*) alebo dlhšie, ako prst hrubé, zvonku žltohnedé a slabo krúžkované, zvnútra sýto pomarančové podzemky voskovitého vzhľadu (sekundárne podzemky – *Curcuma longa*). Droga má slabý pach ako korenie zázvor, chuť korenistú a pálivú. Pri žuvaní farbí sliny na žlté<sup>4</sup>.

Najdôležitejšie obsahové látky predstavujú :

- Farbivá – 3 hlavné diarylheptanoidy: kurkumín, demetoxy- a bis-demetoxykurkumín
- Silica – 9 hlavných seskviterpenoidov (1. chemotyp – deriváty kurkuménu, xantorizol; 2. chemotyp – deriváty turmerónu) a monoterpén gáfor<sup>5</sup>.

Paradoxne však nie je liekopisnou rastlinou *Curcuma longa* L., ale *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. (kurkuma žltokoreňová). Vyznačuje sa vyšším obsahom silice a súčasne nižším zastúpením diarylheptanoidov.

Podľa **ČL 2005** sa požaduje minimálne 50 ml silice v kilograme drogy *Rhizoma curcumae xanthorrhizae*. Ďalej sa požaduje minimálne 1% dicinnamoylmetánových farbív, vyjadrených na obsah kurkumínu, obidve vzťahované na vysušenú drogu<sup>6</sup>.

Izolované farbivá sa používajú ako činidlá v analytickej chémii, na priemyselné farbenie vlny, hodvábu, kože, alebo dreva (upúšťa sa kvôli citlivosti na svetle). Droga tvorí významnú

súčasť viacerých korenín, napr. známeho korenia karí. V potravinárstve je významné použitie farbiva kurkumová žltá (E 100) napr. do cestovín, nálevov, cukroví, chipsov<sup>4</sup>.

### 3.1.2. Všeobecná charakteristika

**Kurkumín:** 1*E*, 6*E* -1,7-bis(4-hydroxy-3-metoxifenyl)-hepta-1,6-dién-3,5-dión  
CAS 458 – 37 – 7

Štruktúra kurkumínu bola prvýkrát opísaná v roku 1815 (Vogel, Pellatier), avšak až takmer o storočie neskôr, v roku 1910 (Lampe et al.), bolo jeho zloženie definitívne potvrdené ako diferuloylmetán. Ďalšie štúdium zlúčeniny viedlo o tri roky neskôr k jej syntéze (Lampe, Milobedzka)<sup>7,8,9</sup>.

Chemicky čistý kurkumín ako substancia dostupný nie je. Je však možné ho nasyntetizovať metódou podľa Pabona (východzie reaktanty acetylacetón, oxid boritý, substituovaný benzaldehyd; v prostredí tributylborátu a n-butylamínu)<sup>10</sup>.

Komerčne dostupné produkty z kurkumy a tiež čistý kurkumín tvoria **zmes** troch prirodzene sa vyskytujúcich kurkuminoidov [Vzorec 1, Vzorec 2]. Priemyselne sa získavajú z olejnej živice materskej rastliny. Po ich vyizolovaní zostáva silicová frakcia, ktorá zatiaľ nemá svoje využitie. Ako sa však ukazuje, vlastní niekoľko farmakologických účinkov (viď kap. 3.1.8.)<sup>11</sup>.

**Kurkumín** je spomedzi kurkuminoidov prítomný v najväčšom množstve. Jeho zastúpenie sa však značne líši [Tab. 1].

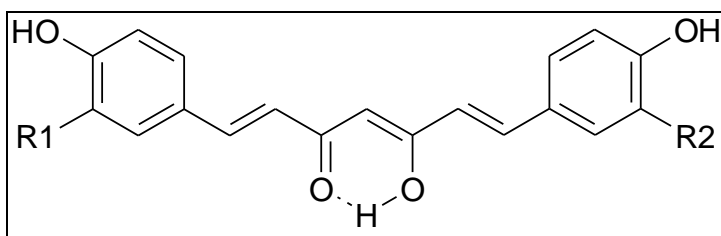
Vzorka	Obsah [%]			
	Kurkumín	Demetoxi-kurkumín	Bis-demetoxi-kurkumín	Suma
Salem	4,14	2,88	2,16	9,18
Mysore	1,06	0,86	0,42	2,34
Erode	4,00	3,36	1,75	9,11
Balasore	5,65	0,83	0,62	7,10

**Tab. 1** – Obsah kurkuminoidov v niektorých sortách kurkumových drog<sup>12</sup>

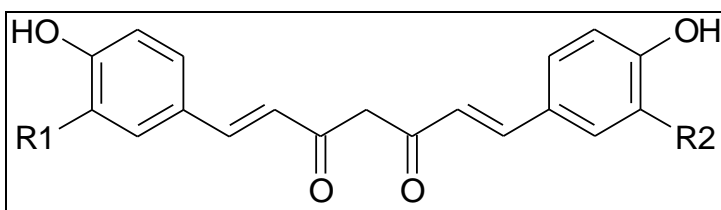
Jednotlivé sorty drogy sa odlišujú aj obsahom zdraviu škodlivých prímiesí. Na základe dostupnej štúdie, ktorá hodnotila obsah ochratoxínu A v indických koreninách, 36% vzoriek kurkumy obsahovalo viac ako 10 µg/kg toxínu. Alarmujúca maximálna hodnota túto hranicu presiahla desaťkrát<sup>13</sup>.

### 3.1.3. Fyzikálne vlastnosti

Na základe definície sa kurkuminoidy zaraďujú medzi tzv. polymetínové farbivá. Jedná sa o zlúčeniny, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú elektrón-donorovú a aj elektrón-akceptorovú skupinu, medzi ktorými je určitý počet metínových skupín ( - CH = )<sup>14</sup>. U kurkuminoidov je akceptorovou skupinou karbonyl a donorovou skupinou hydroxyl. Dochádza ku vzniku konjugovaného systému dvojitých väzieb. V prípade kurkuminoidov je však chromofor potrebné brať komplexnejšie a to kvôli tomu, že sa skladá vždy z dvojice elektrónových donorov a dvojice akceptorov („dvojitý polymetín – merocyanín“). Toto usporiadanie umožňuje vytvárať komplexy s kovmi<sup>15</sup>.



Vzorec 1



Vzorec 2

Kurkuminoidy sú žlto sfarbené kryštalické látky, ktoré sa dobre rozpúšťajú v polárnejších organických rozpúšťadlách (metanol, etanol) a v kyseline octovej. Prakticky nerozpustné sú vo vode a éteri. Vo vodnom prostredí rozpustnosť závisí od pH. Kým v kyslom a neutrálnom prostredí sa nerozpúšťajú, v zásaditom je rozpustný za vzniku sýtočervených solí.

[Tab. 2] uvádza teplotu topenia a molekulovú hmotnosť všetkých troch derivátov. Prípájam i dostupné spektrálne vlastnosti.

	<b>Kurkumín (C)</b>	<b>Demetoxykurkumín (D)</b>	<b>Bis-demetoxykurkumín (B)</b>
R1	-OCH3	-OCH3	-H
R2	-OCH3	-H	-H
Molekulová hmotnosť	368,39	338,36	308,34
Teplota topenia [°C]	180 – 184	170 - 173	223 - 226
$\lambda_{\max}$ (MeOH) [nm]	424	-----	416
$\lambda_{\text{em}}$ (MeOH) [nm]	529	-----	518

**Tab. 2** – Niektoré fyzikálne vlastnosti kurkuminoidov

Emisné maximá sa pri výmene nepolárneho rozpúšťadla za polárnejšie, posúvajú k vyšším vlnovým dĺžkam.

Vyšetrovanie keto-enol tautómie u kurkumínu dokazuje, že s rastúcou polaritou rozpúšťadla stupeň enolizácie lineárne klesá <sup>16</sup>. Výsledky dosiahnuté skúmaním fluorescencie v čase a na NMR naznačujú, že v organických roztokoch je kurkumín prítomný z asi 95% vo forme enolu <sup>17</sup>.

Fluorescencia kurkumínu je rapídne zvýšená v prítomnosti dodecylbenzénsulfonátu sodného (SDBS) a proteínov. Túto vlastnosť je možné využiť u analýzy obsahu bielkovín vo vzorkách <sup>18</sup>. Na posúdenie pomeru lipofilných a hydrofilných vlastností sa používa hodnota logP – rozdeľovací koeficient v systéme oktanol/voda. Na základe jeho hodnoty možno predvídať biologickú dostupnosť. V citovanej práci sa k zisteniu hodnoty logP pristúpilo alternatívnym spôsobom. Porovnaním retenčných časov látok so známou hodnotou logP sa na princípe HPLC na reverzných fázach podarilo určiť hodnotu logP kurkumínu (logP = 2,8) i bis-demetoxykurkumínu (logP = 2,6) <sup>15</sup>.

### 3.1.4. Chemická stabilita

Kurkumín je prakticky nerozpustný v kyslom a neutrálnom pH. Naopak alkalické prostredie vedie k tvorbe rozpustných solí. Disociačné konštanty pK<sub>a</sub> troch kyslých vodíkov boli determinované už dávnejšie a ich hodnoty sú podľa poradia 7,8; 8,5 a 9,0 <sup>20</sup>. Najnovšia štúdia uvádza konštanty kyslosti, ktoré sa od vyššie uvedených hodnôt trochu líšia <sup>19</sup>:

pK <sub>a</sub> 1 = 8,38	kyslý vodík acetylacetonovej skupiny
pK <sub>a</sub> 2 = 9,88	kyslý vodík fenolickej skupiny
pK <sub>a</sub> 3 = 10,51	kyslý vodík fenolickej skupiny

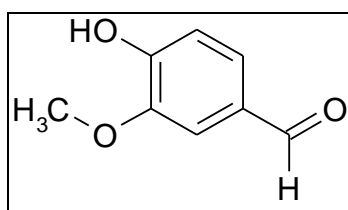
Problémom je, že pri pH vyššom než neutrálnom dochádza v roztoku k rýchlej hydrolytickej degradácii<sup>20,21</sup>. V organických rozpúšťadlách sa navyše kurkumín výrazne rozkladá pri expozícii na svetle<sup>22</sup>.

Zistilo sa, že viac ako 90% kurkumínu sa rýchlo (v priebehu 30 min) rozložilo vo fosfátovom pufre v neutrálne-zásaditých podmienkach (pH = 7,2; teplota 37°C – *in vitro* fyziologické podmienky). Pri tomto pH boli skúšané odstupňované koncentrácie pufru (0,1; 0,05; 0,025 mol/l). Nebol pozorovaný žiadny zjavný katalytický efekt pufru na degradáciu kurkumínu. Podobný rýchly rozklad bol pozorovaný aj pri jeho inkubácii v kultivačnom médiu neobsahujúcom sérum<sup>2</sup>.

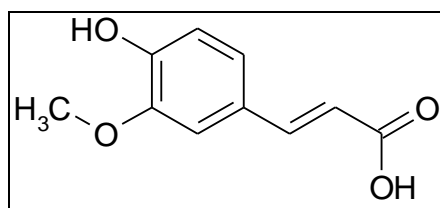
Relatívne zvýšená stabilita v kyslom prostredí sa môže vysvetliť vznikom konjugovanej diénštruktúry. Keď je pH upravené na neutrálne-zásadité, protón sa premiestni z fenolickej skupiny a to vedie k elektrónovým posunom, v dôsledku čoho dôjde k deštrukcii systému.

Popri znížení pH roztoku je stabilita kurkumínu zlepšená aj pridaním antioxidantných látok (glutathion, kyselina askorbová, mikrozomy pečene potkana)<sup>2</sup>.

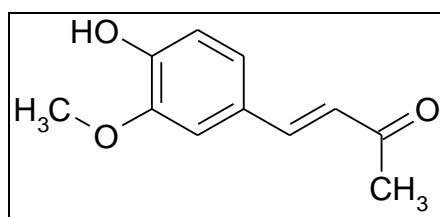
Majoritnými degradačnými produktmi kurkumínu sú *vanilín* [Vzorec 3], *kyselina ferulová* [Vzorec 4] a *feruloylmetán* [Vzorec 5].



Vzorec 3 - vanilín



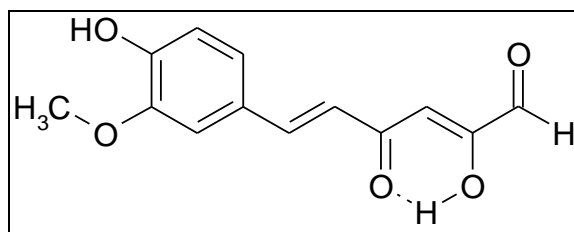
Vzorec 4 – kyselina ferulová



Vzorec 5 – feruloylmetán

Hlavným rozkladným produktom je **vanilín**, ktorý ako sa ukázalo, časom pribúda na úkor inej štruktúry. Táto molekula bola identifikovaná použitím hmotnostného spektrometra.

Z indikovanej molekulovej hmotnosti 248 bol predpovedaný *trans*-6-(4'-hydroxy-3'-metoxyfenyl)-4-dioxo-5-hexenal [Vzorec 6] <sup>2</sup>.



Vzorec 6

Pri hodnotení farmakologického účinku kurkumínu je potrebné vziať do úvahy taktiež biologické efekty zapríčinené degradačnými produktmi – hlavne vanilínom <sup>2</sup>.

U vanilínu, ako prírodného sladidla, bola zistená taktiež inhibícia mutagenézy v bakteriálnych a cicavčích bunkách <sup>23</sup>. Navyše je výkonným scavengerom superoxidového aniónu a tiež hydroxylových radikálov <sup>24</sup>. Bolo by zaujímavé porovnať potenciál kurkumínu a vanilínu v týchto aspektoch.

### 3.1.5. Zlepšenie rozpustnosti vo vode

Boli publikované štúdie zaoberajúce sa zlepšením rozpustnosti kurkumínu vo vode.

V prvej z nich boli k zlepšeniu rozpustnosti kurkumínu použité pomerne bežné farmaceutické excipienty - **cyklodextríny**. Tvorba komplexov rezultovala do nárastu rozpustnosti vo vode pri pH 5 a to najmenej o faktor  $10^4$ . Najvyššiu afinitu kurkumín vykazoval k relatívne hydrofóbnej kavite náhodne metylovaného  $\beta$ -cyklodextrínu. Dosiadnutá koncentrácia kurkumínu činila 290  $\mu\text{g/ml}$ . Najnižšia afinita bola zaznamenaná ku katiónickej kavite hydroxytrimetylamóniumpropyl- $\beta$ -cyklodextrínu.

V rovnakej štúdií bola skúmaná hydrolytická stabilita kurkumínových komplexov v slabo alkalickom prostredí. Výsledkom bolo výrazné zlepšenie stability u všetkých typov cyklodextrínov a to už aj v najnižších koncentráciách (viac ako 50-násobný nárast stability pri 0,1% koncentrácii cyklodextrínu, pri vyšších koncentráciách vyše 500-násobný) . Predsa len lepšie výsledky boli zistené u neutrálnych cyklodextrínov než u nabitých. Ako najstabilnejší sa pri pH 8 ukázal kurkumín v 5% hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextríne. Ďalej bol študovaný pri pH 5, pričom zo zistenej rýchlostnej konštanty sa určil polčas takmer 20 dní.

Pre úplnosť bola u pripravených cyklodextrínových komplexov skúmaná aj stabilita voči pôsobeniu svetla. Tvorba inklúzných komplexov však viedla k zvýšenej svetelnej degradácii kurkumínu. A to jednak oproti roztoku kurkumínu v metanole ( $t_{1/2} = 133$  min), ako aj oproti systému etanol – fosfátový pufor pH 5 v pomere 40:60 ( $t_{1/2} = 70$  min). Fotodegradácia stúpala v rade :  $\gamma$ -cyklodextrín <  $\alpha$ -cyklodextrín <  $\beta$ -cyklodextrín ( $t_{1/2} = 20$  až 29 min v závislosti na substituentoch)<sup>25</sup>.

Druhá experimentálna práca sa zaoberala solubilizáciou lipofilného kurkumínu vo vode pomocou tradične používaných povrchovo aktívnych látok – skrátene surfaktantov. Metodika štúdie je analogická ako pri použití cyklodextrínov. Solubilizácia kurkumínu do miciel za mierne kyslých podmienok (pH 5) viedla ku vzostupu koncentrácie kurkumínu aspoň o faktor  $10^5$ . Najvyššia afinita bola k neutrálnej micelle Triton-X 100 (TX-100), nasledovaná kationickou tetradecyltrimetylamónium-bromidu (TTAB) a aniónickou laurylsíranu sodného (SDS). Maximálna koncentrácia bola získaná u surfaktantu TX-100 pri desaťnásobku kritickej micelárnej koncentrácie (CMC), a sice 740  $\mu\text{g/ml}$ . Roztoky s väčším obsahom miciel sa neskúmali. Skutočnosť, že afinita ku kationickej TTAB bola takmer 5-násobne väčšia než k opačne nabitej SDS (odlišnosť oproti cyklodextrínom) sa dáva na vrub zvýšenej afinity k amínom. Vysvetlenie afinity k TX-100 je jednoduché – lipofilná molekula bez náboja ľahšie prejde cez „stenu“ micely.

Hydrolytická stabilita, zisťovaná pri pH 8, bola pri CMC skoro 1800-krát vyššia, ak bol použitý TX-100 alebo SDS (kationické micely stabilizovali 3-krát menej). Zaujímavý je fakt, že obe micely ochránili kurkumín pred zmenou farby zo žltej (nedisociovaný) na červenú (deprotonovaný, nad hodnotou  $\text{pK}_a$ ). Sýtočervené sfarbenie u kationickej micely TTAB svedčí o nižšom protektívnom pôsobení. Výsledky pri pH 5 však obdobné neboli. TX-100 mal menej stabilizujúci efekt než SDS i TTAB. Dokonca po poldruha mesiaci bol kurkumín v SDS bez zmien. Vypočítané polčasy hydrolýzy pri pH 5 (TTAB;  $t_{1/2} = 2665$  h) pochopiteľne vysoko presahujú polčasy hydrolýzy pri pH 8 (TTAB;  $t_{1/2} = 60$  h).

Fotostabilita po solubilizácii kurkumínu do miciel mala destabilizujúci účinok v porovnaní s bežnými alkoholickými roztokmi. Ďaleko najhoršie na tom bol kurkumín v neutrálnej micelle ( $t_{1/2} = 4,4$  min, pri pH 5 aj pH 8), ktorého stabilitné parametre sú porovnateľné s aprotickými rozpúšťadlami (chloroform, acetonitril). Najvhodnejší v kyslom prostredí je SDS. Najvhodnejší v alkalickom potom cetylpyridinium-bromid. Výsledky však v tomto prípade nie sú dostatočne jednoznačné<sup>26</sup>.

Dosiahnuté výsledky ukazujú, že použitie micel bolo pri solubilizácii i pri stabilite voči hydrolýze efektívnejšie. Naopak nespornou výhodou cyklodextrínov je lepšia akceptácia ľudským organizmom.

### 3.1.6. Farmakokinetika a toxicita

Merania hladín v krvnej plazme ukázali, že kurkumín je z tráviaceho traktu **veľmi slabo absorbovaný**. Po perorálnom podaní sa 75 % kurkumínu vylučuje stolicou. V moči je prítomný iba v stopovom množstve <sup>27</sup>.

Pre ilustráciu: podanie dávok 8 g/deň vyústilo do priemernej koncentrácie 652,5 ng/ml v krvi. Vyššie denné dávky neboli pacientmi akceptované z dôvodu príliš veľkého objemu <sup>28,29</sup>.

Jedna z možností ako zvýšiť systémovú absorpciu spočíva v príprave fosfolipidového komplexu. Experiment na potkanoch poskytol očividné zvýšenie maximálnej plazmatickej koncentrácie (po podaní 300 mg komplexu vzišla plazmatická koncentrácia 601 ng/ml). Došlo aj k predĺženiu doby do jej dosiahnutia <sup>30</sup>. K redukcii potrebného množstva látky by mohlo prispieť aj vytvorenie komplexov s povidonom <sup>31</sup>. Ako zaujímavosť uvádzam spolupodanie piperínu – známeho inhibítora glukuronidácie v čreve a pečeni. Pri podaní 20 mg piperínu bol u ľudí overený nárast biodostupnosti kurkumínu až o 2000% <sup>32</sup>.

Výbornú biodostupnosť je taktiež možné dosiahnuť vhodnou úpravou liekovej formy. Jedným zo spôsobov je príprava mikrosfér – častíc s predĺženou dobou uvoľňovania. Výhodné je použitie biodegradabilných nosičov (sérový albumín, chitosan). In vitro testy naznačujú bifázický model uvoľňovania. Po tzv. burst efekte (rýchle uvoľnenie z povrchu) nasledovalo niekoľkodňové uvoľnenie „depotnej dávky“. Ideálne využitie sa ponúka pri lokálnych zápaloch (kolitída, Crohnova choroba) a pri rakovine hrubého čreva. Predĺžená liberácia však vedie aj k zlepšeniu absorpcie látky do krvného obehu <sup>33</sup>.

Toxicita kurkumínu nebola preukázaná ani vo vysokých dávkach. Na zvieratách neboli badateľné **žiadne toxické účinky** v dávkach vyšších než 5 g/kg <sup>27</sup>. Aj pri 3-mesačnom perorálnom užívaní chorými pacientmi v dávkach 8 g/deň sa kurkumín ukázal ako neškodný <sup>28</sup>.

### 3.1.7. Metabolizmus

Po perorálnom podaní kurkuminoïdov sú dominantnými metabolitmi v plazme glukuronidy a glukuronid-sulfáty. Maximálna hladina konjugátov je dosiahnutá hodinu po podaní <sup>34</sup>. Kurkumín podstupuje rozsiahlu metabolickú konjugáciu a redukcii v tráviacom trakte človeka i potkana. Biotransformácia u človeka je po všetkých stránkach výraznejšia.



V tráviacom trakte ľudí bola preukázaná 18-násobne vyššia redukcia látky než u potkana. Ku glukuronidácii dochádza v mikrozómoch čreva i pečene. Vznik sulfátov a redukčných metabolitov je zase lokalizovaný do cytosolu buniek oboch orgánov. Na základe týchto zistení je teda potrebné racionálne interpretovať experimentálne výsledky, ktoré boli dosiahnuté na zvieratách <sup>35</sup>.

Metabolizmus kurkumínoidov zistený na pečeni potkana objasnil, že vznikajú stabilné redukčné metabolity. Prítomné boli hlavne vo forme glukuronidov, z menšej časti i sulfátov. Najviac zastúpené nezávisle na pohlaví sú hexahydrokurkumínoidy. Výskyt oktahydro- a tetrahydroderivátov sa ukazuje byť závislý od pohlavia. Výsledky enzymatickej hydrolýzy naznačujú, že metabolicky najodolnejším kurkumínoidom je bis-demetoxylkurkumín <sup>36</sup>.

Nie je vylúčené, že by práve redukčné metabolity mohli byť sľubným chemopreventívnym agens v humánnej terapii. Perorálne podaný **tetrahydrokurkumín** (THyC) je oveľa lepšie absorbovaný. Indukuje antioxidantné enzýmy na báze glutathionu minimálne tak dobre ako samotný kurkumín. Táto bezfarebná látka sa tak ukazuje byť zodpovednou za biologické efekty kurkumínu <sup>37</sup>. Avšak pretrvávajú dohady, ktorá molekula je účinnejšia, pretože sú publikované štúdie s opačnými závermi <sup>38,39</sup>.

Štúdium metabolizmu kurkumínu teda otvára nový pohľad na farmakologickú aktivitu v organizme. Naskýta sa priamo možnosť, aby boli pri ďalších klinických testoch použité stabilné hydrogenované deriváty <sup>36</sup>.

### **3.1.8. Farmakologická aktivita**

Kurkumínoidy sú zodpovedné za biologickú aktivitu kurkumy dlhšej. Predmetom vedeckých výskumov sa kurkuma stala až v 70. rokoch 20. storočia <sup>40</sup>. Dnes je známe, že kurkumín vykazuje pestrú škálu farmakologických účinkov. Medicínsky sa využíva k zvyšovaniu tvorby žlče v pečeni a tiež ako stimulátor vyprázdňovania žlčníka. Používa sa aj pri liečbe rakoviny, artritídy, diabetu, Crohnovej choroby, určitých kardiovaskulárnych chorobách, osteoporóze, Alzheimerovej chorobe, psoriáze a i. <sup>41</sup> Použitie kurkumínu v prevencii vzniku rakoviny a v liečbe HIV infekcií je v poslednom desaťročí predmetom intenzívneho laboratórneho a klinického výskumu <sup>42</sup>.

#### **3.1.8.1. Antioxidačný účinok**

Kurkumín je významným **antioxidantom**. Pôsobí ako vychytávač reaktívneho atomárneho kyslíka a následne sa znižuje produkcia mediátorov zápalu (prostaglandíny, leukotriény) <sup>2</sup>. Obsahuje dva elektrofilné nenasýtené karbonyly, ktoré ľahko interagujú s nukleofilnými molekulami napr. s glutathionom (koenzým pri antioxidantných reakciách) <sup>43</sup>. V prítomnosti

polynenasýtených lipidov sa kurkumín v polohe 3' oxidatívne spája s nukleofilným radikálom lipidu. Následnou intramolekulárnou reakciou vzniká stabilná tricyklická štruktúra <sup>44</sup>.

Zásadne sa uplatňuje aj chelatačná schopnosť fenolických skupín. Vysokou mierou je potom obmedzená Fentonova reakcia t.j. oxidácia kyselín a alkoholov katalyzovaná Fe<sup>II</sup>. Fenolické skupiny sú tiež schopné reagovať s radikálmi. Vznikajúce radikály kurkumínu sa následne deaktivujú radikálovou dimerizáciou. Pravdepodobne však dimér nie je terminálnym produktom, ale má uchovanú schopnosť chytať voľné radikály, pretože je zachovaná jedna z pôvodných fenolických skupín <sup>45</sup>.

Poznáme už aj pravdepodobný mechanizmus reakcie so superoxidovým radikálom. Pri nižších koncentráciách superoxidu zapríčiňuje kurkumín jeho dismutáciu (O<sub>2</sub><sup>-</sup> sa oxiduje i redukuje). Kurkumín sám o sebe tu nepodlieha žiadnym zmenám. Pri koncentráciách vyšších kurkumín so superoxidom jednoducho zreaguje <sup>46</sup>.

### 3.1.8.2. Antiflogistický účinok

*Curcuma longa* je vo svojej domovine tradične používaná pri rôznych typoch zápalov. Účinok je sprostredkovaný inhibíciou exprese cyklooxygenázy (COX-2), čo následne vedie k inhibícii tvorby TNF- $\alpha$  a PGE<sub>2</sub>. Z trojice kurkuminoidov vykazuje najlepší antiflogistický efekt práve samotný kurkumín <sup>47</sup>.

Ďalším zo zaujímavých biologických terčov je 5-lipooxygenáza (LOX) – **klúčový enzým biosyntézy leukotriénov**. Pripomeňme iba, že sa spolu s cyklooxygenázou aktivuje pri zápalových reakciách. Kurkumín je vedľa kvercetínu a eugenolu veľmi účinným inhibítorom LOX. Navyše je účinok týchto fenolických látok podobný syntetickým molekulám – napr. fenidonu. Je to iba ďalší dôkaz, naznačujúci potenciál prírodných látok, kurkumínu zvlášť <sup>48</sup>.

Klasickým spôsobom použitia potravinových doplnkov s obsahom podzemku alebo extraktu kurkumy je liečba a prevencia **artritídy**. Podanie extraktu kurkumy pred vypuknutím artritídy malo za následok potlačenie akútnej i chronickej fázy zápalu. Liečba započatá týždeň po vzniku zápalu už však nemala žiaden klinický efekt na opuchnutý kĺb. Ako výrazne účinnejší sa vyhodnotil čistý kurkumín. *In vitro* pre-screening antiflogistického účinku na PGE<sub>2</sub> totiž silno favorizoval extrakt kurkumy než samotné kurkuminoidy. Výsledky nasvedčujú, že vedľajšie látky obsiahnuté v extrakte môžu mať inhibičný vplyv na antiartritický účinok kurkuminoidov <sup>49</sup>.

Nedávno bola klinicky vyšetovaná skupina pacientov so symptómami **peptického vredu**. U prvej skupiny s potvrdeným vredom bola úspešnosť zhojenia 48% po 4 týždňoch liečby, resp. 76% po 12 týždňoch. U druhej skupiny sa prítomnosť vredu nepotvrdila, ale trpeli

gastrointestinálnym dyskomfortom a bolesťou. 14 dní od začiatku podávania extraktu kurkumy už mohli jesť normálnu stravu a bolesť zmizla. Medzitým už bol aj objasnený mechanizmus, ktorý spočíva v špecifickej kompetitívnej blokáde H<sub>2</sub>-histamínového receptora. Kurkumín však sám o sebe blokádu H<sub>2</sub>-receptora nevyvoláva. Sekrécii žalúdočnej kyseliny spôsobuje tiež aktivácia β-adrenoreceptoru, ale táto cesta ovplyvnená nebola<sup>50,51</sup>.

### 3.1.8.3. Protiinvazívny účinok

Je potvrdená **antibakteriálna aktivita** voči G-pozitívnym (MIC = 50 ppm) i G-negatívnym (MIC = 200 ppm) baktériam (vrátane *Pseudomonas aeruginosa*) u silicovej časti extraktu. Dominantnou molekulou v najaktívnejšej frakcii je ar-turmerón, ktorý pravdepodobne veľkou mierou prispieva k účinku<sup>11</sup>.

Výnimočný potenciál kurkumínu bol demonštrovaný aj na schopnosti inhibície HIV-1 integrázy – enzýmu zodpovedného za vstup virovej DNA do chromozómu (IC<sub>50</sub> = 40 μmol/l). Za **antivirotickú aktivitu** by mohli zodpovedať intramolekulárne interakcie, ktoré spôsobujú vzájomné priblíženie hydroxylov na benzénovom jadre<sup>52</sup>. Pôsobivý je aj efekt na ľudský papilomavirus (HPV), ktorý po infikovaní ústí do vzniku karcinómu. Kurkumín indukuje apoptózu napadnutých buniek a selektívne zabraňuje expresii onkogénov vírusu. Uplatňujú sa však aj ostatné down-regulačné mechanizmy, uvedené v kap. 3.1.8.5<sup>53</sup>.

Xantorizol obsiahnutý v silici druhu *Curcuma xanthorrhiza* vykazuje značnú **fungicídnu** aktivitu voči kvasinkám (*Candida* spp.)<sup>54</sup>. **Antiprotozoárna aktivita** je už tiež vedecky zdokumentovaná, najnovšie proti leishmanióze, ktorej chemoterapia dodnes spočíva v podávaní vysoko jedovatých látok s mnohými vedľajšími účinkami. Kurkumín bol pri liečení leishmaniózy (*Leishmania amazonensis*) efektívnejší než referenčný pentamidín<sup>55</sup>.

Kurkuma sa v Thajsku dodnes používa pri uštipnutiach nebezpečnou kobrou<sup>3</sup>. Prišlo sa na to, že vlastnou aktívnou látkou je seskviterpénická zložka silice ar-turmerón. Experimentálne sa potvrdilo, že dokáže neutralizovať hemorhagický hadí jed druhu *Bothrops jararaca* a tiež smrteľný jed hada *Crotalus durissus terrificus*<sup>56</sup>. To, že domorodí ľudia siahajú po kurkume aj pri **helmintózach** alebo pri hmyzích štipancoch, už potom vôbec neprekvapuje<sup>57</sup>.

### 3.1.8.4. Účinky na dýchací, tráviaci a kardiovaskulárny systém

Bola publikovaná štúdia informujúca o pozitívnom vplyve kurkumy na defektný ΔF<sub>508</sub> CFTR (regulátor transmembránového prenosu u cystickej fibrózy) u myši s cystickou fibrózou<sup>58</sup>. V snahe potvrdiť a rozšíriť tieto nádejné predklinické testy však **nebol pozorovaný** žiaden významný vzostup membránového transportu. A to pri použití rôznych vzoriek kurkumínu a rôznych dávkovacích režimov (vrátane režimu z predchádzajúcej štúdie)<sup>59</sup>.

Veľmi zaujímavá štúdia sa zaoberala oprávnenosťou tradičného používania kurkumy pri **črevných a dýchacích problémoch**, ako sú diarrhoea, nadúvanie, kašeľ, astma a pod. Z tohto dôvodu boli skúmané spazmolytické, bronchorelaxačné a kardiovaskulárne účinky (zmeny tlaku krvi, účinky na srdce). Extrakt i vlastný kurkumín disponujú dobrým **spazmolytickým** účinkom založeným hlavne na blokáde  $\text{Ca}^{2+}$ -kanálov. Potvrdila sa aj účinná **relaxácia bronchov**, v prípade kurkumínu selektívna antagonizovaním  $\text{Ca}^{2+}$ -kanálov. Kvôli tejto schopnosti má kurkumín iba vazodilatačný účinok na cievy. Na odlišný typ týchto kanálov v srdci nepôsobí vôbec. U extraktu sa hypotenzívny účinok neprejavil, no vlastne to iba potvrdzuje fakt, že v ľudovej medicíne sa **ako antihypertenzívum neužíva** <sup>60</sup>.

V inej práci porovnávali účinok rôznych typov extraktov. Metanolický extrakt z drogy obsahoval kurkuminoidy so seskviterpénmi a ukázal výraznú **relaxáciu hladkej svaloviny ciev** nezávislú na NO (oxid dusnatý - relaxačný faktor endotelu ciev). Intenzita skúmaného účinku bola u oboch skupín látok približne rovnaká. Presne opačne sa v pokuse správali vodné extrakty obsahujúce hlavne polysacharidy. Na základe dosiahnutých výsledkov sa formulovalo tvrdenie, že obsah farbív a silice priamou úmerou vplýva na cievnu relaxáciu <sup>61</sup>.

Farbivá majú pozoruhodný účinok aj na cholesterolovú homeostázu. Niekoľkonásobne zvyšujú expresiu LDL-receptoru, ktorý vychytáva nadbytočný „zlý“ cholesterol z obehu. Akurát iba pri vysokých dávkach môžu slabo zvýšiť biosyntézu cholesterolu kvôli aktivácii HMG Co-A reductázy a farnezyldifosfátsyntházy. Tieto zmeny na úrovni expresie mRNA sú v súlade s proklamovaným **hypcholesterolemickým pôsobením** kurkumínu <sup>62</sup>.

Dvestomiligramový denný príjem extraktu znižuje obsah lipidových peroxidov v krvi, vrátane peroxidov HDL a LDL. Poznatok má úzky súvis s antioxidantným účinkom kurkumínu. Je známe, že ak je LDL oxidovaný, tak je veľmi agresívny k cievnej stene, čo vedie k arterioskleróze. Protektívny efekt kurkumy je cenný i z dôvodu, že dochádza k úspore prirodzeného antioxidantu tokoferolu. V klinickom teste sa podarilo znížiť peroxidy HDL a LDL o 25 – 50%. Nasvedčuje to aj použitiu **u diabetických pacientov**, kde by mohlo dôjsť k zlepšeniu metabolického syndrómu.

Pozitívny účinok na krvný obeh nie je závislý iba na antioxidantnom účinku. Hydroalkoholický extrakt znižuje patologicky zvýšenú **plazmatickú hladinu fibrinogénu**, ktorý hraje kľúčovú úlohu pri vzniku trombu so všetkými známymi dôsledkami <sup>63,64,65,66</sup>.

### **3.1.8.5. Protirakovinový účinok**

Asi najrozsiahljší výskum prebieha v súčasnosti ohľadom **protirakovinového pôsobenia**. Za posledné roky sa zistilo, že kurkumín má enormný potenciál v prevencii a terapii nádorov.

Tento potenciál vyplýva z jeho schopnosti potláčať proliferáciu veľkej škály nádorových markerov. **Za kľúčové** sa považuje:

- down-regulácia transkripčných faktorov (významný sa ukazuje byť NF-kappa B) <sup>67</sup>
- down-regulácia expresie enzýmov (napr. COX-2, NOS, LOX)
- down-regulácia rôznych cytokínov a chemokínov (TNF, Il-1, Il-6 a iné)
- regulácia receptorov pre rastové faktory (EGFR a pod.)
- inhibícia aktivity kináz (zodpovedajú za prenos fosfátov medzi molekulami) <sup>41,68</sup>

Podanie kurkumínu myšiam inokulovaným bunkami hepatocelulárneho karcinómu viedlo k významnému poklesu tumorom indukovanej expresie COX-2 a sérového VEGF (vazoendoteliálny rastový faktor). Nasvedčuje to, že kurkumín môže **inhibovať angiogénu** v nádore redukciou markerov angiogézy (COX-2, VEGF) <sup>69</sup>.

Účinok kurkumínu *in vivo* bol potvrdený down-reguláciou expresie proangiogenných génov. Redukcia počtu EAT (Ehrlich ascites tumor cells) *in vitro* bez toho, aby bol kurkumín cytotoxický, je pripisovaná **indukcii apoptózy** <sup>70</sup>. V dôsledku poklesu funkcie COX-2, ktorá je v nádorových bunkách viac exprimovaná, dochádza k inhibícii tvorby PGE<sub>2</sub>. Kvôli tomuto mechanizmu dochádza ku zvýšenej apoptóze rakovinových buniek <sup>71</sup>. Kurkumín ako netoxická látka by preto mohol byť vyvinutý k liečbe chorôb, spojených s nadmernou vaskularizáciou <sup>70</sup>.

To, že pálivé karí korenie je účinné proti nádorovým chorobám, dokazuje i výskum uskutočnený v Indii, kde výskyt štyroch bežných druhov rakoviny (hrubého čreva, prsníka, prostaty a pľúc) je 10-krát nižší než napríklad v USA <sup>72</sup>.

1. Asi pred desaťročím bol pozorovaný efekt kurkuminoïdov na proliferáciu MCF-7 buniek **nádoru prsníka**. Najlepší inhibičný účinok na rakovinové bunky preukázal demetoxykurkumín nasledovaný kurkumínom a bis-demetoxykurkumínom <sup>73</sup>.
2. Glutathion-S-transferáza prítomná v **ľudskom melanóme** bola najúčinnjšie inhibovaná práve kurkumínom. Narozdiel od iných  $\alpha,\beta$ -nenasýtených karbonylových zlúčenín inaktiváciu vyvolala nevratná kovalentná modifikácia enzýmu <sup>74</sup>.
3. Protirakovinová aktivita bola demonštrovaná aj na zvieracom modeli s **rakovinou mliečnej žľazy**. Ožiareními kontrolnej skupiny potkanov sa u viac ako 70% vyskytlo zhubné bujnenie. V skupine s príjmom kurkumínu bola incidencia tumoru iba 18%. Predĺžila sa aj doba do vzniku tumoru počas radiácie a zmenšil sa jeho objem <sup>75</sup>.
4. Kurkumínové analógy vykazujú pozoruhodne vysoké antagonistické pôsobenie na androgénny receptor buniek nádorovej línie v **prostate** <sup>76</sup>.

5. Kurkumín pravdepodobne vykazuje nekompetitívny inhibičný účinok na N-acetyltransferázu (NAT) v ľudských **nádorových bunkách hrubého čreva**. Po pridaní acetylovaného 2-aminofluorenu sa v prítomnosti NAT a kurkumínu znížila tvorba DNA-adduktov s aminofluorenem. Výsledky tiež signalizujú výrazné zníženie nádorovej expresie génu pre tento enzým<sup>77</sup>. Užívajúc denne 3,6g kurkumínu boli dosiahnuté dostatočné farmakologické hladiny v **hrubom čreve**. Pri takomto dávkovaní sa znížila hladinu oxidatívneho DNA-adduktu viac ako dvojnásobne<sup>78</sup>.

Podobne ladená štúdia sa zaoberala dosiahnutím efektívnych hladín v **pečeni** po perorálnom podaní. Biodostupnosť však bola veľmi nízka – plazmatická hladina v periférnej krvi dosiahla sotva nanomolárne koncentrácie. Zatiaľ čo kurkumín sa v pečeni nájsť nepodarilo, boli produkty jeho redukcie detekované v stopových množstvách. Po perorálnom podaní tak pravdepodobne nie je možné dosiahnuť v organizme efektívne koncentrácie<sup>79</sup>.

Početné štúdie hovoria o tom, že selektívne COX-2 inhibítory by mohli predchádzať kolorektálnemu karcinómu, ktorý je dnes jednou z hlavných príčin smrti v onkológii. Súčasný výskum naznačujú, že ich dlhodobé podávanie je limitované kardiovaskulárnou toxicitou. Kurkumín **synergicky potencuje účinok celecoxibu** ako selektívneho COX-2 inhibítora, čím umožňuje podanie bežných alebo nižších dávok liečiva<sup>80</sup>.

Okrem schopnosti potláčať rast nádoru bola zistená i opačná reakcia. V prítomnosti cytochrómu P450 (CYP2D6) došlo ku vzniku O-demetylkurkumínu, ktorý môže kvôli oxidatívnym zmenám DNA vykazovať **karcinogenný potenciál**<sup>81</sup>.

### 3.1.8.6. Ďalšie účinky

Perspektívne vyzerá využitie účinkov kurkumínu aj v liečbe **Alzheimerovej choroby**. Znižuje oxidatívne poškodenie buniek, tvorbu senilných plakov a supresívne pôsobí na špecifické zápalové faktory<sup>82</sup>. Pre účinok sa zdá byť dôležitá prítomnosť  $\beta$ -diketónového zoskupenia. Na základe ED<sub>50</sub> jednotlivých látok sa usudzuje, že vyšší účinok má molekula neobsahujúca na benzénovom kruhu metoxy-skupinu<sup>83</sup>. Aktuálne výskumy poukazujú na zásadný vplyv regulačného hému na cytopatologiu pri Alzheimerovej chorobe. Viazaním na „premnžený“ peptid  $\beta$ -amyloidu vzniká *circulus vitiosus*, spojený s peroxidázovou aktivitou komplexu, s nárastom syntézy hému, zvýšeným uptakeom železa a depléciou neurotransmisie. Kurkumín inhibuje práve peroxidázovu aktivitu komplexu  $\beta$ -amyloid – hém (pravdepodobne chelataciou Fe<sup>II</sup> a Cu<sup>I</sup>), čo v mozgu významne znižuje oxidatívny stres<sup>84</sup>.

Zistený bol aj destabilizačný účinok metabolitu kurkumínu – kyseliny ferulovej. V závislosti na dávke inhibuje *in vitro* vznik fibrilov  $\beta$ -amyloidu z dielčích peptidov. Okrem toho rozrušuje preformované fibrily. Jej celková aktivita je slabšia ako u kurkumínu, ale napriek tomu by mohla byť kľúčovou molekulou pre terapiu (lepšia stabilita i rozpustnosť) <sup>85</sup>.

Inhibícia aktivity kinázy je tiež spájaná s **antipsoriatickým efektom** kurkumy. V klinickom teste bol k nepriamo pôsobiacemu kalcipotriolu pridružený kurkumín. Aktivita enzýmu bola upravená na normálnu hodnotu. Popritom znižuje tvorbu rastových faktorov pre keratocyty, čím sa antipsoriatický efekt ešte viac vystupňuje <sup>86,87</sup>. Beztak široké spektrum dopĺňa **protektívne pôsobenie** pri alkoholových hepatopatiách a následných zápaloch <sup>88</sup>.

Zaujímavý prospešný účinok kurkumínu sa zistil aj spolupodaním s ritonavírom – inhibítorom HIV-proteázy. Jeho aplikácia je spájaná s mnohými vaskulárnymi dysfunkciami. Kurkumín však efektívne zabránil vzniku všetkých observovaných zmien <sup>89</sup>.

Substancia má ďalej potenciál ako **farmaceutická pomocná látka** (excipient). Je známe, že kurkumín má stabilizujúci účinok na určité fotolabilné liečivá v roztoku (cefalosporíny) a v topických prípravkoch <sup>90,91</sup>. V mäkkých želatinových tobkách môže byť tiež použitý k ochrane fotosenzitívnych liečiv <sup>92</sup>.

### 3.1.9. Kvantifikácia kurkuminoidov

#### Stanovenie obsahu podľa ČL 2005

0,100 g práškovanej drogy sa zmieša so 60 ml kyseliny octovej ľadovej R a zahrieva sa 60 min vo vodnom kúpeli pri 90°C. Potom sa pridajú 2,0 g kyseliny boritej R a 2,0 g kyseliny šťavelovej R a zahrieva sa ďalších 10 min vo vodnom kúpeli pri 90°C. Po ochladení sa zriedi kyselinou octovou ľadovou R na 100,0 ml a pretrepe sa. 5,0 ml čírej supernatantnej tekutiny sa zriedi kyselinou octovou ľadovou R na 50,0 ml. Meria sa absorbanca pri 530 nm za použitia kyseliny octovej ľadovej R ako kontrolnej tekutiny.

**Obsah dicinnamoylmetánových derivátov** v percentách, vyjadrené ako kurkumín, sa vypočíta podľa vzorca :

$$\frac{A \cdot 0,426}{m}$$

A      absorbanca skúšaného roztoku pri 530 nm

m      hmotnosť skúšanej drogy v gramech

Špecifická absorbanca má hodnotu 2350 <sup>6</sup>.

### Stanovenie obsahu v dostupnej literatúre

V súčasnosti obsahujú vedecké databázy celú radu metód na kvantifikáciu kurkuminoidov. Väčšina z nich sú metódy **spektrofotometrické**, ktoré však vyjadrujú sumu prítomných kurkumínových farbív.

Citlivo a rýchlo je suma kurkumínov stanovená **spektrofluorometrickou metódou**. Rozpustením neznámej vzorky v acetóne sa získa číry roztok. Ožiarí sa pri 424 nm a meria sa žlto-zelená fluorescencia pri 504 nm. Výhodou je časovo nenáročná príprava kalibračnej krivky a okolnosť, že stačí kontrolovať teplotu a nie je dôležitá úprava pH<sup>93</sup>.

Historicky prvá separácia kurkuminoidov z drogy metódou **HPLC** bola popísaná roku 1983. Autori použili amínovú stacionárnu fázu. Mobilná fáza bola tvorená zmesou etanol – voda (94:4). Prítomnosť viac ako 10% vody v mobilnej fáze kolónu deaktivovalo<sup>94</sup>.

Dnes je analýza jednotlivých kurkuminoidov pomocou HPLC možná s výhodou hlavne na reverzných C<sub>18</sub> fázach. Voda ako zložka mobilnej fázy má pH upravené okolo hodnoty 3. Z troch bežne používaných rozpúšťadiel u RP-HPLC sa prednostne používa **acetonitril**. Nahradením acetonitrilu za tetrahydrofurán dochádza k zmene poradia elúcie jednotlivých kurkuminoidov. Metanol ako hlavné rozpúšťadlo neposkytuje dostatočnú selektivitu. S rozvojom gradientovej elúcie vzišlo aj niekoľko rôznych gradientov, ktoré sa ukazujú byť optimálne pri analýze zložitejších matric.

Pri detekcii hmotnostným spektrometrom sa dá acetonitril výhodne použiť so slabým vodným roztokom kyseliny octovej. Táto detekcia je otázna pri použití mobilnej fázy zloženej z octanu amónneho, kyseliny octovej a acetonitrilu, pretože anorganické ióny môžu kontaminovať iónový zdroj v detektore. MS detekcia nie je možná pri použití neprchavej mobilnej fázy s obsahom kyseliny citrónovej a hydroxidu sodného<sup>95,96</sup>. Príklady niektorých metód sú uvedené v [Tab. 3].

Najnovšie je popísaná metóda kombinujúca kvapalinovú chromatografiu s elektrosprejovou ionizáciou a tandemovým hmotnostným spektrometrom (**LC-ESI-MS/MS**). V spojení s DAD vynikajúco poslúžila k identifikácii 19 diarylheptanoidov (12 z nich nebolo nikdy predtým z rastliny opísaných, vrátane šiestich pre kurkumu špecifických)<sup>97</sup>. Rovnaký analytický systém bol validovaný pre kvantifikáciu kurkumínu a THyC v plazme potkana. Prednosťou je minimálny čas detekcie (5 min) a linearita s korelačnými koeficientami na úrovni 0,996, overená v rozsahu nepatrných koncentrácií 0,5 – 500 ng/ml<sup>30</sup>.

K dispozícii je aj ucelená práca, ktorej zámerom bolo sledovať fragmentáciu troch hlavných kurkuminoidov. Látky podstúpili pozitívnu i negatívnu ionizáciu elektrosprejom a boli



analyzované v iónovej pasci od viacerých výrobcov. Nechýba ani analýza v iónovej cyklotrónovej rezonancii (FTICR). Navyše je tu možné nájsť i NMR analýzu kurkumínu<sup>98</sup>.

Nedávno bola popísaná a validovaná metóda stanovenia kurkumových farbív použitím **HP-TLC**. Jej nespornou výhodou je možnosť naniest' niekoľko vzoriek naraz. Optimálne vlastnosti vykazovala vyvíjacia zmes chloroform – metanol (925:75), pričom retardačný faktor  $R_F = 0,48$ . Po vysušení silikagélovej vrstvy bola prevedená denzitometrická analýza použitím absorbančie pri 430 nm. Štatistická analýza preukázala, že je metóda dostatočne presná, reprodukovateľná a robustná. Limit detekcie odpovedá 8 ng kurkumínu v spote<sup>99</sup>.

Známa je aj priama vysokocitlivá **fluorimetrická metóda** k stanoveniu kurkumínu v potravinách. Využíva sa rapídny nárast fluorescence kurkumínu v micelárnych systémoch. Použitie zmesi SDBS (2 mmol/l) a CTAB (1 mmol/l) v octanovom pufre (pH 4) a etanolu ako rozpúšťadla dosiahlo 55-násobný nárast fluorescence oproti prostému vodnému roztoku. Emisné maximum sa posunulo na kratšiu vlnovú dĺžku 494 nm. Stanovenie poskytuje najnižší limit detekcie zo všetkých dostupných metód – 17 pg/ml<sup>100</sup>.

V posledných rokoch sa pri analýze hlavne biologických vzoriek častejšie preferuje **kapilárna elektroforéza**. Skĺbuje výhodu potreby nepatrného množstva vzorky, vysokej účinnosti separácie a krátkej doby analýzy (v dostupných prácach od 3 do 7 minút). V závislosti na použitom pufrovacom systéme a teplote sa pri zavedení separačného napätia menia elektroosmotické vlastnosti elektrolytu. Determinácia kurkuminoidov v moči sa zdá byť optimálna v prítomnosti 15 mmol/l boritanového pufru, upraveného na pH 10,8 s 10%-podielom metanolu ako organického modifikátora, pri zavedení 25 kV napätia a teplote 30°C. Použitie DAD detektora umožňuje pri analýze potvrdiť nielen retenčný čas, ale aj spektrum. Najcitlivejšie stanovenie poskytuje snímanie pri 262 nm. Limit detekcie je na úrovni 200 ng/ml<sup>101</sup>. Analogickou možnosťou je použitie fosfátového pufru (tiež upraveného na alkalické pH) napríklad so selektívnou ampérometrickou detekciou<sup>102</sup>. Prípadne je k dispozícii ešte pár vedeckých prác, popisujúcich stanovenie kurkumínu kapilárnou elektroforézou<sup>103</sup>.

Ako zaujímavosť a pre úplnosť doplním separáciu a stanovenie kurkuminoidov mikroemulznou elektrokinetickou chromatografiou (**MEEKC**). Metóda poskytla rozlíšenie základnej línie medzi jednotlivými píkmi  $R_S = 2,4$ . Celkový čas analýzy neprekročil 18min<sup>104</sup>.

Kolóna	Mobilná fáza	Prietok [ml/min]	Detekcia	Vnútrotný štandard	Pozn.	Citácia
Nova-Pak RP C18, 150×3,9mm	THF : 1%CitricAcid, pH 3 (KOH) <b>(40:60)</b>	1,0	VIS 420nm			96
Symmetry Shield RP C18, 150×3,9mm	THF : 1%CitricAcid, pH 3 (KOH) <b>(50:50)</b>	1,0	VIS 430nm	<i>β-estradiol</i>		105
Devolosil ODS-HG-5, 250×4,6mm	ACN : 0,1%TrifluoroacAcid <b>(50:50)</b>	1,0	VIS 430nm			37
Nova-Pak RP C18, 150×3,9mm	ACN : 0,5%CitricAcid, pH3 (KOH) <b>(40:60)</b>	1,2	UV 350nm			26
Supelcosil LC-18, 250×4,6mm	ACN : 1%CitricAcid, pH 3 (NaOH dilut.) <b>(inic. 50:50)</b>	1,0	VIS 423nm		GRADIENT	95
Luna RP C18, 250×4,6mm	ACN : 0,005% AcAcid <b>(70:30)</b>	0,2	MS/MS	<i>salbutamol</i>		30
Hydro-RP C18, 250×4,6mm	0,05% (v/v) AcAcid v ACN : 0,05% (v/v) AcAcid <b>(50:50)</b>	1,0	VIS 425nm			49
μ-Bondapack RP C18, 300×4,6mm	ACN : 2%AcAcid : MeOH	1,0	VIS 425nm		GRADIENT	12
Symmetry Shield RP C18, 150×3,9mm	ACN : MeOH : H <sub>2</sub> O : AcAcid <b>(41:23:36:1)</b>	1,0	UV 262 nm	<i>17β-estradiol-acetát</i>		106
Kromasil C18, 250×4,6mm	ACN : Fosfátový pufor, pH 4,4 <b>(60:40)</b>	0,8	VIS 428nm			2
Supelcosil LC-18, 250×4,6mm	ACN : 50mM NH <sub>4</sub> OAc + 5% AcAcid <b>(inic. 50:50)</b>	1,0	MS	<i>4-fluoro-4'-hydroxybenzofenón</i>	GRADIENT	95
Symmetry Shield RP C18, 150×3,9mm	ACN : 0,01% NH <sub>4</sub> OAc, pH 4,5 <b>(inic. 5:95)</b>	1,0	VIS 420nm	<i>Tetra-(m-hydrofenyl)-chlorin</i>	GRADIENT	110

**Tab. 3** – Stanovenie kurkuminoidov metódou HPLC dostupné v literatúre

### 3.1.10. Extrakcia

Najjednoduchším spôsobom je extrakcia organickými rozpúšťadlami. Prakticky výhradne sa využíva rozpustnosť kurkumínu v **metanole** (eventuálne v etanole), ktorým sa dá z drogy získať kvantitatívne. Odstránenie lipofilných zložiek silice je možné pred vlastnou extrakciou previesť n-hexánom, čím zlepšíme selektivitu<sup>12</sup>.

O poznanie zložitejšie je extrahovať kurkumín z plazmy. 78% extrakčná účinnosť bola dosiahnutá liquid-liquid extrakciou chloroformom pri použití vnútorného štandardu ( $\beta$ -17-estradiol-acetát). Trochu nižší výťažok použitím etyl-acetátu vyrovnáva jednoduchšie laboratórne prevedenie (etyl-acetát tvorí hornú vrstvu)<sup>105</sup>. V inej štúdií bola ako extrakčné činidlo použitá zmes etyl-acetát – metanol (95:5). Extrakcia kurkumínu z plazmy mala 88% účinnosť, účinnosť z moči bola 70% – obe vzhľadom na rovnaký vnútorný štandard<sup>106</sup>. Použitím metylénchloridu k extrakcii kurkuminoïdov z moču bola dosiahnutá uspokojivá výťažnosť 92%<sup>101</sup>.

Na zvieracom modeli bola zistená extrakčná efektivita aj pre konjugáty kurkumínu. Pri použití zmesi etyl-acetát – izopropanol (90:10) dosahovala iba 50%<sup>35</sup>.

Až na posledný prípad sa jednalo o jednoduchú extrakciu; je prípadne možné zvýšiť vyextrahovaný podiel viacnásobným opakovaním procedúry.

Pomerne častým spôsobom, vyžadujúcim však vyššie náklady, je extrakcia nadkritickým plynom (SFE). S výhodou sa využíva CO<sub>2</sub>, lebo popri chemických výhodách je dôležité, že ako nadkritický plyn existuje už pri 31,2°C a zvýšenom tlaku. Známe je použitie k dekofeinizácii čaju a kávy, či k redukcii obsahu nikotínu v tabaku. Preto je orientácia k SFE hlavne v potravinárstve. Vlastnú extrakciu ovplyvňujú tlak, teplota, prietok, veľkosť častíc a prítomnosť kosolventu. K extrakcii kurkumínu je kosolvent nutný, lebo nie je veľmi rozpustný v CO<sub>2</sub>. Optimalizované parametre k extrakcii sú nasledovné: 25 MPa, 55°C, prietok 3,5 l/min, kosolvent 30% etanol<sup>107,108,109</sup>.

Modernou technikou je extrakcia na pevnej fáze (SPE). V dostupných zdrojoch som však našiel len ručne pripravenú „kolónku“ – bežná striekačka naplnená tributylfosfátovou živicom, ako filtračná membrána poslúžili 2 krúžky netkanej textílie. Extrahovalo sa z petrolejového roztoku, pričom sa kurkumín zachytil v adsorbente. Následne bol eluovaný do vodného roztoku použitím roztoku hydroxidu sodného 0,1 mol/l. Metóda bola validovaná pre následnú kvantifikáciu pomocou kapilárnej elektroforézy. Ako kompromis vysokého výťažku a vysokého koncentračného faktoru, bol zvolený elučný objem 0,3 ml (85% recovery, koncentračný faktor 8,5)<sup>102</sup>.

Zaujímavou alternatívou získania kvantitatívneho výťažku je použitie metódy „foam fractionation“. Je založená na prebublávaní vodného roztoku analytu inertným plynom za tvorby stabilnej peny. Tá vzniká, ak analyt (extrakt) obsahuje povrchovo aktívne látky (v prípade ich absencie môžeme umelo pridať saponín). Na hydrofóbny povrch bubliniek sa adsorbujú nepolárne látky, ktoré sa potom koncentrujú v pene. V prípade kurkuminoidov sa overila použiteľnosť hlavne v malých koncentráciách (5 µg/ml). Proces je inštrumentálne jednoduchý, ekologicky šetrný a selektívny k nepolárnym látkam. Je však pomerne žiadúce optimalizovať určité parametre (prietok plynu, objem roztoku) <sup>110</sup>.

### **3.2. Chromatografické metódy**

Prvé práce zaoberajúce sa chromatografiou v dnešnom pojatí uverejnil ruský botanik M. S. Cvet ešte v roku 1903. Termín **chromatografia** (gr. *chroma* = farba; gr. *grafos* = písať) zaviedol práve on, pretože jeho práce boli zamerané na delenie rastlinných farbív (chlorofylov a karotenoidov). Tento objav ostal dlhé roky stranou záujmu vedcov a k zásadnému využitiu v analytickej chémii došlo až od prelomu 60. a 70. rokov. Dovtedy používané separačné metódy boli postupne zatlačené do úzadia, pričom napr. v analýze plynov znamenali prevrat v prístrojovej a experimentálnej technike.

Chromatografické metódy sú vysoko účinné separačné metódy, slúžiace k oddeleniu analyzovaných zložiek zo zmesi a zároveň k ich kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze. Vynikajú nielen pri analýzach jednoduchších, ale aj zložitejších zmesí látok, kde sa iné analytické metódy, hlavne spektrofotometrické, nedajú principiálne použiť. Keďže drvivá väčšina prírodných ako aj iných látok (viď napr. liekové formy – liečivá, rozkladné produkty, pomocné látky, zbytky rozpúšťadiel) má charakter zmesi, majú chromatografické metódy v analýze prvoradý význam.

Existuje niekoľko spôsobov ako tieto metódy rozdeliť, ale všetky majú spoločný **mechanizmus separácie**. Týmto princípom je mnohonásobné ustáľovanie rovnováhy medzi dvoma vzájomne nemiesiteľnými fázami. Stacionárna (nepohyblivá) fáza má schopnosť rôznou mierou zadržiavať zložky analyzovanej zmesi, zatiaľ čo mobilná (pohyblivá) fáza ich následne zo stacionárnej fázy vymýva a odnáša v smere toku rôznou rýchlosťou. Stacionárna fáza môže byť tuhá alebo kvapalná, mobilnou fázou je buď kvapalina alebo nosný plyn. Vlastná separácia látok závisí na ich retencii v chromatografickom systéme – táto **retencia**

**pôsobí selektívne**, t.j. jedna látka je brzdená viac, iná menej. Rýchlosť postupu látky závisí na sorpčnej rovnováhe, t.j. čím sa látka pevnejšie adsorbuje na stacionárnej fáze, tým dlhšie trvá než sa látka eluuje a preto v chromatografickom systéme (kolóne) postupuje pomalšie. K separácii teda dochádza na základe rôznej afinity delených látok k stacionárnej a mobilnej fáze<sup>111,112,113</sup>.

### 3.2.1. Klasifikácia chromatografických metód

- 3.2.1.1. Podľa princípu separácie**
- adsorpčná chromatografia
  - rozdeľovacia chromatografia
  - ionexová chromatografia
  - gelová chromatografia
  - afinitná chromatografia

#### Adsorpčná chromatografia

Podstatou separácie je odlišná schopnosť adsorpcie zložiek zmesi na aktívny povrch pevnej fázy. Medzi mechanizmy adsorpcie patria elektrostatické sily (interakcie ión-ión, ión-dipól, dipól-dipól), vodíkové väzby, indukované elektrostatické sily, tzv. Londonove a Debyove (interakcie ión-indukovaný dipól, dipól-indukovaný dipól, indukovaný dipól-indukovaný dipól), hydrofóbne interakcie apod. Najčastejšie používané adsorbenty sú silikagél, oxid hlinitý, kremelina, novým trendom sú oxidy zirkónia a titánu.

#### Rozdeľovacia chromatografia

Pri tejto chromatografii sa látky separujú medzi stacionárnou a mobilnou fázou v dôsledku rozdielnych rozdeľovacích koeficientov medzi látkou a stacionárnou, resp. mobilnou fázou.

#### Ionexová chromatografia

Jej realizácia je možná iba ako kvapalinová chromatografia. Stacionárnou fázou sú tzv. iónomeniče (katexy, anexy). Jedná sa o látky, ktoré v styku s vodným prostredím bobtnajú a sú schopné uvoľniť elektrolytickou disociáciou ióny. Uvoľniteľné ióny môžu byť nahradené inými iónmi prítomnými v roztoku. Podstatou separácie je teda rozdielná afinita látok (väčšinou v iónovej forme) k iónovýmenným funkčným skupinám iónomeniča. Priebeh reakcie je vratný. Závisí nielen na afinite iónov k meniču, ale aj na ich koncentrácii.

#### Gelová chromatografia

V princípe sa jedná o kvapalinovú chromatografiu, pričom jednotlivé látky sa separujú na základe veľkosti molekúl. Molekuly látky sú unášané mobilnou fázou cez kolónu, ktorá je naplnená poréznym materiálom. Používajú sa dextransové gely (Sephadex®) tvoriace

priestorovú sieť. Pri prechode kolónou sú menšie molekuly zadržované v póroch, zatiaľ čo väčšie molekuly do pórov vniknúť nedokážu a prechádzajú cez chromatografický systém bez retencie. Voľbou správnej veľkosti pórov v dextráne teda môžeme látky veľmi účinne rozdeliť.

#### Afinitná chromatografia

Je to špeciálna metóda izolácie biologicky aktívnych látok. Preto sa často označuje ako bioafinitná chromatografia. Metóda je založená na špecifických interakciách charakteristických pre biologické a biochemické procesy. Interakcie prebiehajú medzi dvojicou látok s vysokou selektivitou. Tieto dvojice sú napr. enzým-inhibítor, protilátka-antigén, hormón-receptor. Na vhodnom nosiči (agaróza) je kovalentnou väzbou naviazaná jedna z látok uvedených dvojíc. Takto viazanú látku potom možno použiť k selektívnemu zachyteniu druhej látky z roztoku. Ostatné látky sú z kolóny jednoducho vymyté. Zachytená látka sa po zmene zloženia mobilnej fázy selektívne eluuje<sup>111,112,113</sup>.

### **3.2.1.2. Podľa typu mobilnej fázy** - kvapalinová chromatografia (LC) - plynová chromatografia (GC)

#### Kvapalinová chromatografia

Usporiadanie chromatografického systému, v ktorom je mobilnou fázou kvapalina. Ustáľovanie rovnováh potom môže prebiehať v sústave kvapalina – kvapalina (Liquid – Liquid Chromatography), kde je princípom separácie rozdeľovanie v oboch fázach alebo v sústave kvapalina – tuhá látka (Liquid – Solid Chromatography), kde sa separácia deje na základe adsorpcie medzi oboma fázami.

#### Plynová chromatografia

V tomto prípade je mobilnou fázou plynná látka. Analogicky ku kvapalinovej chromatografii potom môžeme vyčleniť zvlášť chromatografický systém plyn – kvapalina (Gas – Liquid Chromatography) na jednej strane a plyn – tuhá látka (Gas – Solid Chromatography) na strane druhej. V prvom prípade sa jedná o chromatografiu rozdeľovaciu, v druhom adsorpčnú<sup>113</sup>.

### **3.2.1.3. Podľa spôsobu prevedenia** - kolónová chromatografia (CC) - chromatografia v plošnom usporiadaní (FBC)

#### Kolónová chromatografia

Stacionárna fáza má v tomto usporiadaní tvar stĺpca (angl. column) – preto aj synonymný názov stĺpcová chromatografia. Mobilnou fázou môže byť ako kvapalina, tak aj plyn. Čo sa

týka praktického využitia v analýze liečiv má v súčasnosti výsadnú pozíciu a to ako HPLC a GC.

#### Chromatografia v plošnom usporiadaní

V tvare stacionárnej fázy tu dominuje horizontálny rozmer nad vertikálnym. Mobilnou fázou v tomto usporiadaní je výhradne kvapalina. Tento typ chromatografie môžeme ešte ďalej rozdeliť a to podľa materiálu stacionárnej fázy. Starším usporiadaním je papierová chromatografia (PC), od ktorej bola následne odvodená tenkovrstevná chromatografia (TLC). V prípade TLC je stacionárnou fázou najčastejšie silikagélava fólia (Silufol ®), v ktorej môže byť nanosená fluorescenčná prísada. Jej využitie je bežné hlavne v laboratórnych podmienkach<sup>111,113</sup>.

#### **3.2.1.4. Podľa vyvíjania chromatogramu**

- frontálna chromatografia
- vytesňovacia chromatografia
- elučná chromatografia

#### Frontálna chromatografia

Vyznačuje sa kontinuálnym prívodom roztoku delenej zmesi po celú dobu trvania chromatografického procesu. Metóda bola vyvinutá k analytickým účelom.

#### Vytesňovacia chromatografia

Na rozdiel oproti frontálnej chromatografii sa tu zmes vnáša jednorázovo. Mobilná fáza je kontinuálne privádzaná a platí, že sa adsorbuje silnejšie než zložky analyzovanej zmesi. Vystupuje teda v úlohe akéhosi vytesňovacieho činidla. Táto metóda bola vyvinutá k preparatívnym účelom.

#### Elučná chromatografia

Pod týmto označením sa skrýva separačne najúčinnější metóda. Je široko využívaná pri delení zmesí nielen v prípade požiadavku vysoko účinného delenia látok. Analyzovaná látka alebo zmes sa nanášajú jednorázovo. Mobilná fáza má menšiu afinitu k stacionárnej fáze než ľubovoľná zo zložiek zmesi a je privádzaná kontinuálne. Podľa zloženia pretekajúceho eluentu sa ďalej rozoznáva izokratická elučná chromatografia s konštantným zložením a gradientová elučná chromatografia s plynule sa meniacim zložením mobilnej fázy<sup>113</sup>.

#### **3.2.1.5. Podľa spôsobu využitia**

- analytická chromatografia
- preparatívna chromatografia
- chromatografia k výrobným účelom

### 3.2.2. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (High Performance Liquid Chromatography) je v súčasnosti jednou z **najprogressívnejších** analytických metód. Nachádza stále väčšie uplatnenie vo všetkých oblastiach analýzy liečiv.

Separáčna účinnosť HPLC závisí na veľkosti častíc stacionárnej fázy. Čím sú menšie a rovnomernejšie usporiadané, tým väčšia je účinná plocha a tým aj separáčna účinnosť. Pre dostatočne rýchly prietok mobilnej fázy je potrebné ju pretlačiť kolónou pomocou čerpadla za vysokého tlaku. Pritom je bezpodmienečne nutné, aby bol tok plynulý a čo možno najmenej pulzný. V kolóne dochádza na základe vyššie uvedených vratných separáčnych mechanizmov k deleniu látok. Rôzne látky sú teda v kolóne rôznou mierou zadržované. Po kolónovom priestore nasleduje priechod detektorom, ktorý identifikuje rozdelené látky a na základe odozvy detektoru je na chromatografickom zázname každá látka vykreslená v podobe píku. Všetko je samozrejme schopné automatizácie a je ovládané počítačovým programom.

Identifikačnou charakteristikou látky je za presne stanovených chromatografických podmienok jej **retenčný čas**. Pre kvantitatívne stanovenie látky potom slúži výška píku alebo častejšie **plocha pod píkom** <sup>114,115</sup>.

Kvantifikácia je možná viacerými spôsobmi:

1. metóda vonkajšieho štandardu
2. metóda vnútorného štandardu
3. kalibračná metóda
4. metóda normalizácie <sup>6</sup>

#### Hlavné výhody HPLC

- Umožňuje nielen separáciu zložiek analytu, ale aj ich kvalitatívne a kvantitatívne hodnotenie
- Minimálne množstvo vzorku potrebné k analýze (rádovo desiatky  $\mu\text{l}$ )
- Rýchlosť analýzy
- Citlivosť stanovenia (v závislosti na použítom detektore od  $10^{-6}$  do  $10^{-12}$  g/ml)
- Možnosť automatizácie
- Umožňuje analýzu tepelne nestálych látok, neprchavých látok, polymérov
- Analýza širokého spektra látok (od silno nepolárnych po polárne; od nízkomolekulárnych až po bielkoviny) <sup>111,115</sup>



### Oblasti využitia HPLC vo farmácii

1. Kontrolne – analytické hodnotenie liečiv (totožnosť a kvantita)
2. Hľadanie nových liečiv – najmä v spojení s MS detekciou
3. Stabilitné štúdie liečiv
4. Izolácia látok syntetického alebo prírodného pôvodu (preparatívne kolóny)
5. Analýza prírodných liečiv v rastlinnom materiále (obsah alkaloidov, glykozidov, vitamínov v rastlinných drogách)
6. „Therapeutical Drug Monitoring“ – monitorovanie liečiv a metabolitov v plazme, séru, moču atď.
7. Hodnotenie výsledkov klinických štúdií

HPLC je široko využívaná vo všetkých liekopisných monografiách. Umožňuje hodnotiť pestré spektrum látok od organických iónov až po polymérne zlúčeniny, čo je hlavnou výhodou oproti plynovej chromatografii. Tá vyžaduje prítomnosť prchavých látok, ktoré po zahriatí prechádzajú do plynného skupenstva bez rozkladu.

Dnes najpoužívanejšou chromatografickou technikou vôbec je **kvapalinová rozdeľovacia chromatografia** (LLC), kde sa využívajú chemicky modifikované stacionárne fázy<sup>6,111</sup>.

### **3.2.3. Kvapalinový chromatograf**

Zostava chromatografu je buď stavebnicového typu (súčasti sú navzájom oddelené, dajú sa prestavovať, či spájať s prídavnými zariadeniami) alebo kompaktného typu (fixné usporiadanie komponentov).

Základné súčasti moderného chromatografu sú :

- Zásobníky mobilnej fázy
- Odplyňovač (degasser)
- Vysokotlaké čerpadlo
- Mixér
- Dávkovacie zariadenie
- Kolóna – termostatovaný kolónový priestor
- Detektor – prípadne viac sériovo zapojených detektorov
- Zberač frakcií
- Počítač – spolu s príslušným softwaram
- Riadiaca jednotka – komunikácia medzi hardwaram a softwaram

Spojky medzi jednotlivými časťami bývajú kapilárne a mali by byť čo možno najkratšie. Kapiláry sú z nerezovej ocele alebo z tzv. PEEKu<sup>111,114,115</sup>.

### Zásobníky mobilnej fázy

Zásobníky mobilnej fázy sú väčšinou sklenené nádoby, ktoré sa dajú uzatvárať, aby nedochádzalo k odparovaniu do prostredia. Mali by byť umiestnené tak, aby boli chránené pred svetlom, otvoreným ohňom a pred prachom vo vzduchu.

### Odplyňovač

Odplynenie mobilnej fázy je veľmi dôležité, pretože prítomné bublinky vzduchu v mobilnej fáze majú za následok znižovanie a kolísanie pracovného tlaku, čím dochádza k pomerne významným zmenám prietoku a v chromatografickom systéme dochádza k narúšaniu procesu separácie. Moderné chromatografy majú degasser priradený čerpadlu. K odplynению môže v závislosti na type degasseru dochádzať pôsobením vakua, ultrazvuku, či prebublaním čistým héliom. V prvom prípade tečie kvapalina cez plastové trubice, ktoré sú v evakuovanom priestore. Malé molekuly plynu potom prechádzajú cez porézne steny mimo chromatografický systém<sup>114</sup>.

### Čerpadlo

Čerpadlom je pumpovaná mobilná fáza ďalej do chromatografického systému. Čerpadlá používané v HPLC patria medzi vysokotlaké. Pracovné tlaky sa môžu pohybovať v rozmedzí 1 – 60 MPa (odpovedá to tlakom 10 – 600 barov). Zväčša však pracovný tlak dosahuje hodnôt tak do 200 barov, pretože za vyšších tlakov hrozí poškodenie chromatografickej kolóny. Základnou požiadavkou, ktorú musí čerpadlo splňovať, je dodávať presné a reprodukovateľné množstvo mobilnej fázy za jednotku času a to i pri veľmi malom prietoku (desiatky mikrolitrov za minútu). Pritom však musí zaistiť čo možno najviac bezpulzný tok.

Čerpadlá sú konštruované hlavne z nerezú alebo titánu. Tesnenia piestov sú z teflónu. Guličky a sediélka piestov zase zo zafíru. Pohyb piestov v čerpadle je elektronicky riadený, aby sa čo najviac vyhladilo kolísanie prietoku spôsobené striedaním vytlačovacej a sacej fázy<sup>111,114</sup>.

### Mixér

Môže byť umiestnený pred alebo za čerpadlom a jeho úlohou je dokonalá homogenizácia jednotlivých zložiek mobilnej fázy, kde je vopred nastavený pomer týchto zložiek.

### Dávkovacie zariadenie

V minulosti používané dávkovače ako napr. stop-flow dávkovač (za zastaveného prietoku), či septový dávkovač, z moderného inštrumentálneho vybavenia úplne vymizli. V dnešnej dobe prevláda vnášanie vzoriek do chromatografického systému za pomoci **šest'cestného ventilu**

s **dávkovacou slučkou**. Ventil umožňuje zmeniť postup mobilnej fázy do kolóny. V jednej polohe je čerpadlo spojené s kolónou priamo a s vlastnou slučkou je možné akokoľvek manipulovať (premývať, plniť roztokom, odmontovať...). Presunutím kohútika do druhej polohy sa slučka vsunie do kvapalinového vedenia (medzi čerpadlo a kolónu) a jej obsah je mobilnou fázou vytlačený ďalej do kolóny. Tento spôsob má nevýhodu v tom, že zmena dávkovaného objemu je možná až po výmene vlastnej slučky (dávkovacia slučka má známy objem). Na druhej strane sú však tieto dávkovače vysoko presné a reprodukovateľné a vhodné pre použitie do automatizovaných prístrojov (autosamplery). **Autosamplery** po naprogramovaní umožnia prakticky prevádzať časovo náročné analýzy.

Ešte pokrokovejšie dávkovanie umožňuje originálne zariadenie firmy Varian s označením AASP (Advanced Automated Sample Processor). Umožňuje nielen presné dávkovanie vzoriek do chromatografu, ale môže aj prevádzať so vzorkom určité úpravy (derivatizácie, riedenie a pod.)<sup>116</sup>.

### 3.2.3.1. Chromatografické kolóny

V kolóne dochádza k najdôležitejšiemu procesu – k separácii analyzovanej zmesi. Účinnosť kolón závisí na kvalite použitého sorbentu, na dĺžke kolóny, na vnútornom povrchu, na vnútornom priemere a na ďalších faktoroch.

Analytické kolóny pre HPLC sú rovné trubice vyrobené z antikorozívnej ocele (prípadne z tvrdeného skla, či titánu), ktorá splňuje podmienku chemickej odolnosti voči pôsobeniu mobilnej fázy a odolnosti voči vysokým pracovným tlakom. Dôležité je, aby bol vnútorný povrch hladký a náplň kolóny bola homogénna. Rozmery kolón závisia od účelu.

Preparatívne kolóny sú obvykle dlhé 30 – 50 cm s vnútorným priemerom 8 – 10 mm (i viac). Dĺžka analytických kolón je 5 – 30 cm s vnútorným priemerom 2 – 6 mm. Veľkosť zŕn náplne najčastejšie v intervale 3 – 10  $\mu\text{m}$ . Obyčajne platí, že čím menšie častice sorbentu, tým je možné použiť kratšiu kolónu pri zachovaní separačnej účinnosti. Limitom veľkosti zŕn sorbentu je fakt, že čím menšie častice, tým sú potrebné výrazne vyššie pracovné tlaky. V tomto smere je teda miniaturizácia častíc obmedzená.

Renomovaní výrobcovia garantujú zhodu medzi jednotlivými šaržami pomocou nasledujúcich parametrov: počet teoretických poschodí (N), selektivita ( $\alpha$ ) a hodnota relatívnej retencie ( $k'$ ) pre určité testovacie analyty<sup>111,115</sup>.

V posledných rokoch sú stále obľúbenejšie monolitické kolóny. Nemajú časticový charakter, ale sú vysoko porézne. Výhodou sú hydrodynamické vlastnosti, keď aj pri vyšších prietokoch

zachovávajú pomerne nízky tlakový odpor. Dostupné sú monolity zo silikagélu, ale aj z polymérov<sup>117</sup>.

K najpoužívanejším náplniam kolón patria:

- a) Nepolymerizované sorbenty na báze silikagélu – *silikagél, oxid hlinitý*
- b) Iónomeniče (ionexy) – makromolekulárne komplexy obsahujúce kyslú alebo zásaditú funkčnú skupinu
  - kationové ionexy (katexy) napr.  $-\text{SO}_3\text{H}$  (silný katex),  $-\text{COOH}$  (slabý katex)
  - aniónové ionexy (anexy) napr.  $-\text{NR}_4^+$  (silný anex),  $-\text{NH}_2$  (slabý anex)<sup>111</sup>
- c) Polymerizované sorbenty na báze sieťovej štruktúry – *polystyrén-divinylbenzén kopolyméry* (tiež je možné modifikovať povrch funkčnými skupinami)<sup>115</sup>
- d) Chemicky viazané stacionárne fázy

Prípravujú sa reakciou silikagélu s chlór-silánmi a alkoxy-silánmi. Na povrch zrníka silikagélu sú potom zakotvené použité radikály. Najčastejšie dlhé alkylové reťazce ( $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_8$ ), ktoré povrch stacionárnej fázy hydrofobizujú. Takéto zloženie stacionárnej fázy sa v praxi veľmi často používa a to v tzv. **reverse phase (RP)** prevedení (stacionárna fáza nepolárna, mobilná fáza polárna t.j. obsahujúca vodu a polárne organické rozpúšťadla). Okrem toho  $\text{C}_2$  a  $\text{C}_3$  reťazce s prítomnými polárnymi funkčnými skupinami ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ). Nevýhodou chemicky modifikovaných fáz na silikagéle je obmedzený rozsah pH, pri ktorom sa môžu používať. Pri  $\text{pH} > 8,5$  dochádza k rozpúšťaniu silikagélu, čo znižuje životnosť kolón<sup>111</sup>.
- e) Chirálné stacionárne fázy – použitie na separáciu opticky aktívnych liečiv
- f) Karbónové stacionárne fázy – povrch je extrémne hydrofóbny, čím je vhodný k separácii veľmi hydrofilných látok, ktoré sa nedostatočne zadržujú na bežných  $\text{C}_{18}$  fázach. Stabilita voči teplote i pH je vysoká. Nevýhodou je krehkosť, menšia efektivita a nutnosť používať mimoriadne čistú mobilnú fázu<sup>115</sup>.
- g) Stacionárne fázy na báze  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$  – cieľom výskumov je príprava mechanicky i termicky odolnejších kolón, schopných analýzy v celom rozsahu pH. Modifikovaný  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nemá taký potenciál ako  $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZrO}_2$ . Posledne menovaný vykazuje zatiaľ najlepšie vlastnosti. Komerčne dostupné sú kolóny od niekoľkých výrobcov. Bez problémov je možné pracovať za vyšších teplôt, čím klesá viskozita mobilnej fázy. Dôsledkom je možnosť vysokého prietoku za bežných tlakov, čo vedie k výraznému skráteniu analýzy. Navyše pri zvýšenej teplote rastie difuzivita analytu a preto pri vysokom prietoku neklesá separačná účinnosť kolóny. Plne vyťažiť

z výhod je však možné až vtedy, keď sa podarí u kolónového vybavenia zvýšiť odolnosť voči extrémnym teplotám a agresívnym mobilným fázam (HCl, NaOH) <sup>118,119</sup>. Zaujímavá aplikácia sa ponúka pri použití vody ako mobilnej fázy. Pri 200°C je totiž polarita subkritickej vody podobná polarite metanolu <sup>120</sup>.

### 3.2.3.2. Detektory

Funkciou detektoru je poskytovať informácie o zložení mobilnej fázy vytekajúcej z kolóny a tým umožňuje kvalitatívne i kvantitatívne hodnotiť výsledky analýzy. Pomocou vhodného senzora sleduje niektorú z vlastností vytekajúcej mobilnej fázy. V nej rozpustené separované látky poskytujú odozvu, ktorá je po zosilení vykreslená v zázname závislosti daného signálu na čase. Výstupom detektoru je teda signál, ktorého intenzita je úmerná koncentrácii látky v eluáte.

Požiadavky na detektory možno charakterizovať takto:

- Linearita odozvy
- Reprodukovateľnosť odozvy
- Univerzálnosť (v určitých prípadoch sa zase vyžaduje selektivita)
- Vysoká citlivosť
- Nezávislosť odozvy na zmene pracovných podmienok (napr. zmena zloženia mobilnej fázy)
- Spoľahlivosť, jednoduchá manipulácia, primeraná cena <sup>111,114</sup>

#### Spektrofotometrické detektory

Tento typ detektorov je absolútne najrozšírenejším spôsobom sledovania zloženia eluátu. Registrujú absorbciu eluátu pretekajúceho cez kyvetu. Zaráďujeme ich medzi detektory selektívne a to preto, lebo sú schopné zaznamenať iba látky absorbujúce v ultrafialovej (UV) alebo vo viditeľnej (VIS) oblasti svetelného žiarenia. Medzi jednotlivými látkami sú významné rozdiely v citlivosti detekcie. Spôsobené je to rôznou veľkosťou ich molárnych absorpčných koeficientov.

Aby látka mohla absorbovať v UV alebo VIS oblasti žiarenia, musí obsahovať vo svojej štruktúre chromofory. **Chromofor** je zoskupenie atómov v molekule, kde dochádza k absorpcii v oblasti 200 – 800 nm. Pri absorpcii žiarenia dochádza k prechodom valenčných elektrónov v molekule a to zo základného stavu do excitovaného. Presnejšie z väzbových ( $\pi$ ) alebo neväzbových (n) molekulových orbitálov na antiväzbové orbitály ( $\pi^*$ ). Látky, ktoré sa dajú týmto spôsobom detekovať obsahujú systém konjugovaných dvojitéch väzieb (aromatické

a heterocyklické zlúčeniny) prípadne násobné väzby medzi atómami (C=C, C=O, C=S, N=N, N=O atď.). Zlúčeniny bez násobných väzieb v oblasti nad 200 nm neabsorbujú. Využívajú sa ako rozpúšťadlá pre UV spektrofotometriu.

Spektrofotometrické detektory sú použiteľné aj pri gradientovej elúcii. Okrem toho pri detekcii nedochádza k žiadnym zmenám eluátu, takže patria medzi nedeštruktívne detektory. Citlivosť spektrofotometrických detektorov je v oblasti  $10^{-10}$  g/ml. Najcitlivejšia detekcia je **v maxime absorpčnej krivky**, preto je potrebné najprv nájsť absorpčné maximum danej látky, aby pri vlastnom stanovení dochádzalo k čo najmenšej chybe.

Tento typ detektorov sa vyrába vo viacerých prevedeniach :

- a) Detektory s **pevne nastavenou** vlnovou dĺžkou (obvykle 220, 254, 280, 436, 546 nm)  
Konštrukčne jednoduché, lacné. Obmedzená použiteľnosť je kompenzovaná vyššou citlivosťou (menší počet optických členov znamená menšie straty žiarenia).
- b) Detektory s niekoľkými pevnými vlnovými dĺžkami (tzv. **filtrové**)  
Kvalita tohto typu v hlavnej miere závisí na kvalite použitého filtra. Vysoké nároky sa kladú aj na zdroj žiarenia, ktorý musí pri viacerých vlnových dĺžkach vyžarovať dostatok energie.
- c) Detektory s možnosťou nastavenia ľubovoľnej vlnovej dĺžky (**spektrofotometrické**)  
Vynikajú hlavne rozsahom použitia. Kvalitu detekcie veľmi výrazne ovplyvňujú vlastnosti monochromátoru. Citlivosť odozvy je na úrovni predchádzajúcich dvoch typov, často aj trochu nižšia.
- d) Detektor s diódovým poľom (**Diode Array Detector**)  
Namiesto jedinej fotodiódy, na ktorú dopadá žiarenie s určitou vlnovou dĺžkou, je v tomto DAD detektore až niekoľko sto fotodiód. Každá neustále registruje dopadajúce žiarenie v rozsahu niekoľkých nanometrov. Zaznamenáva sa celé spektrum eluátu a všetky informácie sú ukladané do pamäti prístroja. Výsledkom je trojrozmerný chromatogram ako závislosť absorpcie na vlnovej dĺžke v čase<sup>112,114</sup>.

Fluorescenčný detektor

Látky s určitými funkčnými skupinami (**luminofory**) sú schopné absorbovať žiarenie s určitou energiou a následne emitovať žiarenie s energiou nižšou. Po absorpcii primárneho žiarenia sa molekuly dostanú do excitovaného stavu a následne pri prechode do stabilnejšieho stavu s nižšou energiou uvoľnia (emitujú) sekundárne žiarenie s vyššou vlnovou dĺžkou. Intenzita emitovaného žiarenia je zosilená fotonásobičom, ktorý je umiestnený kolmo na smer excitačného žiarenia. Detektory pracujúce na tomto fyzikálnom princípe sa vyznačujú mimoriadnou citlivosťou – v závislosti na type látok v rozsahu  $10^{-9}$  –  $10^{-15}$  g/ml. Použitelnosť

vysoko selektívneho detektora sa dá rozšíriť vhodnou derivatizáciou stanovovanej látky (zavedením luminoforu do molekuly)<sup>112,115</sup>.

#### Refraktometrický detektor

Táto detekcia zaznamenáva zmeny indexu lomu eluátu. Výstupný signál odpovedá rozdielu medzi indexom lomu eluátu v mernej cele a čistej mobilnej fázy v referenčnej cele. Je univerzálny, ale vyžaduje mimoriadne starostlivé termostatovanie. Ďalšou nevýhodou je slabšia citlivosť na úrovni  $5 \cdot 10^{-7}$  g/ml<sup>112</sup>.

#### Elektrochemické detektory

Rozoznávame viac konštrukčných variant týchto detektorov, ktoré sú selektívne pre látky schopné oxidácie alebo redukcie. Obsahujú dve elektródy – polarizovateľnú a referenčnú. Citlivosť detekcie je vysoká a dosahuje úrovne približne  $10^{-10}$  g/ml. Mobilná fáza musí byť vodivá, čiže sa nedajú použiť v systéme normálnych fáz.

- a) Ampérometrický detektor – meria sa elektrický prúd prechádzajúci medzi oboma elektródami pri konštantnom elektrickom napätí
- b) Voltametrický detektor – meria sa elektrické napätie medzi oboma elektródami (málo)
- c) Polarografický detektor – meria sa elektrický prúd medzi oboma elektródami v závislosti na zvyšujúcom sa elektrickom napätí
- d) Coulometrický detektor – meria náboj potrebný k oxidácii alebo redukcii látky pri priechode mernou celou<sup>112,114,115</sup>

#### Konduktometrický detektor

Je vhodný pre zaznamenávanie iónových látok. Meria sa vodivosť eluátu medzi dvoma platínovými elektródami, na ktoré je vložené striedavé napätie, aby sa zabránilo ich polarizácii. Citlivosť detekcie  $10^{-8}$  g/ml<sup>114,115</sup>.

#### Hmotnostný spektrometer (MS)

Kombinácia LC-MS sa používa k identifikácii a štruktúrnej analýze ionizovateľných látok. Pre väčšinu látok je detekcia MS oveľa citlivejšia a špecifickejšia. Dokáže analyzovať látky bez chromoforov. Tiež identifikuje zložky v nerozdelených píkoch, čo znižuje potrebu perfektnej chromatografie. Je možné vykonať viacnásobnú analýzu jedného vzorku – po vytvorení hmotnostného spektra sa z neho vyberie konkrétny ión, ktorý sa znova fragmentuje a vytvorí sa ďalšie spektrum. Tento cyklus sa môže viackrát opakovať.

Zariadenie má 3 základné časti :

1. Iónový zdroj – najčastejšie tzv. **soft ionizačné techniky** za atmosférického tlaku (elektrosprej ESI, chemická ionizácia APCI, fotoionizácia APPI)

2. Analyzátor – základné typy sú kvadrupól (Q), iónová pasca (IT), analyzátor doby letu (TOF), iónová cyklotrónová rezonancia (FTICR), prípadne ich kombinácie (napr. QqQ, TOF-IT atď.)
3. Detektor iónov – elektrónový násobič alebo fotonásobič

V iónovom zdroji dochádza k ionizácii analytu a pomocou iónovej optiky sú vzniknuté ióny usmernené v úzkom lúči cez kapiláru do analyzátoru. V ňom na častice pôsobí elektromagnetické pole v evakuovanom priestore. V tomto poli sú ióny podľa pomeru hmotnosť/náboj ( $m/z$ ) urýchlením rozdelené a dopadajú na detektor. Výsledkom je závislosť početnosti iónov na pomere  $m/z$  <sup>121</sup>.

V súčasnosti sa hmotnostný spektrometer stáva nenahraditeľným pomocníkom pri analýze a identifikácii neznámych látok.

### **3.3. Validácia**

Validácia analytickej metódy je séria experimentov, ktorými sa zistia hlavné charakteristiky metódy. Cieľom je potvrdiť, že daná analytická metóda poskytuje reprodukovateľné a spoľahlivé výsledky a tým pádom je použiteľná aj v rôznych laboratóriách, pričom metóda dáva trvalo rovnako spoľahlivé výsledky.

Všeobecne sa pod pojmom validácia myslí postup, ktorým sa metóda pomocou experimentálnych dát preukáže, že je vhodná pre daný účel. Týmto postupom je vývoj zmýšľanej metódy ukončený.

Základné validačné charakteristiky sú linearita, rozsah, presnosť, správnosť, limit detekcie, limit kvantifikácie, selektivita a robustnosť.

#### **3.3.1. System suitability test**

Vlastnú validáciu doprevádza test vhodnosti použitej metódy – v našom prípade test spôsobilosti chromatografického systému. Je to operácia, ktorá tvorí neoddeliteľnú súčasť validácie analytických procedúr. Cieľom je numericky preukázať, že navrhnutý analytický postup je zvolený korektne a dostatočne účinne. Zastrešuje niekoľko parametrov, ktoré ak sú pri opätovnom užití metódy splnené, považujeme dané podmienky za vhodné. Bez opakovania celej validácie konštatujeme, že metóda dáva spoľahlivé výsledky. Spomedzi nich som vybral trojicu parametrov, ktoré najviac charakterizujú priebeh chromatografickej analýzy.



### 3.3.1.1. Účinnosť kolóny

Účinnosť kolóny môže byť vypočítaná ako **zdanlivý počet teoretických poschodí (N)**. Je známých niekoľko matematických vyjadrení, často sa užívajú tieto vzťahy:

$$N = 5,54 \cdot (R_T / w_{1/2})^2$$

$$N = 2\pi \cdot (R_T \cdot h / A)^2$$

$R_T$  retenčný čas látky

$w_{1/2}$  šírka píku v polovici jeho výšky

$h$  výška píku

$A$  plocha píku

Dostupná je aj rovnica podľa Dorsey a Foley, ktorá kombinuje vplyv hodnôt  $N$  a tiež vplyv tvaru píku (symetrie) na separačnú účinnosť kolóny.

Ak chceme zlepšiť kvalitu (účinnosť) kolóny a tým jej separačný výkon, musíme sa riadiť zvýšením počtu teoretických poschodí. Hodnota  $N$  narastá s niektorými faktormi:

- Kvalita úpravy kolóny
- Dĺžka kolóny
- Nižší prietok (ale nie príliš nízky)
- Menšia veľkosť častíc sorbentu
- Nižšia viskozita mobilnej fázy a vyššia teplota
- Menej objemné molekuly vzorky
- Minimálne extrakolónové priestory

Často sa využíva zvýšenie účinnosti separácie nastavením vhodného prietoku mobilnej fázy. Graficky je závislosťou parametra  $N$  na prietoku asymetrická parabola (Van Deemterove krivky)<sup>115</sup>.

### 3.3.1.2. Faktor symetrie píku ( $A_S$ )

Asymetria chromatografických píkov (*tailing*) je spôsobená okrem iného neúmerne vysokou koncentráciou analytu, ktorá zapríčiňuje preťaženie kolóny. Na chvostovanie píkov má vplyv aj prítomnosť voľných silanolových skupín. Liekopisnej požiadavke vyhovuje hodnota v intervale 0,8 – 1,5.

$$A_S = \frac{w_{1/2}}{2d}$$

- d vzdialenosť medzi kolmicou spustenou z hrotu píku a vzostupnou časťou píku v jednej dvadсятine jeho výšky <sup>6</sup>

### 3.3.1.3. Rozlíšenie chromatografických píkov ( $R_S$ )

V chromatografii sa „kvalita separácie“ dvoch látok hodnotí vypočítaním hodnoty rozlíšenia.

Najčastejšie sa využíva vzorec:

$$R_S = \frac{1,18 (R_{T2} - R_{T1})}{w_{1/2 1} + w_{1/2 2}}$$

Výsledky stanovenia je možné hodnotiť, ak je rozlíšenie píkov aspoň 1,0. V prípade eluovania väčšieho počtu látok sa zvykne rozlíšenie vyjadrovať ako hodnota „kritickej“ skupiny dvoch látok, ktorého hodnota  $R_S$  je najnižšia <sup>6,115</sup>.

## 3.3.2. Validačné parametre

### 3.3.2.1. Linearita

Linearita je schopnosť metódy dávať výsledky priamo úmerné koncentrácii stanovovanej látky vo vzorku. Dokladá sa jednak graficky, jednak matematicky za použitia výsledkov lineárnej regresnej analýzy. Výstupným ukazovateľom miery linearity je korelačný faktor. Výstupným ukazovateľom miery citlivosti je smernica priamky, zatiaľ čo hodnota y- úseku (väčšinou veľmi malá) odpovedá miere vedľajších vplyvov.

Požaduje sa potvrdenie linearity v rozmezí 80 – 120% deklarovaného obsahu a stanovenie minimálne 5 rôznych koncentrácií štandardnej látky. Pri stanovovaní nečistôt sa linearita najčastejšie vyjadruje od limitu kvantifikácie po 120% maximálneho povoleného množstva.

### 3.3.2.2. Rozsah

Rozsah je interval medzi dvomi hladinami koncentrácie stanovovanej látky vrátane, v ktorom je látka stanovená s takou presnosťou, správnosťou a linearitou, ako dokladajú výsledky validácie. Experimentálne sa zistí tak, že presnosť, správnosť a linearita sa overia pre krajné hodnoty a aj pre hodnotu vo vnútri intervalu. Pre validáciu metódy však doloženie rozsahu nie je nutné.

### 3.3.2.3. Presnosť

Pod týmto parametrom sa myslí miera zhody medzi jednotlivými výsledkami metódy opakovane prevádzané s homogénnym vzorkom. Podľa podmienok opakovania sa rozlišuje opakovateľnosť a reprodukovateľnosť. V prvom prípade sa metóda prevádza jedným

analytikom na tom istom prístroji, s rovnakými činidlami, v krátkom časovom intervale – jednoducho za rovnakých pracovných podmienok. Na druhej strane reprodukovateľnosť vyjadruje presnosť medzi laboratóriami. Znamená to, že je overená v rôznych laboratóriách, rôznymi analytikmi na odlišnom vybavení (iné šarže činidiel, iné značky prístrojov apod.). Reprodukovateľnosť je overovaná napríklad pred zaradením analytického postupu do liekopisu. Presnosť sa má stanoviť minimálne zo 6 nezávislých analýz homogenizovaného vzorku, ktoré boli prevádzané kompletným postupom. Výsledkom je hodnota relatívnej smerodatnej odchýlky RSD v percentách. Požaduje sa iba doloženie opakovateľnosti.

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD} \cdot 100}{\bar{A}_n}$$

SD      absolútna smerodatná odchýlka

$\bar{A}_n$       priemerná hodnota plôch píkov pre  $n$  jednotlivých analýz

#### 3.3.2.4. Správnosť

Správnosť je tesnosť zhody medzi výsledkami analýzy a skutočným obsahom látky, ktorý je vopred známy alebo zistený inou nezávislou metódou so zaručenou správnosťou. Často sa správnosť zisťuje štandardným prídavkom látky k analyzovanému prípravku alebo k samotnej matici. Štatisticky sa správnosť vyhodnocuje ako **recovery** (výťažnosť):

$$\text{Rec.} = \frac{A_{\text{vz}} \cdot 100}{A_{\text{št}}}$$

Nevyžaduje sa potvrdiť recovery o hladinu vyššie a o hladinu nižšie oproti 100% recovery, ale v tomto prípade má validácia väčšiu robustnosť.

#### 3.3.2.5. Limit detekcie a kvantifikácie

Tieto parametre sa určujú hlavne pre látky, ktoré je možné očakávať vo veľmi malých množstvách (rozkladné produkty, nečistoty).

Limit detekcie odpovedá najnižšej detekovateľnej koncentrácii látky, nestanovovanej kvantitatívne, za definovaných podmienok. Je vhodný pre limitné testy, t.j. testy zisťujúce iba to, či je látka nad alebo pod určitou hranicou.

Limit kvantifikácie je analogicky najnižšia koncentrácia stanoviteľná s prijateľnou správnosťou a presnosťou.

U inštrumentálnych metód sa zisťujú oba limity na základe šumu základnej línie na blankovom zázname v miestach, kde sa predpokladá pík stanovovanej látky. ČL 2005 doporučuje vzťahovať výšku píku na šum v rozsahu dvadsaťnásobku šírky píku v polovici jeho výšky. Limit detekcie je potom trojnásobkom maximálnej odchýlky odozvy šumu, limit kvantifikácie desaťnásobkom. Získaná hodnota sa potom overí analýzou vzorky s príslušnou koncentráciou.

### **3.3.2.6. Selektivita**

Synonymom selektivity je špecifita. Je to schopnosť metódy zmerať správne a špecificky stanovovanú látku v prítomnosti iných látok. Môžu to byť nečistoty, rozkladné produkty, zbytkové rozpúšťadlá, pomocné látky v placebe, prípadne ďalšie účinné látky u kombinovaných prípravkov. Vyjadruje sa ako rozdiel medzi výsledkami analýzy vzorku bez nečistôt a vzorku s pridanými nečistotami, rozkladnými produktmi a inými zložkami. Ak sú tieto zložky neznáme alebo nedostupné, tak je možné selektivitu preukázať ako výťažnosť štandardného prídavku čistej látky k materiálu, obsahujúcemu stále množstvo iných látok. Nepožaduje sa číselné vyhodnotenie selektivity, ale je nutné priložiť napr. chromatogramy placebo, známych rozkladných produktov či chromatogramy vzorkov po rozklade teplom, svetlom, hydrolýzou apod.

### **3.3.2.7. Robustnosť**

Robustnosť je mierou reprodukovateľnosti výsledkov získaných analýzou jedného homogénneho vzorku v rôznych laboratóriách, rôznymi analytikmi, na rôznych prístrojoch a s rôznymi činidlami. Je to miera schopnosti metódy dávať správne a presné výsledky i pri menších zmenách pracovných podmienok, ku ktorým dochádza pri prevádzkovaní metódy na inom mieste, aj keď postup metódy zostal zachovaný. Vyjadruje teda mieru vplyvu meniacich sa podmienok pri prevádzaní metódy na výsledky tejto metódy. SÚKL nepožaduje číselné doloženie robustnosti (stanovením reprodukovateľnosti), ale je vhodné uviesť v dokumentácii poznatky z vývoja metódy. Tým upozorníme na podmienky, ktoré môžu určitým spôsobom ovplyvniť výsledky (zmeny pH, teploty, prietoku, zmeny pomerov mobilnej fázy, státie vzorkov v autosampleroch, zmeny výrobcov kolón, detektorov).

Výsledkom testovania robustnosti by malo byť tolerované rozmedzie hodnôt, predpísané pre každý parameter metódy<sup>6,122</sup>.

## **4. EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ**

## **4.1. Inštrumentálne vybavenie a pomôcky**

### **4.1.1. Prístrojové vybavenie**

Kvapalinový chromatograf Shimadzu (Tokio, Japonsko):

programovacia jednotka SCL-10A<sub>VP</sub>

detektor SPD-10A<sub>VP</sub>

pumpa LC-10AD<sub>VP</sub>

autoinjektor SIL-10AD<sub>VP</sub>

termostat CTO-10AS<sub>VP</sub>

degasser DGU-14A

nízkotlaký modul FCV-10AL<sub>VP</sub>

software Class-VP, Shimadzu

chromatografická kolóna Symmetry RP C<sub>18</sub> (250 × 4,6 mm; 5 μm)

UV spektrofotometer UV2401PC Shimadzu (Tokio, Japonsko)

Analytické váhy AND, Japonsko

Ultrazvukový kúpeľ Ultrasonic bath K10 (Krainek, Slovensko)

Acidimeter s elektromagnetickým miešadlom

Centrifúga Centrifuge T51, MLW (Engelsdorf, Nemecko)

### **4.1.2. Ďalšie pomôcky**

Delené pipety, nedelené pipety, balónik k pipete, mikropipety Hamilton (10, 25 μl)

Kadičky, Erlenmayerove banky, banka na odsávanie, odmerné banky, odmerné valce, lieviky, skúmavky, striekačka s destilovanou vodou a metanolom.

### **4.1.3. Chemikálie**

Metanol (Penta, ČR), Acetonitril (Penta, ČR), Etanol 96% (Merck, ČR), Dietyléter (Penta, ČR).

Dihydrogénfosforečnan sodný p.a.(Lach-Ner, ČR), Kyselina fosforečná 85% p.a. (Lach-Ner, ČR),

Kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, ČR), Hydroxid sodný.

Curcumin techn. (Sigma), Curcumin purum (Fluka), Pigmenta radicis curcumae.

## **4.2. Príprava a úprava používaných roztokov**

### **4.2.1. Príprava mobilnej fázy**

Anorganickú zložku mobilnej fázy predstavuje fosfátový pufor 0,025 mol/l, pH = 2,6 (upravené 1M NaOH).

Organickú zložku mobilnej fázy predstavuje acetonitril.

Po zmiešaní oboch zložiek mobilnej fázy bola zmes odplynená a zhomogenizovaná za použitia ultrazvukového kúpeľa po dobu asi 5 minút.

### **4.2.2. Príprava pracovných roztokov**

#### **4.2.2.1. Pracovné roztoky k extrakcii**

Okrem extrakcie pomocou čistého metanolu bol použitý 0,1 mol/l roztok hydroxidu sodného.

1. Vodný roztok hydroxidu sodného o koncentrácii 0,1 mol/l bol pripravený zriedením zásobného roztoku 1 mol/l (podľa ČL 2005).
2. Metanolový roztok hydroxidu sodného o koncentrácii 0,1 mol/l bol pripravený rozpustením 0,80 g pevného hydroxidu sodného v metanole a doplnením v odmernej banke na 200 ml po čiarku. Rozpúšťanie bolo urýchlené pôsobením ultrazvuku.

Na okyslenie vzniknutých fenolátov bol použitý 0,1 mol/l roztok kyseliny chlorovodíkovej.

3. Vodný roztok kyseliny chlorovodíkovej o koncentrácii 0,1 mol/l (podľa ČL 2005).
4. Metanolový roztok kyseliny chlorovodíkovej bol pripravený zo zásobného roztoku o koncentrácii 1 mol/l (podľa ČL 2005).

Pri extrahovaní oboma roztokmi hydroxidu sodného sme pridávali antioxidačnú látku.

5. Príprava zásobného roztoku kyseliny L-askorbovej o koncentrácii 2,5 mg/ml bola uskutočnená rozpustením 0,0625 g kryštalickej látky v metanole a doplnením v odmernej banke na 25,0 ml po značku.

#### **4.2.2.2. Pracovné roztoky pre linearitu**

K validácii bolo prichystaných 12 pracovných roztokov. Vychádzajúc z pracovného roztoku pre linearitu 1 (PRL<sub>1</sub>) bolo mnohonásobným nariadením pripravených ďalších 11 roztokov.

PRL<sub>1</sub> o koncentrácii kurkuminoïdov 500 µg/ml bol pripravený rozpustením 50,5 mg čistého kurkuminu v metanole v odmernej banke na 100,0 ml.

Príprava ďalších pracovných roztokov je prehľadne uvedená v [Tab. 4]. Zakaždým bol uvedený objem PRL<sub>1</sub> doplnený metanolom do 25,0 ml.

Číslo pracovného roztoku pre linearitu	Koncentrácia kurkuminoidov [µg/ml]	Objem PRL <sub>1</sub> [ml]
2	400	20,0
3	300	15,0
4	200	10,0
5	100	5,0
6	40	2,0
7	20	1,0
8	4	0,2
9	2	0,1
10	0,4	0,02
11	0,2	0,01
12	0,02	0,001

**Tab. 4** – Príprava pracovných roztokov pre linearitu

Pracovný roztok 13 pre určenie limitu detekcie o koncentrácii kurkuminoidov 0,005 µg/ml bol pripravený z 2,50 ml PRL<sub>12</sub> doplnením metanolom do 10,0 ml.

#### 4.2.2.3. Pracovné roztoky pre správnosť

Pre zhodnotenie správnosti bolo pripravených 5 navážok modelového roztoku vzorky s približne 100% obsahom kurkuminoidov.

Model	Navážka [g]
1	0,9985
2	1,0083
3	1,0081
4	1,0121
5	0,9989

**Tab. 5** – Navážky modelového roztoku, použité pri validácii správnosti a presnosti

Postup prípravy modelového roztoku vzorky :

- k 50,1 mg čistého kurkumínu bolo pridané placebo rozpustené v 96% etanole
- po rozpustení bola hmotnosť etanolového roztoku upravená na 20,0300 g



Roztok vonkajšieho štandardu bol pripravený z 50,2 mg čistého kurkumínu rozpustením v metanole a doplnením do 20,0304 g.

#### **4.2.2.4. Pracovné roztoky pre presnosť a opakovateľnosť nastrieknutia**

Pre určenie presnosti bolo použitých 5 navážok modelového roztoku vzorky, ktorého príprava je uvedená v kap. 4.2.2.3.

Pre určenie opakovateľnosti nastrieknutia bol použitý roztok štandardu, ktorý obsahoval presne 50,25 mg čistého kurkumínu. Oranžový prášok bol po rozpustení doplnený metanolom do hmotnosti 20,0100 g.

### **4.2.3. Úprava vzoriek pred analýzou**

#### **1. EXTRAKCIA**

50,00 mg neznámej vzorky je rozpustených v metanole a doplnených do hmotnosti 20,00 g. Odpipetuje sa z toho 1,00 g zmesi a doplní sa v odmernej banke do 25,0 ml:

- a) metanolom
- b) 0,1 mol/l vodným roztokom NaOH
- c) 0,1 mol/l metanolovým roztokom NaOH

Po premiešaní sa ďalej odpipetuje 1,0 ml roztoku. Pridá sa 0,5 ml pracovného roztoku kyseliny L-askorbovej 2,5 mg/ml. Hneď na to sa odmerná banka doplní do objemu 25,0 ml:

- a) metanolom
- b) 0,1 mol/l vodným roztokom HCl
- c) 0,1 mol/l metanolovým roztokom HCl

Výsledný roztok sa dobre premieša a jeho časť sa nastriekne na kolónu.

#### **2. VALIDÁCIA A HODNOTENIE**

50,00 mg neznámej vzorky (prípadne 40,00 alebo 60,00 mg) je rozpustených v metanole a doplnených do hmotnosti 20,00 g.

Odpipetuje sa z toho 1,00 g zmesi a doplní sa metanolom v odmernej banke do 25,0 ml. Po premiešaní sa ďalej odpipetuje 1,0 ml roztoku. Metanolom sa doplní do 25,0 ml odmernej banky. Dobre sa premieša a časť sa nastriekne na kolónu.

## **5. VÝSLEDKY A DISKUSIA**

## **5.1. Stabilita**

Analyzovaniu kurkuminoidov metódou HPLC predchádzalo hodnotenie stability vzorky. Iba dostatočne dobré výsledky môžu dať prísluš pre presnú a reprodukovateľnú kvantifikáciu účinných látok.

Stabilitu analytu je možné sledovať viacerými spôsobmi. Popri výhodách, ktoré poskytuje použitie kvapalinového chromatografu (možnosť sledovať úbytok analytu za súčasného vzniku nových pík; dá sa usudzovať aj na chemizmus prebiehajúcich reakcií; automatizácia a i.) sa stále teší obľube dvojlúčový UV-VIS spektrofotometer. Jeho nespornou výhodou je jednoduché praktické prevedenie a možnosť snímať spektrálne záznamy v nastaviteľnom rozsahu vlnových dĺžok. Nie je potrebná nijak zvlášť komplikovaná inštrumentácia, takže sa optimálne hodí do rutinných laboratórnych výskumov. Práve tento spôsob sme pri skúškach používali aj my.

Zdroje uvedené v kapitole chemická stabilita signalizujú, že štruktúra kurkumínu je pomerne labilná a v roztokoch s organickými rozpúšťadlami by malo byť použité tmavé sklo.

Primárnym cieľom stabilitných štúdií bolo určiť stabilitu metanolového roztoku kurkumínu pri extrakcii roztokmi hydroxidu sodného. Je už dostatočne preskúmaná jeho vysoká nestálosť v neutrálne-zásaditom prostredí, ktorá pri expozícii roztokom 0,1 mol/l hydroxidu sodného naznačuje pravdepodobnú degradáciu. A to platí nielen pre vodný roztok NaOH, ale tento proces vystupuje (pravdepodobne v menšej miere) i v metanolovom roztoku NaOH. Podotýkam, že dôležité v našom prípade je, aby kurkuminoidy nedegradovali v priebehu 5 – 10 minút od prídania hydroxidu. Tento čas je obvykle potrebný k dostatočnému stupňu extrakcie, homogenizácie a následnému okysleniu roztokom 0,1 mol/l HCl.

Ďalšou úlohou je posúdiť vplyv antioxidantných látok na stabilitu roztokov. Tiosíran sodný sa v našom prípade neosvedčil, preto sme zvolili kyselinu L-askorbovú. Nájdenie vhodnej koncentrácie antioxidantnej látky môže zabrániť nežiadúcemu ovplyvneniu spektra (z dôvodu excesívneho zastúpenia alebo iným spôsobom).

### **5.1.1. Stabilita kurkumínu**

Ešte predtým než sme začali študovať vplyv prostredia hydroxidu sodného na roztok kurkumínu, preskenovali sme päťkrát za sebou čistý roztok kurkumínu v metanole. Spektrum je uvedené v kapitole 5.2.2. Jednotlivé spektrá boli zhotovené presne v dvojminútových intervaloch a výsledky sú uvedené v [Tab. 6].

<b>Time</b> [min]	$\lambda_{\max}$ [nm]	$A_{\max}$ [AU]
0	422,0	0,1501
2	422,4	0,1494
4	422,4	0,1497
6	422,4	0,1499
8	422,6	0,1500

**Tab. 6** – Stabilita kurkumínu v metanole

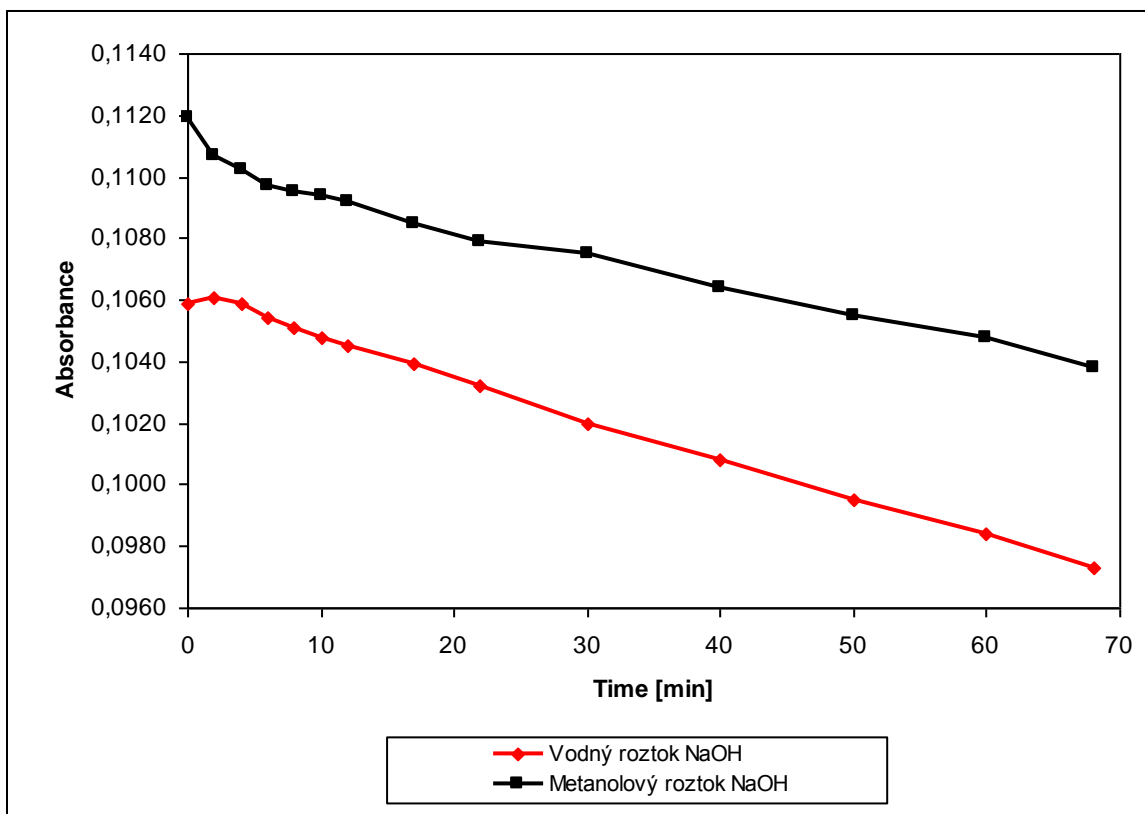
K vlastnému posúdeniu stability sme pristúpili porovnaním stabilných kriviek po pridaní vodného a metanolového 0,1 mol/l roztoku NaOH. Ako slepá vzorka bol použitý metanol.

K 2 ml roztoku kurkumínu v metanole (1  $\mu\text{g/ml}$ ) sme pridali 0,1 ml roztoku NaOH. Rýchlo sme vzniknutú zmes premiešali v celom objeme a dali do kyvety. Premeriavali sme spektrum od 600 po 190 nm v časových intervaloch 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 22, 30, 40, 50, 60 a 68 min. Zo zaznamenaných absorpčných maxím sme zvolili vlnovú dĺžku 509 nm (kurkumín reagoval s NaOH v mieste fenolických skupín za vzniku červeno sfarbených fenolátov), pri ktorej sme v každom zázname odčítali hodnotu absorbancie a vyniesli do grafu [Obr. 1] ako závislosť absorbancie roztoku na čase.

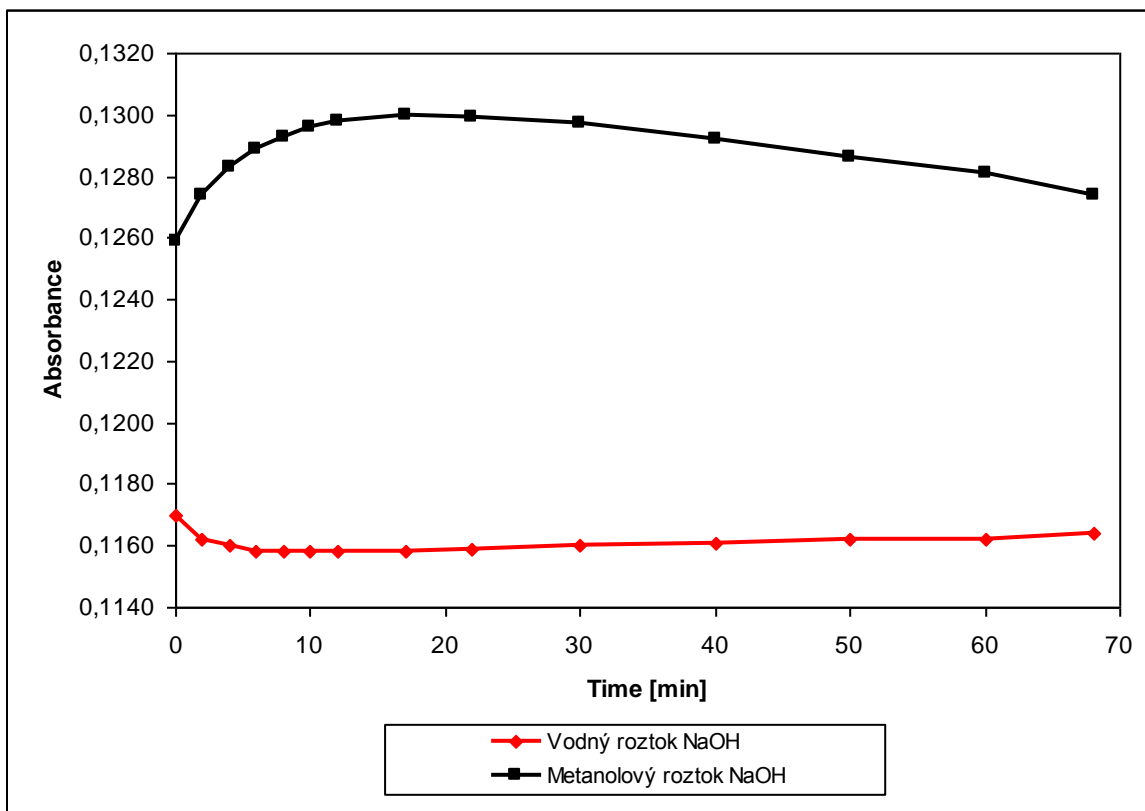
Po premeraní týchto záznamov sme usporiadali obdobný experiment s použitím kyseliny L-askorbovej ako antioxidantnej látky. K 2 ml roztoku kurkumínu v metanole (1  $\mu\text{g/ml}$ ; roztok obsahoval navyše kyselinu askorbovú v koncentrácii 100  $\mu\text{g/ml}$ ) sme pridali 0,1 ml roztoku NaOH. Pracovný postup ďalej je uvedený vyššie. Hodnoty absorbancií v závislosti na čase sú vyjadrené graficky – pozri [Obr. 2].

K tomuto by som ešte poznamenal, že sme neskôr zvolili aj odlišný pracovný postup stabilného testu (viď kap. 5.1.2.). Výsledky, ktoré však neuvádzam, iba potvrdzujú fakt, že aj v nadbytku vodného roztoku NaOH je stabilita kurkumínu prídavkom 100-násobku kyseliny askorbovej dostačujúca.

Na záver pripájam ešte skutočnosť, že okyslenie vzniknutých fenolátov prebehlo prostredníctvom 0,1 mol/l HCl. V stabilných testoch sme skúšali odolnosť voči 50 mM fosfátovému pufru, ktorý bol pripravený z  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Nevýhodou bolo zlé rozpúšťanie v metanole a preto sme ho nahradili kyselinou chlorovodíkovou. Stabilné testy fosfátového pufru svedčia o dostatočne dobrej stabilite s prídavkom kyseliny askorbovej. Dodatočne sme spravili rýchly test, ktorým sme dokázali, že výtazok kurkumínu neklesne o viac ako 5% pri použití HCl.



Obr. 1 – Stabilita kurkumínu v roztokoch hydroxidu sodného 0,1 mol/l



Obr. 2 – Stabilita kurkumínu v roztokoch hydroxidu sodného 0,1 mol/l za prítomnosti kyseliny askorbovej

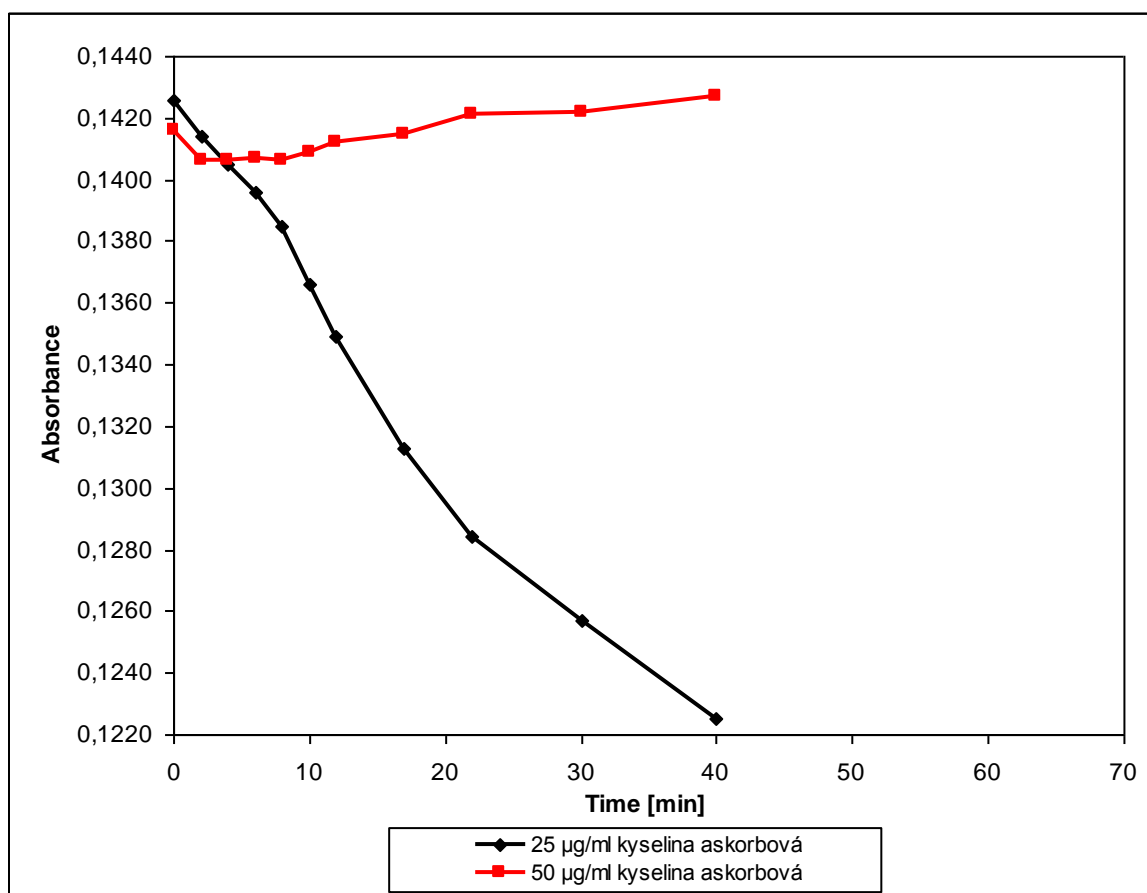
### 5.1.2. Koncentrácia antioxidantnej látky

Z predchádzajúcich výsledkov vyplýva, že prítomnosť kyseliny askorbovej v roztoku kurkumínu vplyva pozitívne na jeho stabilitu. Kvantitatívny pomer zastúpenia kyseliny askorbovej a kurkumínu v týchto pokusoch bol 100 : 1.

V nasledujúcom teste sme skúšali ako sa bude správať kurkumín v roztoku, ak bude kyselina askorbová prítomná v pomere 50 : 1 a konečne 25 : 1.

Pracovný postup bol trochu odlišný. Brali sme v úvahu fakt, že pri extrakcii je použitých takmer 25 ml roztoku NaOH, čo výrazne prevažuje vzhľadom na 1 ml roztoku kurkumínu.

Zmiešali sme teda 4 ml 0,1 mol/l roztoku NaOH a 1 ml roztoku kurkumínu, ktorý obsahoval kurkumín v koncentrácii 5 µg/ml a kyselinu askorbovú v koncentrácii 125, resp. 250 µg/ml. Po premiešaní v skúmavke sa časťou roztoku naplnila kyveta a premeralo sa v časových intervaloch spektrum. Odlišné zloženie roztoku spôsobilo posun absorpčných pásov ku kratším vlnovým dĺžkam. Graficky spracované hodnoty boli zistené pri 469 nm. Slepou vzorkou bol metanolový roztok kyseliny L-askorbovej, v prvom prípade 25 µg/ml a v druhom 50 µg/ml. Dosiiahnuté výsledky dokladá [Obr. 3].



Obr. 3 – Vplyv koncentrácie antioxidantnej látky na stabilitu kurkumínu

## 5.2. Chromatografické podmienky

### 5.2.1. Chromatografický systém

Hodnotenie obsahu kurkuminoidov prebiehalo na kolóne Symmetry RP C<sub>18</sub>, rozmery 250 × 4,6 mm, veľkosť náplne 5 μm. Určité merania týkajúce sa kurkuminoidov boli dostupné na začiatku práce, takže ako mobilnú fázu sme použili už predtým testovanú zmes acetonitrilu a fosfátového pufru s pH = 2,6.

V úvodných meraniach na kvapalinovom chromatografe sme pracovali pri pomere oboch zložiek 50 : 50 a prietoku 0,9 ml/min. Neskôr pri vlastnej validácii sme zvolili ako najvhodnejšiu kombináciu pomer 55 : 45 (fosfátový pufr : acetonitril) pri prietoku 1,05 ml/min. Došlo k optimálnemu posunu retenčných časov všetkých troch látok, zlepšilo sa rozlíšenie a zachované ostali aj optimálne tvary pík.

Všetky experimentálne zloženia mobilnej fázy sú uvedené v [Tab. 7].

<b>Pomer</b> ACN : Fosfát	<b>Prietok</b> [ml/min]	<b>R<sub>T</sub> [min]</b> Bis-demetoxykurkumín	<b>R<sub>T</sub> [min]</b> Demetoxykurkumín	<b>R<sub>T</sub> [min]</b> Kurkumín
50 : 50	0,9	10,47	11,49	12,61
43 : 57	0,9	22,58	25,15	27,93
45 : 55	0,9	18,91	21,01	23,28
45 : 55	1,05	16,19	17,98	19,92

**Tab. 7**– Vplyv zloženia mobilnej fázy a prietoku na retenčné časy eluovaných kurkuminoidov

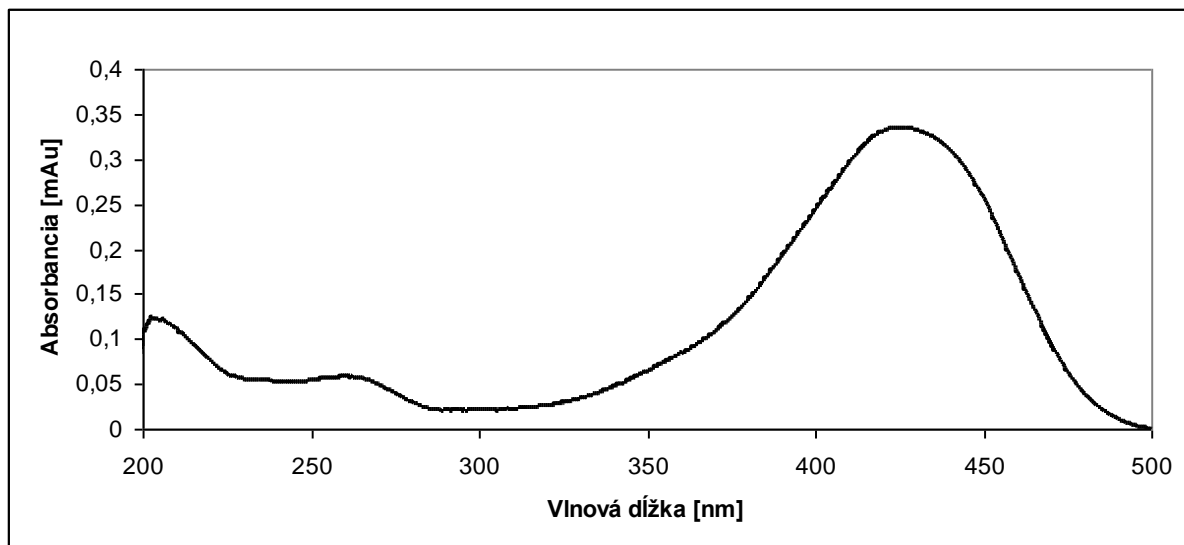
Ako metóda stanovenia obsahu bola zvolená **metóda vonkajšieho štandardu**. Mali sme k dispozícii štandard čistého kurkumínu. Najprv sa analyzovala presne známa koncentrácia štandardu. Následne za rovnakých chromatografických podmienok bola uskutočnená analýza vzoriek. Porovnaním jednotlivých plôch pod píkmi štandardu a vzorky sa vypočíta neznáma koncentrácia vzorky.

### 5.2.2. Vlnová dĺžka detektorov

Aby sme vybrali vhodnú vlnovú dĺžku spektrofotometrického detektoru, vychádzali sme z UV-VIS spektra čistého kurkumínu [Obr. 4].

Spektrum zahŕňa popri signifikantnom maxime pri vlnovej dĺžke 422 nm menej výrazné maximum 262 nm.

Na základe spektra sa najvýhodnejšie javí absorpčné maximum pri 422 nm. Pre zamýšľanú detekciu napr. i z komplikovanej zmesi látok v placebo je táto vlnová dĺžka vysoko selektívna. V podstate patrí už do krátkovlnnej časti viditeľného žiarenia a preto absorbujú iba látky farebné.



Obr. 4 – Absorpčná krivka kurkumínu v UV-VIS oblasti spektra

Detekciu sme ešte navyše zaistili použitím citlivejšieho a selektívnejšieho fluorescenčného detektoru. V chromatografickom systéme bol zapojený v sérii za UV-VIS detektorom. Na základe dostupnej literatúry sme zvolili vlnovú dĺžku emitovaného žiarenia 525 nm, pri zachovanom excitačnom žiarení 422 nm<sup>15</sup>. Rád by som zdôraznil, že tento spôsob detekcie nebol v dostupnej literatúre publikovaný ani v jednom prípade. Predpokladáme, že sa nám podarí určiť výrazne nižší limit detekcie ako použitím samotného UV-VIS detektoru.

### 5.2.3. Metodika pracovných operácií

**Od tohto bodu** výsledky rozdeľujeme zvlášť pre UV-VIS detektor a RF-detektor. Rozhodli sme sa taktiež využiť dostatok dát a hodnotiť obsah jednotlivých kurkuminoidov, pričom v niektorých prípadoch sme to doplnili o obsah sumy farbív.

#### 5.2.3.1. Extrakcia kurkuminoidov

Po predbežných testoch sme zavrhlí možnosť extrahovať kurkumín s využitím dietyléteru. Princípom bola selektívna rozpustnosť kurkumínu vo vodnom roztoku NaOH a éteri v závislosti na ionizácii molekuly. Hrubá extrakcia neposkytla žiadnu výhodu, výťažok bol výrazne nižší a praktické prevedenie oveľa komplikovanejšie.



K vlastnému testovaniu extrakcie sme teda uviedli 3 postupy:

1. extrakcia metanolom
2. extrakcia metanolovým roztokom NaOH
3. extrakcia vodným roztokom NaOH

Priebeh a úpravy vzoriek sú uvedené v kapitole 4.2.

### **5.2.3.2. Validácia metódy**

#### Linearita

Vzhľadom na farmakologický potenciál, ktorý kurkumín stále viac odhaľuje, sme si dali cieľ podchytiť koncentráciu od vysokých hodnôt až na hranicu detekcie. Zvolili sme 12 koncentračných hladín od 500 µg/ml po 0,02 µg/ml. Každá koncentrácia bola nastrieknutá na kolónu 5-krát. Získaná kalibračná priamka vznikla lineárnou regresiou priemerných hodnôt AUC. Dolnú hranicu lineárnej regresie sme zvolili na základe najnižšej kvantifikovateľnej hladiny.

Vzhľadom na mimoriadne široký rozsah koncentrácií sme pristúpili k linearizácii nielen v celom rozsahu, ale aj v čiastkových koncentračných oblastiach. Rozhodol som sa uviesť lineárnu regresiu najmenej koncentrovaných hladín, ktoré sa kvôli odlišnej citlivosti medzi oboma detekciami rádovo odlišujú.

#### Správnosť

Správnosť je odchýlka výsledku hodnotenia od správnej hodnoty. Správna hodnota bola zistená analýzou obsahu metanolového roztoku čistého kurkumínu.

K určení správnosti metódy poslúžila testovaná extrakčná metóda metanolom. Z modelovej neznámej vzorky (viď kap. 4.2.2.3.) bolo pripravených 5 rôznych navážok s obsahom kurkumínu približne 100%. Po úprave (viď kap. 4.2.3.) bola každá vzorka analyzovaná 4krát.

AUC, ktorá bola získaná manuálnou integráciou, bola z nameraných hodnôt upravená vzhľadom na navážku čistej látky v pracovnom roztoku, ako aj vzťahom na navážku kvapalnej vzorky, ktorá bola po zriedení metanolom analyzovaná.

#### Presnosť

Hodnoty použité k validácii presnosti boli získané tiež z výsledkov extrakcie metanolom. Okrem presnosti sme pristúpili aj k určeniu opakovateľnosti nastrieknutia. Vychádzali sme z analýzy vonkajšieho štandardu pri hodnotení neznámych vzoriek. Presná navážka tohto štandardu bola po nariadení a úprave (viď úprava vzoriek, kap. 4.2.3.) aplikovaná na kolónu

v 3 sériach – na úvod, uprostred a v samom závere stanovenia obsahu (s odstupom približne 7 hodín). Každá séria pozostávala z 3 analýz.

AUC bola z nameraných hodnôt upravená vzhľadom na navážku čistej látky v pracovnom roztoku, ako aj vzťahom na navážku kvapalnej vzorky, ktorá bola po zriedení metanolom analyzovaná.

### Limit detekcie a kvantifikácie

Stanovenie limitných hodnôt je možné po analýze šumu v chromatograme blanku. Vychádzali sme z chromatogramu čistého metanolu. ČL 2005 udáva hodnotiť šum v intervale 20-násobku šírky píku v polovici výšky. Pre naše účely by to bolo zložitejšie, pretože máme analyzovať 3 látky, preto sme zvolili hodnotenie šumu základnej línie iným spôsobom. V prípade UV-VIS detekcie v intervale 12 – 24 min.

Fluorescenčná analýza metanolu vykazovala osobitý pokles odozvy v čase asi 15 min. Neostávalo nám nič iné, len hodnotiť šum baseline od 16 – 24 min.

Vychádzajúc z liekopisného vzťahu, ktorý nižšie uvádzam, sme dospeli k pomeru Signal/Noise:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

H výška píku od vrcholu po strednú hodnotu šumu

h maximálna amplitúda výchylky odozvy blanku v určitom časovom intervale

Ako už bolo zdôraznené v teoretickej časti, limit kvantifikácie odpovedá číslu  $S/N = 10$  a limit detekcie je určený  $S/N = 3$ .

Predpokladali sme, že limit detekcie a kvantifikácie bude u RF detekcie nižší než  $0,02 \mu\text{g/ml}$ . Preto sme dodatočne po prebehnutí analýzy linearitu nariadili pracovný roztok 13, ktorý obsahoval kurkuminoidy v koncentrácii  $0,005 \mu\text{g/ml}$ .

### Selektivita

Testovanie selektivity spočíva v porovnaní chromatografického záznamu vzorky a roztoku blanku (v našom prípade čistý metanol). Záznam blanku nesmie v žiadnom prípade interferovať s eluovanými látkami vo vzorke. K posúdeniu selektivity dokladám chromatografický záznam pracovného roztoku pre linearitu 8 (PRL<sub>8</sub>) [Obr. 11, Obr. 20] a záznam metanolu [Obr. 13, Obr. 22]. Ako dôkaz variabilného obsahu kurkuminoïdov dávam k posúdeniu aj chromatogram vzorky *Radiciis curcumae pigmenta* [Obr. 12, Obr. 21].

Na podklade záznamov PRL<sub>8</sub> som stanovil hodnoty rozlíšenia jednotlivých dvojíc eluovaných látok. Pri výpočte som vychádzal z liekopisného vzťahu uvedeného v kap. 3.3.1.3.

Dvojica píkov	Rozlíšenie R <sub>s</sub>	
	UV-VIS	RF
<b>B/D</b>	3,02	2,98
<b>D/C</b>	3,14	2,97

**Tab. 8** – Dosiachnuté rozlíšenie píkov v UV-VIS a RF detekcii

Presnou analýzou píkov vo vyššie uvedenom chromatograme vzorky *Radix curcumae pigmenta* som dodatočne po analýze vypočítal tzv. *tailing factors* (chvostovanie píkov). Pritom som vychádzal z liekopisného vzorca uvedeného v kap. 3.3.1.2.

Všetky hodnoty sú zobrazené prehľadne v [Tab. 9]. Dosiachnuté čísla nepresahujú rozmedzie stanovené v ČL 2005 (0,8 – 1,5).

	Faktor symetrie píku A <sub>s</sub>	
	UV-VIS	RF
Bis-demetoxykurkumín	1,261	1,291
Demetoxykurkumín	1,252	1,125
Kurkumín	1,275	1,248

**Tab. 9** – Hodnoty faktorov symetrie píkov podľa ČL 2005

### 5.3. Výsledky – Spektrofotometrický detektor

#### 5.3.1. Extrakcia kurkuminoidov z modelového vzorku

Známemu úsloviu že „v jednoduchosti je krása“, odpovedajú aj výsledky extrakčných skúšok. Ako najvhodnejší spôsob sa ukázala byť priama extrakcia čistým metanolom, ktorá poskytla výtazok vyše 99%. Na druhom mieste sa umiestnila extrakcia metanolovým roztokom hydroxidu sodného s výtazkom viac ako 95%. Najhoršie na tom skončila extrakcia, ak sme použili ako rozpúšťadlo hydroxidu sodného vodu. Aj z výsledkov pomerne jasne vyplýva, že v priebehu analýzy vzoriek extrahovaných vodným NaOH, dochádza postupne k poklesu obsahu kurkuminoidov. Tento pokles nie je ani zďaleka taký markantný ako u roztoku NaOH

v metanole. Práve naopak sa zdá, že po okyslení sa kurkumín v prostredí metanolu správa obdobne akoby bol extrahovaný prvým spôsobom. Rozdiel približne 4% je pravdepodobne zapríčinený expozíciou štruktúry alkalickému hydroxidu.

Potvrďuje to domnienku, že kurkumín sa vo vodnom prostredí (či už v kyslom, neutrálnom alebo zásaditom) za normálnych podmienok pomerne rýchlo degraduje.

Svoju úlohu však mohla v menšej miere zohrať aj dlhá doba, kým boli vzorky poskytnuté extrakciou oboma hydroxidmi nastrieknuté na kolónu.

RSD jednotlivých sérií pri extrakcii metanolom bola až na jednu výnimku (B-4.séria = 2,7%) nižšia než 1,5%. Ešte lepšiu zhodu výsledkov poskytol druhý spôsob, kde bola RSD okrem jednej 2% hodnoty na úrovni 1% a nižšej. Paradoxom je, že najhorší výsledok extrakcie bol dosiahnutý najlepšou zhodou výsledkov – až na 3 výsledky na úrovni 1,2% boli ostatné série analyzované s  $RSD \leq 0,5\%$ .

Séria	Navážka vzorku [g]	Recovery [%]			
		B	D	C	Suma
1/5	0,9985	100,3	100,8	101,4	101,3
2/5	1,0083	98,2	100,0	100,7	100,5
3/5	1,0081	96,7	97,3	98,0	97,8
4/5	1,0121	98,8	98,9	99,6	99,4
5/5	0,9989	99,3	99,8	101,0	100,7
<b>Priemer</b>		<b>98,7</b>	<b>99,4</b>	<b>100,1</b>	<b>99,4</b>

Tab. 10 – Extrakcia modelovej vzorky metanolom

Séria	Navážka vzorku [g]	Recovery [%]			
		B	D	C	Suma
1/5	0,9929	94,5	94,1	95,1	94,9
2/5	1,0029	97,0	96,9	97,1	97,0
3/5	1,0028	97,7	96,5	97,1	97,0
4/5	0,9971	93,5	91,9	92,3	92,3
5/5	1,0000	95,1	94,4	94,9	94,8
<b>Priemer</b>		<b>95,6</b>	<b>94,8</b>	<b>95,3</b>	<b>95,2</b>

Tab. 11 – Extrakcia modelovej vzorky 0,1 mol/l roztokom NaOH v metanole

Séria	Navážka vzorku [g]	Recovery [%]			
		B	D	C	Suma
1/5	1,0038	95,4	95,1	93,5	93,8
2/5	1,0059	94,5	92,5	91,4	91,7
3/5	1,0013	93,5	91,6	90,5	90,8
4/5	0,9998	95,7	92,8	91,4	91,7
5/5	0,9961	92,9	91,1	89,9	90,2
<b>Priemer</b>		<b>94,4</b>	<b>92,6</b>	<b>91,3</b>	<b>92,8</b>

Tab. 12 – Extrakcia modelovej vzorky 0,1 mol/l roztokom NaOH vo vode

### 5.3.2. Linearita – vid' [Tab. 13]

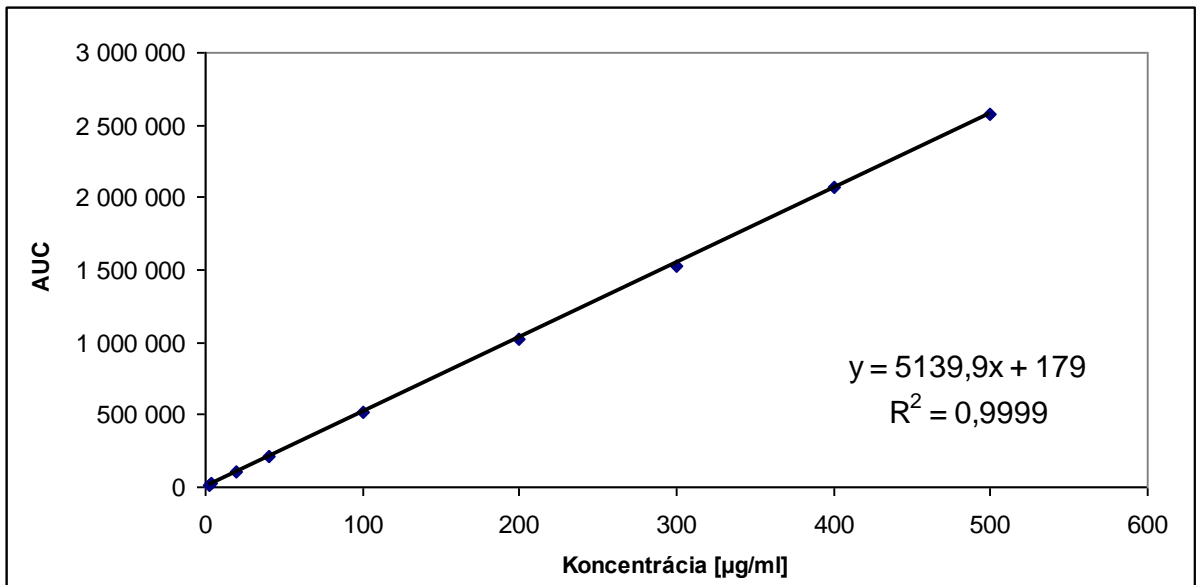
Lineárna regresia ukázala, že v rámci všetkých troch látok je hodnota druhej mocniny korelačného koeficientu vyššia alebo rovná 0,9999. V grafoch [Obr. 5, Obr. 6, Obr. 7] sú uvedené aj parametre regresnej priamky. V tabuľke je uvedená aj suma kurkuminoidov, pretože súčet AUC jednotlivých látok je priamo úmerný výslednej koncentrácii (takisto s vynikajúcim korelačným koeficientom; nepublikované dáta). Prázdne políčka v tabuľke znamenajú píky, ktorý sa nedá kvantifikovať s dostatočnou správnosťou a presnosťou.

Keďže je regresná priamka preložená na veľkom rozsahu koncentrácií, pridávam aj regresné priamky zo spodnej koncentračnej oblasti [Obr. 8, Obr. 9, Obr. 10].

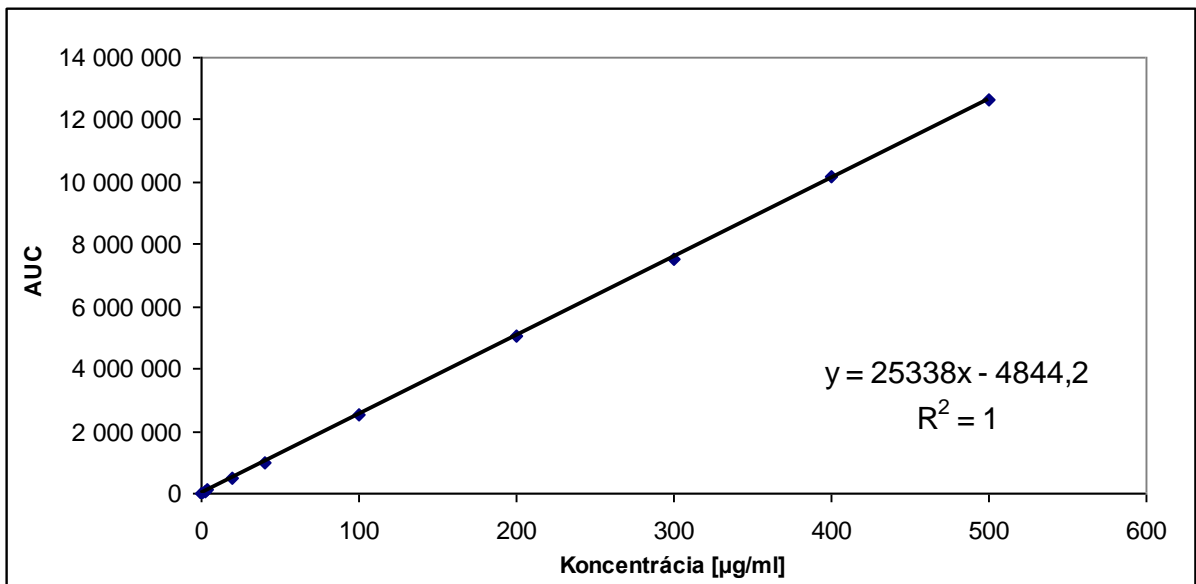
RSD až na dve výnimky (B-2  $\mu\text{g/ml}$  = 4,25%; D-0,4  $\mu\text{g/ml}$  = 2,52%) nepresiahli 1,3%.

Koncentrácia [ug/ml]	AUC Bis-demetoxykurkumín	AUC Demetoxykurkumín	AUC Kurkumín	AUC Suma
500	2 571 664	12 669 838	59 835 395	75 076 897
400	2 068 422	10 184 273	48 457 133	60 709 828
300	1 522 582	7 533 992	36 032 257	45 088 831
200	1 028 564	5 036 362	24 118 819	30 183 746
100	514 353	2 519 547	12 093 746	15 127 646
40	206 897	1 011 804	4 861 602	6 080 303
20	105 249	514 414	2 466 682	3 086 345
4	22 535	108 586	523 846	654 967
2	10 449	51 642	248 353	310 444
0,4	-----	10 135	47 107	-----
0,2	-----	-----	21 443	-----
0,02	-----	-----	-----	-----

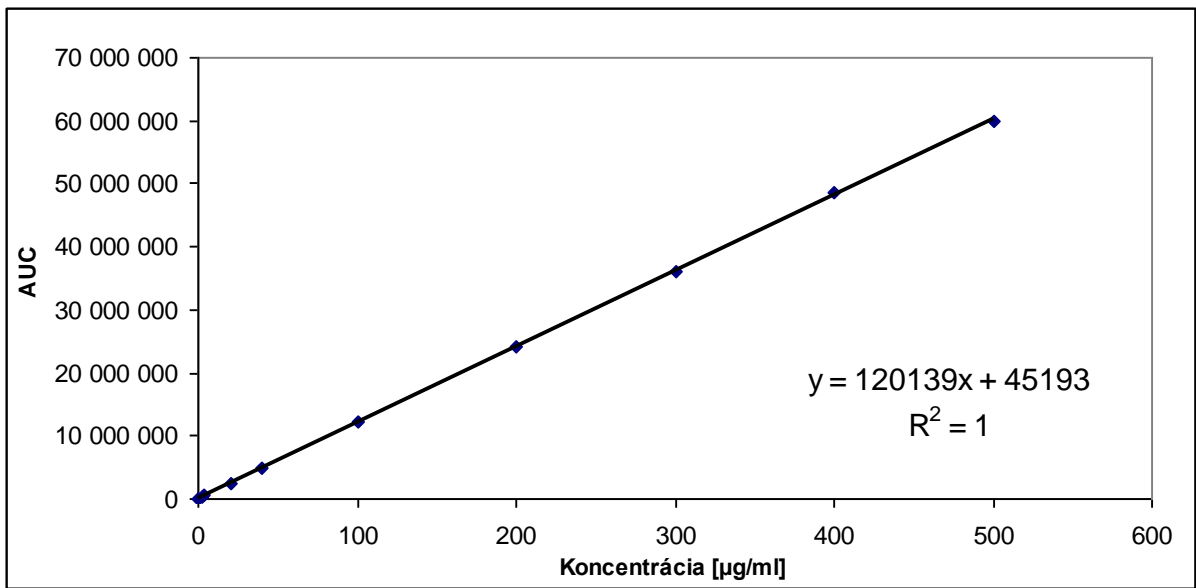
Tab. 13 – Vplyv koncentrácie kurkumínu na veľkosť plôch pod píkmami AUC; manuálna integrácia



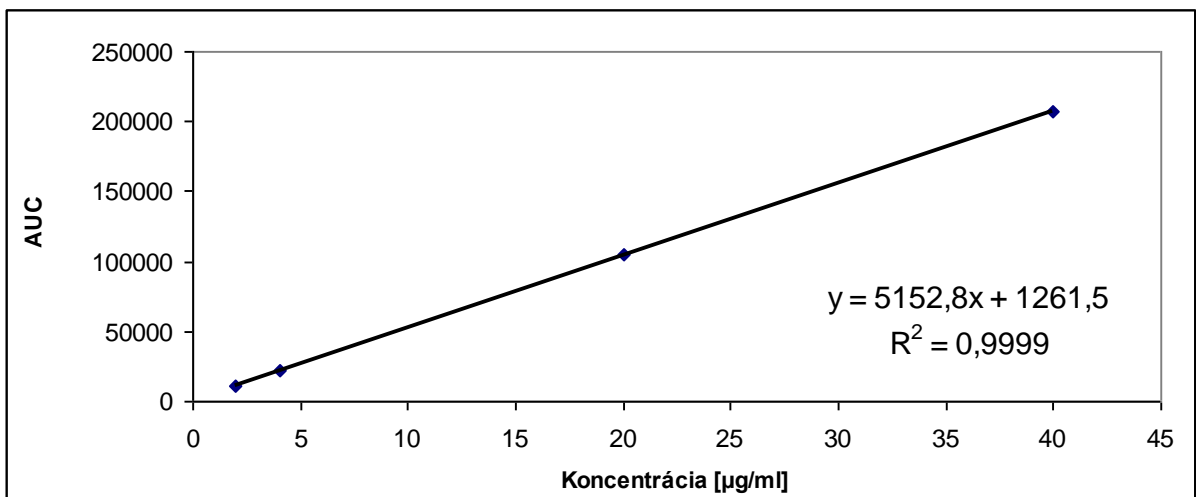
Obr. 5 – Lineárna regresia *bis-demetoxykurkumínu*



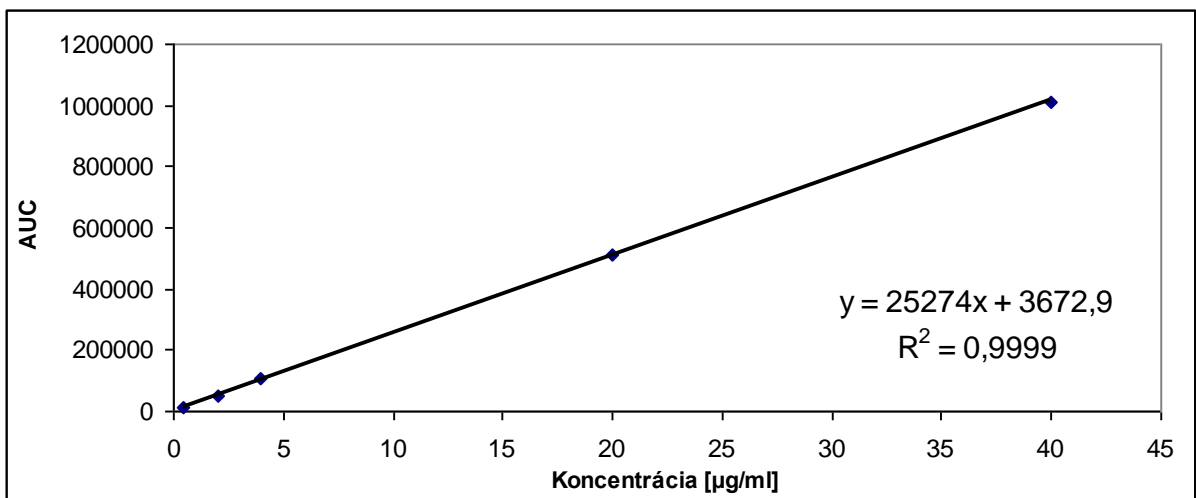
Obr. 6 – Lineárna regresia *demetoxykurkumínu*



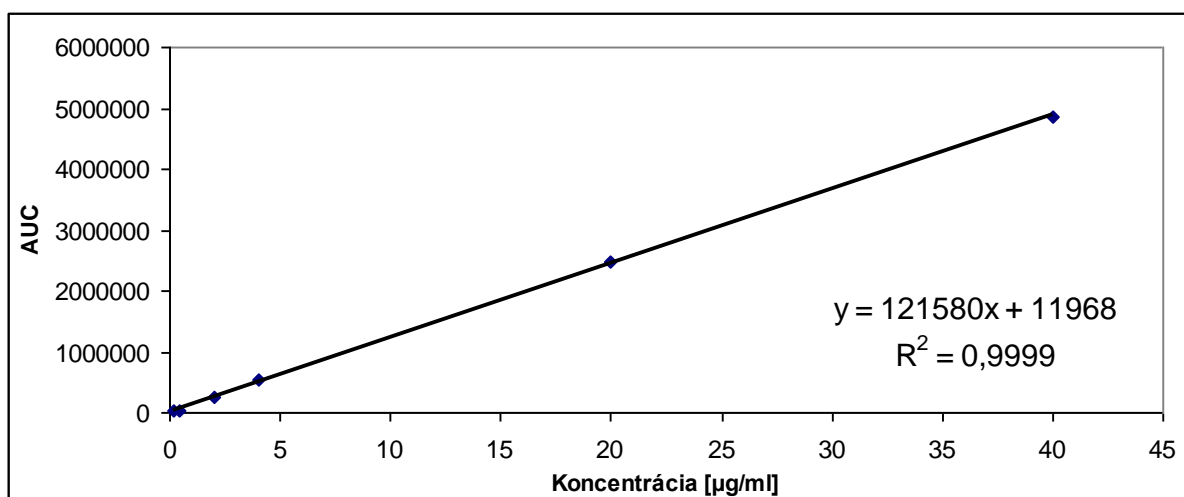
Obr. 7 – Lineárna regresia kurkumínu



Obr. 8 – Lineárna regresia bis-demetoxykurkumínu v rozsahu 40 – 2 µg/ml



Obr. 9 – Lineárna regresia demetoxykurkumínu v rozsahu 40 – 0,4 µg/ml



Obr.10 – Lineárna regresia demutoxykurkumínu v rozsahu 40 – 0,2 µg/ml

### 5.3.3. Správnosť – vid' [Tab. 14]

	Nastrieknutie	Recovery B [%]	Recovery D [%]	Recovery C [%]	Recovery Suma [%]
Model č.1	1/4	98,72	101,19	102,02	101,77
	2/4	102,36	100,18	100,79	100,74
	3/4	100,12	100,81	101,54	101,37
	4/4	100,20	101,16	101,41	101,33
Model č.2	1/4	97,96	99,30	100,26	100,02
	2/4	98,09	100,16	100,87	100,66
	3/4	96,70	99,96	100,50	100,28
	4/4	100,15	100,51	101,01	100,90
Model č.3	1/4	96,65	96,37	96,93	96,83
	2/4	95,57	97,36	97,45	97,37
	3/4	96,30	97,41	97,96	97,81
	4/4	98,23	97,99	99,65	99,33
Model č.4	1/4	100,33	98,23	99,22	99,09
	2/4	99,31	98,39	99,91	99,64
	3/4	94,92	99,35	99,52	99,34
	4/4	100,71	99,52	99,60	99,62
Model č.5	1/4	99,74	99,84	101,00	100,77
	2/4	97,76	99,59	100,75	100,46
	3/4	100,57	100,02	101,11	100,91
	4/4	99,25	99,85	100,94	100,70
	<b>Priemer</b>	<b>98,68</b>	<b>99,36</b>	<b>100,12</b>	<b>99,95</b>
	<b>SD</b>	1,944	1,327	1,373	1,347
	<b>RSD%</b>	<b>1,97</b>	<b>1,34</b>	<b>1,37</b>	<b>1,35</b>

Tab. 14 – Štatistické spracovanie dosiahnutej výťažnosti pre jednotlivé látky ako aj pre súčet



### 5.3.4. Presnosť metódy a opakovateľnosť nastrieknutia – vid' [Tab. 15],[Tab. 16]

Model/ Nastrieknutie	AUC B	AUC D	AUC C	AUC Suma	RSD B [%]	RSD D [%]	RSD C [%]	RSD Suma [%]
1/1	20581	107097	517801	645479	1,499	0,465	0,498	0,419
1/2	21340	106028	511566	638934				
1/3	20872	106693	515324	642888				
1/4	20890	107063	514677	642630				
2/1	20423	105098	508850	634371	1,452	0,509	0,343	0,388
2/2	20450	106008	511968	638426				
2/3	20160	105793	510056	636008				
2/4	20878	106379	512670	639928				
3/1	20150	101998	491939	614087	1,164	0,691	1,206	1,099
3/2	19924	103043	494581	617548				
3/3	20077	103101	497162	620340				
3/4	20480	103714	505778	629972				
4/1	20917	103967	503578	628462	2,698	0,665	0,285	0,261
4/2	20703	104137	507086	631926				
4/3	19789	105155	505073	630017				
4/4	20996	105335	505481	631812				
5/1	20793	105670	512629	639093	1,187	0,177	0,153	0,190
5/2	20381	105404	511324	637109				
5/3	20967	105858	513187	640011				
5/4	20692	105677	512294	638663				
<b>Celkovo</b>					<b>1,970</b>	<b>1,335</b>	<b>1,371</b>	<b>1,348</b>

Tab. 15 – Plochy pod píkmí a vypočítané relatívne smerodajné odchýlky v rámci validácie presnosti metódy

Nastrieknutie	AUC B	AUC D	AUC C	AUC Suma	RSD B [%]	RSD D [%]	RSD C [%]	RSD Suma [%]
1/1	20524	106172	508692	635388	0,749	0,654	0,080	0,169
2/1	20392	105133	508030	633556				
3/1	20699	104867	507948	633514				
1/2	20449	105806	507827	634082	0,290	0,193	0,065	0,076
2/2	20381	105521	507736	633639				
3/2	20500	105411	507215	633126				
1/3	20651	104798	508393	633842	0,913	0,792	0,045	0,113
2/3	20638	106348	508148	635135				
3/3	20973	105038	507940	633951				
<b>Celkovo</b>					<b>0,907</b>	<b>0,530</b>	<b>0,082</b>	<b>0,119</b>

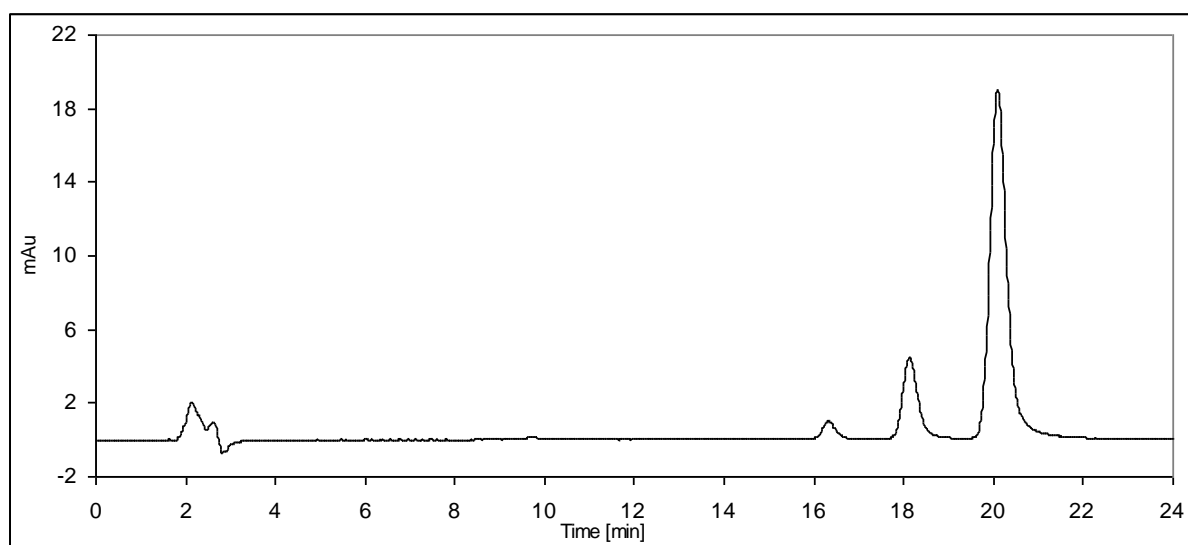
Tab. 16 – Doloženie opakovateľnosti nastrieknutia

### 5.3.5. Limit detekcie a kvantifikácie – vid' [Tab. 17]

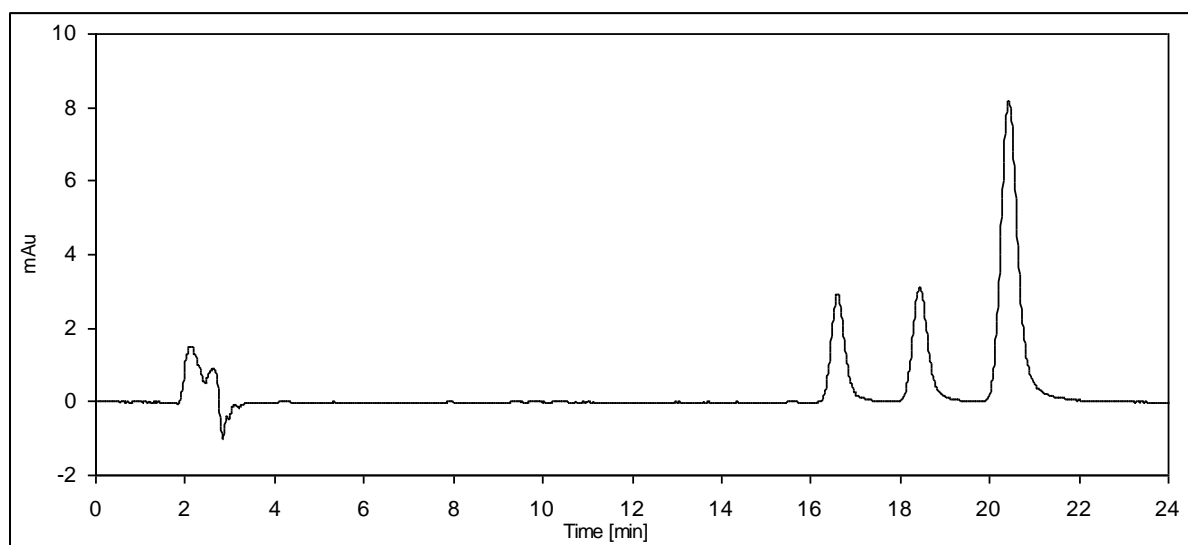
	Limit detekcie		Limit kvantifikácie	
	[ng/ml]	S/N	[ng/ml]	S/N
Bis-demetoxykurkumín	400	4,6	2000	21,0
Demetoxykurkumín	200	9,6	400	19,1
Kurkumín	20	5,9	200	36,0

Tab. 17 – Limity detekcie a kvantifikácie, stanovené podľa vypočítaných hodnôt pomeru S/N (signál/šum)

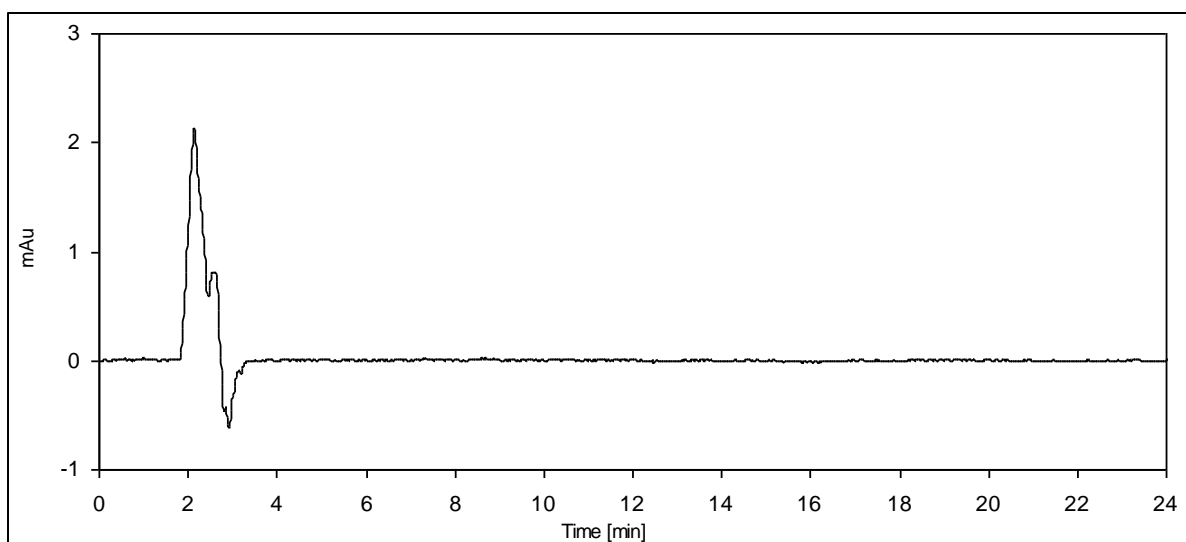
### 5.3.6. Selektivita



Obr. 11 – Chromatogram roztoku štandardu (B – 16,3min; D – 18,1min; C – 20,1min)



Obr. 12 – Chromatogram roztoku vzorky *Radix curcumae pigmenta* (B – 16,6min; D – 18,4min; C – 20,4min)



**Obr. 13** – Chromatogram roztoku blanku (metanol)

## **5.4. Výsledky – Fluorescenčný detektor**

### **5.4.1. Extrakcia kurkuminoidov z modelového vzorku**

Dáta, ktoré boli získané z fluorescenčného (RF) detektoru korešpondujú so závermi z UV-VIS detekcie. Metodika použitá pri extrakcii bola samozrejme usporiadaná tak, aby bola analyzovaná taká vzorka kurkumínu, ktorá pochádza takpovediac „z jedného zdroja“. Umožňuje to vyjadriť súčet plôch pod píkmi AUC ako sumu kurkuminoidov. Všeobecne však platí, že z fluorescenčnej detekcie nie je možné na základe odozvy detektora určiť zastúpenie jednotlivých kurkuminoidov. Všetky tri látky sa totiž, ako sa pri analýze zistilo, líšia intenzitou produkovanej fluorescencie za daných podmienok.

Čo sa týka hodnôt RSD boli všetky tri spôsoby extrakcie vzáčne vyrovnané. Dohromady bolo v programe Microsoft Excel odhadnutých 45 RSD využitím funkcie „Smerodajná odchýlka – výber“, z ktorých iba 7 nepatrne presiahlo hranicu 1%. Zdá sa teda, že fluorescenčnou detekciou je možné dosiahnuť lepšiu presnosť.

Séria	Navážka vzorku [g]	Recovery [%]			
		B	D	C	Suma
1/5	0,9985	99,6	100,3	100,8	100,3
2/5	1,0083	98,5	99,1	99,7	99,1
3/5	1,0081	96,9	97,3	97,6	97,3
4/5	1,0121	99,2	99,1	99,6	99,3
5/5	0,9989	101,1	100,9	101,2	101,1
<b>Priemer</b>		<b>99,1</b>	<b>99,4</b>	<b>99,8</b>	<b>99,4</b>

Tab. 18 – Extrakcia modelovej vzorky metanolom

Séria	Navážka vzorku [g]	Recovery [%]			
		B	D	C	Suma
1/5	0,9929	96,7	95,3	95,6	96,0
2/5	1,0029	99,0	97,5	97,6	98,1
3/5	1,0028	98,1	96,5	96,4	97,1
4/5	0,9971	93,1	91,6	91,7	92,2
5/5	1,0000	94,3	92,9	93,1	93,6
<b>Priemer</b>		<b>96,2</b>	<b>94,7</b>	<b>94,9</b>	<b>95,3</b>

Tab. 19 – Extrakcia modelovej vzorky 0,1 mol/l roztokom NaOH v metanole

Séria	Navážka vzorku [g]	Recovery [%]			
		B	D	C	Suma
1/5	1,0038	94,1	92,0	90,9	92,4
2/5	1,0059	91,2	89,1	88,1	89,5
3/5	1,0013	92,9	90,3	88,8	90,7
4/5	0,9998	94,2	91,7	89,8	91,9
5/5	0,9961	93,8	91,1	89,1	91,3
<b>Priemer</b>		<b>93,2</b>	<b>90,8</b>	<b>89,3</b>	<b>91,1</b>

Tab. 20 – Extrakcia modelovej vzorky 0,1 mol/l roztokom NaOH vo vode

#### 5.4.2. Linearita – vid' [Tab. 21]

Detekcia fluorescencie znamenala výrazné zvýšenie citlivosti. V koncentráciách od 200 µg/ml vyššie to však vyústilo k presýteniu detektoru. Po linearizácii sa to prejavilo znížením smernice priamky a významne to ovplyvnilo koeficient korelácie. Vyplýva z toho, že použitie RF detekcie je vhodné až po dostatočnom zriedení.

Ako môžeme vidieť z parametrov priamok a mocnín koeficientov korelácie [Obr. 14 až Obr. 19], linearita je potvrdená vo všetkých prípadoch s dostatočnou koreláciou. Veľmi solidne korelácie boli určené aj pri nepatrných koncentráciách na úrovni stoviek ng/ml.

Ďalšou špecifickou vlastnosťou RF detekcie kurkumínoidov je nemožnosť určiť ich celkový obsah zo súčtu AUC. Preto neuvádzam stĺpec so sumou trojice látok.

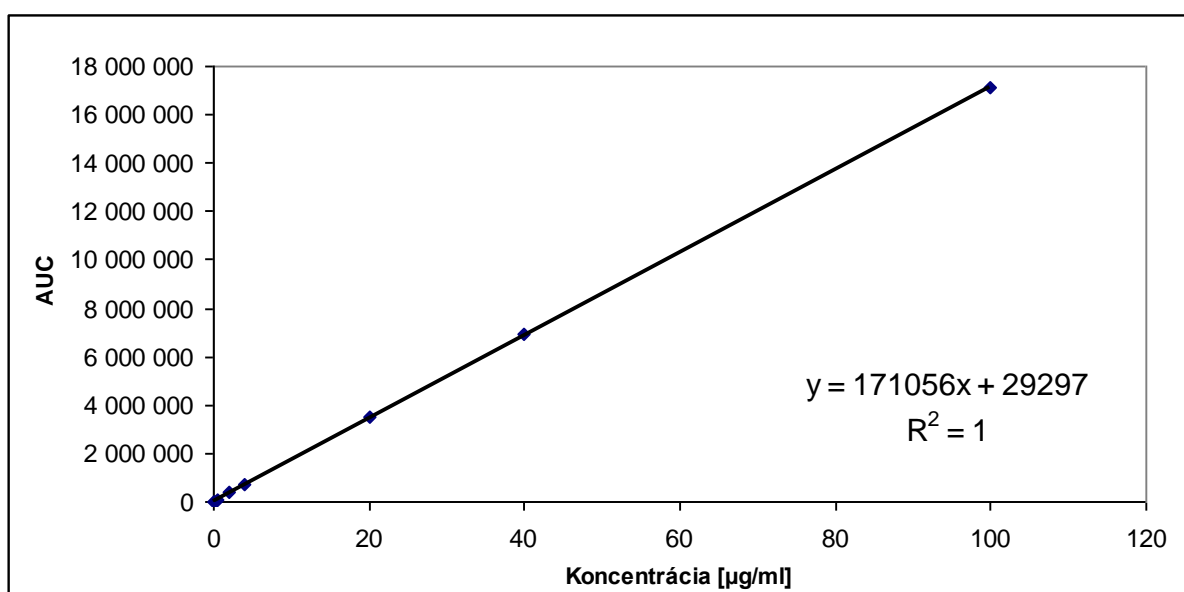
RSD boli podobne ako pri UV detekcii vo väčšine prípadov menšie ako 1%.

Na úrovni 0,2 µg/ml sa jednotlivé RSD pohybovali nasledovne: 3% B; 1,7% D; 1,3% C.

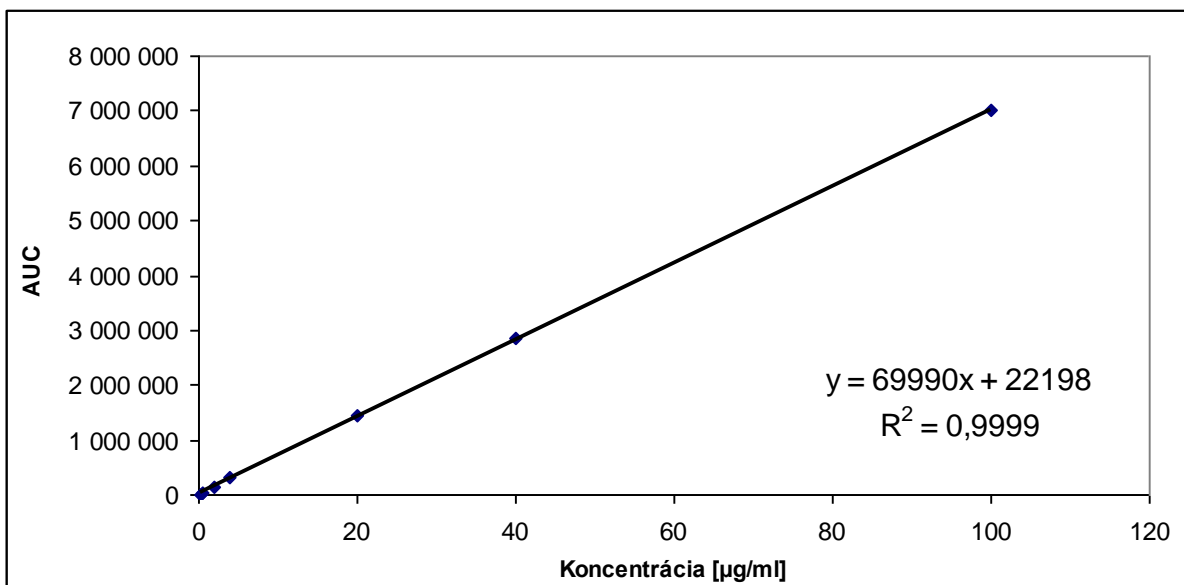
Na poslednej hladine sú obe RSD vysoké: 7,8% pre B; 5,3% pre C.

Koncentrácia [µg/ml]	AUC Bis-demetoxykurkumín	AUC Demetoxykurkumín	AUC Kurkumín
100	17 110 768	7 002 454	17 275 255
40	6 903 439	2 851 810	7 203 476
20	3 502 131	1 455 130	3 701 953
4	751 278	314 855	796 641
2	358 897	151 600	380 849
0,4	69 567	27 015	70 032
0,2	34 608	12 919	30 874
0,02	5 119	-----	4 856

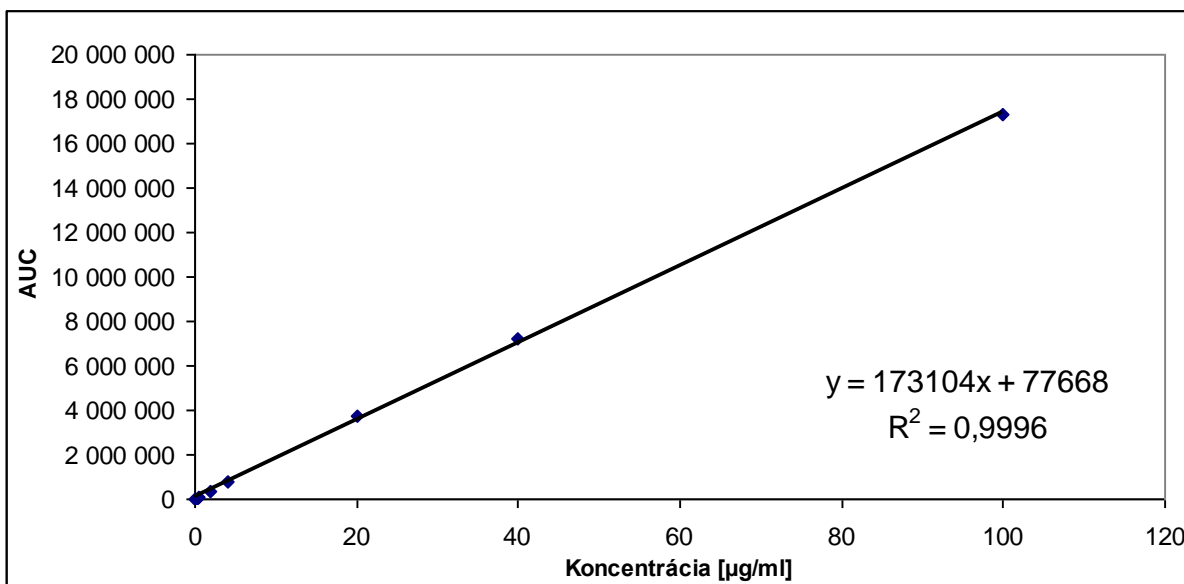
Tab. 21 – Vplyv koncentrácie kurkumínu na veľkosť plôch pod píkmí AUC; manuálna integrácia



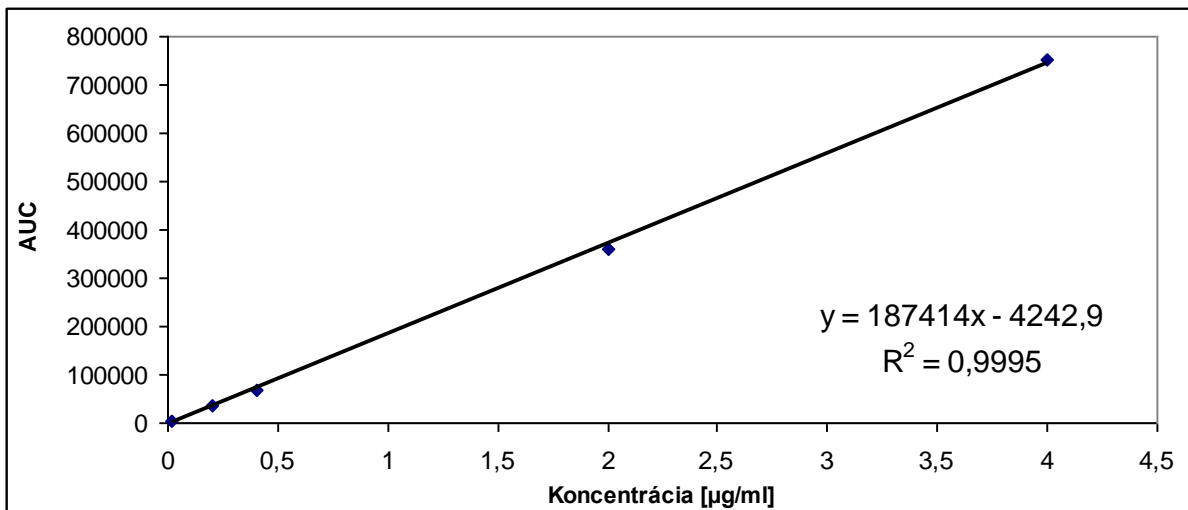
Obr. 14 – Lineárna regresia bis-demetoxykurkumínu



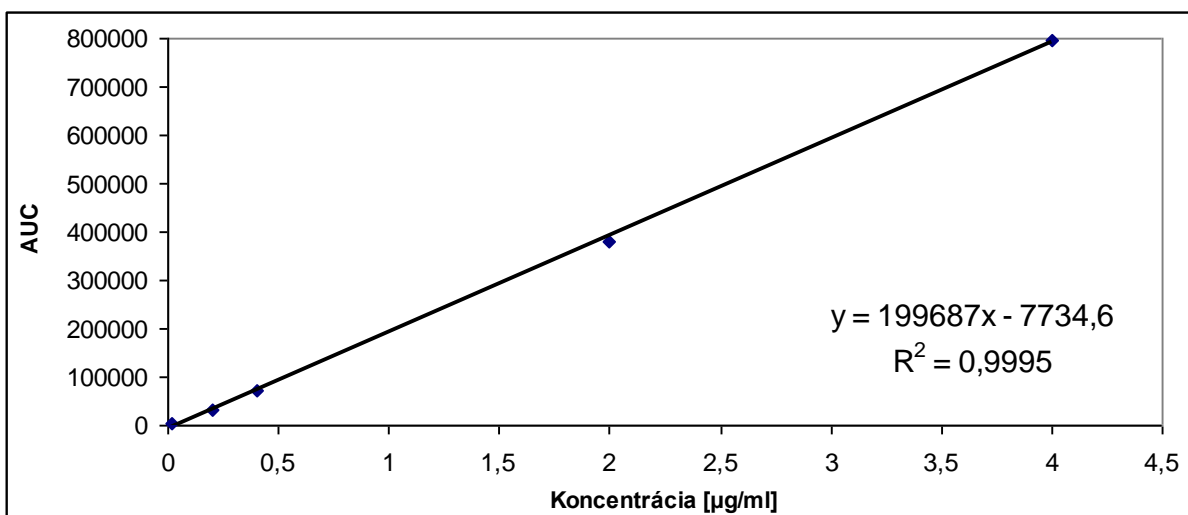
Obr. 15 – Lineárna regresia *demetoxykurkumínu*



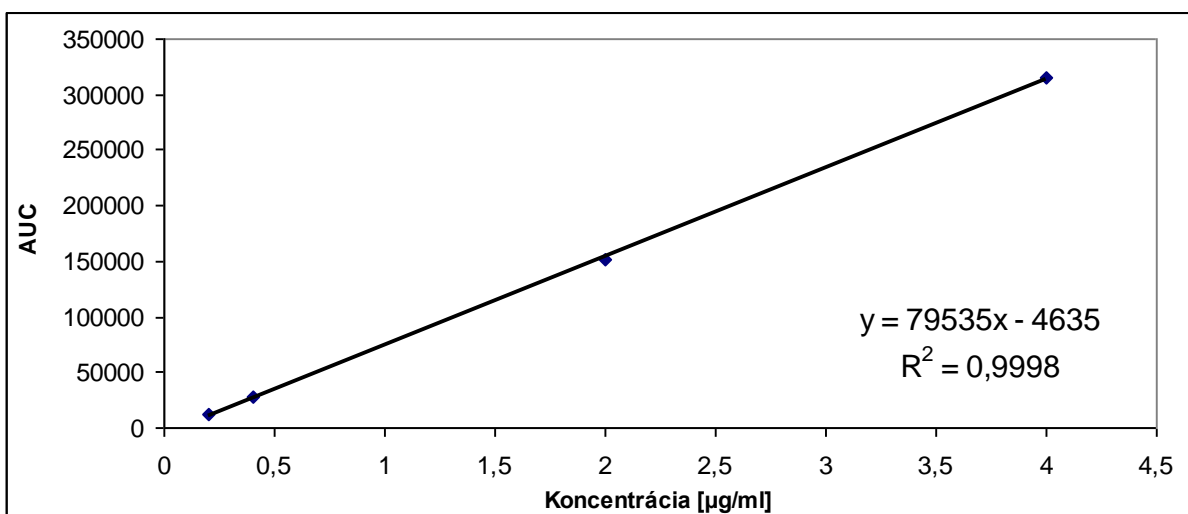
Obr. 16 – Lineárna regresia *kurkumínu*



Obr. 17 – Lineárna regresia *bis-demetoxykurkumínu* v rozsahu 4 – 0,02 µg/ml



Obr. 18 – Lineárna regresia *demetoxykurkumínu* v rozsahu 4 – 0,2 µg/ml



Obr. 19 – Lineárna regresia *kurkumínu* v rozsahu 4 – 0,02 µg/ml

### 5.4.3. Správnosť – vid' [Tab. 22]

	Nastrieknutie	Recovery B [%]	Recovery D [%]	Recovery C [%]	Recovery Suma [%]
Model č.1	1/4	100,64	101,30	101,67	101,19
	2/4	99,14	99,98	100,40	99,82
	3/4	99,39	99,96	100,62	100,01
	4/4	99,37	99,95	100,70	100,04
Model č.2	1/4	98,11	98,68	99,26	98,70
	2/4	98,65	99,24	99,83	99,26
	3/4	98,19	98,88	99,54	98,88
	4/4	99,12	99,72	100,22	99,70
Model č.3	1/4	95,73	96,39	96,46	96,16
	2/4	96,33	96,75	97,07	96,72
	3/4	96,81	97,10	97,54	97,18
	4/4	98,80	98,89	99,35	99,05
Model č.4	1/4	98,72	98,90	99,28	98,99
	2/4	99,14	99,33	99,63	99,38
	3/4	99,30	99,21	99,61	99,42
	4/4	99,47	99,14	99,73	99,52
Model č.5	1/4	100,96	100,91	101,30	101,10
	2/4	100,88	100,58	100,82	100,80
	3/4	101,29	101,35	101,43	101,36
	4/4	101,13	100,78	101,17	101,09
	<b>Priemer</b>	<b>99,06</b>	<b>99,35</b>	<b>99,78</b>	<b>99,42</b>
	<b>SD</b>	1,534	1,392	1,414	1,443
	<b>RSD%</b>	<b>1,55</b>	<b>1,40</b>	<b>1,42</b>	<b>1,45</b>

Tab. 22 – Štatistické spracovanie dosiahnutej výťažnosti pre jednotlivé látky ako aj pre súčet

### 5.4.4. Presnosť metódy a opakovateľnosť nastrieknutia – vid' [Tab. 23], [Tab. 24]

Vzorka/ Nastrieknutie	AUC B	AUC D	AUC C	AUC Suma	RSD B [%]	RSD D [%]	RSD C [%]	RSD Suma [%]
1/1	708010	300903	768809	1777723	0,681	0,667	0,560	0,624
1/2	697460	296982	759167	1753608				
1/3	699235	296926	760838	1756999				
1/4	699109	296878	761470	1757457				
2/1	690252	293129	750530	1733911	0,475	0,461	0,413	0,444
2/2	694055	294777	754836	1743668				
2/3	690786	293704	752653	1737143				
2/4	697363	296217	757810	1751390				



3/1	673506	286316	729398	1689220	1,371	1,141	1,276	1,291
3/2	677688	287390	733977	1699055				
3/3	681118	288431	737577	1707126				
3/4	695073	293743	751256	1740072				
4/1	694545	293782	750685	1739012	0,322	0,179	0,198	0,235
4/2	697481	295037	753361	1745879				
4/3	698592	294686	753196	1746474				
4/4	699800	294477	754112	1748389				
5/1	710322	299730	766004	1776056	0,181	0,322	0,258	0,225
5/2	709702	298777	762383	1770862				
5/3	712620	301051	766971	1780642				
5/4	711475	299364	764966	1775805				
<b>Celkovo</b>					<b>1,549</b>	<b>1,401</b>	<b>1,417</b>	<b>1,451</b>

**Tab. 23** – Plochy pod píkmí a vypočítané relatívne smerodajné odchýlky v rámci validácie presnosti

Nastrieknutie	AUC B	AUC D	AUC C	AUC Suma	RSD B [%]	RSD D [%]	RSD C [%]	RSD Suma [%]
1/1	697781	296270	756559	1750611	0,233	0,384	0,404	0,299
2/1	697443	295017	751004	1743464				
3/1	694820	294009	751632	1740461				
1/2	707924	297546	757162	1762633	0,064	0,185	0,127	0,103
2/2	708593	298249	757096	1763937				
3/2	708791	298637	758794	1766223				
1/3	703882	291344	744561	1739788	0,294	0,319	0,270	0,278
2/3	702866	292203	744502	1739571				
3/3	699907	290349	741051	1731306				
<b>Celkovo</b>					<b>0,749</b>	<b>1,042</b>	<b>0,879</b>	<b>0,728</b>

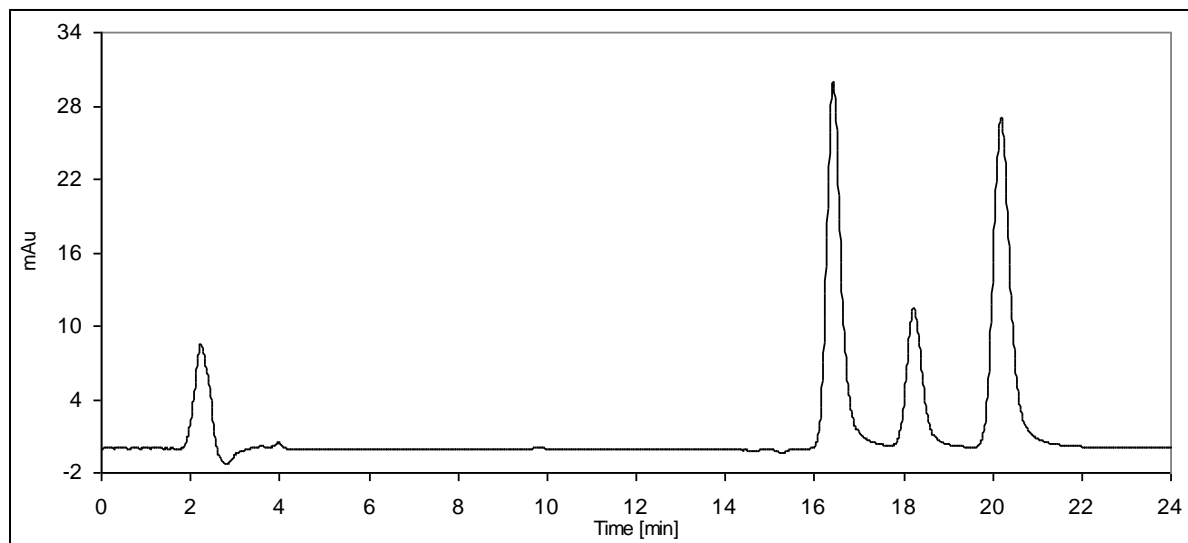
**Tab. 24** – Doloženie opakovateľnosti nastrieknutia

#### 5.4.5. Limit detekcie a kvantifikácie – vid' [Tab. 25]

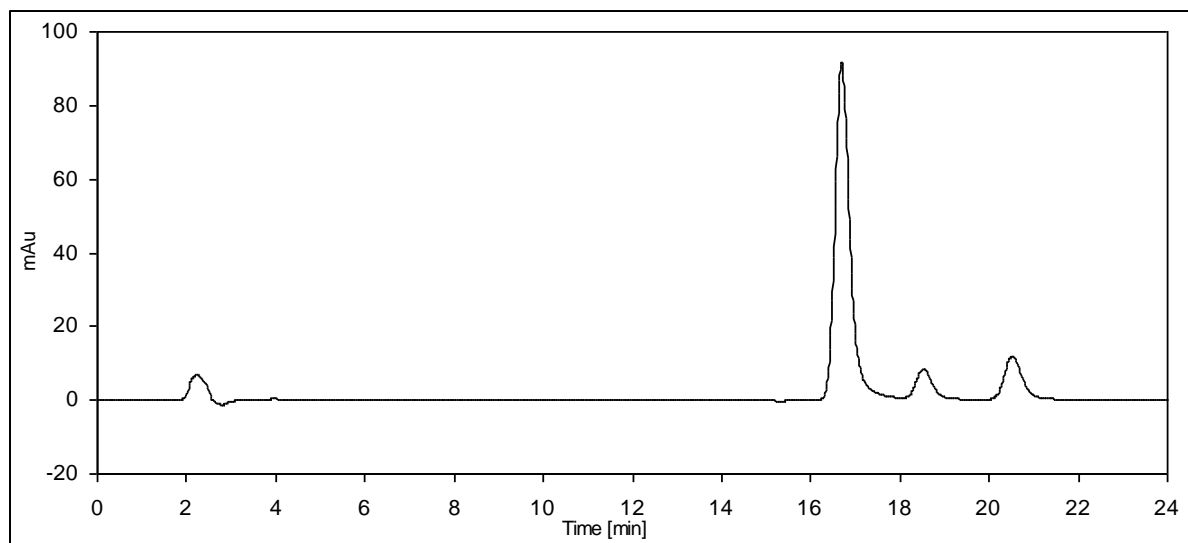
	Limit detekcie		Limit kvantifikácie	
	[ng/ml]	S/N	[ng/ml]	S/N
Bis-demetoxykurkumín	5	6,5	20	12,6
Demetoxykurkumín	20	5	200	30,0
Kurkumín	5	5,8	20	10,8

**Tab. 25** – Limity detekcie a kvantifikácie, stanovené podľa vypočítaných hodnôt pomeru S/N (signál/šum)

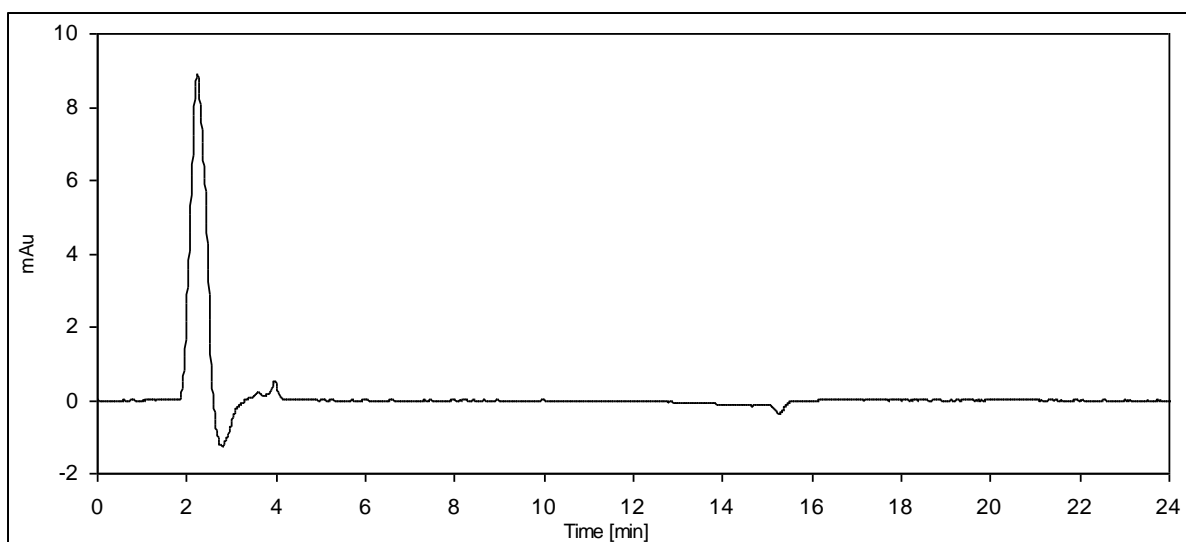
### 5.4.6. Selektivita



**Obr. 20** – Chromatogram roztoku štandardu (B – 16,4min; D – 18,2min; C – 20,2min)



**Obr. 21** – Chromatogram roztoku vzorky *Radicis curcumae pigmenta* (B – 16,7min; D – 18,5min; C – 20,5min)



Obr. 22 – Chromatogram roztoku blanku (metanol)

## 5.5. Hodnotenie obsahu kurkuminoidov v neznámych vzorkách

Na koniec experimentálnej časti by som chcel uviesť výsledky, ktoré boli dosiahnuté pri analýze rôznych dostupných materiálov s obsahom kurkuminoidov. Patria medzi ne:

- a) *Radix curcumae pigmenta* (RCP)
- b) Kurkumín technický
- c) Vzorka s obsahom kurkumínu 120% oproti štandardu
- d) Vzorka s obsahom kurkumínu 80% oproti štandardu

Všetky dostupné materiály boli pripravené a upravené pred analýzou totožným spôsobom, ktorý je uvedený v kap. 4.2.3.

Hodnotenie prebiehalo metódou vonkajšieho štandardu. Príprava štandardu je uvedená v kap. 4.2.2.4. (Tento roztok zároveň poslúžil k určeniu opakovateľnosti nastrieknutia.)

Bola použitá navážka štandardu 1,0028 g, ktorá bola pred HPLC analýzou upravená spôsobom uvedeným v kap. 4.2.3.

Každá neznáma vzorka bola po príprave dvakrát navážená a každá navážka bola po nariadení nastrieknutá na kolónu trikrát. Výsledky sú uvedené ako priemer každej navážky.

V tejto kapitole uvádzam dohromady oba druhy detekcie. Kým stanovenie obsahu pri UV-VIS detekcii neprinieslo žiadne problémy, bol pri detekovaní fluorescence odhalený neočakávaný jav. Všetky tri látky sa totiž výrazne odlišujú v intenzite produkovanej fluorescence za daných

podmienok. Keď si uvedomíme, že chemicky čistý kurkumín sa zatiaľ komerčne získať nedá, vyplýva nám z toho zaujímavá skutočnosť. Obsah kurkuminoïdov v prípade odlišných šarží nie je v priamej úmere k odozve RF detektora a tým k ploche pod píkmí. Naopak kvantifikácia je uskutočniteľná iba metódou vonkajšieho štandardu, ak vieme, že vonkajší štandard je chemicky totožný s neznámou vzorkou. To je však možné iba zriedkavo. Tento aspekt teda pravdepodobne veľmi výrazne redukuje potenciál fluorescenčnej detekcie (pre porovnanie identickej vzorky pozri Obr. 11 a Obr. 20, resp. Obr. 12 a Obr. 21).

Vzorka	AUC				Obsah [%]			
	B	D	C	Suma	B	D	C	Suma
<b>Štandard</b>	20579	105455	507992	634 026	100	100	100	100
<b>RCP</b>	65107	76039	225859	367 004	316,4	72,1	44,5	<b>57,9</b>
	64510	77034	230010	371 554	313,5	73,0	45,3	<b>58,6</b>
<b>Technický</b>	59612	119310	478388	657 311	289,7	113,1	94,2	<b>103,7</b>
	60650	122242	490833	673 725	294,7	115,9	96,6	<b>106,3</b>
<b>120% štandard</b>	24347	121480	586770	732 598	118,3	115,2	115,5	<b>115,5</b>
	25164	126600	611574	763 338	122,3	120,1	120,4	<b>120,4</b>
<b>80% štandard</b>	16946	85157	412054	514 157	82,3	80,8	81,1	<b>81,1</b>
	16759	84705	409229	510 694	81,4	80,3	80,6	<b>80,5</b>

**Tab. 26** – Percentuálny obsah kurkuminoïdov vo vzorkách získaný UV-VIS detektorom

Z [Tab. 27] vyplýva, že technický kurkumín vykazuje najvyšší obsah diarylheptanoïdov. Zaujímavým aspektom je jednoznačne najvyšší obsah bis-demetoxykurkumínu v *Radicis curcumae pigmenta*, ktorý predstavuje takmer 18% prítomného obsahu diarylheptanových farbív. Opačnou eventualitou je iba jeho 3%-podiel vo vzorke štandardu. Obsah zložky kurkumínu je proporcionálne najvyšší v štandarde – okolo 80%.

Namerané výsledky odhaľujú, že vzájomné zastúpenie troch kurkuminoïdov je dosť odlišné. Iba ak si porovnáme podiel látok v štandarde, 120% štandarde a 80% štandarde zistíme relatívnu zhodu v zastúpení. Ani nemusím pripomínať, že boli pripravené z rovnakého východzieho extraktu.

Vzorka	OBSAH [mg/g]			
	B	D	C	Suma
<b>Štandard</b>	0,081	0,416	2,003	2,500
<b>RCP</b>	0,257	0,300	0,891	<b>1,447</b>
	0,254	0,304	0,907	<b>1,465</b>
<b>Technický</b>	0,235	0,470	1,886	<b>2,592</b>
	0,239	0,482	1,935	<b>2,657</b>
<b>120% štandard</b>	0,096	0,479	2,314	<b>2,889</b>
	0,099	0,499	2,411	<b>3,010</b>
<b>80% štandard</b>	0,067	0,336	1,625	<b>2,027</b>
	0,066	0,334	1,614	<b>2,014</b>

**Tab. 27** – Obsah kurkumínoidov vo vzorkách v mg/g získaný UV-VIS detektorom

Hodnoty AUC namerané RF detektorom neuvádzam, lebo nesvedčia o skutočnom obsahu látok. Všimli sme si však, že odozva v RF detektore je výrazná hlavne pre bis-demetoxykurkumín. Oveľa slabšia je pre ostatné 2 látky. Preto som sa rozhodol v rámci diplomovej práce zo všetkých presných analýz určiť akési korekčné koeficienty, ktorými by sa potom dala odozva RF detektoru previesť na kvantite odpovedajúcu odozvu UV-VIS detektoru.

	RF/UV koeficient	SD	RSD%
Bis-demetoxykurkumín	33,549	0,4620	1,38
Demetoxykurkumín	2,850	0,0660	2,31
Kurkumín	1,491	0,0233	1,57

**Tab. 28** – Štatistické spracovanie korekčných koeficientov

Nasledujúca [Tab. 29] uvádza takýmto spôsobom prepočítané plochy pod píkmí na štandardné plochy pod píkmí UV-VIS detekcie. Uvádzam v nej vypočítané zastúpenie jednotlivých látok a tiež sumy farbív.

Vzorka	OBSAH [mg/g]			
	B	D	C	Suma
<b>Štandard</b>	0,083	0,411	2,005	<b>2,500</b>
<b>RCP</b>	0,255	0,318	0,906	<b>1,479</b>
	0,253	0,321	0,920	<b>1,494</b>
<b>Technický</b>	0,233	0,482	1,901	<b>2,617</b>
	0,240	0,494	1,950	<b>2,684</b>
<b>120% štandard</b>	0,096	0,476	2,317	<b>2,889</b>
	0,100	0,498	2,422	<b>3,021</b>
<b>80% štandard</b>	0,067	0,333	1,623	<b>2,023</b>
	0,066	0,331	1,613	<b>2,009</b>

**Tab. 29** – Obsah kurkuminoidov vo vzorkách v mg/g vypočítaný pomocou „korekčných koeficientov“ pre jednotlivé látky; pôvodné dáta získané RF detektorom

Pri porovnaní výsledkov, ktoré boli dosiahnuté dvoma nezávislými detektormi zistíme, že obsah látok je dostatočne podobný, a že by eventuálne bolo možné týmto spôsobom zabezpečiť presnú kvantifikáciu kurkumínu, demetoxykurkumínu i bis-demetoxykurkumínu. Na dôkaz, že analýzou rôznych koncentrácií tej istej vzorky môžeme stanoviť ich celkový obsah pomocou fluorescenčného detektora, dopĺňujem pre ilustráciu nasledujúcu [Tab. 30]. Ako si môžeme všimnúť, určiť exaktne podiel jednotlivých zlúčenín nie je bez „korekčných koeficientov“ mysliteľné.

Vzorka	AUC				OBSAH [mg/g]
	B	D	C	Suma	Suma
<b>Štandard</b>	702 445	294 847	751 373	1 748 666	<b>2,500</b>
<b>120% štandard</b>	807 119	341 003	868 348	2 016 470	<b>2,883</b>
	846 330	357 087	907 496	2 110 912	<b>3,018</b>
<b>80% štandard</b>	561 748	238 762	608 263	1 408 773	<b>2,014</b>
	558 747	236 865	604 219	1 399 830	<b>2,001</b>

**Tab. 30** – Plochy pod píkmami a celkový obsah kurkuminoidov získaný z RF detektora

## **6. ZÁVER**

- Do teoretickej časti som zahrnul literárnu rešerš, ktorá sa zaoberá skupinou látok okolo kurkumínu a podáva faktický prierez stavom jeho súčasného poznania. Myslím, že môže poslúžiť pri jeho ďalšom výskume ako výstižná šablóna, pretože odkazuje na väčšinu dostupnej literatúry, ktorú som pri hľadaní v informačnej databáze Pubmed a Sciencedirect našiel.
- Potenciál kurkumínu v medicíne vystihuje anglický citát: *The efficacy, pharmacologic safety and cost effectiveness of curcuminoids prompt us to "get back to our roots"* <sup>41</sup>.
- Presvedčili sme sa, že extrakcia z primárnych surovín je najefektívnejšia pri použití čistého metanolu ako extrakčného činidla. V konečnom dôsledku bola potvrdená o čosi nižšia účinnosť, ak sme kurkumín extrahovali reakciou so slabým roztokom hydroxidu sodného. Pritom lepšou alternatívou bol metanolový roztok hydroxidu než konvenčný vodný roztok. Nevýhodou oboch týchto spôsobov bolo pracnejšie prevedenie extrakcie a to z dôvodu spätného okyslenia takto vzniknutých roztokov.
- Overili sme, že prítomnosť antioxidantnej látky zlepšuje stabilitu pripravených roztokov. Z nameraných výsledkov vyplýva potvrdenie stability pri 50-násobnom prebytku antioxidantnej látky. Osvedčila sa molekula kyseliny askorbovej, kdežto tiosíran sodný nie je pre použitie v hydroxidových roztokoch kurkumínu vôbec vhodný.
- Na základe literárnej rešerše a menších predchádzajúcich skúsenostiach s analýzou bol navrhnutý chromatografický systém, v ktorom bolo hodnotenie uskutočnené metódou vonkajšieho štandardu:

kolóna	Symmetry RP C <sub>18</sub> (250 × 4,6 mm; 5 μm)
mobilná fáza	ACN : 0,025M fosfátový pufor – pH 2,6 (45 : 55)
prietok	1,05 ml/min
UV-VIS detekcia	422 nm
RF detekcia	ex. 422 nm, em. 525 nm
- Linearita je stanovená na veľkom intervale koncentrácií 500 – 0,02 μg/ml. UV-VIS detekcia sa vyznačuje univerzálnym použitím v celom rozsahu koncentračných hladín. Korelačné koeficienty vo všetkých prípadoch dosahujú pozoruhodných hodnôt okolo 0,9999. RF detekcia bola pri použití dostupného detektoru možná v koncentráciách ≤ 100 μg/ml. Vyznačuje sa rádovo vyššou citlivosťou a bola by preto vhodná pre stanovenie veľmi zriedených roztokov. Korelačné koeficienty sú vo všetkých prípadoch dostačujúce a to v intervale 0,9995 – 0,9999.



- Stanovili sme ďalej správnosť metódy. Priemerná recovery pre sumu kurkuminoidov bola 99,95% (UV-VIS) a 99,42% (RF).
- Je preskúšaná presnosť metódy – RSD pre sumu kurkuminoidov je 1,348 (UV-VIS) a 1,451 (RF).
- V rámci presnosti sme overili aj presnosť nastrieknutia – výstupným ukazovateľom je RSD: 0,119 (UV-VIS) a 0,758 (RF).
- Ponúkame aj limity detekcie pre jednotlivé kurkuminoidy. Zhruba platí, že RF detektor je schopný zaznamenať samotné látky v koncentrácii okolo 10 ng/ml. Spektrofotometria je obecné asi 20-krát menej citlivá.
- K posúdeniu selektivity sú uvedené chromatogramy vzorky a blanku. V prípade UV-VIS detekcie nie je pochyb o tom, že stanovenie je ničím nerušené. RF detekcia blanku však naznačuje pokles základnej línie asi 1 min pred eluovaním prvej látky bisdemetoxylkurkumínu. Rozlíšenie medzi píkmi kurkumových farbív je v oboch prípadoch rovné hodnote 3.
- Uvádžam aj vypočítané hodnoty faktorov symetrie pík. Symetria je dostačujúca pre liekopisné podmienky.
- Určité špecifiká sa vyskytujú pri použití RF detektora. Najzjavnejšie je to, že všetky tri látky sa výrazne líšia v intenzite produkovanej fluorescencie za daných podmienok. Ak vezmeme v úvahu, že kurkumín v širšom zmysle slova je dostupný iba ako zmes uvedenej trojice látok a že zastúpenie týchto zložiek sa navzájom dosť líši, tak nám z toho vyplýva fakt, že nie je možné látky a ani sumu farbív presne kvantifikovať. Jedinou výnimkou sa zdá byť použitie rovnakej vzorky kurkumínu ako vonkajšieho štandardu. Vtedy sa zo súčtu plôch pod píkmi dá vyvodiť na neznámu koncentráciu sumy farbív. Avšak usudzovať na zastúpenie jednotlivých látok je veľmi otáznе – navrhol som použitie korekčných koeficientov pre všetky látky, ktoré ukazujú ako citlivo tenktorý kurkuminoid fluoureskuje.

Dosiahnuté výsledky podávajú obraz o dostatočne presnej a reprodukovateľnej metóde hodnotenia pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. V žiadnej preštudovanej literatúre nie je zmienka o využití fluorescenčnej detekcie eluovaných látok. Možno aj preto sa práve tento spôsob detekcie ukazuje ako menej vhodný, nie však kvôli nedostatočným validačným parametrom, ale vyššie uvedenému záveru.

## Abstrakt

Kurkumín a jeho deriváty patria medzi farmakologicky účinné diarylheptanoidové zlúčeniny. Získavajú sa z rastlinných oddenkov rodu *Curcuma* spp. (*Zingiberaceae*), ktoré sú rozšírené v tropických regiónoch juhovýchodnej Ázie. Posledné desaťročia sa farmaceutická droga dostáva do povedomia vedeckých pracovníkov. Dokázali sa zaujímavé účinky na ľudský organizmus. Terapeuticky sa využíva cholagogický, antioxidačný a antiflogistický účinok. V posledných rokoch sa záujem orientuje na prevenciu a liečbu rakoviny a priaznivý vplyv pri Alzheimerovej chorobe. Po perorálnom podaní však dosahuje systémový obeh iba nepatrné množstvo kurkumínu.

V predkladanej práci sme vypracovali HPLC metódu stanovenia kurkuminoidov. Najlepším spôsobom extrakcie kurkumínových farbív z rastliny alebo extraktu je použitie metanolu ako pomerne polárneho rozpúšťadla. Vo vode je kurkumín prakticky nerozpustný. V alkalických vodných roztokoch sa prejavuje prítomnosť troch slabo kyslých vodíkov. Výslednú ionizáciu dokumentuje zmena farby roztoku zo žltej na červenú. Tieto podmienky pôsobia nepriaznivo na stabilitu kurkumínu – čiastočne je možné degradácii zabrániť použitím antioxidačnej látky a uchovávaním roztoku v tme.

Analýza prebehla na kolóne Symmetry RP C<sub>18</sub> metódou vonkajšieho štandardu. Použitá mobilná fáza bola zmesou acetonitrilu a 0,025 M fosfátového pufru (pH 2,6) v pomere 45 : 55. Metóda zahŕňala použitie dvoch detektorov. UV-VIS detekcia prebehla pri 422 nm. Fluorescenčná detekcia bola uskutočnená pri  $\lambda_{\text{ex}} = 422$  nm a  $\lambda_{\text{em}} = 525$  nm. Dosiadnuté validačné charakteristiky potvrdzujú, že vypracovaná metóda je dostatočne presná, citlivá a reprodukovateľná. Linearita odozvy bola stanovená v širokom rozsahu koncentrácií. Výhodou UV-VIS detekcie je možnosť stanoviť relatívne vysoké koncentrácie kurkuminoidov a korelácia odozvy detektora na koncentracii kurkuminoidu. Poskytuje rádovo nižší detekčný a kvantifikačný limit. Fluorescenčná detekcia umožňuje determinovať kurkumové farbivá na hladine 10 ng/ml. Každý jeden kurkuminoid sa však výrazne odlišuje svojou schopnosťou emitovať sekundárne žiarenie. Preto je za daných podmienok možné stanoviť obsah jednotlivých látok iba ak vzorka a štandard sú chemicky ekvivalentné.

Východiskom by mohla byť separácia kurkuminoidov zo zmesi (napr. preparatívne kolóny alebo HP-TLC) a následná analýza každej látky zvlášť. Získané údaje o intenzite produkovanej fluorescencie by dovolili hodnotiť obsah všetkých troch látok nezávisle na zdroji.

## **Abstract**

Curcumin with its derivatives belongs to pharmacologically acting diarylheptanoids. They are obtained from the herbal rhizomes of genus *Curcuma* spp. (*Zingiberaceae*), which are widespread in tropical regions of south-east Asia. For last decades the drug has been in focus of scientists. On the human organism there have been proven many interesting effects. Therapeutically are used its choleric, antioxidant and antiinflammatory activities. Nowadays the interest orientates to the prevention and treatment of cancer and to the favourable influence on Alzheimer's disease. After oral administration, however, curcumin achieves the system circulation only in traces.

In introduced study we developed HPLC method for the determination of curcuminoids. The most advantageous way is extracting the pigments from the herb or extract with methanol as relatively polar solvent. In the aqueous medium is practically insoluble. The presence of three acid hydrogens exhibits in the alkaline aqueous solutions. The resulting ionisation is documented by color change from yellow to red. These conditions prejudice the stability of the substance – in part we may prevent the degradation by using the antioxidants and keeping in dark place.

The analysis utilizes a reversed-phase C<sub>18</sub> column and involves the use of an external standard. A mobile phase consisted of 45% acetonitrile and 55% phosphate buffer 0,025M, adjusted to pH 2,6. Sample detection was achieved by two different detectors. UV-VIS detection has been run at 422 nm. The fluorescence detection at  $\lambda_{ex} = 422$  nm and  $\lambda_{em} = 525$  nm, respectively. The achieved validation parameters confirm that method is precise sensitive and robust sufficiently. The linearity has been demonstrated on a wide range of concentrations. The benefit of UV-VIS detection is ability to quantify relatively high concentration of curcuminoids and the correlation of AUC on the amount of single curcuminoids. However, it accords lower order detection and quantification limit. Conversely the fluorescence detection is able to determine the curcuma pigments at level 10 ng/ml. The individual substances are different by their capability of emitting the fluorescence. Thus, the amount of single curcuminoids is possible to determine only when the sample and the standard are chemically equal in these conditions.

Potentially, the single-curcuminoid separation from the mixture (e.g. preparative columns or HP-TLC) and subsequent analysis of each substance alone, is the right solution. The obtained fluorescence intensity data could allow the quantification of all three substances independently on the source.

## **7. LITERATÚRA**

- 
- <sup>1</sup> Trojan, S. et al. Lékařská fyziologie, 3. vydání. *Grada Publishing*, Praha (1999)
- <sup>2</sup> Wang, Y-J; Pan, M-H; Cheng, A-L; Lin, L-I; Ho, Y-S; Hsieh, Ch-Y; Lin, J-K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997), 1867 - 1876
- <sup>3</sup> Jahodář, L. Farmakobotanika, semenné rostliny. *Karolinum*, Praha (2006), 189
- <sup>4</sup> Tomko, J. et al. Farmakognózia. *Osveta*, Martin (1999)
- <sup>5</sup> Uehara, S.; Yasuda, I.; Takeya, K.; Itokawa, H. Terpenoids and curcuminoids of the rhizoma of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Yakugaku Zasshi* 112 (1992), 817 - 823
- <sup>6</sup> Český lékopis 2005. *Grada Publishing*, Praha (2005)
- <sup>7</sup> Vogel; Pelletier. *J. Pharm.* 2 (1815), 50
- <sup>8</sup> Lampe, V.; Milobedzka, J.; Kostanecki, V. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 43 (1910), 2163
- <sup>9</sup> Lampe, V.; Milobedzka, J. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 46 (1913), 2235
- <sup>10</sup> Pabon, H.J.J. A synthesis of curcumin and related compounds. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 83 (1964), 379 - 386
- <sup>11</sup> Negi, P.S.; Jayaprakasha, G.K.; Jagan Mohan Rao, L.; Sakariah, K.K. Antibacterial activity of turmeric oil : a byproduct of curcumin manufacture. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999), 4297 - 4300
- <sup>12</sup> Jayaprakasha, G.K.; Jagan Mohan Rao, L.; Sakariah, K.K. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002), 3668 - 3672
- <sup>13</sup> Thirumala-Devi, K.; Mayo, M.A.; Reddy, G.; Tangni, E.K.; Larondelle, Y.; Reddy, D.V. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Addit. Contam.* 18 (2001), 830 - 835
- <sup>14</sup> König, W. *J. prakt. Chem.* (1926), 112. In: Staab, H.A. Einführung in die theoretische organische Chemie. *Verlag Chemie*, Weinheim (1964), 4. vydanie
- <sup>15</sup> Kruse, J. Curcumin und synthetische Derivate als umgebungssensitive Fluoreszenzsonden. *Dizertačná práca, Kiel* (2003)
- <sup>16</sup> Bauer, J. Curcuminoide als potentielle biliäre Schwermetallausscheider – Synthese, Keto-Enol Tautomerie und Redoxverhalten. *Dizertačná práca, Kiel* (1996)
- <sup>17</sup> Khopde, S.M.; Priyadarsini, K.I.; Palit, D.K.; Mukherjee, T. Effect of solvent on the excited-state photophysical properties of curcumin. *Photochem. Photobiol.* 72 (2000), 625 - 631
- <sup>18</sup> Wang, F.; Yang, J.; Wu, X.; Wang, F.; Liu, S. Fluorescence enhancement of the protein – curcumin – sodium dodecylbenzen sulfonate system and protein determination. *Anal. Bioanal. Chem.* 385(2006), 139 - 145
- <sup>19</sup> Bernabe-Pineda, M.; Ramirez-Silva, M.T.; Romero-Romo, M.; Gonzalez-Vergara, E.; Rojas-Hernandez, A. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 60 (2004), 1091 - 1097
- <sup>20</sup> Tonnesen, H.H.; Karlsen, J. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 180 (1985a), 402 - 404
- <sup>21</sup> Tonnesen, H.H.; Karlsen, J. Studies on curcumin and curcuminoids. V. Alkaline degradation of curcumin. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 180 (1985b), 132 - 134
- <sup>22</sup> Tonnesen, H.H.; Karlsen, J.; Beijersbergen van Henegouwen, G. Studies on curcumin and curcuminoids. VIII. Photochemical stability of curcumin. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 183 (1986), 116 - 122
- <sup>23</sup> Ohta, T. Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Crit. Rev. Toxicol.* 23 (1993), 127 - 146
- <sup>24</sup> Liu, J.; Mori, A. Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. *Neuropharmacology* 32 (1993), 659 - 669
- <sup>25</sup> Tonnesen, H.H.; Måsson, M.; Loftsson, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int. J. Pharm.* 244 (2002), 127 - 135
- <sup>26</sup> Tonnesen, H.H. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVIII. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. *Pharmazie* 57 (2002), 820 - 824
- <sup>27</sup> Wahlstrom, B.; Blennow, G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 43 (1978), 86 - 92
- <sup>28</sup> Cheng, A-L; Hsu, C-H; Lin, J-K; Hsu, M-M; Ho, Y-F; Shen, T-S; Ko, J-Y; Lin, J-T; Lin, B-R; Wu, M-S; Yu, H-S; Jee, S-H; Chen, G-S; Chen, T-M; Chen, C-A; Lai, M-K; Pu, Y-S; Pan, M-H; Wang, Y-J; Tsai, C-C; Hsieh, C-Y. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 21 (2001), 2895 - 2900
- <sup>29</sup> Ravindranath, V.; Chandrasekhare, N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology* 16 (1980), 259 - 266
- <sup>30</sup> Liu, A.; Lou, H.; Zhao, L.; Fan, P. Validated LC-MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006), 720 - 727

- <sup>31</sup> Paradkar, A.; Ambike, A.A.; Jadhav, B.K.; Mahadik, K.R. Characterization of curcumin-PVP solid dispersion obtained by spray drying. *Int. J. Pharm.* 271 (2004), 281 - 286
- <sup>32</sup> Shoba, G.; Joy, D.; Joseph, T.; Majeed, M.; Rajendran, R.; Srinivas, P.S. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* 64 (1998), 353 - 356
- <sup>33</sup> Kumar, V.; Lewis, S.A.; Mutalik, S.; Shenoy, D.B.; Venkatesh; Udupa, N. Biodegradable microspheres of curcumin for treatment of inflammation. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 46 (2002), 209 - 217
- <sup>34</sup> Asai, A.; Miyazawa, T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sci.* 67 (2000), 2785 - 2793
- <sup>35</sup> Ireson, C.R.; Jones, D.L.J.; Orr, S.; Coughtrie, M.W.H.; Boocock, D.J.; Williams, M.L.; Farmer, P.B.; Steward, W.P.; Gescher, A.J. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 11 (2002), 105 - 111
- <sup>36</sup> Hoehle, S.I.; Pfeiffer, E.; Solyom, A.M.; Metzler, M. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006), 756 - 764
- <sup>37</sup> Okada, K.; Wangpoengtrakul, C.; Tanaka, T.; Toyokuni, S.; Uchida, K.; Osawa, T. Curcumin and Especially Tetrahydrocurcumin Ameliorate Oxidative Stress-Induced Renal Injury in Mice. *Jour. Of Nutr.* 131 (2001), 2090 - 2095
- <sup>38</sup> Conney, A.H.; Lou Y-R; Xie, J-G; Osawa, T.; Newmark, H.L.; Liu, Y.; Chang, R-L; Huang, M-T. Some perspectives on dietary inhibition of carcinogenesis: studies with curcumin and tea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216 (1997), 234 - 245
- <sup>39</sup> Kim, J-M; Araki, S.; Kim, D-J; Park, C-B; Takasuka, N.; Toriyama, H.B.; Ota, T.; Nir, Z.; Khachik, F.; Shimidzu, N.; Tanaka, Y.; Osawa, T.; Uraji, T.; Murakoshi, M.; Nishino, H.; Tsuda, H. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis* 19 (1998), 81 - 85
- <sup>40</sup> Majeed, M.; Badmaev, V.; Shivakumar, V.; Rajendran, R. Curcuminoid: Antioxidant Phytonutrients. *Nutriscience*, New Jersey (1995), str. 9, kap. 2
- <sup>41</sup> Shishodia, S.; Sethi, G.; Aggarwal, B.B. Curcumin: getting back to the roots. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1056 (2005), 206 - 217
- <sup>42</sup> Srimal, R.C. Turmeric: a brief review of medicinal properties. *Fytoterapia* 68 (1997), 483 - 493
- <sup>43</sup> Awasthi, S.; Pandya, U.; Singhal, S.S.; Lin, J-T; Thivyanathan, V.; Seifert, W.E. Jr; Awasthi, Y.C.; Ansari, G.A. Curcumin-glutathione interactions and the role of human glutathione S-transferase P1-1. *Chem. Biol. Interact.* 128 (2000), 19 - 38
- <sup>44</sup> Masuda, T.; Maekawa, T.; Hidaka, K.; Bando, H.; Takeda, Y.; Yamaguchi, H. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcumin: Analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001), 2539 - 2547
- <sup>45</sup> Masuda, T.; Hidako, K.; Shinohara, A.; Maekawa, T.; Takeda, Y.; Yamaguchi, H. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: Analysis of radical reaction products from curcumin. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999), 71 - 77
- <sup>46</sup> Mishra, B.; Priyadarsini, K.I.; Bhide, M.K.; Kadam, R.M.; Mohan, H. Reactions of superoxide radicals with curcumin: Probable mechanisms by optical spectroscopy and EPR. *Free Radic. Res.* 38 (2004), 355 - 362
- <sup>47</sup> Lantz, R.C.; Chen, G.J.; Solyom, A.M.; Jolad, S.D.; Timmermann, B.N. The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. *Phytomedicine* 12 (2005), 445 - 452
- <sup>48</sup> Prasad, N.S.; Raghavendra, R.; Lokesh, B.R.; Naidu, K.A. Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70 (2004), 521 - 528
- <sup>49</sup> Funk, J.L.; Oyarzo, J.N.; Frye, J.B.; Chen, G.; Clark Lantz, R.; Jolad, S.D.; Solyom, A.M.; Timmermann, B. Turmeric Extracts Containing Curcuminoids Prevent Experimental Rheumatoid Arthritis. *J. Nat. Prod.* 69 (2006), 351 - 355
- <sup>50</sup> Prucksunand, C.; Indrasukhsri, B.; Leethochawalit, M.; Hungspreugs, K. Phase II clinical trial on effect of the long turmeric (*Curcuma longa* Linn) on healing of peptic ulcer. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 32 (2001), 208 - 215
- <sup>51</sup> Kim, D-C; Kim, S-H; Choi, B-H; Baek, N-I; Kim, D.; Kim, M-J; Kim, K-T. *Curcuma longa* extract protects against gastric ulcers by blocking H2 histamine receptors. *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2005), 2220 - 2224
- <sup>52</sup> Mazumder, A.; Raghavan, K.; Weinstein, J.; Kohn, K.W.; Pommier, Y. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochem. Pharmacol.* 49 (1995), 1165 - 1170
- <sup>53</sup> Divya, C.S.; Pillai, M.R. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Mol. Carcinog.* 45 (2006), 320 - 332
- <sup>54</sup> Rukayadi, Y.; Yong, D.; Hwang, J.K. In vitro anticandidal activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *J. Antimicrob. Chemother.* 57 (2006), 1231 - 1234

- <sup>55</sup> Gomes, D.C.; Alegrio, L.V.; Leon, L.L.; Lima, M.E.; Araujo, C.A. Synthetic derivatives of curcumin and their activity against *Leishmania amazonensis*. *Arzneimittelforschung*, 52 (2002), 120-124
- <sup>56</sup> Ferreira, L.A.F.; Henriques, O.B.; Andreoni, A.A.S.; Vital, G.R.F.; Campos, M.M.C.; Habermehl, G.G.; de Moraes, V.L.G. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Toxicon* 30 (1992), 1211-1218
- <sup>57</sup> Nadkarni, K.M. Indian Materia Medica. *Popular Prakashan*, Bombay (1976), 418-419
- <sup>58</sup> Egan, M.E.; Pearson, M.; Weiner, S.A.; Rajendran, V.; Rubin, D.; Glockner-Pagel, J.; Canny, S.; Du, K.; Lukacs, G.L.; Caplan, M.J. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 304 (2004), 600-602
- <sup>59</sup> Song, Y.; Sonawane, N.D.; Salinas, D.; Qian, L.; Pedemonte, N.; Galiotta, L.J.; Verkman, A.S. Evidence against the rescue of defective DeltaF508-CFTR cellular processing by curcumin in cell culture and mouse models. *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 40629 - 40633
- <sup>60</sup> Gilani, A.H.; Shah, A.J.; Ghayur, M.N.; Majeed, K. Pharmacological basis for the use of turmeric in gastrointestinal and respiratory disorders. *Life Sci.* 76 (2005), 3089 - 3105
- <sup>61</sup> Sasaki, Y.; Goto, H.; Tohda, C.; Hatanaka, F.; Shibahara, N.; Shimada, Y.; Terasawa, K.; Komatsu, K. Effects of curcuma drugs on vasomotion in isolated rat aorta. *Biol. Pharm. Bull.* 26 (2003), 1135 - 1143
- <sup>62</sup> Peschel, D.; Koerting, R.; Nass, N. Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. *J. Nutr. Biochem.* (2006) in press
- <sup>63</sup> Ramírez-Boscá, A.; Carrión Gutiérrez, M.A.; Soler, A.; Puerta, C.; Díez, A.; Quintanilla, E.; Bernd, A.; Miquel, J. Effects of the antioxidant turmeric on lipoprotein peroxides: implications for the prevention of atherosclerosis. *Age* 20 (1997), 165-168
- <sup>64</sup> Ramírez-Tortosa, M.C.; Mesa, M.D.; Aguilera, M.C.; Quiles, J.L.; Baro, L.; Ramírez-Tortosa, C.L.; Martínez-Victoria, J.; Gil, A. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL in rabbits and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 147 (1999), 371-378
- <sup>65</sup> Ramírez Boscá, A.; Soler, A.; Carrión-Gutiérrez, M.A.; Pamies Mira, D.; Pardo Zapata, J.; Díaz-Alperi, J.; Bernd, A.; Quintanilla Almagro, E.; Miquel, J. An hydroalcoholic extract of *Curcuma longa* lowers the abnormally high values of human-plasma fibrinogen. *Mech. Ageing Dev.* 114 (2000a), 207-210
- <sup>66</sup> Miquel, J.; Bernd, A.; Sempere, J.M.; Díaz-Alperi, J.; Ramírez-Boscá, A. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 34 (2002), 37 - 46
- <sup>67</sup> Kim, K.; Ryu, K.; Ko, Y.; Park, C. Effects of nuclear factor- $\kappa$ B inhibitors and its implication on natural killer T-cell lymphoma cells. *Br. J. Haematol.* 131 (2005), 59 - 66
- <sup>68</sup> Aggarwal, B.B.; Kumar, A.; Bharti, A.C. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 23 (2003), 363 - 398
- <sup>69</sup> Yoysungnoen, P.; Wirachwong, P.; Bhattarakosol, P.; Niimi, H.; Patumraj, S. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX-2 and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 34 (2006), 109 - 115
- <sup>70</sup> Gururaj, A.E.; Belakavadi, M.; Venkatesh, D.A.; Marme, D.; Salimath, B.P. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002), 934 - 942
- <sup>71</sup> Lev-Ari, S.; Maimon, Y.; Strier, L.; Kazanov, D.; Arber, N. Down-regulation of prostaglandin e2 by curcumin is correlated with inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human colon carcinoma cell lines. *J. Soc. Integr. Oncol.* 4 (2006), 21 - 26
- <sup>72</sup> Časopis 21. století, leden 2006, str.25
- <sup>73</sup> Simon, A.; Allais, D.P.; Duroux, J.L.; Basly, J.P.; Durand-Fontanier, S.; Delage, C. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure – activity relationship. *Cancer Lett.* 129 (1998), 111 - 116
- <sup>74</sup> Iersel, M.L.; Ploemen, J.P.; Struik, I.; van Amersfoort, C.; Keyzer, A.E.; Schefferlie, J.G.; van Bladeren, P.J. Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by alpha,beta-unsaturated carbonyl derivatives. Effects of acrolein, cinnamaldehyde, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethacrynic acid, and trans-2-hexenal. *Chem. Biol. Interact.* 102 (1996), 117 - 132
- <sup>75</sup> Inano, H.; Onoda, M.; Inafuku, N.; Kubota, M.; Kamada, Y.; Osawa, T.; Kobayashi, H.; Wakabayashi, K. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* 21 (2000), 1835-1841
- <sup>76</sup> Ohtsu, H.; Xiao, Z.; Ishida, J.; Nagai, M.; Wang, H-K; Itokawa, C.Y.S.; Shih, C.; Chiang, T.; Chang, E.; Lee, Y.; Tsai, M-Y; Chang, C.; Lee, K-H. Antitumor agents. 217. Curcumin analogues as novel androgen receptor antagonists with potential as anti-prostate cancer agents. *J. Med. Chem.* 45 (2002), 5037 - 5042
- <sup>77</sup> Chen, J.C.; Hwang, J.M.; Chen, G.W.; Tsou, M.F.; Hsia, T.C.; Chung, J.G. Curcumin decreases the DNA adduct formation, arylamines N-acetyltransferase activity and gene expression in human colon tumor cells (colo 205). *In Vivo* 17 (2003), 301 - 309

- <sup>78</sup> Garcea, G.; Berry, D.P.; Jones, D.J.; Singh, R.; Dennison, A.R.; Farmer, P.B.; Sharma, R.A.; Steward, W.P.; Gescher, A.J. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (2005), 120 - 125
- <sup>79</sup> Garcea, G.; Jones, D.J.; Singh, R.; Dennison, A.R.; Farmer, P.B.; Sharma, R.A.; Steward, W.P.; Gescher, A.J.; Berry, D.P. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br. J. Cancer* 90 (2004), 1011 - 1015
- <sup>80</sup> Lev-Ari, S.; Strier, L.; Kazanov, D.; Madar-Shapiro, L.; Dvory-Sobol, H.; Pinchuk, I.; Marian, B.; Lichtenberg, D.; Arber, N. Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005), 6738 - 6744
- <sup>81</sup> Sakano, K.; Kawanishi, S. Metal-mediated DNA damage induced by curcumin in the presence of human cytochrome P450 isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 405 (2002), 223 - 230
- <sup>82</sup> Lim, G-P; Chu, T.; Yang, F.; Beech, W.; Frautschy, S.A.; Cole, G.M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* 21 (2001), 8370 - 8377
- <sup>83</sup> Park, S-Y; Kim, D.S-H-L. Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: A drug discovery effort against Alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.* 65 (2002), 1227 - 1231
- <sup>84</sup> Atamna, H.; Boyle, K. Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: Relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006), 3381 - 3386
- <sup>85</sup> Ono, K.; Hirohata, M.; Yamada, M. Ferulic acid destabilizes preformed beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (2005), 444 - 449
- <sup>86</sup> Heng, M-C; Song, M-K; Harker, J.; Heng, M-K. Drug-induced suppression of phosphorylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. *Br. J. Dermatol.* 143 (2000), 937-949
- <sup>87</sup> Bernd, A.; Theilig, C.; Kippenberger, S.; Ramírez-Boscá, A.; Díaz, J.; Miquel, J.; Kaufmann, R. Effect of *Curcuma longa* extract on the expression of proinflammatory cytokines. *Skin Pharmacol. Appl. Skin. Physiol.* 13 (2000), 226
- <sup>88</sup> Jayadeep, V.R.; Arun, O.S.; Sudhakaran, P.R.; Menon, V.P. Changes in the prostaglandin levels in alcohol toxicity: effect of curcumin and *N*-acetylcysteine. *J. Nutr. Biochem.* 11 (2000), 509-514
- <sup>89</sup> Chai, H.; Yan, S.; Lin, P.; Lumsden, A.B.; Yao, Q.; Chen, C. Curcumin blocks HIV protease inhibitor ritonavir-induced vascular dysfunction in porcine coronary arteries. *J. Am. Coll. Surg.* 200 (2005), 820 - 830
- <sup>90</sup> Thoma, K. Verfahren zur Stabilisierung photoinstabiler Arzneistoffe sowie stabilisierte Arzneizubereitungen. *Offenlegungsschrift* (1983), DE 3136282 A1
- <sup>91</sup> Spielgies, H. Investigations on the photostability of cephalosporins and beta-lactamase inhibitors. *Thesis, Munchen* (1998), 89 - 92
- <sup>92</sup> Tonnesen, H.H.; Karlsen, J. Studies on curcumin and curcuminoids. X. The use of curcumin as a formulation aid to protect light-sensitive drugs in soft gelatin capsules. *Int. J. Pharm.* 38 (1987), 247 - 249
- <sup>93</sup> Jasim, F.; Ali, F. A novel and rapid method for the spectrofluorometric determination of curcumin in curcumin spices and flavors. *Microchemical Journal* 46 (1992), 209 - 214
- <sup>94</sup> Tonnesen, H.H.; Karlsen, J. High-performance liquid chromatography of curcumin and related compounds. *J. Chromatogr.* 259 (1983), 367 - 371
- <sup>95</sup> Hiserodt, R.; Hartman, T.G.; Ho, C-T; Rosen, R.T. Characterization of powdered turmeric by liquid chromatography – mass spectrometry and gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 740 (1996), 51 - 63
- <sup>96</sup> Cooper, T.H.; Clark, G.; Guzinski, J. Food Phytochemicals II: Teas, Spices, and Herbs. *American Chemical Society, Washington, DC* (1994), 231-236
- <sup>97</sup> Jiang, H.; Timmermann, B.N.; Gang, B.R. Use of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify diarylheptanoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) rhizome. *J. Chromatogr. A* 1111 (2006), 21 - 31
- <sup>98</sup> Jiang, H.; Somogyi, A.; Jacobsen, N.E.; Timmermann, B.N.; Gang, D.R. Analysis of curcuminoids by positive and negative electrospray ionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 20 (2006), 1001 - 1012
- <sup>99</sup> Ansari, M.J.; Ahmad, S.; Kohli, K.; Ali, J.; Khar, R.K. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005), 132 - 138
- <sup>100</sup> Wang, F.; Wu, X.; Wang, F.; Liu, S.; Jia, Z.; Yang, J. The sensitive fluorimetric method for the determination of curcumin using the enhancement of mixed micelles. *J. Fluoresc.* 16 (2005), 53 - 59
- <sup>101</sup> Yuan, K.; Weng, Q.; Zhang, H.; Xiong, J.; Xu, G. Application of capillary zone electrophoresis in the separations and determination of the curcuminoids in the urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005), 133 - 138



- <sup>102</sup> Sun, X.; Gao, C.; Cao, W.; Yang, X.; Wang, E. Capillary electrophoresis with amperometric detection of curcumin in Chinese herbal medicine pretreated by solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 962 (2002), 117 - 125
- <sup>103</sup> Lechtenberg, M.; Quandt, B.; Nahrstedt, A. Quantitative determination of curcuminoids in Curcuma rhizomes and rapid differentiation of Curcuma domestica Val. and Curcuma xanthorrhiza Roxb. by capillary electrophoresis. *Phytochem. Anal.* 15 (2004), 152 - 158
- <sup>104</sup> Nhujak, T.; Saisuwan, W.; Srisa-Art, M.; Petsom, A. Microemulsion electrokinetic chromatography for separation and analysis of curcuminoids in turmeric samples. *J. Sep. Sci.* 29 (2006), 666 - 676
- <sup>105</sup> Pak, Y.; Patek, R.; Mayersohn, M. Sensitive and rapid liquid isocratic chromatography method for the quantitation of curcumin in plasma. *J. Chromatogr. B* 796 (2003), 339 - 346
- <sup>106</sup> Heath, D.D.; Pruitt, M.A.; Brenner, D.E.; Rock, C.L. Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 783 (2003), 287 - 295
- <sup>107</sup> Su, S-L; Wu, Q-N; Ouyang Z.; Wu, D-K; Chen, J. Study on the SFE condition for curcumin in Curcuma longa. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 29 (2004), 857 - 860
- <sup>108</sup> Began, G.; Goto, M.; Kodama, A.; Hirose, T. Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), 2189 - 2192
- <sup>109</sup> Braga, M.E.M.; Leal, P.F.; Carvalho, J.E.; Meireles, M.A.A. Comparison of yield, composition and antioxidant activity of turmeric extracts obtained using various techniques. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003), 6604 - 6611
- <sup>110</sup> Backleh-Sohrt, M.; Ekici, P.; Leupold, G.; Parlar, H. Efficiency of foam fractionation for the enrichment of nonpolar compounds from aqueous extracts of plant materials. *J. Nat. Prod.* 68 (2005), 1386 - 1389
- <sup>111</sup> Klimeš, J. et al. Kontrola léčiv I. *Karolinum*, Praha (2002)
- <sup>112</sup> Karlíček, R. et al. Analytická chemie pro farmaceuty. *Karolinum*, Praha (1998)
- <sup>113</sup> Vondrák, D.; Vulteren, J. Analytická chemie. *SNTL – Nakladatelství technické literatury*, Bratislava (1985)
- <sup>114</sup> Churáček, J. et al. Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod. *Academica*, Praha (1993)
- <sup>115</sup> Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L. Practical HPLC Method Development, 2nd edition. *Wiley-Interscience* (1997)
- <sup>116</sup> Zýka, J. Nové směry v analytické chemii – svazek IV. *SNTL – Nakladatelství technické literatury*, Bratislava (1988)
- <sup>117</sup> Zou, H.; Huang, X.; Ye, M.; Luo, Q. Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 954 (2002), 5 – 32
- <sup>118</sup> Nawrocki, J.; Dunlap, C.; McCormick, A.; Carr, P.W. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxides-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A* 1028 (2004), 1 – 30
- <sup>119</sup> Nawrocki, J.; Dunlap, C.; Li, J.; Zhao, J.; McNeff, C.J.; McCormick, A.; Carr, P.W. Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxides-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A* 1028 (2004), 31 - 62
- <sup>120</sup> Yang, Y.; Jones, A.D.; Eaton, C.D. Retention behavior of phenols, anilines and alkylbenzenes in liquid chromatography separations using subcritical water as the mobile phase. *Anal. Chem.* 71 (1999), 3808 - 3813
- <sup>121</sup> Basics of LC/MS. Agilent Technologies, 2001
- <sup>122</sup> International Conference on Harmonisation. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), [online] (2005), [cit. 2006-06-03].  
Dostupné z: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>.