

**Univerzita Karlova**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra analytické chemie



Diplomová práce

**Využití HPLC v kontrole kvality potravních  
doplňků s obsahem gingerolů a  
kurkuminů**

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne

## **Poděkování**

Velice ráda bych poděkovala panu prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za čas, který mi věnoval při vedení této diplomové práce. Děkuji mu za jeho ochotu, trpělivost, vstřícnost, ale také za poskytování odborných i praktických rad, které byly pro dokončení mé práce nezbytné.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Eliška Hujová

Školitel: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití HPLC v kontrole kvality potravních doplňků s obsahem gingerolů a kurkuminů

V této diplomové práci byla vyvinuta a validována analytická HPLC metoda pro stanovení 6-, 8- a 10-gingerolu, 6-shogaolu, kurkuminu, demethoxykurkuminu, bisdemethoxykurkuminu a piperinu. Vyvinutá metoda byla následně využita pro analýzu doplňků stravy: Kurkumin – piperin plus (+ zázvor) od VIESTE, Bio tumeric + ginger od firmy VANAVITA, Ginger root extract od BioMedical, Shogaol zázvor od EPIGEMIC®, Ginger root extract od SWANSON® a Ginger root (*Zingiber officinale*) od SOLGAR®. Pro zajímavost byla tato metoda aplikována i u vybraných čajových směsí obsahujících zázvor a/ nebo kurkumu: Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea), Loyd Brusinky & Zázvor, Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem, Pickwick Nos a krk se zázvorem, Tesco Ginger & Lemon, Teekanne Ginger Curcuma. Pro analýzu byla použita kolona YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6 mm; 3 µm). Separace probíhala při konstantní teplotě 30 °C za gradientové eluce s mobilními fázemi A: acetonitril, B: ultračistá voda s průtokovou rychlostí 1 ml/min. Detekce byla provedena detektorem diodového pole a vlnových délkách 224, 281, 340 a 420 nm.

Klíčová slova: HPLC, 6-, 8-, 10-gingerol, 6-shogaol, kurkumin, demethoxykurkumin, bisdemethoxykurkumin, zázvor, kurkuma

# Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Eliška Hujová

Supervisor: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Title of the diploma thesis: HPLC in quality control of food supplements containing gingerols and curcumins

In this diploma thesis, a new HPLC method for determination of 6-, 8- and 10-gingerol, 6-shogaol, curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, and piperine was developed and validated. The developed method was used for the analysis of food supplements: Kurkumin – piperin plus (+ zázvor) from VIESTE, Bio tumeric + ginger from VANAVITA, Ginger root extract from BioMedical, Shogaol zázvor from EPIGEMIC®, Ginger root extract from SWANSON®, and Ginger root (*Zingiber officinale*) from SOLGAR®. Just as a matter of interest, this method was applied for the selected tea blends containing ginger and/ or tumeric: Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea), Loyd Brusinky & Zázvor, Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem, Pickwick Nos a krk se zázvorem, Tesco Ginger & Lemon, Teekanne Ginger Curcuma. For the analysis YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4.6 mm; 3 µm) analytical column was used. Separation was carried out by gradient elution with mobile phases A: acetonitrile, B: ultrapure water at flow rate 1 ml/min. Detection was performed by diode-array detector (DAD) at wavelengths 224, 281, 340, and 420 nm. The column space temperature was set at 30 °C.

Keywords: HPLC, 6-, 8-, 10-gingerol, 6-shogaol, curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, piperine, ginger, curcuma

# Obsah

1. Seznam použitých zkratk	9
2. Úvod	11
3. Cíl a zadání práce	12
4. Teoretická část	13
4.1. Gingeroly a shogaoly	13
4.1.1. Výskyt a definice	13
4.1.2. Vlastnosti a využití	15
4.2. Kurkumin a jeho deriváty	18
4.2.1. Výskyt a definice	18
4.2.2. Vlastnosti a využití	20
4.3. Piperin	23
4.3.1. Výskyt a definice	23
4.3.2. Vlastnosti a využití	24
4.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	28
4.5. Typy chromatografických kolon	32
4.5.1. Materiály využívané pro výrobu sorbentů	33
4.6. Rešerše stanovení gingerolů, shogaolu, piperinu, kurkuminu a jeho derivátů	37
5. Experimentální část	39
5.1. Použité přístroje a pomůcky	39
5.1.1. Přístroje	39
5.1.2. Kolona	39
5.1.3. Pomůcky	39
5.2. Použité chemikálie	40
5.2.1. Standardy	40

5.2.2.	Rozpouštědla .....	40
5.3.	Testované vzorky .....	41
5.3.1.	Doplňky stravy .....	41
5.3.2.	Čaje .....	42
5.4.	Deklarovaný obsah gingerolů, kurkuminů, piperinu a shogaolu v testovaných potravních doplňcích .....	43
5.5.	Deklarovaný obsah zázvoru a kurkumy v testovaných čajích .....	44
5.6.	Příprava roztoků standardů .....	44
5.6.1.	Příprava zásobních roztoků standardů .....	45
5.6.2.	Příprava pracovních roztoků standardů .....	45
5.6.3.	Příprava roztoku pro test vhodnosti chromatografického systému .....	45
5.6.4.	Příprava roztoku pro opakovatelnost .....	46
5.6.5.	Příprava roztoků pro kalibraci .....	46
5.6.6.	Příprava roztoku pro přesnost .....	46
5.7.	Příprava analyzovaných vzorků .....	47
5.7.1.	Doplňky stravy .....	47
5.7.2.	Čaje .....	47
5.8.	Parametry měření .....	47
6.	Výsledky a diskuze .....	49
6.1.	Vývoj analytické metody, optimalizované parametry .....	49
6.1.1.	Volba vlnové délky .....	49
6.1.2.	Volba složení mobilní fáze .....	52
6.1.3.	Volba vhodného gradientu a kolony .....	55
6.2.	Validace vyvinuté metody za finálních podmínek .....	66
6.2.1.	Test vhodnosti chromatografického systému .....	66

6.2.2.	Linearita.....	70
6.2.3.	Přesnost.....	79
6.3.	Stanovení analyzovaných vzorků.....	80
6.3.1.	Doplňky stravy.....	80
6.3.2.	Čaje.....	86
7.	Závěr.....	92
8.	Seznam obrázků a tabulek.....	95
8.1.	Seznam obrázků.....	95
8.2.	Seznam tabulek.....	99
9.	Seznam použité literatury.....	102



# 1. Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
A <sub>s</sub>	faktor symetrie
Bcl-xL	B-buněčný lymfom-extra velký
BDMK	bisdemethoxykurkumin
cps.	kapsle
COX-1	cyklooxygenáza 1
COX-2	cyklooxygenáza 2
DAD	detektor s diodovým polem
DMK	demethoxykurkumin
ESI	ionizace elektrosprejem
6-GING	6-gingerol
8-GING	8-gingerol
10-GING	10-gingerol
GLUT 2/3/4	transportér glukózy typu 2/3/4
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
5-HT <sub>3</sub>	5-hydroxytryptaminový receptor typu 3/ serotoninový receptor
k	kapacitní faktor
KUR	kurkumin
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
PEG	polyethylenglykol

PIP	piperin
R <sub>s</sub>	rozlišení
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
6-SHOG	6-shogaol
t <sub>R</sub>	retenční čas
UV(B)	ultrafialové záření (typu B)
VIS	viditelné záření
Wh <sub>10</sub>	šířka píku v 10 % výšky

## 2. Úvod

Gingeroly i kurkuminy jsou přírodní fenolické látky, které mají mnoho společných účinků, proto je přínosné je v doplňcích stravy kombinovat, neboť jejich účinky se tak potencují, případně doplňují. Mezi tyto účinky patří především antioxidační a protizánětlivá aktivita, ale dále také antimikrobiální, protinádorová, antidiabetická či hypolipidemická aktivita. Obě tyto látky pochází z oddenků rostlin čeledi zázvorovnickovitých (*Zingiberaceae*), gingeroly se získávají ze zázvoru lékařského (*Zingiber officinale*), kurkuminy z kurkumy dlouhé (*Curcuma longa*). Zázvor i kurkuma jsou rostliny známé již po staletí, a pro své léčebné účinky jsou využívány v tradiční medicíně [1–3].

Kvůli nízké biologické dostupnosti kurkuminů je k těmto doplňkům stravy často přidáván piperin, který dokáže jejich biologickou dostupnost zvýšit až o 2000 % [4].

Doplňky stravy jsou potraviny, které mají doplňovat běžnou stravu o vitamíny, minerály nebo o látky s nutričním či fyziologickým účinkem. Tyto látky jsou v doplňcích stravy obvykle obsaženy v koncentrovanějším množství, a je předpokládán jejich pozitivní vliv na zdraví. Velkou nevýhodou u potravních doplňků je, že na rozdíl od registrovaných léčivých přípravků u nich není kontrolována jejich účinnost, to znamená, že účinky, které výrobce deklaruje pro daný doplněk stravy, nejsou nikým ověřeny [5–7]. Navíc velmi často výrobci ve svých doplňcích stravy deklarují pouze množství rostlinného extraktu, který nijak nevypovídá o obsaženém množství bioaktivních látek, jenž zodpovídají za výsledný účinek. Obsah i složení účinných bioaktivních látek se v rostlině často mění v závislosti na lokalitě a způsobu pěstování, složení půdy, době sklizně, ale například i na způsobu skladování a zpracování rostlinných drog.

### **3. Cíl a zadání práce**

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat novou chromatografickou metodu pro stanovení tří gingerolů (6, 8 a 10-gingerol), jejich derivátu 6-shogaolu, dále piperinu a tří základních kurkuminoidů (kurkumin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin). Tato vyvinutá metoda se následně použila pro ověření kvality a deklarovaného obsahu látek v šesti potravních doplňcích a šesti čajích obsahující zázvor, popřípadě zázvor v kombinaci s kurkumou.

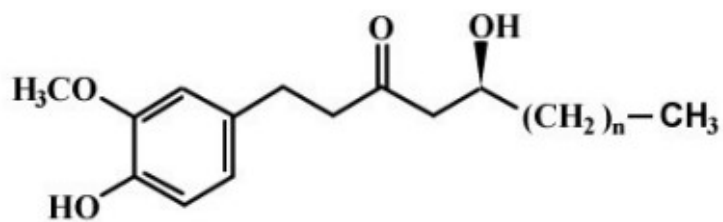
## 4. Teoretická část

### 4.1. Gingeroly a shogaoly

#### 4.1.1. Výskyt a definice

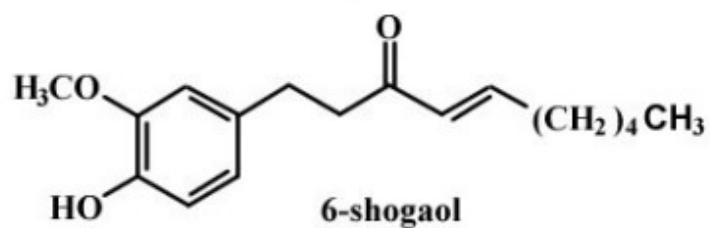
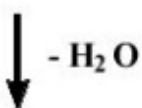
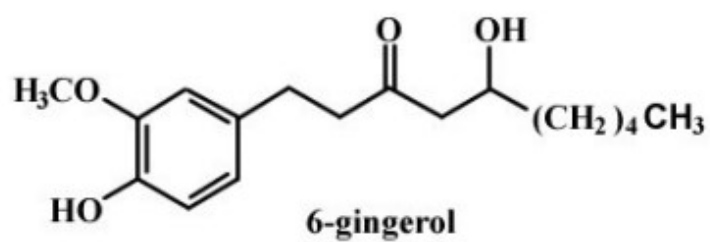
Gingeroly a shogaoly jsou jedny z účinných látek v zázvoru lékařském (*Zingiber officinale*). Zázvor lékařský je rostlina z čeledi zázvorovnickovitých (*Zingiberaceae*). Z této rostliny se nejčastěji využívá její ztlustěný oddenek (*Zingiberis rhizoma*), který je zároveň důležitou lékopisnou drogou. Díky obsahovým látkám, které dodávají zázvorovým oddenkům typickou výraznou vůni a štiplavou chuť, se tyto části zázvoru používají jako koření či potravina, a velmi často v tradiční medicíně. Zázvor lékařský se pěstuje v tropických a subtropických oblastech, přičemž jeho celosvětově největšími producenty jsou Čína a Indie [8–10].

Zatímco za typickou vůni zázvoru mohou obsažené silice, které jsou složeny hlavně ze seskviterpenů (např.  $\alpha$ -zingiberen,  $\beta$ -bisabolen, zingiberon) a monoterpeů (např. cineol, borneol, geraniol, kurkumen), za nápadnou štiplavou chuť zodpovídají právě gingeroly a shogaoly. Štiplavost čerstvého zázvoru způsobují především 1-(3'-methoxy-4'-hydroxyfenyl)-5-hydroalkan-3-ony, známé jako gingeroly. Tyto látky jsou homologickou řadou fenolických ketonů, z nichž v největší míře je v zázvoru obsažen 6-gingerol. Jednotlivé gingeroly se liší počtem atomů uhlíků v postranním řetězci (viz obrázek 1). Štiplavost suchého zázvoru je naopak způsobena přítomností shogaolů, které vznikají dehydratační reakcí z příslušných gingerolů při zvýšené teplotě, tedy při skladování, sušení či tepelné úpravě zázvoru (viz obrázek 2). Přesto, že je obsah shogaolů v suché droze zázvoru obvykle nižší než obsah gingerolů v čerstvé droze, palčivá chuť je zachována, protože shogaoly jsou až dvakrát štiplavější, než gingeroly [1, 11, 12]. Charakteristické zastoupení 6-, 8-, a 10-gingerolu je v zázvoru obvykle 58%, 22% a 20%. Množství jednotlivých látek se ovšem v rostlině může lišit v závislosti na lokalitě, době sklizně a způsobu pěstování [13].

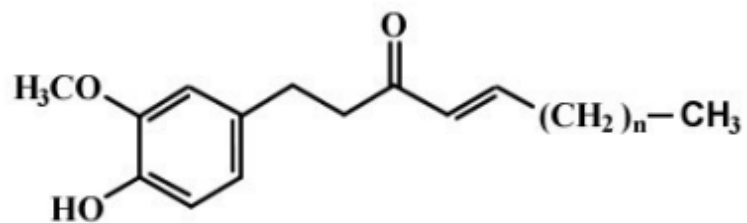


**6-gingerol, n = 4**  
**8-gingerol, n = 6**  
**10-gingerol, n = 8**

Obrázek 1: Strukturní vzorec gingerolů [14].



Obrázek 2: Schéma dehydratace 6-gingerolu na 6-shogaol [14].



**6-shogaol, n = 4**  
**8-shogaol, n = 6**  
**10-shogaol, n = 8**

Obrázek 3: Strukturní vzorec shogaolů [14].

## 4.1.2. Vlastnosti a využití

Kromě typické vůně a chuti, pro kterou se zázvor používá jako koření a ochucovadlo, se již po staletí využívají jeho léčebné účinky. Zázvor je nedílnou součástí tradiční medicíny mnoha zemí, kde se využívá především k léčbě žaludečních obtíží – nevolnosti, zvracení, pomáhá též ale i proti průjmům a podporuje chuť k jídlu při nechutenství. Velmi často se také používá k léčbě nachlazení, infekcí horních cest dýchacích, horečky, kašle, ale i jako prevence chřipkových onemocnění. Zázvor pomáhá i proti bolesti, a to hlavně při migrénách či svalových a revmatických problémech [11, 15].

### 4.1.2.1. Antiemetické účinky

Gingeroly i shogaoly vykazují antiserotoninové účinky, proto se předpokládá, že antiemetický účinek tak bude zprostředkován přes 5-HT<sub>3</sub> receptory. Gingeroly i shogaoly mají malou molekulovou hmotnost, proto mohou snadno procházet hematoencefalickou bariérou a působit tak centrálně [1, 15, 16].

Výsledky některých studií ukázaly, že je zázvor velmi účinný při léčbě kinetóz i postoperativních nevolností a zvracení. Jeho účinky byly dokonce srovnatelné s metoklopramidem. Takto prokázané účinky vedly k možnosti využití zázvoru při léčbě nadměrného zvracení v těhotenství (hyperemesis gravidarum). Studie opravdu prokázaly, že podávání 1 g práškového oddenku zázvoru denně těhotným ženám, má oproti placebo mnohem větší efekt. Nadšení pro tuto indikaci bylo ovšem následně zmírněno tím, že zázvor může prodlužovat dobu krvácení, a dále objevem možné mutageny *Escherichia coli* [15, 17].

### 4.1.2.2. Antibakteriální účinky

Bylo dokázáno, že gingeroly působí baktericidně proti bakterii *Helicobacter pylori*, která způsobuje dyspepsie, peptické vředy a napomáhá k rozvoji rakoviny žaludku a tlustého střeva [1, 18].

Dle studií měl zázvorový extrakt podávaný myším intraperitoneálně na dávce závislou antimikrobiální účinnost proti *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* a *Candida albicans* [19].

#### **4.1.2.3. Antioxidační účinky**

Fenolické sloučeniny v zázvoru, mezi které patří i gingeroly a shogaoly, mají schopnost vychytávat řadu volných radikálů a chránit lipidy buněčných membrán před oxidací. Studie na potkanech ukázaly, že zázvor významně snížil indukovanou peroxidaci lipidů a zvýšil hladiny antioxidačních enzymů spolu se sérovým glutathionem. Bylo též zjištěno, že zázvor má stejný antioxidační účinek jako kyselina askorbová [20].

Prokázalo se, že 6-gingerol má velmi silné antioxidační účinky *in vitro* i *in vivo*. Díky tomu působí proti tvorbě reaktivních forem kyslíku vyvolaných UVB zářením a expresi COX-2. 6-gingerol by tak mohl být účinný v terapii kožních poruch vyvolaných UVB zářením [21].

#### **4.1.2.4. Protizánětlivé účinky**

Gingeroly i shogaoly jsou velmi účinné při potlačení syntézy prostaglandinů prostřednictvím inhibice COX-1 i COX-2, ale též potlačují syntézu leukotrienů inhibicí 5-lipooxygenázy. Právě tato skutečnost odlišuje obsahové látky zázvoru od nesteroidních protizánětlivých léčiv, které inhibují pouze cyklooxygenázy [22]. Bylo prokázáno, že gingeroly s delším alkylovým řetězcem mají větší protizánětlivé účinky [23]. Na rozdíl od nesteroidních protizánětlivých léčiv, které obvykle v důsledku inhibice prostaglandinů způsobují gastrointestinální nežádoucí účinky, složky zázvoru tyto účinky nevyvolávají. Naopak se ukázalo, že zázvor chrání před ulcerací u krys [1].

Dále bylo zjištěno, že gingeroly inhibují také indukci některých genů, které jsou zapojeny do zánětlivé reakce. Tyto geny kódují například cytokiny, chemokiny, indukovatelný enzym cyklooxygenáza-2 či indukovatelnou syntázu oxidu dusnatého [1].

#### **4.1.2.5. Protinádorové účinky**

6-gingerol a 6-shogaol, ale i další látky obsažené v zázvoru, mají i protinádorové účinky, na kterých se podílí řada mechanismů, především vychytávání volných radikálů (antioxidační účinky), změny genových expresí a indukce apoptózy. Všechny tyto mechanismy přispívají ke snížení iniciace a progresu nádoru [11, 24]. Působí proti karcinomům děložního čípku, kolorektálním karcinomům, karcinomům kůže, žaludku, prsů, i proti myeloidní leukémii [25].



#### **4.1.2.6. Hypocholesterolemické, hypolipidemicé a hypoglykemické účinky**

Provedenými studiemi bylo potvrzeno, že 6-gingerol snižuje plazmatické triglyceridy, celkový cholesterol, volné mastné kyseliny a lipoproteiny s nízkou hustotou. Dále také 6-gingerol snížil koncentraci glukózy v plazmě, glykémii na lačno a zlepšil glukózovou toleranci u myší [26]. Gingeroly i shogaoly zprostředkovávají snížení cholesterolu zvýšením vylučování sterolů [27]. Hypoglykemický účinek zprostředkovává 6-gingerol mnoha mechanismy, například zvýšením vychytávání glukózy za podmínek nepřítomnosti inzulínu, indukování fosforylace proteinkinázy aktivovanou 5'adenosinmonofosfátem, ale také podporuje translokaci glukózového transportéru 4 na plazmatickou membránu [28]. Spolu s těmito účinky přichází i snížení tělesné hmotnosti, poměru pasu k bokům i poměru boků [25].

Díky těmto účinkům by mohl být zázvor užit jako adjuvantní terapie pro diabetes melitus 2. typu, metabolický syndrom, obezitu i při vyšších hladinách cholesterolu [25, 26].

#### **4.1.2.7. Účinky na krevní tlak**

Fenolické složky zázvoru mají vasodilatační účinky, které snižují krevní tlak. Tyto účinky jsou dle studií zprostředkovány prostřednictvím duálního inhibičního mechanismu – stimulací muskarinových receptorů a bloádou vápenatých kanálů. Bylo zjištěno, že gingeroly mají mnohem větší vasodilatační aktivitu, než 6-shogaol [1]. Aktivita blokující vápenaté kanály, zprostředkovaná složkami zázvoru, byla velmi podobná jako u verapamilu [20].

#### **4.1.2.8. Antiagregační účinky**

Studie prokázaly, že gingeroly a jejich deriváty způsobují významnou inhibici agregace krevních destiček indukovanou kyselinou arachidonovou – tromboxany, prostaglandiny a prostacykliny odvozené od cyklooxygenázy, se zvýšením fibrinolytické aktivity. Tyto účinky jsou pravděpodobně zprostředkovány inhibicí COX-1, COX-2, popřípadě i tromboxan-syntázy [29]. Inhibice aktivace složek zázvoru je srovnatelná či dokonce vyšší než účinek aspirinu, proto by tyto studie mohly sloužit pro návrh silnějších syntetických analogů gingerolu, které by mohly potenciálně pomoci při prevenci a léčbě kardiovaskulárních onemocnění [20, 29, 30]. Současné podávání s warfarinem ovšem neovlivní jeho farmakokinetiku ani farmakodynamiku [20].

#### 4.1.2.9. Další účinky

Bylo dokázáno, že složky zázvoru jsou prospěšné i pro mozek a jsou účinné proti neurodegenerativním onemocněním. Účinnost 6-gingerolu byla prokázána proti Alzheimerově chorobě i amnézii [25, 31].

Studie také prokázaly analgetický účinek gingerolů a shogaolů. Zázvor pozitivně působí při menstruačních bolestech i bolestech svalů a kloubů. Jeho protizánětlivé a analgetické účinky se využívají v léčbě revmatoidní artritidy i osteoartritidy [25, 32]. Složky zázvoru mají lepší bezpečnostní profil než nesteroidní antiflogistika, ovšem jak gingeroly a shogaoly, tak i nesteroidní antiflogistika mají zvýšené riziko krvácení [33].

6-gingerol má také anthelmintické účinky. Tato sloučenina byla aktivní při léčbě infekce parazitem *Echinococcus granulosus*, dokonce projevila i larvicidní aktivitu. Dále chránila hostitelské buňky před poškozením snížením množství oxidu dusnatého. V ochranné funkci projevil větší účinnost zázvorový extrakt, než pouze samotný 6-gingerol, proto se předpokládá, že 6-shogaol by mohl působit synergicky s 6-gingerolem [25, 34].

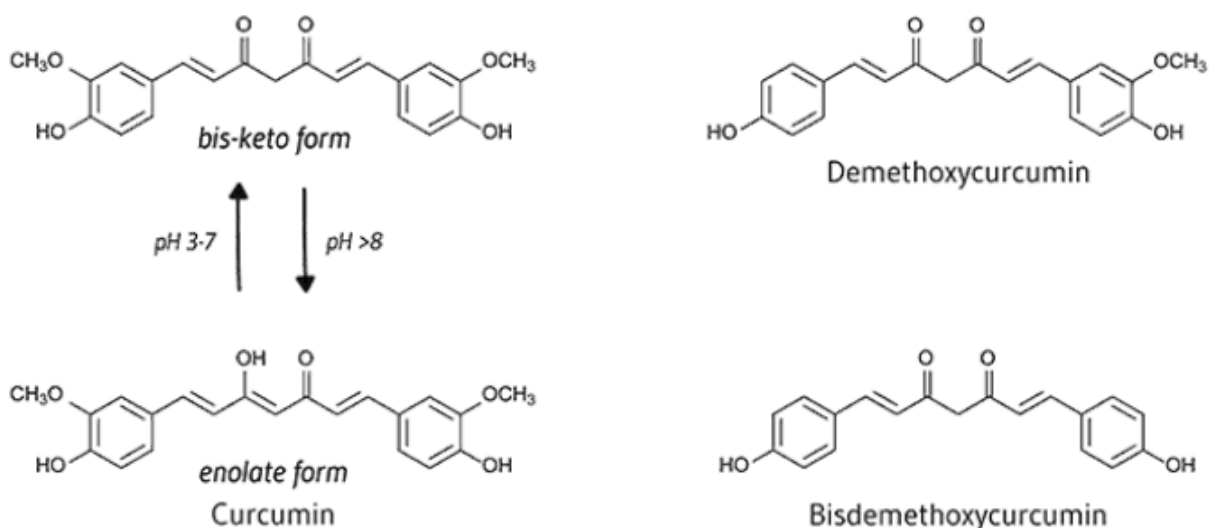
## 4.2. Kurkumin a jeho deriváty

### 4.2.1. Výskyt a definice

Kurkumin a jeho deriváty jsou hlavními obsahovými látkami rostliny kurkumy dlouhé (*Curcuma longa*), lidově známé též jako indický zázvor či indický šafrán. Stejně jako zázvor lékařský, patří i kurkuma dlouhá do čeledi zázvorovnickovitých (*Zingiberaceae*). Kurkuma dlouhá je pěstována v jihovýchodní Asii, především však v Indii, která je největším producentem této rostliny. Z kurkumy se používá zejména její oddenek (*Curcuma longae rhizoma*), který je zároveň i lékopisnou drogou [3, 10, 11]. Oddenky mají pepřovitou vůni, nahořklou hřejivou chuť a na řezu jsou výrazně oranžově zbarveny. Obvykle se zpracovávají sušením a následným mletím na prach, který se používá v potravinářství jako koření, barvivo a v lidové medicíně se hojně využívají jeho léčivé účinky [35].

Hlavními obsahovými látkami kurkumy jsou silice a barvivo. Obsah silic, které zapříčiňují vůni rostliny, bývá v rozmezí 1,5-6 %, a je zastoupen především seskviterpeny (např.

$\alpha$ - a  $\beta$ -pinen, limonen, cineol, eugenol a kampfen). Obsažená žluto-oranžová barviva jsou tvořena kurkuminoidy, tedy fenolickými látkami ze skupiny diarylheptanoidů, jejichž barevnost je způsobena konjugací dvojných vazeb se dvěma aromatickými benzenovými jádry. Hlavními kurkuminoidy jsou kurkumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)hepta-1,6-dien-3,5-dion), který tvoří kolem 2 % sušiny oddenků, a dále jeho deriváty demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin, zastoupeny množstvím přibližně 0,6 % sušiny oddenku. Jsou to nenasycené polyfenolické diketony, které se od sebe liší přítomností a množstvím methoxyskupin na fenolických jádrech (viz obrázek 4). Přítomnost vodíkových vazeb ve vzorcích způsobuje tautomerizace mezi keto a enol formou, které jsou velmi citlivé na změnu pH, v kyselém prostředí se tak proto jejich zbarvení mění z oranžové na žluto-červené, v alkalickém prostředí na červeno-hnědé [11, 36–38].



Obrázek 2: Chemické struktury kurkuminoidů [38].

Kurkumin je lipofilní látka s nízkou rozpustností ve vodě, špatnou gastrointestinální absorpcí a nízkou biologickou dostupností. Navíc se velmi rychle metabolizuje a bývá rychle vyloučen z lidského organismu. Kurkumin podaný perorálně podstupuje velmi intenzivně efekt prvního průchodu játry (first-pass efekt), při kterém je v játrech metabolizován. Pouze zbylá nemetabolizovaná část se ovšem dostane do systémové cirkulace, kde dochází ke konjugaci s glukuronidem a sulfátem. Oproti konjugovaným formám je volný kurkumin mnohem více fyziologicky aktivní, proto je žádoucí, snažit se volnou část kurkuminu v krvi určitým způsobem zvýšit [38]. Velmi často se proto užívá kurkumin společně s piperinem, který dokáže výrazně zvýšit jeho vstřebatelnost, jelikož dokáže inhibovat jaterní i střevní glukuronidaci [4].

## 4.2.2. Vlastnosti a využití

Kurkumin není toxický, proto se velmi často využívá v potravinářství jako koření (je hlavní součástí směsi kari koření), barvivo, ale také konzervant – kurkumin jako přidaná barevná látka je označen kódem E 100. Kromě potravin se kurkuminem barví i látky, dřevo nebo vosk. Chemický průmysl dříve hojně využíval kurkumin i jako acidobazický indikátor, díky jeho schopnostem změny barvy na základě změny pH. Dále nachází využití i v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [35–38].

V lidovém léčitelství nachází kurkuma uplatnění jako stomachikum, při onemocnění ledvin a žlučníku, a zevně i jako dezinficiencium [36].

### 4.2.2.1. Protizánětlivé účinky

Vysoce protizánětlivý účinek kurkuminů spočívá v inhibici mnoha zánětlivých mediátorů, proto kurkuminy působí proti široké škále nemocí, u kterých hraje hlavní roli právě zánět. Mezi tato onemocnění patří například alergie, astma, bronchitida, revmatoidní artritida, kolitida, psoriáza, diabetes, obezita, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, roztroušená skleróza, epilepsie, kardiovaskulární onemocnění a nádorová onemocnění [2, 32].

Kurkuminy interagují s prozánětlivými chemokiny i cytokiny. Jsou důležitými inhibitory různých enzymů včetně lipoxygenázy (→ inhibice leukotrienů), cyklooxygenázy (→ inhibice prostaglandinů a tromboxanů), indukovatelné syntázy oxidu dusnatého (→ inhibice oxidu dusnatého), histonacetyltransferázy, fosfolipázy, hyaluronidázy, dále blokují aktivaci nukleárního faktoru (NF)- $\kappa$ B, nejsilnějšího aktivátoru tumor nekrotizujícího faktoru (TNF)- $\alpha$ , který je hlavním mediátorem zánětu většiny nemocí. V neposlední řadě je kurkumin inhibitorem i transformujícího růstového faktoru (TGF)- $\beta$  a fibrinogeneze, to vysvětluje jeho účinky u fibrózy plic a ledvin, cirhózy jater nebo u Crohnovy choroby [2, 38–40].

### 4.2.2.2. Antioxidační účinky

Antioxidační a protizánětlivá aktivita kurkuminu, jsou dva hlavní mechanismy, které jsou odpovědné za pozitivní vliv na lidský organismus [38].

Studie prokázaly antioxidační účinky kurkuminu *in vitro* i *in vivo*. Kurkumin účinně působí proti oxidačnímu stresu, který má velký význam u mnoha onemocnění, inhibicí

homocysteinem indukované dysfunkce endothelu koronárních artérií, peroxidace lipidů, produkce peroxidových radikálů a oxidu dusnatého. Kurkumin inhibuje peroxidaci lipidů dokonce ve větší míře než  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) [36].

Kurkumin také přímo interaguje se superoxidovým aniontem a hydroxylovým radikálem, má tak funkci i jako vychytávač volných radikálů [36].

#### **4.2.2.3. Protinádorové účinky**

Kurkumin patří k nejslibnějším přírodním látkám, které působí proti mnoha typům karcinomů. Samotný kurkumin nebo v kombinaci s jinými činidly, by mohl do budoucna představovat účinný lék pro léčbu nádorů. Protinádorová aktivita kurkuminu je zprostředkována působením na různé buněčné signální dráhy včetně transkripčních faktorů, zánětlivých cytokinů, růstových faktorů, proteinových kináz a genů modulujících buněčnou proliferaci a apoptózu [41]. Díky těmto schopnostem dokáže kurkumin inhibovat nádorové buněčné proliferace, a tím buď zpomalit nebo zcela zastavit buněčný cyklus v jeho jednotlivých fázích [38].

Studie již popsaly účinky kurkuminů proti karcinomům prsu, prostaty, plic, žaludku, slinivky, jater, hlavy a krku, ale rovněž i kolorektálním a hematologickým karcinomům. Ovšem účinnost při léčbě onemocnění je omezena nízkou biologickou dostupností kurkuminu, a také jeho vedlejšími účinky, jako jsou nevolnost, žlutá stolice, průjem a bolest hlavy. Kvůli těmto skutečnostem bude zapotřebí provést ještě další výzkumy a studie, k ověření kurkuminu jako protinádorové látky [41].

#### **4.2.2.4. Antimikrobiální účinky**

Již mnoho studií prokázalo značnou antimikrobiální aktivitu kurkuminu *in vitro*, ale některé studie *in vivo* uváděly méně účinné výsledky inhibiční aktivity kurkuminu, ve srovnání s běžně používanými látkami.

Bylo zjištěno, že methanolové a ethanolové extrakty z kurkumy a kurkuminoidů jsou účinnější, než jejich vodné roztoky [42]. Studie, která zkoumala aktivitu hexanového a ethanolového extraktu z kurkumy a kurkuminoidů proti 24 patogenním bakteriím izolovaných z kuřat a krevet. U ethanolových extraktů byla prokázána nejvyšší účinnost. Tyto extrakty z kurkumy byly účinné proti 13 bakteriím, oproti tomu extrakty z kurkuminoidů prokázaly

antibakteriální účinnost pouze proti 8 bakteriím *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Edwardsiella tarda* [43].

Nejslibnější účinek prokázal kurkumin proti *Helicobacter pylori*. Studie *in vivo* na myších infikovaných právě touto bakterií, kterým byl pravidelně podáván kurkumin, vykazovaly velmi výrazný eradikační účinek proti *Helicobacter pylori* spojený spolu s obnovením poškozené tkáně žaludku [44]. Kurkumin by se tak mohl používat jako doplněk k již existujícím léčivům proti gastritidám [42].

Kromě antimikrobiálních účinků prokázal kurkumin také rozsáhlé antivirové účinky, proti různým virovým patogenům. Tyto účinky jej vyzdvihly jako kandidáta s velkým potenciálem pro vývoj nových antivirových z přírodních zdrojů, zejména syntézou rozličných derivátů kurkuminu. V neposlední řadě byla u kurkuminu prokázána i antifungální a fungicidní aktivita. Potenciální uplatnění těchto aktivit kurkuminu je ovšem limitováno jeho nízkou biologickou dostupností a špatnou rozpustností ve vodě, proto bude potřeba provést ještě mnoho dalších klinických studií [42].

#### **4.2.2.5. Další účinky**

Kurkumin má schopnost snižovat hladinu glukózy v krvi potlačením zánětu v důsledku hyperglykémie, aktivací adenosinmonofosfátkinázy, stimulací vychytávání glukózy a zvýšením exprese genů GLUT 2, GLUT 3 a GLUT 4. Dále stimuluje sekreci inzulínu z pankreatických buněk, snižuje inzulínovou rezistenci a zlepšuje fungování pankreatických buněk [45].

Pravidelné podávání kurkuminů potkanům s diabetem 2. typu potlačilo hyperlipidémii snížením hladin celkového cholesterolu, fosfolipidů, volných mastných kyselin, a též zamezilo expresi lipoproteinů s nízkou a velmi nízkou hustotou [46].

Kurkumin má také schopnost zabránit poškození jater, které je způsobeno oxidativním stresem. Játra ochraňuje modulací antioxidantních enzymů, kterými jsou glutathionperoxidáza, superoxiddismutáza a nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP) [47].

Suplementace kurkuminem a piperinem u obézních myší zvyšovala ztrátu množství tělesného tuku a snižovala interleukin-1 $\beta$ , plazmatický zánětlivý marker spojený s obezitou. Díky tomuto účinku by mohl být kurkumin používán v prevenci metabolického syndromu [48].

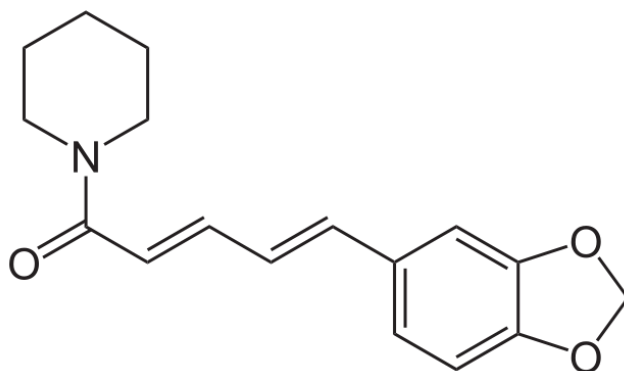
Kurkumin by díky svým účinkům mohl do budoucna nalézt uplatnění i jako nootropikum u Alzheimerovy choroby, prokazuje totiž i anti-amyloidogenní účinky. Kurkumin inhibuje akumulaci beta-amyloidního peptidu a vznik beta-amyloidních fibril, rovněž v centrální nervové soustavě již vytvořené beta-amyloidní fibrily destabilizuje. Dále kurkumin působí jako inhibitor na agregaci beta-amyloidu (zde je lepším inhibitorem než ibuprofen a naproxen) a na tvorbu amyloidních plaků [36].

## 4.3. Piperin

### 4.3.1. Výskyt a definice

Piperin patří mezi hlavní obsahové látky pepřovníku černého (*Piper nigrum*). Pepřovník černý je tropická ovíjivá liána, která patří do čeledi pepřovíkovité (*Piperaceae*). Plodem pepřovníku černého jsou malé bobule (*Piperis fructus*), které jsou zároveň i lékopisnou drogou. Nezralé bobule se suší, a pokud mají neporušený perikarp, označují se jako černý pepř, nebo též černé koření. Dozrálé usušené bobule s odstraněnými svrchními vrstvami perikarpu (oloupané) jsou označovány jako bílý pepř. Dnes je tato rostlina pěstována hlavně v Indii, Indonésii, Malajsii, Brazílii a na Madagaskaru [10, 49, 50].

Typickou ostrou chuť plodů pepřovníku černého způsobuje alkaloid piperin a aromatické silice [49]. Silice jsou v této rostlině zastoupeny především phellandrenem, citralenem, pinenem a limonenem [50]. Alkaloidy jsou dusíkaté organické báze, vznikající v rostlinách jako heterocyklické útvary. Alkaloidy pepřovníku černého jsou pálivé látky, jejichž hlavní funkcí je ochrana rostliny před živočichy a hmyzem. Hlavním štiplavým alkaloidem rostliny je piperin, neboli amid kyseliny piperové – [1-[5-[1,3-benzodioxol-5-yl]-1-oxo-2,4-pentadienyl]piperidin], který je v rostlině zastoupen v množství 2-7,4%. Piperin patří mezi protoalkaloidy. To jsou bazické aminy, které jsou odvozeny od aminokyselin, ale v jejich heterocyklickém systému není obsažen dusík. Ostrá chuť piperinu závisí především na amidické funkční skupině, jež je spojena uhlíkovými atomy s benzenovým jádrem. V celých bobulích pepřovníku černého je piperin velmi stálým alkaloidem, ovšem v případě mletého pepře piperin za přístupu vzduchu velmi snadno oxiduje [51].



Obrázek 3: Strukturální vzorec piperinu [94].

### 4.3.2. Vlastnosti a využití

Černý pepř je díky své ostré chuti jedním z celosvětově nejrozšířenějších koření, známé též jako černé koření. Kromě toho se černý pepř využívá v parfumerii, dále slouží i jako konzervant, a v neposlední řadě je již léta používán v tradiční medicíně. V tradiční medicíně našel uplatnění například při kontrole diabetu, jako stomachikum, spasmolytikum, antipyretikum, afrodiziakum, dále při léčbě bolesti, zimnice, revmatismu nebo pro zvýšení krevního oběhu [52].

#### 4.3.2.1. Antioxidační účinky

*In vitro* experimenty prokázaly antioxidační účinky piperinu. Piperin chrání před oxidačním poškozením zhasením volných radikálů, reaktivních kyslíkových a hydroxylových radikálů a inhibicí peroxidace lipidů. Jako lapač hydroxylových radikálů působí piperin ovšem pouze v nízkých koncentracích, ve vyšších koncentracích spouští piperin Fentonovu reakci, která vede naopak ke zvýšené tvorbě hydroxylových radikálů [53].

Dle studií podporuje piperin antioxidační aktivitu prevencí deplece glutathionu a obnovením hladin cytokinů [54].

Zajímavé je, že po přeměně alkalickou hydrolýzou piperinu na kyselinu piperovou, vykazuje tato látka ještě větší antioxidační aktivitu [55].



#### 4.3.2.2. Protizánětlivé účinky

Piperin vykazuje protizánětlivou aktivitu potlačením prostaglandinů prostřednictvím inhibice COX-1 i COX-2 [54].

Dle studie hodnotící účinky piperinu na zánět dělohy u myší vyvolaný bakterií *Staphylococcus aureus*, může piperin zmírnit zánětlivé poškození prostřednictvím různých mechanismů. Mezi tyto mechanismy patří například snížení interleukinů-1 $\beta$  a -6, a naopak zvýšení exprese interleukinu-10. Dále snížení nadměrné exprese tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$ , snížení toll-like receptorů (TLR) 2 a 4, a dokonce i inhibice mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) a nukleárního faktoru (NF)- $\kappa$ B [56].

#### 4.3.2.3. Antialergické účinky

Při léčbě piperinem bylo pozorováno snížení alergických reakcí u myší, včetně kýčání, zarudnutí a tření nosu. Piperin způsobil na dávce závislé snížení histaminu, koncentraci oxidu dusnatého a snížil expresi interleukinů-1 $\beta$  a -6 a imunoglobulinu E. Kromě toho dále potlačil infiltraci eozinofily a hyperplazii a v závislosti na dávce snížil edém i degranulaci žírných buněk. Tyto výsledky naznačují imunomodulační a protizánětlivou aktivitu piperinu, díky které by mohl být účinný při léčbě alergické rýmy [57].

#### 4.3.2.4. Protinádorové účinky

Piperin vykazoval vynikající protinádorovou aktivitu *in vivo*, kdy dokázal regulovat autofagii, mohl by tak být potenciálním lékem pro protinádorovou terapii [54].

Studie prokázaly, že ethanolový extrakt černého pepře s obsahem piperinu snižoval růst nádoru, prodlužoval dobu přežití, způsoboval zástavu buněčného cyklu a indukoval apoptózu. Dále inhiboval expresi cyklinu A a transmembránové molekuly Bcl-xL, a naopak zvýšil expresi nádorového proteinu p53 i proteinu Bax, který je regulátorem apoptózy. Piperin navíc v nádorových buňkách indukoval oxidační stres, jenž zvýšil aktivitu katalázy, superoxiddismutázy i glutathionreduktázy. Protinádorový účinek piperinu by tak mohl být pravděpodobně způsoben nadprodukcí reaktivních forem kyslíku, způsobujících v nádorových buňkách oxidační stres, který nakonec iniciuje apoptózu buňky [58].

Bylo zjištěno, že piperin omezuje motilitu bakterie *Helicobacter pylori*, která může iniciovat rakovinu žaludku. Snížená motilita bakterie oslabuje její adhezi k buňkám

žaludečního epitelu, a tím snižuje i prostup toxinu, což má za následek zamezení vylučování interleukinu-8. Piperin navíc inhibuje i proteázu *Helicobacter pylori*, tímto způsobem dochází ke snížení štěpení E-cadherinu a exprese  $\beta$ -kateninu, které následně snižuje i translokaci  $\beta$ -kateninu do jádra buněk. Tímto způsobem piperin velice redukuje riziko onkogeneze [59].

Piperin se jako jediný kombinuje s jinými léky pro posílení protirakovinových účinků. Současná léčba rakoviny docetaxelem a piperinem vykazovala synergické působení, které mělo za následek zvýšení cytotoxicity a zlepšení protirakovinné aktivity v buněčných liniích rakoviny jater (Hep G2) [60].

#### **4.3.2.5. Účinky na trávení**

Trávicí stimulační účinky piperinu jsou pravděpodobně způsobeny hned několika faktory. Jedním z nich je zvýšení sekrece slin a slinné amylázy, která štěpí škroby na jednodušší sacharidy. Dále piperin přispívá ke stimulaci jater k produkci a vylučování žluči bohaté na žlučové kyseliny, jež jsou velmi důležité při trávení a vstřebávání tuků. Piperin také výrazně zvyšuje aktivitu enzymů, které se podílejí na trávení, tedy pankreatických enzymů, jako jsou pankreatické lipázy, pankreatické amylázy, trypsin a chymotrypsin, ovšem stimuluje i střevní lipázy a střevní amylázy [61, 62].

#### **4.3.2.6. Hepatoprotektivní účinky**

Pozitivní účinky piperinu na játra potvrdilo již mnoho studií. Piperin snižuje hladiny jaterních enzymů alaninaminotransferázy (ALT), aspartátaminotransferázy (AST) i alkalické fosfatázy (ALP) v myším séru. U potkanů s vyvolanou steatózou jater piperin významně zvýšil plazmatický adiponektin, protein ochraňující proti změnám způsobeným obezitou či rozvinutým metabolickým syndromem. K tomu dále piperin dokázal zvrátit zvýšené hladiny glukózy, inzulínu i jaterních lipidů. Zamezením snížení aktivace signálních molekul adenosinmonofosfátem aktivovaných proteinkináz (AMPK), podporuje piperin v myších játrech oxidaci mastných kyselin, signalizaci inzulínu a lipogenezi. Prostřednictvím aktivace signalizace adiponektin – adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinkináza (AMPK) dokázal piperin zvrátit inzulínovou rezistenci i jaterní steatózu [54].

Studie navíc i potvrdily, že piperin dokáže zabránit tvorbě cholesterolových žlučových kamenů [63].

#### **4.3.2.7. Antidiabetické účinky**

Piperin zvyšuje tvorbu reaktivních forem kyslíku a intracelulárních vápenatých iontů. Tímto zprostředkuje aktivaci proteinkinázy-beta, která je závislá na vápenatých iontech a kalmodulinu (CAMKK $\beta$ ). Aktivace této proteinkinázy-beta zapříčiní fosforylaci adenosinmonofosfátem aktivované proteinkinázy (AMPK), jenž indukuje translokaci glukózového transportéru 4 (GLUT4) na plazmatickou membránu buňky. Aktivací této signální dráhy podporuje piperin vychytávání glukózy v kosterních svalech, a tím zamezuje vzniku hyperglykémie [64].

#### **4.3.2.8. Účinky proti obezitě**

Piperin dle studií v buňkách preadipocytů účinně inhiboval diferenciaci tukových buněk (adipocytů). Navíc v kombinaci s kurkuminem redukoval piperin množství tělesného tuku a plazmatický zánětlivý marker interleukin-1 $\beta$  spojený s obezitou. Díky těmto účinkům by mohl být piperin použit pro léčbu onemocnění souvisejících s obezitou, a v kombinaci s kurkuminem, i jako prevence metabolického syndromu [48, 54].

#### **4.3.2.9. Schopnost zvýšení biologické dostupnosti některých léčiv a bioaktivních sloučenin**

Piperin inhibuje P-glykoprotein, řadu enzymů odpovědných za metabolizaci léčiv a bioaktivních látek v játrech, dále silně inhibuje jaterní a střevní arylhydrokarbonovou hydroxylázu a uridindifosfát (UDP)-glukuronyltransferázu. Těmito účinky zvyšuje biologickou dostupnost mnoha léčiv, ale i fytochemikálií. Za zvýšení biologické dostupnosti je částečně zodpovědná i zvýšená absorpce, které piperin napomáhá působením na ultrastrukturu střevního kartáčového lemu.

Zvýšená biologická dostupnost v kombinaci s piperinem byla potvrzena například u barbiturátů, resveratrolu, propranololu, theofylinu, kurkuminu, kvercetinu, beta-karotenu, koenzymu Q10, pyridoxinu, selenu, fylanthinu, ale i u již zmíněného docetaxelu [65].

#### **4.3.2.10. Další účinky**

Piperin zlepšuje u potkanů i neurodegeneraci u stavu kognitivního deficitu vyvolaného ethylcholin aziridiniovým iontem. Tento stav je podobný Alzheimerově chorobě.

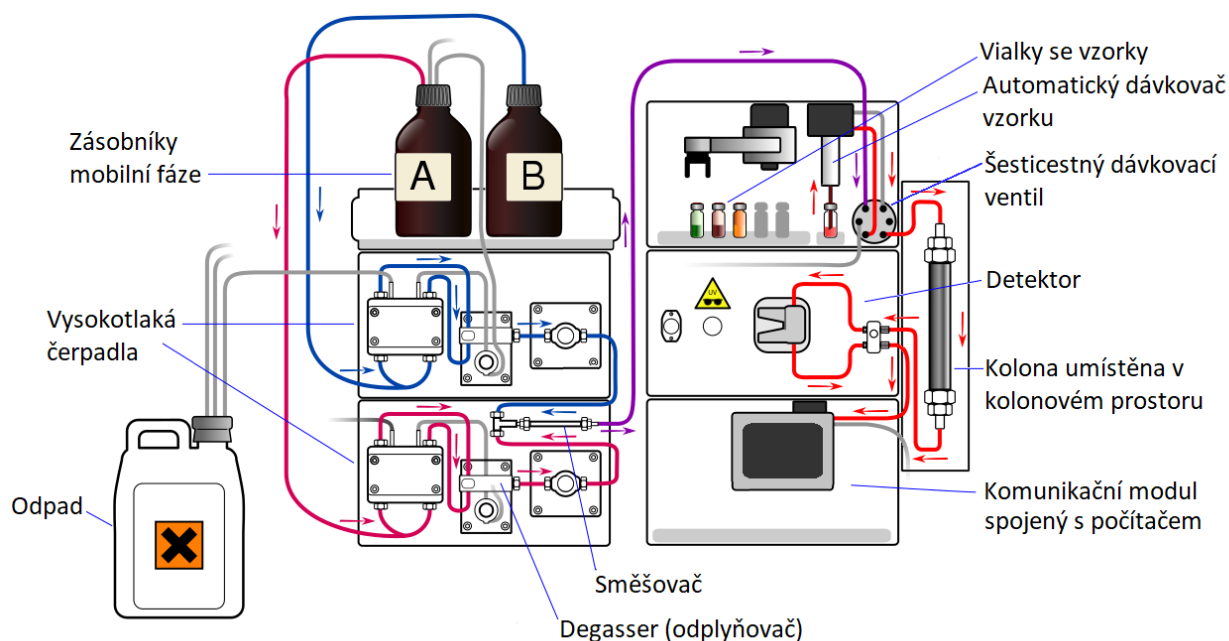
Mechanismus účinku je spojen se zvýšením hustoty neuronů a s inhibicí enzymu acetylcholinesterázy v hipokampu [66].

Kardioprotektivní aktivita piperinu byla potvrzena studií, kdy byly piperinem léčeny myši, u nichž bylo doxorubicinem vyvolané srdeční poškození. Piperin prostřednictvím aktivace receptoru gama aktivovaného peroxisomovým proliferátorem (PPAR $\gamma$ ) zlepšil srdeční funkce, a zároveň snížil oxidační stres srdečního svalu, zánět i apoptózu [67].

#### **4.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

HPLC patří mezi nejpoužívanější analytické metody této doby. Jedná se o fyzikálně-chemickou separační metodu, jejímž principem je dělení látek mezi mobilní (pohyblivou) fázi, ve které je analyzovaná látka rozpuštěna a spolu s ní prochází za vysokého tlaku kolonou, a mezi fází stacionární (nepohyblivou), disponující velkým povrchem, kterou je kolona naplněna. K tomuto dělení analyzovaných látek lze využít jakýchkoliv vratných separačních mechanismů (rozdělování – na základě rozdílné rozpustnosti, adsorpce, iontová výměna, síťový efekt gelu a další) [68, 69].

Výhodami HPLC jsou její citlivost, selektivita, univerzálnost, rychlost, malá spotřeba analyzovaného vzorku a samozřejmě automatizovatelnost. Při jedné analýze jsme schopni za pomoci HPLC provést separaci, ale i kvantitativní a kvalitativní analýzu jednotlivých složek analyzované látky [68].



Obrázek 4: Schéma a popis HPLC systému. (Obrázek převzat a upraven ze zdroje [95].)

Základní součásti HPLC systému jsou zobrazeny na obrázku 6. Mobilní fáze je ze zásobníků čerpána pomocí čerpadla pod vysokým tlakem do celého chromatografického systému. Před přívodem do kolony prochází mobilní fáze degasserem, jenž zajistí odvod všech rozpuštěných plynů, které by mohly zamezit kontinuálnímu průtoku mobilní fáze, často způsobují kolísání základní linie a zvyšují šum signálu detektoru. Odplynění pomocí degasseru lze nahradit i probubláváním mobilní fáze heliem [70]. Dále může mobilní fáze procházet směšovačem, a to v takovém případě, kdy je čerpána z více než jednoho zásobníku. Každý zásobník totiž může obsahovat jinou kapalinu, z nichž se skládá výsledná mobilní fáze. Mobilní fáze může mít po celou dobu analýzy stejné složení, přičemž je i její eluční síla při analýze stále stejná. Takovouto analýzu nazýváme jako izokratickou eluci. V opačném případě mohou vysokotlaká čerpadla a směšovač zajistit měnící se složení mobilní fáze v čase analýzy. S rozdílným složením mobilní fáze se mění i její eluční síla, která se obvykle zvyšuje díky zvýšení podílu méně polární složky a snížení podílu polární složky (vody). To umožňuje dosáhnout co možná nejlepšího rozlišení analyzovaných látek, a zároveň zkrátit dobu analýzy na časově přijatelnou. Tuto analýzu označujeme jako gradientovou eluci [71].

Poté přichází na řadu požadovaný analyzovaný vzorek. Ten může být do chromatografického systému nadávkován buď manuálně nebo automatickým dávkovačem

(autosamplerem). V rámci automatizace v současnosti jednoznačně převažuje užití automatického dávkovače vzorku. Jeho hlavní součástí je obvykle šesticečný otočný ventil s dávkovací smyčkou definovaného objemu. Ve fázi plnění je z vialky injektorem nasáván vzorek, kterým je plněna dávkovací smyčka, přičemž mobilní fáze protéká mimo tuto smyčku. Následně se šesticečný ventil otočí do pozice, kdy smyčkou protéká mobilní fáze, jenž s sebou unáší i vzorek, který je tímto dávkován na kolonu [70, 71].

Vzorek následně spolu s mobilní fází prochází analytickou kolonou, která je umístěna v kolonovém prostoru. Kolonový prostor je termostatovaný a má za úkol udržovat konstantní teplotu během analýzy. Kolísání teploty při analýze by mělo vliv na její selektivitu a na retenční časy [70].

Před analytickou kolonou může být nainstalována ještě předkolona, ta ovšem nemá vliv na samotný průběh analýzy, slouží pouze jako ochrana před poničením analytické kolony nečistotami vzorku a mobilní fáze.

Analytická kolona je naplněna sorbentem – stacionární fází, která může mít polární či nepolární charakter. V případě, že je stacionární fáze tvořena polárním sorbentem, jako mobilní fáze je použito nepolární rozpouštědlo nebo jejich směs. V tomto případě budou na polární stacionární fázi nejvíce zadržovány polární analyzované vzorky, a to především na základě polárních interakcí (vodíkové vazby nebo dipól-dipól interakce). Toto uspořádání se nazývá chromatografie na normální fázi. Častěji je ovšem využívána chromatografie na obrácené (reverzní) fázi, kdy je stacionární fáze tvořena nepolárním sorbentem a mobilní fázi zde představují polární rozpouštědla. Zde jsou hlavním mechanismem retence hydrofóbní interakce, zastoupeny především van der Waalsovými silami. Výhodou chromatografie na obrácené fázi je právě lepší práce s polárními mobilními fázemi, které mají vyšší teploty varu a menší hořlavost [71].

Při průchodu analyzovaného vzorku kolonou interagují jeho složky s mobilní i stacionární fází. Složky, které poskytují jen slabé interakce se stacionární fází, jsou na koloně méně zadržovány, proud mobilní fáze je unáší s sebou dále ve formě úzkého pásu, a jsou tak dříve vymyty (eluovány) z kolony. Naopak látky poskytující silnější interakce se stacionární fází jsou na koloně zadržovány déle, a i vymyty z kolony budou v pozdějším čase. Pokud jednotlivé

složky vzorku poskytují různé interakce se stacionární fází, mohou být takto od sebe odseparovány [68].

Po vymytí z kolony putují jednotlivé složky analyzovaného vzorku do detektoru, ve kterém probíhá kvalitativní i kvantitativní hodnocení vzorku. Detektor převádí fyzikální nebo chemické vlastnosti analyzovaných složek vzorku v mobilní fázi na elektrický signál, který je úměrný jejich koncentraci. Detektor by měl pracovat na takovém principu, aby dokázal detekovat všechny analyzované složky vzorku najednou. Detektor by měl být tedy dostatečně univerzální, jeho odezva by měla být reprodukovatelná, lineární, ale neměla by být závislá na složení mobilní fáze (to by byl problém při gradientové eluci). Velice důležitou vlastností detektoru je také dostatečně vysoká citlivost i pro velmi malé koncentrace analyzovaných látek.

V případě naší analýzy byl použit detektor s diodovým polem (DAD – diode array detector). Tento detektor patří mezi spektrofotometrické detektory, které využívají schopnosti látek absorbovat záření ve viditelné nebo UV oblasti spektra. To způsobuje relativní univerzálnost tohoto detektoru, protože právě v této oblasti spektra vykazuje absorpenci většina organických látek obsahujících ve své molekule chromofor, právě pro tyto látky je detektor i vysoce citlivý. Detektor s diodovým polem patří mezi konstrukčně nejsložitější spektrofotometrické detektory. Skládá se z pole fotodiod v množství nejčastěji 512 až 1024, jejich počet udává spektrální rozlišení detektoru. Díky vysokému počtu fotodiod je detektor schopen zaznamenávat celé spektrum vlnových délek v reálném čase, výsledkem tohoto procesu je trojrozměrné (3D) spektrum, které následně umožňuje získat UV spektrum jednotlivých složek analyzovaného vzorku, a jejich detekci při různě zvolených vlnových délkách. Další výhodou tohoto detektoru je možnost vyhodnocení tzv. čistoty píku, tedy zjištění případné koeluce dalších látek. Pro kvantitativní analýzu je zde využit Lambert-Beeruv zákon, kdy platí, že odezva detektoru je přímo závislá na délce cely a na koncentraci analyzované látky v mobilní fázi [72].

Pokud je použit nedestruktivní detektor, mobilní fáze spolu s analyzovaným vzorkem dále odtéká do nádoby s odpadem, do sběrače frakcí, případně do následujícího sériově zapojeného detektoru [70].

Elektrický signál z detektoru putuje dále do komunikačního modulu, jenž je napojen na počítač, na kterém je nainstalován chromatografický software. Tento software umožňuje ovládání analýzy, kontrolu celého systému i generování a vyhodnocení získaných dat, pomocí tabulek a chromatogramů.

Chromatogram je představen závislostí intenzity odezvy detektoru (osa Y) na čase (osa X), na které jsou znázorněny jednotlivé složky analyzovaného vzorku ve formě chromatografických píků, oddělených základní linií. Kvalitativní charakteristikou každé látky je retenční čas. Ten lze z chromatogramu vyčíst z osy X, jako vzdálenost maxima daného píku od času nadávkování na kolonu (od nuly). Kvantitativním ukazatelem je plocha pod píkem, která je přímo úměrná koncentraci analyzované látky.

## 4.5. Typy chromatografických kolon

Chromatografické kolony naplněné stacionární fází, jako základní komponenta celého chromatografického systému, zodpovídají za jeho účinnost, selektivitu i rychlost analýzy. Jak již bylo zmíněno výše, právě v koloně dochází k samotné separaci analyzovaných látek. Kolony jsou vytvořeny nejčastěji z trubice z nerezové oceli, ale mohou být i z plastu nebo ze skla. Tyto trubice bývají dlouhé 10-30 cm a jejich průměr se pohybuje v rozmezí 2-5 mm. Uvnitř kolony je za pomoci frit uzavřena náplň, jenž je tvořena sorbentem. Sorbent může sloužit buď přímo jako stacionární fáze nebo může být jeho povrch modifikován vhodnou stacionární fází [73, 74].

Dle sorbentu můžeme kolony dělit na částicové a monolitické. Částicové kolony jsou vyplněny malými porézními kulovitými částicemi. Čím menší jsou částice v koloně, tím budou klást větší odpor toku mobilní fáze, proto bude následně zapotřebí vyšších tlaků v systému. Pórovitost částic zajišťuje jejich velký povrch, důležitý pro správnou separaci. Dle povahy lze částice dělit na:

- Porézní částice – v částicových kolonách se tento typ částic vyskytuje nejčastěji. Průměr částic bývá od 1,5 do 5  $\mu\text{m}$ , a k tomu každá z částic disponuje velmi velkým povrchem, proto lze na kolony s těmito částicemi dávkovat i větší objemy analyzovaných vzorků.



- Povrchově porézní částice (též také core-shell nebo fused-core) – jsou tvořeny pevným neporézním jádrem, obaleným porézní vrstvou sorbentu. Celková velikost těchto částic bývá v rozmezí 2 až 5  $\mu\text{m}$ . Při separaci neprochází analyzovaná látka do jádra, ale prochází pouze vrstvou sorbentu, která má velmi velký povrch. Tímto dochází k menší difúzi zón a výrazně se tak zvýší účinnost celé analýzy, protože interakce stacionární a mobilní fáze s analyzovanou látkou jsou mnohem efektivnější. Kolona s tímto typem stacionární fáze byla použita v této diplomové práci.
- Pelikulární částice – opět jsou tvořeny pevným jádrem, které jsou nyní ovšem obaleny velmi tenkou vrstvou polymerní stacionární fáze. Jejich povrch i průměr (1,5 až 2,5  $\mu\text{m}$ ) je oproti povrchově porézním částicím velmi redukován. Díky rychlejšímu přenosu hmoty jsou tyto částice vhodné pro separaci makromolekul.
- Perfúzní částice – při jejich využití můžeme pracovat za nižších tlaků v systému, protože tyto částice mají obvykle větší průměr (často 10  $\mu\text{m}$ ). V perfúzní částici se nachází dva typy pórů, jenž tvoří propojenou síť. Jedny průchozí, velké 400 až 800 nm, kterými prochází mobilní fáze, a druhé menší (30 až 100 nm), které na ně navazují. Tento typ částic se často využívá při rychlé separaci biomakromolekul s vysokou separační účinností [74].

Oproti tomu monolitické kolony jsou tvořeny pouze jedním kusem sorbentu. Takovýto sorbent je syntetizován přímo v koloně nebo se předem připraví, a následně se do kolony uzavře. Díky vysoké porositě mají i tyto sorbenty velmi velký povrch. Porozitu sorbentu zde zastávají dva druhy pórů: makropóry a mesopóry. Makropóry s průměrem obvykle kolem 2  $\mu\text{m}$  jsou zodpovědné hlavně za vedení mobilní fáze skrz kolonu. Za samotnou separaci stojí póry výrazně menší (10 nm), které ovšem mají mnohem větší povrch, a to mesopóry. Podíl sorbentu z celkového objemu kolony je u monolitických kolon nejvíce 20 % (u kolon náplňových až 60 %), to umožňuje zvýšení průtoku mobilní fáze, ale zároveň i zachování nízkého tlaku při separaci [74, 75].

#### **4.5.1. Materiály využívané pro výrobu sorbentů**

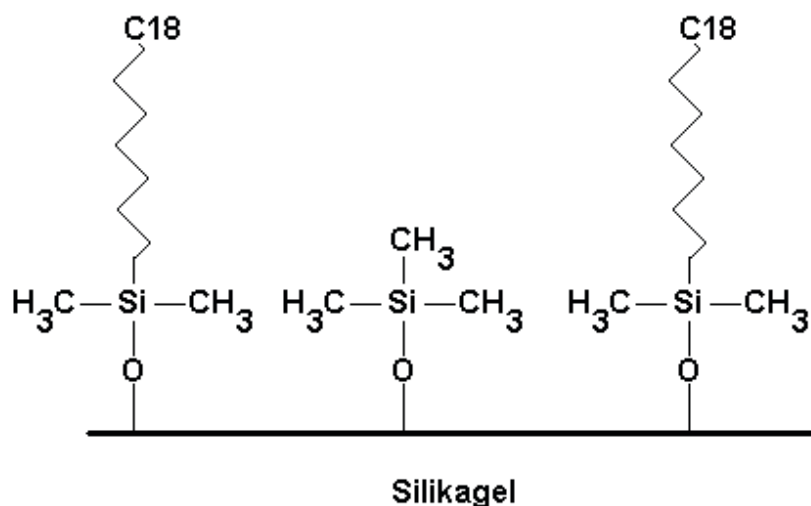
Nejčastěji využívaným materiálem ve výrobě sorbentů do chromatografických kolon je silikagel. Z této látky lze vytvořit částice s přesným průměrem i velikostí pórů, ovšem její

velkou nevýhodou je nestabilita při vyšších teplotách i při vyšším pH. Při pH vyšším než 8 se silikagel rozpouští, při teplotách 60 až 70 °C dochází k jeho degradaci [74, 76].

Tento problém se v současné době řeší nejčastěji kovalentní modifikací silanolových skupin, respektive hydroxylových skupin, kterými je pokryt povrch silikagelu. Modifikace se provádí nejčastěji organosilanem, který nahradí silanolové skupiny za nepolární funkční skupiny [74]. Dle polaritě ligandů kovalentně navázaných organosilanů se vzniklé modifikované stacionární fáze používají v různých módech chromatografie:

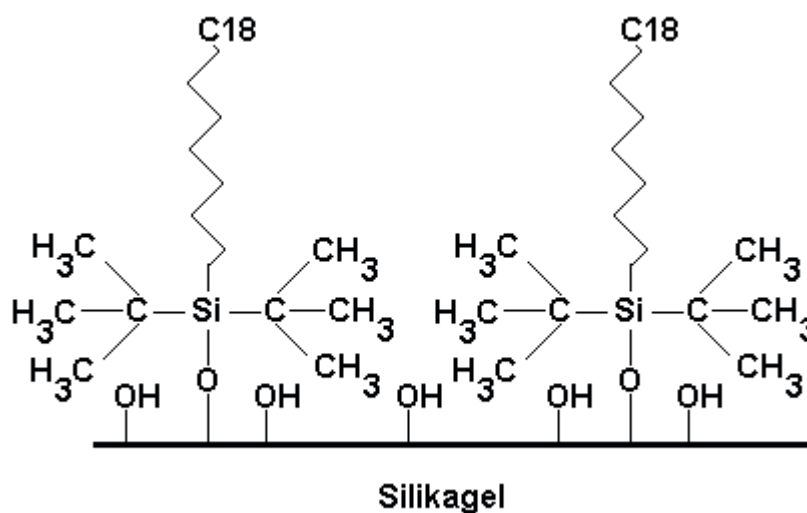
- ligandy s polárním charakterem se využívají v chromatografii na normálních fázích nebo v chromatografii na bázi hydrofilních lipofilních interakcí tzv. HILIC (např.: -OH, -NO<sub>2</sub>, PEG)
- ligandy s nepolárním charakterem jsou využívány v reverzním módu chromatografie (např.: -C8, -C18, amid, fenyl, fluorované fáze)
- ligandy se středně polárním charakterem lze využít v obou chromatografických módech a také i v módu HILIC (např.: -NH<sub>2</sub>, -CN)
- při iontovýměnné chromatografii se používají ligandy s iontovým charakterem (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, COO<sup>-</sup>) [74, 76]

Ovšem kvůli sterickému bránění navázaných objemných skupin, nelze takto modifikovat veškeré silanolové skupiny, ale maximálně jejich polovina, přičemž druhá polovina zůstává ve formě volných polárních silanolů. Nemodifikované silanolové skupiny mohou nepříznivě ovlivnit separaci, protože analyzovaná látka by mohla reagovat s jak modifikovanými skupinami, tak právě i s volnými nemodifikovanými. Tento jev by zapříčiňoval chvostování píků, především bazických látek. Tato potíž je často řešena další modifikací zbylých silanolových skupin malými silany, kupříkladu dimethylchlorsilan či trimethylchlorsilan. Tento proces, jenž sníží počet volných silanolů o dalších 20 až 30 % se nazývá „endcapping“ [74, 77].



Obrázek 5: Znáornění „endcappingu“ volných silanolových skupin pomocí trimethylchlorosilanu [77].

Další problém, který může nastat při modifikaci silikagelu, je hydrolýza a uvolnění těchto navázaných zbytků při pH nižším než 2. I tento problém je ovšem řešitelný, a to sterickým chráněním hydrolyzovatelné vazby objemnější funkční skupinou, například isopropylovou nebo isobutylovou [74, 77].



Obrázek 7: Zobrazení sterického bránění volných silanolových skupin navázáním objemných skupin [77].

Kromě (modifikovaného) silikagelu se samozřejmě používají i další materiály pro výrobu sorbentů, jedněmi z nich jsou oxidy kovů. Nejvíce využíván je oxid zirkoničitý, ale dále také oxid hlinitý a titaničitý. Oxidy kovů jsou vysoce chemicky i fyzikálně odolné látky, oproti silikagelu jsou odolnější při vyšších teplotách i pH. Jejich modifikace je komplikovanější, ale i přesto se na trhu některé modifikované sorbenty oxidů kovů nacházejí [74].

Dalším používaným materiálem jsou polymery, nejčastěji zesítný polystyren, polyvinylalkoholy a substituované methakryláty. Jejich modifikace je relativně snadná a jsou stabilní v širokém rozmezí pH. Mají ale zásadní nevýhodu, a to nižší účinnost separace a riziko změny objemu polymeru při kontaktu s některými organickými rozpouštědly [74].

Atypickým materiálem pro výrobu sorbentů je i grafitizovaný uhlík. Ten je tvořen porézními, hexagonálně uspořádanými, plochými šupinkami atomů uhlíku. Grafitizovaný uhlík je velmi odolný v celém rozmezí pH a snese teploty až do 200°C. Nevýhodami je vysoká náchylnost k poškození za použití vyšších tlaků při separaci, nižší účinnost, horší tvary píků a těžce předpověditelná selektivita. Tento materiál ovšem nachází uplatnění při separaci polohových izomerů a stereo-/ diastereoizomerů [74].

## **4.6. Rešerše stanovení gingerolů, shogaolu, piperinu, kurkuminu a jeho derivátů**

Doposud nebyla publikována metoda, která by stanovovala kombinaci všech těchto analyzovaných látek najednou, ale existuje již mnoho metod pro stanovení buď částečné kombinace těchto látek, nebo pro stanovení jednotlivých látek. Z následující tabulky je patrné, že pro stanovení a separaci gingerolů, shogaolů, piperinu, kurkuminu, demethoxykurkuminu a bisdemethoxykurkuminu je nejčastěji použit systém vysokoúčinné kapalinové chromatografie, spolu s kolonami se stacionárními fázemi typu C18. Organickou složku mobilní fáze nejčastěji tvoří acetonitril a k detekci bývá ve většině případů použit detektor s diodovým polem.

Tabulka 1: Přehled předchozích studií a podmínek separace gingerolů, shogaolů, piperinu, kurkuminu a jeho derivátů.

Vzorek	Stanovované látky	Mobilní fáze	Typ kolony	Detektor	Zdroj
10 ks doplňků stravy a práškového oddenku zázvoru	6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol, 10-shogaol, zingeron, 6-paradol	voda + ACN	Kinetex C18, 150 x 3 mm, 5 μm	DAD	[78]
Doplňky stravy	6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol, 10-shogaol	voda + ACN	pro detekci a identifikaci: Waters Xterra MS C18, 100 x 2,1 mm, 3,5 μm Pro kvantifikaci: Agilent ZORBAX SB-C18, 100 x 2,1 mm, 3,5 μm	tandemově zapojené ESI- MS-MS	[79]
Doplňky stravy, koření, čaje a nápoje obsahující zázvor	6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol	voda + MeOH	Waters Symmetry C8, 150 x 3,9 mm, 5 μm	DAD	[80]
Vzorky obsahující kurkuminoidy z <i>Curcuma longa</i> : kari, hořčičná omáčka, instantní dýňová polévka, nudle a instantní kořenící prášek na nudle	kurkumin, demethoxykurkumin, bisdemethoxykurkumin	Voda + 0.1 % CH <sub>3</sub> COOH, ACN + 0,1 % CH <sub>3</sub> COOH	Kinetex C18 Fused-core (částice sorbentu s pevným jádrem), 100 x 4,6 mm, 2,6 μm	DAD	[81]
Mikroemulze získané zapouzdřením kurkuminoidního prášku v mikroemulzi olej ve vodě (O/W)	kurkumin, demethoxykurkumin, bisdemethoxykurkumin	ACN + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (45:55)	Symmetry® C18, 250 x 4,6 mm, 5 μm	DAD	[82]
Plody <i>Piper nigrum</i>	piperin	voda + MeOH (30:70)	HiQ Sil C18W, 100 x 1,5 mm, 3 μm	UV	[83]
Lidská plazma	kurkumin, piperin	0,15 % vodný roztok HCOOH + ACN (60:40)	XB-C8, 250 x 4,6 mm, 5 μm	ESI-MS-MS	[84]

## **5. Experimentální část**

### **5.1. Použité přístroje a pomůcky**

#### **5.1.1. Přístroje**

Chromatografický systém:

Chromatograf: Shimadzu LC-10

Pumpy: LC-10AD VP

Degasser: DGU -14 A

Autosampler: SIL-HT A

Termostat kolony: CTO-10AC VP

Detektor: DAD detektor SPD-M10A VP

Vyhodnocení: Software LC Labsolutions

#### **5.1.2. Kolona**

YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm; 3 µm

#### **5.1.3. Pomůcky**

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Analytické váhy – Sartorius securi 225D-1CEU

Ultrazvuková lázeň – Bandelin SONOREX RK100

Pipety – Brand

Plastové injekční stříkačky – Braun, Omnifix®

PTFE filtry o velikosti pórů 0,2 µm - Whatman™ a filtry 0,45 µm nylon – VWR

## **5.2. Použité chemikálie**

### **5.2.1. Standardy**

Demethoxycurcumin  $\geq 95,0\%$  (HPLC); Sigma-Aldrich

Bisdemethoxycurcumin  $\geq 95,0\%$  (HPLC); Sigma-Aldrich

Curcumin  $\geq 99,5\%$  (HPLC); Sigma-Aldrich

Piperine  $\geq 97\%$ ; Sigma-Aldrich

6-Shogaol  $\geq 98\%$ ; ChemFaces

6-Gingerol  $\geq 98\%$ ; ChemFaces

8-Gingerol  $\geq 98\%$ ; ChemFaces

10-Gingerol  $\geq 98\%$ ; ChemFaces

### **5.2.2. Rozpouštědla**

Methanol (HPLC gradient grade); Fisher Chemical

Acetonitril (HPLC gradient grade); Honeywell

Kyselina octová ledová 100,0%; VWR Chemicals

Ultračistá voda; čisticí systémem Milli-Q (Millipore, Berford)



## 5.3. Testované vzorky

### 5.3.1. Doplnky stravy

VIESTE Kurkumin – piperin plus (+ zázvor), 60 cps.

VANAVITA Bio turmeric + ginger, 90cps.

BioMedical Ginger root extract, 60 cps.

EPIGEMIC® Shogaol zázvor, 30 cps.

SWANSON® Ginger root extract, 60 cps.

SOLGAR® Ginger root (Zingiber officinale), 100 cps.



Obrázek 9: Testované doplňky stravy [85–90].

## 5.3.2. Čaje

Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea)

Loyd Brusinky & Zázvor

Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem

Pickwick Nos a krk se zázvorem

Tesco Ginger & Lemon

Teekanne Ginger Curcuma



Obrázek 10: Testované čaje [96–101].

## 5.4. Deklarovaný obsah gingerolů, kurkuminů, piperinu a shogaolu v testovaných potravních doplňcích

Tabulka 2: Deklarovaný obsah látek v testovaných potravních doplňcích.

Výrobce	Název přípravku	Deklarovaný obsah rostlinného extraktu (mg/1 cps.)			
		Zázvor lékařský	Kurkuma dlouhá	Černý pepř	Shogaol
Vieste	Kurkumin-piperin plus + zázvor	50	650	10	-
Vanavita	Bio tumeric + ginger	40	670	extrakt 10 (piperin 9,5)	-
BioMedical	Ginger root extract	427	-	-	-
Epigemic®	Shogaol zázvor	250 (standardizovaný na 10 % gingerolů a z toho podíl 6-gingerol/ 6-shogaol min. 30 %)	-	-	z 10 % gingerolů podíl 6-gingerol/ 6-shogaol min. 30 %
Swanson®	Ginger root extract	200 (standardizováno na 20 % gingerolů)	-	-	-
Solgar®	Ginger root	500 + práškový extrakt z kořene zázvoru 5	-	-	-

## 5.5. Deklarovaný obsah zázvoru a kurkumy v testovaných čajích

Tabulka 3: Deklarovaný obsah látek v testovaných čajích.

Výrobce	Název čaje	Obsah zázvoru a kurkumy v %	
		Zázvor lékařský	Kurkuma dlouhá
Dilmah	Orange & Ginger	2	-
Loyd	Brusinky & Zázvor	13	-
Teekanne	Dýchací cesty a krk se zázvorem	29	-
Pickwick	Nos a krk se zázvorem	25	-
Tesco	Ginger & Lemon	13	-
Teekanne	Ginger Curcuma	43	40

## 5.6. Příprava roztoků standardů

Standardy 6-gingerolu, 8-gingerolu, 10-gingerolu a 6-shogaolu byly rozpuštěny v 500  $\mu$ l methanolu podle tabulky uvedené níže. Standardy piperinu, kurkuminu, demethoxykurkuminu a bisdemethoxykurkuminu byly rozpuštěny v acetonitrilu okyseleném kyselinou octovou 500  $\mu$ l (49:1). Okyselená fáze byla použita kvůli lepší stabilitě kurkuminů, které jsou nestabilní při neutrálních hodnotách pH [82], zejména bisdemethoxykurkuminu, který se jinak rozkládal. Všechny skleněné vialky s roztoky standardů byly uchovávány v ledničce, aby se tak předcházelo jejich degradaci.

### 5.6.1. Příprava zásobních roztoků standardů

Tabulka 4: Příprava zásobních roztoků standardů.

Standard	Navážka (mg)	Methanol (μl)	ACN + CH <sub>3</sub> COOH (49:1)	Koncentrace (mg/l)
6-gingerol	0,50	500	-	1000
8-gingerol	0,55	500	-	1100
10-gingerol	0,50	500	-	1000
6-shogaol	0,53	500	-	1060
Piperin	0,51	-	500	1020
Kurkumin	0,51	-	500	1020
Demethoxykurkumin	0,51	-	500	1020
Bisdemethoxykurkumin	0,53	-	500	1060

### 5.6.2. Příprava pracovních roztoků standardů

Pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků standardů methanolem. Zásobní roztoky byly naředěny dvacetkrát, tedy 50 μl z každého zásobního roztoku se naředilo 950 μl methanolu. Dále se připravil směsný roztok standardů smísením 50 μl každého ze zásobních standardů, který byl naředěn 700 μl methanolu.

### 5.6.3. Příprava roztoku pro test vhodnosti chromatografického systému

Pro test vhodnosti chromatografického systému byl připraven nový směsný roztok standardů. Tento byl tvořen 100 μl z každého zásobního standardu a doplněn 200 μl methanolu do objemu 1000 μl. Tento směsný roztok standardů byl naředěn methanolem v poměru 50:50. Výsledná koncentrace připraveného roztoku tedy byla 50 mg/l.

#### 5.6.4. Příprava roztoku pro opakovatelnost

Naředěný roztok standardů (50 mg/l), který byl použit pro test vhodnosti chromatografického systému, byl následně využit i pro měření opakovatelnosti.

#### 5.6.5. Příprava roztoků pro kalibraci

Z neředěného směsného roztoku standardů pro test vhodnosti chromatografického systému (100 mg/l) byla později připravena kalibrační řada roztoků o různé koncentraci pro test linearity. Tato kalibrační řada vznikla ředěním směsného roztoku standardů methanolem v různých poměrech, které je shrnuto v tabulce 5.

Tabulka 5: Ředění kalibračních roztoků standardů.

Objem směsného roztoku standardů ( $\mu$ l)	Objem methanolu ( $\mu$ l)	Výsledná koncentrace (mg/l)
100	0	100
80	20	80
60	40	60
40	60	40
20	80	20
10	90	10
5	95	5
2	98	2

#### 5.6.6. Příprava roztoku pro přesnost

Bylo naváženo 100 mg vzorku od potravních doplňků EPIGEMIC® Shogaol zázvor a VANAVITA Bio tumeric + ginger, který se následně extrahoval do 10 ml methanolu, pomocí ultrazvukové lázně po dobu 15 minut. Dále byla tato směs přefiltrována do vialek přes 0,2  $\mu$ m PTFE filtry.

## 5.7. Příprava analyzovaných vzorků

### 5.7.1. Doplnky stravy

Obsah tří kapslí doplňku stravy byl vysypán a homogenizován v kádince. Následně bylo naváženo 100 mg této směsi, která byla extrahována do 10 ml methanolu po dobu 15 minut pomocí ultrazvukové lázně. Poté byl roztok přefiltrován přes PTFE filtry o velikosti pórů 0,2  $\mu\text{m}$  do skleněných vialek.

### 5.7.2. Čaje

Čaje byly připraveny dle návodu na obalu, byly louhovány po dobu 5-10 minut ve 250 ml horké vody. Takto připravený extrakt byl následně přefiltrován přes PTFE filtry s velikostí pórů 0,2  $\mu\text{m}$  do skleněných vialek.

Druhé vzorky těchto čajů byly extrahovány do methanolu. Obsah čajového sáčku byl vysypán do 40 ml methanolu, tato směs byla 15 minut ultrazvukována, a následně přefiltrována do vialek.

## 5.8. Parametry měření

K analýze byl použit HPLC chromatograf Shimadzu LC-10 vybavený binární pumpou, degasserem, autosamplerem, kolonovým termostatem a detektorem diodového pole. Pro kontrolu systému, sběr a vyhodnocování dat byl využit chromatografický software LC Labsolutions. Chromatografie byla provedena pomocí gradientové eluce, která je charakteristická proměnlivým složením mobilní fáze během separace. Optimální chromatografické podmínky, podle kterých byla následně provedena i validace, zahrnovaly jako mobilní fázi A: acetonitril, jako mobilní fázi B: ultračistou vodu. Mobilní fáze protékala kolonou průtokem 1 ml/min. Složení gradientu mobilní fáze v průběhu analýzy je znázorněno v tabulce 6.

Tabulka 6: Průběh finálního gradientu použitého pro validaci metody.

Časový průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01 – 5,00	50
5,00 – 9,00	50 – 25
9,00 – 9,20	25 – 10
9,20 – 11,00	10
11,00 – 11,20	10 – 50
11,20 – 13,00	50
13,01	stop

Separace probíhala při 30 °C na koloně YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6 mm) o velikosti částic 3 µm. Objem dávkovaného vzorku na kolonu činil 10 µl. Separované píky byly detekovány při několika vlnových délkách. Píky gingerolů byly detekovány při 281 nm, 6-shogaol při 224 nm, piperin při 340 nm a píky kurkuminoidů při 420 nm.

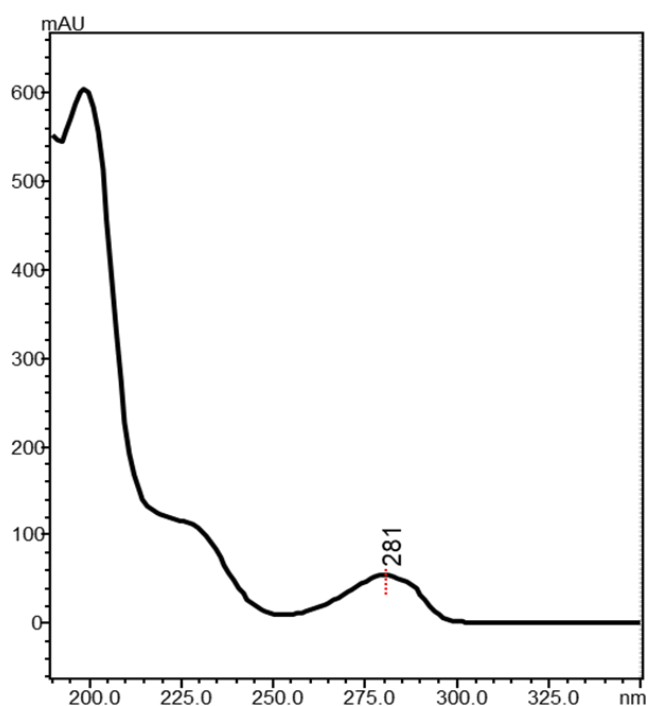


## 6. Výsledky a diskuze

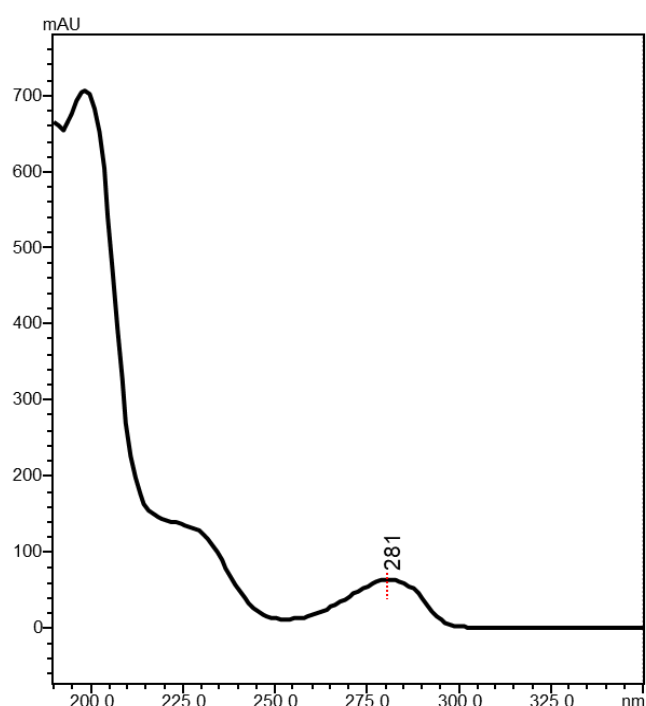
### 6.1. Vývoj analytické metody, optimalizované parametry

#### 6.1.1. Volba vlnové délky

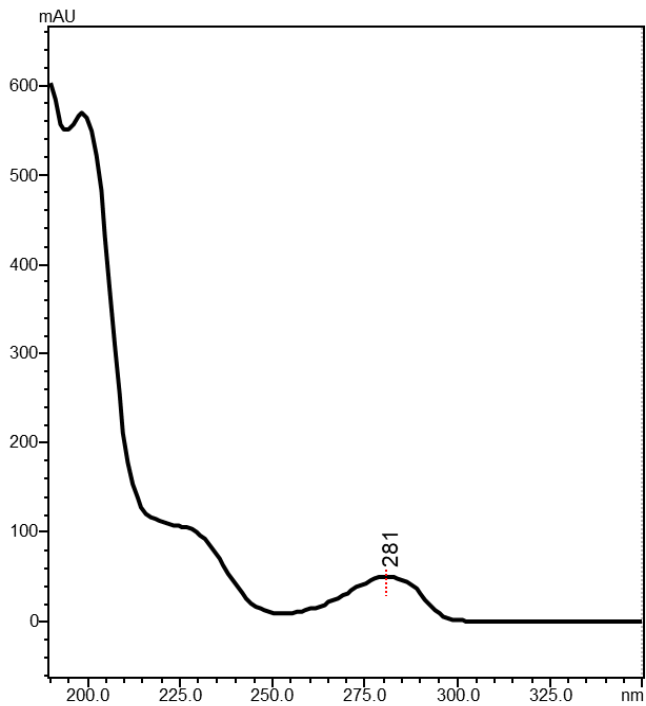
DAD detektor umožnil výběr různých vlnových délek pro detekci jednotlivých analytů. Detekce byla provedena při čtyřech vlnových délkách: 224, 281, 340 a 420 nm. Tyto vlnové délky byly vybrány dle absorpčních maxim jednotlivých analyzovaných látek. Naměřená absorpční spektra jednotlivých látek v použité mobilní fázi jsou následující:



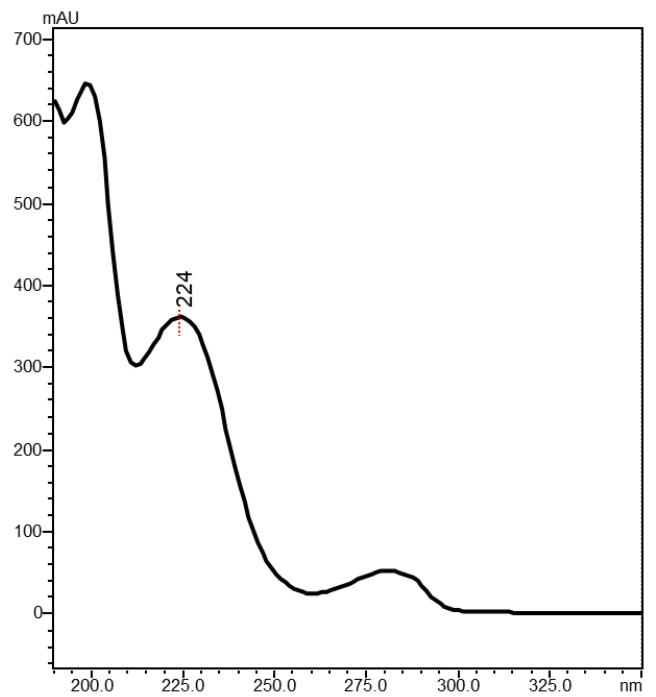
Obrázek 11: Absorpční spektrum 6-gingerolu.



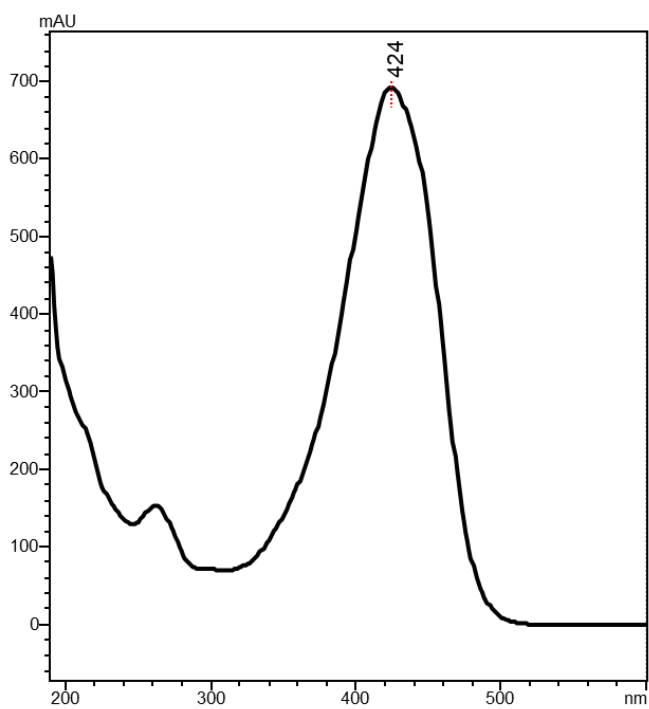
Obrázek 9: Absorpční spektrum 8-gingerolu.



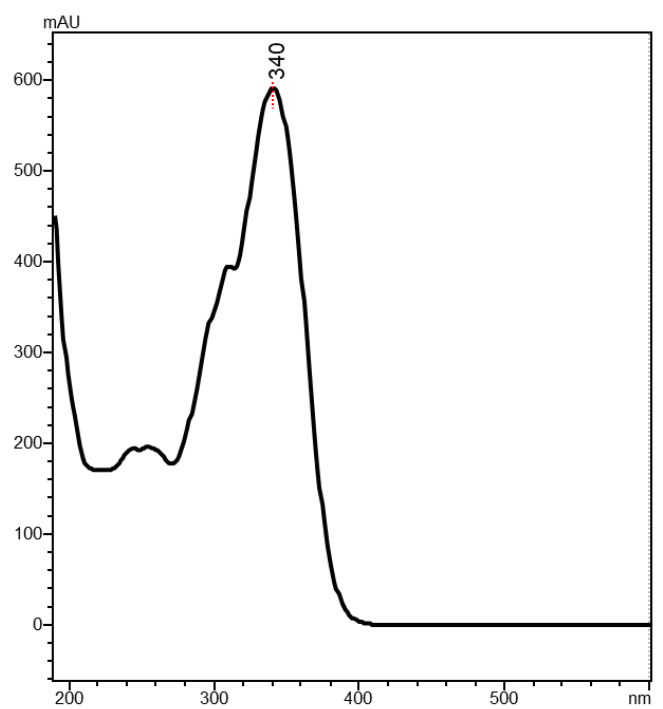
Obrázek 13: Absorpční spektrum 10-gingerolu.



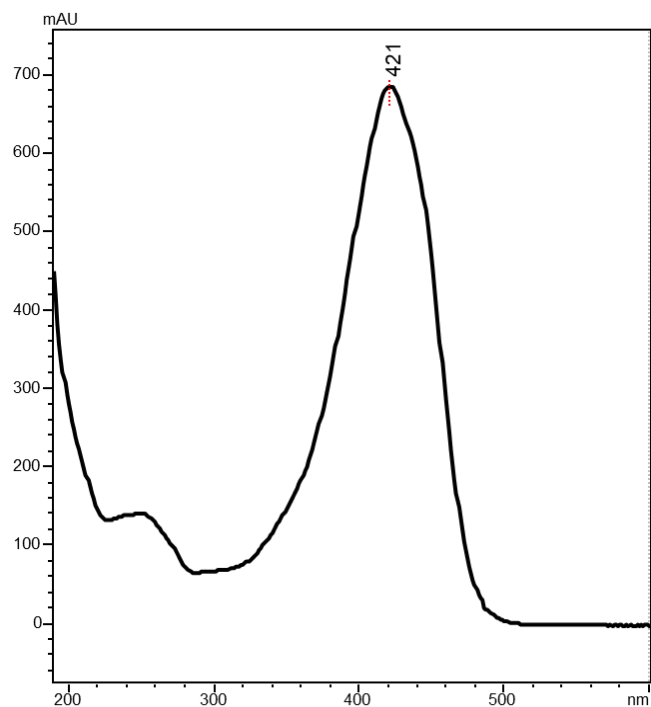
Obrázek 14: Absorpční spektrum 6-shogaolu.



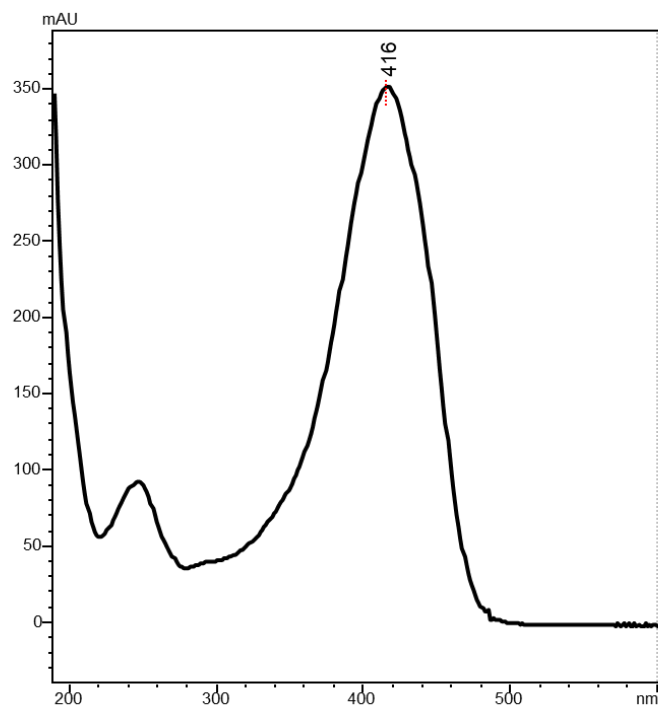
Obrázek 10: Absorpční spektrum kurkuminu.



Obrázek 16: Absorpční spektrum piperinu.



Obrázek 11: Absorpční spektrum demethoxykurkuminu.



Obrázek 18: Absorpční spektrum bisdemethoxykurkuminu.

Zvolené vlnové délky, při nichž byla prováděna detekce, tedy odpovídaly jednotlivým analyzovaným látkám tak, jak je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 7: Jednotlivé vlnové délky, při kterých byly detekovány konkrétní analyzované látky.

Analyzovaná látka	$\lambda$ (nm)
6-shogaol	224
6-gingerol	281
8-gingerol	
10-gingerol	
Piperin	340
Kurkumin	420
demethoxykurkumin	
bisdemethoxykurkumin	

Pro optimalizaci separačních podmínek celé analýzy (volba gradientu a výběr vhodné kolony) byla využita jednotná vlnová délka 276 nm. Při této vlnové délce se absorpční spektra všech osmi analyzovaných látek překrývají, proto je bylo možné takto detekovat všechny současně.

## 6.1.2. Volba složení mobilní fáze

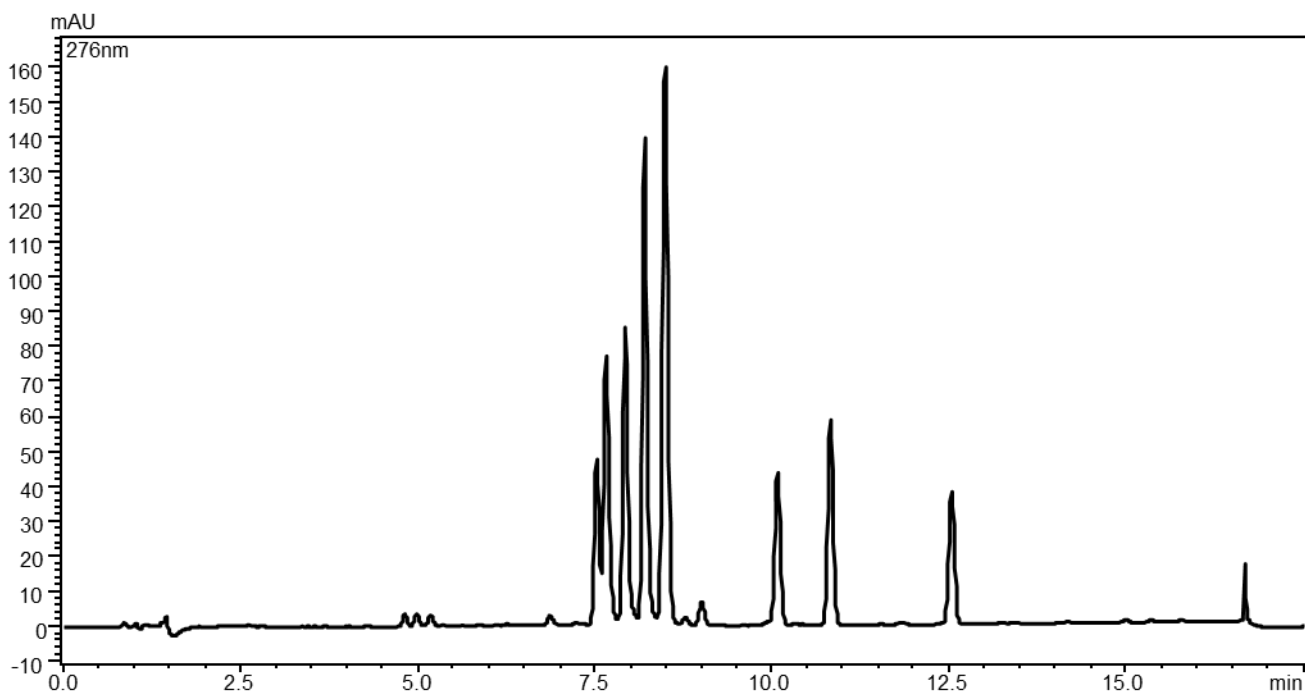
Při výběru vhodné mobilní fáze se vycházelo z postupů publikovaných v odborné literatuře. Bylo vyvinuto již několik analytických metod pro stanovení kurkuminů, piperinu, gingerolů a shogaolu, ale ještě nebyla v odborné literatuře publikována taková metoda, která by stanovila a separovala všechny tyto látky současně. Pro separaci gingerolů a shogaolu byla nejčastěji využita gradientová eluce, pro kterou byly potřeba dvě mobilní fáze – mobilní fáze A: acetonitril a mobilní fáze B: voda [78, 91]. Pro separaci kurkuminů a piperinu byla většinou použita izokratická eluce, jejíž mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a vody (90:10, v/v) [92]. Okyselený acetonitril na pH 3 byl použit pro analýzu samotných kurkuminů [93].

Na první testované koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm bylo proto v prvotním hledání optimálních podmínek separace vyzkoušeno několik mobilních fází na základě zmíněné literatury:

1. Gradientová eluce – mobilní fáze A: acetonitril, mobilní fáze B: ultračistá voda. Průtok mobilních fází byl 1,2 ml/min, eluce trvala 17,50 min, teplota kolonového prostoru činila 30 °C. Složení mobilních fází během eluce je znázorněno v následující tabulce 8. Z testovaných 8 látek byly kromě prvního páru odděleny téměř všechny.

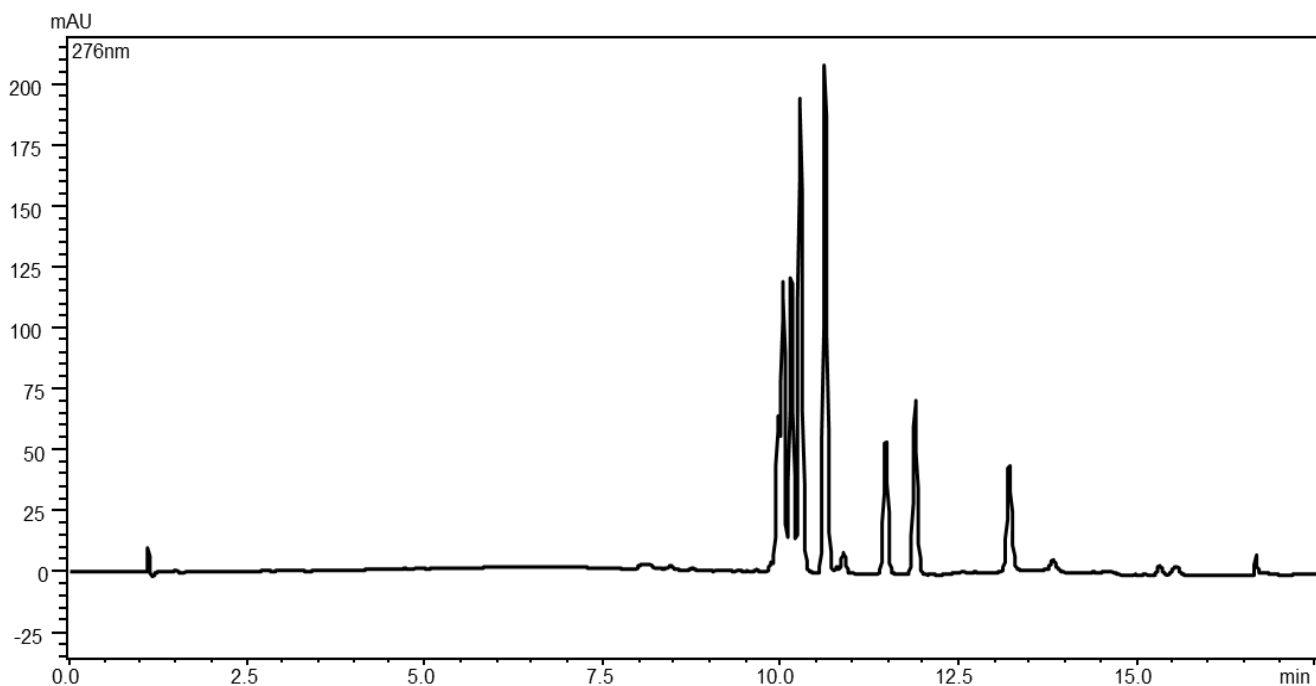
Tabulka 8: Průběh gradientu (č. 2) pro výběr mobilní fáze.

Časový průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01 – 15,00	70 -0
15,00 – 15,20	0 - 70
15,20 – 17,50	70
17,50	stop



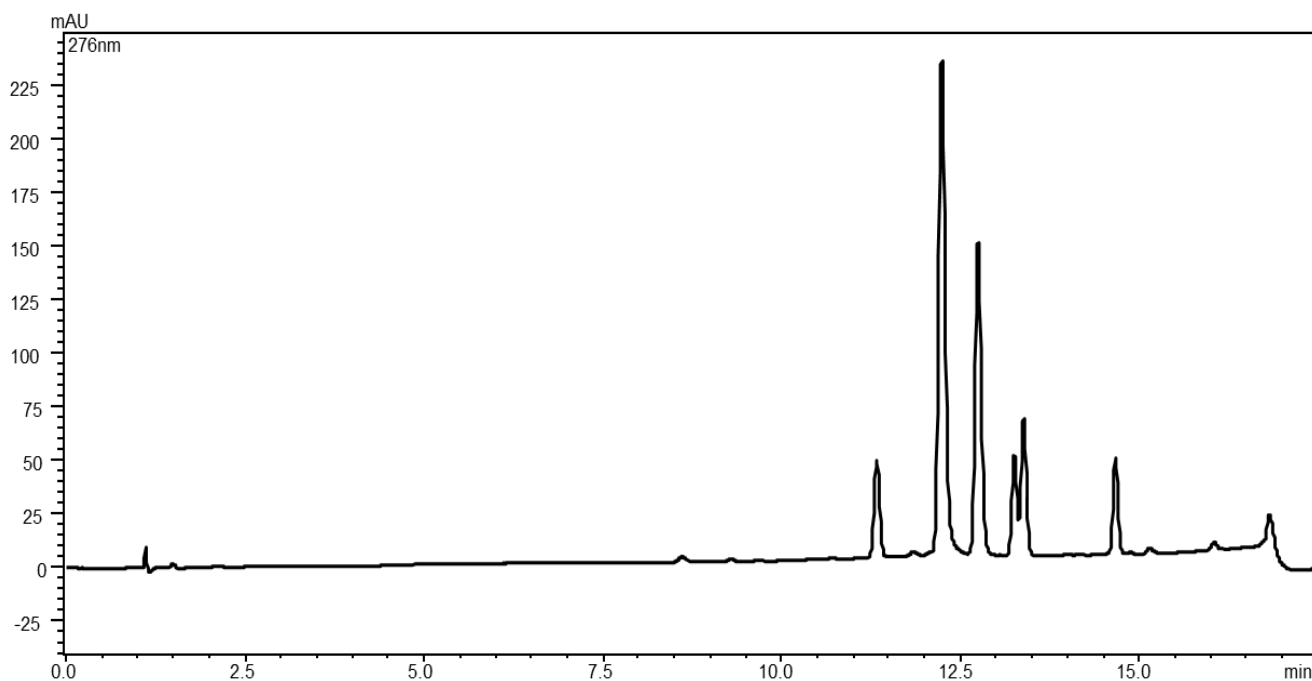
Obrázek 19: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6mm, 5 µm), 17,5 minut při teplotě 30 °C formou gradientové eluce o složení mobilních fází A: ultračistá voda, B: acetonitril.

2. Gradientová eluce – mobilní fáze A: acetonitril, mobilní fáze B: 1% kyselina octová. Ostatní podmínky gradientové eluce jsou stejné jako u předchozí analýzy. U této okyselené fáze nedošlo k separaci prvních 4 píků.



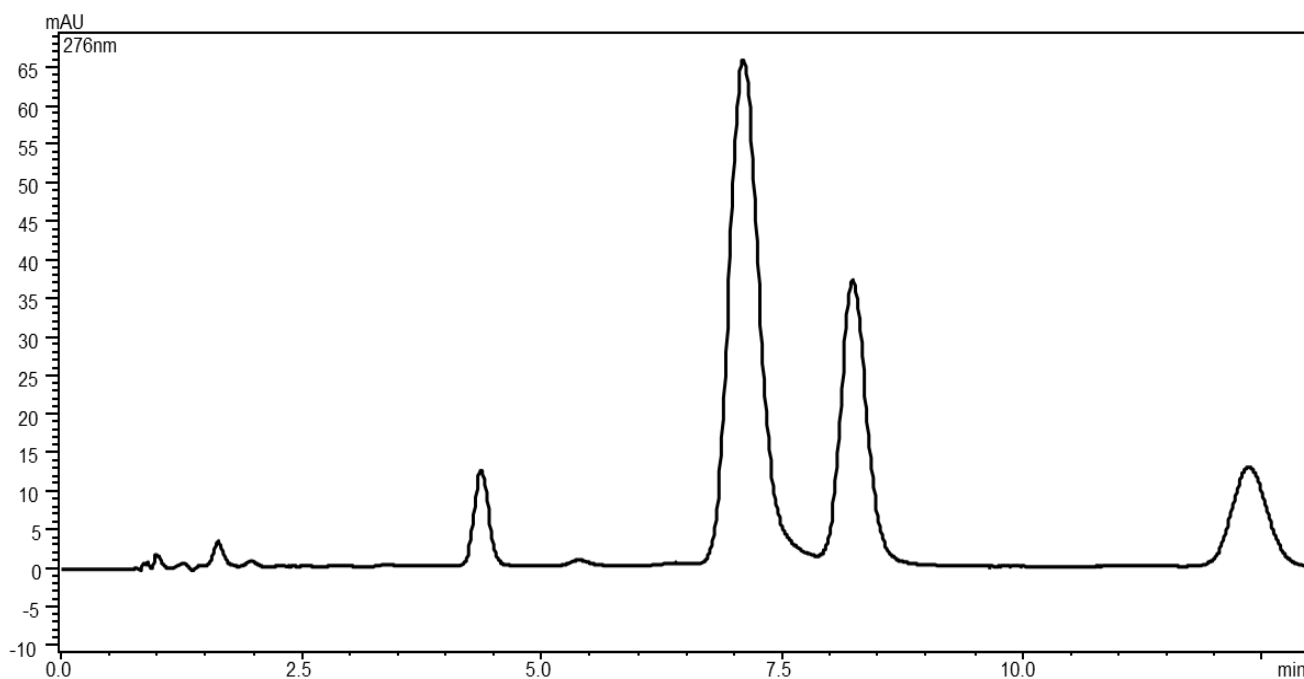
Obrázek 20: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6mm, 5 µm), 17,5 minut při teplotě 30 °C formou gradientové eluce o složení mobilních fází A: 1% kyselina octová, B: acetonitril.

3. Gradientová eluce – mobilní fáze A: methanol, mobilní fáze B: ultračistá voda. Ostatní podmínky gradientové eluce jsou stejné jako u předchozí analýzy. Vliv methanolu byl spíše negativní jelikož docházelo ke koeluci více párů píků.



Obrázek 21: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6mm, 5  $\mu$ m), 17,5 minut při teplotě 30 °C formou gradientové eluce o složení mobilních fází A: ultračistá voda, B: methanol.

4. Izokratická eluce – mobilní fáze: methanol : voda 66:33; průtoková rychlost 1,5 ml/min. Čas analýzy se zkrátil na 13 minut, teplota na koloně byla 30 °C. Isokratická eluce vedla ke koeluci většiny analyzovaných látek, proto byla vyhodnocena jako zcela nevhodná.



Obrázek 22: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6mm, 5 µm), 13 minut při teplotě 30 °C formou isokratické eluce o složení mobilní fáze methanol : voda (1 ml/min : 0,5 ml/min).

Jako optimální pro tuto analýzu byla zvolena gradientová eluce s mobilními fázemi A: acetonitril, B: ultračistá voda. Okyselení mobilní fáze sice zajistilo užší píky, ale snížilo odezvu a rozlišení analytů. Methanol byl pro tuto analýzu vyhodnocen jako zcela nevhodný. Pro další optimalizaci separace bylo tedy testováno několik vybraných gradientů s acetonitrilem a vodou, a dalších 13 stacionárních fází jež jsou uvedeny níže.

### 6.1.3 Volba vhodného gradientu a kolony

Podmínky separace byly pro zkoušení kolon následující: teplota kolonového prostoru činila 30 °C, celá eluce trvala 17,5 minut, nástřik směsi standardů byl 10 µl, detekce byla prováděna při 276 nm, průtok mobilní fáze 1,0 ml/min, separace látek probíhala gradientovou elucí, která zahrnovala dvě mobilní fáze – A: acetonitril, B: ultračistá voda.

Na každé koloně byly zkoušeny 4 lineární gradienty s různým obsahem organické fáze na začátku separace. Průběh jednotlivých gradientů je popsán v tabulkách 9-12.

Tabulka 9: Průběh gradientu č. 1

Časový průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01 – 15,00	80 -0
15,00 – 15,20	0 - 80
15,20 – 17,50	80
17,50	stop

Tabulka 10: Průběh gradientu č. 2

Časový průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01 – 15,00	70 -0
15,00 – 15,20	0 - 70
15,20 – 17,50	70
17,50	stop

Tabulka 11: Průběh gradientu č. 3

Časový průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01 – 15,00	60 -0
15,00 – 15,20	0 - 60
15,20 – 17,50	60
17,50	stop



Tabulka 12: Průběh gradientu č. 4

Časový průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01 – 5,00	50
5,00 – 15,00	50 – 0
15,00 – 15,20	0 – 50
15,20 – 17,50	50
17,50	stop

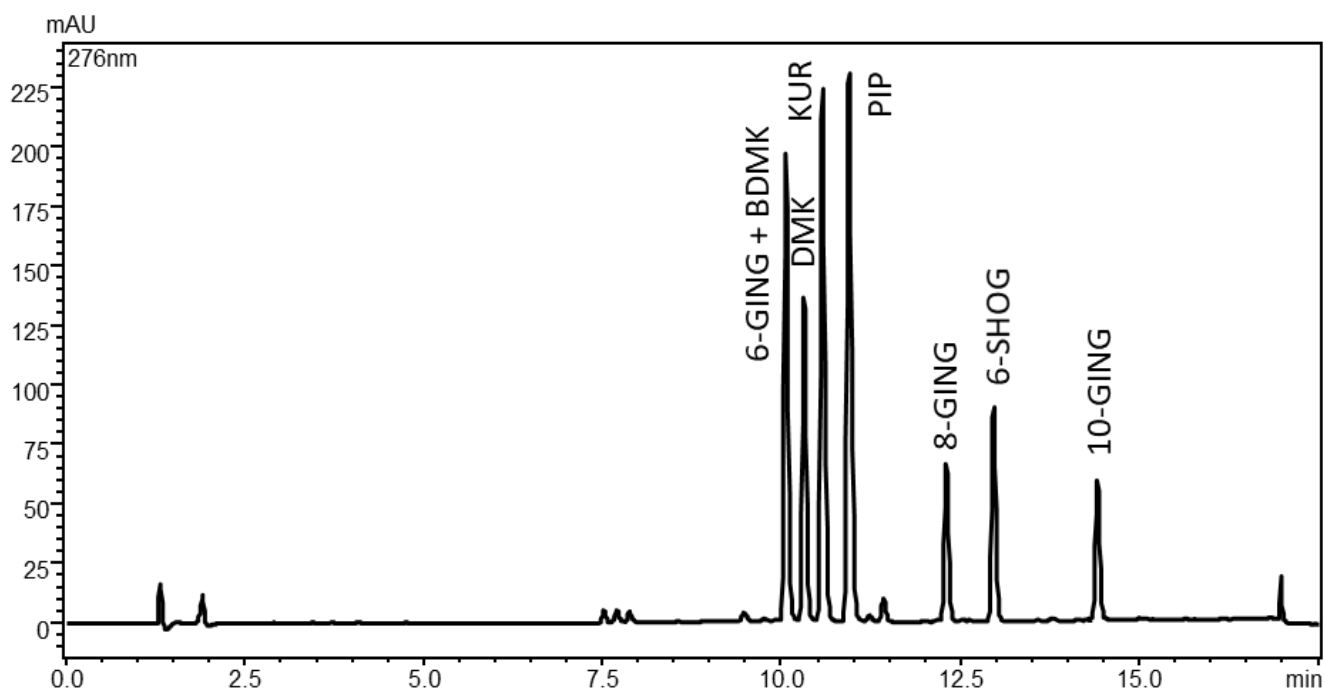
Nejprve byla provedena identifikace jednotlivých píků směsi, porovnáním retenčních časů po nástřiku dílčích standardů. Poté bylo testováno celkem 14 různých stacionárních fází. Na každé koloně byly zkoušeny všechny 4 gradienty. Zkoušené kolony jsou shrnuty v tabulce 13.

Tabulka 13: Seznam testovaných kolon.

	Kolona
1	YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm
2	YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 µm
3	YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 µm
4	Ascentis® Express 90Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm
5	Ascentis® Express 90Å RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm
6	Kinetex® XB-C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm
7	Kinetex® EVO C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm
8	Luna® Omega, Polar C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 5 µm
9	ARION® Plus C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm
10	ARION® Polar C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm
11	ARION® Phenyl-Butyl, 150 x 4,6 mm, 3 µm
12	ACE UltraCore Super C18, 150 x 4,6 mm, 2,5 µm,
13	ACE UltraCore, Super Phenyl-Hexyl, 150 x 4,6 mm, 2,5 µm
14	Avantor® ACE® Excel, C18-Amide, 150 x 4,6 mm, 2 µm

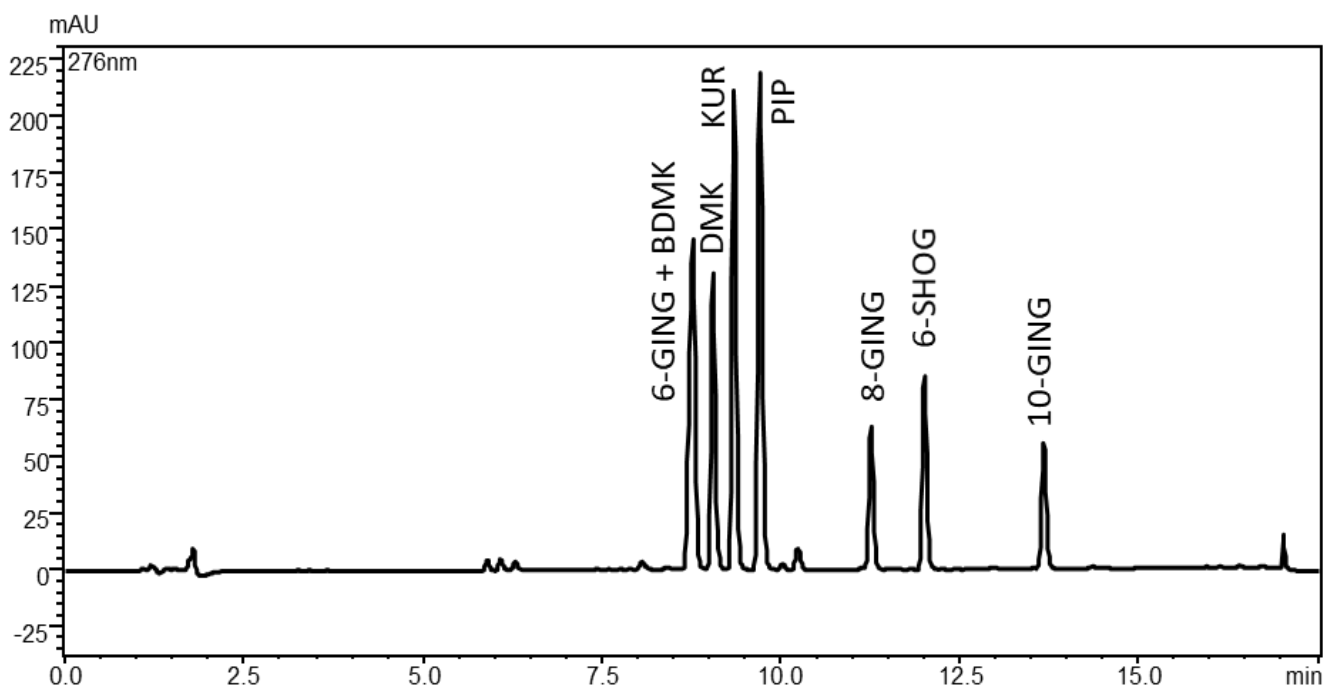
Při hodnocení chromatogramů jednotlivých kolon se přihlíželo zejména k rozlišení jednotlivých látek, symetrii píků, ale i k celkovému času separace. Na následujících chromatogramech jsou zobrazeny pouze příklady kolon s nejlepší účinností z hlediska rozlišení a času separace. Jednotlivé separované látky jsou označeny zkratkami: 6-GING – 6-gingerol, 8-GING – 8-gingerol, 10-GING – 10-gingerol, 6-SHOG – 6-shogaol, PIP – piperin, KUR – kurkumin, DMK – demethoxykurkumin, BDMK – bisdemethoxykurkumin.

### Kolona č. 3: YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 μm



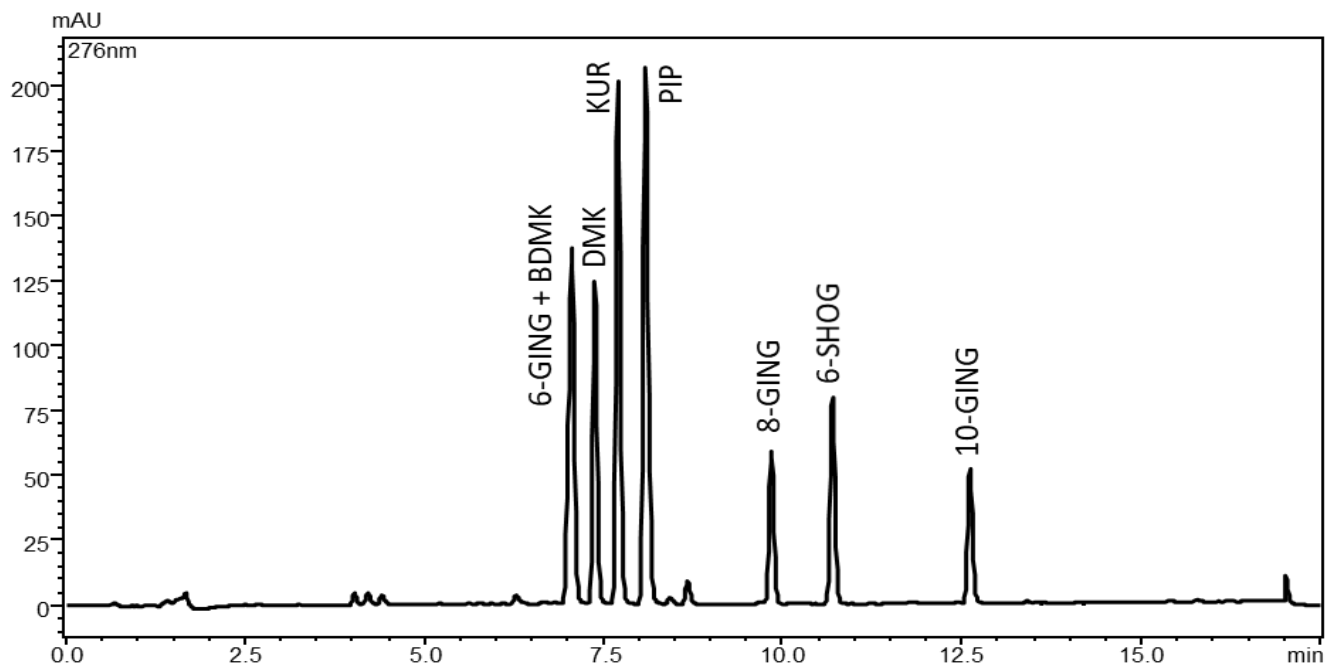
Obrázek 23: Chromatogram separace na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 μm, za použití gradientu č. 1.

Jednotlivé látky nebyly při gradientu č. 1 dostatečně odseparovány, zejména 6-gingerol a bisdemethoxykurkumin tvořili jeden pík.



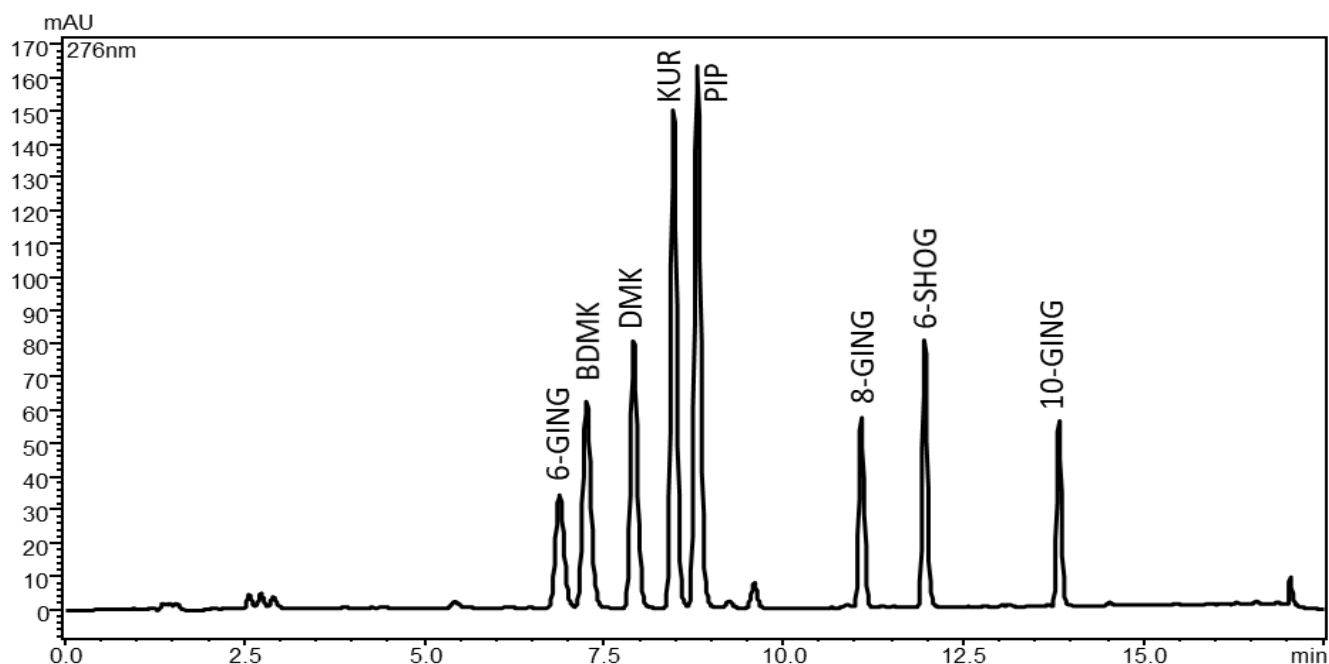
Obrázek 24: Chromatogram separace na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 μm, za použití gradientu č. 2.

Při gradientu č. 2 opět nebyly dostatečně odseparovány 6-gingerol a bisdemethoxykurkumin, jenž tvořili jeden pík. Celá separace se ale lehce časově zkrátila.



Obrázek 25: Chromatogram separace na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m, za použití gradientu č. 3.

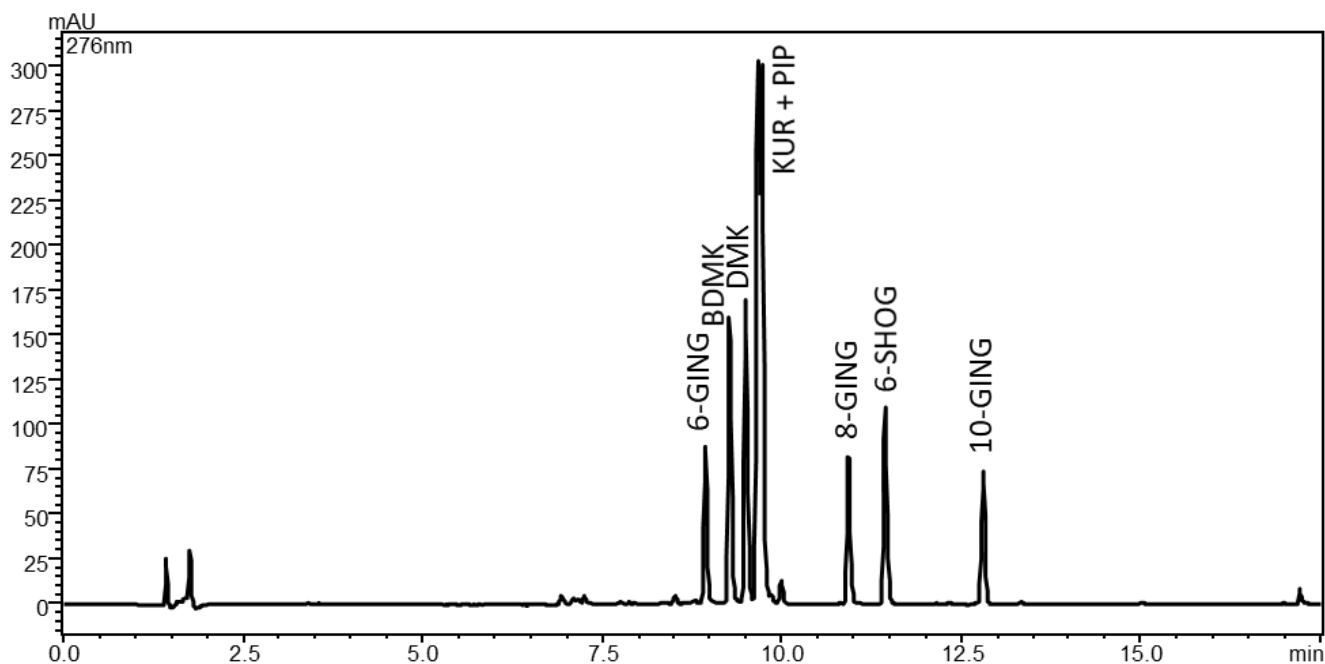
Jednotlivé látky nebyly ani při gradientu č. 3 dostatečně odseparovány, 6-gingerol a bisdemethoxykurkumin opět tvořili jeden pík. Celá analýza se v čase ale výrazně zkrátila.



Obrázek 26: Chromatogram separace na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m, za použití gradientu č. 4.

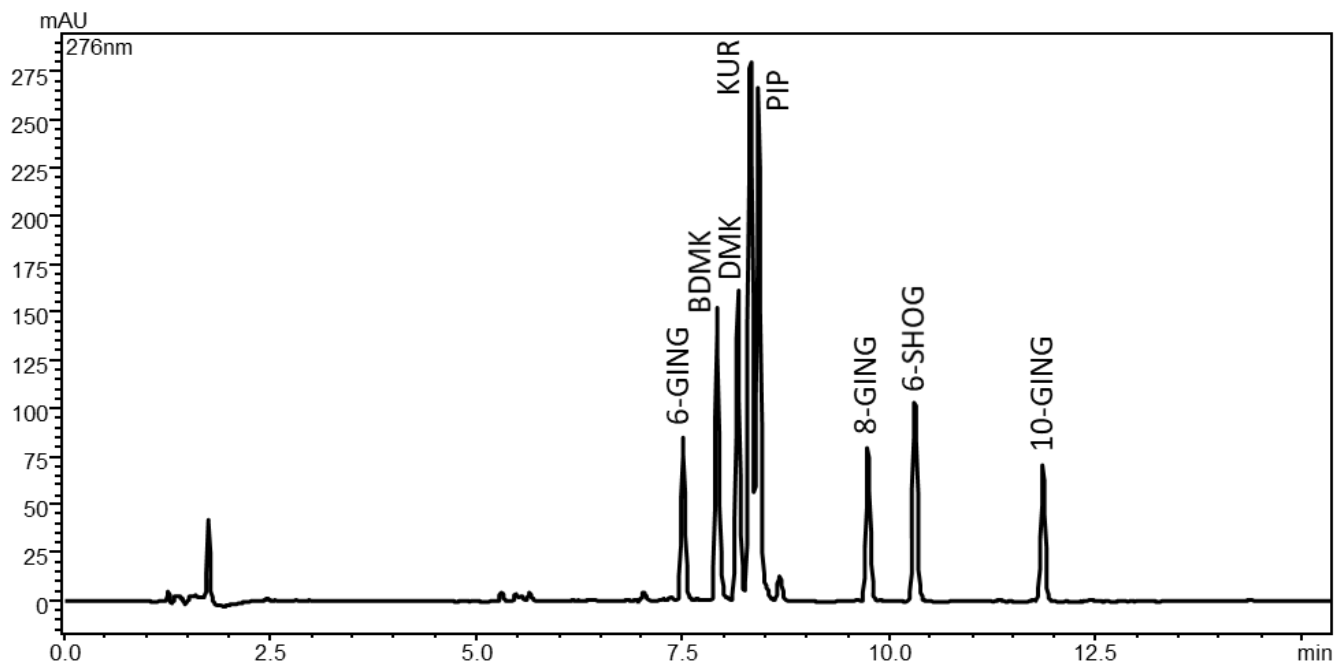
Všechny analyzované látky byly při gradientu č. 4 dostatečně rozlišeny až na základní linii, proto byla tato kolona vyhodnocena jako optimální pro použití.

**Kolona č. 6: Kinetex® XB-C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm**



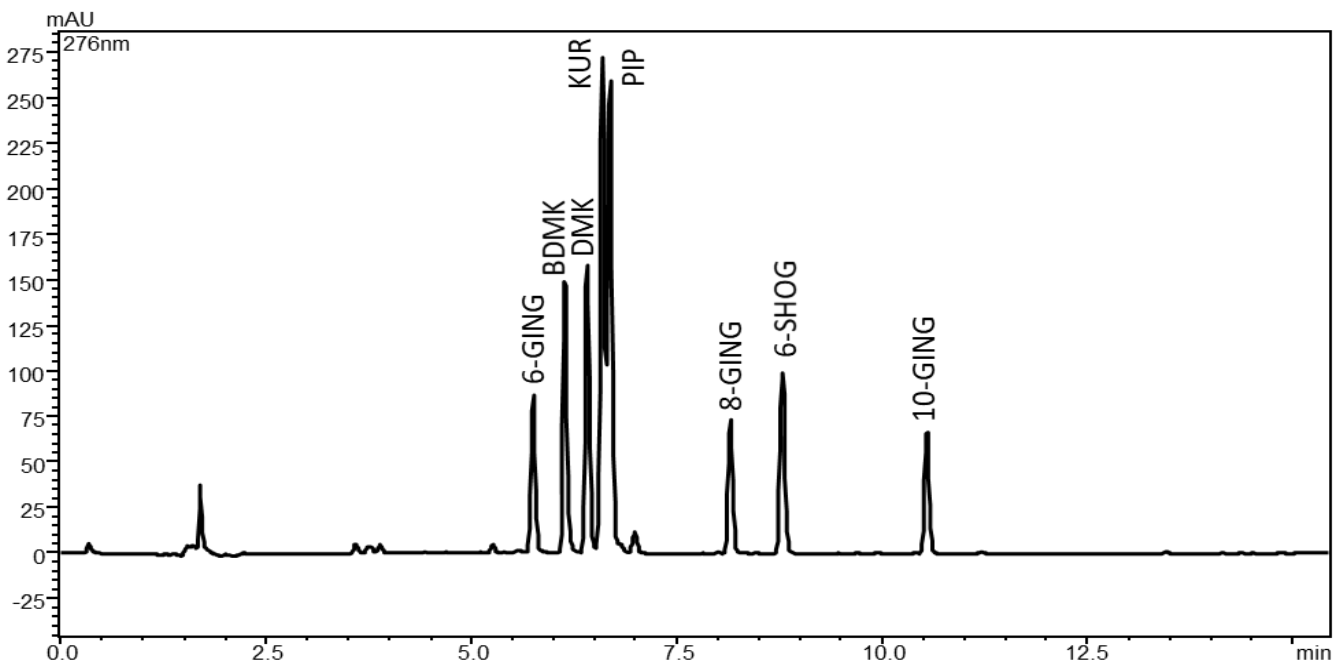
Obrázek 27: Chromatogram separace na koloně Kinetex® XB-C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, za použití gradientu č. 1.

Jednotlivé látky nebyly při gradientu č. 1 dostatečně odseparovány, kurkumin a piperin tvořili dvojpík.



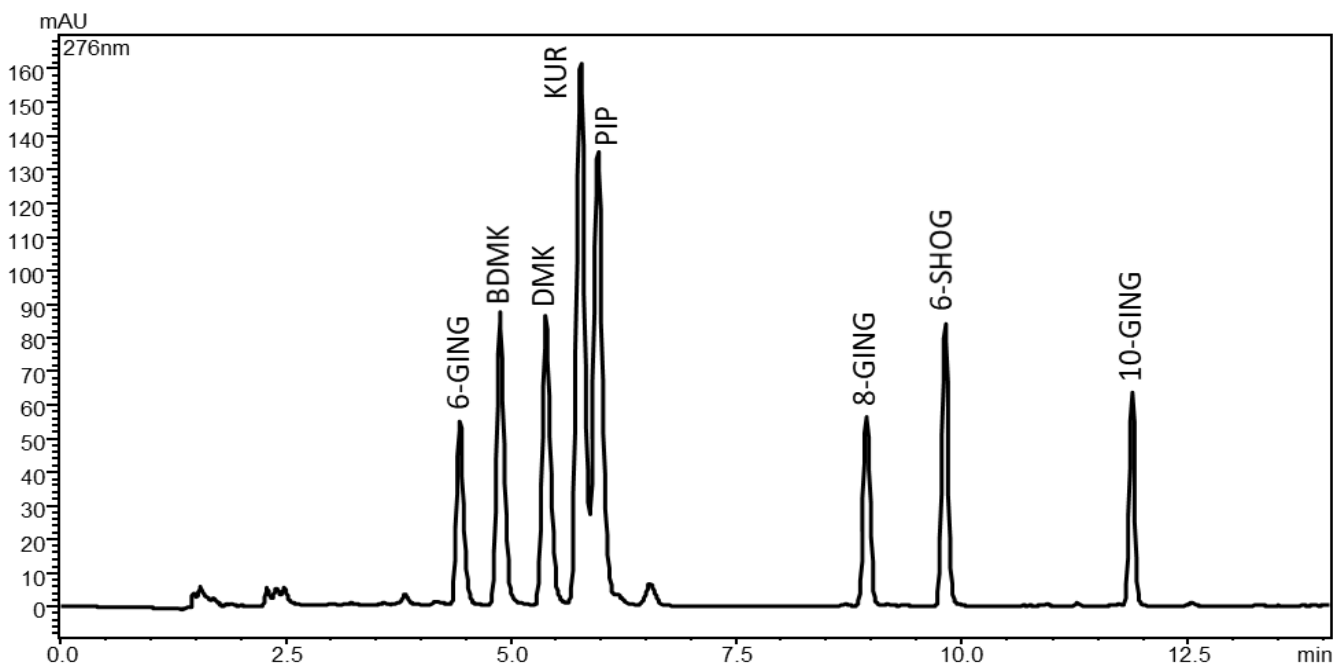
Obrázek 28: Chromatogram separace na koloně Kinetex® XB-C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, za použití gradientu č. 2.

Analyzované látky nebyly při gradientu č. 2 opět dostatečně odseparovány, kurkumin a piperin tvořili dvojpík, který byl ovšem rozlišen více, než při gradientu č. 1.



Obrázek 29: Chromatogram separace na koloně Kinetex® XB-C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, za použití gradientu č. 3.

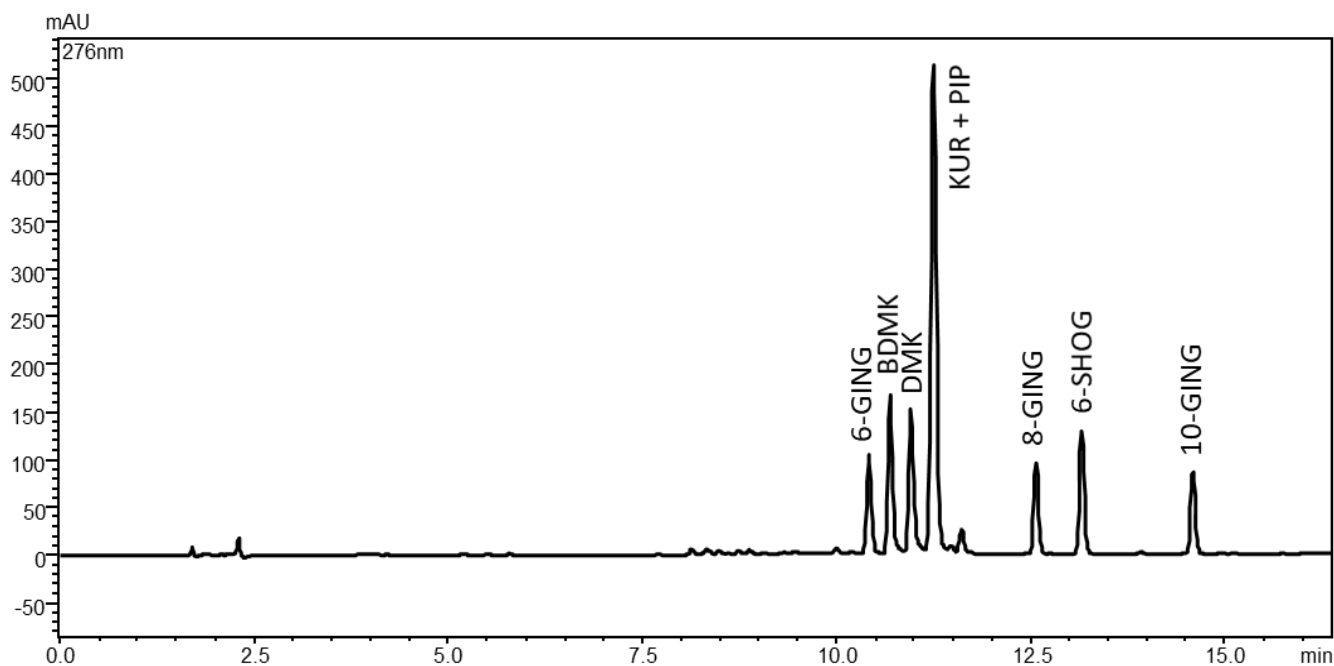
Jednotlivé látky nebyly znovu při gradientu č. 3 dostatečně odseparovány, kurkumin a piperin tvořili dvojpík. Celá analýza se ale výrazně zkrátila v čase.



Obrázek 30: Chromatogram separace na koloně Kinetex® XB-C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, za použití gradientu č. 4.

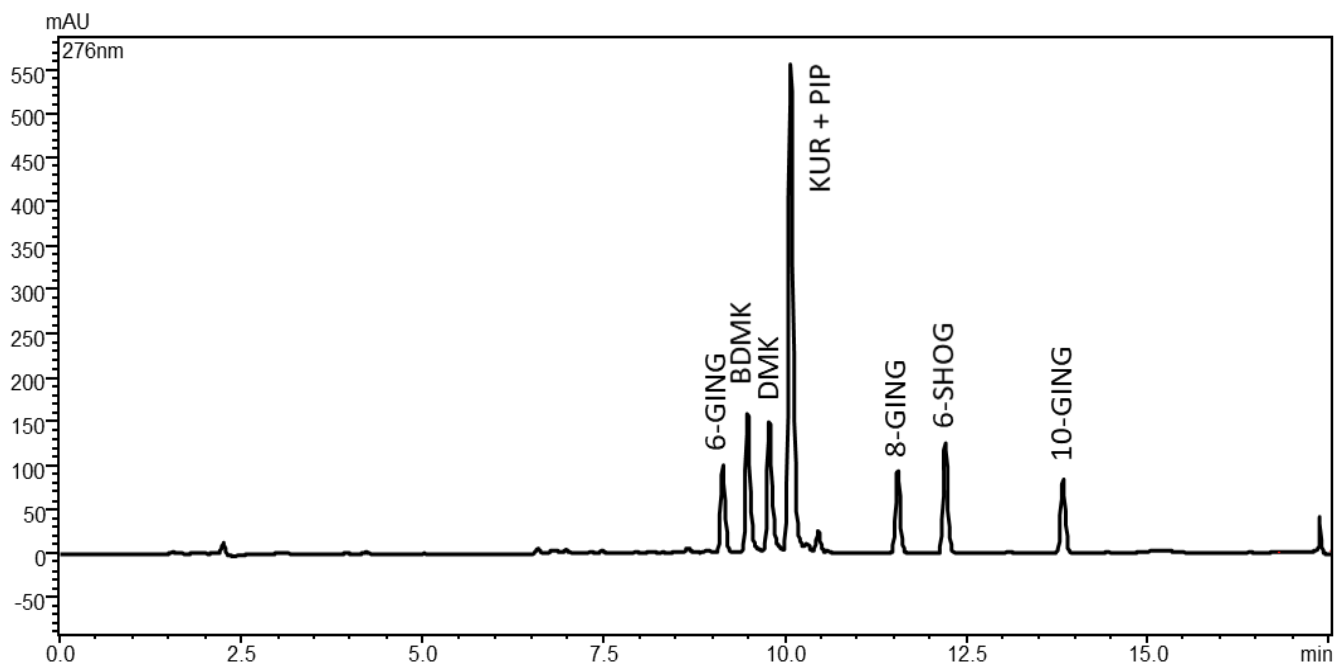
Jednotlivé látky při gradientu č. 4 nebyly dostatečně rozlišeny až na základní linii. Kurkumin a piperin opět tvořili dvojpík, který byl ovšem rozlišen více, než u předchozích gradientů.

**Kolona č. 10: ARION® Polar C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm**



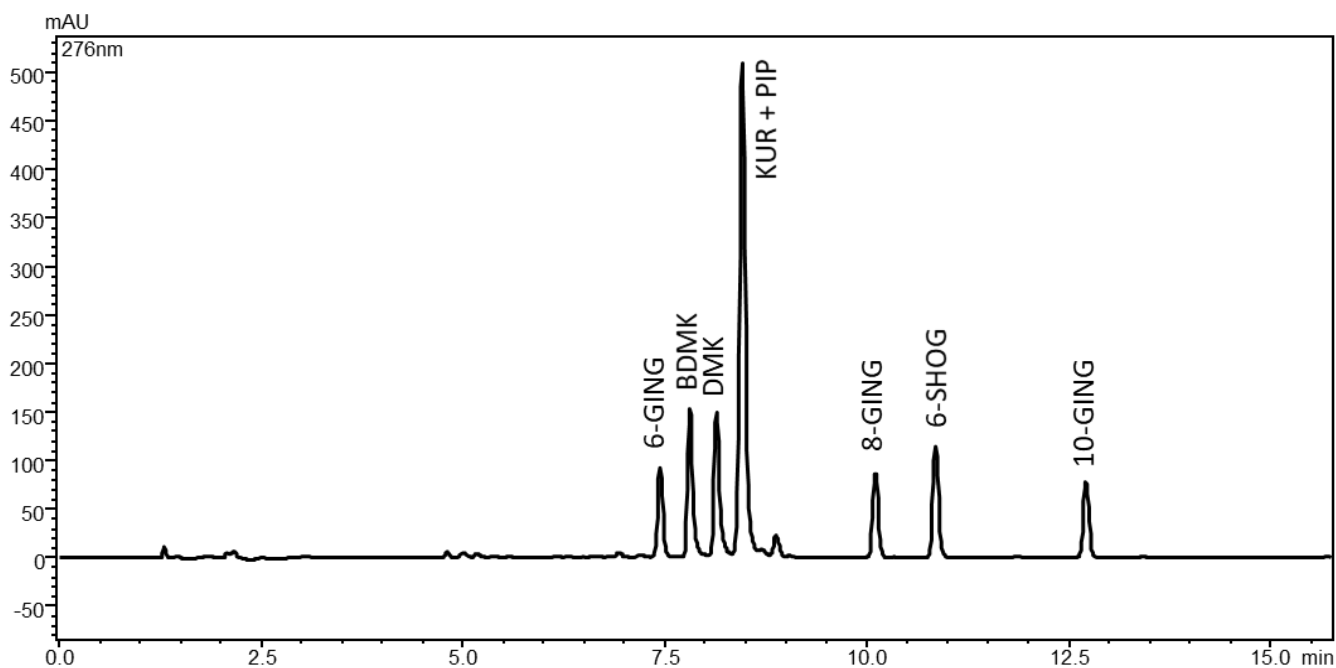
Obrázek 31: Chromatogram separace na koloně ARION® Polar C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm, za použití gradientu č. 1.

Analyzované látky nebyly při gradientu č. 1 dostatečně odseparovány, kurkumin a piperin tvořili jeden pík.



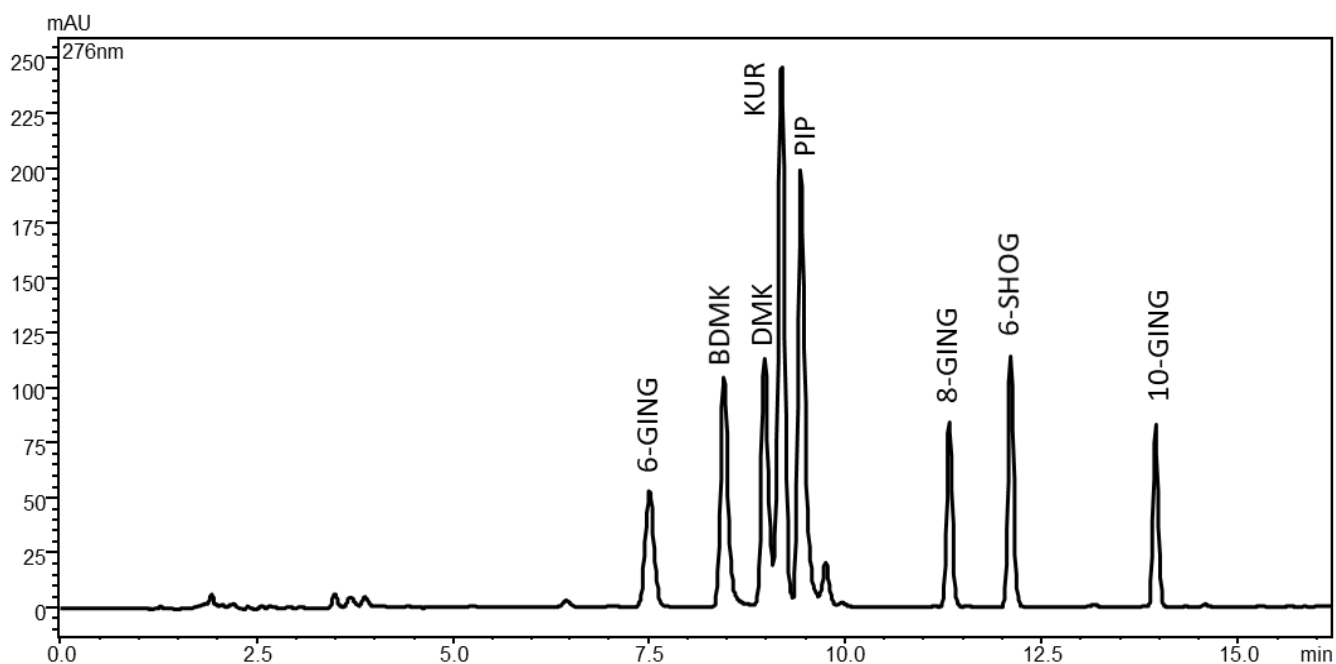
Obrázek 32: Chromatogram separace na koloně ARION® Polar C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm, za použití gradientu č. 2.

Jednotlivé látky nebyly při gradientu č. 2 dostatečně odseparovány, kurkumin a piperin opět tvořili jeden pík.



Obrázek 33: Chromatogram separace na koloně ARION® Polar C18, 150 x 4,6 mm, 3 μm, za použití gradientu č. 3.

Jednotlivé látky nebyly při gradientu č. 3 opět dostatečně odseparovány, kurkumin a piperin stále tvořili jeden pík, celá analýza se ovšem lehce zkrátila v čase.



Obrázek 34: Chromatogram separace na koloně ARION® Polar C18, 150 x 4,6 mm, 3 μm, za použití gradientu č. 4.

Jednotlivé látky nebyly při gradientu č. 4 dostatečně rozlišeny až na základní linii, demethoxykurkumin a kurkumin tvořili dvojpík, ale oproti předchozím gradientům na této koloně, zde bylo zřetelně vidět všech 8 píků.



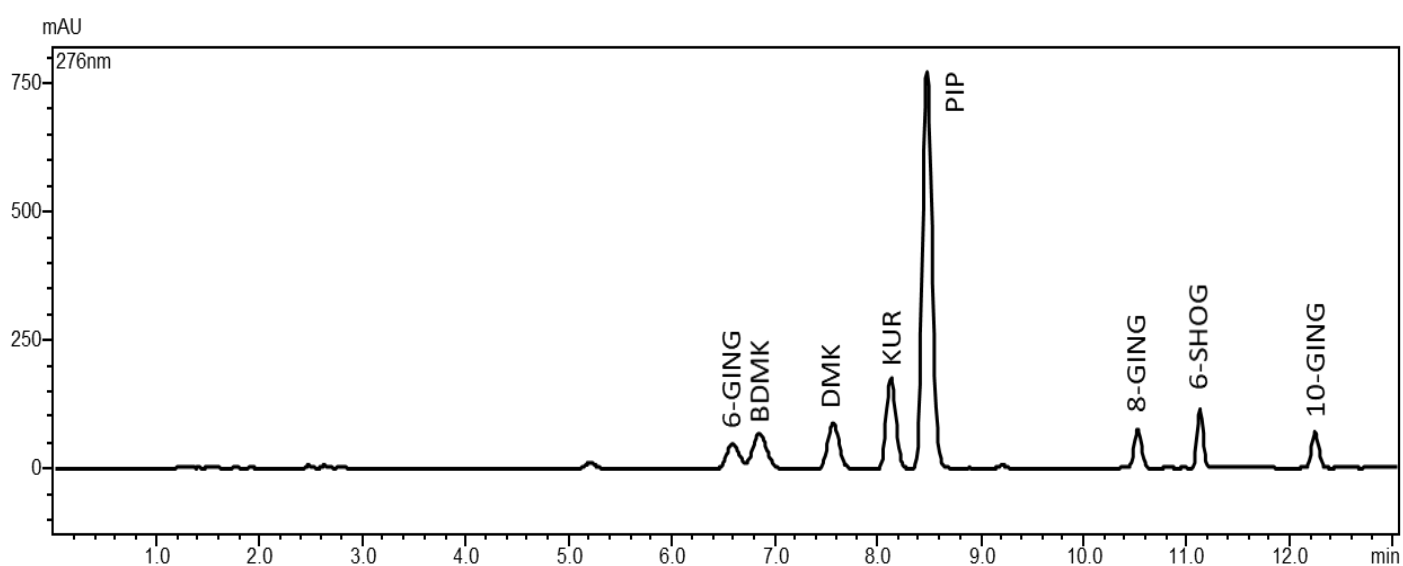
Po otestování všech čtyř gradientů na všech dvanácti testovaných kolonách, byla jako optimální kolona vyhodnocena kolona č. 3: YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 μm částice, s gradientem č. 4.

Poté, co byla zjištěna optimální kolona a gradient, byl gradient č. 4 poupraven, s cílem zkrácení celé analýzy. Úpravou gradientu se analýzu podařilo zkrátit ze 17,5 minut na 13 minut. Průběh upraveného gradientu je znázorněn v tabulce 14.

Tabulka 14: Průběh finálního gradientu.

Časový průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01 – 5,00	50
5,00 – 9,00	50 – 25
9,00 – 9,20	25 – 10
9,20 – 11,00	10
11,00 – 11,20	10 – 50
11,20 – 13,00	50
13,01	stop

Chromatogram finálního gradientu na testované koloně č. 3: YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 μm, je zobrazen na následujícím obrázku.



Obrázek 35: Chromatogram separace za finálních podmínek.

## 6.2. Validace vyvinuté metody za finálních podmínek

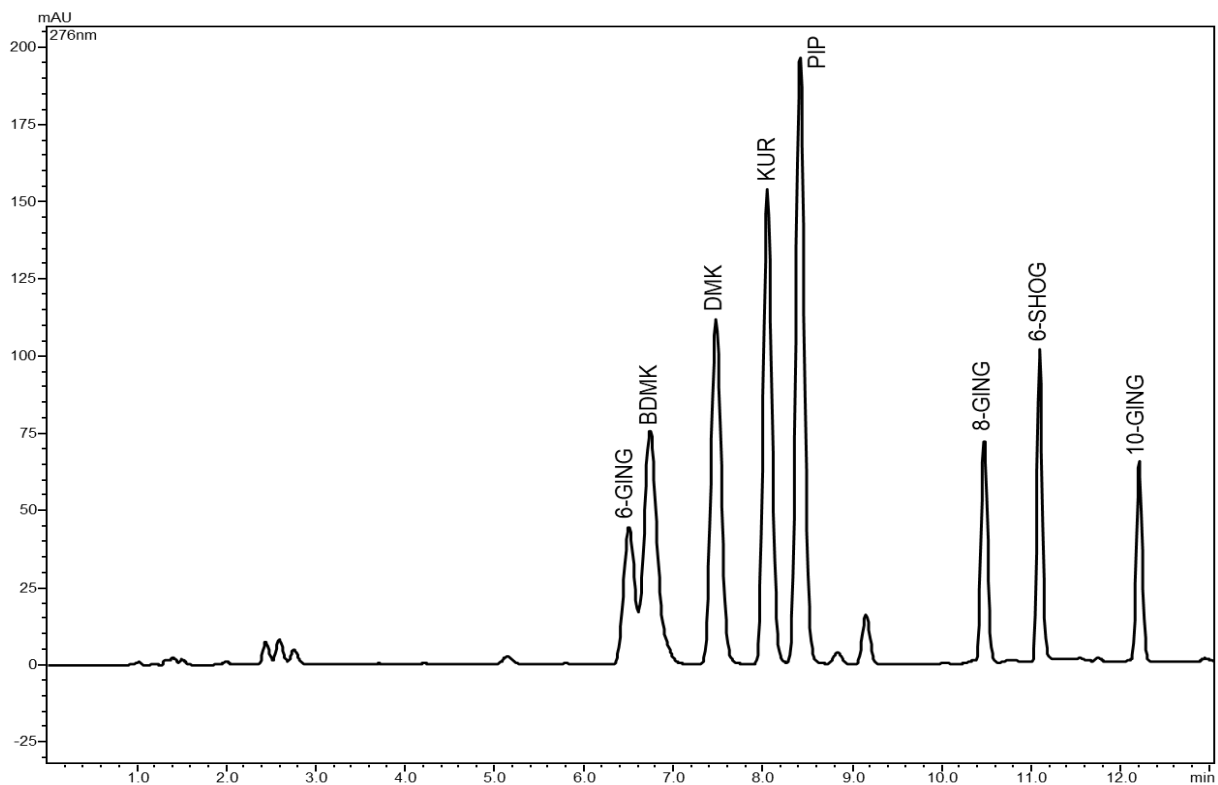
### 6.2.1. Test vhodnosti chromatografického systému

K hodnocení se využil pracovní roztok směsi standardů (viz kapitola 5.6.3.) na koncentrační hladině 50 mg/l, bylo provedeno šest nástřiků. Pro stanovení testu vhodnosti chromatografického systému se hodnotili: opakovatelnost retenčních časů ( $t_R$ ), faktor symetrie ( $A_s$ ), rozlišení ( $R_s$ ), kapacitní faktor ( $k$ ), šířka píku v 10 % výšky ( $Wh_{10}$ ) a opakovatelnost ploch píků.

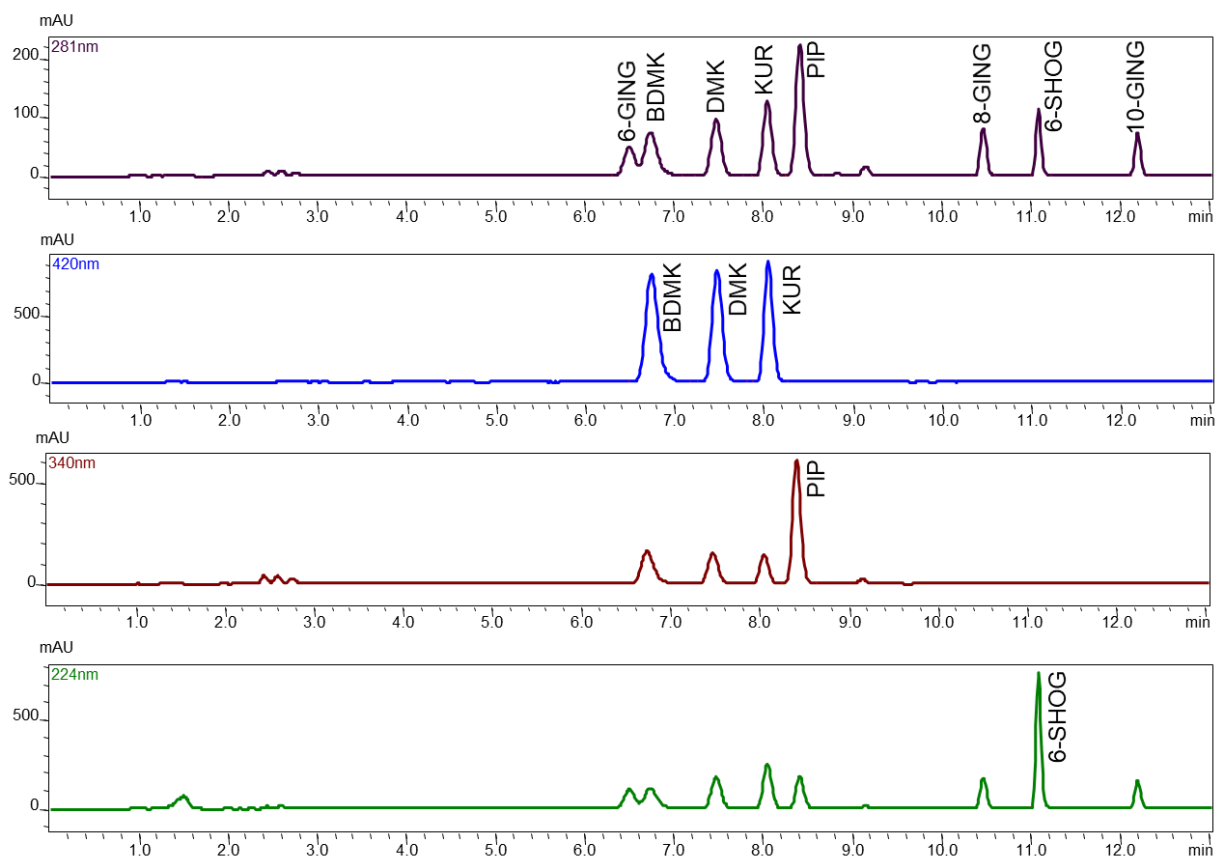
Tabulka 15: Parametry testu vhodnosti chromatografického systému.

Standardy	$t_R$	$t_R$ RSD (%)	$A_s$	$R_s$	$k$	$Wh_{10}$
6-gingerol	6,487	0,233	-	19,120	5,862	0
bisdemethoxykurkumin	6,722	0,241	-	0,864	3,370	0
demethoxykurkumin	7,459	0,185	1,128	2,851	4,103	0,225
kurkumin	8,035	0,138	1,152	2,739	4,440	0,189
piperin	8,399	0,121	1,154	1,888	4,541	0,186
8-gingerol	10,459	0,066	1,169	12,094	7,256	0,140
6-shogaol	11,081	0,045	1,224	4,507	6,550	0,116
10-gingerol	12,192	0,037	1,192	8,340	7,761	0,129

Chromatogramy získané při testu vhodnosti chromatografického systému jsou zobrazeny na následujících obrázcích.



Obrázek 36: Chromatogram testu vhodnosti chromatografického systému naměřený při vlnové délce 276 nm.



Obrázek 37: Chromatogramy testu vhodnosti chromatografického systému naměřené při vlnových délkách 281, 420, 340 a 224 nm.

Pro stanovení opakovatelnosti ploch jednotlivých píků byla provedena analýza šesti nástřiků směsného roztoku standardů na koncentrační hladině 50 mg/l (viz kapitola 5.6.4.). Opakovatelnost se posuzuje hodnotou relativní směrodatné odchylky ploch pod píky, která se vypočítá dle následujícího vzorce:

$$RSD = \frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{průměr}} * 100$$

Výsledky opakovatelnosti jsou zaznamenány v tabulce 16.

Tabulka 16: Výsledky opakovatelnosti ploch píků jednotlivých standardů.

Standard	6-gingerol	8-gingerol	10-gingerol	6-shogaol	Piperin	Kurkumin	Demethoxykurkumin	Bisdemethoxykurkumin
Plocha pod píkem	425912	390240	324494	3115441	3941559	6097602	6767342	7958496
	429307	396093	327138	3111502	3942891	6111142	6784090	8015738
	417203	388145	326033	3095170	3913098	6069934	6739512	7999824
	426973	390223	328479	3122358	3946081	6109018	6789805	8095477
	429230	391651	328094	3129663	3959464	6120045	6801841	8138880
	436567	397304	332942	3163512	4007782	6195073	6887175	8266113
Průměr	427532	392276	327863	3122941	3951813	6117136	6794961	8079088
Směrodatná odchylka	6282	3624	2879	23021	31329	41938	50066	112837
RSD (%)	1,47	0,92	0,88	0,74	0,79	0,69	0,74	1,40

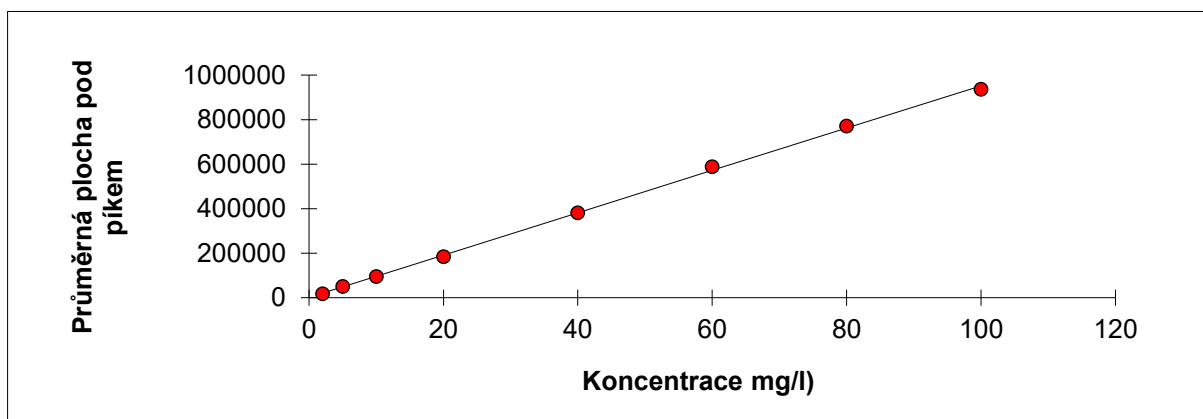
## **6.2.2. Linearita**

Pro stanovení linearity byla připravena kalibrační řada roztoků standardů o osmi koncentracích od 2 do 100 mg/l (viz kapitola 5.6.5.). Byly provedeny tři nástřiky od každé koncentrace, pro výpočet se použily průměrné hodnoty ploch pod píky. Výsledky byly hodnoceny metodou lineární regrese, jako závislost průměru plochy pod píkem na koncentraci.

### 6.2.2.1. Kalibrační závislost 6-gingerolu

Tabulka 17: Výsledky testu linearity 6-gingerolu.

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2	17743
5	50510
10	94972
20	184255
40	381611
60	588671
80	770642
100	935700



Obrázek 38: Kalibrační závislost 6-gingerolu.

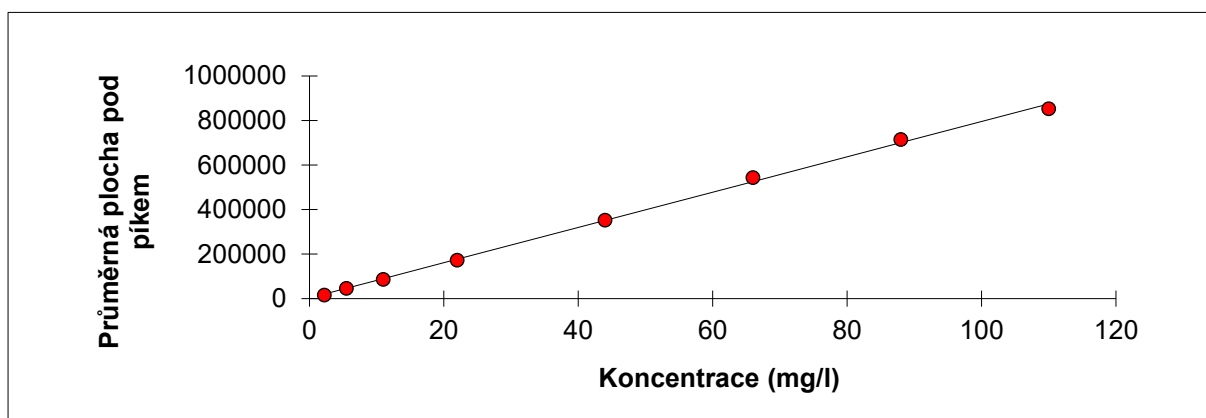
Tabulka 18: Parametry lineární regrese 6-gingerolu.

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby ± 110 ± 5777	
Směrnice	k =	9500		
Absolutní člen	q =	1559		
Korelační koeficient	r =	0,999599		
Reziduální odchylka	s =	10745		

### 6.2.2.2. Kalibrační závislost 8-gingerolu

Tabulka 19: Výsledky testu linearity 8-gingerolu.

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2,2	16141
5,5	46186
11	87420
22	172839
44	352662
66	543690
88	714994
110	853371



Obrázek 39: Kalibrační závislost 8-gingerolu.

Tabulka 20: Parametry lineární regrese 8-gingerolu.

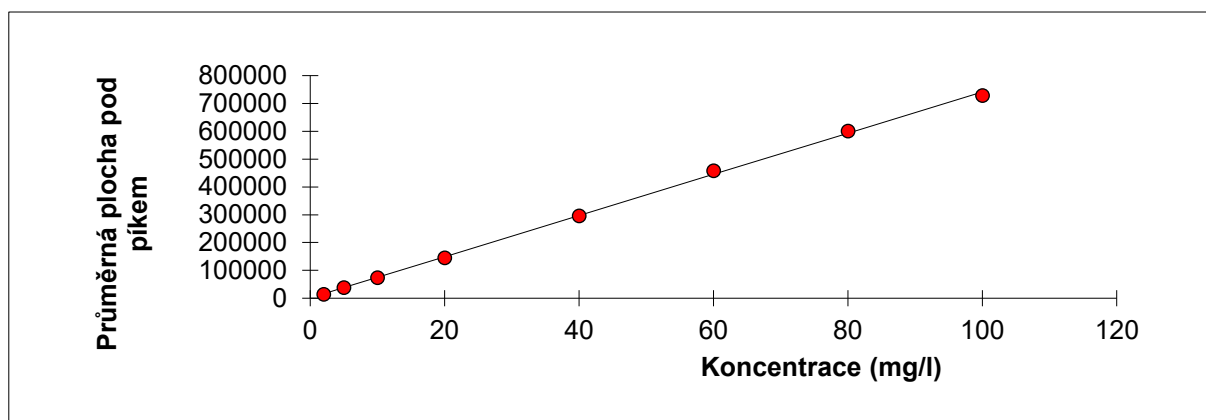
Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$					
Počet bodů	n =	8	±	Odhad chyby	
Směrnice	k =	7925			122
Absolutní člen	q =	2966			7040
Korelační koeficient	r =	0,999293			
Reziduální odchylka	s =	13094			



### 6.2.2.3. Kalibrační závislost 10-gingerolu

Tabulka 2: Výsledky testu linearitu 10-gingerolu.

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2	13643
5	38913
10	73652
20	145251
40	296337
60	457926
80	600537
100	728829



Obrázek 40: Kalibrační závislost 10-gingerolu.

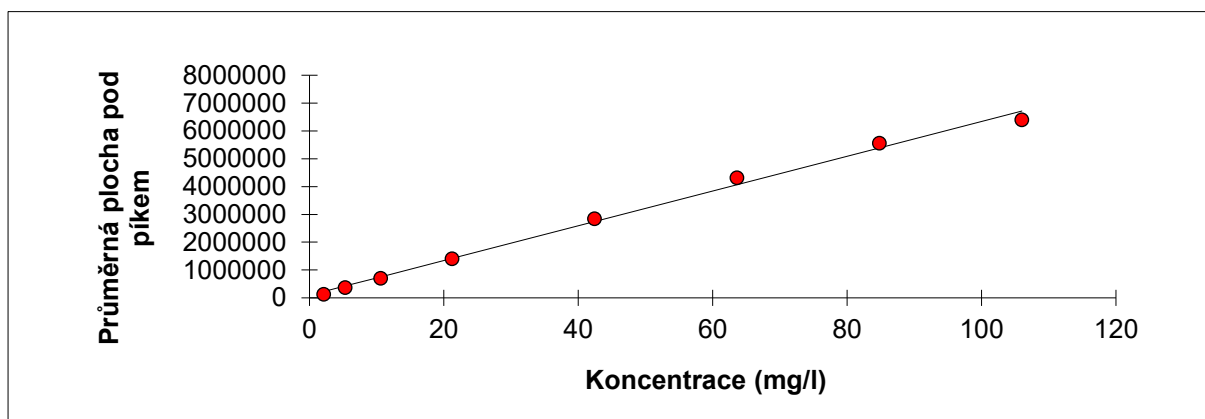
Tabulka 22: Parametry lineární regrese 10-gingerolu.

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$					
Počet bodů	n =	8	±	Odhad chyby	
Směrnice	k =	7399			83
Absolutní člen	q =	1179			4355
Korelační koeficient	r =	0,999625			
Reziduální odchylka	s =	8099			

### 6.2.2.4. Kalibrační závislost 6-shogaolu

Tabulka 3: Výsledky testu linearitu 6-shogaolu.

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2,12	133142
5,3	376043
10,6	710592
21,2	1401934
42,4	2841518
63,6	4318186
84,8	5565185
106	6394757



Obrázek 41: Kalibrační závislost 6-shogaolu.

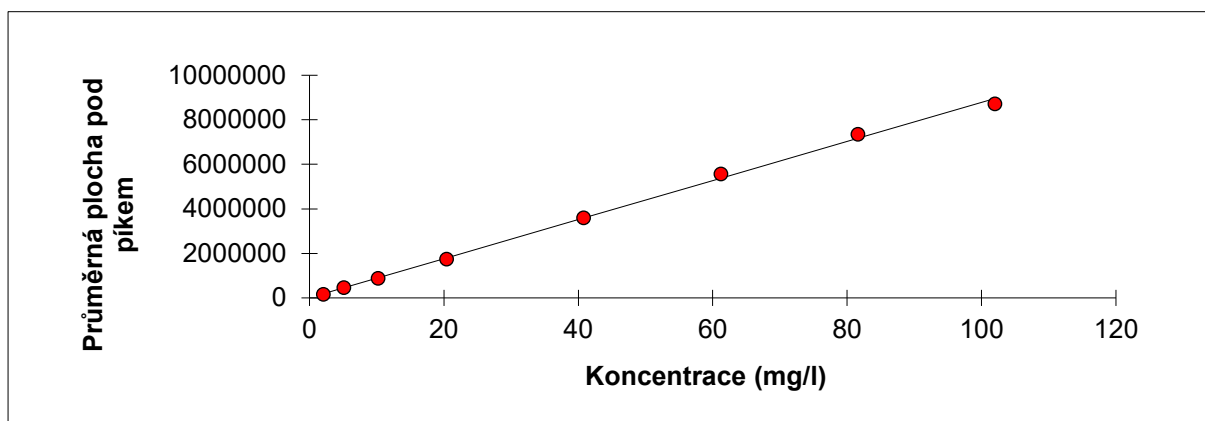
Tabulka 4: Parametry lineární regrese 6-shogaolu.

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$					
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby		
Směrnice	k =	62437			± 1845
Absolutní člen	q =	95162			± 102846
Korelační koeficient	r =	0,997391			
Reziduální odchylka	s =	191275			

### 6.2.2.5. Kalibrační závislost piperinu

Tabulka 25: Výsledky testu linearity piperinu.

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2,04	152002
5,1	449468
10,2	870422
20,4	1741609
40,8	3592521
61,2	5566041
81,6	7350247
102	8711967



Obrázek 42: Kalibrační závislost piperinu.

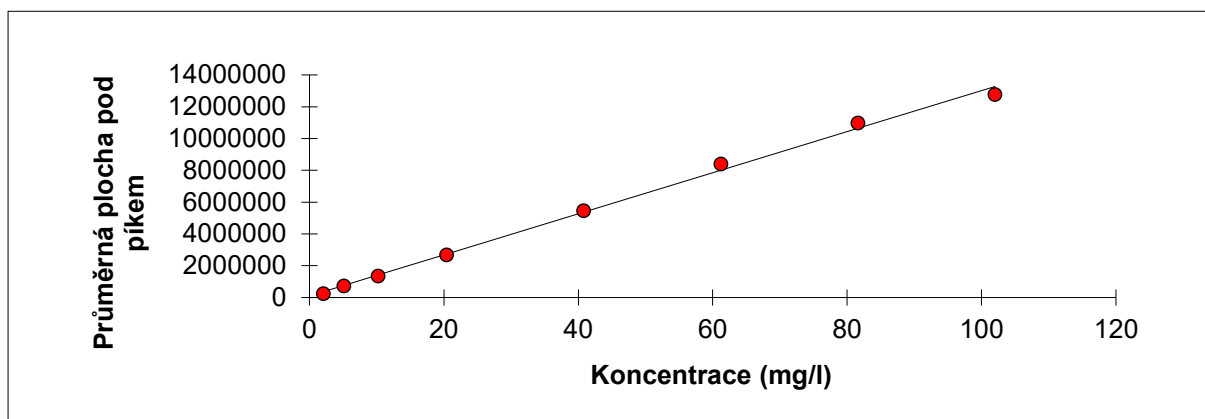
Tabulka 26: Parametry lineární regrese piperinu.

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$					
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby		
Směrnice	k =	87738			± 1501
Absolutní člen	q =	8118			± 80542
Korelační koeficient	r =	0,999122			
Reziduální odchylka	s =	149793			

### 6.2.2.6. Kalibrační závislost kurkuminu

Tabulka 27: Výsledky testu linearity kurkuminu.

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2,04	240077
5,1	712691
10,2	1351804
20,4	2668508
40,8	5455837
61,2	8393294
81,6	10966425
102	12759434



Obrázek 43: Kalibrační závislost kurkuminu.

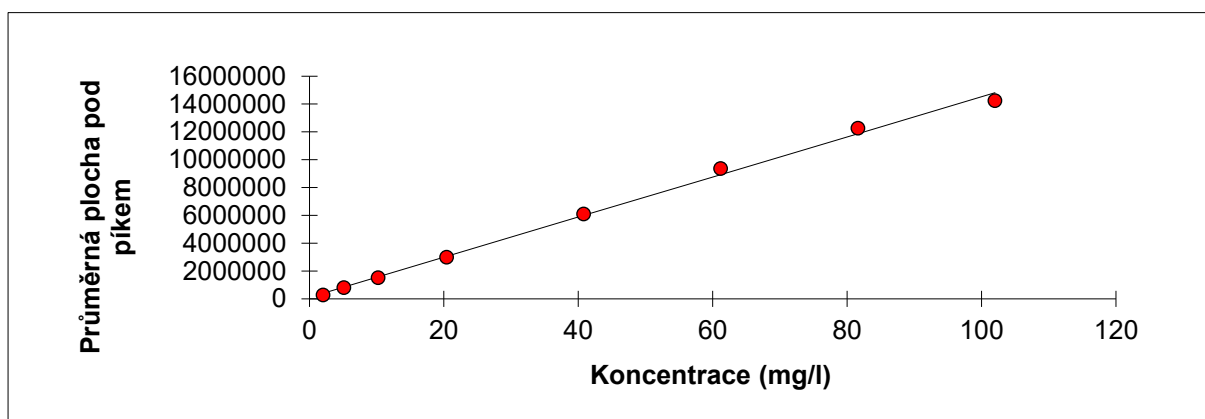
Tabulka 28: Parametry lineární regrese kurkuminu.

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby ± 3053 ± 163756	
Směrnice	k =	129114		
Absolutní člen	q =	100046		
Korelační koeficient	r =	0,998327		
Reziduální odchylka	s =	304557		

### 6.2.2.7. Kalibrační závislost demethoxykurkuminu

Tabulka 29: Výsledky testu linearity demethoxykurkuminu

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2,04	268729
5,1	793028
10,2	1506658
20,4	2978565
40,8	6089040
61,2	9367640
81,6	12252247
102	14242757



Obrázek 44: Kalibrační závislost demethoxykurkuminu.

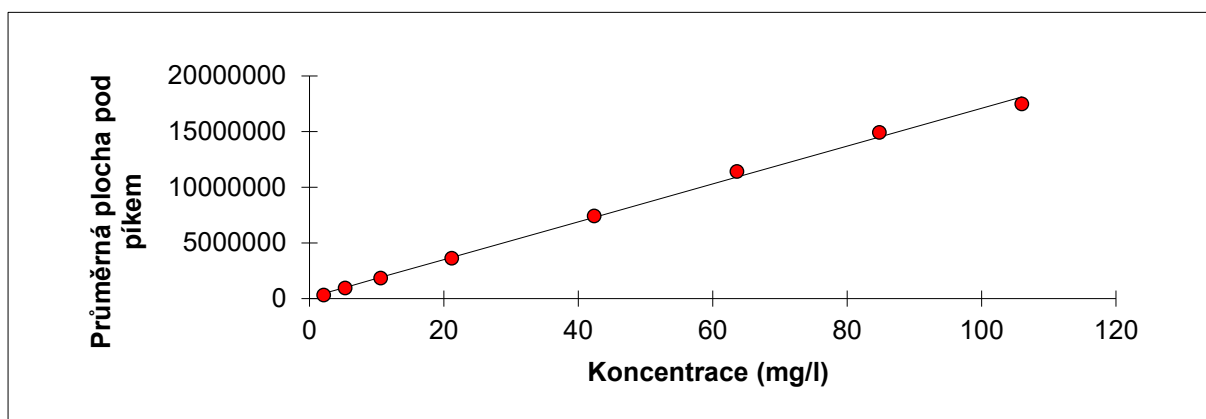
Tabulka 30: Parametry lineární regrese demethoxykurkuminu.

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$				
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby	
Směrnice	k =	144180		± 3425
Absolutní člen	q =	109958		± 183734
Korelační koeficient	r =	0,998311		
Reziduální odchylka	s =	341714		

### 6.2.2.8. Kalibrační závislost bisdemethoxykurkuminu

Tabulka 31: Výsledky testu linearity bisdemethoxykurkuminu.

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2,12	322563
5,3	955994
10,6	1823645
21,2	3616217
42,4	7409221
63,6	11404363
84,8	14929990
106	17481249



Obrázek 45: Kalibrační závislost bisdemethoxykurkuminu.

Tabulka 32: Parametry lineární regrese bisdemethoxykurkuminu.

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$					
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby		
Směrnice	k =	169902			± 3666
Absolutní člen	q =	106586			± 204365
Korelační koeficient	r =	0,998606			
Reziduální odchylka	s =	380082			

### 6.2.3. Přesnost

K určení parametru přesnosti bylo využito dvou vzorků – EPIGEMIC® Shogaol zázvor a VANAVITA Bio tumeric + ginger, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.6.6. Tyto dva potravní doplňky byly vybrány proto, aby bylo pokryté celé spektrum analyzovaných látek, jelikož není dostupný žádný doplněk obsahující všech 8 látek společně. Od obou vzorků bylo připraveno šest navážek, které byly následně extrahovány do roztoku methanolu. Každý z připravených roztoků byl dvakrát nadávkován na kolonu. Tímto byly získány průměry ploch pod píky, které se poté přepočítali na jednotnou navážku 100 mg dle vzorce:

$$x = A * \frac{100}{m}$$

kde:  $A$  je průměr ploch píků a  $m$  se rovná reálné hmotnosti navážky. Výsledky přesnosti vzorků jsou zaznamenány v tabulkách 33 a 34.

Tabulka 33: Výsledky přesnosti – vzorek EPIGEMIC® Shogaol zázvor.

	6-gingerol	8-gingerol	10-gingerol	6-shogaol	Piperin
Průměrné hodnoty ploch píků přepočítané na navážku 100 mg	2569124	426775	582801	4119884	36294
	2571441	429623	595029	4143565	36487
	2578933	431764	598865	4144401	36574
	2581673	425029	591600	4136999	36625
	2614412	429390	607212	4194924	37042
	2565165	423936	591834	4116712	36726
Průměr	2580125	427753	594557	4142747	36625
Směrodatná odchylka	17887	3007	8165	28140	251
RSD (%)	0,69	0,70	1,37	0,68	0,69

Tabulka 34: Výsledky přesnosti - vzorek VANAVITA Bio tumeric + ginger.

	Bisdemethoxykurkumin	Demethoxykurkumin	Kurkumin	Piperin
Průměrné hodnoty ploch píků přepočítané na navážku 100 mg	4280513	5986490	12871423	8233441
	4231139	5912319	12860713	8115356
	4302121	5974884	13113330	8513406
	4216066	5878969	12969038	8374899
	4213959	5876031	12962557	8370714
	4186586	5832531	12885416	8488767
Průměr	4238397	5910204	12943746	8349431
Směrodatná odchylka	43972	60306	95163	152085
RSD (%)	1,04	1,02	0,74	1,82

## 6.3. Stanovení analyzovaných vzorků

### 6.3.1. Doplnky stravy

Od každého testovaného doplňku stravy bylo naváženo třikrát 100 mg. Příprava těchto vzorků je popsána v kapitole 5.7.1. Každý z připravených roztoků byl poté dvakrát dávkován na kolonu. Byly tak získány plochy píků, ze kterých se stanovil jejich průměr. Z průměrných hodnot jednotlivých analyzovaných látek a standardů byla vypočtena koncentrace analyzovaných látek v mg/l dle vzorce:

$$c_x = \frac{A_x}{A_{st}} * c_{st}$$

$c_x$  ...koncentrace analyzované látky

$A_x$  ...průměrná plocha pod píkem analyzované látky

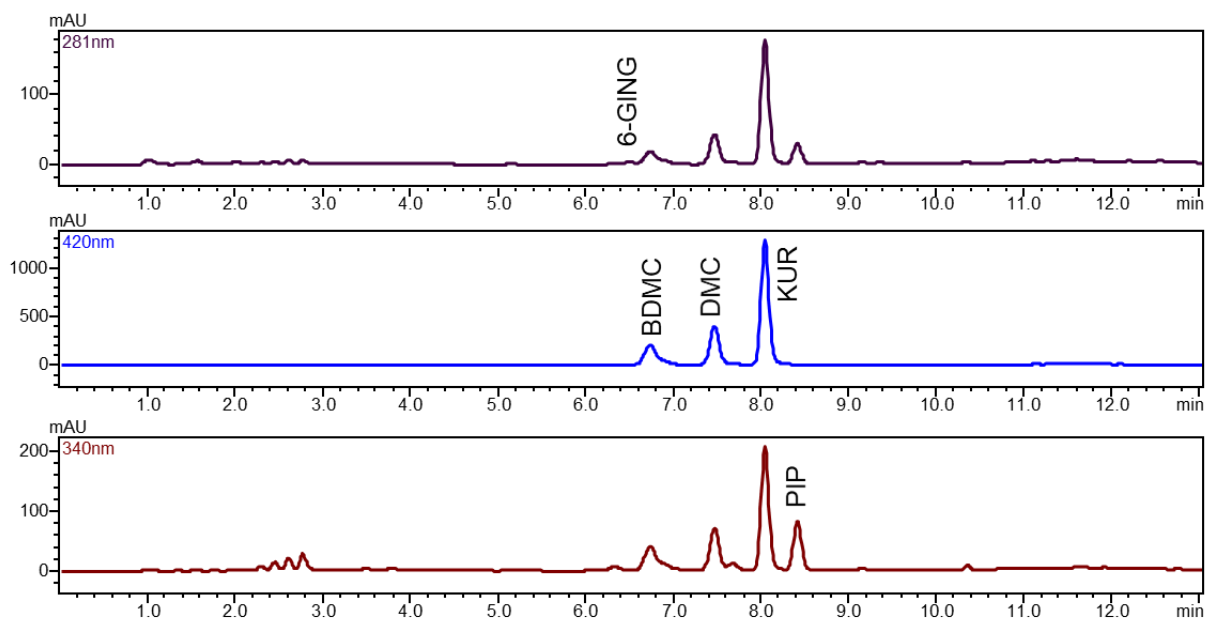
$c_{st}$  ...koncentrace standardu

$A_{st}$  ...průměrná plocha pod píkem standardu

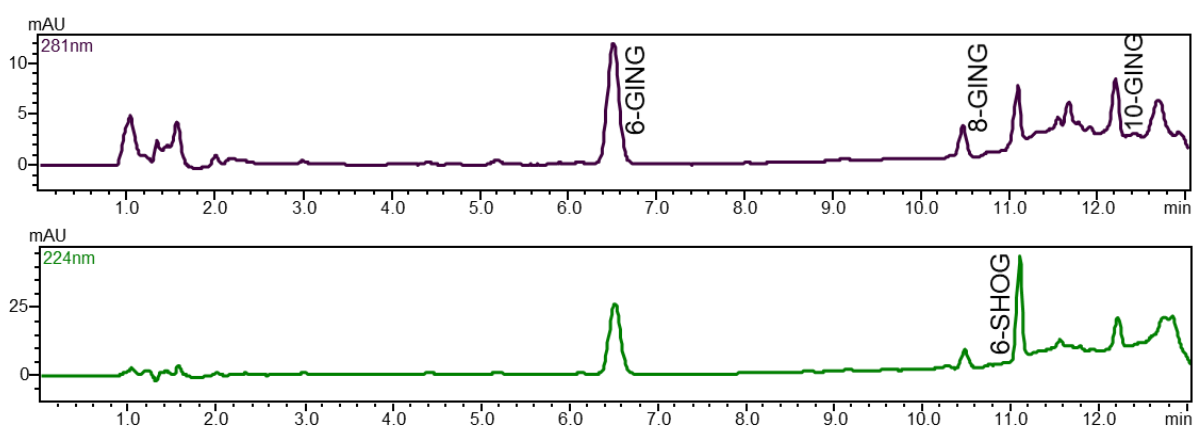


Dále pro výpočet obsahu v mg potravního doplňku byl proveden přepočet na objem extrakčního činidla a celkovou hmotnost tablety.

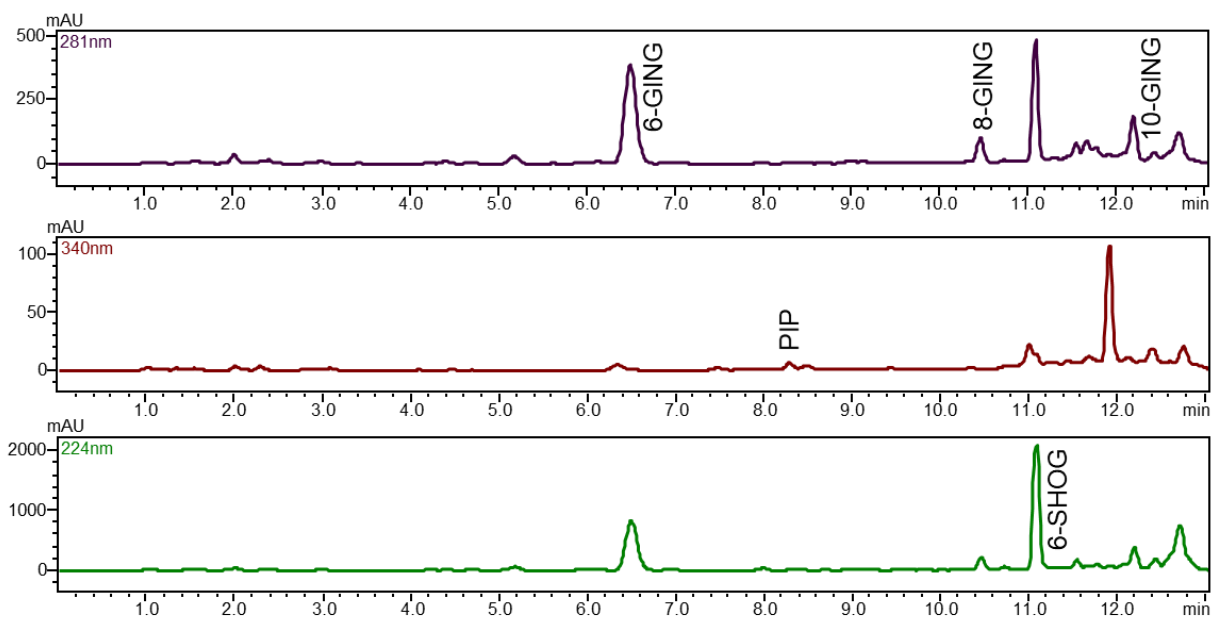
Příklady chromatogramů získaných analýzou potravních doplňků jsou pro zajímavost zobrazeny na následujících obrázcích. Žádný z testovaných potravních doplňků ovšem neobsahoval všechny analyzované látky najednou, vždy byla naměřena pouze jejich částečná kombinace.



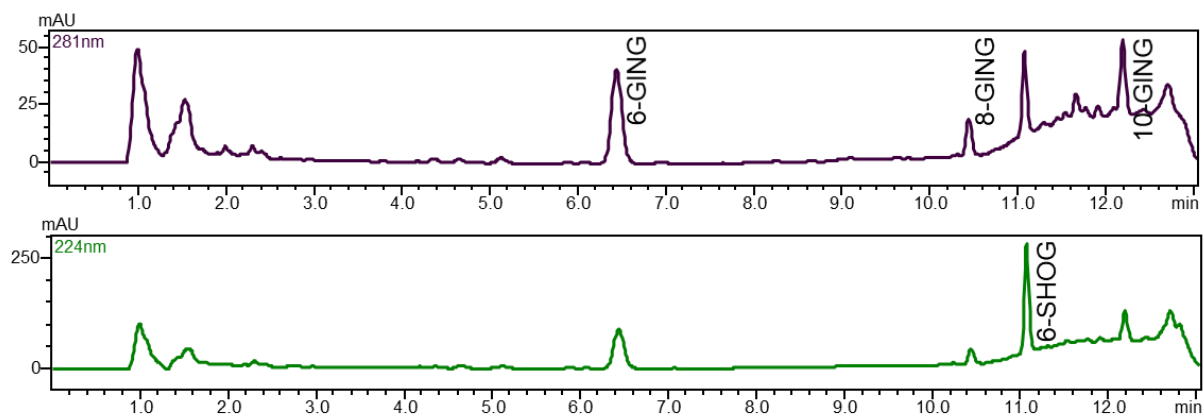
Obrázek 46: Chromatogramy potravního doplňku VIESTE Kurkumin – piperin plus (+ zázvor).



Obrázek 47: Chromatogramy potravního doplňku BioMedical Ginger root extract.



Obrázek 48: Chromatogramy potravního doplňku SWANSON® Ginger root extract.



Obrázek 49: Chromatogramy potravního doplňku SOLGAR® Ginger root (Zingiber officinale).

Výsledky stanovení jsou sumarizovány v následujících tabulkách, pro přehlednost je přidána i tabulka deklarovaného obsahu látek v testovaných potravních doplňcích.

Tabulka 35: Deklarovaný obsah látek v testovaných potravních doplňcích.

Výrobce	Název přípravku	Deklarovaný obsah rostlinného extraktu (mg/1 cps.)			
		Zázvor lékařský	Kurkuma dlouhá	Černý pepř	Shogaol
Vieste	Kurkumin-piperin plus + zázvor	50	650	10	-
Vanavita	Bio tumeric + ginger	40	670	extrakt 10 (piperin 9,5)	-
BioMedical	Ginger root extract	427	-	-	-
Epigemic®	Shogaol zázvor	250 (standardizovaný na 10 % gingerolů a z toho podíl 6-gingerol/ 6-shogaol min.30 %)	-	-	z 10 % gingerolů podíl 6-gingerol/ 6-shogaol min. 30 %
Swanson®	Ginger root extract	200 (standardizováno na 20 % gingerolů)	-	-	-
Solgar®	Ginger root	500 + práškový extrakt z kořene zázvoru 5	-	-	-

Tabulka 36: Stanovení gingerolů, shogaolu, kurkuminů a piperinu ve vybraných potravních doplňcích, obsahujících zázvor a/ nebo kurkumu a piperin.

Testované doplňky stravy	Množství nalezené v jedné kapsli (mg)									
	6-GING	8-GING	10-GING	6-SHOG	Suma gingerolů a shogaolu	PIP	KUR	DMK	BDMK	Suma kurkuminů
VIESTE Kurkumin – piperin plus (+ zázvor)	0,13	-	-	-	0,13	0,38	4,07	1,30	0,77	6,14
VANAVITA Bio tumeric + ginger	-	-	-	-	0,00	6,78	7,15	2,91	1,70	11,76
BioMedical Ginger root extract	0,53	0,08	0,19	0,05	0,85	-	-	-	-	0,00
EPIGEMIC® Shogaol zázvor	8,42	1,52	2,48	1,90	14,32	0,01	-	-	-	0,00
SWANSON® Ginger root extract	12,38	2,00	3,41	5,30	23,09	0,01	-	-	-	0,00
SOLGAR® Ginger root (Zingiber officinale)	1,85	0,42	0,87	0,64	3,78	-	-	-	-	0,00

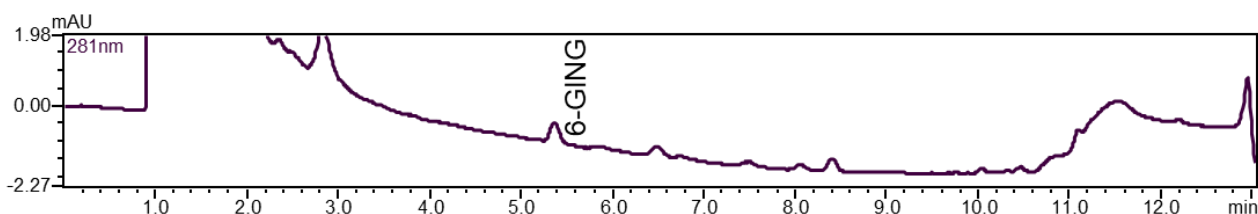
Tabulka 37: Procentuální obsah analyzovaných látek z deklarovaného množství v potravních doplňcích.

Testované doplňky stravy	Obsah analyzovaných látek z deklarovaného množství extraktu (%)		
	Gingeroly a shogaol	Piperin	Kurkuminy
VIESTE Kurkumin – piperin plus (+ zázvor)	0,26	3,80	0,94
VANAVITA Bio tumeric + ginger	0,00	71,37	1,76
BioMedical Ginger root extract	0,20	0,00	0,00
EPIGEMIC® Shogaol zázvor	5,73	0,00	0,00
SWANSON® Ginger root extract	11,55	0,00	0,00
SOLGAR® Ginger root (Zingiber officinale)	0,75	0,00	0,00

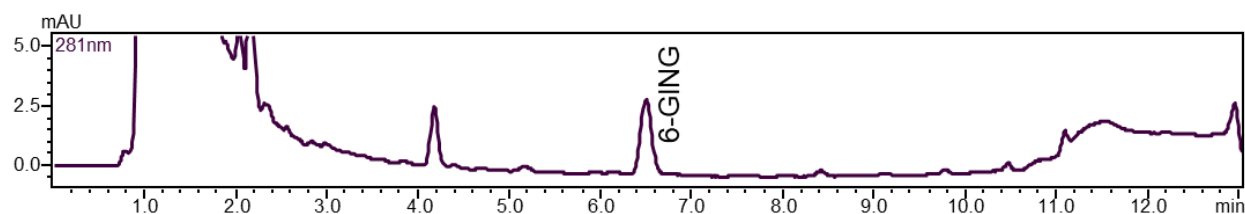
### 6.3.2. Čaje

Nad rámec této diplomové práce byl jen pro zajímavost změřen obsah analyzovaných látek i ve vzorcích čajů obsahujících zázvor, případně i kurkumu. Vzorky čajů byly připraveny dle kapitoly 5.7.2. Jedny vzorky byly extrahovány do methanolu, z druhých vzorků byl připraven nálev v horké vodě (dle doporučené přípravy na obalu). Jednotlivé vzorky byly následně dávkovány na kolonu. Pro výpočet obsahu analyzovaných látek v jednotlivých čajích byl použit stejný postup jako u potravních doplňků. Pro výpočet obsahu v mg testovaného čaje byl proveden přepočítání na objem extrakčního činidla a 1 g čaje.

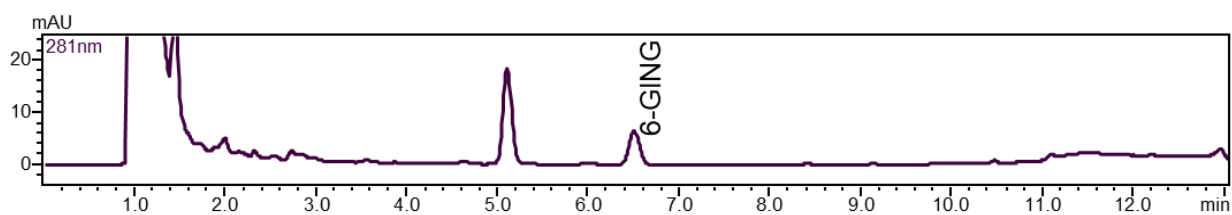
Příklady chromatogramů získaných při analýzách čajů extrahovaných do horké vody jsou na následujících obrázcích.



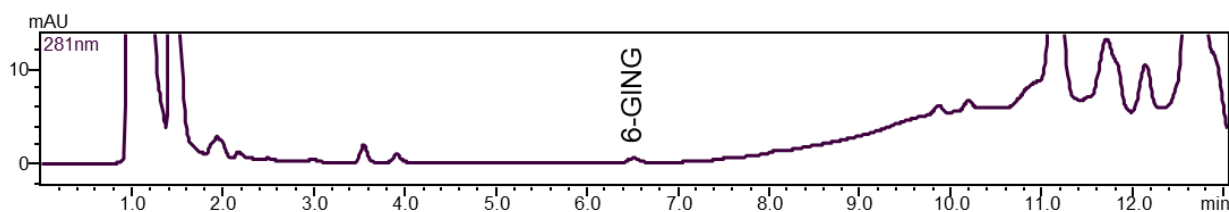
Obrázek 50: Chromatogram čaje Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea) extrahovaného do horké vody.



Obrázek 51: Chromatogram čaje Loyd Brusinky & Zázvor extrahovaného do horké vody.



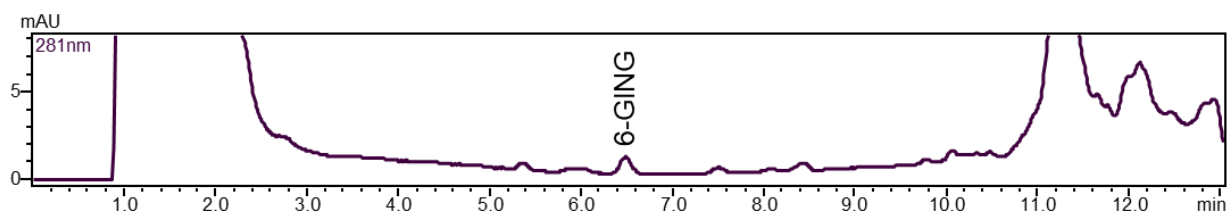
Obrázek 52: Chromatogram čaje Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem extrahovaného do horké vody.



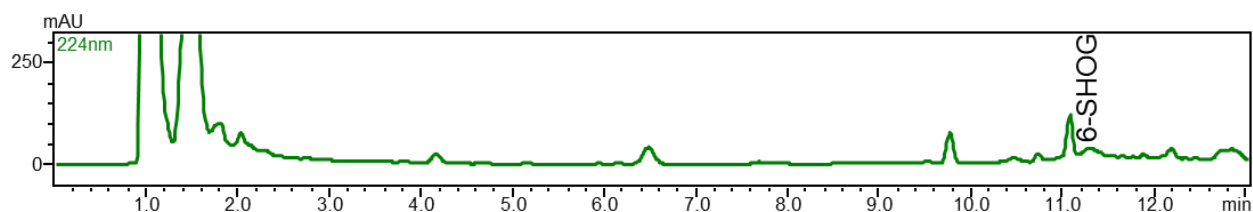
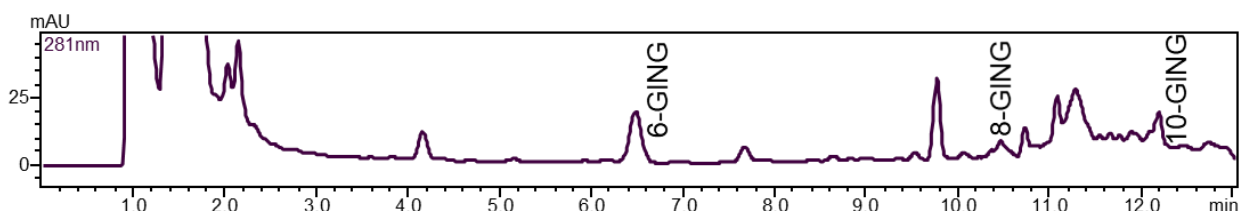
Obrázek 53: Chromatogram čaje Teekanne Ginger Curcuma extrahovaného do horké vody.

Ve všech vzorcích čajů, které byly extrahovány do horké vody bylo možno detekovat pouze 6-gingerol.

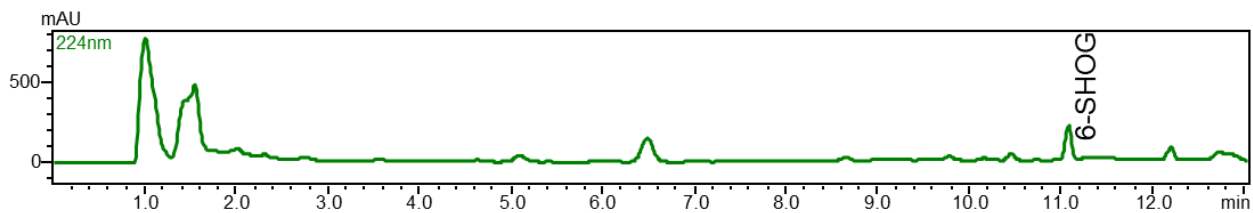
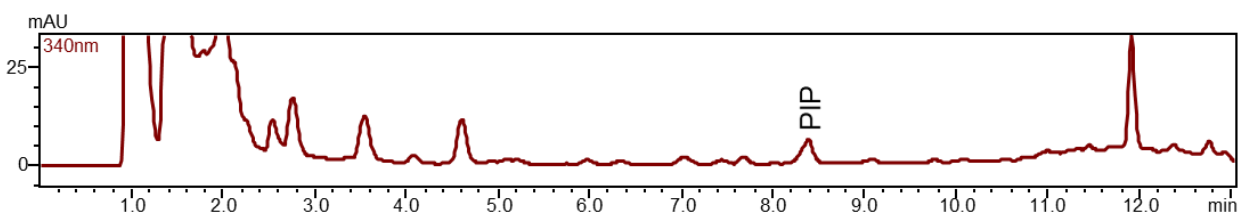
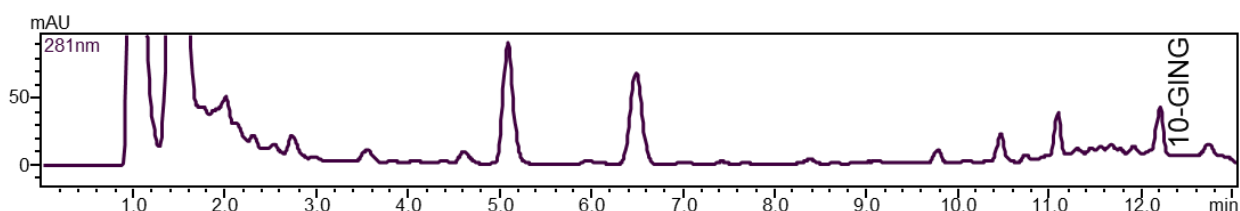
Na následujících obrázcích jsou zobrazeny příklady chromatogramů testovaných čajů, které byly extrahovány do methanolu.



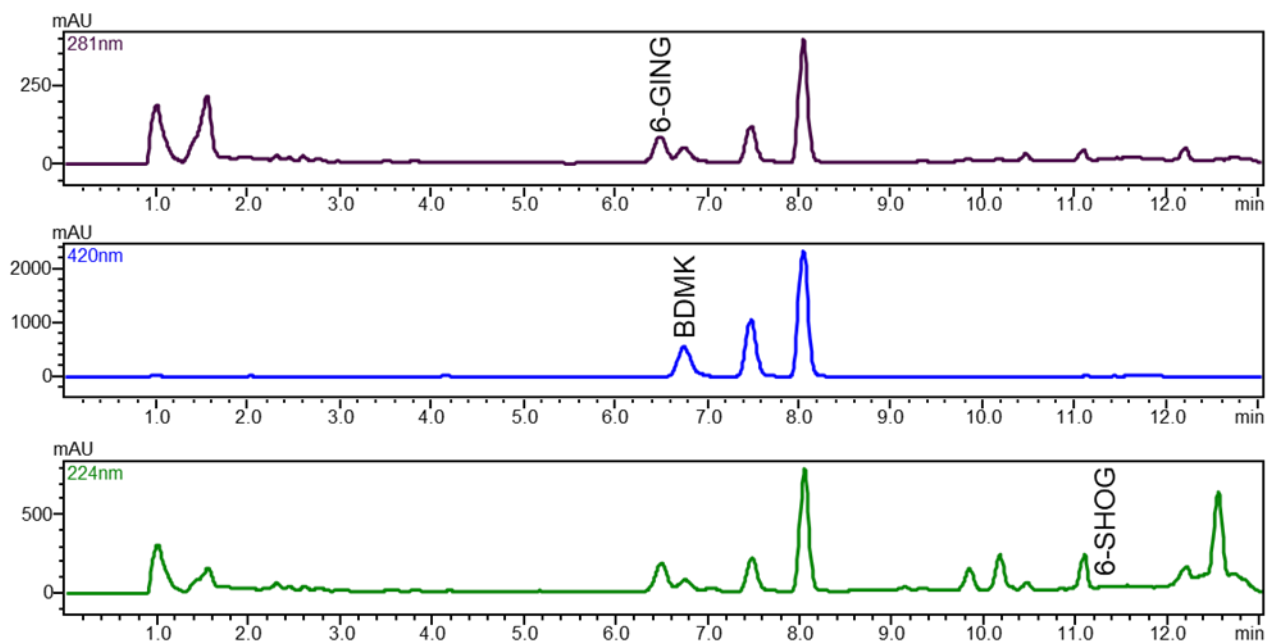
Obrázek 54: Chromatogram čaje Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea) extrahovaného do methanolu.



Obrázek 55: Chromatogramy čaje Loyd Brusinky & Zázvor extrahovaného do methanolu.



Obrázek 56: Chromatogramy čaje Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem extrahovaného do methanolu.



Obrázek 57: Chromatogramy čaje Teekanne Ginger Curcuma extrahovaného do methanolu.

Extrakcí testovaných vzorků čajů do methanolu bylo detekováno více analyzovaných látek než extrakcí do horké vody. V žádném ze vzorku čajů ovšem nebyly detekovány všechny z námi analyzovaných látek najednou.

Výsledky stanovení jsou sumarizované v následujících tabulkách, pro přehlednost je přidána i tabulka deklarovaného obsahu látek v testovaných čajích.

Tabulka 38: Deklarovaný obsah látek v testovaných čajích.

Výrobce	Název čaje	Obsah zázvoru a kurkumy v %	
		Zázvor lékařský	Kurkuma dlouhá
Dilmah	Orange & Ginger	2	-
Loyd	Brusinky & Zázvor	13	-
Teekanne	Dýchací cesty a krk se zázvorem	29	-
Pickwick	Nos a krk se zázvorem	25	-
Tesco	Ginger & Lemon	13	-
Teekanne	Ginger Curcuma	43	40



Tabulka 39: Stanovení gingerolů, shogaolu, kurkuminů a piperinu ve vybraných čajích extrahovaných do horké vody, obsahujících zázvor a/ nebo kurkumu.

Testované čaje extrahované do horké vody	Množství nalezené v 1 g čaje (mg)
	6-gingerol
Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea)	0,01
Loyd Brusinky & Zázvor	0,33
Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem	0,68
Pickwick Nos a krk se zázvorem	0,38
Tesco Ginger & Lemon	0,47
Teekanne Ginger Curcuma	0,04

Tabulka 40: Procentuální obsah analyzovaných látek z deklarovaného množství testovaných čajů extrahovaných do horké vody.

Testované čaje extrahované do horké vody	Obsah analyzovaných látek z deklarovaného množství zázvoru a kurkumu (%)
	6-gingerol
Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea)	0,00
Loyd Brusinky & Zázvor	0,00
Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem	0,02
Pickwick Nos a krk se zázvorem	0,01
Tesco Ginger & Lemon	0,01
Teekanne Ginger Curcuma	0,00

Tabulka 41: Stanovení gingerolů, shogaolu, kurkuminů a piperinu ve vybraných čajích extrahovaných do methanolu, obsahujících zázvor a/ nebo kurkumu.

Testované čaje extrahované do methanolu	Množství nalezené v 1 g čaje (mg)									
	6-GING	8-GING	10-GING	6-SHOG	Suma gingerolů a shogaolu	PIP	KUR	DMK	BDMK	Suma kurkuminů
Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea)	0,02	-	-	-	0,02	-	-	-	-	0,00
Loyd Brusinky & Zázvor	0,36	0,12	0,11	0,10	0,69	-	-	-	-	0,00
Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem	1,31	0,26	0,45	0,25	2,27	0,01	-	-	-	0,00
Pickwick Nos a krk se zázvorem	1,40	0,25	0,43	0,17	2,25	-	-	-	-	0,00
Tesco Ginger & Lemon	0,55	0,10	0,16	0,08	0,89	-	-	-	-	0,00
Teekanne Ginger Curcuma	1,96	0,33	0,67	0,36	3,32	-	3,04	1,31	0,73	5,08

Tabulka 42: Procentuální obsah analyzovaných látek z deklarovaného množství testovaných čajů extrahovaných do methanolu.

Testované čaje extrahované do horké vody	Obsah analyzovaných látek z deklarovaného množství zázvoru a kurkumy (%)		
	Gingeroly a shogaol	Piperin	Kurkuminy
Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea)	0,00	0,00	0,00
Loyd Brusinky & Zázvor	0,01	0,00	0,00
Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem	0,07	0,00	0,00
Pickwick Nos a krk se zázvorem	0,06	0,00	0,00
Tesco Ginger & Lemon	0,01	0,00	0,00
Teekanne Ginger Curcuma	0,14	0,00	0,20

## 7. Závěr

Tato diplomová práce se zaměřovala na stanovení obsahu 6-, 8- a 10-gingerolu, 6-shogaolu, piperinu, kurkuminu, demethoxykurkuminu a bisdemethoxykurkuminu v 6 testovaných potravních doplňcích. Nad rámec této práce byly tyto látky stanoveny i v 6 testovaných čajích obsahujících zázvor a/ nebo kurkumu. Pro stanovení těchto osmi látek byla vyvinuta, optimalizována a validována chromatografická metoda. U této validované metody byla použita gradientová eluce se dvěma mobilními fázemi, mobilní fáze A: ACN a B: ultračistá voda. Eluce všech 8 látek trvala 13 minut na koloně YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6 mm) o velikosti částic 3  $\mu\text{m}$ , při teplotě 30 °C. Detekce analyzovaných látek byla prováděna pomocí detektoru diodového pole při vlnových délkách 281 nm pro gingeroly, 224 nm pro 6-shogaol, 340 nm pro piperin a 420 nm pro kurkuminy.

Výsledky stanovení obsahu testovaných potravních doplňků byly sumarizovány v tabulkách 36 a 37. Protože přesný deklarovaný obsah gingerolů v extraktech potravních doplňků bylo možné porovnat pouze u dvou potravních doplňků, a to u EPIGEMIC® Shogaol zázvor a SWANSON® Ginger root extract, u přípravku VANAVIDA Bio tumeric + ginger bylo možné porovnat obsah piperinu, v ostatních případech byl obsah analyzovaných látek vyjádřen pouze jako procentuální síla obsaženého rostlinného extraktu.

Jako nejkvalitnější byl z testovaných potravních doplňků z hlediska zázvorového extraktu vyhodnocen přípravek SWANSON® Ginger root extract. Výrobce deklaruje v tomto přípravku zázvorový extrakt standardizovaný na 20 % gingerolů, naměřený obsah gingerolů byl ale pouze 11,55 %, i přesto byl tento zázvorový extrakt nejsilnější ze všech testovaných potravních doplňků.

Naopak nejméně kvalitní zázvorové extrakty byly obsaženy v přípravcích VANAVIDA Bio tumeric + ginger a BioMedical Ginger root extract. Přípravek VANAVIDA Bio tumeric + ginger deklaruje 40 mg zázvorového extraktu v jedné kapsli, námi vyvinutou metodou ovšem nebyly v tomto přípravku nalezeny žádné gingeroly ani shogaoly. Extrakty kurkumy a černého pepře obsažené v tomto přípravku byly na druhou stranu více kvalitní. Přípravek BioMedical Ginger

root extract, který oproti předchozímu přípravku obsahuje pouze zázvorový extrakt, deklaruje 427 mg tohoto extraktu, ale naměřené množství gingerolů bylo pouze 0,20 %.

Přípravek EPIGEMIC® Shogaol zázvor deklaruje 250 mg zázvorového extraktu, standardizovaného na 10 % gingerolů a z toho podíl 6-gingerolu a 6-shogaolu alespoň 30 %. Naměřené množství gingerolů bylo 5,73 %, tedy téměř poloviční, než výrobce deklaruje. Ale podíl 6-gingerolu a 6-shogaolu v naměřeném množství byl 30,91 %, tudíž odpovídající deklarovanému množství výrobcem.

Pro srovnání síly extraktů z kurkumy a černého pepře jsme měli pouze dva potravní doplňky, které je obsahují, a to VIESTE Kurkumin – piperin plus (+ zázvor) a VANAVITA Bio tumeric + ginger. Oba tyto extrakty byly silnější v přípravku VANAVITA Bio tumeric + ginger. Deklarované množství extraktu z kurkumy bylo 670 mg, přičemž naměřené množství kurkuminů bylo 1,76 %. Deklarované množství extraktu černého pepře bylo 10 mg, ale v tomto případě výrobce konkretizoval množství piperinu z tohoto extraktu, a to na 9,5 mg. Naměřené množství piperinu odpovídalo 6,78 mg, tedy 71,37 %.

Účinné látky rostlinných extraktů v testovaných potravních doplňcích byly obsaženy pouze ve velmi malých množstvích. Dokonce i pokud výrobce tvrdil, že daný rostlinný extrakt je standardizován na určité procento obsahových látek, tak naměřené procento těchto látek ve většině případů dosahovalo jen lehce nad polovinu deklarovaného množství. Nízké procento naměřených analyzovaných látek může být důsledkem použití nekvalitních rostlinných extraktů v potravních doplňcích, nebo například nesprávným zpracováním těchto extraktů.

Metoda vyvinutá v této diplomové práci byla následně pro zajímavost použita i pro analýzu 6 čajových směsí obsahujících zázvor, v jednom případě zázvor a kurkumu. Výsledky stanovení obsahu testovaných čajových směsí byly sumarizovány v tabulkách 39 až 42. Množství zázvoru a kurkumy v čajích je výrobcem deklarováno pouze procentuálním zastoupením jednotlivých bylin. Proto i množství naměřených účinných obsahových látek v těchto čajích je v tabulkách výše sumarizováno v procentech. Vzorky čajů byly připraveny dvěma způsoby, nejprve louhováním a extrakcí do horké vody (příprava dle návodu a obalu), a poté i extrakcí do methanolu.

Horká voda jako extrakční činidlo pro gingeroly a kurkuminy se ukázala jako zcela nevhodná. Ve vzorcích čajů extrahovaných právě do horké vody byl detekován pouze 6-gingerol, a to v množstvích menších než při extrakci do methanolu.

Při extrakci vzorků čajů do methanolu se jeví jako nejkvalitnější čaj Teekanne Ginger Curcuma, který na své deklarované množství zázvoru obsahuje nejvyšší procento gingerolů – 0,14 %. Tento čaj jako jediný z testovaných obsahuje i kurkuminy, a to v množství 0,2 %. Naopak nejméně kvalitní z pohledu obsahu analyzovaných látek se jeví čaj Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea), ve kterém byl detekován jen 6-gingerol, ale v množství pouze v minimálním, téměř žádném.

## 8. Seznam obrázků a tabulek

### 8.1. Seznam obrázků

Obrázek 1: Strukturní vzorec gingerolů [14]. .....	14
Obrázek 2: Schéma dehydratace 6-gingerolu na 6-shogaol [93].....	14
Obrázek 3: Strukturní vzorec shogaolů [14].....	14
Obrázek 4: Chemické struktury kurkuminoidů [38] .....	19
Obrázek 5: Strukturní vzorec piperinu [94]. .....	24
Obrázek 6: Schéma a popis HPLC systému. (Obrázek převzat a upraven ze zdroje [95].).....	29
Obrázek 7: Znárodnění „endcappingu“ volných silanolových skupin pomocí trimethylchlorsilanu [77].....	35
Obrázek 8: Zobrazení sterického bránění volných silanolových skupin navázáním objemných skupin [77]. .....	35
Obrázek 9: Testované doplňky stravy [84–89].....	41
Obrázek 10: Obrázek 10: Testované čaje [94–99].....	42
Obrázek 11: Absorpční spektrum 6-gingerolu. ....	49
Obrázek 12: Absorpční spektrum 8-gingerolu. ....	49
Obrázek 13: Absorpční spektrum 10-gingerolu.....	50
Obrázek 14: Absorpční spektrum 6-shogaolu.....	50
Obrázek 15: Absorpční spektrum kurkuminu. ....	50
Obrázek 16: Absorpční spektrum piperinu.....	50
Obrázek 17: Absorpční spektrum demethoxykurkuminu.....	51
Obrázek 18: Absorpční spektrum bisdemethoxykurkuminu.....	51

Obrázek 19: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6mm, 5 µm), 17,5 minut při teplotě 30 °C formou gradientové eluce o složení mobilních fází A: ultračistá voda, B: acetonitril. ....	53
Obrázek 20: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6mm, 5 µm), 17,5 minut při teplotě 30 °C formou gradientové eluce o složení mobilních fází A: 1% kyselina octová, B: acetonitril.....	53
Obrázek 21: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6mm, 5 µm), 17,5 minut při teplotě 30 °C formou gradientové eluce o složení mobilních fází A: ultračistá voda, B: methanol.....	54
Obrázek 22: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS (150 x 4,6mm, 5 µm), 13 minut při teplotě 30 °C formou isokratické eluce o složení mobilní fáze mathanol : voda (1 ml/min : 0,5 ml/min).....	55
Obrázek 23: Chromatogram separace na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 µm, za použití gradientu č. 1.....	59
Obrázek 24: Chromatogram separace na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 µm, za použití gradientu č. 2.....	59
Obrázek 25: Chromatogram separace na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 µm, za použití gradientu č. 3.....	60
Obrázek 26: Chromatogram separace na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 µm, za použití gradientu č. 4.....	60
Obrázek 27: Chromatogram separace na koloně Kinetex® XB-C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, za použití gradientu č. 1. ....	61
Obrázek 28: Chromatogram separace na koloně Kinetex® XB-C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, za použití gradientu č. 2. ....	61
Obrázek 29: Chromatogram separace na koloně Kinetex® XB-C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, za použití gradientu č. 3. ....	62
Obrázek 30: Chromatogram separace na koloně Kinetex® XB-C18, 100Å, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, za použití gradientu č. 4. ....	62



Obrázek 31: Chromatogram separace na koloně ARION® Polar C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm, za použití gradientu č. 1.....	63
Obrázek 32: Chromatogram separace na koloně ARION® Polar C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm, za použití gradientu č. 2.....	63
Obrázek 33: Chromatogram separace na koloně ARION® Polar C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm, za použití gradientu č. 3.....	64
Obrázek 34: Chromatogram separace na koloně ARION® Polar C18, 150 x 4,6 mm, 3 µm, za použití gradientu č. 4.....	64
Obrázek 35: Chromatogram separace za finálních podmínek.....	65
Obrázek 36: Chromatogram testu vhodnosti chromatografického systému naměřený při vlnové délce 276 nm.....	67
Obrázek 37: Chromatogramy testu vhodnosti chromatografického systému naměřené při vlnových délkách 281, 420, 340 a 224 nm.....	67
Obrázek 38: Kalibrační závislost 6-gingerolu.....	71
Obrázek 39: Kalibrační závislost 8-gingerolu.....	72
Obrázek 40: Kalibrační závislost 10-gingerolu. ....	73
Obrázek 41: Kalibrační závislost 6-shogaolu.....	74
Obrázek 42: Kalibrační závislost piperinu.....	75
Obrázek 43: Kalibrační závislost kurkuminu.....	76
Obrázek 44: Kalibrační závislost demethoxykurkuminu. ....	77
Obrázek 45: Kalibrační závislost bisdemethoxykurkuminu.....	78
Obrázek 46: Chromatogramy potravního doplňku VIESTE Kurkumin – piperin plus (+ zázvor).....	81
Obrázek 47: Chromatogramy potravního doplňku BioMedical Ginger root extract.....	81
Obrázek 48: Chromatogramy potravního doplňku SWANSON® Ginger root extract.....	82
Obrázek 49: Chromatogramy potravního doplňku SOLGAR® Ginger root (Zingiber officinale)...	82

Obrázek 50: Chromatogram čaje Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea) extrahovaného do horké vody.....	86
Obrázek 51: Chromatogram čaje Loyd Brusinky & Zázvor extrahovaného do horké vody.....	86
Obrázek 52: Chromatogram čaje Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem extrahovaného do horké vody.....	86
Obrázek 53: Chromatogram čaje Teekanne Ginger Curcuma extrahovaného do horké vody...	86
Obrázek 54: Chromatogram čaje Dilmah Orange & Ginger (flavoured ceylon black tea) extrahovaného do methanolu.....	87
Obrázek 55: Chromatogramy čaje Loyd Brusinky & Zázvor extrahovaného do methanolu.....	87
Obrázek 56: Chromatogramy čaje Teekanne Dýchací cesty a krk se zázvorem extrahovaného do methanolu.....	87
Obrázek 57: Chromatogramy čaje Teekanne Ginger Curcuma extrahovaného do methanolu.....	88

## 8.2. Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled předchozích studií a podmínek separace gingerolů, shogaolů, piperinu, kurkuminu a jeho derivátů.....	38
Tabulka 2: Deklarovaný obsah látek v testovaných potravních doplňcích.....	43
Tabulka 3: Deklarovaný obsah látek v testovaných čajích.....	44
Tabulka 4: Příprava zásobních roztoků standardů.....	45
Tabulka 5: Ředění kalibračních roztoků standardů.....	46
Tabulka 6: Průběh finálního gradientu použitého pro validaci metody.....	48
Tabulka 7: Jednotlivé vlnové délky, při kterých byly detekovány konkrétní analyzované látky.....	51
Tabulka 8: Průběh gradientu (č. 2) pro výběr mobilní fáze.....	52
Tabulka 9: Průběh gradientu č. 1.....	56
Tabulka 10: Průběh gradientu č. 2.....	56
Tabulka 11: Průběh gradientu č. 3.....	56
Tabulka 12: Průběh gradientu č. 4.....	57
Tabulka 13: Seznam testovaných kolon.....	58
Tabulka 14: Průběh finálního gradientu.....	65
Tabulka 15: Parametry testu vhodnosti chromatografického systému.....	66
Tabulka 16: Výsledky opakovatelnosti ploch píků jednotlivých standardů.....	69
Tabulka 17: Výsledky testu linearitu 6-gingerolu.....	71
Tabulka 18: Parametry lineární regrese 6-gingerolu.....	71

Tabulka 19: Výsledky testu linearity 8-gingerolu.....	72
Tabulka 20: Parametry lineární regrese 8-gingerolu.....	72
Tabulka 5: Výsledky testu linearity 10-gingerolu.....	73
Tabulka 22: Parametry lineární regrese 10-gingerolu.....	73
Tabulka 6: Výsledky testu linearity 6-shogaolu.....	74
Tabulka 7: Parametry lineární regrese 6-shogaolu.....	74
Tabulka 25: Výsledky testu linearity piperinu.....	75
Tabulka 26: Parametry lineární regrese piperinu.....	75
Tabulka 27: Výsledky testu linearity kurkuminu.....	76
Tabulka 28: Parametry lineární regrese kurkuminu.....	76
Tabulka 29: Výsledky testu linearity demethoxykurkuminu.....	77
Tabulka 30: Parametry lineární regrese demethoxykurkuminu.....	77
Tabulka 31: Výsledky testu linearity bisdemethoxykurkuminu.....	78
Tabulka 32: Parametry lineární regrese bisdemethoxykurkuminu.....	78
Tabulka 33: Výsledky přesnosti – vzorek EPIGEMIC® Shogaol zázvor.....	79
Tabulka 34: Výsledky přesnosti - vzorek VANAVITA Bio tumeric + ginger.....	80
Tabulka 35: Deklarovaný obsah látek v testovaných potravních doplňcích.....	83
Tabulka 36: Stanovení gingerolů, shogaolu, kurkuminů a piperinu ve vybraných potravních doplňcích, obsahujících zázvor a/ nebo kurkumu a piperin.....	84
Tabulka 37: Procentuální obsah analyzovaných látek z deklarovaného množství v potravních doplňcích.....	85
Tabulka 38: Deklarovaný obsah látek v testovaných čajích.....	88

Tabulka 39: Stanovení gingerolů, shogaolu, kurkuminů a piperinu ve vybraných čajích extrahovaných do horké vody, obsahujících zázvor a/ nebo kurkumu.....	89
Tabulka 40: Procentuální obsah analyzovaných látek z deklarovaného množství testovaných čajů extrahovaných do horké vody.....	89
Tabulka 41: Stanovení gingerolů, shogaolu, kurkuminů a piperinu ve vybraných čajích extrahovaných do methanolu, obsahujících zázvor a/ nebo kurkumu.....	90
Tabulka 42: Procentuální obsah analyzovaných látek z deklarovaného množství testovaných čajů extrahovaných do methanolu.....	91

## 9. Seznam použité literatury

- [1] ALI, Badreldin H., Gerald BLUNDEN, Musbah O. TANIRA and Abderrahim NEMMAR. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, 46(2), 409–420 [accessed. 2022-03-19]. ISSN 0278-6915. Available at: doi:10.1016/J.FCT.2007.09.085
- [2] AGGARWAL, Bharat B. and Kuzhuvilil B. HARIKUMAR. Potential Therapeutic Effects of Curcumin, the Anti-inflammatory Agent, Against Neurodegenerative, Cardiovascular, Pulmonary, Metabolic, Autoimmune and Neoplastic Diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology* [online]. 2009, 41(1), 40 [accessed. 2022-04-03]. ISSN 13572725. Available at: doi:10.1016/J.BIOCEL.2008.06.010
- [3] JAHODÁŘ, Luděk. *FARMAKOBOTANIKA, semenné rostliny*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1225-9.
- [4] SHOBA, Guido, David JOY, Thangam JOSEPH, M. MAJEED, R. RAJENDRAN and P. S.S.R. SRINIVAS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta medica* [online]. 1998, 64(4), 353–356 [accessed. 2022-04-02]. ISSN 0032-0943. Available at: doi:10.1055/S-2006-957450
- [5] *Státní zemědělská a potravinářská inspekce | Právní předpisy vztahující se k doplňkům stravy a obecné informace o doplňcích stravy* [online]. [accessed. 2022-04-12]. Available at: <https://www.szpi.gov.cz/clanek/pravni-predpisy-vztahujici-se-k-doplncikum-stravy-a-obecne-informace-o-doplncich-stravy.aspx?q=Y2hudW09Mg%3d%3d>
- [6] *Rozlišení doplňků stravy od léčivých přípravků, Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [accessed. 2022-04-12]. Available at: <https://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplnciku-stravy-od-lecivych-pripravku>
- [7] *Internetový portál bezpečnosti potravin - Doplňky stravy* [online]. [accessed. 2022-04-12]. Available at: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/doplanky-stravy.aspx>

- [8] BALIGA, Manjeshwar Shrinath, Raghavendra HANIADKA, Manisha Maria PEREIRA, Jason Jerome D'SOUZA, Princy Louis PALLATY, Harshith P. BHAT and Sandhya POPURI. Update on the Chemopreventive Effects of Ginger and its Phytochemicals. <http://dx.doi.org/10.1080/10408391003698669> [online]. 2011, 51(6), 499–523 [accessed. 2022-03-12]. ISSN 10408398. Available at: doi:10.1080/10408391003698669
- [9] JONÁŠ, Josef and Jiří KUCHAR. *Svět přírodních antibiotik, tajné zbraně rostlin*. Praha: Eminent, 2014. ISBN 978-80-7281-479-4.
- [10] GARDA PUBLISTING, a.s., *Český lékopis 2017 4. díl. 1. vydání*. 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [11] BAČOVÁ, Barbora. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE Analýza zázvorového extraktu I. *Diplomová práce*. 2010.
- [12] ZÁRUBOVÁ, Kateřina. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE Analýza zázvorového extraktu II. *Diplomová práce* [online]. 2010 [accessed. 2022-03-20]. Available at: [https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/24272/DPTX\\_2008\\_1\\_11160\\_0\\_55714\\_0\\_67513.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/24272/DPTX_2008_1_11160_0_55714_0_67513.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [13] CHEN, Chung Yi, Kuo Chen CHENG, Andy Y. CHANG, Ying Ting LIN, You Cheng HSEU and Hui Min WANG. 10-Shogaol, an Antioxidant from Zingiber officinale for Skin Cell Proliferation and Migration Enhancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, 13(2), 1762 [accessed. 2022-03-22]. ISSN 14220067. Available at: doi:10.3390/IJMS13021762
- [14] URBANOVÁ, Martina. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Katedra analytické chemie VÝVOJ HPLC METODY PRO STANOVENÍ 6-GINGEROLU, KAPSAICINU, 8-GINGEROLU, 6-SHOAOLU A 10-GINGEROLU VE VZORCÍCH ZÁZVOROVNÍKU LÉKAŘSKÉHO. *Diplomová práce* [online]. 2015 [accessed. 2022-03-27]. Available

at: [https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/65562/DPTX\\_2014\\_2\\_11160\\_0\\_315350\\_0\\_140896.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/65562/DPTX_2014_2_11160_0_315350_0_140896.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- [15] TŮMOVÁ, Lenka. Zázvor - využití v terapii a jeho možné interakce s ostatními léčivy. *Praktické lékárenství* [online]. 2009 [accessed. 2022-03-20]. Available at: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2009/06/09.pdf>
- [16] YAMAHARA, Johji, Huang Qi RONG, Masatsugu IWAMOTO, Goro KOBAYASHI, Hisashi MATSUDA and Hajime FUJIMURA. Active components of ginger exhibiting anti-serotonergic action. *Phytotherapy Research* [online]. 1989, 3(2), 70–71 [accessed. 2022-03-20]. ISSN 10991573. Available at: doi:10.1002/PTR.2650030208
- [17] MILLER, Lucinda G. Herbal Medicinals: Selected Clinical Considerations Focusing on Known or Potential Drug-Herb Interactions. *Archives of Internal Medicine* [online]. 1998, 158(20), 2200–2211 [accessed. 2022-03-26]. ISSN 0003-9926. Available at: doi:10.1001/ARCHINTE.158.20.2200
- [18] O'MAHONY, Rachel, Huda AL-KHTHEERI, Deepaka WEERASEKERA, Neluka FERNANDO, Dino VAIRA, John HOLTON and Christelle BASSET. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2005, 11(47), 7499 [accessed. 2022-03-27]. ISSN 10079327. Available at: doi:10.3748/WJG.V11.I47.7499
- [19] JAGETIA, Ganesh Chandra, Manjeshwar Shrinath BALIGA, Ponemone VENKATESH and Jagadish N. ULLOOR. Influence of Ginger Rhizome (*Zingiber officinale* Rosc) on Survival, Glutathione and Lipid Peroxidation in Mice after Whole-Body Exposure to Gamma Radiation. *Radiation Research* [online]. 2003, 160(5), 584–592 [accessed. 2022-03-27]. ISSN 00337587. Available at: doi:10.1667/RR3057
- [20] NICOLL, Rachel and Michael Y. HENEIN. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A hot remedy for cardiovascular disease? *International Journal of Cardiology* [online]. 2009, 131(3), 408–409 [accessed. 2022-03-29]. ISSN 0167-5273. Available at: doi:10.1016/J.IJCARD.2007.07.107



- [21] KIM, Jin Kyoung, Younghwa KIM, Kwang Min NA, Young Joon SURH and Tae Yoon KIM. [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo. <https://doi.org/10.1080/10715760701209896> [online]. 2009, 41(5), 603–614 [accessed. 2022-03-26]. ISSN 10715762. Available at: doi:10.1080/10715760701209896
- [22] GRZANNA, Reinhard, Lars LINDMARK and Carmelita G. FRONDOZA. Ginger—An Herbal Medicinal Product with Broad Anti-Inflammatory Actions. <https://home.liebertpub.com/jmf> [online]. 2005, 8(2), 125–132 [accessed. 2022-03-26]. ISSN 1096620X. Available at: doi:10.1089/JMF.2005.8.125
- [23] BERNARD, Megan, Suzanne J. FURLONG, Melanie R. POWER COOMBS and David W. HOSKIN. Differential Inhibition of T Lymphocyte Proliferation and Cytokine Synthesis by [6]-Gingerol, [8]-Gingerol, and [10]-Gingerol. *Phytotherapy Research* [online]. 2015, 29(11), 1707–1713 [accessed. 2022-03-26]. ISSN 1099-1573. Available at: doi:10.1002/PTR.5414
- [24] BALIGA, Manjeshwar Shrinath, Raghavendra HANIADKA, Manisha Maria PEREIRA, Jason Jerome D’SOUZA, Princy Louis PALLATY, Harshith P. BHAT and Sandhya POPURI. Update on the Chemopreventive Effects of Ginger and its Phytochemicals. <http://dx.doi.org/10.1080/10408391003698669> [online]. 2011, 51(6), 499–523 [accessed. 2022-03-27]. ISSN 10408398. Available at: doi:10.1080/10408391003698669
- [25] KIYAMA, Ryoiti. Nutritional implications of ginger: chemistry, biological activities and signaling pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 2020, 86, 108486 [accessed. 2022-03-26]. ISSN 0955-2863. Available at: doi:10.1016/J.JNUTBIO.2020.108486
- [26] SINGH, Amar Bahadur, AKANKSHA, Nilendra SINGH, Rakesh MAURYA and Arvind Kumar SRIVASTAVA. Anti-hyperglycaemic, lipid lowering and anti-oxidant properties of [6]-gingerol in db/db mice. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* [online]. 2009, 1(12), 536–544 [accessed. 2022-03-29]. ISSN 2006-9723. Available at: doi:10.5897/IJMMS.9000021

- [27] LEI, Lin, Yuwei LIU, Xiaobo WANG, Rui JIAO, Ka Ying MA, Yuk Man LI, Lijun WANG, Sun Wa MAN, Shengmin SANG, Yu HUANG and Zhen Yu CHEN. Plasma cholesterol-lowering activity of gingerol- and shogaol-enriched extract is mediated by increasing sterol excretion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, 62(43), 10515–10521 [accessed. 2022-03-29]. ISSN 15205118. Available at: doi:10.1021/JF5043344/ASSET/IMAGES/JF5043344.SOCIAL.JPEG\_V03
- [28] SON, Myoung Jin, Yutaka MIURA and Kazumi YAGASAKI. Mechanisms for antidiabetic effect of gingerol in cultured cells and obese diabetic model mice. *Cytotechnology 2014* 67:4 [online]. 2014, 67(4), 641–652 [accessed. 2022-03-29]. ISSN 1573-0778. Available at: doi:10.1007/S10616-014-9730-3
- [29] NURTJAHJA-TJENDRAPUTRA, Effie, Alaina J. AMMIT, Basil D. ROUFOGALIS, Van H. TRAN and Colin C. DUKE. Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger. *Thrombosis Research* [online]. 2003, 111(4–5), 259–265 [accessed. 2022-03-29]. ISSN 0049-3848. Available at: doi:10.1016/J.THROMRES.2003.09.009
- [30] KOO, K. L.K., A. J. AMMIT, V. H. TRAN, C. C. DUKE and B. D. ROUFOGALIS. Gingerols and Related Analogues Inhibit Arachidonic Acid-Induced Human Platelet Serotonin Release and Aggregation. *Thrombosis Research* [online]. 2001, 103(5), 387–397 [accessed. 2022-03-29]. ISSN 0049-3848. Available at: doi:10.1016/S0049-3848(01)00338-3
- [31] EL HALAWANY, Ali M., Nesrine S. EL SAYED, Hossam M. ABDALLAH and Riham Salah EL DINE. Protective effects of gingerol on streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: emphasis on inhibition of  $\beta$ -amyloid, COX-2, alpha-, beta - secretases and A $\beta$ 1a. *Scientific Reports 2017 7:1* [online]. 2017, 7(1), 1–11 [accessed. 2022-03-27]. ISSN 2045-2322. Available at: doi:10.1038/s41598-017-02961-0
- [32] FIALOVÁ, Silvia. Prírodné liečivá proti bolesti kĺbov, kostí a svalov. *Praktické lekárnictvo* [online]. 2013 [accessed. 2022-03-29]. Available at: <https://www.solen.sk/storage/file/article/94d01be5cade61017e05b05b0a3e3648.pdf>

- [33] LAKHAN, Shaheen E., Christopher T. FORD and Deborah TEPPER. Zingiberaceae extracts for pain: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition Journal* [online]. 2015, 14(1), 1–10 [accessed. 2022-03-30]. ISSN 14752891. Available at: doi:10.1186/S12937-015-0038-8/FIGURES/4
- [34] AMRI, Manel and Chafia TOUIL-BOUKOFFA. In vitro anti-hydatic and immunomodulatory effects of ginger and [6]-gingerol. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [online]. 2016, 9(8), 749–756 [accessed. 2022-03-27]. ISSN 1995-7645. Available at: doi:10.1016/J.APJTM.2016.06.013
- [35] EDITOŘI ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. *kurkuma | Popis, historie a použití | Encyklopedie Britannica* [online]. 24. December 2020 [accessed. 2022-03-30]. Available at: <https://www.britannica.com/plant/turmeric>
- [36] PATOČKA, Jiří. KURKUMIN – KOŘENÍ NEBO NOVÉ LÉČIVO ALZHEIMEROVY NEMOCI? *Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové a Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice* [online]. 2005 [accessed. 2022-03-31]. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/288586740>
- [37] HANZLÍKOVÁ, Hana. Charakteristika, vlastnosti a využití kurkuminu, Univerzita Tomše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. *Bakalářská práce* [online]. 2019 [accessed. 2022-03-31]. Available at: [https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/43804/hanzl%C3%ADkov%C3%A1\\_2019\\_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/43804/hanzl%C3%ADkov%C3%A1_2019_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [38] TILLEROVÁ, Markéta. Enkapsulace kurkuminu v koloidních disperzích, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. *Diplomová práce* [online]. 2021 [accessed. 2022-04-02]. Available at: [https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/47340/tillero%C3%A1\\_2021\\_dp.pdf?sequence=-1&isAllowed=y](https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/47340/tillero%C3%A1_2021_dp.pdf?sequence=-1&isAllowed=y)
- [39] SHEHZAD, Adeeb, Munibah QURESHI, Muhammad Nabeel ANWAR and Young Sup LEE. Multifunctional Curcumin Mediate Multitherapeutic Effects. *Journal of Food Science* [online]. 2017, 82(9), 2006–2015 [accessed. 2022-04-03]. ISSN 1750-3841. Available at: doi:10.1111/1750-3841.13793

- [40] HE, Yan, Yuan YUE, Xi ZHENG, Kun ZHANG, Shaohua CHEN and Zhiyun DU. Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked? *Molecules* [online]. 2015, 20(5), 9183 [accessed. 2022-04-03]. ISSN 14203049. Available at: doi:10.3390/MOLECULES20059183
- [41] GIORDANO, Antonio and Giuseppina TOMMONARO. Curcumin and Cancer. *Nutrients* [online]. 2019, 11(10) [accessed. 2022-04-03]. ISSN 20726643. Available at: doi:10.3390/NU11102376
- [42] ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, Soheil, Habsah ABDUL KADIR, Pouya HASSANDARVISH, Hassan TAJIK, Szaly ABUBAKAR and Keivan ZANDI. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Research International* [online]. 2014, 2014 [accessed. 2022-04-04]. ISSN 23146141. Available at: doi:10.1155/2014/186864
- [43] LAWHAVINIT, Ong-ard, Ngampong KONGKATHIP and Boonsong KONGKATHIP. Antimicrobial Activity of Curcuminoids from *Curcuma longa* L. on Pathogenic Bacteria of Shrimp and Chicken. *Kasetsart Journal - Natural Science* [online]. 2010 [accessed. 2022-04-04]. ISSN 44 : 364-371. Available at: <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/anres/article/view/244941/167429>
- [44] DE, Ronita, Parag KUNDU, Snehasikta SWARNAKAR, T. RAMAMURTHY, Abhijit CHOWDHURY, G. Balakrish NAIR and Asish K. MUKHOPADHYAY. Antimicrobial Activity of Curcumin against *Helicobacter pylori* Isolates from India and during Infections in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2009, 53(4), 1592 [accessed. 2022-04-04]. ISSN 00664804. Available at: doi:10.1128/AAC.01242-08
- [45] GHORBANI, Zeinab, Azita HEKMATDOOST and Parvin MIRMIRAN. Anti-Hyperglycemic and Insulin Sensitizer Effects of Turmeric and Its Principle Constituent Curcumin. *International Journal of Endocrinology and Metabolism* [online]. 2014, 12(4), 18081 [accessed. 2022-04-04]. ISSN 17269148. Available at: doi:10.5812/IJEM.18081
- [46] PARI, Leelavinothan and Pidarani MURUGAN. Antihyperlipidemic effect of curcumin and tetrahydrocurcumin in experimental type 2 diabetic rats. *Renal failure* [online]. 2007, 29(7), 881–889 [accessed. 2022-04-04]. ISSN 0886-022X. Available at: doi:10.1080/08860220701540326

- [47] SHEHZAD, Adeb, Munibah QURESHI, Muhammad Nabeel ANWAR and Young Sup LEE. Multifunctional Curcumin Mediate Multitherapeutic Effects. *Journal of Food Science* [online]. 2017, 82(9), 2006–2015 [accessed. 2022-04-04]. ISSN 1750-3841. Available at: doi:10.1111/1750-3841.13793
- [48] MIYAZAWA, Taiki, Kiyotaka NAKAGAWA, Sharon H. KIM, Michael J. THOMAS, Ligi PAUL, Jean Marc ZINGG, Gregory G. DOLNIKOWSKI, Susan B. ROBERTS, Fumiko KIMURA, Teruo MIYAZAWA, Angelo AZZI and Mohsen MEYDANI. Curcumin and piperine supplementation of obese mice under caloric restriction modulates body fat and interleukin-1 $\beta$ . *Nutrition & metabolism* [online]. 2018, 15(1) [accessed. 2022-04-16]. ISSN 1743-7075. Available at: doi:10.1186/S12986-018-0250-6
- [49] NOVÁK, Jan and Milan SKALICKÝ. *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. 4. vydání. Praha: Powerprint, 2017. ISBN 978-80-7568-036-5.
- [50] PROCHÁZKOVÁ, Marcela. Mikroflóra vybraných druhů koření, Mendelova univerzita v Brně Agronomická fakulta Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin . *Bakalářská práce* [online]. 2016 [accessed. 2022-04-05]. Available at: <https://theses.cz/id/np46pk/17959517>
- [51] TOMAN, Patrik. NUTRIČNÍ HODNOTA PEPŘE ČERNÉHO A BÍLÉHO, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta Technologická. *Diplomová práce* [online]. 2016 [accessed. 2022-04-05]. Available at: file:///C:/Users/dell/Downloads/adoc.pub\_nutrini-hodnota-pepe-erneho-a-bileho-bc-patrik-tom.pdf
- [52] MEGHWAL, Murlidhar and T. K. GOSWAMI. Piper nigrum and Piperine: An Update. *Phytotherapy Research* [online]. 2013, 27(8), 1121–1130 [accessed. 2022-04-12]. ISSN 1099-1573. Available at: doi:10.1002/PTR.4972
- [53] MITTAL, R. and R. L. GUPTA. In vitro antioxidant activity of piperine. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* [online]. 2000, 22(5), 271–274 [accessed. 2022-04-13]. ISSN 03790355. Available at: doi:10.1358/MF.2000.22.5.796644
- [54] HAQ, Iahisham Ul, Muhammad IMRAN, Muhammad NADEEM, Tabussam TUFAIL, Tanweer A. GONDAL and Mohammad S. MUBARAK. Piperine: A review of its biological

- effects. *Phytotherapy Research* [online]. 2021, 35(2), 680–700 [accessed. 2022-04-13]. ISSN 1099-1573. Available at: doi:10.1002/PTR.6855
- [55] ZARAI, Zied, Emna BOUJELBENE, Nadia BEN SALEM, Youssef GARGOURI and Adel SAYARI. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2013, 50(2), 634–641 [accessed. 2022-04-13]. ISSN 0023-6438. Available at: doi:10.1016/J.LWT.2012.07.036
- [56] ZHAI, Wen Jun, Zhen Biao ZHANG, Nian Nian XU, Ying Fang GUO, Changwei QIU, Cheng Ye LI, Gan Zhen DENG and Meng Yao GUO. Piperine Plays an Anti-Inflammatory Role in *Staphylococcus aureus* Endometritis by Inhibiting Activation of NF- $\kappa$ B and MAPK Pathways in Mice. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* [online]. 2016, 2016 [accessed. 2022-04-13]. ISSN 1741-427X. Available at: doi:10.1155/2016/8597208
- [57] ASWAR, Urmila, Sumit SHINTRE, Shilpa CHEPURWAR and Manoj ASWAR. Antiallergic effect of piperine on ovalbumin-induced allergic rhinitis in mice. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2014.982299> [online]. 2015, 53(9), 1358–1366 [accessed. 2022-04-13]. ISSN 17445116. Available at: doi:10.3109/13880209.2014.982299
- [58] DE SOUZA GRINEVICIUS, Valdelúcia Maria Alves, Maicon Roberto KVIECINSKI, Nádia Sandrini Ramos SANTOS MOTA, Fabiana OURIQUE, Luiza Sheyla Evenni PORFIRIO WILL CASTRO, Rafaela Rafognato ANDREGUETTI, João Francisco GOMES CORREIA, Danilo Wilhem FILHO, Claus Tröger PICH and Rozangela Curi PEDROSA. *Piper nigrum* ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2016, 189, 139–147 [accessed. 2022-04-13]. ISSN 0378-8741. Available at: doi:10.1016/J.JEP.2016.05.020
- [59] THARMALINGAM, Nagendran, Min PARK, Min Ho LEE, Hyun Jun WOO, Hyun Woo KIM, Ji Yeong YANG, Ki Jong RHEE and Jong Bae KIM. Piperine treatment suppresses *Helicobacter pylori* toxin entry in to gastric epithelium and minimizes  $\beta$ -catenin mediated oncogenesis and IL-8 secretion in vitro. *American Journal of Translational*

- Research* [online]. 2016, 8(2), 885 [accessed. 2022-04-13]. ISSN 19438141. Available at: /pmc/articles/PMC4846933/
- [60] DING, Yanfang, Yingying DING, Yutong WANG, Changyuan WANG, Meng GAO, Youwei XU, Xiaodong MA, Jianping WU and Lei LI. Soluplus®/TPGS mixed micelles for co-delivery of docetaxel and piperine for combination cancer therapy. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1679834> [online]. 2019, 25(1), 107–115 [accessed. 2022-04-16]. ISSN 10979867. Available at: doi:10.1080/10837450.2019.1679834
- [61] SRINIVASAN, K. Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. <http://dx.doi.org/10.1080/10408390601062054> [online]. 2007, 47(8), 735–748 [accessed. 2022-04-16]. ISSN 10408398. Available at: doi:10.1080/10408390601062054
- [62] MEGHWAL, Murlidhar and T. K. GOSWAMI. Piper nigrum and Piperine: An Update. *Phytotherapy Research* [online]. 2013, 27(8), 1121–1130 [accessed. 2022-04-12]. ISSN 1099-1573. Available at: doi:10.1002/PTR.4972
- [63] SONG, Xiu Yun, Shuang XU, Jin Feng HU, Jia TANG, Shi Feng CHU, Hang LIU, Ning HAN, Jing Wei LI, Dong Ming ZHANG, Yue Ting LI and Nai Hong CHEN. Piperine prevents cholesterol gallstones formation in mice. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2015, 751, 112–117 [accessed. 2022-04-16]. ISSN 0014-2999. Available at: doi:10.1016/J.EJPHAR.2015.01.038
- [64] MAEDA, Ayumi, Takeshi SHIRAO, Daishi SHIRASAYA, Yasukiyo YOSHIOKA, Yoko YAMASHITA, Mitsugu AKAGAWA, Hitoshi ASHIDA, A MAEDA, T SHIRAO, D SHIRASAYA, Y YAMASHITA, H ASHIDA, Y YOSHIOKA and M AKAGAWA. Piperine Promotes Glucose Uptake through ROS-Dependent Activation of the CAMKK/AMPK Signaling Pathway in Skeletal Muscle. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2018, 62(11), 1800086 [accessed. 2022-04-16]. ISSN 1613-4133. Available at: doi:10.1002/MNFR.201800086
- [65] DEROSA, Giuseppe, Pamela MAFFIOLI and Amirhossein SAHEBKAR. Piperine and its role in chronic diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. 2016, 928, 173–184 [accessed. 2022-04-16]. ISSN 22148019. Available at: doi:10.1007/978-3-319-41334-1\_8/TABLES/1

- [66] CHONPATHOMPIKUNLERT, Pennapa, Jintanaporn WATTANATHORN and Supaporn MUCHIMAPURA. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2010, 48(3), 798–802 [accessed. 2022-04-16]. ISSN 0278-6915. Available at: doi:10.1016/J.FCT.2009.12.009
- [67] YAN, Jie, Si Chi XU, Chun Yan KONG, Xiao Yang ZHOU, Zhou Yan BIAN, Ling YAN and Qi Zhu TANG. Piperine Alleviates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via Activating PPAR- $\gamma$  in Mice. *PPAR Research* [online]. 2019, 2019 [accessed. 2022-04-16]. ISSN 16874765. Available at: doi:10.1155/2019/2601408
- [68] STARIAT, Ján and Petra KOVAŘÍKOVÁ. Farmaceutická analýza: HPLC - historie a základní principy [online]. no date [accessed. 2022-04-17]. Available at: <https://dl1.cuni.cz/mod/resource/view.php?id=149771>
- [69] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty [učební text pro posluchače Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové]*. 3. vydání. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1453-3.
- [70] STARIAT, Ján and Petra KOVAŘÍKOVÁ. Farmaceutická analýza: HPLC - popis základního hardwaru [online]. no date [accessed. 2022-04-18]. Available at: <https://dl1.cuni.cz/mod/resource/view.php?id=149769>
- [71] WEB.VSCHT.CZ. Základy analýzy potravin: VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC) , Přednáška 6 [online]. no date [accessed. 2022-04-18]. Available at: [https://web.vscht.cz/~koplikr/%c4%8c%c3%a1stA6\\_2.pdf](https://web.vscht.cz/~koplikr/%c4%8c%c3%a1stA6_2.pdf)
- [72] STARIAT, Ján and Petra KOVAŘÍKOVÁ. Farmaceutická analýza: HPLC - detektory [online]. no date [accessed. 2022-04-19]. Available at: <https://dl1.cuni.cz/mod/resource/view.php?id=152108>
- [73] SKLENÁŘOVÁ, Hana and Ludmila MATYSOVÁ. Inovace studijního programu farmacie na Farmaceutické fakultě UK Instrumentální metody HPLC chromatografie [online]. no date [accessed. 2022-04-22]. Available



at: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/223917/mod\\_resource/content/1/HPLC\\_chromatografie.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/223917/mod_resource/content/1/HPLC_chromatografie.pdf)

- [74] STARIAT, Ján and Petra KOVAŘÍKOVÁ. Farmaceutická analýza: HPLC – stacionární fáze a separační módy [online]. no date [accessed. 2022-04-22]. Available at: [https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/399298/mod\\_resource/content/1/Lekce%204\\_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/399298/mod_resource/content/1/Lekce%204_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf)
- [75] TÝM HPLC.CZ. *MONOLITICKÉ HPLC KOLONY* [online]. [accessed. 2022-04-25]. Available at: [http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic\\_columns.htm](http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic_columns.htm)
- [76] TÝM HPLC.CZ. *HPLC teorie - Adsorbenty - Kolony* [online]. [accessed. 2022-04-25]. Available at: [http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html#\\_1\\_Polar\\_sorbent](http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html#_1_Polar_sorbent)
- [77] TÝM HPLC.CZ. *VLIV AKTIVITY ZBYTKOVÝCH SILANOLOVÝCH SKUPIN NA REVERZNÍ FÁZI* [online]. [accessed. 2022-04-24]. Available at: <http://www.hplc.cz/Tip/silanol.htm>
- [78] YOU, Hong, Bailey IRELAND, Michael MOESZINGER, Haoshu ZHANG, Laura SNOW, Scott KREPICH and Vivian TAKAGAWA. Determination of bioactive nonvolatile ginger constituents in dietary supplements by a rapid and economic HPLC method: Analytical method development and single-laboratory validation. *Talanta* [online]. 2019, 194, 795–802 [accessed. 2022-04-07]. ISSN 0039-9140. Available at: doi:10.1016/J.TALANTA.2018.10.075
- [79] TAO, Y. I., Wenkui LI, Wenzhong LIANG and Richard B. VAN BREEMEN. Identification and Quantification of Gingerols and Related Compounds in Ginger Dietary Supplements Using High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2009, 57(21), 10014 [accessed. 2022-04-25]. ISSN 00218561. Available at: doi:10.1021/JF9020224
- [80] SCHWERTNER, Harvey A. and Deborah C. RIOS. High-performance liquid chromatographic analysis of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol in ginger-containing dietary supplements, spices, teas, and beverages. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, 856(1–2), 41–47 [accessed. 2022-04-25]. ISSN 1570-0232. Available at: doi:10.1016/J.JCHROMB.2007.05.011

- [81] OSORIO-TOBÓN, J. Felipe, Pedro I.N. CARVALHO, Gerardo Fernández BARBERO, Gislaine Chrystina NOGUEIRA, Mauricio Ariel ROSTAGNO and Maria Angela De Almeida MEIRELES. Fast analysis of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Food Chemistry* [online]. 2016, 200, 167–174 [accessed. 2022-04-25]. ISSN 0308-8146. Available at: doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.01.021
- [82] KOOP, Heidegrid S., Rilton A. DE FREITAS, Lauro M. DE SOUZA, Glauca R. MARTINEZ and Joana L.M. SILVEIRA. Development and validation of a RP-HPLC-PDA method for determination of curcuminoids in microemulsions. *Chromatographia* [online]. 2013, 76(15–16), 1041–1048 [accessed. 2022-04-25]. ISSN 00095893. Available at: doi:10.1007/S10337-013-2402-1/TABLES/2
- [83] KOLHE, Smita R, Priyanka BOROLE and Urmi PATEL. EXTRACTION AND EVALUATION OF PIPERINE FROM PIPER NIGRUM LINN [online]. no date [accessed. 2022-04-25]. ISSN 0976-4550. Available at: www.ijabpt.com
- [84] WANG, Xiu Mei, Qi Zhi ZHANG, Jian YANG, Rong Hua ZHU, Jun ZHANG, Li Jing CAI and Wen Xing PENG. Validated HPLC–MS/MS Method for Simultaneous Determination of Curcumin and Piperine in Human Plasma. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2012, 11(4), 621–629 [accessed. 2022-04-25]. ISSN 1596-5996. Available at: doi:10.4314/tjpr.v11i4.13
- [85] *Ginger Root Vegetable Capsules - Pack of 100* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: <https://solgar.co.uk/products/solgar-ginger-root-vegetable-capsules-pack-of-100>
- [86] *Swanson Maximum Strength Ginger Root Extract 200 Milligrams 60 Veg Capsules : Health & Household* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: <https://www.amazon.com/Swanson-Maximum-Strength-Milligrams-Capsules/dp/B07L5G52QC?th=1>
- [87] *Shogaol Zázvor Epigemic® 30 kapslí | Nástroje zdraví | Eshop* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: <https://www.nastrojezdravi.cz/p/shogaol-zazvor-epigemic-30-kapsli>

- [88] *Zázvorový extrakt - BioMedical* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: <https://www.namaximum.cz/ginger-root-extract-zazvorovy-extrakt-v-kapslich/?parameters%5B2%5D=67>
- [89] *BIO Kurkuma + Zázvor - VanaVita* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: <https://gymbeam.cz/bio-kurkuma-zazvor-vanavita.html>
- [90] *Katalog produktů / Vieste* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: [http://www.viestegroup.cz/katalog-produktu/vieste/vieste-kurkumin-piperin-plus-60-cps\\_381/](http://www.viestegroup.cz/katalog-produktu/vieste/vieste-kurkumin-piperin-plus-60-cps_381/)
- [91] YUDTHAVORASIT, Soparat, Kanet WONGRAVEE and Natchanun LEEPIPATPIBOON. Characteristic fingerprint based on gingerol derivative analysis for discrimination of ginger (*Zingiber officinale*) according to geographical origin using HPLC-DAD combined with chemometrics. *Food Chemistry* [online]. 2014, 158, 101–111 [accessed. 2022-04-07]. ISSN 0308-8146. Available at: doi:10.1016/J.FOODCHEM.2014.02.086
- [92] CHUMROENPHAT, Theeraphan, Issaraporn SOMBOONWATTHANAKUL, Surapon SAENSOUK and Sirithon SIRIAMORNPNUN. The diversity of biologically active compounds in the rhizomes of recently discovered zingiberaceae plants native to North Eastern Thailand. *Pharmacognosy Journal* [online]. 2019, 11(5), 1014–1022 [accessed. 2022-04-07]. ISSN 09753575. Available at: doi:10.5530/PJ.2019.11.160
- [93] MA, Zhengshuan, Anooshirvan SHAYEGANPOUR, Dion R. BROCKS, Afsaneh LAVASANIFAR and John SAMUEL. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin. *Biomedical Chromatography* [online]. 2007, 21(5), 546–552 [accessed. 2022-04-07]. ISSN 1099-0801. Available at: doi:10.1002/BMC.795
- [94] WIKIPEDIA - THE FREE ENCYKLOPEDIA. *Piperine* [online]. 2022 [accessed. 2022-04-05]. Available at: <https://en.wikipedia.org/wiki/Piperine>
- [95] CC BY 3.0. *HPLC – Wikipedie* [online]. 2010 [accessed. 2022-04-19]. Available at: [https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/Soubor:Preparative\\_HPLC.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/Soubor:Preparative_HPLC.svg)
- [96] *Dilmah černý čaj pomeranč a zázvor 30g (20x1,5g)* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: <https://www.tomato.cz/dilmah-cerny-caj-pomeranc-a-zazvor-30g-20x1->

5g/?gclid=Cj0KCQiApL2QBhC8ARIsAGMm-KFUSFAy3mqA0JWkq8jO8H-  
I9SIXPwzJ3JC5cdNUmOOf2U38hDj6CpUaArFfEALw\_wcB

- [97] *Loyd Bylinno-ovocný čaj aromatizovaný brusinky & zázvor 20 x 2g (40g)* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: [https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001020011980?selectedUrl=https%3A%2F%2Fsecure.ce-tescoassets.com%2Fassets%2FCZ%2F056%2F5900396023056%2FShotType1\\_540x540.jpg](https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001020011980?selectedUrl=https%3A%2F%2Fsecure.ce-tescoassets.com%2Fassets%2FCZ%2F056%2F5900396023056%2FShotType1_540x540.jpg)
- [98] *TEEKANNE Dýchací cesty a krk se zázvorem, bylinná směs, 10 sáčků, 20g* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: [https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001120823629?selectedUrl=https%3A%2F%2Fsecure.ce-tescoassets.com%2Fassets%2FCZ%2F948%2F8594024715948%2FShotType1\\_540x540.jpg](https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001120823629?selectedUrl=https%3A%2F%2Fsecure.ce-tescoassets.com%2Fassets%2FCZ%2F948%2F8594024715948%2FShotType1_540x540.jpg)
- [99] *PICKWICK čaj NOS A KRK 10 ks 20g* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: [https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001120901192?selectedUrl=https%3A%2F%2Fsecure.ce-tescoassets.com%2Fassets%2FCZ%2F414%2F8594001660414%2FShotType1\\_540x540.jpg](https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001120901192?selectedUrl=https%3A%2F%2Fsecure.ce-tescoassets.com%2Fassets%2FCZ%2F414%2F8594001660414%2FShotType1_540x540.jpg)
- [100] *Tesco Ovocný čaj se zázvorem a citronovou kůrou 20 x 2g (40g)* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: [https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2005100579790?selectedUrl=https%3A%2F%2Fsecure.ce-tescoassets.com%2Fassets%2FCZ%2F867%2F5051007137867%2FShotType1\\_540x540.jpg](https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2005100579790?selectedUrl=https%3A%2F%2Fsecure.ce-tescoassets.com%2Fassets%2FCZ%2F867%2F5051007137867%2FShotType1_540x540.jpg)
- [101] *TEEKANNE Ginger Curcuma, World Special Teas, 20 sáčků, 35g* [online]. [accessed. 2022-04-26]. Available at: [https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001020258597?selectedUrl=https%3A%2F%2Fsecure.ce-tescoassets.com%2Fassets%2FCZ%2F556%2F5901086058556%2FShotType1\\_540x540.jpg](https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001020258597?selectedUrl=https%3A%2F%2Fsecure.ce-tescoassets.com%2Fassets%2FCZ%2F556%2F5901086058556%2FShotType1_540x540.jpg)