

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI  
KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

Diplomová práce

HPLC v kontrole kvality potravních doplňků na bázi  
extraktů s kurkuminy

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

Hradec Králové 2022

Veronika Stříbrná

### **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.

Dne v Hradci Králové

Ráda bych poděkovala panu prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady a ochotu v průběhu vypracování celé diplomové práce.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Veronika Stříbrná

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

Název diplomové práce: HPLC v kontrole kvality potravních doplňků na bázi extraktů s kurkuminy

V této práci byla vyvinuta a validována HPLC metoda pro separaci a současné stanovení účinných látek piperinu, kurkuminu, demetoxykurkuminu a bisdemetoxykurkuminu.

Tato HPLC metoda byla následně použita pro stanovení obsahu těchto látek ve vybraných doplňcích stravy a to jmenovitě: Kurkumin – piperin plus Vieste, Kurkumin-piperin komplex Natural Medicaments, Kurkuma: piperin Setaria, Cur-Cum Astina, Kurkumín Liftea, Kurkumin Advance a Curcumin turmeric.

Výsledky měření byly na závěr porovnány s deklarovaným obsahem extraktu a vyhodnoceny v % jako kvalita potravního doplňku z hlediska deklarovaného množství. K analýze byla použita kolona Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, částice 2,7 µm a předkolona Ascentis® RP-Amide 5 x 4,6 mm, částice 2,7 µm. Režim analýzy byl zvolen gradientový o délce analýzy 12,5 minuty s průtokem mobilní fáze 1,0 ml/min. Jako mobilní fáze byla vybrána směs 100% acetonitrilu s 0,1% kys. fosforečnou. Detekce probíhala pomocí DAD detektoru při vlnových délkách 280, 340 a 420nm.

Klíčová slova: HPLC, piperin, kurkumin, demetoxykurkumin, bisdemetoxykurkumin, potravní doplňky

## ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Veronika Stříbrná

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

Title of diploma thesis: HPLC in quality control of food supplements based on curcumin extracts

In this diploma thesis, a new HPLC method for the simultaneous determination of active components in food supplements, piperine, curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin was developed and validated.

The method was used to determine the level of the relevant analytes in the selected food supplements, namely Curcumin – piperine plus Vieste, Curcumin-piperine complex Natural Medicaments, Turmeric: piperine Setaria, Cur-Cum Astina, Curcumin Liftea, Curcumin Advance a Curcumin turmeric.

Finally, the obtained results were compared with the declared extract content and evaluated as a percentage of quality of the food supplement.

An Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm particle size analytical column with Ascentis® RP-Amide 5 x 4,6 mm, 2,7 µm particle size precolumn was used for analysis. A gradient elution with analysis time of 12.5 minutes and flow rate of mobile phase 1.0 ml/min was used. As the mobile phase a mixture of acetonitrile 100% and 0.1% phosphoric acid was chosen. The detection was performed with a DAD detector at wavelengths of 280, 340 and 420 nm.

Keywords: HPLC, piperine, curcumin, demetoxycurcumin, bisdemetoxycurcumin, food supplements

## Obsah

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	10
2. ÚVOD.....	11
3. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE.....	12
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
4.1.Piperin.....	13
4.1.1 Farmakognostické údaje.....	13
4.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti piperinu.....	14
4.1.3 Tradiční čínská medicína.....	15
4.1.4 Biologická dostupnost.....	15
4.1.5 Farmakologické účinky.....	15
4.2 Kurkumin a jeho přírodní analogy.....	16
4.2.1 Farmakognostické údaje.....	16
4.2.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti piperinu.....	17
4.2.3 Tradiční čínská medicína.....	18
4.2.4 Biologická dostupnost.....	18
4.2.5 Farmakologické účinky.....	18
4.3 Přírodní analogy.....	18
4.4 HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	19
4.5 Chromatografické kolony.....	20
4.5.1 Kolona Ascentis® Express 90 Å RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice.....	20
4.6 DAD – detektor diodového pole.....	20
4.7 Možnosti hodnocení piperinu a kurkuminu.....	21
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
5.1 Použité pomůcky, přístroje a materiál.....	23
5.1.1 Pomůcky.....	23
5.1.2 Přístroje.....	23
5.1.3 Materiál.....	25
5.1.3.1 Chemikálie.....	25
5.1.3.2 Standardy.....	25
5.1.3.3 Použité potravní doplňky.....	25
5.2 Příprava mobilní fáze, zásobního extrakčního činidla a roztoků standardů.....	26
5.2.1 Příprava mobilní fáze.....	26

5.2.2 Příprava zásobního extrakčního činidla pro standardy a vzorky .....	26
5.2.3 Příprava zásobního roztoku standardu pro optimalizaci a validaci metody .....	26
5.2.4 Příprava pracovního roztoku směsi standardů pro optimalizaci a validaci metody .....	26
5.2.5 Příprava pracovních roztoků standardů pro test způsobilosti chromatografického systému .....	26
5.2.6 Příprava pracovního roztoku směsi standardů pro kalibraci a opakovatelnost.....	26
5.2.7 Příprava pracovních roztoků standardů pro limit detekce .....	27
5.2.8 Příprava roztoků standardů pro stanovení obsahu potravních doplňků.....	28
5.2.9 Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu pro určení ideálního vnitřního standardu.....	28
5.2.10 Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu pro stanovení obsahu vzorků potravních doplňků .....	28
5.3 Příprava vzorků .....	29
5.3.1 Příprava vzorků potravních doplňků.....	29
5.3.2 Příprava vzorků pro optimalizaci extrakčního činidla .....	30
5.3.3 Příprava vzorků pro přesnost .....	30
5.3.4 Příprava vzorků pro správnost .....	30
5.4 Parametry měření .....	30
6. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	31
6.1 OPTIMALIZACE METODY .....	31
6.1.1 Volba vlnové délky .....	31
6.1.1.1 Absorpční spektrum tetrahydrokurkuminu .....	32
6.1.1.2 Absorpční spektrum piperinu.....	32
6.1.1.3 Absorpční spektrum kurkuminu .....	33
6.1.1.4 Absorpční spektrum demetoxykurkuminu.....	33
6.1.1.5 Absorpční spektrum bisdemetoxykurkuminu.....	34
6.1.1.6 Absorpční spektrum metylparabenu .....	34
6.1.2 Volba průběhu gradientu .....	35
6.1.2.1 Gradient A „delší“ .....	35
6.1.2.2 Gradient A „kratší“ .....	36
6.1.2.3 Gradient B .....	36
6.1.2.4 Gradient C.....	36

6.1.2.5 Gradient D.....	37
6.1.3 Hodnocení stability bisdemetoxykurkuminu .....	37
6.1.4 Volba kolony.....	38
6.1.4.1 Kolona Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice.....	38
6.1.4.2 Kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice .....	39
6.1.4.3 Kolona YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm částice.....	39
6.1.4.4 Kolona YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 5 µm částice. ....	39
6.1.4.5 Kolona YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 µm částice .....	40
6.1.4.6 Kolona YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 µm částice .....	40
6.1.4.7 Kolona Kinetex® XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice .....	40
6.1.4.8 Kolona Kinetex® EVO-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice .....	41
6.1.4.9 Kolona Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6mm 2,6 µm částice .....	41
6.1.4.10 Kolona Kinetex Biphenyl 150 x 4,6mm 2,6 µm částice.....	41
6.1.4.11 Kolona Luna® Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm částice .....	42
6.1.5 Volba vnitřního standardu .....	42
6.1.6 Volba extrakčního činidla .....	43
6.1.6.1 Vyhodnocení ploch kurkuminu u vzorku Cur-Cuma Astina .....	43
6.1.6.2 Vyhodnocení ploch kurkuminu u vzorku Kurkuma: piperin Setaria.....	44
6.1.7.Optimální nastavení pro HPLC analýzu .....	46
6.2 VALIDACE METODY .....	47
6.2.1 Test způsobilosti chromatografického systému .....	47
6.2.2 Linearita .....	48
6.2.2.1 Kalibrační závislost pro piperin.....	48
6.2.2.2 Kalibrační závislost pro kurkumin.....	49
6.2.2.3 Kalibrační závislost demetoxykurkumin .....	50
6.2.2.4 Kalibrační závislost pro bisdemetoxykurkumin .....	51
6.2.3 Opakovatelnost .....	51
6.2.4 Přesnost .....	52
6.2.4.1 Přesnost vzorku Cur-Cuma Astina .....	52
6.2.4.2 Přesnost vzorku Kurkuma-Piperin Setaria.....	53
6.2.5 Správnost .....	53
6.2.6 Limit detekce a kvantifikace.....	54



6.2.7 Stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích .....	55
6.1.7.1 Váha obsahu kapslí (tobolek) vybraných doplňků stravy.....	56
6.1.7.2 Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých účinných látek v analyzovaných doplňcích stravy.....	56
6.1.7.3 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Vieste Kurkumin-piperin plus ...	57
6.1.7.4 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex .....	59
6.1.7.5 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Setaria Kurkuma: Piperin .....	61
6.1.7.6 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Astina Cur-Cum.....	62
6.1.7.7 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex Liftea Kurkumin .....	64
6.1.7.8 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Advance Kurkumin .....	65
6.1.7.9 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Jamieson Curcumin Turmeric ...	67
6.1.7.10 Vyhodnocení kvality vybraných doplňků stravy .....	68
6.1.7.11 Porovnání obsahu kurkuminu k ceně doplňku stravy .....	69
7. ZÁVĚR .....	70
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	72
9. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK .....	75
9.1 Seznam obrázků.....	75
9.2 Seznam tabulek .....	77

## 1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN – Acetonitril

As – Asymetrie chromatografických píků

BDMK – Bisdemetoxykurkumin

Cps. – Kapsle

DAD – Diode array detector; detektor diodového pole

DMK – Demetoxykurkumin

EA – Ethylacetát

ESI – Ionizace elektrosprejem

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IS – Vnitřní standard

k – Retenční faktor

KUR –Kurkumin

LC-MS – Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

LOD – Limit detekce

LOQ – Limit kvantifikace

MeOH – Methanol

MF – Mobilní fáze

MS – Hmotnostní spektrofotometrie

Mw – Molekulová hmotnost

PIP – Piperin

Rs – Rozlišení chromatografických píků

RSD – Relativní směrodatná odchylka

SD – Směrodatná odchylka

Tbl. – Tableta

TOF – Hmotnostní spektrometrie doby letu

$t_r$  – Retenční čas

$w_h$  – Šířka píku

## 2. ÚVOD

Piperin se vyskytuje především v plodu pepřovníku černém z čeledi pepřovníkovité, v obsahovém rozmezí 1,7–7,4 % piperinu v rostlině. Dodává rostlině charakteristickou štiplavou chuť a vyskytuje se zde ve třech geometrických izomerech isopiperinu, isochavicinu a chavicinu. Chemicky ho můžeme zařadit mezi přírodní alkaloidy, je špatně rozpustný ve vodě a dosahuje nízké biologické dostupnosti v těle.

Pro své antioxidační, protinádorové, antihypertenzní, antipyretické, analgetické, antiastmatické, antidepresivní, antibakteriální, antiapoptické a další účinky je předmětem mnoha studií a používán také i jako doplněk stravy.

Kurkumin se vyskytuje ve vytrvalé bylině Kurkumě dlouhé, jinak nazývané jako indický šafrán z čeledi zázvorníkovité. Chemicky je to lipofilní polyfenolová látka, je stejně jako piperin špatně rozpustný ve vodě a má nízkou biologickou dostupnost.

Kurkumin má klinicky dokázanou účinnost při cukrovce, zánětlivých onemocněních střev a artritidě. Stejně jako piperin je předmětem mnoha studií. Vzhledem k faktu, že piperin zvyšuje biologickou dostupnost kurkuminu, se tyto dvě látky velmi často vyskytují v potravních doplňcích společně.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je v současnosti jednou z nejpoužívanějších analytických metod nejen v analýze potravních doplňků. V této práci byla vyvinuta a validována nová HPLC metoda pro současné stanovení účinných látek piperinu, kurkuminu, demetoxykurkuminu a bisdemetoxykurkuminu. Tato metoda byla následně použita pro stanovení obsahu těchto látek ve vybraných doplňcích stravy. Výsledky měření byly na závěr porovnány s deklarovaným obsahem extraktu a vyhodnoceny v % jako kvalita potravního doplňku.

### **3. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE**

Cílem diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat HPLC metodu pro současné stanovení piperinu, kurkuminu, demetoxykurkuminu a bisdemetoxykurkuminu.

Dále bylo cílem aplikovat vyvinutou metodu pro stanovení obsahu těchto čtyř látek v 7 vybraných doplňcích stravy pro porovnání jejich kvality.

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 Piperin

#### 4.1.1 Farmakognostické údaje

Bylina latinsky: *Piper nigrum*

Bylina česky: Pepřovník černý

Čeleď latinsky: Piperaceae

Čeleď česky: Pepřovníkovité

Rostlinná droga: *Piperis nigri fructus* – plod pepřovníku černého



Obrázek 1 - Ilustrovaný obrázek *Piper nigrum* [1]

Účinná látka piperin se vyskytuje v plodu Pepřovníku černého. Je to tropická ovíjivá liána pěstována právě pro svůj plod (bobuli) obsahující tuto účinnou látku, která dodává rostlině štiplavou chuť a hojně se tak využívá jako koření po celém světě.

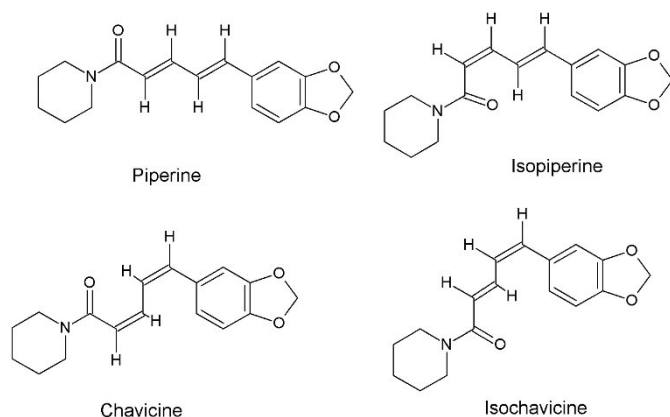
Pepřovník černý pocházející původem z jihozápadní Indie se v dnešní době široce pěstuje v mnoha tropických oblastech. Mezi největší celosvětové pěstitele pepře černého patří Vietnam, Indie, Indonésie a Srí Lanka.

Tato ovíjivá liána dřevnatí a dorůstá výšky až 4 metry. Její listy jsou střídavě řapíkaté a květenství uspořádané v hrozenství vyrůstá z nodů naproti listům. Plod tvaru kulaté bobule obsahuje pouze jedno semeno [1],[2],[3],[9].

Mezi další druhy pepře patří: pepř dlouhý (*P. longum*), pepř úzkolistý (*P. angustifolium*), pepřovník betelový (*P. betle*) – jehož listy se žvýkají pro jeho stimulující efekt na CNS, či pepřovník opojný (*P. methysticum*) – s hlavní účinnou složkou laktonem kavainem, ze kterého se připravuje opojný nápoj kava-kava [4],[5],[6].

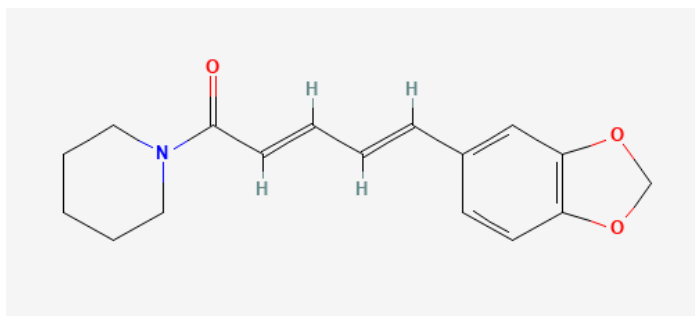
Obsahové látky pepře černého jsou zejména: alkaloidy (piperin), pryskyřice (obsahující amidovou složku chavicin), silice (pinen, felandren, karyofylen, sabinen), flavonoidy, terpentoidy, steroly, fenoly, lignany, terpeny a chalkony [2],[9],[10].

Piperin se v rostlině vyskytuje ve třech geometrických izomerech isopiperinu, isochavicinu a chavicinu v obsahu 1,7–7,4 %. Chemicky se jedná o přírodní alkaloid piperinového typu [11].

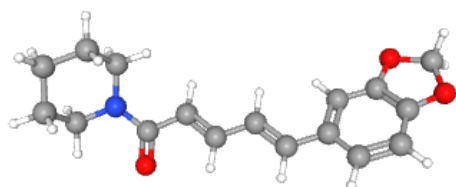


Obrázek 2 – Geometrické izomery piperinu [11]

#### 4.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti piperinu



Obrázek 3 - Chemické struktura piperinu [7]



Obrázek 4 - Interaktivní model chemické struktury piperinu typu, míč a hůl'' [7]

Název IUPAC: (2*E*, 4*E*) -5-(1,3benzodioxol-5-yl) -1piperidin-1-ylpenta-2,4dien-1-on

Molekulární vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>

M<sub>w</sub> = 285,34

Bod tání: 131–135 °C

Rozpustnost: rozpustný v ethanolu, methanolu a acetonitrilu.

Uchovávání a stabilita: stabilní při pokojové teplotě. Je termicky nestabilní, například během domácího vaření se během 10-30 minut může ztratit 16–34 % účinné látky piperinu. Proto se pro zachování farmakologických účinků nedoporučuje dlouhodobé vystavení tepla [7], [8], [12].

#### **4.1.3 Tradiční čínská medicína**

V tradiční čínské medicíně se nejvíce využívá při chřipce, bolestech svalů, nachlazení, vyčerpání, jako nervové tonikum, ke zvýšení krevního oběhu, povzbuzení chuti k jídlu a povzbuzení peristaltiky, také podporuje enzymatickou aktivitu slinivky břišní [10].

#### **4.1.4 Biologická dostupnost**

Piperin je špatně rozpustný ve vodě a dosahuje nízké biologické dostupnosti, což omezuje jeho terapeutické účinky a možnosti aplikace [10].

#### **4.1.5 Farmakologické účinky**

Dle moderní medicíny piperin vykazuje četné farmakologické účinky, jako jsou antioxidantní, protinádorové, antihypertenzní, antipyretické, analgetické, antiastmatické, antidepressivní, antibakteriální, antiapoptické a další účinky.

Také umožňuje zvýšenou biologickou dostupnost potravin, léků (např: tetracyklinových antibiotik), antikarcinogenů a dalších fotochemikálií (kurkumin) [10,11,12].

## 4.2 Kurkumin

### 4.2.1 Farmakognostické údaje

Bylina latinsky: *Curcuma Longa*

Bylina česky: Kurkuma dlouhá

Čeleď latinsky: Zingiberaceae

Čeleď česky: Zázvorníkovité

Rostlinná droga: rhizoma curcumae longa – oddenek kurkumy dlouhé



Obrázek 5 - Ilustrovaný obrázek *Curcuma longa* [14]

Kurkumin se vyskytuje ve vytrvalé bylině Kurkumě dlouhé, jinak nazývané jako indický šafrán (anglicky Turmeric), která je odedávna pěstována v jihovýchodní Asii – Indii, Laosu a Thajsku jako koření.

*Curcuma longa* z čeledi Zingiberaceae je charakteristická svými zdužnatělými kořenovými oddenky, podobnými oddenkům zázvoru nebo kosatců. Z jeho oddenku vyrůstá až jeden a půl metru vysoký stonek a dlouze řapíkaté listy. Mezi nimi vyrůstá klas osazený světle žlutými květy. Plodem jsou trojpouzdré mnohosemenné tobolky.

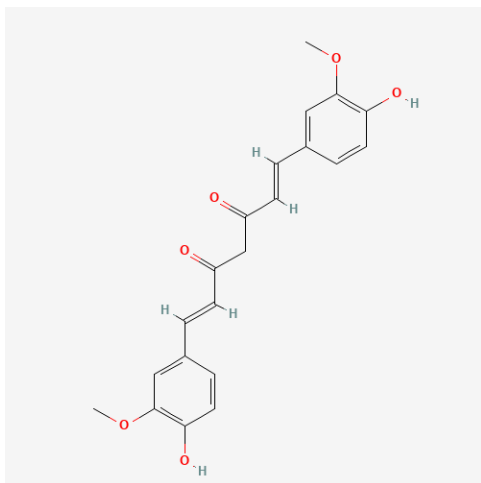
Mezi čeleď zázvorníkovité dále patří například: Zázvor obecný (*Zingiber officinale*) či Galgán velký (*Alpinia Galanga*).

Farmaceutickou surovinou jsou typické oddenky žluté barvy (rhizoma curcumae) obsahující mnoho biologicky aktivních látek jako jsou například: ketony (turmerton, artumaron, zingiberin), ostré hořčiny, silice (tolilmetylkarbinol), pryskyřice, barviva (kurkumin) a další látky.

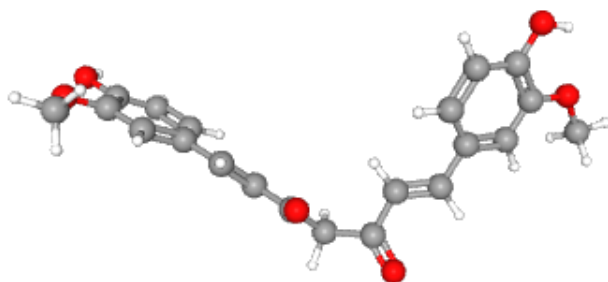
Nejvýznamnější látkou je právě barvivo kurkumin, lipofilní polyfenolová látka, která tvoří 2–5 % prášku z kurkumy [9],[13],[14],[15].



## 4.2.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti kurkuminu



Obrázek 6 Chemická struktura kurkuminu [17]



Obrázek 7 Interaktivní model chemické struktury kurkuminu typu „ míč a hůl“ [17]

Název IUPAC: (1E, 6E) -1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl) hepta-1,6dien-3,5dion

Molekulární vzorec:  $C_{21}H_{20}O_6$

Mw = 368,4

Bod tání: 183 °C

Rozpustnost: velmi dobře rozpustný v metanolu, ethanolu, kyselině octové a acetonu.

Uchování a stabilita: stabilní při pokojové teplotě, citlivý na světlo. Kurkumin může mít až tři kyselé protony, dva z fenolických OH skupin (v rozmezí 8,5–10,7) a jeden v enol formě. V kyselém a neutrálním prostředí je kurkumin stabilní, vyskytuje se v jeho keto formě, která se chová jako elektronový akceptor. V zásaditém prostředí dochází k deprotonaci funkčních skupin a změnou v enol formu, která je nestabilní [16],[17].

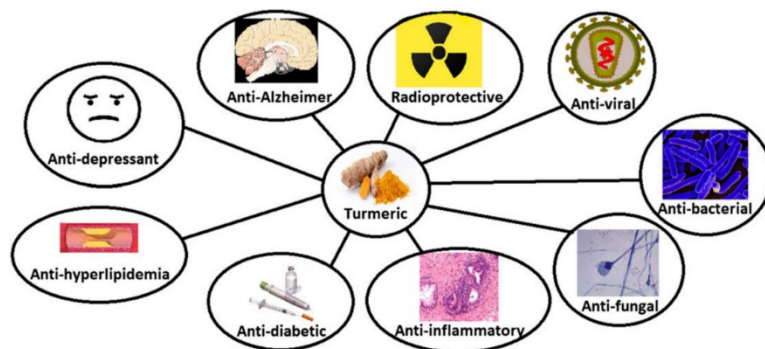
### 4.2.3 Tradiční čínská medicína

Kurkuma, čínsky, jiang huáng“ je známá více než 3000let, obchodovalo se s ní jako s kořením již ve středověku. Droga se často využívá jako součást koření známé, curry“, které kromě kurkumy obsahuje především černý pepř, cayenský pepř, kmín, koriandr a pískavici.

Dle tradiční medicíny se užívá při onemocnění žlučníku na zvýšení tvorby žluči, tlumí záněty a křečové stahy žlučových, zlepšuje chuť k jídlu a napomáhá trávení. Používá se k čištění pórů v pleti, reguluje činnost mazových žláz, chrání pleť před akné, zlepšuje prokrvení a podporuje tvorbu kolagenu. Napomáhá uvolňování hlenu. Dále má účinek jako nesteroidní antiflogistikum na revmatoidní artritidu. Snižuje hladinu cholesterolu a snižuje aktivitu některých bílkovin, které stimulují růst nádoru. Kurkumu lze také zařadit mezi přírodní antibiotika s antibakteriálním a antivirovým účinkem [18],[19],[20].

### 4.2.4 Biologická dostupnost

Kurkumin má špatnou biologickou dostupnost, vysokou rychlost metabolismu a exkrece. Vzhledem k faktu, že piperin zvyšuje biologickou dostupnost kurkuminu (snižuje glukuronidaci kurkuminu), se tyto dvě látky kombinují v potravních doplňcích velmi často [21].



Obrázek 8 - Přehled farmakologických účinků kurkuminu [22]

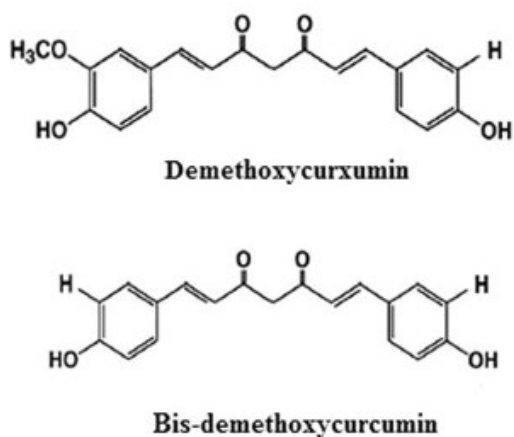
### 4.2.5 Farmakologické účinky

Kurkumin se využívá proti autoimunitním onemocněním, metabolickým onemocněním, neurologickým onemocněním, kardiovaskulárním onemocněním, plicním onemocněním, onemocněním jater, má protivirové, antibakteriální a antiseptické vlastnosti, radioprotektivní vlastnosti a také tlumí rozvoj zánětlivých onemocnění. Klinicky je dokázána jeho účinnost při cukrovce, zánětlivých onemocněních střev a artritidě. Momentálně probíhají studie hodnotící protinádorový účinek kurkuminoidů. [21],[22],[23].

### 4.3 Přírodní analogy

Kurkuminoidy nacházející se v rozemleté droze se skládají z kurkuminu (77 %), demethoxykurkuminu (DMC; 17 %) a bisdemethoxykurkuminu (BDMC; 3 %).

Dle literatury má zřejmě DMK a BDMK podobnou biologickou aktivitu jako kurkumin. Tetrahydrokurkumin (THC) vykazuje především antioxidační, protizánětlivé a protirakovinné účinky [23].



Obrázek 9 - Chemická struktura kurkuminoidů [24]

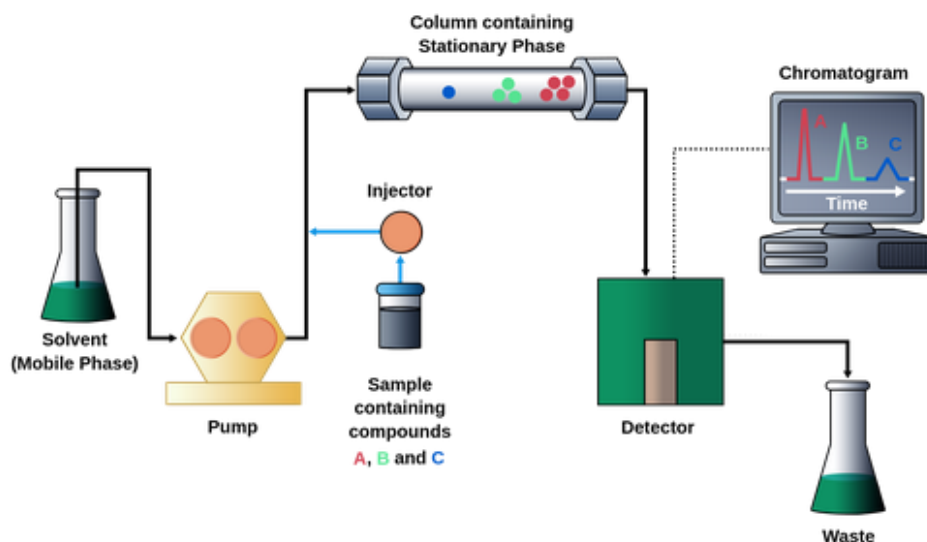
#### 4.4 HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Je v dnešní době jedna z nejpoužívanějších chromatografických metod, sloužící k separaci složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti a zároveň jejich koncentrace.

Během separace se analyty opakovaně rozdělují mezi mobilní kapalnou fázi a stacionární fázi. Základem metody je tedy opakovaná distribuce dělených látek právě mezi těmito dvěma fázemi, kdy na základě jejich afinity k těmto fázím dochází ke vzájemným interakcím.

Existuje několik typů chromatografie na základě těchto interakcí. Naše metoda byla vyvinuta za použití adsorpční kapalinové chromatografie, kde jsou základem mezimolekulové přitažlivé síly mezi stacionární fází a analytem. Stacionární fáze se využívají většinou na bázi silikagelu v různých úpravách, a to zejména nepolárními alkylovými řetězci C-8, C-18 a jinými dalšími modifikacemi na principu reverzní fáze – fenyl, fenyl-hexyl, pentafluorofenyl, bifenyl aj.

Schéma kapalinového chromatografu viz níže obrázek č. 10. Základní schéma kapalinového chromatografu [25],[26],[27].



Obrázek 10 - Základní schéma kapalinového chromatografu [27]

## 4.5 Chromatografické kolony

Kolony jsou tvořené ocelovou trubicí, nejčastěji o délce 5–15 cm a obsahují náplň-sorbent, ve většině případech silikagel, který je často modifikován dle potřebných vlastností stacionární fáze. V dnešní době se používají dle charakteru sorbentu dva typy kolon – náplňové a monolitické [25],[26],[27].

### 4.5.1 Kolona Ascentis® Express 90 Å RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice

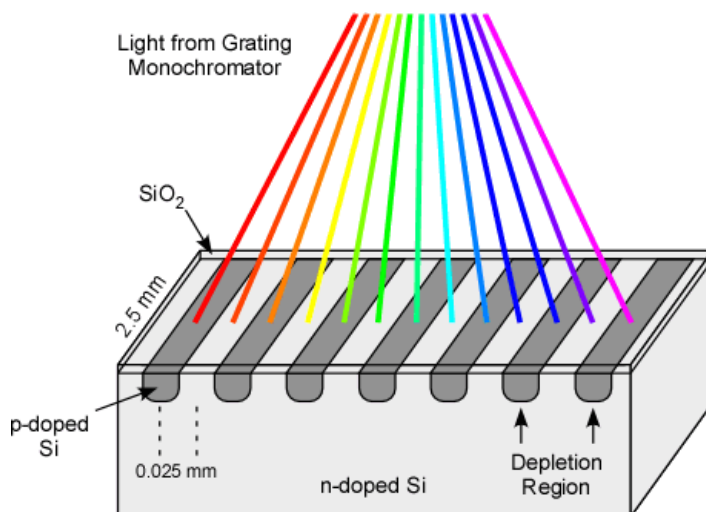
Tato kolona, která byla využita v diplomové práci, je založena na moderní technologii „fused-core“ částic, která spočívá v odlišné přípravě oproti klasickým typům kolon. Částice kolony obsahují pevné silikagelové jádro, kolem kterého je vázán tenký purifikovaný silikagelový porézní plášť. Hlavní výhodou je práce při nižších, až polovičních zpětných tlacích a velmi vysoká účinnost kolony. Díky vysoké účinnosti „fused-core“ technologie umožňuje používat kratší kolony a snižuje spotřebu rozpouštědel.

Tato kolona je selektivní především pro polární sloučeniny, speciálně pro ty, které jsou donory vodíkových vazeb. Je kompatibilní pro LC-MS a kompatibilní s vodným prostředím [28].

## 4.6 DAD – detektor diodového pole

V rámci této diplomové práce byl využit detektor diodového pole (DAD). Tento detektor obsahuje řadu citlivých fotodiód, které umožňují simultánní snímání světla vlnových délek v celém absorpčním spektru.

Ultrafialové nebo viditelné světlo je nejprve odděleno monochromátorem a takto oddělené vlnové délky jsou poté vyrovnány na povrchu lineárního diodového pole pomocí kolimačního zrcadla nebo čočky [29].



Obrázek 11 - Schéma diodového pole [29]

#### 4.7 Možnosti hodnocení piperinu a kurkuminu

V této tabulce je popsáno 9 vybraných prací, které stanovují kurkuminoidy a piperin v různých vzorcích pomocí HPLC. Jedná se buď o stanovení spektrofotometrickým detektorem UV/VIS, DAD nebo FLD nebo hmotnostním detektorem TOF či ESI. Tyto látky byly stanovovány buď za účelem hodnocení klinických studií, a to především kvantitativně v lidské či zvířecí plazmě, či za účelem kvalitativním i kvantitativním pro určení obsahu a čistoty v rostlinných přípravcích.

Kurkuminoidy a piperin se používají v doplňcích stravy pro své mnohé příznivé účinky na lidský organismus. Jejich obsah je vyjádřený jako obsah extraktu na 1 kapsli či tobolku a bývá v rozmezí kolem 110 – 650 mg extraktu kurkuminů a 5 – 10mg extraktu piperinu v jedné kapsli či tobolce.

Tabulka 1 - Možnosti stanovení piperinu a kurkuminoidů

Stanovované látky	MF	EČ	Detekce	Chromatografická kolona	Zdroj
kurkumin, piperin	ACN, 5% kys. citronová	ACN	UV-2075	Luna® C18 (150 × 4,6 mm)	[30]
piperin	Acetonitril	Acetonitril : voda (90:10)	UV	C18	[31]
kurkuminoidy	-	MeOH	Q-TOF Premier	Waters Synapt® BEH C8 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm částice)	[32]
kurkuminoidy	-	MeOH	Triple TOF 5600; ESI	Welch Ultimate® C18 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm částice)	[32]
kurkumin	ACN, kys. octová pH 3,2	EA a MeOH 95:5	FLD	Luna® C18 (150 × 4 mm, 3 μm částice)	[33]
kurkumin	ACN, kys. octová	-	DAD	C18 (250 × 4 mm, 5 μm částice)	[34]
kurkuminoidy	ACN, 0,1% kys. mravenčí	-	UV/VIS	C 18	[35]
kurkumin a jeho metabolity v plazmě, plicní tkáni	octan amonný pH 4,5, ACN	octan amonný pH 4,5, ACN 50:50 (v/v)	UV/VIS	Atlantis® C 18 (150 × 4,6 mm, 3 μm)	[36]
kurkuminoidy	ACN, MeOH, voda 40:20:40 (v/v/v)	MeOH	UV/VIS	Agilent® C18 (250 x 4,6 mm ID, 5 μm)	[37]
kurkumin, didekanoát kurkumin	ACN, THF– H2O, 0,1% kys. mravenčí	ACN	UV	Phenomenex® C 18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)	[38]

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použité pomůcky, přístroje a materiál

#### 5.1.1 Pomůcky

Analytické váhy (Sartorius Secura 225D-1CEU)

Ultrazvuková lázeň (Bandelin Sonorex RK100)

Centrifuga (MPW-260R) - otáčky 10 tisíc RPM, 25 °C

Pipety (Brand)

PTFE filtry (velikosti pórů 0,22 μm)

Jednorázové injekční stříkačky (3ml Omnifix®)

Braun – Laboratorní sklo a pomůcky

#### 5.1.2 Přístroje

Tabulka 2 - Chromatografický systém

Chromatograf:	UHPLC Nexera X2 system (Shimadzu Corporation, Japan)
Detektor:	DAD detector SPD-M10A VP
Degaser:	DGU-14 A
Autosampler:	SIL-HTA
Pumpy:	LC-10 AD VP
Termostat kolony:	CTO-10 AC VP
Vyhodnocovací systém „LC Lab-Solution“:	Shimadzu Corporation, Japan

Při optimalizaci separace kurkuminů a piperinu byly testovány následující kolony:

Tabulka 3 - Testované kolony

Výrobce	Název – charakteristika kolony, velikost částic
Supelco Analytical	Ascentis® Express 90 Å RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice
Supelco Analytical	Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice
YMC CO., LTD.	YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm částice
YMC CO., LTD.	YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 5 µm částice
YMC CO., LTD.	YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 µm částice
YMC CO., LTD.	YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 µm částice
Phenomenex®	Kinetex® XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice
Phenomenex®	Kinetex® EVO-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice
Phenomenex®	Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6mm, 2,6 µm částice
Phenomenex®	Kinetex Biphenyl 150 x 4,6mm, 2,6 µm částice
Phenomenex®	Luna® Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm částice



### 5.1.3 Materiál

#### 5.1.3.1 Chemikálie

Acetonitril HPLC gradient grade (VWR Chemicals)

Kyselina octová 100% (VWR Chemicals)

Ultračistá voda (systém Milli-Q)

Kyselina fosforečná 85% p.a. (Penta)

Kyselina mravenčí reagent grade 95% (Sigma-Aldrich)

Methanol HPLC gradient grade (VWR Chemicals)

#### 5.1.3.2 Standardy

Kurkumin 99,5% (Sigma – Aldrich)

Demetoxykurkumin 95% (Sigma-Aldrich)

Bisdemetoxykurkumin 95% (Sigma-Aldrich)

Tetrahydrokurkumin 98% (ChemFaces)

Piperine 97% (Sigma-Aldrich)

Methylparaben 99% (Fluka)

Ethylparaben 99% (Fluka)

Ibuprofen 99%(Fluka)

Diclofenacum natricum 99% (Fluka)

#### 5.1.3.3 Použité potravní doplňky

Tabulka 4 – Přehled analyzovaných potravních doplňků

Název přípravku	Výrobce	Forma	Obsah extraktu kurkuminů v mg/cps.	Obsah extraktu piperinu v mg/cps.
Kurkumin – piperin plus	Vieste	kapsle	650	10
Kurkumin-piperin komplex	Natural Medicaments	tablety	300	5
Kurkuma: piperin	Setaria	tobolky	350	5
Cur-Cum	Astina	kapsle	111	5
Kurkumín	Liftea	kapsle	157	-
Kurkumin	Advance	kapsle	400	5
Curcumin turmeric	Jamieson	kapsle	50	-

## **5.2 Příprava mobilní fáze, zásobního extrakčního činidla a roztoků standardů**

### **5.2.1 Příprava mobilní fáze**

Mobilní fáze byla vzhledem k použité gradientové eluci složena z organické a vodné fáze. Jako organická fáze byl používán čistý acetonitril, který byl čerpán přímo ze zásobní lahve. Vodná složka se připravovala naplněním zásobní lahve 900 ml ultračisté vody a okyselením 0,9 ml 85% kyseliny fosforečné. Byla tak připravena 0,085%  $H_3PO_4$  okyselená vodná fáze o pH cca 2,0.

### **5.2.2 Příprava zásobního extrakčního činidla pro standardy a vzorky**

Při přípravě zásobního extrakčního činidla pro standardy a vzorky bylo smíseno 196 ml acetonitrilu 100% se 4ml kyseliny octové 100%. Byla tak připravena 2%  $CH_3COOH$  okyselená organická fáze.

### **5.2.3 Příprava zásobního roztoku standardu pro optimalizaci a validaci metody**

Při přípravě jednotlivých standardů bylo naváženo 0,49–0,51 mg standardu, který byl následně rozpuštěn v 1 ml zásobního extrakčního činidla pro standardy a vzorky.

Ze základních 5 standardů (tetrahydrokurkumin, piperin, kurkumin, demetoxykurkumin a bisdemetoxykurkumin) bylo takto připraveno 5 zásobních roztoků standardů o koncentraci 0,50 mg/ml, které byly následně používány po naředění pro optimalizaci separačních podmínek a validaci metody.

### **5.2.4 Příprava pracovního roztoku směsi standardů pro optimalizaci a validaci metody**

Z 5 základních zásobních roztoků standardů pro optimalizaci a validaci metody (viz výše) bylo odebráno 20  $\mu$ l od každého roztoku standardu a přidáno k 400  $\mu$ l okyseleného acetonitrilu. Byla tak připravena směs 5 standardů o objemu 0,5 ml a koncentraci 0,02 mg/ml.

### **5.2.5 Příprava pracovních roztoků standardů pro test způsobilosti chromatografického systému**

Při přípravě jednotlivých standardů bylo naváženo 0,49–0,51 mg standardu, který byl následně rozpuštěn v 1 ml zásobního extrakčního činidla pro standardy a vzorky.

Ze 6 standardů (tetrahydrokurkuminu, piperinu, kurkuminu, demetoxykurkuminu, bisdemetoxykurkuminu a vnitřního standardu methylparabenu) bylo takto připraveno 6 zásobních roztoků standardů o koncentraci 0,50 mg/ml, které byly následně naředěny na koncentrační hladinu 100 mg/l.

V této koncentrační hladině byly standardy dávkovány na kolonu v 6 nástřicích o objemu 5  $\mu$ l.

### **5.2.6 Příprava pracovního roztoku směsi standardů pro kalibraci a opakovatelnost**

Pro kalibraci byl použit pracovní roztok směsi standardů pro optimalizaci a validaci metody (viz výše), který byl následně ředěn na koncentrační hladiny označené jako 1-9 (viz tabulka 5 – Příprava pracovních roztoků pro kalibraci).

Tabulka 5 – Příprava pracovních roztoku pro kalibraci

Hladina	Koncentrace standardů mg/l
1	100
2	75
3	50
4	25
5	15
6	10
7	5
8	2
9	1

Všechny tyto hladiny byly měřeny ve třech nástrčích o objemu 5  $\mu$ l.

Pro opakovatelnost byly použity roztoky standardů na hladinách 1, 2, 25 a 100 mg/l. Tyto 4 hladiny byly měřeny v 6 nástrčích o objemu 5  $\mu$ l.

### 5.2.7 Příprava pracovních roztoků standardů pro limit detekce

Při určení limitu detekce se vycházelo z roztoků pro kalibraci, které byly postupně ředěny na další koncentrační hladiny 1 mg/l, 0,5 mg/l, 0,25 mg/l, 0,125 mg/l, 0,0625 mg/l, 0,03125 mg/l.

### **5.2.8 Příprava roztoků standardů pro stanovení obsahu potravních doplňků**

Při tomto měření bylo využito 4 standardů: piperinu, kurkuminu, demetoxykurkuminu, bisdemetoxykurkuminu. Tetrahydrokurkumin nebyl dále analyzován, jelikož bylo zjištěno, že se v žádném potravním doplňku nevyskytuje. Ze zásobních roztoků standardů pro optimalizaci a validaci metody bylo odebráno 5 µl od každého standardu a napipetováno do společné vialky, ke které bylo přidáno 180 µl zásobního roztoku vnitřního standardu metylparabenu pro stanovení obsahu vzorků. Standardy byly v tomto roztoku rozpuštěny o koncentraci 25 mg/l a vnitřní standard o koncentraci 90 mg/100ml.

### **5.2.9 Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu**

Bylo naváženo 0,5 mg daného vnitřního standardu (metylparabenu, ethylparabenu, diclofenaku a ibuprofenu) a následně rozpuštěno v 1 ml zásobního extrakčního činidla. U těchto látek byl hledán vhodný retenční čas.

### **5.2.10 Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu pro stanovení obsahu vzorků potravních doplňků**

Vnitřní standard byl připraven navážením 20 mg methylparabenu a následným rozpuštěním v 200 ml zásobního extrakčního činidla pro standardy a vzorky. Vnitřní standard byl připraven v roztoku o koncentraci 100 mg/l.

Tento zásobní roztok byl dále použit na rozpouštění standardů a vzorků potravních doplňků při stanovení obsahu vzorků potravních doplňků.

## **5.3 Příprava vzorků**

### **5.3.1 Příprava vzorků potravních doplňků**

Všechny vzorky byly připravovány pomocí stejného postupu, odlišovala se pouze navážka potravního doplňku a extrakční činidlo, ve kterém byl rozpuštěn.

U každého potravního doplňku se vycházelo z přípravy vzorku pomocí obsahu tří jeho kapslí/tabletek.

V případě tabletky u potravního doplňku od výrobce Natural-Medicaments, se tablety rozdrtily v porcelánové třence s těrkou. V případě ostatních potravinových doplňků, které byly ve formě kapslí, se kapsle pouze vysypaly.

Ze 3 takto připravených prášků od každého potravního doplňku, se pomocí intenzivního míchání vytvořila homogenizovaná směs.

Následně bylo naváženo 2–10 mg (viz tabulka – Přehled navážek vzorků potravních doplňků pro validaci) této homogenizované směsi od každého doplňku stravy a rozpustily ho v daném extrakčním činidle, v 15 ml plastové zkumavce.

Dalším krokem, bylo vložení do ultrazvukové lázně s destilovanou vodou pokojové teploty, po dobu deseti minut.

Poté se vzorky přenesly do centrifugy po dobu 15 minut při otáčkách 10 tisíc za minutu a teplotě 25°C.

Jako poslední krok byly vzorky opatrně přefiltrovány přes membránový filtr 0,22 µm přímo do připravených, označených vialek, které byly následně uzavřeny.

Tabulka 6 – Přehled navážek vzorků potravních doplňků pro validaci

Název přípravku	Výrobce	Navážka pro přesnost (mg/5ml)	Navážka pro správnost (mg/10ml)	Navážka pro stanovení obsahu (mg/10ml)
Kurkumin – piperin plus	Vieste	-	-	10
Kurkumin-piperin komplex	Natural Medicaments	-	-	10
Kurkuma: piperin	Setaria	5	-	10
Cur-Cum	Astina	5	2	10
Kurkumín	Liftea	-	-	10
Kurkumin	Advance	-	-	10
Curcumin turmeric	Jamieson	-	-	10

### 5.3.2 Příprava vzorků pro optimalizaci extrakčního činidla

Vzorky pro určení extrakčního činidla byly připravovány identicky jako v obecné přípravě vzorků (viz výše). Navážka 10 mg vzorku byla rozpuštěna ve čtyřech různých testovaných extrakčních činidlech.

Tabulka 7 - Příprava vzorků pro určení extrakčního činidla

Označení vzorku	1. složka	2. složka
1.	9200 µl methanolu	800 µl kyseliny mravenčí
2.	9200 µl methanolu	800 µl kyseliny octové
3.	9200 µl acetonitrilu	800 µl kyseliny mravenčí
4.	9200 µl acetonitrilu	800 µl kyseliny octové

Nástřík ve třech opakováních byl dávkován o objemu 5 µl.

### 5.3.3 Příprava vzorků pro přesnost

Validační parametr přesnosti byl stanoven na vzorku Cur-Cuma a Kurkuma: piperin.

Pro určení přesnosti byly potravní doplňky připravovány identicky jako v obecné přípravě vzorků (viz výše).

7 navážek o hmotnosti 5 mg od každého doplňku stravy bylo rozpuštěno v 4950  $\mu$ l acetonitrilu a 50  $\mu$ l zásobního roztoku standardu tetrahydrokurkuminu (který nebyl v potravních doplňcích přítomen, a proto byl pro hodnocení přesnosti přidán) v 15 ml plastové zkumavce.

Nástřík na kolonu byl dávkován o objemu 5  $\mu$ l. Každá ze sedmi navážek vzorku potravního doplňku byla dávkována ve třech opakováních.

### 5.3.4 Příprava vzorků pro správnost

Vzhledem k malému množství standardů, jejich ceně a vysokým koncentracím kurkuminů v potravních doplňcích, byla správnost, tedy výtěžnost metody určována pouze s využitím kurkuminu. Ostatní látky mají velice podobné struktury, a tudíž se předpokládá, že se během extrakčního procesu budou chovat totožně. Při přípravě spike vzorku bylo naváženo 2 mg potravního doplňku Cur-Cuma, který byl rozpuštěn v 9750  $\mu$ l zásobního extrakčního činidla pro standardy a vzorky a následně bylo přidáno 250  $\mu$ l standardu kurkuminu. Na chromatografickou kolonu byl dávkován objem 5  $\mu$ l.

## 5.4 Parametry měření

Analýza probíhala při teplotě 30 °C, na kolonu bylo dávkováno 5  $\mu$ l roztoku. Mobilní fáze o složení acetonitril 100%/0,085% kys. fosforečná měla průtokovou rychlost 1,0 ml/min. Analyty byly detekovány při vlnových délkách 280 nm, 345 nm a 420 nm. Výsledky byly vyhodnoceny z chromatografických záznamů a ploch příslušných píků.

## 6.VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Optimalizace metody

#### 6.1.1 Volba vlnové délky

Při volbě vlnové délky pro jednotlivé standardy, byla pomocí DAD detektoru snímající celé absorpční spektrum, změřena absorpční spektra standardů. Jednotlivé vlnové délky pro detekci byly vybrány podle absorpčních maxim standardů.

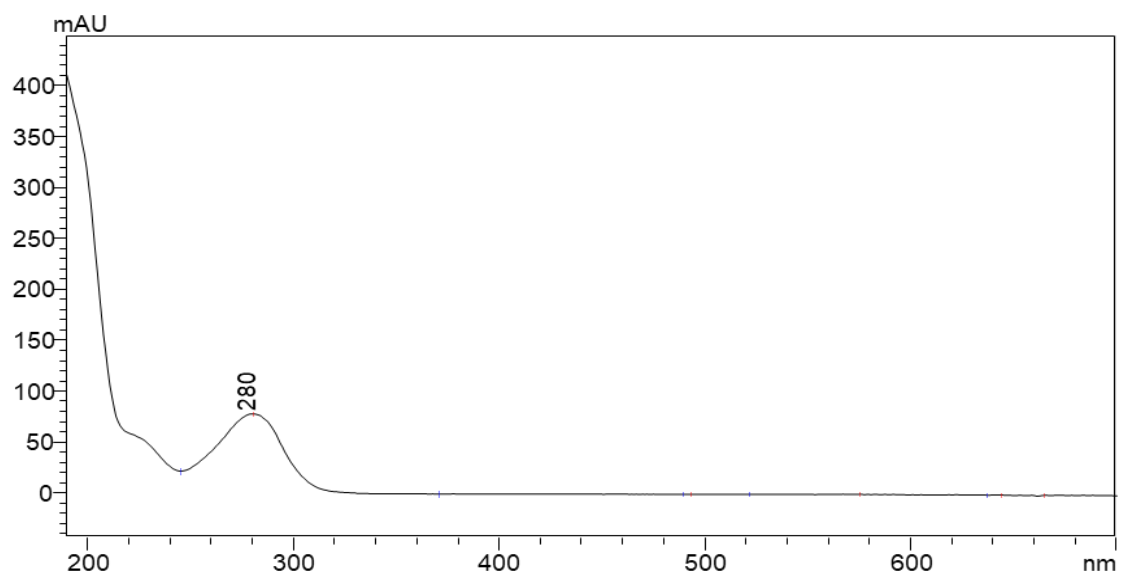
Tabulka č.8 – Zjištěná absorpční maxima standardů

Název standardu	Vlnová délka (nm)
Tetrahydrokurkumin	280
Piperin	341
Kurkumin	424
Demetoxykurkumin	420
Bisdemetoxykurkumin	415
Metylparaben (IS)	256

U optimalizace separačních podmínek byla pro zjednodušení zvolena jedna vlnová délka, a to vlnová délka 280 nm, při které dostatečně absorbovaly všechny stanovované látky.

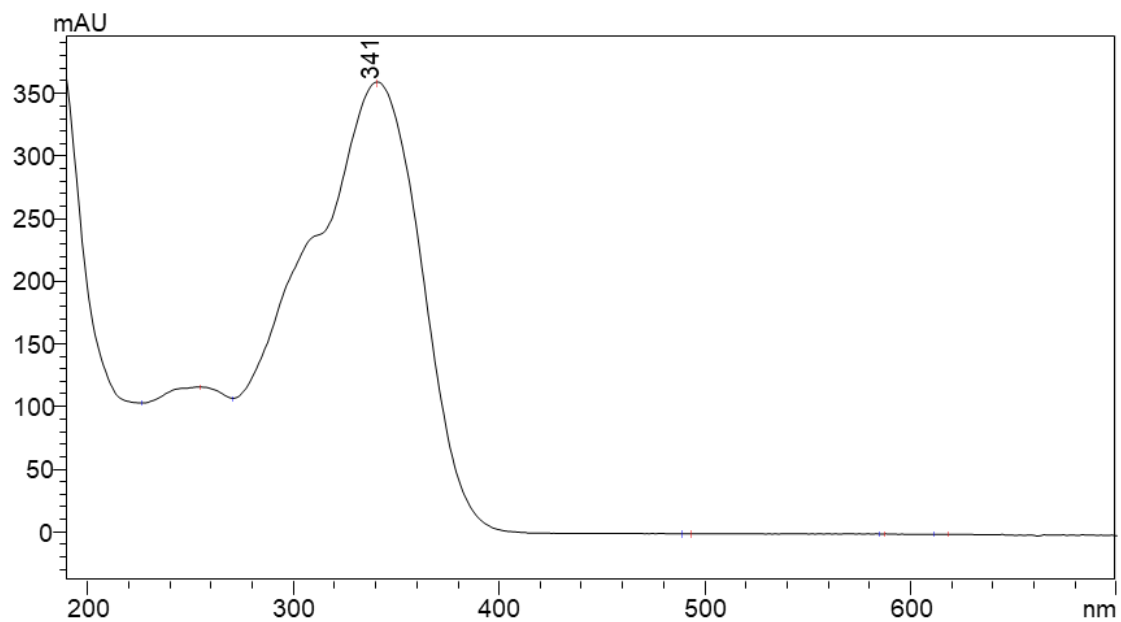
Pro validaci byly vybrány tři vlnové délky. Vlnová délka 280 nm pro tetrahydrokurkumin, vlnová délka 341 nm pro piperin (která umožňuje i detekci kurkuminu, demetoxykurkuminu a bisdemetoxykurkuminu) a vlnová délka 420 nm pro kurkumin, demetoxykurkumin a bisdemetoxykurkumin. Metylparaben vykazuje dostatečnou odezvu při 280 nm, nebylo třeba ho hodnotit zvlášť při jeho maximální absorbanci o vlnové délce 256 nm.

### 6.1.1.1 Absorpční spektrum tetrahydrokurkuminu



Obrázek 19 – Absorpční spektrum tetrahydrokurkuminu

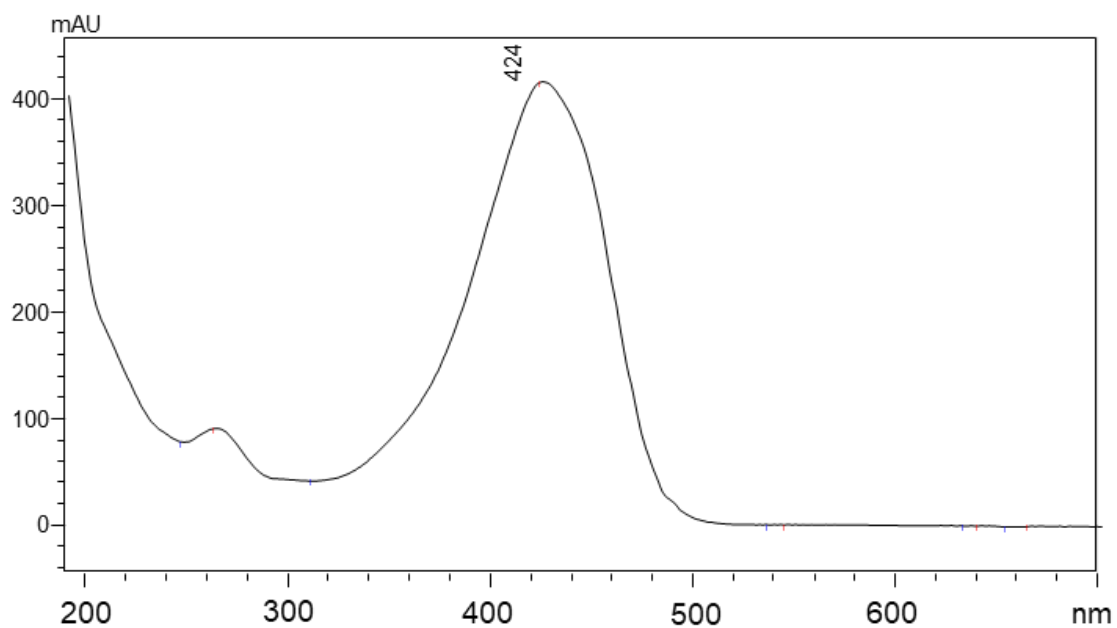
### 6.1.1.2 Absorpční spektrum piperinu



Obrázek 20 – Absorpční spektrum piperinu

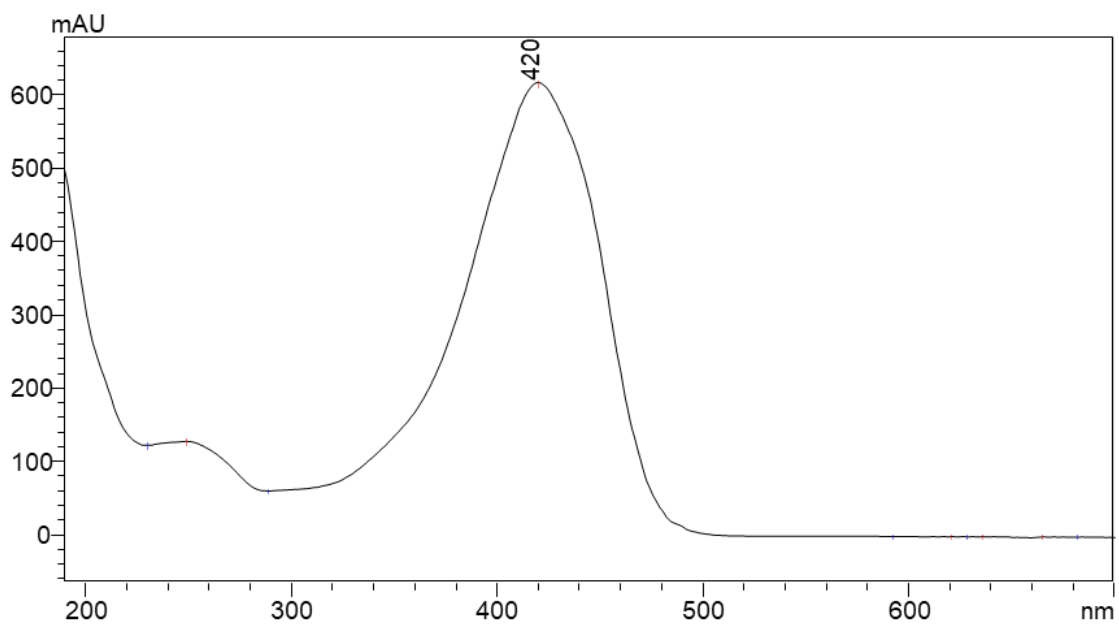


### 6.1.1.3 Absorpční spektrum kurkuminu



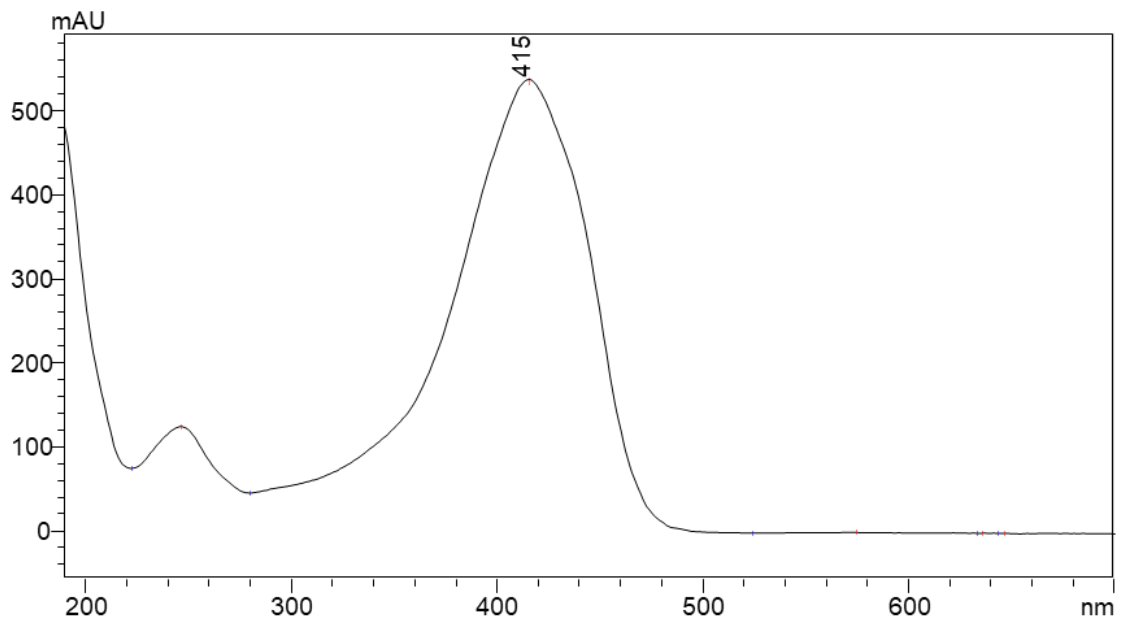
Obrázek 21 – Absorpční spektrum kurkuminu

### 6.1.1.4 Absorpční spektrum demetoxykurkuminu



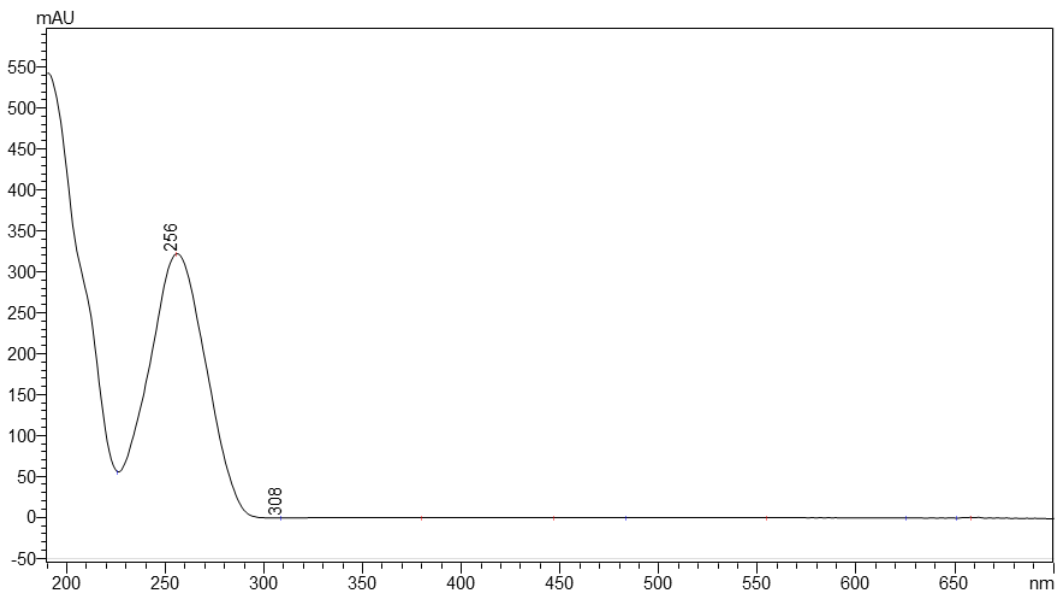
Obrázek 22 – Absorpční spektrum demetoxykurkuminu

### 6.1.1.5 Absorpční spektrum bisdemetoxykurkuminu



Obrázek 23 – Absorpční spektrum bisdemetoxykurkuminu

### 6.1.1.6 Absorpční spektrum methylparabenu



Obrázek 24 – Absorpční spektrum methylparabenu

## 6.1.2 Volba průběhu gradientu

Na počátku optimalizace byla měřena gradientová eluce, a to při čtyřech různých lineárních gradientech: A, B, C, D o délce 12,5 minuty. Gradient A byl navíc měřen i o délce 17,5 minuty. Cílem bylo dosáhnout separace s dostatečným rozlišením na chromatogramu v co nejkratším čase.

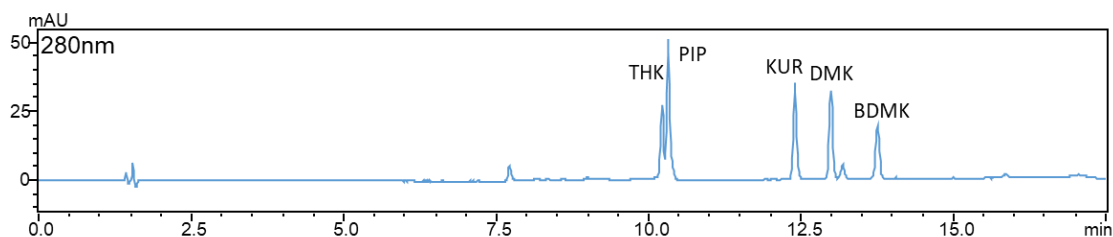
Podmínky: kolona – Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice Supelco Analytical, teplota 30 °C, průtok 1ml/min, MF 100% ACN/0,085% kys. fosforečná

Tabulka 9 – Přehled zkoušených gradientů

Přehled gradientů	Čas analýzy (min)	Průběh gradientu (% organické fáze)
Gradient A „delší“	17,5	20–80
Gradient A „kratší“	12,5	20–80
Gradient B	12,5	25–75
Gradient C	12,5	2–100
Gradient D	12,5	5–100

### 6.1.2.1 Gradient A „delší“

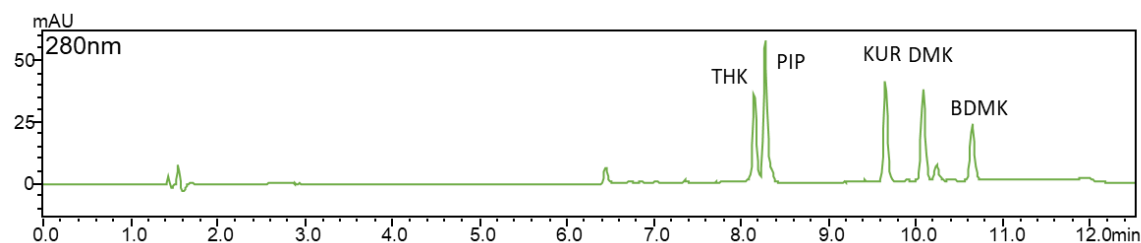
Gradient „A delší“ se zastoupením organické fáze 20 % na začátku analýzy a 80 % na konci analýzy, o délce analýzy 17,5 minuty.



Obrázek 12 – Chromatografický záznam separace jednotlivých kurkuminů a piperinu za podmínek gradientu A „delší“ na koloně Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice

### 6.1.2.2 Gradient A „kratší“

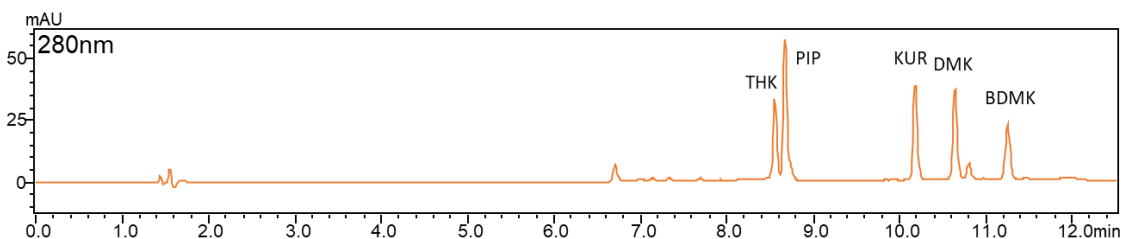
Gradient A „kratší“ se zastoupením organické fáze 20 % na začátku analýzy a 80 % na konci analýzy, o délce analýzy 12,5 minuty.



Obrázek 13 – Chromatografický záznam separace jednotlivých kurkuminů a piperinu za podmínek gradientu A „kratší“ na koloně Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m částice

### 6.1.2.3 Gradient B

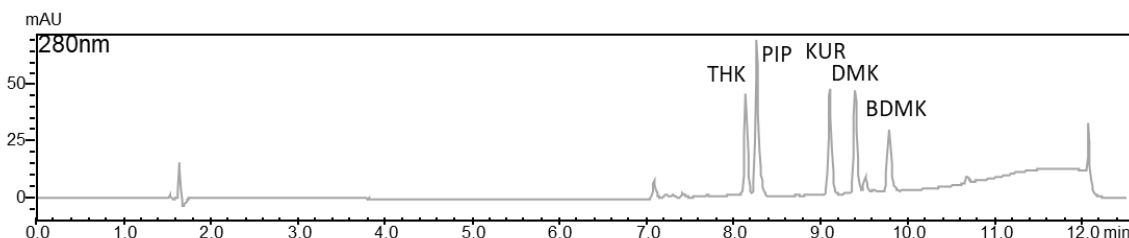
Gradient B se zastoupením organické fáze 25 % na začátku analýzy a 75 % na konci analýzy, o délce analýzy 12,5 minuty.



Obrázek 14 – Chromatografický záznam separace jednotlivých kurkuminů a piperinu za podmínek gradientu B na koloně Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m částice

### 6.1.2.4 Gradient C

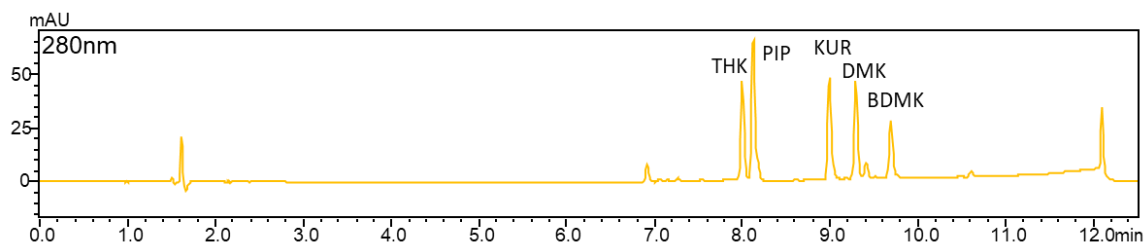
Gradient C se zastoupením organické fáze 2 % na začátku analýzy a 100 % na konci analýzy, o délce analýzy 12,5 minuty.



Obrázek 15 – Chromatografický záznam separace jednotlivých kurkuminů a piperinu za podmínek gradientu C na koloně Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m částice

### 6.1.2.5 Gradient D

Gradient D se zastoupením organické fáze 5 % na začátku analýzy a 100 % na konci analýzy, o délce analýzy 12,5minuty.



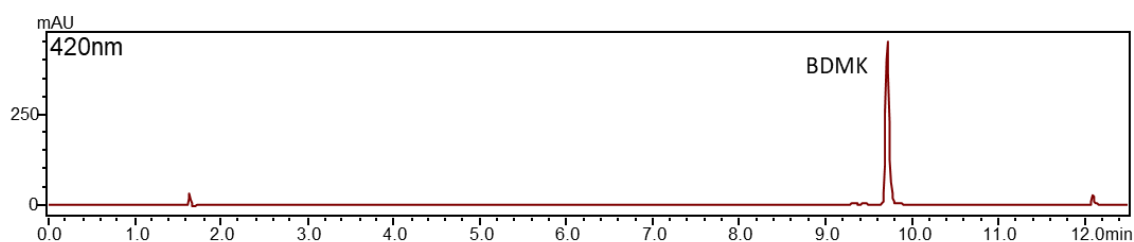
Obrázek 16 – Chromatografický záznam separace jednotlivých kurkuminů a piperinu za podmínek gradientu D na koloně Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 μm částice

Jako nejvhodnější gradient byl vybrán gradient D o délce měření 12,5 minuty. Standardy byly při tomto gradientu eluovány v nejkratším retenčním čase s poměrně dobrým rozlišením, což byl hlavní faktor při výběru gradientu pro testování separace na dalších stacionárních fázích. Tento gradient byl tedy využíván v průběhu optimalizace separace na dalších testovaných kolonách. Detailní rozpis průběhu tohoto lineárního gradientu je uveden dále v Tabulce 13.

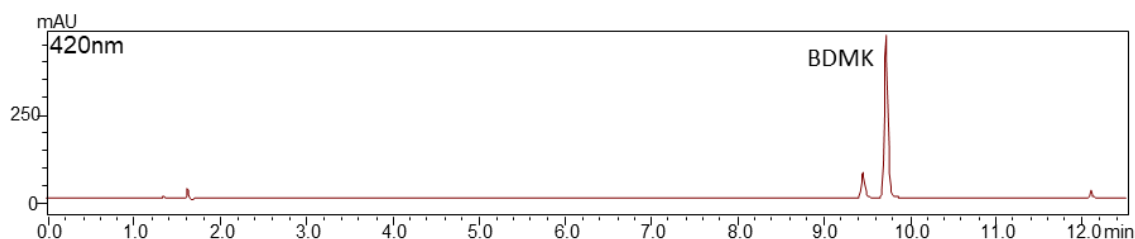
### 6.1.3 Hodnocení stability bisdemetoxykurkuminu

V průběhu vypracování diplomové práce bylo zjištěno, že se bisdemetoxykurumin v zásobním roztoku organického rozpouštědla rozkládá, jak je zřejmé z následujícího chromatogramu. Byla tedy hodnocena stabilita i ostatních standardů v extrakčním činidle 100% acetonitrilu po tříměsíčním uchování ve tmě v lednici (v teplotním rozmezí 2–8 °C).

Bylo naváženo 0,49–0,51 mg standardu, který byl následně rozpuštěn v 1 ml 100% acetonitrilu a uchovávan v uzavřených vialkách. Čtyři z pěti standardů byly při opakovaném měření po třech měsících (v září 2020) stabilní a nevykazovaly žádné rozkladné produkty. U bisdemetoxykurkuminu došlo zřejmě k rozkladnému procesu, jehož následkem se před jeho elucí objevil neznámý pík degradačního produktu.



Obrázek 17 – Chromatografický záznam standardu bisdemetoxykurkuminu, čerstvý roztok



Obrázek 18 – Chromatografický záznam standardu bisdemetoxykurkuminu po 3 měsících skladování

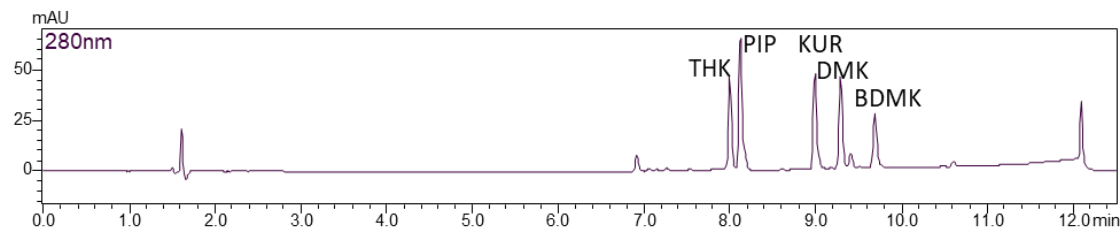
Z odborné literatury bylo zjištěno, že okyselením roztoku standardů kyselinou octovou se zajistí jejich delší stabilita. Nově připravené roztoky standardů byly tedy následně okyseleny kys. octovou. Díky této úpravě, byly všechny látky stabilní po zbytek měření.

#### 6.1.4 Volba kolony

Při optimalizaci separace byly testovány kolony dostupné na pracovišti s různým typem stacionární fáze. Vzhledem k náročnosti separace byly zvoleny kolony s povrchově porézními částicemi o délce 150 mm. Přehled jednotlivých separací na vybraných kolonách uveden níže.

Podmínky analýzy: teplota 30 °C, průtok 1 ml/min, MF 100% ACN/0,085% kys. fosforečná, gradientová eluce podle podmínek gradientu D.

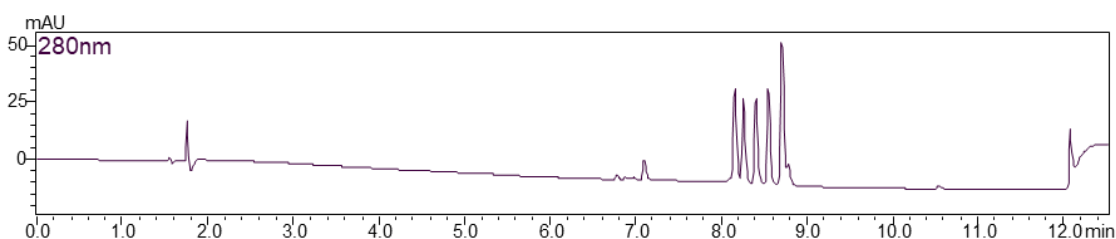
##### 6.1.4.1 Kolona Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice



Obrázek 25 – Chromatografický záznam – Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice

Účinnost kolony byla dostatečná. Kolona byla vyhodnocena jako optimální i z hlediska účinnosti separace kritického páru tetrahydrokurkuminu a piperinu. Proto také byla po všech provedených experimentech vybrána pro validaci metody a stanovení látek v potravních doplňcích.

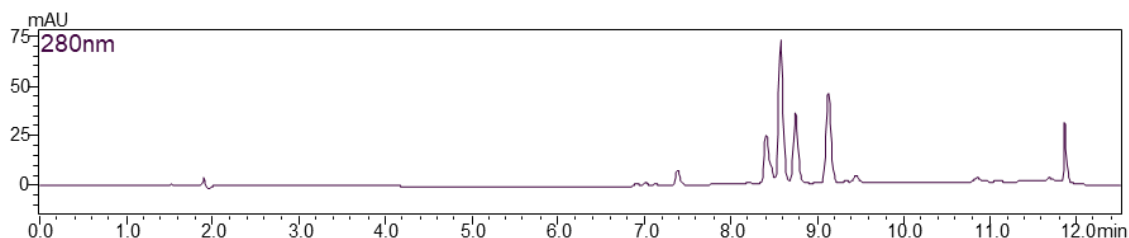
#### 6.1.4.2 Kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice



Obrázek 26 – Chromatografický záznam separace jednotlivých kurkuminů a piperinu – Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice

Účinnost této kolony nebyla dostatečná, standardy nebyly separovány v dostatečném rozlišení. Tato kolona byla vyhodnocena pro naše měření jako nevhodná.

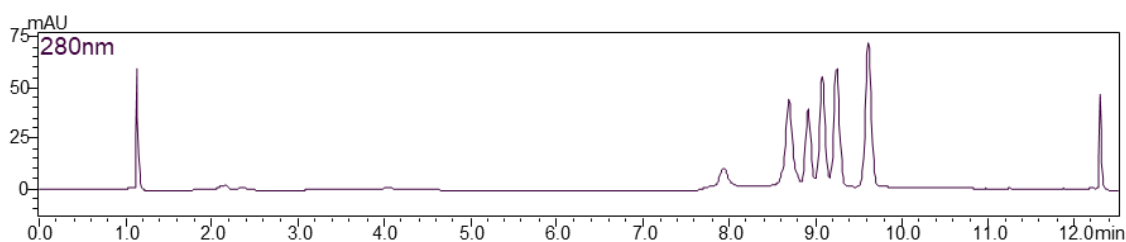
#### 6.1.4.3 Kolona YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm částice



Obrázek 27 – Chromatografický záznam – YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm částice

Účinnost této kolony nebyla dostatečná. Na této koloně nebyly odseparovány všechny standardy. Tato kolona byla vyhodnocena pro naše měření jako nevhodná.

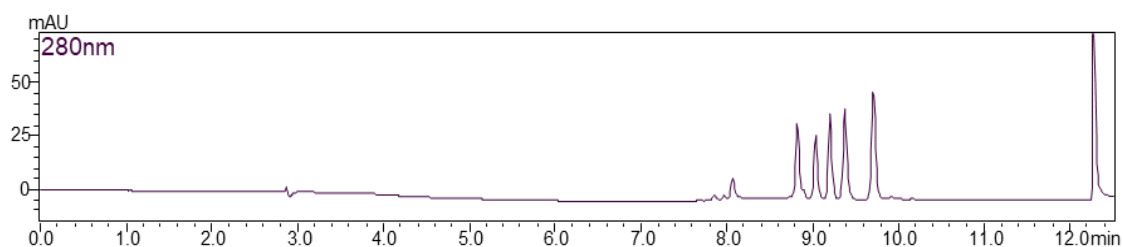
#### 6.1.4.4 Kolona YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 5 µm částice



Obrázek 28 – Chromatografický záznam – YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 5 µm částice

Účinnost této kolony nebyla dostatečná, standardy nebyly separovány v dostatečném rozlišení. Tato kolona byla vyhodnocena pro naše měření jako nevhodná.

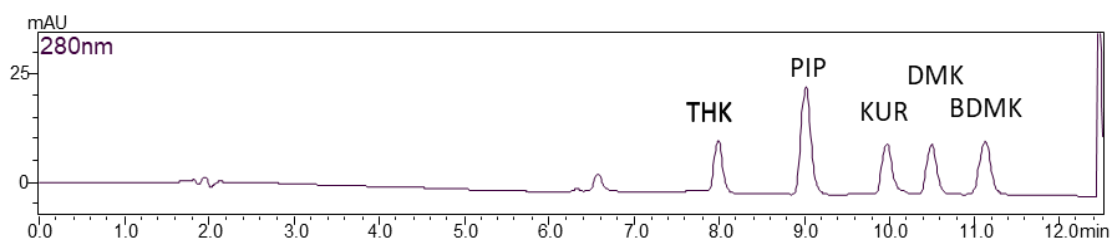
#### 6.1.4.5 Kolona YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 µm částice



Obrázek 29 – Chromatografický záznam – YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 µm částice

Účinnost této kolony nebyla dostatečná, standardy nebyly separovány v dostatečném rozlišení. Kolona byla vyhodnocena pro naše měření jako nevhodná.

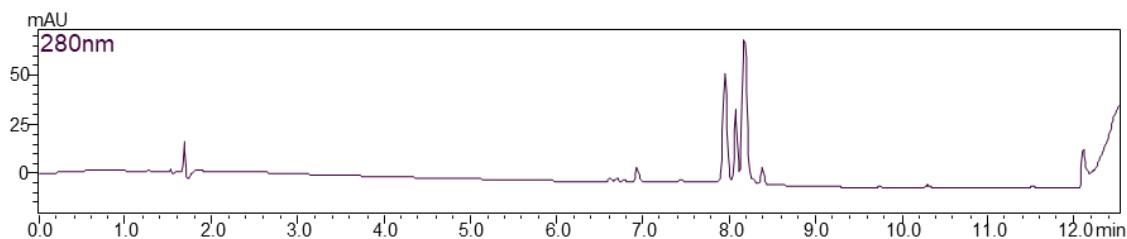
#### 6.1.4.6 Kolona YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 µm částice



Obrázek 30 – Chromatografický záznam – YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 µm částice

Účinnost kolony byla dostatečná, retenční časy látek na této koloně byly však pozdější, než u kolony Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice. Tato kolona byla vyhodnocena jako druhá neoptimálnější kolona. Nicméně díky silným hydrofobním interakcím látek s C-30 alkylovými řetězci dochází ke značné difúzi zón.

#### 6.1.4.7 Kolona Kinetex® XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice

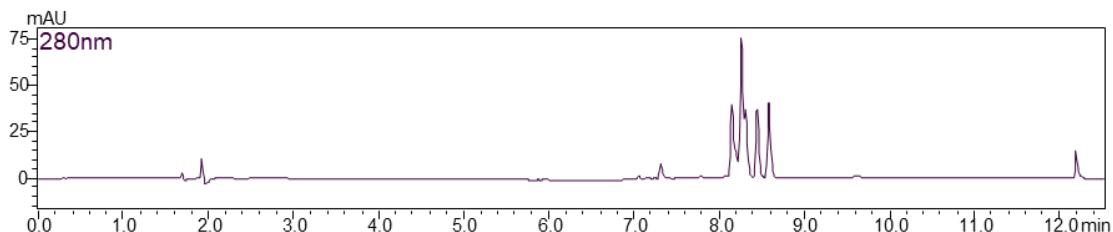


Obrázek 31 – Chromatografický záznam – Kinetex® XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice



Účinnost této kolony nebyla dostatečná. Na této koloně nebyly odseparovány všechny standardy. Docházelo ke vzájemné ko-eluci více látek. Tato kolona byla vyhodnocena pro naše měření jako nevhodná.

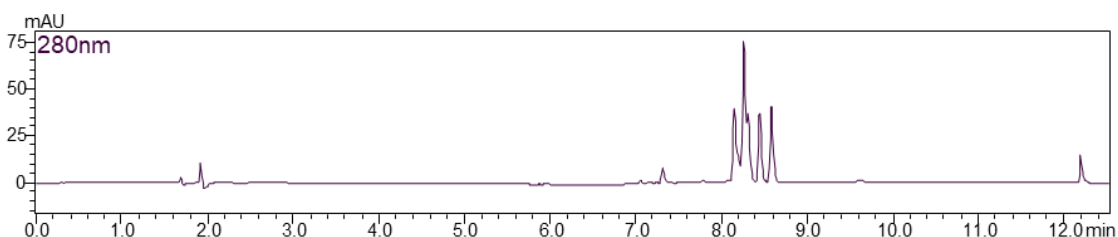
#### 6.1.4.8 Kolona Kinetex® EVO-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice



Obrázek 32 – Chromatografický záznam – Kinetex® 2,6 µm EVO-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice

Účinnost této kolony nebyla dostatečná. Na této koloně nebyly odseparovány všechny standardy. Docházelo ke ko-eluci prvních tří látek a to tetrahydrokurkuminu, piperinu a kurkuminu. Tato kolona byla vyhodnocena pro naše měření jako nevhodná.

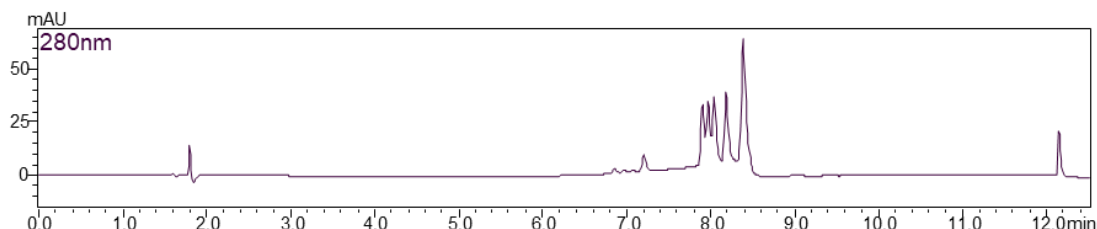
#### 6.1.4.9 Kolona Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6mm, 2,6 µm částice



Obrázek 33 - Chromatografický záznam – Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6mm 2,6 µm částice

Účinnost této kolony nebyla dostatečná. Na této koloně nebyly odseparovány všechny standardy. Docházelo ke ko-eluci prvních tří látek a to tetrahydrokurkuminu, piperinu a kurkuminu. Tato kolona byla vyhodnocena pro naše měření jako nevhodná.

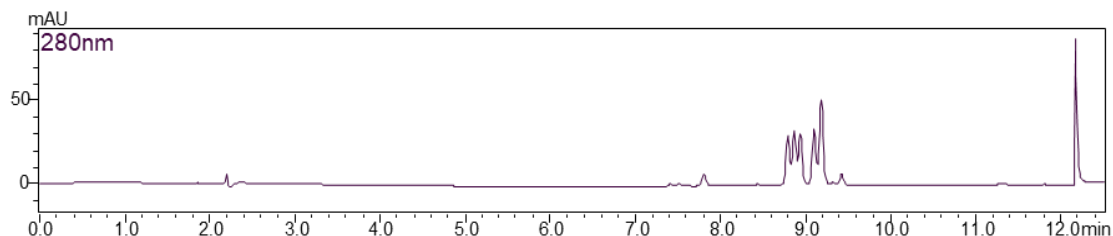
#### 6.1.4.10 Kolona Kinetex Biphenyl 150 x 4,6mm, 2,6 µm částice



Obrázek 34 – Chromatografický záznam – Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice

Účinnost této kolony nebyla dostatečná. Na této koloně nebyly odseparovány všechny standardy. Docházelo ke ko-eluci prvních tří látek a to tetrahydrokurkuminu, piperinu a kurkuminu. Tato kolona byla vyhodnocena pro naše měření jako nevhodná.

#### 6.1.4.11 Kolona Luna® Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm částice



Obrázek 35– Chromatografický záznam – Luna® Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm částice

Účinnost této kolony nebyla dostatečná. Na této koloně nebyly odseparovány všechny standardy. Docházelo ke ko-eluci prvních tří píků a to tetrahydrokurkuminu, piperinu a kurkuminu a posledních dvou píků, a to demetoxykurkuminu a bisdemetoxykurkuminu. Tato kolona byla vyhodnocena pro naše měření jako nevhodná.

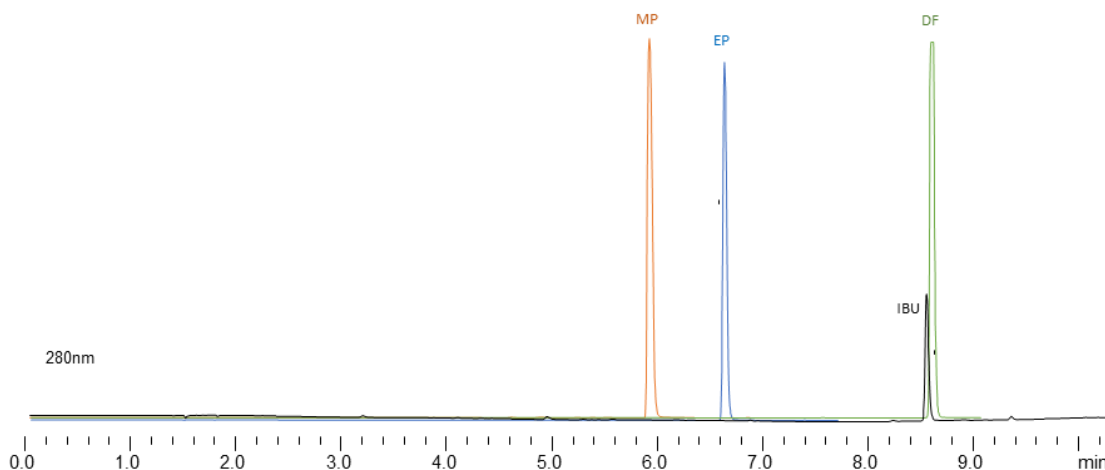
#### 6.1.5 Volba vnitřního standardu

Vnitřní standard je vhodně zvolená chemická látka přidaná do analytického vzorku, díky které je možné s větší správností a přesností kvantifikovat množství účinné látky ve vzorku. Jako vnitřní standard je volena látka, která se eluuje v blízkosti stanovovaných látek, a která zároveň s těmito látkami nijak neinterferuje. Zároveň tato látka nesmí být nativně přítomna ve vzorku.

Vhodný vnitřní standard byl vybrán z těchto testovaných látek:

Tabulka 10 - Volba vnitřního standardu

Možný vnitřní standard	Retenční čas ( $t_r$ ) (min)
Methylparaben	5,9
Ethylparaben	6,7
Diklofenak	8,5
Ibuprofen	8,5



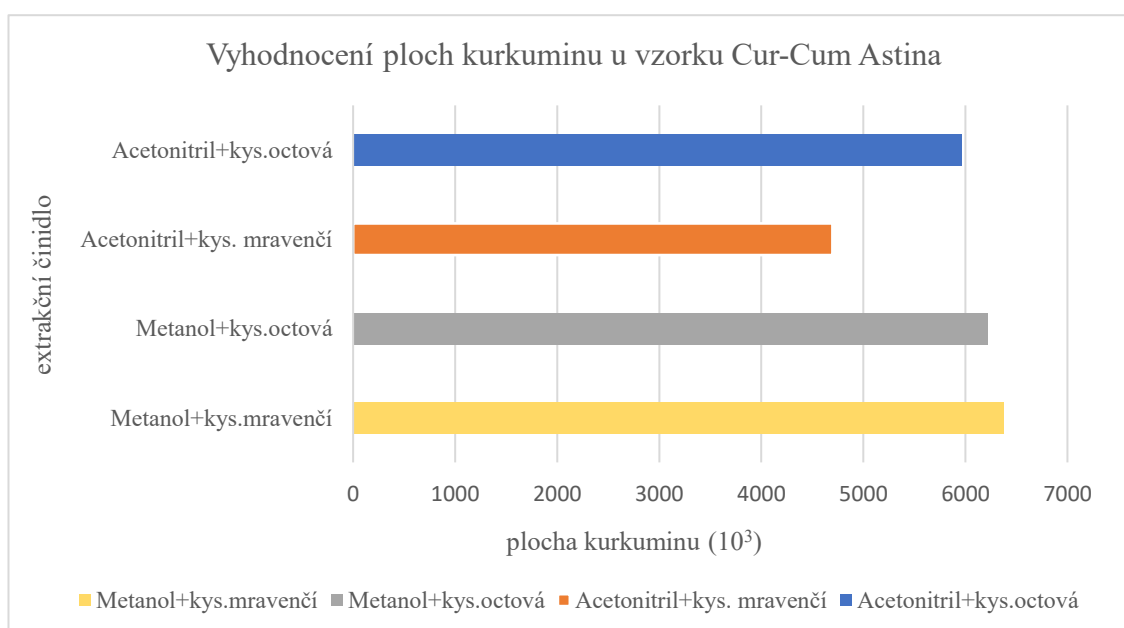
Obrázek 36 – Souhrnný chromatografický záznam retenčních časů vnitřních standardů

Jako nejvhodnější vnitřní standard byl tímto měřením vybrán methylparaben, který se eluuje v ideálním retenčním čase cca 6 minut, čímž se svým retenčním časem nepřekrývá s žádnou ze stanovovaných látek.

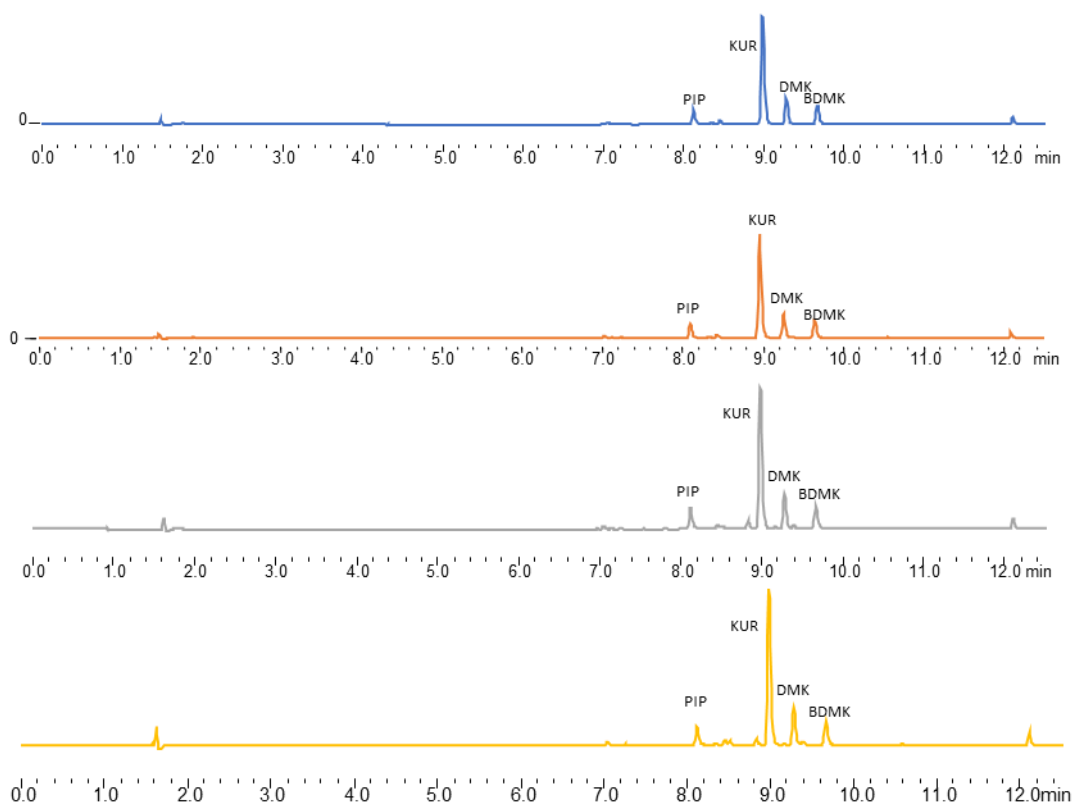
### 6.1.6 Volba extrakčního činidla

Vzorky Cur-Cum Astina a Kurkuma: piperin Setaria se za účelem dosažení co nejvyšší účinnosti extrakce proměřovaly v různých extrakčních činidlech a sledovaly se jejich odezvy na chromatogramu.

#### 6.1.6.1 Vyhodnocení ploch kurkuminu u vzorku Cur-Cuma Astina

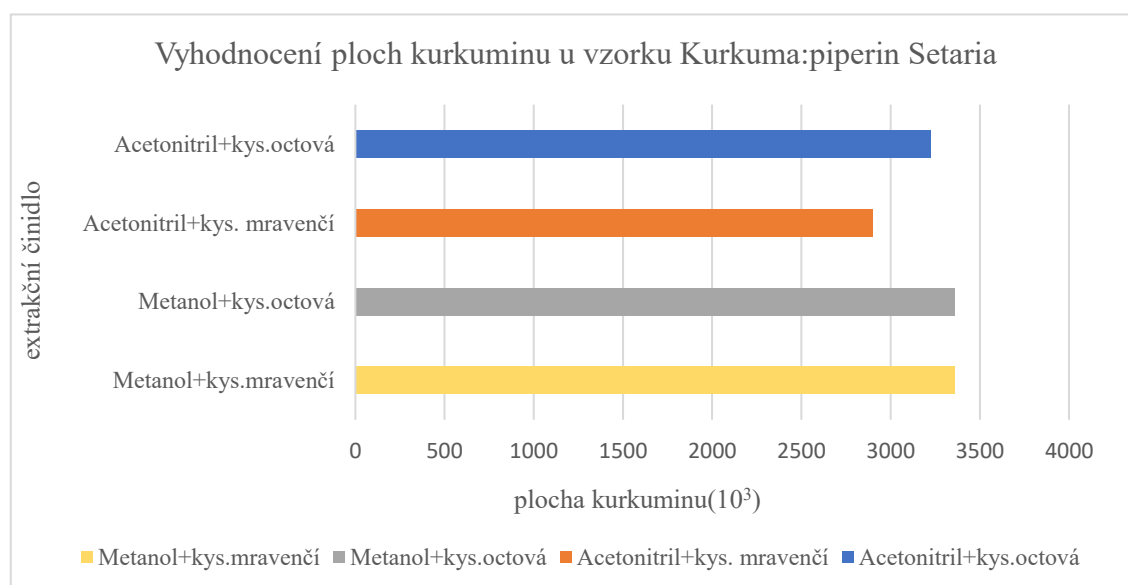


Obrázek 37– Vzorek Cur-Cum Astina – Vyhodnocení ploch kurkuminu

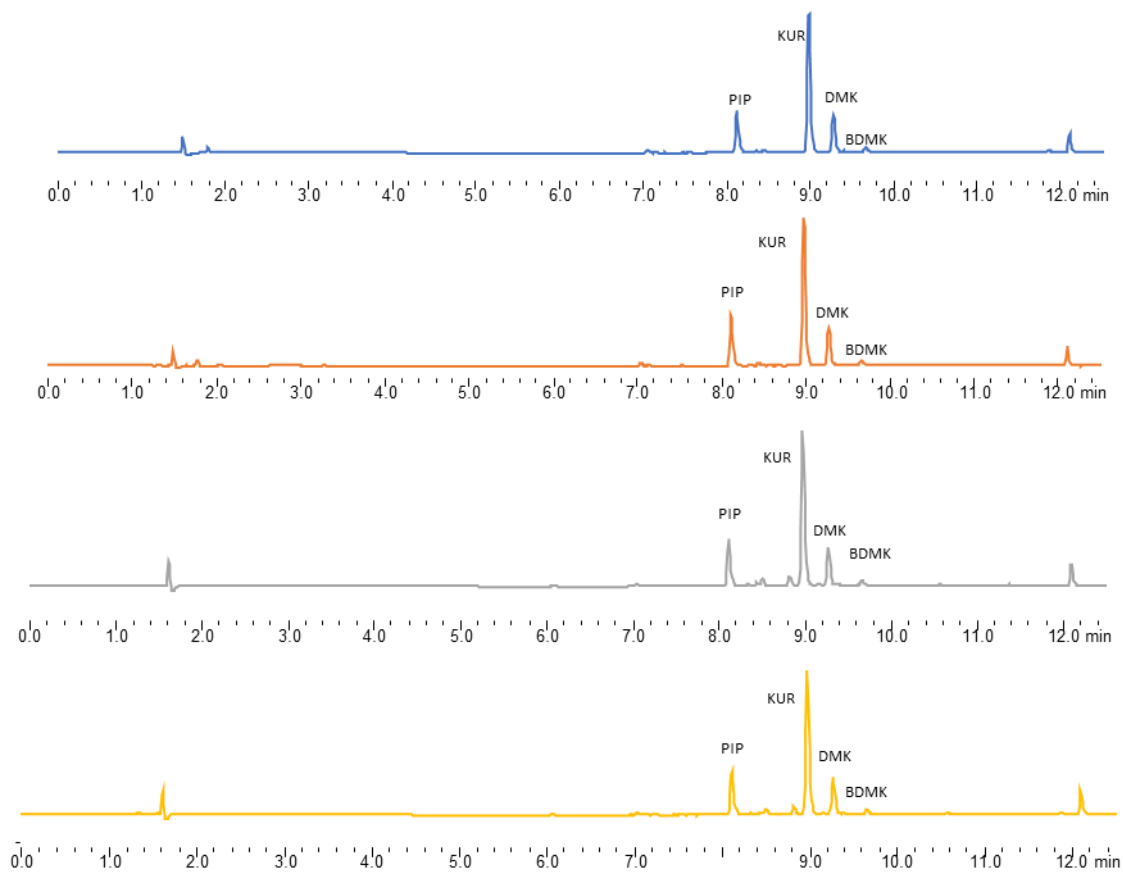


Obrázek 38 – Souhrnný chromatografický záznam vzorku Cur-Cuma Astina ve čtyřech různých extrakčních prostředích při 280 nm

### 6.1.6.2 Vyhodnocení ploch kurkuminu u vzorku Kurkuma: piperin Setaria



Obrázek 39 -Vzorek Kurkuma: piperin Setaria: Vyhodnocení ploch kurkuminu



Obrázek 40 – Souhrnný chromatografický záznam vzorku Cur-Cuma Astina ve čtyřech různých extrakčních prostředích při 280 nm

Největší odezvu poskytoval vzorek v extrakčním činidle MeOH okyseleném kys. mravenčí. Vzhledem ke skutečnosti, že vzorky dosahovaly podobné, pouze v jednotkách procent nižší odezvy také v ACN okyseleném v kys. octové a tomu, že byla v tomto extrakčním činidle ověřena jeho stabilita, bylo rozhodnuto pro setrvání u tohoto extrakčního činidla. Extrakční účinnost pak byla potvrzena v rámci validace metody parametrem správnosti.

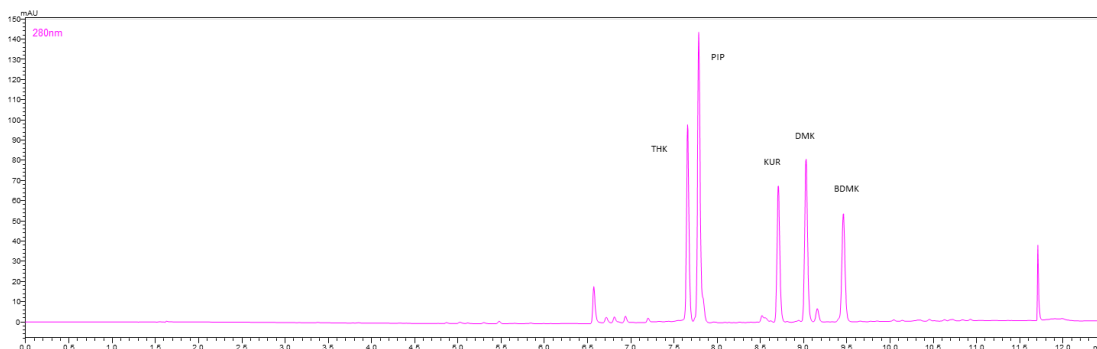
### 6.1.7 Optimální nastavení pro HPLC analýzu

Tabulka 11 – Optimální nastavení pro HPLC analýzu

Stacionární fáze	Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice Supelco Analytical
Předkolona	Ascentis® RP-Amide 5 x 4,6 mm, 2,7µm částice Supelco Analytical
Mobilní fáze	Acetonitril 100 %/0,1% kys. fosforečná
Objem nástřiku	5 µl
Rychlost průtoku	1 ml/min
Teplota v kolonovém prostoru	30 °C
Detekce	248 nm THK, 341 nm PIP, 425 nm kurkumin, DMK, BDMK
Režim analýzy	gradientový
Typ gradientu	5–100 % organická MF
Délka měření	12,5 minuty

Tabulka 12 - Časový průběh vybraného gradientu v minutách

Čas analýzy (min)	Organické fáze (%)	Vodná fáze (%)
0	5	95
10,00	95	5
10,20	5	95
12,50	5	95



Obrázek 43 - Chromatogram za optimálních separačních podmínek

## 6.2 VALIDACE METODY

### 6.2.1 Test způsobilosti chromatografického systému

Pro test způsobilosti chromatografického systému byly použity standardy tetrahydrokurkuminu, piperinu, kurkuminu, demetoxykurkuminu, bisdemetoxykurkuminu a vnitřního standardu methylparabenu.

Tyto standardy byly měřeny v koncentrační hladině 100 mg/l v 6 nástricích o objemu 5  $\mu$ l.

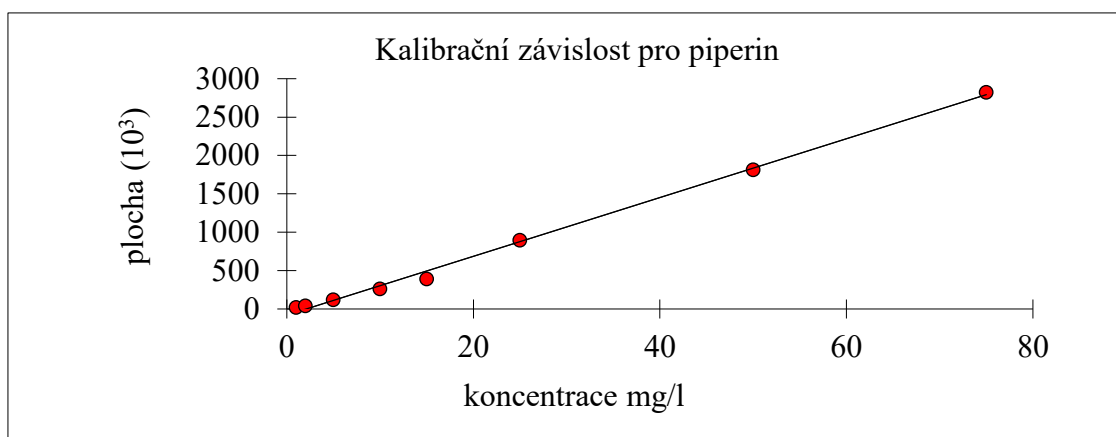
Tabulka 13 – Test způsobilosti chromatografického systému

Standard	$t_r$	$t_r$ RSD (%)	Wh (min)	k	As	Rs
Methylparaben	6,04	0,25	0,031	2,64	1,160	4,532
Tetrahydrokurkumin	7,62	0,14	0,030	3,60	1,088	1,454
Piperin	7,69	0,71	0,031	3,63	1,273	3,388
Kurkumin	8,60	0,12	0,033	4,19	1,117	2,281
Demetoxykurkumin	8,89	0,11	0,034	4,36	1,115	1,605
Bisdemetoxykurkumin	9,27	0,09	0,038	4,59	1,069	3,825

## 6.2.2 Linearita

Ke stanovení linearity bylo použito 8 kalibračních hladin v koncentračním rozmezí od 1 mg/l do 75 mg/l. Na každé koncentrační hladině byly provedeny tři nástříky, z jejichž hodnoty byla určena průměrná hodnota plochy píku. Výsledky byly upraveny zahrnutím plochy vnitřního standardu metylparabenu, který byl měřen v koncentraci 20,32 mg/l. Pro vyhodnocení výsledků byla použita metoda lineární regrese.

### 6.2.2.1 Kalibrační závislost pro piperin



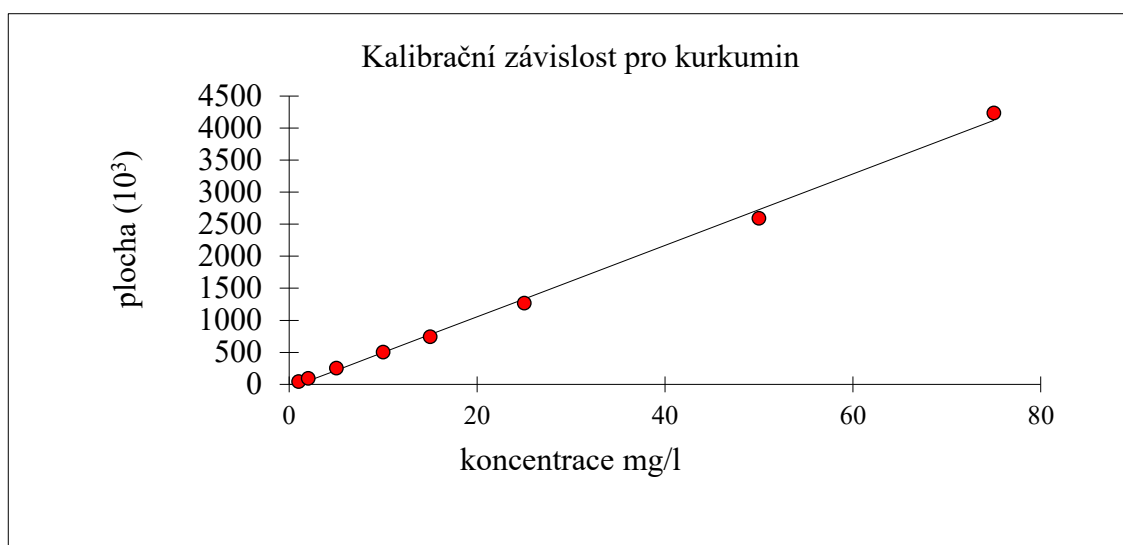
Obrázek 44 – Kalibrační závislost pro piperin

Tabulka 14 – Parametry lineární regrese pro piperin

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	5,02566	± 0,084611
Abs. člen	q =	0,009186	± 0,378011
Korelační koef.	r =	0,999151	
Reziduální odch.	s =	0,912895	



### 6.2.2.2 Kalibrační závislost pro kurkumin

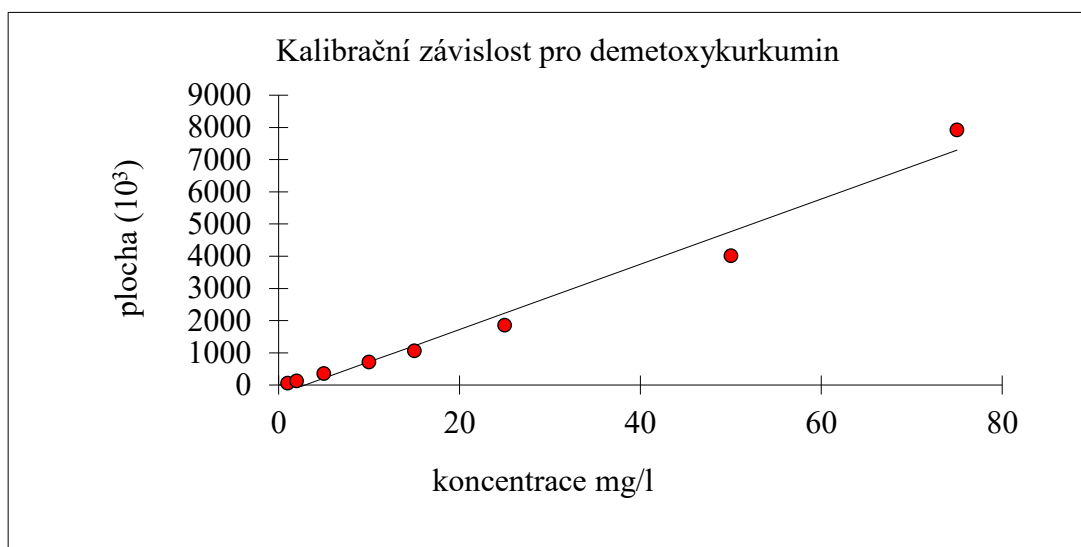


Obrázek 45 – Kalibrační závislost pro kurkumin

Tabulka 15 - Parametry lineární regrese pro kurkumin

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	7,452989	±0,07287
Abs. člen	q =	0,519859	± 0,325557
Korelační koef.	r =	0,999713	
Reziduální odch.	s =	0,786219	

### 6.2.2.3 Kalibrační závislost demetoxykurkumin

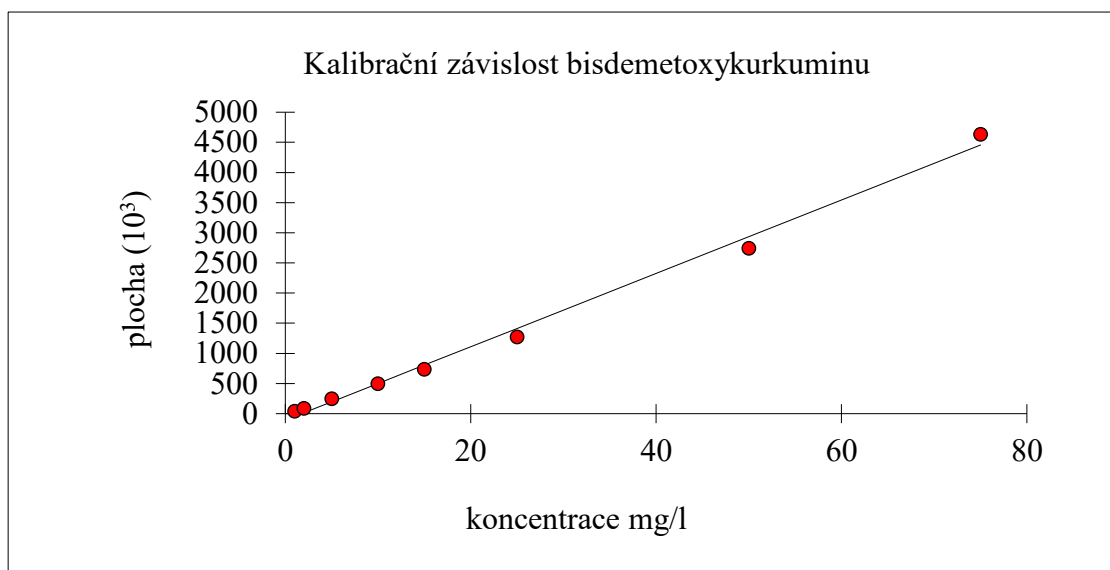


Obrázek 46 – Kalibrační závislost pro demetoxykurkumin

Tabulka 16 – Parametry lineární regrese pro demetoxykurkumin

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	13,97608	±0,255319
Abs. člen	q =	1,948924	± 1,14067
Korelační koef.	r =	0,99900	
Reziduální odch.	s =	2,754716	

### 6.2.2.4 Kalibrační závislost pro bisdemetoxykurkumin



Obrázek 47 - Kalibrační závislost pro bisdemetoxykurkumin

Tabulka 17 – Parametry lineární regrese pro bisdemetoxykurkumin

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	8,201033	±0,029355
Abs. člen	q =	0,219423	±0,131149
Korelační koef.	r =	0,999962	
Reziduální odch.	s =	0,316724	

### 6.2.3 Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti byly použity roztoky standardů tetrahydrokurkuminu, piperinu, kurkuminu, demetoxykurkuminu a bisdemetoxykurkuminu na koncentračních hladinách 1, 2, 25 a 100 mg/l. Tyto 4 hladiny byly měřeny v 6 nástřicích o objemu 5  $\mu$ l.

Tabulka 18 – Opakovatelnost roztoku standardů na měřených koncentračních hladinách

Standardy	RSD (%) dle koncentrační hladiny			
	1 mg/l	2 mg/l	25 mg/l	100 mg/l
THK	0,59	0,98	0,75	0,37
PIP	0,56	0,87	0,54	0,46
KUR	0,47	0,12	0,75	0,50
DMK	0,27	0,11	0,67	0,75
BDMK	0,45	0,16	0,39	0,70

Relativní směrodatná odchylka nepřekročila u žádného ze standardů více jak 1 %.

### 6.2.4 Přesnost

Pro stanovení přesnosti byly použity přípravky Cur-Cuma Astina a Kurkuma-Piperin Setaria. Bylo připraveno 7 navážek o hmotnosti 5 mg od každého doplňku stravy, tyto navážky byly následně rozpuštěny v 4950  $\mu$ l acetonitrilu a 50  $\mu$ l zásobního roztoku standardu tetrahydrokurkuminu (který nebyl v potravních doplncích přítomen, a proto byl pro hodnocení přesnosti přidán). Každá navážka byla proměřena třikrát o objemu nástřiku 5  $\mu$ l.

#### 6.2.4.1 Přesnost vzorku Cur-Cuma Astina

Tabulka 19 – Přesnost vzorku Cur-Cuma Astina

Cur-Cuma Astina	Průměr ploch	SD	RSD (%)
THK	77894	426	0,54
PIP	524516	5088	0,97
KUR	9069096	68794	0,75
DMK	2420028	6506	0,27
BDMK	2497413	20229	0,86

#### 6.2.4.2 Přesnost vzorku Kurkuma-Piperin Setaria

Tabulka 20 – Přesnost vzorku Kurkuma-Piperin Setaria

Kurkuma-Piperin Setaria	Průměr ploch	SD	RSD (%)
THK	71112	580	0,81
PIP	448305	41645	0,82
KUR	3956224	18450	0,43
DMK	1179724	3545	0,30
BDMK	234370	13642	0,86

Relativní směrodatná odchylka nepřekročila u žádného ze vzorků více jak 1 %.

#### 6.2.5 Správnost

Pro určení správnosti metody byl analyzován přípravek Cur-Cuma Astina. Bylo připraveno 6 navážek vzorku s přidavkem standardu kurkuminu, dva pracovní roztoky standardu a dva roztoky matrice vzorku (obsahující pouze vzorek bez přidavku standardu). Každý z roztoků byl dávkován ve 3 opakováních o objemu nástřiku 5  $\mu$ l.

Tabulka 21 – Správnost vzorku Cur-Cuma Astina

	Průměr ploch	Průměr výtěžnosti (%)
V1	1794398	96,63
V2	1912242	105,82
V3	1965521	109,97
V4	1991307	111,98
V5	1967101	110,10
V6	1916229	106,13
Průměr průměrů ploch	1924466	
Průměr průměrů výtěžnosti (%)	106,77	
Směrodatná odchylka SD	70860	
RSD (%)	3,68	

Výtěžnost standardu kurkuminu dosáhla průměrně hodnot výtěžnosti v rozmezí 96–112 %. Relativní směrodatná odchylka byla vypočtena na hodnotu 3,68 %.

Vzhledem k nedostatečnému množství standardu piperinu a dalších standardů a faktu, že ostatní standardy jsou strukturně podobné samotnému kurkuminu, bylo provedeno hodnocení parametru správnosti pouze u tohoto standardu.

#### 6.2.6 Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce byl stanoven změřením 7 pracovních roztoků o klesajících koncentračních hladinách. První koncentrační hladina byla poslední koncentrační hladinou při stanovování linearitě metody a to 1 mg/l. Další koncentrační hladiny byly ředěním připraveny na koncentrace 0,5 mg/l, 0,25 mg/l, 0,125 mg/l, 0,0625 mg/l a 0,03125 mg/l. Šum linie detektoru dosahoval hodnoty 0,05mAU.

Tabulka 22 – Limity detekce a kvantifikace u měřených standardů

	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
THK	0,03	0,10
PIP	0,02	0,05
KUR	0,02	0,05
DMK	0,02	0,05
BDMK	0,06	0,20

Všechny vybrané standardy lze detekovat při velmi nízkých koncentracích, vzhledem k přítomnosti chromoforů v chemické struktuře.

### 6.2.7 Stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích

Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení piperinu, kurkuminu, demetoxykurkuminu a bisdemetoxykurkuminu v 7 vybraných doplňcích stravy (viz tabulka č. 4 – Přehled analyzovaných potravních doplňků). Tetrahydrokurkumin nebyl nalezen v žádném potravním doplňku. Bylo připraveno 6 roztoků vzorků pro každý analyzovaný doplněk stravy dle kapitoly: Příprava vzorků pro stanovení obsahu. Každý z těchto připravených roztoků vzorků jednotlivých potravních doplňků byl dávkován na kolonu o objemu 3  $\mu$ l ve třech opakováních. Výpočet byl korelován plochou vnitřního standardu methylparabenu v roztoku vzorku ku roztoku standardu. Snížení velikosti objemu dávkovaného vzorku bylo provedeno poté, co bylo zjištěno, že kurkumin v některých potravních doplňcích je v příliš vysoké koncentraci přesahující odezvu detektoru. Testované nižší navážky nedávaly reprodukovatelné výsledky a případné ředění by vnášelo další potenciální chybu do stanovení.

Vypočtená koncentrace v mg/l byla přepočítána dle váhy jednotlivých kapslí/(tobolek) na koncentraci mg/cps (tbl). Vzhledem k tomu, že žádný z vybraných doplňků stravy neměl deklarovaný obsah účinných látek, ale pouze obsah extraktu piperinu/kurkuminu, byl výsledek vyhodnocen jako – vypočtený obsah extraktu v %.

#### 6.1.7.1 Váha obsahu kapslí (tobolek) vybraných doplňků stravy

Tabulka 23 – Váha obsahu kapslí (tobolek) vybraných doplňků stravy

Název DS	Firma	Váha obsahu tří cps. (tbl.) (mg)	Průměr váhy obsahu jedné kapsle (mg)
Kurkumin – piperin plus	Vieste	2049	683
Kurkumin-piperin komplex	Natural Medicaments	1897	632
Kurkuma: piperin	Setaria	1112	371
Cur-Cum	Astina	1198	399
Kurkumín	Liftea	1532	511
Kurkumin	Advance	1270	423
Curcumin turmeric	Jamieson	2091	697

Přípravek Setaria je jako jediný z vybraných přípravků prodáváný ve formě tablet.

### 6.1.7.2 Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých účinných látek v analyzovaných doplňcích stravy

Tabulka 24 – Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých účinných látek v analyzovaných doplňcích stravy 1. část

Název DS	Firma	DMK	BDMK
		Vyhodnoceno	Vyhodnoceno
Kurkumin – piperin plus	Vieste	ANO	ANO
Kurkumin-piperin komplex	Natural Medicaments	NE	NE
Kurkuma: piperin	Setaria	ANO	ANO
Cur-Cum	Astina	ANO	ANO
Kurkumín	Liftea	ANO	ANO
Kurkumin	Advance	ANO	ANO
Curcumin turmeric	Jamieson	ANO	ANO



Tabulka 25 – Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých účinných látek v analyzovaných doplňcích stravy 2. část

Název DS	Firma	Piperin		Kurkumin	
		Deklarováno	Vyhodnoceno	Deklarováno	Vyhodnoceno
Kurkumin – piperin plus	Vieste	ANO	ANO	ANO	ANO
Kurkumin-piperin komplex	Natural Medicaments	ANO	ANO	ANO	ANO
Kurkumina: piperin	Setaria	ANO	NE	ANO	NE
CurCum	Astina	ANO	ANO	ANO	ANO
Kurkumin	Liftea	NE	NE	ANO	ANO
Kurkumin	Advance	ANO	ANO	ANO	ANO
Curcumin turmeric	Jamieson	NE	NE	ANO	ANO

Vzhledem k tomu, že obsah tetrahydrokurkuminu nebyl deklarován v žádném z vybraných doplňků stravy a faktu, že v průběhu optimalizace a validace nebyl nalezen v žádném z měřených doplňků stravy, bylo správně předpokládáno, že se nevyskytne ani během tohoto měření.

Také dle očekávání přípravky Liftea kurkumin a Jamieson curcumin turmeric neobsahovaly dle měření účinnou látku piperin, což odpovídá realitě vzhledem neuvedení této účinné látky v deklarovaném obsahu.

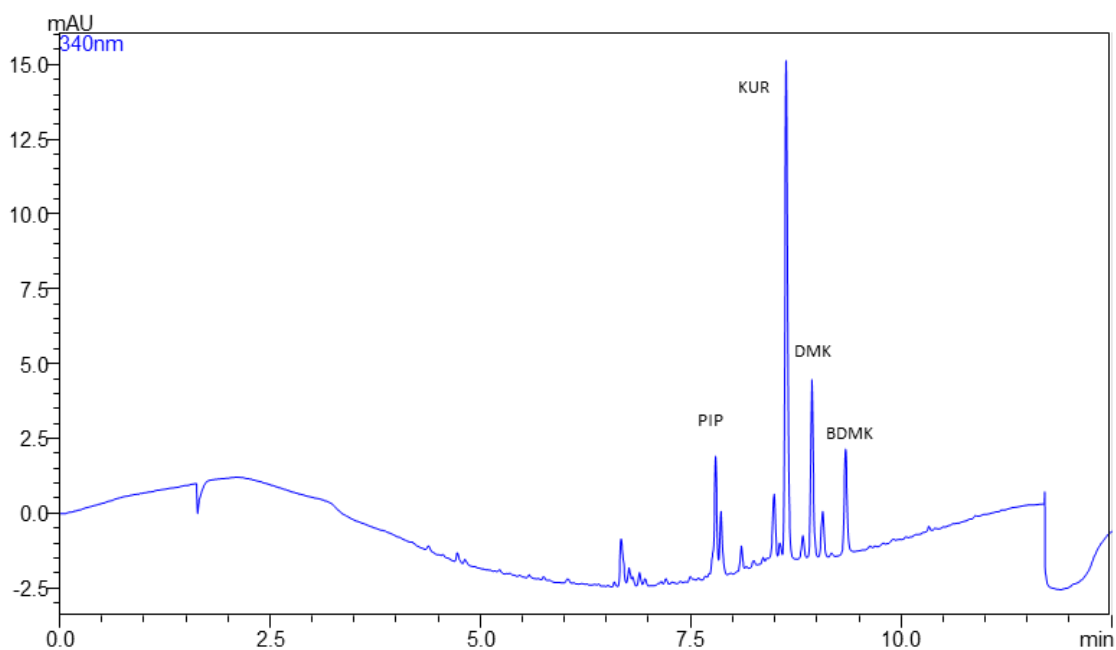
### 6.1.7.3 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Vieste Kurkumin-piperin plus

V přípravku Vieste Kurkumin-piperin plus byl deklarován obsah extraktu piperinu 10 mg/cps. a obsah extraktu kurkuminů 650 mg/cps. Stanovovanou metodou bylo vyhodnoceno, že tento přípravek obsahoval v jedné kapsli 0,24 mg piperinu a 6,77 mg kurkuminů, což odpovídá 2,35 % extraktu a piperinu a 0,97 % kurkuminů.

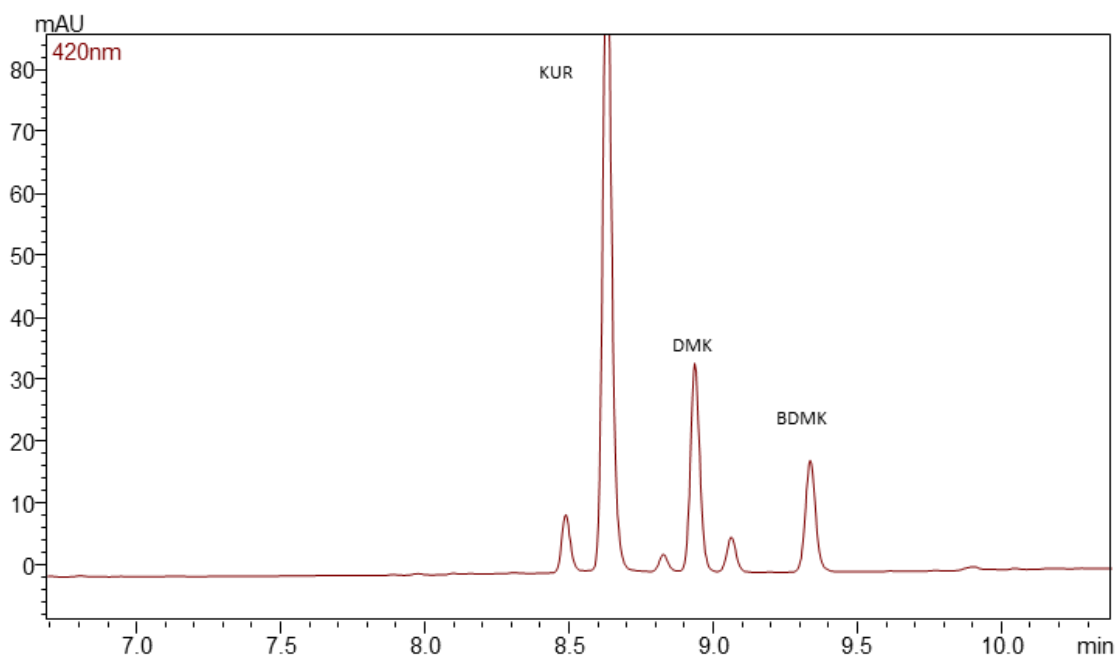
Jedná se o nevyhovující přípravek s nízkým obsahem deklarovaných látek.

Tabulka 26 – Vyhodnocení obsahu přípravku Vieste Kurkumin-piperin plus

Vieste Kurkumin-piperin plus	Uvedený obsah extraktu v mg/cps.	Zjištěný obsah v mg/cps.	Vypočtený obsah extraktu v %
PIP	10	0,24	2,35
KUR	650	3,94	0,97
DMK		1,45	
BDMK		1,38	



Obrázek 48 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Vieste Kurkumin-piperin plus při 340 nm



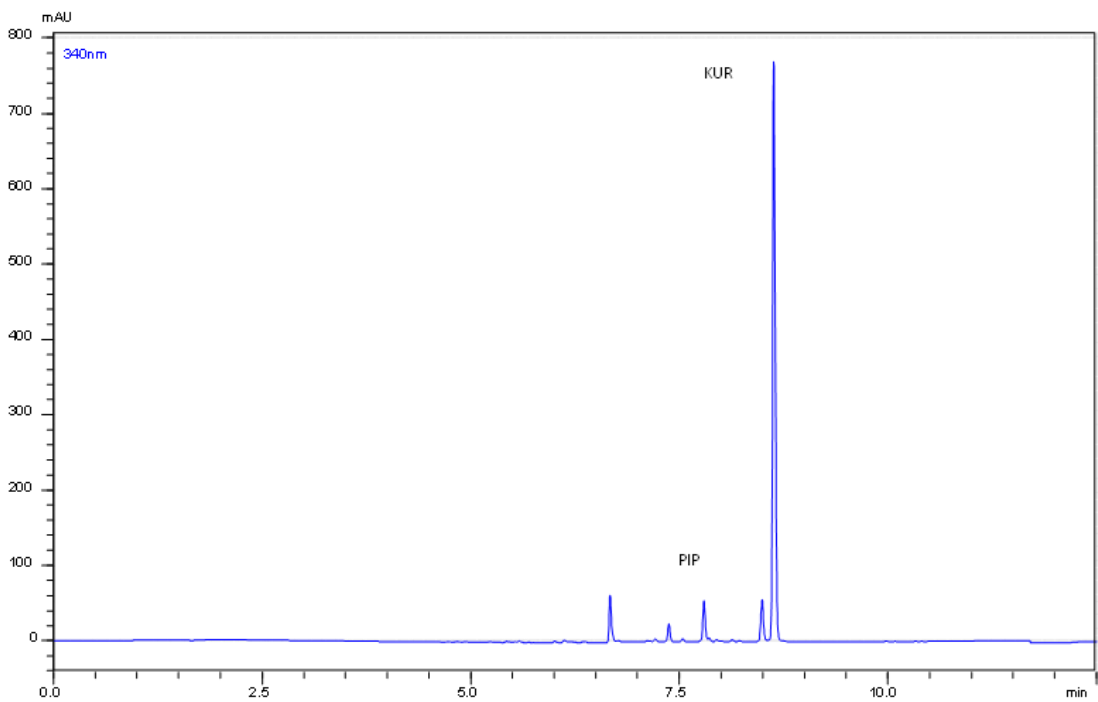
Obrázek 49 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Vieste Kurkumin-piperin plus při 420 nm

#### 6.1.7.4 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex

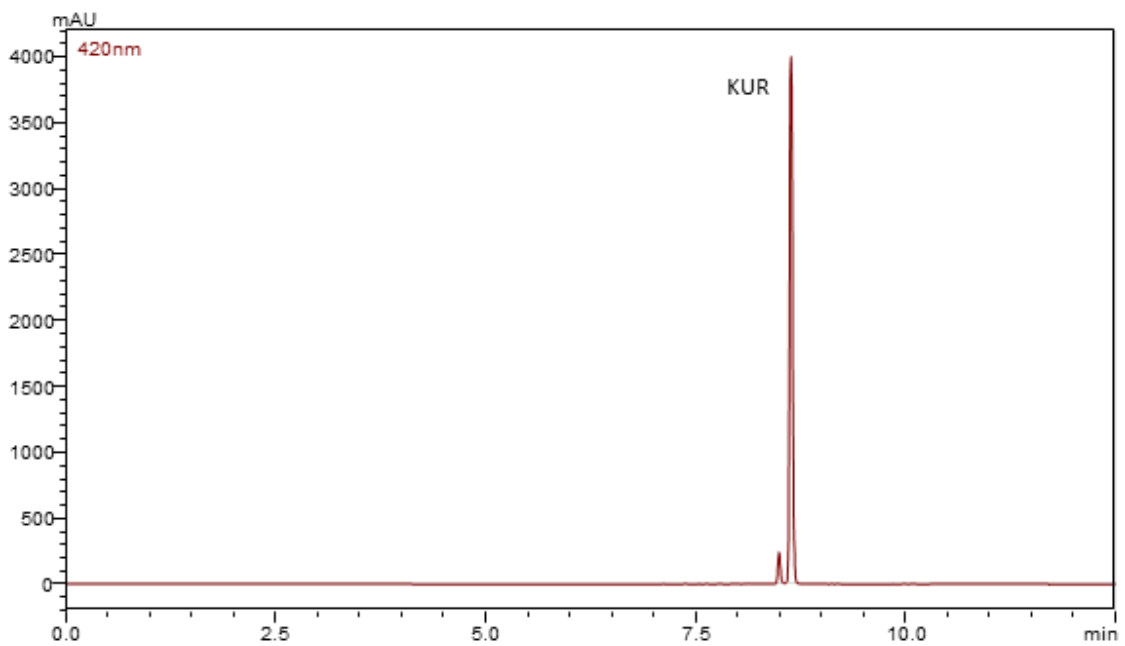
V přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex byl deklarován obsah extraktu piperinu 5 mg/cps. a obsah extraktu kurkuminů 300 mg/cps. Naši stanovenou metodou bylo vyhodnoceno, že tento přípravek obsahoval v jedné kapsli 3,10 mg piperinu a 155,90 mg kurkuminů, což odpovídá 62,08 % extraktu piperinu a 51,97 % kurkuminů.

Tabulka 27 – Vyhodnocení obsahu přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex

Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex	Uvedený obsah extraktu v mg/cps.	Zjištěný obsah v mg/cps.	Vypočtený obsah extraktu v %
PIP	5	3,10	62,08
KUR	300	155,90	51,97
DMK		-	
BDMK		-	



Obrázek 50 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex při 340 nm



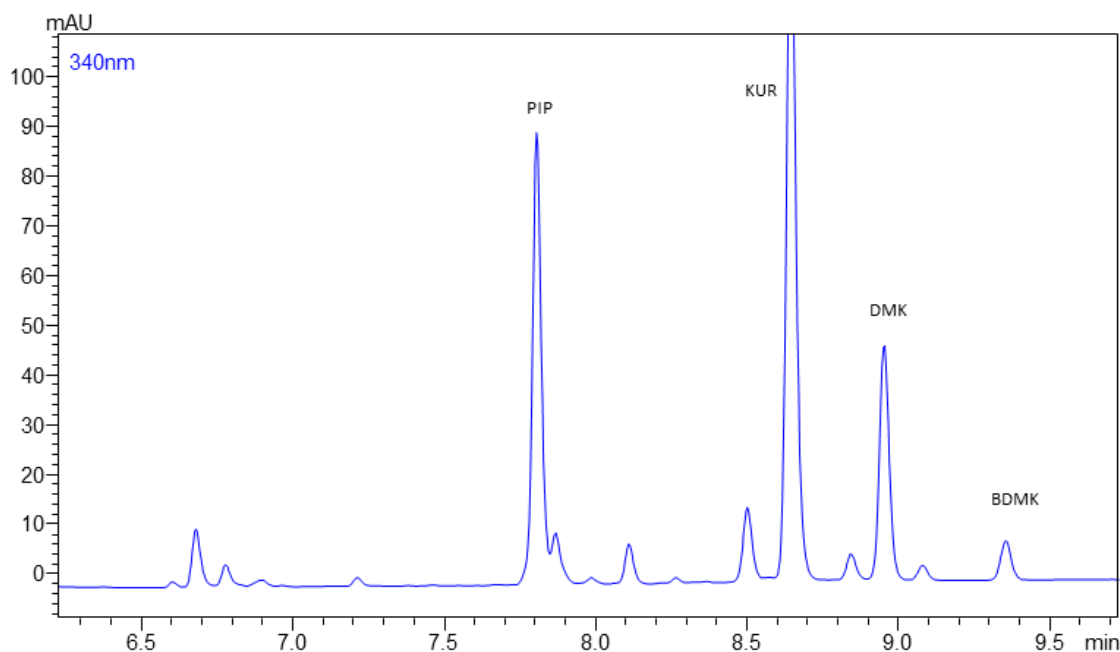
Obrázek 51 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex při 420 nm

### 6.1.7.5 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Setaria Kurkuma: Piperin

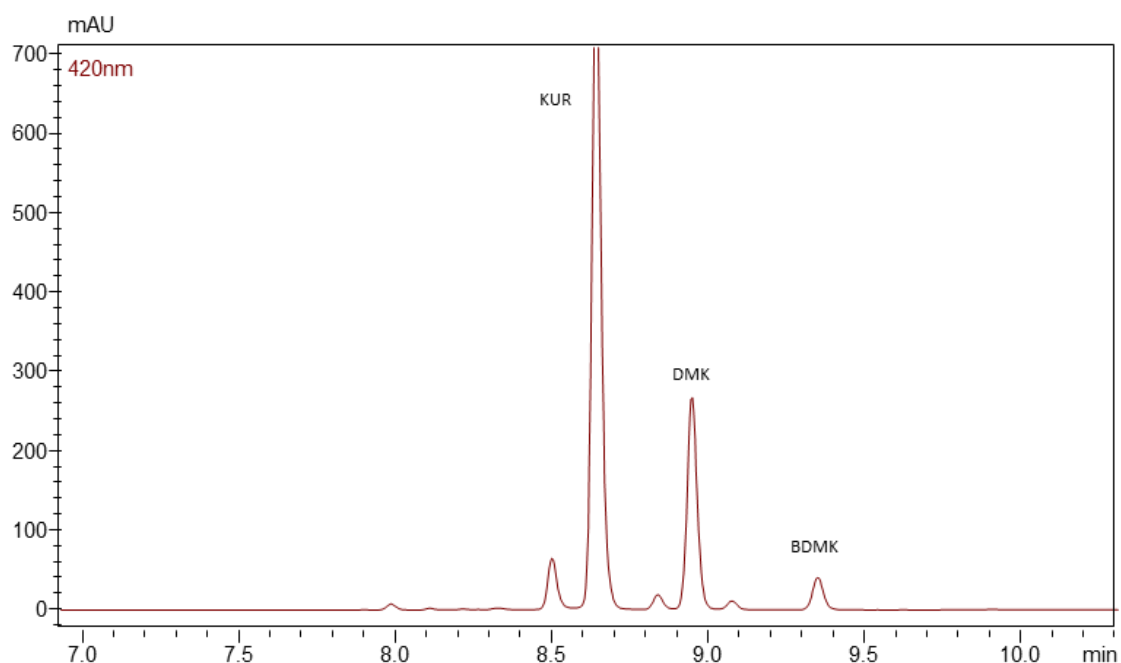
V přípravku Setaria Kurkuma: Piperin byl deklarován obsah extraktu piperinu 5 mg/cps. a obsah extraktu kurkuminů 350 mg/cps. Stanovenou metodou bylo vyhodnoceno, že tento vzorek obsahoval v jedné kapsli 2,90 mg piperinu a 24,17 mg kurkuminů, což odpovídá 58,10 % extraktu a piperinu a 6,91 % kurkuminů.

Tabulka 28 - Vyhodnocení obsahu přípravku Setaria Kurkuma: Piperin

Setaria Kurkuma: Piperin	Uvedený obsah extraktu v mg/cps.	Zjištěný obsah v mg/cps.	Vypočtený obsah extraktu v %
PIP	5	2,90	58,10
KUR	350	17,39	6,91
DMK		5,89	
BDMK		0,89	



Obrázek 52 - Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Setaria Kurkuma: Piperin při 340 nm



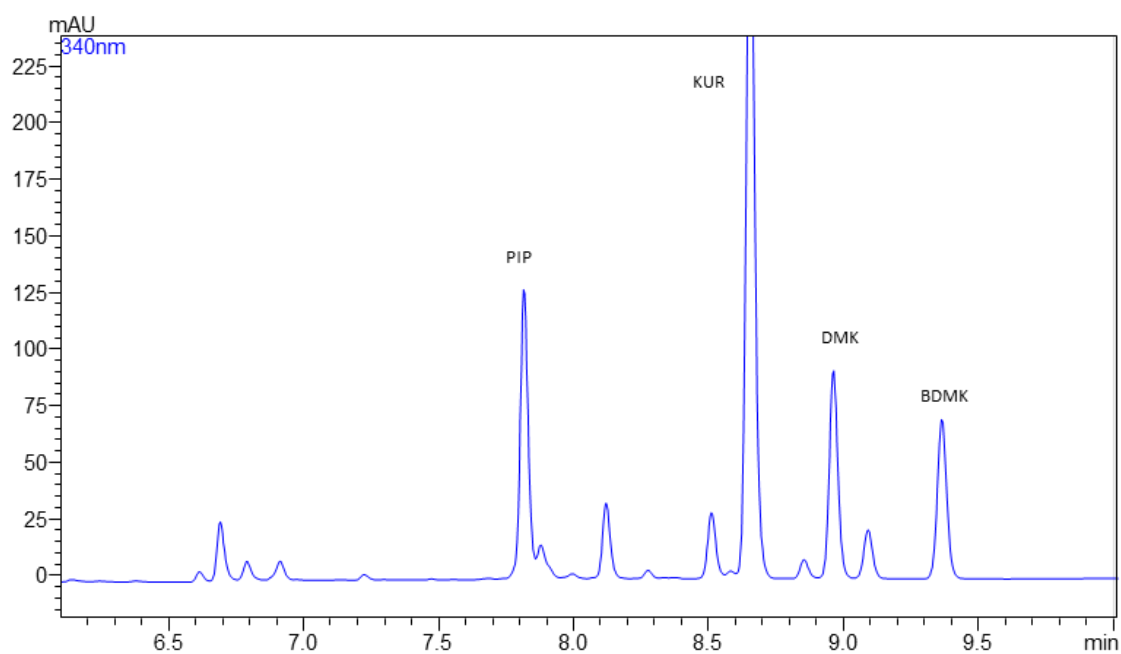
Obrázek 53 - Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Setaria Kurkuma: Piperin při 420 nm

#### 6.1.7.6 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Astina Cur-Cum

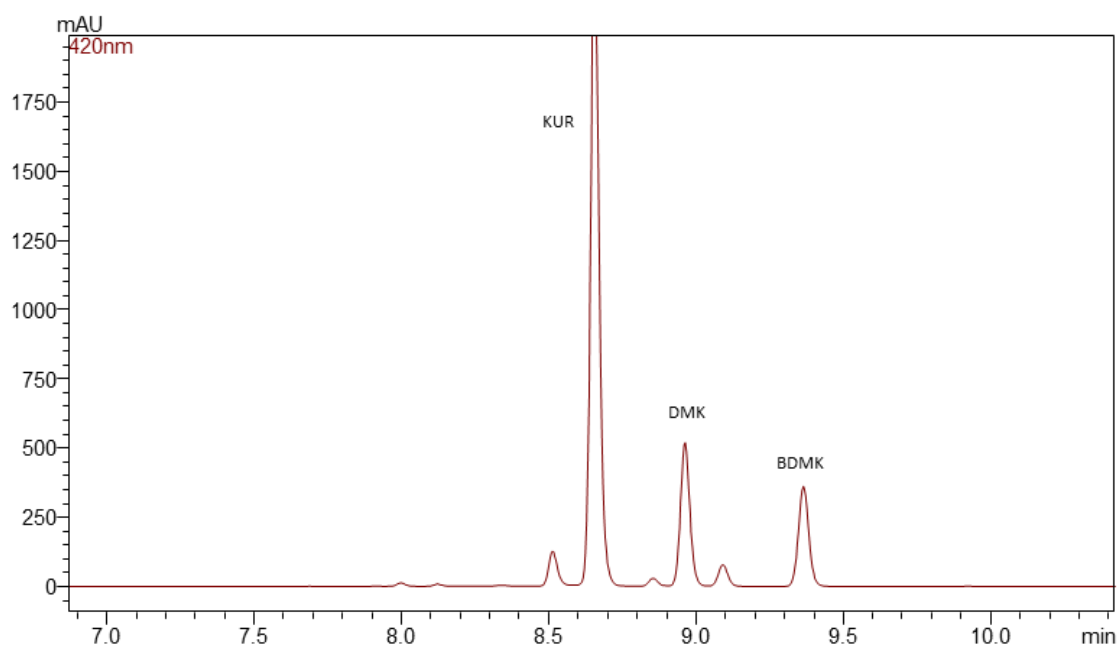
V přípravku Astina Cur-Cum byl deklarován obsah extraktu piperinu 5mg/cps. a obsah extraktu kurkuminů 111 mg/cps. Naši stanovenou metodou bylo vyhodnoceno, že tento vzorek obsahoval v jedné kapsli 3,16 mg piperinu a 69,57 mg kurkuminů, což odpovídá 63,10 % extraktu piperinu a 62,70 % kurkuminů.

Tabulka 29 – Vyhodnocení obsahu přípravku Astina Cur-Cum

Astina Cur-Cum	Uvedený obsah extraktu v mg/cps.	Zjištěný obsah v mg/cps.	Vypočtený obsah extraktu v %
PIP	5	3,16	63,10
KUR	111	48,66	62,70
DMK		11,98	
BDMK		8,93	



Obrázek 54 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Astina Cur-Cum při 340 nm



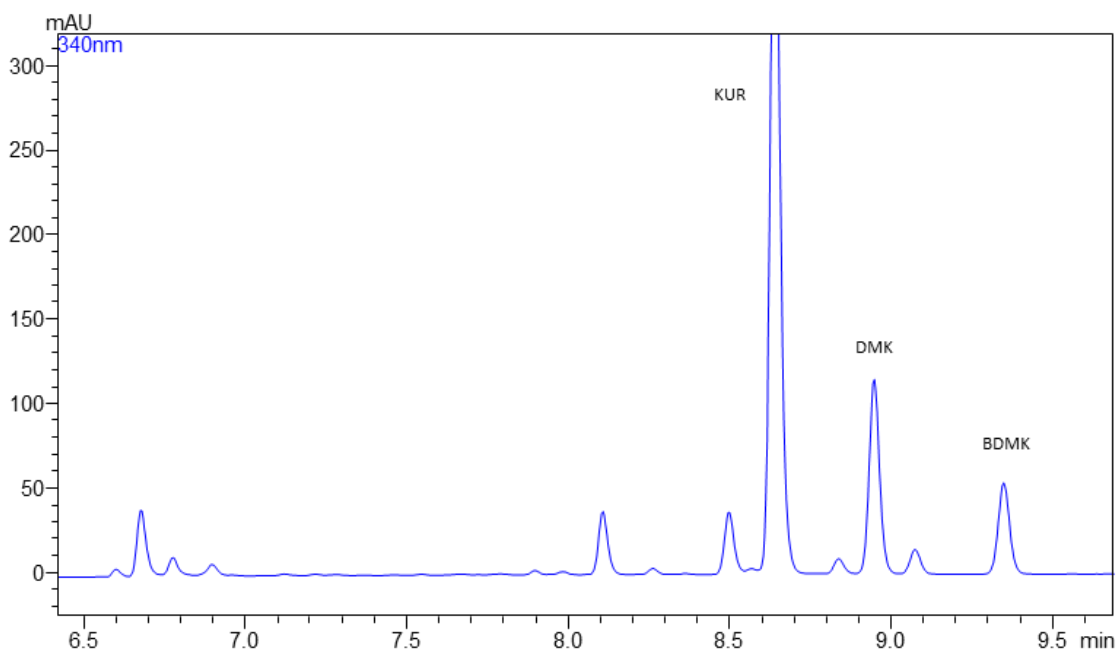
Obrázek 55 - Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Astina Cur-Cum při 420 nm

### 6.1.7.7 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex Liftea Kurkumin

V přípravku Liftea Kurkumin byl deklarován a obsah extraktu kurkuminů 157 mg/cps. Naši stanovenou metodou bylo vyhodnoceno, že tento vzorek obsahoval v jedné kapsli 127 mg kurkuminů, což odpovídá 81,22 % extraktu kurkuminů.

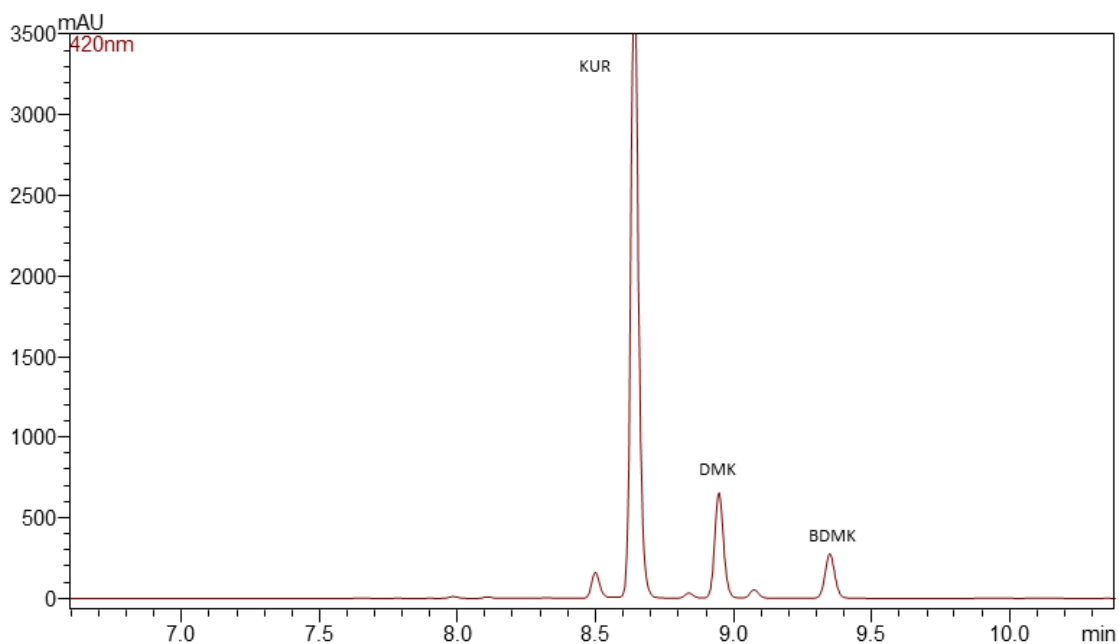
Tabulka 30 – Vyhodnocení obsahu přípravku Liftea Kurkumin

Liftea Kurkumin	Uvedený obsah extraktu v mg/cps.	Zjištěný obsah v mg/cps.	Vypočtený obsah extraktu v %
PIP	-	-	-
KUR	157	99,02	81,22
DMK		19,69	
BDMK		8,81	



Obrázek 56– Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Liftea Kurkumin při 340 nm





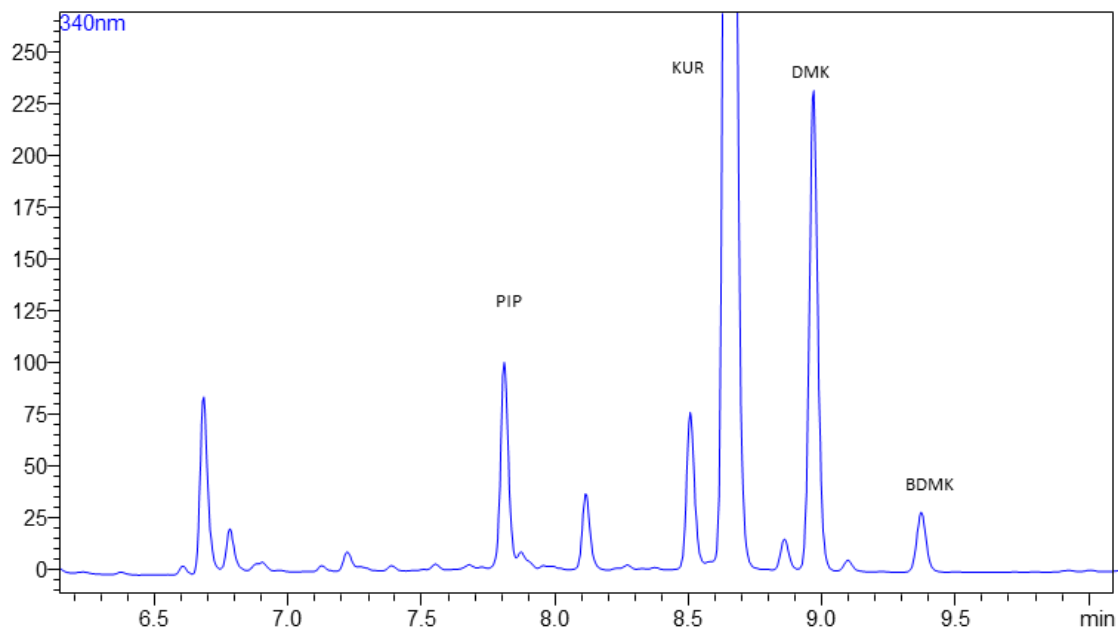
Obrázek 57 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Liftea Kurkumin při 420 nm

#### 6.1.7.8 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Advance Kurkumin

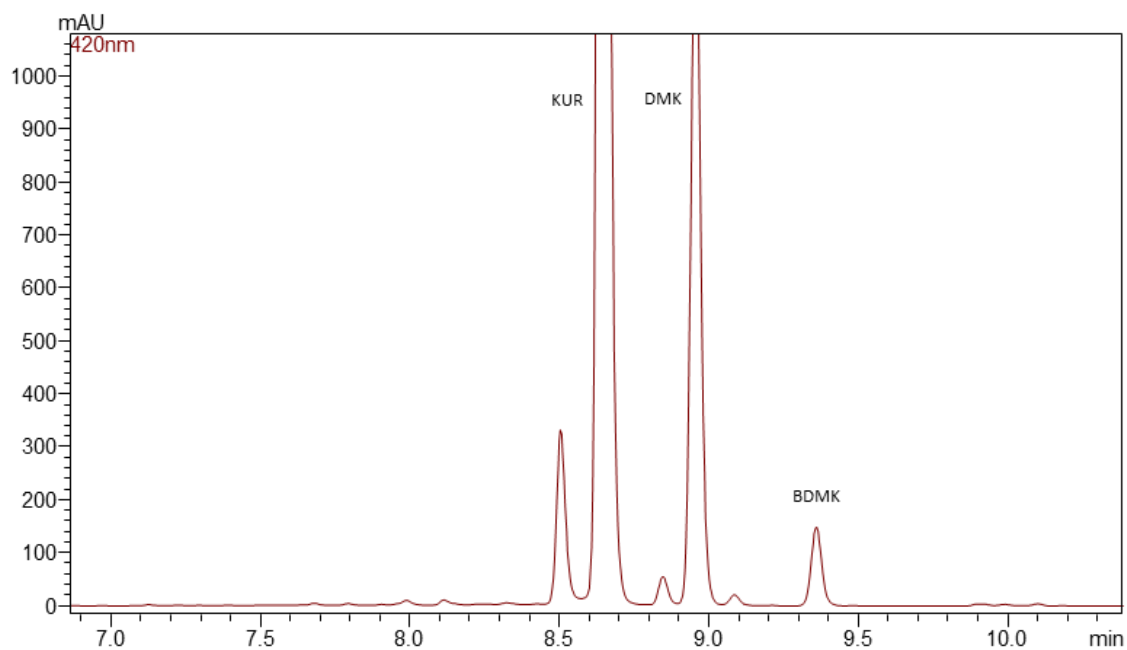
V přípravku Advance Kurkumin byl deklarován obsah extraktu piperinu 5 mg/cps. a obsah extraktu kurkuminů 400 mg/cps. Naši stanovenou metodou bylo vyhodnoceno, že tento vzorek obsahoval v jedné kapsli 3,45 mg piperinu a 155,88 mg kurkuminů, což odpovídá 69,54 % extraktu a piperinu a 38,97 % kurkumu.

Tabulka 31 – Vyhodnocení obsahu přípravku Advance Kurkumin

Advance Kurkumin	Uvedený obsah extraktu v mg/cps.	Zjištěný obsah v mg/cps.	Vypočtený obsah extraktu v %
PIP	5	3,45	69,54
KUR	400	118,97	38,97
DMK		33,11	
BDMK		3,80	



Obrázek 58 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Advance Kurkumin při 340 nm



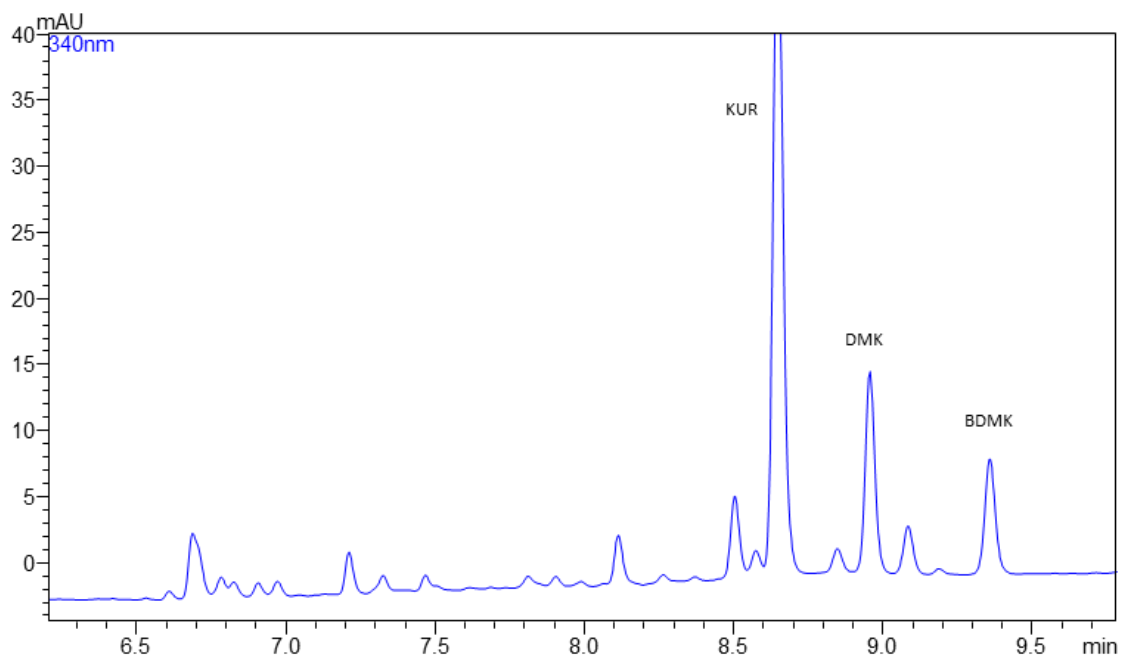
Obrázek 59 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Advance Kurkumin při 420 nm

### 6.1.7.9 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Jamieson Curcumin Turmeric

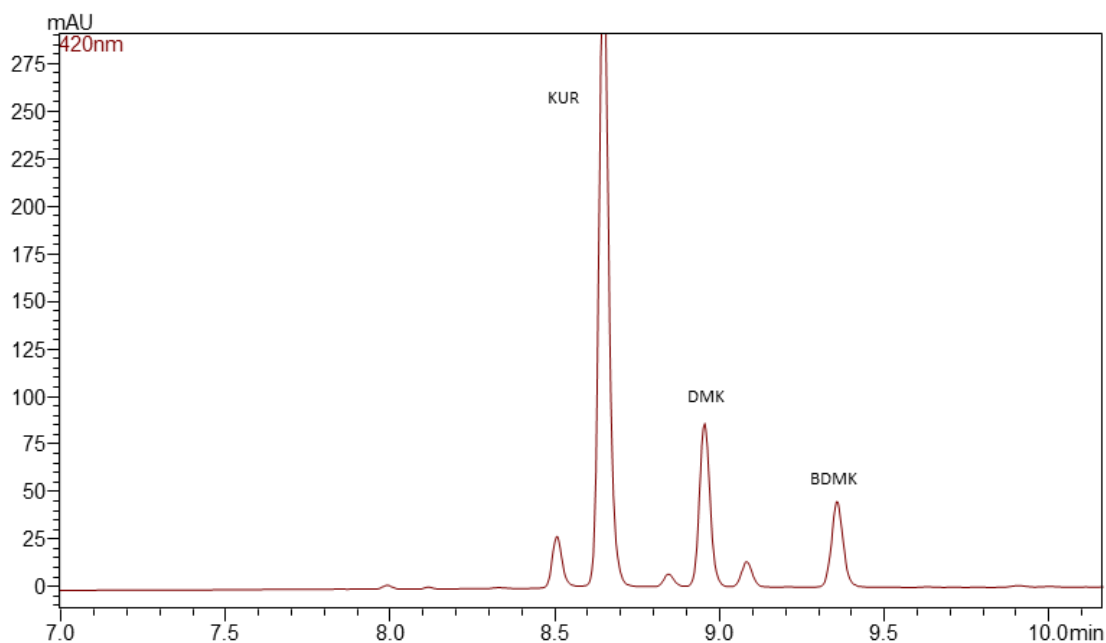
V přípravku Jamieson Curcumin Turmeric byl deklarován obsah extraktu kurkuminů 50 mg/cps. Naši stanovenou metodou bylo vyhodnoceno, že tento vzorek obsahoval v jedné kapsli 20,57 mg kurkuminů, což odpovídá 41,14 % extraktu kurkuminů.

Tabulka 32 – Vyhodnocení obsahu přípravku Jamesion Curcumin Turmeric

Jamieson Curcumin Turmeric	Uvedený obsah extraktu v mg/cps.	Zjištěný obsah v mg/cps.	Vypočtený obsah extraktu v %
PIP	-	-	-
KUR	50	14,61	41,14
DMK		4,08	
BDMK		1,88	



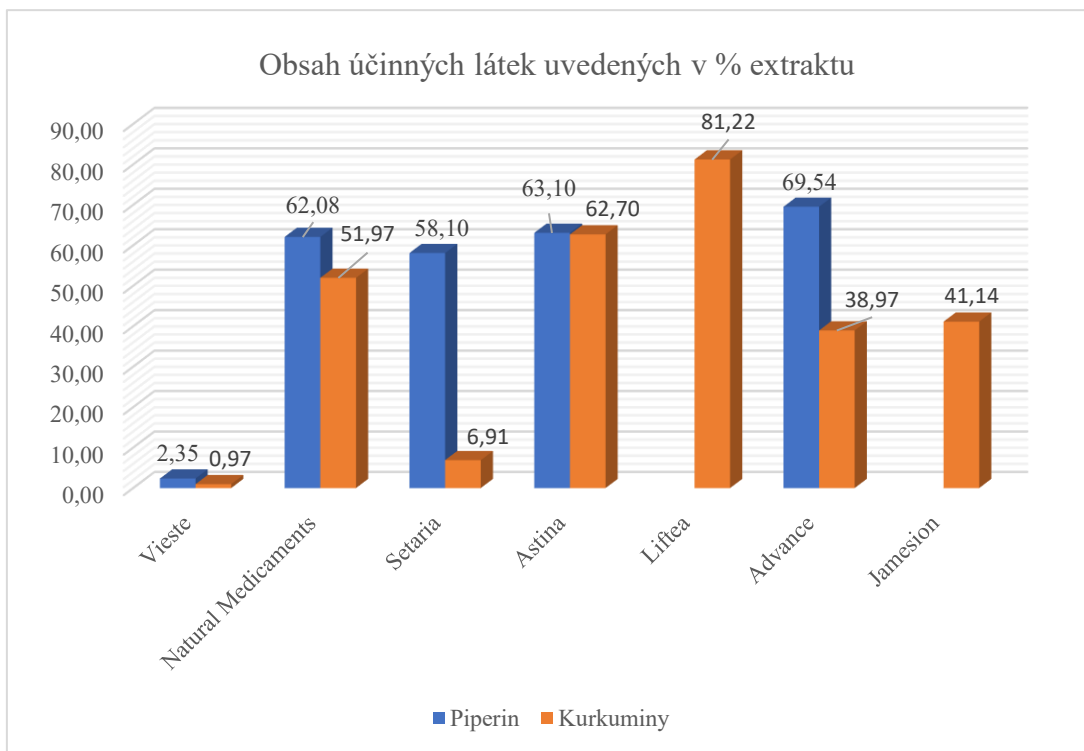
Obrázek 60 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Jamesion Curcumin Turmeric při 340 nm



Obrázek 61 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Jamesion Curcumin Turmeric při 420 nm

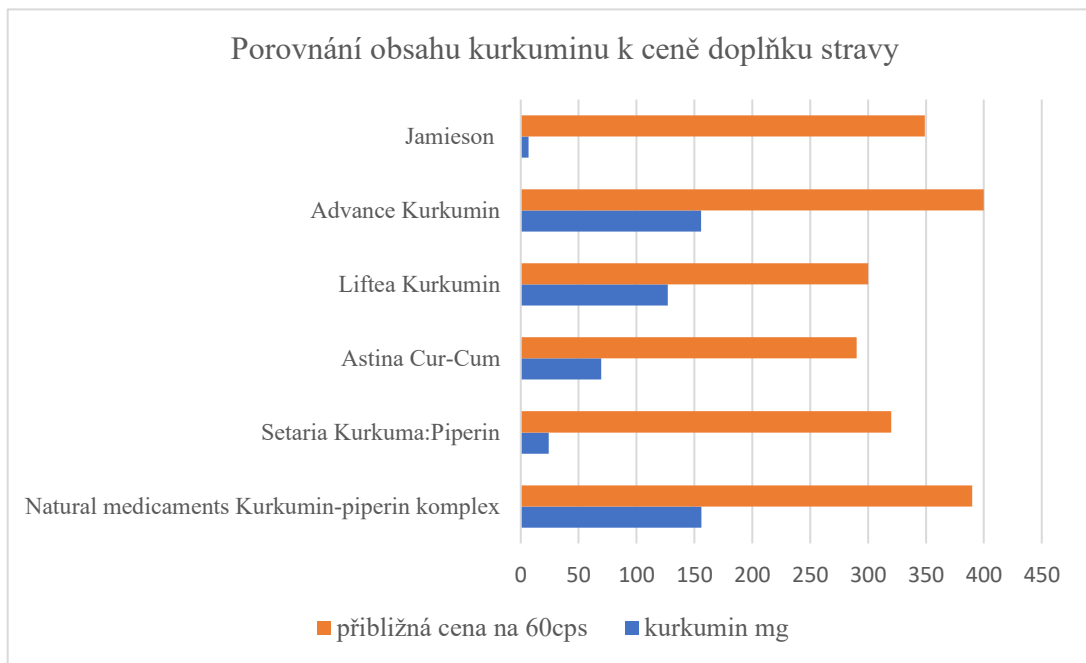
#### 6.1.7.10 Vyhodnocení kvality vybraných doplňků stravy

Potravní doplňky od značky Natural medicaments a Astina dosáhly obsahu extraktu piperinu i kurkuminů kolem 60 %. Potravní doplněk Advance dosáhl obsahu extraktu piperinu téměř 70 % obsah extraktu kurkuminů však necelých 40 %. Potravní doplněk Liftea dosáhl obsahu extraktu kurkuminů nad 80 %. Potravní doplněk Jamieson dosáhl obsahu extraktu kurkuminů pod 50 %. Potravní doplněk Setaria dosáhl extraktu kurkuminů pouze necelých 7 % a piperinu téměř 60 %. Potravní doplněk Vieste dosáhl extraktu piperinu pouhých 2,35 % a extraktu kurkuminů pouhých 0,97 %. Zcela evidentně se jedná o nevyhovující přípravek s nízkým obsahem deklarovaných látek.



Obrázek 62 – Vyhodnocení kvality vybraných doplňků stravy

#### 6.1.7.11 Porovnání obsahu kurkuminu k ceně doplňku stravy



Obrázek 63 - Porovnání obsahu kurkuminu k ceně doplňku stravy

Dle měření bylo vyhodnoceno, že pro zákazníka je poměrem cena/obsah nejvíce výhodný doplněk stravy Liftea Kurkumin a nejméně výhodný doplněk stravy Setaria Kurkuma: piperin. Přípravek Vieste Kurkumin-piperin plus nebyl do tohoto hodnocení nezapočítán, vzhledem k tomu, že se jedná o nevyhovující přípravek s nízkým obsahem deklarovaných látek.

Tabulka 33 – Souhrnný přehled změřeného obsahu piperinu a kurkuminů u jednotlivých doplňků stravy

Název DS	Firma	Obsah v jedné kapsli/tabletě v mg				
		PIP	KUR	DMK	BDK	Suma všech kurkuminů
Kurkumin – piperin plus	Vieste	0,24	3,94	1,45	1,38	6,77
Kurkumin-piperin komplex	Natural Medicaments	3,10	155,90	-	-	155,90
Kurkuma: piperin	Setaria	2,90	17,39	5,89	0,89	24,17
Cur-Cum	Astina	3,16	48,66	11,98	8,93	69,57
Kurkumín	Liftea	-	99,02	19,69	8,81	127,00
Kurkumin	Advance	3,45	118,97	33,11	3,80	155,88
Curcumin turmeric	Jamieson	0,24	14,61	4,08	1,88	6,77

## 7. ZÁVĚR

Byla vyvinuta, optimalizována a validována HPLC metoda pro stanovení vybraných obsahových látek v 7 vybraných doplňcích stravy a to jmenovitě: Kurkumin – piperin plus Vieste, Kurkumin-piperin komplex Natural Medicaments, Kurkuma: piperin Setaria, Cur-Cum Astina, Kurkumín Liftea, Kurkumin Advance a Curcumin turmeric. Tyto doplňky stravy obsahovaly všechny či pouze některé z těchto účinných látek: piperin, kurkumin, demetoxykurkumin a bisdemetoxykurkumin. Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení obsahu těchto účinných látek.

Tato metoda byla také schopna analyzovat účinnou látku tetrahydrokurkumin, kterou však žádný z přípravků neobsahoval.

K analýze byla použita kolona Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice a předkolona Ascentis® RP-Amide 5 x 4,6 mm, 2,7 µm částice Supelco Analytical. Režim analýzy byl zvolen gradientový o délce analýzy 12,5 minuty a průtokem 1,0 ml/min. Jako mobilní fáze byla vybrána směs 100% acetonitrilu s 0,1% kys. fosforečnou.

Vzorky byly detekovány pomocí DAD detektoru při třech vlnových délkách (280 nm, 340 nm, 420 nm) a konstantní teplotě 30°C. Na začátku analýzy činil tlak na koloně 21 MPa a objem nástřiku činil 5 µl nebo 3 µl.

Hodnoty asymetrie píků se pohybovaly v rozmezí od 1,069 po 1,273. Limit faktoru symetrie SST pro HPLC požadované Ph. Eur. se pohybuje v rozmezí 0,8–1,5.

Rozlišení SST pro HPLC doporučené FDA je >2, při měření se pohybovaly hodnoty nad 1,5 kromě tetrahydrokurkuminu, kde byla hodnota rozlišení 1,454.

Kapacitní faktor-retenční faktor se pohyboval v rozmezí 2,64–4,59 limit dle SST pro HPLC doporučené FDA >2.

U testování parametru linearity u daných standardů bylo dosaženo hodnot korelačního koeficientu nad 0,999.

Opakovatelnost standardů vyjádřená směrodatnou odchylkou nepřesahovala na žádné z koncentračních hladin hodnotu 1 %.

Opakovatelnost nástřiku SST pro HPLC doporučené FDA <1%

Přesnost byla též vyhodnocena relativní směrodatnou odchylkou, kdy u obou analyzovaných potravních doplňků nepřesáhla hodnotu 1 %.

Při vyhodnocení správnosti, která byla vyjádřena hodnotou výtěžnosti a relativní směrodatnou odchylkou pro kurkumin, byly získány hodnoty 3,68 % RSD a rozmezí 96–112 % výtěžnosti u kurkuminu.

V přepočtu na obsah v jedné kapsli obsahoval nejvíce piperinu doplněk stravy od značky Advance a to 3,45 mg piperinu v jedné kapsli.

V přepočtu na obsah v jedné kapsli obsahovaly nejvíce kurkuminů doplňky stravy od značky Natural medicaments a Advance a to 160 mg v jedné kapsli.

V přepočtu na poměr ceny a obsahu kurkuminů vychází pro zákazníka nejlépe doplněk stravy od značky Liftea.

Nejhorší poměr cena/obsah naopak měl doplněk stravy od značky Jamieson.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Piper nigrum. Wikipedie [online]. [cit. 2022-02-02]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Pep%C5%99ovn%C3%ADk\\_%C4%8Dern%C3%BD](https://cs.wikipedia.org/wiki/Pep%C5%99ovn%C3%ADk_%C4%8Dern%C3%BD)
2. Piper nigrum / pepřovník černý. Avicenna [online]. [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: <http://www.avicenna.cz/item/piper-nigrum-peprovník-cerny>
3. PIPER NIGRUM L. – pepřovník černý. Botany [online]. Vít Grulich, 2011 [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/piper-betle/>
4. Pepřinec. MUNI SCI [online]. [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: [https://www.sci.muni.cz/bot\\_zahr/media/pdf/clanky/peprinec.pdf](https://www.sci.muni.cz/bot_zahr/media/pdf/clanky/peprinec.pdf)
5. PIPER METHYSTICUM. Botanic [online]. Lukáš Rojek [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: <https://botanic.cz/herbar/piper-methysticum>
6. PIPER BETLE L. – pepřovník betelový. Botany [online]. Vít Grulich, 2019 [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/piper-betle/>
7. Piperine. PubChem [online]. [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piperine>
8. Piperin. Sigma aldrich [online]. [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/p49007?gclid=CjwKCAiAl-6PBhBCEiwAc2GOVLjkNFBSGnXFTx9EhS0yZxpHkru6itAOHNRUZJopSEKSIsbkPAC4hBoCDRkQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/p49007?gclid=CjwKCAiAl-6PBhBCEiwAc2GOVLjkNFBSGnXFTx9EhS0yZxpHkru6itAOHNRUZJopSEKSIsbkPAC4hBoCDRkQAvD_BwE)
9. JAHODÁŘ, Luděk. Farmakobotanika: semenné rostliny. Vyd. 3., upr. a dopl. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2015-2.
10. SHITYAKOV, Sergey, Ehsan BIGDELIAN, Aqeel A. HUSSEIN, Muhammad Bilal HUSSAIN, Yogesh Chandra TRIPATHI, Muhammad Usman KHAN a Mohammad Ali SHARIATI. Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper. European Journal of Medicinal Chemistry [online]. 2019, 176, 149-161 [cit. 2022-02-04]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ejmech.2019.04.002
11. HAQ, Iahitsham-Ul, Muhammad IMRAN, Muhammad NADEEM, Tabussam TUFAIL, Tanweer A. GONDAL a Mohammad S. MUBARAK. Piperine: A review of its biological effects. Phytotherapy Research [online]. 2021, 35(2), 680-700 [cit. 2022-02-03]. ISSN 0951-418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.6855
12. MEGHWAL, Murlidhar a T. K. GOSWAMI. Piper nigrum and Piperine: An Update. Phytotherapy Research [online]. 2013, 27(8), 1121-1130 [cit. 2022-02-03]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.4972
13. CURCUMA LONGA. Botanic [online]. Radka Kelichová [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: <https://botanic.cz/herbar/curcuma-longa>
14. Kurkuma. Wikipedie [online]. [cit. 2021-12-04]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Kurkuma>
15. Curcuma longa. Botanic [online]. Radka Kelichová [cit. 2022-02-04]. Dostupné z: <https://botanic.cz/herbar/curcuma-longa>
16. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1386?lang=en&ion=US>
17. Národní centrum pro biotechnologické informace (2022). PubChem Compound Summary pro CID 969516, kurkumin. Načteno 31. ledna 2022 z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>.



18. TEPLÍKOVÁ, Jarmila. Zázvor v kuchyni: pěstování, léčivé účinky a recepty: galgán, kurkuma a kardamom – sourozenci zázvoru: 277 receptů. Praha: Vyšehrad, 2004, c2005. ISBN 80-702-1778-2.
19. GARRAN, Thomas Avery. Naše bylinky v tradiční čínské medicíně: praktický průvodce. Brno: Computer Press, 2009. ISBN 978-80-251-2295-2.
20. ZENTRICH, Josef Antonín. Zentricnova encyklopedie fytoterapie: Aencyclopaedia phytotherapeutica Centriciana. Olomouc: Fontána, 2014. ISBN 978-80-7336-493-9.
21. GUPTA, Subash Chandra, Sahdeo PRASAD a Bharat B. AGGARWAL, ed. *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016 [cit. 2022-02-25]. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-3-319-41332-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-41334-1
22. SOLEIMANI, Vahid, Amirhossein SAHEBKAR a Hossein HOSSEINZADEH. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. *Phytotherapy Research* [online]. 2018, 32(6), 985-995 [cit. 2022-02-04]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.6054
23. KOCAADAM, Betül a Nevin ŞANLIER. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2015, 57(13), 2889-2895 [cit. 2022-02-04]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2015.1077195
24. Haroon Khalid, Kai Bin LIEW, Gabriel Onn Kit LOH a Kok Kiang PEH. Stability indicating HPLC–UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. *Food Chemistry* [online]. 2015, 170, 321-326 [cit. 2022-02-09]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.066
25. KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda – nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
26. NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
27. Vysoce výkonná kapalinová chromatografie (HPLC). *Labster Theory* [online]. [cit. 2022-02-02]. Dostupné z: [https://theory.labster.com/niche\\_hplc/](https://theory.labster.com/niche_hplc/)
28. HPLC Columns: Ascentis® Express HPLC and UHPLC Columns Maximum Resolution on any System. *Merck: © 2022 Merck KGaA* [online]. Darmstadt, Germany: SigmaAldrich, 2022, 10/2020 [cit. 2022-02-25]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/products/analytical-chemistry/analytical-chromatography/hplc-columns>
29. Detektory. Whitman college [online]. Whitman college [cit. 2022-02-02]. Dostupné z: [http://people.whitman.edu/~dunnivfm/FAASICPMS\\_Ebook/CH2/2\\_2\\_9.html](http://people.whitman.edu/~dunnivfm/FAASICPMS_Ebook/CH2/2_2_9.html)
30. RODRIGUEZ, Elliott L., Chenhua ZHANG, Ashley G. WOOLFORK, et al. Analysis of curcumin and piperine in biological samples by reversed-phase liquid chromatography with multi-wavelength detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2021, 1162 [cit. 2022-02-04]. ISSN15700232. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122487
31. SHITYAKOV, Sergey, Ehsan BIGDELIAN, Aqeel A. HUSSEIN, Muhammad Bilal HUSSAIN, Yogesh Chandra TRIPATHI, Muhammad Usman KHAN a Mohammad Ali SHARIATI. Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2019, 176, 149-161 [cit. 2022-02-04]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ejmech.2019.04.002

32. KOTHA, Raghavendhar R. a Devanand L. LUTHRIA. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules* [online]. 2019, 24(16) [cit. 2022-02-04]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24162930
33. ANTUNES, Alisson Henrique, Flávia Rasmussen FARIA, João Felipe MOTA, Mariângela Fontes SANTIAGO, Ana Carolina KOGAWA a Kênnia Rocha REZENDE. Bioanalytical method by HPLC-FLD for curcumin analysis in supplemented athletes. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2020, 28(5), 599-606 [cit. 2022-02-04]. ISSN 13190164. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jsps.2020.03.012
34. YUSUF, Helmy, Nina WIJANI, Rizka Arifa RAHMAWATI, Riesta PRIMA HARINASTITI, M. Agus Syamsur RIJAL a Dewi ISADIARTUTI. Analytical method for the determination of curcumin entrapped in polymeric micellar powder using HPLC. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* [online]. 2021, 32(4), 867-873 [cit. 2022-02-04]. ISSN 2191-0286. Dostupné z: doi:10.1515/jbcpp-2020-0491
35. LI, Rui, Cheng XIANG, Min YE, Hui-Fang LI, Xing ZHANG a De-An GUO. Qualitative and quantitative analysis of curcuminoids in herbal medicines derived from *Curcuma* species. *Food Chemistry* [online]. 2011, 126(4), 1890-1895 [cit. 2022-02-05]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.014
36. KHORSHIDI, Neda, Marzieh RAHIMI a Iraj SALIMIKIA. Application of aeration-assisted homogeneous liquid-liquid microextraction procedure using Box-Behnken design for determination of curcumin by HPLC. *Journal of Separation Science* [online]. 2020, 43(13), 2513-2520 [cit. 2022-02-04]. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.202000001
37. SYED, Haroon Khalid, Kai Bin LIEW, Gabriel Onn Kit LOH a Kok Khiang PEH. Stability indicating HPLC-UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. *Food Chemistry* [online]. 2015, 170, 321-326 [cit. 2022-02-09]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.066
38. HAN, Ying-Rui, Jin-Jin ZHU, Yu-Rong WANG, Xing-Sheng WANG a Yong-Hong LIAO. A simple RP-HPLC method for the simultaneous determination of curcumin and its prodrug, curcumin didecanoate, in rat plasma and the application to pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* [online]. 2011, 25(10), 1144-1149 [cit. 2022-02-09]. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1584

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

### 9.1 Seznam obrázků

Obrázek 1 – Ilustrovaný obrázek *Piper nigrum* [1]

Obrázek 2 – Geometrické izomery piperinu [11]

Obrázek 3 – Chemická struktura piperinu [7]

Obrázek 4 – Interaktivní model chemické struktury piperinu typu „míč a hůl“ [7]

Obrázek 5 – Ilustrovaný obrázek *Curcuma longa* [14]

Obrázek 6 – Chemická struktura kurkuminu [17]

Obrázek 7 – Interaktivní model chemické struktury piperinu typu „míč a hůl“ [17]

Obrázek 8 – Přehled farmakologických účinků kurkuminu [22]

Obrázek 9 – Chemická struktura kurkuminoidů [24]

Obrázek 10 – Základní schéma kapalinového chromatografu [27]

Obrázek 11 – Schéma diodového pole [29]

Obrázek 12 – Chromatografický záznam gradientu A „delší“

Obrázek 13 – Chromatografický záznam gradientu A „kratší“

Obrázek 14 – Chromatografický záznam gradientu B

Obrázek 15 – Chromatografický záznam gradientu C

Obrázek 16 – Chromatografický záznam gradientu D

Obrázek 17 – Chromatografický záznam standardu bisdemetoxykurkuminu, červenec 2020

Obrázek 18 – Chromatografický záznam standardu bisdemetoxykurkuminu, září 2020

Obrázek 19 – Absorpční spektrum tetrahydrokurkuminu

Obrázek 20 – Absorpční spektrum piperinu

Obrázek 21 – Absorpční spektrum kurkuminu

Obrázek 22 – Absorpční spektrum demetoxykurkuminu

Obrázek 23 – Absorpční spektrum bisdemetoxykurkuminu

Obrázek 24 – Absorpční spektrum metylparabenu

Obrázek 25 – Chromatografický záznam – Ascentis® Express RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice

Obrázek 26 – Chromatografický záznam – Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice

Obrázek 27 – Chromatografický záznam – YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 5 µm částice

Obrázek 28 – Chromatografický záznam – YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 5 µm částice

Obrázek 29 – Chromatografický záznam – YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 µm částice

Obrázek 30 – Chromatografický záznam – YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 µm částice

Obrázek 31 – Chromatografický záznam – Kinetex® XB-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice

Obrázek 32 – Chromatografický záznam – Kinetex® EVO-C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm částice

Obrázek 33 – Chromatografický záznam – Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6mm, 2,6 µm částice

Obrázek 34 – Chromatografický záznam – Kinetex Biphenyl 150 x 4,6mm µm částice

Obrázek 35 – Chromatografický záznam – Luna® Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm částice

Obrázek 36 – Souhrnný chromatografický záznam vnitřních standardů

Obrázek 37 – Vzorek Cur-Cum Astina – Vyhodnocení ploch kurkuminu

Obrázek 38 – Souhrnný chromatografický záznam vzorku Cur-Cuma Astina ve čtyřech různých extrakčních prostředích při 280 nm

Obrázek 39 – Vzorek Kurkuma: piperin Setaria: Vyhodnocení ploch kurkuminu

Obrázek 40 – Souhrnný chromatografický záznam vzorku Cur-Cuma Astina ve čtyřech různých extrakčních prostředích při 280 nm

Obrázek 41 – Chromatografický záznam – YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 µm částice při 30 °C

Obrázek 42 – Chromatografický záznam – YMC Carotenoid 150 x 4,6 mm, 5 µm částice při 40 °C

Obrázek 43 – Chromatogram za optimálních separačních podmínek

Obrázek 44 – Kalibrační závislost pro piperin

Obrázek 45 – Kalibrační závislost pro kurkumin

Obrázek 46 – Kalibrační závislost pro demetoxykurkumin

Obrázek 47 – Kalibrační závislost pro bisdemetoxykurkumin

Obrázek 48 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Vieste Kurkumin-piperin plus při 340nm

Obrázek 49 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Vieste Kurkumin-piperin plus při 420nm

Obrázek 50 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex při 340nm

Obrázek 51 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex při 420nm

Obrázek 52 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Setaria Kurkuma: Piperin při 340nm

Obrázek 53 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Setaria Kurkuma: Piperin při 420nm

Obrázek 54 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Astina Cur-Cum při 340nm

Obrázek 55 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Astina Cur-Cum při 420nm

Obrázek 56 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Liftea Kurkumin při 340nm

Obrázek 57 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Liftea Kurkumin při 420nm

Obrázek 58 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Advance Kurkumin při 340nm

Obrázek 59 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Advance Kurkumin při 420 nm

Obrázek 60 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Jamieson Curcumin Turmeric při 340nm

Obrázek 61 – Chromatografický záznam – Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Jamieson Curcumin Turmeric při 420nm

Obrázek 62 – Vyhodnocení kvality vybraných doplňků stravy

Obrázek 63 – Porovnání obsahu kurkuminu k ceně doplňku stravy

## **9.2 Seznam tabulek**

Tabulka 1 – možnosti stanovení piperinu a kurkuminoidů

Tabulka 2 – Chromatografický systém

Tabulka 3 – Testované kolony

Tabulka 4 – Přehled analyzovaných potravních doplňků

Tabulka 5 – Příprava pracovních roztoku pro kalibraci

Tabulka 6 – Přehled navážek vzorků potravních doplňků pro validaci

Tabulka 7 – Příprava vzorků pro určení extrakčního činidla

Tabulka 8 – Zjištěná absorpční maxima standardů

Tabulka 9 – Přehled zkoušených gradientů

Tabulka 10 – Volba vnitřního standardu

Tabulka 11 – Optimální nastavení pro HPLC analýzu

Tabulka 12 – Časový průběh gradientu v minutách

Tabulka 13 – Test způsobilosti chromatografického systému

Tabulka 14 – Parametry lineární regrese pro piperin

Tabulka 15 – Parametry lineární regrese pro kurkumin

Tabulka 16 – Parametry lineární regrese pro demetoxykurkumin

Tabulka 17 – Parametry lineární regrese pro bisdemetoxykurkumin

Tabulka 18 – Opakovatelnost roztoku standardů na měřených koncentračních hladinách

Tabulka 19 – Přesnost vzorku Cur-Cuma Astina

Tabulka 20 – Přesnost vzorku Kurkuma-Piperin Setaria

Tabulka 21 – Správnost vzorku Cur-Cuma Astina

Tabulka 22 – Limity detekce a kvantifikace u měřených standardů

Tabulka 23 – Váha obsahu kapslí (tobolek) vybraných doplňků stravy

Tabulka 24 – Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých účinných látek v analyzovaných doplňcích stravy 1.část

Tabulka 25 – Vyhodnocení přítomnosti jednotlivých účinných látek v analyzovaných doplňcích stravy 2. část

Tabulka 26 – Vyhodnocení obsahu přípravku Vieste Kurkumin-piperin plus

Tabulka 27 – Vyhodnocení obsahu přípravku Natural medicaments Kurkumin-piperin komplex

Tabulka 28 – Vyhodnocení obsahu přípravku Setaria Kurkuma: Piperin

Tabulka 29 – Vyhodnocení obsahu přípravku Astina Cur-Cum

Tabulka 30 – Vyhodnocení obsahu přípravku Liftea Kurkumin

Tabulka 31 – Vyhodnocení obsahu přípravku Advance Kurkumin

Tabulka 32 – Vyhodnocení obsahu přípravku Jamieson Curcumin Turmeric

Tabulka 33 – Souhrnný přehled změřeného obsahu piperinu a kurkuminů u jednotlivých doplňků stravy