

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Studium stability kurkuminu

Diplomová práce

Autor práce: Monika Sekaninová

Vedoucí práce: Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium stability kurkuminu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10.4.2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému vedoucímu práce Ing. Matyáši Orsákovi, Ph.D. za odborné vedení při práci v laboratoři, také za rady, připomínky a trpělivost při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Vladimíru Pivcovi, CSc. za praktické rady a pomoc v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Marii Eliášové za jazykovou korekturu a pomoc s překladem textu.

Souhrn

Potravinářská barviva jsou v dnešní době používána ve většině výrobků. V posledních letech začínají převažovat barviva přírodní, mezi něž patří také kurkumin. Ten se získává z oddenku kurkumy dlouhé (*Curcuma longa* L.), kde ho doprovází demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin. Tyto tři látky se nazývají kurkuminoidy a mají žlutou barvu. Můžeme je najít v mnoha výrobcích, jako jsou cukrovinky, mléčné výrobky, pečivo, vejce a další. U kurkuminu je prokázána řada pozitivních zdravotních účinků, mezi něž patří protizánětlivé účinky, antioxidační aktivita, protirakovinné účinky a mnoho dalších.

Kurkuminoidy jsou nerozpustné ve vodě, což způsobuje jejich nízkou biologickou využitelnost. Stabilitu kurkuminoidů ovlivňuje řada faktorů, nejvíce teplota, světlo, pH a doba skladování. Pro hodnocení těchto faktorů se používá nepřeberné množství analytických metod. Nejčastěji se jedná o spektrofotometrické metody, TLC, HPLC a MS.

Stabilitou kurkuminoidů, hlavně kurkuminu, se zabývá mnoho studií. V dnešní době se studuje stabilita i v rámci potravin. Proto cílem této práce bylo stanovit obsah kurkuminoidů v potravině (sirupu) a zjistit vliv skladovacích podmínek na jejich stabilitu. Podmínky simulovaly stánkový prodej a skladování v domácích podmínkách. Vzorky sirupů a extraktů kurkumy pro porovnání byly uchovány v podmínkách tma/chlad, tma/teplo, světlo/chlad a světlo/teplo. Byly stanoveny hypotézy, že kurkumin je běžně používané potravinářské barvivo, že se mění v čase na jiné sloučeniny a že pH ovlivňuje jeho stabilitu. Pro stanovení obsahu kurkuminu a jeho derivátů byla využita metoda HPLC. Stabilita kurkuminu byla vyhodnocena pomocí spektrofotometrie.

Z výsledků vyplývá, že u většiny vzorků není statisticky průkazný pokles absorbance ani pokles množství kurkuminoidů. V rámci experimentu docházelo pouze ke kolísání hodnot. Statisticky průkazný pokles byl pouze u vzorku kurkumy v podmínkách světlo/teplo. Při měření bylo zjištěno, že k největší degradaci docházelo u vzorků sirupů v chladu a zároveň ve tmě. V těchto podmínkách naopak kurkumin v extraktu kurkumy vykazuje nejvyšší stabilitu. Jak bylo zjištěno, také pH má vliv na stabilitu kurkuminoidů. Sirupy měly kyselé pH a v tomto prostředí je kurkumin nejstabilnější.

Klíčová slova: kurkuma, pomerančový sirup, E100, demethoxykurkumin, bisdemethoxykurkumin

Summary

Food colours are nowadays used in most products. Natural colours, to whom curcumin belongs, are starting to predominate these days. Curcumin is obtained from rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.), where it is accompanied by demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. These three compounds are called curcuminoids and have yellow colour. They can be found in many products, like sweets, dairy products, pastry, eggs and others. Many health benefits of curcumin, such as anti-inflammatory effects, antioxidant activity, anticarcinogenic effects and many others, were proved.

Curcuminoids are water-insoluble compounds, which causes their small bioavailability. The stability of curcuminoids is affected by many factors, mostly temperature, light, pH and length of storage. Many analytical methods are used to assess these factors. Spectrophotometric methods, TLC, HPLC and MS are the most frequent.

Many studies deal with stability of curcuminoids, especially curcumin. These days also the stability in food is studied. Therefore the objective of this thesis was to establish the content of curcuminoids in food (syrup) and assess the effect of storage conditions on the stability. The conditions simulated trading from stall and storage in home conditions. Samples of the syrups and turmeric extracts were kept in conditions dark/cold, dark/warmth, light/cold, light/warmth. These hypotheses were established: curcumin is regularly used food colour, in time it turns into other compounds and pH affects its stability. Content of curcumin and its derivatives was determined by HPLC. Stability of curcumin was assessed using spectrophotometry.

The results show that values of absorbance and curcuminoid content fluctuated. However, neither the decline of absorbance nor the decline of curcuminoid content were statistically significant in most of the samples. The only sample with statistically significant decline of values was the sample of turmeric in conditions light/warmth. The highest degradation was detected in the samples of syrups kept in cold and dark. On the contrary the turmeric extract showed the highest stability in these conditions. The effect of pH on the stability of curcuminoids was proved too. Syrups had low pH, in which the curcumin was the most stable.

Keywords: turmeric, orange syrup, E100, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin

Obsah

1 ÚVOD	8
2 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	9
3 LITERÁRNÍ REŠERŽE	10
3.1 Potravinářská barviva	10
3.1.1 Dělení.....	10
3.1.2 Legislativa	11
3.1.2.1 Označování přídatných látek	11
3.2 Kurkuma dlouhá	12
3.2.1 Chemické složení.....	12
3.2.2 Charakteristika	12
3.2.3 Výrobky.....	13
3.3 Kurkumin	15
3.3.1 Výroba	15
3.3.2 Použití v potravinářství.....	16
3.3.3 Vliv na zdraví	18
3.4 Stabilita a formy stabilizace kurkuminu	20
3.4.1 Vliv pH.....	20
3.4.2 Vliv světla.....	21
3.4.3 Vliv teploty.....	22
3.4.4 Ostatní	23
3.4.5 Formy stabilizace.....	23
3.5 Metody stanovení kurkuminu	24
3.5.1 Spektrofotometrie.....	24
3.5.2 HPLC	26
3.5.3 TLC.....	26
4 MATERIÁL A METODY.....	28
4.1 Materiály a instrumentace	28
4.1.1 Rostlinný materiál	28
4.1.2 Chemikálie	28
4.1.3 Přístroje	28
4.1.4 Pomůcky	29
4.1.5 Programy	29
4.2 Metody	29
4.2.1 Stanovení sušiny	29

4.2.2	Příprava standardů	29
4.2.2.1	Kurkumin (CC)	29
4.2.2.2	Demethoxykurkumin (DMC) a bisdemethoxykurkumin(BDMC).....	30
4.2.3	Příprava kalibračních roztoků a měření kalibrační řady.....	31
4.2.4	Homogenizace a příprava vzorků.....	32
4.2.5	Skladování vzorků.....	33
4.2.6	Příprava a proměřování vzorků	33
4.2.6.1	UV/VIS Spektrofotometrie.....	34
4.2.6.2	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	34
4.2.7	Vyhodnocení měření	35
4.2.8	Optimalizace metody	35
5	VÝSLEDKY	37
5.1	Průzkum trhu.....	37
5.2	Stanovení stability	37
6	DISKUZE.....	42
7	ZÁVĚR.....	45
8	SEZNAM LITERATURY	46
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57
10	SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY	58

1 ÚVOD

Barva výrobku hraje podstatnou úlohu při výběru potravin. Často jsou výrobky dobarvovány potravinářskými barvivy. V dnešní době dochází k edukaci obyvatel a zákazníci se začínají zajímat o to, co vlastně jedí. Výrobci to vědí, a proto je dnes preferováno použití přírodních barviv, která jsou v očích zákazníků "sympatičtější".

Do skupiny přírodních barviv se řadí i kurkumin, který se získává extrakcí z oddenku kurkumy. V kurkumě jsou také obsaženy demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin, které jsou společně s kurkuminem označovány jako kurkuminoidy. Tyto látky mají jasně žlutou barvu a nejčastěji se s nimi lze setkat v koření kari. Kurkumin nejenže v potravinách funguje jako barvivo, ale je považován také za silný antioxidant a má mnoho pozitivních zdravotních účinků. Mezi ně patří protizánětlivý a protirakovinný účinek.

Je obecně známo, že přírodní barviva jsou méně stabilní. Neustále tedy dochází k novým výzkumům v oblasti stability kurkuminu. Na stabilitu mají vliv přírodní faktory, jakými jsou teplota, vlhkost, světlo, pH a v neposlední řadě i doba skladování. Působení těchto faktorů je zkoumáno pomocí analytických metod. Bylo také zjištěno, že kurkuminoidy jsou nerozpustné ve vodě, čímž se snižuje jejich biologická využitelnost.

V této práci je hodnocena stabilita kurkuminoidů v potravině i v methanolovém extraktu kurkumy. Hodnocenými faktory jsou teplota a přístup světla. K hodnocení byla použita spektrofotometrie a vysoce účinná kapalinová chromatografie.

2 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Cíle práce:

1. Stanovit obsah kurkuminu, příp. demethoxy- a bisdemethoxykurkuminu ve vybrané potravíně.
2. Zjistit kvalitativní a kvantitativní změny v obsahu jmenovaných složek.
3. Zjistit vliv skladovacích podmínek na stabilitu kurkuminu a jeho derivátů.

Hypotézy:

1. Kurkumin je běžně používané potravinářské barvivo.
2. Kurkumin se v čase mění na jiné sloučeniny (demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin).
3. pH má vliv na stabilitu kurkuminu.

3 LITERÁRNÍ REŠERŽE

3.1 Potravinářská barviva

Barviva jsou do potravin přidávána již po celá staletí. Je známo, že Egypťané barvili bonbóny a víno již 400 let př.n.l. (Downham et Collins, 2000). V dnešní době patří barva výrobku mezi nejdůležitější vlastnosti potravin, protože často na základě barvy zákazníci hodnotí, zda je potravina bezpečná, čerstvá a jestli je chutná. (Mortensen, 2006). V posledních letech se zvyšuje poptávka po přírodních barvivech. Ty však mohou mít značné nevýhody oproti syntetickým barvivům. Mezi jejich nevýhody patří hlavně chemická nestabilita, velká proměnlivost barevných odstínů (i v rámci šarže), často udělují výrobku nežádoucí chuť a vůni, dále mohou potravinu kontaminovat toxickými kovy, insekticidy, herbicidy nebo mikroorganismy a často jsou náchylné k mikrobiálnímu kažení (Anon1., n.d.).

Barviva jsou přidávána do potravin z několika důvodů. Hlavně k posílení méně výrazné barvy, pro sjednocení barvy v rámci celé šarže, pro obnovení barvy ztracené při zpracování a pro obarvení potravin, které jsou prakticky bezbarvé (Hendry et Houghton, 1996).

Barevné látky absorbují viditelné spektrum elektromagnetického záření v rozsahu 380 – 780 nm. Látka použitá jako barvivo by měla mít dostatečně velký absorpční koeficient, dostatečnou stabilitu a neměla by být toxická (Čopíková et al., 2005).

3.1.1 Dělení

Barviva obvykle bývají zpracovatelná ve formě pravého či nepravého roztoku, a proto se často dělí na barviva rozpustná ve vodě, rozpustná v organických rozpouštědlech, barviva disperzní atd. Barviva lze dále dělit podle barvy, chemického složení či struktury, způsobu vazby na materiál, biologické funkce v přírodním materiálu nebo rozpustnosti (Čopíková et al., 2005). Potravinářská barviva mohou být rozdělena do čtyř kategorií:

- syntetická barviva,
- přírodně identická barviva,
- přírodní barviva,
- anorganická barviva (Mortensen, 2006).

Syntetická barviva se nevyskytují v přírodě a jsou vyráběna chemicky (žlutá SY, karmoisin a tartrazin). Přírodně identická barviva jsou vyráběna chemickou syntézou tak, aby byla chemicky totožná s barvivy nalezenými v přírodě (β -karoten, riboflavin a kanthaxanthin). Přírodní barviva jsou získána z přírodního jedlého zdroje s využitím uznávané metody

přípravy potravin (kurkumin, bixin a anthokyany) (Hendry et Houghton, 1996). Anorganická barviva jsou oxid titaničitý, zlato a stříbro (Mortensen, 2006).

3.1.2 Legislativa

Používání potravinářských přídatných látek při výrobě potravin je velmi přísně regulováno legislativními předpisy. Ty přesně vymezují potraviny, při jejichž výrobě se nesmí používat určité typy přídatných látek, popř. lze používat pouze omezený počet přídatných látek. Prostřednictvím těchto předpisů se zajišťuje, že nedojde při běžné konzumaci potravin k překročení hodnot ADI (přijatelná denní dávka) pro jednotlivé přídatné látky. Některé přídatné látky nemají stanovenou hodnotu ADI a smějí se používat jen v nejnižším množství, které je nezbytné k dosažení požadovaného technologického účinku, tzv. quantum satis (QS) (Anon2., n.d.)

Dle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách se barvivy rozumějí látky, které potravině dodávají barvu nebo barvu obnovují a zahrnují přírodní složky potravin a přírodních zdrojů, jež jako takové nejsou obvykle používány jako potraviny a nejsou obvykle používány jako charakteristické složky potravin. Ve smyslu tohoto nařízení jsou barvivy přípravky získané z potravin a dalších jedlých materiálů z přírodních zdrojů extrakcí fyzikální nebo chemické povahy, která má za následek selektivní oddělení pigmentů vzhledem k výživovým nebo aromatickým složkám. Nařízení (ES) č. 1333/2008, které je použitelné od ledna 2010, konsoliduje veškerou legislativu týkající se potravinářských přídatných látek, včetně směrnice pro barviva 94/36/ES. Toto nařízení je přímo aplikovatelné v členských státech EU.

3.1.2.1 Označování přídatných látek

Přítomnost přídatných látek, které byly v potravině použity, musí být uvedena na obale. Přítomnost přídatné látky se na obale označuje tak, že se uvede název nebo číselný kód E, který se skládá z písmena E a trojmístného čísla. Číselný kód E je označení používané pro identifikaci přídatné látky v EU. Přidělení číselného kódu E znamená, že aditivní látka prošla posouzením bezpečnosti a byla povolena v EU. Seznam povolených přídatných látek a příslušných E kódů je uveden ve vyhlášce Ministerstva zdravotnictví ČR č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin a v nařízení (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách (Kundrlíková et Pavelková, 2014)

Codex Alimentarius a WHO/FAO vypracovaly všeobecné normy pro potravinová aditiva, tzv. General Standards on Food Additives (GSFA). Účelem této normy je

vypracování a harmonizace mezinárodních pravidel týkajících se aditiv použitelných v rámci světového obchodu s potravinami. V GSFA jsou zahrnuta pouze aditiva přezkoumaná JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Aditiva mají svůj Mezinárodní číselný systém INS (International Numbering System), který je analogický se systémem E-číselných kódů zavedených v zemích EU (Kundrlíková et Pavelková, 2014).

3.2 Kurkuma dlouhá

3.2.1 Chemické složení

Chemické složení kurkumy je uvedeno v tabulce č. 1 (Chattopadhyay et al., 2004).

Tabulka č. 1: Složení kurkumy

Složky	Množství [%]
Sacharidy	69,4
Voda	13,1
Bílkoviny	6,3
Tuky	5,1
Min. látky	3,5
Kurkumin	3 - 4

3.2.2 Charakteristika

Kurkuma dlouhá (*Curcuma longa* L.) je vytrvalá bylina z čeledi *Zingiberaceae* pocházející z jižní Asie (Socaciu, 2007).

Taxonomické zařazení:

- třída: *Liliopsida*,
- podtřída: *Commelinids*,
- řád: *Zingiberales*,
- čeleď: *Zingiberaceae*,
- rod: *Curcuma*,
- druh: *Curcuma longa* (Chattopadhyay et al., 2004).

Bylo popsáno více než 100 druhů kurkumy, přesto z komerčního hlediska je nejpodstatnější právě kurkuma dlouhá. Má jasně zelené listy, kónický žlutý květ a zralosti dosahuje po 7 až 10 měsících (Socaciu, 2007). Je pěstována v mnoha tropických oblastech po celém světě (MacDougall, 2002) jako je Čína, Indie, Jižní Amerika (Francis, 1999), Indonésie, Jamajka a Peru (Socaciu, 2007). Primární komerční výroba probíhá v Indii, kde je

kurkuma používána jako koření již po tisíce let (MacDougall, 2002). Ze sušených mletých oddenků je získáván jasně žlutý prášek, také známý jako žlutý zázvor nebo indický šafrán (Socaciu, 2007).

Po celá staletí je kurkuma využívána jako potravinářské barvivo a na Dálném východě též jako barvivo textilní. V orientální kuchyni je hlavní součástí koření kari, kterému dává charakteristickou barvu a přispívá svou zemitou, lehce hořkou chutí (Coultate, 2008). Kurkuma má také významné biologické účinky a byla široce používána v tradiční indické a čínské medicíně (Socaciu, 2007).

Kurkuma obsahuje dvě hlavní skupiny sloučenin: první je skupina kurkuminoidů odpovědná za žluto-oranžovou barvu. Patří sem kurkumin, demethoxykurkumin, a bisdemethoxykurkumin. Tyto sloučeniny jsou také označovány některými autory jako kurkumin I, II a III v uvedeném pořadí nebo CC, DMC a BDMC. Existují v rámci rovnováhy v keto a enol formě. A druhou skupinou jsou sloučeniny dávající chuť a aroma. V kurkumě bylo identifikováno velké množství těkavých olejů, mezi něž patří α -turmeron, β -turmeron, ar-turmeron, ar-kurkumin, turmeronol, zingiberen a fellandren. Tyto sloučeniny jsou odpovědné za specifickou chuť kurkumy (Socaciu, 2007). Vzorce vybraných sloučenin lze najít na obrázku č. 1.

3.2.3 Výrobky

Z kurkumy jsou vyráběny tři základní typy výrobků a to esenciální olej, pryskyřice a kurkumin.

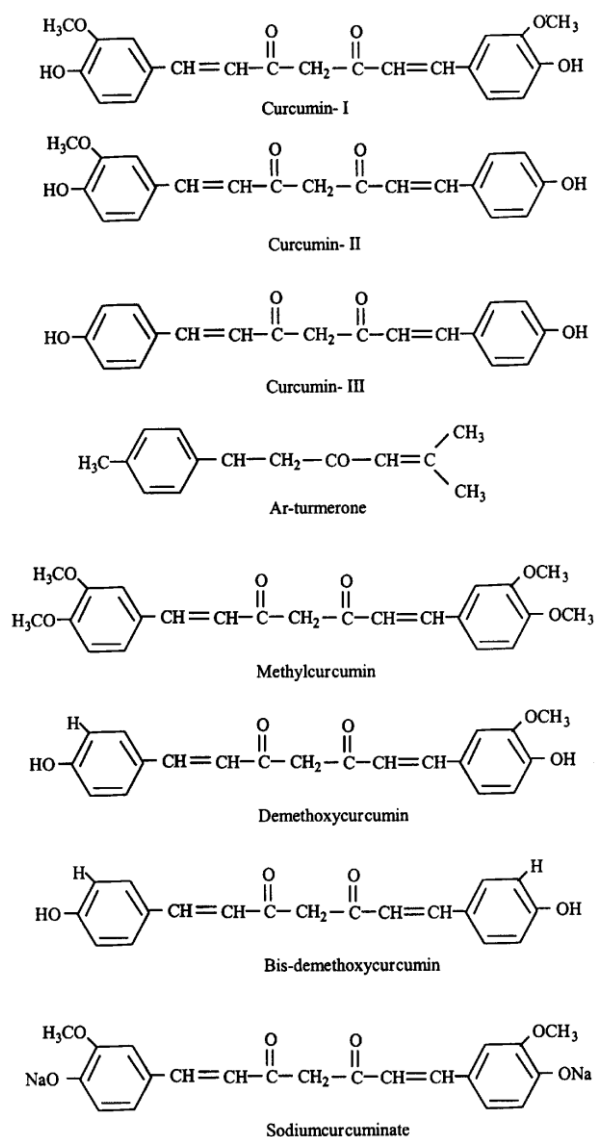
Esenciální olej je získáván destilací vodní parou z mletého prášku kurkumy. Jsou v něm zachovány všechny těkavé aromatické složky a neobsahuje barviva. V kurkumě tvoří 3 až 5 % všech přítomných látek. Po esenciálním oleji je na trhu velmi malá poptávka (Hendry et Houghton, 1996). Složení éterického oleje v tabulce č. 2 (Chattopadhyay et al., 2004).

Tabulka č. 2: Složení éterického oleje

Složky	Množství [%]
Seskviterperny	53
Zingiberen	25
Fellandren	1
Cineol	1
Sabinen	0,6
Borneol	0,5

Nejčastěji jsou z kurkumy získávány pryskyřice. V těchto extraktech jsou obsaženy sloučeniny odpovědné za chuť a barvu ve stejném relativním poměru jako jsou v kořeni, ze kterého jsou extrakty vyráběny. Pryskyřice jsou získány extrakcí rozpouštědlem z mleté kurkumy. Proces je totožný s metodami používanými při výrobě jiných pryskyřičných koření. Tato koření mívají několik výhod oproti kořeni mletému, mívají totiž vynikající mikrobiologickou kvalitu, standardizované organoleptické vlastnosti a nejsou v nich obsaženy nečistoty. Proto se používání pryskyřic v průběhu posledních 30 let neustále zvyšuje. V pryskyřicích je obsažen kurkumin v množství 37 až 55 %.

Kurkumin je hlavní složka kurkumy odpovědná za barvu. Jsou v něm obsažena již velmi malá množství sloučenin dávajících kurkumě chuť. Je vyráběn krystalizací pryskyřice a mívá 95% čistotu, což bývá standardně komerčně dostupná kvalita (Hendry et Houghton, 1996).



Obrázek č. 1: Chemické vzorce sloučenin nacházejících se v kurkumě (Chattophyay et al., 2004)

3.3 Kurkumin

Kurkumin byl poprvé izolován v roce 1815 (Chattopadhyay et al., 2004). Čistý kurkumin byl izolován v roce 1842 panem Vogelem. Možná struktura byla publikována v následujících desetiletích několika chemiky (Prasad et al., 2014), ale správná chemická struktura byla určena až v roce 1973 vědci Roughley a Whitingem. Biologické vlastnosti kurkuminu byly vědecky identifikovány v polovině dvacátého století.

Kurkumin (diferuloylmethan) tvoří 3 - 4 % kurkumy a je odpovědný právě za její žlutou barvu. Kurkuma zahrnuje kurkumin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin (kurkuminoidy). Procentuální složení kurkuminoidů v kurkumě se mezi autory liší. Jedni z nich uvádějí 94 % kurkuminu, 6 % demethoxykurkuminu a 0,3 % bisdemethoxykurkuminu (Chattopadhyay et al., 2004; Ruby et al., 1995) a druzí zmiňují 77 % kurkuminu, 17 % demethoxykurkuminu a 3 % bisdemethoxykurkuminu (Afsan et al., 1999; Aggarwal et al., 2007).

Kurkumin patří mezi polyenová barviva. Ta obsahují dvojně vazby a většina z nich je v konfiguraci *trans*. Jsou to lineární nenasycené konjugované uhlovodíky nebo jejich deriváty. Jsou nerozpustné či prakticky nerozpustné ve vodě (Čopíková et al., 2005).

Chemický název kurkuminu je 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy-fenyl)-hepta-1,6-dien-3,5-dion. Sumární vzorec je $C_{21}H_{20}O_6$ a pKa hodnota je 8,54 (Prasad et al., 2014). Teplota tání kurkuminu se pohybuje v rozmezí 176 - 177 °C. Je rozpustný v ethanolu, kyselině octové, ketonech, chloroformu a alkáliích, ve kterých tvoří červenohnědé soli (Chattopadhyay et al., 2004). Lipofilní kurkumin má maximální vlnovou délku 425 nm. Označuje se též jako přírodní žluť 3 nebo turmeric yellow (Čopíková et al., 2005). Jeho barevný odstín je velmi podobný tartrazinu (Hendry et Houghton, 1996).

Molekulární konfigurace kurkuminu mohou existovat ve dvou tautomerních formách - keto a enol formě. Enol forma je složena ze tří ionizovatelných protonů a dvou fenolických skupin. Enol forma je převládající hlavně v alkalických podmínkách. Keto forma převládá v kyselých a neutrálních podmínkách a také v pevné fázi. Kurkumin pak působí jako silný donor vodíkových atomů (Prasad et al., 2014).

3.3.1 Výroba

Kurkumin se získává extrakcí z usušeného oddenku kurkumy. Proces extrakce vyžaduje oddenek rozemletý na prášek. Ten je následně promýván vhodným rozpouštědlem, které extrahuje barviva. Po následné destilaci rozpouštědla je získána pryskyřice. Ta je podrobena dalšímu promývání pomocí selektivních rozpouštědel. JECFA uvádí jako vhodná rozpouštědla pro extrakci kurkuminu aceton, methanol, ethanol a isopropanol. Evropská

komise ve směrnici 95/45/EC uvádí aceton, methanol, ethanol, n-butanol, oxid uhličitý, ethylacetát, dichlormethan a hexan. Po extrakci je kurkumin získán krystalizací. Výsledkem celého tohoto procesu je žlutooranžový krystalický prášek, který se dále používá např. jako potravinářské barvivo. Obsahuje více než 90 % látek podílejících se na barvě a mohou být obsažena i velmi nízká množství těkavých olejů a dalších látek přírodního původu, které se přirozeně vyskytují v kurkumě (JECFA, 2004).

Na extrakci kurkuminu z kurkumy má vliv několik faktorů. Mezi ně patří teplota, velikost částic, doba míchání a poměr rozpouštědla a kurkumy. Různými kombinacemi parametrů lze docílit výtěžnosti 4,49 až 12,89 %. Jako optimální podmínky pro extrakci kurkuminu byla stanovena teplota 60 °C, velikost částic 0,42 mm, doba míchání 30 minut a poměr rozpouštědla (ethanol) ke kurkumě 50 (Sogi et al., 2010).

Kurkumin může být připraven i synteticky, ale v této formě nesmí být použit jako potravinářská přídatná látka (JECFA, 2004).

Při syntéze kurkuminoidů mohou být výtěžky nízké a mohou se také měnit. Po syntéze je třeba oddělit jednotlivé kurkuminoidy a provést odstranění nečistot pomocí kombinace tenkostěnné kapalinové chromatografie a chromatografie kolonové. Kurkumin lze syntetizovat kondenzací vanilinu a acetylacetonu (pentan-2, 4-dion) v přítomnosti anhydridu kyseliny borité / butyl boritanu a butylaminu. Bisdemethoxykurkumin lze syntetizovat stejně jako kurkumin, pouze s použitím 4-hydroxybenzaldehydu namísto vanilinu a poloviční molární dávky. Demethoxykurkumin je možné syntetizovat jako bisdemethoxykurkumin, ale pomocí ekvivalentního (polovičního) molárního množství vanilinu a 4-hydroxybenzaldehydu. Vzhledem k tomu, že syntetické kurkuminoidy lze připravit ve vysoké čistotě a také jsou poměrně stabilní, mohou být použity jako náhradní referenční standard pro kvantitativní stanovení přirozeně se vyskytujících kurkuminoidů (Scotter, 2009).

3.3.2 Použití v potravinářství

Jak již bylo řečeno, kurkumin je obsažen v rostlině kurkumě. Ta je používána v mnoha tradičních kuchyních, buď samostatně či jako součást kari koření, kde je jednou z hlavních složek (Hendry et Houghton, 1996).

Výtažek z kurkumy je používán často do masných a rybích výrobků, výrobků zpracovaných jako jsou hořčice, nakládaná zelenina, zmrazené rybí filé, zmrazené bramborové krokety, máslo a sýry. Výtažek je používán v rozmezí 2 - 640 ppm. Kurkumin a koncentrát kurkuminoidů býval používán jako potravinářské barvivo omezeně, nejčastěji

tam, kde nemohl být použit výtažek z kurkumy, což byly výrobky jako mražené krémy, želatina, limonády a likéry (Delgado-Vargas et Paredes-López, 2003).

Dnes je kurkumin široce používán jako barvivo v potravinářském, kosmetickém, textilním i nápojovém průmyslu (Gilda et al., 2010). Kurkumin je používán do mléčných výrobků, tuků, olejů, tukových emulzí, zmrzlin, ovocných a zeleninových výrobků, cukrovinek, výrobků z obilovin, pečiva, masa a masných výrobků, ryb a rybích výrobků, vajec a výrobků z vajec, koření, polévek, omáček, potravin určených pro zvláštní výživu, nápojů, potravin připravených k přímé spotřebě (JECFA, 2004), sorbetů, instantních směsí na dezerty a instantních pudinků (Hendry et Houghton, 1996). U výrobků, kde je zapotřebí dosáhnout odlišného odstínu či odstín upravit na žlutý, je kurkumin kombinován s dalším barvivem. Nejčastěji se jedná o barvivo annatto hlavně pro barvení mléka, cukrářských výrobků, koláčů, sušenek (Hendry et Houghton, 1996) a uzených ryb (Scotter, 2011). Vanilková zmrzlina je často barvena směsí kurkuminu a norbixinu.

Kurkumin často dosahuje intenzivního žlutého odstínu už při nízkých koncentracích. Již při 20 ppm je těžké rozpoznat změnu barvy při navyšování dávky, je proto důležité stanovit minimální úroveň potřebného množství (Hendry et Houghton, 1996). Použité hladiny kurkuminu se pohybují od 5 do 500 mg/kg v závislosti na kategorii potravin (JECFA, 2004). Maximální limity kurkuminu pro obarvení potravin v rámci Evropské unie jsou stanoveny nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách, jehož součástí je nyní původní směrnice Evropského parlamentu a Rady 94/36/ES ze dne 30. června 1994 o barvivech pro použití v potravinách. Kurkumin je zde uveden pro použití *quatum satis* do margarínů, minarinu, ostatních tukových emulzí, bezvodých tuků, americana, džemů, rosolů, marmelád, pasturnas (jedlý vnější povrch), sušených granulovaných brambor a bramborových vloček. Při nejvyšším množství 20 mg/kg je možné kurkumin použít do tepelně opracovaných uzených masných výrobků, paštik a sekané. A pro nejvyšší množství 100 mg/kg jsou zde uvedeny Bitter soda a Bitter víno. Dále je uveden seznam potravin, ve kterém je možné kurkumin použít v uvedeném nejvyšším množství. Maximální limity pro různé potraviny (polévky, surimi) se nacházejí v rozsahu 50 až 500 mg/kg s výjimkou jedlých povlaků sýrů a jedlých střívek, u kterých je možné kurkumin dávkovat *quantum satis*.

Potraviny také často mohou procházet v průběhu skladování změnami, mezi něž může patřit peroxidace lipidů vedoucí ke žluknutí. Aby bylo tomuto ději zabráněno, je možné do potravin přidat kurkumin. Ten pak mívá roli antioxidantu, zajišťujícího prodloužení trvanlivosti a skladovatelnosti potravin, čímž se dosáhne lepší bezpečnosti, výživové kvality,

funkčnosti a chutnosti potraviny. Antioxidační aktivita byla zjištěna i u ostatních kurkuminoidů (Jayaprakasha et al., 2006). U kurkuminu bylo dále zjištěno, že vykazuje silnou antioxidační aktivitu srovnatelnou s vitamínem C a E. Kurkumin také může být použit pro zpomalení tvorby oxidačních produktů, udržování kvality a prodloužení životnosti léčiv. (Ak et Gülçin, 2008).

3.3.3 Vliv na zdraví

Kurkumin byl používán v tradiční medicíně po mnoho let. Používal se jako domácí lék na různá onemocnění, včetně chorob žlučových cest, nechutenství, na kašel, jaterní poruchy a revmatismus. Za posledních několik desítek let se stanovila jeho biologická a farmakologická aktivita (Chattopadhyay et al., 2004). Po celá staletí se kurkumin používal jako koření v dávkách až do 100 mg/den. Nedávné klinické studie uvádějí dávku až 8 g/den/osobu bez vedlejších účinků (Shishodia et al., 2005).

Starověké texty indické medicíny popisují použití kurkuminu pro léčbu zánětlivých onemocnění, včetně výronů, otoků po úrazech a břišních problémů. V textech o tradiční čínské medicíně je popisováno použití kurkuminu pro léčbu bolesti břicha. Nejvíce je kurkumin spojován se schopností potlačit zánět. Bylo prokázáno, že kurkumin je účinný při akutních i chronických zánětech (Shishodia et al., 2005).

Protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Kurkumin je silný antioxidant. Ve skutečnosti je kurkumin dokonce 10x silnějším antioxidantem než vitamín E. Kurkumin zabraňuje oxidaci hemoglobinu a inhibuje peroxidaci lipidů. Antioxidační aktivita by mohla být zprostředkována antioxidačními enzymy, jako jsou superoxiddismutáza, kataláza nebo glutathionperoxidáza. A právě potlačení peroxidace lipidů kurkuminem může vést k potlačení zánětu (Shishodia et al., 2005).

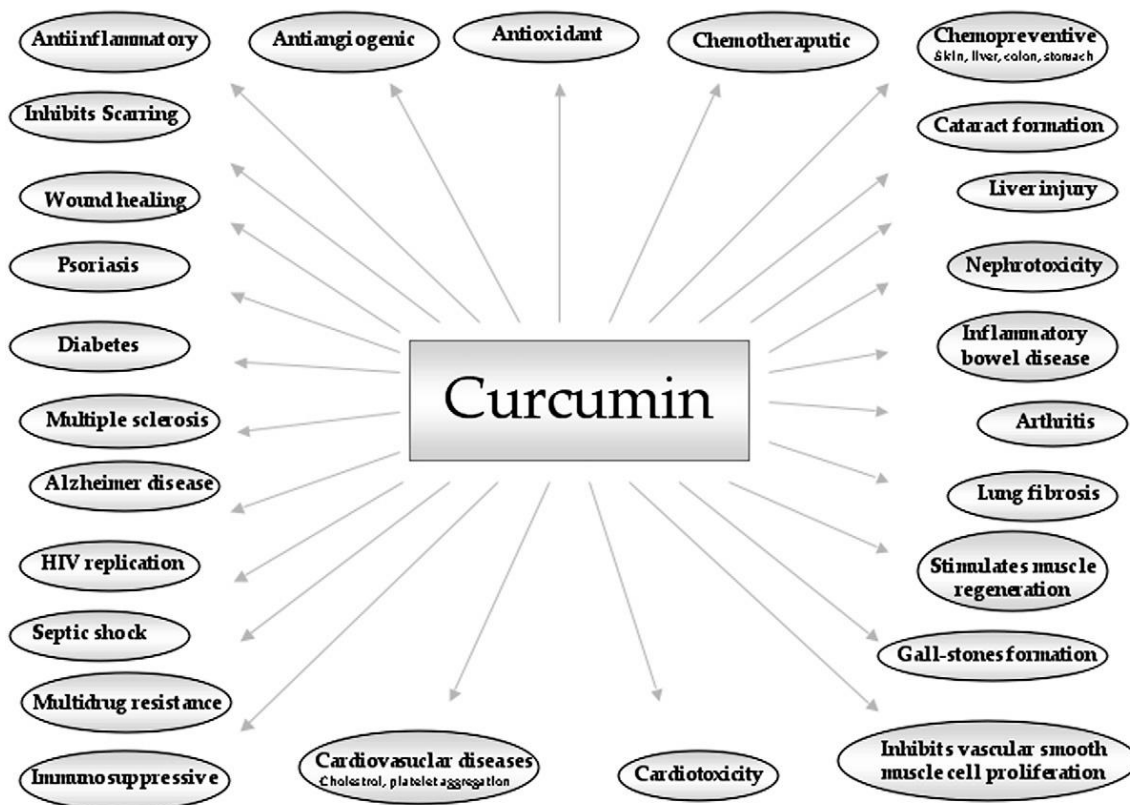
Protirakovinné účinky. Kurkumin má potenciální protirakovinné účinky v různých systémech. *In vivo* potlačuje rakovinu kůže, žaludku, tlustého střeva a jater u myší. Bylo prokázáno, že inhibuje proliferaci široké škály nádorových buněk, včetně karcinomu tlustého střeva, epidermálního karcinomu a karcinomu prsu (Shishodia et al., 2005).

Kardioprotektivní účinky. Kurkumin je účinný proti ateroskleróze, díky tomu že inhibuje šíření periferních krevních mononukleárních buněk a buněk hladkého svalstva cév. Dále působí proti infarktu myokardu, tím že zabraňuje oxidaci LDL proteinu a inhibuje agregaci krevních destiček (Shishodia et al., 2005).

Kožní nemoci. Kurkumin je účinný proti rakovině kůže, lupénce, sklerodermii a dermatitidě. Pomáhá hojení ran, brání tvorbě jizev a hraje také roli při regeneraci svalstva.

Dále může být kurkumin použit při léčbě diabetu II. typu, revmatoidní artritidy, roztroušené sklerózy, Alzheimerovy choroby, idiopatických střevních zánětů, cystické fibrózy (Shishodia et al., 2005). Pomáhá při léčbě plicních a neurologických problémů, ztrátě kostí a svalů, depresích, chronické únavě a neuropatické bolesti (Anand et al., 2008). Pozitivní účinky má také na střevo, protože vlivem kurkuminu dochází ke zvyšování aktivity střevní lipázy, sacharázy a maltázy. Kurkumin chrání játra a ve slinivce zvyšuje aktivitu pankreatické lipázy, amylázy, trypsinu a chymotrypsinu (Chattopadhyay et al., 2004). Všechny pozitivní zdravotní účinky jsou zobrazeny na Obrázku č. 2.

Účinnější než kurkumin mohou být některé jeho analogy. Bylo zjištěno, že fenolické analogy jsou mnohem aktivnější než ty nefenolické. Fenolické skupiny totiž brání navázání dvěma methylovým skupinám do ortho polohy a tím se zvyšuje antioxidační aktivita. Fenolická skupina zachycuje volné radikály a přítomnost methoxy skupin zvyšuje antioxidační efekt (Venkatesan et al., 2000).



Obrázek č. 2: Nemoci léčené kurkuminem (Shishodia, et al., 2005)

Relativně vysoký počet zpráv také naznačuje, že za určitých podmínek by mohl kurkumin vykazovat toxicitu. U kurkuminu ale dochází k rozsáhlému metabolismu ve

střevech a játrech, je tedy mimo gastrointestinální trakt v nanomolárních koncentracích a nelze dosáhnout jeho vysokých koncentrací v plazmě a tkáních po perorálním podání (Burgos-Morón et al., 2010).

Za bezpečnou dávku při krátkodobém příjmu je považováno množství 8 g/den/osobu. U dávky 0,9 až 3,6 g denně po dobu 1 - 4 měsíců může dojít k některým nežádoucím účinkům, včetně nevolnosti a průjmu (Burgos-Morón et al., 2010). V jiné studii bylo zjištěno, že dávka 12 g/den po dobu 3 měsíců je lidmi dobře tolerovaná, a tedy vhodná pro dlouhodobé studie chemopreventivních účinků kurkuminu (Lao et al., 2006).

V průběhu let bylo provedeno několik studií zabývajících se bezpečností kurkuminu *in vivo*. Byly provedeny testy na myších, u kterých byla zjevná anemie způsobená ovlivněním metabolismu železa kurkuminem (Jiao et al., 2009). Kurkumin může také podporovat zhoršení rakoviny plic u myši s nádorem (Dance-Barnes et al., 2009). V dávce 100 mg/kg podávané perorálně po dobu šesti po sobě jdoucích dnů způsobuje kurkumin žaludeční vředy u potkanů albínů vlivem výrazného snížení obsahu mucinu v žaludeční šťávě (Gupta et al., 1980). Je také prokázáno, že kurkumin může způsobovat poškození DNA a chromozomální změny a to jak *in vitro*, tak i *in vivo* v koncentracích obdobných těm, které mají prospěšný efekt. Dále v experimentálních studiích bylo prokázáno, že nízké koncentrace kurkuminu vyvolávají antioxidační efekt, ovšem naopak dávky vyšší zvyšují buněčné hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS) (Burgos-Morón et al., 2010). Kurkumin a jeho deriváty podávané myším ve vysokých dávkách a po delší dobu mohou být toxické pro játra (Kandarkar et al., 1998).

3.4 Stabilita a formy stabilizace kurkuminu

Kurkumin, je řazen mezi přírodní potravinářská barviva. Ta bývají často mnohem více citlivá na pH, teplotu nebo světlo. Tyto skutečnosti jsou ovšem poněkud překvapivé, protože *in vivo* se barvy zdají být poměrně stabilní (Wissgott et Bortlik, 1996).

3.4.1 Vliv pH

Kurkumin dosahuje žlutého zbarvení při hodnotách pH 1 – 7 a při pH > 7 se barva mění na červenou (Hendry et Houghton, 1996; Tønnesen et Karlsen, 1985a; Tønnesen et Karlsen, 1985b). Tři kurkuminoidy obsaženy v kurkumě jsou reagující podobně na změny pH (Price et Buescher, 1997). Při pH 1 – 6 dochází k velmi pomalému odbourávání kurkuminooidů, s čímž se můžeme setkat v žaludku při konzumaci potravin (Pan et al., 1999).

Při pH od 7,5 do 10,2 dochází k rychlé degradaci kurkuminoidů a v rozmezí pH 10,2 až 11,95 je degradace zpomalena (Bernabé-Pineda et al., 2004; Price et Buescher, 1997).

Kurkumin lze rozpustit v 0,1 M hydroxidu sodném, čímž je dosaženo alkalického pH. Ovšem v tomto prostředí je degradován do 1 hod., zatímco kurkumin s přidavkem telecího séra dosahuje vyšší stability. U něj dochází k degradaci < 20 % kurkuminu během 1 hod. a po inkubaci 8 hod. je zůstatek kurkuminu na úrovni 50 %. Ve fosfátovém pufru při pH 7,2 - 7,4 je po 30 minutách inkubace rozloženo až 90 % kurkuminu (Wang et al., 1997). V těchto podmínkách je možné kurkumin stabilizovat přidavkem glutationu, N-acetyl-L-cysteinu nebo přidavkem kyseliny askorbové (Oetari et al., 1996).

U bisdemethoxykurkuminu bylo stanoveno, že v alkalickém prostředí je odolnější vůči degradaci v porovnání s ostatními kurkuminoidy. Byly zjištěny poločasy 0,4 – 99 hod. pro kurkumin, 1 – 1700 hod. pro demethoxykurkumin a 4 – 2200 hod. pro bisdemethoxykurkumin. Ukazuje se tedy, že absencí methoxy skupin je zvyšována stabilita v alkalickém prostředí (Price et Buescher, 1997). Přidáním acidifikačních prostředků (např. kyseliny citrónové, kyseliny gentisové, kyseliny gallové, kukuřičného škrobu či emulgačního činidla) lze zmírnit degradaci kurkuminu v alkalickém prostředí (Delgado-Vargas et Paredes-López, 2003).

Při pH 7,2 jsou hlavními produkty degradace *trans*-6-(4'-hydroxy-3'-methoxyfenyl)-2,4-dioxo-5-hexenal (Wang et al., 1997), tetrahydrokurkumin (Pan et al., 1999), zatímco vanilin, ferulová kyselina a feruloylmethan jsou minoritními rozkladnými produkty. S narůstající inkubační dobou je zvyšováno množství vanilinu (Wang et al., 1997). Při fyziologickém pH může ve vodném pufru docházet k degradaci formou autooxidace, což je přímým důsledkem antioxidační činnosti kurkuminu. Ten vycytává kyslík, čímž je spuštěna řetězová radikálová reakce a důsledkem toho je tvorba deoxygenovaného produktu bicyklopentadienu. Jako další produkty degradace byly zachyceny malá množství vanilinu a hexahydrokurkuminu. Degradace tohoto typu může být také zprostředkována peroxidázami či oxygenázami (Griesser et al., 2011).

3.4.2 Vliv světla

Jak již bylo uvedeno, kurkumin je citlivý na světlo. Bylo ovšem zjištěno, že kationt Al^{3+} snižuje úroveň fotodegradace. Vliv kationtu byl zkoumán v okurkovém láku. Poločas v produktech bez kationtu byl stanoven na 7,5 hod., ovšem po přidavku Al^{3+} byl poločas prodloužen na 10,5 až 14 hod. Kromě toho absorpční spektrum kurkumy v láku nebylo změněno (Delgado-Vargas et Paredes-López, 2003). Chatterjee et al. (1998) zjistili, že gama

záření v dávkách 1,5 až 10 kGy neovlivňuje množství kurkuminu v ethanolovém extraktu kurkumy ani bezprostředně po ozáření ani při skladování po 12 měsících. Toho by mohlo být využito pro zlepšení mikrobiologické kvality výrobků s kurkumou, vzhledem k tomu, že antioxidační aktivita je zachována i po ozáření. Joshi et al. (2009) porovnávali stabilitu barvy pryskyřice kurkumy v kapalné i krystalické formě. Vzorky byly vystaveny monochromatickému světlu po dobu jedné hodiny. Měření barevné intenzity probíhalo v intervalu 10 minut na spektrofotometru. Výsledkem jejich bádání bylo, že světlo nemá vliv na intenzitu barvy po dobu jedné hodiny.

Khurana et Ho (1988) uvádí při fotochemické degradaci jako rozkladné produkty vanilin, p-hydroxybenzaldehyd, aldehyd ferulové kyseliny, p-hydroxybenzoovou kyselinu, vanilovou a ferulovou kyselinu.

3.4.3 Vliv teploty

Hendry et Houghton (1996) uvádějí, že kurkumin vykazuje velmi dobrou stabilitu při vystavení vyšším teplotám, např. při pečení. I přesto se řada autorů snaží dosáhnout lepší stability kurkuminu při působení vyšších teplot na jeho molekulu. Zebib et al. (2010) se zabývali stabilizací kurkuminu formou tvorby komplexů s dvojmocnými kationty (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Se^{2+}). Samotný kurkumin zde byl stabilní do teploty 160 °C. Po dosažení teploty 400 °C byl kurkumin kompletně degradován. Stabilita komplexů oproti samotnému kurkuminu byla za stejný časový úsek mnohem vyšší. Další možností zvýšení odolnosti kurkuminu je aplikace kationtu Al^{3+} . Bylo zjištěno, že napomáhá zvýšení odolnosti vůči vyšším teplotám u roztoku láku z okurek, čímž se podílí na zabránění tepelného zničení kurkuminoidů v nálevu solného roztoku při teplotách 40 až 90 °C (Delgado-Vargas et Paredes-López, 2003). Kromě toho bylo zjištěno, že množství kurkuminu v ethanolovém extraktu kurkumy je stabilní po dobu 12 měsíců při teplotách okolí 25 - 32 °C (Chatterjee et al., 1998). Joshi et al. (2009) porovnávali stabilitu barvy oleoresinu kurkumy v kapalné a krystalické formě. Barvu měřili spektrofotometricky po 10, 30 a 60 minutách tepelného opracování ve vroucí vodní lázni pro kapalnou formu a v sušárně při teplotě 100 °C pro krystalickou formu barvy. Došlo k poklesu intenzity barvy o 3 %, 5 % a 12 %. Při zahřívání po dobu 10, 30 a 60 minut. Kapalný i krystalický vzorek byl také stabilní při pokojové teplotě po dobu 6 měsíců. Za tuto dobu byla snížena intenzita barvy na 80 % z původní hodnoty. Byla také studována tepelná stabilita u vodných a olejových forem kurkumy aplikovaných na extrudované výrobky. Stabilita byla hodnocena v rozsahu teplot 125 až 155 °C. Oba produkty byly dobré stability, ovšem lepší byla naměřena u kurkumy rozpuštěné ve vodném prostředí (Delgado-Vargas et Paredes-

López, 2003). Sowbhagya et al. (2005) se také zabývali extrudovanými výrobky. Sledovali změnu jasů, odstínu a sytosti barvy kurkuminu a tartrazinu aplikovaných na extrudovaný výrobek, který byl skladován při 27 °C. Kurkumin vykazoval totožnou míru stability po dobu 4 týdnů jako synteticky vyráběný tartrazin a po 10 týdnech došlo ke ztrátě pouze 22,8 % kurkuminu. Proto při použití do extrudovaných výrobků může být tartrazin zastoupen kurkuminem. Suresh et Srinivasan (2009) se zaměřili na stabilitu kurkuminu při tepelném zpracování. Zjistili, že molekula kurkuminu je citlivá na teplo na prvním atomu uhlíku alkylového řetězce, který spojuje obě fenylové skupiny. Kurkumin byl degradován na několik sloučenin, z nichž tři hlavní byly charakterizovány jako ferulová kyselina, vanilin a kyselina vanilinová.

3.4.4 Ostatní

Intenzita barvy solubilizovaného kurkuminu může být snížena při vystavení SO₂, a to hlavně při použití koncentrace vyšší než 100 ppm (Hendry et Houghton, 1996).

Degradace kurkuminu je také ovlivněna obsahem kyslíku a dusíku v atmosféře. Pořadí stability je kurkumin > demethoxykurkumin > bisdemethoxykurkumin s poločasem v rozmezí 8,6 až 10,4 hod. na vzduchu a 9,0 až 12,0 hod. v dusíkové atmosféře. V dusíkové atmosféře jsou tedy kurkuminoidy stabilnější (Delgado-Vargas et Paredes-López, 2003).

3.4.5 Formy stabilizace

Hydrofobní charakter této polyfenolické sloučeniny spolu s rychlým metabolismem, fyzikálně-chemickou a biologickou nestabilitou přispívá k jeho špatné biologické dostupnosti. K vyřešení tohoto problému bylo navrženo několik možných přístupů, jako zapouzdření kurkuminu do liposomů (Niu et al., 2012; Thangapazham et al., 2008), polymerních micel (Bisht et al., 2007), nanočástic (Yallapu et al., 2010), tvorba komplexu s cyklodextrinem (Prasad et al., 2012; Tomren et al., 2007; Tønnesen et al., 2002), polymerními konjugáty (Dey et Sreenivasan, 2014; Manju et Sreenivasan, 2010; Mitra, 2008; Wang et al., 2012; Yu et Huang, 2010) či tvorba mikroemulze (Lin et al., 2009; Wang et al., 2008). V mnoha zemích v rámci potravinářského průmyslu je kurkumin používán ve směsi s emulgátorem. V této formě je obsah kurkuminu 4 až 10 % a je snadno mísitelný s vodou. Pro tyto účely je také často upřednostňován Polysorbát 80, protože je ideálním nosičem pro kurkumin. Komerčně dostupnými jsou i další formy, včetně suspenzí kurkuminu v rostlinném oleji a disperzí ve škrobu, ovšem tyto formy nejsou tak často aplikovány (Hendry et Houghton, 1996).

3.5 Metody stanovení kurkuminu

Pro izolaci a kvantifikaci kurkuminoidů se používá několik analytických metod, včetně metod spektrofotometrických, které jsou užitečné pro stanovení celkového obsahu kurkuminoidů, ovšem nelze jimi stanovit jednotlivé složky v oddenku. Byly také popsány různé metody HPLC, které jsou jedněmi z nejvíce rozšířených technik pro oddělení kurkuminoidů. Stupeň separace závisí především na typu kolony a použitém eluentu (Anabula et al., 2014). Pro analýzu kurkuminu v biologických vzorcích byla využita HPLC metoda s fluorescenčním detektorem (Schiborr et al., 2010). Byly také vyzkoušeny metody s hmotnostní spektrometrií, jako je HPLC-MS pro stanovení kurkuminu v plazmě (Yang et al., 2011). Další možností je HPLC s použitím detektoru diodového pole, jehož výhodou je schopnost selektivně analyzovat studované analyty (Korany et al., 2013) nebo HPLC s elektrochemickou detekcí (Long et al., 2014). Cheng et al. (2010) vyvinuli metodu UPLC pro kvantifikaci kurkuminoidů. Zjistili, že metoda poskytuje rychlejší analýzu a lepší rozlišení, než je dosaženo u konvenčního HPLC. Kapilární elektroforéza (CE) je alternativou k HPLC pro analýzu kurkuminoidů. Ve srovnání s HPLC není u CE pro separaci vyžadována drahá chromatografická kolona a lze použít nízký objem rozpouštědel pro separaci (Anabula et al., 2014; Lechtenberg et al., 2004). Metody plynové chromatografie (GC) v důsledku nízké volatility a tepelně labilní povahy kurkuminoidů nemohou být využity (Jayaprakasha et al., 2005). Pro stanovení celkových i jednotlivých kurkuminoidů byla použita i metoda vysoce účinné tenkovrstvé chromatografie (HPTLC) s DAD (Pozharitskaya et al., 2008). Separace kurkuminoidů lze docílit i tenkovrstvou chromatografií (TLC) nejčastěji za použití silikagelu (Perét-Almeida et al., 2005). Rege et al. (2014) pro stanovení využili sloupcové chromatografie a kurkumin dále analyzovali pomocí infračervené spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FTIR), hmotnostní spektrometrií (LC-MS) a nukleární magnetickou rezonancí (NMR), kterou také použili Gören et al. (2009). Metodu sloupcové chromatografie využili pro extrakci kurkuminoidů také Zhan et al. (2011).

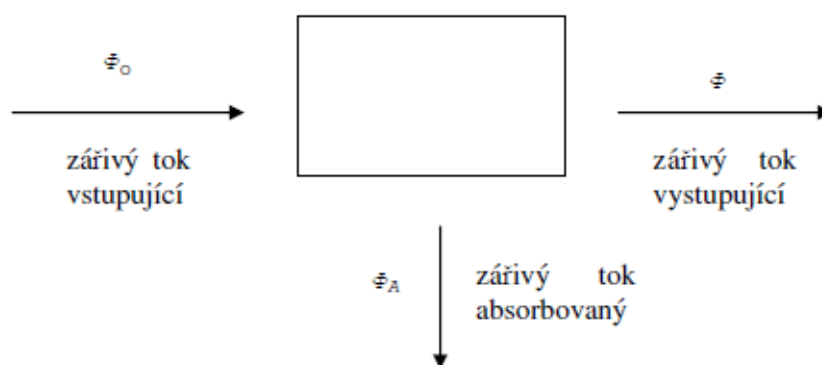
3.5.1 Spektrofotometrie

Molekuly mají schopnost pohlcovat elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Je to dáno tím, že mohou existovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Jestliže má molekula přejít ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší, musí absorbovat záření o frekvenci ν , která právě odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami (Sinica, n.d.).

Energeticky nejnáročnější jsou přechody mezi elektronovými energetickými hladinami. Běžně jsou způsobeny absorpcí ultrafialového (190 až 400 nm) a viditelného záření (400 až 800 nm). Absorpci záření lze měřit na přístrojích, které nazýváme absorpční spektrofotometry. Při absorpčním měření je ze vstupujícího toku záření Φ_0 část absorbována vzorkem (absorbovaný zářivý tok Φ_A) a v ideálním případě zbytek projde a je zaznamenán jako vystupující zářivý tok Φ (Sinica, n.d.).

Podíl zářivých toků Φ a Φ_0 se nazývá propustnost neboli transmitance.

Na většině spektrofotometrů lze také odečíst hodnotu absorbance A , tj. záporný logaritmus propustnosti: $A = -\log \tau = \log (\Phi_0 / \Phi)$



Obrázek č. 3: Princip spektrofotometrie (Sinica, n.d.)

Konstrukčně se spektrofotometry dělí na jednopaprskové a dvoupaprskové. Absorpční spektrofotometr je tvořen čtyřmi základními částmi:

1. Zdroj záření
2. Monochromátor - je tvořen vstupní a výstupní štěrbinou, rozkladným prvkem a zrcadlovou nebo čočkovou soustavou. Rozkladným prvkem může být hranol nebo reflexní mřížka.
3. Absorpční prostředí - tvoří kyveta s roztokem.
4. Detekční systém - je složen z detektoru záření a elektronického zařízení na zpracování jeho odezvy. Detektor převádí zářivý tok na elektrický signál (Sinica, n.d.).

Svazek polychromatického záření vycházející ze zdroje dopadá na vstupní štěrbinu monochromátoru. Po rozkladu na reflexní mřížce nebo hranolu vychází z výstupní štěrbinou svazek přibližně monochromatického záření, které je charakterizováno intervalem vlnových délek, které projdou výstupní štěrbinou. Střední hodnotou tohoto intervalu je nastavená vlnová délka. Velikost intervalu je závislá na konstrukci přístroje. Po průchodu absorpčním

prostředím dopadá monochromatické záření na fotoelektrický detektor a vzniklý fotoproud se převádí na digitální výstup (Sinica, n.d.).

3.5.2 HPLC

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. Tato metoda je vhodná pro dělení organických méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách.

HPLC je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází, která je vždy kapalná. Stacionární fáze je zakotvená v chromatografické koloně. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. Uplatňují se interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází a sorpce analytů na stacionární fází.

Vysoce účinný kapalinový chromatograf pracuje tak, že jsou vzorky dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Ta unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru. Měřenou veličinou je fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost. Výstupem z detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, tj. chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku. Kvantitativní analýza se provádí na principu odečtení výsledku z kalibrační křivky.

Jako náplň kolon (stacionární fáze) se používají polární nemodifikované adsorbenty (silikagel, méně často oxid hlinitý) nebo náplně s chemicky vázanými stacionárními fázemi na silikagelovém nosiči. Jako mobilní fáze se většinou užívá voda, organická rozpouštědla a jejich směsi.

Je-li stacionární fáze polárnější než mobilní fáze, mluvíme o systémech s normálními fázemi. V opačném případě jde o systém s obrácenými fázemi (Anon3, n.d.).

3.5.3 TLC

TLC, dnes nejběžnější plošně uspořádaná chromatografie. TLC znamená Thin Layer Chromatography, česky: tenkovrstvá chromatografie. Jedná se o tenkou vrstvu sorbentu přichyceného na podložku z hliníku, skla či polymeru. Nejběžnějším sorbentem je silikagel. K některým vrstvám výrobci přidávají lumifor, světélkující v UV spektru, nejčastěji při 254nm, nebo 366nm, sloužící vyhodnocování chromatogramu.

K TLC chromatografii je potřebná i chromatografická komora, nádoba ve které probíhá vztlínání mobilní fáze. Pro zdárný průběh chromatografie je nutné, aby se chromatografické komoře nasatily páry mobilní fáze. Do komory se tedy vkládá i arch filtračního papíru, sloužící k urychlení odparu mobilní fáze (Anon4, n.d.).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiály a instrumentace

4.1.1 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byl použit vzorek kořene rostliny *Curcuma longa L.* Jednalo se o krájený kořen (sklizeň 2014) zakoupený u firmy Natura, Waldemar Grešík, Děčín.

4.1.2 Chemikálie

- ethylacetát - čistota: p.a., výrobce: Lachner
- dichlormethan - čistota: p.a., výrobce: Lachner Lachner
- hexan - čistota: p.a., výrobce: Lachner
- methanol - čistota: p.a., výrobce: Lachner
- methanol HPLC super gradient - čistota: p.a., výrobce: Lachner
- tetrahydrofuran - čistota: p.a., výrobce: J. T. Baker
- chloroform - čistota: p.a., výrobce: Lachner
- destilovaná voda - katedra chemie ČZU
- demineralizovaná voda - katedra chemie ČZU
- analytický standard: kurkumin - čistota: $\geq 98,0 \%$, výrobce: Fluka AG

4.1.3 Přístroje

- elektrický kávomlýnek, Gorenje
- analytické váhy, Kern
- sušárna Venticell 111, Brněnská medicínská technika a.s.
- třepačka vratná, GLF 3006, Unimed
- rotační vakuová odparka, Heating Bath B-490, BÜCHI
- elektromagnetické míchadlo TetraCon® 325, WTW
- spektrofotometr Heλios γ, Thermo Electron Corporation
- kapalinový chromatograf Ultimate 3000, Dionex, Thermo Scientific™
 - pumpa, Dionex
 - dávkovač, Dionex
 - kolona, Zorbax Extend - C18, 3 x 250 mm, 5 μm, Agilent
 - předkolona, Security Guard Column - C18, 4 x 3,0 mm, Phenomenex
 - detektor PAD (photodiode array detector), Dionex
- přístroj pro přípravu demineralizované vody Simplicity®UV, Millipore

4.1.4 Pomůcky

- skleněné desky na tenkovrstvou chromatografii Kieselgel 60 F₂₅₄, rozměr 20 cm x 20 cm, koncentrační zóna 2,5 cm x 20 cm, vrstva 0,25 mm, Merck
- aluminiové destičky na tenkovrstvou chromatografii Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck
- spektrofotometrické plastové kyvety, 1,5 ml, Brand
- membránové filtry PVDF 0,45 μm, Chromservis
- vialky, Clear Snap-it, 2 ml, Thermo Fisher Scientific
- víčka na vialky, polypropylen, Clear Snap-it, 11 mm, Thermo Fisher Scientific
- pipety Acura: 10 - 100 μl; 100 - 1000 μl; 0,5 - 5 ml
- dělicí nálevky, kádinky, destilační baňky, odměrné baňky (5 ml, 10 ml, 25 ml, 100 ml), odměrné válce, kapkovitá baňka
- filtrační aparatura s filtračním papírem (č. 4, 150 mm)
- hliníková vysoušečka s víčkem
- sítko, skleněná vana na TLC, skleněné lahvičky s víčky, vodní lázeň, plastové injekční stříkačky, laboratorní kovové lžičky, navažovací papír

4.1.5 Programy

- Microsoft Office 2007 Excel, Microsoft
- Vision 32, Thermo Electron Corporation
- Chromeleon 6.8, Thermo Fisher Scientific

4.2 Metody

4.2.1 Stanovení sušiny

Na analytických vahách bylo odváženo 5 g vzorku s přesností 0,001 g namleté sušiny do hliníkové vysoušečky s víčkem. Vzorek byl sušen v sušárně Venticel při teplotě 103 °C po dobu 48 hodin do konstantní hmotnosti.

4.2.2 Příprava standardů

4.2.2.1 Kurkumin (CC)

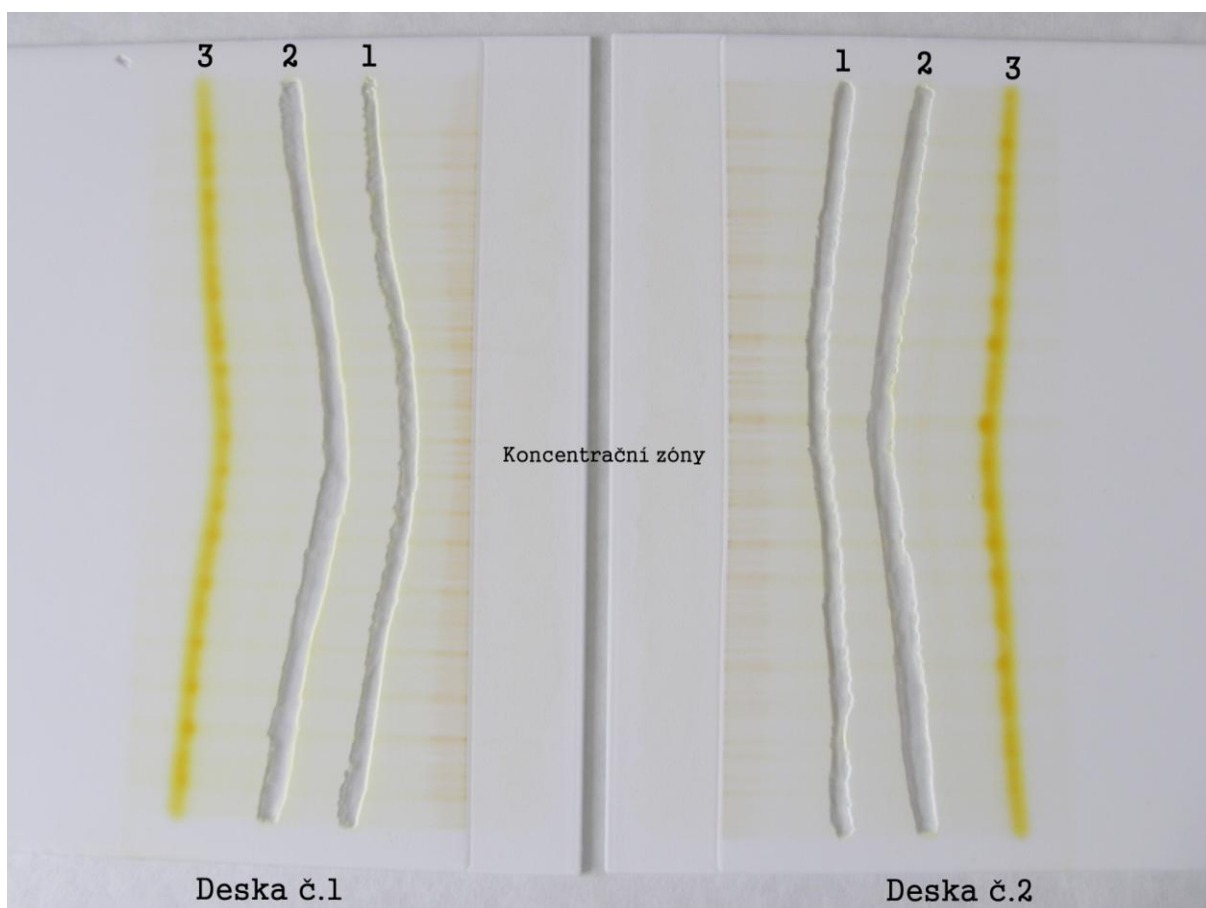
Standard kurkuminu o hmotnosti 10 mg byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněn po rysku methanolem. Vytvořený pracovní roztok byl důkladně promíchán a následně byl použit pro přípravu kalibrační řady roztoků standardu. V době kdy nebyl roztok používán, byl uložen v mrazničce při teplotě minus 18 °C bez přístupu světla.

4.2.2.2 *Demethoxykurkumin (DMC) a bisdemethoxykurkumin(BDMC)*

Příprava roztoku kurkumy: Krájený kořen kurkumy byl rozemlet na elektrickém mlýnku a následně byl prosát přes sítko, aby zůstal pouze jemný prášek. Z něj bylo odváženo 10 g s přesností na 0,001 g do 100 ml baňky. Do ní bylo přidáno 50 ml methanolu a vzniklý roztok byl třepán na třepačce 30 minut pro zlepšení extrakce kurkuminoidů z kořene kurkumy. Poté byl vzorek doplněn methanolem po rysku, promíchán a filtrován přes filtrační aparaturu za použití filtračního papíru č. 4. Vzniklý roztok byl poté použit k izolaci DMC a BDMC.

Příprava elučního roztoku: Odměrným válcem bylo odměřeno 50 ml chloroformu a do něj odpipetováno 2,5 ml methanolu, čímž byl vytvořen poměr rozpouštědel 20:1 (dle autorů Lee et Choung, 2011 a Paramasivam et al., 2009). Roztok byl důkladně promíchán a použit jako eluát pro tenkovrstvou chromatografii při izolaci DMC a BDMC.

Izolace DMC a BDMC: Pro izolaci byly použity dvě skleněné desky pro tenkovrstvou chromatografii se silikagelem. Na každou desku bylo odpipetováno 400 µl roztoku filtrované kurkumy. Celkem tedy bylo použito pro izolaci 800 µl roztoku kurkumy. Desky byly vloženy do roztoku eluátu (chloroform a methanol v poměru 20:1) ve skleněné chromatografické vaně s víkem, který byl 10 minut předtím nalit do vany pro nasycení vzduchu párami rozpouštědla. Desky byly vyvíjeny v eluátu 35 minut a poté byly z vany vyjmuty a ponechány v zapnuté digestoři na 10 minut do úplného vysušení. Poté byly opět vloženy do vany s rozpouštědly na 35 minut, čímž bylo dosaženo lepší separace kurkuminoidů a oddělení dalších nečistot. Po opětovném vysušení byly jednotlivé barevné skvrny z obou desek seškrábány na navažovací papír. Jednalo se o barevné skvrny č. 1 a 2, viz obrázek č. 4, odpovídající BDMC a DMC (pořadí určeno dle retenčních faktorů popsanych autory Paramasivam et al., 2009). Barevná skvrna č. 3 představovala CC, který nebylo třeba izolovat, protože byl dostupný koutpený standard, každopádně i přesto bylo při optimalizaci metody ověřeno, že poslední skvrna odpovídá kurkuminu. Vzhledem k použití dvou desek byly vždy smíchány dvě barevné skvrny z desky č. 1 a desky č. 2 odpovídající totožnému analytu (určeno dle pořadí od koncentračních zón). Získaný prášek byl následně promýván methanolem přes fritu do předem zvážených skleněných baněk s víčkem. Když již byl filtrovaný roztok čirý, byly lahvičky umístěny do kapkovité baňky a na vakuové rotační odparce byl methanol odpařen při teplotě 40 °C bez rotace. Po odpaření rozpouštědla byly lahvičky se vzorky zváženy. Bylo získáno 0,6 mg DMC a 0,8 mg BDMC. Tyto analyty byly naředěny 1 ml methanolu, důkladně promíchány a vzniklé pracovní roztoky byly použity pro přípravu kalibračních roztoků standardů DMC a BDMC.



Obrázek č. 4: Desky na TLC se seškrábanými analyty. 1 - BDMC, 2 - DMC, 3 - CC

4.2.3 Příprava kalibračních roztoků a měření kalibrační řady

Kurkumin: Byla použita kalibrační řada 5 roztoků o koncentracích 5 - 100 $\mu\text{g/ml}$. Z pracovního roztoku standardu CC (0,4 mg/ml) vždy bylo odpipetováno množství uvedené v tabulce č. 3 do odměrné baňky o objemu 10 ml a bylo doplněno po rysku methanolem. Dále byly roztoky kalibrační řady důkladně promíchány a proměřeny na HPLC.

Tabulka č. 3: Kalibrační řada pro standard kurkumin

	Skutečná koncentrace na 10 ml [μg]	Pipetované množství pracovního roztoku [ml]
roztok č. 1	50	0,125
roztok č. 2	200	0,5
roztok č. 3	400	1
roztok č. 4	800	2
roztok č. 5	1000	2,5

Demethoxykurkumin: Byla použita ředící řada o koncentracích 10 - 50 µg/ml. Z roztoku standardu DMC (0,6 mg/ml) bylo vždy odpipetováno množství uvedené v tabulce č. 4 do 5 ml odměrné baňky a bylo doplněno po rysku methanolem. Dále byly roztoky kalibrační řady důkladně promíchány a proměřeny na HPLC.

Tabulka č. 4: Kalibrační řada pro standard demethoxykurkumin

	Skutečná koncentrace na 5 ml [µg]	Pipetované množství pracovního roztoku [ml]
roztok č. 1	60	100
roztok č. 2	150	250
roztok č. 3	240	400

Bisdemethoxykurkumin: Byla použita ředící řada o koncentracích 10 - 50 µg/ml. Z roztoku standardu BDMC (0,8 mg/ml) bylo vždy odpipetováno množství uvedené v tabulce č. 5 do 5 ml odměrné baňky a bylo doplněno po rysku methanolem. Dále byly roztoky kalibrační řady důkladně promíchány a proměřeny na HPLC.

Tabulka č. 5: Kalibrační řada pro standard bisdemethoxykurkumin

	Skutečná koncentrace na 5 ml [µg]	Pipetované množství pracovního roztoku [ml]
roztok č. 1	80	100
roztok č. 2	200	250
roztok č. 3	320	400

Kalibrační řady pro CC, DMC a BDMC byly proměřeny pomocí metody HPLC za modifikovaných podmínek popsaných autory Price et Buescher (1997): kolona Zorbax Extend C18, 3 x 250 mm, 5 µm; teplota kolony 25 °C; teplota dávkovače 10 °C; mobilní fáze: demineralizovaná voda (A) a tetrahydrofuran (B) v objemovém poměru 55:45 (A:B); isokratická eluce s průtokem 0,800 ml/min; vlnová délka 420 nm. Z výsledků byly následně sestaveny kalibrační křivky v programu Microsoft Excel 2007.

4.2.4 Homogenizace a příprava vzorků

Sirup: V místním hypermarketu byly zakoupeny 4 lahve sirupu Hello Ovocný sirup extra hustý Pomeranč z šarží 07:27/1 a 07:28/1 a minimální trvanlivostí do 13. 8. 2015. Všechny lahve byly přelity do velké 4 l kádinky a 10 minut homogenizovány ručním mícháním pomocí skleněné tyčinky. Prázdné lahve byly vypláchnuty destilovanou vodou

a nechány na vzduchu k vyschnutí. Poté byly zhomogenizované vzorky přelity zpět do lahví, tak aby ve všech bylo zhruba stejné množství sirupu. Připravené sirupy byly označeny čísly 1 - 4. Lahve se sirupem č. 1 a 2 byly obaleny alobalem pro zabránění přístupu světla.

Kurkuma: Do odměrné baňky o objemu 2 l bylo napipetováno 6 ml filtrovaného roztoku kurkumy (stejného jako byl použit pro izolaci kurkuminoidů) a baňka byla doplněna po rysku methanolem pro HPLC. Roztok byl promíchán a zhomogenizovaný roztok kurkumy rozdělen do 4 lahví o objemu 500 ml. Připravené roztoky byly označeny čísly 1 - 4. Lahve s roztokem č. 1 a 2 byly obaleny alobalem pro zabránění přístupu světla.

4.2.5 Skladování vzorků

Lahve se sirupy i extraktem kurkumy byly umístěny do podmínek dle tabulky č. 6. Aby bylo docíleno stejného množství dopadajících slunečních paprsků byly sirupy a roztoky kurkumy umístěny na totožnou lednici, v níž byly zbylé lahve. Umístění zaručilo, že na lahve nedopadaly přímé sluneční paprsky.

Tabulka č. 6: Podmínky skladování vzorků

Sirup či roztok kurkumy	Přístup světla	Teplota
1	NE	prosklená lednice, 5 °C
2	NE	laboratoř, 24 °C
3	ANO	prosklená lednice, 5 °C
4	ANO	laboratoř, 24 °C

4.2.6 Příprava a proměření vzorků

Sirup byl promíchán a do kádinky byl napipetován 1 ml. K němu bylo přidáno 5 ml destilované vody a 7 ml methanolu pro HPLC. Tento roztok byl 5 minut míchán elektromagnetickým míchadlem pro zhomogenizování. Poté z něj bylo odebráno stříkačkou množství cca 1 - 1,5 ml a přes membránový filtr PVDF 0,45 µm byl vzorek přefiltrován do spektrofotometrické plastové kyvety. Stejný postup byl aplikován na všechny testované sirupy. Vzorky sirupů byly dále spektrofotometricky proměřovány.

Pro první měření sirupů byl postup totožný, pouze byl použit homogenát všech 4 sirupů v 4 l kádince, tedy byl použit sirup před rozlitím do lahví.

Roztok kurkumy byl pouze přelit v dostatečném množství do kádinky a 5 minut homogenizován elektromagnetickým míchadlem. Poté z něj bylo odebráno stříkačkou množství cca 1 - 1,5 ml a přes membránový filtr PVDF 0,45 µm byl vzorek přefiltrován do

spektrofotometrické plastové kyvety. Stejný postup byl aplikován na všechny testované roztoky kurkumy. Vzorky kurkumy byly dále spektrofotometricky proměřovány.

Pro první měření kurkumy byl postup totožný, pouze byl použit homogenát naředěné kurkumy v 2 l odměrné baňce, tedy byl použit roztok kurkumy před rozlitím do lahví.

4.2.6.1 UV/VIS Spektrofotometrie

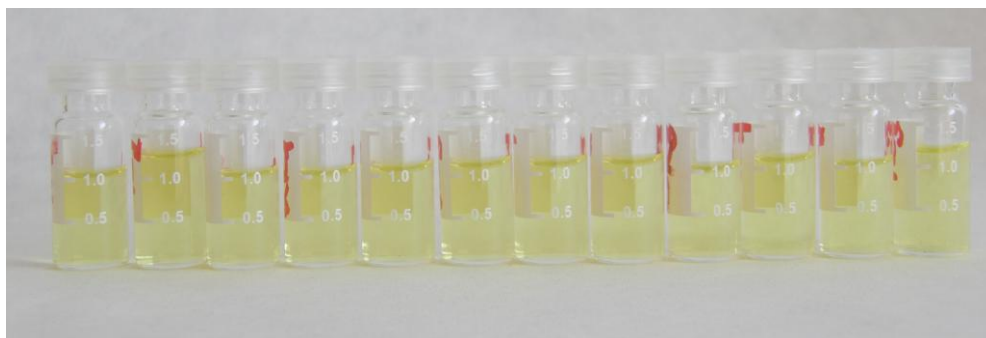
U vzorků byla měřena absorbance na spektrofotometru Helios γ . Vždy na začátku bylo do kyvety nalito rozpouštědlo methanol pro HPLC a na toto rozpouštědlo byl přístroj nulován. Poté již byly proměřovány přefiltrované vzorky sirupů a kurkumy ve třech opakováních. Celkem tedy bylo proměřováno 24 vzorků.

Vzorky byly proměřovány při vlnových délkách 418 nm, 420 nm, 423 nm, 424 nm, 428 nm a 430 nm (první tři vlnové délky byly použity podle autorů Lee et Choung, 2011, ostatní vlnové délky byly navíc) . Po měření byl vzorek přelit do vialky a měřen metodou HPLC.

4.2.6.2 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vzorky ve vialkách byly proměřovány na kapalinovém chromatografu Ultimate 3000 za modifikovaných podmínek popsanych autory Price et Buescher (1997):

- kolona: Zorbax Extend - C18, 3 x 250 mm, 5 μ m
- předkolona, Security Guard Column - C18, 4 x 3,0 mm
- mobilní fáze: demineralizovaná voda (A) a tetrahydrofuran (THF) (B) v objemovém poměru 55:45 (A/B)
- průtok: 0,800 ml/min, od 3. měření průtok 0,600 ml/min z důvodu vysokého tlaku
- teplota kolony: 25 °C
- teplota dávkovače: 10 °C
- nástřik vzorku: 5 μ l
- vlnová délka: 420 nm



Obrázek č. 5: Ukázka vzorků kurkumy pro měření HPLC

4.2.7 Vyhodnocení měření

Obsah kurkuminoidů byl vyhodnocen z plochy píků z kalibrační křivky standardů CC, DMC a BDMC.

4.2.8 Optimalizace metody

Výběr vhodné potraviny: Na začátku pokusu byly testovány potraviny sirup a hořčice. Sirup i hořčice byly rozpuštěny v methanolu a destilované vodě. Pro sirup bylo použito ředění 1 ml/100 ml a u hořčice 5 g/100 ml. Po naředění byly vzorky umístěny do dělicí nálevky a byla snaha extrahovat ze vzorků kurkumin. Na základě vyhlášky Komise 95/45/EC byla pro extrakci kurkuminu zvolena rozpouštědla jako ethylacetát, dichlormethan a hexan. U vzorků ve vodě docházelo k oddělení, u vzorků v methanolu došlo k oddělení pouze v hexanu. Rozpouštědla byla odpařena na vakuové rotační odparce a vzorky byly rozpuštěny v 2 ml methanolu, přefiltrovány do vialek a proměřeny na HPLC. Při stanovení byly kurkuminoidy detekovány pouze u základního sirupu v methanolu, u hořčice bylo množství kurkuminoidů pravděpodobně pod bodem detekce nebo vzhledem k polaritě analytů zůstaly navázány na tuk, který se oddělil na filtru. Bylo tedy rozhodnuto pro měření vzorků sirupů.

Volba vhodného sirupu: Byly testovány 3 druhy sirupů (Hello Ovocný sirup extra hustý Pomeranč, Hello Ovocný sirup extra hustý Červený pomeranč a Dizzy Pomeranč). Nejprve byly všechny sirupy naředěny v poměru 1:5:5 pro sirup:destilovanou vodu:methanol a poté proměřeny pomocí HPLC a spektrofotometru. Bylo ale zjištěno, že vzorky jsou moc kalné pro budoucí stanovení absorbance a ve vzorku Sirupu červený pomeranč nebyl kurkumin pomocí HPLC detekován. U sirupů Hello Ovocný sirup extra hustý Červený pomeranč a Dizzy Pomeranč byl sirup navíc obarven i karoteny. Pro měření byl tedy vybrán sirup Hello Ovocný sirup extra hustý Pomeranč, který neobsahoval žádná jiná přidaná barviva, která by mohla ovlivňovat měření. U sirupu byly následně vyzkoušeny různé poměry rozpouštědel a sirupu. Čirého roztoku bylo dosaženo při poměru 1:5:7 pro sirup:destilovaná voda:methanol.

Izolace DMC a BDMC z kurkumy: Vzorek krájené sušené kurkumy byl rozemlet na ručním mixéru, prosátý přes síto a byl naředěn methanolem v poměru 10 g/100 ml. Přefiltrovaný vzorek byl testován na TLC na poměry rozpouštědel. Jako rozpouštědla byla použita chloroform a methanol, která byla použita autory Lee et Choung (2011). Rozpouštědla byla připravena v poměrech 3:1, 5:1, 10:1, 12:1, 15:1, 20:1, 25:1 a použita pro chromatografii na tenkovrstvé desce s naředěným vzorkem kurkumy. Při vysokém obsahu methanolu byl vzorek velmi dobře unášen, a byl tedy blízko čela. Nejlepších parametrů dosahoval poměr 20:1, a byl tedy zvolen v dalším postupu. Přefiltrovaný vzorek kurkumy byl

nanesen pipetou na skleněnou desku se silikagelem v množství 200 μl a po eluci byly desky se vzorky vysušeny při pokojové teplotě a opět eluovány rozpouštědly. Bylo zjištěno, že při druhé eluci byly odděleny nečistoty a vzorky byly lépe zafixovány. Poté byly vzorky seškrábány a promývány methanolem. Pro odstranění rozpouštědla byla použita vodní lázeň. Ovšem poté nebyl na HPLC detekován demethoxykurkumin, který byl pravděpodobně zničen vlivem vyšší teploty ve vodní lázni. V dalším pokusu bylo na desku aplikováno 350 μl roztoku kurkumy a vzhledem k dobré eluční schopnosti rozpouštědel bylo při následné izolaci aplikováno množství 400 μl na desku. Dále byla pro odstranění rozpouštědel použita vakuová rotační odparka při 40 $^{\circ}\text{C}$. V tomto případě byly detekovány všechny kurkuminoidy. Bylo také vyzkoušeno stanovení prostorů mezi jednotlivými vzorky, u těchto vzorků nebyly kurkuminoidy detekovány.

Optimalizace HPLC: V rámci pokusu byly nejprve vyzkoušeny teploty kolony 20, 25, a 30 $^{\circ}\text{C}$ a poměr tetrahydrofuranu a demineralizované vody pro stanovení HPLC. Nejlépe byly píky odděleny při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$ a za použití THF:voda v poměru 45:55. Aby byl tlak na koloně ideální, byl vybrán průtok 0,800 ml/min, který byl později snížen na 0,600 ml/min, právě z důvodů vysokého tlaku v koloně.

5 VÝSLEDKY

Byla studována stabilita kurkuminoidů v sirupech a methanolovém extraktu kurkumy za použití spektrofotometrické metody a kapalinové chromatografie.

5.1 Průzkum trhu

Literární zdroje uvádějí, že je kurkumin používán do nepřeberného množství výrobků. Pro ověření byl tedy proveden průzkum na trhu, v tabulce č. 7 je uveden seznam vybraných výrobků s obsahem kurkuminu.

Tabulka č. 7: Dostupné výrobky s obsahem kurkuminu

Druh výrobku			
Mléčné výrobky	Instantní potraviny	Cukrovinky	Ostatní
Pribináček banánový	Bramborové knedlíky, Vitana	Orion pistácie	Hořčice plnotučná, Clever
Acidofilní mléko vanilkové, Kunín	Bramborové knedlíky, Natura	Orion limetkový krém	Tyčinky bramborové, Bohemia
Kefírové mléko banánové	Škubánky v prášku, Natura	Primavera erdbeeren, Haribo	Vaječný likér, Granete a Starorežná
Kostíci svačinka	Halušky, Natura	Balla Balla, Haribo	Relax exotica
Florian vaječný likér	Bramborák, Natura	Pico Balla, Haribo	
	Klasický bramborák, Amylon	Deli pistáciová	
	Chlupaté knedlíky, Amylon	Katty Jelly fruit	

5.2 Stanovení stability

Veškeré prezentované výsledky byly měřeny ve vlnové délce 420 nm. V rámci experimentu byly použity metody jako absorpční spektrofotometrie a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Metodou tenkovrstvé chromatografie byly z kurkumy získány jednotlivé kurkuminoidy. Bylo experimentálně zjištěno, že obsah kurkuminu v 10 g oddenku kurkumy o vlhkosti 14,06 % je 500 mg, což odpovídá 5 %. Demethoxykurkuminu bylo získáno 75 mg, což je 0,75 % a bisdemethoxykurkuminu bylo 100 mg odpovídajících 1 %.

Pro vyhodnocení měření byly nejprve vytvořeny kalibrační křivky pro měření metodou absorpční spektrofotometrie a kapalinové chromatografie. Grafy kalibračních křivek

jsou uvedeny v příloze, viz Příloha I. Byly získány regresní rovnice uvedené v tabulce č. 8 i s odpovídajícími regresními koeficienty.

Tabulka č. 8: Regresní rovnice a koeficienty

Použitá metoda	Analyt	Regresní rovnice	Regresní koeficient
UV-VIS spektrofotometrie	CC	$y = 0,1829x + 0,0242$	0,9927
	DMC	$y = 0,0439x + 0,2599$	0,9826
	BDMC	$y = 0,0287x + 0,0031$	0,9998
Kapalinová chromatografie (HPLC)	CC	$y = 0,1374x + 0,2894$	0,9898
	DMC	$y = 0,4027x + 0,1968$	0,9897
	BDMC	$y = 0,2196x - 0,0393$	0,9975

Množství kurkuminoidů bylo zjištěno oběma metodami. V tabulce č. 9 jsou uvedeny množství CC, DMC a BDMC vypočtená z příslušných regresních rovnic. Stanovení obsahu kurkuminoidů pomocí spektrofotometrie je pouze orientační, vzhledem k překrývajícím se absorpčním spektrům je totiž nelze vyjádřit jednotlivě. Výsledky spektrofotometrie ukazují, že DMC a BDMC jsou světlejší, proto aby se docílilo stejné barevné intenzity jako kurkuminu, bylo by potřeba jejich vyšší množství. Pro vyhodnocení byl tedy obsah kurkuminoidů brán jako ekvivalent kurkuminu.

Tabulka č. 9: Množství kurkuminoidů v sirupu č. 1

Číslo týdne	Absorpční spektrofotometrie			Kapalinová chromatografie		
	CC	DMC	BDMC	CC	DMC	BDMC
1	5,1482	16,0802	33,5442	21,8253	1,1425	0,3840
2	5,5378	17,7032	36,0268	24,3408	1,1830	0,3598
3	5,3652	17,1091	35,1182	33,2450	1,6482	0,3089
4	5,5135	17,6020	35,8720	31,6174	1,6403	0,4562
5	6,5198	21,7944	42,2848	39,2304	2,2492	0,5775
6	6,1619	20,3035	40,0044	37,5029	1,8688	0,5239
7	6,1691	20,3334	40,0500	39,2802	2,1332	1,4203
8	5,8681	19,0795	38,1321	35,6171	1,7918	0,8041
9	5,3189	19,7911	34,6316	32,8340	1,5933	0,8574
10	5,2832	16,6426	34,4045	34,0249	1,4480	0,6728

Na základě naměřené absorbance byla testována stabilita analytů v čase v podmínkách tma/chlad, tma/teplo, světlo/chlad a světlo/teplo. Statisticky průkazný rozdíl

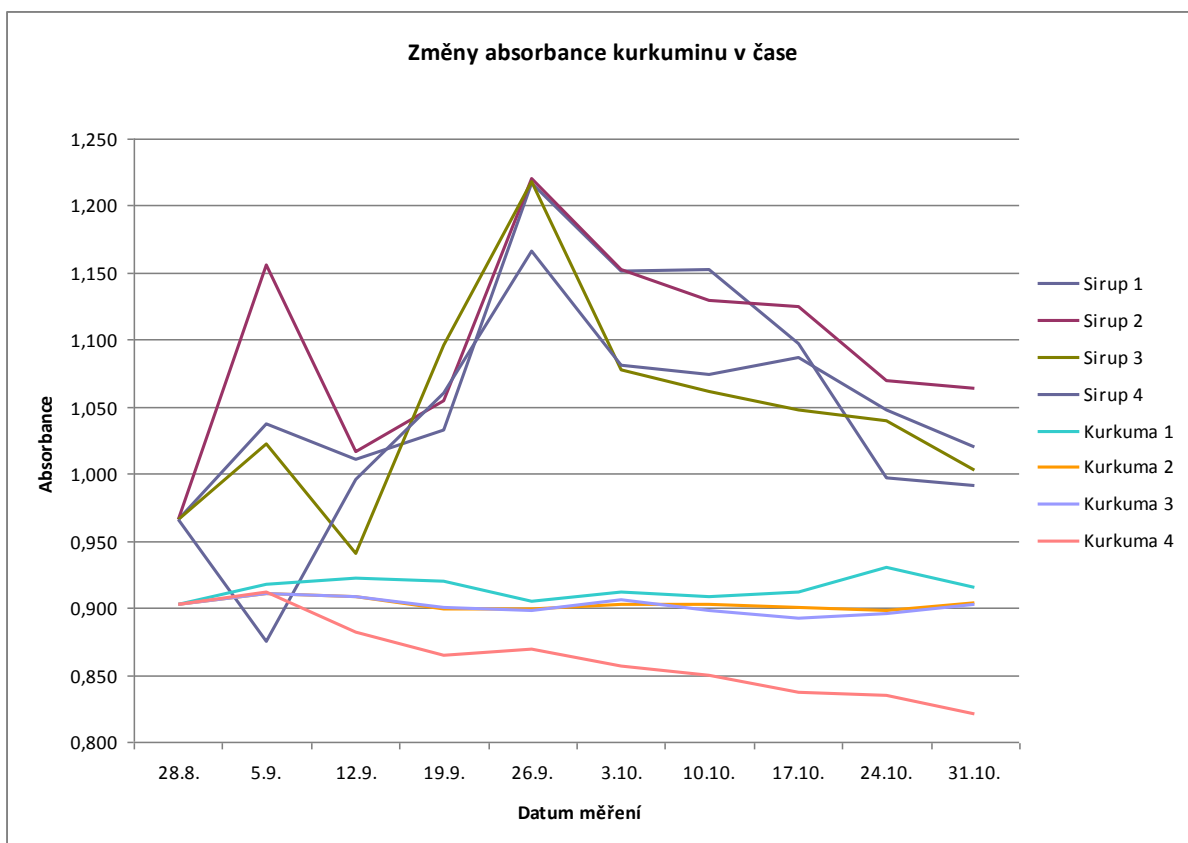
($p < 0,05$) mezi 1. a 10. měřením byl pouze u tří vzorků a to u sirupu č. 2 (tma/teplo) a kurkumy č. 1 (tma/chlad), kde docházelo k nárůstu. Třetím vzorkem byla kurkuma č. 4 (světlo/teplo), kde docházelo k poklesu, který je statisticky průkazný ($p < 0,05$) (viz tabulka č. 10). U ostatních vzorků nebyl statisticky průkazný rozdíl, v průběhu experimentu docházelo pouze ke kolísání množství analytů, tabulky jsou uvedeny v příloze, viz Příloha III.

Tabulka č. 10: Výsledky statistického vyhodnocení metodou ANOVA

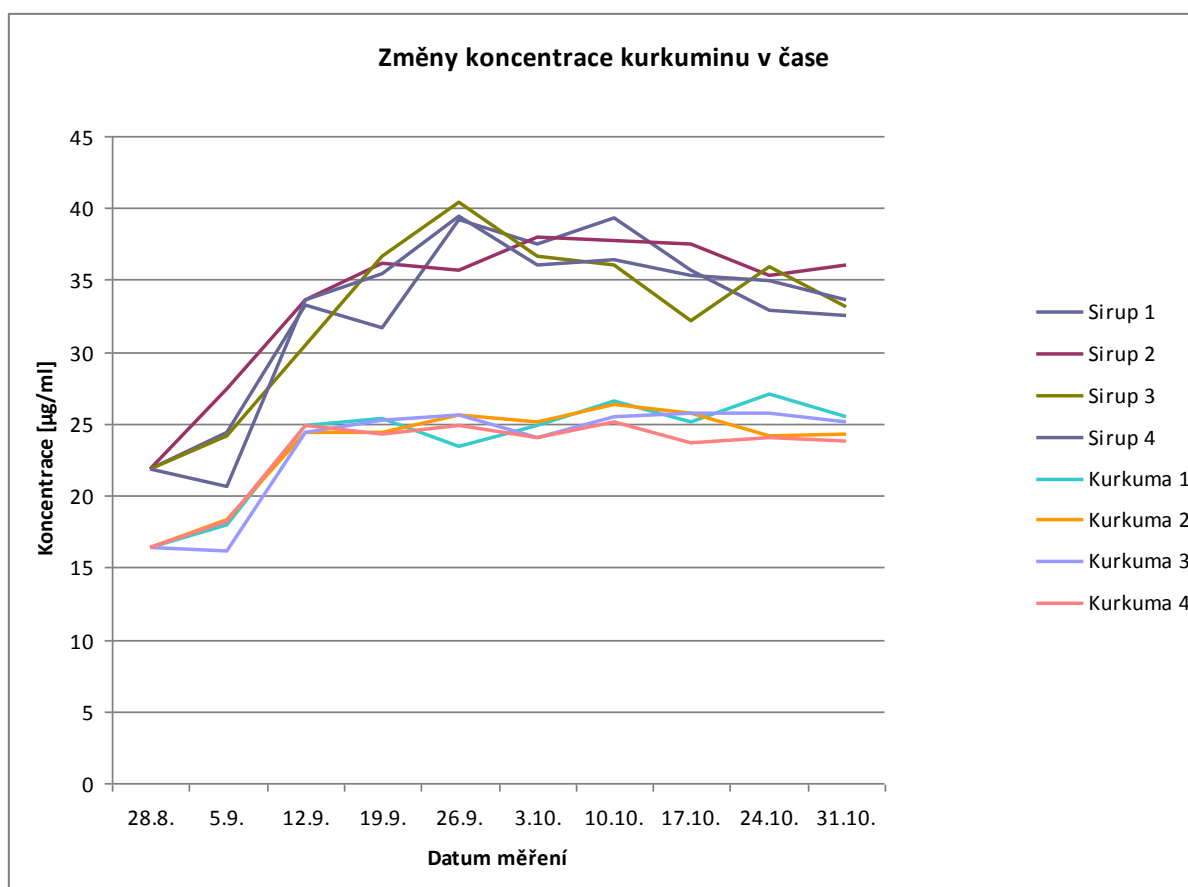
Scheffeho test; proměnná Absorbance Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. $PC = ,00001$, $sv = 20,000$										
Týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,1106	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	0,1106		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3	0,0000	0,0000		0,0004	0,0061	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
4	0,0000	0,0000	0,0004		0,9787	0,1703	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000
5	0,0000	0,0000	0,0061	0,9787		0,0143	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000
6	0,0000	0,0000	0,0000	0,1703	0,0143		0,6070	0,0001	0,0000	0,0000
7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0001	0,6070		0,0124	0,0022	0,0000
8	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0124		0,9993	0,0006
9	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0022	0,9993		0,0034
10	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0034	

Kolísání je také patrné z grafu č. 1 a grafu č. 2, kde je vidět, že v první polovině doby skladování docházelo k nárůstu absorbance. Maximálních hodnot dosahoval kurkumin ve 4. týdnu. U vzorků sirupů došlo k navýšení absorbance o 26 % pro vzorky sirupů č. 1 až 3 a o 20 % pro vzorek sirupu č. 4. Od tohoto momentu dále absorbance i množství kurkuminu klesalo. V 10. týdnu vzorky sirupu dosáhli snížení absorbance o 18 % pro vzorek sirupu č. 1 a o 13 % pro vzorky sirupů č. 2 až 4, tedy téměř na původní hodnoty. Kurkumin obsažený v extraktu kurkumy vykazoval dobrou stabilitu kromě kurkuminu ve vzorku kurkumy č. 4, který byla umístěna v podmínkách světlo/teplo. Z grafu č. 1 je také vidět, že u druhého měření byly velké výkyvy, což by mohlo být způsobeno chybou měření. U DMC a BDMC byl průběh obdobný jen mírnější, tedy docházelo k menším změnám. Nejvýraznějšího poklesu hodnot absorbance i koncentrace došlo u vzorku sirupu č. 1, který byl skladován v podmínkách tma/chlad. Naopak kurkuma č. 4 umístěná ve stejných podmínkách vykazovala nejvyšší stabilitu.

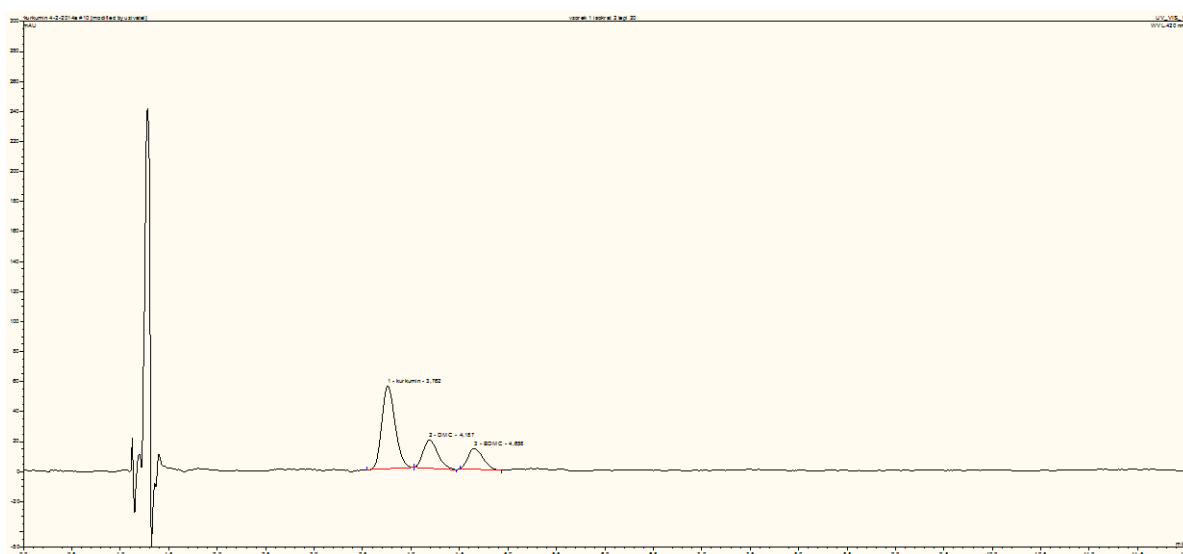
V rámci experimentu bylo také změřeno pH v sirupu a nabývalo hodnoty 2,39.



Graf č. 1: Změny hodnot absorpance ve vzorcích v 420 nm



Graf č. 2: Změny hodnot koncentrace ve vzorcích v 420 nm



Graf č. 3: Ukázka chromatogramu extraktu kurkumy - píky zleva: mobilní fáze, CC, DMC a BDMC

6 DISKUZE

Byla studována stabilita kurkuminoidů v sirupu a methanolovém extraktu kurkumy za použití spektrofotometrické metody a kapalinové chromatografie.

V rámci průzkumu v obchodech bylo zjištěno, že kurkumin se nachází v mnoha výrobcích, nejčastěji se jedná o mléčné výrobky, hořčice a instantní směsi na přípravu pokrmů, kde se očekává nažloutlé zbarvení. Kurkumin se používá k obarvení potravin i v jiných zemích, což dokazují mnohé studie. Lee et al. (2011) se zabývali stabilitou kurkuminoidů v 54 potravinách nejčastěji v rámci koření, cukrovinek, hořčic, zelených čajů, ale i dalších výrobků. Tímto byla potvrzena hypotéza, že kurkumin je běžně používané potravinářské barvivo.

Použitá kurkuma obsahovala 5 % kurkuminu (50 mg/g kurkumy), 0,75 % demethoxykurkuminu (7,5 mg/g kurkumy) a 1 % bisdemethoxykurkuminu (10 mg/g kurkumy). Sogi et al. (2010) uvádějí obsah kurkuminu v rozsahu 4,49 až 12,89 % v závislosti na teplotě, rozpouštědle, době míchání a velikosti částic. Maximální výtěžnosti dosahovali při použití ethanolu a teplotě 60 °C. Z výsledků je patrné, že obsah kurkuminu byl na spodní hranici, což bude způsobeno použitím nižší teploty při stanovení a jiného rozpouštědla (methanol). Long et al. (2013) použili pro stanovení metodu HPLC s elektrochemickou detekcí. Zjistili, že obsah CC, DMC a BDMC odpovídá hodnotám 0,275 mg/g, 0,118 mg/g a 0,200 mg/g. To jsou mnohem nižší hodnoty než byly naměřeny v rámci této práce, je to pravděpodobně způsobeno použitím odlišné metody a mobilních fází. Každopádně z toho je zřejmé, že metoda HPLC s PDA detektorem je efektivnější. Autoři se také liší v rámci obsahu jednotlivých kurkuminoidy. V rámci experimentu bylo získáno menší množství DMC oproti BDMC. Ke stejným výsledkům dospěli Long et al. (2013), naopak Perét-Almeida et al. (2005) měli obsahy kurkuminoidů v pořadí CC>DMC>BDMC. Tyto velké rozdíly v obsazích kurkuminoidů by mohly být způsobeny odlišnými klimatickými podmínkami pro pěstování kurkumy, případně použitím rozdílných rozpouštědel a extrakčních metod.

Z výsledků měření je patrné, že obsah kurkuminu v průběhu 10 týdnů kolísal. Statisticky průkazné rozdíly mezi prvním a posledním týdnem ($p < 0,05$) byly zjištěny pouze u vzorků: sirup č. 2 umístěný v podmínkách tma/tepl (došlo k nárůstu) a u kurkumy č. 1, která byla ve tmě a chladu (došlo také k nárůstu). Statisticky významný pokles byl evidován u vzorku kurkumy č. 4 umístěné na světle a v teple. Z grafu č. 1 (viz výsledky) je evidentní, že obsah kurkuminu nejprve narůstal a poté klesal v různé míře u jednotlivých vzorků. Vzhledem k tomu, že pro měření byl použit sirup s příchutí pomeranče, nachází se ve složení

pomerančová šťáva z koncentrátu. Z toho lze předpokládat i obsah kyseliny askorbové. Je obecně známo, že kyselina askorbová je silným antioxidantem. Nor et al. (2009) zjistili antioxidačními účinky u kurkuminu. JECFA (2004) dokonce uvádí, že kurkumin je osmkrát silnější antioxidant než vitamin E. Na základě těchto informací lze předpokládat, že by ve vzorcích sirupů mohlo docházet u těchto dvou látek k vzájemnému antioxidačnímu ovlivnění. Kurkumin a kyselina askorbová si mohly poskytovat navzájem protony a tím způsobit kolísání množství měřeného analytu. V rámci prvních 4. týdnů docházelo ke zvyšování absorbance sirupů. Mohlo by to být dáno tím, že vzorky byly pokaždé před měřením promíchány a molekuly kurkuminu nacházející se poblíž hladiny či na ní, se dostaly k novému zdroji kyseliny askorbové. Po 4 týdnech docházelo k poklesu obsahu kurkuminu, to by pak mohlo být způsobeno vyčerpáním kyseliny, čímž by nemohlo docházet k obnovení kurkuminu. Kyselina askorbová mohla tedy stabilizovat kurkumin, což by pak odpovídalo zjištění Oetari et al. (1996), kteří se zabývali testováním nejrůznějších antioxidantů na stabilitu kurkuminu a uvádějí, že stabilita kurkuminu je výrazně zvýšena přidávkem kyseliny askorbové. Změny množství kurkuminu by mohly být vysvětleny také tím, že v roztocích sirupů docházelo ke vzniku volných radikálů jak kyseliny askorbové tak kurkuminu, ale tím mohla být spuštěna autooxidace kurkuminu, kdy samotný kurkumin eliminoval vlastní radikály. V roztoku by pak mohlo dojít v důsledku rozkladu molekul enol formy kurkuminu ke snaze nastolit rovnováhu mezi množstvím tautomerů a v roztoku by keto forma přecházela na enol formu. Tím by mohl být vysvětlen nárůst kurkuminu v počátcích měření. K autooxidaci by případně dojít mohlo, protože Griesser et al. (2011) potvrdili možnost autooxidace kurkuminu při dostatku obsahu molekul kyslíku.

Ve vzorcích vystavených chladu docházelo k výraznému poklesu množství kurkuminoidů. To je v rozporu se zjištěním, že roztok kurkumy v těchto podmínkách je nejstabilnější. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že sirup je mnohem složitější soustava látek než extrakt z kurkumy a zároveň se jedná o prostředí vhodné k průběhu tautomerního přesmyku u kurkuminu z enol na keto formu. Kawano et al. (2013) uvádějí, že v roztoku je převaha kurkuminu v enol formě. Obecně je známo, že je tato forma energeticky nevýhodná a kurkumin přechází na výhodnější keto formu. Kawano et al. (2013) se zabývali právě analýzou keto-enol tautomerie kurkuminu a použitím několika metod potvrdili obsah keto a enol formy v roztoku s tím, že větší obsah je u enol formy. Také ale zjistili, že jednotlivé tautomerní formy se eluují v rozdílných časech a nabývají i odlišných UV spekter. V dostupné literatuře (Perét-Almeida et al., 2005; Li et al., 2013; Scotter, 2009) je pro směs kurkuminoidů ale uvedeno absorpční maximum 420 - 425 nm. Bylo předpokládáno, že

v maximu 420 nm jsou měřeny obě tautomerní formy. Vzhledem k tomu, že ale došlo k tak výraznému poklesu množství, je pravděpodobné, že byla měřena pouze enol forma a při jejím úbytku došlo ke zvýšení keto formy.

Průběh změn DMC a BDMC byl obdobný jako u CC, pouze byl více pozvolný a lze tedy říci, že tyto dva kurkuminoidy vykazovaly lepší stabilitu než kurkumin. Tím byla vyvrácena hypotéza, že se kurkumin mění na demethoxykurkumin nebo bisdemethoxykurkumin. Rege et al. (2014) testovali kurkuminoidy na stabilitu a antioxidační aktivitu ve slunečnicovém oleji, za různých hodnot pH a došli k závěru, že DMC a BDMC jsou v kyselém prostředí stabilnější než CC, který díky methoxyskupinám je náchylnější k oxidaci.

Je tedy evidentní, že na stabilitu má vliv i pH. U sirupu bylo stanoveno pH na 2,39. V rámci bakalářské práce byly hodnoceny faktory jako pH, teplota či druh rozpouštědla působící na stabilitu kurkuminu v extraktu kurkumy. V rámci práce, bylo potvrzeno, že v kyselém prostředí je kurkumin nejstabilnější. S těmito závěry také souhlasí řada autorů. Price a Buescher (1997) uvádějí, že u kurkuminu dochází k rychlé degradaci při pH v rozmezí 7,5 – 10,2 a Tønnesen a Karlsen (1985a) zjistily, že degradace kurkuminu ve vodě je vysoká při $\text{pH} > 7,5$. Tímto byla potvrzena hypotéza, že pH ovlivňuje stabilitu.

7 ZÁVĚR

V práci jsem se zabývala studiem stability skupiny kurkuminoidů, kam patří kurkumin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin. Cílem práce bylo stanovit obsahy jednotlivých analytů v potravině a zjistit vliv skladovacích podmínek na jejich stabilitu. Zároveň byly stanoveny hypotézy, že kurkumin je běžně používaným barvivem, že se mění v čase a na jeho stabilitu má vliv pH.

Mnoho autorů se zabývá studiem kurkuminu v potravinách. Je také považován za již běžně používané barvivo, proto bylo zjišťováno, jestli tomu tak je. Kurkumin byl na základě analýzy trhu nalezen v řadě potravin jako jsou mléčné výrobky, hořčice, cukrovinky a další. Tímto byla potvrzena hypotéza, že je kurkumin běžně používané potravinářské barvivo.

Stabilita kurkuminoidů byla měřena po dobu 10 týdnů. V průběhu měření hodnoty absorbance a koncentrace kolísaly. U vzorků sirupu ve tmě a teple a kurkumy ve tmě a chladu, došlo ke statisticky průkaznému nárůstu absorbance ($p < 0,05$), tedy lze říci i stability. U kurkumy na světle a v teple došlo ke statisticky průkaznému poklesu. Demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin měly stejný průběh jako kurkumin, a proto nemohlo dojít k přeměně kurkuminu na tyto látky. Tímto byla vyvrácena hypotéza, že se kurkumin v čase mění na deriváty demethoxy- a bisdemethoxykurkumin.

K nejvýraznějšímu poklesu absorbance docházelo u vzorku sirupu ve tmě a chladu, což bylo nečekané, protože kurkuma v těchto podmínkách je nejstabilnější. Mnoho autorů se zabývá stabilitou kurkuminu pouze ve vyšších teplotách a často krátkodobě, proto by bylo vhodné provést studie i na ovlivnění stability kurkuminu za nižších teplot, které jsou například v lednici.

Skladování vzorku také ovlivňovalo pH, čím byla potvrzena poslední hypotéza. Bylo zjištěno, že kurkumin je nejstabilnější v kyselém prostředí a v prostředí alkalickém dochází k rychlé degradaci.

8 SEZNAM LITERATURY

- Afsan, H., Parveen, N., Khan, N. U., Hadi, S. M. 1999. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chemico-Biological interaction*. 121 (2). 161-175.
- Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H. 2007. Curcumin: the indian solid gold. *Advances in experimental medicine and biology*. 595. 1-75.
- Ak, T., Gülçin, İ. 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological interaction*. 174 (1). 27-37.
- Anand, P., Thomas, S. G., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Sung, B., Tharakan, S.T., Misra, K., Priyadarsini, I. K., Rajasekharan, K. N., Aqqarwal, B. B. 2008. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochemical pharmacology*. 76 (11). 1590-1611.
- Anon1. Potravinářská barviva [online]. *Bezpečnost potravin*. n.d. [cit. 2014-12-07]. Dostupné z <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76567.aspx>>.
- Anon2. Nežádoucí reakce na potravinářské přídatné látky [online]. *Bezpečnost potravin*. n.d. [cit. 2014-12-07]. Dostupné z <http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/prilohy/Nezadouci_reakce_na_PPL.pdf>.
- Anon3. HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie [online]. Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola. n.d. [cit. 2015-04-8]. Dostupné z <<http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>>.
- Anon4. Separační metody v analytické chemii - chromatografie [online]. Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola. n.d. [cit. 2015-04-8]. Dostupné z <<http://anl.zshk.cz/vyuka/separacni-metody.aspx>>.

- Anubala, S., Sekar, R., Nagaiah, K. 2014. Development and validation of an analytical method for the separation and determination of major bioactive curcuminoids in *Curcuma longa* rhizome and herbal product using non-aqueous capillary electrophoresis. *Talanta*. 123. 10-17.
- Bernabé-Pineda, M., Ramírez-Silva, M. T., Romero-Romo, M., González-Vergara, E., Rojas-Hernández, A. 2004. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition. *Spectrochimica acta part A: Molecular and biomolecular spectroscopy*. 60 (5). 1091-1097.
- Bisht, S., Feldmann, G., Soni, S., Ravi, R., Karikar, C., Maintra, A., Maintra A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy [online]. *Journal of nanobiotechnology*. 2007. [cit. 2015-01-03]. Dostupné z <<http://www.jnanobiotechnology.com/content/5/1/3>>.
- Burgos-Morón, E., Calderón-Montaño, J. M., Salvador, J., Robles, A., López-Lázaro, M. 2010. The dark side of curcumin. *International journal of cancer*. 126 (7). 1771-1775.
- Chatterjee, S., Padwal-Desai, S. R., Thomas, P. 1998. Effect of γ -irradiation on the colour power of turmeric (*Curcuma longa*) and red chillies (*Capsicum annum*) during storage. *Food research international*. 31 (9). 625-628.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R. K. 2004. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current science*. 87 (1). 44-53.
- Coultate, T. P. 2008. *Food: the chemistry of its components*. 5nd ed. RSC publishing. Cambridge. p. 501. ISBN: 978-0-85404-111-4.
- Čopíková, J., Uher, M., Lapčík, O., Moravcová, J., Drašár, P. 2005. Přírodní barevné látky. *Chemické listy*. 99 (11). 802-816.

- Dance-Barnes, S. T., Kock, N. D., Moore, J. E., Lin, E. Y., Mosley, L. J., D'Agostino, R. B., McCoy, T. P., Townsend, A. J., Miller, M. S. 2009. Lung tumor promotion by curcumin. *Carcinogenesis*. 30 (6). 1016-1023.
- Dandawate, P. R., Vyas, A., Ahmad, A., Banerjee, S., Deshpande, J., Swamy, K. V., Jamadar, A., Dumhe-Klaire, A. C., Padhye, S., Sarkar, F. H. 2012. Inclusion complex of novel curcumin analogue CDF and β -cyclodextrin (1:2) and its enhanced in vivo anticancer activity against pancreatic cancer. *Pharmaceutical research*. 29 (7). 1775-1786.
- Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. 2003. Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press. Boca Raton (Florida). p. 327. ISBN: 1-58716-076-5.
- Dey, S., Sreenivasan, K. 2014. Conjugation of curcumin onto alginate enhances aqueous solubility and stability of curcumin. *Carbohydrate polymers*. 99. 499-507.
- Downham, A., Collins, P. 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. *International journal of food science and technology*. 35 (1). 5-22.
- Francis, F. J. 1999. Colorants. Eagan press. Saint Paul. p. 144. ISBN: 1-891127-00-4.
- Gilda, S., Kanitkar, M., Bhonde, R., Paradkar, A. 2010. Activity of water-soluble turmeric extract using hydrophilic excipients. *LWT-Food science and technology*. 43 (1). 59-66.
- Gören, A.C., Çikrikçi, S., Çergel, M., Bilsel, G. 2009. Rapid quantitation of curcumin in turmeric via NMR and LC–tandem mass spectrometry. *Food chemistry*. 113 (4). 1239-1242.
- Griesser, M., Pistis, V., Suzuki, T., Tejera, N., Pratt, D. A., Schneider, C. 2011. Autoxidative and cyclooxygenase-2 catalyzed transformation of the dietary chemopreventive agent curcumin. *The journal of biological chemistry*. 286 (2). 1114-1124.

- Gupta, B., Kulshrestha, V. K., Srivastava, R. K., Prasad, D. N. 1980. Mechanisms of curcumin induced gastric ulcer in rats. *Indian journal of medical research*. 71 (5). 806-814.
- Hendry, G. A. F., Houghton, J. D., 1992. *Natural food colorants*. Blackie. Glasgow. p. 280. ISBN: 0-216-93146-0.
- Jayaprakasha G. K., Jagan Mohan Rao L., Sakariah, K. K. 2005. Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends in food science and technology*. 16 (12). 533-548.
- Jayaprakasha, G. K., Jaganmohan Rao, L., Sakariah, K. K. 2006. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food chemistry*. 98 (4). 720-724.
- JECFA (Stankovic, I.). Curcumin. 61st JECFA - Chemical and Technical Assessment (CTA) [online]. FAO. 2004. [cit. 2015-01-03]. Dostupné z <<http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/61/Curcumin.pdf> >
- Jiao, Y., Wilkinson IV, J., Di, X., Wang, W., Hatcher, H., Kock, N. D., D'Agostino Jr., R., Knovich, M. A., Torti, F. M., Torti, S. V. 2009. Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. *Blood*. 113 (2). 462-469.
- Joshi, P., Jain, S., Sharma, V. 2009. Turmeric (*Curcuma longa*) a natural source of edible yellow colour. *International journal of food science and technology*. 44 (2). 2402-2406.
- Kandarkar, S. V., Sawwant, S. S., Ingle, A. D., Deshpande, S. S., Maru, G. B. 1998. Subchronic oral hepatotoxicity of turmeric in mice - Histopathological and ultrastructural studies. *Indian journal of experimental biology*. 36 (7). 675-679.

- Khurana, A., Ho, CH. T. 1988. High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Curcuminoids and Their Photo-oxidative Decomposition Compounds in *Curcuma Longa* L. Journal of liquid chromatography. 11 (11). 2295-2304.
- Korany, M. A., Haggag, R. S., Ragab, M. A. A., Elmallah, O. A. A validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of silymarin and curcumin in various dosage forms [online] Arabian journal of chemistry. 2013 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535213001858>>.
- Kundrlíková, P., Pavelková, K. Přídavné látky (aditiva) [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 2014 [cit. 2014-12-04]. Dostupné z <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005724&nid=11324&chnum=1&hl=aditiv>>.
- Lao, C. D., Ruffin IV, M. T., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., Boggs, M. E., Crowell, J., Rock, C. L., Brenner, D. E. 2006. Dose escalation of a curcuminoid formulation. BMC Complementary and alternative medicine. 17. 6-10.
- Lechtenberg, M., Quandt, B., Nahrstedt, A.. 2004. Quantitative determination of Curcuminoids in curcuma rhizomes and rapid differentiation of *Curcuma domestica* Val. and *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by capillary electrophoresis. Phytochemical analysis. 15(3). 152-158.
- Lee, J. H., Choung, M. G. 2011. Determination of curcuminoid colouring principles in commercial food by HPLC. Food chemistry. 124 (3). 1217-1222.
- Li, H. X., Zhang, H. L., Zhang, N., Wang, N., Yang, Y., Zhang, Z. Z. 2013. Isolation of three curcuminoids for stability and simultaneous determination of only using one single standard substance in turmeric colour principles by HPLC with ternary gradient system. LWT-Food science and technology. 57 (1). 446-451.

- Lin, C. C., Lin, H. Y., Chen, H. C., Yu, M. W., Lee, M. H. 2009. Stability and characterisation of phospholipid - based curcumin – encapsulated microemulsions. *Food chemistry*. 116 (4). 923-928.
- Long, Y., Zhang, W., Wang, F., Chen, Z. 2014. Simultaneous determination of three curcuminoids in *Curcuma longa L.* by high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Journal of pharmaceutical analysis*. 4 (5). 325-330.
- MacDougall, D. B. 2002. *Colour in food: improving quality*. CRC press. Boca Raton. p. 378. ISBN: 0-8493-1542-5.
- Manju, S., Sreenivasan, K. 2011. Synthesis and characterization of a cytotoxic cationic polyvinylpyrrolidone-curcumin conjugate. *Journal of pharmaceutical sciences*. 100 (2). 504-511.
- Mitra, A. P. 2008. Stabilizing effect of chitosan on curcumin from the damaging action of alkaline pH and ultraviolet light. *Journal of surface science and technology*. 24 (1-2). 39-55.
- Mortensen, A. 2006. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*. 78 (8). 1477-1491.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. In: Úřední věstník Evropské unie. 2008. L 354. s. 16-33. Dostupné také z <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:CS:PDF>.
- Niu, Y., Ke, D., Yang, Q., Wang, X., Chen, Z., An, X., Shen, W. 2012. Temperature – dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7,0. *Food chemistry*. 135 (3). 1377-1382.

- Nor, F. M., Mohamed, S., Idris, N. A., Ismail, R. Antioxidative properties of *Curcuma longa* leaf extract in accelerate oxidation and deep frying studies. Journal of the american oil chemists' society. 86 (2). 141-147.
- Oetari, S., Sudibio, M., Commandeur, J. N., Samhoedi, R., Vermeulen, N. P. 1996. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. Biochemical pharmacology. 51 (1). 39-45.
- Pan, M. H., Huang, T. M., Lin, J. K. 1999. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. Drug metabolism and disposition. 27 (4). 486-494.
- Paramasivan, M., Poi, R., Banerjee, H., Bandyopadhyay, A. 2009. High-performance thin layer chromatographic method for quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma longa* germplasm. Food chemistry. 113 (2). 640-644.
- Perét-Almeida, L., Cherubino, A. P. F., Alves, R. J., Dufossé, L., Glória, M. B. A. 2005. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. Food research international. 38 (8-9). 1039-1044.
- Pozharitskaya, O. N., Ivanova, S. A., Shikov, A. N., Makarov, V. G. 2008. Separation and free radical-scavenging activity of major curcuminoids of *Curcuma longa* using HPTLC-DPPH method. Phytochemical analysis. 19 (3). 236-243.
- Prasad, S., Gupta, C. G., Tyagi A. K., Aggarwal, B. B. 2014. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. Biotechnology advances. 32 (6). 1053-1064.
- Price, L. C., Buescher, R.W. 1997. Kinetics of alkaline degradation of the food pigments curcumin and curcuminoids. Journal of food science. 62 (2). 267-269.

- Rege, S., Monin, S., Wadekar, S., Pratap, A., Bhowmick, D. 2014. Effect of demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on antioxidant activity of curcumin in refined sunflower oil. *Journal of food processing and preservation*. 38 (1). 296-303.
- Ruby, A. J., Kuttan, G., Dinesh Babu, K., Rajasekharan, K. N., Kuttan, R. 1995. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer letters*. 94 (1). 79-83.
- Scotter, M. J. 2009. Synthesis and chemical characterisation of curcuminoid colouring principles for their potential use as HPLC standards for the determination of curcumin colour on foods. *Food science and technology*. 42 (8). 1345-1351.
- Scotter, M. J. 2011. Method for the determination of European union-permitted added natural colours in food: a review. *Food additives and contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure and risk assessment*. 28 (5). 527-596.
- Schiborr, C., Eckert, G.P., Rimbach, G., Frank, J. 2010. A validated method for the quantification of curcumin in plasma and brain tissue by fast narrow-bore high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 397 (5). 1917-1925.
- Shishodia, S., Sethi, G., Aqqarwal, B. B. 2005. Curcumin: getting back to the roots. *Annals of the New York academy of sciences*. 1056. 206-217.
- Sinica, A. Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra [online]. VŠCHT. n.d. [cit. 2015-02-08]. Dostupné z <http://www.vscht.cz/an/lach1/5_Foto.pdf>.
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 94/36/ES ze dne 30. června 1994 o barvivech pro použití v potravinách. In: Úřední věstník Evropské unie. 1994. L 237. s. 298-314. Dostupné také z <http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav08_cs.pdf>.
- Socaciu, C. 2007. Food colorants: chemical and functional properties. CRC press. London. p. 633. ISBN: 978-0-8493-9357-0.

- Sogi, D. S., Sharma, S., Oberoi D. P. S., Wani, I. A. 2010. Effect of extraction parameters on curcumin yield from turmeric. *Journal of food science and technology*. 47 (3). 300-304.
- Sowbhagya, H. B., Smitha, S., Sampathu, S. R., Krishnamurthy, N., Bhattacharya, S. 2005. Stability of water-soluble turmeric colourant in an extruded food product during storage. *Journal of food engineering*. 67 (3). 367-371.
- Suresh, D., Gurudutt, K. N., Srinivasan, K. 2009. Degradation of bioactive spice compound: curcumin during domestic cooking. *European food research and technology*. 228 (5). 807-812.
- Tayyem, R. F., Heath, D. D., Al-Delaimy, W. K., Rock, CH. L. 2006. Curcumin content of turmeric and curry powders. *Nutrition and cancer*. 55(2). 126-131.
- Thanqapazham, R. L., Puri, A., Tele,S., Blumenthal, R., Maheshwari, R. K. 2008. Evaluation of a nanotechnology-based carrier for delivery of curcumin in prostate cancer cells. *International journal of oncology*. 32 (5). 1119-1123.
- Tomren, M. A., Másson, M., Loftsson, T., Tønnesen, H. H. 2007. Studies on curcumin and curcuminoids: XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: Stability, activity and complexation with cyclodextrin. *journal of pharmaceutics*. 338 (1-2). 27-34.
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J. 1985a. Studies on curcumin and curcuminoids. V. Alkaline degradation of curcumin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 180 (2). 132-134.
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J. 1985b. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 180 (5). 402-404.

- Tønnesen, H. H., Másson, M., Loftsson, T. 2002. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility and photochemical stability. *International journal of pharmaceutics*. 244 (1-2). 127-135.
- Venkatesan, P., Rao, M.N. 2000. Structure-activity relationships for the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging of free radicals by synthetic symmetrical curcumin analogues. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 52 (9). 1123-1128.
- Wang, X., Jiang, Y., Wang, Y. W., Huang, M. T., Ho, Ch. T., Huang, Q. 2008. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. *Food chemistry*. 108 (2). 419-424.
- Wang, Y. J., Pan, M. H., Cheng, A. L., Lin, L. I., Ho, Y. S., Hsieh, C. Y., Lin, J. K. 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 15 (12). 1867-1876.
- Wang, Y. F., Shao, J. J., Zhou, Ch. H., Zhang, D. L., Bie, X. M., Lv, F. X., Zhang, Ch., Lu, Z. X. 2012. Food preservation effects of curcumin microcapsules. *Food control*. 27 (1). 113-117.
- Wissgott, U., Bortlik, K. 1996. Prospect for new natural food colorant. *Trend in food science and technology*. 7 (9). 298-302.
- Yallapu, M. M., Dobberpuhl, M. R., Maher, D. M., Jaggi, M., Chauhan, S. Ch. 2012. Design of curcumin loaded cellulose nanoparticles for prostate cancer. *Current drug metabolism*. 13 (1). 120-128.
- Yang, X., Ma, J., Ye, Y., Zhang, Y., Lin, G., Zheng, Y., Li, X., Wang, X.. 2011. LC–APCI–MS quantitative analysis of Curcumin in rabbit plasma. *Chromatographia* 73 (5-6). 605-608.

- Yu, H., Huang, Q. 2010. Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. *Food chemistry*. 119 (2). 669-674.
- Zebib, B., Mouloungui, Z., Noirot, V. Stabilization of curcumin by complexation with divalent cations in glycerol/water system [online]. *Bionorganic chemistry and application*. 2010. [cit. 3.1.2015]. Dostupné z: <<http://www.hindawi.com/journals/bca/2010/292760/>>
- Zhan, P. Y., Zeng, X. H., Zhang H. M., Li, H. H. 2011. High-efficient column chromatographic extraction of curcumin from *Curcuma longa*. *Food chemistry*. 129 (2). 700-703.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADI - přijatelná denní dávka

QS - quantum satis

ANOVA - analýza rozptylu

WHO - Světová zdravotnická organizace

FAO - Organizace pro výživu a zemědělství

GSFA - General standards on food additives

INS - mezinárodní číselný systém

ROS - reaktivní formy kyslíku

CC - kurkumin

DMC - demethoxykurkumin

BDMC - bisdemethoxykurkumin

HPLC - vysoce účinná kapalinová chromatografie

UPLC - ultra účinná kapalinová chromatografie

TLC - tenkovrstvá kapalinová chromatografie

HPTLC - vysoce účinná tenkovrstvá kapalinová chromatografie

GC - plynová chromatografie

MS - hmotnostní spektrometrie

CE - kapilární elektroforéza

FTIR - infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací

DAD - detektor diodového pole

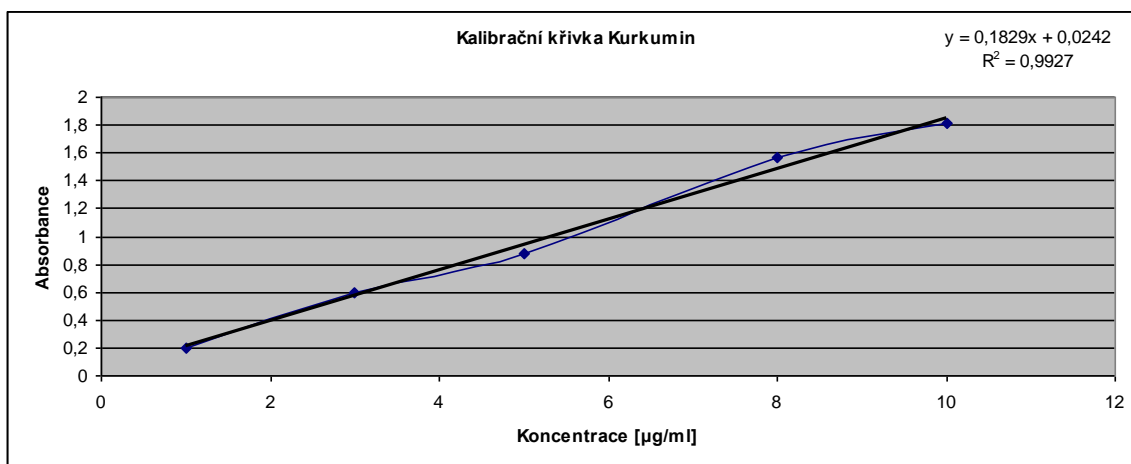
PAD - fotodiodový detektor

THF - tetrahydrofuran

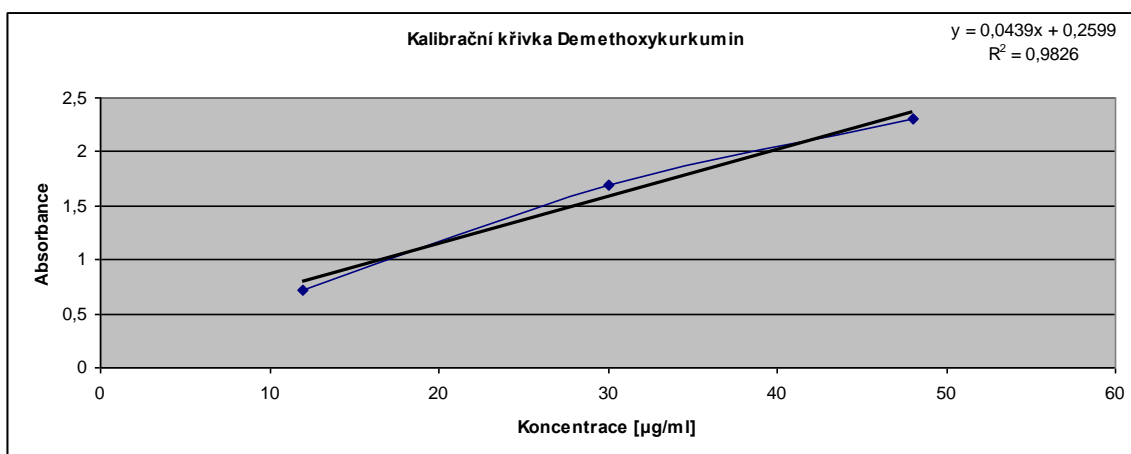
10 SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY

Příloha I - Kalibrační křivky pro metodu Absorpční spektrofotometrie

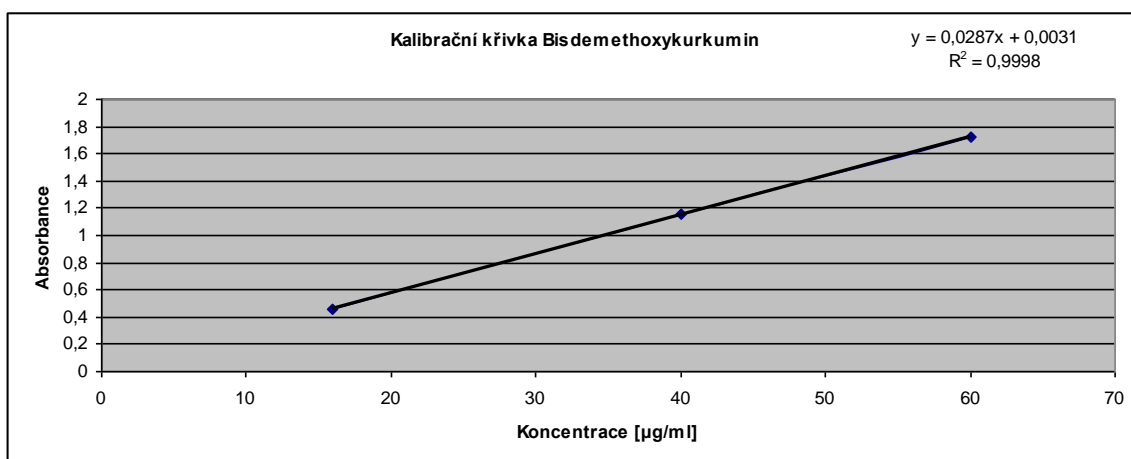
Obrázek č. 1: Kalibrační křivka pro kurkumin



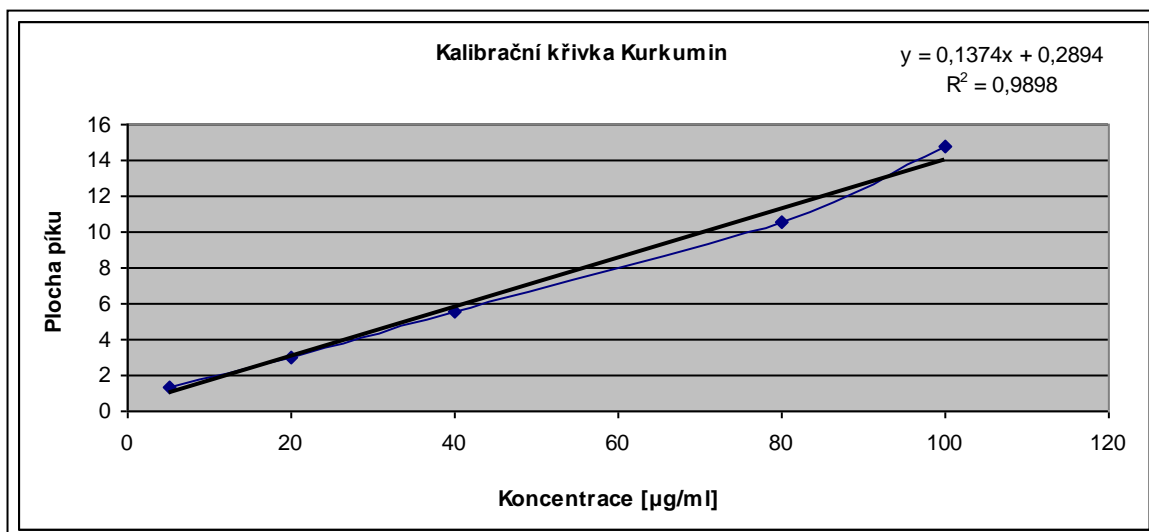
Obrázek č.2: Kalibrační křivka pro demethoxykurkumin



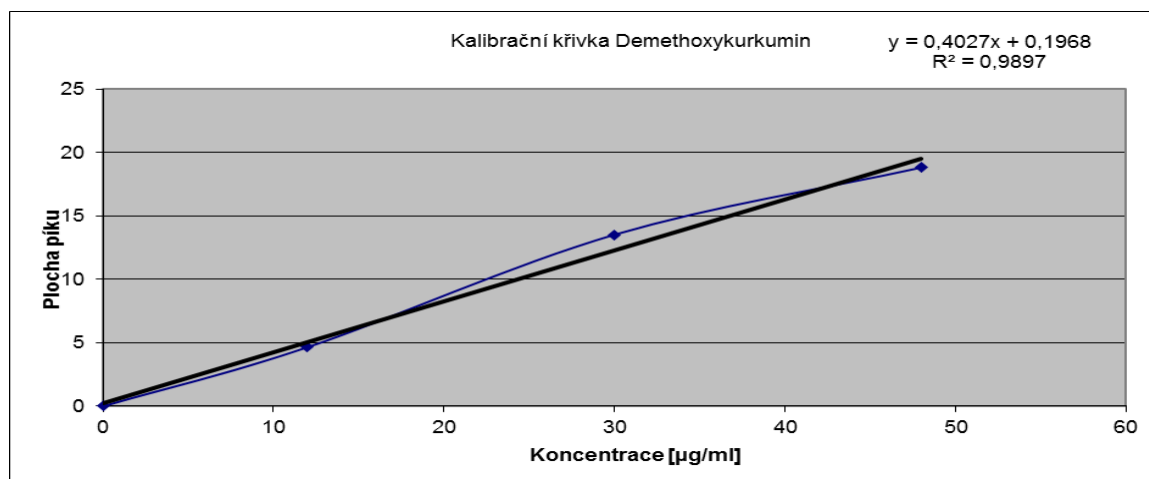
Obrázek č. 3: Kalibrační křivka pro bisdemethoxykurkumin



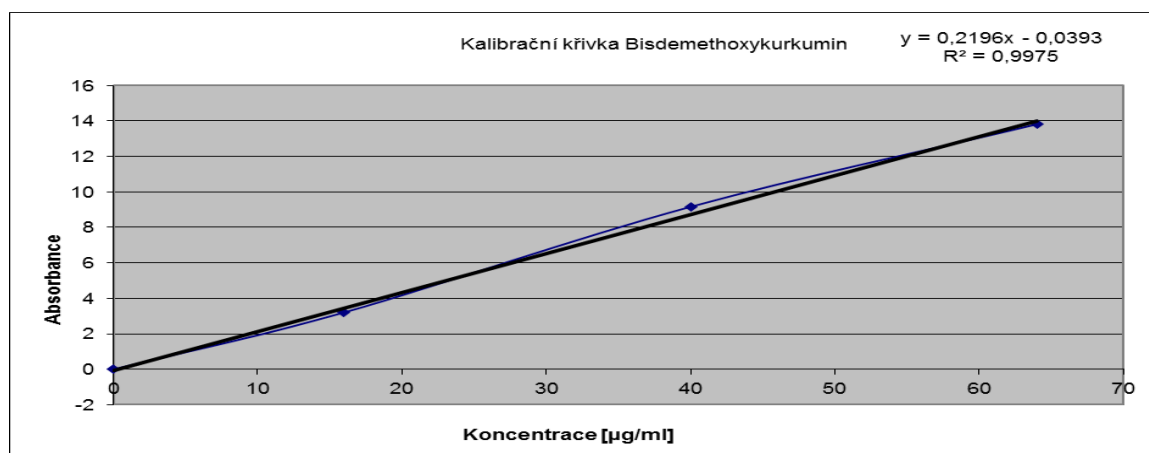
Obrázek č. 4: Kalibrační křivka pro kurkumin



Obrázek č.5: Kalibrační křivka pro demethoxykurkumin



Obrázek č. 6: Kalibrační křivka pro bisdemethoxykurkumin



Příloha III - Výsledky statistického vyhodnocení spektrofotometrie metodou ANOVA

Tabulka č. 1: Statistické vyhodnocení spektrofotometrie metodou ANOVA – Sirup.č 1

Scheffeho test; proměnná Absorbance Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00070, sv = 20,000										
Týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,3461	0,8686	0,4325	0,0000	0,0000	0,0000	0,0040	0,9856	0,9973
2	0,3461		0,9960	1,0000	0,0000	0,0171	0,0153	0,5697	0,9311	0,8475
3	0,8686	0,9960		0,9990	0,0000	0,0020	0,0018	0,1371	0,9999	0,9993
4	0,4325	1,0000	0,9990		0,0000	0,0119	0,0107	0,4731	0,9659	0,9088
5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,4608	0,4886	0,0113	0,0000	0,0000
6	0,0000	0,0171	0,0020	0,0119	0,4608		1,0000	0,7146	0,0006	0,0003
7	0,0000	0,0153	0,0018	0,0107	0,4886	1,0000		0,6871	0,0005	0,0003
8	0,0040	0,5697	0,1371	0,4731	0,0113	0,7146	0,6871		0,0500	0,0302
9	0,9856	0,9311	0,9999	0,9659	0,0000	0,0006	0,0005	0,0500		1,0000
10	0,9973	0,8475	0,9993	0,9088	0,0000	0,0003	0,0003	0,0302	1,0000	

Tabulka č. 2: Statistické vyhodnocení spektrofotometrie metodou ANOVA – Sirup.č 2

Scheffeho test; proměnná Absorbance Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00060, sv = 20,000										
Týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,0000	0,6947	0,0741	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0204	0,0350
2	0,0000		0,0008	0,0237	0,3798	1,0000	0,9925	0,9749	0,0849	0,0511
3	0,6947	0,0008		0,9262	0,0000	0,0011	0,0089	0,0139	0,6393	0,7803
4	0,0741	0,0237	0,9262		0,0000	0,0318	0,1884	0,2635	0,9998	0,9999
5	0,0000	0,3798	0,0000	0,0000		0,3114	0,0608	0,0400	0,0003	0,0001
6	0,0000	1,0000	0,0011	0,0318	0,3114		0,9973	0,9886	0,1108	0,0677
7	0,0001	0,9925	0,0089	0,1884	0,0608	0,9973		1,0000	0,4718	0,3368
8	0,0001	0,9749	0,0139	0,2635	0,0400	0,9886	1,0000		0,5918	0,4439
9	0,0204	0,0849	0,6393	0,9998	0,0003	0,1108	0,4718	0,5918		1,0000
10	0,0350	0,0511	0,7803	0,9999	0,0001	0,0677	0,3368	0,4439	1,0000	

Tabulka č. 3: Statistické vyhodnocení spektrofotometrie metodou ANOVA – Sirup.č 3

Scheffeho test; proměnná Absorbance Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00040, sv = 20,000										
Týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,2771	0,9745	0,0001	0,0000	0,0009	0,0065	0,0270	0,0595	0,8048
2	0,2771		0,0252	0,0645	0,0000	0,3079	0,7774	0,9786	0,9985	0,9958
3	0,9745	0,0252		0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0016	0,0039	0,1717
4	0,0001	0,0645	0,0000		0,0003	0,9980	0,8482	0,4921	0,2945	0,0081
5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
6	0,0009	0,3079	0,0000	0,9980	0,0000		0,9985	0,9286	0,7783	0,0534
7	0,0065	0,7774	0,0004	0,8482	0,0000	0,9985		0,9998	0,9938	0,2541
8	0,0270	0,9786	0,0016	0,4921	0,0000	0,9286	0,9998		0,9999	0,5941
9	0,0595	0,9985	0,0039	0,2945	0,0000	0,7783	0,9938	0,9999		0,8050
10	0,8048	0,9958	0,1717	0,0081	0,0000	0,0534	0,2541	0,5941	0,8050	

Tabulka č. 4: Statistické vyhodnocení spektrofotometrie metodou ANOVA – Sirup.č 4

Scheffeho test; proměnná Absorbance Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00110, sv = 20,000										
Týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,3143	0,9976	0,2765	0,0004	0,0927	0,1372	0,0662	0,4735	0,9001
2	0,3143		0,0635	0,0010	0,0000	0,0002	0,0004	0,0001	0,0024	0,0148
3	0,9976	0,0635		0,7682	0,0030	0,4113	0,5301	0,3239	0,9256	0,9997
4	0,2765	0,0010	0,7682		0,1614	0,9998	0,9999	0,9991	0,9999	0,9812
5	0,0004	0,0000	0,0030	0,1614		0,4234	0,3170	0,5214	0,0779	0,0141
6	0,0927	0,0002	0,4113	0,9998	0,4234		1,0000	1,0000	0,9944	0,8014
7	0,1372	0,0004	0,5301	0,9999	0,3170	1,0000		0,9999	0,9990	0,8898
8	0,0662	0,0001	0,3239	0,9991	0,5214	1,0000	0,9999		0,9833	0,7110
9	0,4735	0,0024	0,9256	0,9999	0,0779	0,9944	0,9990	0,9833		0,9989
10	0,9001	0,0148	0,9997	0,9812	0,0141	0,8014	0,8898	0,7110	0,9989	

**Tabulka č. 5: Statistické vyhodnocení spektrofotometrie metodou ANOVA –
Kurkuma.č 1**

Scheffeho test; proměnná Absorbance - Kurkuma 1 Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00001, sv = 20,000										
Týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,0073	0,0002	0,0012	0,9967	0,2125	0,6737	0,2501	0,0000	0,0193
2	0,0073		0,9315	0,9991	0,0551	0,8733	0,3904	0,8315	0,0139	0,9999
3	0,0002	0,9315		0,9997	0,0021	0,1530	0,0259	0,1276	0,2552	0,7501
4	0,0012	0,9991	0,9997		0,0101	0,4450	0,1057	0,3906	0,0733	0,9777
5	0,9967	0,0551	0,0021	0,0101		0,7021	0,9883	0,7570	0,0000	0,1306
6	0,2125	0,8733	0,1530	0,4450	0,7021		0,9978	1,0000	0,0003	0,9796
7	0,6737	0,3904	0,0259	0,1057	0,9883	0,9978		0,9991	0,0000	0,6464
8	0,2501	0,8315	0,1276	0,3906	0,7570	1,0000	0,9991		0,0002	0,9661
9	0,0000	0,0139	0,2552	0,0733	0,0000	0,0003	0,0000	0,0002		0,0052
10	0,0193	0,9999	0,7501	0,9777	0,1306	0,9796	0,6464	0,9661	0,0052	

**Tabulka č. 6: Statistické vyhodnocení spektrofotometrie metodou ANOVA
– Kurkuma.č 2**

Scheffeho test; proměnná Absorbance – Kurkuma 2 Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00001, sv = 20,000										
Týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,2582	0,7057	0,9954	0,9925	1,0000	1,0000	0,9995	0,9756	0,9999
2	0,2582		0,9987	0,0410	0,0355	0,2703	0,2907	0,0690	0,0233	0,4964
3	0,7057	0,9987		0,1998	0,1773	0,7220	0,7478	0,3006	0,1242	0,9165
4	0,9954	0,0410	0,1998		1,0000	0,9943	0,9921	1,0000	1,0000	0,9382
5	0,9925	0,0355	0,1773	1,0000		0,9909	0,9877	1,0000	1,0000	0,9196
6	1,0000	0,2703	0,7220	0,9943	0,9909		1,0000	0,9993	0,9717	0,9999
7	1,0000	0,2907	0,7478	0,9921	0,9877	1,0000		0,9990	0,9645	0,9999
8	0,9995	0,0690	0,3006	1,0000	1,0000	0,9993	0,9990		0,9999	0,9814
9	0,9756	0,0233	0,1242	1,0000	1,0000	0,9717	0,9645	0,9999		0,8483
10	0,9999	0,4964	0,9165	0,9382	0,9196	0,9999	0,9999	0,9814	0,8483	

Tabulka č. 7: Statistické vyhodnocení spektrofotometrie metodou ANOVA

– Kurkuma.č 3

Scheffého test; proměnná Absorbance - kurkuma 3										
Pravděpodobnosti pro post-hoc testy										
Chyba: meziskup. PČ = ,00001, sv = 20,000										
Týden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0,1529	0,4235	0,9942	0,7223	0,8889	0,7023	0,0239	0,2670	1,0000
2	0,1529		0,9998	0,0199	0,0023	0,9196	0,0021	0,0000	0,0003	0,1491
3	0,4235	0,9998		0,0772	0,0101	0,9981	0,0093	0,0001	0,0015	0,4158
4	0,9942	0,0199	0,0772		0,9961	0,3487	0,9949	0,1778	0,8147	0,9948
5	0,7223	0,0023	0,0101	0,9961		0,0646	1,0000	0,6538	0,9986	0,7301
6	0,8889	0,9196	0,9981	0,3487	0,0646		0,0601	0,0006	0,0109	0,8839
7	0,7023	0,0021	0,0093	0,9949	1,0000	0,0601		0,6746	0,9990	0,7102
8	0,0239	0,0000	0,0001	0,1778	0,6538	0,0006	0,6746		0,9744	0,0246
9	0,2670	0,0003	0,0015	0,8147	0,9986	0,0109	0,9990	0,9744		0,2729
10	1,0000	0,1491	0,4158	0,9948	0,7301	0,8839	0,7102	0,0246	0,2729	

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I - Kalibrační křivky pro metodu Absorpční spektrofotometrie

Příloha II - Kalibrační křivky pro metodu HPLC

Příloha III - Výsledky statistického vyhodnocení spektrofotometrie metodou ANOVA

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1. Chemické vzorce sloučenin nacházejících se v kurkumě (Chattophay et al., 2004)

Obrázek č. 2: Nemoci léčené kurkuminem (Shishodia, et al., 2005)

Obrázek č. 3: Princip spektrofotometrie (Sinica, n.d.)

Obrázek č. 4: Desky na TLC se seškrábanými analyty. 1 - BDMC, 2 - DMC, 3 - CC

Obrázek č. 5: Ukázka vzorků kurkumy pro měření HPLC

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Změny hodnot absorbance ve vzorcích v 420 nm

Graf č. 2: Změny hodnot koncentrace ve vzorcích v 420 nm

Graf č. 3: Ukázka chromatogramu extraktu kurkumy - píky zleva: mobilní fáze, CC, DMC a BDMC

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Složení kurkumy

Tabulka č. 2: Složení éterického oleje

Tabulka č. 3: Kalibrační řada pro standard kurkumin

Tabulka č. 4: Kalibrační řada pro standard demethoxykurkumin

Tabulka č. 5: Kalibrační řada pro standard bisdemethoxykurkumin

Tabulka č. 6: Podmínky skladování vzorků

Tabulka č. 7: Dostupné výrobky s obsahem kurkuminu

Tabulka č. 8: Regresní rovnice a koeficienty

Tabulka č. 9: Množství kurkuminoidů v sirupu č. 1

Tabulka č. 10: Výsledky statistického vyhodnocení metodou ANOVA