

# Stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC

Bc. Adéla Blažková

---

Diplomová práce  
2009

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla BLAŽKOVÁ**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
Téma práce: **Stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC.**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

- Fyziologický popis rostliny Ginkgo biloba.
- Biologicky aktivní látky Ginkgo biloby.
- Doplnky stravy na bázi Ginkgo biloby.
- Princip HPLC.

### II. Praktická část

- Chromatografické stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC UV/VIS.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] [http://www.ekozahrady.com/ginkgo\\_biloba.htm](http://www.ekozahrady.com/ginkgo_biloba.htm).

[2] BOWN, D. Encyclopaedia of Herbs and their Uses, London 1995.

[3] <http://www.garten.cz/a/cz/4726-ginkgo-biloba-jinan-dvoulalocny/>.

[4] KOCH, E., JAGGY, H. Chemistry and biology of alkyphenols from Ginkgo biloba, 1997 .

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.**

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

**18. února 2009**

Termín odevzdání diplomové práce:

**31. května 2009**

Ve Zlíně dne 31. května 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*vedoucí katedry*

## **ABSTRAKT**

Cílem práce bylo stanovení kyseliny ginkgolové v doplňcích stravy, k jejichž stanovení byla použita chromatografická metoda HPLC-UV/VIS. Byly vypracovány vhodné a optimální chromatografické podmínky pro detekci kyseliny ginkgolové v preparátech Ginkgo biloba.

Klíčová slova: Ginkgo biloba, kyselina ginkgolová, HPLC, UV/VIS

## **ABSTRACT**

The aim of this work was to specify ginkgolic acid in nourishment accessories, chromatographic method HPLC-UV/VIS was used for determination of ginkgolic acid. Suitable procedure for extraction and installation of optimal chromatographic conditions was developed.

Keywords: Ginkgo biloba, ginkgolic acid, HPLC, UV/VIS

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce Ing. Daniele Kramářové, PhD. za odborné vedení, rady a trvalý zájem při vypracování diplomové práce. Ráda bych zároveň chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

*Motto*

„Pověz mi a zapomenu; ukaž mi a já si vzpomenu; ale nech mne se zúčastnit a já pochopím.“ (Konfucius)

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně 19. 5. 2009

.....

Podpis studenta

# OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>9</b>
<b>1 FYZIOLOGICKÝ POPIS ROSTLINY <i>GINKGO BILOBY</i>.....</b>	<b>10</b>
1.1 PĚSTOVÁNÍ.....	11
1.2 PLODY <i>GINKGO BILOBY</i> .....	12
1.3 VÝBĚR VHODNÉHO STANOVISŤE.....	13
<b>2 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY <i>GINKGO BILOBY</i>.....</b>	<b>14</b>
2.1 TERPENY.....	14
2.2 FLAVONOIDY.....	15
2.3 KYSELINA GINKGOLOVÁ.....	16
2.4 FYZIOLOGICKÉ ÚČINKY PŘIPISOVANÉ <i>GINKGO BILOBĚ</i> .....	16
2.4.1 Hlavní účinky.....	16
2.4.2 Alzheimerova choroba.....	17
2.4.3 Poruchy sluchu a rovnováhy.....	18
<b>3 DOPLŇKY STRAVY NA BÁZI <i>GINKGO BILOBY</i>.....</b>	<b>19</b>
3.1 TEBOKAN.....	19
3.2 GINGIO.....	20
3.3 GINKOPRIM.....	21
3.4 GS GINKGO FORTE.....	21
3.5 BIO BILOBA.....	22
3.6 TANAKAN.....	22
<b>4 VYSOCEÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE (HPLC).....</b>	<b>24</b>
4.1 MOBILNÍ A STACIONÁRNÍ FÁZE.....	24
4.2 CHROMATOGRFICKÁ SEPARACE.....	25
4.3 CHROMATOGRFICKÁ ZAŘÍZENÍ.....	26
4.3.1 Zásobníky mobilní fáze.....	27
4.3.2 Vysokotlaké čerpadlo.....	27
4.3.3 Dávkovací zařízení.....	27
4.3.4 Předkolona.....	28
4.3.5 Chromatografická kolona.....	28
4.3.6 Detektor.....	28
<b>5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....</b>	<b>32</b>
<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>33</b>
<b>6 METODIKA.....</b>	<b>34</b>

6.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	34
6.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	34
6.3	PREPARÁTY <i>GINKGO BILOBA</i> .....	35
6.4	METODA HPLC-UV.....	35
6.4.1	Stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV.....	35
6.4.1.1	Extrakce tablet potravních doplňků na bázi Ginkgo biloba.....	35
6.4.1.2	Stanovení chromatografických podmínek pro detekci kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV.....	36
6.4.1.3	Stanovení vhodných podmínek pro měření kalibrační křivky kyseliny ginkgolové a kyseliny ginkgolové v reálném vzorku tablety metodou HPLC-UV.....	37
6.4.1.4	Kalibrační křivka pro stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV.....	37
<b>7</b>	<b>STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY GINKGOLOVÉ V PREPARÁTECH METODOU HPLC-UV.....</b>	<b>39</b>
7.1	VLASTNÍ STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY GINKGOLOVÉ V PREPARÁTECH <i>GINKGO BILOBA</i> METODOU HPLC-UV.....	39
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>40</b>
8.1	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ KYSELINY GINKGOLOVÉ METODOU HPLC-UV.....	40
8.1.1	Výsledky extrakce kyseliny ginkgolové z preparátů na bázi Ginkgo biloba.....	40
8.1.2	Výsledky stanovení chromatografických podmínek pro detekci kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV.....	40
8.1.3	Výsledky stanovení vhodných podmínek pro měření kalibrační křivky kyseliny ginkgolové a stanovení kyseliny ginkgolové v reálném vzorku potravních doplňků metodou HPLC-UV.....	41
8.1.4	Výsledky a přesnost stanovení kalibrační křivky kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV.....	41
8.1.5	Výsledky a přesnost vlastního stanovení obsahu kyseliny ginkgolové v preparátech na bázi Ginkgo biloba.....	43
8.1.5.1	Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech <i>TEBOKAN</i> .....	43
8.1.5.2	Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech <i>GINGIO</i> .....	44
8.1.5.3	Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech <i>GINKOPRIM</i> .....	46
8.1.5.4	Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech <i>GS GINKO FORTE</i> .....	46
8.1.5.5	Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech <i>BIO BILOBA</i> .....	47
8.1.5.6	Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech <i>TANAKAN</i> .....	48
8.2	DISKUZE.....	49
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>50</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>57</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>58</b>

## ÚVOD

Kyselina ginkgolová je jednou z biologicky aktivních látek obsažených v potravních doplňcích na bázi *Ginkgo biloby*. Jedná se o silný alergen, který může u citlivých jedinců způsobovat kožní vyrážky a alergie.

Jako doplňky stravy se označují přípravky, které vypadají podobně jako léčivé preparáty a prodávají se jak v lékárnách tak i mimo ně. Potravní doplňky jsou nutričními faktory (vitamíny, minerální látky, atd.) s významnými biologickými účinky, ale nejsou náhradou pestré stravy. Dodávají organismu živiny a látky příznivě působící na zdravotní stav, které potřebuje, ale nezíská si je v dostatečné míře v běžné stravě. Preparáty *Ginkgo biloba* obsahují extrakt z listů *Ginkgo biloba*, ve kterých je účinnou složkou molekula EGb 761, obsahující 24 % flavonových glykosidů a 6 % terpenových laktonů [13, 21].

Hlavním účinkem preparátů na bázi *Ginkgo biloba* je rozšiřování cévních kapilár v periferním cévním řečišti a zlepšení průtoku krve. Dalšími důležitými účinky *Ginkgo biloby* jsou odstraňování pocitu únavy, zlepšení paměti a zvýšení mozkové činnosti. Zlepšení průtoku krve organismem se neprojevuje jen v mozku, ale i zlepšením prokrvení vnitřního ucha, dochází k odstranění nepříjemného hučení v uších (*tinitus*), zlepšuje se také prokrvení oční sítnice u diabetiků. Využívá se pro lepší prokrvení končetin a rovněž potlačení syndromu „studených rukou a nohou“.

Obecně se doporučuje užívat 1 - 2 tablety 3x denně. Jedna tableta obsahuje 40 mg standardizovaného extraktu EGb 761 a celková denní účinná dávka odpovídá 120 mg.den<sup>-1</sup>. Tyto preparáty není vhodné podávat dětem do 12 let a pacientům, kteří užívají léčiva s obsahem salicylátů a barbiturátů. Nedá se vyloučit interakce s přípravky ovlivňujícími krevní srážlivost.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 FYZIOLOGICKÝ POPIS ROSTLINY *GINKGO BILOBA*

*Ginkgo biloba* je asi jedna z nejstarších žijících rostlin na světě. Vyznačuje se vysokou odolností vůči klimatickým změnám a přírodním živlům [1]. *Ginkgo biloba* může dosáhnout stáří až 1000 let. První zmínky o této rostlině se objevily v Číně, kde staří léčitelé používali listy a semena tohoto stromu k léčbě astmatu, plicních onemocnění aj [2].

### Taxonomické zařazení [3]:

Říše :	rostliny <i>Plantae</i>
Oddělení :	jinany <i>Ginkgophyta</i>
Třída :	jinany <i>Ginkgopsida</i>
Řád :	jinanotvaré <i>Ginkgoales</i>
Čeleď :	jinanovité <i>Ginkgoaceae</i>
Rod :	jinan <i>Ginkgo</i>
Druh :	Jinan dvoulaločný <i>Ginkgo biloba</i>

*Ginkgo biloba* je česky nazývána jako Jinan dvoulaločný. Patří do čeledi jinanovitých, která tvoří přechod mezi jehličnatými a listnatými stromy [4]. Na naší planetě se vyskytoval již v období druhohor. Je údajně poslední žijící fosílií a dorůstá běžně výšky 35 metrů, má šedou kůru a listy tvaru vějířku. V naší republice patří mezi vzácné druhy, můžeme ho najít v zámeckém parku ve Strážnici, Mendlově zahradě v Brně, ve Zlínském parku naproti technologické fakultě apod. [5].

Blahodárné účinky výtažku z jeho listů využívá čínská medicína již pět tisíc let. V posledních letech se preparáty s účinným obsahem listu z tohoto stromu objevují i na našem trhu v různých formách a od různých výrobců a distributorů [5].

V listech je obsaženo velké množství flavonoidů, terpenů, organických kyselin. Je známo, že komplex těchto látek odborně zvaných „ginkgolides“, není obsažen v jiné rostlině. Hlavním účinkem extraktu z listů je rozšiřování cévních kapilár v periferním cévním řečišti a zlepšení průtoku krve.



Obr. 1: List *Ginkgo biloby* – Jinan dvoulaločný [1]

## 1.1 Pěstování

Pěstování je snadné, prospívá ve většině druhů půd, ale nejraději má propustnou, sušší jílovitou hlínu a pozici chráněnou před větrem. Dobře zakořeněné rostliny jsou odolné proti suchu a nevadí jim ani extrémní mráz a městský znečištěný vzduch. Stromy jsou plně mrazuvzdorné do  $-40^{\circ}\text{C}$ . Snášejí také půdu upěchovanou a chudou na živiny, což je dalším důvodem k výsadbě v ulicích [1]. *Ginkgo* prakticky netrpí nemocemi a není ohrožováno škůdci. Tyto stromy jsou buď samčí nebo samičí. Ale pozor, jen samčí rostliny jsou vhodné do ulic a blízkosti domů, protože plody samičích stromů mohou nepříjemně zapáchat [1].

*Ginkgo* roste většinou pomalu, průměrně méně než 30 cm za rok, a to v období od konce května do konce srpna. Růst je nepředvídatelný. Jeden rok nerostou třeba vůbec a druhý rok mohou vyrůst i o 1 metr. Strom začíná plodit až ve věku 35 let. Jeden samčí strom stačí pro opylování pěti samičích, k opylení může dokonce dojít až poté, co plody spadnou na zem. Zatím pro nás nejsou plody tak důležité jako listy [6].

Patří mezi jehličnany, i když to na pohled vůbec nevypadá, jeho jehlice jsou zploštělé a široké, že se nedají jinak nazývat než listy [1]. Ty mají tvar vějíře až 8 cm velké. Jinan dvoulaločný je opadavý strom. Kvete v dubnu a v květnu současně s rašením listů. Samčí květy jsou jehnědy rostoucí na brachyblastech. Samičí květ je nahé zelené vajíčko [1]. Strom má v mládí hladkou šedou kůru, která se později mění na hnědošedou rozpukanou borku.

Pohlaví stromu lze někdy ještě před dospělostí určit, protože samičí mají téměř horizontální větve a hluboce vykrajované listy, zatímco samčí větve svírají s kmenem ostřejší úhel a listy jsou vykrajované méně, jsou matné a hráškově zelené barvy, ale vždy to nemusí být úplně zřejmé. Na podzim se mění na nápadně žlutou. Větve samčích mohou být naroubovány na samičí strom a obráceně a zajistit tak oplodnění. Tyto stromy se mohou dožít až dvou tisíc let [7].



Obr. 2: List *Ginkgo biloby* na podzim [1]

## 1.2 Plody *Ginkgo biloby*

Plody lze požívat jen v nepatrném množství syrové, ale vařené mohou být jedeny i jako hlavní potravina. Jejich dužnina poněkud zapáchá, ale ve východní Asii jsou semena považována za pochoutku [2]. Mají měkkou olejovitou strukturu s dužnatým nažloutlým osemním se sladkou příchutí, a jsou kulaté, zhruba velikosti třešně. Velmi dobré jsou pečené, chutnají jako něco mezi bramborem a jedlým kaštanem a dají se jíst ve velkém množství. Vařené plody se dají použít do polévek, kaší atd. Jsou bohaté na niacin, škrob a bílkoviny, jsou nízkotučné. Při vaření je lépe nechat semena ve skořápkách, které jsou tenké a je snadné loupat je při jídle. Syrové plody Ginkga jsou ale trpké, obsahují látku 4'-metoxy-pyridoxin, která ničí vitamin B<sub>6</sub> v těle. Tato negativní vlastnost je ale kompletně odstraněna tepelnou úpravou [8].

Obr. 3: Plod *Ginkgo biloby* [1]Obr. 4: Zralá semena *Ginkgo biloby* [3]Obr. 5: *Ginkgo biloba*

### 1.3 Výběr vhodného stanoviště

*Ginkgo biloba* je víceméně nenáročný strom a při výběru stanoviště neklade velké požadavky. Nejlépe se mu daří na místech, kde má dostatek prostoru. Ginkgo se může vysadit na slunci či v polostínu. pH půdy by mělo být mírně kyselé. Pokud zemina, do které bylo Ginkgo zasazeno, nemá tuto charakteristiku, tak Ginkgo bude růst bez problémů. Dobře roste i ve velmi tuhé jílované půdě. Nedoporučuje se lokalita s nadměrnou vlhkostí půdy nebo půda, která je neustále mokrá [9].

## 2 BIOLOGICKY A AKTIVNÍ LÁTKY *GINKGO BILOBY*

*Ginkgo biloba* obsahuje přibližně na 60 biologicky aktivních látek, které působí příznivě na centrální nervovou soustavu (CNS) a krevní oběh, pomáhá shlukování krevních destiček v cévách a snižuje riziko vzniku krevních sraženin. Působí na Alzheimerovu chorobu, ale také při ušním *tinitusu* (šumění a pískání v uších). [10]

Standardizovaný extrakt z *Ginkgo biloby* je vysoce čistá směs vyrobená z listů, ořechů a větví stromu.

Mezi nejdůležitější patří terpeny, flavonoidy a organické kyseliny, především sesquiterpenoidní polyketen bilobalid a pět od něj odvozených ginkgolidů. Jedná se o unikátní chemické struktury typu polycyklických éterů pro něž je charakteristická přítomnost *terc*-butylové skupiny, která se v přírodních látkách vyskytuje vzácně [11]. Jsou známy tyto složky:

### Terpeny

- Bilobalid,
- Ginkgolid A, B, C.

### Flavonoidy

- Amentoflavon,
- Bilobetin,
- Sekvoiaflavon,
- Kvercetin,
- Kamferol,
- Ginkgetin [3].

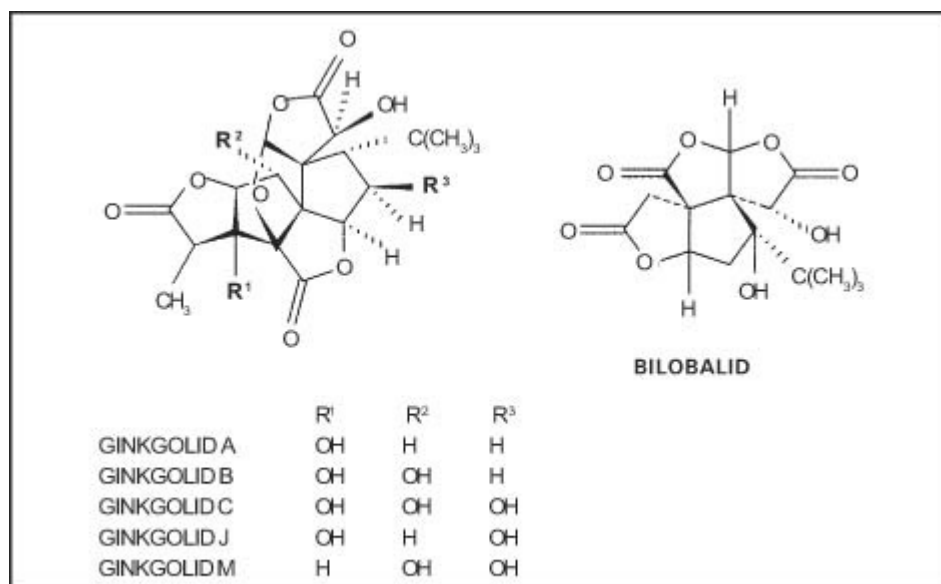
### Organické kyseliny

- Kyselina ginkgolová (hydroxykynurenová kyselina),
- Askorbová kyselina [11].

### 2.1 Terpeny

Terpenové laktony omezují tvorbu krevních sraženin a rozšiřují tepny, žíly i vlasečnice. Ginkgolid B narušuje nebo zcela blokuje činnost faktoru aktivace trombocytů (krevních destiček). Má význam v takových poruchách imunity, jako je syndrom toxického šoku [12].

Tvorba volných radikálů může narušit cévní membrány, což vede ke zvýšení cévní propustnosti, která může zapříčinit zhoršení krevního toku v mozku, hlavně u stárnoucích lidí. Začíná se zjišťovat, že kromě ochrany buněčných membrán, má extrakt *Ginkgo biloby* vliv i na další faktory jako například narušení cévního tonusu nebo změny metabolických pochodů v mozku a při poruchách v neurotransmiterech a jejich receptorech [13].



Obr. 6: Chemická struktura terpenů obsažených v *Ginkgo biloba* [14]

## 2.2 Flavonoidy

Významnými látkami jsou flavonoidy, které patří k tzv. antioxidantům. Ginkgo obsahuje 24 % flavonoidových glykosidů a alespoň 6 % terpenů ginkgolidů A, B a C a bilobalid. Řada dalších složek činí extrakt rozpustným. Flavonglykosidy, které patří do rodiny bioflavonoidů, jsou flavonoidové molekuly vyskytující se právě jen u ginkga [13].

Tato směs biologicky aktivních přírodních produktů rozšiřuje škálu účinků celého extraktu. Např. flavonoidy fungují jako „vyčytávače“ volných radikálů [13].

Ginkoflavonoidy jsou absorbovány z gastrointestinálního traktu (GIT) přibližně ze 60 %, biodostupnost ginkolidu A a B je prakticky úplná, bilobalidu asi ze 70 %. Maximálních plazmatických hladin po vstřebání bývá dosaženo po 30 - 60 minutách. Biologický poločas uvedených látek bývá v průměru cca 4,5 hod.

Obě tyto skupiny látek mají velmi příznivý vliv na zlepšení přísunu krve do mozku a většího množství kyslíku a cukru do buněk [10].

### 2.3 Kyselina ginkgolová

I když se zdá, že kyselina ginkgolová je v preparátech *Ginkgo biloby* žádoucí, tak je tomu naopak, protože kyselina ginkgolová je silný alergen a vysoce toxická, a proto se v preparátech *Ginkgo biloby* musí vyskytovat v co nejmenším množství. Může způsobovat nežádoucí účinky, jako jsou alergické reakce a to zejména kožní, bolesti hlavy a zažívací problémy [15].

Kyselina ginkgolová je nalezena v poměrně vysoké koncentraci v semenech *Ginkgo biloby*, ale je také nalezena v nižších koncentracích v listech. Z listů se potom vyrábí účinný extrakt *Ginkgo biloby*, jehož účinky jsou popsány v kapitole 2.4. Přítomnost kyseliny ginkgolové v listech je důvodem, proč listy *Ginkgo biloby* není vhodné také i pro užívání v bylinných čajích [16,52].

Uvádí se, že v preparátech by nemělo být více než 5 ppm ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) kyseliny ginkgolové v jedné tabletě [16,17]. Chemicky se kyselina ginkgolová označuje jako kyselina hydroxykynurenová [11].

### 2.4 Fyziologické účinky připisované *Ginkgo bilobě*

#### 2.4.1 Hlavní účinky *Ginkgo biloby* :

- stabilizuje hladinu glukózy,
- odstraňuje pocity únavy,
- zlepšuje paměť,
- zvyšuje mozkovou činnost,
- pozitivně působí na poruchu sluchu a zraku,
- potlačuje alergické reakce,
- zabraňuje vzniku sraženin,
- používá se jako prostředek při nemoci ledvin,



- zmírňuje příznaky stáří,
- urychluje hojení ran,
- prospívá pleti.

Už bylo řečeno, že látky obsažené v listech především rozšiřují cévy a tak umožňují zlepšení průtoku krve v našem těle. Zlepšuje se zásobování všech částí těla kyslíkem a živinami, zejména pak glukózou [1].

V mozkové tkáni dochází k okysličování paměťových buněk. Výsledkem je zvýšení koncentrace a také celková mentální pozornost. U starších lidí potom ustupují stavy zapomnětlivosti, zmatenosti a deprese. Ginkgo je díky svým antioxidačním vlastnostem schopno zachytávat volné radikály, které způsobují předčasné opotřebení a stárnutí buněk [17,18].

Zlepšení průtoku krve organismem se neprojevuje jen v mozku, ale i zlepšením prokrvení vnitřního ucha, dochází k odstranění nepříjemného hučení v uších, zlepšuje se také prokrvení oční sítnice u diabetiků a oddaluje se vznik a zhoršení chorob oka spojené s cukrovkou. Využívá se pro lepší prokrvení končetin a rovněž potlačení syndromu „studených rukou a nohou“ [17,18,19]. Dá se říci, že Ginkgo se používá všude tam, kde je zpomalený nebo zhoršený průtok krve [10].

#### 2.4.2 Alzheimerova choroba

Extrakt *Ginkgo biloby* zbrzdí nebo zpomaluje degeneraci mozku v prvotních stádiích této choroby, která se projevuje zapomínáním, podezíravostí, zakládáním věcí, poruchami paměti, známkami deprese a úzkosti, změnou osobnosti [13].

Jde o degenerativní onemocnění mozku, kdy dochází postupně k úplné demenci. Změny způsobují rozpad nervových vláken, nervových buněk a mění se také látková činnost mozku.

V současné době trpí demencí ¼ lidí starších 85 let, z toho je 50 - 60 % přičítáno Alzheimerově chorobě. Tato choroba není nemoc jen starých lidí, ale může postihnout i mladší a to již v 50. roku života. V České republice trpělo touto nemocí v roce 2008 asi 120 tisíc osob. Současná medicína nedokázala tuto chorobu vyléčit, ale pouze zpomalit. Proto se doporučuje *Ginkgo biloba* jako prevence.

### 2.4.3 Poruchy sluchu a rovnováhy

Ginkgo biloba se projevila jako účinná látka i pro pacienty s poruchami sluchu, a to např. při šumění a hučení v uších (*ušní tinitus* - šelest), ale také s poruchou rovnováhy [20].

Ušní šelest se projevuje trvalým pískáním, zvoněním a hučením v jednom nebo obou uších. Prozatím neexistuje léčba ušních šelestů, ale užívání *Ginkgo biloby* může pomoci zlepšit krevní oběh a nervové funkce v mozku a uších.

### 3 DOPLŇKY STRAVY NA BÁZI *GINKGO BILOBY*

Doplňků stravy na bázi *Ginkgo biloby* je na trhu v dnešní době mnoho. Vyrábí se jak v tabletách či želatinových kapslích, tak i jako roztok s přídavkem etanolu.

Mezi nejvíce prodávanými (nejběžněji užívanými) na českém trhu byly v této práci vybrány následující preparáty: Tebokan (Dr. Willmar Schwabe), Gingio (HEXANEL, s.r.o.), GinkoPrim (WALMARK, a.s.), GS Ginkgo FORTE (Green-Swan Pharmaceuticals ČR, a.s.), Bio Biloba (Pharma Nord), Tanakan (Beaufour Ipsen Pharma).

#### 3.1 Tebokan



Obr. 7: Vzorek Tebokanu

Vyrábí se jako potahovaná tableta, která má složení *Ginkgo biloba extract. sicc. normatum* 40 mg (Ginkgoflavonglykosid 9,6 mg, terpenlaktón 2,4 mg) a pomocné látky laktózu, mikrokrystalickou celulózu.

Tebokan obsahuje extrakt z Jinanu dvoulaločného EGb 761, standardizovaný na 24 % flavonových glykosidů a 6 % terpenových laktonů (ginkgolidy A, B, C a bilobalid) s účinkem rozšiřujícím cévy a zlepšující průtok krve. Snížením kapilární prostupnosti snižuje tvorbu a přítomnost nežádoucích produktů vznikajících při metabolismu [21].

Užívá se pro poruchy mozkové výkonnosti a to poruchy paměti, koncentrace, emoční labilitu spojené s depresí, syndrom demence (Alzheimerova typu, primární degenerativní demence). Dále u osob se závratěmi a ušním šelestem cévního původu.

Výrobce uvádí přecitlivělost na některou ze složek extraktu z *Ginkgo biloby*. Nebezpečné je užívat jej při krvácivých stavech. Přípravek není doporučen podávat dětem mladším 12 let. Nedoporučuje se podávat v době těhotenství a během kojení.

Nežádoucí účinky byly při užívání přípravku ojediněle zaznamenány mírnými žaludečními a střevními obtížemi, bolestí hlavy nebo alergickými reakcemi kůže. Byl pozorován i výskyt krvácení při dlouhodobém užívání. Důležitá je opatrnost při současném podání léčiv s obdobným účinkem.

Při demenci se doporučuje užívat 1 - 2 tablety 3krát denně. Minimální doba užívání by měla být nejméně 8 týdnů. Při obstrukčních chorobách periferních tepen se podává minimálně po dobu 6 týdnů. Při léčbě ušních šelestí a závratí se podává 1 tableta 3krát denně nebo 2 tablety 2krát denně. Tablety se polykají celé, užívají se po jídle a zapíjejí se malým množstvím vody [21].

### 3.2 Gingio



Obr. 8: Vzorek Gingia

1 tableta Gingia je složena ze 40 mg *Ginkgo bilobae extractum siccum normatum* a pomocných látek jako jsou mikrokrystalická celulóza, mohohydrát laktózy.

Gingio je určen k léčbě příznaků poruch prokrvení mozku a končetin, poruch paměti, snížení schopnosti soustředění, deprese, závratí, hučení v uších a bolestech hlavy.

Může se vyskytnout přecitlivělost na kteroukoliv složku přípravku, nedoporučuje se podávat dětem do 12 let.

Velmi vzácně se mohou vyskytnout zažívací potíže jako je zvracení a průjem, dále pak bolesti, pocity návalů nebo alergické kožní reakce.

Doporučuje se užívat 1 - 2 tablety 3krát denně po dobu 8 týdnů až 3 měsíců. Při závratích a *tinitusu* se užívají 1 - 2 tablety 2krát denně, minimálně po dobu 6 týdnů. Tablety se polykají celé, nerozkousané s malým množstvím tekutiny [22].

### 3.3 GinkoPrim



Obr. 9: Vzorek GinkoPrimu

Obsahuje extrakt z *Ginkgo biloba* v kombinaci s hořčíkem. Tímto složením je užívání přípravku spojeno se snížením rizikových faktorů onemocnění srdce a cév. Hořčík příznivě ovlivňuje nervový a svalový systém a pomáhá udržovat správnou funkci srdce a cév.

Tableta obsahuje 40 mg stand. extraktu *Ginkgo biloba* a 150 mg hořčíku.

Má blahodárný účinek na krevní oběh a cévy. Je vhodný pro seniory, protože ovlivňuje příznivě paměť, pro lidi trpící studenými končetinami a ovlivňuje potíže se sluchem.

Užívá se 1 tableta denně nejlépe po jídle a zapíjí se tekutinou [23].

### 3.4 GS Ginkgo FORTE



Obr. 10: Vzorek GS Ginkgo FORTE

Přípravek GS Ginkgo FORTE je ve formě měkkých želatinových kapslí, které usnadňují polykání. Užívá se při pocitu studených rukou a nohou, poruchách paměti a schopností soustředit se, zvýšené psychické zátěži, závratích, hučení v uších. Užívá se 1 kapsle denně. Kapsle je možné užít kdykoli v průběhu dne. Přípravek je vhodné užívat dlouhodobě, s vysazením účinek odeznívá [24].

### 3.5 Bio Biloba



Obr. 11: Vzorek Bio Biloby

Obsahuje výtažek z listů stromu *Ginkgo biloba*, který rozšiřuje krevní kapiláry, podporuje krevní oběh v celém těle a má blahodárné antioxidační účinky v mozkové tkáni. Jedna tableta přípravku Bioaktivní Biloba obsahuje 100 mg extraktu z *Ginkgo biloba* [25].

Extrakt z *Ginkgo biloby* zabraňuje zvýšenému shlukování krevních destiček a jejich usazování na stěně cév. Zabezpečuje přívod kyslíku a výživných látek do tkání lidského organismu a chrání je před škodlivými účinky volných radikálů.

Zlepšuje paměť a schopnost soustředění, snižuje hučení v uších, pomáhá při pocitu studených rukou a nohou. Denně se užívá 1 tableta po jídle [25].

### 3.6 Tanakan



Obr. 12: Vzorek Tanakanu

Obsahuje standardizovaný extrakt EGb 761 z listů *Ginkgo biloba*. Vyrábí se buď jako potahované tablety vhodné pro diabetiky a nebo jako perorální roztok, který obsahuje alkohol a je nevhodný pro pacienty s jaterním onemocněním.

Přípravek se užívá při poruchách paměti, pozornosti, periferního prokrvení a mikrocirkulace, závratích, ušních šelestech, popřípadě poruchách zraku podmíněných nedostatečným prokrvením sítnice u starších osob.

Při vzájemném působení s dalšími léčivými je vhodná zvýšená opatrnost u salicylátů a barbiturátů. Nedá se vyloučit interakce s přípravky ovlivňujícími krevní srážlivost.

Přípravek bývá obvykle dobře snášen. V ojedinělých případech se mohou vyskytnout zářivací poruchy jako nevolnost, průjem, alergické kožní reakce.

Užívá se 1 potahovaná tableta 3x denně před jídlem. Tablety se polykají celé, nerozkousané a zapíjí se malým množstvím tekutiny. Účinek léčby se projeví až po 2 – 4 týdnech užívání [26].

## 4 VYSOCEÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

Chromatografie je separační proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá), působením fyzikálně-chemických interakcí, což jsou např. iontová výměna, adsorpce, rozpouštění, srážení, atd. [27].

Kapalinová chromatografie se začala rozvíjet do své klasické podoby až ve třicátých letech 20. století. Jedním z důvodů pomalého rozvoje kapalinové chromatografie bylo, že nebyly známy vhodné aparatury a zejména pak detektory (průtokové cely s objemem 10  $\mu$ l) a čerpadla mobilní fáze, která pracují za vysokých tlaků. Proces dělení byl velmi pomalý, protože průtok mobilní fáze byl veden pouze gravitační silou a nebyly dostupné dostatečně účinné sorbenty. Eluční křivky se vytvářely z jednotlivých frakcí a bylo nutné urychlit výměnné procesy v chromatografické koloně. Toho se dosáhlo zmenšením částecek náplně, a tak se zkrátily cesty vnitřní a vnější difúze, současně se pracovalo při větším průtoku mobilní fáze a musely být zvýšeny vstupní tlaky na koloně. Proto se kapalinová chromatografie označuje jak metodou vysokotlakou (High Pressure), ale také metodou vysokorychlostní (High Performance) [28].

Rozvoj kapalinové chromatografie díky objevení nových stacionárních fází a aparatur, hlavně vysokotlakých čerpadel a detektorů, je od roku 1965 jednou z nejpoužívanějších separačních metod [29].

Jednou z hlavních výhod HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) je pestrá použitelnost, neboť analyzuje až 80 % známých látek [27].

V HPLC je nejdůležitější přesnost analýzy, která závisí na kontrolách instrumentálních a separačních podmínek, a podle ní se odvíjí výsledky konečné analýzy. Správnost a přesnost metody je založena na kalibraci systému standardy o známém složení [27].

### 4.1 Mobilní a stacionární fáze

Mobilní fází je označována fáze pohyblivá bez ohledu na skupenství. Stacionární fází je nepohyblivá fáze a v chromatografii může mít velmi rozdílnou formu. Někdy jsou to částčky tuhé fáze o velikosti jednotek mikrometrů, jindy je to tenká vrstvička kapaliny, nanesená na tuhých částicích, film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry nebo porézní materiál vyplňující celou kolonu [30].



Výběr mobilní a zejména stacionární fáze patří mezi nejdůležitější faktory, které ovlivňují správnost výsledku separace. Mezi stacionární fází plněnou částicemi patří konvenční stacionární fáze. Částice mohou mít různý tvar, velikost a strukturu. Tyto vlastnosti spolu s délkou a vnitřním průměrem kolony, ovlivňují separační vlastnosti [31]. Vývoj nových technologií umožnil přípravu částic s průměrem jen několik  $\mu\text{m}$ . Tyto částice mají vyšší účinnost a kapacitu, ale také vyšší tlak na koloně [32]. Používaný průměr částic je 3 - 5  $\mu\text{m}$ , které mohou být neporézní nebo porézní [30,33].

Částice jsou z anorganického materiálu, jejich jádro je nejčastěji z oxidů křemíku, hliníku nebo zirkonu. Mají vysokou účinnost i kapacitu [34].

Kapalinová chromatografie se dělí podle stacionární fáze na:

- Adsorpční chromatografii, kdy stacionární fází je absorbent,
- Iontovou chromatografii, která má stacionární fází ionex,
- Gelovou chromatografii nebo gelovou filtrační chromatografii, jejíž stacionární fází je neionizovaný přírodní nebo syntetický gel,
- Afinitní chromatografii, jejíž stacionární fáze obsahuje zakotvené ligandy, na které se rozdělená látka váže [29].

## 4.2 Chromatografická separace

Chromatografická separace látek v koloně může být provedena třemi způsoby:

- Frontální,
- Vytěšňovací,
- Eluční.

Chromatografická separace látek v koloně je provedena eluční technikou, při které systémem protéká konstantní rychlostí mobilní fáze o konstantním složení, tedy o konstantní eluční síle, tzv. izokratická eluce [35]. Složky vzorku jsou silněji sorbovány v koloně než složky mobilní fáze, jednotlivé složky jsou eluovány z kolony v pořadí sorpce na stacionární fází a jsou mezi sebou odděleny čistou mobilní fází. Mění-li se složení mobilní fáze s časem, jedná se o gradientovou eluci [36]. Doba, kterou chromatografovaná látka stráví v koloně, se nazývá retenční (eluční) čas [35].

Přes kolonu naplněnou sorbentem postupuje určitou rychlostí mobilní fáze. Na začátek kolony se umístí vzorek, který obsahuje složky 1 a 2. Mobilní fáze unáší vzorek ke konci kolony, přičemž složka 2 postupuje pomaleji než složka 1. Při prostupu vzorku kolonou jsou molekuly složek buď v mobilní fázi nebo jsou na sorbentu. Při průchodu kolonou každá molekula vzorku přejde mnohokrát z proudu mobilní fáze na povrch sorbentu a zpět [30].

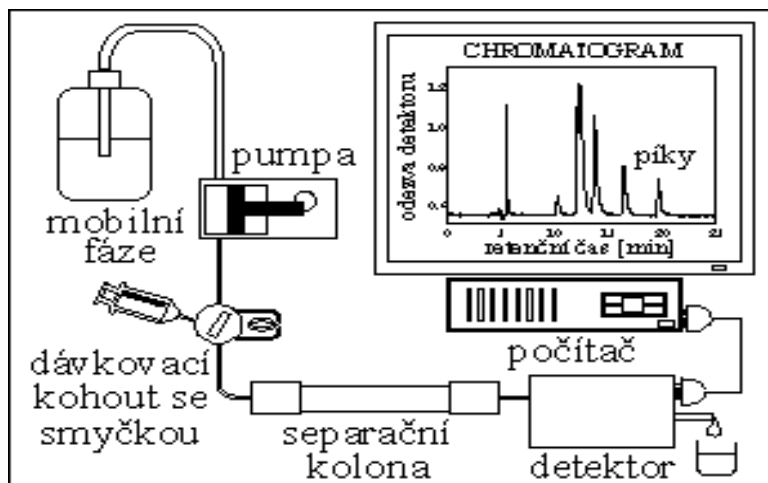
Doba, po kterou průměrná molekula dané složky setrvává na povrchu sorbentu, závisí na velikosti interakce mezi složkou a sorbentem a určuje pořadí, v jakém složka eluuje z kolony. Čím větší interakce, tím později složka eluuje a má větší retenční čas [30].

### 4.3 Chromatografická zařízení

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí:

- Zásobníky mobilní fáze,
- Vysokotlaké čerpadlo,
- Dávkovací zařízení,
- Předkolona,
- Kolona,
- Detektor,
- Registrační zařízení (zapisovač, PC).

Další součásti: odplyňovače mobilní fáze, termostaty, spojovací kapiláry, on-line filtry, saturační a ochranné kolonky, jímače frakcí [37].



Obr. 13: Schéma uspořádání HPLC [38]

#### 4.3.1 Zásobníky mobilní fáze

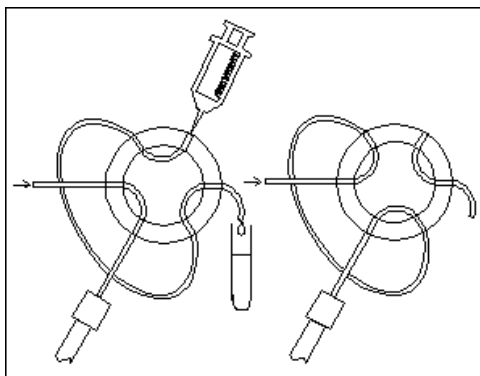
Mobilní fáze, která je většinou směs organických rozpouštědel nebo vodní roztoky pufrů, se prvně před použitím filtrují, aby se odstranily nečistoty. Do HPLC je mobilní fáze dávkována lahví, do kterých je zavedena hadička s fritou. [39]

#### 4.3.2 Vysokotlaké čerpadlo

Čerpadla zajistí konstantní bezpulsní průtok (cca  $0,1 - 10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) při tlacích do 60 MPa. Důležitá je přesnost a reprodukovatelnost průtoků v celé škále pracovních tlaků. Hlavní typy čerpadel jsou pneumatická, pístová, membránová a typu „injekční stříkačka“. [37] Na výrobu čerpadel u HPLC se používá nerezová ocel [39].

#### 4.3.3 Dávkovácí zařízení

Používají se dávkovácí ventily, které umožní přesnější dávkování a nevyžadují zastavení toku mobilní fáze. Jedná se o vícecestné ventily s vyměnitelnou dávkovácí smyčkou. Smyčkové dávkovače dávkují libovolný objem mikrostříkačkou do smyčky při atmosférickém tlaku. Po naplnění se obsah vymyje do kolony tak, že se pootočí ventilem mobilní fáze.



Obr. 14: Dávkovací kohout s dávkovací smyčkou [38]

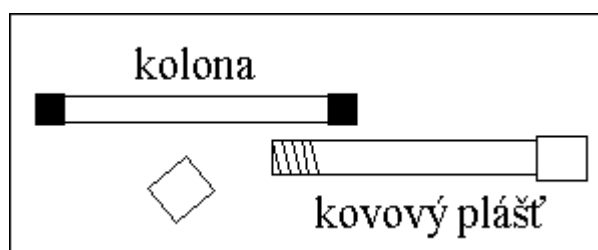
#### 4.3.4 Předkolona

Předkolony bývají umístěny mezi dávkovačem a chromatografickou kolonou.

#### 4.3.5 Chromatografická kolona

Chromatografické kolony bývají vyrobeny z nerezavějících kovů, speciálně tvrzených skel a plastů. Používají se kolony naplněné pórovitými náplněmi o průměru 1 - 5  $\mu\text{m}$  o vnitřním průměru 3 - 6 mm a délce 5 - 25 cm. Materiálem na plnění kolon jsou založeny na anorganické matici (silikagel, oxid hlinitý), na níž mohou být vázány různé stacionární fáze. [38,39]

Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně [40,41].

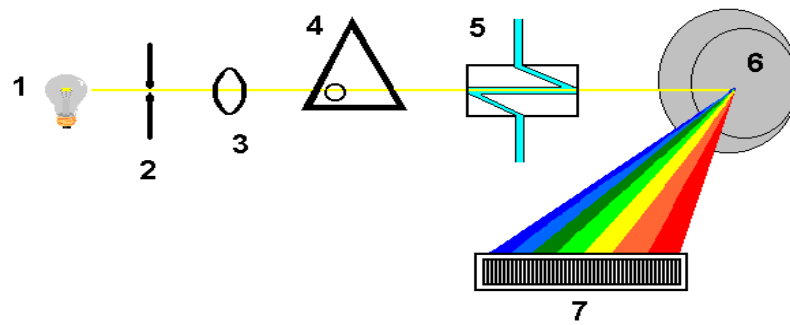


Obr. 15: Chromatografická kolona [37,38]

#### 4.3.6 Detektor

Detektor umožňuje stanovení jednotlivých částí separované složky, jejich identifikaci a kvantitativní stanovení.

**Spektrofotometrický detektor** je nejčastěji používaným detektorem v HPLC. Je založen na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. [42]



Obr. 16: Schéma detektoru diodového pole [42]



Obr. 17: JASCO HPLC UV [43]



Obr. 18: Detektor DAD [44]



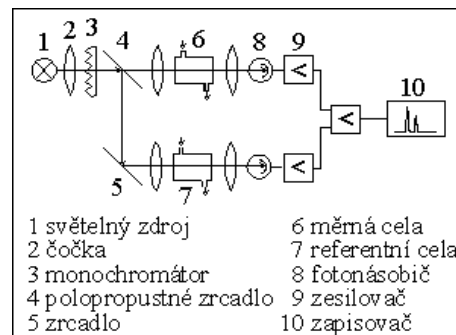
Obr. 19: Dávkoč [44]

**Fotometrický detektor** měří změny intenzity světla způsobenými vymýváním vzorku. Většina organických látek absorbuje v oblasti UV záření, některé i ve viditelné oblasti světla. Detektory pracují buď s fixní vlnovou délkou (254 nm), dále pak s možností výběru několika vlnových délek nebo s monochromátorem a pracují na principu spektrofotometru

od 190 do 400 nm. Světlo zdroje prochází průtokovou celou, intenzita prošlého paprsku je měřena fotonásobičem a kontinuálně se snímá signál eluovaných složek.



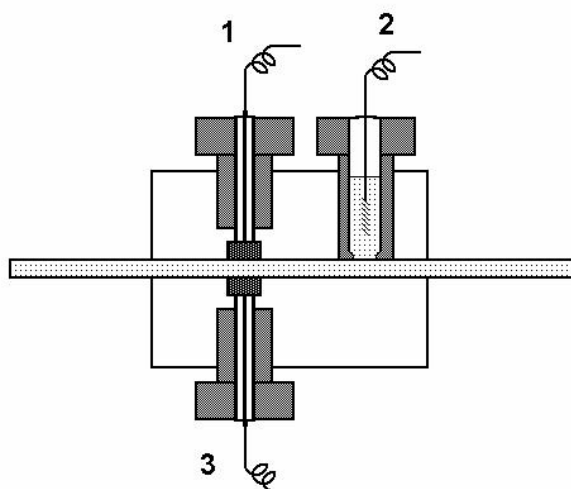
Obr. 20: HPLC s UV-VIS detektorem [45]



Obr. 21: Fotometrický detektor

**Fluorescenční detektor** je založen na principu fluorescence a je schopen absorbovat ultrafialové záření a vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření [46].

**Elektrochemický detektor** umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace látek v eluentu v případě, že jsou tyto látky elektrochemicky aktivní. Elektrochemický detektor měří elektrodový potenciál, proud nebo kapacitu vyvolanou průchodem látky detektorem, ve kterém jsou umístěny elektrody s napětím pro elektrochemickou reakci. Systém může být zapojen ve dvouelektrodovém nebo třielektrodovém zapojení (Obr. 22). Podle podmínek měření se dělí elektrolytické metody na potenciostatické, kdy se měří při konstantním potenciálu pracovní elektrody a metody amperostatické, kdy se měří za konstantního proudu. Elektrochemické detektory dosahují vysoké citlivosti. Vyšší požadavky se kladou na čistotu mobilní fáze a dokonalé odvzdušnění, aby se získaly reprodukovatelné výsledky [46,47].



Obr. 22: Schéma elektrochemického detektoru [47]

1 - pracovní elektroda, 2 - pomocná elektroda, 3 - referenční elektroda

## 5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky statistické analýzy se hodnotí podle přesnosti, správnosti a reprodukovatelnosti. Metoda je schopna poskytovat konzistentně shodné výsledky pro nezávislá měření, která jsou prováděna se stejným vzorkem a stejným postupem různými pracovníky v různých laboratořích.

Malé a nepravidelné odchylky se určují statisticky z opakovaných analýz, proto se provádí měření pro každý vzorek pětkrát a ovlivňují přesnost stanovení. Aritmetický průměr všech výsledků se přibližuje skutečné hodnotě:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n} \quad (1)$$

Odhad směrodatné odchylky se vypočítá podle vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left( \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)} \quad (2)$$



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 METODIKA

### 6.1 Použité chemikálie

Acetonitril (LAB-SCAN)

Isopropanol (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Standard kyseliny ginkgolové (Sigma Aldrich, Riedel-del Haën, SRN)

Metanol čistoty pro HPLC (Sigma Aldrich, Riedel-del Haën, SRN)

Kyselina fosforečná (Chemapol Praha)

Destilovaná a redestilovaná voda

### 6.2 Použité přístroje a pomůcky

Předvážky (Kern, SRN)

Analytické váhy (AFA-210 LC)

Lednice (Samsung- Calex, CZ)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Speciální zařízení:

- Aparatura pro HPLC – UV/VIS (Hewlett Packard 1100)
- vakuovaný odplyňovací modul G1322A,
- binární pumpy G1312A,
- termostat kolon G1316A,
- detektor UV/VIS DAD G1315A,
- dávkovací ventil analytický smyčkový (20 µl),
- kolona SUPELCOSIL LC 8 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm; Supelco, USA),
- PC s vyhodnocovacím programem Chemstation - Instrument 1, (Agilent, USA).

Dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

Mikrofiltry 0,45  $\mu\text{m}$ , Nylon (Supelco, USA)

Mikrofiltry na mobilní fázi 0,2  $\mu\text{m}$  (Supelco, USA)

### 6.3 Preparáty *Ginkgo biloby*

Tebokan (Dr. Willmar Schwabe),

Gingio (Hexanel, s.r.o.),

GinkoPrim (Walmark, a.s.),

GS Ginkgo FORTE (Green-Swan Pharmaceuticals CR, a.s.),

Bio Biloba (Pharma Nord),

Tanakan (Beaufour Ipsen Pharma).

### 6.4 Metoda HPLC-UV

#### 6.4.1 Stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV

##### 6.4.1.1 Extrakce tablet potravních doplňků na bázi *Ginkgo biloba*

Extrakce kyseliny ginkgolové z tablet potravních doplňků na bázi *Ginkgo biloby* byla prováděna za laboratorní teploty 21 °C. Při extrakci byly vždy všechny vzorky chráněny proti světlu tak, že byly baleny extrakční baňky Al-folií. Pro extrakci byla použita rozpouštěcí činidla acetonitril - kyselina fosforečná v poměru 99,7 : 0,3, která se jevila jako nejvhodnější.

#### Extrakční postup

Tableta potravních doplňků na bázi *Ginkgo biloby* byla zvážena na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. Potom byla rozdrovena ve třecí misce a kvantitativně převedena do 25 ml odměrné baňky. Do 25 ml odměrné baňky bylo přidáno 20 ml rozpouštěcí směsi acetonil-kyselina fosforečná v poměru 99,7 : 0,3. Odměrná baňka byla obalena Al-folií, aby nedošlo k oxidaci a vzorek byl chráněn před světlem a důkladně protřepán. Poté byl přefiltrován přes papírový filtr do kádinky, která byla také obalena Al-folií. Z kádinky byl ode-

brán vzorek a přefiltrován přes mikrofiltr nylon 0,45  $\mu\text{m}$  do vialky obalenou Al-folií. Výsledek extrakce udává kapitola 8.1.1.

#### 6.4.1.2 Stanovení chromatografických podmínek pro detekci kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV

Pro vypracování metodiky měření kyseliny ginkgolové byl použit standard kyseliny ginkgolové (výrobce Sigma Aldrich) a tableta na bázi *Ginkgo biloba* (Ipsen). Tableta byla složena ze standardizovaného extraktu *Ginkgo bilobae* (EGb 761) obsahujícího 24 % Ginkgoheterosidů a 6 % ginkgolidů a bilobalidu, dále obsahoval monohydrát laktózy, mikrokrystalickou celulózu, kukuřičný škrob, koloidní bezvodý oxid křemičitý, mastek, magnesiumstearát, makrogol 400, makrogol 6000, hydroxypropylmethylcelulózu, oxid titaničitý, červený oxid železitý. Bližší informace jsou uvedeny v kapitole 3.

Standard kyseliny ginkgolové byl extrahován v 1 ml metanolu, ze kterého bylo automatickou pipetou odpipetováno 10  $\mu\text{l}$  do odměrné baňky a přidána buď to rozpouštěcí směs acetonitril : kyselina fosforečná v poměru 99,7 : 0,3 nebo rozpouštědlo metanol. Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Eluce byla prováděna gradientově, kdy byly použity dvě mobilní fáze (A a B). Mobilní fáze A byla složena z acetonitrilulu :  $\text{rH}_2\text{O}$  :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99 : 1 : 0,3 a mobilní fáze B byla tvořena acetonitrem :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99,7 : 0,3. Gradientová eluce probíhala při teplotě 35  $^\circ\text{C}$ , tlaku 26 bar a průtok mobilní fáze byl prvně stanoven na 1,0  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Gradienty mobilních fází byly stanoveny podle uvedené tabulky 1.

Tabulka 1: Gradientová eluce

Čas analýzy [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
5	100	0
45	60	40
60	1	99

Pro detekci kyseliny ginkgolové byly stanoveny dvě vlnové délky 254 nm a 310 nm. Každý vzorek byl proměřen pětkrát při stejných podmínkách.

Cílem bylo určit nejvhodnější podmínky (vlnovou délku) pro detekci kyseliny ginkgolové a její retenční čas. Výsledky měření udává kapitola 8.5.2.

#### **6.4.1.3 Stanovení vhodných podmínek pro měření kalibrační křivky kyseliny ginkgolové a kyseliny ginkgolové v reálném vzorku tablety metodou HPLC-UV**

Vzorek tablety na bázi *Ginkgo biloby* byl extrahován podle postupu uvedeného v kapitole 6.3.1.1 metodou extrakce za použití rozpouštěcí směsi acetonitril-kyselina fosforečná v poměru 99,7 : 0,3. Takto upravený vzorek byl vstříknut na kolonu po filtraci přes mikrofiltr nylon 0,45  $\mu\text{m}$ . Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Eluce byla prováděna gradientově se dvěma mobilními fázemi, mobilní fáze A (acetonitril : rH<sub>2</sub>O : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v poměru 99 : 1 : 0,3) a mobilní fáze B (acetonitril : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v poměru 99,7 : 0,3), při teplotě 35 °C, tlaku 27 bar a průtok mobilní fáze byl prvně stanoven na 1,0 ml.min<sup>-1</sup> a poté zvýšen na 1,1 ml.min<sup>-1</sup>. Vzorek byl proměřen pětkrát při následujících vlnových délkách  $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 = 310 \text{ nm}$ .

Cílem bylo zjistit, při jaké vlnové délce je nejvhodnější chromatografická detekce kyseliny ginkgolové v tabletách či při jaké vlnové délce je vhodné proměřit kalibrační křivku metodou HPLC-UV. Výsledky měření udává kapitola 8.1.3.

#### **6.4.1.4 Kalibrační křivka pro stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV**

Byly připraveny standardní roztoky kyseliny ginkgolové (výrobce Sigma Aldrich) o různých koncentracích. Jako první byl připraven standardní roztok o koncentraci 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  tak, že ze standardu kyseliny ginkgolové, který byl rozpuštěn v 1 ml metanolu, bylo odpipetováno 20  $\mu\text{l}$  pomocí automatické pipety do 25 ml odměrné baňky a vzorek byl doplněn 9980  $\mu\text{l}$  rozpouštěcí směsí (acetonitril : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v poměru 99,7 : 0,3) automatickou pipetou. Z toho zásobního roztoku byly získány následující koncentrace standardních roztoků pro měření kalibrační křivky: 8, 5, 4, 3 a 2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

Byly měřeny ještě druhé hodnoty pro kalibrační křivku, pro kterou byly připraveny standardní roztoky ze stejného standardu (výrobce Sigma Aldrich), ale bylo použito jiné rozpouštědlo (metanol). Ze standardu kyseliny ginkgolové, který je rozpuštěn v 1 ml metano-

lu, byl připraven standardní roztok o koncentraci  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  tak, že pomocí automatické pipety bylo odpipetováno  $5 \mu\text{l}$  ze standardu do odměrné baňky a vzorek byl doplněn  $4995 \mu\text{l}$  metanolem. Z toho zásobního roztoku byly získány následující koncentrace standardních roztoků pro měření kalibrační křivky: 4, 3, 2 a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Eluce byla prováděna gradientově se dvěma mobilními fázemi, mobilní fáze A (acetonitril :  $\text{rH}_2\text{O}$  :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99 : 1 : 0,3) a mobilní fáze B (acetonitril :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99,7 : 0,3), při teplotě  $35^\circ\text{C}$ , tlaku 27 bar a průtoku mobilní fáze  $1,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Kalibrační křivka byla měřena při vlnových délkách 254 nm a 310 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku [ $\text{mAV}\cdot\text{s}^{-1}$ ] na koncentraci kyseliny ginkgolové [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]. Retenční čas kyseliny ginkgolové byl cca 2,3 - 2,4 min. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen pětkrát.

Výsledky stanovení kalibrační křivky kyseliny ginkgolové jsou uvedeny v kapitole 8.1.4.

## 7 STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY GINKGOLOVÉ V JEDNOTLIVÝCH PREPARÁTECH METODOU HPLC-UV

### 7.1 Vlastní stanovení obsahu kyseliny ginkgolové v preparátech *Ginkgo biloba* metodou HPLC-UV

Bylo vybráno šest rozdílných vzorků tablet na bázi *Ginkgo biloby*:

- Tebokan (Dr. Willmar Schwabe),
- Gingio (Hexanel, s.r.o.),
- GinkoPrim (Walmart, a.s.),
- GS Ginkgo FORTE (Green-Swan Pharmaceuticals ČR, a.s.),
- Bio Biloba (Pharma Nord),
- Tanakan (Beaufour Ipsen Pharma).

Vzorky jsou podrobně popsány v kapitolách 3.1 až 3.6.

Vybrané vzorky byly podrobeny extrakci podle postupu uvedeného v kapitole 6.4.1.1 za použití rozpouštěcí směsi acetonitril :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99,7 : 0,3. Vzorek byl přefiltrován před vstříkem na kolonu přes mikrofiltr nylon 0,45  $\mu\text{m}$ . Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Eluce probíhala gradientově se dvěma mobilními fázemi, mobilní fáze A (acetonitril :  $\text{rH}_2\text{O}$  :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99 : 1 : 0,3) a mobilní fáze B (acetonitril :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99,7 : 0,3), při teplotě 35 °C, tlaku 27 bar a průtoku 1,1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Detekce kyseliny ginkgolové byla prováděna při dvou vlnových délkách,  $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 = 310$ . Každý vzorek byl proměřen pětkrát při každé vlnové délce. Po proměření byly odečteny plochy píku [ $\text{mAV}\cdot\text{s}^{-1}$ ], a pak byla vypočtena koncentrace kyseliny ginkgolové v dané tabletě.

Výsledky stanovení obsahu kyseliny ginkgolové v jednotlivých preparátech *Ginkgo biloby* jsou uvedeny v kapitole 8.1.5.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Výsledky a přesnost stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV

#### 8.1.1 Výsledky extrakce kyseliny ginkgolové z preparátů na bázi *Ginkgo biloba*

##### Extrakční postup

Extrakce byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 6.4.1.1. Kyselina ginkgolová byla nejlépe extrahována z preparátů *Ginkgo biloba* při použití rozpouštěcí směsi acetonitril : kyseliny fosforečné v poměru 99,7 : 0,3 a to při laboratorní teplotě. Bylo pozorováno, že vzorek v použité směsi rozpouštědel byl rozpuštěn a nedošlo ke vzniku sraženiny. Tedy tato rozpouštěcí směs byla použita při všech extrakcích kyseliny ginkgolové z tablet na bázi *Ginkgo biloba*.

#### 8.1.2 Výsledky stanovení chromatografických podmínek pro detekci kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV

Tablety na bázi *Ginkgo biloba* a standard kyseliny ginkgolové (Sigma Aldrich) byly proměřeny za podmínek uvedených v kapitole 6.4.1.2.

Cílem bylo stanovit vhodné separační a detekční podmínky, které by byly nejvhodnější pro stanovení kyseliny ginkgolové a zjistit retenční čas kyseliny ginkgolové. Z chromatogramů byly vyvozeny tyto závěry:

**Standard kyseliny ginkgolové** měl nejlepší detekci při vlnové délce 310 nm. Jako vhodnější rozpouštědlo bylo stanoveno acetonitril : kyselina fosforečná v poměru 99,7 : 0,3, protože při použití této rozpouštěcí směsi byla lepší detekce kyseliny ginkgolové. Retenční čas nastal v 2,35 min (chromatogram 1, příloha I).

**Tableta na bázi *Ginkgo biloba*** měla podobnou odezvu jako standard. Jako nejvhodnější detekce byla vyhodnocena při vlnové délce 310 nm (chromatogram 2, příloha I) a použití rozpouštěcí směsi acetonitril : kyselina fosforečná v poměru 99,7 : 0,3. Retenční čas byl 2,4 min.



### **8.1.3 Výsledky stanovení vhodných podmínek pro měření kalibrační křivky kyseliny ginkgolové a stanovení kyseliny ginkgolové v reálném vzorku potravních doplňků metodou HPLC-UV**

Postup extrakce byl proveden za podmínek uvedených kapitole 6.4.1.1 a podmínky měření vzorku tablety na bázi *Ginkgo biloba* byly provedeny podle metody, která je uvedena v kapitole 6.4.1.3.

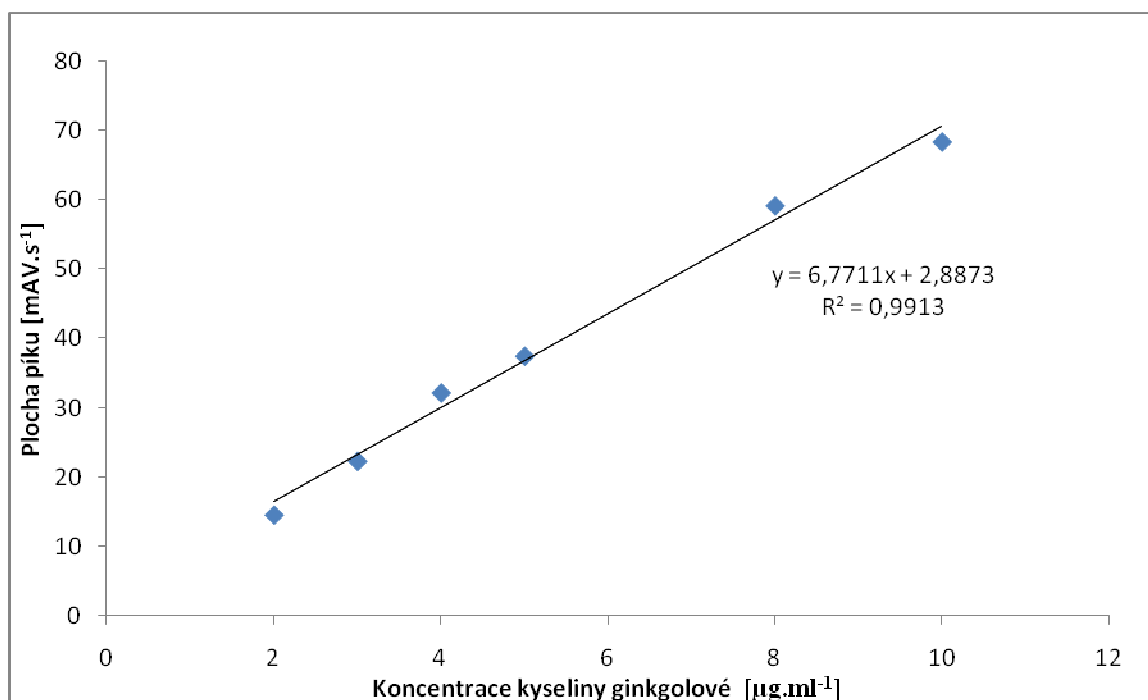
Cílem bylo proměřit vzorky tablet při různých vlnových délkách a určit, při které vlnové délce bude nejlepší detekce kyseliny ginkgolové. Analyzovalo se při vlnových délkách  $\lambda_1 = 254$  nm,  $\lambda_2 = 310$  nm. Z chromatografické analýzy bylo zjištěno, že nejlepší detekce nastala při vlnové délce 310 nm v retenčním čase 2,4 min. Následné měření kalibrační křivky a stanovení kyseliny ginkgolové ve vzorcích tablet na bázi *Ginkgo biloba* bylo provedeno při této vlnové délce (310 nm). Analýza je uvedena v příloze I, chromatogram 3.

### **8.1.4 Výsledky a přesnost stanovení kalibrační křivky kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV**

Kalibrační křivka pro chromatografické stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 6.4.1.4 a pro sestavení kalibrační křivky byly použity výsledky prvního měření, tedy jako rozpouštědlo byla použita rozpouštěcí směs acetonitril : kyselina fosforečná v poměru 99,7 : 0,3. Tato rozpouštěcí směs byla vhodnější pro extrakci kyseliny ginkgolové a následné detekci metodou HPLC-UV. Byly vypočteny průměrné hodnoty ploch píků, které jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Kalibrace kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV při vlnové délce 310 nm

Koncentrace kyseliny ginkgolové [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Průměrná plocha píku [ $\text{mAV}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	Směrodatná odchylka [ $\text{mAV}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
2	14,57	0,104
3	22,33	0,208
4	32,17	0,321
5	37,47	0,404
8	59,13	0,833
10	68,33	0,551



Graf 1: Kalibrační křivka s regresní rovnicí pro stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV při vlnové délce 310 nm

Z kalibrační křivky byla stanovena rovnice regresní přímky s korelačním koeficientem 0,9913.

### 8.1.5 Výsledky a přesnost vlastního stanovení obsahu kyseliny ginkgolové v preparátech na bázi *Ginkgo biloba*

Postup stanovení kyseliny ginkgolové pro všechny preparáty na bázi *Ginkgo biloba* byl proveden podle metody uvedené v kapitole 7.1. Bylo zvoleno 6 rozdílných preparátů na bázi *Ginkgo biloba*, které jsou uvedeny v kapitole 7.1 a jejich popis je v kapitole 3. Z každého preparátu bylo zváženo 20 tablet, z nichž byla vypočtena průměrná hmotnost. Pro analýzu bylo použito 5 tablet z každého zváženého množství vzorků preparátů a každá tableta byla měřena pětkrát při vlnových délkách  $\lambda_1 = 254$  nm,  $\lambda_2 = 310$  nm. Pro vlastní vyhodnocení byly použity výsledky detekce při vlnové délce 310 nm, protože při této vlnové délce byly lépe vyhodnoceny plochy píků. Retenční čas kyseliny ginkgolové nastal cca ve 2,4 minutě a v tomto čase byly odečteny plochy píků. Průběh analýzy je uveden v chromatogramech v příloze I.

#### 8.1.5.1 Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech *TEBOKAN*

Postup pro stanovení kyseliny ginkgolové byl proveden podle metody, která je uvedena v kapitole 7.1. Nejprve bylo na analytických vahách zváženo 20 tablet preparátu *TEBOKAN* s přesností na 0,0001 g a z těchto hodnot byla vypočtena průměrná hmotnost 0,2679 g.

Tabulka 3: Přesnost stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV

Číslo měření	Plocha píku [mAV.s <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [μg.ml <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [μg.tableta <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [ppm]
1.	10,8	1,168	0,0584	0,217
2.	10,7	1,153	0,0576	0,215
3.	10,9	1,183	0,0591	0,220
4.	10,9	1,183	0,0591	0,220
5.	10,7	1,153	0,0576	0,215
průměr		1,168	0,0583	0,217

Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v preparátech Tebokan byl vypočten podle vzorce (1) a odhad směrodatné odchylky  $s$  podle vzorce (2), které jsou uvedeny v kapitole 5.

**Směrodatná odchylka  $s = 0,0025$**

**Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v jedné tabletě Tebokanu :**

**$0,217 \pm 0,0025$  ppm**

Plochy píku byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační křivky a byly vypočteny koncentrace kyseliny ginkgolové v jednotlivých vzorcích v  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Tato hodnota pak byla přepočtena na ppm. Průměrná hodnota kyseliny ginkgolové v preparátech Tebokan byla stanovena na 0,217 ppm v jedné tabletě. Stanovený obsah kyseliny ginkgolové v preparátu Tebokan odpovídá předepsané hodnotě, neboť se udává, že obsah kyseliny ginkgolové nesmí přesáhnout 5 ppm v jedné tabletě, což je uvedeno v kapitole 2.3.

#### **8.1.5.2 Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech GINGIO**

Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové bylo provedeno podle metody uvedené v kapitole 7.1. Na analytických vahách bylo zváženo 20 tablet preparátu GINGIO s přesností na 0,0001 g a byla vypočtena průměrná hmotnost tablety 0,2547 g.

Tabulka 4: Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV

Číslo měření	Plocha píku [mAV.s <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [μg.ml <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [μg.tableta <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [ppm]
1.	8,6	0,843	0,0421	0,165
2.	8,5	0,828	0,0414	0,162
3.	8,4	0,814	0,0407	0,159
4.	8,5	0,828	0,0414	0,162
5.	8,4	0,814	0,0407	0,159
průměr		0,825	0,0412	0,161

Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v preparátu Gingio byl vypočten podle vzorce (1) a odhad směrodatné odchylky  $s$  podle vzorce (2), který je uveden v kapitole 5.

**Směrodatná odchylka  $s = 0,0025$**

**Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v jedné tabletě Gingia:**

**$0,161 \pm 0,0025$  ppm**

Plochy píku byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační křivky a byly vypočteny koncentrace kyseliny ginkgolové v jednotlivých vzorcích v  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Tato hodnota pak byla přepočtena na ppm. Průměrná hodnota kyseliny ginkgolové v preparátech Gingio byla stanovena na 0,161 ppm v jedné tabletě, která odpovídá předepsané hodnotě obsahu kyseliny ginkgolové, jejíž obsah nesmí přesáhnout 5 ppm v jedné tabletě (kapitola 2.3).

### 8.1.5.3 Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech GINKOPRIM

Postup stanovení kyseliny ginkgolové byl proveden podle metody uvedené v kapitole 7.1. Na analytických vahách bylo zváženo 20 tablet preparátu GINKOPRIM s přesností na 0,0001 g a byla vypočtena průměrná hmotnost 0,9563 g.

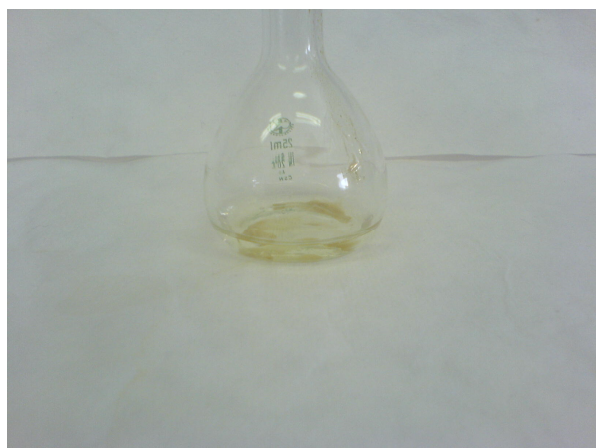
Bylo zjištěno, že touto metodikou nelze stanovit obsah kyseliny ginkgolové v preparátu GinkoPrim, protože při detekci byly naměřeny hodnoty pod limit detekce.

### 8.1.5.4 Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech GS GINKO FORTE

Na analytických vahách bylo zváženo 20 tablet s přesností na 0,0001 g, jejichž průměrná hmotnost byla 0,5879 g. Tyto kapsle nebylo možné stanovit metodikou uvedenou v kapitole 7.1, protože kapsle obsahují oleje, které se nerozpouští v používané rozpouštěcí směsi acetonitril : kyselina fosforečná v poměru 99,7 : 0,3 a nerozpustí se ani v rozpouštědle metanolu. Obsah kapsle se sráží, a není tedy možné stanovit obsah kyseliny ginkgolové v kapslích GS Ginko FORTE (Obr. 23 a 24) vypracovanou metodikou.



Obr. 23: Obsah kapsle Ginko FORTE



Obr. 24: Sražený obsah kapsle Ginko FORTE

### 8.1.5.5 Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech BIO BILOBA

Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové bylo provedeno podle metody uvedené v kapitole 7.1. Na analytických vahách bylo zváženo 20 tablet preparátu BIO BILOBA s přesností na 0,0001 g a byla vypočtena průměrná hmotnost tablety 0,4275 g.

Tabulka 5: Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV

Číslo měření	Plocha píku [mAV.s <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [μg.ml <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [μg.tableta <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [ppm]
1.	31	4,151	0,207	0,484
2.	33	4,447	0,222	0,519
3.	31	4,151	0,207	0,484
4.	32	4,299	0,214	0,500
5.	33	4,447	0,222	0,519
průměr		4,299	0,214	0,501

Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v preparátu Bio Biloba byl vypočten podle vzorce (1) a odhad směrodatné odchylky  $s$  podle vzorce (2), který je uveden v kapitole 5.

**Směrodatná odchylka  $s = 0,0175$**

**Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v jedné tabletě Bio Biloba**

**$0,501 \pm 0,0175$  ppm**

Plochy píku byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační křivky a byly vypočteny koncentrace kyseliny ginkgolové v jednotlivých vzorcích v  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Tato hodnota pak byla přepočtena na ppm. Průměrná hodnota kyseliny ginkgolové v preparátech Bio Biloba byla stanovena na 0,501 ppm v jedné tabletě. Stanovená hodnota obsahu kyseliny ginkgolové odpo-

vidá předepsané hodnotě obsahu kyseliny ginkgolové, což je 5 ppm v jedné tabletě, která je uvedena v kapitole 2.3.

#### 8.1.5.6 Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech TANAKAN

Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové bylo provedeno podle metody uvedené v kapitole 7.1. Na analytických vahách zváženo 20 tablet preparátu TANAKAN s přesností na 0,0001 g a byla vypočtena průměrná hmotnost tablety 0,2629 g.

Tabulka 6: Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV

Číslo měření	Plocha píku [mAV.s <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [μg.ml <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [μg.tableta <sup>-1</sup> ]	Obsah kyseliny ginkgolové [ppm]
1.	9,3	0,947	0,0473	0,179
2.	9,5	0,976	0,0488	0,185
3.	9,5	0,976	0,0488	0,185
4.	9,3	0,947	0,0473	0,179
5.	9,6	0,991	0,0495	0,188
průměr		0,967	0,0483	0,183

Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v preparátu Tanakan byl vypočten podle vzorce (1) a odhad směrodatné odchylky  $s$  podle vzorce (2), který je uveden v kapitole 5.

**Směrodatná odchylka  $s = 0,00402$**

**Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v jedné tabletě Tanakanu**

**$0,183 \pm 0,00402$  ppm**



Plochy píku byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační křivky a byly vypočteny koncentrace kyseliny ginkgolové v jednotlivých vzorcích v  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Tato hodnota pak byla přepočtena na ppm. Průměrná hodnota kyseliny ginkgolové v preparátech Tanakan byla stanovena na 0,183 ppm v jedné tabletě. Stanovené hodnota obsahu kyseliny ginkgolové odpovídá předepsané hodnotě 5 ppm v jedné tabletě, která je uvedena v kapitole 2.3.

## 8.2 Diskuze

Pro stanovení obsahu kyseliny ginkgolové v preparátech byla stanovena vhodná metodika, kdy bylo jako rozpouštědlo použita rozpouštěcí směs acetonitril :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99,7 : 0,3. Jako nejlepší průtok mobilní fáze byl stanoven průtok  $1,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Vzorky byly proměřeny na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Jako nejvhodnější vlnová délka pro detekci kyseliny ginkgolové se jevila vlnová délka 310 nm, která byla použita jak pro stanovení kalibrační křivky tak i pro vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v jednotlivých preparátech *Ginkgo biloby*. Eluce probíhala gradientově při teplotě 35 °C a tlaku cca 27 bar.

Stanovením byl zjištěn obsah kyseliny ginkgolové v preparátech *Ginkgo biloby*, kdy jako nejvhodnější byl stanoven preparát Gingio, u kterého obsah kyseliny ginkgolové byl stanoven na  $0,161 \pm 0,0025$  ppm v jedné tabletě. V preparátu Gingio obsah kyseliny ginkgolové nepřesáhl hodnotu 5 ppm v jedné tabletě (kapitola 2.3), což je mezní hodnota pro stanovení obsahu kyseliny ginkgolové, neboť tato kyselina je silný alergen a může způsobit alergické reakce (kapitola 2.3). Zatímco nejvyšší obsah kyseliny ginkgolové byl v preparátu Bio Biloba, ale také nepřesáhl mezní hodnotu stanovení obsahu kyseliny ginkgolové, která je 5 ppm v jedné tabletě (kapitola 2.3). Obsah kyseliny ginkgolové v preparátu Bio Biloba byl stanoven na  $0,501 \pm 0,0175$  ppm v jedné tabletě.

Jako nejvhodnější se tedy doporučuje preparát Gingio.

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovení kyseliny ginkgolové v preparátech na bázi *Ginkgo biloba* metodou HPLC-UV. V této práci byly testovány a stanoveny optimální podmínky pro extrakci a detekci kyseliny ginkgolové z preparátů *Ginkgo biloba*. Byly vybrány odlišné preparáty a v nich podle stanovené metody vyhodnocena detekce kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV.

Extrakce kyseliny ginkgolové z tablet byla provedena pomocí rozpouštěcí směsi acetonitril : kyselina fosforečná v poměru 99,7 : 0,3 a to při laboratorní teplotě 21 °C. Pro tuto metodu byly použity dvě mobilní fáze A a B. Pro mobilní fázi A byla použita směs acetonil : rH<sub>2</sub>O : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v poměru 99 : 1 : 0,3 a mobilní fáze B byla tvořena acetonitril : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v poměru 99,7 : 0,3. Také byl testován průtok mobilní fáze a jako nejlepší byl stanoven průtok 1,1 ml.min<sup>-1</sup>. Vzorky byly proměřeny na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm). Pro detekci byly použity vlnové délky 254 nm a 310 nm, kdy vlnová délka 310 nm se jevila jako nejvhodnější z hlediska detekovatelnosti. Vlnová délka 310 nm byla použita pro vyhodnocení kalibrační křivky a stanovení obsahu kyseliny ginkgolové v jednotlivých preparátech *Ginkgo biloba*. Eluce probíhala gradientově při teplotě 35 °C a tlaku cca 27 bar. Bylo provedeno vlastní stanovení kyseliny ginkgolové v různých preparátech *Ginkgo biloba* (Tebokan, Gingio, GinkoPrim, GS Ginkgo FORTE, Bio Biloba, Tanakan) a ověřena přesnost jejich stanovení. Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v preparátu Tebokan byl naměřen 0,217 ± 0,0025 ppm v jedné tabletě. Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v preparátu Gingio byl naměřen 0,161 ± 0,0025 ppm v jedné tabletě. V preparátu GinkoPrim bylo zjištěno, že touto metodikou nelze stanovit obsah kyseliny ginkgolové, protože při detekci byly naměřeny hodnoty pod limit detekce. Také kapsle GS Ginko FORTE nebylo možné stanovit touto metodikou, protože kapsle obsahují oleje, které se nerozpouští v používané rozpouštěcí směsi acetonitril : kyselina fosforečná v poměru 99,7 : 0,3 a nerozpustí se ani v rozpouštědle metanolu. Obsah kapsle se sráží, a není tedy možné stanovit obsah kyseliny ginkgolové v kapslích GS Ginko FORTE touto vypracovanou izolační technikou. Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v preparátu Bio Biloba byl naměřen 0,501 ± 0,0175 ppm v jedné tabletě. Průměrný obsah kyseliny ginkgolové v preparátu Tanakan byl naměřen 0,183 ± 0,00402 ppm v jedné tabletě.

U žádného z preparátů naměřená hodnota nepřekročila povolenou hodnotu 5 ppm kyseliny ginkgolové v jedné tabletě, která je silným alergenem a vysoce toxická a může u pacientů

způsobit alergické reakce, bolesti hlavy a zažívací obtíže (kapitola 2.3). Jako nejvhodnější preparát byl stanoven Gingio, který měl obsah kyseliny ginkgolové stanoven na 0,161 ppm v jedné tabletě.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Dostupné na URL: <http://www.garten.cz/a/cz/-ginkgo-biloba-jinan-dvoulalocny>
- [2] Dostupné na URL:  
[http://www.enviweb.cz/?env=priroda\\_archiv\\_hdejd/Ginkgo\\_biloba\\_jedinecny\\_prirodni\\_lek.html](http://www.enviweb.cz/?env=priroda_archiv_hdejd/Ginkgo_biloba_jedinecny_prirodni_lek.html)
- [3] Dostupné na URL: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Jinan\\_dvoulalocny](http://cs.wikipedia.org/wiki/Jinan_dvoulalocny)
- [4] Dostupné na URL: <http://www.jinandvoulalocny.wz.cz/>
- [5] Dostupné na URL:  
<http://bylinky.abecedazdravi.cz/ginkgo-biloba-jinan-dvoulalocny>
- [6] Dostupné na URL: <http://ginkgo-biloba.cz/jinan-dvoulalocny>
- [7] BOWN, D. *Encyclopaedia of Herbs and their Uses*, London 1995
- [8] Dostupné na URL: [http://www.ekozahrady.com/ginkgo\\_biloba.htm](http://www.ekozahrady.com/ginkgo_biloba.htm)
- [9] Dostupné na URL: <http://www.proginkgo.org/histcz.html>
- [10] Dostupné na URL:  
<http://zdravi.centrum.cz/prirodni-medicina/2007/9/28/clanky/je-stary-umi-toho-ale-dost/>
- [11] PATOČKA J. *Jinan dvoulaločný (Ginkgo biloba) jako léčivá rostlina*. Bull Čs Spol Biochem 1992; 20:19–21
- [12] KOCH, E., JAGGY, H. *Chemistry and Biology of Alkyphenols from Ginkgo biloba*, 1997
- [13] Dostupné na URL: [http://www.energycentrum.cz/dokumenty/pd\\_celitin.doc](http://www.energycentrum.cz/dokumenty/pd_celitin.doc)
- [14] Dostupné na URL: <http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/PSYCH401/10.htm>
- [15] Dostupné na URL: <http://www.thehealthierlife.co.uk/natural-health-articles/mental-health/gingko-biloba-extract-cognitive-function-00932.html>
- [16] THIELE, A. *Averting of Drug-induced Risks, Grade II: Pharmaceuticals Containing Ginkgo biloba Leaves*, 1997
- [17] DeKOSKY, S. T. a kol. *The Ginkgo Evaluation of Memory Study*, Contemporary Clinical Trials, USA, 2006

- [18] Dostupné na URL: <http://www.celostnimediceina.cz/ginkgo-biloba--jinan-dvoulalocny.htm>
- [19] Dostupné na URL: [http://level.ffservis.cz/ginkgo\\_biloba.htm](http://level.ffservis.cz/ginkgo_biloba.htm)
- [20] Dostupné na URL: <http://www.zdrava-vyziva.net/ginkgo-biloba.php>
- [21] Dostupné na URL:  
<http://www.schwabepharma.com/international/products/tebonin/index.php>
- [22] Dostupné na URL: [www.hexanel.cz](http://www.hexanel.cz)
- [23] Dostupné na URL: [www.walmark.cz](http://www.walmark.cz)
- [24] Dostupné na URL: [www.grswan.cz](http://www.grswan.cz)
- [25] Dostupné na URL: [www.pharmanord.cz](http://www.pharmanord.cz)
- [26] Dostupné na URL: [www.ipsen.cz](http://www.ipsen.cz)
- [27] PACÁKOVÁ, K., ŠTULÍK, K. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*, UK Praha, SPN Praha 1986
- [28] Dostupné na URL: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Chromatografie>
- [29] Dostupné na URL: <http://www.eurochem.cz/>
- [30] Dostupné na URL: <http://chemie.jiriurban.cz/index.php?clanek=5>
- [31] CHURÁČEK, J. a kol. *Analytická separace látek*, SNTL Praha 1990
- [32] CHEN, H., HORVÁTH, C., J. *Chromatogr. A* 705, 1995
- [33] BARDER, T. J., WOHLMAN, P. J., THRALL, C., DUBIOS, P. D., *LC-GC*, 1997
- [34] McCOY, M., KALGHATGI, K., REGNIER, F. E., AFEYAN, N. B., J. *Chromatogr. A* 743, 1996
- [35] Dostupné na URL:  
[http://www.kch.zcu.cz/cz/di/sks/02KAPALINOVA\\_CHROMATOGRAFIE.pdf](http://www.kch.zcu.cz/cz/di/sks/02KAPALINOVA_CHROMATOGRAFIE.pdf)
- [36] Dostupné na URL: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJAOJ.htm>
- [37] Dostupné na URL: [www.fzp.ujep.cz](http://www.fzp.ujep.cz)
- [38] Dostupné na URL: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [39] Dostupné na URL:  
<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200540/hypertext/BOAJALB.htm>

- [40] CHURÁČEK, J., FRENČÍK, M., ŠKÁRA, B. a kol. *Biochemické laboratorní metody*, Alfa, Praha 1981
- [41] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*, Praha: SNTL, 1984
- [42] Dostupné na URL: [http://www.hplc.cz/Teorie/UV\\_VIS\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html)
- [43] Dostupné na URL: <http://www.jasco.co.uk/uv-vis.asp>
- [44] Dostupné na URL:  
<http://www.ecomsro.cz/cz/s40-Detail-produktu/Davkovani/c4-Davkovaci-ventily/p592-Ventil-D-davkovaci-analyticko-smyckovy-UNI>
- [45] Dostupné na URL:  
<http://www.labicom.cz/default.aspx?server=1&article=220&section=96>
- [46] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, 1. vydání, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 1996
- [47] Dostupné na URL: <http://www.hplc.cz/>
- [48] Dostupné na URL: [http://www.iontosorb.cz/cz/exp\\_tech.htm](http://www.iontosorb.cz/cz/exp_tech.htm)
- [49] DEAN, J. *Chemical Separation Methods*, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1969
- [50] JANDERA, P. a kol. *Kapalinová chromatografie*, ČVTS, Pardubice, 1979
- [51] Dostupné na URL: <http://jehlicnany.atlasrostlin.cz/jinan-dvoulalocny>
- [52] HECKER, U. *Stromy a keře*, REBO, 2003

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

HPLC Vysocúčinná kapalinová chromatografie

EGb 761 Molekula standardizovaného extraktu

GIT Gastrointestinální trakt

PC Počítač

UV Ultrafialové záření

CNS Centrální nervový systém

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1: List <i>Ginkgo biloby</i> – Jinan dvoulaločný	11
Obr. 2: List <i>Ginkgo biloby</i> na podzim	12
Obr. 3: Plod <i>Ginkgo biloby</i>	13
Obr. 4: Zralá semena <i>Ginkgo biloby</i>	13
Obr. 5: <i>Ginkgo biloba</i>	13
Obr. 6: Chemická struktura terpenů obsažených v <i>Ginkgo biloba</i>	15
Obr. 7: Vzorek Tebokanu	19
Obr. 8: Vzorek Gingia	20
Obr. 9: Vzorek GinkoPrimu	21
Obr. 10: Vzorek GS Ginkgo FORTE	21
Obr. 11: Vzorek Bio Biloby	22
Obr. 12: Vzorek Tanakanu	22
Obr. 13: Schéma uspořádání HPLC	27
Obr. 14: Dávkovací kohout s dávkovací smyčkou	28
Obr. 15: Chromatografická kolona	28
Obr. 16: Schéma detektoru diodového pole	29
Obr. 17: JASCO HPLC UV	29
Obr. 18: Detektor DAD	29
Obr. 19: Dávkovač	29
Obr. 20: HPLC s UV-VIS detektorem	30
Obr. 21: Fotometrický detektor	30
Obr. 22: Schéma elektrochemického detektoru	31
Obr. 23: Obsah kapsle Ginko FORTE	46
Obr. 24: Sražený obsah kapsle Ginko FORTE	46



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Gradientová eluce	36
Tabulka 2: Kalibrace kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV při vlnové délce 310 nm	42
Tabulka 3: Přesnost stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV	43
Tabulka 4: Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV	45
Tabulka 5: Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV	47
Tabulka 6: Vlastní stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV	48

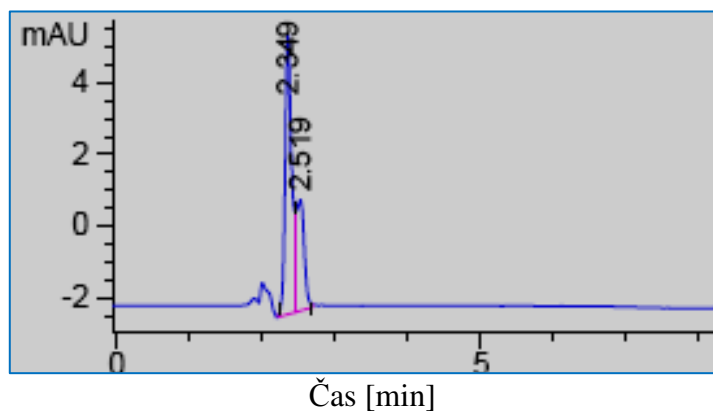
## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC-UV

## PŘÍLOHA P I: STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY GINKGOLOVÉ METODOU HPLC

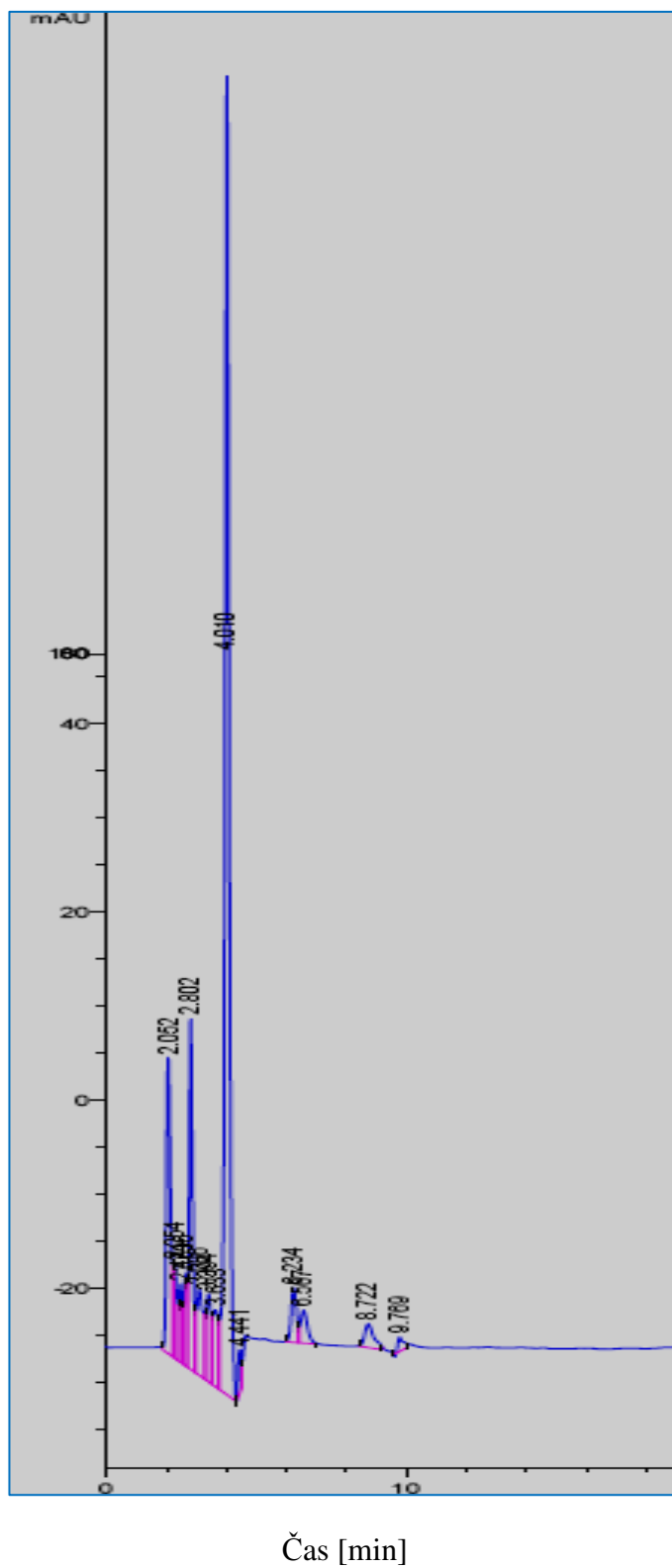
Chromatogram 1: Stanovení chromatografických podmínek pro měření kyseliny ginkgolové za použití standardu kyseliny ginkgolové

Výška píku



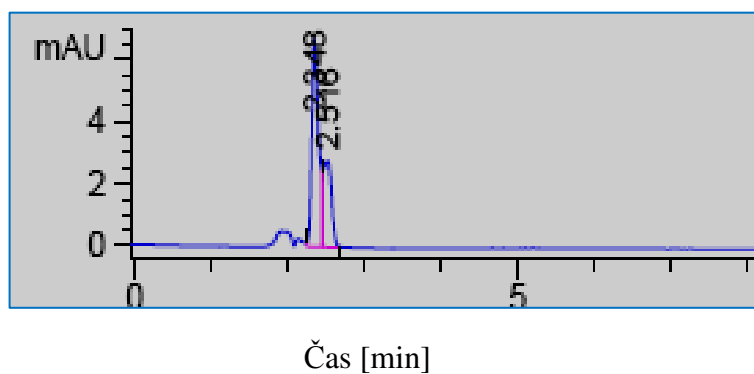
Chromatogram 2: Stanovení chromatografických podmínek pro měření kyseliny ginkgolo-  
vé v tabletách na bázi *Ginkgo biloby*

Výška píku



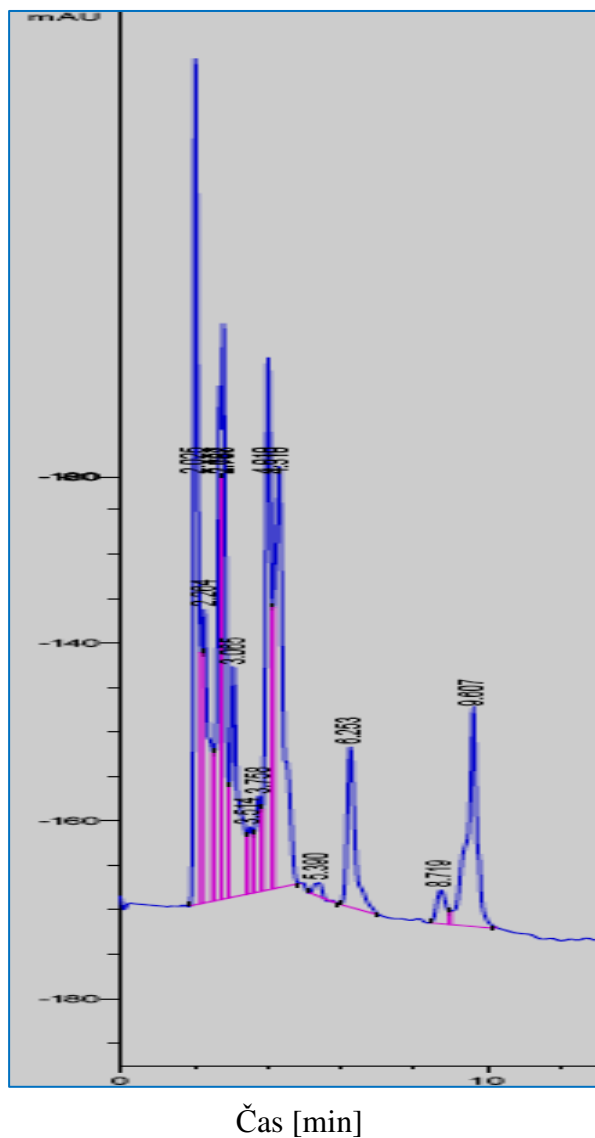
Chromatogram 3: Stanovení vhodných podmínek pro měření kalibrační křivky kyseliny ginkgolové a stanovení kyseliny ginkgolové v reálném vzorku potravního doplňku metodou HPLC-UV

Výška píku



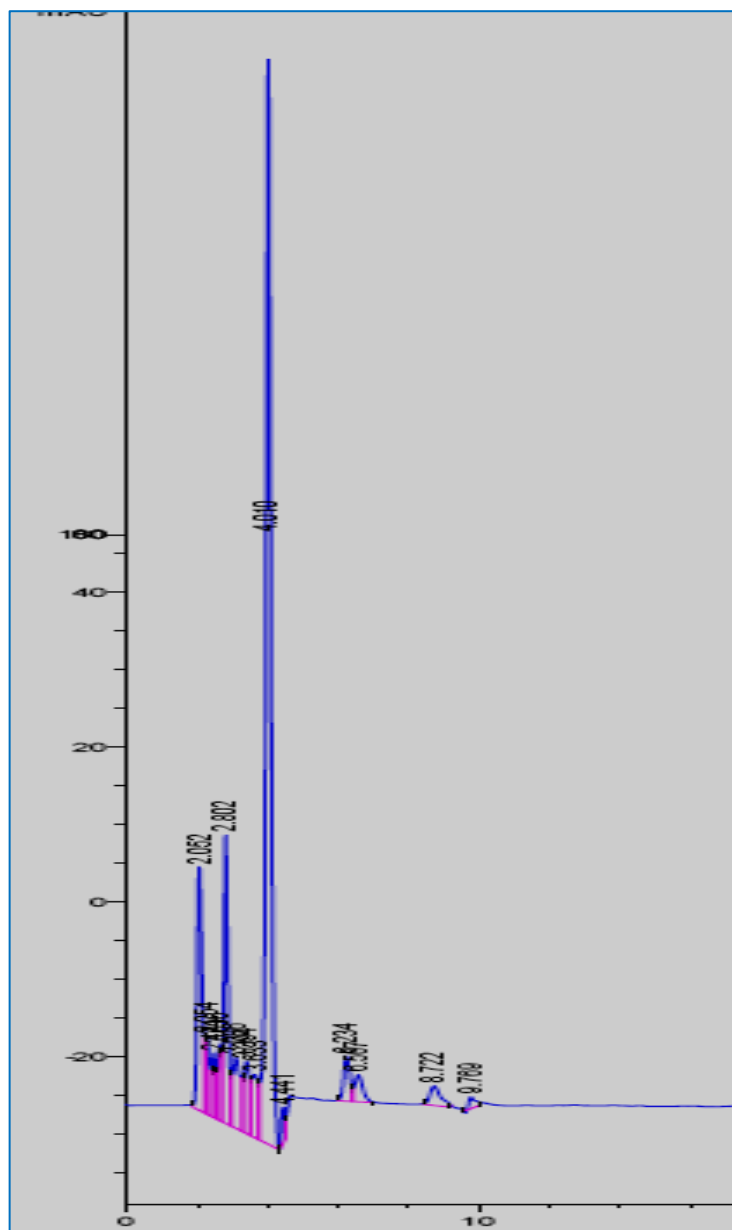
Chromatogram 4: Vlastní stanovení obsahu kyseliny ginkgolové v preparátech *Ginkgo biloby*

Výška píku



Chromatogram 5: Vlastní stanovení obsahu kyseliny ginkgolové v preparátech *Ginkgo biloby*

Výška píku



Čas [min]