

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



IZOLACE A PURIFIKACE ALFA A BETA HOŘKÝCH KYSELIN Z CHMELE

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jaroslav Jenčo, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Kateřina Malá

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL BOTANY



ISOLATION AND PURIFICATION OF ALPHA AND BETA BITTER ACIDS FROM HOPS

Diploma thesis

Supervisor: RNDr. Jaroslav Jenčo, Ph.D.

Head of the department: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Kateřina Malá

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce, RNDr. Jaroslavu Jenčovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce v laboratoři, za trpělivost a čas, který mi věnoval, a rovněž za změření hmotnostních spekter. Také bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Jakubu Chlebkovi, Ph.D. za spolupráci během provádění flash chromatografie. Mé poděkování rovněž patří doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., kterému vděčím za změření NMR spekter a ostatním zaměstnancům katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky, kteří mi byli v laboratoři nápomocni.

PROHLÁŠENÍ

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

Tato diplomová práce byla vypracovaná za finanční podpory projektu SVV 260 662.

V Hradci Králové, 23. 1. 2025

.....

Kateřina Malá

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

6-PN	6-prenylnaringenin
8-PN	8-prenylnaringenin
AChE	acetylcholinesteráza
AK	aminokyselina
BCAT	větvená aminotransferáza
BCKDH	větvená ketoaciddehydrogenáza
BChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervový systém
COX-2	indukovaná cyklooxygenáza
DER	poměr Drug to Extract Ratio
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DMX	desmethoxyxanthohumol
DS	doplňek stravy
DSM-V	pátá aktualizace sekce Sleep Wake Disorders klasifikačního systému Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (Food and Drug Administration)
GIT	gastrointestinální trakt
GMO	geneticky modifikovaný organismus
HICCL	chmelová karboxyl-CoA ligáza
HIV-1	druh 1 viru lidské imunodeficiency
HIVPS	chmelová valerofenonová syntáza
HSV-1	druh 1 viru <i>Herpes simplex</i>
HSV-2	druh 2 viru <i>Herpes simplex</i>
IBU	mezinárodní jednotka hořkosti
ICSD	klasifikační systém spánkových poruch International (Classification of Sleep Disorders)
ICSD-3	třetí aktualizovaná podoba ICSD
IS	imunitní systém
ISI	dotazník indexu závažnosti nespavosti (Insomnia severity index)

IX	isoxanthohumol
KBT	kognitivně behaviorální terapie
KVS	kardiovaskulární systém
LP	léčivý přípravek
MHBA	zralé hořké kyseliny
MZ ČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
MZe ČR	Ministerstvo zemědělství České republiky
NREM	synchronní spánek (non rapid eye movement)
OAV	hodnota aktivity vůně (Odor Activity Value)
PIBP	florisobutyrofenon
PIVP	florisovalerofenon
PMBP	flormethylbutanofenon
PS ČLS JEP	Psychiatrická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně
PT	prenyltransferáza
REM	fáze spánku doprovázená rychlým pohybem očí (rapid eye movement)
RHP	referenční hodnota příjmu
SOP	Systém pro oznamování potravin MZe ČR
SVL ČLS JEP	Společnost všeobecného lékařství České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TE	thioesteráza
XH	xanthohumol

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Chmel otáčivý [16] a samičí šištice chmelu otáčivého [2]	4
Obrázek 2. Plně vyvinutý peltátní trichom zachycený pomocí světelné mikroskopie [19]	5
Obrázek 3. Humulon.....	9
Obrázek 4. Kohumulon	9
Obrázek 5. Adhumulon	9
Obrázek 6. Prehumulon	9
Obrázek 7. Posthumulon	9
Obrázek 8. Lupulon	10
Obrázek 9. Kolupulon	10
Obrázek 10. Adlupulon	10
Obrázek 11. Prelupulon	10
Obrázek 12. Postlupulon	10
Obrázek 13. Schéma biosyntézy hořkých kyselin, modifikováno z článku [15]	12
Obrázek 14. Znázornění rostlinné buňky chmelu [4]	12
Obrázek 15. Xanthohumol.....	16
Obrázek 16. Isoxanthohumol.....	16
Obrázek 17. Desmethylxanthohumol	16
Obrázek 18. 8-prenylnaringenin	17
Obrázek 19. 6-prenylnaringenin	17
Obrázek 20. Nejvýznamnější složky chmelové silice, čerpáno z [14]	19
Obrázek 21. LLE – filtrace a následné oddělování fází pomocí děličky	39
Obrázek 22. TLC destičky pro S9, S8, S7, S6, S4, S5	43
Obrázek 23. TLC destičky pro S8, S10, S11 a S12	43
Obrázek 24. TLC po postříkání činidlem obsahujícím 2-aminoethyl-difenylboritan	43
Obrázek 25. HPLC chromatogram extraktu	44
Obrázek 26. GC/MS chromatogram extraktu	45
Obrázek 27. Předkolona pro flash chromatografii.....	47
Obrázek 28. Flash chromatografie sumárního extraktu	47
Obrázek 29. UV Flash chromatogram	48
Obrázek 30. Kontrolní TLC frakcí A až V.....	49

Obrázek 31. HPLC chromatogram, frakce C	50
Obrázek 32. HPLC chromatogram, frakce J	51
Obrázek 33. Chromatogram 1. preparativní HPLC frakce J, K a L	52
Obrázek 34. Chromatogram 3. preparativní HPLC frakce B a C.....	53
Obrázek 35. Kohumulon.....	54
Obrázek 36. HPLC-UV chromatogram kohumulonu	54
Obrázek 37. ESI-MS spektrum kohumulonu	55
Obrázek 38. EI-MS spektrum kohumulonu	55
Obrázek 39. Humulon	56
Obrázek 40. HPLC-UV chromatogram humulonů	56
Obrázek 41. ESI-MS spektrum humulonů	57
Obrázek 42. EI-MS spektrum humulonů	57
Obrázek 43. Kolupulon.....	58
Obrázek 44. HPLC-UV chromatogram kolupulonů	58
Obrázek 45. ESI-MS spektrum kolupulonů	59
Obrázek 46. EI-MS spektrum kolupulonů	59
Obrázek 47. Lupulon	60
Obrázek 48. HPLC-UV chromatogram lupulonů.....	60
Obrázek 49. ESI-MS spektrum lupulonů	61
Obrázek 50. EI-MS spektrum lupulonů	61
Obrázek 51. Svijanský Máz 11 %	62
Obrázek 52. Doplněk stravy HopsVital	62
Obrázek 53. Chromatogram izolovaných standardů v "overlay" módu	64
Obrázek 54. HPLC-UV a HPLC-MS chromatogram piva	64
Obrázek 55. HPLC-UV a HPLC-MS chromatogram doplňku stravy HopsVital	65

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Taxonomické kategorie charakterizující chmel otáčivý [10,11]	3
Tabulka 2. Chemické vlastnosti hořkých kyselin dle databáze ChemSpider [29]	8
Tabulka 3. Složení jednotlivých vyvíjecích soustav pro TLC	41
Tabulka 4. Složení vyvíjecí soustavy pro HPTLC, gradientová eluce	42
Tabulka 5. Jednotlivé migrační vzdálenosti u HPTLC	43
Tabulka 6. Gradientová eluce u HPLC	44
Tabulka 7. Látky identifikované pomocí GC-MS	46
Tabulka 8. Získané frakce po provedení flash chromatografie	49
Tabulka 9. Porovnání metody EBC 7.7 s optimalizovanou metodou	63
Tabulka 10. Charakteristiky píků standardů dle HPLC-UV chromatogramu	64
Tabulka 11. Charakteristiky píků u piva dle HPLC-UV chromatogramu	64
Tabulka 12. Charakteristiky píků u DS HopsVital dle HPLC-UV chromatogramu	65

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍL PRÁCE	2
3	TEORETICKÁ ČÁST	3
3.1	CHMEL OTÁČIVÝ – <i>HUMULUS LUPULUS</i> L.	3
3.1.1	<i>Taxonomické zařazení.....</i>	3
3.1.2	<i>Variety druhu Humulus lupulus</i>	5
3.1.3	<i>Výskyt chmelu.....</i>	6
3.1.4	<i>Používané drogy</i>	6
3.2	OBSAHOVÉ LÁTKY CHMELU	6
3.2.1	<i>Hořké kyseliny.....</i>	7
3.2.1.1	Alfa hořké kyseliny	8
3.2.1.2	Beta hořké kyseliny	9
3.2.1.3	Další hořké kyseliny	10
3.2.1.4	Biosyntéza hořkých kyselin	11
3.2.1.5	Hořké kyseliny v pivu	13
3.2.1.6	Biologická aktivita a použití hořkých kyselin	13
3.2.2	<i>Flavonoidy</i>	16
3.2.2.1	Flavonoidy vyskytující se v chmelu	16
3.2.2.2	Biologická aktivita a použití chmelových flavonoidů	17
3.2.3	<i>Silice.....</i>	18
3.2.3.1	Chmelová silice	18
3.2.3.2	Biologická aktivita a použití chmelové silice	19
3.3	NESPAVOST	20
3.3.1	<i>Vybrané poruchy spánku</i>	20
3.3.2	<i>Diagnostika nespavosti.....</i>	21
3.3.3	<i>Terapie nespavosti.....</i>	22
3.3.3.1	Nefarmakologická opatření	23
	Režimová terapie – spánková hygiena.....	23
	Kognitivně behaviorální psychoterapie	23
3.3.3.2	Farmakoterapie	24
	Hypnotika	25
	Další farmaka.....	25
3.3.3.3	Fytoterapie	27
3.4	NUTRACEUTIKA.....	28
3.4.1	<i>Význam nutraceutik.....</i>	28
3.4.2	<i>Legislativní vymezení.....</i>	29
3.4.3	<i>Kontrola nutraceutik.....</i>	30

3.4.4	<i>Terminologie</i>	31
3.4.5	<i>Doplňky stravy</i>	31
3.4.5.1	Uvádění doplňků stravy na trh	32
3.4.5.2	Označování doplňků stravy	32
3.4.5.3	Doplňky stravy s rostlinnými extrakty	34
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.1	CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A INSTRUMENTÁLNÍ VYBAVENÍ	36
4.1.1	<i>Chemikálie</i>	36
4.1.2	<i>Pomocný materiál</i>	36
4.1.3	<i>Rostlinný materiál</i>	36
4.1.4	<i>Přístroje a software</i>	37
4.1.5	<i>Chromatografické adsorbenty, kolony, kartridže</i>	38
4.2	OBECNÉ POSTUPY	38
4.2.1	<i>Příprava postřikového činidla</i>	38
4.2.2	<i>Zpracování rostlinného materiálu a příprava základního extraktu</i>	38
4.3	IZOLACE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ Z HUMULUS LUPULUS	40
4.3.1	<i>Vyvíjecí soustavy pro analytickou metodu TLC a HPTLC</i>	40
4.3.2	<i>Vlastní izolace hořkých kyselin</i>	41
4.3.3	<i>Analytická metoda HPLC/MS-ESI</i>	44
4.3.4	<i>Analýza GC/MS-EI</i>	45
4.3.5	<i>Flash chromatografie</i>	47
4.3.5.1	Analýza frakcí pomocí HPLC	50
4.3.6	<i>Preparativní HPLC</i>	51
5	VÝSLEDKY	54
5.1	ANALÝZA IZOLOVANÝCH STANDARDŮ HOŘKÝCH KYSELIN	54
5.1.1	<i>KOHUMULON</i>	54
5.1.2	<i>HUMULON</i>	56
5.1.3	<i>KOLUPULON</i>	58
5.1.4	<i>LUPULON</i>	60
5.2	POROVNÁNÍ PŘÍTOMNOSTI HOŘKÝCH KYSELIN V DOPLŇKU STRAVY A NÁPOJI S OBSAHEM CHMELU	62
5.2.1	<i>Úprava vzorku piva</i>	62
5.2.2	<i>Úprava vzorku doplňku stravy</i>	62
5.3	OPTIMALIZACE METODY PRO STANOVENÍ HOŘKÝCH KYSELIN	63
5.4	POROVNÁNÍ HPLC SEPARACE S IZOLOVANÝMI STANDARDY	64
6	DISKUSE A ZÁVĚR	66
7	POUŽITÁ LITERATURA	69

1 ÚVOD

Význam rostlin a jejich obsahových látek jako léčebných prostředků je znám již od starověku. I v současné éře moderních léčiv zůstávají rostliny jedním z klíčových zdrojů nových léčivých molekul – za poslední tři dekády více než 60 % nových aktivních farmaceutických substancí pochází buď přímo z přírodních zdrojů, nebo jejich syntéza byla inspirována přírodními látkami. Během posledních dekád se značně zdokonalily možnosti, jak obsahové látky z rostlin získávat. Pomocí širokého spektra analytických metod, které zahrnuje chromatografické metody, elektroforézu, izotopové techniky nebo enzymologii, je možné obsahové látky přesně strukturně charakterizovat [1,2,3].

Chmel otáčivý je především známý tím, že se používá při výrobě piva. Hlavními obsahovými látkami chmele jsou hořké kyseliny, které je možné rozdělit na alfa a beta kyseliny. Hořké kyseliny v pivu zodpovídají za jeho hořkost. Pro pivovarnictví jsou významné i chmelové siličné látky, které dodávají pivu specifickou chuť a aroma. Nicméně obsahové látky chmele, jež kromě hořkých kyselin a siličných látek zahrnují i flavonoidy, mají také různé biologické účinky, které mohou být užitečné ve farmacii [4,5].

Použití chmele k léčbě nespavosti je jednou z nejstarších a nejtradičnějších aplikací této rostliny. Sedativní účinky chmele byly pozorovány u sběraček během jeho intenzivního pěstování pro výrobu piva, avšak tyto vlastnosti byly známy už mnohem dříve. Ve starověkém Římě byly chmelu připisovány uklidňující účinky, rostlina se používala jako hypnotikum i proti křečím. V minulosti se také chmel používal k plnění nahrátek polštářů, které měly pomáhat zlepšit spánek. Sedativní účinky vykazují jak hořké kyseliny, tak i jejich derivát 2-methyl-3-buten-2-ol [4,6,7].

Nespavost je poruchou spánku s poměrně vysokou prevalencí. Jedná se o závažné onemocnění, které může výrazně snížit kvalitu života a vést k únavě, usínání a podrážděnosti během dne. Vzhledem k tomu, že použití farmakoterapie v léčbě nespavosti je rozporuplné, jelikož farmaka často ne příliš pozitivně ovlivňují kvalitu spánku, může být použití přírodních léčiv velmi žádané [8,9].

Cílem této diplomové práce bylo izolovat a purifikovat hořké kyseliny a další fytochemicky zajímavé látky z chmele za účelem získání jejich standardů. Výzkum navazuje na probíhající studii kvantitativní analýzy obsahových látek nutraceutik na podporu nespavosti s výtažky z *Humulus lupulus* L.

2 CÍL PRÁCE

- 1) Vypracování odborného přehledu dané problematiky
 - Obsahové látky chmele, jeho význam a využití v nutraceutikách
- 2) Zvládnutí izolační a analytické metodiky
 - Izolace hořkých kyselin z chmele a jejich porovnání v doplňcích stravy a nápojích
- 3) Extrakce a přečištění cílových látek pomocí separačních technik
 - Purifikace standardů hořkých kyselin
- 4) Zpracování výsledků
- 5) Sepsání diplomové práce

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Chmel otáčivý – *Humulus lupulus* L.

3.1.1 Taxonomické zařazení

Tabulka 1. Taxonomické kategorie charakterizující chmel otáčivý [10,11]

říše	<i>Plantae</i> (rostliny)
oddělení	<i>Magnoliophyta</i> (rostliny krytosemenné)
třída	<i>Rosopsida</i> (vyšší dvouděložné rostliny)
řád	<i>Rosales</i> (růžotvaré)
čeleď	<i>Cannabaceae</i> (konopovité)
rod	<i>Humulus</i> (chmel)
druh	<i>Humulus lupulus</i> L. (chmel otáčivý)

Přiřazení čeledi *Cannabaceae* k řádu *Rosales* bylo učiněno teprve v roce 2003, do té doby byla tato čeleď řazena k řádu *Urticales*. V řádu *Rosales* lze kromě čeledi konopovitých nalézt i čeledi *Moraceae* (morušovníkovité), *Rosaceae* (růžovité), *Rhamnaceae* (řešetlákovité), *Eleagnaceae* (hlošínovité) či *Urticaceae* (kopřivovité) [2].

Čeleď *Cannabaceae* původně zahrnovala pouze dva rody – *Humulus* a *Cannabis*. Až po provedení fylogenetických studií a sloučení čeledi s původní čeledí *Celtidaceae* došlo k rozšíření čeledi konopovitých o rody *Aphananthe*, *Celtis*, *Chaetachme*, *Gironniera*, *Lozanella*, *Parasponia*, *Pteroceltis* a *Trema*. Původní rody *Humulus* a *Cannabis* byly před vytvořením čeledi konopovitých v roce 1925 považovány za členy čeledí *Moraceae* a *Urticaceae*. Čeleď tedy současně zahrnuje 10 rodů, které obsahují přibližně 117 druhů [12,13].

K rodu *Humulus* kromě druhu *H. lupulus* L. náleží i druhy *H. japonicus* (synonymum: *H. scandens*; chmel japonský) a *H. yunnanensis*. *H. japonicus* se od druhu *H. lupulus* odlišuje i tím, že neprodukuje hořké kyseliny ani deriváty xanthohumolu [13].

Humulus lupulus L. (chmel otáčivý) je dvoudomá rostlina vytrvalého charakteru. Jedná se o popínavou liánu. Rostlinu lze využívat přibližně po dobu 25 až 30 let. Lodyha chmelu je pravotočivě ovíjivá, pevná a drsná a na sobě má tuhé dvouramenné přichytné chlupy. Rostlina může dosahovat délky 6 až 18 metrů. Listy chmelu jsou vstřícné a dlanité, mohou být troj- až pětialočné, na okrajích jsou pilovité. Květy chmelu jsou dvoudomé. Samičím rostlinám, které se pěstují na rozdíl od samčích kulturně, se v úžlabí listů vytvářejí svazky pestíkových

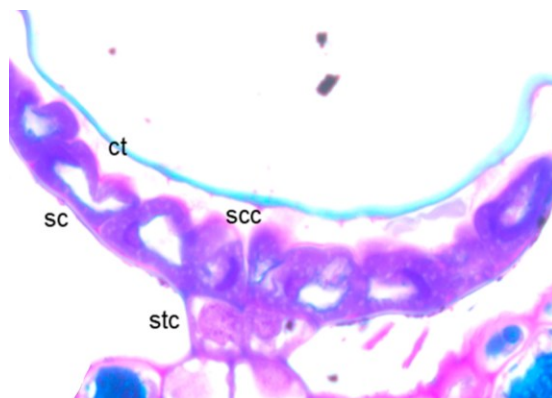
květů. U těchto samičích rostlin se během zrání formují chmelové šištice. Naopak samčí rostliny mají květy obsahující prašníky. Rozmnožování chmelu probíhá vegetativně [2,14,15,16,17,18].



Obrázek 1. Chmel otáčivý [16] a samičí šištice chmelu otáčivého [2]

Chmelové výhonky začínají v podobě lián růst během jara, při šplhání rostlin se uplatňují jejich tuhé příchytne chlupy. Samičí šištice jsou tvořeny během léta a sklizeň probíhá k jeho konci nebo s příchodem podzimu, v době, kdy chmelová šištice obsahuje největší množství pryskyřice. Ihned po sklizni jsou samičí šištice sušeny horkým vzduchem a často lisovány do válcovitých pelet, čímž dojde ke snížení celkového povrchu a tím ke snížení chemické degradace obsahových látek [13].

V rostlině se vyskytují tři typy sekrečních struktur. Nejvýznamnější jsou žláznaté trichomy nacházející se na chmelových šišticích a listech chmelu. Trichomy mohou být dvojího morfologického typu – s kulatou, nebo radiální hlavičkou. Žláznaté trichomy s radiální hlavičkou, jinak zvané peltátní žláznaté trichomy, se u chmelu mohou označit pojmem lupulinové žlázky [19].



Obrázek 2. Plně vyvinutý peltátní trichom zachycený pomocí světelné mikroskopie [19]

(ct = kutikula, sc = sekreční buňky, scc = subkutikulární dutina, stc = buňky stopky)

Kromě žláznatých trichomů chmel disponuje i sekrečním systémem latexových kanálků a fenolickými idioblasty. Latexové kanálky a fenolické idioblasty, podobně jako lupulinové žlásky, produkují řadu látek charakteru sekundárních metabolitů, které vykazují pozitivitu na detekční činidla pro fenolické sloučeniny, terpeny, alkaloidy, třísloviny a další. Systém latexových kanálků je prostoupen kromě kořenů a prašníků celou rostlinou. Fenolické idioblasty se nacházejí v listech, kořenech a květech chmelu [19].

3.1.2 Variety druhu *Humulus lupulus*

Druh *Humulus lupulus* L. se na Zemi vyskytuje v několika varietách. Popsány byly var. *lupulus*, var. *cordifolius*, var. *neomexicanus*, var. *lupuloides*, var. *pubescens* a var. *brachystachyus*. Varieta *lupulus* je domácí v Evropě, ostatní variety se vyskytují v Asii (jak na pevnině, tak v ostrovním Japonsku) a Severní Americe [13,20].

Existuje i řada dalších kultivarů, které vznikly cíleným křížením variet z různých kontinentů a je jich známo více než sto. Některé z vytvořených kultivarů jsou schopné produkovat zvýšené množství hořkých kyselin, zatímco jiné byly kultivovány pro získání vyššího množství silice [13,20].

V případě chmelu japonského se často jedná o jednoroční rostlinu, která se vyskytuje zejména v Japonsku, Koreji a Číně. Samičí květenství se podobají šišticím chmelu otáčivého, ale neobsahují takové množství pryskyřice, tudíž využití chmelu japonského je omezeno zejména na okrasné účely. Rostlina však obsahuje značné množství flavonoidů, které mají množství možných biologických účinků. Druh *H. yunnanensis* je endemitem čínské provincie Yunnan. Jedná se o vytrvalou rostlinu [16].

3.1.3 Výskyt chmelu

Chmel je původní rostlinou východní Evropy, ale nyní se vyskytuje také v téměř celé střední Evropě, stejně jako ve střední a severní Asii. Lze jej nalézt také v Africe a Severní Americe. Při pěstování chmelu v kulturách pro léčebné nebo pivovarnické účely se využívají výhradně samičí rostliny. Samčí rostliny, které produkují pyl, se záměrně v oblastech kulturního pěstování chmelu nevysazují, aby nedocházelo k opylení samičích šištic a tvorbě semen, čímž se zajišťuje stálá kvalita produktu. Divoce rostoucí chmel nelze pro léčebné ani pivovarnické účely použít. V České republice jsou významnými oblastmi pro pěstování chmelu pro pivovarnictví zejména Žatecko, Roudnicko, Úštěcko, Rakovnicko, Slánsko a Českolipsko. Vzhledem k tomu, že v Číně jsou přítomny všechny tři druhy rodu *Humulus* současně, je možné, že poprvé se chmel vyskytl v Asii a až poté se začal šířit do Evropy a Severní Ameriky [14,16,17,18,21].

3.1.4 Používané drogy

Jako drogy získávané z chmelu otáčivého se využívají samičí šišťice (*Lupuli flos*, případně *Lupuli strobilus*) a samičí žláзки (*Lupuli glandulae*). Samičí, neboli lupulinové žláзки se nacházejí na šišťicích i listech chmelové rostliny a jsou tvořeny žláznatými trichomy [22].

Droga *Lupuli flos* je popsána v Českém lékopise 2017, kde je v rámci zkoušek totožnosti uvedeno, že chmelové šišťice jsou zpravidla dlouhé dva až pět centimetrů, mají vejčitý tvar a jejich rozpráškovaná forma má zelenožlutou barvu. Oproti tomu droga *Lupuli glandulae* v Českém lékopise 2017 zahrnuta není [23].

Droga *Lupuli flos* vykazuje širokou škálu biologických účinků. Její hlavní farmakologickou vlastností je sedativní efekt. K dalším potenciálním účinkům patří antioxidační, estrogenní, antibakteriální, antifungální a antivirové vlastnosti, podpora trávení a také protinádorová aktivita. Projevuje se taky protizánětlivými a neuroprotektivními účinky a může ovlivnit metabolický syndrom a kognitivní funkce. V pivovarnictví nachází droga uplatnění jakožto korigens chuti, hořčina i konzervant [4,6,15,24,25].

3.2 Obsahové látky chmelu

Mezi obsahové látky rostlin lze zařadit primární metabolity, sekundární metabolity a hormony. Hormony jsou zodpovědné za regulaci procesů v organismu a rovněž se podílí na metabolismu. Rozdíl mezi primárními a sekundárními metabolity je v tom, že primární metabolity jsou nezbytné pro základní životní funkce rostliny, jako jsou růst, dýchání

a fotosyntéza, zatímco sekundární metabolity nejsou pro její přežití bezprostředně nezbytné [26,27].

Sekundární metabolity hrají roli v interakcích rostliny s okolním prostředím. Přítomnost různých sekundárních metabolitů může být typická pro jednotlivé rostliny. Tyto metabolity lze rozdělit do tří hlavních skupin – fenolických sloučenin, terpenů a sloučenin obsahujících dusík. Fenolické sloučeniny vznikají metabolickou přeměnou šikimátu, terpeny jsou metabolity tvořené z 2-methyl-buta-1,3-dienových jednotek a sloučeniny obsahující dusík je možné rovněž označit jako produkty metabolismu aminokyselin (AK). Sekundární metabolity mohou často představovat prostředky, které mohou potenciálně snížit riziko civilizačních onemocnění [26,27,28].

Co se týče primárních metabolitů, chmel obsahuje sacharidy glukózu, fruktózu, maltózu a galaktózu, dále pektin a cukerné alkoholy, například myo-inositol. Z aminokyselin je nejtypičtější asparagin, který tvoří až 75 % hmotnosti všech AK [16].

Hlavní složkou chmelové šišťice je chmelová pryskyřice, další významnou složku představuje chmelová silice. V droze *Lupuli flos* a obecně v chmelu lze identifikovat následující sekundární metabolity: pryskyřičné hořké kyseliny, terpeny a další složky tvořící silici, prenylované flavonoidy a kondenzované trísloviny [14,15,27,28].

3.2.1 Hořké kyseliny

Pryskyřice tvoří hlavní složku drog *Lupuli flos* a *Lupuli glandulae*. V chmelové pryskyřici jsou obsaženy hořčiny floroglucinového typu neboli hořké kyseliny [14].

Hořčiny jako obsahové látky různých rostlinných drog jsou chemicky různorodou skupinou. Pokud v droze obsažené hořčiny nemají žádný další farmakologický význam a drogy se vyznačují pouze svou hořkou chutí, označují se tyto drogy jako amara. Mezi významné hořčiny patří iridoidní glykosidy (čeledi *Gentianaceae*, *Menyanthaceae*, *Plantaginaceae*), terpeny (často seskviterpeny – například drogy *Absinthii herba*, *Cardui benedicti herba*, nebo diterpeny – *Marrubii herba*), steroidy (*Condurango cortex*) nebo florogluciny, jež jsou právě obsaženy v drogách chmelu. V lékopisu je obsah hořčin hodnocen zkouškou nazývanou číslo hořkosti [14].

Hořčiny floroglucinového typu zahrnují zejména alfa a beta hořké kyseliny. Tyto kyseliny tvoří 15 až 30 % hmotnosti drogy *Lupuli flos* a v droze *Lupuli glandulae* dokonce 50 až 80 %. Zastoupení alfa a beta hořkých kyselin, respektive jejich poměr, závisí na konkrétní varietě

chmelu. Jejich celkové množství může během skladování klesat, podobně jako v případě těkavých složek chmelových silic. Hořké kyseliny mají světle žlutou barvu, olejovitou až pryskyřičnou strukturu a jsou snadno rozpustné v uhlovodíkových rozpouštědlech, například v hexanu [14,15].

Tabulka 2. Chemické vlastnosti hořkých kyselin dle databáze ChemSpider [29]

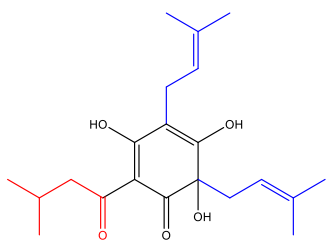
	<i>logD</i> (pH 5,5)	<i>logD</i> (pH 7,4)	<i>index lomu</i>	<i>logP</i>	<i>molekulová hmotnost</i>
<i>humulon</i>	2.41	0.79	1.558	5.14	362.466
<i>kohumulon</i>	4.31	2.53	1.563	5.81	348.439
<i>adhumulon</i>	2.41	0.79	1.558	5.14	362.466
<i>lupulon</i>	5.48	3.81	1.530	8.77	414.586
<i>kolupulon</i>	6.80	5.13	1.532	8.23	400.559
<i>adlupulon</i>	4.78	3.13	1.530	7.81	414.586
<i>isohumulon</i>	1.14	0.41	1.537	5.26	362.466
<i>isokohumulon</i>	0.84	0.18	1.541	4.73	348.439

3.2.1.1 Alfa hořké kyseliny

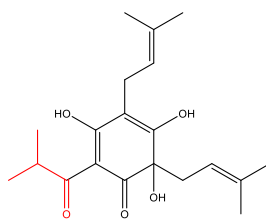
Jako alfa hořké kyseliny se označují monoacylflorogluciny se dvěma dimethylallylovými postranními řetězci. Patří mezi ně humulon a jeho deriváty: kohumulon, adhumulon, prehumulon a posthumulon. Alfa hořké kyseliny nejsou příliš stálé. Jejich obsah v chmelu se pohybuje mezi 2 až 15 hmotnostními procenty. Podíl jednotlivých alfa hořkých kyselin v jejich celkovém množství je následující: humulon tvoří 35 až 70 %, kohumulon 20 až 65 % a adhumulon 10 až 15 %. Množství humulonu a kohumulonu se odvíjí od typu chmelu a podmínek jeho pěstování, zatímco množství adhumulonu zůstává relativně stálé napříč různými typy chmelu. Prehumulon a posthumulon se vyskytují pouze minoritně. Vyšší obsah kohumulonu bývá někdy spojován s nižší kvalitou chmelu, i když toto tvrzení zůstává předmětem odborných diskusí [4,14,15,20].

Během výroby piva dochází k poklesu podílu alfa hořkých kyselin, zatímco podíl iso-alfa hořkých kyselin se naopak zvyšuje. Tento proces je důsledkem izomerizačních reakcí, které probíhají během vaření mladiny a vedou k přeměně alfa hořkých kyselin na iso-alfa hořké kyseliny, jež jsou poté hlavními hořkými složkami piva. Alfa hořké kyseliny samotné nemají hořkou chuť. Rychlost izomerizačních reakcí je silně závislá na teplotě. Hořkost piva se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách hořkosti (IBU), které odkazují na koncentraci iso-alfa hořkých kyselin. 1 IBU odpovídá 1 mg iso-alfa hořkých kyselin v 1 litru piva [4,13,30,31].

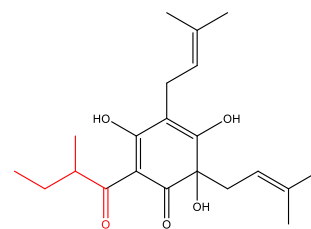
V obrázku znázorňujícím chemickou strukturu humulonu jsou modře vyznačeny dva dimethylallylové postranní řetězce.



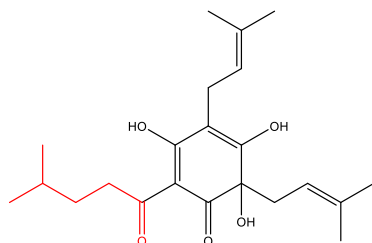
Obrázek 3. Humulon



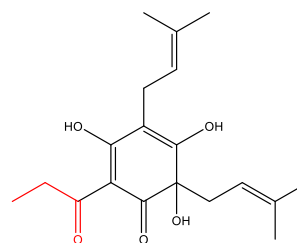
Obrázek 4. Kohumulon



Obrázek 5. Adhumulon



Obrázek 6. Prehumulon

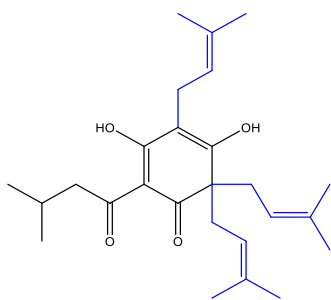


Obrázek 7. Posthumulon

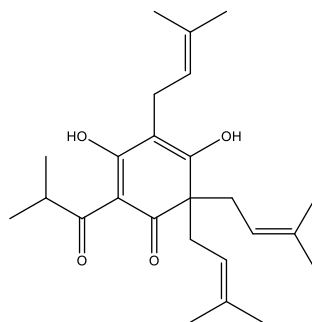
3.2.1.2 Beta hořké kyseliny

Beta hořké kyseliny jsou strukturně rovněž monoacylflorogluciny, na rozdíl od alfa kyselin však se třemi dimethylallylovými postranními řetězci. Tento rozdíl způsobuje, že jsou chemicky méně kyselé než odpovídající alfa hořké kyseliny. Díky dalšímu dimethylallylovému řetězci a nižší kyselosti neizomerizují během vaření piva, jako je tomu u alfa hořkých kyselin. Mezi beta hořké kyseliny patří lupulon a jeho deriváty: kolupulon, adlupulon, prelupulon a postlupulon. Co se týče zastoupení jednotlivých beta hořkých kyselin v jejich celkovém množství, lupulon tvoří 30 až 55 %, kolupulon 20 až 65 % a adlupulon 10 až 15 %. Analogicky k alfa hořkým kyselinám se prelupulon a postlupulon vyskytují také pouze v minoritním množství. Celkový obsah beta hořkých kyselin v chmelu činí 2 až 10 %. V pivovarnictví jsou beta hořké kyseliny méně důležité než alfa, jelikož jsou méně rozpustné v mladině a pivu. Beta hořké kyseliny nemají hořkou chuť. Mohou velmi snadno oxidovat [4,14,15,16,20].

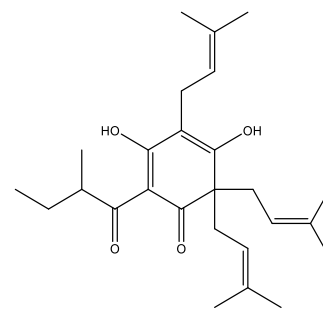
Tři dimethylallylové postranní řetězce jsou znázorněny v obrázku popisujícím chemickou strukturu lupulonu, opět modrou barvou.



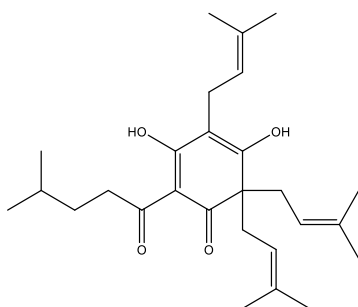
Obrázek 8. Lupulon



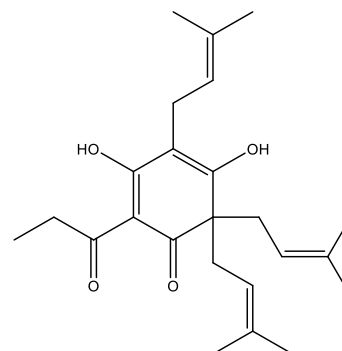
Obrázek 9. Kolupulon



Obrázek 10. Adlupulon



Obrázek 11. Prelupulon



Obrázek 12. Postlupulon

Prefixy *ko-*, *ad-*, *pre-* a *post-*, ať už u alfa, nebo beta hořkých kyselin, souvisejí se strukturou postranního acylového řetězce. Základní hořké kyseliny, tedy humulon a lupulon, obsahují stejně jako ostatní deriváty dva nebo tři dimethylallylové postranní řetězce. Odlišující acylový postranní řetězec je u humulonu a lupulonu tvořen isovalerylovou skupinou. U derivátů s prefixem *ko-*, tedy kohumulonu a kolupulonu, se nachází isobutyrylový postranní řetězec, u derivátů s prefixem *ad-* methylbutyrylový, s prefixem *pre-* isohexanoylový a s prefixem *post-* propanoylový postranní řetězec [4].

Rozlišení jednotlivých postranních řetězců je znázorněno v obrázcích znázorňujících chemické struktury humulonu a jeho derivátů, a to červenou barvou.

3.2.1.3 Další hořké kyseliny

Jak již bylo zmíněno, kromě alfa a beta hořkých kyselin jsou důležité i iso-alfa hořké kyseliny, které vznikají z alfa hořkých kyselin během vaření piva. Iso-alfa hořké kyseliny jsou více rozpustné ve vodě než alfa hořké kyseliny a také jsou daleko více hořké. Tyto kyseliny jsou odpovědné za hořkost piva. Lze k nim zařadit isohumulon, isokohumulon a isoadhumulon. Iso-alfa hořké kyseliny se vyskytují jako směs jednotlivých *cis-* a *trans-* izomerů, kde *cis-* izomer je ten stabilnější [4,15,25].

Existují i iso-beta hořké kyseliny, které je možné rovněž označit jako hulupony. Mohou vznikat oxidací beta hořkých kyselin, které jsou, jak již bylo zmíněno, velmi citlivé na oxidaci. Hulupony jsou vysoce stabilní a na rozdíl od beta hořkých kyselin mají hořkou chuť, jsou však o něco méně hořké než iso-alfa kyseliny. Patří k nim hulupon, kohulupon nebo adhulupon. Dále se v chmelu vyskytují hulupinové kyseliny nebo humulinony, připravit lze i redukované iso-alfa hořké kyseliny či humulinové kyseliny. Oxidované hořké kyseliny, tedy hulupony jakožto oxidované beta hořké kyseliny a humulinony jakožto oxidované alfa hořké kyseliny, je možné označit termínem zralé hořké kyseliny (MHBA = matured hop bitter acids) [4,15,25].

3.2.1.4 Biosyntéza hořkých kyselin

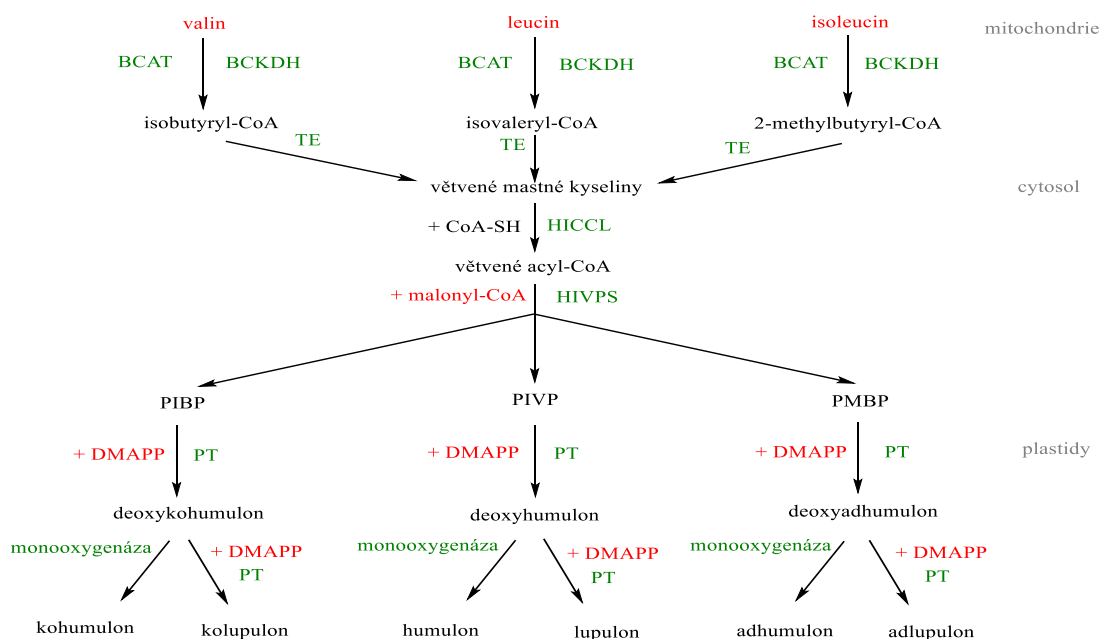
Hořké kyseliny jsou prenylované deriváty floriglucitolu. Biosyntéza hořkých kyselin probíhá v buňkách lupulinových žlázek, které jsou přítomny jak na šišticích, tak na listech chmelu. Již podle dřívějších studií bylo zjištěno, že biosyntéza hořkých kyselin vyžaduje přítomnost větvených AK a malonyl-CoA jako klíčových prekurzorů pro tvorbu polyketidových struktur hořkých kyselin. Další výzkumy ukázaly, že tento proces je vysoce kompartmentalizovaný. Třetím potřebným prekurzorem je dimethylallylpyrofosfát, který se chová jako prenylový donor [4,22].

V počátečních fázích biosyntézy se větvené AK, tedy leucin, isoleucin a valin, přeměňují v mitochondriích na větvené acyl-CoA. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy větvenou aminotransferázou (BCAT) a větvenou ketoaciddehydrogenázou (BCKDH). Výsledné acyl-CoA, které slouží jako prekurzory pro budoucí hořké kyseliny, zahrnují 2-methylbutyryl-CoA (pro adhumulon a adlupulon), isobutyryl-CoA (pro kohumulon a kolupulon) a isovaleryl-CoA (pro humulon nebo lupulon) [4].

Tyto acyl-CoA se pomocí thioesterázy (TE) přesouvají z mitochondrií do cytosolu. V cytosolu se opět esterifikují za působení chmelové karboxyl-CoA ligázy (HICCL) a následně reagují se třemi molekulami malonyl-CoA, což vede ke vzniku acylfloriglucitolů, které také lze označit jako polyketidová jádra. Tento proces katalyzuje enzym chmelová valerofenonová syntáza (HIVPS). Vznikající acylfloriglucitoly zahrnují flormethylbutanofenon (PMBP) z 2-methylbutyryl-CoA, florisobutyrofenon (PIBP) z isobutyryl-CoA a florisovalerofenon (PIVP) z isovaleryl-CoA [4,22].

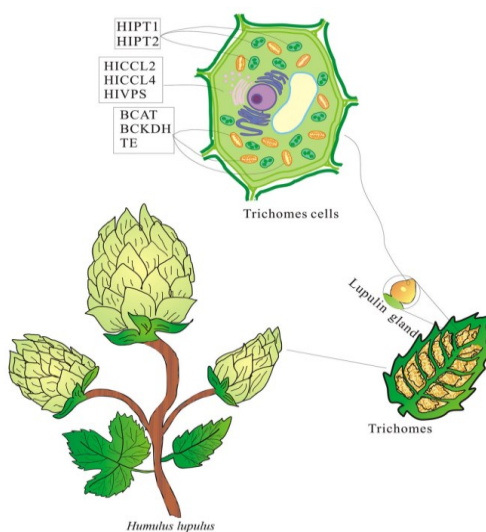
Poslední fáze biosyntézy probíhá v plastidech, kde dochází k prenylaci acylfloriglucitolů. Při reakci s dimethylallylpyrofosfátem (DMAPP), katalyzované

prenyltransferázou (PT), se vytvářejí hořké kyseliny. V tomto konečném kroku prenylace se rozhoduje, zda vzniknou alfa, nebo beta hořké kyseliny. Nejprve dojde ke dvěma prenylačním reakcím, jejímiž produkty jsou diprenylové meziprodukty (deoxyderiváty alfa hořkých kyselin). Beta hořké kyseliny vznikají poté po proběhnutí třetí prenylace, zatímco alfa hořké kyseliny jsou produktem dvou prenylačních reakcí a následného oksyložením pomocí monooxygenázy [4,22].



Obrázek 13. Schéma biosyntézy hořkých kyselin, modifikováno z článku [15]

(zeleně jednotlivé katalyzující enzymy, červeně prekurzory hořkých kyselin)



Obrázek 14. Znázornění rostlinné buňky chmelu [4]

(rozlišení, zda se enzymy podílející se na biosyntéze nacházejí v mitochondriích, plastidech, nebo v cytosolu)

3.2.1.5 Hořké kyseliny v pivu

Zastoupení jednotlivých hořkých kyselin v pivu je následující: alfa hořké kyseliny se mohou vyskytovat v koncentracích až 4 mg na litr piva, iso-alfa hořké kyseliny v koncentracích 10 až 100 mg. Význam alfa hořkých kyselin v pivu souvisí s jejich schopností stabilizovat pěnu, potlačovat pění, přispívat k uchování piva a v neposlední řadě právě k možnosti izomerizovat na iso-alfa hořké kyseliny, jež pivu dodávají potřebnou hořkost. Nežádoucím důsledkem obsahu iso-alfa hořkých kyselin v pivu může být vznik tzv. lightstruck (skunkového) aromatu po vystavení světlu. Konečný výtěžek alfa hořkých kyselin v pivu se pohybuje mezi 25 až 35 %, přičemž ztráty jsou způsobeny adsorpcí iso-alfa hořkých kyselin na pevné částice nebo kvasinky a dalšími oxidačními procesy, které nevedou k tvorbě iso-alfa hořkých kyselin. Hulupony se vyskytují v koncentracích několika mg na litr piva, nicméně společně s beta hořkými kyselinami jejich obsah není pro kvalitu piva tolik důležitý. Iso-alfa hořké kyseliny tvoří více než 80 % všech chmelových složek v pivu [15].

3.2.1.6 Biologická aktivita a použití hořkých kyselin

Možnosti terapeutického využití drogy *Lupuli flos* a její různé biologické aktivity jsou zmíněny již výše. Mnohé z těchto aktivit jsou přisuzovány přítomnosti hořkých kyselin. Dosavadní výzkumy zaměřené na účinky hořkých kyselin a dalších složek chmelu byly realizovány převážně na sumárních extraktech, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*, obvykle na laboratorních zvířatech. Přesto však dosud chybějí jednoznačné závěry týkající se farmakologického profilu těchto látek. Pro komplexnější pochopení jejich účinků je nezbytné získat podrobnější farmakokinetické informace o jednotlivých sloučeninách a provést další výzkum, ideálně prostřednictvím randomizovaných, dvojitě zaslepených a placebem kontrolovaných klinických studií [4,6,15].

- **Sedativní aktivita**

Sedativní a hypnotické účinky chmelu jsou známy již dlouhou dobu, počínaje pozorováním únavy a ospalosti u sběračů této rostliny. Podle dostupných studií souvisejí tyto účinky především s obsahem alfa a beta hořkých kyselin, přičemž alfa kyseliny působí hypnoticky a sedativně, kdežto beta kyseliny spíše anxiolyticky. Sedativně rovněž působí látka 2-methyl-3-buten-2-ol, derivát hořkých kyselin, jenž se v chmelu nachází v nízkých koncentracích. Účinek mohou podporovat i obsažené flavonoidy. Studie, které se zabývaly sedativním působením alfa hořkých kyselin, prokázaly, že tyto sloučeniny mohou prodloužit

dobu spánku, která byla indukována pentobarbitalem. Chmel je jakožto sedativně působící bylina často kombinován s kozlíkem nebo mučenkou [4,6,9].

- **Antibakteriální aktivita**

Chmel je historicky využíván pro zvýšení trvanlivosti piva. Hlavním mikrobiálním kontaminantem piva je grampozitivní bakterie *Lactobacillus sp.* Antibakteriální účinky proti těmto bakteriím vykazují nejen hořké kyseliny, ale podle některých studií také chmelové silice a flavonoid xanthohumol. Z hořkých kyselin jsou nejúčinnější beta hořké kyseliny, zatímco iso-alfa hořké kyseliny jsou nejméně účinné. Tento rozdíl vyplývá ze vztahu mezi antibakteriální účinností a hydrofobicitou molekul – vyšší hydrofobicita zvyšuje antibakteriální aktivitu, zatímco vyšší rozpustnost ve vodě ji snižuje. Beta hořké kyseliny mají více postranních dimethylallylových řetězců, což zvyšuje jejich hydrofobicitu. Naopak iso-alfa hořké kyseliny, které jsou ve vodě přibližně 25krát rozpustnější než alfa hořké kyseliny, vykazují nejnižší antibakteriální aktivitu právě z tohoto důvodu. Hydrofobicita se také zvyšuje s prodlužujícím se postranním acylovým řetězcem. Dalším faktorem, který ovlivňuje míru antibakteriálního účinku, je pH prostředí – s jeho poklesem antibakteriální aktivita stoupá. Kromě svého tradičního využití při konzervaci piva mohou hořké kyseliny potenciálně najít uplatnění i při konzervaci potravin, například proti časté kontaminaci grampozitivní bakterií *Listeria sp.*, či v průmyslové výrobě ethanolu. Avšak pro účinnou konzervaci potravin by bylo potřeba použít poměrně vysoké koncentrace těchto kyselin [4,6,15].

- **Protinádorová aktivita**

Hořké kyseliny vykazují i jisté protinádorové účinky, a to prostřednictvím různých mechanismů. Působí jako inhibitory růstu nádorových buněk, například humulon na premyelocytární leukemické buňky a lupulon na buňky kolorektálního karcinomu. Mohou fungovat jako blokátory karcinogenních drah, například humulon a redukované iso-alfa hořké kyseliny inhibují signální dráhu enzymu cyklooxygenázy-2 (COX-2), která je často spojována s rozvojem nádorových onemocnění. Dále působí jako induktory apoptózy, kdy humulon podporuje programovanou buněčnou smrt v některých leukemických buněčných liniích, a jako inhibitory angiogeneze, přičemž humulon snižuje hladinu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). Kromě hořkých kyselin se protinádorovými účinky vyznačuje také flavonoid xanthohumol, který dokáže inhibovat všechny tři fáze karcinogeneze – iniciaci,

promoci a progresi nádoru. Prokázány byly jeho schopnosti inhibovat angiogenezi a potlačovat růst nádorů [4,6].

- **Antioxidační aktivita**

Určité antioxidační účinky mají jak alfa, tak beta hořké kyseliny. Humulon a lupulon se osvědčily nejen při neutralizaci volných radikálů, ale také při inhibici peroxidace lipidů. Ve srovnání s některými přírodními antioxidanty, jako jsou alfa-tokoferol a kyselina askorbová, vykazaly tyto sloučeniny dokonce silnější antioxidační aktivitu. Antioxidační vlastnosti byly rovněž potvrzeny u chmelového flavonoidu xanthohumolu [4,15,24].

- **Protizánětlivá aktivita**

Dle některých *in vitro* studií bylo prokázáno, že hořké kyseliny selektivně inhibují COX-2 a mají tedy potenciální využití v protizánětlivé terapii. Vybrané *in vivo* studie dále ukázaly, že hořké kyseliny jsou schopné zmírnit otoky vyvolané zánětem, nicméně jiné *in vivo* studie tento účinek nepotvrdily. Rozdíly v závěrech mezi jednotlivými studiemi by mohly být způsobeny nízkou biologickou dostupností hořkých kyselin po perorálním podání [15].

- **Biologická aktivita podporující trávení**

Hořkost chmelu a obsažených hořkých kyselin může stimulovat sekreci žaludečních šťáv, což činí chmel účinným prostředkem pro podporu trávení [6,15].

- **Účinky mající pozitivní vliv na metabolický syndrom a kognitivní funkce**

Iso-alfa hořké kyseliny vykazují potenciál v regulaci metabolismu lipidů a glukózy, a tím i v ovlivnění parametrů metabolického syndromu. Tyto sloučeniny mohou přispět k prevenci diabetu mellitu 2. typu prostřednictvím zlepšení glukózové tolerance. Současně mají schopnost snižovat riziko vzniku dyslipidémie a obezity, vykazují ochranné účinky na kardiovaskulární systém (KVS) a mohou pomáhat v prevenci hypertenze. Epidemiologické studie naznačují silnou souvislost mezi obezitou, diabetem 2. typu (zejména inzulinovou rezistencí) a zvýšeným rizikem demence. Iso-alfa hořké kyseliny by tedy mohly hrát roli v prevenci kognitivních poruch, včetně oddálení nástupu Alzheimerovy choroby. Podobné příznivé účinky byly pozorovány i u MHBA, které mohou zlepšovat metabolismus lipidů, snižovat riziko kognitivních poruch spojených s obezitou a podporovat celkovou kognitivní funkci. MHBA navíc zlepšují kognitivní výkon u zdravých starších dospělých, kteří subjektivně pociťují pokles kognitivních funkcí. Tyto látky přispívají ke zlepšení nálady a redukci duševního stresu [4,15,25,32].

- **Neuroprotektivní aktivita**

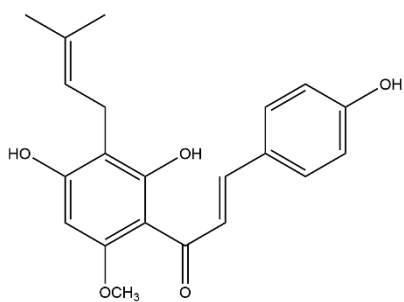
Iso-alfa hořké kyseliny, jak již bylo uvedeno, vykazují potenciál pro využití v léčbě neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba. Kromě toho se na základě studií provedených na extraktech z *Lupuli flos* předpokládá, že účinné látky, jako jsou lupulon a xanthohumol, mohou přispívat k inhibici acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BChE), což naznačuje jejich možnou roli v terapii těchto onemocnění [24,25].

3.2.2 Flavonoidy

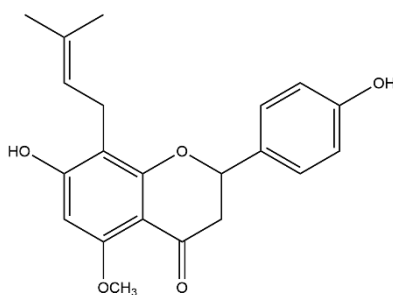
Flavonoidy lze charakterizovat jako deriváty 2-fenylchromanu. Na základě stupně oxidace pyranového kruhu se rozdělují na flavony, flavonoly, flavanony, dihydroflavonoly, flavan-3-oly, flavan-3,4-dioly, chalkony a aurony. V přírodě se vyskytují ve formě aglykonů a glykosidů, přičemž obě formy mohou vykazovat biologickou aktivitu [14].

3.2.2.1 Flavonoidy vyskytující se v chmelu

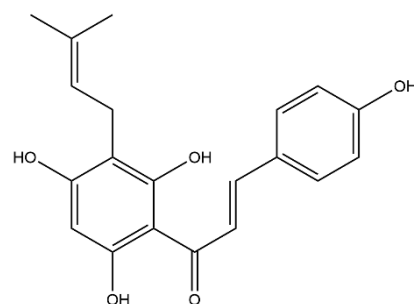
Nejvýznamnější flavonoidy, které se nacházejí v chmelu, patří k prenylovaným flavonoidům. Jedná se o prenylovaný chalkon xanthohumol (XH), jeho flavanonový izomer isoxanthohumol (IX), chalkon desmethylxanthohumol (DMX) a dále flavanony 6-prenylnaringenin (6-PN) a 8-prenylnaringenin (8-PN). DMX je možné označit za prekursor většiny flavonoidů vyskytujících se v chmelu. Jeho izomerizací vznikají 6-PN a 8-PN, jež jsou považovány za chmelové estrogény [6,16,20,33].



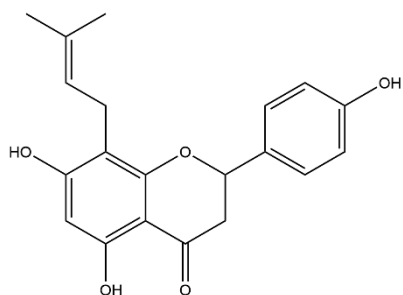
Obrázek 15. Xanthohumol



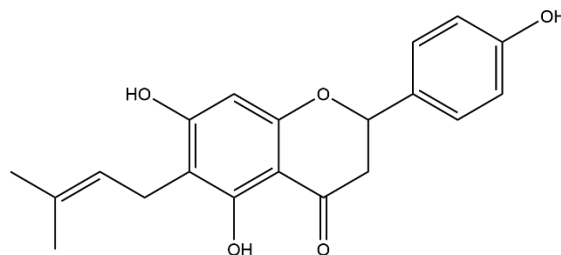
Obrázek 16. Isoxanthohumol



Obrázek 17. Desmethylxanthohumol



Obrázek 18. 8-prenylnaringenin



Obrázek 19. 6-prenylnaringenin

3.2.2.2 Biologická aktivita a použití chmelových flavonoidů

- **Estrogenní aktivita**

Souvislost mezi chmelem a hormonální aktivitou byla poprvé zaznamenána u sběraček chmelu, u nichž byla pozorována zvýšená četnost menstruačních poruch. Na základě studií prováděných *in vitro* i *in vivo* na potkanech byla potvrzena estrogenní aktivita, zejména u 8-PN, známého také jako hopein. Byly prokázány jeho účinky zahrnující snížení hladiny luteinizačního hormonu (LH) a folikulostimulačního hormonu (FSH), zvýšení hladiny prolaktinu, zvýšení hmotnosti dělohy, stimulaci sekrece mléčných žláz a schopnost zmírňovat návaly horka během menopauzy. Estrogenní aktivita byla rovněž identifikována u 6-PN a za látky s potenciálními estrogenními účinky lze považovat i IX a XH, neboť v lidském organismu podléhají metabolické přeměně na 8-PN. Ve srovnání s estradiolem, jehož biologické působení 8-PN napodobuje, je jeho estrogenní účinnost až 20 000krát nižší [6,13].

- **Antifungální a antivirová aktivita**

Antifungální aktivita byla zaznamenána u XH a 6-PN, které vykazují účinnost proti houbám rodu *Trichophyton spp.*, avšak neprokázaly aktivitu vůči lidskému patogenu *Candida albicans*. Z dalších látek obsažených v chmelu jsou antifungálně účinné hořké kyseliny, zejména alfa hořké kyseliny, které účinkují proti *Candida albicans*, *Trichophyton spp.* a také proti *Fusarium spp.* Další flavonoidy, jako IX a DMX, mohou rovněž vykazovat antifungální aktivitu. IX vykazuje účinnost například proti *Botrytis cinerea*, patogenní houbě schopné infikovat různé komerčně pěstované plodiny. Antivirové účinky jsou patrné u XH, který může působit proti cytomegaloviru, viru herpes simplex (HSV-1 i HSV-2) nebo viru HIV-1. Nízká antivirová aktivita byla dále zaznamenána u iso-alfa hořkých kyselin, a to vůči několika DNA a RNA virům [6,15,33,34].

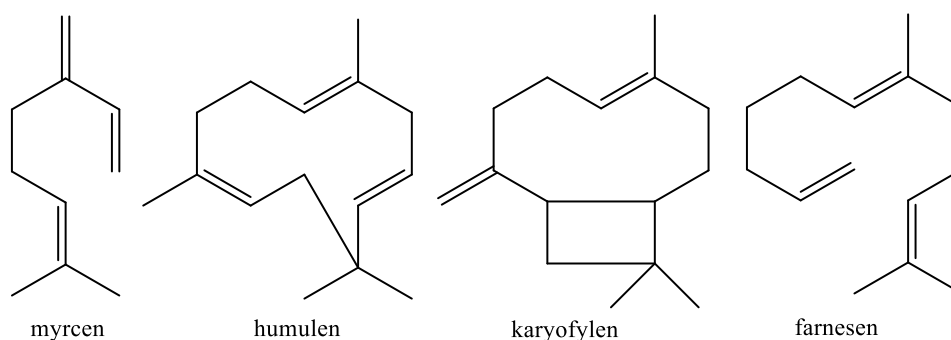
3.2.3 Silice

Silice jsou vonné látky olejovité konzistence, které jsou lipofilní a špatně rozpustné ve vodě. Obvykle jsou bezbarvé a tekuté s komplexním složením, převážně zahrnujícím sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, malým počtem kyslíkatých funkčních skupin a bez glykosidických vazeb. Mezi tyto sloučeniny patří uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny, estery a ethery. Nejčastějšími složkami silic jsou monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny a fenyylpropanoidy. Silice se získávají z rostlin převážně destilací s vodní parou, prostou destilací, extrakcí lipofilními rozpouštědly nebo mechanickými metodami bez zahřívání. Typicky se nacházejí v rostlinách z čeledí *Pinaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae* nebo *Zingiberaceae*. V rostlinách jsou obsaženy v siličných buňkách, siličných kanálcích nebo v žláznatých trichomech, jak je tomu u chmelu. Nejčastěji nacházejí uplatnění v potravinářství a kosmetickém průmyslu [14].

3.2.3.1 Chmelová silice

Chmelová silice představuje těkavou složku obsaženou v lupulinových žlázkách chmelových šištic. Plně vyvinuta je až v konečné fázi zrání chmelu. Její biosyntéze předchází biosyntéza hořkých kyselin. Složení chmelové silice je komplexní; tvoří ji především uhlovodíky (přibližně 50–80 %), kyslíkaté sloučeniny (asi 30 %) a v menším množství také sirné sloučeniny. Největší podíl v silici zaujímají uhlovodíkové terpeny, zejména monoterpen myrcen (30–50 %) a seskviterpeny, jako jsou humulen (15–25 %), karyofylen a farnesen, které společně tvoří až 90 % obsahu silice. Kyslíkaté sloučeniny v silici zahrnují kyslíkaté monoterpeny, jako jsou alkoholy linalool, geraniol a nerol. Dále jsou zastoupeny estery kyseliny isomáselné, vyšší mastné kyseliny, methylketony, ketony s větveným řetězcem a epoxidy [14,35,36,37].

Obsah kyslíkatých sloučenin v chmelu postupně narůstá během skladování, zatímco obsah uhlovodíků klesá, což může ovlivnit aroma chmelu. Poměr jednotlivých sloučenin obsažených v silici se odvíjí od odrůdy chmelu (například americké odrůdy obsahují více myrcenu, zatímco evropské více karyofylenu), oblasti výskytu, načasování sklizně a podmínkách skladování. Celkový obsah silice v chmelu se pohybuje v rozmezí 0,5–3 hmotnostních procent a s prodlužující se dobou skladování klesá [14,35,36].



Obrázek 20. Nejvýznamnější složky chmelové silice, čerpáno z [14]

3.2.3.2 Biologická aktivita a použití chmelové silice

- **Použití silice jako zdroje aroma v pivu**

Chmelová silice hraje klíčovou roli při určování chuti a aroma piva, přičemž její obsah a složení slouží jako důležité kvalitativní ukazatele. Na výsledném aroma piva se podílejí nejen uhlovodíky a kyslíkaté látky, ale také sirné sloučeniny. Ačkoli jejich zastoupení v silici činí přibližně jedno procento, díky jejich výrazné sensorické aktivitě nelze jejich vliv na finální aroma piva zanedbat. Mezi důležité látky, které formují výsledné aroma piva, patří siličné estery, monoterpenové alkoholy a oxidační produkty monoterpenů a seskviterpenů. Podíl jednotlivých sloučenin na výsledném aroma je možné kvantifikovat pomocí výpočtu známého jako "Odor Activity Value" (OAV). Tento parametr je definován jako poměr koncentrace dané sloučeniny k prahové hodnotě její vůně. Za nejvýznamnější se považují sloučeniny, u kterých tento poměr přesahuje hodnotu dva. Aroma piva může být například citrusové, bylinné, ovocné, květinové nebo typicky chmelové. Ke zvýšení koncentrace siličných látek a omezení jejich ztrát odpařováním během procesu výroby se využívá metoda tzv. suchého chmelení. Tento postup spočívá v přidání chmelu až do vychlazeného piva po dokončení fermentace [30,35,36].

- **Biologická aktivita chmelové silice**

Chmelová silice obsahuje linalool, který může vykazovat sedativní účinky, karyofylen s potenciálními antikarcinogenními vlastnostmi a myrcen, jenž může mít analgetické a protizánětlivé účinky. Kromě využití v pivovarnictví by chmelová silice mohla nalézt uplatnění také jako přírodní pesticid. Její účinnost proti škůdcům je spojována především s obsahem myrcenu a karyofylenu. Výzkum zaměřený na aplikaci chmelové silice v této oblasti a na její další biologické účinky je však dosud omezený [35,38].

3.3 Nespavost

Nespavost neboli insomnie, je stav charakterizovaný potížemi se spánkem. Spánek je při tomto stavu nekvalitní, neuspokojivý a neosvěžující, což vede ke sníženému fungování organismu během dne. Jedná se o nejčastější poruchu spánku – prevalence nespavosti se pohybuje v rozmezí 10–40 %, přičemž různé zdroje uvádějí mírně odlišná procenta. Výskyt této poruchy se zvyšuje s věkem. Nespavost se může projevit potížemi při usínání, neschopností spánek udržet, nebo předčasným ranním probuzením [39,40,41,42,43,44].

Aby bylo možné příznaky označit za nespavost jako poruchu spánku, musí trvat minimálně dva týdny (některé zdroje uvádějí jeden měsíc) a objevovat se alespoň třikrát týdně. Pro potvrzení diagnózy je třeba nespavost objektivně doložit, například prostřednictvím svědectví jiné osoby nebo vyšetření ve spánkové laboratoři [39,40,41,45].

Podle intenzity obtíží se nespavost rozděluje na mírnou, střední a těžkou, zatímco podle délky trvání obtíží na akutní, subchronickou a chronickou. Za chronickou nespavost je považován stav, který trvá déle než půl roku. Nespavost může být chápána buď jako samostatná nosologická jednotka, nebo jako příznak jiného onemocnění [46,47].

3.3.1 Vybrané poruchy spánku

Poruch spánku existuje mnoho, řádově desítky. Jejich prevalence v populaci stále narůstá, což souvisí mimo jiné s rostoucím životním tempem a společenským důrazem na výkon. Se stárnutím populace dochází jednak ke zvýšení výskytu poruch spánku obecně, neboť spánek ve vyšším věku bývá méně kvalitní a efektivní, a jednak ke zvýšení prevalence poruch spánku navázaných například na kognitivní poruchy, které se u starších osob objevují častěji [45,48,49,50].

Spánkové poruchy lze klasifikovat dvěma hlavními systémy. Prvním z nich je International Classification of Sleep Disorders (ICSD), který od roku 2014 platí již ve své třetí aktualizované podobě (ICSD-3). Druhým je Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, konkrétně jeho sekce Sleep-Wake Disorders, která byla v roce 2013 vydána v páté aktualizaci (DSM-V, římská číslice „V“ označuje páté vydání) [51].

Systém ICSD rozděluje poruchy spánku do osmi hlavních kategorií: insomnie, poruchy dýchání související se spánkem, hypersomnie centrálního původu, poruchy cirkadiánního rytmu spánku, parasomnie, poruchy spojené s pohyby ve spánku a jiné poruchy spánku. Tyto hlavní skupiny se dále dělí na podskupiny, přičemž klasifikační systém ICSD-3 zahrnuje

téměř sto různých poruch spánku. Toto dělení bylo zavedeno již v druhé aktualizaci ICSD, která nahradila starší členění na dyssomnie a parasomnie. Dyssomnie zahrnují poruchy spánku spojené s nedostatečným množstvím nebo kvalitou spánku, přičemž příčinou bývají psychické faktory. Parasomnie naopak zahrnují abnormální jevy objevující se během spánku, které mají epizodický charakter [42,44,51].

Systém DSM-V rozlišuje deset kategorií poruch spánku: insomnie, hypersomnie, narkolepsie, poruchy spánku spojené s dýcháním, poruchy cirkadiánního rytmu spánku, poruchy buzení v NREM spánku, poruchy spojené s nočními můrami, poruchy chování v REM spánku, syndrom neklidných nohou a poruchy spánku vyvolané látkami či léky [51].

Hypersomnie je porucha spánku, která se projevuje nadměrnou potřebou spánku, přestože ho jedinec má dostatek. Charakteristická je přetrvávající únava po probuzení a nedostatečný pocit odpočinku, přičemž únava přetrvává i během dne [43].

Narkolepsie je porucha spánku, při níž postižený často usíná během dne, a to nekontrolovaně. Spánek v noci je nekvalitní. Denní usínání se obvykle dostavuje pravidelně, například po čtyřech hodinách, přičemž krátký spánek obnoví energii na další čtyři hodiny. Současně se mohou objevit příznaky jako neschopnost pohybu nebo kataplexie [42,43].

Mezi spánkové poruchy patří také spánková apnoe, kterou lze rozdělit na obstrukční syndrom spánkové apnoe a centrální syndrom spánkové apnoe. Oba syndromy jsou spojeny s poruchou ventilace během spánku. Obstrukční apnoe je charakterizována krátkodobou obstrukcí dýchacích cest, zatímco centrální apnoe je způsobena ztrátou automatického řízení dechové aktivity. Spánková apnoe bývá často doprovázena nočním chrápáním. Za apnoi se obecně považuje zástava dechu trvající deset sekund a déle [42,43,52].

Mezi parasomnie patří například náměsíčnost, noční děsy, noční pomočování, bruxismus, noční křeče v lýtkách, enuréza, ronchopatie nebo spánková opilost. Tyto poruchy bývají často důsledkem stresu a poruch koordinace biologických a psychologických procesů v organismu. Nejčastěji se vyskytují během hlubokého spánku. K poruchám spánku patří také syndrom neklidných nohou a méně častý syndrom nočního jedení [42,43,51,53,54].

3.3.2 Diagnostika nespavosti

Diagnostika nespavosti probíhá primárně na klinické úrovni, s důrazem na spánkovou anamnézu. Vyšetření týkající se spánku zpravidla provádí praktický lékař, přičemž zapojení specialisty není ve většině případů nutné. Pacient je dotazován na charakter spánku svých

rodičů, kvalitu spánku v dětství, první projevy nespavosti a faktory, které ovlivňují zhoršení nebo zlepšení jeho spánku. Pro větší objektivitu je vhodné doplnit pacientovy výpovědi o údaje získané od další osoby, spánkový deník, specializované nebo laboratorní vyšetření. Diagnostiku mohou podpořit i dotazníky, například Insomnia Severity Index (ISI) [45,46,55].

Laboratorní vyšetření často zahrnuje endokrinologický screening, protože je třeba vyloučit onemocnění štítné žlázy. Klíčové je také zhodnocení případné souvislosti nespavosti s jiným onemocněním, u něž může být nespavost pouhým symptomem [55].

Specializované vyšetření, například ve spánkové laboratoři, má komplexní charakter a využívá polysomnografické záznamy, tzv. hypnogramy. Tato metoda se volí v případech, kdy nespavost významně snižuje kvalitu života. K takovému vyšetření může pacienta doporučit jak praktický lékař, tak specialista – somnolog. Vyšetření ve spánkové laboratoři však není rutinní součástí diagnostiky všech poruch spánku, protože ne vždy přináší jednoznačné výsledky [42,43,45]. Další možností je aktigrafie, která rovněž není prováděna rutinně. Spočívá v monitorování pohybové aktivity nedominantní horní končetiny a na základě intenzity pohybů určuje dobu a kvalitu spánku. Tuto technologii využívají i chytré hodinky, díky čemuž se jedná o ekonomicky dostupnou metodu [42,45,55].

3.3.3 *Terapie nespavosti*

Terapie nespavosti zahrnuje několik přístupů. Nejčastěji se využívá farmakoterapie, ačkoli je spojena s řadou rizik. Vedle ní jsou však významné i nefarmakologické metody, mezi které patří režimová opatření a kognitivně-behaviorální terapie. Další možností je fytotherapie [40,47,56].

Cílem léčby insomnie je zajistit její efektivitu a bezpečnost, což znamená volit terapii kauzální, která minimalizuje riziko vzniku závislosti, nenarušuje kognitivní funkce a nevede k delirantním stavům. Léčba nespavosti je komplexní proces, který vyžaduje individuální přístup ke každému pacientovi [47,56,57].

Akutní krátkodobou nespavost lze často řešit cílenou edukací pacienta o zásadách spánkové hygieny. V některých případech může být zahájena krátkodobá léčba nízkými dávkami farmak, aby se předešlo přechodu nespavosti do chronické formy. U chronické insomnie je zásadní identifikace její příčiny a volba kauzální léčby, která ji efektivně řeší [39,58].

Pokud je nespavost spojena s abúzem hypnotik, je nutné kromě psychoterapie zahrnout také odvykací léčbu, která by měla probíhat pod vedením psychiatra [39].

3.3.3.1 Nefarmakologická opatření

Léčba nefarmakologickými prostředky se zdá být nejvhodnější možností léčby nespavosti. Její hlavní výhodou je, že na rozdíl od farmakoterapie nevede k rozvoji závislosti, zaměřuje se na příčiny nespavosti a její účinky jsou dlouhodobé. Mezi metody nefarmakologické léčby patří režimová terapie, která zahrnuje správnou spánkovou hygienu a kognitivně-behaviorální terapie [46,56].

Kognitivně-behaviorální terapie je v mnoha případech klíčovým terapeutickým nástrojem, přesto bývá často podceňována. Zejména u chronické nespavosti by měla být nefarmakologická opatření upřednostněna před farmakoterapií. Bez změny chování pacienta, kterou právě tyto přístupy podporují, by se po ukončení farmakoterapie nespavost pravděpodobně vrátila [46,56,59].

Režimová terapie – spánková hygiena

Spánková hygiena představuje soubor doporučení, která by měli dodržovat všichni jedinci trpící nespavostí, pokud bylo vyloučeno, že příčinou jejich obtíží je jiné onemocnění, jež vyžaduje primární léčbu. Tato pravidla jsou zároveň vhodná i pro osoby, které nespavostí netrpí, avšak jsou vystaveny podmínkám zvyšujícím riziko jejího vzniku a rozvoje [40,46].

Pravidla spánkové hygieny zahrnují udržování pravidelného režimu spánku, tedy uléhání a vstávání ve stejný čas, včetně víkendů, s omezením denního spánku na maximálně 30 až 45 minut. Postel by měla sloužit výhradně k nočnímu spánku, není vhodné v ní přes den pracovat či vykonávat jiné činnosti. Ložnice by měla být příjemná, dobře vyvětraná, zatemněná a s teplotou mezi 17 a 21 stupni Celsia. Ke kvalitnímu spánku přispívá pravidelný pohyb během dne, ranní cvičení nebo relaxační aktivity před spaním, například teplá koupel či řízené dýchání. Pokud se do 30 minut nepodaří usnout, doporučuje se opustit lůžko a věnovat se klidné činnosti, například čtení nebo poslechu hudby [40,45,46,56,59].

K režimové terapii patří i vhodné zacházení s psychostimulačními látkami. Kofein, například v podobě kávy nebo silného černého čaje, by měl být konzumován nejpozději do 14. až 15. hodiny. Alkohol by neměl být používán jako prostředek k usínání, neboť hrozí riziko vzniku závislosti. Nikotin je rovněž nevhodný, zejména před spaním a během noci [46].

Kognitivně behaviorální psychoterapie

Kognitivně behaviorální terapie (KBT) představuje nejpropracovanější přístup v rámci nefarmakologických opatření pro léčbu nespavosti. Dle doporučených postupů Psychiatrické

společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (PS ČLS JEP) je označována jako léčba první volby. KBT se zaměřuje na způsoby myšlení a vzorce chování, které přispívají k rozvoji insomnie. Úspěšnost terapie však vyžaduje spolupracujícího a dostatečně motivovaného pacienta [45,55,56,59].

Terapie zahrnuje tři základní složky: kognitivní, behaviorální a individuální. Kognitivní složka využívá principy kognitivní restrukturalizace k nahrazení maladaptivních vzorců myšlení smysluplnějšími formami. Cílem je zmírnit úzkost spojenou s uléháním a eliminovat myšlenky vedoucí k nespavosti. Behaviorální složka se zaměřuje na změnu chování a rozvoj dovedností, přičemž zahrnuje spánkovou restrikcí, režimová opatření a kontrolu stimulů. Individuální složka KBT je přizpůsobena konkrétním problémům pacienta [55,56]. Komplexní KBT zahrnuje edukaci pacienta, spánkovou restrikcí, kontrolu stimulů, kognitivní restrukturalizaci, spánkovou hygienu a relaxační techniky. Spánková restrikce pracuje s omezením času stráveného na lůžku, čímž se zvyšuje efektivita spánku. Kognitivní restrukturalizace pak pomáhá identifikovat a modifikovat automatické myšlenky spojené se spánkem, s cílem snížit úzkost a zlepšit kvalitu spánku [45,46,56,59].

Přestože KBT prokazatelně zlepšuje léčbu insomnie, její akceptace se liší podle věku. Starší pacienti často upřednostňují farmakoterapii, zatímco mladší jedinci častěji vyhledávají nefarmakologická řešení, aby se vyhnuli užívání léčiv [55].

3.3.3.2 Farmakoterapie

V České republice jsou k léčbě nespavosti nejčastěji předepisována hypnotika, přestože jejich užívání přináší řadu nežádoucích účinků ve srovnání s nefarmakologickou terapií. Mezi hlavní nevýhody hypnotik patří riziko vzniku tolerance a závislosti, přičemž jejich podávání nepředstavuje kauzální řešení léčby. Mezi další farmaka, která se k léčbě nespavosti používají, patří antidepresiva se sedativním účinkem, antihistaminika, antiepileptika, antipsychotika a melatonin [45,47,55,60].

Při farmakoterapii je nezbytné zohlednit riziko kombinace léčiv s alkoholem, jejich podávání během těhotenství, a také jejich potenciál ovlivňovat paměť, chování a myšlení pacienta. Důležitou součástí léčby je rovněž plánování bezpečného vysazení farmak, protože jejich ukončení může být spojeno s obtížemi. Farmakoterapie by měla být volena zejména v případech, kdy nefarmakologická opatření nedosáhla požadovaného účinku [45,60].

Hypnotika

Hypnotika jsou farmaka určená k navození spánku. Ideální hypnotikum však neexistuje. Aby mohlo být hypnotikum považováno za ideální, muselo by spánek navodit velmi rychle, ideálně do třiceti minut od podání, zajistit přirozený spánek trvající šest až osm hodin, nepodporovat vznik tolerance a závislosti, nezpůsobovat ranní nevolnosti a neovlivňovat běžné denní fungování pacienta. Rovněž by nemělo vykazovat vysoký interakční potenciál s jinými látkami [40,47,60]. Použití hypnotik v léčbě nespavosti by mělo být omezeno především na terapii krátkodobé a přechodné formy insomnie, ideálně v kombinaci s KBT a zaměřením na příčiny nespavosti. Hypnotika lze rozdělit do tří generací [56].

Hypnotika první generace zahrnují barbiturátová hypnotika, nebarbiturátová a nebenzodiazepinová hypnotika. Tato generace má vysoký potenciál pro vznik tolerance a závislosti, a proto je její použití v léčbě insomnie již považováno za obsoletní [40,56].

Do **hypnotik druhé generace** se řadí benzodiazepiny. Kromě hypnotického a sedativního účinku mají také anxiolytické, myorelaxační a antikonvulzivní vlastnosti. Podle délky působení se dělí na krátkodobě, střednědobě a dlouhodobě působící. Ačkoli benzodiazepiny prodlužují celkovou dobu spánku a redukují počet nočních probuzení, negativně ovlivňují spánkovou architekturu, zejména zkracují fázi REM spánku [47,56,60,61].

Hypnotika třetí generace jsou v rámci farmakoterapie hypnotiky považována za léky první volby. Do této skupiny patří zolpidem, zopiclon, eszopiclon a zaleplon. Zolpidem se vyznačuje rychlým nástupem účinku a krátkým trváním působení. U zdravých jedinců nenarušuje spánkovou architekturu. Jeho použití je možné i u starších pacientů. Ve srovnání s benzodiazepiny mají hypnotika třetí generace menší riziko vzniku tolerance a závislosti, přesto však nelze tato rizika zcela vyloučit. Doba jejich užívání by neměla přesáhnout čtyři týdny [39,47,55,56,58,60].

Další farmaka

Jelikož hypnotika by měla být primárně používána k terapii krátkodobé nespavosti, při léčbě dlouhodobé insomnie je vhodné nasazení jiných farmak, zejména pokud pacient trpí dalším onemocněním. U psychiatrických poruch jsou indikovány antidepresiva či antipsychotika. Pokud nespavost souvisí s jiným onemocněním, měla by být primárně léčena základní choroba, která k insomnii přispívá [60].

Antidepresiva se sedativním účinkem představují první volbu u pacientů s nespavostí kombinovanou s depresí. Nejčastěji užívanými látkami jsou trazodon, mirtazapin, agomelatin a amitriptylin, off-label pak dosulepin. Dalším moderním antidepresivem je doxepin. U dlouhodobé insomnie mohou být antidepresiva vhodná i u pacientů, kteří depresí netrpí [8,40,55].

Klasická antipsychotika využívaná v terapii nespavosti zahrnují levomepromazin, chlorprothixen a melperon, zatímco mezi atypická antipsychotika se řadí risperidon a tiaprid. Tyto léky jsou často indikovány u farmakorezistentní insomnie nebo u pacientů s organickým onemocněním mozku. Dalšími látkami s využitím v této oblasti jsou kvetiapin a olanzapin. Dle doporučených postupů PS ČLS JEP však nejsou chlorprothixen, levomepromazin, kvetiapin a olanzapin v terapii insomnie doporučeny. Tiaprid, olanzapin a risperidon mají doporučení od sekce Společnosti všeobecného lékařství (SVL ČLS JEP) díky schopnosti synchronizovat biologické rytmy [47,55,56].

Další farmaka používaná k léčbě insomnie zahrnují antihistaminika a antiepileptika. Antihistaminika, jako jsou promethazin, bisulepin nebo dimetinden, se využívají pro svůj tlumivý účinek na centrální nervový systém (CNS). Nicméně PS ČLS JEP antihistaminika, konkrétně promethazin, v léčbě nespavosti nedoporučuje. Antiepileptika, jako lamotrigin a valproát sodný, doporučuje SVL ČLS JEP pro schopnost synchronizovat biologické rytmy. U pacientů s epilepsií mohou být použity pregabalin, gabapentin a tiagabin, avšak dle PS ČLS JEP pouze ve výjimečných případech [55,56].

Melatonin je hormon produkováný epifýzou v závislosti na cirkadiánním rytmu, jehož sekrece během noci roste. U starších osob dochází k fyziologickému poklesu jeho produkce, což odůvodňuje použití melatoninu v léčbě insomnie u seniorů a při poruchách cirkadiánního rytmu. Používá se melatonin s prodlouženým uvolňováním, který napodobuje jeho fyziologickou sekreci během noci. Melatonin má chronobiotické a slabší chronohypnotické účinky, přičemž podporuje kvalitu spánku a zkracuje dobu usínání. Ve srovnání s antidepresivy a antipsychotiky vykazuje minimální nežádoucí účinky. Jeho použití je doporučeno PS ČLS JEP i SVL ČLS JEP u pacientů starších 55 let [8,55,56,59].

Novější látkou v terapii insomnie je suvorexant, duální antagonist orexinových receptorů. Neuropeptidy orexiny, jejichž hladiny podléhají cirkadiánní rytmicitě, hrají významnou roli při regulaci spánku. Suvorexant se využívá při nespavosti charakterizované obtížemi s navozením i udržením spánku [55,62].

3.3.3.3 Fytoterapie

V terapii nespavosti se často využívají rostliny, respektive přípravky z nich, jako jsou kozlík lékařský, mučenka pletní a chmel otáčivý. Účinkům chmele otáčivého je věnována předchozí část práce. Mezi další používané rostliny patří třezalka tečkovaná, levandule úzkolistá nebo meduňka lékařská [9,56,63].

Kozlík lékařský (*Valeriana officinalis* L.) se využívá k léčbě mírnějších forem nespavosti, jako anxiolytikum nebo spasmolytikum. Aplikuje se extrakt z kořene a oddenků. Dlouhou dobu byly za účinné sedativní látky považovány iridoidní valepotriáty, avšak podle novějších výzkumů je sedativní účinek přisuzován flavonoidním glykosidům a kyselině valerenové. Kozlík je obecně považován za bezpečný, avšak jeho užití by mělo být vyloučeno během těhotenství a kojení [9,56].

Mučenka pletní (*Passiflora incarnata* L.) je využívána v terapii nespavosti díky obsahu laktolů (maltol, ethylmaltol), karbolinových alkaloidů (harman, harmin, harmol) a flavonoidů (vitexin, isovitexin, apigenin, luteolin, kvercetin). Drogou tvoří květy a nať. Mučenka se užívá při nespavosti, úzkosti, ale také v léčbě dysmenorey, průjmu, hemoroidů, epilepsie nebo popálenin. Není vhodná k dlouhodobému užívání, ani během těhotenství a kojení. Během tvorby plodů dochází ke zvýšení obsahu kyanoglykosidů, proto by měla být nať sbírána před zahájením plodnosti rostliny [9,56].

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum* L.) se primárně používá k léčbě depresivních stavů a úzkostí, může však být využita také při nespavosti, zejména pokud její příčinou je stres, neklid nebo úzkost. Drogou je kvetoucí nať obsahující naftodianthrony (např. hypericin) a floriglucinoly (např. hyperforin). Mechanismus účinku třezalky je podobný některým antidepresivům – inhibuje zpětné vychytávání serotoninu, dopaminu a noradrenalinu. Při užívání třezalky je třeba dbát na riziko lékových interakcí, možnost fototoxicity a gastrointestinální nežádoucí účinky. Užívání během těhotenství a kojení není doporučeno [9,56].

Meduňka lékařská (*Melissa officinalis* L.) obsahuje silice, trísloviny a flavonoidy. Používá se v terapii nespavosti, dále jako stomachikum a anxiolytikum. Šafrán obsahuje krocín, karotenoid s anxiolytickým, sedativním a hypnotickým účinkem. Silice levandule (*Lavandula angustifolia* L.), složená převážně z linaloolu a linalyl acetátu, působí jako antidepresivum a anxiolytikum. Při dlouhodobém užívání, zejména díky anxiolytickému účinku, může zlepšit spánek. Drogou jsou květenství levandule [9,56,63,64].

3.4 Nutraceutika

Nutraceutika označují funkční potraviny (*functional food*) nebo doplňky stravy (*food supplements*) blahodárně působící na lidský organismus. Často mají prokazatelné účinky v prevenci nemocí. Jedná se o komerční dietetické produkty (tedy potraviny či extrakty), jež příznivě ovlivňují lidskou fyziologii, nelze je však zařadit mezi léčivé přípravky ani mezi potraviny ve vlastním slova smyslu. Nutraceutika je možné také uvést jako potravinářské produkty, jestli jsou aktivními složkami bioaktivní sloučeniny z potravin [65,66,67].

Pojem nutraceutikum vychází ze slov nutrition (výživa) a pharmaceutical (léčivý). Prvním, kdo tento pojem použil, byl Dr. Stephen DeFelice v roce 1989 v USA. Využívat se nutraceutika začala však již dříve. První známky používání nutraceutik sahají až do starověku, zmínky o jejich užívání lze nalézt v tehdejších lékařských spisech z Indie, Číny, Egypta i Říma. Ve Spojených státech amerických byla hojně uplatňována již v padesátých letech minulého století, v Japonsku v letech sedmdesátých a do západní Evropy pronikla v letech osmdesátých. V České republice se nutraceutika na trh dostala až po roce 1990. Na počátku devadesátých let došlo v USA k významné expanzi nutraceutik. Tento rozmach v používání nutraceutik souvisí se zvyšující se touhou občanů po zdravém životním stylu a jejich ochotou používat k předcházení různým onemocněním raději přírodní a organické látky nežli látky syntetické. Rovněž mediální zájem nutraceutikám pomohl upevnit si své místo na trhu [65,68,69,70].

Po vymezení pojmu nutraceutikum Dr. DeFelicem se v USA objevilo několik dalších definic. Se zajímavou definicí přišel v roce 1999 Zeisel: „Nutraceutika jsou doplňky stravy, jež dodávají koncentrovanou formu dané bioaktivní látky z potraviny, prezentovanou v nepotravinové matici, a které se používají za účelem zlepšení zdraví v dávkách vyšších, než jaké by bylo možné získat z běžné stravy.“ V jiných zemích však tento pojem může být definován jinak a někde existuje dokonce několik různých definic. V některých zemích může být pojem nutraceutikum označován i jinými termíny. To vše vede k jistým odlišnostem v regulačním pojetí nutraceutik [67,70].

3.4.1 Význam nutraceutik

DeFelice již v roce 1995 nastínil, že budoucnost nutraceutik se zdá být velmi nadějná. Prohlásil, že pravděpodobně dojde ke vzniku samostatného nutraceutického průmyslu, nutraceutika budou významně ovlivňovat léčbu a prevenci nemocí a mj. dodávat spotřebitelům energii. Také naznačil, že nutraceutický průmysl bude soutěžit s průmyslem

farmaceutickým i potravinářským na poli volně prodejných přípravků a že nový nutraceutický průmysl bude pro výdej léčivých přípravků bez lékařského předpisu znamenat obrovskou příležitost [71].

Nutraceutika mají významné postavení a mohou působit na různé části lidského těla. Mohou ovlivňovat CNS, tedy působit na něj tlumivě, nebo stimulačně, imunitní systém (IS), KVS a metabolismus lipidů a cholesterolu, gastrointestinální trakt (GIT), urogenitální systém, ale také mohou pomáhat regulovat tělesnou hmotnost, zabraňovat předčasnému stárnutí a pomáhat při hormonálních poruchách [66].

Světový trh s nutraceutiky vykazuje rostoucí tendenci. Lze vnímat různé marketingové principy, které ovlivňují úspěšnost nutraceutik na trhu. Více prosperující jsou přípravky, jejichž účinek je snadno vnímatelný, které mají atraktivní a inovativní balení a příznivou cenu. Popularita nutraceutik je spojena s vyšším vzděláním společnosti, delší průměrnou délkou života, ekonomickými změnami a lepší dostupností informací. Klíčovou roli hraje rostoucí zdravotní uvědomělost společnosti. Nutraceutika nejsou jen módním trendem, ale mají potenciál stát se dlouhodobou součástí naší stravy. Proto je důležité, aby o nich měli povědomí nejen zdravotníci, ale i spotřebitelé [69]. Při hodnocení tržního potenciálu nutraceutik je nutné rozlišovat, zda se jedná o nutraceutika již zavedená, nebo nutraceutika potenciální. Většina spadá do kategorie potenciálních nutraceutik [71].

V budoucnosti mají nutraceutika potenciál hrát důležitou roli v preventivní zdravotní péči. Spotřebitelé je mohou preferovat před dražšími léky a léčebnými postupy, které by byly potřebné na léčbu onemocnění, jimž mohou právě pomocí nutraceutik předejít. Některé společnosti vyvíjející doplňky stravy (DS) nabízejí personalizované výživové doplňky založené na genetickém profilu [69].

3.4.2 Legislativní vymezení

Zatímco léčiva se v České republice legislativně řídí normami vycházejícími ze zákona č. 378/2007 Sb., *o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech)*, nutraceutika (resp. doplňky stravy, jelikož nutraceutika v ČR legislativně vymezena nejsou) jsou ošetřena předpisy, které vycházejí ze zákona č. 110/1997 Sb., *o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů*. Stejným zákonem jsou ošetřeny i potraviny pro běžnou spotřebu. Specifičtější pro DS je pak vyhláška č. 58/2018 Sb., *o doplňcích stravy a složení potravin*. Tato vyhláška stanovuje, které

vitaminy a minerální látky lze použít pro výrobu DS, jak musejí být DS označeny a v jakých formách mohou být používány [65,66,72,73,74].

3.4.3 Kontrola nutraceutik

Na rozdíl od léčiv nejsou nutraceutika kontrolována stejnou úrovní regulace. Jelikož nutraceutika jsou ošetřena zákonem o potravinách a tabákových výrobcích, nevyžadují před uvedením na trh testování účinnosti a bezpečnosti, jako je tomu u léčivých přípravků (LP). Z toho plyne, že DS mnohdy nemají stanovené normy pro dávkování. Kromě toho není běžné, aby u DS byla kontrolována kvalita ani není dokumentována čistota a stabilita použitých látek. [69,70,75,76].

LP před uvedením na trh musí projít přísným preklinickým a klinickým testováním. Tento proces zajišťuje, že léčiva jsou bezpečná a účinná. V rámci preklinických studií jsou LP testovány z hlediska bezpečnosti a toxicity. Testování toxicity je nejčastěji prováděno *in vitro* na laboratorních zvířatech. V rámci klinických studií jsou testovány různě velké skupiny pacientů, toto testování zahrnuje 4 fáze. Hlavním cílem klinického testování je prokázání, že LP je bezpečný a účinný, než dojde k jeho uvedení na trh [70,77].

Vzhledem k tomu, že i řada nutraceutik má potenciální farmakologické účinky, bylo by vhodné, aby i nutraceutika byla regulována obdobně jako LP a byla důkladněji testována jejich bezpečnost a účinnost. FDA vydala v roce 2007 požadavek na správnou výrobní praxi pro DS, kterým výrobcům nutraceutik uložila povinnost hodnotit složení, identitu, kvalitu a sílu daných přípravků. Rovněž je požadováno, aby DS na americkém trhu byly hodnoceny z hlediska čistoty, účinnosti a obsažených kontaminantů a jiných příměsí [70,76,77].

Kromě FDA o zlepšení kvality a spolehlivosti výživových doplňků usilují i jiné regulační orgány po celém světě. Snahu uznat zdravotní přínosy DS vykazují regulační orgány v Evropě i Kanadě, Indii, Japonsku a dalších zemích. Spojené státy mají díky požadavku FDA na správnou výrobní praxi pro DS výrazný náskok oproti Evropě, kde podobný požadavek neexistuje. V Evropě je odpovědnost za regulaci DS rozdělena mezi jednotlivé státy a dozor nad touto oblastí má na úrovni EU Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) [70,76].

V České republice se bezpečností a zdravotní nezávadností DS zabývá Státní zdravotní ústav (SZÚ). Tento ústav hodnotí DS na základě přiložené dokumentace a provádí laboratorní analýzy. Posuzuje, zda doplněk obsahuje pouze schválené formy vitaminů a minerálů a zda u doplňků s rostlinnými extrakty neobsahuje některou z rizikových částí rostliny. Rovněž SZÚ

testuje přítomnost možných kontaminantů, ať už chemických (olovo, kadmium, rtuť), nebo mikrobiologických (mykotoxiny). Zabývá se také doporučenou denní dávkou doplňku a jeho řádným označením [78].

3.4.4 Terminologie

Pojem nutraceutikum je odborným dietologickým názvem, který je však v určitých situacích zaměňován s pojmem doplněk stravy. Obdobně je tomu u pojmů potravinový doplněk, potravní doplněk, doplněk výživy, suplement, nutriční doplněk, dietetikum, parafarmaceutikum, doplňková výživa nebo potravina určená pro zvláštní výživu – všechny tyto pojmy mohou být někdy používány ve smyslu doplňku stravy, což nemusí být vždy zcela vhodné. Také je od nutraceutik potřeba odlišovat pojem potravina nového typu a samozřejmě obecně pojem potravina, stejně jako léčivo, případně léčivý přípravek [65,79].

Nutraceutika lze zařadit do skupiny parafarmaceutik. Označení parafarmaceutika se používá v souvislosti s lékárnou a rozumí se jím všechny přípravky a DS, jež jsou vydávány v lékárně, a nepatří mezi léčiva [65].

3.4.5 Doplnky stravy

Doplňkem stravy je dle zákona o potravinách a tabákových výrobcích myšlena potravina, která má za cíl doplňovat běžnou stravu a obsahuje koncentrované množství vitaminů, minerálních látek nebo jiných látek s nutričním či fyziologickým účinkem. Tyto látky jsou v potravine obsaženy buď jednotlivě, nebo v kombinaci. DS jsou určeny k přímé konzumaci v malých, přesně stanovených dávkách. DS může být také definován jako potravina pro zvláštní výživu, která obsahuje zvýšené množství potravních doplňků. O zařazení DS mezi potraviny pro zvláštní výživu rozhoduje Ministerstvo zdravotnictví ČR (MZ ČR). Termínem potravní doplněk lze souhrnně označit vitaminy, minerály, AK, specifické mastné kyseliny, extrakty a další biologicky aktivní nutriční faktory. Některé potravní doplňky mohou v určitých situacích zastávat roli léčiv – v takových případech je u nich uvedena indikace, nelze však již hovořit o DS [65,73,80].

Jednotlivé DS lze rozdělit do několika skupin podle jejich složení a zaměření. Nejčastějšími jsou doplňky obsahující vitaminy a minerály (které lze též souhrnně označit pojmem mikroživiny), doplňky obsahující rostlinné extrakty a dále doplňky pro specifické použití, tedy např. doplňky podporující hubnutí, povzbuzující doplňky, doplňky na problémy s klouby, doplňky obsahující mastné kyseliny a doplňky sportovní výživy. Další skupiny tvoří

doplňky s obsahem probiotik, enzymů a v některých státech i s obsahem hormonů. V České republice mohou být hormony obsaženy pouze v LP. Toto dělení je postavené jednak na historickém vývoji DS a jednak na možnostech využití jednotlivých doplňků [79,80].

Pro tuto diplomovou práci jsou klíčovou skupinou doplňky stravy obsahující rostlinné extrakty.

3.4.5.1 Uvádění doplňků stravy na trh

Na rozdíl od léčiv nepodléhají DS před uvedením na trh schvalovacím procesům. Výrobce nebo dovozce má před dodáním na trh pouze povinnost informovat Ministerstvo zemědělství ČR (MZe ČR) a předložit mu text etikety v českém jazyce. Toto oznámení lze provést buď v listinné podobě, nebo od 11. listopadu 2021 upřednostňovaným způsobem – elektronicky prostřednictvím Systému pro oznamování potravin (SOP), dostupného na webových stránkách MZe ČR. V systému SOP provozovatel potravinářského podniku, který chce uvést doplněk na trh, vyplní informace o jeho složení, dalších vlastnostech a přiloží text etikety. Za správnost údajů uvedených na etiketě nese plnou odpovědnost sám provozovatel. Doplňky stravy mohou být uváděny do prodeje výhradně v balené podobě [73,81,82].

3.4.5.2 Označování doplňků stravy

Z vyhlášky č. 58/2018 Sb., o doplňcích stravy a složení potravin vyplývá, že při označování DS je nutné na obalu daného doplňku uvést v názvu slova „doplněk stravy“, názvy vitaminů, minerálů nebo dalších látek s nutričním či fyziologickým účinkem a číselný údaj vyjadřující množství těchto látek vztažený na doporučenou denní dávku. U vitaminů a minerálů je dále nutné uvést údaje o jejich obsahu i v procentech referenční hodnoty příjmu (RHP). Na obal je dále nutné uvést doporučenou denní dávku daného DS a varování před jejím překročením a upozornit uživatele, aby DS skladoval mimo dosah dětí a že DS nenahrazuje pestrnou stravu. U některých DS je potřeba přidat ještě další specifická upozornění, konkrétně u doplňků s obsahem vitaminu A větším než 800 µg v denní dávce text „Nevhodné pro těhotné ženy“, u doplňků obsahujících rostlinu *Ginkgo biloba* text „Může snižovat srážlivost krve“, u doplňků obsahujících rostlinu *Cimicifuga racemosa* upozornění na nutnost přerušení konzumace při podezření na jaterní onemocnění uživatele a u doplňků s obsahem monakolinu K upozornění na nevhodnost pro děti, mládež, těhotné a kojící ženy, osoby užívající hypolipidemika a osoby s onemocněním ledvin, jater a svalovými poruchami [72].

Ve stejné vyhlášce je rovněž uvedeno, že při označování DS mohou být na obalu použita výživová a zdravotní tvrzení. Nemůžou však být použita tvrzení léčebná – nelze tedy uvést, že DS má schopnost léčit nebo pomáhat v prevenci určitých onemocnění. Léčebná tvrzení jsou nepřípustná i v rámci propagace DS, stejně tak nelze deklarovat žádné terapeutické účinky nebo uvádět indikace, protože DS, na rozdíl od léčiv, slouží pouze k upevňování zdraví. Kromě výživových a zdravotních tvrzení se na obalu DS mohou vyskytovat i tvrzení o struktuře a funkci, tvrzení o vysoké účinnosti nebo například u přípravků s antioxidační aktivitou rovněž údaj o obsahu antioxidantů [65,66,70,72].

Za zdravotní tvrzení je považováno takové tvrzení, které popisuje vztah mezi DS nebo některou z jeho složek a nemocí či zdravotním stavem. Zdravotní tvrzení musejí být postavena na všeobecně platných a uznávaných vědeckých poznatcích a používána v souladu s požadavky právních předpisů EU. Tato tvrzení se vztahují k přesně určenému množství dané látky. V USA za schvalování zdravotních tvrzení zodpovídá FDA, která také poskytuje seznam konkrétních schválených tvrzení. Vedle schválených zdravotních tvrzení existují i tzv. kvalifikovaná tvrzení, u nichž je k dispozici nižší úroveň vědeckých důkazů. Výživové tvrzení poukazuje na speciální a příznivé výživové vlastnosti doplňku stravy či potraviny obecně – ať už zvýšený, nebo snížený obsah živin nebo abnormální výživovou hodnotu [70,83,84].

Výživová a zdravotní tvrzení se na obalu DS vyskytují na základě dobrovolnosti, nicméně pokud jsou použita, musejí splňovat podmínky přímo použitelného předpisu EU o požadavcích na uvádění výživových a zdravotních tvrzení při označování potravin. Nesmějí být klamavá, dvojsmyslná nebo nepravdivá a nesmějí vzbuzovat pochyby o bezpečnosti nebo nutriční vyváženosti jiných DS potažmo potravin. Rovněž nesmějí naznačovat, že běžná vyvážená strava není schopna dodat sama o sobě dostatečné množství živin. Je zakázáno, aby tato tvrzení vybízela ke konzumaci nadměrného množství určité potraviny nebo takovou konzumaci ospravedlňovala. Kromě toho by neměla u spotřebitelů vyvolávat obavy z případných změn tělesných funkcí, ať už prostřednictvím textu nebo jiných grafických prvků. Pravdivost tvrzení musí být ověřena EFSA [72,78,84,85].

Jestliže je na obalu uvedeno zdravotní tvrzení, musí být doplněno také tabulkou výživových hodnot. Tato tabulka musí být umístěna v takové části obalu, aby byla viditelná společně s údajem o množství látky, na kterou se tvrzení vztahuje. Je vyžadováno uvést celkovou kalorickou hodnotu, kalorickou hodnotu tuků, celkové množství tuků, množství nasycených tuků, množství cholesterolu, celkové množství sacharidů, vlákniny, bílkovin, cukrů,

obsah vitaminů A a C, sodíku, vápníku a železa, pokud se tyto složky v doplňku vyskytují v měřitelných množstvích [70,84].

Na obal je také nutné uvést netto hmotnost jedné dávky a deklarovat počet dávek ve spotřebitelském balení. Je stanoveno, v jakém pořadí mají být ve složení uvedeny jednotlivé složky. Také je specifikováno, jakým způsobem mohou být nazvány jednotlivé vitaminy a minerály, například vitamin C může být uveden jako vitamin C i jako kyselina askorbová. Množství složek je uváděno ve vztahu k jedné dávce. Pokud je u přípravku možné různé dávkování, lze uvést hodnoty odpovídající jednotlivým dávkovacím možnostem. Do tabulky obsahující jednotlivé složky je důležité zahrnout také procentuální podíl denních RHP jednotlivých složek. Pokud procentuální podíl RHP některé ze složek vychází tak, že zaokrouhlení vede k hodnotě 0 %, uvádí se jako „méně než 1 %“, aby nedocházelo k matení spotřebitelů [70,79,86].

Dále je třeba připojit upozornění „Ukládat mimo dosah dětí“, varování, pokud doplněk není určen dětem nebo těhotným, datum minimální trvanlivosti a také název a adresu výrobce či distributora. Jestliže v doplňku jsou obsaženy alergen, potravinářská aditiva či azo-barviva, tuto skutečnost je na obalu rovněž nutné řádně uvést. Také je nezbytné informovat spotřebitele o obsahu sladidel, cukru společně se sladidly, aspartamu, vyššího množství přidaných polyolů a geneticky modifikovaných organismů (GMO) [70,79].

3.4.5.3 Doplňky stravy s rostlinnými extrakty

DS obsahující rostlinné extrakty se na trhu vyskytují v různých formách, jež jsou jakousi obdobou lékových forem. Tyto doplňky lze nalézt v podobě tablet, tinktur, čajů, nálevů nebo tobolek. Pro označování DS obsahujících kapalný bylinný extrakt platí, že na obalu musí být uvedeny údaje o jeho hmotnosti nebo objemu. Jestliže se v DS vyskytuje extraktů více, ve složení jsou seřazeny podle hmotnosti nebo objemu. V případě extraktů je často uváděno, ze které části rostlin byly extrakty získány. Může být uvedena informace o koncentraci čerstvého extraktu. Rovněž je nutné uvést použité rozpouštědlo [70,79].

Údaj o obsahu rostlinných extraktů uvedený na obalech doplňků stravy často neposkytuje žádné informace o množství bioaktivních látek, které se v těchto extraktech skutečně nacházejí. Obsah těchto látek se totiž přirozeně mění v závislosti na podmínkách pěstování rostlin, jako je typ půdy, klima, teplota nebo roční období. Tento nedostatek transparentnosti může vést k problémům s dávkováním – spotřebitel buď dostane

nedostatečné množství účinných látek, nebo naopak riskuje předávkování. Bez důsledné kontroly a standardizace obsahu bioaktivních látek zůstává přesné dávkování doplňků stravy s rostlinnými extrakty problematické [76].

Příloha č. 2 vyhlášky č. 58/2018 Sb., o doplňcích stravy a složení potravin poskytuje seznam rostlin, které je zakázáno používat při výrobě potravin. Patří mezi ně například kořen rostliny *Aconitum spp.*, list, nať a kořen rostliny *Atropa spp.*, list rostliny *Digitalis spp.* nebo celé rostliny *Erythroxylon sp.* či *Taxus spp.* Příloha č. 1 této vyhlášky zároveň stanovuje podmínky pro použití některých rostlin v DS, konkrétně připouští maximální možná množství určitých částí vybraných rostlin v denní dávce. Například sušený list rostliny *Ginkgo biloba* může v denní dávce dosahovat maximálně 4000 mg, sušená nať rostliny *Hypericum perforatum* maximálně 900 mg a standardizovaný extrakt kořene s obsahem 4 % rosavinu rostliny *Rhodiola rosea* maximálně 100 mg [72].

Doplňky stravy obsahující rostlinné extrakty patří k nejvyhledávanějším na trhu, protože spotřebitelé je často vnímají jako přirozenější alternativu k syntetickým lékům. Předpokládá se, že jsou bezpečnější, šetrnější k organismu a nezpůsobují vedlejší účinky, což přispívá k jejich popularitě [76].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie, materiál a instrumentální vybavení

4.1.1 Chemikálie

- Acetonitril Gradient grade (Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko) (CH_3CN)
- Cyklohexan p. a. (Ing. Švec – PENTA s.r.o., Praha) (CH_x)
- Diethylamin p. a. (Ing. Švec – PENTA s.r.o., Praha) (Et_2NH)
- Diethylether p. a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice) (Et_2O)
- Dichlormethan p. a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice) (DCM)
- Ethanol p. a. (Ing. Švec – PENTA s.r.o., Praha) (EtOH)
- Ethylacetát p. a. (Ing. Švec – PENTA s.r.o., Praha) (EtOAc)
- *n*-heptan p. a. (Ing. Švec – PENTA s.r.o., Praha) (C_7H_{16})
- *n*-hexan p. a. (Ing. Švec – PENTA s.r.o., Praha) (C_6H_{14})
- Iso-oktan p. a. (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko) (C_8H_{18})
- Isopropanol LC-MS (Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko) ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)
- Kyselina chlorovodíková (Ing. Švec – PENTA s.r.o., Praha) (HCl)
- Kyselina mravenčí (VWR International s.r.o., Stříbrná Skalice) (HCOOH)
- Methanol LC-MS (VWR International s.r.o., Stříbrná Skalice) (MeOH)
- Toluén p. a. (Ing. Švec – PENTA s.r.o., Praha) (To)
- 18M Ω voda (Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko) (H_2O)

4.1.2 Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 (MilliporeSigma, Billerica, USA)
- Silikagel
- Vliselín
- Filtrační papír
- Alobal

4.1.3 Rostlinný materiál

- Chmel Columbus určený pro vaření piva, ve formě pelet, sklizeň 2020, obsah alfa hořkých kyselin: 15,8 %, země původu: USA (PRONECO s.r.o., Klentnice)

4.1.4 Přístroje a software

Přístroje:

- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super10P (BANDELIN electronic GmbH&Co. KG, Berlín, Německo)
- Vakuová odparka Laborota 4000 (Heidolph Instruments GmbH&Co. KG, Schwabach, Německo)
- Magnetická míchačka Heidolph M1 Hei-Standard (Heidolph Instruments GmbH&Co. KG, Schwabach, Německo)
- Laboratorní třepačka Heidolph Promax 2020 (Heidolph Instruments GmbH&Co. KG, Schwabach, Německo)
- Laboratorní váha Kern 440-53 (KERN&SOHN GmbH, Balingen, Německo)
- UV lampa (CAMAG, Muttenz, Švýcarsko)
- Vzduchový kompresor Hailea ACO-6604 (Guangdong Hailea Group Co., Ltd., Shenzhen, Čína)
- Exsikátor
- Systém pro HPTLC – Automatic TLC Sampler 4, Automatic Developing Chamber ADC 2, TLC Scanner 3 (CAMAG, Muttenz, Švýcarsko)
- Flash chromatografický systém Puriflash 535 XL UV800 (Interchim, Montluçon Francie)
- Preparativní/analytický HPLC systém Waters Autopurification system – automatické dávkovací zařízení připojené ke sběrači frakcí Waters Sampler Manager 2767, kolonový selektor System Fluidics Organizer, binární gradientová pumpa Waters 2545, detektor s diodovým polem Waters 2998, hmotnostní spektrometr Waters Acquity qDa s elektrosprejovou ionizací (HPLC/MS-ESI) (Waters Corporation, Milford, USA)
- Plynový chromatograf Agilent 7890 A s hmotnostním detektorem Agilent 5975 C MSD pracujícím v režimu elektronové ionizace při 70 eV (GC/MS-EI) (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornie, USA)

Software:

- WinCATS® 4.1.10 pro HPTLC
- Intersoft X v 10.20.24.79.8 pro flash chromatografii
- MassLynx® V4.2 SCN976 pro HPLC analýzu
- FractionLynx® V4.2 SCN976 pro preparativní HPLC

4.1.5 Chromatografické adsorbenty, kolony, kartridže

- TLC destičky SiO₂, 60, F254, komerční analytické hliníkové desky s 0,2mm vrstvou silikagelu, velikost 20 × 20 cm (Merck Group, Praha)
- HPLC kolona XSelect® CSH™ C18, 4,6 mm × 100 mm, velikost částic 5 μm (Waters Corporation, Milford, USA)
- HPLC kolona Kinetex EVO Core-Shell, C18 100 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Preparativní HPLC kolona XSelect® CSH™ C18, 19 mm × 100 mm, velikost částic 5 μm (Waters Corporation, Milford, USA)
- Flash chromatografie – kartridž FlashPure EcoFlex Silica, 50 μm irregular, 120 g (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švýcarsko)

4.2 Obecné postupy

4.2.1 Příprava postřikového činidla

Jako postřikové činidlo pro vizualizaci a detekci složek po provedení TLC chromatografie posloužil 1% methanolvý roztok 2-aminoethyl-difenylboritanu. Toto činidlo bylo připraveno smísením 1 ml 2-aminoethyl-difenylboritanu a doplněním MeOH na celkový objem 100 ml.

4.2.2 Zpracování rostlinného materiálu a příprava základního extraktu

Základní extrakt byl získán pomocí extrakce kapalina-kapalina (LLE). Bylo naváženo 40,06 g chmelových pelet. K peletám bylo přidáno 400 ml Et₂O, 80 ml MeOH a 160 ml 0,1M HCl (koncentrace připravena naředěním 10 ml 5% HCl pomocí H₂O na celkový objem 160 ml). Tato směs poté byla umístěna na třepačku, kdy byla třepána po dobu 40 minut při frekvenci 132 otáček za minutu. Pak byla směs přefiltrována. Materiál, který utvořil filtrační koláč, byl znovu smísen s 400 ml Et₂O, 80 ml MeOH a 160 ml 0,1M HCl a znovu třepán, tentokrát při frekvenci 240 otáček za minutu. Poté byla opět provedena filtrace.

Po první filtraci byly získány dvě fáze, organická (O1) a vodná (V1), chmelové složky byly extrahovány do O1 tvořené Et₂O. Druhá filtrace vedla k získání dvou fází, organické (O2) a druhé fáze (E), která kvůli patrnému emulznímu charakteru byla sama ještě jednou filtrována. Filtrace fáze E vedla k získání vodné fáze (V2).



Obrázek 21. LLE – filtrace a následné oddělování fází pomocí děličky

Oddělování jednotlivých fází probíhalo v děličce. Základní extrakt byl získán smísením fáze O1 a O2. Tyto fáze byly přemístěny do varné baňky a umístěny na vakuovou odparku. Na odparce byla nastavena teplota 40 °C a rychlost otáčení 90 otáček za minutu. Byla získána viskózní kapalina hnědozelené barvy, ve které bylo pozorováno určité množství vosků. Do baňky byl přidán EtOH a baňka byla umístěna do mrazáku. Po vyjmutí z mrazáku byla opět umístěna na vakuovou odparku, na které byla nastavena teplota 30 °C a 60 otáček za minutu. Proces přidání EtOH a umístění na odparku byl opakován ještě jednou. Po odpaření bylo ke směsi přidáno 300 ml MeOH a baňka umístěna do ultrazvukové lázně, aby došlo k odstranění vosků ze směsi. To se však zcela nepodařilo, proto byla po vyjmutí z lázně baňka vložena na 100 minut do mrazáku, kde se vosky vysrážely, a poté byla směs přefiltrována.

K propláchnutí filtračního koláče bylo použito 100 ml MeOH. Aby byla směs koncentrovanější, byla opět umístěna na vakuovou odparku, tentokrát postupně po menších množstvích. S pomocí malého množství EtOH a Et₂O byla směs přemístěna do zásobní vialky, ve které byla ještě odfoukána pomocí vzduchového kompresoru za zahřívání ve vodní lázni na magnetické míchačce. Výsledný základní extrakt byl stále viskózní a hnědozelený, již bez nežádoucích vosků.

4.3 Izolace sekundárních metabolitů z *Humulus Lupulus*

4.3.1 *Vyvíjecí soustavy pro analytickou metodu TLC a HPTLC*

Pro provádění TLC chromatografie byly jako adsorbenty použity komerční silikagelové desky o velikosti 20 × 20 cm. Tyto desky byly stříhány dle potřeby na různé velikosti, nejčastěji byly využívány úzké pruhy asi 3 cm × 20 cm. Na desku byl tužkou narýsován start, a to ve vzdálenosti 1 cm od spodního okraje desky. Na start byly poté nanášeny vzorky, ne blíže než 1 cm od bočních okrajů desky. Vzorky byly nanášeny buď ručně kapilárou, nebo pomocí přístrojového vybavení pro HPTLC analýzu Autosampler 4. Desky byly po nanesení vzorků vkládány do vyvíjecích komor s připravenými mobilními fázemi. Ke zlepšení nasycování komor byla často používána harmonika z filtračního papíru. Při vkládání desek do komory bylo zajištěno, že hladina mobilní fáze v momentu vložení nepřesahuje úroveň startovní linie a zároveň je dostatečná pro správnou chromatografii, tedy cca 0,5 cm vysoká. Jakmile hladina mobilní fáze dosáhla vzdálenosti cca 1 cm od horního okraje desek, byly desky z komory vyjmuty a okamžitě byly tužkou na desku naznačeny konečné hladiny mobilní fáze. Poté byly desky vysušeny a byly detekovány jednotlivé látky.

Detekce byla prováděna pod UV s $\lambda = 254$ nm a 366 nm. Hořké kyseliny pod UV s $\lambda = 366$ nm fluoreskovaly zeleně (alfa hořké kyseliny) a tmavě modře (beta hořké kyseliny). Při detekci pod UV s $\lambda = 254$ nm fluoreskovaly celé silikagelové desky a hořké kyseliny byly viditelné jako tmavé skvrny. K detekci bylo také vyzkoušeno detekční činidlo s 2-aminoethyl-difenylboritanem, po jehož použití byly hořké kyseliny viditelné ve žluté barvě.

Tabulka 3. Složení jednotlivých vyvíjecích soustav pro TLC

Vyvíjecí soustava	Jednotlivé složky	Poměr složek
S1	C ₆ H ₁₄ : C ₃ H ₈ O : HCOOH : Et ₂ O	50 : 10 : 0,25 : 0,25
S2	C ₈ H ₁₈ : C ₃ H ₈ O : HCOOH : Et ₂ O	50 : 10 : 0,25 : 0,25
S3	To : C ₃ H ₈ O : HCOOH : Et ₂ O	50 : 10 : 0,25 : 0,25
S4	C ₆ H ₁₄	1
S5	To	1
S6	C ₆ H ₁₄ : CH ₃ CN	95 : 5
S7	To : CH ₃ CN	95 : 5
S8	HCOOH : To : CH ₃ CN	0,5 : 95 : 5
S9	HCOOH : C ₆ H ₁₄ : CH ₃ CN	0,5 : 95 : 5
S10	To : CH ₃ CN : HCOOH : DCM	94 : 5 : 0,5 : 0,5
S11	To : CH ₃ CN : HCOOH : DCM	94 : 5 : 0,5 : 2
S12	To : CH ₃ CN : HCOOH : DCM	85 : 5 : 0,5 : 10
S13	To : CH ₃ CN : HCOOH : DCM : EtOAc	85 : 5 : 0,5 : 10 : 5
S14	To : CH ₃ CN : HCOOH : DCM : EtOAc	85 : 5 : 0,5 : 10 : 10
S15	To : CH ₃ CN : HCOOH : DCM : EtOAc	85 : 5 : 0,5 : 10 : 15
S16	To : CH ₃ CN : HCOOH : DCM : EtOAc	85 : 5 : 0,5 : 10 : 25
S17	To : CH ₃ CN : HCOOH : DCM : EtOAc : MeOH	85 : 5 : 0,5 : 10 : 25 : 5

4.3.2 Vlastní izolace hořkých kyselin

Snahou bylo pomocí TLC a HPTLC najít mobilní fázi/vyvíjecí soustavu, která dokáže jednotlivé složky nejlépe oddělit a tuto mobilní fázi poté použít u flash chromatografie.

Získaný základní extrakt byl nejprve podroben optimalizované HPTLC analýze podle literatury [87]. Pomocí HPTLC a vyvíjecí soustavy tvořené z Et₂O : MeOH : C₇H₁₆ (viz tabulku č. 6) však nebylo dosaženo požadované separace na HPTLC destičce 20×10cm, proto byl zvolen přístup, že se bude vzorek nanášet pomocí autosampleru k HPTLC systému na destičku 3×20cm, po nanesení však analýza bude probíhat jako klasické TLC. K tomuto rozhodnutí došlo i po přihlédnutí k faktu, že docházelo k nerovnoměrnému nanášení extraktu, kvůli vysoké viskozitě. Docházelo tím k diskrepancím v koncentraci jednotlivých látek a tloušťce jednotlivých nanášených pásů.

Tabulka 4. Složení vyvíjecí soustavy pro HPTLC, gradientová eluce

Kroky gradientové eluce	Složení vyvíjecí soustavy	Poměr složek
HP1	Et ₂ O : MeOH : C ₇ H ₁₆	20 : 20 : 0
HP2		16 : 16 : 8
HP3		14 : 14 : 12
HP4		12 : 12 : 16
HP5		10 : 10 : 20
HP6		8 : 8 : 24
HP7		6 : 6 : 28
HP8		4 : 4 : 32
HP9		2 : 2 : 36

Nejprve byly ze silikagelové desky vystřiženy 3 menší destičky o rozměrech 10 cm × 6,5 cm. Na ty byly pomocí autosampleru nanесeny vzorky o objemu 25 µl a tyto destičky byly umístěny do komor s vyvíjecími soustavami S1, S2 a S3. Komory byly během vyvíjení umístěny v lednici a vyvíjení tedy probíhalo za snížené teploty: 7°C.

Poté bylo vystřiženo několik destiček o rozměru 3 cm × 20 cm. Jako mobilní fáze byla vyzkoušena čistá rozpouštědla – vyvíjecí soustavy S4 a S5. Tyto soustavy se nejevily jako ideální, o trochu lépe zvládl složky rozdělit čistý To (S5). Vyvíjení již probíhalo při pokojové teplotě.

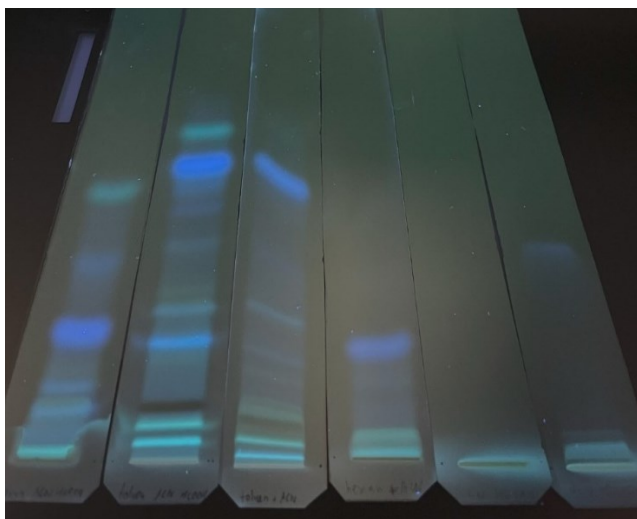
Dalšími vyzkoušenými soustavami byly soustavy S6 a S7, kdy k C₆H₁₄ a To byl přidán CH₃CN, a S8 a S9, kdy byla navíc přidána ještě HCOOH. Destičky, které byly vyvíjeny ve vyvíjecích soustavách S8 a S9 byly po prvním vyvinutí v těch samých soustavách vyvinuty ještě jednou.

Metoda HPTLC:

Chromatografie HPTLC byla provedena pomocí systému pro HPTLC analýzu značky CAMAG se softwarem WinCATS®. Byla použita technika gradientové eluce. Mobilní fáze se skládala ze 3 rozpouštědel (Et₂O, MeOH a C₇H₁₆), jejichž poměr se měnil od HP1 do HP9 – jednotlivé poměry jsou uvedeny v tabulce č. 5. Doba sušení byla nastavena na 3 minuty. Migrační vzdálenosti se měnily od 15 mm u kroku HP1 do 63 mm u HP9, jednotlivé migrační vzdálenosti jsou uvedeny v tabulce č. 3. Celková migrační vzdálenost byla nastavena na 5 cm a celkový migrační čas na 55 minut. Detekce byla prováděna pod UV při vlnových délkách $\lambda = 360 \text{ nm}$ a $\lambda = 366 \text{ nm}$.

Tabulka 5. Jednotlivé migrační vzdálenosti u HPTLC

Krok	Migrační vzdálenost
HP1	15 mm
HP2	21 mm
HP3	27 mm
HP4	33 mm
HP5	39 mm
HP6	45 mm
HP7	51 mm
HP8	57 mm
HP9	63 mm



Obrázek 22. TLC destičky pro S9, S8, S7, S6, S4, S5

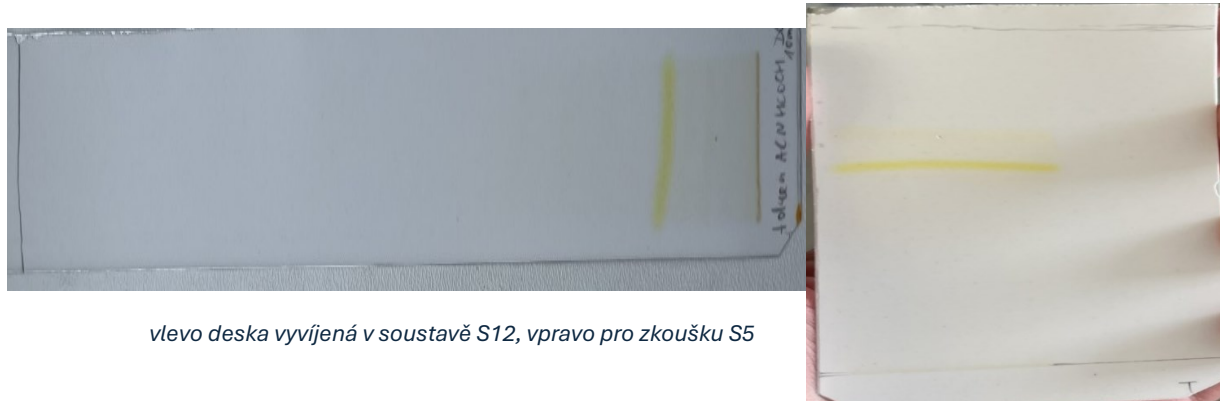
detekce pod UV $I = 366 \text{ nm}$; vyvíjecí soustavy zleva: S9, S8, S7, S6, S4, S5



Obrázek 23. TLC destičky pro S8, S10, S11 a S12

detekce pod UV $I = 366 \text{ nm}$; vyvíjecí soustavy zleva: S8 po druhém vyvíjení, S10, S11, S11 – druhá destička, S12, S12 – druhá destička

Nejlépe se složky oddělily při použití soustavy S8. Následně byla utvořena obdoba soustavy S9 vyvíjecí soustava S10, která obsahovala navíc přídavek DCM s cílem lepšího oddělení složek. Zvyšující se podíl DCM byl následně přidán do soustav S11 a S12. V soustavě



vlevo deska vyvíjená v soustavě S12, vpravo pro zkoušku S5

Obrázek 24. TLC po postřikání činidlem obsahujícím 2-aminoethyl-difenyboritan

S11 i S12 byly vyvíjeny vždy dvě destičky, jelikož jedna z nich byla poté detekována pomocí postřikového činidla obsahujícího 2-aminoethyl-difenylboritan.

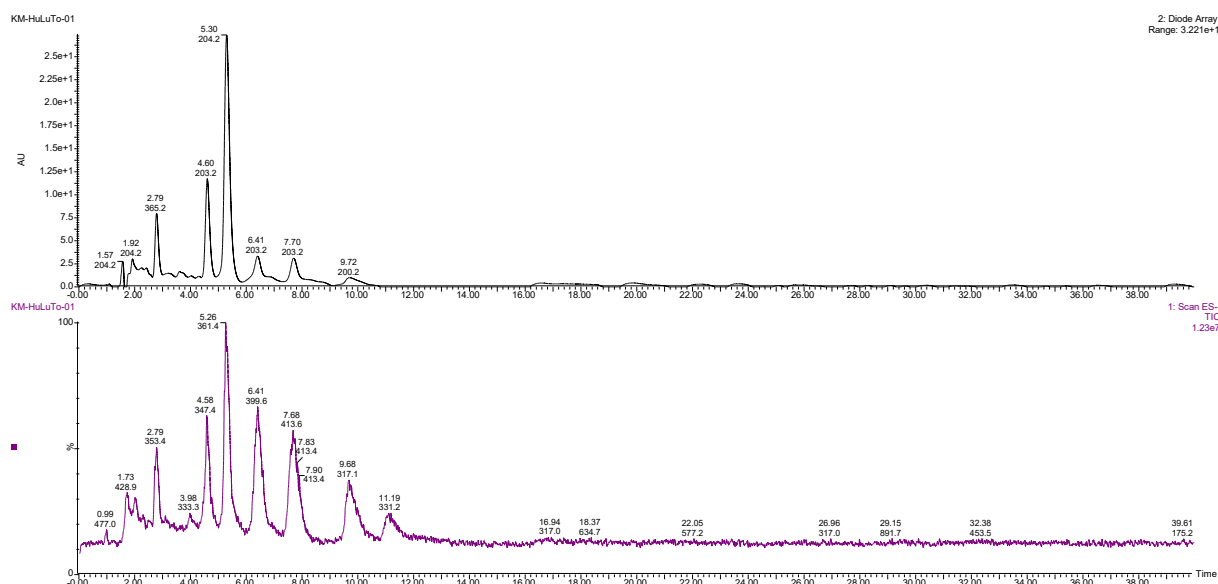
4.3.3 Analytická metoda HPLC/MS-ESI

Pro zjištění kompozice extraktu byl použit HPLC systém Waters Autopurification systém a kolona XSelect® CSH™ C18 o rozměrech 100 × 4,6 mm. Do vialky pro analýzu bylo naváženo 0,0094 g vzorku/základního extraktu, který byl rozpuštěn v MeOH. Jako mobilní fáze byly použity následující rozpouštědla: A) H₂O + HCOOH, B) MeOH + HCOOH. Byla použita gradientová eluce v lineárním režimu (Tabulka 4).

Tabulka 6. Gradientová eluce u HPLC

Počet minut od začátku analýzy	A	B
0	95 %	5 %
40	0 %	100 %

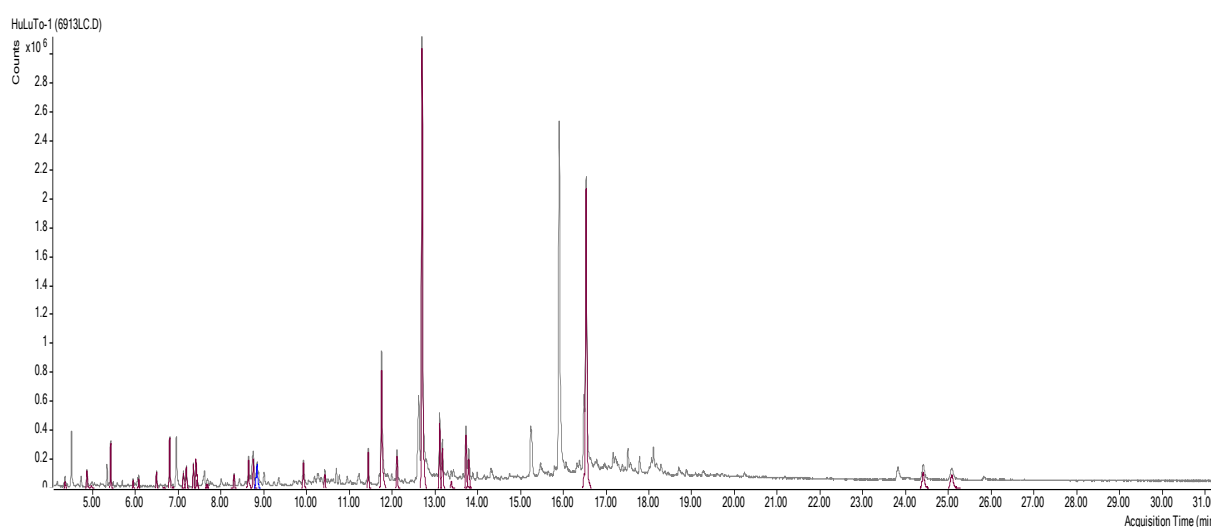
Doba analýzy byla nastavena na 40 minut, rychlost průtoku činila 1 ml/min. Látky v extraktu byly monitorovány jak pomocí PDA detektoru s rozsahem 210 až 450 nm, tak pomocí hmotnostní detekce v rozsahu 200-600 m/z. Pro monitorování hořkých kyselin byla dle literatury zvolena ionizace v negativním módu. Napětí na kuželu bylo nastaveno na 10 V. Z chromatogramu jsou patrné převážně píky s obdobnou m/z, jako je u hořkých kyselin.



Obrázek 25. HPLC chromatogram extraktu

4.3.4 Analýza GC/MS-EI

Pro sledování těkavých sloučenin v extraktu byl vzorek změřen pomocí plynového chromatografu spolu s hmotnostní detekcí. Vzhledem k neznámému množství a koncentraci jednotlivých látek byla při analýze využita standardní generická metoda na alkaloidy, využívána na katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky. Na koloně HP5-MS (30 m × 0,32 mm, tloušťka stacionární fáze 0,25 µm) bylo separováno a následně pomocí knihovny NIST11, s minimálním faktorem shody 80%, orientačně identifikováno 35 látek. Je možné, že v extraktu se vyskytovaly i další látky, které kvůli minimálnímu zastoupení nebyly detekovány.



Obrázek 26. GC/MS chromatogram extraktu

Vzhledem ke komplexnímu složení daného extraktu byla jako další postup zvolena frakcionace pomocí flash chromatografie.

Tabulka 7. Látky identifikované pomocí GC-MS

Retenční čas	Název	Faktor shody	Plocha píku	Procentuální zastoupení
4,3557	3-methoxy-3-methylbutan-2-on	87,8	74548,7	0,351%
4,8665	geraniol	93,6	168994,2	0,796%
4,9667	diethylester kyseliny jablečné	83,5	26992,0	0,127%
5,4212	cyklometikon 6	95,0	383191,7	1,804%
5,9460	ethylester kyseliny <i>cis</i> -4-decenové	87,4	62351,6	0,294%
6,0771	α -kubeben	86,3	74811,8	0,352%
6,4944	karyofylen	98,2	148852,1	0,701%
6,6627	5-methoxy-1,3-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrazol	82,1	7869,9	0,037%
6,8022	humulen	98,2	506478,3	2,385%
6,8735	heptylester <i>N</i> -(4-butylbenzoyl)-D-alaninu	83,4	11440,3	0,054%
7,1188	β -selinen	93,0	189718,9	0,893%
7,1890	γ -maalien	93,8	257085,2	1,210%
7,3558	γ -kadinen	95,9	233939,8	1,101%
7,4146	δ -kadinen	93,3	439179,2	2,068%
7,4437	<i>cis</i> -kalamenen	82,6	96048,8	0,452%
7,6658	α -kalakoren	82,5	46859,3	0,221%
7,6868	selina-3,7(11)-dien	82,7	48595,5	0,229%
8,3030	humulen	85,0	130206,7	0,613%
8,6446	karyofylen oxid	91,2	315023,3	1,483%
8,7533	9,11-dodekadien-1-ol	81,1	351007,9	1,653%
8,8439	epiglobulol	82,2	398618,3	1,877%
9,9254	2,5,5,8a-tetramethyl-4-methylen-6,7,8,8a-tetrahydro-4 <i>H</i> -chromen-4a(5 <i>H</i>)-yl hydroperoxid	80,1	335256,9	1,579%
10,4329	oktadekamethyl-cyklononasiloxan	86,6	154899,0	0,729%
11,4422	methylester kyseliny palmitové	95,6	380906,4	1,793%
11,7541	kyselina dehydrokohumulínová	84,6	1761299,4	8,293%
12,1129	ethylester kyseliny palmitové	90,1	361531,8	1,702%
12,6988	4,4,5',5'-tetramethyl-1,1'-bi(cyklohexan)-6-en-2,3'-dion	83,3	5989104,9	28,199%
13,1080	methylester kyseliny linolové	94,8	717199,1	3,377%
13,1750	methylester kyseliny linolenové	92,0	535504,7	2,521%
13,3792	methylester kyseliny stearové	86,4	86046,2	0,405%
13,7240	ethylester kyseliny 9,12-oktadekadienové	94,5	638072,6	3,004%
13,7900	ethylester kyseliny linolenové	84,8	435484,0	2,050%
16,5318	lupulon	92,5	5029626,8	23,682%
24,4084	β -amyrin	90,5	413173,2	1,945%
25,0786	α -amyrin	90,2	428655,9	2,018%

Barevným gradientem jsou vyznačeny látky s největším procentuálním zastoupením

4.3.5 Flash chromatografie

Pro flash chromatografii byl použit flash chromatografický systém Interchim PuriFlash 535XL a kartridž FlashPure EcoFlex Silica 120g. Hmotnost základního extraktu, který byl při flash chromatografii použit, činila 12,6711 g. Extrakt byl skladován ve vialce, z níž byl získán pomocí DCM. K extraktu byla přidána křemelina v poměru 3 : 1, bylo tedy naváženo 38,0133 g křemeliny. Z extraktu, DCM a křemeliny byl udělán roztěr, který byl poté vložen na odpařovací misku a přidané množství DCM bylo odpařeno. Po odpaření byla směs vložena do předkolony, kde spodní vrstvu tvořil silikagel, následně byla přidána vysušená směs a horní vrstvu tvořila samostatná křemelina.



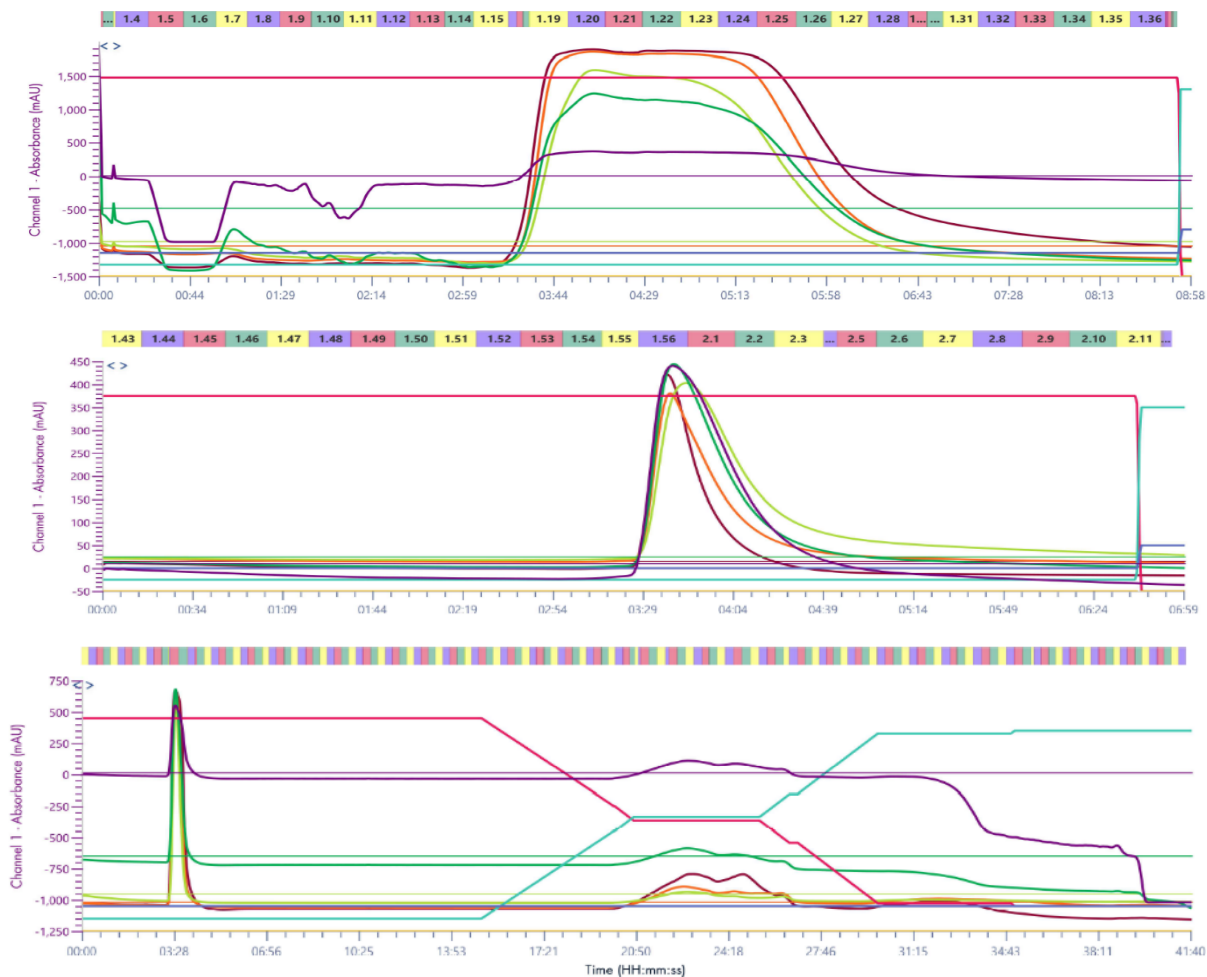
Obrázek 27. Předkolona pro flash chromatografii



Obrázek 28. Flash chromatografie sumárního extraktu

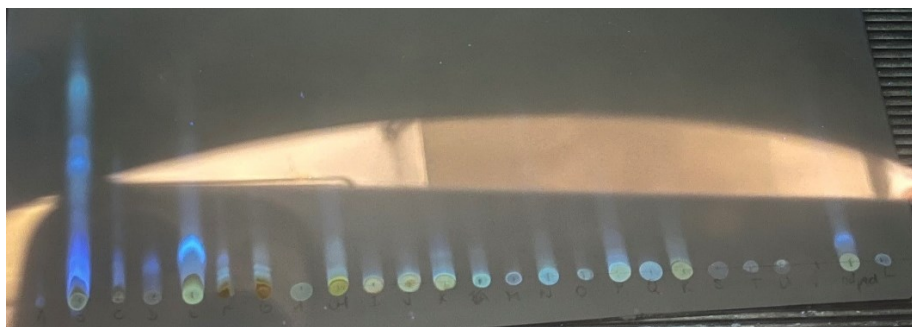
Jako mobilní fáze byla po provedení TLC vybrána soustava složením obdobná soustavě S12 pro TLC (To, CH₃CN, HCOOH a DCM v poměru 85 : 5 : 0,5 : 10). Složka HCOOH byla zastoupena pouze v minimálním množství v rámci jednoho z rozpouštědel. Byla nastavena gradientová eluce. Množství DCM zůstalo po celou dobu průběhu flash chromatografie stejné, množství To kleslo z 85 % na 10 % a naopak množství CH₃CN z původních 5 % vzrostlo na 90 %. Na závěr flash chromatografie došlo k promytí systému vodou.

Výsledkem flash chromatografie byl zisk 224 objemových frakcí. Bylo provedeno analytické TLC všech objemových frakcí, aby mohly být následně některé frakce spojeny. Pro realizaci TLC byly frakce často vybírány pouze ob jednu frakci, nebo bylo spojeno více frakcí dohromady dle UV chromatogramu. K analýze byly využívány silikagelové desky o rozměru



Obrázek 29. UV Flash chromatogram

10 cm × 20 cm, přičemž na každou desku bylo naneseno 10 různých vzorků. Při provádění TLC byla nejprve používána vyvíjecí soustava S12. Od desky, na níž byly naneseny frakce 56-75, došlo během druhého vyvíjení této desky k přidání 5 ml EtOAc ke stávající vyvíjecí soustavě – soustava S13. Následující desky, počínaje frakcí 76, byly již vyvíjeny v soustavě s obsahem 10 ml EtOAc – soustava S14. Od frakce 95 došlo k dalšímu obohacení mobilní fáze o EtOAc – již bylo použito 15 ml, soustava S15, a to až do frakce 195, jelikož od frakce 196 do frakce 224 bylo již v mobilní fázi obsaženo konečných 25 ml EtOAc – soustava S16. K posledním dvěma TLC deskám bylo po prvním vyvinutí do mobilní fáze přidáno ještě 5 ml MeOH, jelikož vzorky frakcí zůstaly na startu. Při druhém vyvíjení těchto dvou desek byla tedy uplatněna vyvíjecí soustava S17.



Obrázek 30. Kontrolní TLC frakcí A až V

Spojené frakce po flash chromatografii byly označeny písmeny A až V. Písmenem V byla označena frakce, jež byla získána při promývání flash chromatografického systému vodou. Vytvoření frakcí A až V z původních 224 frakcí popisuje tabulka č. 7.

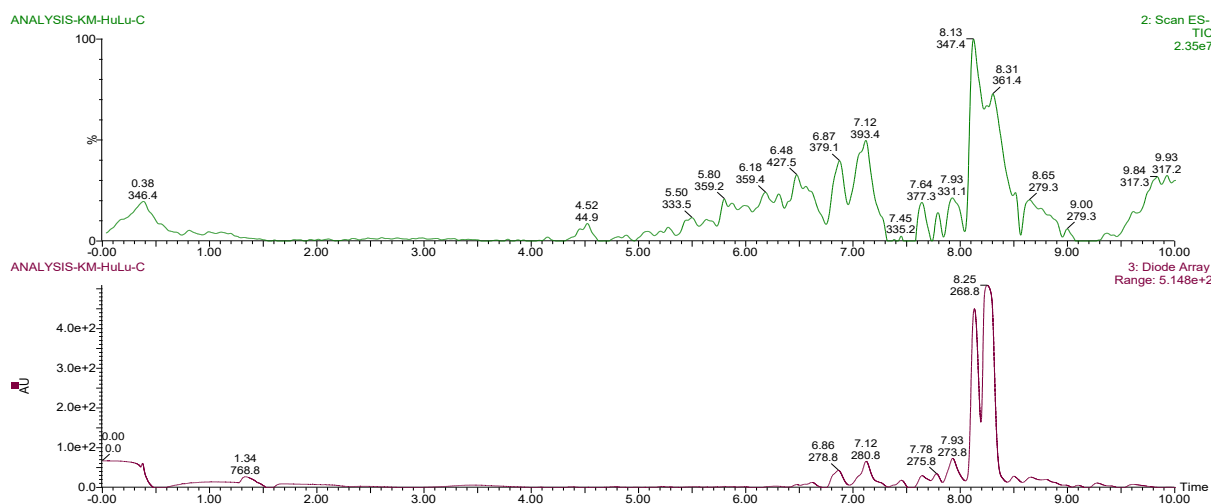
Frakce A až V byly poté umístěny do baněk. Obsah každé baňky byl posléze pomocí postupného odふうávání za použití vzduchového kompresoru přenesen do odpovídající vialky. K přenosu byl použit DCM a MeOH. Jednotlivé vialky byly označeny písmenem dané frakce a zváženy. Před vážením vialek s obsahem byly všechny vialky umístěny do exsikátoru.

Tabulka 8. Získané frakce po provedení flash chromatografie

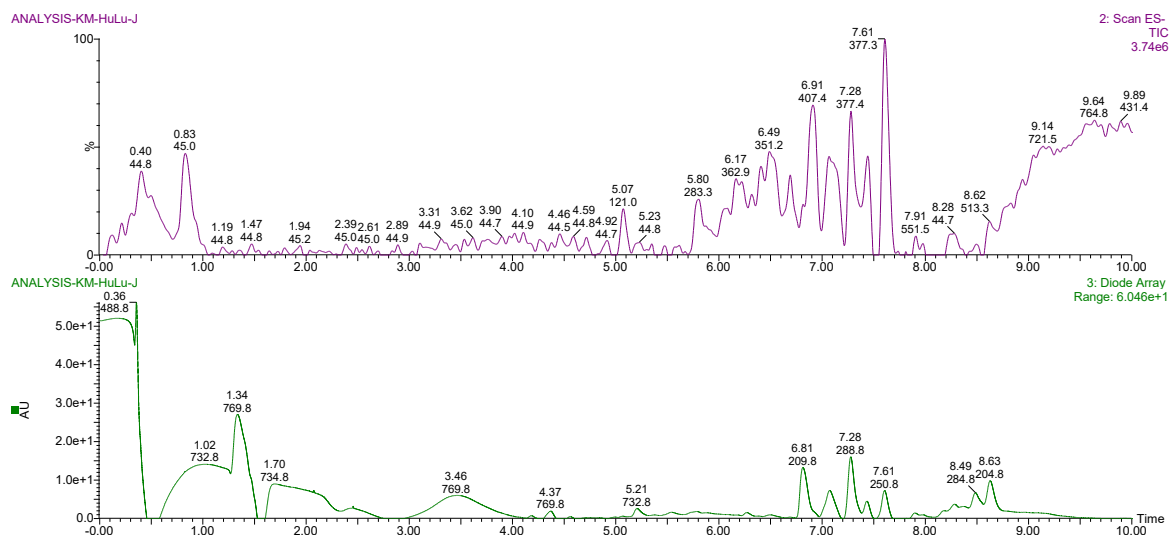
Původní frakce	Vzniklá frakce	Vypočítaná hmotnost dané frakce [g]
1-17	A	0,3022
18-20	B	1,7251
21-23	C	2,2267
24-30	D	1,2235
31-54	E	0,6703
55-57	F	0,6081
58-68	G	0,1762
69-71	H	0,0115
72-82	CH	0,1194
83-84	I	0,0505
85	J	1,6965
86	K	0,2148
87-94	L	0,0511
95-113	M	0,0611
114-146	N	0,1308
147-152	O	0,1068
153-163	P	0,8273
164-173	Q	0,5883
174-194	R	0,8280
195-206	S	0,1508
207-224	T	0,2048
Odpad ze systému	U	0,3123
Výplach systému H ₂ O	V	0,0022

4.3.5.1 Analýza frakcí pomocí HPLC

K určení frakcí s obsahem hořkých kyselin byly všechny frakce podrobeny chromatografické analýze. Malé množství každé z frakcí (0,2 – 0,5 mg) bylo pomocí kapiláry přemístěno do vialek pro analýzu. Do každé vialky bylo předtím odpipetováno 500 μ l MeOH, ve kterém byly jednotlivé frakce rozpuštěny. Složení mobilní fáze bylo stejné jako v předešlé analýze. Doba analýzy činila 10 minut. Analýzy pomocí hmotnostní detekce probíhaly jak v pozitivním, tak v negativním režimu. Nejvíce alfa hořkých kyselin bylo nalezeno ve frakcích B a C, zatímco nejvíce beta hořkých kyselin bylo nalezeno ve frakcích J, K a L. Z toho důvodu bylo rozhodnuto pokračovat s těmito frakcemi další separací pomocí preparativní chromatografie. Preparativní chromatografii předcházela optimalizace podmínek separace a nastavení podmínek sběru frakcí.



Obrázek 31. HPLC chromatogram, frakce C



Obrázek 32. HPLC chromatogram, frakce J

4.3.6 Preparativní HPLC

Frakce J, K a L byly po spojení podrobeny preparativní chromatografii. Extrakt jednotlivých frakcí byl zcela rozpuštěn v MeOH LC-MS čistoty tak, aby byly jednotlivé frakce úplně rozpuštěny a čištěny pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC-MS (Waters Corporation, Milford, USA). Vzorek byl analyzován při laboratorní teplotě. Objem nástřiku na koloně byl 1000 μ l na 1 frakcionaci. Celkem bylo provedeno 30 nástřiků. Pro separaci byla použita kolona XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 19 mm, vnitřní průměr 5 μ m) (Waters Corporation, Milford, USA). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 17,06 ml/min. Mobilní fáze se skládala ze dvou složek: složka A – H₂O s 0,1% HCOOH, složka B – MeOH s 0,1% HCOOH.

Program 1 gradientové eluce mobilní fáze byl naprogramován následovně (objem/objem):

- 0–5 min 5 % B,
- 5–28 min 5 % B, 100 % B,
- 28. minuta 5 % B, průtok 20 ml/min,
- poté 4 minuty pro návrat do výchozích podmínek pro ekvilibraci.

Celková doba analýzy byla 32 minut.

Program 2 gradientové eluce mobilní fáze byl naprogramován následovně (objem/objem):

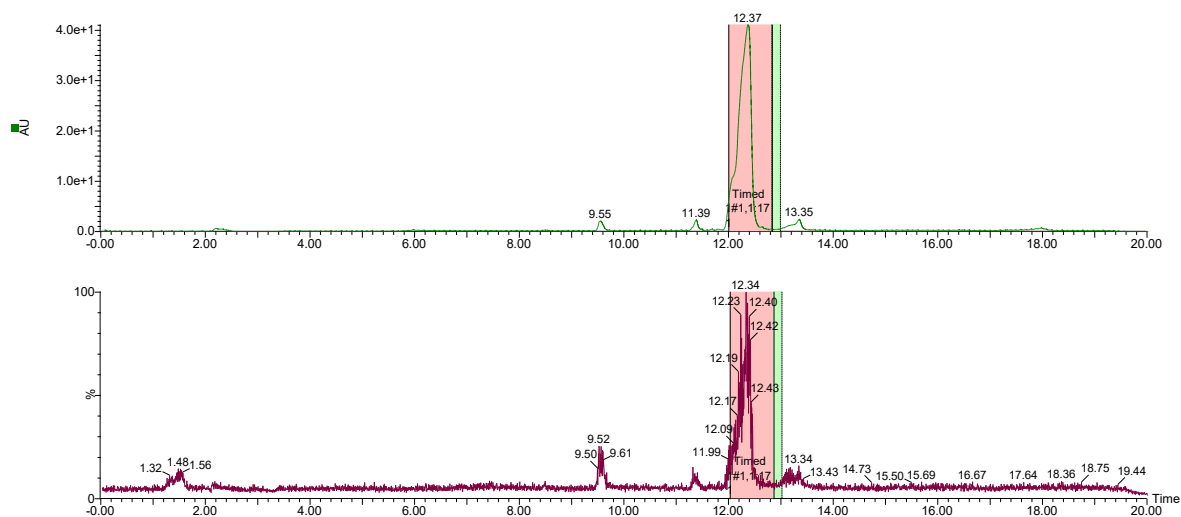
- 0–15 min 5 % B,
- 15–25 min 5 % B, 100 % B,
- 28. minuta 5 % B,
- poté 4 minuty pro návrat do výchozích podmínek pro ekvilibraci.

Celková doba analýzy byla 32 minut.

Program 3 gradientové eluce mobilní fáze byl naprogramován následovně (objem/objem):

- 0–18,5 min 5 % B, 100 % B,
- 19. minuta 5 % B,
- poté 2 minuty pro návrat do výchozích podmínek pro ekvilibraci.

Celková doba analýzy byla 20 minut.



Obrázek 33. Chromatogram 1. preparativní HPLC frakce J, K a L

Pro detekci absorbance byl nastaven rozsah PDA detektoru od 200 do 400 nm se vzorkovací frekvencí 20 Hz. LC ESI-MS analýzy byly provedeny v negativním iontovém módu. Optimální hodnoty parametrů ESI-MS byly: rozdělení toku na MS – 1000:1, kapilární napětí – 0,8 kV, teplota sondy – 600 °C, napětí na kuželu – -12 V. Hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozsahu 200–600 m/z.

Frakce B a C byly po spojení podrobeny preparativní chromatografii. Extrakt jednotlivých frakcí byl rozpuštěn v MeOH LC-MS čistoty a separovány pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC-MS (Waters Corporation, Milford, USA). Vzorek byl analyzován při laboratorní teplotě. Objem nástřiku na koloně byl 1000 µl na 1 frakcionaci. Celkem bylo provedeno 57 nástřiků. Pro separaci byla použita kolona XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 19 mm, vnitřní průměr 5 µm) (Waters Corporation, Milford, USA). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 17,06 ml/min. Mobilní fáze se skládala ze dvou složek: složka A – H₂O s 0,1 % HCOOH, složka B – MeOH s 0,1 % HCOOH.

Program 1 gradientové eluce mobilní fáze byl naprogramován následovně (objem/objem):

- 0–5 min 5 % B,
- 5–15 min od 5 % B do 100 % B,
- 15–28 min 5 % B,
- 28. minuta 5 % B, průtok 20 ml/min,
- poté 4 minuty pro návrat do výchozích podmínek pro ekvilibraci.

Celková doba analýzy byla 32 minut.

Program 2 gradientové eluce mobilní fáze byl naprogramován následovně (objem/objem):

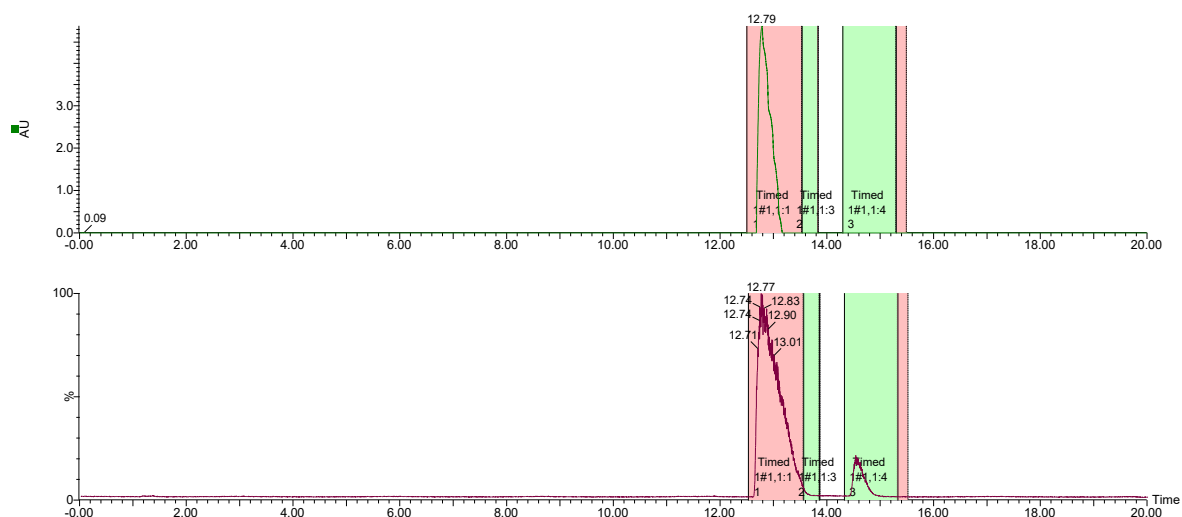
- 0–15 min 5 % B,
- 15–25 min 5 % B, 5-100 % B,
- 28. minuta 5 % B,
- poté 4 minuty pro návrat do výchozích podmínek pro ekvilibraci.

Celková doba analýzy byla 32 minut.

Program 3 gradientové eluce mobilní fáze byl naprogramován následovně (objem/objem):

- 0–18,5 min 5 % B, 100 % B,
- 19. minuta 5 % B,
- poté 2 minuty pro návrat do výchozích podmínek pro ekvilibraci.

Celková doba analýzy byla 20 minut.



Obrázek 34. Chromatogram 3. preparativní HPLC frakce B a C

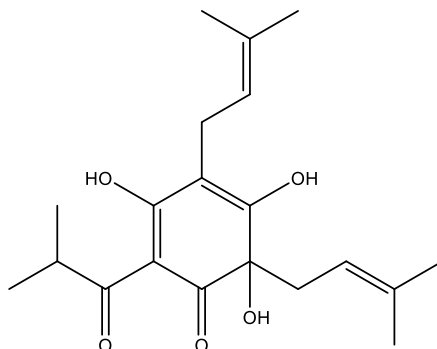
5 VÝSLEDKY

5.1 Analýza izolovaných standardů hořkých kyselin

5.1.1 KOHUMULON

Sumární vzorec: $C_{20}H_{28}O_5$

izolované množství: 31,7 mg



Obrázek 35. Kohumulon

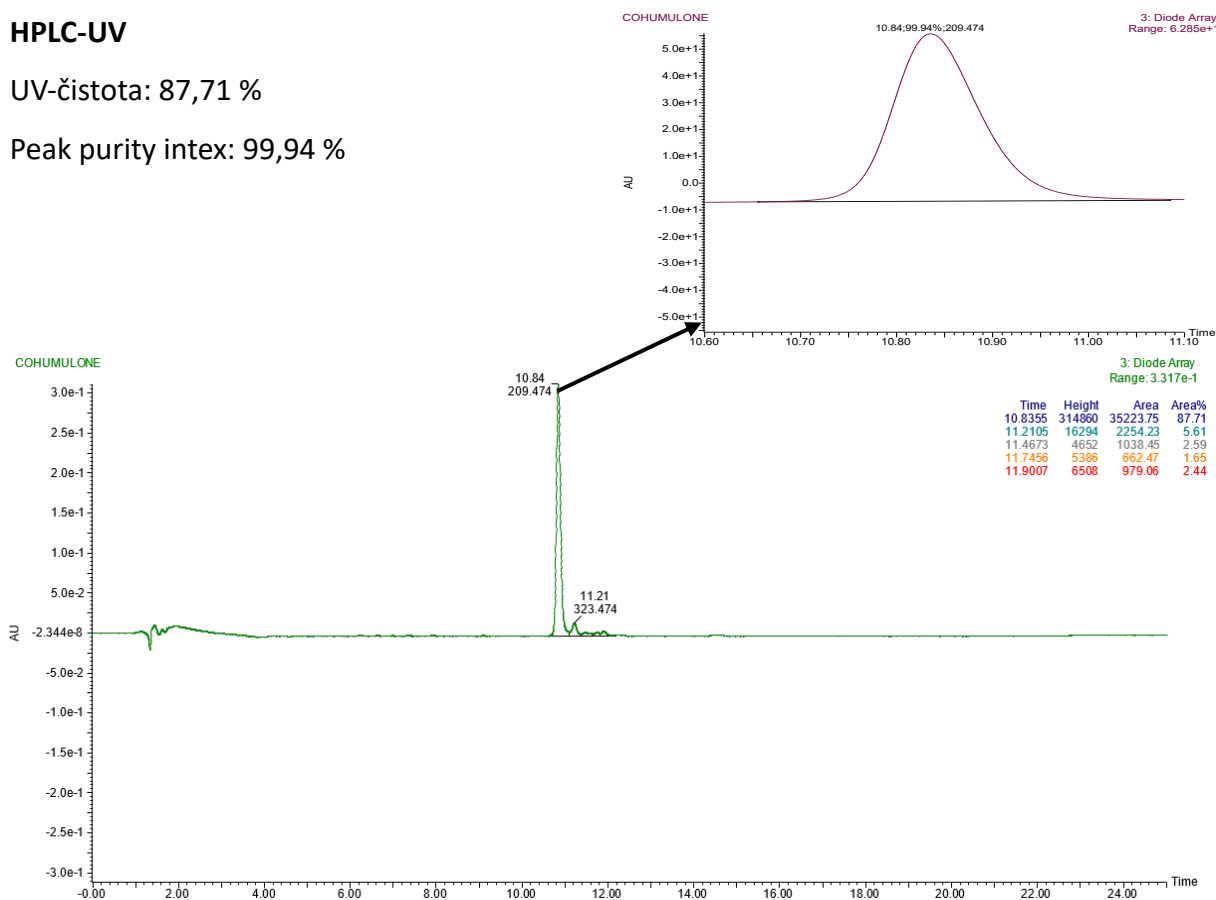
NMR analýza

Struktura byla určena na základě porovnání dat s literaturou [88].

HPLC-UV

UV-čistota: 87,71 %

Peak purity index: 99,94 %



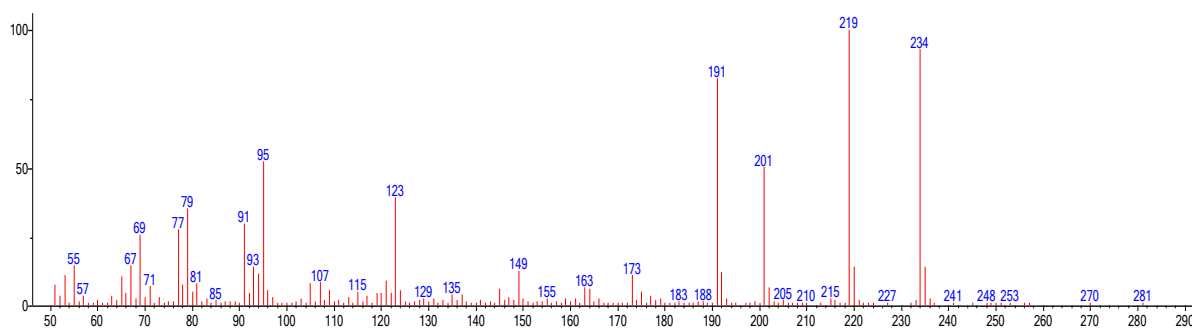
Obrázek 36. HPLC-UV chromatogram kohumulonu

ESI-MS $[M - H]^-$ 347,298 m/z



Obrázek 37. ESI-MS spektrum kohumulonu

GC-EI-MS $[M]^+$ 219 (99,9), 234 (92,7), 191 (82,1), 95 (52,1), 201 (49,9), 123 (38,9), 79 (34,8), 91 (29,5), 77 (27,5), 69 (25,6) m/z (%).

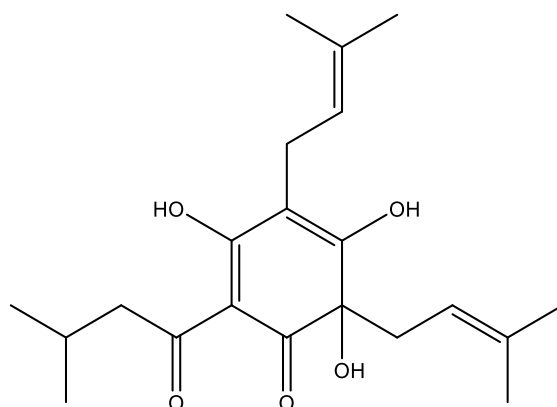


Obrázek 38. EI-MS spektrum kohumulonu

5.1.2 HUMULON

Sumární vzorec: $C_{21}H_{30}O_5$

izolované množství: 70,8 mg



Obrázek 39. Humulon

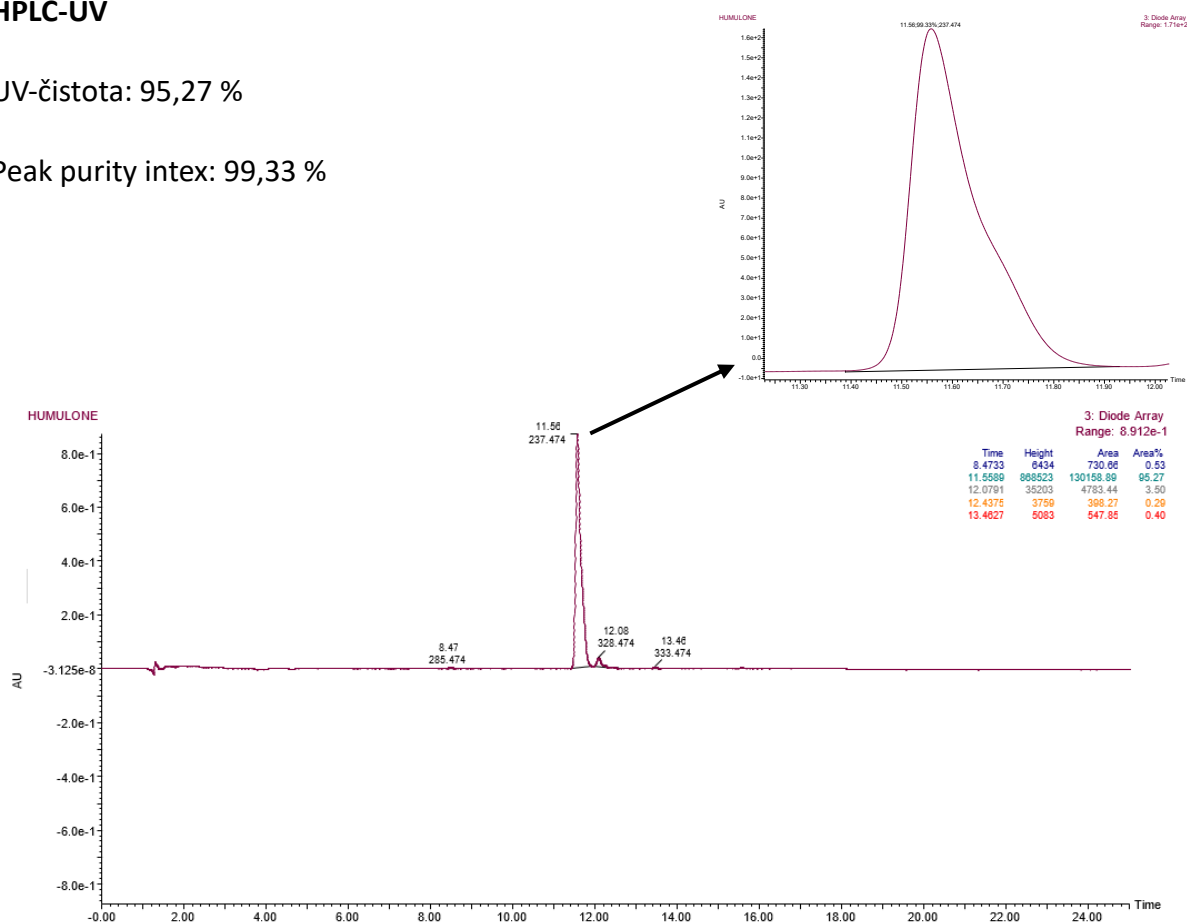
NMR analýza

Struktura byla určena na základě porovnání dat s literaturou [88].

HPLC-UV

UV-čistota: 95,27 %

Peak purity index: 99,33 %



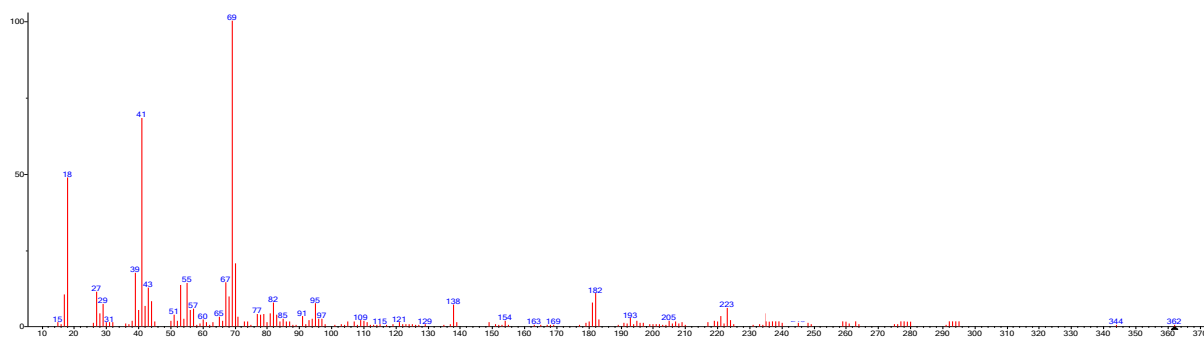
Obrázek 40. HPLC-UV chromatogram humulonu

ESI-MS $[M - H]^-$ 361,284 m/z



Obrázek 41. ESI-MS spektrum humulonů

GC-EI-MS $[M]^+$: 69 (99,9), 41 (68,1), 18 (48,5), 70 (20,4), 39 (17,3), 67 (14,2), 55 (14), 53 (13,4), 43 (12,6), 27 (11,2) m/z (%).

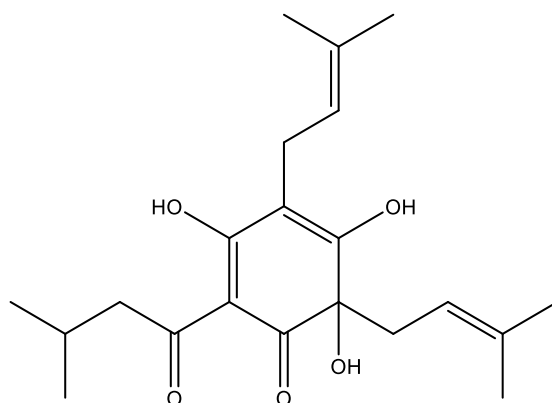


Obrázek 42. EI-MS spektrum humulonů

5.1.3 KOLUPULON

Sumární vzorec: $C_{25}H_{36}O_4$

izolované množství: 51,3 mg



Obrázek 43. Kolupulon

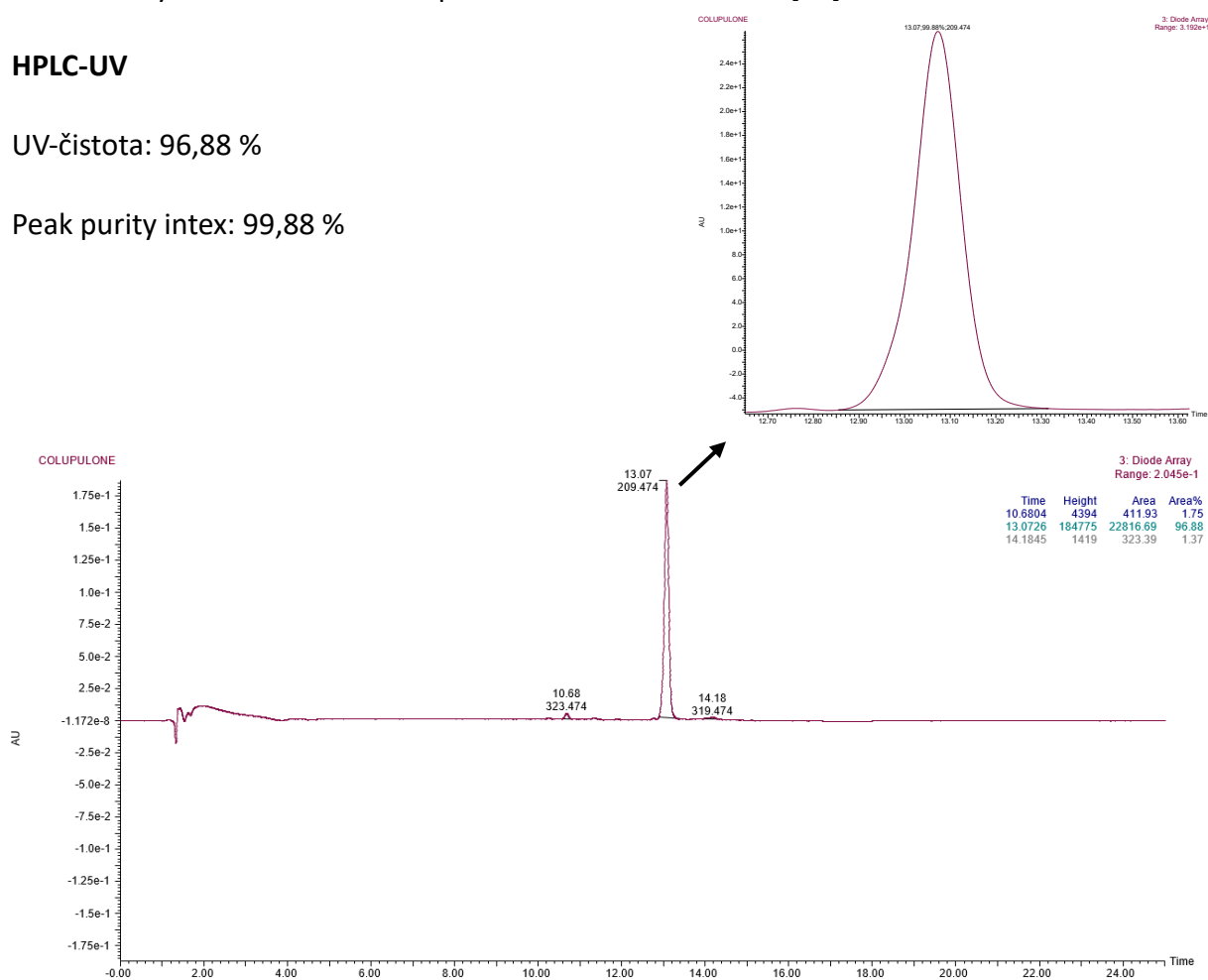
NMR analýza

Struktura byla určena na základě porovnání dat s literaturou [89].

HPLC-UV

UV-čistota: 96,88 %

Peak purity index: 99,88 %



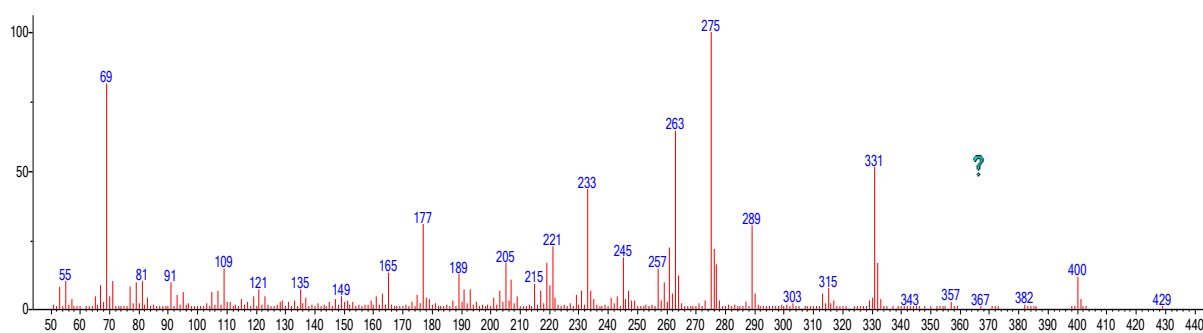
Obrázek 44. HPLC-UV chromatogram kolupulonu

ESI-MS $[M - H]^-$ 399,375 m/z



Obrázek 45. ESI-MS spektrum kolupulonu

GC-EI-MS $[M]^+$ 275 (99,9), 69 (81,3), 263 (64,3), 331 (51), 233 (43,2), 177 (30,2), 289 (29,9), 221 (22,5), 261 (22), 276 (21,3) m/z (%).

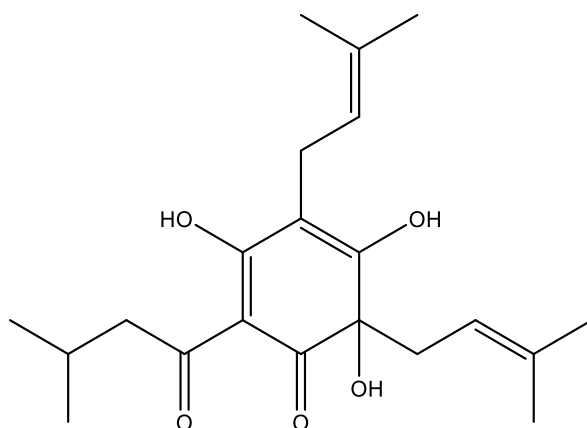


Obrázek 46. EI-MS spektrum kolupulonu

5.1.4 LUPULON

Sumární vzorec: $C_{26}H_{38}O_4$

izolované množství: 86,0 mg



Obrázek 47. Lupulon

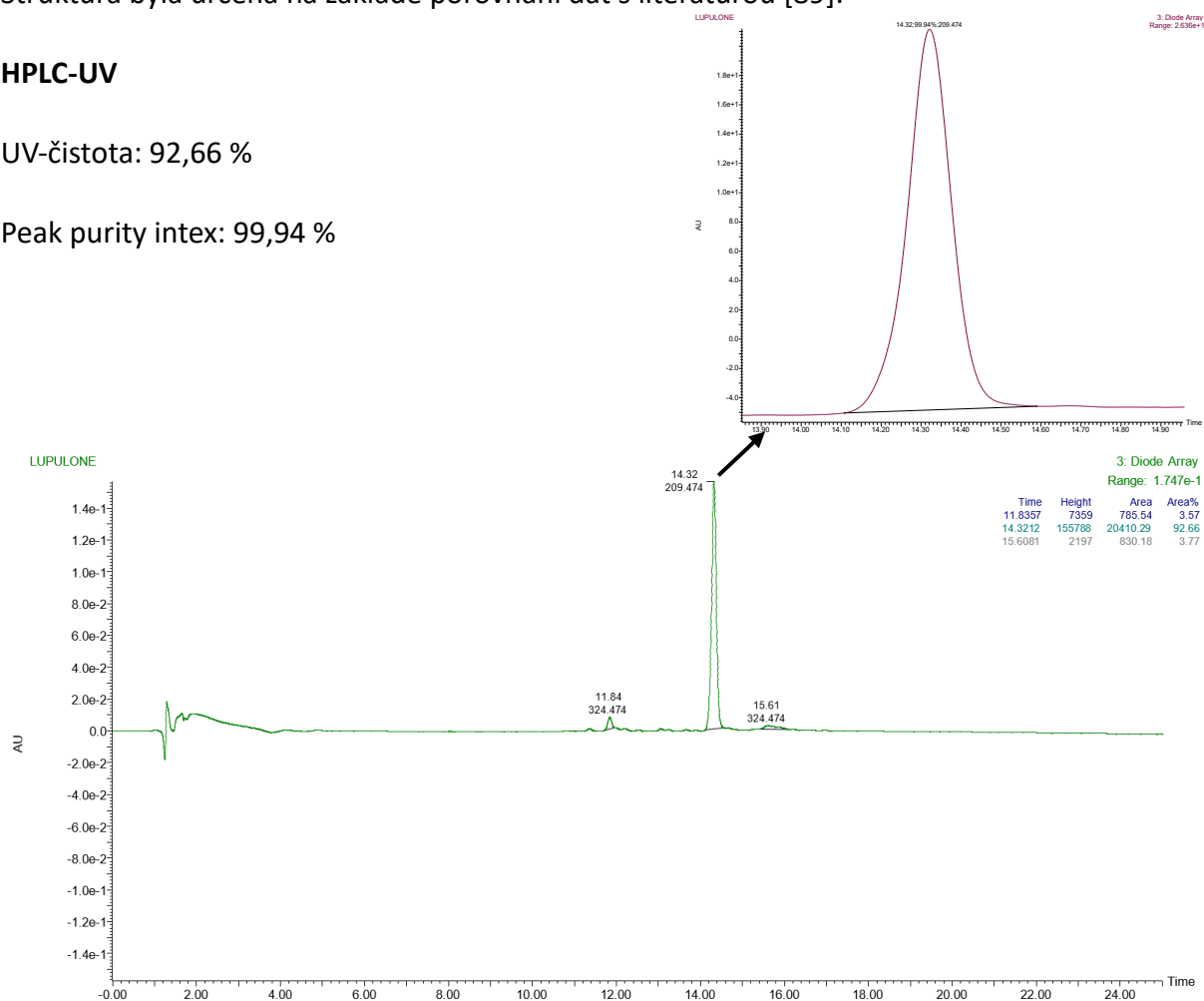
NMR analýza

Struktura byla určena na základě porovnání dat s literaturou [89].

HPLC-UV

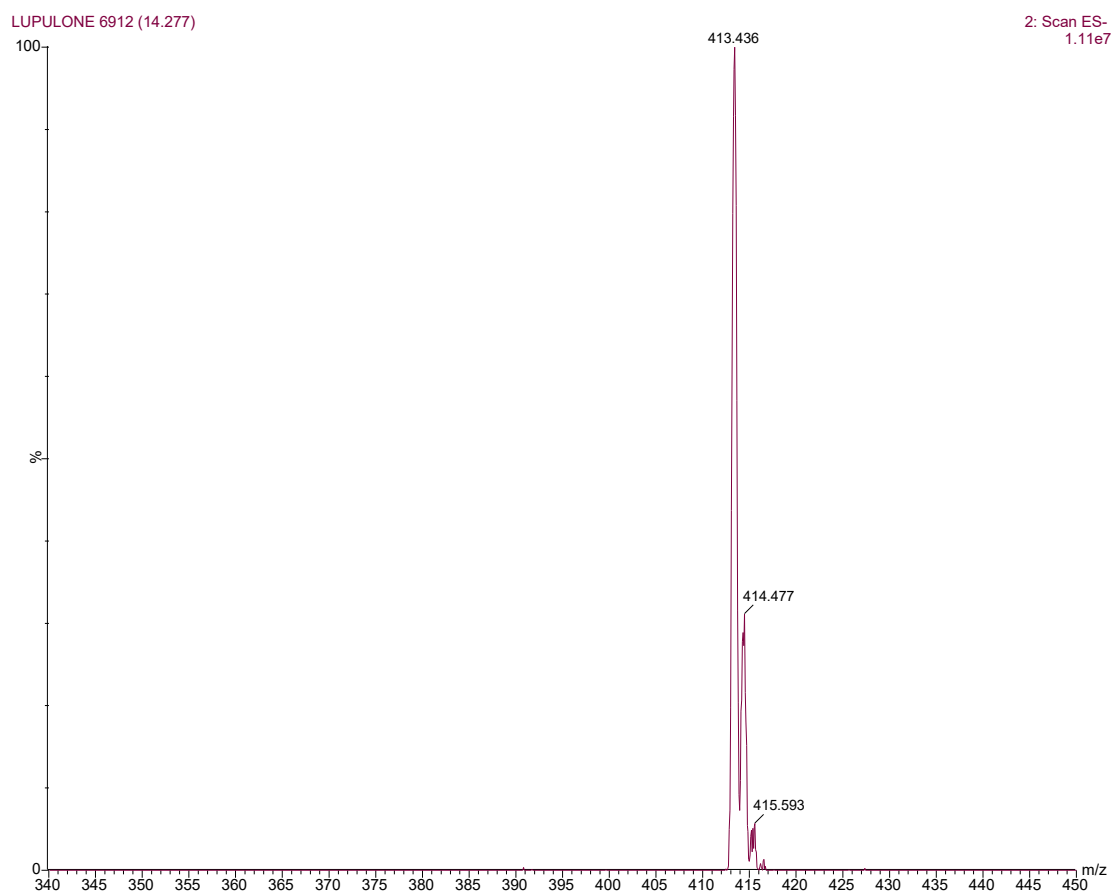
UV-čistota: 92,66 %

Peak purity index: 99,94 %



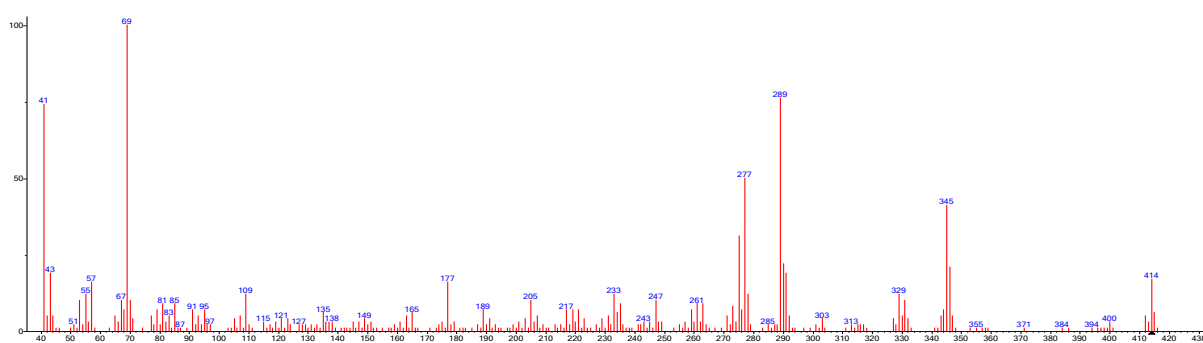
Obrázek 48. HPLC-UV chromatogram lupulonu

ESI-MS $[M - H]^-$ 413,436 m/z



Obrázek 49. ESI-MS spektrum lupulonu

GC-EI-MS $[M]^+$ 69 (99,9), 289 (76), 41 (74), 277 (50), 345 (41), 275 (31), 290 (22), 346 (21), 43 (19), 291 (19) m/z (%).

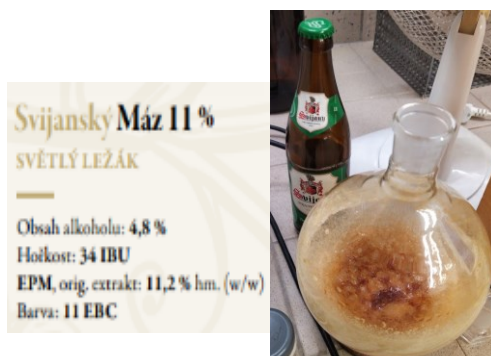


Obrázek 50. EI-MS spektrum lupulonu

5.2 Porovnání přítomnosti hořkých kyselin v doplňku stravy a nápoji s obsahem chmelu

5.2.1 Úprava vzorku piva

Pro porovnání přítomnosti hořkých kyselin bylo vybráno pivo Svijanský Máz, u kterého je garantován obsah hořkých kyselin 34 IBU (34 mg/l hořkých kyselin). Pro úpravu byla použita modifikovaná metoda dle Americké společnosti pivovarských chemiků (ASBC - 23), kterou doporučuje i EBC metoda.



Obrázek 51. Svijanský Máz 11 %

Pivo bylo po smíchání s dostatečným množstvím EtOH za účelem vytvoření azeotropu odpařeno do sucha na vakuové odparce. Následně bylo rozpuštěno ve 100 ml 2M HCl s 200 ml iso-oktanu a 3× přetřepáno. Iso-oktanová frakce byla následně spojena, odpařena do sucha a rozpuštěna ve 30 ml 2-propanolu. Před analýzou byl 1 ml přefiltrován přes stříkačkový filtr z teflonu.

5.2.2 Úprava vzorku doplňku stravy

U doplňku stravy se postupovalo dle metody EBC 7.7 jako s materiálem obsahujícím extrakt z chmelových šištic.



Obrázek 52. Doplněk stravy HopsVital

10 tablet bylo homogenizováno (obsah chmelového extraktu v jedné tabletě je 350 mg). Bylo odváženo takové množství homogenátu, které odpovídá 0,5 g extraktu. Prášek byl kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky s přídatkem 30 ml MeOH a byl rozpuštěn v ultrazvukové lázni. Po rozpuštění a vychladnutí byl vzorek doplněn po rysku. Obsah baňky byl pak důkladně promíchán. Před analýzou byl 1 ml přefiltrován přes stříkačkový filtr z teflonu.

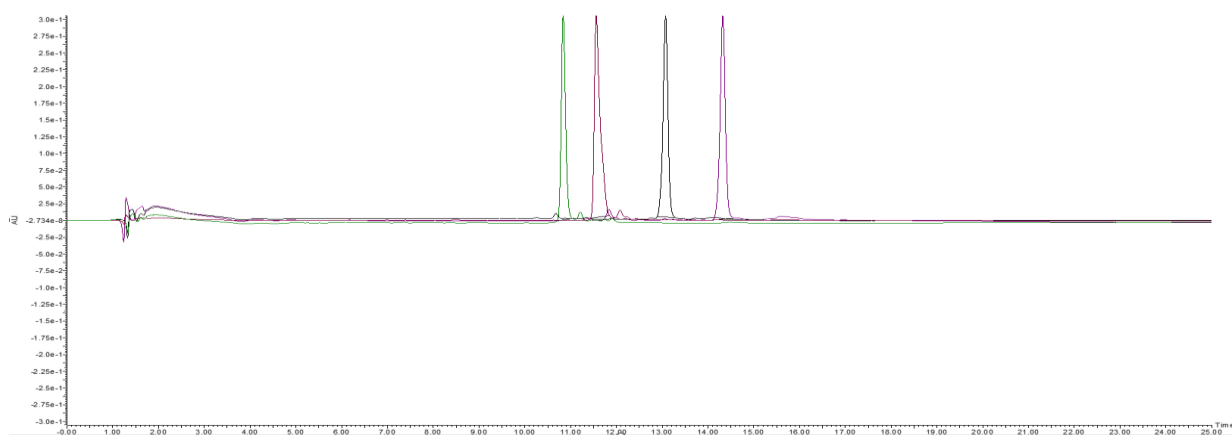
5.3 Optimalizace metody pro stanovení hořkých kyselin

Metoda EBC 7.7 a 7.8 specifikuje podmínky analýzy chmelové pryskyřice vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v celém chmelu i v granulích a chmelových extraktech. Vzhledem k mnoha faktorům bylo nezbytné danou metodu optimalizovat s ohledem na potřeby laboratoře, dostupnost stacionárních fází a přístrojové vybavení.

Tabulka 9. Porovnání metody EBC 7.7 s optimalizovanou metodou

	EBC 7.7	Optimalizovaná metoda
Stacionární fáze	Nucleosil 250 × 4 mm, RP-C18, 5 µm	Kinetex EVO Core-Shell C18 100 × 4,6 mm, 2,6 µm
Mobilní fáze	900 ml MeOH 180 ml voda 5 ml H ₃ PO ₄	A: voda + 0,1 % HCOOH B: MeOH + 0,1 % HCOOH
Průtok	0,8 ml/min	0,8 ml/min
Průběh analýzy	izokraticky	0 – 2 min = gradient 5 % – 75 % B 2 – 23 min = gradient 75 % – 100 % B 24 – 25 min = gradient 100 % – 5 % B
teplota termostatu	40 °C	ambientní
Nástřik	10 µl	5 µl
Doba analýzy	40 minut	25 minut
Detekce	λ = 314 nm	λ = 200–450 nm ESI ⁻ = 300–500 m/z

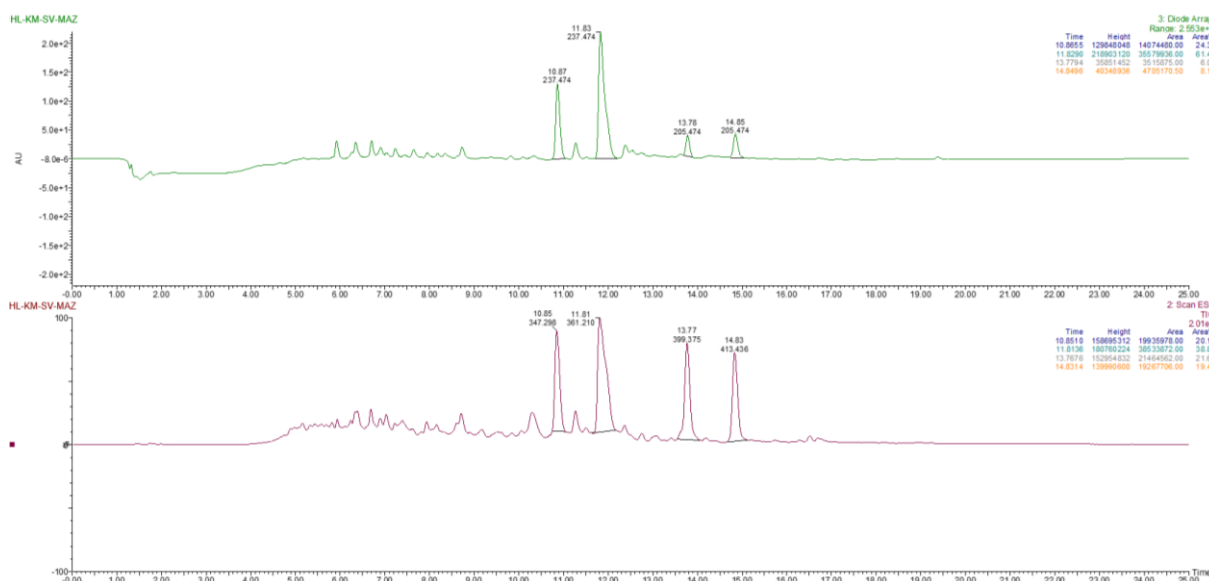
5.4 Porovnání HPLC separace s izolovanými standardy



Obrázek 53. Chromatogram izolovaných standardů v "overlay" módu

Tabulka 10. Charakteristiky píků standardů dle HPLC-UV chromatogramu

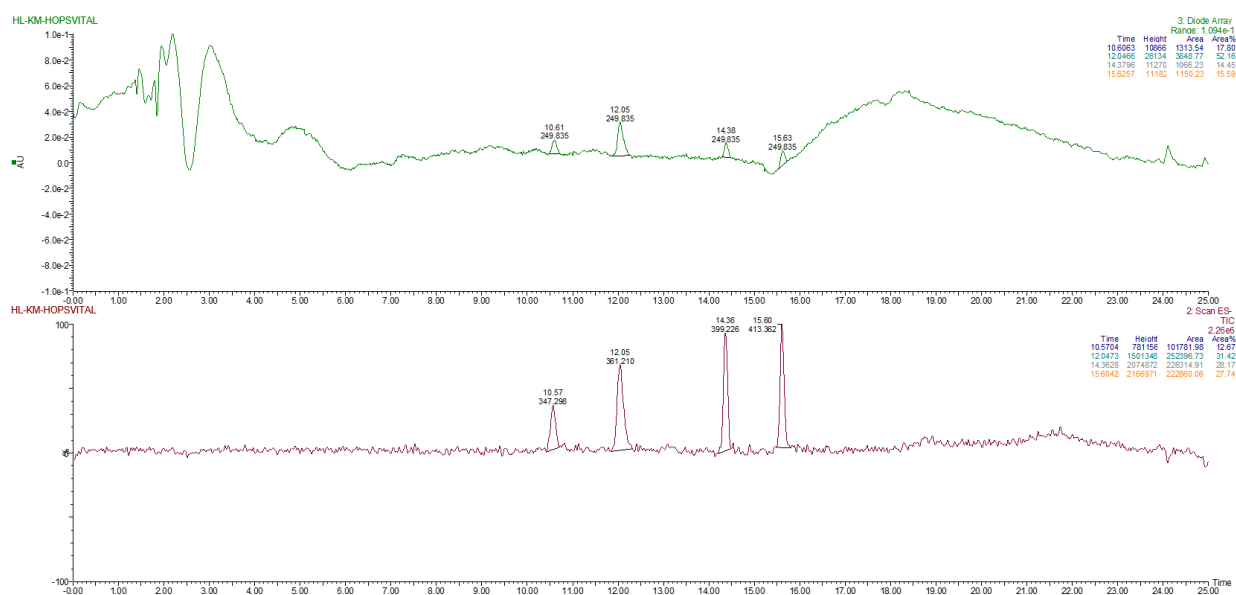
Látka	Retenční čas	Výška píku	Plocha píku (1 mg/ml)
Kohumulon	10,8355	180466	23064,38
Humulon	11,5589	184989	26338,73
Kolupulon	13,0726	181334	22500,10
Lupulon	14,3112	173621	20420,29



Obrázek 54. HPLC-UV a HPLC-MS chromatogram piva

Tabulka 11. Charakteristiky píků u piva dle HPLC-UV chromatogramu

Látka	Retenční čas	Výška píku	Plocha píku
Kohumulon	10,8655	129848048	14074480,00
Humulon	11,8290	218903120	35579936,00
Kolupulon	13,7794	35851452	3515875,00
Lupulon	14,8496	40348936	4705170,50



Obrázek 55. HPLC-UV a HPLC-MS chromatogram doplňku stravy HopsVital

Tabulka 12. Charakteristiky píků u DS HopsVital dle HPLC-UV chromatogramu

Látka	Retenční čas	Výška píku	Plocha píku
Kohumulon	10,6063	10866	1313,54
Humulon	12,0466	26134	3848,77
Kolupulon	14,3796	11270	1066,23
Lupulon	15,6257	11182	1150,23

6 DISKUSE A ZÁVĚR

Doplňky stravy zažívají v posledním desetiletí nárůst zájmu a popularity. V souvislosti s tím se zvyšuje jejich konzumace, produkce a rozmanitost jak v jejich složení, tak i v aplikačních formách. Jak již bylo zmíněno v teoretické části diplomové práce, na rozdíl od léčiv nejsou DS kontrolovány stejným regulačním mechanismem. Kvalitativní a kvantitativní hodnocení DS s obsahem rostlinného extraktu by mělo podobně jako u fytofarmak vycházet z monitorování účinných složek extraktu dle správné výrobní a laboratorní praxe. Bohužel v dnešní době ještě stále není na území Evropské unie ani Ameriky monitorování zavedeno.

Diplomová práce se zaměřila na monitorování doplňků stravy s obsahem chmelového extraktu, zejména hořkých kyselin. U hořkých kyselin bylo pozorováno mnoho biologických účinků, k nimž patří i účinek sedativní, díky němuž jsou v terapii nespavosti často používány. Tyto produkty jsou určeny jak pro podporu snadnějšího usínání a zlepšení kvality spánku, tak pro ženy procházející obdobím klimakteria. Dostupné jsou ve formě tablet, tobolek nebo ve formě tekuté, tedy jako perorální kapky. Jednotlivé doplňky často kombinují chmelový extrakt s dalšími rostlinnými extrakty, jako je extrakt z kozlíku lékařského, mučenky pletní, meduňky lékařské, nebo šišáku bajkalského. Některé produkty obsahují pouze chmel v granulované podobě, nebo kombinaci chmelu s inulinem.

Chmel se obecně používá v pivovarnictví a na hodnocení jeho kvality jsou pro tyto účely vytvořeny různé standardní operační postupy. Hořké kyseliny plní v pivu významnou funkci, stabilizují pěnu a hrají roli při skladování piva. V podobě iso-alfa hořkých kyselin také tomuto nápoji dodávají potřebnou hořkost. Na území Evropské unie existuje jediný dodavatel standardů hořkých kyselin pro pivovarnictví, firma Labor Veritas, která dodává mezinárodně schválený kalibrační extrakt. Vzhledem k jeho relativně vysoké ceně a nízké čistotě bylo rozhodnuto jednotlivé látky izolovat a purifikovat z komerčně dostupných zdrojů, a to chmelových pelet.

Cílem této diplomové práce bylo izolovat vybrané hořké kyseliny z chmelových pelet, purifikovat je a porovnat získané látky s vybraným doplňkem stravy vyskytujícím se na českém trhu – HopsVital, a s vybraným nápojem – pivem Svijanský Máz 11 %.

Základní sumární extrakt byl získán z 250 g chmelových pelet pomocí extrakce z kapaliny do kapaliny. Analýzou za pomoci HPTLC a TLC analýzy byly zjištěny nejvhodnější podmínky pro následnou separaci obsažených látek. Separace sumárního výtřepku probíhala

nejprve pomocí flash chromatografie. Pro separaci byla vzhledem k hmotnosti základního extraktu, která činila 12,6711 g, a relativně dobré separaci použita kartridž FlashPure EcoFlex Silica 120 g. Separace vedla k zisku 224 frakcí. Z těchto frakcí byly pomocí TLC a HPLC-MS analýzy, na základě podobností ve složení, následně pospojovány frakce A až V. Frakce J, K a L vykazovaly na TLC i HPLC chromatogramu přítomnost beta hořkých kyselin. Z toho důvodu byly po spojení (celkově 1,9624 g) frakcionovány a několikanásobně přečištěny pomocí preparativní chromatografie. Obdobným způsobem se postupovalo i u frakcí B a C (celkově 3,9518 g), ze kterých byly přečišťovány alfa hořké kyseliny. Izolované látky byly po odpaření podrobeny strukturní analýze a určeny jako kohumulon, humulon, kolupulon a lupulon. Jednotlivé strukturní charakteristiky přečištěných látek byly objasněny spektrálními metodami a jsou zahrnuty v kapitole 5.1.

Pro analýzu izolovaných látek byla zvolena metoda EBC 7.7 a 7.8, která popisuje HPLC stanovení hořkých kyselin v celém chmelu i v granulích a v chmelových extraktech spolu se specifickými podmínkami analýzy. Protože se jedná o pilotní studii a její hlavním cílem bylo izolovat standardy, bylo rozhodnuto, že budou izolované látky porovnané s doplňkem stravy a nápojem s obsahem chmele, který je z hlediska obsahu hořkých kyselin monitorován, pivem.

Metoda využívá kolonu Nucleosil 250 × 4 mm, RP-C18, s 5 μm plně porézními částicemi, která je udržována při teplotě 40 °C. Mobilní fáze složená z přibližně 83 % MeOH, 16 % vody a 1 % H₃PO₄, která je při průtoku 0,8 ml za minutu, je izokraticky dodávána do systému. Protože laboratoř nevlastní danou kolonu, přístroj používaný pro analýzu a purifikaci nemá termostat, a má připojený hmotnostní detektor, a doba analýzy by byla příliš zdouhavá, bylo rozhodnuto metodu optimalizovat pro podmínky laboratoře. Zároveň bylo výhodné použít pro analýzu hmotnostní detekci. Preparativní/analytická HPLC-MS využívá pro svůj rutinní provoz kolonu XSelect® CSH™ C18, 4,6 mm × 100 mm, s velikostí částic 5 μm (Waters Corporation, Milford, USA), proto začala optimalizace na ní. Kyselina fosforečná není kompatibilní s hmotnostní detekcí, proto byla použita mobilní fáze ve složení 18MΩ voda s přídatkem 0,1% kyseliny mravenčí, která byla dodávána z pumpy A, a mobilní fáze B, tvořená methanolem s přídatkem 0,1% kyseliny mravenčí. Poměr jednotlivých složek mobilní fáze byl ponechán tak, jak byl specifikován v metodě EBC. Vzhledem k nedostatečnému rozlišení jednotlivých píků i při optimalizaci složení mobilní fáze byla zvolena gradientová eluce. Použití gradientové eluce vedlo k prodloužení času analýzy, ale ke zlepšení tvaru píků. Při optimalizaci gradientu však často docházelo, zejména u extraktu piva, ke koeluci interferujících komponentů extraktu

s hořkými kyselinami. Z toho důvodu bylo nezbytné zvýšit selektivitu separace. Proto byla pro separaci zvolena kolona Kinetex EVO Core-Shell C18 100 × 4,6 mm, s povrchově porézními 2,6µm částicemi (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

U této kolony bylo vyzkoušeno několik podmínek včetně původních, ve snaze dosáhnout adekvátní separace v izokratickém módu a za rozumného času. Vzhledem k povaze látek, které mají spíše lipofilní charakter (Tabulka 2.), bylo očekáváno, že použití většího množství organického rozpouštědla v průběhu separace tak, jak doporučuje EBC metoda (80 % MeOH), povede k lepší separaci. V průběhu několika analýz docházelo postupně ke ztrátě rozlišení a změnám v retenčních časech, které by nebyly tolerovatelné při budoucí validaci metody. U EBC metody je před analýzou doporučována minimálně půlhodinová ekvilibrace před každou analýzou. Do značné míry docházelo při proplachu mezi analýzami ke zlepšení rozlišení a tvaru píků u analýz. Vedlo nás to k závěru, že při reverzním módu dochází také k interakcím s hydroxylovými skupinami hořkých kyselin, a proto by bylo vhodné inkorporovat proplach vodní fází v průběhu analýzy. Z toho důvodu byl zvolen rychlý gradient z 5 % MeOH na 70 % v průběhu prvních 2 minut analýzy. Do značné míry to za daných podmínek změnilo opakovatelnost po sobě jdoucích analýz (rozdíl opakovatelnosti retenčních časů se zmenšil o 1 minutu).

Pro porovnání s izolovanými standardy o koncentraci 1 mg/ml jsme se rozhodli využít vzorek piva a DS s deklarovaným množstvím hořkých kyselin. Piva plzeňského typu s označením „ležák“ by měla obsahovat hořčiny v rozsahu 30–35 IBU (odpovídá 30–35 µg/ml, nebo také 30–35 mg/l hořkých kyselin). Doplněk stravy množství hořkých kyselin neuvádí, ale uvádí množství chmelového extraktu. V závislosti na varietě chmele může obsahovat od 2 do 15 % alfa a od 2 do 10 % beta hořkých kyselin [4]. Z chromatogramů je možné usoudit, že dané látky jsou přítomny jak v DS, tak v pivu. Rozlišení mezi jednotlivými píky je uspokojivé. U piva dochází k interferencím ostatních látek, proto by bylo vhodnější ještě optimalizovat extrakční postup. Na druhou stranu je vzorek piva mnohonásobně koncentrovanější než vzorek DS, který je ještě naředěn.

Závěrem je možné říct, že se povedlo izolovat a purifikovat standardy hořkých kyselin a porovnat je s reálnými vzorky DS a nápoje s obsahem chmele. Použitý preparativní/analytický HPLC přístroj není nejvhodnější volbou pro analytické stanovení a zavedení metody do praxe. Došlo ale k optimalizaci podmínek analytické metody, která může být v budoucnu po kalibraci a validaci použita na měření hořkých kyselin v DS a ke kontrole jejich kvality na jiném přístroji.

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Velu G., Palanichamy V., Rajan A. P. (2018). Phytochemical and pharmacological importance of plant secondary metabolites in modern medicine. *Bioorganic phase in natural food: an overview*, 135-156.
2. Jahodář L.: *Farmaceuticky významné semenné rostliny*. Nakladatelství Karolinum, Praha, 2022.
3. Kabera J. N., Semana E., Mussa A. R., He X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol*, 2(7), 377-392.
4. Zhang G., Zhang N., Yang A., Huang J., Ren X., Xian M., Zou, H. (2021). Hop bitter acids: Resources, biosynthesis, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(11), 4343-4356.
5. Schindler R., Sharrett Z., Perri M. J., Lares M. (2019). Quantification of α -acids in fresh hops by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *ACS omega*, 4(2), 3565-3570.
6. Zanolini P., Zavatti M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of ethnopharmacology*, 116(3), 383-396.
7. Korpelainen H., Pietiläinen M. (2021). Hop (*Humulus lupulus* L.): Traditional and present use, and future potential. *Economic botany*, 75(3), 302-322.
8. Smolík P. (2009). Trendy farmakoterapie v léčbě nespavosti. *Psychiatrie pro praxi*, 10(2), 63-66.
9. Martin J., Martinová D. (2014). Léčivé rostliny s hypnotickým a sedativním účinkem. *Praktické lékařství*, 10(6), 226-228.
10. <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id3469/>, staženo 15. 8. 2024.
11. <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=HULU>, staženo 7. 5. 2024.
12. Zhang H., Jin J., Moore M. J., Yi T., Li D. (2018). Plastome characteristics of Cannabaceae. *Plant diversity*, 40(3), 127-137.
13. Chadwick L. R., Pauli G. F., Farnsworth N. R. (2006). The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L.(hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine*, 13(1-2), 119-131.
14. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: *Farmakognozie*. Nakladatelství Karolinum, Praha, 2019.

15. Van Cleemput M., Cattoor K., De Bosscher K., Haegeman G., De Keukeleire D., Heyerick A. (2009). Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *Journal of natural products*, 72(6), 1220-1230.
16. Carbone K., Gervasi, F. (2022). An updated review of the genus *Humulus*: a valuable source of bioactive compounds for health and disease prevention. *Plants*, 11(24), 3434.
17. Novák F. A.: *Farmaceutická botanika*. Zdravotnické nakladatelství Společnosti československých lékařů a vědeckých zdravotních pracovníků J. E. Purkyně, Praha, 1950.
18. Korbelař J., Endris Z.: *Naše rostliny v lékařství*. Státní zdravotnické nakladatelství, n. p., Praha, 1968.
19. Ramos F. P., Iwamoto L., Piva V. H., Teixeira, S. P. (2024). Updating the Knowledge on the Secretory Machinery of Hops (*Humulus lupulus* L., Cannabaceae). *Plants*, 13(6), 864.
20. Flythe M. D., Kagan I. A., Wang Y., Narvaez, N. (2017). Hops (*Humulus lupulus* L.) bitter acids: modulation of rumen fermentation and potential as an alternative growth promoter. *Frontiers in veterinary science*, 4, 131.
21. Wang G., Fan C., Qiu Y., Zhao Y., Zhang J., Xin H., Li, X. (2021). The complete chloroplast genome of *Humulus lupulus* cv. 'Fubei-1' (Rosales: Cannabaceae). *Mitochondrial DNA Part B*, 6(8), 2439-2441.
22. Clark S. M., Vaitheeswaran V., Ambrose S. J., Purves R. W., Page J. E. (2013). Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*). *BMC plant biology*, 13, 1-14.
23. *Český lékopis 2017 – Doplněk 2020*. Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha, 2020.
24. Stasiłowicz-Krzemień A., Cielecka-Piontek, J. (2023). Hop Flower Supercritical Carbon Dioxide Extracts Coupled with Carriers with Solubilizing Properties – Antioxidant Activity and Neuroprotective Potential. *Antioxidants*, 12(9), 1722.
25. Ayabe T., Fukuda T., Ano Y. (2020). Improving effects of hop-derived bitter acids in beer on cognitive functions: a new strategy for vagus nerve stimulation. *Biomolecules*, 10(1), 131.
26. Agostini-Costa T. da S., Vieira R. F., Bizzo H. R., Silveira D., Gimenes M. A. (2012). Secondary metabolites.
27. Erb M., Kliebenstein D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant physiology*, 184(1), 39-52.
28. Opletal L.: *Přírodní látky a jejich biologická aktivita. Svazek 3, Nutraceutika: sekundární metabolity rostlin*. Nakladatelství Karolinum, Praha, 2016.

29. <https://www.chemspider.com/>, staženo 12. 8. 2024.
30. Schindler R., Sharrett Z., Perri M. J., Lares, M. (2019). Quantification of α -acids in fresh hops by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *ACS omega*, 4(2), 3565-3570.
31. <https://brouwland.com/en/blog/post/international-bitterness-units.html>, staženo 12. 11. 2024.
32. Fukuda T., Ohnuma T., Obara K., Kondo S., Arai H., Ano, Y. (2020). Supplementation with matured hop bitter acids improves cognitive performance and mood state in healthy older adults with subjective cognitive decline. *Journal of Alzheimer's Disease*, 76(1), 387-398.
33. Stevens J. F., Ivancic M., Hsu V. L., Deinzer M. L. (1997). Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 44(8), 1575-1585.
34. Yan Y. F., Wu T. L., Du S. S., Wu Z. R., Hu Y. M., Zhang Z. J., Zhao W. B., Yang C. J., Liu, Y. Q. (2021). The Antifungal Mechanism of Isoxanthohumol from *Humulus lupulus* Linn. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10853.
35. Rutnik K., Knez Hrnčič M., Jože Košir I. (2022). Hop essential oil: Chemical composition, extraction, analysis, and applications. *Food Reviews International*, 38(sup1), 529-551.
36. Krofta K.: *Hodnocení kvality chmele*. Chmelařský institut, Žatec, 2008.
37. Kralj D., Zupanec J., Vasilj D., Kralj S., Pšeničnik J. (1991). Variability of essential oils of hops, *Humulus lupulus* L. *Journal of the Institute of Brewing*, 97(3), 197-206.
38. Paventi G., De Acutis L., De Cristofaro A., Pistillo M., Germinara G. S., Rotundo G. (2020). Biological activity of *Humulus lupulus* (L.) essential oil and its main components against *Sitophilus granarius* (L.). *Biomolecules*, 10(8), 1108.
39. Pretl M. (2008). Praktický lékař a nespavost. *Medicina Pro Praxi*, 5(3), 123-126.
40. Moráň M. (2008). Farmakologie nespavosti. *Praktické lékařství*, 4, 166-171.
41. Roth T. (2007). Insomnia: definition, prevalence, etiology, and consequences. *Journal of clinical sleep medicine*, 3(5 suppl), S7-S10.
42. Vašutová K. (2009). Spánek a vybrané poruchy spánku a bdění. *Praktické lékařství*, 1, 17-20.
43. Moráň, M. (2009). Poruchy spánku. *REM*, 1(2).
44. Borzová C. (2002). Primární poruchy spánku. *Interní medicína pro praxi*, 1, 10-14.
45. Borzová C.: *Nespavost a jiné poruchy spánku: pro nelékařské zdravotnické obory*. Grada Publishing a. s., Praha, 2009.
46. Borzová C. (2005). Léčba chronické nespavosti. *Psychiatrie pro praxi*, 3(2), 61-63.

47. Borzová C. (2002). Farmakoterapie insomnie. *Interní medicína pro praxi*.
48. Sovová E., Sovová M., Sova M.: *Primární prevence v praxi – projekt 5S*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2023.
49. Konrád J. (2005). Kognitivní poruchy ve stáří. *Psychiatrie pro praxi*, 5, 229-232.
50. Šonka K. (2005). Poruchy spánku ve stáří. *Neurologie pro praxi*, 4(1), 11-13.
51. Thorpy M. (2017). International classification of sleep disorders. *Sleep disorders medicine: basic science, technical considerations and clinical aspects*, 475-484.
52. Slouka D., Holoubková J., Frei J. (2015). Obstrukční syndrom spánkové apnoe. *Syndrom spánkové apnoe*. Plzeň: Euroverlag, 55-71.
53. Moráň M. (2002). Parasomnie v NREM spánku. *Neurologie pro praxi*, 3(3), 131-133.
54. Faltus F. (2007). Syndrom nočního jedlctví. *Česká a slovenská psychiatrie*, 103(6), 291-296.
55. Kec D., Ludka O., Hamerníková V., Kubánek J., Bednařík J., Vlčková E. (2020). Současné trendy v léčbě a diagnostice chronické nespavosti. *Česká a Slovenská Psychiatrie*, 116(3).
56. Vašutová K. (2009). Léčba nespavosti. *Praktické lékařství*, 5(2), 70-75.
57. Borzová C. (2008). Spánek a paměť ve vztahu k medikaci. *Psychiatr. Praxi*, 9(5), 213-216.
58. Šonka K., Nevšímalová S. (2006). Moderní farmakoterapie nespavosti. *Interní medicína pro praxi*, 7(9), 401-404.
59. Závěšická L. (2014). Chronická nespavost. *Psychiatrie pro praxi*, 15(1), 9-14.
60. Moráň M. (2005). Použití hypnotik u insomnie. *Interní medicína pro praxi*, 3(10), 446-450.
61. Praško J., Závěšická L., Ticháčková A. (2009). Léčba primární insomnie z pohledu psychiatra. *Psychiatrie pro praxi*, 10(6), 250-256.
62. Yang L. P. (2014). Suvorexant: first global approval. *Drugs*, 74, 1817-1822.
63. Racková S., Vranová V. (2020). Možnosti fytofarmak při zvládání úzkostných poruch. *Praktické lékařství*, 16(4), 226-228.
64. Borrás S., Martínez-Solís I., Ríos J. L. (2021). Medicinal plants for insomnia related to anxiety: an updated review. *Planta Medica*, 87(10/11), 738-753.
65. Opletal L.: *Přírodní látky a jejich biologická aktivita. Svazek 1, Nutraceutika: primární metabolity a látky obsažené ve strukturovaných biologických systémech*. Nakladatelství Karolinum, Praha, 2010.
66. Kohout P. (2010). Možnosti ovlivnění imunitního systému nutraceutiky. *Interní medicína pro praxi*, 12(3), 140-144.

67. Espín J. C., García-Conesa M. T., Tomás-Barberán F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2986-3008.
68. Kalra E. K. (2003). Nutraceutical - definition and introduction. *Aaps Pharmsci*, 5(3), 25.
69. Pathak Y. V., Lokhande J. N.: *Handbook of metallonutraceuticals*. CRC Press, Londýn, Velká Británie, 2014.
70. Pathak Y. V., Schapiro S. J.: *Handbook of Nutraceuticals, Volume I, Ingredients, Formulations and Applications*. CRC Press, Londýn, Velká Británie, 2010.
71. Adebowale A. O., Liang Z., Eddington N. D. (2000). Nutraceuticals, a call for quality control of delivery systems: A case study with chondroitin sulfate and glucosamine. *Journal of nutraceuticals, functional & medical foods*, 2(2), 15-30.
72. Vyhláška č. 58/2018 Sb. o doplňcích stravy a složení potravin. Sbírka zákonů, částka 29, 2018.
73. Zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. Sbírka zákonů, částka 38, 1997.
74. Zákon č. 378/2007 Sb. o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů. Sbírka zákonů, částka 115, 2007.
75. Larsen L. L., Berry J. A. (2003). The regulation of dietary supplements. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 15(9), 410-414.
76. Fibigr J., Šatínský D., Solich P. (2018). Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts. *Analytica Chimica Acta*, 1036, 1–15.
77. Preuss C. (2009). Pharmacological characterization of nutraceuticals. Article in *Handbook of Nutraceuticals Volume I: Ingredients, Formulations, and Applications*. CRC Press, 149–155.
78. <https://www.nzip.cz/clanek/161-doplanky-stravy>, staženo 19. 11. 2024.
79. Mach I.: *Doplňky stravy - jaké si vybrat při sportu i v každodenním životě*. Grada Publishing, a. s., Praha, 2012.
80. Vilikus Z. a kolektiv: *Výživa sportovců a sportovní výkon*. Nakladatelství Karolinum, Praha, 2015.
81. <https://sukl.gov.cz/encyklopedie/jaky-je-rozdil-mezi-lekem-a-doplnekem-stravy/>, staženo 15. 11. 2024.
82. <https://mze.gov.cz/public/portal/mze/potraviny/doplanky-stravy>, staženo 15. 11. 2024.

83. Kocourek V.: *Úvod do potravinářské legislativy*. Fakulta potravinářské a biochemické technologie VŠCHT, Praha, 2014.
84. Babička L.: *Průvodce světem potravin; Rady spotřebitelům, na co si dát pozor při nakupování a manipulaci s potravinami*. Ministerstvo zemědělství, Odbor bezpečnosti potravin, Praha, 2012.
85. Michalová I., Šíma P.: *Co jsou doplňky stravy a v čem se liší od léčivých přípravků - 1. část*. Sdružení českých spotřebitelů. Laboratoř imunoterapie, Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha.
86. Meer M., Misner S., Meer R. (2005). Labeling of dietary supplements: consumer awareness and industry compliance. *Journal of nutraceuticals, functional & medical foods*, 4(3-4), 29-44.
87. Wagner H.: *Plant Drug Analysis in A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 1996.
88. Hoek A. C., Hermans-Lokkerbol A. C., Verpoorte R. (2001). An improved NMR method for the quantification of α -Acids in hops and hop products. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 12(1), 53-57.
89. Schulz C., Chiheb C., Pischetsrieder M. (2019). Quantification of co-, n-, and ad-lupulone in hop-based dietary supplements and phytopharmaceuticals and modulation of their contents by the extraction method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 168, 124-132.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Kandidát: Kateřina Malá

Školitel: RNDr. Jaroslav Jenčo, Ph.D.

Název diplomové práce: Izolace a purifikace alfa a beta hořkých kyselin z chmele

Klíčová slova: chmel, chromatografie, extrakce kapalina-kapalina, humulon, lupulon

Předmětem této diplomové práce bylo zpracování chmelových pelet za účelem izolace a purifikace hořkých kyselin, tedy hlavních obsahových látek chmele. Hořké kyseliny mají mj. sedativní účinek, kterého se využívá v doplňcích stravy působících proti nespavosti.

Pomocí extrakce z kapaliny do kapaliny byl získán základní extrakt. Následným provedením HPTLC a TLC analýzy a separací pomocí flash chromatografie došlo ke vzniku 224 frakcí. Z těchto frakcí byly vybrány frakce bohaté zvláště na alfa a beta hořké kyseliny. Následně byly několikrát přečištěny pomocí preparativní chromatografie, aby mohlo dojít k izolaci 4 konkrétních hořkých kyselin – humlonu, kohumlonu, luplonu a koluplonu.

Analýza hořkých kyselin byla provedena za využití metody EBC 7.7 a 7.8. Ta popisuje HPLC stanovení hořkých kyselin v chmelu i v granulích, podmínky této metody však musely být optimalizovány a přizpůsobeny podmínkám laboratoře.

V práci došlo také k porovnání izolovaných hořkých kyselin se vzorkem doplňku stravy HopsVital a vzorkem nápoje s obsahem chmele, piva. Přítomnost hořkých kyselin v těchto vzorcích byla dokázána pomocí HPLC-UV a HPLC-MS chromatogramů.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate: Kateřina Malá

Supervisor: RNDr. Jaroslav Jenčo, Ph.D.

Title of diploma thesis: Isolation and purification of alpha and beta bitter acids from hops

Key words: hops, chromatography, liquid-liquid extraction, humulone, lupulone

The main focus of this diploma thesis was the processing of hop pellets for the isolation and purification of bitter acids, the main active compounds in hops. Bitter acids have, among other benefits, a sedative effect, making them useful in dietary supplements for insomnia relief.

A basic extract was obtained by liquid-liquid extraction. Subsequently, HPTLC and TLC analysis and separation using flash chromatography were performed and yielded 224 fractions. From these fractions, fractions rich in alpha and beta bitter acids were selected. These fractions were then purified several times by preparative chromatography, leading to the isolation of 4 specific bitter acids – humulone, cohumulone, lupulone and colupulone.

The analysis of bitter acids was conducted using EBC methods 7.7 and 7.8, which describe HPLC determination of bitter acids in hops and hop pellets. However, the conditions of this method had to be optimized and adapted to the laboratory conditions and instruments.

The thesis also includes a comparison of the isolated bitter acids with a dietary supplement sample, HopsVital, and a hop-containing beverage sample, beer. The presence of bitter acids in these samples was confirmed using HPLC-UV and HPLC-MS chromatograms.