Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Diplomová práce

Vývoj UHPLC metody pro stanovení withanolidů v potravních doplňcích na bázi extraktu z Ashwagandhy

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

Hradec Králové 2025 **Bc. Eliška Vašutová**

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.

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za ochotné a vstřícné jednání při řešení této diplomové práce, také za cenné rady, věnovaný čas a trpělivost. Poděkování patří také mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali a byli mi oporou.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Eliška Vašutová

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

Název diplomové práce: Vývoj UHPLC metody pro stanovení withanolidů v potravních doplňcích na bázi extraktu z Ashwagandhy

Tato diplomová práce se zabývala vývojem a validací metody ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) pro separaci a stanovení látek withaferinu A, withanolidu A, withanolidu B, withanosidu IV, withanosidu V a withanonu, které jsou obsaženy v extraktech z Vitánie snodárné, běžně označované jako Ashwagandha. Vyvinutá metoda byla následně aplikována k určení obsahu zmíněných withanolidů v deseti potravních doplňcích: Ashwagandha BIO Organic (Blendea), Ashwagandha (ActiveLab), Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd), Ashwagandha Extract Organic BIO (Viridian), Ashwagandha (Green Idea), Ashwagandha (ADVANCE nutraceutics), Ashwagandha (Gym Beam), Ashwagandha (Webber Naturals), Ashwagandha (Vilgain) a Ashwagandha (Jíme zdravě).

Pro analýzu byla použita kolona Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm s částicemi o velikosti 2,6 µm. Byla využita gradientová eluce s mobilní fází A: acetonitril a mobilní fází B: ultračistá voda. Analýza probíhala při konstantní teplotě 30 °C a rychlost průtoku mobilní fáze činila 1,0 ml/min. Detekce byla provedena detektorem diodového pole při vlnových délkách 215 nm (withaferin A, withanosid IV) a 228 nm (withanolid A, withanolid B, withanosid V, withanon).

Klíčová slova: UHPLC, withaferin A, withanolid A, withanolid B, withanosid IV, withanosid V, withanon, Vitánie snodárná, Ashwagandha, doplňky stravy

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Eliška Vašutová

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

Title of the diploma thesis: Development of UHPLC method for the determination of withanolides in dietary supplements with Ashwagandha extract

In this diploma thesis, a new ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC) method was developed and validated for the separation and determination of withaferin A, withanolide A, withanolide B, withanoside IV, withanoside V and withanone, which are contained in the extracts of Withania somnifera, commonly known as Ashwagandha. The developed method was subsequently used to determine the withanolides in ten dietary supplements: Ashwagandha BIO Organic (Blendea), Ashwagandha (ActiveLab), Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd), Ashwagandha Extract Organic BIO (Viridian), Ashwagandha (Green Idea), Ashwagandha (ADVANCE nutraceutics), Ashwagandha (Gym Beam), Ashwagandha (Webber Naturals), Ashwagandha (Vilgain) a Ashwagandha (Jíme zdravě).

A Kinetex F5 100 Å 150 x 4.6 mm analytical column with 2.6 µm particles was used for the analysis. The analysis was carried out by gradient elution with mobile phase A: acetonitrile, mobile phase B: ultrapure water. The analysis was carried out at a temperature of 30 °C and the flow rate of the mobile phase was 1.0 ml/min. Detection was performed with a diode array detector at two wavelengths of 215 nm (withafern A, withanoside IV) and 228 nm (withanolide A, withanolide B, withanoside V, withanone).

Key words: UHPLC, withaferin A, withanolide A, withanolide B, withanoside IV, withanoside V, withanone, Withania somnifera, Ashwagandha, dietary supplements

Obsah

1 Seznam použitých zkratek 8
2 Úvod 10
3 Cíl a zadání práce 11
4 Teoretická část 12
4.1 Doplňky stravy 12
4.2 Vitánie snodárná – Ashwagandha 12
4.2.1 Stavba rostliny 13
4.2.2 Výskyt a pěstování 14
4.2.3 Využití a účinky na organismus 15
4.2.4 Obsahové látky 18
4.2.5 Withanolidy 18
4.2.6 Kontraindikace 26
4.2.7 Aplikační formy a dávkování 26
4.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 27
4.4 Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie 29
4.5 Rešerše stanovení analytů v doplňcích stravy na bázi Ashwagandhy 30
5 Experimentální část 33
5.1 Použité přístroje a pomůcky 33
5.1.1 Chromatografický systém 33
5.1.2 Testované kolony 33
5.1.3 Pomůcky 34
5.2 Použité chemikálie 34
5.2.1 Standardy 34
5.2.2 Rozpouštědla 34
5.2.3 Doplňky stravy 35
5.3 Příprava roztoků 36
5.3.1 Příprava roztoků pro standardy a vzorky 36
5.3.2 Příprava zásobních roztoků standardů pro optimalizaci metody 36
5.3.3 Příprava pracovních roztoků standardů 36
5.3.4 Příprava roztoků pro kalibraci 37
5.3.5 Příprava vzorků pro opakovatelnost 37

5.3.6 Příprava vzorků pro přesnost a preciznost 37
5.3.7 Příprava analyzovaných vzorků potravních doplňků 38
5.3.8 Příprava mobilní fáze 38
5.4 Parametry měření 39
6 Výsledky a diskuse 40
6.1 Vývoj analytické metody, optimalizované parametry 40
6.1.1 Volba vlnové délky 40
6.1.2 Volba gradientu a kolony 41
6.1.3 Volba složení mobilní fáze 49
6.1.4 Optimalizace složení extrakčního rozpouštědla 51
6.1.5 Test vhodnosti chromatografického systému 54
6.1.6 Opakovatelnost 55
6.1.7 Linearita 55
6.1.8 Preciznost a přesnost 62
6.2 Stanovení vzorků 63
6.2.1 Zhodnocení kvality analyzovaných doplňků stravy 71
6.2.2 Porovnání obsahu stanovovaných withanolidů v kapslích s obsahem extraktu Ashwagandy s cenou jednotlivých doplňků stravy 72
7 Závěr 73
8 Zdroje 75
9 Seznam obrázků a tabulek 82
9.1 Seznam obrázků 82
9.2 Seznam tabulek 85

1 Seznam použitých zkratek

ACHE	acetylcholinesteráza
ACN	acetonitril
AN	Alzheimerova nemoc
A_s	faktor symetrie
CAD	detektor nabitého aerosolu
DM	diabetes mellitus
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusného
GC	plynová chromatografie
GABA	kyselina gama aminomáselná
GPX	glutathionperoxidáza
GSH	glutathion
HAM-A	Hamiltonova škála úzkosti
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
Hsp90	heat shock protein 90
IPP	izopentyl difosfát
KAT	kataláza
LD_{50}	letální dávka
MDSC	myeloidní supresorové buňky
MEP	2-metyl-D-erytritol-4-fosfát
MS	hmotnostní spektrometrie
NF-κB	nukleární faktor kappa
NO	oxid dusný
NOAEL	hodnota dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku
Pc	kapacita separace

PDA	detektor fotodiodového pole
PEEK	polyetheretherketon
PTFE	polytetrafluorethylen
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SOD	superoxiddismutáza
SQS	skvalensyntáza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
t_r	retenční čas
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
V_{O2max}	maximální spotřeba kyslíku

2 Úvod

Vitánie snodárná (*Withania somnifera*), běžně označována jako Ashwaghanda, je stálezelený keř, jehož kořeny, listy a extrakty z nich jsou již po několik staletí využívány v tradiční indické medicíně s názvem Ájurvéda. Rostlina je označována jako adaptogen, termín, kterým se označuje skupina neškodných látek zvyšujících fyzickou i psychickou odolnost vůči stresu vyvolanému na organismus. Dnes jsou extrakty z Ashwaghandhy distribuovány jako doplňky stravy užívané pro snížení fyzické slabosti, stresu, a únavy [1], [2].

Hlavními bioaktivními látkami zodpovědnými za vlastnosti této rostliny jsou withanolidy, skupina více než 40 látek s komplexní strukturou, ergostanovou kostrou a laktonovým postranním řetězcem. Dále jsou v rostlině přítomny také alkaloidy, fenolické kyseliny či saponiny [2].

Významem doplňků stravy je příznivě ovlivňovat zdraví spotřebitele. Na rozdíl od léků neslouží k prevenci ani k léčbě onemocnění. Jedná se o specifickou skupinu produktů, které mají obohatit běžnou stravu o vitamíny, minerály a další látky s nutričními nebo fyziologickými účinky. Negativní stránkou této problematiky je skutečnost, že výrobce není povinen před uvedením na trh ověřovat účinnost doplňku stravy ani obsah a stabilitu bioaktivních látek v něm obsažených [3].

3 Cíl a zadání práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a validovat chromatografickou metodu pro separaci a stanovení šesti účinných látek obsažených ve Vitánii snodárné – Ashwagandhě – withanolidu A, withanolidu B, withaferinu A, withanosidu IV, withanosidu V a withanonu. Byly stanoveny důležité parametry, mezi něž patří linearita, opakovatelnost, výtěžnost spolu se zvolením vhodného složení mobilní fáze a typu kolony. Vyvinutá metoda byla následně použita pro stanovení výše uvedených látek v deseti potravních doplňcích na bázi extraktu z kořene Ashwagandhy.

4 Teoretická část

4.1 Doplňky stravy

Doplňky stravy charakterizují skupinu produktů, které se užívají za účelem doplnění běžné stravy o minerály, vitamíny a jiné živiny s příznivým účinkem na organismus. Na jejich obalu nesmí být, na rozdíl od registrovaného léčivého přípravku, uváděna tvrzení o léčivých a preventivních vlastnostech produktu, povolena jsou pouze prohlášení o zdravotním nebo výživovém tvrzení, která nesmí být v rozporu s právními předpisy EU. Na obalu musí být uvedeno označení „doplněk stravy“. Dalšími rozdíly oproti registrovaným léků jsou v procesu schvalování, který u doplňku stravy zcela odpadává a výrobce či dovozce má pouze povinnost informovat Ministerstvo zemědělství, na které je povinen před prvním uvedením na trh zaslat znění české etikety. Výrobce či dovozce dále není povinen ověřovat účinnost doplňku stravy [3], [4].

4.2 Vitánie snodárná – Ashwagandha

Vitánie snodárná (*Withania somnifera*), označována jako Ashwagandha, jinak také označována jako indický ženšen či indická zimní třešeň, se řadí mezi rostliny rodu withanie (*Withania*), patřící do čeledi lilkovité (*Solanaceae*). Rostlina je používána ve směru alternativní medicíny zvané Ájurvéda. Jedná se o označení pro systém tradičního indického lékařství [5]. Slovo Ájurvéda v překladu znamená „Věda života“ [2]. Je založena na holistickém vnímání světa a přípravky z přírodních zdrojů jsou její běžnou součástí. Rostlina je v mnoha receptech této medicíny používána buď samostatně nebo v kombinaci s jinými léčivými rostlinami [6]. Ashwagandha je v ájurvédském systému klasifikována jako „rasajána“, což znamená „tonikum“, a působí především jako omlazující prostředek, obrana proti nemocem, zpomaluje stárnutí a zlepšuje paměť [7].

Obrázek 1: Vitánie snodárná [8]

Ashwagandha se řadí mezi adaptogeny. Termín adaptogen poprvé použili Brekhman a Dardymo v roce 1969 a označil tímto termínem neškodné látky, které nespecifickým způsobem zvyšují odolnost vůči škodlivým faktorům chemické, fyzikální, biologické či psychologické povahy a přispívají tak k normalizaci homeostázy jedince [9]. Příjem těchto látek je spojen s lepší adaptací na stres, udržování metabolických funkcí a lepším fyzickým i mentálním výkonem [10]. Adaptogeny jsou po tisíce let součástí tradičních medicín, např. tradiční čínské medicíny nebo výše zmiňované Ájurvédy[6].

Označení Ashwagandha pochází ze starověkého jazyka nazývaného Sanskrt. Slovo Ashwagandha lze rozdělit na dvě dílčí části: ashwa – označení pro slovo „kůň“ a gandha – znamenající „vůně, aroma“. Tento název odkazuje na typickou vůni kořene rostliny [1], [5].

4.2.1 Stavba rostliny

Vitánie snodárná je stálezelený keř, 0,5 až 2 metry vysoký, s hvězdovitými chlupy na větvičkách, jež jim dodávají našedlou barvu. Vejčité listy, na lícní straně hustě šedě plstnaté, na straně rubové jsou zbarveny do šedo-zelena, mají velikost okolo 3-10 cm na délku a 1,5-7 cm na šířku [11]. Báze listů je klínovitá, vrcholky jsou špičaté nebo tupé. Mladší listy bývají plstnatější než starší, které jsou později lysé až téměř lysé [12].

Květy jsou uspořádány do krátkých vijanů, které se nacházejí na koncích větviček či při úžlabí listů. Květy Vitánie snodárné tvoří žlutozelené koruny zvonkovitého tvaru, které jsou ochlupené na vnější straně. Koruna nasedá na kalich o délce 4-5 mm, je rovněž ochlupený šedými hvězdovitými chlupy a má úzce trojúhelníkové cípy. V každém květu se nachází 5 tyčinek.

Plody rostliny jsou oranžové bobule. Nacházejí se v kalichu, který je zvětšen na 1-3 cm a jsou v něm zcela skryté [11]. Květy i plody disponují řadou látek podílejících se na antimikrobní obraně rostliny [13].

Obrázek 2: Zralé (vlevo) a nezralé (vpravo) plody Vitánie Snodárné [8], [14]

Kořeny dosahují délky okolo 15-25 cm, postupně se větví a zužují, bývají popisovány jako masité a statné. Mají žlutohnědé zabarvení, hořkou chuť a koňské aroma, díky kterému rostlina dostala označení Ashwagadha [13].

Obrázek 3: Kořeny Vitánie snodárné [15]

4.2.2 Výskyt a pěstování

Druh je běžně k nalezení v subtropických oblastech Indie, Afriky, Asie, Austrálie a některých částech Evropy [13]. Takto široké rozpětí výskytu však není původní, rostlina pochází z Indie [16].

Ashwagandha je pěstována na suchých písčitohlinitých půdách a farmakologická aktivita kořenů zpracovávaných na práškovou formu je ovlivněna jejich kvalitou. Při pěstování jsou používána organická hnojiva, která zlepšují vlastnosti půdy jako dostupnost vyživujících látek pro rostliny a tím zvyšují výnos vypěstovaných žádaných rostlinných částí a vyšší obsah požadovaných látek. Nicméně při pěstování rostlin dále zpracovávaných jako doplňky stravy nejsou vždy postupy správné kultivace dodržovány, což vede k nižší kvalitě a účinnosti přípravků vyrobené z takovýchto rostlin [17]. Čerstvé kořeny se sklízí během ledna až března a následně jsou sušeny v zákrytu bez přímého slunečního záření pro vyšší výnos aktivních látek [18]. Produkce sekundárních metabolitů Vitánie snodárné je také značně závislá na fyziologickém stádiu keře. Tradičně je rostlina sklízena v jejím dospělém stádiu, tedy v době, kdy je masa kořenu největší. Co se týče podmínek, rostlinu mohou ohrozit nižší teploty, které zapříčiní pokles biologicky aktivních látek [19]. Ideálními teplotami pro pěstování jsou rozmezí mezi 20-38 °C [7]. Textura kořene závislá na obsahu škrobu a vlákniny je zásadní pro cenu vypěstovaných kořenů. Kořeny s křehkou strukturou obsahují vyšší podíl škrobu, a naopak menší podíl vlákniny. Takovéto kořeny jsou na trhu dražší, jelikož jsou snáze zpracovatelné na jemný prášek charakteristický pro přípravky dostupné na globálním trhu [20].

4.2.3 Využití a účinky na organismus

Použití Ashwagandhy se jeví jako značně široké, co se lidského zdraví týče. Potenciálem a benefity této rostliny se v posledním desetiletí zajímá čím dál více jedinců, hlavně z důvodů týkajících se jejího využití v oblastech zvládání stresu, zlepšení či udržování kognitivních funkcí, zvýšení fyzického výkonu nebo například úpravy spánkového režimu. Mimo tyto oblasti se dále rostlina dle studií projevuje jako účinný neuroprotektivní, antioxidační, imunomodulativní, antibakteriální, antivirový a protirakovinný subjekt. Svůj potenciál má také u léčby diabetu a přikládají se jí i kardioprotektivní vlastnosti. Potenciál rostliny je tedy značně velký, je třeba brát v úvahu, že je více než nutné tyto vlastnosti dále zkoumat a více porozumět mechanismům, na kterých fungují. Některé z účinků jsou připisovány jednotlivým withanolidům, avšak u mnohých vlivů na lidský organismus dosud nebyly nalezeny látky, které by je přímo způsobovaly. Otázkou je také efektivita zapojení Ashwaganhdy a látek v ní obsažené do terapie, ať už jako účinné látky či podpůrné léčby [21].

Níže jsou stručně popsány jednotlivé mechanismy účinku v nejvíce zmiňovaných oblastech působení. Podrobnější popis mechanismů je popsán u vybraných withanolidů v kapitole Withanolidy.

Anxiolytické účinky

Anxiolytické vlastnosti této rostliny jsou připisovány GABA-podobné aktivitě. Kyselina gama aminomáselná (GABA) je hlavní tlumivý neurotransmiter v mozku, jejíž funkcí je snížení aktivity neuronů. Nadměrná nervová aktivita vede k neklidu, nespavosti a úzkosti. Dále je v klinických studiích popisován efekt snížení hladiny hormonu kortizolu, který je asociovaný se stresem [5], [7].

Anxiolytické účinky byly prokázány také na krysách se spánkovou deprivací. Testované subjekty byly rozděleny do tří skupin: krysy bez přerušeného spánku, krysy se spánkovou deprivací a krysy se spánkovou deprivací, kterým byl podáván rostlinný extrakt. Mezi dvěma posledními skupinami byly signifikantní rozdíly. Krysy, kterým byl podán extrakt vykazovaly méně úzkostné chování, rozdíly byly také v hladinách zánětlivých markerů a pozorována byla i redukce stresem – vyvolané apoptózy [22].

Studie z roku 2019 prováděny na lidech s mírnou úrovní stresu a úzkosti s kontrolními skupinami užívajícími placebo ukazují signifikantní změny nálady k lepšímu, spolu s významným poklesem kortizolu v ranních hodinách. Dle Hamiltonovy škály úzkosti (Hamilton Anxiety Rating Scale – HAM-A) se míra úzkosti snížila u 41 % účastníků jímž byla podávána Ashwagandha oproti 24 % těch, kterým bylo podáváno placebo. Dále byly zaznamenány zlepšení při dotazování se na symptomy deprese, úzkosti a stresu. Tyto výsledky byly pozorovány na skupině 60 účastníků, kterým byla podávána dávka extraktu o hmotnosti 240 mg o standardizovaném obsahu withanolidů, který nebyl menší než 35 % [23].

Ovlivnění spánku

Absence kvalitního spánku má prokazatelné následky na psychické i fyzické zdraví. Nespočetněkrát byly dokázány spojitosti mezi nedostatkem spánku a chorobami jako například hypertenzí, metabolickým syndromem a onemocněním věnčitých tepen. Spolu s charakteristickými projevy spánkového deficitu, jakými je únava a stres dochází ke snížení celkové kvality života. S poruchami spánku se lze vypořádat farmakologicky či přístupy nefarmakologickými, mezi které lze zařadit spánkovou hygienu a různé relaxační techniky. Posuzování spánku bývá složité. Pro studie jsou upřednostňovány hodnocení za pomocí dotazníků a stupnic, do kterých účastníci vyplňují své subjektivní pocity. Objektivnější metodou je polysomnografické vyšetření, které je ale časově, kapacitně a finančně náročnější a může také narušovat běžnou spánkovou rutinu účastníka. Existují četné studie, jejichž výsledky ukazují na zlepšení kvality spánku při užívání Ashwagandhy. Studie z roku 2021 se zdravými jedinci a jedinci, kterým byla diagnostikována insomnie, ukázala významné pozitivní ovlivnění kvality spánku obou skupin po osmi týdnech užívání kapslí se 600 mg extraktu kořene Ashwagandhy oproti kontrolním skupinám užívajícím placebo [24].

Ovlivnění fyzické výkonosti

V tomto textu již byl zmíněn fakt, že Ashwagandha se považuje za „rasajánu“, což znamená „tonikum“, a to i v oblastech fyzické aktivity [7]. Byly publikovány různé studie zkoumající vliv rostliny na fyzickou výkonnost, za hlavní proměnné považují svalovou sílu, maximální množství kyslíku, které tělo dokáže použít během aktivity (VO_{2max}), svalovou únavu, a fyzickou regeneraci (tj. bolest, zánětlivé stavy a kvalitu spánku). Jsou také měřeny hematologické parametry, jakými jsou hematokrit, počet červených krvinek, množství hemoglobinu a další. Tyto studie naznačují přímé souvislosti mezi výše zmíněnými proměnnými a denní suplementací Ashwagandhou. Mechanismy účinku souvisejí s antioxidační aktivitou bioaktivních látek rostliny. Je známo, že pro procesy fyziologické adaptace na trénink je nutná přiměřená fyziologická hladina ROS, avšak jejich přebytek naopak na výkonnost působí negativně. Pokud jde o kardiorespirační a vytrvalostní výkon, bylo zjištěno, že suplementace Ashwagandhou přispívá ke zvýšení hematologických parametrů, což může vysvětlovat lepší výsledky při měření VO_{2max}, zlepšené regenerační procesy pak mohou souviset s lepší kvalitou spánku, která je popsána v odstavci výše [25].

Antidiabetický účinek

Mechanismy účinku Ashwaghandy na poli diabetu byly ověřovány na in vitro, in vivo a in silico studiích. Mezi mechanismy účinku patří inhibice enzymu dipeptidyl-peptidázy 4 vodným extraktem z Vitánie snodárné. V jiné studii se u pacientů, kterým se podával rostlinný extrakt, vyskytly nižší hladiny glukózy v krvi, srovnatelné s podáním hypoglykemického léku Daonil, avšak bez jeho nežádoucích účinků. Dále bylo zjištěno, že po podání vodného extraktu rostliny se efektivně snížila hladina insulinu, glykovaného hemoglobinu a krevního cukru [2]. Dalším účinným mechanismem je inhibice enzymů α-amylázy a α-glukosidázy, které štěpí oligosacharidy a disacharidy [26].

Neuroprotektivní efekt

Aswagandha se využívá v léčbě neurodegenerativních onemocnění mezi které se řadí Alzheimerova nemoc, Parkinsonova choroba a Huntingtonova nemoc. Tyto nemoci se vyznačují postupnou ztrátou neuronů, která vyústí ve změny chování a ztrátu kognitivních funkcí. Neuroprotektivní vlastnosti aswagandhy se připisují antioxidačním vlastnostem spolu se schopností inhibice peroxidace lipidů. Těmi vlastnostmi se vyznačují hlavně withanosidy [2]. Ashwagandha moduluje tvůrce oxidačního stresu v mozku, jako je superoxiddismutáza (SOD), kataláza (KAT) a neenzymatické antioxidanty, jako je glutathion (GSH). Kořeny a jejich extrakt indukují růst axonů a dendritů, což naznačuje jejich možný vliv na regeneraci neuronů [7].

Protirakovinný efekt

Nádorově transformované buňky ztrácí schopnost programované buněčné smrti či apoptózy, což ústí v nekontrolovatelný růst nádorové masy a šíření se do dalších orgánů přes krevní či lymfatické řečiště. Tyto stavy jsou charakterizovány zvýšenou hladinou antiapoptotických proteinů, a naopak sníženou hladinou proteinů navozujících apoptózu. Nádorové buňky mohou mít rovněž zvýšenou expresi telomerázy, čímž se vyhýbají buněčné smrti. Četné studie zejména na buněčných liniích naznačují potlačení nádorového bujení a pozastavení vývoje maligních buněk rakoviny plic, prsu, tlustého střeva, děložního čípku, prostaty a buněk centrálního nervového systému. Ukázalo se, že extrakty z listů jsou v oblasti protinádorové aktivity více efektivní než extrakty z jiných částí rostliny zejména v případech rakoviny tlustého střeva a prostaty. Mechanismem působení je zabránění genetické aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NF-κB) a zpomalení cyklooxigenázové aktivity, proliferace tumorových buněk a peroxidace lipidů. Dalším mechanismem účinku je modulace tumor supresorových genů, mezi něž se řadí nukleární transkripční faktor p53. Je to známý transkripční faktor bránící buňkám postupovat buněčným cyklem. Některá nádorová onemocnění se vyznačují právě poklesem nebo ztrátou funkce tohoto transkripčního faktoru [2].

Antioxidační účinky

Antioxidanty hrají důležitou roli v rámci obrany proti volným radikálům a ROS. Withanolidy přítomny v Ashwagandhě mají příznivě schopnost ovlivňovat aktivitu hlavních antioxidačních enzymů, které vychytávají volné radikály, řadí se mezi ně superoxid dismutáza (SOD), kataláza (KAT) a glutathion peroxidáza (GPX). Dalšími antioxidačními mechanismy jsou například snížení lipidové peroxidace a inhibice nežádoucí oxidační modifikace proteinů. Antioxidační vlastnosti účinných látek Ashwaghandy mohou z části vysvětlovat její antistresové účinky a efekt na lepší psychickou výkonnost [5].

Protizánětlivé účinky a imunomodulační účinky

Dle preklinických studií rostlina dokáže regulovat míru zánětu pomocí redukce mediátorů zánětu jako cytokinů, oxidu dusného a ROS a zároveň zvyšovat hladiny protizánětlivých cytokinů. Imuno-modulační vlastnosti byly prokázány ve studiích na myších,

kdy podání Ashwagandhy zapříčinilo celkový vzestup populace bílých krvinek s pozitivním účinkem také na titr cirkulujících protilátek. Další studie, tentokrát prováděna na lidech, zaznamenala zvýšení aktivity NK-buněk a cytokinů jedinců, kterým byl podáván rostlinný extrakt oproti kontrolní skupině, jíž bylo podáváno placebo [21].

Antimikrobní účinky

Extrakty z kořene Ashwagandhy vykazují antibakteriální vlastnosti, přesněji inhibují růst gram-negativních bakterií, mezi nimiž jsou například *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundi*, a *Klebsiella pneumoniae*. Mechanismus tohoto účinku pravděpodobně spočívá v imuno-modulaci, tedy zvýšení reaktivity imunitního systému a zvýšení cytotoxicity vůči mikrobům. Další zatím málo prozkoumanou teorií je narušení buněčné stěny bakterií. Zaznamenány byly také antifungální vlastnosti přesněji inhibice růstu kvasinek *Candida albicans*, avšak proti plísním druhu *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger* obsahované látky žádné inhibiční nebo fungicidní vlastnosti nevykazovaly [21].

4.2.4 Obsahové látky

Rostlina je bohatá na celou škálu biologicky aktivních látek. Mezi něž se řadí flavonoidy, glykosidy, saponiny, fenolické kyseliny, alkaloidy a withanolidy, které jsou na základě četných studií zodpovědné za většinu biologické aktivity, pro kterou je Ashwagandha používána a věnuje se jim následující kapitola [2], [26]. Do skupiny alkaloidů obsažených v této rostlině se řadí witanin, somniferin, somnin, tropin, somniferinin, cholin a anaferin. Mezi obsaženými flavonoidy jsou 3-O-rutinosid, kvercetin a 6,8-dihydroxycemferol [21].

4.2.5 Withanolidy

Withanolidy jsou definovány jako steroidní laktony s mnohočetnými kyslíkatými skupinami na dvaceti osmi uhlíkaté ergostanové kostře. Podle přítomnosti substituentů postranního řetězce na 17. uhlíku lze tuto množinu látek rozdělit na 2 skupiny: withanolidy typu A s δ-laktonovým kruhem, kde jsou oxidovány uhlíky 22 a 26, a withanolidy typu B s γ-laktonovým postranním kruhem, s oxidovanými uhlíky 23 a 26 [27]. Withanolidy nesou označení písmeny A-Y, dále do skupiny withanolidů patří withaferin, withanon, withadomnifernin A a withasomniferoly A-C [21].

Vitánie snodárná rovněž obsahuje glykosidy withanolidů, uváděny taky jako glykowithanolidy, nazývané withanosidy. Postranní řetězec, většinou se jedná o 6-O-β-D-glukopyranosyl-β-D-glukopyranosyl, je propojen s ergostanovou kostrou na jejím třetím uhlíku. Ve Vitánii snodárné zatím bylo identifikováno jedenáct withanosidů, byly označeny římskými čísly I-XI a vyznačují se neuroprotektivní a antistresovou aktivitou [28].

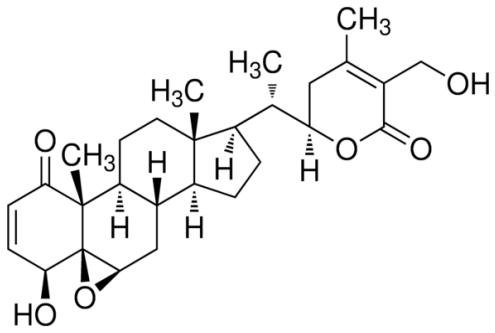
Jako zdroj těchto látek se z rostliny zpracovávají kořeny, které jsou, co se spektra a obsahu látek týče, nejbohatší částí rostliny [4]. V lidové medicíně se v recepturách využívají také extrakty z listů [29].

Komplexní struktura těchto látek je důvodem rozličných biologických účinků, které zajímají odborníky z oblasti chemie, medicíny a biologie od poloviny minulého století. V rostlinách z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) bychom našli více jak 600 různých typů withanolidů, přičemž ve Vitánii snodárné nalézáme přes 40 druhů těchto aktivních látek [1]. Výskyt withanolidů však není omezen pouze na rostliny z čeledi lilkovitých, určité studie poukazují i na fakt, že tyto látky byly izolovány z některých mořských organismů, přesněji měkkých korálů *Paraminabea acronocephala*, a z rostlin z čeledí takovité (*Taccaceae)*, bobovité (*Fabaceae*) a hluchavkovité (*Lamiaceae*) [30], [31].

Withanolidy jsou obecně považovány za bezpečné látky bez nežádoucích účinků, ačkoliv v posledních letech bylo zaznamenáno několik případů jaterní toxicity. Projevy většinou vymizely po vysazení doplňku stravy. Nahlášené případy byly klasifikovány jako jaterní toxicita způsobena bylinnými přípravky a doplňky stravy. U velkého množství případů jaterního poškození způsobeného právě doplňky stravy je velmi obtížné označit jedinou látku jakožto viníka těchto stavů, jelikož se jedná o nadužívání různých doplňků stravy a tím přijímání široké škály látek v nich obsažených. Nejsou však naprostou výjimkou i případy překračování doporučené denní dávky přípravků. Z experimentu na krysách bylo zjištěno, že hodnota dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (no observed adverse effect level – NOAEL), udávající nejvyšší koncentraci nebo množství látky, při kterém se u exponované populace neprojeví žádné zjistitelné nepříznivé účinky, byla 2000 mg sušeného extraktu Ashwaganhdy na kg na den. Tato hodnota převedena na člověka odpovídá asi 325 mg/kg/den. Studie z roku 2021 prokázala, že withanon, jeden z nejvíce zastoupených withanolidů v extraktech dostupných na trhu, vytváří stabilní adukty s nukleosidy deoxyguanosinem, deoxyadenosidem a deoxycytidinem. Dochází tak k formaci aduktů ve struktuře DNA a narušení její funkce. Dále bylo zjištěno, že adukty vytváří i s aminy, reakce u nich je vratná. Detoxikace v obou případech probíhá za pomoci GSH, avšak při vyčerpání jeho kapacity či jeho nižších hladinách může dojít k poškození DNA [32]. Studie akutní toxicity Vitánie snodárné z roku 2014 vyústila ve smrt myší po injekci extraktu a byla stanovena hodnota LD_{50} jako 1260 mg/kg váhy těla myši [18]. Aspekty bezpečnosti a toxicity extraktů z Aswagandhy a látek v ní obsažených jsou předmětem dalšího zkoumání [32].

Withaferin A

Withaferin A je vůbec první izolovaný withanolid. Jeho izolace z Vitánie snodárné poprvé proběhla v roce 1965 [33]. Izolace této sloučeniny s ohledem na její zajímavé biologické vlastnosti vedla k detailnějšímu zkoumání této rostliny a k izolaci dalších strukturně podobných sloučenin [30]. Jeho molekulová hmotnost je 470.6 g/mol. Sumární vzorec withaferinu A je $C_{28}H_{38}O_6$ [34]. Spolu s withanonem jsou v rostlině v největším zastoupení [26]. Jedná se o dvaceti osmi uhlíkatou sloučeninu s ergostanovou kostrou a δ – lakotonovým kruhem, skládajícím se z pěti atomů uhlíku a jednoho atomu kyslíku, řadí se tedy do skupiny withanolidů typu A. Sloučenina vykazuje značnou reaktivitu, disponuje místy pro vodíkové vazby, přesněji 2 místy pro donory a 6 místy pro její akceptory. Dále obsahuje tři místa v jeho struktuře, které jsou reaktivními místy pro neutrofilní molekuly, jsou jimi nenasycený kruh A, přesněji dvojná vazba mezi uhlíkem C2 a C3, dále epoxidová funkční skupina na uhlíku C5, který je součástí kruhu B a nenasycený laktonový kruh, také označován jako kruh E. Tato místa slouží například pro tvorbu kovalentní vazby mezi withaferinem A a thiolovými skupinami proteinů obsahující cystein [35], [36].



Obrázek 4: Chemická struktura withaferinu A

Withaferin A disponuje širokou škálou biologických účinků na organismus, studie uvádějí protizánětlivé účinky, pozitivní přínos při boji proti diabetu, imuno-modulační a také protinádorové účinky spojeny s aktivitou antiangiogenní.

Co se týká protirakovinné aktivity zmiňované sloučeniny, witaferin A úspěšně atakuje rozličné procesy spojené s buněčnou smrtí, proliferací a buněčným cyklem a napomáhá tak s potlačením nádorového bujení. Četné studie odhalují potlačení růstu tumorů při simulacích na rozličných nádorových buněčných kulturách, stejně tak poukazují na zvýšení efektivity léčby rakoviny chemoterapeutiky právě v kombinaci s touto sloučeninou. Molekulární mechanismy pochodů, kterými withaferin A proti nádorově zvrhlým buňkám působí není ještě zcela objasněn, avšak některé již byly popsány[31]. Mezi tyto procesy řadíme kupříkladu rozrušení komplexu heat shock proteinu 90 (Hsp90) a co-chaperonu Cdc37. Hsp90 je spolu s co-chaperonem Cdc37 zodpovědný za stabilizaci onkogenů, vedoucí k přežívání nádorových buněk. Withaferin A poruší stabilitu tohoto komplexu a tato akce ústí v nižší přežívání buněk

novotvarů. Protirakovinné účinky také zahrnují jeho schopnost působit na nádorové buňky cytotoxicky produkcí reaktivních sloučenin kyslíku a vyvolávat v nich apoptzóu [31], [35].

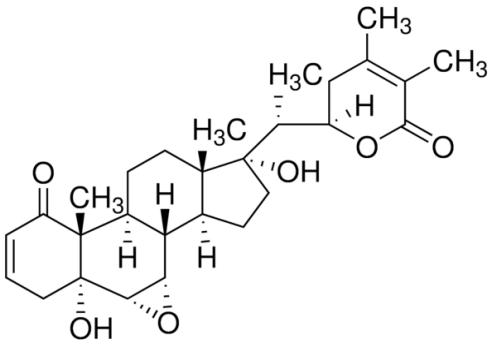
S nádorovými onemocněními úzce souvisí procesy spojené se zánětem. Withaferin A účinkuje také jako protizánětlivé činidlo, jež atakuje molekuly spojené se zánětlivými procesy a je schopen tímto potlačit iniciaci i progresi nádorového bujení. Nukleární faktor kappa B (NK – κB) je jeden z transkripčních faktorů hrajících významnou roli v procesech vedoucích k zánětu, angiogenezi, metastázování a proti apoptotickým mechanismům. Ztráta kontroly nad jeho regulací vede k prolongovanému zánětu a v nejhorších případech k nádorové transformaci.

Withaferin A dále disponuje imuno-modulačními vlastnostmi, tlumí proliferaci B a T-lymfocytů na periferii a zároveň je schopen aktivovat cytotoxické T-lymocyty (CD8+) pomocí útlumu produkce myeloidních supresorových buněk (myeloid derived suppressor cells – MDSC), což je heterogenní skupina buněk, která negativně ovlivňuje imunitní reakci těla během zánětu, infekcích, rakovině či autoimunitních onemocněních. Při nádorovém bujení MDCS zapříčiňuje snížení aktivace a infiltrace cytotoxických T-lymfocytů do nádoru a tím znemožní tuto cestu buněčné odpovědi. Withaferin A je schopen této blokaci zamezit.

Mezi další schopnosti withaferinu A jsou antiagregační, antikoagulační a profybrinolytická aktivita [35]. Za zmínku také stojí aktivita proti patogenu *Leishmania donovani*. Withaferin A, co by inhibitor protein kinázy C dokáže depolarizovat membránový potenciál a tím zapříčinit produkci ROS v buňkách patogenu [21], [35].

Withanon

Withanon se řadí mezi withanolidy typ A, s δ-laktonovým kruhem, kde jsou oxidovány uhlíky 22 a 26 [37]. Jeho sumární vzorec je $C_{28}H_{38}O_6$. Molekulová hmotnost withanonu činí 470.6 g/mol [38].



Obrázek 5: Chemická struktura withanonu

Co se týče neuroprotektivní aktivity withanonu, jsou známy účinky proti exciotoxicitě, stavu, kdy nadbytek gluthaminu přítomného v mezibuněčném prostoru aktivuje inotropní, kainátové a s G-proteinem spřažené receptory na postsynaptické membráně, což vyústí

v buněčnou smrt neuronu. Exotoxicita je jedním z hlavních mechanismů neurodegenerativních onemocnění. Withanon zlepšil životaschopnost buněk snížením exotoxicity indukované přes výše zmíněné receptory [37].

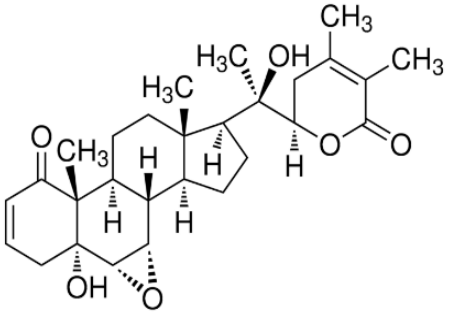
Za zmínění stojí antivirotické účinky withanonu proti viru SARS-CoV-2, redukuje glykosylaci spike proteinů na jeho vnější struktuře. Je známo, že větší míra glykosilace povrchových spike proteinů usnadní viru invazi do buněk a ovlivní imunitní odpověď hostitele. Podle studie z roku 2021 se withanon dokáže navázat na spike protein viru SARS-CoV-2 a může snižovat úroveň glykosylace na místě navázání. Withanon také inhibuje jednu z hlavních proteáz tohoto viru a tím potlačuje jeho další replikaci a transkripci [39].

Tak jako i další withanolidy, i withanon disponuje protinádorovou aktivitou, jako příklad můžeme uvést jeho působení s proteinem survivinem. Tento malý protein se v těle uplatňuje jako inhibitor apoptózy a jeho hodnoty jsou zvýšeny u velkého spektra nádorových onemocnění, ve zdravé tkáni je sotva detekovatelný. Kromě potlačování buněčné smrti zaujímá také roli v umocnění buněčné proliferace a angiogeneze v tumoru. Survivin spolu s dalšími proteiny inhibujícími apoptózu se váží na kaspázy a znemožňují jejich přirozené fungování. Withanon je schopen se navázat na jednu z domén survivinu, znemožnit jeho aktivitu vůči kaspázám a tím vyvolat apoptózu selektivně v nádorové buňce [40]. Dále dokáže selektivně zabíjet rakovinné buňky aktivací tumor-supresorového proteinu p53 [41].

Simulační studie ukazují na potenciální užití v terapii proti *Mycobacterium tuberculosis*, kde se withanon při simulacích úspěšně navázal na enzym této mykobakterie, L-asparaginázu, a dokázal jej tak inhibovat. Tato hydroláza katalyzuje štěpení L-asparaginu a tím generuje dusík spolu s amoniakem, který pomáhá vyrovnat se mykobakterii s působením kyselých látek v prostředí fagosomu. L-asparagináza by se mohla stát jedním z nových cílů pro léčiva proti tuberkulóze [42].

Withanolid A

Molekulová hmotnost withanolidu A je 470.6 g/mol a jeho sumární vzorec je $C_{28}H_{38}O_6$ [43].



Obrázek 6: Chemická struktura withanolidu A

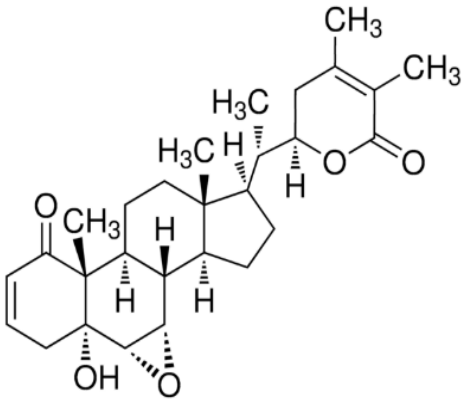
Mezi účinky withanolidu A můžeme zmínit inhibici enzymů α-amylázy a α-glukosidázy, enzymů, které katalyzují hydrolýzu sacharidů. Oba enzymy štěpí oligosacharidy a disacharidy za vzniku monosacharidů, čímž zvyšují hodnoty glukózy v krvi. Inhibicí α-amylázy a α-glukosidázy se snižuje vstřebávání glukózy, což je jeden z obecně přijímaných postupů pro regulaci postprandiální hyperglykémie u pacientů s diabetem. Withanolid A byl porovnáván ve studii s léky s obsahem akarbózy, látky běžně využívané v léčbě DM 2. typu, která také vykazuje inhibiční účinky vůči zmiňovaným enzymům. In-silico simulace odhalily inhibiční aktivitu withanolidu A, která v porovnání se zmiňovaným léčivem byla lepší, stejně tak jako biologická dostupnost, čímž se potvrdil terapeutický potenciál tohoto withanolidu v oblasti DM 2. typu. Zde je třeba brát na vědomí, že efektivita in vitro se může lišit a je třeba dalších studií objasňujících chování této sloučeniny v těle pacientů [26].

Withanolid A indukuje růst neuritů v případech neurodegenerativních onemocnění. Předpokládalo se, že jeho neuroprotektivní účinky jsou způsobeny vazbou na glukokortikoidní receptor, avšak simulační experimenty prokázaly pouze slabou vazbu mezi dvěma subjekty. Withanolid A postrádal klíčové stabilizační interakce s tímto receptorem. Stimulace růstu neuritů je tedy pravděpodobně zapříčiněná příbuznou cestou, například modulací tohoto receptoru či regulací signalizačních drah s ním blízce spojených [44]. Studie v oblasti Alzheimerovy nemoci (AN) dokázaly, že withanolid A je inhibitorem acetylcholinesterázy (ACHE). Withanolid A vykazoval silnou nekovalentní vazbu s enzymem vyúsťující v jeho inhibici. ACHE je enzym lokalizovaný ve svalech a mozkové tkáni, jeho úkolem je hydrolýza neurotransmiteru acetylcholinu, který hraje důležitou roli v poznávání a vytváření paměti. Různé studie ukazují na silnou souvislost mezi nedostatkem acetylcholinu v mozku a zhoršenými kognitivními funkcemi. Právě inhibice enzymu je jedním z mechanismů terapie pacientů s AN [45].

Withanolid A dále vykazuje vasoprotektivní účinky mechanismem zvýšení fosforylace endoteliální syntázy oxidu dusného (eNOS) a tím zvýšení koncentrace oxidu dusného (NO) v tkáni, který má vazorelaxační účinky, jež jsou přínosné u kardiovaskulárních onemocnění, u kterých je dysfunkce endotelu spojená s nižší produkcí NO [46].

Withanolid B

Strukturním vzorcem $C_{28}H_{38}O_5$ je withanolid B látka, která má ve své čisté formě strukturu jemných jehlicovitých krystalů[47], [48]. Molekulová hmotnost withanolidu B je 454.6 g/mol [48]. Od dříve zmíněného withanolidu A se liší absencí hydroxylové skupiny na atomu uhlíku na pozici 20 [49].

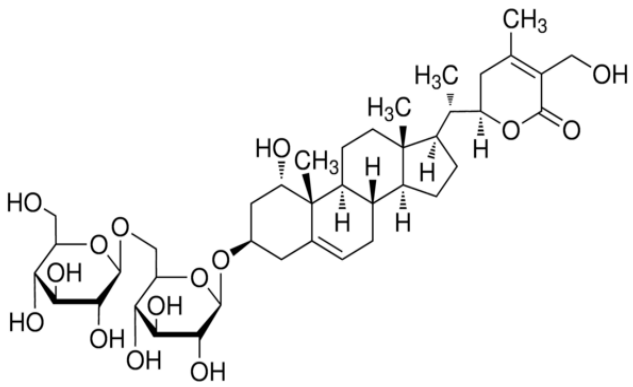


Obrázek 7: Chemická struktura withanolidu B

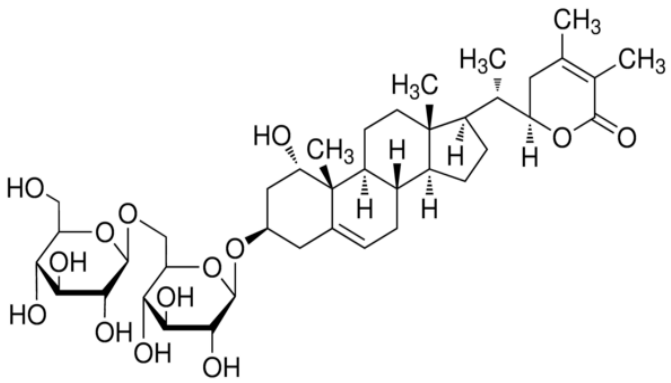
Byl popsán účinek withanolidu B na hojení kostní tkáně (studie prováděna na buněčné kultuře lidských mezenchymálních kmenových buňkách) skrze zvýšení exprese genů zprostředkovávajících osteogenezi a zvýšení koncentrace proteinů s ní souvisejících. Zároveň přisívá k formaci extracelulárního prostoru kostní matrix a zvyšuje aktivitu alkalické fosfatázy. Tyto poznatky dávají withanolidu B potenciál jakožto látce schopné řešit defekty kostí [50].

Withanosid IV a withanosid V

Glykosylované deriváty withanolidů, withanosid IV a withanosid V, obsahují O-glykosidickou vazbu na třetím uhlíku své ergostanové kostry, na kterou jsou navázány dvě molekuly glukopyranózy, přičemž jsou mezi sebou také propojeny O-glykosidickou vazbou. [28]. Molekulová hmotnost withanosidu IV činí 782.9 g/mol a sumární vzorec je $C_{40}H_{62}O_{15}$ [51]. Hlavním metabolitem po orálním požití je jeho aglykon sominon, který se po podání nacházel v plazmě. Spekuluje se, že tuto přeměnu realizují střevní bakterie enzymem β-glukosidáza. Hmotnostní analýza séra detekovala také druhý metabolit s molekulovou hmotností vyšší než sominonu, ten ale zatím nebyl identifikován [52]. Sumární vzorec withanosidu V je $C_{40}H_{62}O_{14}$ a jeho molekulová hmotnost činí 766.9 g/mol [53]. Na rozdíl od withanosidu IV v jeho struktuře chybí hydroxylová skupina na atomu uhlíku na pozici 27 [49].



Obrázek 8: Chemická struktura withanosidu IV



Obrázek 9: Chemická struktura withanosidu V

Withanosid IV vykazuje neuroprotektivní účinky a jeho potenciál jde směrem k léčbě neurodegenerativních onemocnění. Withanosid IV spolu se sominonem jsou schopni zabránit degradaci dendritů a axonů. Studie také naznačila větší posílení míry synapsí při podávání sominonu myším namísto stejných dávek withanosidu IV. Tato skutečnost může naznačovat, že deglykosylace vede k lepším výsledkům než pří podání samotného withanosidu IV [52].

4.2.5.1 Biosyntéza withanolidů

Biosyntéza withanolidů společně s její regulací představuje komplexní proces zahrnující několik kroků enzymatické přeměny a účasti transkripčních faktorů. Přestože withanolidy pocházejí z univerzálních prekurzorů tvořených fytosterolovou cestou, enzymy a geny jež se biosyntézy účastní nejsou ještě zcela objasněny [54]. Jejich biosyntézu lze rozdělit na tři fáze:

Tvorba triterpenové kostry

Kostrou withanolidů je triterpenoidová struktura, proto jejich biosyntéza začíná tvorbou isoprenoidů. Metabolická cesta začíná tvorbou izopentyl difosfátu (IPP) a dimetylallyl difosfátu (DMAPP), jež jsou základními stavebními bloky všech terpenoidů o délce pěti uhlíků. Pro vytvoření IPP disponuje rostlina dvěma metabolickými drahami s rozličnou lokalizací. Jedná se o mevalonátovou dráhu, která probíhá v cytosolu a jejím počátečním bodem je acetyl-CoA a ne-mevalonátovou dráhu, 2-C-metyl-D-erytritol-4-fosfátovou (MEP), která je lokalizována v plastidech s výchozími látkami pyruvátem a glyceraldehyd-3-fosfátem [55].

U dráhy mevalonátové je pomocí šesti enzymatických kroků molekula mevalonátu přeměněna na jednu molekulu IPP, ten je poté ireverzibilně přeměněn na DMAPP pomocí IPP izomerázy. Naproti tomu dráha ne-mevalonátová poskytuje z molekuly pyruvátu a glyceraldehyd-3-fosfátu jednu molekulu IPP a jednu molekulu DMAPP [54]. Při biosyntéze withanolidů se tyto dvě dráhy podílejí na produkci v poměru 3:1 [54], [55].

Biosyntéza fytosterolů

Kondenzací jedné molekuly DMAPP a dvou molekul IPP vzniká molekula farensyl difosfátu, první reakce tvorby fytosterolů je katalyzována enzymem farensyl pyrofosfát syntáza. Následuje tvorba skvalenu spojením dvou molekul farensyl difosfátu, jehož se účastní enzym skvalen syntháza (SQS). Skvalen se stává důležitým prekurzorem pro steroly a triterpeny. Dále probíhá série desaturací, hydroxylací, epoxidací, tvorby cyklických struktur a prodlužování řetězců za vzniku dvou důležitých meziproduktů: kampesterolu a 24-metyldesmosterolu. Z těchto dvou látek jsou následně modifikacemi tvořeny withanolidy [54], [55].

Biosyntéza withanolidů

Na konverzi sterolové kostry na withanolidy se podílí enzymy CYP450 jež jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu. Tato vysoce variabilní skupina enzymů je regulována transkripčními faktory a jednotlivé druhy enzymů jsou zodpovědné za vznik různých withanolidů v rostlině, například forma označovaná jako WsCYP71B35 je zodpovědná za enzymatickou formaci withaferinu A, withanolidu A, withanolidu B a withanosidu IV. Přený mechanismus konverze 24-metyldesmosterolu na withanolidy však zatím není zcela objasněn [54].

4.2.6 Kontraindikace

Ačkoliv valná většina studií uvádí Ashwaghandu jakožto netoxickou, není doporučováno užívání rostliny ani přípravků z ní vyrobených v období těhotenství a kojení. Důkazy, že je rostlina opravdu neškodná v těchto situacích stále chybí a jsou neúplné[18].

Užívání by se také měli vyhnou pacienti s hypertyreózou. Do této skupiny, které není užívání Ashwagandhy doporučováno, lze zařadit pacienty, kteří pociťují příznaky, jakými jsou podrážděnost, neklid, nervozita, úzkost, třes rukou, bušení srdce, psychomotorický neklid, svalová slabost a únava. Přestože přípravky obsahující kořen Ashwagandhy prokázaly zmírňující účinky výše uvedených příznaků, jejich užívání u osob s hypertyreózou je kontraindikováno, protože zhoršují projevy tohoto onemocnění [21].

4.2.7 Aplikační formy a dávkování

Nejčastější aplikační formou Ashwaghandy na českém trhu jsou kapsle plněné extraktem z jejího kořene. Mezi další aplikační formy se řadí tablety, práškové formy a sirupy [2]. V minulosti se tradičně zhotovovaly také vodné odvary či oleje připravované z kořenů a listů, zmiňovány jsou také odvary kořene do mléka [7], [18]. V České republice není prozatím stanovena referenční hodnota příjmu withanolidů.

4.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se řadí mezi separační techniky. Její princip spočívá v opakovaném dosažení rovnováhy mezi analyzovanými látkami a dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Látky se rozdělují mezi pohyblivou (mobilní) fázi, která je kapalná, a nepohyblivou (stacionární) fázi, která je tvořena buď pevným materiálem nebo kapalinou (ukotvenou na pevném nosiči) umístěným v chromatografické koloně [56], [57]. Kontakt analytu se stacionární fází je zajištěn prostřednictvím difuze. V rámci chromatografického procesu se rozlišují tři typy difuze: difuze podélná (pohyb částic analytu v mobilní fázi), vířivá (pohyb částic analytu směrem k povrchu částic stacionární fáze a zpět) a difuze uvnitř pórů částic v různých směrech (transport hmoty analytu do stacionární fáze a zpět). Součet jednotlivých příspěvků difuze je vyjádřen pomocí van Deemterovy rovnice. Van Deemterova rovnice vyjadřuje vztah mezi výškou teoretického patra H a lineární průtokovou rychlostí mobilní fáze. Oddělování analytů nastává v důsledku jejich různých interakcí s mobilní nebo stacionární fází [58]. V závislosti na principu separace analytů se chromatografie dělí na různé typy, jako jsou adsorpční chromatografie, rozdělovací chromatografie, afinitní, gelová, iontově-výměnná a další. Díky nesčetným modifikacím lze separovat široké spektrum látek, chromatografie je tedy univerzální fyzikálně-chemická analytická metoda využívaná v mnoha odvětvích. Chromatografií lze separovat jednotlivé složky směsi a následně určit jejich kvantitativní i kvalitativní parametry [57].

Přístrojové uspořádání

Hlavními komponenty chromatografického systému jsou vysokotlaká čerpadla se zásobníky mobilních fází, z nichž putují kapaliny přes filtry pro zachycení mechanických nečistot do směšovače, ve kterém probíhá mísení mobilních fází do požadované koncentrace. Lze využít izokratickou nebo gradientovou eluci, při které se složení mobilní fáze kontinuálně mění [59]. Mobilní fáze procházejí odplyňovačem (degasser), kde jsou zbaveny vzduchových bublin, které mohou narušovat plynulost průtoku mobilní fáze a zamezit tak šumu při detekci. Součástí přístroje je dále dávkovací zařízení (autosampler) s kazetami pro uložení vialek. Dávkované objemy jsou v řádech jednotek až desítek µl. Vzorek se automaticky dávkuje na kolonu pomocí dávkovací jehly. Následuje nástřik vzorku na kolonu, kterou protéká mobilní fáze. Separace látek probíhá na chromatografické koloně díky mobilní fázi, která eluuje analyty interagující s fází stacionární. V některých případech se pro ochranu kolony zapojuje předkolona, která je umístěna před chromatografickou kolonu. Kolona je umístěna v kolonovém termostatu, který zajišťuje stálou teplotu během separace. Po separaci látky odcházejí do detektoru, jehož signál je vyhodnocen vhodným softwarem [57].

Chromatografické kolony

Chromatografické kolony bývají většinou 50–250 mm dlouhé a jejich průměr se pohybuje okolo 2-4,6 mm. Velikost částic u náplňových kolon je v rozmezí 2-5 µm. Kolony jsou plněny rovnoměrně a částice by měly být co nejvíce homogenní [59]. Materiál pláště kolony bývá nejčastěji nerezová ocel [60].

V HPLC se používají různé typy stacionárních fází, které jsou důležité pro dosažení efektivní separace analytů. Jedním z nejběžnějších materiálů pro výrobu stacionárních fází je silikagel, který může být chemicky modifikován a jsou na něj vázány různé funkční skupiny. V konečném důsledku volba stacionární fáze závisí na povaze analytu, typu separace a požadavcích na selektivitu metody. Mezi používané typy stacionárních fází se řadí: stacionární fáze s chemicky vázanými alkylovými řetězci, stacionární fáze modifikované aromatickými funkčními skupinami, fluorované stacionární fáze a stacionární fáze na bázi oxidů kovů (oxid hlinitý a zirkoničitý). Velké oblibě se také těší systémy s reverzními fázemi, které jsou jedním z nejběžněji používaných typů chromatografických technik, zejména pro separace organických sloučenin. Princip retence v těchto systémech je založen na rozdílech v polaritě mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fáze v reverzní chromatografii je obvykle hydrofobní, což znamená, že obsahuje alkylové řetězce, které interagují s analyty na základě jejich hydrofobních vlastností. Tento systém je citlivý na různé faktory, jako je složení mobilní fáze a pH, které mohou výrazně ovlivnit chování analytů. Chromatografie na reverzních fázích má široké využití v analytické chemii, zejména při analýze komplexních směsí, jako jsou farmaceutické přípravky, přírodní produkty, nebo biologické vzorky, díky své vysoké selektivitě a účinnosti separace [61].

V oblasti běžných HPLC separací se také vývoj sorbentů zaměřuje na povrchově porézní částice, které mají pevné jádro a na povrchu porézní vrstvu. Tento design umožňuje zlepšení účinnosti chromatografické separace ve srovnání s částicemi stejné velikosti, které jsou celkově porézní [57].

Detektory

Detektor v HPLC systému by měl splňovat následující požadavky: měl by být dostatečně citlivý, vykazovat dobrou reprodukovatelnost a linearitu, jeho odezva by neměla být závislá na složení mobilní fáze při použití gradientové eluce a také by měl disponovat velkou univerzálností [59]. Nejstarším z typů detektorů je refraktometrický detektor, který je sice univerzální, ale méně citlivý, také je třeba termostatu pro udržení konstantní teploty detekční cely, měření indexu lomu je totiž silně závislé na teplotě. Mezi velmi rozšířené detektory patří UV-VIS detekce založená na měření absorbance. Lze měřit pouze při jednotlivých vlnových délkách, nebo s využitím diodového pole – PDA detektoru. Jeho citlivost je vyšší než u refraktometrického detektoru a je také univerzální. Trochu méně všestranné se jeví detektory fluorimetrické, které detekují emisní záření analytu po jeho excitaci primárním zářením, fluorescenci. Tuto vlastnost vykazuje malé spektrum látek, často je potřeba derivatizace analytů s cílem vytvoření fluoreskujících látek. Mezi nejnovější typy detekce se řadí hmotnostní detektory. Principem detekce je ionizace látek a jejich následné rozdělení podle poměru hmotnosti a náboje, urychlení těchto iontů a detekcí. Hmotnostní detektory jsou nejcitlivější a nacházejí své uplatnění ve farmaceutické analýze, analýze biologického materiálu a toxikologii. Další detekční techniky zahrnují infračervenou spektroskopii a elektroanalytické metody mezi něž patří konduktometrie a amperometrie. Po postkolonové derivatizaci může být využita i

chemiluminiscence. Mezi moderní univerzální detektory patří také detektory založené na tvorbě aerosolu např. CAD a ELSD [57].

Vyhodnocení dat

Výstupem HPLC analýzy jsou jak kvalitativní, tak kvantitativní data. Výstupem analýzy je chromatogram, jehož osa x znázorňuje čas analýzy a osa y míru odezvy detektoru. Kvalitativním parametrem každého analytu je jeho retenční čas (t_r) a kvantitativním parametrem je plocha pod píkem. Ideální tvar píku je Gaussovský, jeho tvar/symetrii hodnotí faktor symetrie A_s. Pro kvantitativní hodnocení lze využít kalibrační závislosti nebo metody vnitřního standardu [57].

4.4 Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) je modifikací HPLC, která umožňuje zkrátit dobu analýzy a zvýšení separační účinnosti. Mezi výhody UHPLC se řadí snížení spotřeby rozpouštědel a tím snížení nákladů na analýzu, snížení meze detekce a zvýšení citlivosti. Doba analýzy je přímo úměrná délce a vnitřnímu průměru kolony a nepřímo úměrná průtoku mobilní fáze. Platí tedy, že čím kratší a užší je kolona a čím vyšší je objemový průtok, tím bude doba analýzy kratší [62]. Přístrojové uspořádání je stejné jako u HPLC systémů, vyžaduje však odolné šroubení a spojovací kapiláry, které jsou schopny odolat vysokým tlakům a teplotám (do 1500-2000 bar, 150 °C). Mezi materiály používané v UHPLC analýze patří ocel, pozlacená ocel, kombinace ocel-PEEK (polyetheretherketon), vysoce odolný PEEK [63].

Rozdíly nacházíme ve velikosti kolon a částic přítomných uvnitř. V UHPLC bývají kolony kratší, jejich rozměry jsou 5–10 cm a jejich vnitřní průměr se pohybuje okolo 2 mm. Velikost částic využívaných v UHPLC analýze je menší než 2 µm. Nejčastějším rozměrem částic je 1,7 µm, je to optimální velikost, menší částice vyvolávají větší zpětný tlak a rozdíl účinnosti je oproti velikosti 1,7 µm zanedbatelný. Menší částice také přispívají zvětšením plochy povrchu stacionární fáze a tím se zvyšuje plocha pro interakce mezi analyty a stacionární fází. Částice v těle kolony musí být co nejvíce homogenní a rovnoměrně uloženy, toho se dosahuje pomocí plnění za vysokého tlaku při výrobě kolony. Těmito změnami v rozměrech kolony a částic stacionární fáze dojde ke zvýšení citlivosti metody z důvodů nižšího rozmývání elučních zón [62].

Účinnost separace je u UHPLC systémů větší, příčinou jsou plošší průběhy van Deemterových křivek, jejichž minima odpovídají takovému průtokovému objemu, při kterém má určitá kolona nejvyšší účinnost, tj. rozšíření zóny analytu je minimální [60].

Charakteristickým parametrem při UHPLC analýze je vysoký zpětný tlak. Zpětný tlak generovaný UHPLC kolonou je přímo úměrný její délce a nepřímo úměrný velikosti částic sorbentu a vnitřnímu průměru kolony. Pokud dojde ke zmenšení velikosti částic sorbentu na

třetinu, zpětný tlak na koloně se zvýší devítinásobně. Jedná se o nežádoucí jev, který je v systému řešen odolnými spoji [63].

Běžnými detektory využívanými v UHPLC analýze jsou UV-VIS detektory, PDA detektory, odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD) a MS detekce. Jsou kladeny vyšší nároky na software a frekvenci snímání dat z detektorů z důvodů užších šířek píků [63].

Přístroje UHPLC vyžadují rozpouštědla a chemikálie s vyšší čistotou než HPLC systémy. Rozpouštědla, pufry a modifikátory musí splňovat požadavky této instrumentace na maximální čistotu, a to zejména oblastech: velmi nízký posun UV signálu při gradientní eluční analýze, minimální obsah nečistot, nejnižší pozadí (obsah iontů) při spojení s MS detekcí a méně než 100 ppb alkalických kovů. Rozpouštědla určená pro UHPLC jsou filtrována přes mikrofiltr s póry o velikosti 0,1 µm, mají maximální odparek 1 ppm a jsou balena v inertní atmosféře, což zajišťuje jejich dlouhodobou stabilitu při skladování [64].

4.5 Rešerše stanovení analytů v doplňcích stravy na bázi Ashwagandhy

Pro stanovení obsahu withanolidů v extraktech Ashwagandhy jsou běžně používány chromatografické metody (HPLC i UHPLC) s kolonami plněnými sorbenty na bázi C18. Používanými mobilními fázemi jsou methanol a acetonitril pro organickou složku a voda či 0,1 % kyselina octová či mravenčí. Mezi užívané detektory se řadí UV detektory a PDA detektory ve vlnových délkách v rozsahu 225 až 230 nm. Výjimkou není také spojení HPLC či UHPLC s hmotnostní detekcí v režimech MS a MS/MS. Minoritní zastoupení mají techniky plynové chromatografie (GC), tenkovrstvé chromatografie (TLC), vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie (HPTLC). Analyzovanými materiály pro stanovení nejčastěji bývají extrakty nebo čerstvé kořeny či listy rostliny [16]. Níže je znázorněna tabulka s popisem vybraných metod stanovení.

Tabulka 1: Přehled možností stanovení withanolidů

Analyzovaný materiál	Stanovované látky	Druh kolony / stacionární fáze	Složení mobilní fáze	Doba analýzy	Separace	Detekce	Zdroj
Sušené kořeny	Withaferin A, withanolid A, withanolid B, withanon	RP-18 Merck, 250 x 4.6 mm, 5 µm částice	Metanol/H_2O	38 minut	HPLC	UV-PDA-MS	[65]
Kořeny	Withanosid IV, withanosid V, withanosid VII, withaferin A, withanolid A, withanolid B, 12- deoxywithastramonolid, withanon, viscosalakton B, 27-hydroxywithanon, dihydrowithaferin A	Phenomenex Luna 5 µm C8 100 Å, 250 × 4.6 mm, 5 µm částice	Acetonitril/ H_2O	40 minut	UHPLC	UV-DAD a MS/MS	[28]
Extrakt z kořenů	Withanosid IV, withanosid V, withaferin A, withanolid A, withanolid B, withanon, 27-hydroxywithanon, Physagulin D, Withastramonolide	Phenomenex Luna-C8, 250 × 4,6 mm, 5 µm částice	Acetonitril/0,5 % H_3PO_4 + KH_2PO_4	40 minut	HPLC	PDA	[66]
Listy a kořeny	27-hydroxywithanon, 17-hydroxywithaferin A, 17-hydroxy-27-deoxywithaferin A, withaferin A, withanolid D, 27-hydroxywithanolid B, withanolid A, withanon, 27-deoxywithaferin A	Waters RP 150 × 3.9 mm, 4 µm částice	MeOH+ 0, 1 % CH_3COOH /H_20 + 0,1 % CH_3COOH	60 minut	HPLC	PDA a ELSD	[67]

Potravní doplňky, kořeny	Withaferin A, 12-deoxywithastromonolid, withanolid A	Neuvedena	Acetonitril/H_2O+ 0,1 % CH_3COOH	30 minut	HPLC	PDA	[68], [69]
Potravní doplňky	Withaferin A, withanolid A, withanolid B, withanosid IV, withanosid VII, withanosid V, 27-hydroxywithanon, 12-deoxywithastramonolid, withanon, viscosalakton B, dihydrowithaferin A	YMC Triart C18, 100 × 3 mm, 3 µm částice	Acetonitril/0,1 % HCOOH/H_2O + 10mM NH_4COOH	20 minut	HPLC	MS	[70]
Kořeny, stonky, listy	Withaferin A, withanon, withanolid A, kyselina kávová, kyselina ferulová, kyselina benzoová	Hliníková deska, silikagel 60 F_{254}	Toluen, ethylacetát, CH_3COOH	20 minut	HPTLC	UV	[71]
Kořeny, stonky, listy	Withanolid A, withanolid B, withaferin A, withanon, withanosid IV, withanosid V	Waters ACQUITY BEH C18, 50 × 2,1 mm, 1.7 µm částice	Acetonitril/0,1 % HCOOH	2,5 minut	UHPLC	PDA a MS	[72]

5 Experimentální část

5.1 Použité přístroje a pomůcky

5.1.1 Chromatografický systém

Chromatograf: Shimadzu Nexera LC-40

Pumpy: LC-40B X3 Degasser: DGU-405

Autosampler: SIL-40C X3

Kolonový termostat: CTO-40C

Detektor: PDA detektor SPD-M40

Vyhodnocení: software LC LabSolutions

5.1.2 Testované kolony

Tabulka 2: testované kolony

	Výrobce	Název kolony, charakteristika
1	YMC CO., LTD	YMC-Triart C-18 100 x 4,6 mm; 5 µm částice
2	YMC CO., LTD	YMC-Triart C-18 ExRS 150 x 4,6 mm; 3 µm částice
3	Supelco Analytical	Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm částice
4	Supelco Analytical	Ascentis Express 90 Å RP-Amide 150 x 4,6 mm; 2,7 µm částice
5	Supelco Analytical	Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 3 mm; 2,0 µm částice
6	YMC CO., LTD	YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm; 3 µm částice
7	Phenomenex®	Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm; 2,6 µm částice
8	YMC CO., LTD	YMC-Triart PFP 150 x 3 mm; 1,9µm částice
9	Phenomenex®	Kinetex F5 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,7 µm částice
10	Phenomenex®	Kinetex Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 2,6 µm částice
11	Phenomenex®	Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,6 µm částice
12	Phenomenex®	Luna Omega PS C18 150 x 2,1 mm; 1,6 µm částice
13	Supelco Analytical	Ascentis Express 90 Å PAH 150 x 3,0 mm; 2,7 µm částice
14	Phenomenex®	Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm; 5 µm částice
15	Avantor	Arion Polar C18 UHPLC 150 x 4,6 mm; 2,2 µm částice
16	Avantor	Arion Plus C18 HPLC 150 x 4,6 mm; 3,0 µm částice
17	Avantor	Arion Plus C18 UHPLC 150 x 2,1 mm; 1,7 µm částice

5.1.3 Pomůcky

Běžné laboratorní sklo

Automatické pipety (Brand)

Automatické váhy (Sartorius Secura 225D-1CEU)

Ultrazvuková lázeň (Bandelin Sonorex Digitec)

Plastové injekční stříkačky (Omnifix®)

PTFE filtry – velikost pórů 0,22 µm (Chromservis)

5.2 Použité chemikálie

5.2.1 Standardy

Withanolid A ≥ 98 % (PhytoLab, Německo)

Withanolid B ≥ 98 % (PhytoLab, Německo)

Withaferin A ≥ 97 % (PhytoLab, Německo)

Withanosid IV ≥ 95 % (PhytoLab, Německo)

Withanosid V ≥ 94 % (PhytoLab, Německo)

Withanon ≥ 94 % (PhytoLab, Německo)

5.2.2 Rozpouštědla

Methanol absolute HPLC gradient grade (Biosolve)

Acetonitrile LC-MS grade (Biosolve)

Kyselina mravenčí 98 % (Lachner)

Ultračistá voda (systém Milli-Q, Millipore)

5.2.3 Doplňky stravy

Tabulka 3: Analyzované doplňky stravy

Název Přípravku	Výrobce	Forma	Udávaný obsah withanolidů
Ashwagandha BIO Organic	Blendea	kapsle	25 mg
Ashwagandha	ActiveLab	kapsle	21 mg
Ashwagandha	Kräuterhaus Sanct Bernahrd	kapsle	15 mg
Ashwagandha Extract Organic BIO	Viridian	kapsle	15 mg
Ashwagandha – tobolky	Green Idea	kapsle	5 % (22,5 mg)
Ashwagandha	ADVANCE nutraceutics	kapsle	5 % (17,5 mg)
Ashwagandha	Gym Beam	kapsle	25 mg
Ashwagandha 3600 mg	Webber Naturals	kapsle	5 % (15 mg)
Ashwagandha	Vilgain	kapsle	25 mg
Ashwagandha	Jíme zdravě	kapsle	20 mg

5.3 Příprava roztoků

5.3.1 Příprava roztoků pro standardy a vzorky

Jako rozpouštědlo standardů byl použit čistý methanol. Pro extrakci reálných vzorků potravních doplňků byly při optimalizaci extrakční účinnosti použity roztoky 25 %, 50 % a 75 % a 100 % methanolu, dále také acetonitril a ultračistá voda. Roztoky methanolu pro extrakci byly připraveny smísením ultračisté vody s methanolem v poměrech dle následující tabulky.

Tabulka 4: Příprava roztoků methanolu pro extrakci potravních doplňků

Methanol (ml)	Ultračistá voda (ml)	Výsledná koncentrace
25	75	25 %
50	50	50 %
75	25	75 %

5.3.2 Příprava zásobních roztoků standardů pro optimalizaci metody

Zásobní roztoky standardů withanolidů byly připraveny dle tabulky uvedené níže. Při rozpouštění standardů byla použita ultrazvuková lázeň. Připravené roztoky standardů byly skladovány v lednici pro zamezení jejich degradace.

Tabulka 5: Zásobní roztoky standardů

Látka	Navážka (mg)	Methanol (µl)	Koncentrace (mg/l)
Withanolid A	1,00	1000	1000
Withanolid B	1,09	1000	1090
Withaferin A	1,06	1000	1060
Withanosid IV	1,00	1000	1000
Withanosid V	1,06	1000	1060
Withanone	1,05	1000	1050

5.3.3 Příprava pracovních roztoků standardů

Příprava pracovních roztoků standardů spočívala v ředění jednotlivých zásobních roztoků standardů methanolem. K 20 µl každého zásobního roztoku bylo pipetováno 980 µl methanolu, standardy tedy byly ředěny padesátkrát. Tento roztok byl využit k identifikaci píků na chromatogramu. Zároveň byl připraven i pracovní směsný roztok standardů smísením 20 µl withanolidu A, withanolidu B, withaferinu A, withanosidu IV, withanosidu V a withanonu a doplněním methanolem do 1000 µl, tedy pipetováním 880 µl methanolu.

5.3.4 Příprava roztoků pro kalibraci

Pro kalibraci bylo připraveno 10 směsných roztoků o koncentracích v rozmezí 0,25 až 50 mg/l. Od každého z šesti zásobních roztoků standardů byl do vialek pipetován daný objem a následně byl roztok ředěn methanolem do výsledného objemu 1000 µl. Objemy zásobních roztoků standardů a methanolu s výslednou koncentrací jsou vypsány v tabulce níže.

Tabulka 6: Příprava roztoků pro kalibraci

Objem každého standardu (µl)	Objem methanolu (µl)	Výsledná koncentrace (mg/l)
0,25*	-	0,25
0,5*	-	0,5
1*	-	1
2	988	2
5	970	5
10	940	10
20	880	20
30	820	30
40	760	40
50	700	50

*roztoky byly připraveny polovičním ředěním roztoku o koncentraci 2 mg/l z důvodů vyšší přesnosti pipetování.

5.3.5 Příprava vzorků pro opakovatelnost

Pro ověření opakovatelnosti byly použity roztoky, které byly připravené v rámci kalibrační řady, jednalo se o koncentrační hladiny 1, 5 a 20 mg/l.

5.3.6 Příprava vzorků pro přesnost a preciznost

a) Příprava směsného roztoku standardů

Do vialky bylo pipetováno 100 µl roztoku z každého ze šesti standardů. Následně byl objem doplněn do 1000 µl 50 % metanolem.

b) Příprava extraktů vzorku Vilgain Ashwagandha

Pro určení výtěžnosti bylo připraveno 9 navážek přípravku Vilgain Ashwagandha. Přibližná hmotnost navážek byla 5 mg. Navážky byly označeny čísly 1 až 9, k prvním sedmi navážkám bylo přidáno 100 µl směsného roztoku standardů pro výtěžnost a 1900 µl 50 % methanolu. Ke zbývajícím dvěma navážkám byl pipetován pouze 50 % metanol o objemu 2000 µl.

Následně se tyto vialky podrobily 15minutové extrakci na ultrazvukové lázni, poté se vzorky centrifugovaly 2 minuty při 8000 RPM. Roztoky byly přefiltrovány do nových vialek pomocí plastové stříkačky a PFTE filtru.

c) Příprava roztoků standardů

Pro výpočet a změření výtěžnosti byly připraveny také 3 roztoky směsi standardů. Tyto roztoky byly zhotoveny smísením 50 µl směsného roztoku standardů a 950 µl 50 % methanolu ve vialkách.

5.3.7 Příprava analyzovaných vzorků potravních doplňků

Vzorky kapslí od každého doplňku byly připraveny vysypáním 5 kapslí a následným promísením v kádince. Z hmotnosti těchto 5 kapslí byla vypočítána průměrná hmotnost jedné kapsle. Ze zhomogenizované směsi bylo naváženo 100 mg směsi do 15 ml centrifugační zkumavky. V plastové zkumavce se tato navážka rozpustila v 10 ml 50 % methanolu a následně se na 15 minut vložila do ultrazvukové lázně. Extrakt byl poté centrifugován 2 minuty při 8000 RPM. Následně se extrakty pomocí plastové injekční stříkačky a 0,2 µm PTFE filtru přefiltrovaly do vialek a poté byly analyzovány UHPLC. Přípravky s vyšším obsahem stanovovaných látek byly před analýzou x-krát ředěny, jmenovitě jde o přípravky Ashwagandha BIO Organic (Blendea) a Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd), které byly naředěny pětkrát a přípravek Ashwagandha – tobolky (Green Idea), který byl naředěn desetkrát. Od každého potravního doplňku byly vždy připraveny 2 vzorky.

5.3.8 Příprava mobilní fáze

Pro analýzu bylo využíváno gradientové eluce. Jako organická fáze byl používán čistý acetonitril, při optimalizaci by využitý i čistý methanol. Pro vodnou složku byla využita ultračistá voda, v průběhu optimalizace byla také testována i 0,1% kyselina mravenčí, která byla připravena smísením 999 ml ultračisté vody a 1 ml koncentrované kyseliny mravenčí.

5.4 Parametry měření

Analýza byla uskutečněna pomocí chromatografu Schimadzu Nexera LC-40 s vysokotlakým čerpadlem, odplyňovačem mobilních fází (degasser), dávkovačem vzorků (autosampler), chromatografickou kolonou v kolonovém termostatu a detektorem diodového pole.

Ovládání a kontrola přístroje probíhaly prostřednictvím programu LabSolutions, který zároveň sloužil ke sběru a následnému vyhodnocení získaných dat.

Separace probíhala při gradientové eluci, jejíž průběh popisuje tabulka níže Za optimální složení mobilní fáze byl zvolen acetonitril jako mobilní fáze A a ultračistá voda jako mobilní fáze B. Průtoková rychlost mobilní fáze činila 1 ml/min a dávkovaný objem vzorku činil 10 µl. Separace probíhala při teplotě 30 °C na koloně Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm s velikostí částic 2,6 µm. Jednotlivé separované látky byly měřeny při dvou vlnových délkách: 215 nm pro píky withanosidu IV a withaferinu A a 228 nm pro píky withanosidu V, withanolidu A, withanonu a withanolidu B.

Tabulka 7: Finální průběh gradientu pro separaci withanolidů

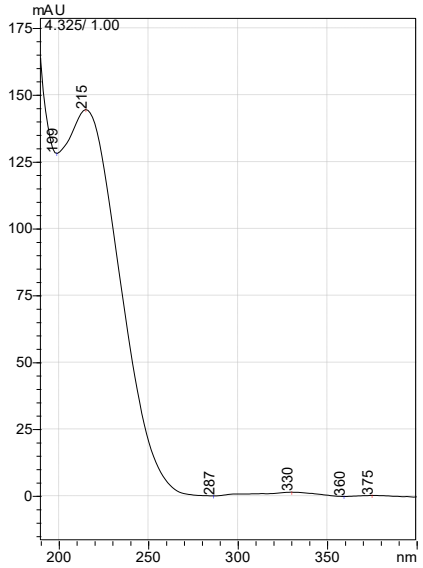
Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 7,00	70-28	1
7,00-7,20	28-0	
7,20-7,70	0-70	
7,70-10,00	70	
10,00	stop	

6 Výsledky a diskuse

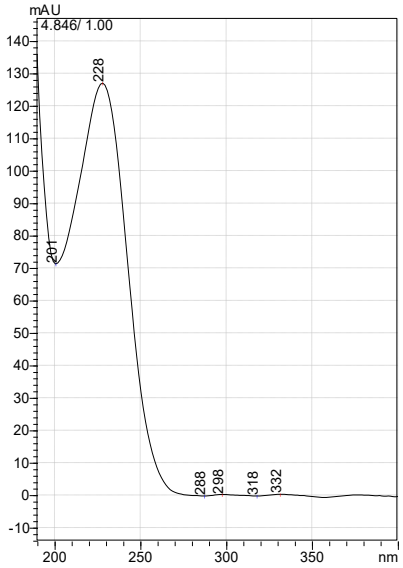
6.1 Vývoj analytické metody, optimalizované parametry

6.1.1 Volba vlnové délky

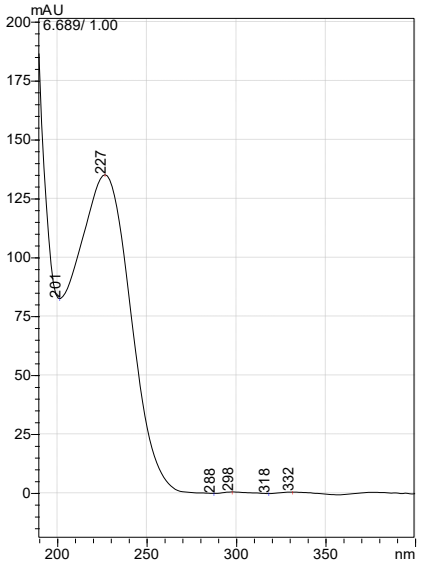
Za účelem detekce analyzovaných látek PDA detektorem byly zvoleny dvě vlnové délky odpovídající absorpčním maximům jednotlivých analytů. Byly zvoleny vlnové délky 215 nm a 228 nm, při níž byly viditelné všechny analyzované látky. Absorpční spektra jednotlivých látek v dané mobilní fázi jsou zobrazena na obrázcích níže. Tabulka 8 shrnuje vlnové délky, při kterých byly jednotlivé withanolidy detekovány.



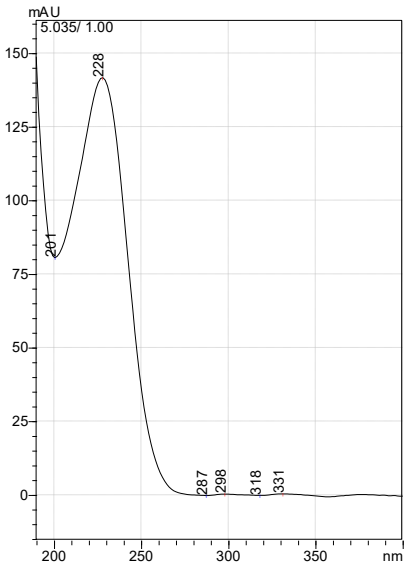
Obrázek 10: Absorpční spektrum withaferinu A



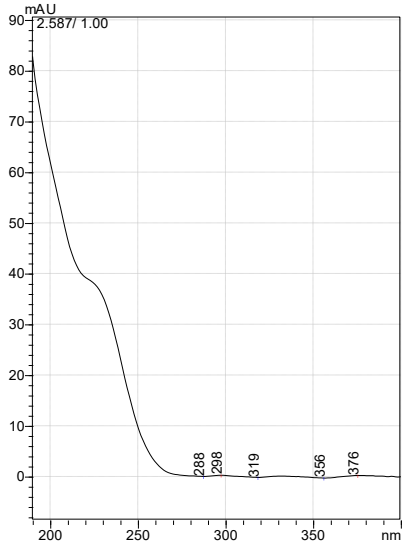
Obrázek 11: Absorpční spektrum withanolidu A



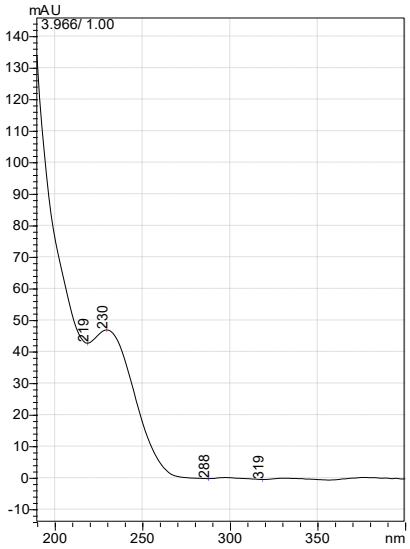
Obrázek 12: Absorpční spektrum withanolidu B



Obrázek 13: Absorpční spektrum withanonu



Obrázek 14: Absorpční spektrum withanosidu IV



Obrázek 15: Absorpční spektrum withanosidu V

Tabulka 8: Jednotlivé vlnové délky pro detekci stanovovaných analytů

Stanovovaná látka	Vlnová délka [nm]
Withaferin A	215
Withanolid A	228
Withanolid B	228
Withanon	228
Withanosid IV	215
Withanosid V	228

6.1.2 Volba gradientu a kolony

Při optimalizaci kolony bylo navrženo několik gradientů mobilní fáze. Separace probíhala při různých počátečních poměrech jednotlivých mobilních fází a s různou strmostí nástupu organické fáze. Také byla testována i isokratická eluce. Celkem bylo testováno 17 kolon, jejich seznam je uveden v tabulce č. 2 výše v textu. Při volbě vhodné chromatografické kolony bylo pohlíženo na několik parametrů: rozlišení píků analyzovaných látek, jejich symetrie a celkový čas separace. Na každé koloně byly testovány téměř všechny gradienty mobilní fáze. Dávkovaný objem na kolonu činil 2–10 µl, objem se určoval vzhledem průměru testované kolony. Průtoky mobilní fáze byly 1,0 ml/min, 0,75 ml/min a 0,4 ml/minutu, rovněž dle průměru jednotlivých kolon a velikosti jejich částic. Testování jednotlivých kolon probíhalo při konstantní teplotě 30 °C a doba separace činila 12 minut, ve finální verzi gradientu byla doba separace zkrácena na dobu 10 minut. Tabulky níže shrnují průběh jednotlivých gradientů.

Tabulka 9: Gradient A1

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 10,00	70–10	1,0
10,00-10,02	10-70	
10,02-12,00	70	
12,00	stop	

Tabulka 10: Gradient B1

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 10,00	80–10	1,0
10,00-10,02	10-80	
10,02-12,00	80	
12,00	stop	

Tabulka 11: Gradient C1

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 10,00	60–10	1,0
10,00-10,02	10-60	
10,02-12,00	70	
12,00	stop	

Tabulka 12: Gradient D – isokratická eluce

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 12,00	50	1,0

Tabulka 13: Gradient E

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 7,00	70-28	1,0
7,00-7,20	28-0	
7,20-7,70	0-70	
7,70-10,00	70	
10,00	stop	

Tabulka 14: Gradient A2

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 10,00	70–10	0,75
10,00-10,02	10-70	
10,02-12,00	70	
12,00	stop	

Tabulka 15: Gradient B2

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 10,00	80–10	0,75
10,00-10,02	10-80	
10,02-12,00	80	
12,00	stop	

Tabulka 16: Gradient C2

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 10,00	60–10	0,75
10,00-10,02	10-60	
10,02-12,00	70	
12,00	stop	

Tabulka 17: Gradient A3

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 10,00	70–10	0,4
10,00-10,02	10-70	
10,02-12,00	70	
12,00	stop	

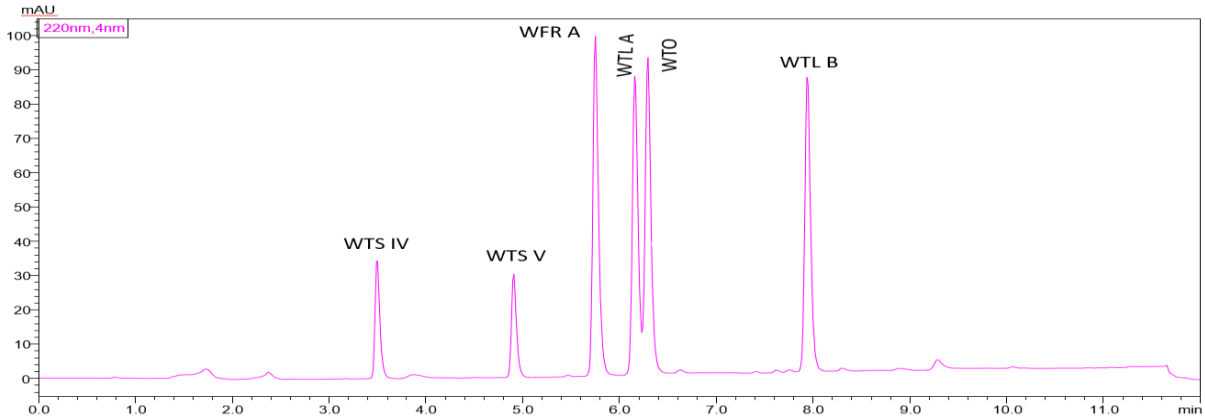
Tabulka 18: Gradient B3

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 10,00	80–10	0,4
10,00-10,02	10-80	
10,02-12,00	80	
12,00	stop	

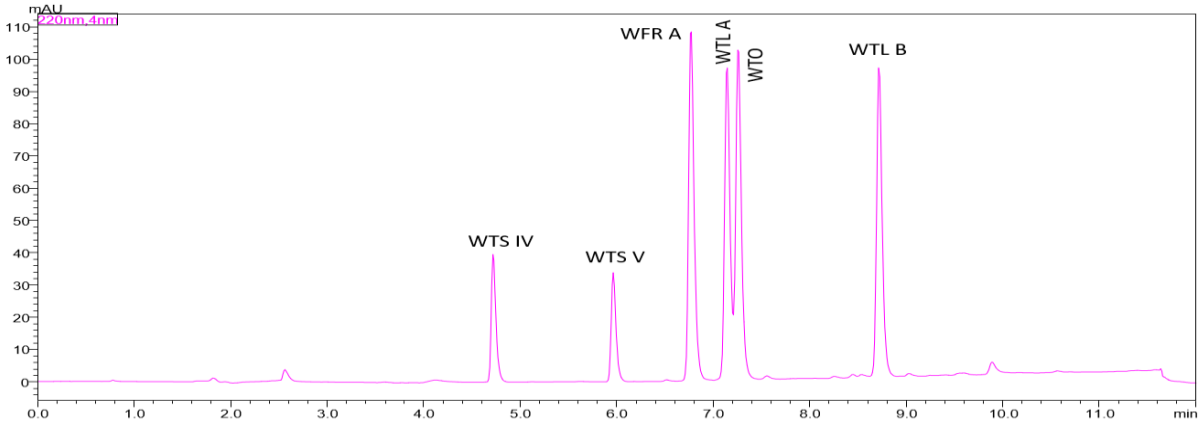
Tabulka 19: Gradient C3

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01 – 10,00	60–10	0,4
10,00-10,02	10-60	
10,02-12,00	70	
12,00	stop	

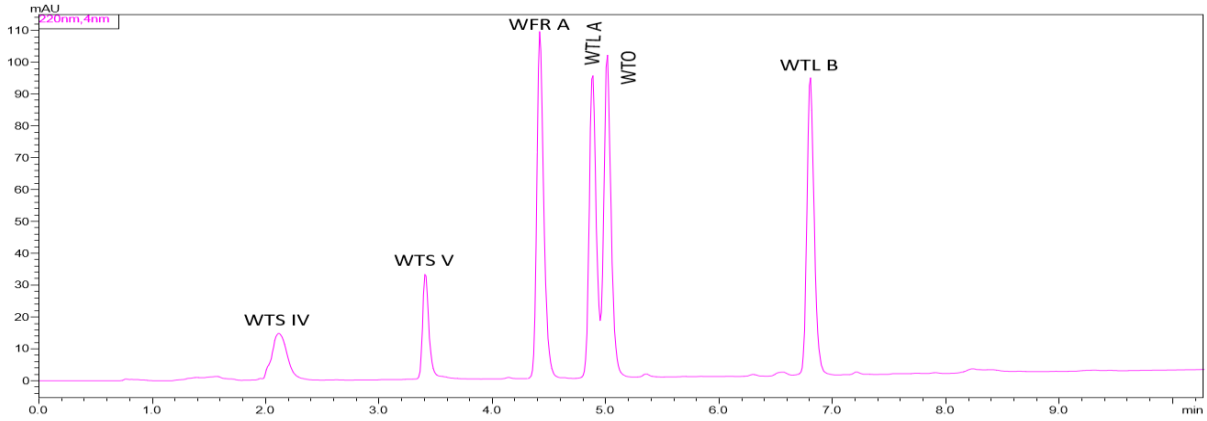
Níže jsou přiloženy chromatogramy zobrazující pouze vybrané kolony s kratšími časy separace a nejlepším rozlišením píků. Analyzované látky jsou označeny zkratkami: WTS IV (withanosid IV), WFR A (withaferin A), WTS V (withanosid V), WTL A (withanolid A), WTO (withanon) a WTL B (withanolid B). Na chromatografech lze vidět, že kritickým párem tvořícím ve většině případů dvojpík byl withanolid A a withanon. Otestováním všech sedmnácti kolon při daných gradientech byla jako optimální pro analýzu zvolena kolona Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm; 2,6 µm.



Obrázek 16: Chromatogram průběhu separace na koloně YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm; 3 µm, gradient A1

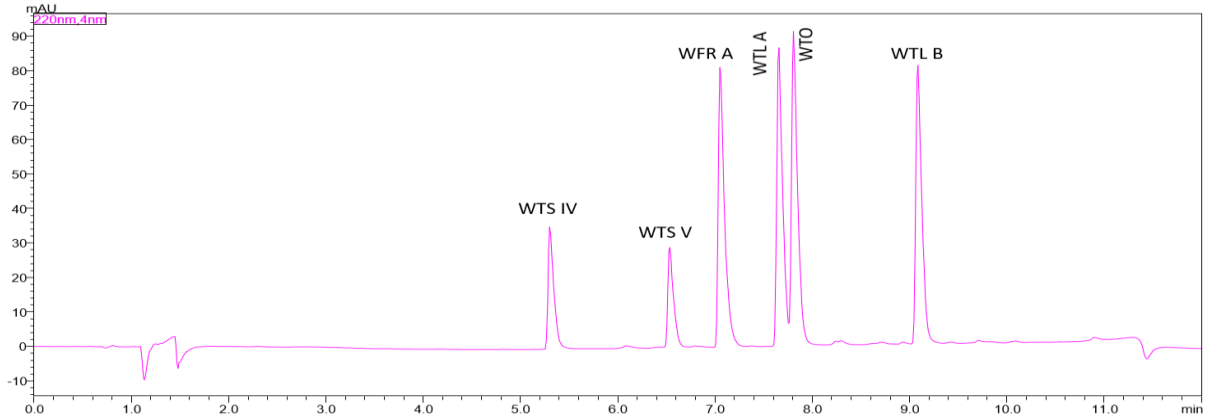


Obrázek 17: Chromatogram průběhu separace na koloně YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm; 3 µm, gradient B1

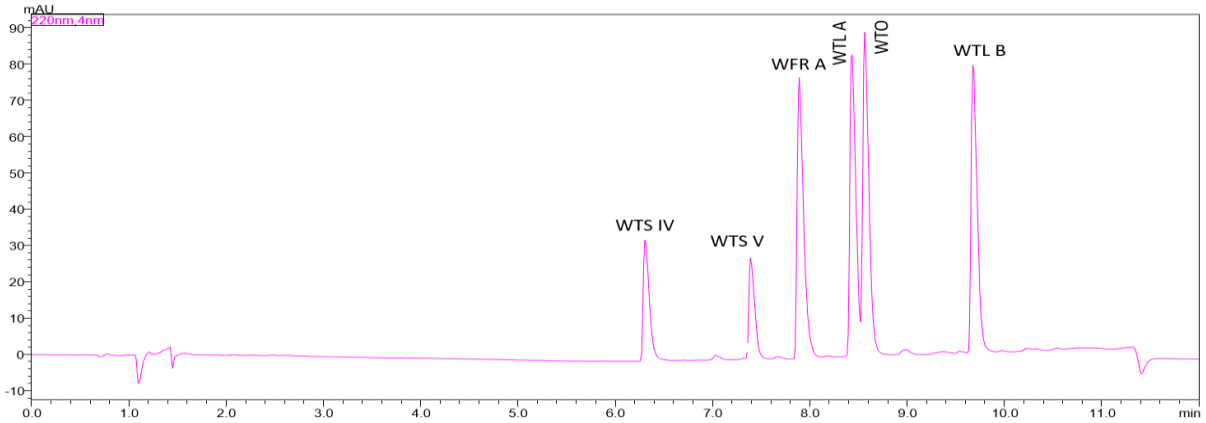


Obrázek 18: Chromatogram průběhu separace na koloně YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm; 3 µm, gradient C1

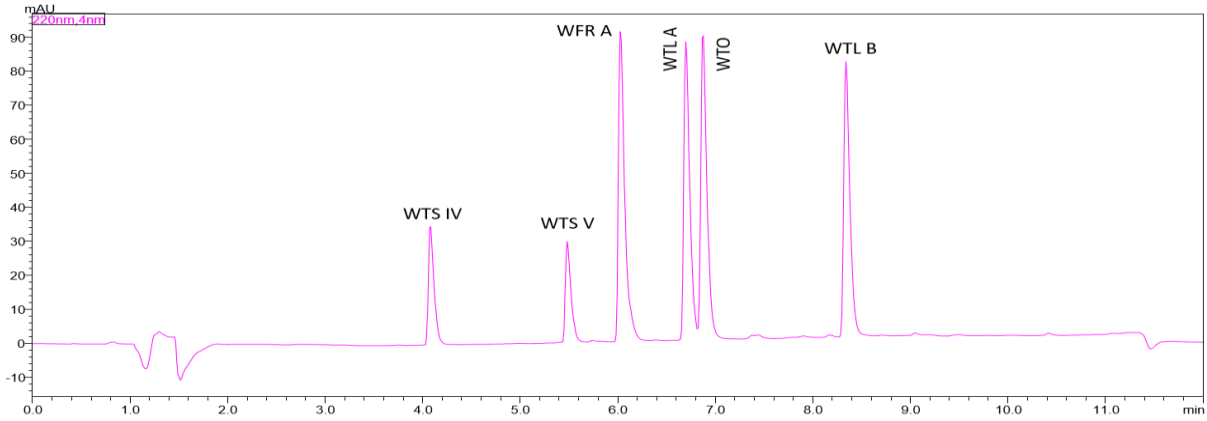
Analyty withanolid A a withanon se neseparovaly na koloně YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm; 3 µm dostatečně. Při použití gradientu C se sice čas analýzy zkrátil, ale objevilo se nežádoucí rozšíření píku withanosidu IV.



Obrázek 19: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,6 µm, gradient A3

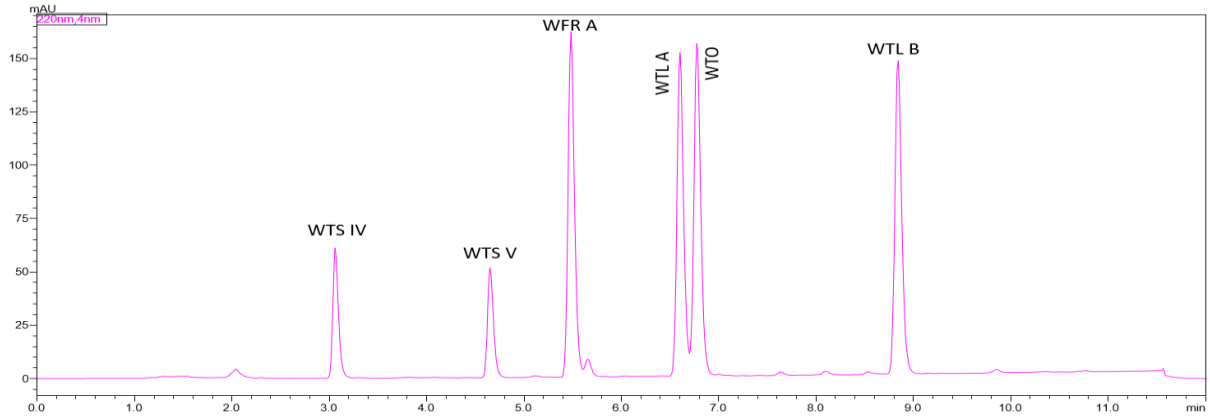


Obrázek 20: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,6 µm, gradient B3

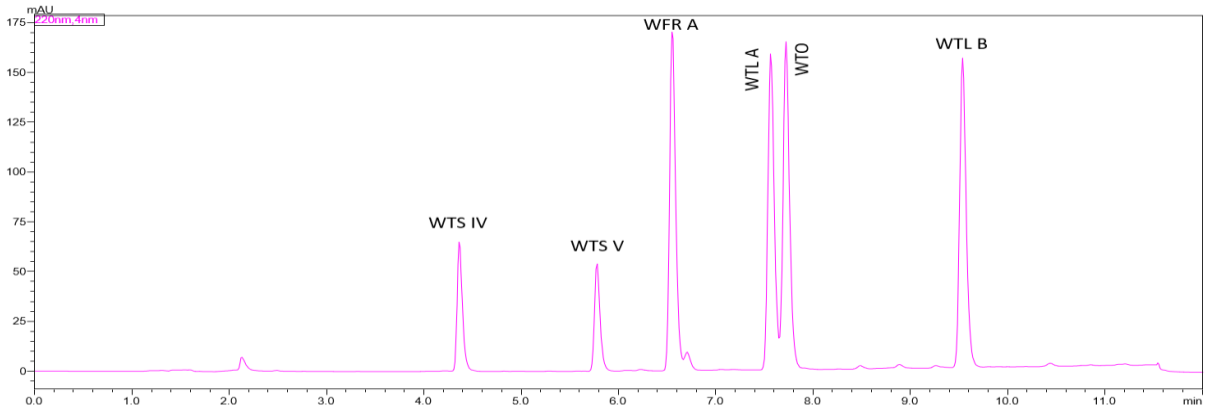


Obrázek 21: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,6 µm, gradient C3

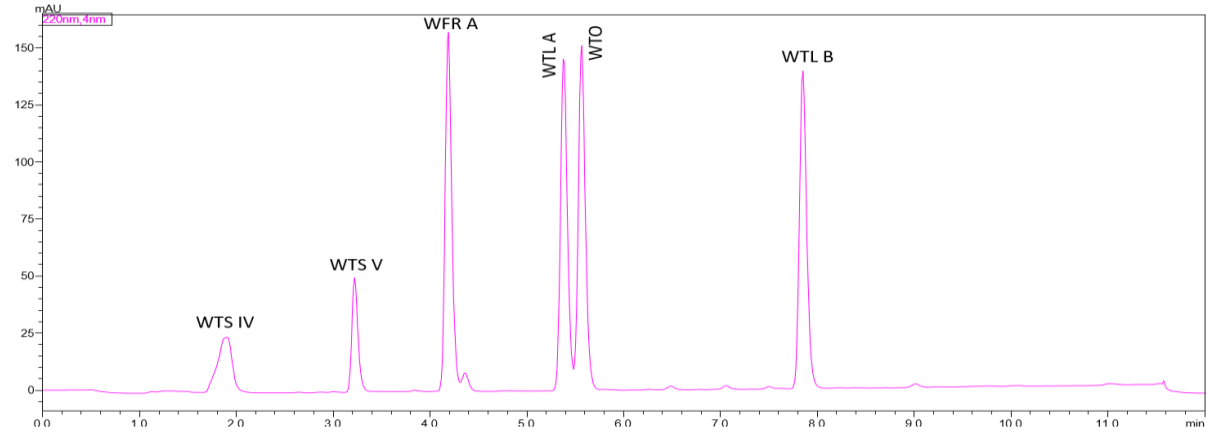
Na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,6 µm se také píky analytů withanolidu A a withanonu neoddělovaly na základní linii. Nejlepší separace byla získána při použití gradientu C, avšak rozlišení stále nedosahovalo k nulové linii.



Obrázek 22: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm; 5 µm, gradient A1

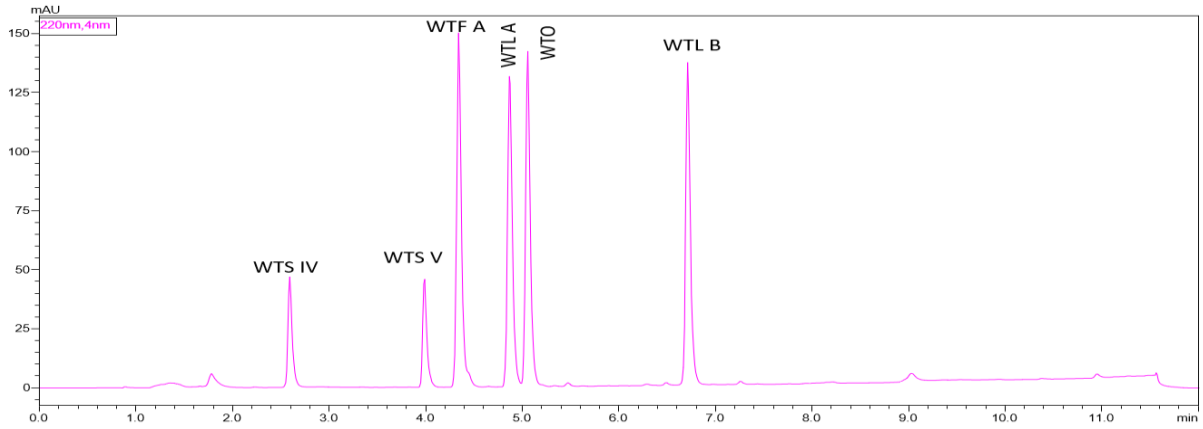


Obrázek 23: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm; 5 µm, gradient B1

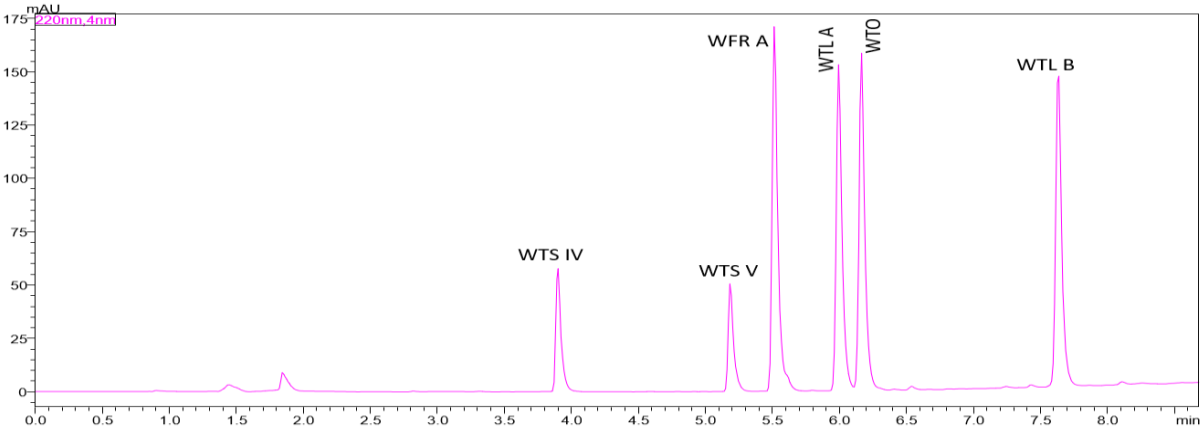


Obrázek 24: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm; 5 µm, gradient C1

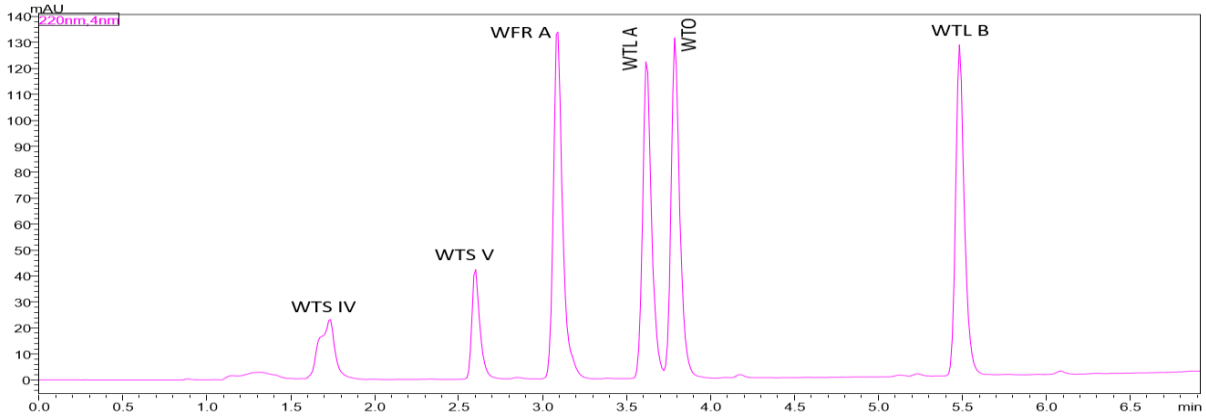
Kolona Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm; 5 µm. Separace probíhala obdobně jako u předchozí kolony, stále nebyla dosažena požadovaná separace píků withanolidu A a withanonu. U této kolony si lze také všimnout špatné symetrie píku a nečistoty withaferinu A.



Obrázek 25: Chromatogram průběhu separace na koloně Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm; 2,6 µm, gradient A1



Obrázek 26: Chromatogram průběhu separace na koloně Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm; 2,6 µm, gradient B1



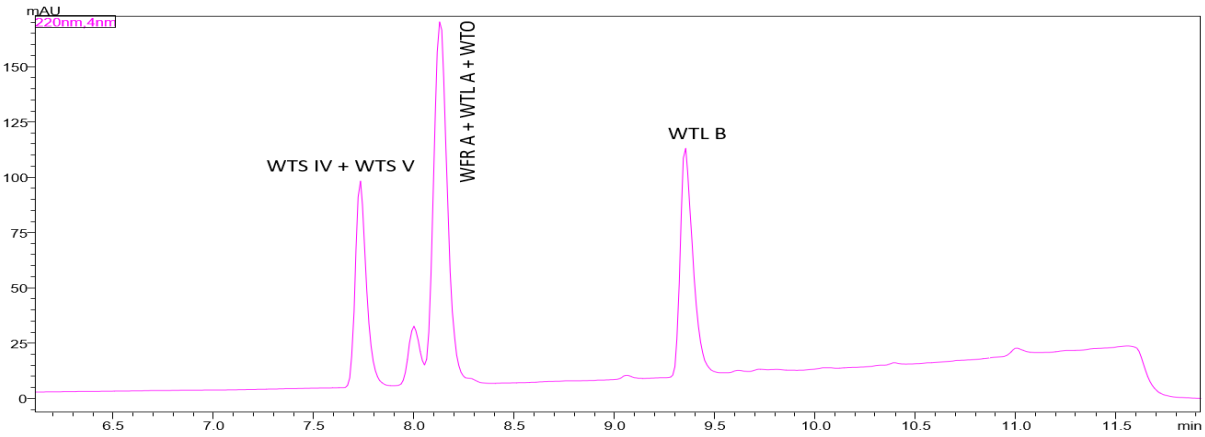
Obrázek 27: Chromatogram průběhu separace na koloně Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm; 2,6 µm, gradient C1

Kolona Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm; 2,6 µm vykazovala nejlepší separaci problémového páru píků withanolidu A a withanonu, které jiné kolony nedokázaly dostatečně rozdělit. Při použití gradientu C1 se výrazně zkrátil čas separace, avšak se nepatrně zhoršilo rozlišení již zmiňovaných problémových píků. Tato kolona byla vybrána jako vhodná pro

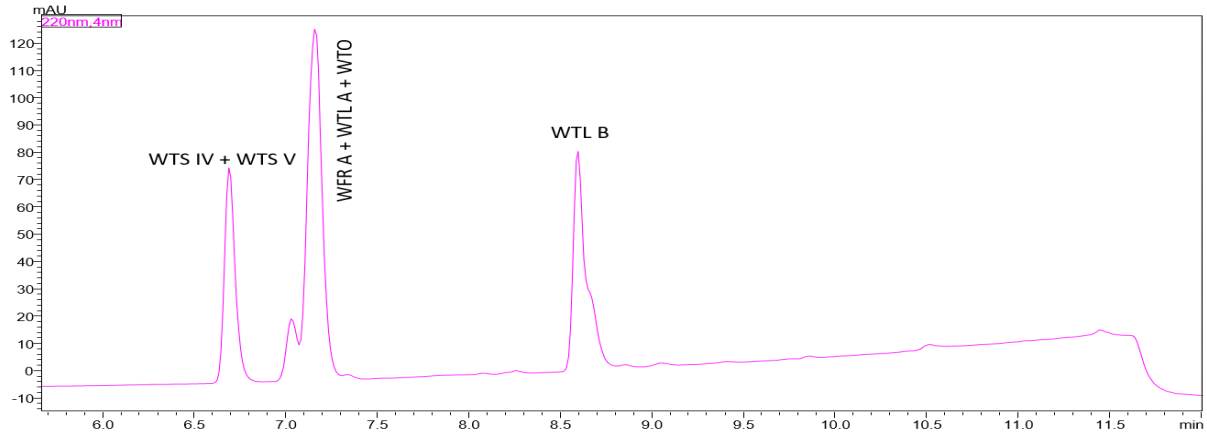
analýzu reálných vzorků. Gradient A1, který se jevil jako nejvhodnější v oblasti separace píků a doby analýzy, byl modifikován před finální validací a byl vytvořen gradient E, jehož průběh napodobuje gradient A1, přičemž se doba analýzy zkrátila z dvanácti na deseti minut.

6.1.3 Volba složení mobilní fáze

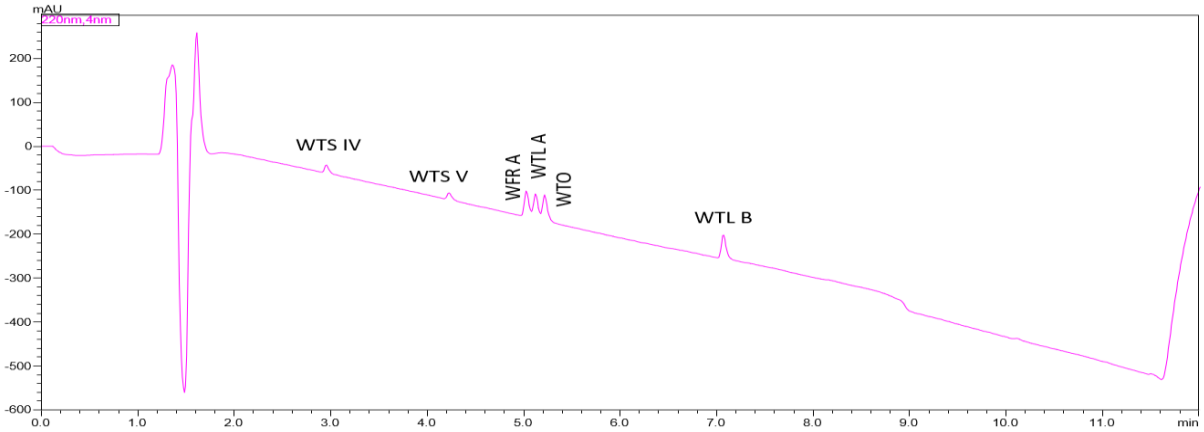
Při optimalizaci separačních podmínek na jednotlivých kolonách byl vyzkoušen jako mobilní fáze 100% methanol místo acetonitrilu. Metanol se jako mobilní fáze neosvědčil, nedošlo k separaci hned několika píků a retenční časy analytů byly delší. Také se testovala mobilní fáze o složení acetonitril – kyselina mravenčí, která se ukázala jako málo účinná. Na chromatogramech lze zřetelně vidět postupně klesající nulová linie, což je při separaci nežádoucí. Složení mobilní fáze bylo testováno na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm, níže jsou chromatogramy se složením mobilní fáze metanol – voda, acetonitril – voda + kys. mravenčí a pro porovnání také acetonitril – voda při gradientech A1 a C1.



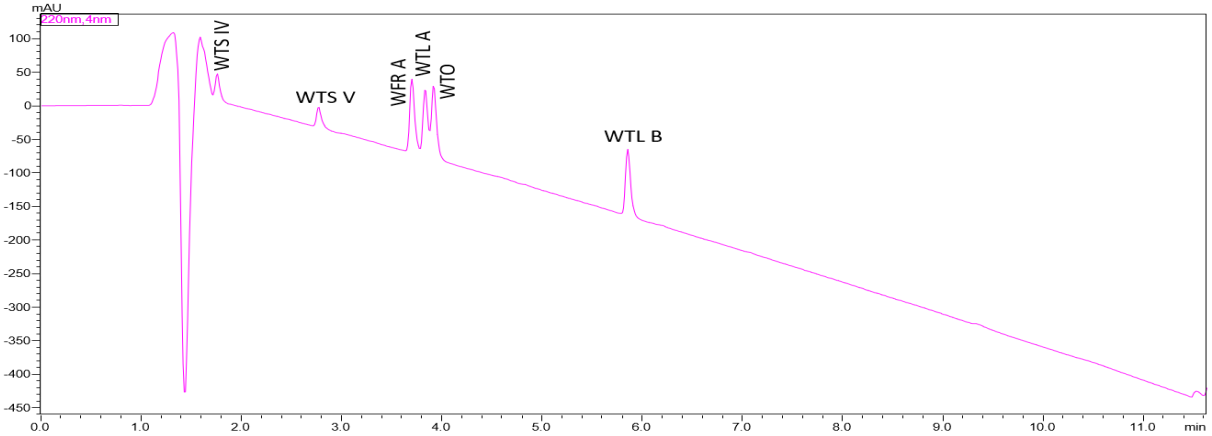
Obrázek 28: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu A1 za použití methanolu jako organické složky mobilní fáze.



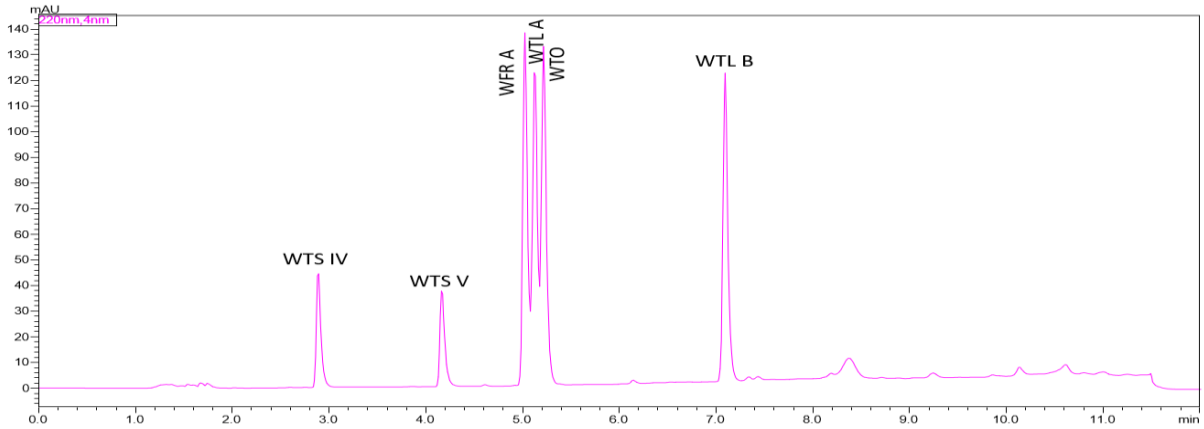
Obrázek 29: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu C1 za použití methanolu jako organické složky mobilní fáze.



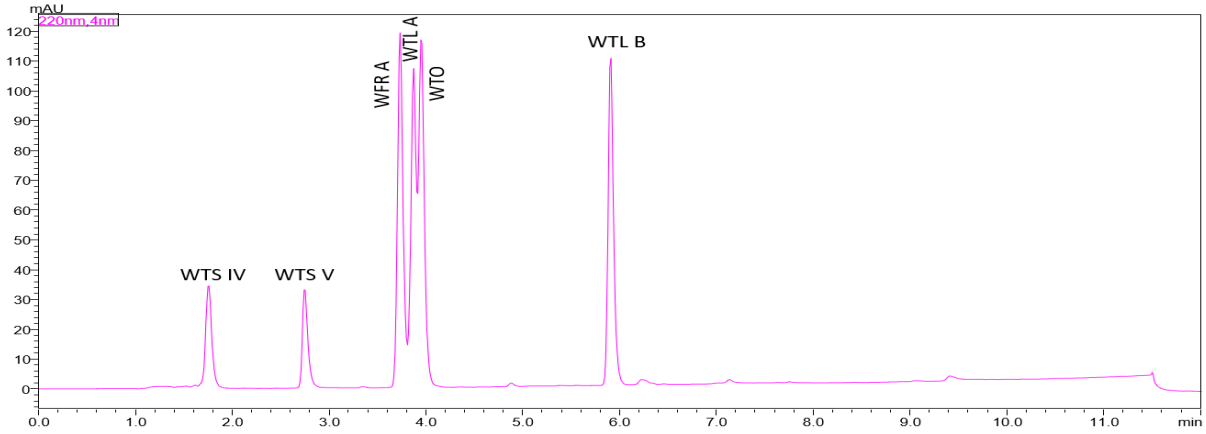
Obrázek 30: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu A1 za použití kyseliny mravenčí jako vodné složky mobilní fáze.



Obrázek 31: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu C1 za použití kyseliny mravenčí jako vodné složky mobilní fáze.



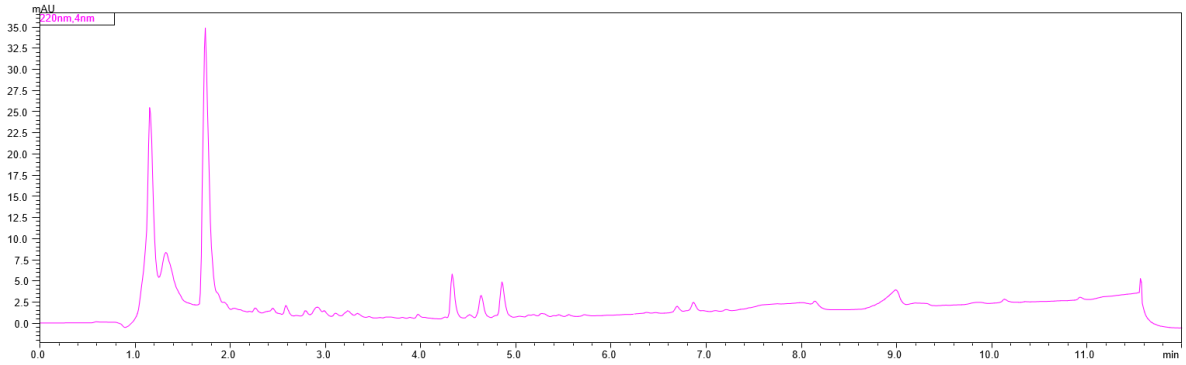
Obrázek 32: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu A1 za použití acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze.



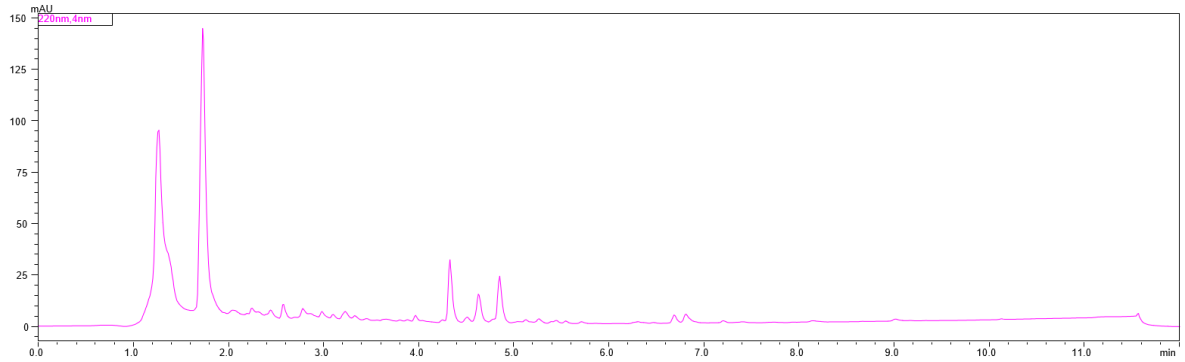
Obrázek 33: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu C1 za použití acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze.

6.1.4 Optimalizace složení extrakčního rozpouštědla

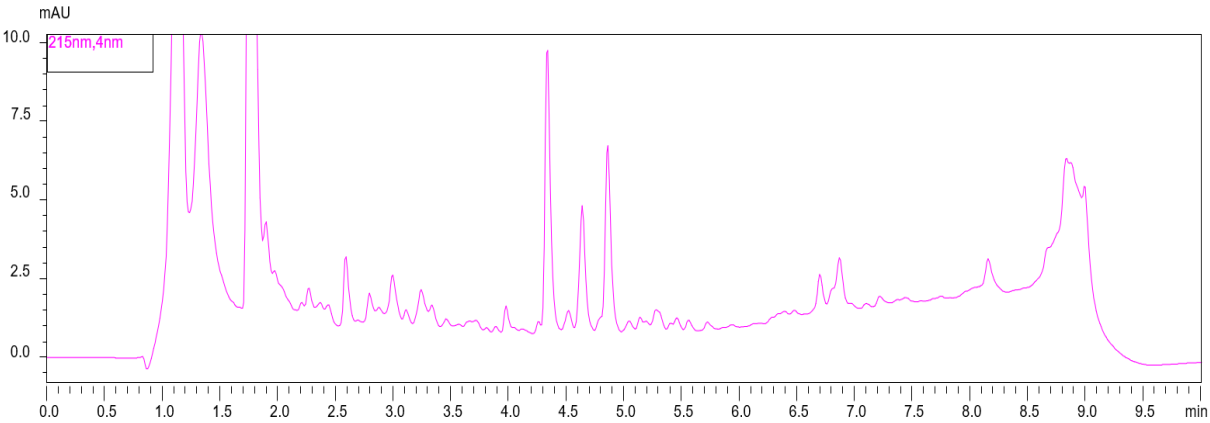
Pro zjištění největší účinnosti extrakce withanolidů z matrice potravních doplňků bylo testováno několik extrakčních činidel. Konkrétně se jednalo o roztoky 25 %, 50 % a 75 % a 100 % methanolu, acetonitril a ultračistou vodu. Postupy přípravy roztoků methanolu jsou popsány v kapitole 4.3.1. Optimalizace probíhala na koloně Kinetex F5 100 Å 150 x 4.6 mm; 2.6 µm při gradientu A1. Jako vzorek byl použit přípravek Ashwagandha (Vilgain), navážka činila 100 mg. Objem extrakčního činidla byl ve všech případech 10 ml. Z chromatogramů níže, kde jsou zřetelné odezvy píků hlavních withanolidů, lze vyvodit, že jako nejvhodnější extrakční činidlo se jevil 50 % methanol, který byl následně použit při analýze všech vzorků doplňků stravy.



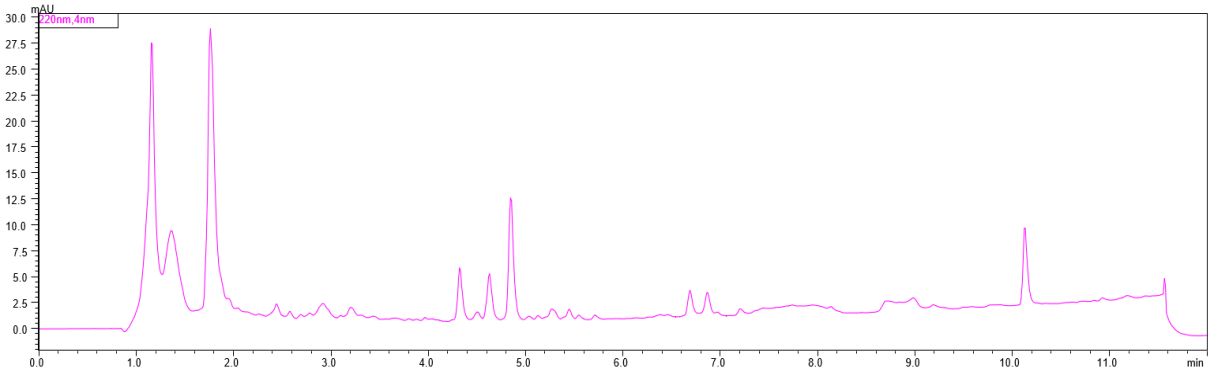
Obrázek 34: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí 25 % methanolu



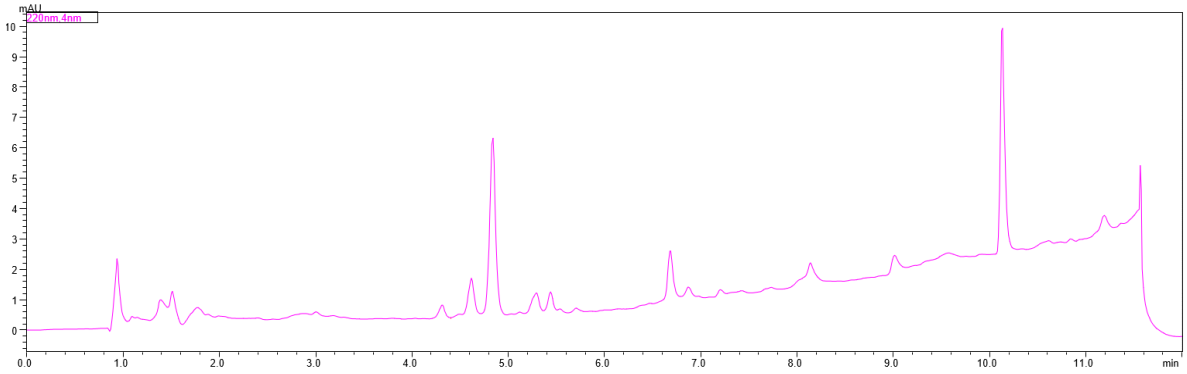
Obrázek 35: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí 50 % methanolu



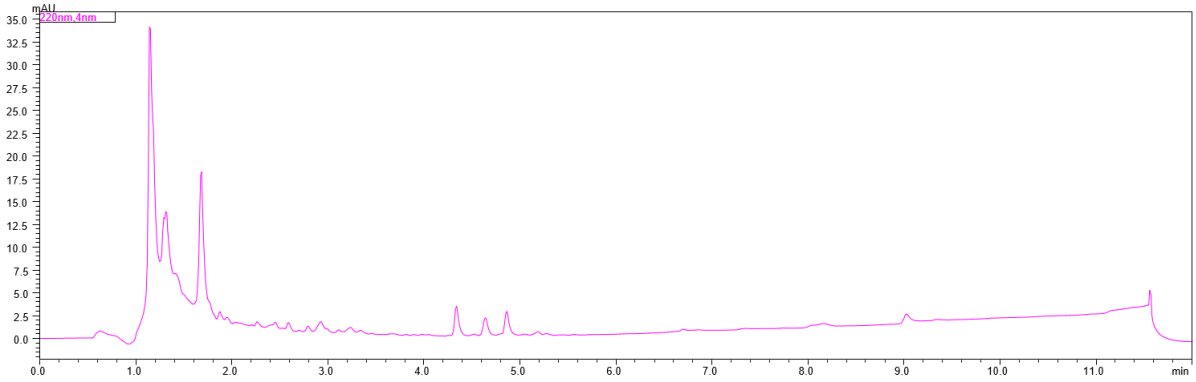
Obrázek 36: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí 75 % methanolu



Obrázek 37: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí 100 % methanolu



Obrázek 38: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí acetonitrilu



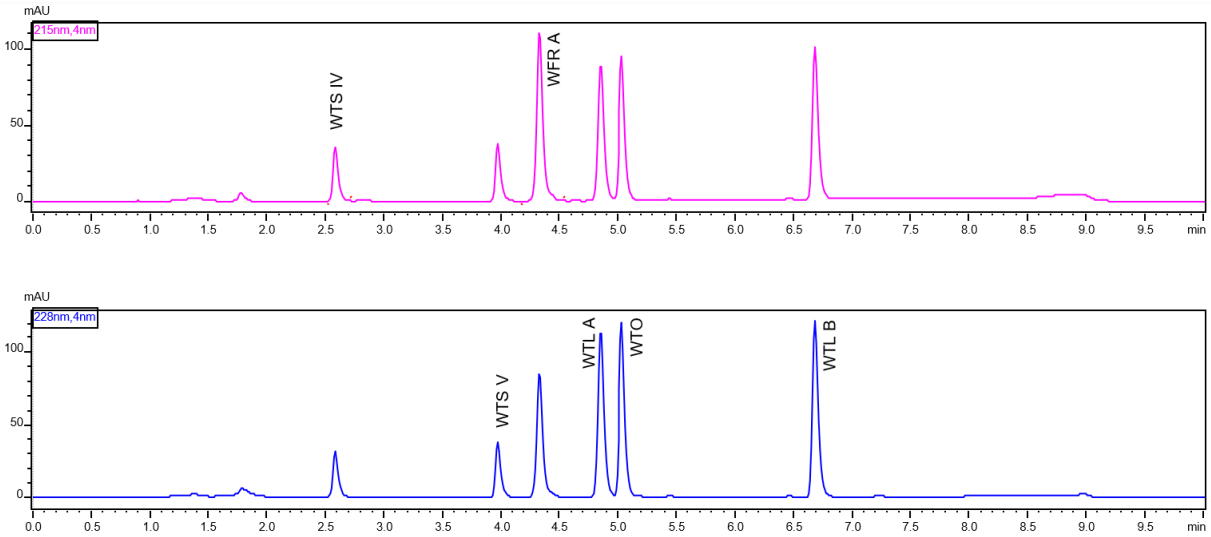
Obrázek 39: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí ultračisté vody

6.1.5 Test vhodnosti chromatografického systému

Pro provedení testu vhodnosti chromatografického systému byl využit roztok směsi standardů uvedený v kapitole 5.3.4 o koncentraci 20 mg/l. Bylo provedeno celkem šest nástřiků. Finální podmínky měření jsou uvedeny v kap. 4.4. Parametry, které test hodnotil, byly: opakovatelnost retenčních časů (t_r), opakovatelnost ploch píků, faktor symetrie (A_s), rozlišení (R_s), kapacitní faktor (k) a kapacita separace (Pc). Zmíněné parametry popisuje tabulka níže.

Tabulka 20: Vyhodnocení parametrů testu vhodnosti chromatografického systému.

Standardy	t_r	t_r RSD [%]	Plochy píků RSD [%]	A_s	R_s	k	Pc
Withanosid IV	2,58	0	0,87	1,32	7,56	0,46	55,34
Withaferin A	4,33	0,10	0,28	1,17	17,42	1,44	48,16
Withanosid V	3,97	0,11	0,22	1,40	14,82	0,54	54,19
Withanolid A	4,85	0,08	0,20	1,19	8,75	0,88	46,45
Withanon	5,04	0,08	0,24	1,24	1,73	0,95	48,16
Withanolid B	6,69	0,08	0,24	1,31	15,75	1,59	48,16



Obrázek 40: Chromatogramy zobrazující test vhodnosti chromatografického systému naměřené při vlnových délkách 215 nm a 228 nm

6.1.6 Opakovatelnost

Pro vyhodnocení opakovatelnosti ploch píků stanovovaných látek byly využity směsné roztoky standardů withanosidu IV, withaferinu A, withanosidu V, withanolidu A, withanonu a withanolidu B na třech koncentračních hladinách: 1 mg/l, 5 mg/l a 20 mg/l. Příprava roztoků pro opakovatelnost je popsána v kapitole 5.3.5. Nástřik směsi standardů byl proveden šestkrát. Výpočet opakovatelnosti byl proveden dle vzorce:

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

Tabulka níže zobrazuje výsledky opakovatelnosti.

Tabulka 21: Výsledky opakovatelnosti

	RSD (%) dle koncentrační hladiny		
Standard	**1 mg/l**	**5 mg/l**	**20 mg/l**
Withanosid IV	1,86	1,62	0,87
Withaferin A	1,13	1,15	0,28
Withanosid V	1,39	1,47	0,22
Withanolid A	1,22	1,19	0,20
Withanon	1,35	1,17	0,24
Withanolid B	1,09	1,19	0,24

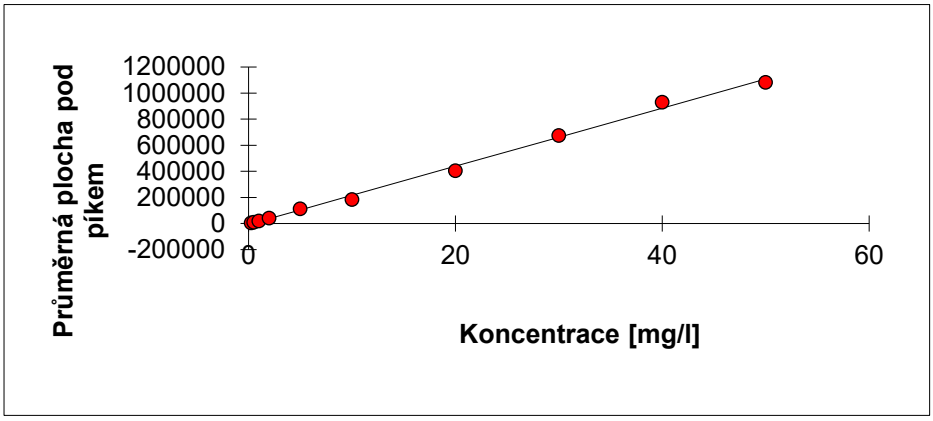
6.1.7 Linearita

Pro určení linearity byla použita kalibrační řada deseti roztoků standardů v rozmezí koncentrací 0,25 – 50 mg/l. Příprava jednotlivých roztoků je popsána v kapitole 5.3.4. Od každého roztoku dané koncentrace byly uskutečněny tři nástřiky o objemu 10 µl. Následně se pomocí průměrných ploch píků a metody lineární regrese sestrojily kalibrační křivky jednotlivých analyzovaných látek. Níže jsou zobrazeny kalibrační závislosti jednotlivých stanovovaných látek.

6.1.7.1 Kalibrační závislost withaferinu A

Tabulka 22: Kalibrační závislost pro withaferin A

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
0,25	5565
0,5	11390
1	21447
2	41353
5	113086
10	185166
20	404514
30	676640
40	930010
50	1082361



Obrázek 41: Graf kalibrační závislosti pro withaferin A

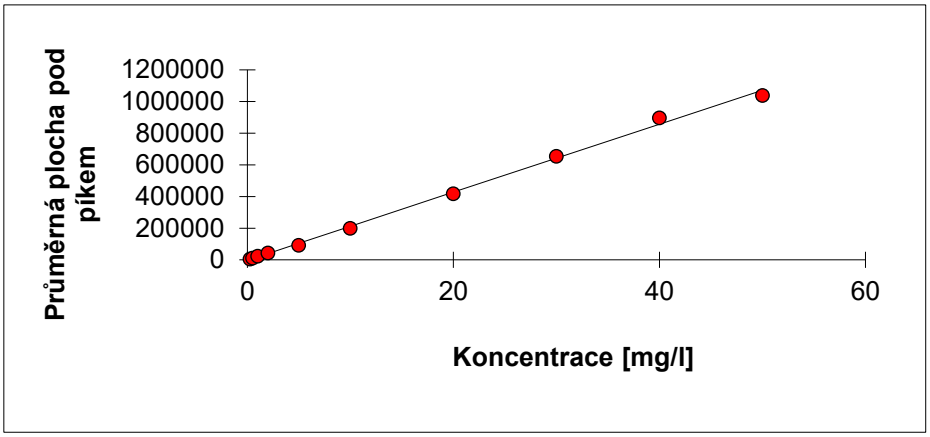
Tabulka 23: Parametry lineární regrese pro withaferin A

Statistické parametry pro regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby:
Směrnice	k =	22300	± 468
Absolutní člen	q =	-6855	± 10995
Korelační koeficient	r =	0,9982	
Reziduální odchylka	s =	25652	

6.1.7.2 Kalibrační závislost withanolidu A

Tabulka 24: Kalibrační závislost pro withanolid A

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
0,25	5687
0,5	11749
1	22743
2	44266
5	92567
10	199336
20	416795
30	654046
40	897581
50	1038304



Obrázek 42: Graf kalibrační závislosti pro withanolid A

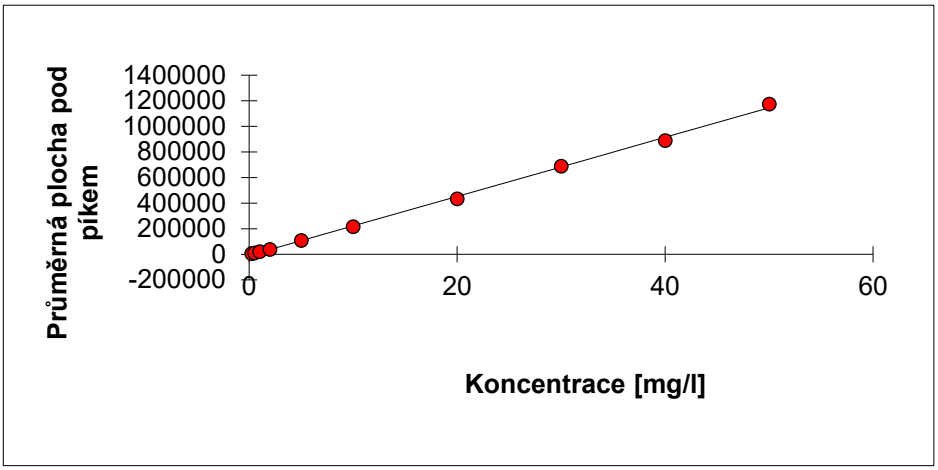
Tabulka 25: Parametry lineární regrese pro withanolid A

Statistické parametry pro regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby:
Směrnice	k =	21475	± 376
Absolutní člen	q =	-2614	± 8831
Korelační koeficient	r =	0,9988	
Reziduální odchylka	s =	20602	

6.1.7.3 Kalibrační závislost withanolidu B

Tabulka 26: Kalibrační závislost pro withanolid B

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
0,25	4471
0,5	9626
1	18510
2	36014
5	105592
10	213883
20	433285
30	687473
40	888823
50	1171788



Obrázek 43: Graf kalibrační závislosti pro withanolid B

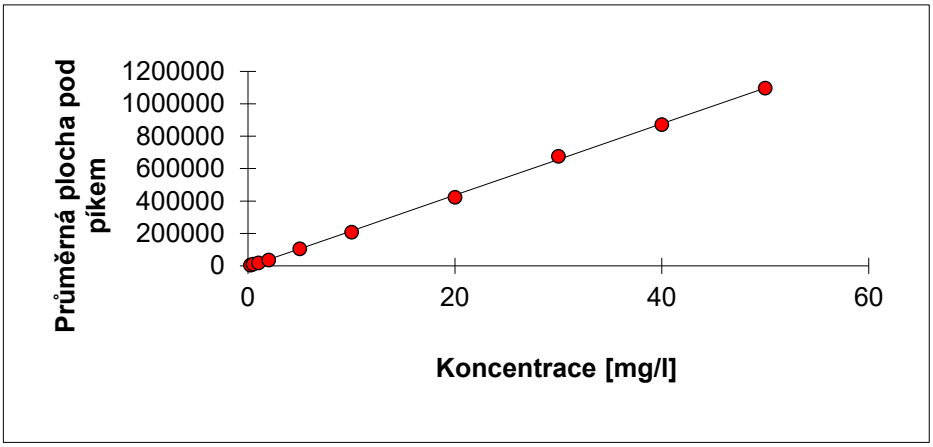
Tabulka 27: Parametry lineární regrese pro withanolid B

Statistické parametry pro regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby:
Směrnice	k =	23099	± 284
Absolutní člen	q =	-9743	± 6678
Korelační koeficient	r =	0,9994	
Reziduální odchylka	s =	15580	

6.1.7.4 Kalibrační závislost withanonu

Tabulka 28: Kalibrační závislost pro withanon

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
0,25	4620
0,5	10097
1	18282
2	35907
5	105888
10	207932
20	422110
30	676469
40	871530
50	1096771



Obrázek 44: Graf kalibrační závislosti pro withanon

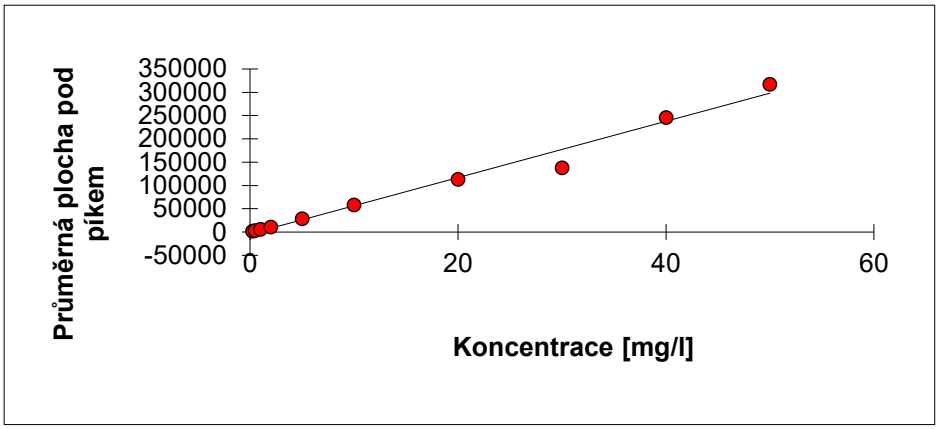
Tabulka 29: Parametry lineární regrese pro withanon

Statistické parametry pro regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby:
Směrnice	k =	22052	± 174
Absolutní člen	q =	-5108	± 4080
Korelační koeficient	r =	0,9998	
Reziduální odchylka	s =	9519	

6.1.7.5 Kalibrační závislost withanosidu IV

Tabulka 30: Kalibrační závislost pro withanosid IV

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
0,25	1448
0,5	3098
1	5741
2	10702
5	28020
10	58066
20	112725
30	137381
40	245363
50	316617



Obrázek 45: Graf kalibrační závislosti withanosidu IV

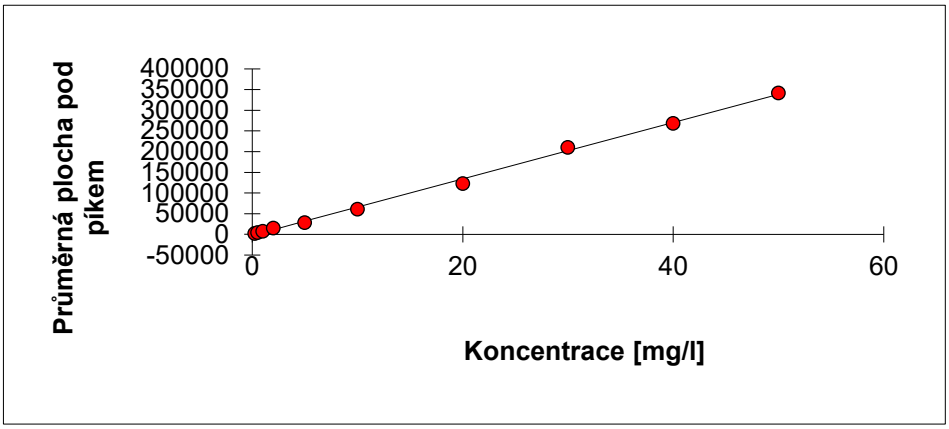
Tabulka 31: Parametry lineární regrese withanosidu IV

Statistické parametry pro regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby:
Směrnice	k =	6039	± 293
Absolutní člen	q =	-3959	± 6891
Korelační koeficient	r =	0,9907	
Reziduální odchylka	s =	16077	

6.1.7.6 Kalibrační závislost withanosidu V

Tabulka 32: Kalibrační závislost withanosidu V

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
0,25	1957
0,5	3927
1	7579
2	15066
5	28231
10	61000
20	122344
30	209933
40	268433
50	341330



Obrázek 46: Graf kalibrační závislosti withanosidu V

Tabulka 33: Parametry lineární regrese withanosidu V

Statistické parametry pro regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby:
Směrnice	k =	6815	± 108
Absolutní člen	q =	-2216	± 2545
Korelační koeficient	r =	0,9999	
Reziduální odchylka	s =	16077	

6.1.8 Preciznost a přesnost

Pro vyhodnocení přesnosti metody byl použit doplněk stravy Ashwagandha výrobce Vilgain. Bylo připraveno devět navážek: k sedmi z nich byl přidán směsný roztok standardů a dva zůstaly jako roztoky vzorků bez standardů. Dále byly připraveny tři směsné roztoky standardů. Podrobný popis přípravy je uveden v kapitole 5.3.6. Tyto připravené roztoky byly následně dávkovány na kolonu ve třech opakováních. Pro jednotlivé analyty byly dosaženy hodnoty výtěžnosti v rozmezí 100-106 %. Preciznost metody byla popsána relativní směrodatnou odchylkou pro jednotlivé hodnoty výtěžnosti získané ze sedmi analýz vzorků s přídavkem standardů a pohybovala se v intervalu 1,39-2,31 %. Tabulka níže znázorňuje tyto údaje pro jednotlivé withanolidy.

Tabulka 34: Parametry přesnosti a preciznosti vyvinuté metody.

	Přesnost [%]	**Preciznost RSD [%]**
Withanosid IV	101,06	2,24
Withaferin A	103,24	1,47
Withanosid V	106,41	1,80
Withanolid A	102,13	1,81
Withanon	103,70	1,39
Withanolid B	100,76	2,31

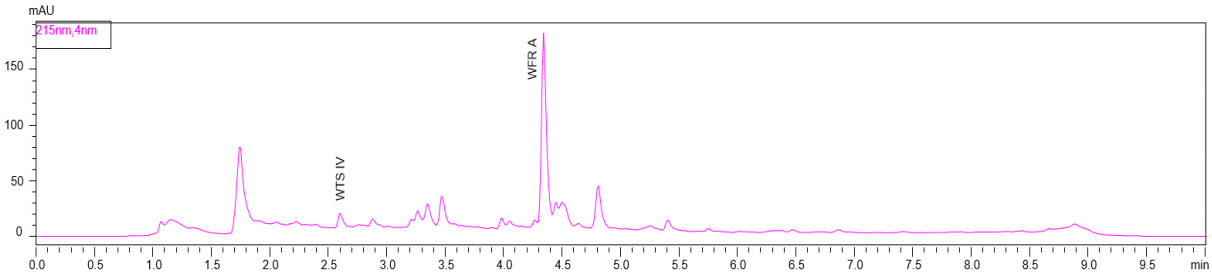
6.2 Stanovení vzorků

Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení vybraných withanolidů – withanosid IV (WTS IV), withaferin A (WFR A), withanosid V (WTS V), withanolid A (WTL A), withanon (WTO) a withanolid B (WTL B) - v deseti potravních doplňcích. Z každého potravního doplňku byly zhotoveny dvě navážky, které se následně zpracovaly a z každého vzorku byly provedeny dva nástřiky o objemu 10 µl. Příprava vzorků potravních doplňků probíhala podle kapitoly 5.3.7. Následně byly vyhodnoceny plochy píků a byly zprůměrovány.

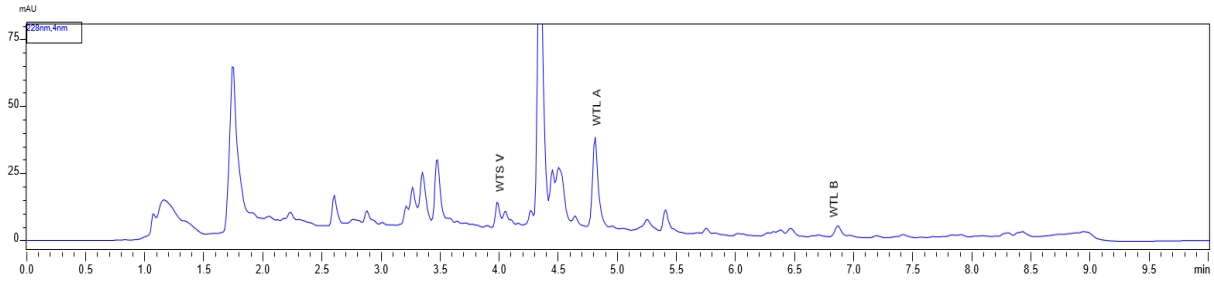
Koncentrace účinných látek v jednotlivých potravních doplňcích byla vypočítána z hodnot ploch pod píky standardů a analytů a koncentrace standardů pomocí rovnice lineární regrese získané při měření roztoků standardů. Při výpočtu byla zohledněna hmotnost navážky, ředění vzorků a objem extrakčního činidla. U všech kapslí byl vypočítán obsah stanovovaných látek v jedné kapsli.

Obrázky níže zobrazují průběhy separací jednotlivých doplňků stravy. Některé z přípravků neobsahovaly všechny analyty stanovované v této diplomové práci.

Přípravek Ashwagandha BIO Organic (Blendea)

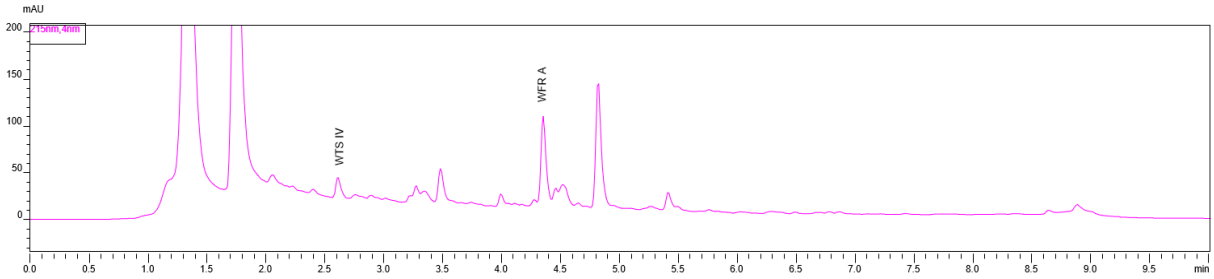


Obrázek 47: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha BIO Organic (Blendea) při 215 nm

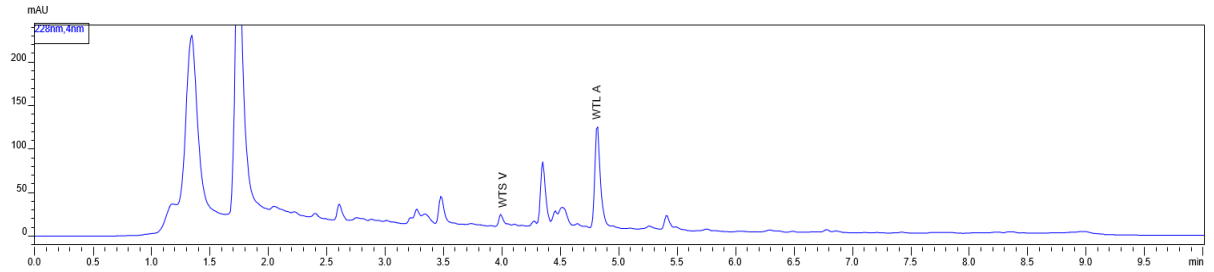


Obrázek 48: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha BIO Organic (Blendea) při 228 nm

Přípravek Ashwagandha (ActiveLab)

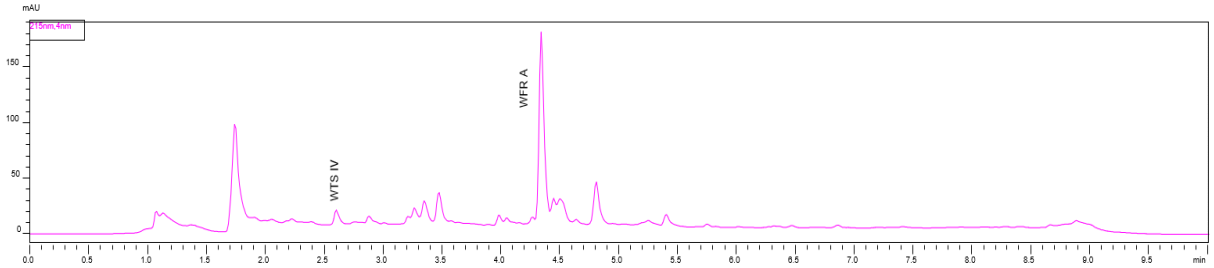


Obrázek 49: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (ActiveLab) při 215 nm

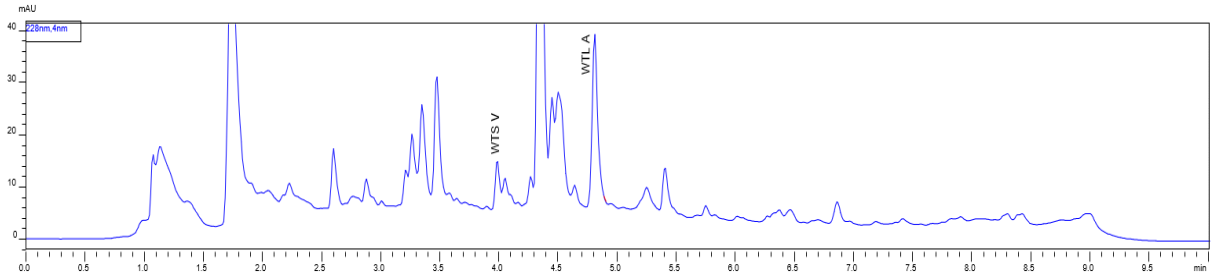


Obrázek 50: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (ActiveLab) při 228 nm

Přípravek Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd)

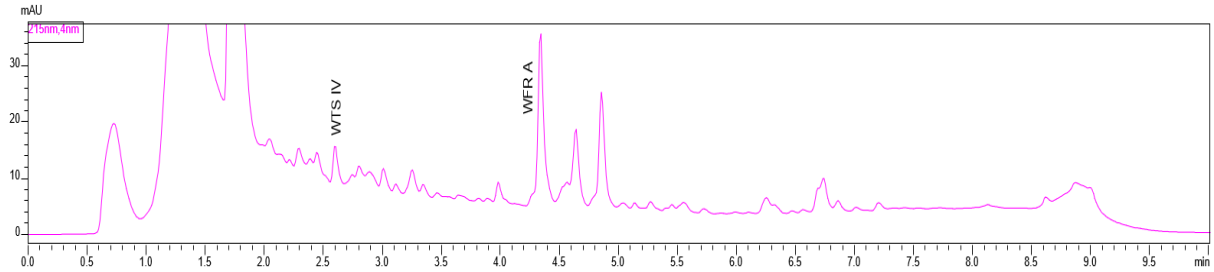


Obrázek 51: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd) při 215 nm

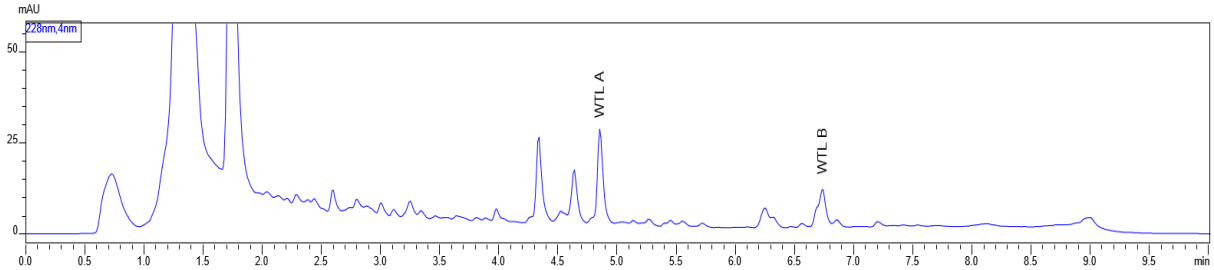


Obrázek 52: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd) při 228 nm

Přípravek Ashwagandha Extract Organic BIO (Viridian)

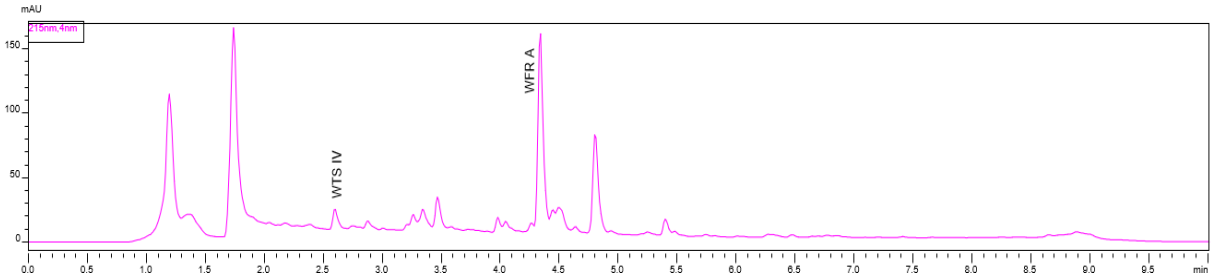


Obrázek 53: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha Extract Organic BIO (Viridian) při 215 nm

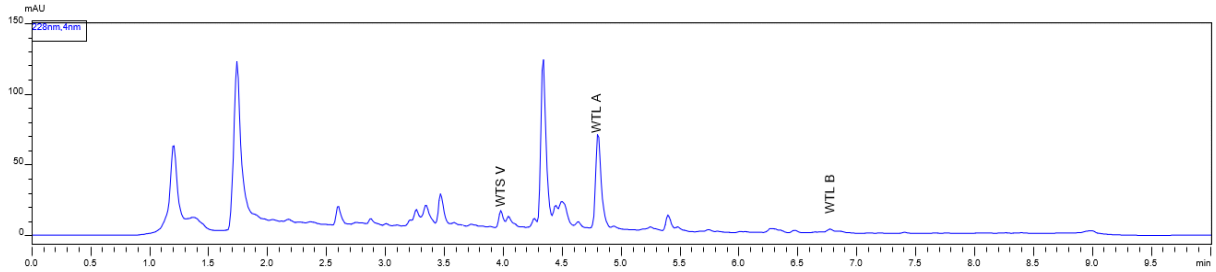


Obrázek 54: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha Extract Organic BIO (Viridian) při 228 nm

Přípravek Ashwagandha – tobolky (Green Idea)

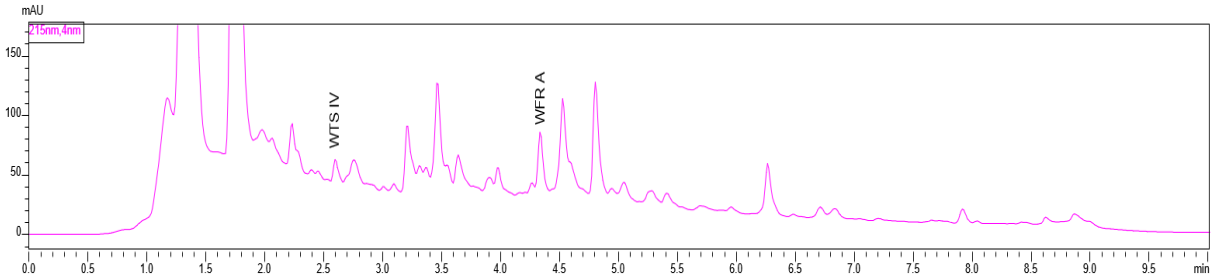


Obrázek 55: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha – tobolky (Green Idea) při 215 nm

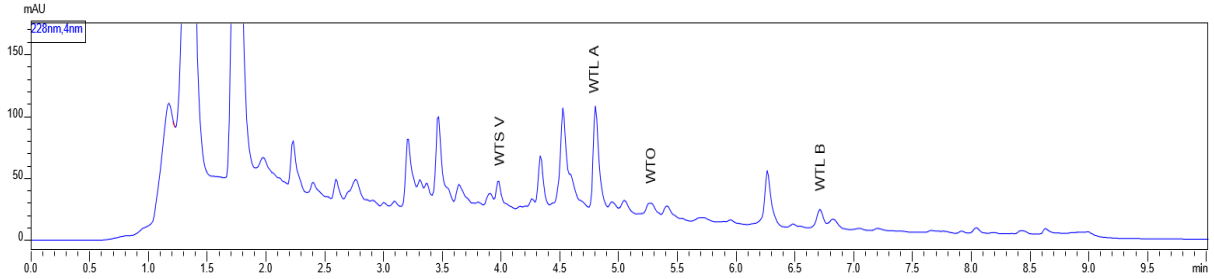


Obrázek 56: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha – tobolky (Green Idea) při 228 nm

Přípravek Ashwagandha (ADVANCE nutraceutics)

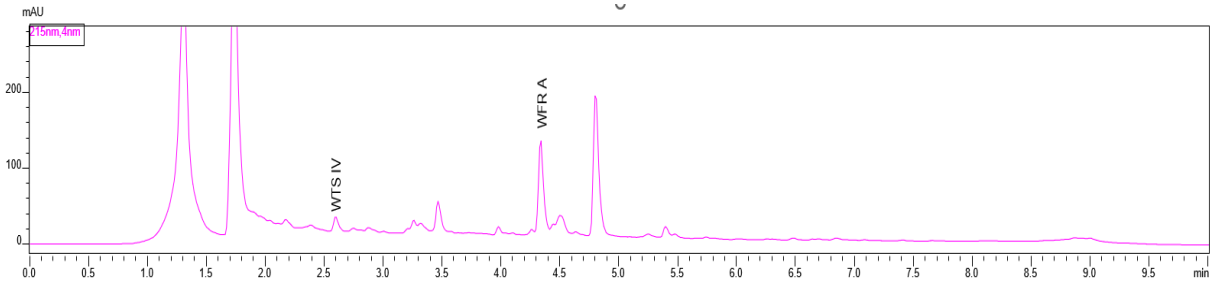


Obrázek 57: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (ADVANCE nutraceutics) při 215 nm

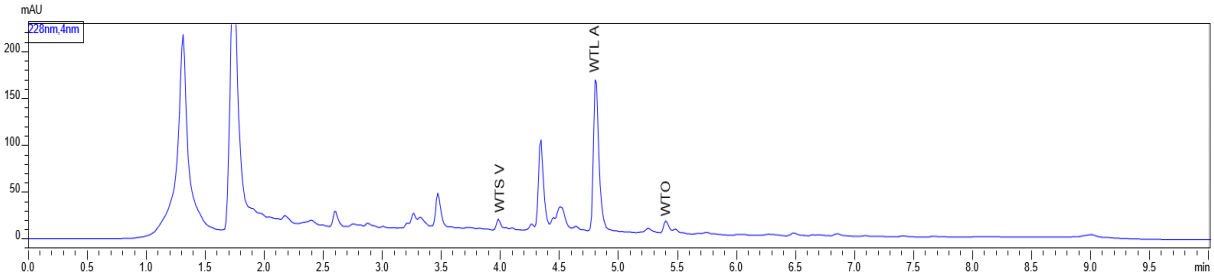


Obrázek 58: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (ADVANCE nutraceutics) při 228 nm

Přípravek Ashwagandha (Gym Beam)

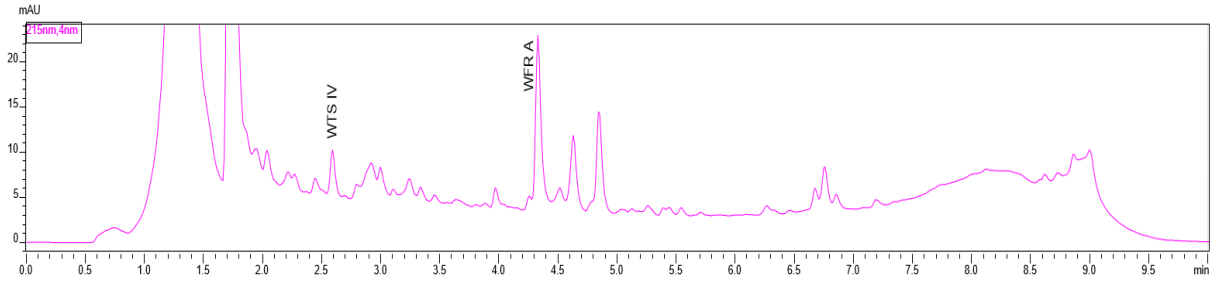


Obrázek 59: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Gym Beam) při 215 nm

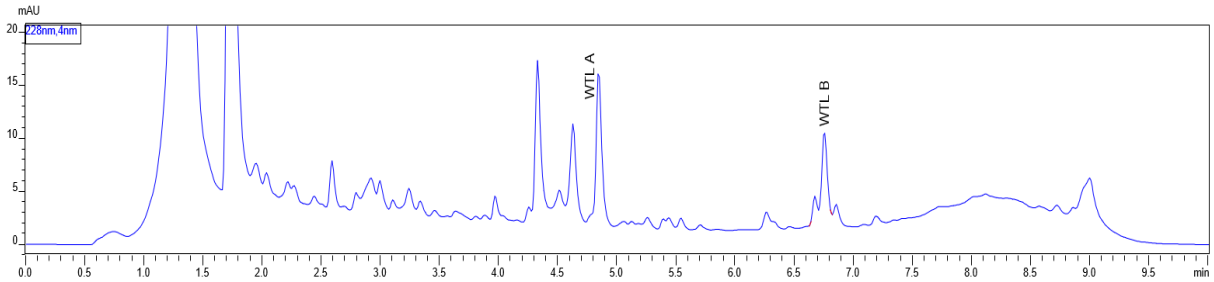


Obrázek 60: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Gym Beam) při 228 nm

Přípravek Ashwagandha 3600 mg (Webber Naturals)

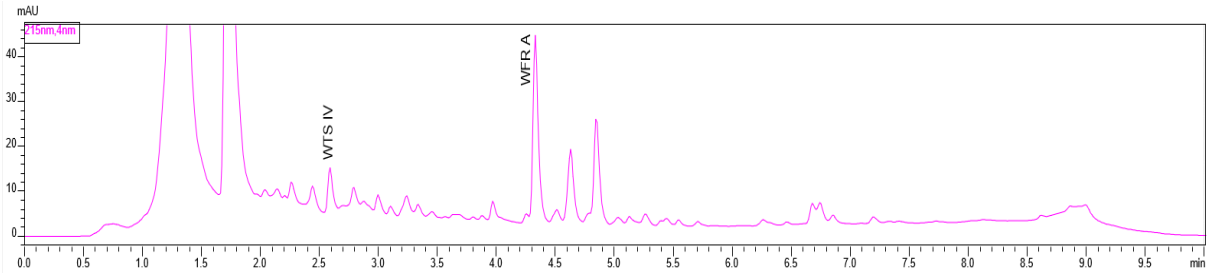


Obrázek 61: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Webber Naturals) při 215 nm

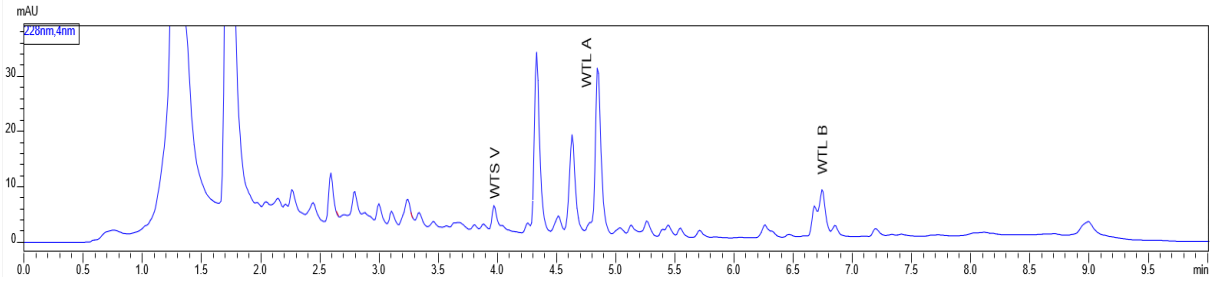


Obrázek 62: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Webber Naturals) při 228 nm

Přípravek Ashwagandha (Vilgain)

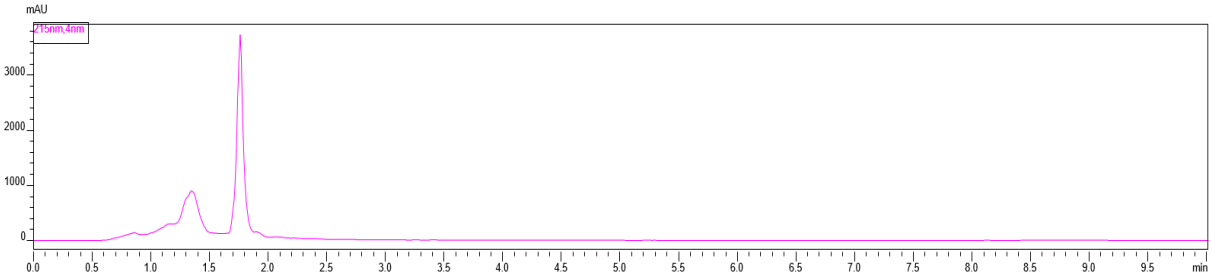


Obrázek 63: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) při 215 nm

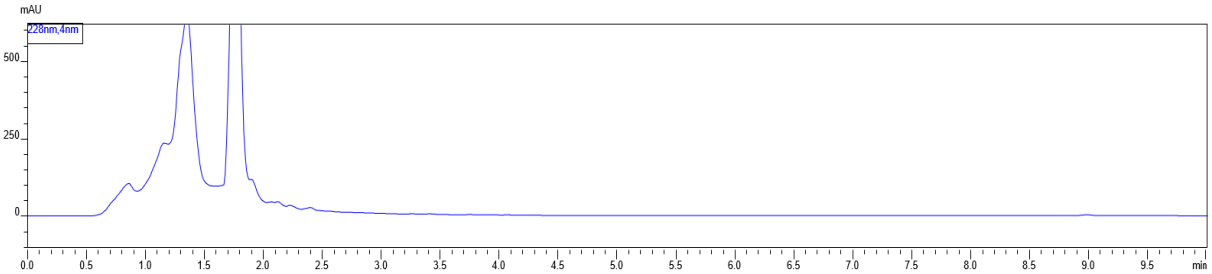


Obrázek 64: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) při 228 nm

Přípravek Ashwagandha (Jíme zdravě)



Obrázek 65: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Jíme zdravě) při 215 nm



Obrázek 66: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Jíme zdravě) při 228 nm

Tabulka 35 shrnuje obsah stanovovaných withanolidů v jednotlivých doplňcích stravy.

Tabulka 35: Výsledky stanovení withanolidů v doplňcích stravy s obsahem extraktu z Ashwagandhy v jednotlivých kapslích

	WTS IV [mg]	**WFR A [mg]**	**WTS V [mg]**	**WTL A [mg]**	**WTO [mg]**	**WTL B [mg]**	**Suma všech látek v kapsli [mg]**
Ashwagandha BIO Organic (Blendea)	1,39	5,36	0,47	1,22	0,00	0,42	**8,87**
Ashwagandha (ActiveLab)	0,28	0,38	0,18	0,56	0,00	0,00	**1,39**
Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd)	1,75	6,23	0,62	1,49	0,28	0,59	**11,05**
Ashwagandha Extract Organic BIO (Viridian)	0,09	0,14	0,00	0,11	0,00	0,12	**0,47**
Ashwagandha – tobolky (Green Idea)	2,94	9,21	1,16	4,63	0,00	0,72	**18,65**
Ashwagandha (ADVANCE nutraceutics)	0,25	0,26	0,17	0,41	0,03	0,12	**1,24**
Ashwagandha (Gym Beam)	0,38	0,75	0,18	1,18	0,03	0,00	**2,53**
Ashwagandha 3600 mg (Webber Naturals)	0,07	0,07	0,00	0,06	0,00	0,09	**0,30**
Ashwagandha (Vilgain)	0,21	0,28	0,08	0,24	0,00	0,09	**0,89**
Ashwagandha (Jíme zdravě)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	**0,00**

V následující tabulce se nachází souhrn deklarovaného množství withanolidů a skutečného obsahu analyzovaných withanolidů v jednotlivých doplňcích stravy s přepočtem na procenta.

Tabulka 36: porovnání deklarovaného a stanoveného množství withanolidů

	Deklarované množství withanolidů [mg]	Stanovené množství withanolidů v 1 kapsli [mg]	Porovnání s deklarovaným množstvím [%]
Ashwagandha BIO Organic (Blendea)	25	8,87	**35,48**
Ashwagandha (ActiveLab)	21	1,39	**6,62**
Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd)	15	11,05	**73,67**
Ashwagandha Extract Organic BIO (Viridian)	15	0,47	**3,13**
Ashwagandha – tobolky (Green Idea)	22,5	18,65	**82,89**
Ashwagandha (ADVANCE nutraceutics)	17,5	1,24	**7,09**
Ashwagandha (Gym Beam)	25	2,53	**10,12**
Ashwagandha 3600 mg (Webber Naturals)	15	0,30	**2,00**
Ashwagandha (Vilgain)	25	0,89	**3,56**
Ashwagandha (Jíme zdravě)	20	0,00	**0,00**

6.2.1 Zhodnocení kvality analyzovaných doplňků stravy

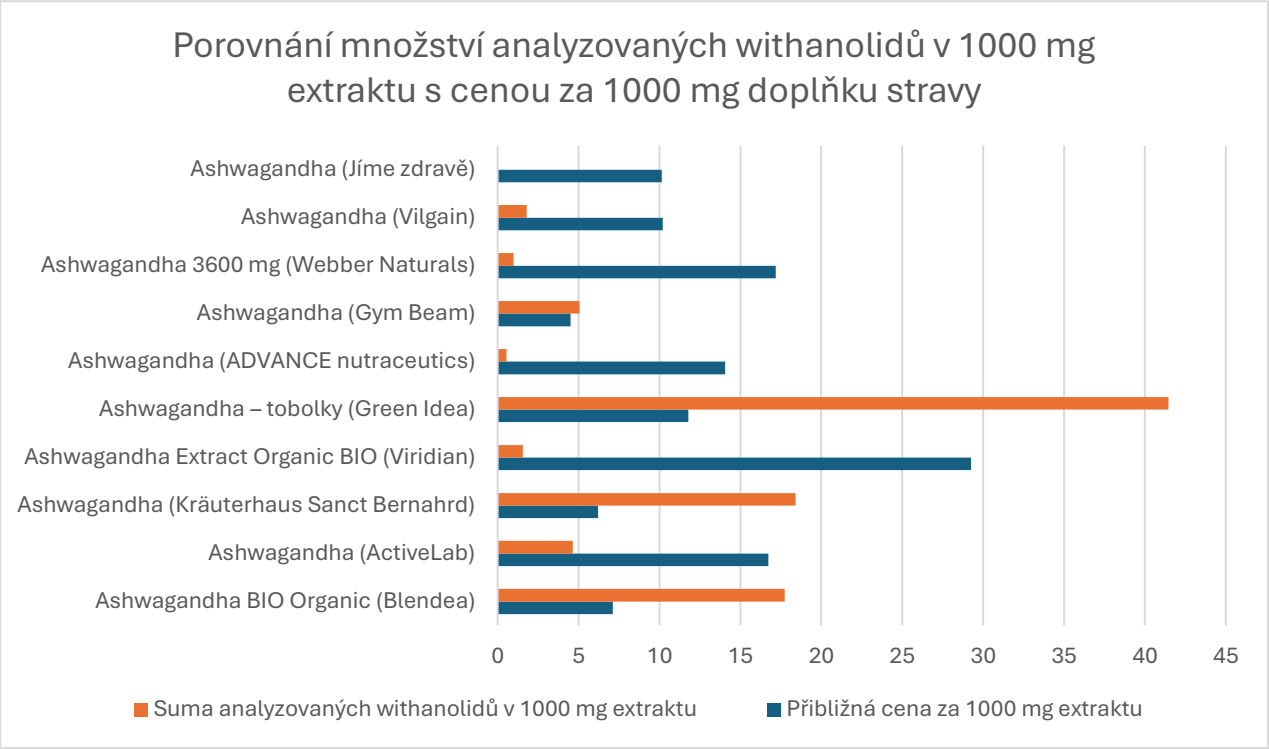
Analýza vybraných deseti doplňků stravy s extraktem z Ashwagandhy se zaměřila na stanovení množství withanolidů v jednotlivých kapslích a porovnání těchto hodnot s deklarovanými údaji výrobců. Z výsledků měření vyplynulo, že mezi jednotlivými produkty existují značné rozdíly v míře shody mezi deklarovaným a stanoveným obsahem účinných látek.

Nejvyšší shodu s deklarovanými hodnotami vykazovaly přípravky Ashwagandha – tobolky – Green Idea (82,89 %) a Ashwagandha – Kräuterhaus Sanct Bernhard (73,67 %), u nichž byl stanovený obsah withanolidů v relativně dobré shodě s deklarovaným obsahem dle výrobce. Ostatní hodnocené vzorky vykazovaly výraznější odchylky, následoval přípravek Ashwagandha BIO Organic – Blendea (35,48 %). Přípravek, u něhož vyvinutou metodou nebyly nalezeny žádné stanovované látky, byl Ashwagandha (Jíme zdravě), dále byl stanoven nedostatečný obsah withanolidů u produktů Ashwagandha 3600 mg – Webber Naturals (2,00 %), Ashwagandha Extract Organic BIO – Viridian (3,13 %) a Ashwagandha – Vilgain (3,56 %). V těchto případech je reálný obsah látky takřka zanedbatelný ve srovnání s hodnotami uvedenými výrobcem, což může vést k nedostatečnému účinku přípravku při jeho běžném užívání. Podobně nízké hodnoty byly zjištěny také u produktů značek ADVANCE nutraceutics (7,09 %), ActiveLab (6,62 %) a Gym Beam (10,12 %), u nichž stanovený obsah sice není nulový, avšak zdaleka nedosahuje očekávané hladiny.

Metoda byla vyvinuta pro stanovení šesti hlavních withanolidů, tudíž lze vyvodit, že celkový obsah withanolidů v kapsli může být vyšší. Na chromatogramech v kapitole 5.2, která se věnuje stanovení vzorků jednotlivých doplňků stavy, ale vidíme, že námi stanovované withanolidy jsou majoritní a tvoří i nejvyšší píky. Lze tedy předpokládat, že i přes kvantifikaci minoritních withanolidů vyskytujících se v extraktech, a připočtení jejich sumy, by nebylo ani u jednoho z výrobků dosaženo obsahu deklarované hodnoty výrobcem.

6.2.2 Porovnání obsahu stanovovaných withanolidů v kapslích s obsahem extraktu Ashwagandy s cenou jednotlivých doplňků stravy

Obrázek 67 znázorňuje graf porovnávající celkové stanovené množství withanolidů a cenu 1000 mg extraktu jednotlivých doplňků stravy. Cena 1000 mg extraktu byla vypočítána z průměrné ceny produktu. V poměru cena/obsah účinných látek jsou pro spotřebitele jednoznačně výhodné přípravky Ashwagandha – tobolky – Green Idea a Ashwagandha – Kräuterhaus Sanct Bernhard. Naopak nejhorší z hodnocených dopadl přípravek zdravě Ashwagandha Extract Organic BIO – Viridian a Ashwagandha – Jíme zdravě.



Obrázek 67: Porovnání množství withanolidů s přibližnou cenou 1000 mg extraktu

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala vývojem, optimalizací a validací metody ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení withanolidů v potravních doplňcích na bázi extraktu z Ashwagandhy, jmenovitě pak withaferiu A, withanolidu A, withanolidu B, withanonu, withanosidu IV a withanosidu V. Tyto látky byly analyzovány v deseti doplňcích stravy v kapslové formě, jedná se o přípravky: Ashwagandha BIO Organic (Blendea), Ashwagandha (ActiveLab), Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd), Ashwagandha Extract Organic BIO (Viridian), Ashwagandha (Green Idea), Ashwagandha (ADVANCE nutraceutics), Ashwagandha (Gym Beam), Ashwagandha 3600mg (Webber Naturals), Ashwagandha (Vilgain) a Ashwagandha (Jíme zdravě).

Pro separaci a validaci metody byla vybrána kolona Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm s velikostí částic 2,6 µm. Analýza probíhala za použití gradientové eluce a jako organická složka mobilní fáze byl zvolen acetonitril. Teplota kolonového termostatu po celou dobu analýzy, která trvala 10 minut, byla 30 °C. Průtok mobilní fáze činil 1,0 ml/min a objem vzorků dávkovaných na kolonu byl 10 µl. Stanovované látky byly detekovány pomocí PDA detektoru při dvou vlnových délkách: 215 nm pro withaferin a withanosid IV a 228 nm pro withanon, withanolid A, withanolid B a withanosid V. Získaná data byla zpracovávána pomocí softwaru LC LabSolutions.

Validace zahrnovala ověření linearity všech šesti withanolidů v koncentračním rozmezí 0,25 - 50 mg/l, korelační koeficienty dosahovaly hodnot 0,9982 pro withaferin A, 0,9988 pro withanolid A, 0,9994 pro withanolid B, 0,9998 pro withanon, 0,9907 pro withanosid IV a 0,9999 pro withanosid V. Dále byla měřena opakovatelnost metody ve třech koncentračních hladinách, 1 mg/l, 5 mg/l a 20 mg/l. Opakovatelnost byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou a u všech koncentračních hladin byla menší než 1,9 %. Pro ověření výtěžnosti extrakčního postupu byl vybrán doplněk stravy Ashwagandha výrobce Vilgain a naměřené hodnoty výtěžnosti činily 100,76 - 106,41 %. Pro měření preciznosti metody bylo využito stejného přípravku. Její hodnoty u jednotlivých analytů se pohybovaly v rozmezí 1,39 - 2,31 %. Byl proveden test vhodnosti chromatografického systému, byly získány hodnoty opakovatelnosti retenčních časů pro jednotlivé analyty vyjádřen relativní směrodatnou odchylkou nepřesahovaly hodnotu 0,11 %, dále hodnoty faktoru asymetrie pro jednotlivé látky, které se pohybovaly v rozmezí 1,17-1,40. Opakovatelnost plochy píků vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou dosahovala hodnot v rozpětí 0,20 - 0,87 %. Zjištěné hodnoty rozlišení píků se nacházely v rozsahu 1,73 – 17,42. Kapacitní faktor dosahoval hodnot 0,44 – 1,59 a kapacita separace hodnot v rozmezí 48,16 - 54,19.

Celkový obsah analyzovaných látek v jednotlivých doplňcích stravy byl velmi rozličný a značná část z nich obsahovala pouze zlomek deklarovaných hodnot withanolidů. Produkt s největší shodou stanovené a deklarované hodnoty withanolidů byl Ashwagandha – tobolky od výrobce Green Idea, obsah withanolidů v jedné kapsli činil 18,65 mg, z deklarovaných 22,5 mg se jedná o shodu 82,89 %. Následoval potravní doplněk Ashwagandha od výrobce Kräuterhaus Sanct Bernahrd, který v 1 kapsli obsahoval 11,05 mg z deklarovaných 15 mg (73,67

%). Hůře pak dopadly doplňky Ashwagandha BIO Organic od firmy Blendea – 8,87 mg z deklarovaných 25 mg (35,48 %), Ashwagandha výrobce Gym Beam, 2,52 mg z 25 mg (10,12 %), Ashwagandha od výrobce ADVANCE nutraceutics, 1,24 mg z 17,5 mg (7,09 %) a Ashwagandha od firmy ActiveLab s 1,39 mg z deklarovaných 21 mg v jedné kapsli. V poslední řadě stojí výrobky firmem Vilgain, Viridian a Webber Naturals. Naměřený obsah withanolidů byl u produktu Ashwagandha (Vilgain) 0,89 mg z 25 mg (3,56 %), Ashwagandha Extract Organic BIO, Ashwagandha (Viridian) 0,47 mg z 15 mg (3,13 %) a Ashwagandha 3600mg (Webber Naturals) 0,30 mg z 15 mg (2,00 %). V doplňku stravy Ashwagandha od výrobce Jíme zdravě nebyl nalezen žádný ze stanovených withanolidů.

8 Zdroje

[1] V. G. Vaidya *et al.*, „Clinical pharmacokinetic evaluation of Withania somnifera (L.) Dunal root extract in healthy human volunteers: A non-randomized, single dose study utilizing UHPLC-MS/MS analysis", *J Ethnopharmacol*, roč. 322, bře. 2024, doi: 10.1016/j.jep.2023.117603.

[2] N. Yadav, S. Tripathi, a N. S. Sangwan, „Phyto-therapeutic potential of Withania somnifera: Molecular mechanism and health implications", 1. březen 2024, *John Wiley and Sons Ltd*. doi: 10.1002/ptr.8100.

[3] „Jaký je rozdíl mezi lékem a doplňkem stravy?", Viděno: 3. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://sukl.gov.cz/encyklopedie/jaky-je-rozdil-mezi-lekem-a-doplnkem-stravy/

[4] „Doplněk stravy". Viděno: 2. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/477

[5] Jinu John, „THERAPEUTIC POTENTIAL OF WITHANIA SOMNIFERA: A REPORT ON PHYTO-PHARMACOLOGICAL PROPERTIES", *Int J Pharm Sci Res*, roč. 5, č. 6, s. 2131–2148, čvc. 2014, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(6).2131-48.

[6] C. Wu *et al.*, „A scoping review of Ayurvedic rasayana adaptogens in oncology", 1. leden 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.jaim.2023.100879.

[7] S. Zahiruddin *et al.*, „Ashwagandha in brain disorders: A review of recent developments", 15. červenec 2020, *Elsevier Ireland Ltd*. doi: 10.1016/j.jep.2020.112876.

[8] „Vitánie snodárná". Viděno: 31. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Withanie_snod%C3%A1rn%C3%A1

[9] D. A. Bonilla, Y. Moreno, C. Gho, J. L. Petro, A. Odriozola-Martínez, a R. B. Kreider, „Effects of ashwagandha (Withania somnifera) on physical performance: systematic review and bayesian meta-analysis", *J Funct Morphol Kinesiol*, roč. 6, č. 1, bře. 2021, doi: 10.3390/jfmk6010020.

[10] V. Todorova, K. Ivanov, C. Delattre, V. Nalbantova, D. Karcheva-Bahchevanska, a S. Ivanova, „Plant adaptogens—history and future perspectives", *Nutrients*, roč. 13, č. 8, srp. 2021, doi: 10.3390/nu13082861.

[11] „WITHANIA SOMNIFERA (L.) Dunal". Viděno: 20. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://botany.cz/cs/withania-somnifera/

[12] „Withania somnifera". Viděno: 20. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://databaze.dendrologie.cz/domains/databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=28659

[13] H. Gaurav *et al.*, „Biodiversity, Biochemical Profiling, and Pharmaco-Commercial Applications of Withania somnifera: A Review", 1. únor 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/molecules28031208.

[14] „Ženšen indický - Withania somnifera - semena ženšenu - 7 ks". Viděno: 22. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://www.semena.cz/zensen-indicky-withania-somnifera-semena-zensenu-7-ks

[15] „Ashwagandha, Indian Ginseng, Root (Withania Somnifera)". Viděno: 31. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://chasdomundo.pt/en/medicinal-herbs/ashwagandha-indian-ginseng-root-withania-somnifera

[16] M. T. Abdelwahed, M. A. Hegazy, a E. H. Mohamed, „Major biochemical constituents of Withania somnifera (ashwagandha) extract: A review of chemical analysis", 1. leden 2023, *Sciendo*. doi: 10.1515/revac-2022-0055.

[17] R. S. Jat, B. B. Basak, a N. A. Gajbhiye, „Organic manures and biostimulants fostered soil health and increased the harvest quality of the medicinal herb ashwagandha", *Agron J*, roč. 113, č. 1, s. 504–514, led. 2021, doi: 10.1002/agj2.20457.

[18] D. S. Mandlik a A. G. Namdeo, „Pharmacological evaluation of Ashwagandha highlighting its healthcare claims, safety, and toxicity aspects", 2021, *Taylor and Francis Ltd.* doi: 10.1080/19390211.2020.1741484.

[19] A. Kumar, E. Abrol, S. Koul, a D. Vyas, „Seasonal low temperature plays an important role in increasing metabolic content of secondary metabolites in Withania somnifera (L.) Dunal and affects the time of harvesting", *Acta Physiol Plant*, roč. 34, č. 5, s. 2027–2031, zář. 2012, doi: 10.1007/s11738-012-0968-0.

[20] R. Ramesh Kumar, L. Prasanna Anjaneya Reddy, A. Niranjana Kumar, K. Komaraiah, S. Purnanand, a K. P. Sastry, „Root textural quality in ashwagandha (Withania somnifera) as influenced by crop growth periods and morphotypes", *Ind Crops Prod*, roč. 34, č. 1, s. 1231–1234, čvc. 2011, doi: 10.1016/j.indcrop.2011.03.016.

[21] P. Mikulska *et al.*, „Ashwagandha (Withania somnifera)—Current Research on the Health-Promoting Activities: A Narrative Review", 1. duben 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/pharmaceutics15041057.

[22] T. Kaur *et al.*, „Withania somnifera as a potential anxiolytic and immunomodulatory agent in acute sleep deprived female Wistar rats", *Mol Cell Biochem*, roč. 427, č. 1–2, s. 91–101, bře. 2017, doi: 10.1007/s11010-016-2900-1.

[23] A. L. Lopresti, S. J. Smith, H. Malvi, R. Kodgule, a D. Wane, „An investigation into the stress-relieving and pharmacological actions of an ashwagandha (Withania somnifera) extract: A randomized, double-blind, placebo-controlled study", *Medicine (United States)*, roč. 98, č. 37, zář. 2019, doi: 10.1097/MD.0000000000017186.

[24] K. L. Cheah, M. N. Norhayati, L. H. Yaacob, a R. A. Rahman, „Effect of Ashwagandha (Withania somnifera) extract on sleep: A systematic review and meta-analysis", 1. září 2021, *Public Library of Science*. doi: 10.1371/journal.pone.0257843.

[25] D. A. Bonilla, Y. Moreno, C. Gho, J. L. Petro, A. Odriozola-Martínez, a R. B. Kreider, „Effects of ashwagandha (Withania somnifera) on physical performance: systematic review and bayesian meta-analysis", *J Funct Morphol Kinesiol*, roč. 6, č. 1, bře. 2021, doi: 10.3390/jfmk6010020.

[26] H. A. Oyewusi, Y. S. Wu, S. Z. Safi, R. A. Wahab, M. H. M. Hatta, a K. Batumalaie, „Molecular dynamics simulations reveal the inhibitory mechanism of Withanolide A against α-glucosidase and α-amylase", *J Biomol Struct Dyn*, roč. 41, č. 13, s. 6203–6218, 2023, doi: 10.1080/07391102.2022.2104375.

[27] L. L. Dutra, R. J. Borges, V. G. Maltarollo, T. A. O. Mendes, G. C. Bressan, a J. P. V. Leite, „In silico evaluation of pharmacokinetics properties of withanolides and simulation of their biological activities against Alzheimer's disease", *J Biomol Struct Dyn*, roč. 42, č. 5, s. 2616–2631, 2024, doi: 10.1080/07391102.2023.2206909.

[28] A. Girme *et al.*, „Investigating 11 withanosides and withanolides by UHPLC-PDA and mass fragmentation studies from ashwagandha (withania somnifera)", *ACS Omega*, roč. 5, č. 43, s. 27933–27943, lis. 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c03266.

[29] M. T. Abdelwahed, M. A. Hegazy, a E. H. Mohamed, „Major biochemical constituents of Withania somnifera (ashwagandha) extract: A review of chemical analysis", 1. leden 2023, *Sciendo*. doi: 10.1515/revac-2022-0055.

[30] M. H. Mirjalili, E. Moyano, M. Bonfill, R. M. Cusido, a J. Palazón, „Steroidal lactones from withania somnifera, an ancient plant for novel medicine", červenec 2009. doi: 10.3390/molecules14072373.

[31] B. Hassannia, E. Logie, P. Vandenabeele, T. Vanden Berghe, a W. Vanden Berghe, „Withaferin A: From ayurvedic folk medicine to preclinical anti-cancer drug", 1. březen 2020, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.bcp.2019.08.004.

[32] S. Siddiqui, N. Ahmed, M. Goswami, A. Chakrabarty, a G. Chowdhury, „DNA damage by Withanone as a potential cause of liver toxicity observed for herbal products of Withania somnifera (Ashwagandha)", *Curr Res Toxicol*, roč. 2, s. 72–81, led. 2021, doi: 10.1016/j.crtox.2021.02.002.

[33] D. Tewari *et al.*, „Withania somnifera (L.) Dunal: Phytochemistry, structure-activity relationship, and anticancer potential", 1. duben 2022, *Elsevier GmbH*. doi: 10.1016/j.phymed.2022.153949.

[34] „Withaferin A". Viděno: 18. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/265237

[35] T. Sultana *et al.*, „Withaferin A: From Ancient Remedy to Potential Drug Candidate", 1. prosinec 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/molecules26247696.

[36] W. Vanden Berghe, L. Sabbe, M. Kaileh, G. Haegeman, a K. Heyninck, „Molecular insight in the multifunctional activities of Withaferin A", 15. listopad 2012. doi: 10.1016/j.bcp.2012.08.027.

[37] N. J. Dar, J. A. Bhat, N. K. Satti, P. R. Sharma, A. Hamid, a M. Ahmad, „Withanone, an Active Constituent from Withania somnifera, Affords Protection Against NMDA-Induced Excitotoxicity in Neuron-Like Cells", *Mol Neurobiol*, roč. 54, č. 7, s. 5061–5073, zář. 2017, doi: 10.1007/s12035-016-0044-7.

[38] „Withanone". Viděno: 18. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21679027

[39] V. S. Patil, V. B. Hupparage, A. P. Malgi, S. H. Deshpande, S. A. Patil, a S. P. Mallapur, „Dual inhibition of COVID-19 spike glycoprotein and main protease 3CLpro by Withanone from Withania somnifera", *Chin Herb Med*, roč. 13, č. 3, s. 359–369, čvc. 2021, doi: 10.1016/j.chmed.2021.06.002.

[40] V. P. Wadegaonkar a P. A. Wadegaonkar, „Withanone as an inhibitor of survivin: A potential drug candidate for cancer therapy", *J Biotechnol*, roč. 168, č. 2, s. 229–233, říj. 2013, doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.028.

[41] R. Wadhwa, H. Kataria, N. Shah, S. C. Kaul, a G. Kaur, „Water extract of Ashwagandha leaves limits proliferation and migration, and induces differentiation in glioma cells", *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, roč. 2011, 2011, doi: 10.1093/ecam/nep188.

[42] D. Sharma, R. Saini, a A. Mishra, „Natural phytocompounds physalin D, withaferin a and withanone target L-asparaginase of Mycobacterium tuberculosis: a molecular dynamics study", *J Biomol Struct Dyn*, roč. 41, č. 7, s. 2645–2659, 2023, doi: 10.1080/07391102.2022.2036239.

[43] „Withanolide A". Viděno: 18. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Withanolide-A

[44] E. A. Crane *et al.*, „Profiling withanolide A for therapeutic targets in neurodegenerative diseases", *Bioorg Med Chem*, roč. 27, č. 12, s. 2508–2520, čer. 2019, doi: 10.1016/j.bmc.2019.03.022.

[45] A. Grover, A. Shandilya, V. Agrawal, V. S. Bisaria, a D. Sundar, „Computational evidence to inhibition of human acetyl cholinesterase by withanolide a for alzheimer treatment", *J Biomol Struct Dyn*, roč. 29, č. 4, s. 651–662, 2012, doi: 10.1080/07391102.2012.10507408.

[46] P. Pathak *et al.*, „Standardized root extract of Withania somnifera and Withanolide A exert moderate vasorelaxant effect in the rat aortic rings by enhancing nitric oxide generation", *J Ethnopharmacol*, roč. 278, říj. 2021, doi: 10.1016/j.jep.2021.114296.

[47] H. Zhang, K. Hagan, O. Patel, X. Tong, V. W. Day, a B. N. Timmermann, „6α,7α-epoxy-5α-hydroxy-1-oxo-22R-witha-2, 24-dienolide(withanolide B), 5β,6β-epoxy-4β,20-dihydroxy-1-oxo- 22R-witha-2,24-dienolide(withanolide D), and 4β,27-Dihydroxy-1-oxo-22R- witha-2,5,24-trienolide(5,6-deoxywithaferin A) in roots of Withania somnifera: Isolation and their crystal structures", *J Chem Crystallogr*, roč. 44, č. 3, s. 169–176, bře. 2014, doi: 10.1007/s10870-014-0499-1.

[48] „Withanolide B". Viděno: 18. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14236711

[49] S. Dubey, M. Kallubai, A. Sarkar, a R. Subramanyam, „Elucidating the active interaction mechanism of phytochemicals withanolide and withanoside derivatives with human serum albumin", *PLoS One*, roč. 13, č. 11, lis. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0200053.

[50] Z. Kuang *et al.*, „Withanolide B promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells via ERK1/2 and Wnt/β-catenin signaling pathways", *Int Immunopharmacol*, roč. 88, lis. 2020, doi: 10.1016/j.intimp.2020.106960.

[51] „Withanoside IV". Viděno: 18. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71312551

[52] T. Kuboyama, C. Tohda, a K. Komatsu, „Withanoside IV and its active metabolite, sominone, attenuate Aβ(25-35)-induced neurodegeneration", *European Journal of Neuroscience*, roč. 23, č. 6, s. 1417–1426, bře. 2006, doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04664.x.

[53] „Withanoside V". Viděno: 18. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10700345

[54] A. K. Narayanan a D. A. Nagegowda, „Biosynthesis of the triterpenoid withanolides in Withania somnifera", 1. říjen 2024, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.pbi.2024.102576.

[55] G. Y. Xia, S. J. Cao, L. X. Chen, a F. Qiu, „Natural withanolides, an update", 24. listopad 2021, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d1np00055a.

[56] „Separační analytické metody - úvod, princip, rozdělení". Viděno: 31. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=155334

[57] „Vysokoúčinná kapalinová chromatografie". Viděno: 30. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=164601

[58] „Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod". Viděno: 30. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://lcms.cz/article/686

[59] „Analytická chemie - skripta (autor: prof. R. Karlíček)". Viděno: 31. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/mod/book/view.php?id=155473&chapterid=3014#mod_book-chapter

[60] „High Performance Liquid Chromatography, HPLC". Viděno: 31. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html

[61] L. Nováková, M. Douša, P. Česla. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.

[62] „Teorie UPLC". Viděno: 31. březen 2025. [Online]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/uplc/teorie_uplc.html#_chrom_parametry

[63] „Moderní trendy v HPLC, iontovýměnná a gelová chromatografie, rychlá chromatografie". Viděno: 31. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=189171

[64] „UHPLC". Viděno: 30. březen 2025. [Online]. Dostupné z: https://www.chromservis.eu/cz/uhplc

[65] R. K. Khajuria *et al.*, „Separation, identification, and quantification of selected withanolides in plant extracts of Withania somnifera by HPLC-UV(DAD) - Positive ion electrospray ionisation-mass spectrometry", *J Sep Sci*, roč. 27, č. 7–8, s. 541–546, kvě. 2004, doi: 10.1002/jssc.200301690.

[66] S. H. Nile *et al.*, „Chemical composition, cytotoxic and pro-inflammatory enzyme inhibitory properties of Withania somnifera (L.) Dunal root extracts", *South African Journal of Botany*, roč. 151, s. 46–53, pro. 2022, doi: 10.1016/j.sajb.2021.11.003.

[67] N. Das Chaurasiya *et al.*, „Analysis of withanolides in root and leaf of Withania somnifera by HPLC with photodiode array and evaporative light scattering detection", *Phytochemical Analysis*, roč. 19, č. 2, s. 148–154, 2008, doi: 10.1002/pca.1029.

[68] S. Kumar, R. Singh, N. Gajbhiye, a T. Dhanani, „Extraction optimization for phenolic- and withanolide-rich fractions from withania somnifera roots: Identification and quantification of withaferin a, 12-deoxywithastromonolide, and withanolide a in plant materials and marketed formulations using a reversed-phase HPLC–photodiode array detection method", *J AOAC Int*, roč. 101, č. 6, s. 1773–1780, 2018, doi: 10.5740/jaoacint.18-0081.

[69] M. Ganzera, M. I. Choudhary, a I. A. Khan, „Quantitative HPLC analysis of withanolides in Withania somnifera", *Fitoterapia*, roč. 74, č. 1–2, s. 68–76, 2003, doi: 10.1016/S0367-326X(02)00325-8.

[70] L. Zellner, M. Wierer, M. Himmelsbach, B. Schatzmann, B. Thalhamer, a C. W. Klampfl, „Determination of Withanolides and Withanosides in Ashwagandha Based Products Using HPLC-Drift-Tube-Ion-Mobility Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry", *Electrophoresis*, 2025, doi: 10.1002/elps.202400188.

[71] V. Tomar, T. Beuerle, a D. Sircar, „A validated HPTLC method for the simultaneous quantifications of three phenolic acids and three withanolides from Withania somnifera plants and its herbal products", *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, roč. 1124, s. 154–160, srp. 2019, doi: 10.1016/j.jchromb.2019.06.009.

[72] P. Chandra *et al.*, „Quantitative determination of multi markers in five varieties of Withania somnifera using ultra-high performance liquid chromatography with hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer combined with multivariate analysis: Application to pharmaceutical dosage forms", *J Pharm Biomed Anal*, roč. 129, s. 419–426, zář. 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2016.07.032.

9 Seznam obrázků a tabulek

9.1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Vitánie snodárná 12
Obrázek 2: Zralé (vlevo) a nezralé (vpravo) plody Vitánie Snodárné 13
Obrázek 3: Kořeny Vitánie snodárné 14
Obrázek 4: Chemická struktura withaferinu A 20
Obrázek 5: Chemická struktura withanonu 21
Obrázek 6: Chemická struktura withanolidu A 22
Obrázek 7: Chemická struktura withanolidu B 24
Obrázek 8: Chemická struktura withanosidu IV 24
Obrázek 9: Chemická struktura withanosidu V 25
Obrázek 10: Absorpční spektrum withaferinu A 40
Obrázek 11: Absorpční spektrum withanolidu A 40
Obrázek 12: Absorpční spektrum withanolidu B 40
Obrázek 13: Absorpční spektrum withanonu 40
Obrázek 14: Absorpční spektrum withanosidu IV 41
Obrázek 15: Absorpční spektrum withanosidu V 41
Obrázek 16: Chromatogram průběhu separace na koloně YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm; 3 µm, gradient A1 45
Obrázek 17: Chromatogram průběhu separace na koloně YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm; 3 µm, gradient B1 45
Obrázek 18: Chromatogram průběhu separace na koloně YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm; 3 µm, gradient C1 45
Obrázek 19: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,6 µm, gradient A3 46
Obrázek 20: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,6 µm, gradient B3 46
Obrázek 21: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,6 µm, gradient C3 46
Obrázek 22: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm; 5 µm, gradient A 47
Obrázek 23: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm; 5 µm, gradient B1 47
Obrázek 24: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna Omega Polar C18 100 Å 150 x 4,6 mm; 5 µm, gradient C1 47
Obrázek 25: Chromatogram průběhu separace na koloně Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm; 2,6 µm, gradient A1 48
Obrázek 26: Chromatogram průběhu separace na koloně Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm; 2,6 µm, gradient B1 48

Obrázek 27: Chromatogram průběhu separace na koloně Kinetex F5 100 Å 150 x 4,6 mm; 2,6 µm, gradient C1 48
Obrázek 28: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu A1 za použití methanolu jako organické složky mobilní fáze 49
Obrázek 29: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu C1 za použití methanolu jako organické složky mobilní fáze 49
Obrázek 30: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu A1 za použití kyseliny mravenčí jako organické složky mobilní fáze 50
Obrázek 31: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu C1 za použití kyseliny mravenčí jako organické složky mobilní fáze 50
Obrázek 32: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu A1 za použití acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze 50
Obrázek 33: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ C18 150 x 4,6 mm; 2,7 µm při gradientu C1 za použití acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze 51
Obrázek 34: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí 25 % methanolu 52
Obrázek 35: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí 50 % methanolu 52
Obrázek 36: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain pomocí 75 % methanolu 52
Obrázek 37: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí 100 % methanolu 53
Obrázek 38: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí acetonitrilu 53
Obrázek 39: Chromatogram po extrakci 100 mg doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) pomocí ultračisté vody 53
Obrázek 40: Chromatogramy zobrazující test vhodnosti chromatografického systému naměřené při vlnových délkách 215 nm a 228 nm 54
Obrázek 41: Graf kalibrační závislosti pro withaferin A 56
Obrázek 42: Graf kalibrační závislosti pro withanolid A 57
Obrázek 43: Graf kalibrační závislosti pro withanolid B 58
Obrázek 44: Graf kalibrační závislosti pro withanon 59
Obrázek 45: Graf kalibrační závislosti withanosidu IV 60
Obrázek 46: Graf kalibrační závislosti withanosidu V 61

Obrázek 47: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha BIO Organic (Blendea) při 215 nm 63
Obrázek 48: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha BIO Organic (Blendea) při 228 nm 63
Obrázek 49: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (ActiveLab) při 215 nm..... 64
Obrázek 50: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (ActiveLab) při 228 nm..... 64
Obrázek 51: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd) při 215 nm 64
Obrázek 52: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Kräuterhaus Sanct Bernahrd) při 228 nm 64
Obrázek 53: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha Extract Organic BIO (Viridian) při 215 nm..... 64
Obrázek 54: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha Extract Organic BIO (Viridian) při 228 nm 65
Obrázek 55: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha – tobolky (Green Idea) při 215 nm 65
Obrázek 56: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha – tobolky (Green Idea) při 228 nm 65
Obrázek 57: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (ADVANCE nutraceutics) při 215 nm 66
Obrázek 58: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (ADVANCE nutraceutics) při 228 nm 66
Obrázek 59: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Gym Beam) při 215 nm..... 66
Obrázek 60: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Gym Beam) při 228 nm..... 66
Obrázek 61: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Webber Naturals) při 215 nm 67
Obrázek 62: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Webber Naturals) při 228 nm 67
Obrázek 63: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) při 215 nm 67
Obrázek 64: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Vilgain) při 228 nm 67
Obrázek 65: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Jíme zdravě) při 215 nm 67
Obrázek 66: Chromatogram doplňku stravy Ashwagandha (Jíme zdravě) při 228 nm.....68
Obrázek 67: Porovnání množství withanolidů s přibližnou cenou 1000 mg extraktu..... 72

9.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled možností stanovení withanolidů 31
Tabulka 2: testované kolony 33
Tabulka 3: Analyzované doplňky stravy 35
Tabulka 4: Příprava roztoků methanolu pro extrakci potravních doplňků 36
Tabulka 5: Zásobní roztoky standardů 36
Tabulka 6: Příprava roztoků pro kalibraci 37
Tabulka 7: Finální průběh gradientu pro separaci withanolidů 39
Tabulka 8: Jednotlivé vlnové délky pro detekci stanovovaných analytů 41
Tabulka 9: Gradient A1 42
Tabulka 10: Gradient B1 42
Tabulka 11: Gradient C1 42
Tabulka 12: Gradient D – isokratická eluce 42
Tabulka 13: Gradient E 43
Tabulka 14: Gradient A2 43
Tabulka 15: Gradient B2 43
Tabulka 16: Gradient C2 43
Tabulka 17: Gradient A3 44
Tabulka 18: Gradient B3 44
Tabulka 19: Gradient C3 44
Tabulka 20: Vyhodnocení parametrů testu vhodnosti chromatografického systému. 54
Tabulka 21: Výsledky opakovatelnosti 55
Tabulka 22: Kalibrační závislost pro withaferin A 56
Tabulka 23: Parametry lineární regrese pro withaferin A 56
Tabulka 24: Kalibrační závislost pro withanolid A 57
Tabulka 25: Parametry lineární regrese pro withanolid A 57
Tabulka 26: Kalibrační závislost pro withanolid B 58
Tabulka 27: Parametry lineární regrese pro withanolid B 58
Tabulka 28: Kalibrační závislost pro withanon 59
Tabulka 29: Parametry lineární regrese pro withanon 59
Tabulka 30: Kalibrační závislost pro withanosid IV 60
Tabulka 31: Parametry lineární regrese withanosidu IV 60
Tabulka 32: Kalibrační závislost withanosidu V 61
Tabulka 33: Parametry lineární regrese withanosidu V 61
Tabulka 34: Parametry přesnosti a preciznosti vyvinuté metody 62
Tabulka 35: Výsledky stanovení withanolidů v doplňcích stravy s obsahem extraktu z Ashwagandhy v jednotlivých kapslích 69
Tabulka 36: porovnání deklarovaného a stanoveného množství withanolidů 70