

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Tomáš Lener

Ověření autenticity pozůstatků léčivých přípravků
z 18. století s obsahem jalovce nebo lékořice

Verification of the authenticity of
remains of 18th century medicinal
products containing juniper or liquorice

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14. května 2024.

Abstrakt

Metodou HPLC-MS byly analyzovány tři historické zbytky farmak z 18. století s obsahem jalovce (*Rob juniperi*, *Lignum juniperi*) nebo lékořice (*Pulvis radices liquiritiae*) a pomocí chemotaxonomického přístupu byla ověřována jejich autenticita. Zdrojem chemotaxonomických markerů byl novodobý referenční materiál, ze kterého byla provedena i replikace vzorku *Rob juniperi* podle dvou dobových receptur. HPLC-MS metoda poskytla dobré výsledky, ale ukázala se nedostatečnou pro analýzu vzorku *Lignum juniperi*, a proto byl jalovcový materiál analyzován i metodou GC-MS, která už dostatečný důkaz o autenticitě obou jalovcových vzorků poskytla. Metodou HPLC-MS byl v jalovcovém materiálu poprvé identifikován viridiflorin heptosid, pro který byla, podobně jako pro pět markerů lékořice, naměřena ESI fragmentační spektra a byl navrhnut jejich možný fragmentační mechanismus. Na základě získaných výsledků lze potvrdit přípravu historických vzorků z uvedených rostlin.

Klíčová slova: HPLC-MS, GC-MS, chemotaxonomie, jalovec, lékořice, tandemová hmotnostní spektrometrie, viridiflorin

Abstract

Three remains of historical pharmaceuticals from 18th century containing juniper (*Rob juniperi*, *Lignum juniperi*) or liquorice (*Pulvis radices liquiritiae*) were analyzed by HPLC-MS method and their authenticity was verified using a chemotaxonomic approach. Current reference material was the source of chemotaxonomic markers and also a raw material for replication of *Rob juniperi* according to two period recipes. HPLC-MS method provided good results but was insufficient to analyze *Lignum juniperi*. Therefore, GC-MS method was also used to analyze the juniper samples and it provided sufficient results to prove the authenticity of both juniper samples. HPLC-MS method identified viridiflorin heptoside for the first time in juniper material, for which as well as for five liquorice markers ESI fragmentation spectra were measured and their possible fragmentation mechanism was proposed. Based on the obtained results, the preparation of historical samples from the mentioned plants can be confirmed.

Key words: HPLC-MS, GC-MS, Chemotaxonomy, Juniper, Liquorice, Tandem mass spectrometry, Viridiflorin

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odborné vedení a podnětné rady při psaní této práce a za vstřícnost, ochotu a čas při konzultacích.

Také bych rád poděkoval RNDr. Martinu Štíhovi, Ph.D. za naměření a pomoc s vyhodnocením hmotnostních spekter a za navržení fragmentačních mechanismů vybraných látek.

Mé poděkování patří též Antonu Korbanovi, Ph.D. za zaučení a odborný dohled při měření s metodou plynové chromatografie, věcné připomínky a jeho ochotný přístup.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Historie barokní lékárny	9
2.2	Chemotaxonomie	9
2.3	Jalovec obecný	10
2.3.1	Výskyt jalovce.....	11
2.3.2	Využití jalovce v historii	11
2.3.3	Současné využití jalovce	12
2.3.4	Látky obsažené v jalovci	12
2.3.5	Dobové receptury přípravku <i>Rob juniperi</i>	13
2.4	Lékořice lysá	14
2.4.1	Výskyt lékořice	15
2.4.2	Využití lékořice v historii.....	15
2.4.3	Současné využití lékořice	16
2.4.4	Látky obsažené v lékořici.....	16
2.4.5	Rizika spojená s konzumací lékořice.....	17
3	Experimentální část.....	19
3.1	Popis vzorků.....	19
3.1.1	Historický vzorek jalovcového robu, novodobé jalovcové plody, replikace dvou dobových receptur jalovcového robu	19
3.1.2	Historické a novodobé jalovcové dřevo	21
3.1.3	Historický a novodobý vzorek lékořicového kořene	22
3.2	Chemikálie	23
3.3	Použité postupy, přístroje a metody	24
3.3.1	Příprava novodobého robu z jalovce podle lékopisu z 18. století.....	24
3.3.2	Příprava novodobého robu z jalovce podle lékopisu z 19. století.....	24
3.3.3	Extrakce jalovcových plodů a robů	25
3.3.4	Extrakce jalovcového dřeva	25
3.3.5	HPLC s UV/VIS a MS detekcí (jalovec).....	26

3.3.6	GC s FID a MS detekcí a mikroextrakce tuhou fází.....	27
3.3.7	GC-FID optimalizace	28
3.3.8	Extrakce lékořicového materiálu	29
3.3.9	HPLC s UV/VIS a MS detekcí (lékořice)	29
4	Výsledky a diskuse.....	31
4.1	Analýza jalovcových historických vzorků	31
4.1.1	HPLC s MS detekcí.....	31
4.1.2	GC s MS detekcí	33
4.1.3	Vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie viridiflorinu	36
4.2	Analýza historického prášku z lékořicového kořene	37
4.2.1	HPLC s UV/VIS detekcí	37
4.2.2	HPLC s MS/MS detekcí	38
4.2.3	Návrh fragmentačních mechanismů pěti nalezených chemotaxonomických markerů lékořice ...	42
5	Závěr.....	47
6	Literatura	48

Seznam zkratek a symbolů

A_λ	absorbance při vlnové délce λ
DAD	detektor s diodovým polem (angl. <i>diod-array detector</i>)
EI	elektronová ionizace (angl. <i>electron ionization</i>)
ESI	elektrosprejová ionizace (angl. <i>electrospray ionization</i>)
FID	plamenový ionizační detektor (angl. <i>flame ionization detector</i>)
m/z	poměr hmotnosti ku náboji iontu
rpm	otáčky za minutu
SPME	mikroextrakce tuhou fází (angl. <i>solid phase micro extraction</i>)
t	čas [min]
t_r	retenční čas [min]

1 Úvod

Tato práce si kladla za cíl provést analýzu celkem tří historických farmak z 18. století, pocházejících z lékárny kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech, které podle dobových nápisů měly obsahovat jalovec nebo lékořici, a za využití chemotaxonomického přístupu se pokusit ověřit autenticitu historických vzorků. Hlavním cílem bylo provést kvalitativní analýzu, ale pokud by to bylo realizovatelné a žádoucí, tak se pokusit i o kvantifikaci a na základě získaných výsledků provedených měření diskutovat složení vzorků po uplynutí delší doby od jejich vzniku a případně zkoumat mechanismy, kterými jednotlivé charakteristické účinné látky degradaci podléhají. Primární metodou používanou v této práci byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie, ale vzhledem k různorodosti látek obsažených v jednotlivých vzorcích byla využita i metoda plynové chromatografie. Pro studium tak komplexního materiálu jako je rostlinný materiál a přípravky z něj vyráběné a celkově historických farmak s omezeným množstvím vzorku, bylo nezbytné používat jako detekci hmotnostní spektrometrii, přesto byla v této práci použita nejprve i v případě kapalinové chromatografie UV/VIS detekce a v případě plynové chromatografie FID detekce pro vyzkoušení a ověření separačních podmínek.

2 Teoretická část

2.1 Historie barokní lékárny

Lékárna kapucínského kláštera u kostela Panny Marie a sv. Andělů v Praze na Hradčanech byla v provozu přibližně od roku 1680 jako soukromá domácí lékárna sloužící především pro potřebu dvou tehdy se v Praze nacházejících kapucínských klášterů. Josefské reformy na konci 18. století vedly ke snižování počtu klášterů, tedy i kapucínů, a v návaznosti na tyto skutečnosti došlo k utlumování činnosti lékárny a definitivnímu ukončení jejího provozu nejpozději roku 1822. Nedošlo však k její likvidaci, a tak zůstala zachována v původním stavu až do roku 1895, kdy byla znovuobjevena a její inventář byl umístěn do sbírek Národního muzea¹. Díky tomu se v ní unikátně zachovaly léčivé přípravky v původním stavu, staré dnes prakticky dvě století.

2.2 Chemotaxonomie

Dělení organismů lze provádět podle různých kritérií^{2,3}. Historicky se vycházelo při třídění organismů do skupin zejména z podobností v jejich vzhledu (morfologii), ale rozvoj separačních metod, především chromatografických, a různých typů detekcí (UV/VIS, MS, NMR) umožnil podrobnější zkoumání organismů na úrovni jejich chemického složení, což vedlo ke vzniku chemotaxonomie, tedy způsobu klasifikace a identifikace organismů podle rozdílů a podobností v jejich chemickém složení. Tato klasifikace je založena zejména na studiu sekundárních metabolitů, které bývají pro jednotlivé druhy charakteristické a často poskytují organismu nějakou výhodu (ochrana, konkurenceschopnost atd.). Jejich syntéza je ale značně ovlivněna abiotickými i biotickými faktory, v čemž spočívá nevýhoda chemotaxonomie.

2.3 Jalovec obecný

Jalovec obecný (*Juniperus communis* L.; obr. 2.1) je jehličnatý stálezelený keř nebo menší strom kuželovitého tvaru z čeledi cypřišovitých rostlin (*Cupressaceae*)^{4,5}. Řadí se do rodu jalovec (*Juniperus*), který čítá okolo 60 druhů, z nichž většina roste na severní polokouli. Jalovec má často více kmenů s hladkou, trhlinatou šedohnědou kůrou, která se pruhovitě odlupuje a trojhranné hnědé větévky nesoucí ve střídavých trojčetných přeslenech uspořádané odstáté tuhé pichlavé šedozelelé jehlice s bílým proužkem na svrchní straně.

Jedná se o rostlinu dvoudomou⁴. Samčí rostliny nesou žluté vejcovité šištice, zatímco na samičích rostlinách lze objevit samičí zelené šištice, kterým po oplození srostou zelené zvětšující se šupiny a zdužnatí. Vzniklý dužnatý plod s tvrdým osemením, šišticová bobule/jalovčinka, změní během zrání, které trvá 2 až 3 roky, postupně barvu ze zelené až na modrou.



Obr. 2.1 Jalovec obecný (převzato z ⁶)

2.3.1 Výskyt jalovce

Jalovec obecný má veliký areál výskytu, roste na severní polokouli⁵. Rozlišují se čtyři hlavní varianty, ale vzhledem k různým geografickým polohám je u jalovce pozorována veliká variabilita v morfologii a také v zastoupení látek obsažených v jalovcovém esenciálním oleji.

2.3.2 Využití jalovce v historii

Jalovec je rostlina, jejíž využití lidmi je archeologickými nálezy dokládáno již v době bronzové⁷. Písemné zmínky o využití této rostliny se pak objevují už ve starověku, kdy byl pro svoji výraznou vůni používán v lidovém léčitelství jako dezinfekční prostředek při epidemiích, ale i pro náboženské účely⁸.

Jalovec zmiňuje například Plinius Starší ve svém díle *Naturalis historia*⁹, kde rozlišuje jalovec na malý a velký. Uvádí prospěšnost jalovcových plodů na bolesti břicha, hrudníku i periférií a zmiňuje jejich močopudnost. Dále uvádí jejich účinky na zmírnění plynatosti, kašle, pocitu chladu a na abscesy. Navíc popisuje i možné použití jalovcového extraktu k mazání na tělo jako prevenci před uštknutím hadem a pálení jalovce k odpuzování hadů. Pálení dřeva nebo plodů jalovce k očištění infekčního vzduchu zmiňuje francouzský lékárník Pierre Pomet ve svém díle *Histoire générale des drogues*¹⁰ z roku 1748. Ve Francii se také k ochraně proti infekcím ve vzduchu vyráběly tzv. *St. Roch's confits*, tedy bonbony vyráběné z jalovcových plodů a pojmenované po světcí a patronu proti moru, sv. Rochu z Montpellier.

Veliký historický význam jalovce pro lidstvo dokládá i existence latinsky psané knihy *Arkeuthologia seu Juniperi descriptio curiosa*¹¹ z roku 1679, která se zabývá pouze jalovcem.

2.3.3 Současné využití jalovce

Drogou získávanou z jalovce jsou jeho plody – jalovčinky⁴. Zralé jalovčinky se sbírají na podzim a mají pryskyřičnatou vůni a kořeněnou chuť, zprvu palčivě sladkou a následně hořkou. Dříve se jako droga využívalo i jalovcové dřevo.

Jak jalovcové dřevo, tak plody lze využít při přípravě pokrmů^{4,12}. Jalovcové plody jsou využívány jako koření na zvěřinu, ryby a zeleninu. Jedná se o jedno z mála koření pocházejících z oblastí s chladným klimatem. Dále jsou jalovčinky nezbytné pro výrobu některých alkoholických nápojů jako například borovičky a ginu. Jalovcové dřevo lze zase použít vzhledem k jeho vůni při uzení masa. Aroma a chuť jalovcových drog je dána těkavými látkami, které jsou obsaženy i v esenciálním oleji jalovce.

Jalovcový olej lze získat destilací jakékoli části rostliny, ale nejvyšší zastoupení je ho obsaženo v jalovcových plodech (0,2–3,42 %)^{8,12}. Jalovcový esenciální olej má jehličnatou hořkou chuť a nachází využití nejen ve farmacii, ale také v aromaterapii a je i účinným odpuzovačem komárů. Význam jalovcového oleje lze doložit také skutečností, že je uváděn i v současném 10. vydání Evropského lékopisu¹³. Jalovcový olej vykazuje diuretický, antiseptický a antirevmatický účinek a také působí proti nadýmání¹⁴.

2.3.4 Látky obsažené v jalovci

Silice jalovce obsahuje především mono- a seskviterpenické uhlovodíky (například α - a β -pinen), kyslíkaté terpenické sloučeniny, zejména pak diuretický působící terpinen-4-ol a také jsou v ní zastoupeny mnohé flavonoidy^{4,14}.

Riziko při konzumaci hrozí při záměně plodů jalovce obecného s jalovcem chvojkou (chvojka klášterská, *Juniperus sabina*), jehož silice obsahuje jedovatý sabinol⁴. Větve tohoto druhu byly dříve také využívány k vyvolání potratu.

Příklady významných skupin látek jalovce a jejich vybraní zástupci jsou uvedeny v tab. 2.1.

Tabulka 2.1

Příklady látek charakteristických pro jalovcové plody, jejich CASRN a zdroj

Skupina látek	Hlavní látka	CASRN	Ref.
Monoterpeny	α -pinen	80-56-8	15, 16
	limonen	138-86-3	15
	myrcen	123-35-3	15
	sabinen	3387-41-5	15, 16
Diterpeny	<i>trans</i> -komunová kyselina	10178-32-2	15, 17
	junicedral	70901-87-0	15
Seskviterpeny	longifolen	475-20-7	17
Fenolické sloučeniny	vanillin	121-33-5	18
Flavonoidy	apigenin	520-36-5	15, 19
	cedren	11028-42-5	15
	(+)-longifolen	475-20-7	15
	luteolin	491-70-3	15
	kvercetin	117-39-5	15, 19
Kumariny	umbeliferon	93-35-6	15

2.3.5 Dobové receptury přípravku *Rob juniperi*

Farmaceutický přípravek *Rob juniperi* (jalovcový rob, „jalovcová povidla“) je přípravek vyráběný ze šťávy jalovčinek oslazených cukrem nebo medem a zahuštěný varem²⁰.

V barokní lékárně kapucínského kláštera na Hradčanech byl používán lékopis *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Vinnense*²¹ z roku 1729. Podle tohoto lékopisu z 18. století spočívá příprava jalovcového robu ve smíchání šesti liber (asi 2,520 kg) čerstvých jalovčinek a půl libry moučkového bílého cukru (asi 210 g), tedy poměr plody:cukr činí 12:1. Směs má být opatrně zahřívána až se dosáhne konzistence povidel.

Přibližně o sto let mladší lékopis *Pharmacopoeia Austriaca*²² z roku 1855 zmiňuje ale přípravu jalovcového robu již komplikovanější. Podle tohoto lékopisu z 19. století se jalovcový rob připravuje vařením rozmačkaných jalovčinek s vodou v poměru 1:4 a následným přepasírováním vzniklé směsi přes bavlněné plátno. Získaná tekutina je pak odpařena do konzistence medu, je k ní přidán cukr v poměru 3:1 a dále je zahřívána, dokud se cukr nerozpustí.

2.4 Lékořice lysá

Lékořice lysá (*Glycyrrhiza glabra* L.; obr. 2.2) je vytrvalá bylina z čeledi bobovitých rostlin (*Fabaceae*)²³. Je pěstována pro své dlouhé dřevnaté kořeny, ze kterých vyrůstají na bázi dřevnatí stonky, dosahující výšky až 1,5 m a nesoucí 15 cm dlouhé složené lichozpeřené listy. Květy fialové barvy jsou uspořádány do hroznovitých květenství. Plodem jsou lysé lusky ukrývající 3 až 8 tmavě zelených semen.

Drogou získávanou z lékořice je její kořen, který je zmíněn i v současném 10. vydání Evropského lékopisu¹³ a je definován jako sušený, loupaný, či neloupaný, celý, či krájený kořen a výhonky (šlahouny) rostliny *Glycyrrhiza glabra* L. a/nebo *Glycyrrhiza inflata* Bat. a/nebo *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.



Obr. 2.2 Lékořice lysá (převzato z ⁶)

2.4.1 Výskyt lékořice

Lékořice lysá (*G. glabra*) pochází z oblasti Středozemního moře a jihovýchodní Asie²³. Z rodu lékořice čítajícího okolo 30 druhů je *G. glabra* spolu s *G. infantia* a *G. uralensis* nejčastěji pěstovaný a zkoumaný druh, ale farmakologicky aktivní látky obsahuje celá již prozkoumaná polovina druhů tohoto rostlinného rodu. Dnes se *G. glabra* pěstuje v celé Evropě, na Středním východě a jihu Asie, zatímco v Číně se pěstují především *G. infantia* a *G. uralensis*.

2.4.2 Využití lékořice v historii

Využití lékořice lidmi sahá v lidské historii až do doby před více než 4 000 lety, kdy se první zmínky o lékořici objevují v Chammurapiho zákoníku a v Asýrii^{23,24}. Ve starověkém Egyptě byla nalezena v Tutanchamonově hrobce (14. století př. Kr.). Starověké egyptské lékařské papyry ji doporučují jako mírné laxativum a expektorans a při vnitřním užití ke zklidnění jater a na nemoci spojené se slinivkou a dýchacím systémem. Lékořici také znali a využívali i v antickém Řecku a Římě. Z řečtiny je odvozeno její latinské jméno *Glycyrrhiza*, které v překladu znamená „sladký kořen“ a odkazuje na sladkou chuť kořene této rostliny. Lékořici uvádí řecký lékař Dioscorides ve svém díle *De Materia Medica*²⁵ a také římský filozof Plinius Starší v díle *Naturalis Historia*⁹, kde je doporučována k léčbě astmatu, kašle, vředů a na neplodnost.

Kromě lékařského využití byla lékořice, konkrétně žvýkání jejího kořene, využívána v kombinaci se sýrem z koňského mléka kočovným národem Skythů²⁶, a poté i římskými vojáky při dlouhých pochodech k zahnání žízně²⁴.

Barokní lékopisy uvádějí více než 45 přípravků z lékořice, což svědčí o její důležitosti i v tomto období²⁷. Využívána byla na léčbu různých respiračních onemocnění, tuberkulózy, horečky, kapavky a mnohých dalších nemocí.

Lékořice se objevuje také v tradiční čínské a indické medicíně, kde si svou úlohu stále udržuje.

2.4.3 Současné využití lékořice

Kořen lékořice se sklízí po třech až čtyřech letech pěstování, a kromě jeho využití v lidovém léčitelství, kde je lékořice označována za nejpoužívanější bylinu – uvádí se, že je používána ve více než 60 % přípravků tradiční čínské medicíny – je používána i ve farmacii jako dochucovadlo a zklidňující a mírné expektorans a může také ulevovat od bolesti při žaludečních vředech^{14,23}. Navíc v lékořici obsažený glycyrrhizin působí protizánětlivě, antivirově a zvyšuje prostupnost léčiv kůží, a tak lze glycyrrhizinový gel využít jako nosič lokálně používaných léčiv.

Lékořice je asi nejvíce známa svým využitím v potravinářství, kde se používá pro svoji sladkou chuť k výrobě cukrovinek a také k dochucování nápojů, např. ochucených čajů. Jako dochucovadlo se lékořice používá i v tabákovém průmyslu, kde je přidávána do směsí žvýkacího tabáku, aby zmírnila hořkost tabákových listů²⁶. Různé další části lékořice nacházejí využití v kosmetice.

2.4.4 Látky obsažené v lékořici

Lékořice, jako všechny rostliny, obsahuje veliké množství různorodých látek. Hlavními biologicky a farmaceuticky aktivními látkami lékořice jsou glycyrrhizin (draselná nebo vápenatá sůl diglukopyranosiduronyl-glycyrrhetinové kyseliny), glabridin, likochalkon A a 18-glycyrrhetinová kyselina²³.

Charakteristickými skupinami jsou pak triterpenové saponiny (např. glycyrrhizin), které způsobují sladkou chuť lékořice²⁸. Další významnou skupinou látek jsou flavonoidy obsažené v lékořicovém kořeni a způsobující jeho žlutou barvu¹⁴.

Příklady významných skupin látek lékořice a vybraní zástupci jsou uvedeni v tab. 2.2.

Tabulka 2.2

Příklady látek charakteristických pro lékořici, jejich CASRN a zdroj

Skupina látek	Hlavní látka	CASRN	Ref.
Triterpenové saponiny	glycyrrhizin	1405-86-3	14,23
	24-hydroxyglycyrrhizin	118441-84-2	23
	glabrová kyselina	22327-86-2	23
Isoflavony	glikorikon	161099-37-2	23
Katechiny	isokvercetin	482-35-9	23
	kvercetin	117-39-5	23
	kaempferol	520-18-3	23
	rutin	153-18-4	23
Polyfenolické sloučeniny	likoricidin	30508-27-1	23
	glabridin	59870-68-7	14,23
	likviritigenin	578-86-9	14,23
	likviritin	551-15-5	14,23
Kumariny	glycyrol	23013-84-5	23
	glycyrin	66056-18-6	23
	umbeliferon	93-35-6	23
Chalkony	isolikviritigenin	961-29-5	23
	echinatin	34221-41-5	23

Velice významné jsou druhově specifické markery, podle kterých lze od sebe odlišit jednotlivé druhy lékořice lišící se v obsahu látek kvalitativně i kvantitativně²³. Příkladem může být sloučenina glabridin, která se vyskytuje pouze v lékořici *G. glabra*, ale další dva často používané druhy lékořice (*G. infanta* a *G. uralensis*) tuto látku neobsahují.

Při ověřování autenticity historického materiálu skladovaného za nespécifikovaných podmínek po velmi dlouho dobu, během které mohlo dojít k mnohým změnám v chemickém složení vzorku, mohou tyto sloučeniny ale spíše jen poukazovat na rod lékořice, protože určování konkrétního druhu by bylo velice nejisté.

2.4.5 Rizika spojená s konzumací lékořice

Přestože lékořice nachází široké využití i v současnosti, s její nadměrnou konzumací jsou spojena velká rizika. *EU Scientific Committee on Food* stanovila v roce 2003 horní limit příjmu glycyrrhizinu na 100 mg/den, což odpovídá přibližně 60 – 70 g lékořice²⁹.

Riziko spočívá v pseudohyperaldosteronismu, tedy syndromu způsobeném zvýšeným příjmem lékořice (například v podobě lékořicových sladkostí). Lékořice, respektive v ní obsažený glycyrrhizin, způsobí inhibici enzymu 21- β -hydroxylasy, což se projeví nárůstem plazmatické koncentrace kortisolu a poklesem plazmatické koncentrace kortisonu. Tyto změny vedou v ledvinách k zadržování iontů sodných a nadměrné ztrátě iontů draselných, což se projeví jako pseudohyperaldosteronismus, tedy stav charakterizovaný hypokalemií, hypertenzí, otoky a poškozením svalů a mozku²⁶.

Konzumace lékořice navíc ovlivňuje i katalytickou aktivitu cytochromu P-450, čímž může ovlivnit farmakokinetiku a farmakodynamiku současně užívaných léků²³.

3 Experimentální část

3.1 Popis vzorků

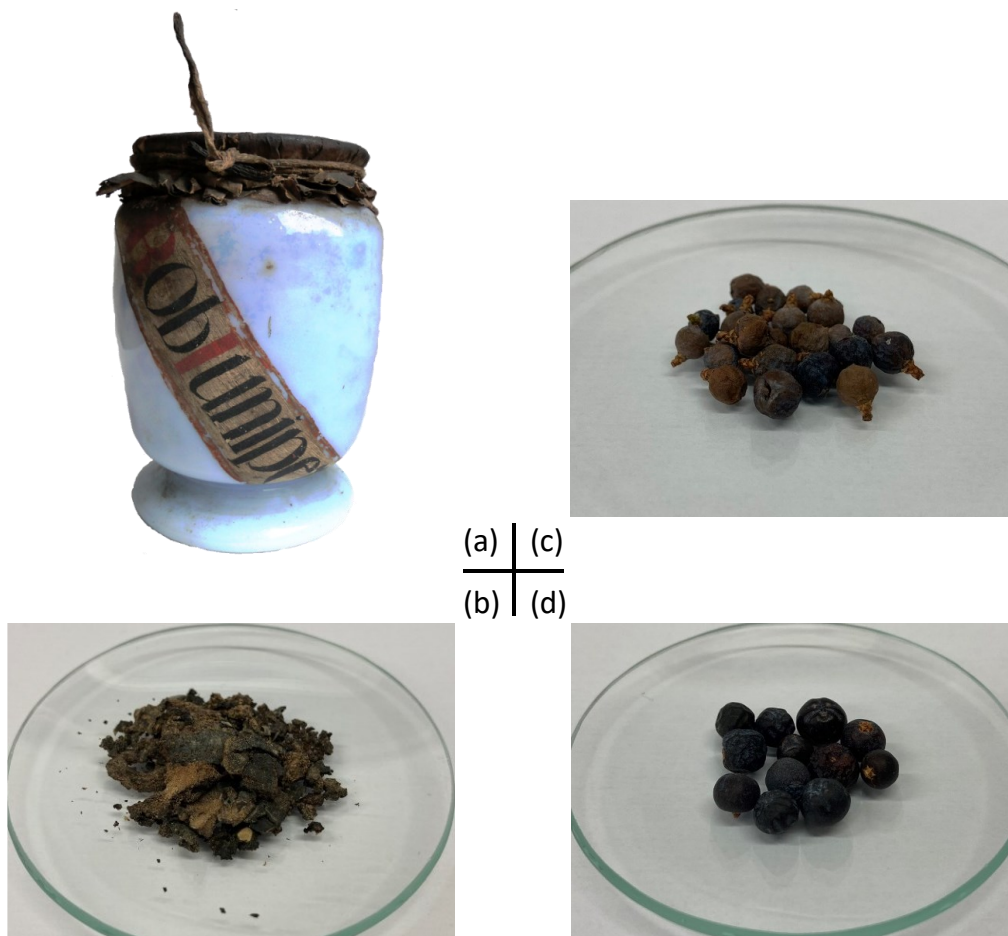
Historické vzorky farmak vyrobených z jalovce (rob a dřevo) a prášek z kořene lékořice pocházející z někdejší lékárny kapucínského kláštera u kostela Panny Marie a sv. Andělů v Praze na Hradčanech byly získány ze sbírek Národního muzea a odebrány z původních barokních stojatek na podzim roku 2022.

Referenčním materiálem sloužícím jako zdroj chemotaxonomických markerů, které nejsou na trhu dostupné ve formě standardů, byly vzorky novodobých přírodnin (novodobé plody a dřevo jalovce a novodobý sušený lékořicový kořen). Pro analýzu jalovcového robu byl navíc připraven referenční materiál replikací tohoto farmaceutického přípravku podle dvou dobových receptur.

3.1.1 Historický vzorek jalovcového robu, novodobé jalovcové plody, replikace dvou dobových receptur jalovcového robu

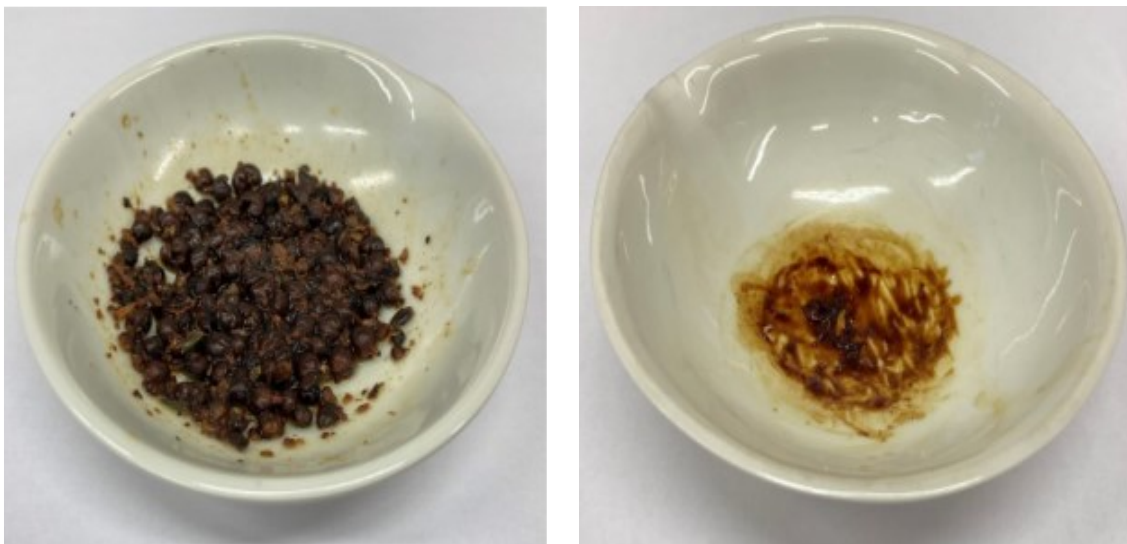
Vzorek historického jalovcového robu (inv. č. H2-4957) byl získán z historické nádoby, vyrobené z bílého skla, o výšce 10 cm a průměru 7 cm, opatřené nápisem „*Rob Juniper*:“ (obr. 3.1a) a uzavřené koženým víčkem s provázkem. Samotný vzorek hrudkovité struktury a tmavě hnědé, místy až černé, barvy (obr. 3.1b), byl odebrán porcelánovou lžičkou.

Jako referenční materiál pro analýzu historického jalovcového robu byly použity novodobé čerstvé (obr. 3.1c) a sušené (obr. 3.1d) jalovcové plody. Čerstvé jalovcové plody byly nasbírány v prosinci 2022 na soukromém pozemku na západě České republiky a byly skladovány v mrazáku. Sušené jalovcové plody byly zakoupeny v roce 2022 v obchodě Salveo v Praze.



Obr. 3.1 (a) barokní farmaceutická nádoba s nápisem „Rob Juniper:“, ve které byl uložen vzorek historického jalovcového robu (inv. č. H2-4957); (b) vzorek historického jalovcového robu; (c) novodobé čerstvé jalovcové plody; (d) novodobé sušené jalovcové plody

Pro analýzu historického jalovcového robu byly jako referenční materiál použity také novodobé replikace dvou dobových receptur (viz odd. 3.3.1 a 3.3.2). První byla připravena podle lékopisu *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Vinnense*²¹ z roku 1729 (lékopis z 18. století), podle kterého byly farmaceutické přípravky připravovány i v historické barokní lékárně. Jelikož ale i po modifikaci dobové receptury opakovaným přidáním vody nebylo dosaženo výsledné konzistence povidel (obr. 3.2a), tak byla provedena i replikace podle lékopisu *Pharmacopoeia Austriaca*²² z roku 1855 (lékopis z 19. století), kde už je postup přípravy komplikovanější, ale výsledná konzistence skutečně povidla připomíná (obr. 3.2b).



(a) | (b)

Obr. 3.2 Výsledek novodobé replikace jalovcového robu podle receptu z lékopisu (a) *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Vinnense* (lékopis z 18. století) a (b) *Pharmacopoeia Austriaca* (lékopis z 19. století)

3.1.2 Historické a novodobé jalovcové dřevo

Vzorek historického jalovcového dřeva (inv. č. H2-4842) byl v lékárně uložen v dřevěné válcovité nádobě o výšce 14 cm a průměru 9 cm opatřené nápisem „*Lig: Iunip:*“ (obr. 3.3a) a skládal se z drobných kousků dřeva nažloutlé až oranžové barvy. Na okrajích některých kousků byly patrné i kousky našedlé kůry (obr. 3.3b).

Jako referenční materiál pro analýzu historického jalovcového dřeva bylo použito novodobé jalovcové dřevo získané z téže rostliny, ze které byly nasbírány novodobé čerstvé jalovcové plody. Novodobé dřevo bylo analyzováno ve dvou variantách – oloupané bez kůry (obr. 3.3c) a s kůrou (obr. 3.3d). Obě varianty byly skladovány v podobě menších kousků v lednici.

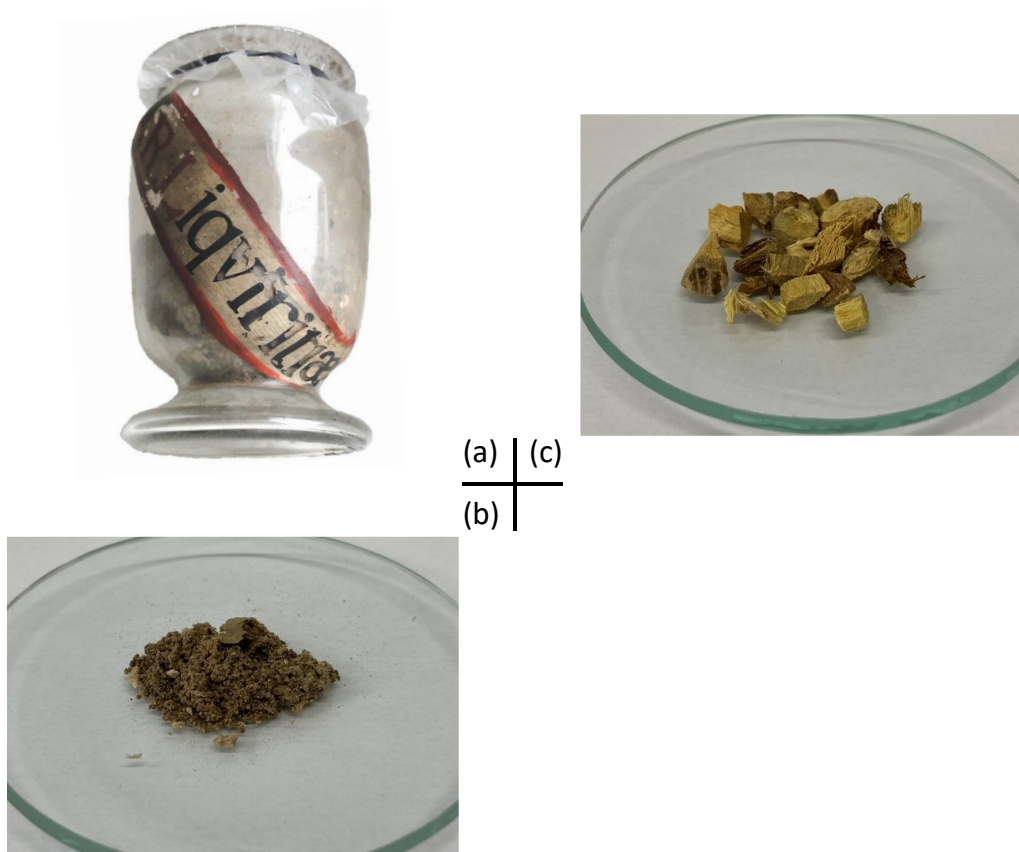


Obr. 3.3 (a) barokní farmaceutická nádoba s nápisem „*Lig: Junip:*“, ve které byl uložen vzorek historického jalovcového dřeva (inv. č. H2-4842); (b) vzorek historického jalovcového dřeva; (c) novodobé jalovcové dřevo loupané; (d) novodobé jalovcové dřevo s kûrou

3.1.3 Historický a novodobý vzorek lékořicového kořene

Historický vzorek prášku z kořene lékořice lysé (inv. č. H2-9480, *Pulvis radice liquoritiae*) byl v lékárně uložen ve skleněné nádobě o výšce 9 cm a průměru 6 cm opatřené nápisem „ ⚗ *R. Liquiritiae*“ (obr. 3.4a) - původní chybějící víčko bylo nahrazeno gumičkou upevněnou polymerovou fólií. Jednalo se o vzdušný hrudkovitý materiál světle hnědé až žluté barvy sdružující se do smotků a místy obsahující větší ploché kousky (obr. 3.4b).

Jako referenční materiál pro analýzu historického prášku z lékořicového kořene byly použity sušené kousky lékořicového kořene (obr. 3.4c) zakoupené v prodejně Salveo (Praha) v prosinci 2022.



Obr. 3.4 (a) barokní farmaceutická nádoba s nápisem „*R. Liquiritiae*“, ve které byl uložen vzorek historického prášku z lékořicového kořene (inv. č. H2-9480); (b) vzorek historického prášku z lékořicového kořene; (c) novodobé kousky lékořicového kořene

3.2 Chemikálie

Ke všem úkonům byla používána voda Milli-Q, tedy deionizovaná voda o měrné vodivosti $< 0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$, která byla získána pomocí přístroje Milli-Q (Millipore, USA). Při HPLC analýze byla také k přípravě složek mobilní fáze používána mravenčí kyselina (98% p. a., Lach-Ner, Česká republika) a acetonitril (pro HPLC-MS; Macron Fine Chemicals, USA).

Extrakčním činidlem byla směs ethanolu (96%, p.a., Penta, Česká republika) a vody Milli-Q okyselená mravenčí kyselinou. V případě lékořice byl použit k extrakci také methanol (pro MS; Biosolve Chimie, Francie).

Při přípravě jalovcových robů podle dobových receptur byla použita sacharosa (Lach-Ner, Česká republika).

3.3 Použité postupy, přístroje a metody

3.3.1 Příprava novodobého robu z jalovce podle lékopisu z 18. století

Na analytických vahách Sartorius R 200 D (Sartalex, Německo) byly odváženy přesně asi 3 g čerstvých v třecí misce rozmačkaných jalovcových plodů. K navážce bylo přidáno 0,25 g cukru (podle poměru plody:cukr = 12:1). Navážky byly promíchány a v porcelánové misce umístěny na vodní lázeň. Po 5 minutách ve vodní lázni plody změkly a byly znovu rozmačkány tloučkem a nechány ve vodní lázni dalších 5 minut. Po celkové době zahřívání ve vodní lázni 10 minut bylo pozorováno spíše vysychání bobulí, a proto bylo přidáno malé množství vody (aby došlo k ponoření celé směsi). Směs byla míchána skleněnou tyčinkou a když byla téměř veškerá voda odpařena, byla přidána další. Celkem byla voda přidána do směsi třikrát, v 10., 22. a 29. minutě zahřívání (vždy když bylo předešlé množství téměř odpařeno). Příprava extraktu byla ukončena po 32 minutách zahřívání, kdy byla téměř všechna voda odpařena a začal se extrakt podobat konzistencí povidlům. Miska byla vyjmuta z lázně, přikryta po vychladnutí Petriho miskou a umístěna do lednice.

3.3.2 Příprava novodobého robu z jalovce podle lékopisu z 19. století

Na analytických vahách byly odváženy přesně asi 3 g čerstvých v třecí misce rozmačkaných jalovcových plodů. Navážka byla umístěna v porcelánové misce na vodní lázeň a hned na začátku zahřívání bylo přidáno 25 ml vody. Směs byla za občasného míchání skleněnou tyčinkou zahřívána 15 minut. Následně byl obsah misky (rozetřené plody s menším množstvím vody než na začátku zahřívání vlivem odparu) pasírován přes čisté bílé plátno a ždímán pomocí lžičky a zatočení plátna do čisté porcelánové misky. Získaná hnědá kapalina byla v porcelánové misce umístěna na vodní lázeň a zahřívána 13 minut. Došlo k zahuštění kapaliny až na požadovanou konzistenci medu a bylo přidáno množství cukru odpovídající přibližně poměru hustá kapalina:cukr = 3:1 (hmotnost přidaného cukru byla 0,34303 g). Po přidání cukru byla kapalina míchána a zahřívána

do rozpuštění veškerého cukru po dobu 2 minut. Miska byla vyjmuta z lázně, přikryta po vychladnutí Petriho miskou a umístěna do lednice.

3.3.3 Extrakce jalovcových plodů a robů

Pomocí extrakčního činidla byla provedena extrakce čerstvých plodů, sušených plodů a historického vzorku jalovce a také z čerstvých jalovcových plodů připravených robů podle lékopisu z 18. a 19. století. Extrakčním činidlem byla směs ethanolu a vody v poměru 7:3 (pH upraveno na hodnotu 2 pomocí mravenčí kyseliny a pH-metru Jenway 3510 (Barloworld Scientific, UK) s elektrodou HC 103 (Theta, ČR)). Pomocí achátové třecí misky s tloučkem byly před vážením homogenizovány (spíše rozmačkány) čerstvé plody, sušené plody a historický extrakt. Na analytických vahách bylo do plastové mikrozkušavky Eppendorf odváženo přesně asi 100 mg vzorků. K navážkám bylo přidáno 1,5 cm³ extrakčního činidla. V případě robu připraveného podle lékopisu z 19. století byla navážka kvůli menšímu množství vzorku pouze přesně asi 75 mg a přídavek extrakčního činidla byl 1,125 ml, tedy byl zachován stejný poměr jako u navážek 100 mg. Vzorky byly třepány na třepače Thermo-Shaker (Grand-bio, EU) při 1000 rpm po dobu 30 minut. Ze vzorků robu podle lékopisu z 19. století byl pipetován 1 ml do centrifugačního filtru (Corning, USA). Všechny vzorky byly umístěny do stolní centrifugy miniSpin plus při 10 000 rpm na 10 minut. Ostatní supernatanty byly přefiltrovány přes 0,2 μm stříkačkový filtr z acetátu celulosy (Whatman) pomocí 1ml plastových stříkaček do vložek ve vialkách. Přefiltrované extrakty robu podle lékopisu z 19. století byly pipetovány rovnou. Takto připravené extrakty byly analyzovány pomocí HPLC s UV/VIS a MS detekcí.

3.3.4 Extrakce jalovcového dřeva

Na analytických vahách bylo odváženo přesně asi 100 mg kousků novodobého (s kůrou a bez kůry) i historického jalovcového dřeva do plastových mikrozkušavek značky Eppendorf a k navážkám bylo přidáno 1,5 ml extrakčního činidla (ethanol:voda = 7:3, okyseleno mravenčí kyselinou na pH = 2). Mikrozkušavky byly dány do ultrazvukové lázně Bandelin Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Německo) na 2,5 h při výkonu

80/320 W a následně byly umístěny do lednice na 7 dnů. Po 7 dnech z nich bylo pipetováno 750 μl do vložek s filtrem v plastových mikrozkuškových a ty byly umístěny do centrifugy na 10 min při 10 000 rpm. Přefiltrované extrakty byly pipetovány do vložek ve vialkách a analyzovány pomocí HPLC s UV/VIS a MS detekcí.

3.3.5 HPLC s UV/VIS a MS detekcí (jalovec)

Podmínky HPLC analýzy byly převzaty od Innocenti a kol.¹² a poupraveny. Analýza byla provedena na koloně XBridge® BEH C18 (150×3 mm, 2.5 μm), jejíž teplota byla temperována na 30 °C. Mobilní fáze byla dvousložková, kdy složkou A byla 0,1% mravenčí kyselina a složkou B byl 100% acetonitril. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml min⁻¹. Byla použita gradientová eluce o celkovém čase analýzy 50 min. Prvních 15 minut bylo množství složky A 75 %. Následně během 10 min lineárně kleslo na 65 % (do 25. minuty chromatogramu) a během dalších 10 min kleslo na 50 % (do 35. minuty chromatogramu). Poté během 5 minut lineárně kleslo na 0 % (do 40. minuty chromatogramu) a takto setrvalo 7 minut (do 47. minuty chromatogramu) a následně během 1 minuty vzrostlo na 75 % (48. minuta chromatogramu) a tak zůstalo konstantní 2 minuty (do 50. minuty chromatogramu).

K UV/VIS detekci byl využit přístroj UHPLC Nexera XR s DAD detektorem (Shimadzu), objem nástřiku byl 1 mm³ a data byla sbírána a vyhodnocována programem LabSolutions 2010 (Shimadzu) při vlnových délkách 254 a 350 nm.

Pro analýzu s tandemovou hmotnostní detekcí prováděnou na přístroji Agilent 1290 Infinity II LC System s binárním čerpadlem byla použita stejná metoda. Objem nástřiku byl 5 mm³. Vysokorozlišující tandemová hmotnostní detekce byla provedena na přístroji Bruker QqTOF compact instrument ovládaném Compass otof Control 4.0 softwarem (Bruker Daltonics, Německo) a data byla vyhodnocována pomocí programu Compass DataAnalysis 4.4 (Bruker Daltonics, Německo). Tandemová hmotnostní spektra byla naměřena v pozitivním i negativním módu elektrosprejové ionizace s rozsahem skenu m/z od 50 do 1000. Průtok zmlžovacího plynu byl 3,0 dm³ min⁻¹ a jeho teplota byla 220 °C. Napětí kapiláry bylo 2800 V. Naměřená hmotnostní spektra byla analyzována pomocí softwaru Compass CompoundCrawler 3.0 (Bruker, Německo) a byla porovnávána s literaturou a databázemi PubChem³⁰, ChemSpider³¹ a ChEBI³².

3.3.6 GC s FID a MS detekcí a mikroextrakce tuhou fází

Pro analýzu vzorků jalovcového dřeva, jalovcových plodů, historického dřeva a historického jalovcového robu byla použita také plynová chromatografie (GC) s FID a MS detekcí. Separace těkavých látek byla provedena podle upravené metody Adamse⁵.

Příprava vzorků byla provedena metodou mikroextrakce tuhou fází (SPME) v uspořádání *Head space*. K zachycení analytů bylo používáno vlákno (SUPELCO Bellefonte) s povrchem 50/30 μm DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan). Toto vlákno lze používat v rozmezí pH 2–11, teploty 230–270 $^{\circ}\text{C}$ a maximálně do teploty 270 $^{\circ}\text{C}$.

Nejprve byla provedena GC analýza s FID detekcí na přístroji GC-2010 (Shimadzu) na koloně Rxi-624 Sil MS 30 m \times 0,25 mm \times 1,4 μm (Max. 320 $^{\circ}\text{C}$) a následně bylo přikročeno k MS detekci na přístroji GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu) s kvadrupólovým detektorem (Shimadzu) na koloně Rxi-1301 Sil MS 60 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm (Max. 320 $^{\circ}\text{C}$). Mobilní fází (nosný plyn) byl pro GC-FID vodík a pro GC-MS bylo použito helium. Lineární rychlost (linear velocity) plynů byla 35,0 cm s^{-1} . Ionizace byla provedena klasickou metodou EI (elektronová ionizace) a k identifikaci látek bylo použito porovnání spekter s databází spekter NIST. Ke zpracování a vyhodnocení chromatogramů a EI spekter byl použit software GCMS Postrun Analysis.

Ke hrubému zjištění optimálních parametrů analýzy i extrakce byla primárně použita metoda GC-FID a k tomuto účelu byl použit vzorek novodobého jalovcového dřeva bez kůry. Po přechodu na MS detekci stejných vzorků byly parametry separace drobně upraveny. Další GC-MS analýzy byly provedeny podle následujících parametrů: teplota injektoru 250 $^{\circ}\text{C}$, splitless mód s časem dávkování 1 min. Teplotní program kolony: počáteční izoterma 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min., zahřátí na 290 $^{\circ}\text{C}$ rychlostí 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ s konečnou izotermou 1 min. Dávkování bylo prováděno manuálně.

Parametry MS detekce: teplota iontového zdroje 200 $^{\circ}\text{C}$, interface teplota 200 $^{\circ}\text{C}$, ionty se registrovaly v režimu skenu $m/z = 29\text{--}300$.

Byla optimalizována také doba extrakce, kdy byla zkoušena extrakce po dobu 3, 5 a 10 min. Za dostačující dobu (vzhledem k poměru intenzita/čas extrakce) trvání extrakce byla vybrána extrakce po dobu 5 min. Vzhledem k nedostatečné těkavosti

některých analytů byla extrakce prováděna jak při laboratorní teplotě, tak po zahřívání po dobu 5 min na asi 90 °C.

V případě měření jalovcových plodů čerstvých, sušených a historického jalovcového robu byly vzorky zhomogenizovány a jejich přiměřené množství bylo dáno do vialek (tak aby pokryly dno). Vzhledem k saturaci MS detektoru některými látkami v novodobých jalovcových plodech byla v případě těchto analýz pozměněna metoda a mód dávkování byl změněn na split s poměrem 1:50. Také v případě novodobých plodů nebyla naměřena varianta se zahříváním, protože obsah látek byl tak vysoký, že došlo k saturaci detektoru již za pokojové teploty.

3.3.7 GC-FID optimalizace

Orientační parametry GC metody byly optimalizovány pomocí FID detektoru na koloně Rxi-624 Sil MS 30 m × 0,25 mm × 1,4 μm (Max. 320 °C) na vzorku novodobého jalovcového dřeva bez kůry. Pro GC-FID měření byl použit split mód a teplota detektoru byla vždy o 10 °C vyšší než konečná teplota teplotního programu.

V prvním kroku byl použit teplotní program začínající na 50 °C a stoupající rychlostí 20 °C min⁻¹ na 90 °C a následně rychlostí 30 °C min⁻¹ na 240 °C s konečnou izotermou 3 min. Celkový čas analýzy byl 10 min. Byl použit split mód se split poměrem 1:10.

V druhém kroku byla prodloužena doba analýzy na 15 min, snížen split poměr na 1:4, zvýšena konečná teplota na 300 °C a prodloužena konečná izoterma na 6 min.

Doba analýzy trvající 15 minut se ukázala zbytečně dlouhou, protože po 10. minutě už nebyly pozorovány žádné další píky, a proto byl čas analýzy nechán 10 min a zkrácena konečná izoterma na 1 min. Tyto parametry byly vyzkoušeny ve třetím kroku optimalizace GC-FID metody. Přehledný souhrn optimalizovaných parametrů je uveden v tab. 3.1. V rámci GC-FID měření byla optimalizována i délka extrakce, která byla vyzkoušena při 3, 5 a 10 min. Za dostačující dobu extrakce (vzhledem k poměru intenzita/čas extrakce) byla vybrána extrakce po dobu 5 min.

V případě MS detekce byla použita kolona se stejnou stacionární fází, ale větší délkou, a proto byla doba analýzy prodloužena na 15 min.

Tabulka 3.1

Souhrn parametrů GC-FID optimalizovaných ve třech krocích

Parametr	1. krok	2. krok	3. krok
Celkový čas analýzy / min	10	15	10
Počáteční teplota / °C	50	50	50
Konečná teplota / °C	240	300	300
Split poměr	1:10	1:4	1:4
Čas dávkování / min	1	1	1
Teplota injektoru / °C	250	250	250
Teplota detektoru / °C	250	310	310

3.3.8 Extrakce lékořicového materiálu

Historický prášek z kořene lékořice lysé i novodobé kousky sušeného lékořicového kořene byly zhomogenizovány v třecí misce s tloučkem a takto zhomogenizovaných vzorků bylo na analytických vahách odváženo přesně asi 100 mg do plastových mikrozkušavek se šroubovacím víčkem. K extrakci byl použit methanol a extrakční činidlo (ethanol:voda = 7:3, okyseleno mravenčí kyselinou na pH = 2). Vždy 1,5 ml daného extrakčního činidla bylo přidáno k navážkám a plastové mikrozkušavky byly umístěny do ultrazvukové lázně na 30 min při výkonu 80/320 W a poté dány do stolní centrifugy při 10 000 rpm na 10 min. Supernatanty byly přefiltrovány přes stříkačkové filtry (0,2 µm) a analyzovány pomocí HPLC s UV/VIS a MS detekcí.

3.3.9 HPLC s UV/VIS a MS detekcí (lékořice)

Podmínky HPLC analýzy byly převzaty od Avula a kol.²⁸. Analýza byla provedena na koloně XBridge® BEH C18 (150×3 mm, 2.5 µm), jejíž teplota byla temperována na 40 °C. Mobilní fáze byla dvousložková, kdy složkou A byl 0,1% vodný roztok mravenčí kyseliny a složkou B byl 0,1% roztok mravenčí kyseliny v acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl 0,21 cm³ min⁻¹. Byla použita gradientová eluce o celkovém čase analýzy 45 min. Během prvních 25 minut lineárně kleslo množství složky A z 90 % na 55 %. Poté během 8 minut kleslo na 0 % složky A (do 33. minuty chromatogramu) a tak setrvalo

7 minut (do 40. minuty chromatogramu), kdy skokově vzrostlo zastoupení složky A na 90 % (do 40. minuty chromatogramu) a tak setrvalo 5 minut (do 45 minuty chromatogramu).

Tato metoda byla provedena s UV/VIS a hmotnostní detekcí, které byly provedeny na stejných přístrojích a se stejnými parametry detekce jako v případě měření materiálu jalovce.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Analýza jalovcových historických vzorků

4.1.1 HPLC s MS detekcí

V rámci HPLC-MS analýzy historického jalovcového robu byly analyzovány pro porovnání i obě varianty připravených novodobých jalovcových robů dle dobových receptur a také sušené i čerstvé jalovcové plody. Novodobé roby sloužily jako ukazatel degradace sloučenin během přípravy robu z jalovcových plodů. Analýzou uvedených vzorků bylo nalezeno v negativním módu ESI celkem 67 látek, ale ne všechny nalezené sloučeniny se nacházely ve všech vzorcích. Porovnáním s literaturou a změřením tandemových spekter s vysokým rozlišením bylo charakterizováno celkem 37 látek. Látky, které byly nalezeny v alespoň dvou vzorcích jsou shrnuty v tab. 4.1.

Sacharosa používaná při přípravě robu byla nalezena v obou replikovaných robech, ale nebyla nalezena v robu historickém. V historickém vzorku nebyly nalezeny ani žádné jiné jednoduché sacharidy. Možným vysvětlením by mohla být mikrobiální degradace sacharosy během několika set let, kdy byl historický vzorek uložen v původní nádobě. Jiným možným vysvětlením by mohlo být i nepřidání cukru během přípravy historického robu.

Současně v historickém robu a novodobých jalovcových vzorcích bylo nalezeno celkem 6 látek. Jednalo se o kvercetin 3-O- β -D-xylopyranosid, apigenin 7-O- β -D-glukosid, kaempferol 3-O- β -D-xylopyranosid, kvercetin, kvercetin, a viridiflorin heptosid. Jedná se o látky charakteristické pro jalovec až na viridiflorin heptosid, což je látka, která nebyla dosud v jalovci literaturou popsána, ale v rámci provedené analýzy byla nalezena i v novodobých jalovcových plodech. V případě čtyř látek se jedná o glykosidy a jejich přítomnost v historickém vzorku svědčí o jejich stabilitě. Některé jiné

pro jalovec charakteristické glykosidy (prokyanidin B₂, apigenin, amentoflavon, sekvojaflavon, imbrikatolová kyselina a isokupressová kyselina) byly nalezeny pouze v novodobých vzorcích, což by mohlo být způsobeno jejich degradací v historickém vzorku v průběhu let, a tedy poukazovat na jejich nižší stabilitu.

Tabulka 4.1

Látky nalezené pomocí HPLC-MS/MS v historickém vzorku jalovcového robu (HR), novodobém robu R1 a R2 a čerstvých (PČ) a sušených (PS) jalovcových plodech (retenční čas, jméno a CASRN látky, vzorec, [M-H]⁻ ion, přítomnost ve vzorku, reference k určení látky)

<i>t_r</i> / min	Sloučenina, CASRN	Vzorec	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	Přítomnost ve vzorku					Ref.
				HR	R1	R2	PČ	PS	
1,7	Citronová kyselina, [77-92-9]	C ₆ H ₈ O ₇	191,0563	√	√	√	√		
1,7	Sacharosa, [57-50-1]	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,1086	√	√				
2,2	Prokyanidin B ₂ , [29106-49-8]	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1360	√	√	√			17, 33
2,3	Katechin, [154-23-4]	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0719	√	√	√			33, 34
2,4	Rutin, [153-18-4]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1477				√	√	
2,6	Kvercetin 3- <i>O</i> -β-D-glukopyranosid, [482-35-9]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0899	√	√	√	√	√	19
2,9	Dietylfumarát, [623-91-6]	C ₈ H ₁₂ O ₄	171,067	√					
3,5	Kvercetin 3- <i>O</i> -β-D-xylopyranosid, [549-32-6]	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433,0773	√	√	√	√	√	35
4,0	Apigenin 7- <i>O</i> -β-D-glukosid, [578-74-5]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431,0988	√		√	√	√	12, 19
5,1	Kaempferol 3- <i>O</i> -β-D-xylopyranosid, [61117-16-6]	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417,0000	√	√	√	√	√	34
5,3	Kvercetin, [117-39-5]	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301, 2172	√	√	√	√	√	34, 12
5,5	Kvercetin, [522-12-3]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0922	√	√	√	√	√	33
6,0	<i>Nevyřešeno</i>	C ₂₀ H ₁₈ O ₉	401,0878		√	√	√	√	
6,8	Luteolin, [491-70-3]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0897		√	√		√	12, 15
12,7	Viridiflorin heptosid ^a	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623,1960	√		√	√	√	— ^a
16,1	Diosmetin, [520-34-3]	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299,2009				√	√	36
16,4	Apigenin, [520-36-5]	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269,0442		√	√	√	√	12, 19, 15
17,2	Negundin B, [844692-51-9]	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	357,1343			√	√	√	37
21,9	Amentoflavon, [1617-53-4]	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	537,0782	√	√	√	√	√	33, 12
30,3	<i>Nevyřešeno</i>	C ₂₁ H ₂₂ O ₇	385,1296				√	√	
33,7	Sekvojaflavon, [21763-71-3]	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₀	551,0974	√	√	√	√	√	38
38,6	<i>Nevyřešeno</i>	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	303,1974	√	√			√	
39,1	Imbrikatolová kyselina, [6832-60-6]	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	321,3434	√	√			√	39, 40
40,3	Isokupressová kyselina, [1909-91-7]	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	319,2148	√	√	√	√	√	15, 39

^a Rozbor MS/MS spektra je proveden v odst. 4.1.3.

V případě vzorku historického jalovcového dřeva byly stejnou metodou HPLC-MS analyzovány i dvě varianty jalovcového dřeva novodobého (bez kůry a s kůrou). V negativním módu ESI se podařilo nalézt pouze 8 látek, z čehož se pouze 4 vyskytovaly zároveň v historickém i novodobém vzorku (tab. 4.2). Jelikož žádná z nalezených látek

není tak charakteristická pro jalovec, že by její přítomnost v historickém vzorku stačila jako důkaz, že historický vzorek je skutečně jalovcové dřevo, bylo přikročeno k analýze plynovou chromatografií s MS detekcí.

Tabulka 4.2

Látky nalezené pomocí HPLC-MS/MS v historickém vzorku jalovcového dřeva (HD) a novodobého jalovcového dřeva loupaného (DL) a s kůrou (DK) (retenční čas, jméno a CASRN látky, vzorec, $[M-H]^-$ ion, přítomnost ve vzorku, reference k určení látky)

t_r / min	Sloučenina, CASRN	Vzorec	m/z $[M-H]^-$	Přítomnost ve vzorku			Ref.
				HD	DL	DK	
2,8	<i>Nevyřešeno</i>	$C_{25}H_{32}O_{10}$	491,1916	√	√	√	
5,2	<i>Nevyřešeno</i>	$C_{26}H_{32}O_{11}$	519,1878	√	√	√	
37,7	[6]-Gingerol, [23513-14-6]	$C_{17}H_{26}O_4$	293,1763	√	√	√	41
39,1	Imbrikatolová kyselina, [6832-60-6]	$C_{20}H_{34}O_3$	321,3434	√		√	39, 40

4.1.2 GC s MS detekcí

Vzhledem k nedostatečné identifikaci chemotaxonomických markerů jalovce v historickém vzorku jalovcového dřeva pomocí HPLC-MS bylo přikročeno k analýze obou historických jalovcových vzorků pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, která je ve spojení s mikroextrakcí tuhou fází velice vhodná k analýze těkavých látek hojně obsažených v jalovci, jak uvádí literatura⁴².

Pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí byl analyzován historický vzorek jalovcového dřeva a obě varianty novodobého jalovcového dřeva (s kůrou a bez kůry). Látky nalezené alespoň ve dvou vzorcích jsou uvedeny v tab. 4.3. Celkem 12 látek s literaturou^{43–47} doložitelným výskytem v jalovci bylo nalezeno v historickém a obou variantách novodobého jalovcového dřeva, čímž se podařilo nalézt dostatečný důkaz o autenticitě historického jalovcového dřeva. Pozoruhodná je také skutečnost, že těkavé látky jsou v jalovcovém dřevě přítomné i po více než 200 letech.

Tabulka 4.3

Látky nalezené pomocí GC-MS v historickém vzorku jalovcového dřeva (HD) a novodobého jalovcového dřeva loupaného (DL) a s kůrou (DK) (retenční čas, jméno a CASRN látky, vzorec, experimentální m/z molekulárního iontu, přítomnost látky v analyzovaném vzorku, reference k určení látky)

t_r / min	Sloučenina, CASRN	Vzorec	m/z	Přítomnost ve vzorku						Ref.
				Extrakce I. ^a			Extrakce II. ^b			
				HD	DL	DK	HD	DL	DK	
7,2	α -Pinen, [80-56-8]	C ₁₀ H ₁₆	136,2	√	√	√	√	√	√	43, 44, 45, 46
7,4	(±)-Kamfen, [79-92-5]	C ₁₀ H ₁₆	136,2			√		√	√	44, 45
7,7	β -Pinen, [127-91-3]	C ₁₀ H ₁₆	136,2			√			√	44, 45
7,8	β -Myrcen, [123-35-3]	C ₁₀ H ₁₆	136,2			√				44, 45, 46
8,0	3-Caren, [13466-78-9]	C ₁₀ H ₁₆	136,2			√		√	√	44, 45
8,2	D-Limonen, [5989-27-5]	C ₁₀ H ₁₆	136,2	√	√	√		√		44, 45, 46
9,7	Terpinen-4-ol, [562-74-3]	C ₁₀ H ₁₈ O	154,3		√	√		√	√	44, 45
11,0	α -Kopaen, [3856-25-5]	C ₁₅ H ₂₄	204,4	√	√	√	√	√	√	43, 44, 45, 46
11,4	α -Cedren, [469-61-4]	C ₁₅ H ₂₄	204,4		√		√			43
11,5	β -Cedren, [546-28-1]	C ₁₅ H ₂₄	204,4	√		√		√		43
11,6	<i>cis</i> -Thujopsen, [32435-95-3]	C ₁₅ H ₂₄	204,4	√	√		√	√	√	44, 46
11,7	γ -Muurolen, [30021-74-0]	C ₁₅ H ₂₄	204,4		√	√		√	√	44
12,0	β -Kadinen, [523-47-7]	C ₁₅ H ₂₄	204,4	√	√	√		√	√	43, 44, 46
12,0	(+)-Cuparen, [16982-00-6]	C ₁₅ H ₂₄	202,3	√	√		√	√		43, 44
12,1	(-)-Calamenen, [483-77-2]	C ₁₅ H ₂₄	202,3	√	√	√	√	√		43
12,9	α -Cedrol, [77-53-2]	C ₁₅ H ₂₆ O	222,4	√			√		√	43
13,1	Cadalen, [483-78-3]	C ₁₅ H ₁₈	198,3	√	√	√	√	√	√	43, 44
13,8	(-)-Isolongifolol acetat, [18367-70-9]	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264,4	√			√			47

^a vzorky byly nechány za laboratorní teploty a doba extrakce byla 5 min

^b vzorky byly zahřívány 5 min na 90 °C s následnou extrakcí po dobu 5 min

Vzhledem k úspěšnému nalezení těkavých látek pomocí GC-MS v historickém jalovcovém dřevě byl stejnou metodou analyzován i vzorek historického jalovcového robu a novodobých jalovcových plodů čerstvých a sušených. V těchto vzorcích se celkem podařilo nalézt 27 látek charakteristických pro jalovec a přítomných alespoň ve dvou vzorkách, což shrnuje tab. 4.4. Celkem 25 těchto látek bylo přítomno jak v historickém robu, tak i v některém z novodobých vzorků a podporuje tedy potvrzení autenticity historického robu metodou HPLC-MS. Čtyři látky byly nalezeny pouze v historickém robu. Jednalo se o terpenoidy ylangen, α -muurolen a α -calacoren vyskytující se v jalovcovém oleji pouze v nízkých koncentracích a nejspíše došlo k jejich zakoncentrování při přípravě jalovcového robu, zatímco v novodobém referenčním materiálu jalovcových plodů vzhledem k jejich nízké koncentraci detegovány nebyly⁴⁸. Čtvrtou látkou je γ -selinen charakteristický pro jehlice jalovce⁴⁴. Jeho přítomnost

v historickém přípravku *Rob juniperi* tedy poukazuje na kontaminaci jalovcových plodů jehlicemi jalovce při přípravě povidel, což jen utvrzuje autenticitu tohoto vzorku.

Tabulka 4.4

Látky nalezené pomocí GC-MS ve vzorku historického jalovcového robu (HR) a v novodobých čerstvých (PČ) a sušených (PS) jalovcových plodů (retenční čas, jméno a CASRN látky, vzorec, experimentální *m/z* molekulárního iontu, přítomnost látky v analyzovaném vzorku, reference k určení látky)

<i>t_R</i> / min	Sloučenina, CASRN	Vzorek	<i>m/z</i>	Přítomnost ve vzorku				Ref.
				HR ^a	HR ^b	PČ	PS	
7,1	(±)- α -Thujen, [2867-05-2]	C ₁₀ H ₁₆	136,2	√	√	√		43
7,2	α -Pinen, [80-56-8]	C ₁₀ H ₁₆	136,2	√	√	√	√	43, 44, 45, 46
7,4	(±)-Kamfen, [79-92-5]	C ₁₀ H ₁₆	136,2		√	√		44, 45
7,5	Thuja-2,4(10)-dien, [36262-09-6]	C ₁₀ H ₁₄	134,2		√		√	5
7,7	Sabinen, [3387-41-5]	C ₁₀ H ₁₆	136,2		√	√		43
7,7	β -Pinen, [127-91-3]	C ₁₀ H ₁₆	136,2		√	√	√	44, 45
7,8	β -Myrcen, [123-35-3]	C ₁₀ H ₁₆	136,2			√	√	44, 45, 46
8,2	D-Limonen, [5989-27-5]	C ₁₀ H ₁₆	136,2	√	√	√	√	44, 45, 46
8,2	o-Cymen, [527-84-4]	C ₁₀ H ₁₄	134,2	√		√	√	5
8,2	β -Fellandren, [555-10-2]	C ₁₀ H ₁₆	136,2			√	√	44
8,3	1,8-Cineol, [470-82-6]	C ₁₀ H ₁₈ O	154,3	√			√	43
8,4	γ -Terpinen, [99-85-4]	C ₁₀ H ₁₆	136,2		√	√		44
9,0	Linalool, [78-70-6]	C ₁₀ H ₁₈ O	154,3	√		√		43
9,7	Terpinen-4-ol, [562-74-3]	C ₁₀ H ₁₈ O	154,3	√		√		44, 45
10,5	Bornyl acetat, [76-49-3]	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196,3		√	√	√	43
10,8	α -Cubeben, [17699-14-8]	C ₁₅ H ₂₄	204,4		√	√	√	43
11,0	Ylangen, [14912-44-8]	C ₁₅ H ₂₄	204,4	√	√			43
11,0	α -Kopaen, [3856-25-5]	C ₁₅ H ₂₄	204,4	√	√	√	√	43, 44, 45, 46
11,2	(-)- β -Elemen, [515-13-9]	C ₁₅ H ₂₄	204,4	√	√	√	√	43
11,7	(1Z,4Z,7Z)-1,5,9,9-Tetramethyl-1,4,7-cykloundekatrien, [400822-79-9]	C ₁₅ H ₂₄	204,4		√	√	√	49
11,7	γ -Muurolen, [30021-74-0]	C ₁₅ H ₂₄	204,4		√			44
12,0	β -Kadinen, [523-47-7]	C ₁₅ H ₂₄	204,4	√		√	√	43, 44, 46
11,8	α -Muurolen, [10208-80-7]	C ₁₅ H ₂₄	204,4	√	√			43
11,9	β -Selinen, [17066-67-0]	C ₁₅ H ₂₄	204,4		√	√	√	43
12,2	γ -Selinen, [515-17-3]	C ₁₅ H ₂₄	204,4	√	√			43
12,2	Selina-3,7(11)-dien, [6813-21-4]	C ₁₅ H ₂₄	204,4		√		√	43
12,2	α -Calacoren, [21391-99-1]	C ₁₅ H ₂₀	200,3	√	√			43

^a vzorky byly nechány za laboratorní teploty a doba extrakce byla 5 min

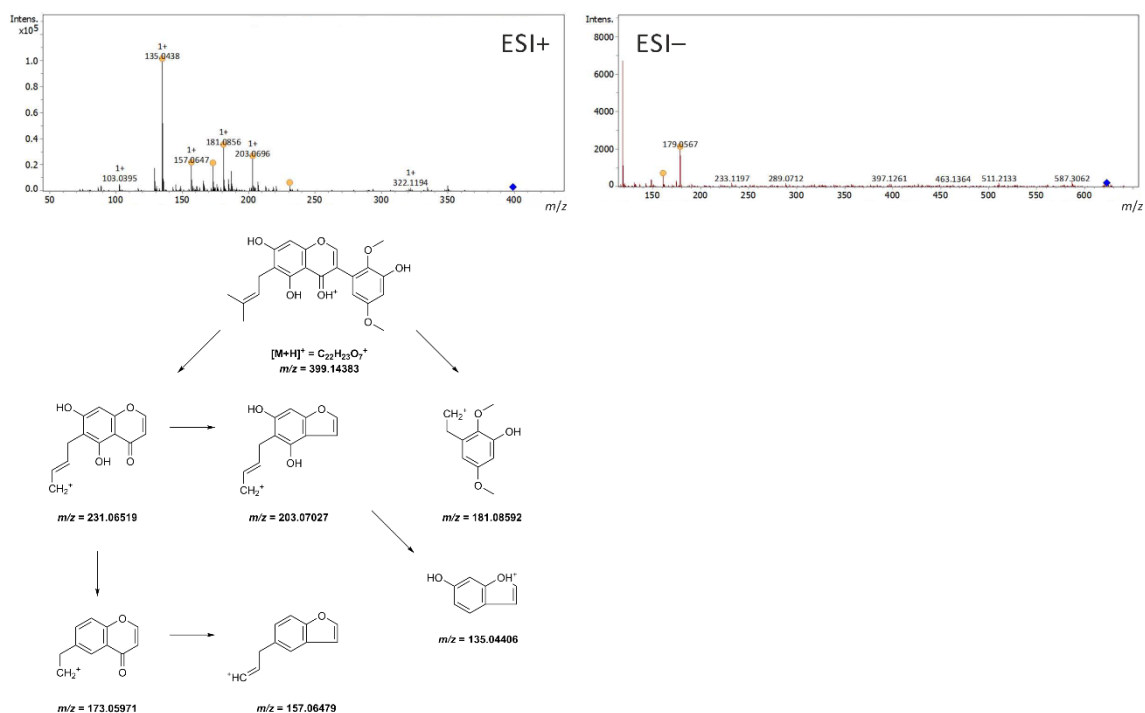
^b vzorky byly zahřívány 5 min na 90 °C s následnou extrakcí po dobu 5 min

4.1.3 Vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie viridiflorinu

K identifikaci sloučeniny s retenčním časem 12,7 min nalezené pomocí HPLC-MS analýzy v historickém jalovcovém robu a i v novodobém referenčním materiálu byla provedena vysokorozlišující tandemová hmotnostní spektrometrie a získaná spektra byla porovnána s literaturou, na jejímž základě byla sloučenina určena jako viridiflorin heptosid. Jedná se o isoflavon, který byl poprvé objeven v rostlině *Tephrosia viridiflora*⁵⁰ a také byl nalezen v rostlinách *Ficus carica*⁵¹ a *Millettia brandisiana*⁵², ale dosud nebyl identifikován v jalovci obecném.

Hmotnostní spektrum viridiflorinu ani jeho fragmentační mechanismus nebyly dosud publikovány, a proto bylo změřeno tandemové hmotnostní spektrum v negativním i pozitivním módu elektrosprejové ionizace a pro pozitivní mód byl navržen fragmentační mechanismus (obr. 4.1).

V negativním módu ESI byl v čase 12,7 min pozorován molekulární ion $[M-H]^-$ s $m/z = 623,1960$ (vzorec $C_{29}H_{36}O_{15}$ o hmotě 624,59 Da), zatímco v pozitivním módu byl ve stejném čase pozorován molekulární ion $[M+H]^+$ o $m/z = 399,1433$ (vzorec $C_{22}H_{22}O_7$ o hmotě 398,41 Da). Rozdíl těchto fragmentů odpovídá vzorci $C_7H_{14}O_8$ o hmotě 226,181 Da a mohlo by se tedy jednat o sacharidovou jednotku ze skupiny heptosidů. V pozitivním módu ionizace je sacharidová složka viridiflorin heptosidu již odštěpena, a navíc je toto spektrum znatelněji bohatší na fragmenty, a proto byla možná cesta fragmentace viridiflorinu navržena pro pozitivní mód. Fragmenty vznikající touto cestou jsou analogické fragmentům vznikajících v hmotnostních spektrech jiných flavonoidů a isoflavonoidů^{53, 54}, což podporuje správnost tohoto návrhu.

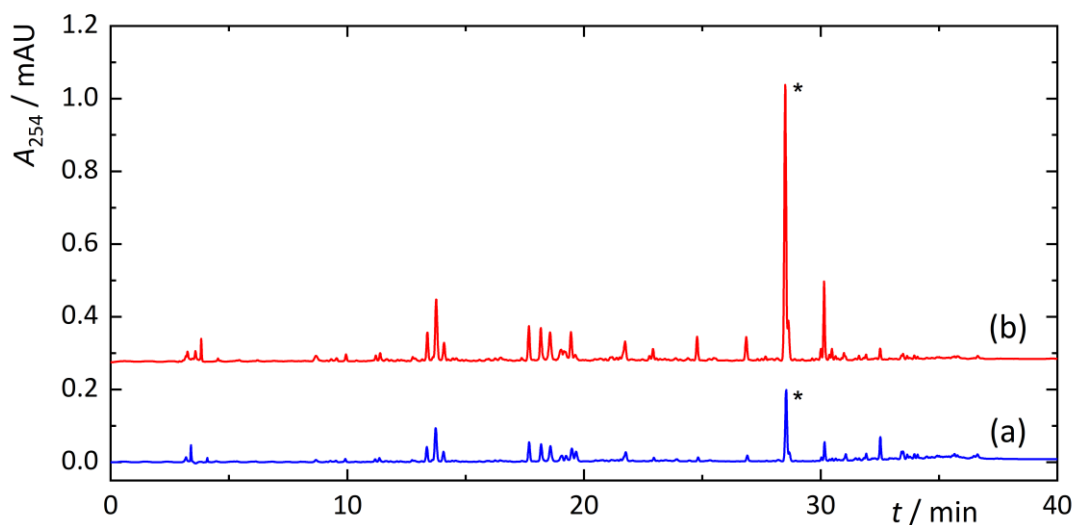


Obr. 4.1 ESI–MS² spektra produktových iontů prekurzorového iontu viridiflorinu v ESI⁺ a viridiflorin heptosidu v ESI[–] (označeny kosočtvercem) a návrh ESI⁺–MS² fragmentace viridiflorinu (*m/z* hodnoty byly vypočítány)

4.2 Analýza historického prášku z lékořicového kořene

4.2.1 HPLC s UV/VIS detekcí

HPLC s UV/VIS detekcí sloužila k ověření podmínek separace a zároveň i k porovnání účinnosti extrakce pomocí daných extrakčních činidel. Při porovnání chromatogramů extraktů novodobého sušeného lékořicového kořene extrahovaného methanolem (obr. 4.2a) a směsí ethanolu a vody v poměru 7:3 okyselené mravenčí kyselinou na pH = 2 (obr. 4.2b) byla patrná vyšší intenzita některých píků při použití okyseleného ethanolického extrakčního činidla. V případě některých píků bylo ale pozorováno snížení jejich intenzity, a proto byly pomocí HPLC-MS metody analyzovány oba typy extraktů. Pík označený hvězdičkou byl s určitou pravděpodobností identifikován jako glycyrrhizin na základě porovnání UV/VIS spekter s absorpčním maximem při 250 nm uvedených v literatuře⁵⁵ a retenčního času zjištěného pomocí hmotnostní detekce.



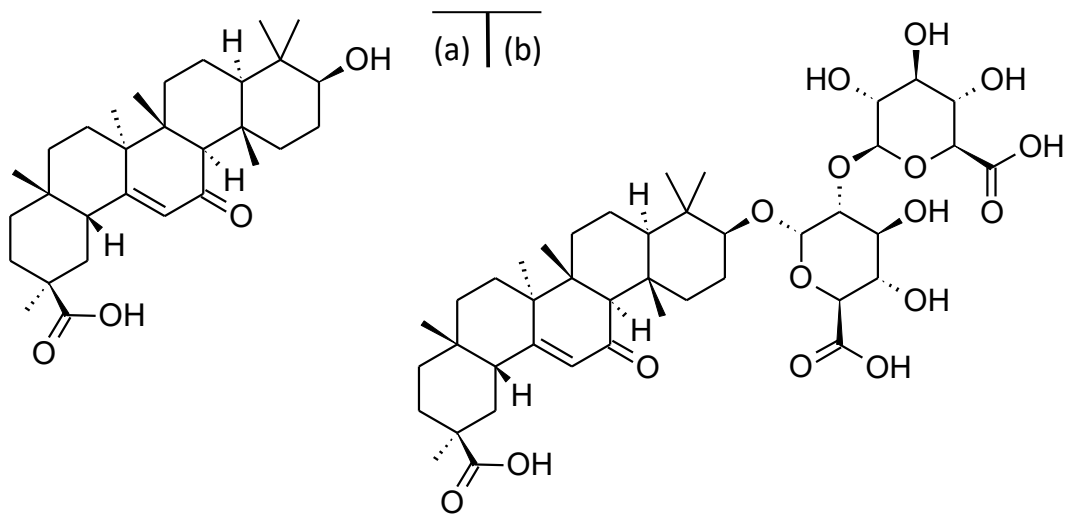
Obr. 4.2 HPLC-UV/VIS chromatogram extraktu novodobého sušeného lékořicového kořene extrahovaného (a) methanolem a (b) směsí ethanolu a vody v poměru 7:3, okyselené mravenčí kyselinou na pH = 2. Pík přiřazený glycyrrhizinu je označen hvězdičkou. Provedeno na koloně XBridge® BEH C18 (150×3 mm, 2.5 μm) s gradientovou elucí (0,1% vodný roztok mravenčí kyseliny a 0,1% roztok mravenčí kyseliny v acetonitrilu), průtoková rychlost 0,21 cm³ min⁻¹. Měřeno při 254 nm.

4.2.2 HPLC s MS/MS detekcí

HPLC-MS/MS analýzou historického vzorku prášku z lékořicového kořene a novodobého referenčního sušeného lékořicového kořene bylo nalezeno veliké množství látek. Identifikace byla provedena porovnáním nalezených látek s látkami uvedenými Avulou a kol.²⁸ a pro vybrané látky také změřením jejich MS/MS spekter. Celkem bylo identifikováno v novodobém materiálu 31 chemotaxonomických markerů lékořice (tab. 4.5), z nichž ale pouze devět (isoviolanthin, likviritin apiosid, likviritin, likurosid, neoisolviritin, likviritigenin, macedonosid C, glycyrrhizin a glycyrrhethinová kyselina) bylo identifikováno současně i ve vzorku historickém. To poukazuje na degradaci některých pro lékořici charakteristických látek během dlouhé doby uložení, což se shoduje se závěry dosud jediné podobné práce (zkoumající celé kousky lékořice pomocí chemotaxonomie) od Shibata a kol.⁵⁶, ověřujících autenticitu údajně přes 1250 let starého lékořicového vzorku pocházejícího z města Nara v Japonsku.

Z výsledků uvedených v tab. 4.5 je také patrná důležitost volby extrakčního činidla, protože čtyři z devíti chemotaxonomických markerů nalezených současně v historickém i novodobém materiálu bylo identifikováno v historickém vzorku pouze v okyseleném ethanolovém extraktu, zatímco v novodobém vzorku byly identifikovány i v extraktu methanolovém, což by mohlo být způsobeno nižšími koncentracemi těchto látek v historickém materiálu oproti materiálu novodobému a jejich snadnější extrakci kyselým extrakčním činidlem. Toto tvrzení podporují i výsledky získané s UV/VIS detekcí, kde byla pozorována vyšší intenzita píků v okyseleném ethanolovém extraktu oproti extraktu methanolovému. Na druhou stranu, v případě glycyrrhetinové kyseliny, která byla nalezena v obou novodobých extraktech, se jednalo o látku nalezenou v historickém vzorku pouze v methanolovém extraktu a poukazuje to tak na výhodu současného použití více extrakčních činidel.

Na glycyrrhetinové kyselině a glycyrrhizinu lze na základě výsledků uvedených v tab. 4.5 ilustrovat důležitost pH extrakčního činidla. Obě látky byly identifikovány v novodobém referenčním materiálu, jak v methanolovém, tak i v okyseleném ethanolovém extraktu. V případě extrakce historického vzorku byl ale glycyrrhizin nalezen pouze v okyseleném ethanolovém extraktu, zatímco glycyrrhetinová kyselina byla nalezena pouze v methanolovém extraktu. Obě sloučeniny mají velice podobnou strukturu (obr. 4.3a,b), liší se pouze v diglukopyranosiduronylové jednotce přítomné ve struktuře glycyrrhizinu. Výsledky ukazují, že obě látky lze extrahovat oběma použitými extrakčními činidly a obě jsou v historickém vzorku přítomny v detegovatelných koncentracích. Možná příčina nepřítomnosti glycyrrhetinové kyseliny v okyseleném ethanolovém extraktu by mohla být způsobena její nižší disociací v kyselém prostředí, zatímco glycyrrhizin s mnoha polárními hydroxylovými a dvěma karboxylovými skupinami v diglukopyranosiduronylové jednotce je v kyselém prostředí snadněji ionizovatelný.



Obr. 4.3 (a) struktura glycyrrhetinové kyseliny [471-53-4], (b) struktura glycyrrhizinu [1405-86-3]

Tabulka 4.5

Sloučeniny nalezené pomocí HPLC-MS/MS analýzy v novodobém sušeném lékořičovém kořeni (N) a historickém vzorku *Pulvis radiceis liquiritiae* (H) extrahovaných methanolem (M) nebo extrakčním činidlem (E; směs ethanolu a vody v poměru 7:3 (v/v), jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 2 přidávkem mravenčí kyseliny) v pozitivním (+) nebo negativním (-) módu ESI (retenční čas, název a CASRN sloučeniny, molekulový vzorec, experimentální m/z iontů $[M+H]^+$ a $[M-H]^-$, m/z fragmentačních iontů v pozitivním a negativním módu ESI, přítomnost sloučenin v analyzovaném materiálu).

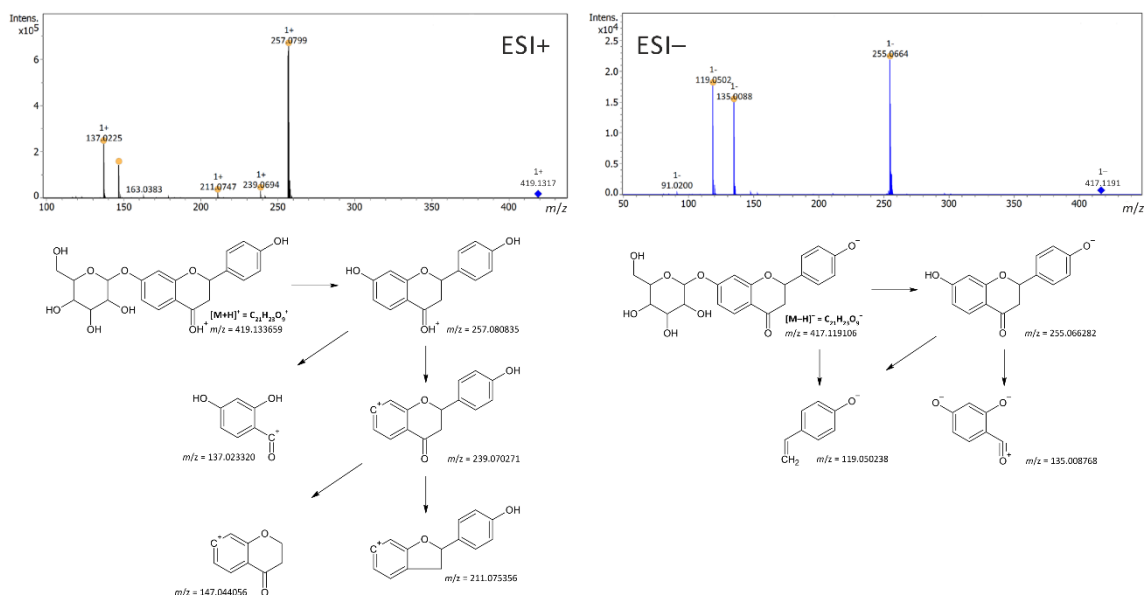
t_R / min	Sloučenina, CASRN	Molekulový vzorec	m/z $[M+H]^+$	Fragmentační ionty v ESI ⁺	m/z $[M-H]^-$	Fragmentační ionty v ESI ⁻	NM +	NM -	NE +	NE -	HM +	HM -	HE +	HE -
10,3	Soforaflavon B, [22052-75-1]	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417,1149	255	N/A	N/A	√		√					
11,3	Isoviolanthin, [40788-84-9]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579,1699	405; 337; 121	577,1577	503; 457; 383; 353	√	√	√	√	√	√	√	√
11,9	Neolikviritin, [5088-75-5]	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419,1317	257; 137	417,1191	255; 135; 119	√	√	√	√				
12,0	Likviritin, [551-15-5]	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419,1317	257; 137	417,1182	255; 135; 119	√	√	√	√	√	√	√	√
12,4	Likviritin apiosid, [74639-14-8]	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	551,1738	257; 137	549,1613	429; 255; 135; 119	√	√	√	√	√	√	√	√
13,2	Genistin, [529-59-9]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433,1106	271; 137	431,0969	311; 269	√	√	√	√				
14,9	Naringenin-7-O-(2-β-D-apiofuranosyl)-β-D-glukopyranosid, N/A	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	567,1677	273; 195; 153	565,1578	433; 271; 151; 125	√	√	√	√				
14,9	Naringenin-7-O-β-D-glukopyranosid, N/A	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	435,1254	273; 153	433,1133	341; 311; 271; 151	√	√	√	√				
16,4	Likurosid, [29913-71-1]	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	551,1743	257; 137	549,1610	417; 255; 135; 119	√	√	√	√			√	√
16,4	Isolikviritin, [5041-81-6]	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419,1323	257; 137	417,1190	255; 135; 119	√	√	√	√				
16,9	Glycyosid, [125310-04-5]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	563,1746	269	561,1602	267	√	√	√	√				
17,2	Kumatakenin B, [2196-14-7]	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255,0644	227; 145; 137; 119	253,0506	135; 117; 91	√	√	√	√				
17,8	Neoisolikviritin, [59122-93-9]	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419,1316	257; 137	417,1192	255; 135; 119	√	√	√	√			√	
17,8	Likochalkon B, [58749-23-8]	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	287,0908	255; 193; 178; 121	285,0785	270; 177; 150; 121	√	√	√	√				
17,9	Ononin, [486-62-4]	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	431,1323	269	N/A	N/A	√	√	√	√				
19,2	Likviritigenin, [578-86-9]	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257,0801	211; 147; 137; 119	255,0696	135; 119; 91	√	√	√	√	√	√	√	√
20,1	Kalykosin, [20575-57-9]	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285,0742	270; 253; 225; 137	283,0630	268; 239; 211; 108	√	√	√	√				
22,3	Lékořičový glykosid E, [202657-66-7]	C ₃₅ H ₃₅ O ₁₄ N	694,2126	276; 257; 240; 144	692,1986	549; 531; 255; 160	√	√	√	√				
22,5	Echinatin, [34221-41-5]	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	271,0960	229; 177; 153; 121	269,0842	253; 237; 133; 92	√	√	√	√				
23,0	Naringenin, [480-41-1]	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273,0753	177; 153; 147; 121	271,0639	135	√	√	√	√				
23,0	Ononin-6-O-acetát, N/A	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀	473,1414	269; 133; 103	N/A	N/A	√	√	√	√				
23,2	Yunganosid K ₂ , [156980-51-7]	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	839,4053	469; 451; 233	837,3914	351; 193	√	√	√	√				
23,2	Isolikviritigenin, [961-29-5]	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257,0807	239; 147; 137; 119	255,0692	119; 91	√	√	√	√				
26,8	Formononetin, [485-72-3]	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	257,0807	254; 237; 226; 197	267,0689	252; 223; 208; 195	√	√	√	√				
27,6	Vestitol, [35878-41-2]	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	N/A	N/A	271,1003	252; 135; 109; 91	√	√	√	√				
28,9	Macedonosid C, [256441-33-5]	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	823,4107	453	821,3959	351; 193; 113	√	√	√	√			√	√
28,9	Glycyrrhizin, [1405-86-3]	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	823,4107	453	821,3959	351; 193; 113	√	√	√	√			√	√
30,4	<i>Nevyřešeno</i>	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	355,1520	313; 193; 175; 133	353,1400	338; 177; 160; 150	√	√	√	√				
31,0	Erythrinin B, [51225-30-0]	C ₃₀ H ₁₈ O ₅	339,1205	283; 255; 205; 165	337,1088	293; 245; 201; 117	√	√	√	√				
32,8	Glabridin, [59870-68-7]	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	325,1423	189; 171; 149; 123	323,1302	213; 201; 175; 135	√	√	√	√				
33,1	Likoflavon B, [91433-17-9]	C ₂₅ H ₂₆ O ₄	391,1891	335; 279; 167; 149	389,1740	344; 283; 161; 135	√	√	√	√				
35,3	Glycyrrhetinová kyselina, [471-53-4]	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	471,3459	453; 425; 235; 189	469,3316	383	√	√	√	√	√	√		

4.2.3 Návrh fragmentačních mechanismů pěti nalezených chemotaxonomických markerů lékořice

Většina chemotaxonomických markerů lékořice není dostupná ve formě analytických standardů, a proto byla k ověření jejich identifikace využita tandemová hmotnostní spektrometrie. Celkem pro pět z 31 identifikovaných látek, jejichž spektra nebyla dosud v literatuře^{57,58} podrobněji zkoumána, byl navrhnout jejich fragmentační mechanismus a je uveden i s naměřenými fragmentačními spektry.

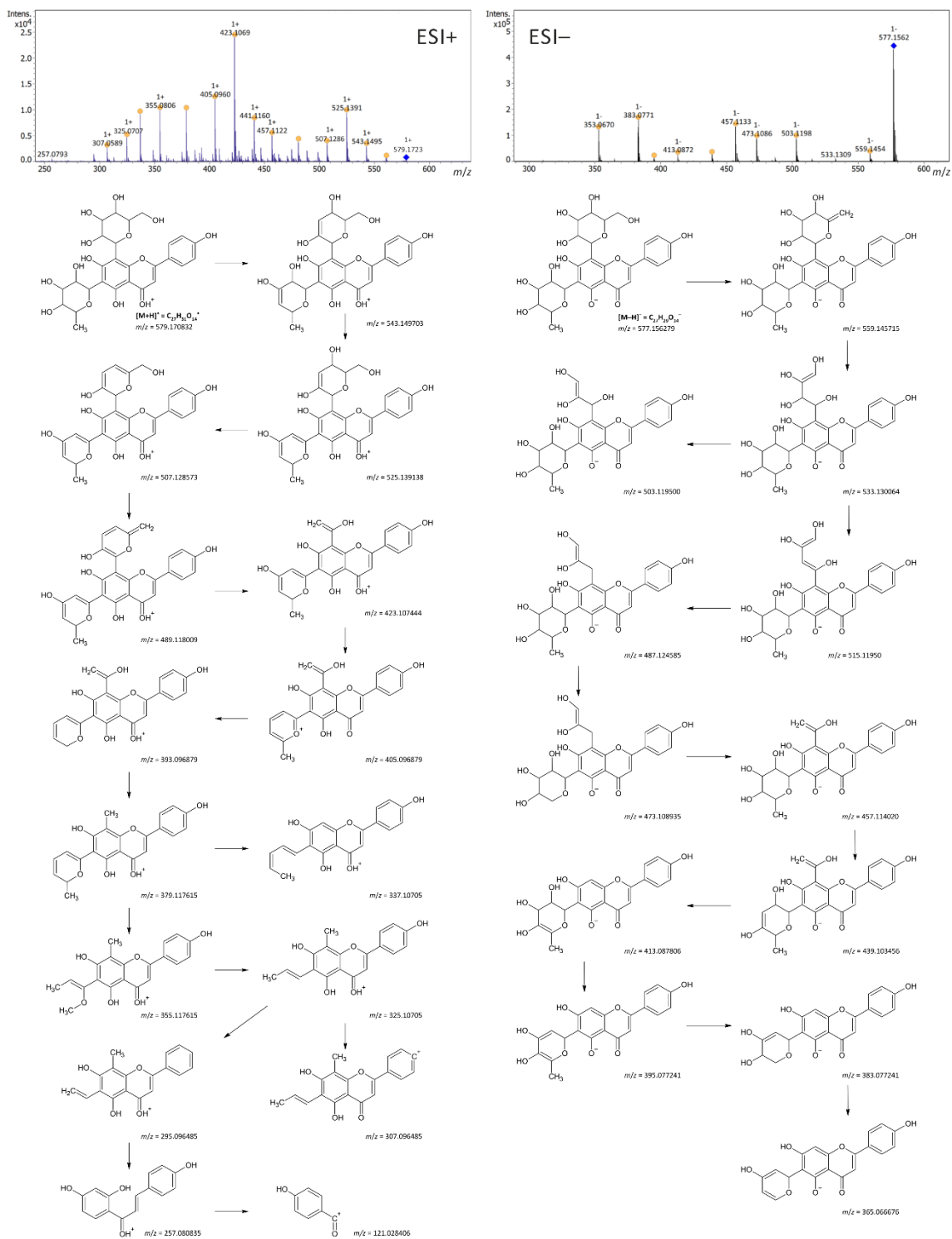
Konkrétně se jedná o tři deriváty flavonu (neolikviritin, isoviolanthin, lékořicový glykosid E) a dvě látky strukturně příbuzné glycyrrhizinu (yunganosid K₂, macedonosid C).

Nejjednodušší strukturu ze tří flavonových látek má neolikviritin (obr. 4.4) eluující ve 12,0 min a nalezený pouze v novodobém vzorku lékořicového kořene. Jedná se o strukturní analog likviritinu, v jehož spektrech^{59,60} jsou pozorovatelné některé shodné fragmentační ionty, například v ESI⁺ $m/z = 257,0799$ a $m/z = 137,0225$, ale obě látky lze od sebe odlišit v HPLC na základě retenčních časů.



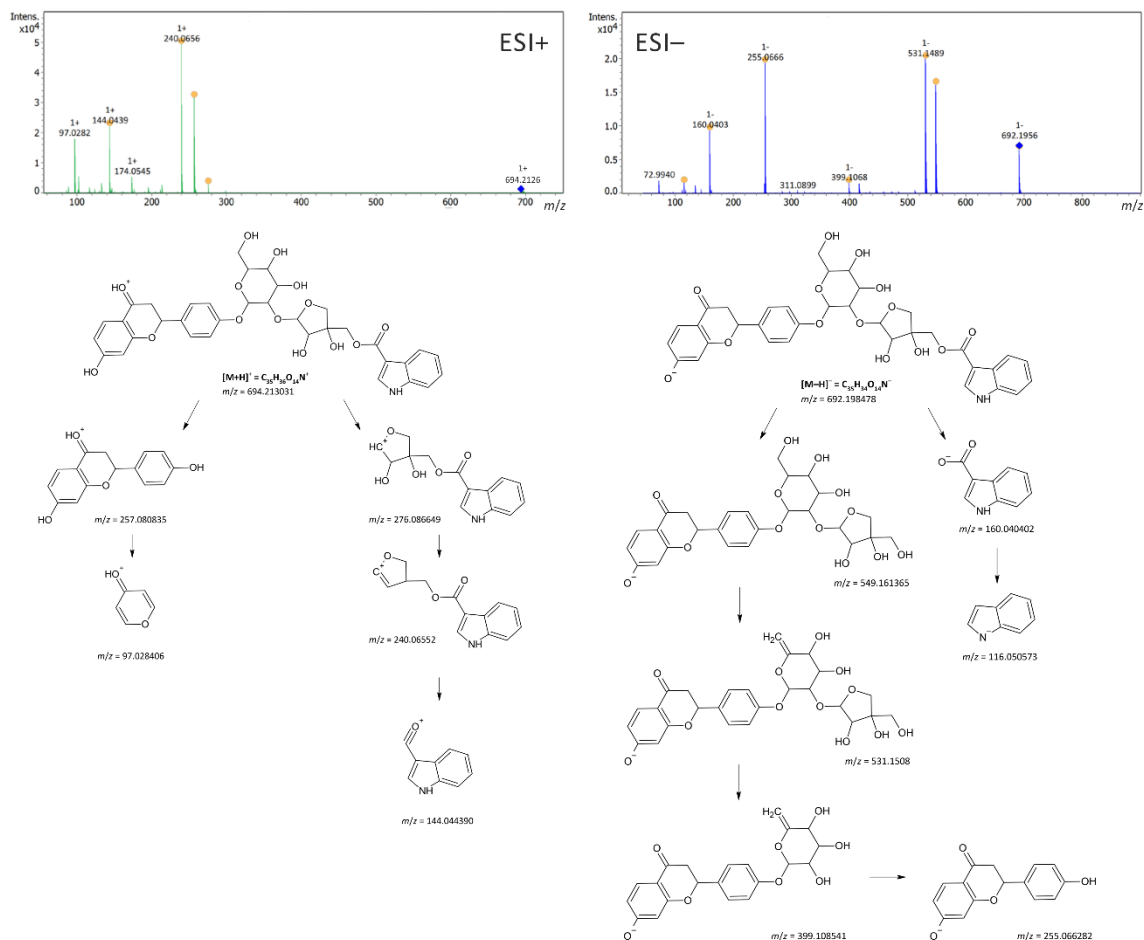
Obr. 4.4 ESI-MS² spektra produktových iontů prekursorového iontu neolikviritinu (označený kosočtvercem) a navržený fragmentační mechanismus (m/z hodnoty byly vypočítány)

Druhou látkou je diglykosid likviritinu, isoviolanthin, eluující v 11,3 min a nalezený v historickém i novodobém vzorku. Jeho v obou módech ESI na fragmenty bohaté spektrum odlišující se výrazně od spektra likviritinu^{61,62} je zajištěno odštěpováním deseti hydroxylových skupin ze struktury této látky. Pořadí ztrát hydroxylových skupin je v obr. 4.5 pouze odhadnuto.



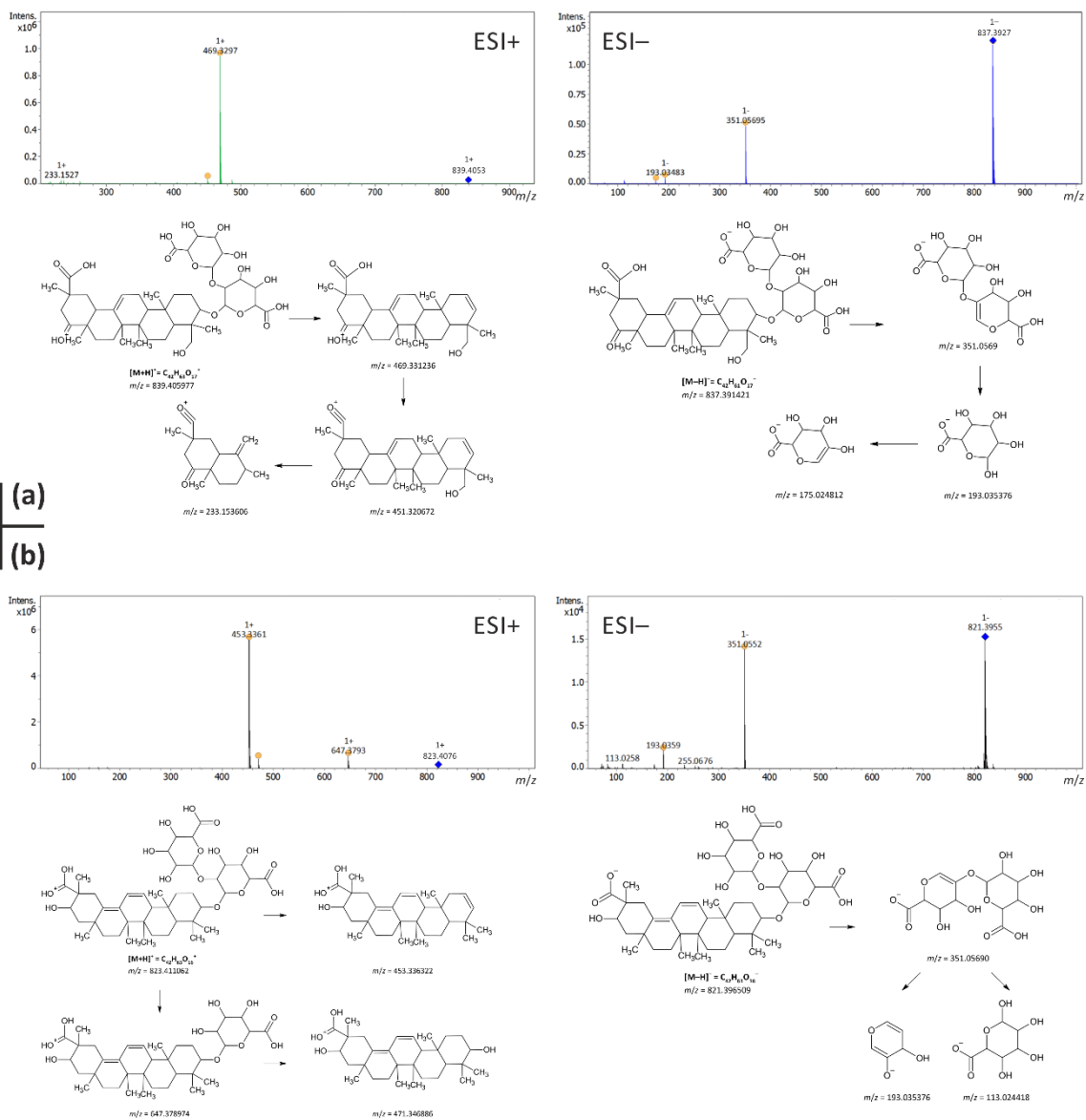
Obr. 4.5 ESI-MS² spektra produktových iontů prekursorového iontu isviolanthinu (označený kosočtvercem) a navržený fragmentační mechanismus (*m/z* hodnoty byly vypočítány)

Třetím derivátem flavonu je lékořicový glykosid E (obr. 4.6) eluující v 22,3 min a identifikovaný pouze v novodobém materiálu.



Obr. 4.6 ESI-MS² spektra produktových iontů prekuzorového iontu lékořicového glykosidu E (označený kosočtvercem) a navržený fragmenční mechanismus (*m/z* hodnoty byly vypočítány)

Dvě látky strukturně příbuzné glycyrrhizinu a glycyretinové kyselině jsou navzájem strukturními analogy vycházející ze struktury ursolové kyseliny (CASRN [77-52-1]). Prvním z nich je yunganosid K₂ (obr. 4.7a) eluující v 23,2 min a nalezený pouze v novodobém lékořicovém materiálu. Druhou látkou je macedonosid C (obr. 4.7b) eluující v 28,9 min a nalezený v historickém i novodobém materiálu.



Obr. 4.7 (a) ESI-MS² spektra produktových iontů prekursorového iontu yunganosidu K₂ (označený kosočtvercem) a navržený fragmentační mechanismus (m/z hodnoty byly vypočítány); **(b)** ESI-MS² spektra produktových iontů prekursorového iontu macedonosidu C (označený kosočtvercem) a navržený fragmentační mechanismus (m/z hodnoty byly vypočítány)

5 Závěr

V rámci této práce byly analyzovány pozůstatky tří farmak z 18. století s údajným obsahem jalovce nebo lékořice. Konkrétně se jednalo o *Rob juniperi*, *Lignum juniperi* a *Pulvis radices liquiritiae*. Cílem bylo provést kvalitativní analýzu a na základě chemotaxonomického přístupu ověřit, zdali byly přípravky připraveny podle dobových receptur a zkoumat případnou degradaci jejich složek. Jako zdroj chemotaxonomických markerů byl použit novodobý referenční materiál a pro lepší autentičnost referenčního materiálu byla pro vzorek *Rob juniperi* provedena i replikace podle dvou dobových receptur. Primární metodou analýzy byla HPLC s hmotnostní detekcí, které předcházela UV/VIS detekce sloužící k orientačnímu vyzkoušení podmínek analýzy. V případě jalovcových vzorků bylo nutno vzhledem k těkavosti analytů použít i GC-MS metodu, které předcházela FID detekce k optimalizaci parametrů extrakce i metody samotné.

Výsledky analýz identifikovaly dostatečné množství chemotaxonomických markerů dané rostliny ve všech historických vzorcích, čímž byla potvrzena jejich autenticita a byl splněn cíl práce. Navíc v případě historických jalovcových vzorků přítomnost některých analytů poukázala na pozoruhodnou stabilitu některých glykosidů a těkavých sloučenin jalovce. Zajímavým bylo nenalezení žádného jednoduchého cukru v historickém vzorku *Rob juniperi*, který mohl podlehnout degradaci, nebo bylo zapomenuto na jeho přidání při přípravě. HPLC-MS také odhalila v tomto historickém vzorku i novodobém referenčním materiálu viridiflorin heptosid, který dosud nebyl v jalovci popsán, a proto byla naměřena jeho fragmentační spektra a navrhnout jeho možný fragmentační mechanismus, což bylo zveřejněno v již úspěšně publikovaném článku shrnujícím analýzu historického jalovcového vzorku⁶³. Fragmentační spektra a možný fragmentační mechanismus byl navrhnout i pro pět látek identifikovaných v lékořicovém materiálu. Pro extrakci lékořicového materiálu se navíc ukázalo výhodným také použití okyseleného ethanolického extrakčního činidla použitého k extrakci jalovcových vzorků.

6 Literatura

1. Nesměrák, K.; Kunešová, J.: Farmaceutická historie kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech. Část I. Klášterní lékárna. *Česká a slovenská Farmacie* **64**, 79–94 (2015).
2. Singh, R.; Geetanjali: Chemotaxonomy of medicinal plants: possibilities and limitations. In: *Natural Products and Drug Discovery: An Integrated Approach*. S. C. Mandal, V. Mandal, T. Konishi (Eds.). Amsterdam, Elsevier 2018. p. 119–136.
3. Reynolds, T.: The evolution of chemosystematics. *Phytochemistry* **68**, 2887–2895 (2007).
4. Jirásek, V.; Starý, F.: *Atlas léčivých rostlin*. 2. vydání. Praha, Státní pedagogické nakladatelství Praha 1989.
5. Adams, R. P.: The leaf essential oils and chemotaxonomy of *Juniperus* sect. *Juniperus*. *Biochemical Systematics and Ecology* **26**, 637–645 (1998).
6. von Schlechtendal, D.F.L.: *Abbildung und Beschreibung aller in der Pharmacopoea Borussica aufgeführten Gewaechse*. Vol. 2. Berlin, Ludwig Oehmigke 1833.
7. Sabato, D.; Masi, A.; Pepe, C.; Uccesu, M.; Peña-Chocarro, L.; Usai, A.; Giachi, G.; Capretti, C.; Bacchetta, G.: Archaeobotanical analysis of a Bronze Age well from Sardinia: A wealth of knowledge. *Plant Biosystems* **149**, 205–215 (2015).
8. Judžentienė, A.: A review of volatile organic compounds of wild and cultivated common juniper in Lithuania. *Chemija* **30**, 184–193 (2019).
9. Pliny: *Natural History*. Vol. VI. London, William Heinemann 1951.
10. Pomet P.: *A Complete History of Drugs*. London, Bonwicke 1748.
11. Scharf B.: *Arkeythologia seu Juniperi descriptio curiosa*. Frankfurt am Main, Leipzig, Caroli Wollffii 1679.
12. Innocenti, M.; Michelozzi, M.; Giaccherini, C.; Ieri, F.; Vincieri, F. F.; Mulinacci, N.: Flavonoids and Biflavonoids in Tuscan Berries of *Juniperus Communis* L.:

- Detection and Quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 6596–6602 (2007).
13. Council of Europe: *European Pharmacopoeia*, 10th ed., Strasbourg, Council of Europe 2019.
 14. Evans, W. C.: *Pharmacognosy*. 16th ed. Edinburgh, Saunders Elsevier 2009.
 15. Bais, S.; Gill, N. S.; Rana, N.; Shandil, S.: A phytopharmacological review on a medicinal plant: *Juniperus communis*. *International Scholarly Research Notices* **2014**, 634723 (2014).
 16. Caramiello, R.; Bocco, A.; Buffa, G.; Maffei, M.: Chemotaxonomy of *Juniperus Communis*, *J. Sibirica* and *J. Intermedia*. *Journal of Essential Oil Research* **7**, 133–145 (1995).
 17. Gordien, A. Y.; Gray, A. I.; Franzblau, S. G.; Seidel, V.: Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus Communis* L. (*Cupressaceae*). *Journal of Ethnopharmacology* **126**, 500–505 (2009).
 18. Krasikova, A. A.; Bogolitsyn, K. G.; Gusakova, M. A.; Ivakhnov, A. D.; Khviuzov, S. S.; Samsonova, N. A.: Analysis of phenolic components in supercritical extracts of *Juniperus communis* L. wood with high-performance liquid chromatography. *Russian Journal of Physical Chemistry B* **13**, 1164–1168 (2019).
 19. Miceli, N.; Trovato, A.; Dugo, P.; Cacciola, F.; Donato, P.; Marino, A.; Bellinghieri, V.; La Barbera, T. M.; Glüvenç, A.; Taviano, M. F.: Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus Communis* L. var. *communis* and *Juniperus Communis* L. var. *saxatilis* Pall, from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 6570–6577 (2009).
 20. Drábek P.: Zapomenuté lékové formy a galenické přípravky (III. část) Polotuhé lékové formy a galenické přípravky. *Praktické Lékárenství* **3**, 303–306 (2007).
 21. *Dispensatorium Pharmaceuticum Austriaco-Viennense*. Collegium Pharmaceuticum (eds.), Vienna, Kürner 1729.
 22. Anonymní: *Pharmacopoea Austriaca*. Editio quinta. Vienna, Caesaria Regia Aulica et Imperialia Typographia 1855.

23. Husain, I.; Bala, K.; Khan, I. A.; Khan, S. I.: A review on phytochemicals, pharmacological activities, drug interactions, and associated toxicities of licorice (*Glycyrrhiza* sp.). *Food Frontiers* **2**, 449–485 (2021).
24. Ding, Y.; Brand, E.; Wang, W.; Zhao, Z.: Licorice: Resources, applications in ancient and modern times. *Journal of Ethnopharmacology* **298**, 115594 (2022).
25. Dioscorides of Anazabus P.: *De Materia Medica*. Olms, Hildesheim 2005.
26. Lee, M. R.: Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): the journey of the sweet root from Mesopotamia to England. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* **48**, 378–382 (2018).
27. Triller D.: *Dispensatorium Pharmaceuticum Universale*, Tomus secundus., Francofurtum, Varrentrapp 1764.
28. Avula, B.; Bae, J.-Y.; Chittiboyina, A. G.; Wang, Y.-H.; Wang, M.; Zhao, J.; Ali, Z.; Brinckmann, J. A.; Li, J.; Wu, C.; Khan, I. A.: Chemometric analysis and chemical characterization for the botanical identification of *Glycyrrhiza* species (*G. Glabra*, *G. Uralensis*, *G. Inflata*, *G. Echinata* and *G. Lepidota*) using liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-QToF). *Journal of Food Composition and Analysis* **112**, 104679 (2022).
29. Scientific Committee on Food: *Opinion of the Scientific Committee on Food on Glycyrrhizinic Acid and its Ammonium Salt*. Brusel 2003. Dostupné z: https://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out186_en.pdf
30. National Library of Medicine: *PubChem* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (citováno 25.4.2024)
31. Royal Society of Chemistry: *ChemSpider* [online]. Dostupné z: <https://www.chemspider.com/> (citováno 25.4.2024)
32. EMBL-EBI: *ChEBI* [online]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/> (citováno 25.4.2024)
33. Chaouche, T. M.; Haddouchi, F.; Atik-Bekara, F.; Ksouri, R.; Azzi, R.; Boucherit, Z.; Tefiani, C.; Larbat, R.: Antioxidant, haemolytic activities and HPLC-DAD-ESI-MSⁿ characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Industrial Crops and Products* **64**, 182–187 (2015).

34. Tang, J.; Dunshea, F. R.; Suleria, H. A. R.: LC-ESI-QTOF/MS Characterization of phenolic compounds from medicinal plants (hops and juniper berries) and their antioxidant Activity. *Foods* **9**, 7 (2020).
35. Keskes, H.; Belhadj, S.; Jlail, L.; El Feki, A.; Damak, M.; Sayadi, S.; Allouche, N.: LC-MS-MS and GC-MS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian *Juniperus phoenice* leaves. *Pharmaceutical Biology* **55**, 88–95 (2017).
36. Jiménez-González, A.; Quispe, C.; Bórquez, J.; Sepúlveda, B.; Riveros, F.; Areche, C.; Nagles, E.; García-Beltrán, O.; Simirgiotis, M. J.: UHPLC-ESI-ORBITRAP-MS analysis of the native Mapuche medicinal plant palo negro (*Leptocarpha rivularis* DC. – *Asteraceae*) and evaluation of its antioxidant and cholinesterase inhibitory properties. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **33**, 936–944 (2018).
37. Azhar-UI-Haq; Malik, A.; Khan, M. T. H.; Anwar-ul-Haq; Khan, S. B.; Ahmad, A.; Choudhary, M. I.: Tyrosinase inhibitory lignans from the methanol extract of the roots of *Vitex negundo* Linn. and their structure-activity relationship. *Phytomedicine* **13**, 255–260 (2006).
38. Maatooq, G. T.; El-Sharkawy, S. H.; Afifi, M. S.; Rosazza J. P. N.: Flavonoids from two *Cupressaceae* Plants. *Natural Product Sciences* **4**, 9–14 (1998).
39. Piccinelli, A. L.; Mencherini, T.; Celano, R.; Mouhoubi, Z.; Tamendjari, A.; Aquino, R. P.; Rastrelli, L.: Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 5080–5088 (2013).
40. Martin, A. M.; Queiroz, E. F.; Marston, A.; Hostettmann, K.: Labdane diterpenes from *Juniperus Communis* L. Berries. *Phytochemical Analysis* **17**, 32–35 (2006).
41. Salahuddin, M. A. H.; Ismail, A.; Kassim, N. K.; Hamid, M.; Ali, M. S. M.: Phenolic profiling and evaluation of *in vitro* antioxidant, α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities of *Lepisanthes fruticosa* (Roxb) Leenh fruit extracts. *Food Chemistry* **331**, 1227240 (2020).
42. Foudil-Cherif, Y.; Yassaa, N.: Enantiomeric and non-enantiomeric monoterpenes of *Juniperus communis* L. and *Juniperus oxycedrus* needles and berries determined by HS-SPME and enantioselective GC/MS. *Food Chemistry* **135**, 1796–1800 (2012).

43. Carroll, J. F.; Tabanca, N.; Kramer, M.; Elejalde, N. M.; Wedge, D. E.; Bernier, U. R.; Coy, M.; Becnel, J. J.; Demirci, B.; Başer, K. H. C.; Zhang, J.; Zhang, S.: Essential oils of *Cupressus funebris*, *Juniperus communis*, and *J. chinensis* (*Cupressaceae*) as repellents against ticks (Acari: Ixodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae) and as toxicants against mosquitoes. *Journal of Vector Ecology* **36**, 258–268 (2011).
44. Gonny, M.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L.; Casanova, J.: Analysis of *Juniperus Communis* subsp. *alpina* needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and ¹³C-NMR. *Flavour and Fragrance Journal* **21**, 99–106 (2006).
45. Filipowicz, N.; Piotrowski, A.; Ochocka, J. R.; Asztemborska, M.: The Phytochemical and genetic survey of common and dwarf juniper (*Juniperus communis* and *Juniperus nana*) identifies chemical races and close taxonomic identity of the species. *Planta Medica* **72**, 850–853 (2006).
46. Loizzo, M. R.; Tundis, R.; Conforti, F.; Saab, A. M.; Statti, G. A.; Menichini, F.: Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chemistry* **105**, 572–578 (2007).
47. Ait-Ouazzou, A.; Lorán, S.; Arakrak, A.; Laglaoui, A.; Rota, C.; Herrera, A.; Pagán, R.; Conchello, P.: Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International* **45**, 313–319 (2012).
48. Chatzopoulou, P. S.; Katsiotis S. T.: Study of the essential oil from *Juniperus communis* "berries" (cones) growing wild in Greece. *Planta Medica* **59**, 554–556 (1993).
49. Siddiqui, B. S.; Ali, S. T.; Rajput, M. T.; Gulzar, T.; Rasheed, M.; Mehmood, R.: GC-based analysis of insecticidal constituents of the flowers of *Azadirachta indica* A. Juss. *Natural Product Research* **23**, 271–283 (2009).
50. Gómez, F.; Calderon, J. S.; Quijano, L.; Domínguez, M.; Rios, T.: Viridiflorin, an isoflavone from *Tephrosia viridiflora*. *Phytochemistry* **24**, 1126–1128 (1985).
51. Liu, Y.-P.; Guo, J.-M.; Yan, G.; Zhang, M.-M.; Zhang, W.-H.; Qiang, L.; Fu, Y.-H.: Anti-inflammatory and antiproliferative prenylated isoflavone derivatives from the

- fruits of *Ficus carica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **67**, 4817–4823 (2019).
52. Pancharoen, O.; Athipornchai, A.; Panthong, A.; Taylor W. C.: Isoflavones and rotenoids from the leaves of *Millettia brandisiana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **56**:6, 835–838(2008).
 53. Hughes, R. J.; Croley, T. R.; Metcalfe, C. D.; March, R. E.: A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. *International Journal of Mass Spectrometry* **210/211**, 371–385 (2001).
 54. Cavaliere, C.; Cucci, F.; Foglia, P.; Guarino, C.; Samperi, R.; Laganà, A.: Flavonoid profile in soybeans by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 2177–2187 (2007).
 55. Olchowik-Grabarek, E.; Czerkas, K.; Matchanov, A. D.; Esanov, R. S.; Matchanov, U. D.; Zamaraeva, M.; Sekowski, S.: Antibacterial and antihemolytic activity of new biomaterial based on glycyrrhizic acid and quercetin (GAQ) against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Functional Biomaterials* **14**, 368 (2023).
 56. Shibata, M. J. A.; Kondo, K.; Terabayashi, S.: Identification of the licorice root stored in Shosoin based on the sequences of internal transcribed spacer (ITS) on nrDNA and the chemotaxonomic consideration. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* **79**, 176–180 (2003).
 57. Elsevier: *Reaxys* [online]. Dostupné z: <https://www.reaxys.com/> (citováno 25.4.2024)
 58. CAS: *Scifinderⁿ* [online]. Dostupné z: <https://scifinder-n.cas.org/> (citováno 25.4.2024)
 59. Li, J.; Wang, J.; Li, J.; Li, J.; Liu, S.; Gao, W.: Salicylic acid induces the change in the adventitious root of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.: bioactive compounds and antioxidant enzymes. *Research on Chemical Intermediates* **42**, 1503–1519 (2016).
 60. Zhou, S.; Cao, J.; Qiu, F.; Kong, W.; Yang, S.; Yang, M.: Simultaneous determination of five bioactive components in radix glycyrrhizae by pressurised liquid extraction combined with UPLC-PDA and UPLC/ESI-QTOF-MS confirmation. *Phytochemical Analysis* **24**, 527–533 (2013).

61. Sun, L.; Zhao, M.; Zhao, Y.; Jiang, X.; Wang, M.; Zhang, Y.; Zhao, C.: Rapid characterization of chemical constituents of Shaoyao Gancào decoction using UHPLC coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *RSC Advances* **10**, 29528–29535 (2020).
62. Wang, Z.; Li, W.; Lu, J.; Yuan, Z.; Pi, W.; Zhang, Y.; Lei, H.; Jing, W.; Wang, P.: Revealing the active ingredients of the traditional Chinese medicine decoction by the supramolecular strategies and multitechnologies. *Journal of Ethnopharmacology* **300**, 115704 (2023).
63. Nesměrák, K.; Lener, T.; Korban, A.; Štícha, M.: Authentication of two eighteenth century juniper-containing drug remains by HPLC–MS/MS and GC–MS. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **154**, 977–986 (2023).