

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Tomáš Lener

Analýza historického farmaceutického přípravku
s obsahem čekanky z 18. století

Analysis of historical pharmaceutical
preparation containing chicory from the
18th century

Bakalářská práce

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

Praha 2022

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 16. května 2022.

Abstrakt

Pomocí HPLC s UV/VIS a tandemovou hmotnostní detekcí byla provedena kvalitativní analýza historického farmaceutického přípravku – čekankového extraktu – z 18. století, jehož autenticita byla ověřována. Jako zdroj vybraných chemotaxonomických markerů čekanky a ukazatel úspěšnosti extrakce různými rozpouštědly sloužil novodobý sušený čekankový kořen. Jestli je historický vzorek skutečně extraktem, bylo dokázáno zkouškou rozpustnosti ve vodě. Bylo provedeno VIS spektrometrické stanovení inulinu, jehož obsah byl stanoven v novodobém vzorku na 52,4 % a v historickém extraktu na 7,45 %. Z naměřených UV/VIS spekter vybraných standardů a literatury byla zvolena vlnová délka detekce 254 a 320 nm. Pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie se podařilo dokázat autenticitu historického extraktu čekanky, a navíc určit nový chemotaxonomický marker čekanky – arteinkulton.

Klíčová slova: HPLC-MS, HPLC-UV/VIS, UV/VIS spektrometrie, čekanka, historický extrakt, čekankový kořen, arteinkulton

Abstract

A historical pharmaceutical preparation – chicory extract – from the 18th century whose authenticity was investigated was qualitatively analyzed using HPLC with UV/VIS and MS² detection. A current dry chicory root was used as a source of selected chicory chemotaxonomic markers and an indicator of the success of extraction with different solvents. The authenticity of the historical extract was proved by a water solubility test. A VIS spectrometric determination of inulin was used and the inulin content was determined to be 52.4% in the current dry chicory root and 7.45% in the historical extract. The detection wavelength 254 and 320 nm was selected from measured UV/VIS spectra of selected standards and the literature. The authenticity of the historical chicory extract was proven by tandem mass spectrometry, and, moreover, arteincultone – a new chicory chemotaxonomic marker – was identified.

Key words: HPLC-MS, HPLC-UV/VIS, UV/VIS Spectrometry, Chicory, Historical extract, Chicory root, Arteincultone

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky a cenné rady při psaní této práce. Také mu děkuji za pomoc při získávání informací, ochotu a vstřícnost při konzultacích.

Dále bych rád poděkovat RNDr. Martinu Štíchovi, Ph.D. za naměření a pomoc s vyhodnocením hmotnostních spekter.

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Původ analyzovaného historického vzorku	8
2.2	Čekanka obecná	8
2.2.1	Výskyt čekanky	10
2.2.2	Varianty čekanky	10
2.2.3	Historie využití čekanky	10
2.3	Látky obsažené v čekance a jejich účinky	11
2.3.1	Fruktany	13
2.3.2	Seskviterpenoidy	14
2.3.3	Flavonoidy	15
2.3.4	Kumariny	15
2.3.5	Organické kyseliny	16
2.3.6	Steroidy a triterpenoidy	17
2.3.7	Sloučeniny s dusíkem	18
2.4	Chemotaxonomické markery vybrané v této práci	18
2.5	Metody analýzy látek obsažených v čekance	20
3	Experimentální část	22
3.1	Popis vzorků	22
3.2	Chemikálie	23
3.3	Přístroje a metody	24
3.3.1	Extrakce	24
3.3.2	Roztoky chemotaxonomických markerů	25
3.3.3	Stanovení inulinu	25
3.3.4	HPLC s UV/VIS a hmotnostní detekcí	26
4	Výsledky a diskuse	28
4.1	Zkouška rozpustnosti	28
4.2	Stanovení inulinu	28
4.3	Měření UV/VIS spekter vybraných chemotaxonomických markerů a výběr vhodných vlnových délek pro detekci	31
4.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV/VIS detekcí	32
4.5	Identifikace chemotaxonomických markerů pomocí HPLC s MS ² detekcí	35
5	Závěr	39
	Literatura	41

Seznam zkratk a symbolů

A	absorbance
c	hmotnostní koncentrace [g dm^{-3}]
DAD	detektor s diodovým polem (angl. <i>diod-array detector</i>)
ESI	elektrosprejová ionizace
FLD	fluorescenční detektor
m	hmotnost [g]
m/z	poměr hmotnosti ku náboji iontu
rpm	otáčky za minutu
t_r	retenční čas [min]
V	objem [dm^3]
w	hmotnostní procenta [%]
λ	vlnová délka [nm]
λ_{max}	vlnová délka maxima [nm]

1 Úvod

Cílem této práce bylo pomocí metody HPLC s UV/VIS a tandemovou hmotnostní detekcí provést kvalitativní analýzu historického vzorku extraktu čekanky z 18. století a novodobého vzorku sušeného čekankového kořene a na základě výsledků provedených měření potvrdit, zdali je historický vzorek skutečně extraktem čekanky. Také pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovat hlavní látky typické pro čekanku, to znamená pokusit se stanovit chemotaxonomické markery¹ čekanky, popřípadě nalézt jejich degradační produkty. Získané výsledky obou vzorků porovnat a zjistit, jak se změnil obsah látek v historickém vzorku oproti látkám vyskytujícím se ve vzorku novodobém. Na základě zjištěných informací diskutovat výskyt účinných látek v historickém vzorku a jejich stálost.

2 Teoretická část

2.1 Původ analyzovaného historického vzorku

Analyzovaný vzorek, označený jako extrakt čekanky, byl získán z dobové lékárnické nádoby pocházející z někdejší lékárny kapucínského kláštera u kostela Panny Marie a sv. Andělů v Praze na Hradčanech. Lékárna byla v provozu přibližně od roku 1680 a svoji činnost ukončila v roce 1822 (cit. ²).

Ve výše uvedené kapucínské lékárně byly farmaceutické přípravky připravovány podle lékopisu *Dispensatorium pharmaceuticum Austriaco-Viennense*³ z roku 1729. Podle tohoto lékopisu byl čekankový extrakt připraven vařením sušených kořenů čekanky ve vodě. Před koncem varu byl přidán ethanol a vzniklá směs byla odpařením zahuštěna, čímž vznikl hustý pastovitý extrakt.

2.2 Čekanka obecná

Čekanka obecná (*Cichorium intybus* L.; obr. 2.1) je vytrvalá bylina z čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*) neboli složnokvěté (*Compositae*)⁴. Výška rostliny je 15–150 cm. Má ztuha přímou, hranatou, nahoře větvenou, lysou až lehce štětinatou lodyhu nesoucí střídavé, přisedlé, středně kracovité, střelovité, podlouhlé až kopinaté, srdčité až uťaté lodyžní listy. Přízemní listy jsou řapíkaté, kracovitě laločnaté, vespod hustě štětinaté a tvoří růžici. Obojaké, kromě pestíku pětičetné, květy se srostlými obaly tvoří květenství úbor. Zákrov úborů je dvouřadý, lůžko je lysé, bez plevek. Kalich je nezřetelný. Koruna je souměrná, dole trubkovitá, výše jednostranně jazykovitá, na vrcholu přibližně pětizubá. Nejčastěji je koruna jasně modré barvy, ale vzácněji se vyskytuje i růžová či bílá. Tyčinky jsou modré, souprašné. Semeník je spodní,

jednovaječný. Plodem je obvejčitá nažka slámově žluté až téměř černé barvy s věnečkem štětinek na vrcholu. Kořen je vřetenovitý. Čekanka je mléčící rostlina.

Vědecký název čekanky, *Cichorium intybus*, má původ v latině a řečtině. *Cichorium* odkazuje na výskyt čekanky u polí (χωρίον = pole)⁵. *Intybus* je částečně z řečtiny, kde εντομος (éntomos) znamená krájet, to odkazuje na listy čekanky a částečně z latiny, kde *in* = v a *tubus* = trubice, což odkazuje na duté stonky čekanky. Český název „čekanka“ existuje v češtině již dlouho, neboť se objevuje ve Slovníku staročeském a byl tedy znám už ve staročeštině⁶.



Obr. 2.1 Čekanka obecná (převzato z⁴)

2.2.1 Výskyt čekanky

Čekanka obecná není příliš náročná na podmínky, ale preferuje vápenaté půdy^{4,7}. Roste na krajích polí a cest, na náspech a suchých loukách. Pochází z Evropy, ale dnes se hojně vyskytuje i v Severní Americe a částečně v Asii. Zavlečena byla také na jih Afriky, do Austrálie a na Nový Zéland. V České republice roste hojně.

2.2.2 Varianty čekanky

Čekanky obecné existuje více forem. Planě rostoucí čekanka se označuje jako *var. intybus*⁴. Vyšlechtěnou variantou čekanky je *var. sativum*, která se vyznačuje zvětšeným kořenem. Další vyšlechtěnou odrůdou je *var. foliosum*, také známá jako listová čekanka. Jedná se o zimní zeleninu, která je oblíbená především v západní Evropě. V zimě jsou pěstovány její rychlené vybělené puky úzce kuželovitého tvaru.

2.2.3 Historie využití čekanky

Čekanka obecná je známa a lidmi využívána pro své terapeutické a léčebné vlastnosti již velice dlouho. Ve svém díle *Naturalis historia* píše Plinius o čekance v Egyptě⁸. Také uvádí některé možné způsoby přípravy čekanky k léčebným účelům. Uvádí například její velice prospěšné účinky na játra, ledviny, žaludek a močový měchýř. Čekanka je uváděna také už v Ebersově staroegyptském lékařském papyru⁹. Čekanku zmiňuje i římský básník Quintus Horatius Flaccus ve svém díle *Ódy*: „stravou mou jsou olivy, čekanky s lehkým slezem“¹⁰. Botanický popis čekanky uvádí Theofrastos ve svém díle *O rostlinách*¹¹.

První „průmyslové“ zpracovávání čekanky je známo z padesátých let 17. století v Nizozemsku¹². První kulturní pěstování čekanky je v Evropě doloženo v Prusku v druhé polovině 18. století⁴. Pěstování čekanky obecné se v Evropě rozšířilo také vlivem kontinentální blokády, kterou roku 1806 vyhlásil Napoleon Bonaparte a která vedla k zamezení dovozu zrnové kávy, což zvýšilo zájem o náhražku kávy vyráběnou z čekanky – cikorku. V Čechách se první výroba cikorky objevuje na začátku

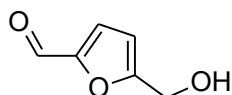
19. století v Mochtíně u Klatov. Cikorka se v Evropě používala především v období válek^{7, 13}.

Dnes je čekanka celosvětově rozšířena a v lidovém léčení se využívá v mnoha zemích^{4, 7, 14}. V Evropě a USA se tradičně využívá kořen čekanky, ze kterého lze vyrobit náhražku kávy. Z mladých listů čekanky obsahujících hodně vitamínu C se připravuje salát. Květy a semena čekanky se využívají v Indii.

2.3 Látky obsažené v čekance a jejich účinky

Čekanka obecná je používána pro mnohé své vlastnosti, které jsou dány látkami v ní obsaženými. Jako rostlinný materiál obsahuje velké množství látek. Její kořen je například zdrojem velkého množství látek s antioxidačními a antibakteriálními účinky¹⁵.

Drogou získávanou z čekanky je její kořen. Droga je světle hnědé barvy, mírně hořké chuti, bez pachu⁴. Vzhledem k vysokému obsahu inulinu v čekankovém kořeni se čekanka používá jako náhražka kávy. Při pražení dochází k rozkladu hořčin a ke karamelizaci sacharidů včetně inulinu, kořeny tmavnou a vzniká aromatický oxymethylfurfurol (obr. 2.2).



Obr. 2.2 Chemická struktura 5-oxymethylfurfurolu (CASRN [67-47-0])

Souhrn hlavních látek obsažených v čekance je uveden v tab. 2.1. Některé významné skupiny látek jsou charakterizovány v následujícím textu.

Tabulka 2.1

Skupiny látek obsažené v čekance, hlavní zástupce, jejich CASRN a odkaz na literaturu

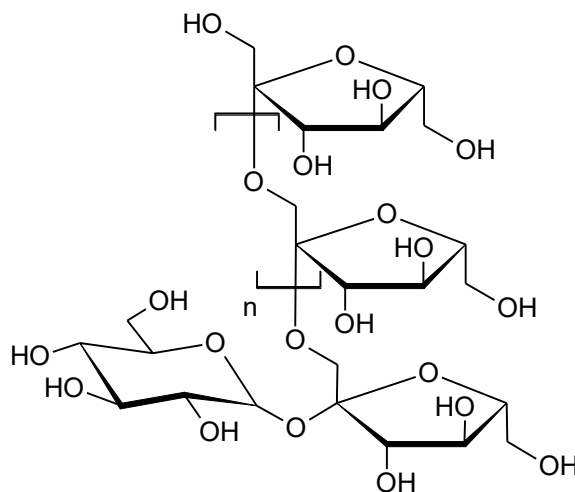
Skupina látek	Hlavní zástupce	CASRN	Citace	
Aldehydy	koniferylaldehyd	[458-36-6]	14	
	syringaldehyd ^a	[134-96-3]	14	
Esenciální oleje	oktan	[111-65-9]	14	
Flavonoidy	kaempferol	[520-18-3]	17, 14	
	kvercetin ^a	[117-39-5]	14	
	kyanidin	[13306-05-3]	17, 14	
Kumariny	cichoriin	[531-58-8]	7	
	eskuletin ^a	[305-01-1]	7	
	eskulin ^a	[531-75-9]	7	
	skopoletin	[92-61-5]	7	
	umbeliferon ^a	[93-35-6]	7	
Organické kyseliny	kafeoylchinové kyseliny		14	
	čekanková kyselina ^a	[6537-80-0]	14	
	chinová kyselina ^a	[77-95-2]	17, 14	
	isochlorogenové kyseliny	[2450-53-5] pro A	5	
	jablečná kyselina	[6915-15-7]	17, 14	
	kávová kyselina ^a	[331-39-5]	17	
Polyacetyleny	ponticaepoxid	[3562-36-5]	5	
Polysacharidy (fruktany)	inulin	[22413-78-1]	5, 7, 14, 12	
Seskviterpenoidy (seskviterpenové laktony)	cichoriolid A, B, C	[117013-49-7] pro A	5	
	cichoriosid A, B, C	[117013-48-6] pro A	19, 14	
	crepidiasid A, B	[101921-36-2] pro A	19, 14	
	intybulid	[374536-45-5] pro A	14	
	laktucin	[1891-29-8]	5, 20, 16	
	laktukopikrin	[65725-11-3]	5, 14, 20, 16	
	picrisid B	[104778-12-3]	7, 14	
	sonchusid A, C	[111618-82-7] pro A	19, 14	
	Sloučeniny s dusíkem	fenidon ^a	[92-43-3]	14
		8-hydroxychinolin	[148-24-3]	14
kofein ^a		[58-08-2]	14	
theofylin ^a		[58-55-9]	14	
Steroidy a triterpenoidy	α -amyrin	[638-95-9]	14	
	daucosterol	[474-58-8]	14	
	intybusoloid	[1011244-46-4]	14	
	kampesterol	[474-62-4]	14	
	β -sitosterol ^a	[83-46-5]	14	
	taraxasterol	[1059-14-9]	14	
	taraxeron	[514-07-8]	14	

^a Látka byla zvolena jako chemotaxonomický marker v této bakalářské práci.

2.3.1 Fruktany

Jako fruktan lze označit jakoukoli sloučeninu s převahou fruktosyl-fruktosových vazeb¹². Fruktany z čekanky (inulin, oligofruktosa) se řadí mezi vlákninu, tedy skupinu látek zahrnujících nestravitelné sacharidy a v horní části gastrointestinálního traktu nedegradovatelné ligniny. Většina sloučenin patřících mezi vlákninu je nerozpustná ve vodném roztoku enzymů (např. celulosa), ale fruktany z čekanky jsou v tomto vodném roztoku rozpustné.

Hlavní látkou, pro kterou byla čekanka i v minulosti hojně pěstována, jelikož je jejím významným zdrojem, je inulin⁷. Inulin je farmaceuticky nejvýznamnější fruktan. Jedná se o zásobní polysacharid, který se charakteristicky vyskytuje v kořenech mnoha zástupců čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*) a zvonkovité (*Campanulaceae*). Inulin je polysacharid tvořící lineární řetězce z až padesáti fruktofuranosových jednotek, které jsou spojeny β -(1 \rightarrow 2) vazbou (obr. 2.3), a každý řetězec je zakončen glukosovou jednotkou. Biosyntéza inulinu probíhá pomocí enzymů. Inulin se nebarví roztokem jodu. Savcí enzymy nejsou schopny inulin hydrolyzovat, není tedy savci metabolizován a je vylučován nezměněn. Čerstvý čekankový kořen o hmotnosti 100 g obsahuje 15–20 g inulinu¹².



Obr. 2.3 Chemická struktura inulinu (CASRN [22413-78-1])

Čekankové fruktany nejsou lidskými enzymy v horní části gastrointestinálního traktu štěpeny a nedochází tedy k jejich absorpci, ale pokračují do tlustého střeva, kde podléhají fermentaci vlivem bakterií¹².

Fruktany z čekanky jsou považovány za prebiotikum, tedy nestravitelné složky potravy, které podporují ve střevech se vyskytující bakterie příznivě ovlivňující svého hostitele¹². Jsou specifické tím, že jsou v tlustém střevě zcela zfermentovány a ve stolici se už žádné nenacházejí. Fruktany obsažené v čekance podporují tělu prospěšné bifidobakterie, které je jsou schopné využívat pravděpodobně díky schopnosti tvořit enzymy štěpící vazbu β -(1 \rightarrow 2). Oproti tomu fakultativně patogenní bakterie fruktany z čekanky příliš nevyužívají a v některých případech tyto fruktany i potlačují jejich růst.

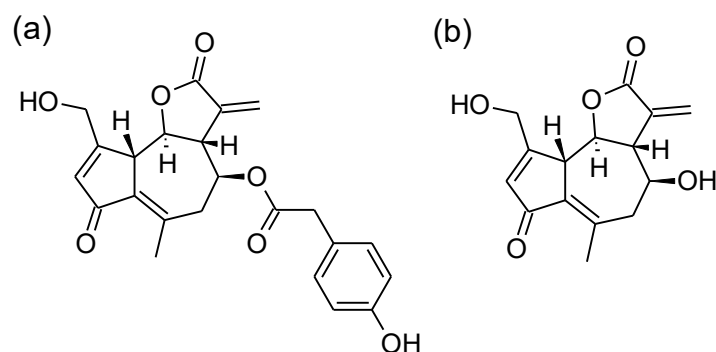
Čekankové fruktany jsou také schopné zabraňovat průjmům, jelikož povzbuzují vstřebávání vody a soli¹².

Fruktany z čekanky jsou, jak již bylo uvedeno, látky ve vodě rozpustné, a navíc se jedná o látky bez chuti a tepelně stabilní, které lze dobře kombinovat se sladidly¹². Vzhledem k těmto vlastnostem nacházejí veliké uplatnění v potravinářství, protože jsou velice vhodné k nahrazování cukru, tedy sacharidů stravitelných v trávicím traktu (sacharosa, škrob), které mají mnohem větší energetické hodnoty než nestravitelné fruktany.

2.3.2 Seskviterpenoidy

Další významnou skupinou látek vyskytujících se v čeledi hvězdicovité jsou seskviterpenoidy (seskviterpenové laktony)¹⁴. Seskviterpenoidů bylo izolováno veliké množství; Aisa¹⁴ uvádí padesát pět. Většinou se jedná o seskviterpenoidy odvozené od guajanových seskviterpenů, ale některé mají jako základ eudesmanový seskviterpen. Hořkost způsobuje seskviterpenoid vyskytující se v celé rostlině, laktukopikrin.

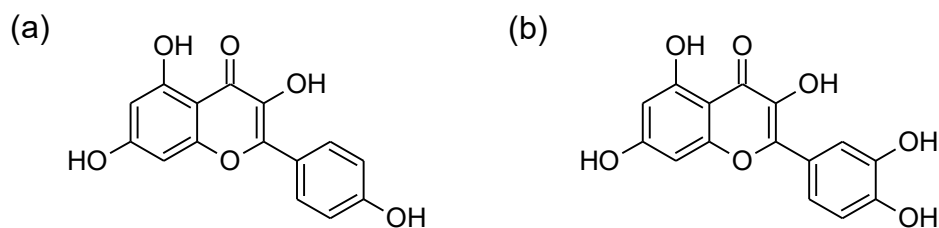
Seskviterpenoidy laktukopikrin a laktucin (obr. 2.4) vykazují antimalarické účinky¹⁶. Vodný extrakt čekankového kořene lze proto využít jako antimalarikum, které je ale citlivé na světlo.



Obr. 2.4 Chemická struktura (a) laktukopikrinu (CASRN [65725-11-3]) a (b) laktucinu (CASRN [1891-29-8])

2.3.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou významné rostlinné sekundární metabolity^{7, 14, 17}. Jedná se o nejrozsáhlejší skupinu fenolických sloučenin v rostlinách. Vyskytují se ve všech částech rostlin, ale především jsou přítomny ve fotosyntetizujících buňkách. Jsou přítomny volně i ve formě glykosidů. Jejich funkcí je ochrana rostliny před UV zářením. Flavonoidy jsou díky své struktuře látky s významnými antioxidačními účinky, a proto je dobré je přijímat ve stravě. Působí preventivně proti chronickým degenerativním onemocněním (kardiovaskulárním a trávicího traktu). Příklady flavonoidů vyskytujících se v čekance obecné jsou kaempferol a kvercetin (obr. 2.5).

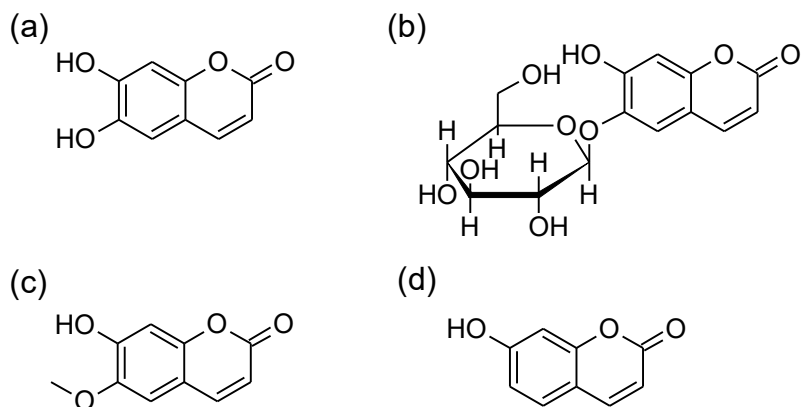


Obr. 2.5 Chemická struktura (a) kaempferolu (CASRN [520-18-3]) a (b) kvercetinu (CASRN [117-39-5])

2.3.4 Kumariny

Kumariny se v rostlinách vyskytují volně i ve formě glykosidů⁷. Jsou to deriváty benzo- α -pyronu a je pro ně charakteristická vůně čerstvě posečeného sena. V amoniakálním

roztoku modře, modrozeleně nebo fialově fluoreskují, čehož lze využít ve vizualizaci těchto sloučenin při chromatografii. Lépe je fluorescence pozorovatelná při použití ultrafialového světla. V listech čekanky se vyskytuje eskuletin, eskulin, cichoriin, skopoletin a umbeliferon (obr. 2.6).



Obr. 2.6 Chemická struktura (a) eskuletinu (CASRN [305-01-1]), (b) eskulinu (CASRN [531-75-9]), (c) skopoletinu (CASRN [92-61-5]) a (d) umbeliferonu (CASRN [93-35-6])

2.3.5 Organické kyseliny

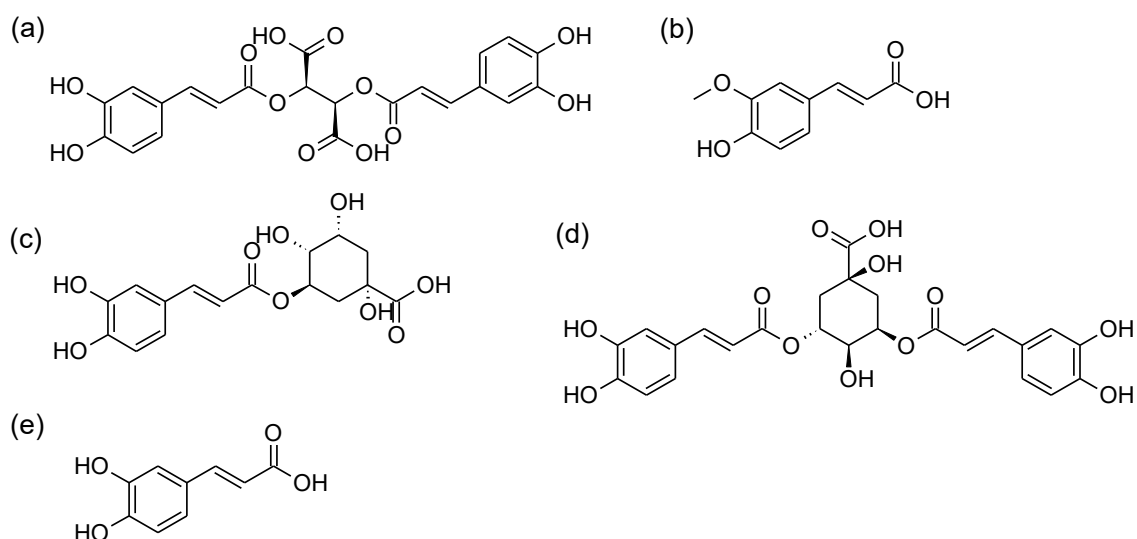
V čekance se vyskytují také mnohé organické kyseliny. Za hlavní bioaktivní látky čekanky jsou považovány kafeoylchinové kyseliny¹⁵. Mnoho organických kyselin se nachází v listech čekanky (např. flavonoidy čekankové kyseliny, izomery chlorogenové kyseliny)¹⁴. Působí jako antioxidanty a také způsobují inhibici aktivity enzymu α -glukosidasy.

Čekanka obsahuje čtyři významné hydroxyskořicové kyseliny (obr. 2.7)¹⁸. Hlavní sloučeninou je chlorogenová kyselina, která je významný antioxidant a má také antihyperglykemický účinek, jelikož inhibuje v játrech enzym glukosa-6-fosfatasu. V kořeni čekanky se nacházejí tři další hydroxyskořicové kyseliny – čekanková, kávová a ferulová kyselina, které se liší farmakologickými vlastnostmi.

Čekanková kyselina má antihyperglykemické účinky, jelikož vykazuje inzulinotropní účinek na β -buňky pankreatu a také stimuluje vychytávání glukosy svalovými buňkami¹⁸. Na rozdíl od chlorogenové kyseliny ale nepůsobí na játra.

Kávová kyselina má také antihyperglykemický účinek¹⁸. Působí především snížením glukagonem indukované glykogenolýzy v játrech a také snižuje uvolňování inzulínu.

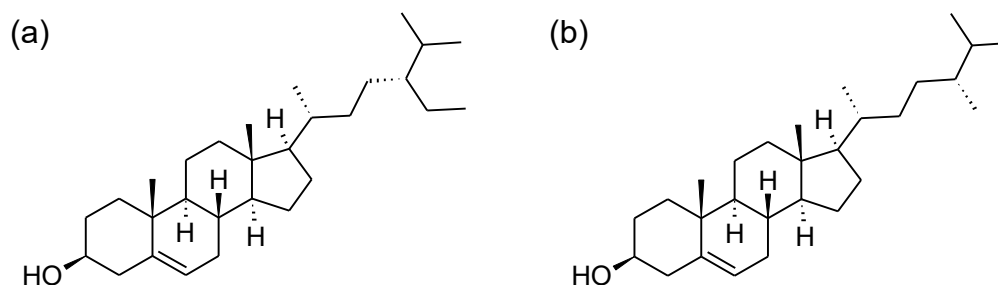
Ferulová kyselina má inzulinotropní účinek na β -buňky pankreatu¹⁸.



Obr. 2.7 Chemické struktury hydroxyskořicových kyselin: (a) čekanková kyselina (CASRN [6537-80-0]), (b) ferulová kyselina (CASRN [1135-24-6]), (c) chlorogenová kyselina (CASRN [327-97-9]), (d) isochlorogenová kyselina A (CASRN [2450-53-5]) a (e) kávová kyselina (CASRN [331-39-5])

2.3.6 Steroidy a triterpenoidy

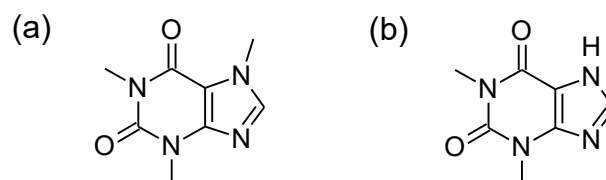
Steroly vyskytující se v rostlinách se nazývají fytosteroly. Všechny rostliny obsahují steroly a stanoly⁷. Tyto látky se oproti cholesterolu špatně vstřebávají v trávicím traktu a zároveň také inhibují vstřebávání cholesterolu z potravy. Vzhledem k této vlastnosti je dobré je zařadit do jídelníčku u lidí se zvýšeným množstvím cholesterolu v krvi. Hlavními steroly v rostlinách jsou sitosterol a kampesterol (Obr. 2.8).



Obr. 2.8 Chemická struktura (a) β -sitosterolu (CASRN [83-46-5]) a (b) kampesterolu (CASRN [474-62-4])

2.3.7 Sloučeniny s dusíkem

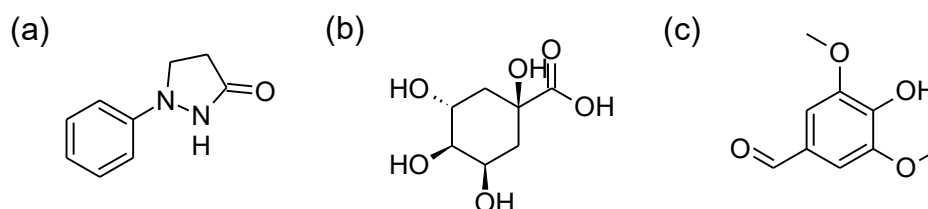
Kofein a theofylin (obr. 2.9) jsou purinové alkaloidy, deriváty xanthinu⁷. Kofein působí na nervovou soustavu a také má slabý diuretický účinek. Theofylin má silnější diuretický účinek než kofein, neboť uvolňuje hladkou svalovinu účinněji než kofein.



Obr. 2.9 Chemická struktura (a) kofeinu (CASRN [58-08-2]) a (b) theofylinu (CASRN [58-55-9])

2.4 Chemotaxonomické markery vybrané v této práci

Z látek literaturou uváděných jako často se vyskytující v čekance obecné (tab. 2.1) bylo vybráno dvanáct na trhu dostupných látek a ty byly použity jako chemotaxonomické markery. Struktury látek, jejichž vzorce nebyly uvedeny výše v textu, jsou znázorněny na obr. 2.10.



Obr. 2.10 Chemická struktura (a) fenidonu (1-fenyl-3-pyrazolidinon), (b) D-(-)-chinové kyseliny, (c) syringaldehydu

Byl vybrán také inulin, který byl ale stanovován jinou metodou, protože ho nelze dobře detekovat pomocí MS.

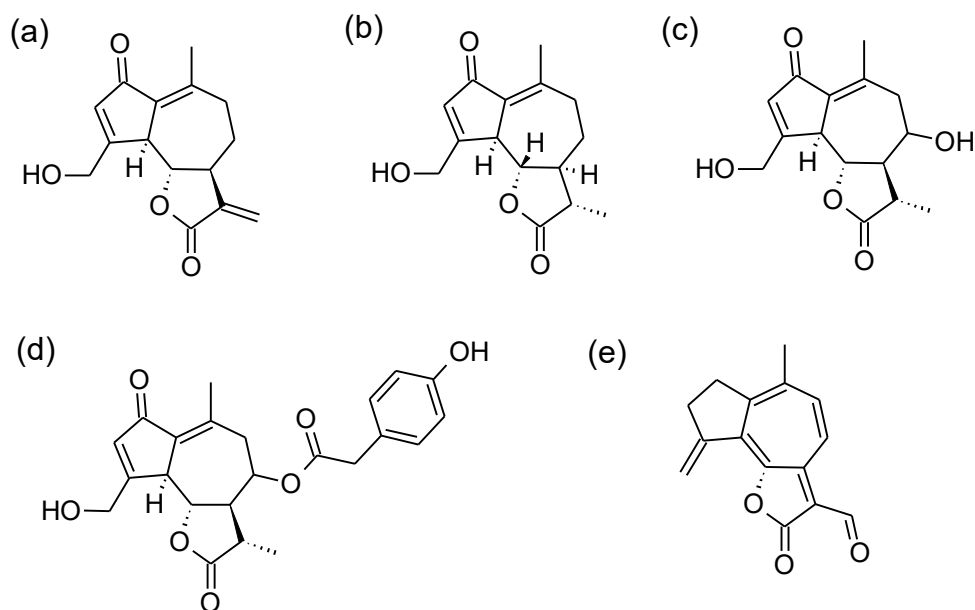
Vzhledem k nedostupnosti řady chemotaxonomických markerů byl jako zdroj těchto látek použit novodobý kořen čekanky. Jako chemotaxonomické markery byly vybrány látky ze skupiny seskviterpenových laktonů a hydroxyskořicových kyselin

(tab. 2.2)^{21, 22, 23, 24}. Struktury chemotaxonomických markerů, které nebyly uvedeny výše v textu, jsou znázorněny na obr. 2.11.

Tabulka 2.2

Vybrané chemotaxonomické markery čekanky ze skupiny seskviterpenových laktonů a hydroxyskořicových kyselin, jejich CASRN a odkaz na literaturu

Skupina látek	Vybraný chemotaxonomický marker	CASRN	Citace
Hydroxyskořicové kyseliny	čekanková kyselina	[6537-80-0]	14, ^{21, 23}
	chlorogenová kyselina	[327-97-9]	5, ^{21, 23}
	isochlorogenová kyselina A	[2450-53-5]	5, ²¹
Seskviterpenové laktony	lettucenin A	[97915-46-3]	25
	11,13-dihydro-8-deoxylaktucin	[7726-34-3]	20
	8-deoxylaktucin	[65725-10-2]	19, ²⁰
	laktucin	[1891-29-8]	5, ^{16, 19, 20}
	laktukopikrin	[65725-11-3]	5, ^{14, 16, 20}
	11 β ,13-dihydrolaktucin	[83117-63-9]	19, ²⁰
	11 β ,13-dihydrolaktukopikrin	[125519-47-3]	20



Obr. 2.11 Chemické struktury zbývajících zvolených chemotaxonomických markerů ze skupiny seskviterpenových laktonů: (a) 8-deoxylaktucin, (b) 11,13-dihydro-8-deoxylaktucin, (c) 11 β ,13-dihydrolaktucin, (d) 11 β ,13-dihydrolaktukopikrin a (e) lettucenin A

2.5 Metody analýzy látek obsažených v čekance

Vzhledem k tomu, že čekanka je rostlinný materiál, ve kterém se vyskytuje velké množství látek, jsou k analýze používány zejména separační metody. Velice významnou a častou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Willeman a kol.²⁶ studovali vzorky kořene čekanky *Cichorium intybus var. sativum* pomocí HPLC s DAD detekcí. Zaměřil se na stanovení volných chlorogenových kyselin a seskviterpenových laktonů. Mobilní fáze se skládala ze tří složek okyselených 0,1% kyselinou fosforečnou. Složkou A byla voda, složkou B byl methanol a složkou C byl acetonitril. Byla použita gradientová eluce a analýza trvala 16,5 min. Kolona byla temperována na 45 °C. Analýza byla prováděna na koloně Kinetex PFP (100×4,6 mm, 2,6 μm). Seskviterpenových laktonů a chlorogenových kyselin bylo stanoveno 250 a 100 μg g⁻¹ sušeného kořene, 790 a 1,5 μg g⁻¹ čekankové mouky a 160 a 820 μg g⁻¹ pražených kousků kořene.

Stanovením inulinu v kořenu čekanky obecné se zabýval Basaran a kol.²⁷, kteří použili isokratickou eluci na koloně Inertsil-NH₂ (250×4,6 mm, 5 μm) a mobilní fází byla ultračistá voda. Kolona byla temperována na 80 °C. Detekce byla prováděna pomocí refraktometrického detektoru. Koncentrace inulinu se pohybovaly v rozmezí 90–144 g kg⁻¹.

Metodu na spektrometrické stanovení inulinu v plazmě a moči navrhl Heyrovský²⁸. Principem je reakce β-indolyloctové kyseliny s fruktosou a fruktosu obsahujícími sacharidy (inulin) v prostředí koncentrované kyseliny chlorovodíkové, kdy vzniká při laboratorní teplotě během 15 až 18 h, nebo po zahřátí ve vodní lázni na 37 °C po dobu 1 h fialové zbarvení, které lze stanovit spektrometricky při vlnové délce 530 nm.

Při analýze rostlinného materiálu je důležitým krokem také extrakce, kterou se více zabýval Liu a kol.¹⁵ při studiu antibakteriální a antioxidační aktivity extraktu kořene čekanky obecné. Optimální podmínky byly při kombinaci 70% ethanolu, 24 h dlouhé době louhování a trojnásobné ultrazvukové lázni s příkonem 300 W. Ke stanovení kafeoylchinových kyselin z kořene čekanky byla použita metoda HPLC na koloně Diamonsil 18 C (250×4,6 mm) s lineární gradientovou elucí. Mobilní fáze byla směs destilované vody a acetonitrilu, obě složky byly okyseleny 3% octovou kyselinou.

Kolona byla temperována na teplotu 38 °C. Při extrakci za optimálních podmínek obsahoval extrakt čekankového kořene 0,104 % kafeoylchinových kyselin.

3 Experimentální část

3.1 Popis vzorků

Vzorek historického extraktu čekanky byl získán ze sbírky Národního muzea (inv. č. H2-9568). Pochází z kapucínské lékárny, kde byl uskladněn ve skleněné nádobě o průměru 50 mm a výšce 120 mm (obr. 3.1a). Stěny nádoby byly přetřené barvou, která měla za úkol chránit obsah před světlem. Hrdlo nádoby bylo překryto koženým víčkem, které bylo upevněno provázkem. Nádoba je označena nápisem „Ext: Cichor[ii]“. V nádobě byly uschovány suché kousky čekankového extraktu různých tvarů, ve středu světlé a okraje tmavě hnědé až černé (obr. 3.1b). Suché kousky vznikly vyschnutím původně hustého a pastovitého extraktu během 200 let, kdy byl extrakt uložen v původní nádobě v kapucínské lékárně.

Novodobý vzorek sušeného čekankového kořene byl zakoupen v říjnu 2021 v prodejně Salveo (Praha) a byl uložen v papírovém sáčku (obr. 3.1c). Kousky kořene měly světle hnědou barvu (obr. 3.1d).



Obr. 3.1 Analyzované vzorky: (a) barokní stojatka, z níž byl odebrán historický vzorek extraktu čekanky, (b) ukázka vzhledu odebraného historického vzorku extraktu čekanky, (c) sáček s novodobým vzorkem čekankového kořene, (d) ukázka vzhledu novodobého vzorku čekankového 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 s UV/VIS detekcí byl jako složka A mobilní fáze používán mravenčanový pufr o koncentraci $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 2,23$, který byl připraven z mravenčí kyseliny (98% p. a., Lach-Ner, Česká republika) a v poměru 1:2 zředěné 35% kyseliny chlorovodíkové (35% p. a., Lach-Ner, Česká republika). Pro HPLC s MS detekcí byl na místo mravenčanového pufru použit vodný roztok mravenčí kyseliny o koncentraci

10^{-2} mol dm⁻³ a pH = 3,50. Složkou B mobilní fáze byl v obou případech detekce methanol (HPLC, Biosolve Chimie, Francie).

K extrakcím vzorků byla použita voda Milli-Q, ethanol (96%, p.a., Penta, Česká republika), *n*-hexan (HPLC, Macron Fine Chemicals), ethyl-acetát (99,7% p. a., Penta, Česká republika).

K přípravě roztoků standardů (chemotaxonomických markerů) byly, pokud není uvedeno jinak, použity látky od výrobce Sigma-Aldrich o následující čistotě: čekanková kyselina ($\geq 95\%$ HPLC), eskuletin (98%), eskulin hydrát ($\geq 98\%$), fenidon (97%), D(-)-chinová kyselina (98%), kávová kyselina ($\geq 98,0\%$ HPLC), kofein (extra pure, Fisher Chemical), kvercetin ($\geq 95\%$ HPLC), sitosterol ($\geq 96\%$), syringaldehyd (98%), theofylin ($\geq 99\%$) a umbeliferon (99 %).

Standardem inulinu byl vzorek pro potravinářské účely (99 % inulin, 1 % protispěková látka oxid křemičitý) od společnosti F&N (Česká republika). K jeho stanovení byla také použita β -indolyloctová kyselina (p. a., Lachema, Česká republika) a výše zmíněná kyselina chlorovodíková.

3.3 Přístroje a metody

3.3.1 Extrakce

K extrakci vzorku novodobého kořene a historického extraktu čekanky bylo vzato pár kousků vzorku a ty byly rozetřeny pomocí tloučku v třecí misce na prach. Ze vzniklého zhomogenizovaného prášku bylo odvažováno přesně asi 100 mg do mikrozkušavky Eppendorf na analytických vahách Sartorius R 200 D (Sartalex, Německo). K navážkám bylo přidáno 1,5 cm³ příslušného rozpouštědla. K extrakci byla jako rozpouštědlo použita voda Milli-Q, ethanol, *n*-hexan a ethyl-acetát. Vzorky byly následně umístěny do ultrazvukové lázně Bandelin Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Německo) po dobu 15 minut při výkonu 80/320 W. Následně byly umístěny do centrifugy miniSpin plus (Eppendorf AG, Německo) po dobu 10 minut při 10 000 rpm. Automatickou pipetou byl supernatant odpipetován do vialek.

Při extrakci hexanem byl supernatant po centrifugaci pipetován do mikrozkušavek Eppendorf a ty byly umístěny do odparky miVac DNA (GeneVac Ltd, UK) na 30 minut

při 70 °C. Odparky byly před analýzou rozpuštěny v 0,1 cm³ mobilní fáze (90 % mravenčanového pufru a 10 % methanolu).

Extrakce ethyl-acetátem byla provedena také pro navážky 100 mg historického a novodobého vzorku, ale navíc byl připraven i slepý vzorek. Navážky byly rozpuštěny v 1 cm³ ethyl-acetátu a mikrozkušavky Eppendorf byly zakryté alobalem umístěny do třepačky Thermo-Shaker (Grand-bio, EU) na 2 h při 830 rpm a pokojové teplotě. Následně byly mikrozkušavky Eppendorf dány do centrifugy miniSpin plus po dobu 10 minut při 10 000 rpm. Supernatanty byly přefiltrovány přes 0,2 µm stříkačkový filtr z acetátu celulosy (Whatman) do mikrozkušavky Eppendorf a odpařeny v odparce miVac DNA při 50 °C po dobu 30 minut. Odparky byly před analýzou rozpuštěny v 0,1 cm³ mobilní fáze.

3.3.2 Roztoky chemotaxonomických markerů

Zásobní roztoky standardů (chemotaxonomických markerů) byly připraveny navážením přesně asi 10 mg standardu na analytických vahách do 10cm³ odměrných baněk, které byly doplněny po rysku 96% ethanolem. Pro HPLC analýzu byly roztoky všech standardů zředěny tak, že bylo pipetováno 100 mm³ zásobního roztoku do 10cm³ odměrné baňky a ta byla doplněna po rysku 96% ethanolem. Analýza roztoku standardu eskulinu byla provedena i pro nezředěný roztok vzhledem k jeho horší rozpustnosti. Odlišně byl připraven roztok standardu čekankové kyseliny, jehož navážka byla pouze 0,27 mg a byl rozpuštěn pouze v 1 cm³ 96% ethanolu. Zředěné roztoky standardů kromě čekankové kyseliny byly podrobeny UV/VIS spektrometrii na spektrometru HP-8453 (Hewlett Packard, USA) v křemenných kyvetách optické dráhy 1 cm.

3.3.3 Stanovení inulinu

Stanovení inulinu ve vzorku novodobého kořene a historického extraktu čekanky bylo provedeno metodou podle Heyrovského²⁸. Byl připraven zásobní roztok β-indolyloctové kyseliny o koncentraci 5 000 mg dm⁻³ rozpuštěním navážky β-indolyloctové kyseliny v 96% ethanolu a vodný zásobní roztok inulinu o koncentraci 1 000 mg dm⁻³, ze kterého byla připravena sada kalibračních roztoků o koncentracích inulinu 20; 40; 60;

80 a 100 mg dm⁻³. Byl připraven také slepý vzorek. Novodobý i historický vzorek byl zhomogenizován v třecí misce s tloučkem a na analytických vahách bylo na lodičku odváženo 0,10087 g novodobého a 0,10261 g historického vzorku. Navážky byly kvantitativně převedeny do 25cm³ odměrných baněk, které byly doplněny po rysku vodou, uzavřeny víčkem a promíchány. Vzniklé extrakty byly přefiltrovány přes filtrační papír a do 10cm³ odměrných baněk byl pipetován 1 cm³ přefiltrovaných extraktů. Odměrné baňky s filtráty byly doplněny vodou po rysku a promíchány, čímž byly připraveny zředěné extrakty. Z kalibračních roztoků a zředěných extraktů byl pipetován 1 cm³ do skleněných zkumavek se zátkou, do kterých bylo přidáno 0,2 cm³ zásobního roztoku β-indolyloctové kyseliny a 8 cm³ 35% kyseliny chlorovodíkové. Zkumavky byly umístěny do vodní lázně EB7 (Labor- und Reinraumtechnik Arnsdorf, Německo) o teplotě 37 °C po dobu 1 h. Poté bylo změřeno spektrum příslušných roztoků při 530 nm na spektrometru HP-8453 v křemenných kyvetách optické dráhy 1 cm. Spektrum extraktu novodobého kořene čekanky bylo změřeno ještě po jeho zředění 35% kyselinou chlorovodíkovou v poměru 1:2.

3.3.4 HPLC s UV/VIS a hmotnostní detekcí

Extrakty vzorků a roztoky standardů byly analyzovány pomocí metody HPLC-UV na přístroji UHPLC Nexera XR s DAD a FLD detektorem (Shimadzu). Metoda byla převzata a upravena podle Willemana a kol.²⁶. Stacionární fází byla kolona Kinetex 2,6μ Phenyl-Hexyl 100A (100×3,0 mm). Mobilní fáze se skládala ze dvou složek. Složkou A byl mravenčanový pufr o koncentraci 10⁻² mol dm⁻³ a pH = 2,23, k jehož přípravě byl použit pH-metr Jenway 3510 (Barloworld Scientific, UK) s elektrodou HC 103 (Theta, ČR) a složkou B byl methanol. Celkový čas analýzy byl 22 minut. K analýze byl použit gradient začínající na 90 % složky A. Během prvních 15 minut lineárně kleslo zastoupení složky A až na 10 % a takto setrvalo konstantně 2 minuty (do 17. minuty chromatogramu). Poté zastoupení složky A lineárně vzrostlo během 3 minut (do 20. minuty chromatogramu) na 90 %. Poslední dvě minuty (do 22. minuty chromatogramu) bylo zastoupení složky A konstantně 90 %. Průtok mobilní fáze byl 0,5 cm³ min⁻¹. Teplota kolony byla temperována na 30 °C. Pro analýzu s DAD detekcí

při vlnových délkách 254 a 320 nm byl objem nástřiku 1 mm³. Data byla sbírána a vyhodnocována programem LabSolutions 2010 (Shimadzu).

Stejná metoda byla použita i pro analýzu s MS detekcí na přístroji Agilent 1200 HPLC System s binárním čerpadlem. V tomto případě ale musel být použit kvůli ionizaci na místo mravenčanovaého pufru roztok mravenčí kyseliny o koncentraci 10⁻² mol dm⁻³ a pH = 3,50 a objem nástřiku vzorku byl 3 mm³. ESI-HRMS detekce byla provedena na Bruker QqTOF Compact přístroji se softwarem Compass of Control 4.0 (Bruker Daltonics, Německo). Ke zpracování dat byl použit software Compass DataAnalysis 4.4 (Build 200.55.2969) (Bruker Daltonics, Německo). ESI-MS² byla provedena v pozitivním i negativním iontovém módu. Rozmezí skenu bylo od *m/z* 50 do *m/z* 1000. Zmlžovací plyn měl teplotu 220 °C a jeho průtok byl 3,0 dm³ min⁻¹. Napětí kapiláry bylo 2800 V. Naměřená hmotnostní spektra byla analyzována softwarem Compass CompoundCrawler 3.0 (Bruker, Německo) a byla porovnána s literaturou a databázemi PubChem²⁹, ChemSpider³⁰, ChEBI³¹.

4 Výsledky a diskuse

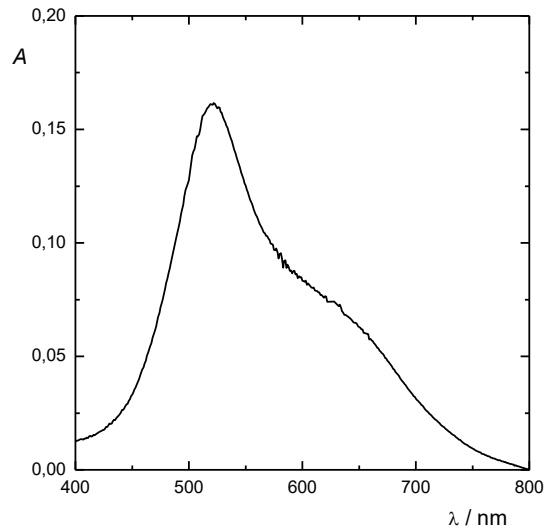
4.1 Zkouška rozpustnosti

Ověření, zda je historický vzorek skutečně extraktem a nikoli jen suchým čekankovým kořenem, bylo provedeno zkouškou rozpustnosti ve vodě. Historický vzorek se rozpustil a zbarvil vodu tmavě hnědě, zatímco novodobý vzorek čekankového kořene se nerozpustil, ale pouze nabobtnal. Tímto testem bylo ověřeno, že historický vzorek čekankového extraktu je extraktem. Tmavé zbarvení by mohlo být důsledkem přípravy extraktu, kdy při tepelném zpracování čekankového kořene dochází ke karamelizaci sacharidů.

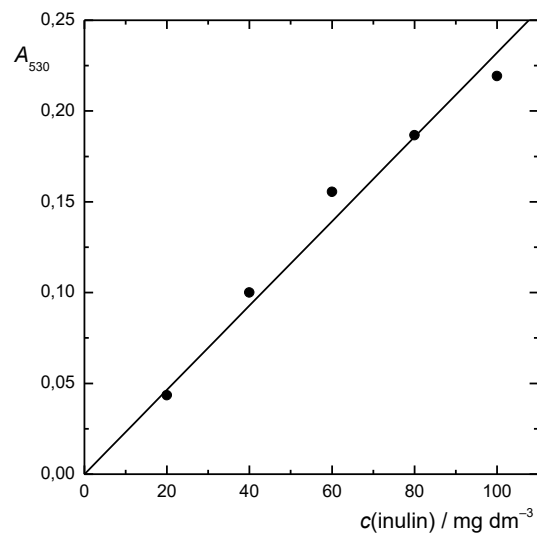
4.2 Stanovení inulinu

Pro ověření vhodné vlnové délky stanovení bylo nejprve proměřeno absorpční spektrum reakčního produktu inulinu s β -indolyloctovou kyselinou v prostředí koncentrované kyseliny chlorovodíkové (obr. 4.1), a na základě něho zvoleno měření absorbance při 530 nm.

Následně byla pomocí kalibračních roztoků inulinu sestrojena kalibrační závislost uvedená na obr. 4.2.



Obr. 4.1 UV/VIS spektrum reakčního produktu inulinu (o koncentraci 60 mg dm^{-3}) s β -indolyloctovou kyselinou v prostředí koncentrované kyseliny chlorovodíkové (měřeno v křemenné kyvetě optické dráhy 1 cm)



Obr. 4.2 Kalibrační závislost pro stanovení inulinu na základě jeho reakce s β -indolyloctovou kyselinou v prostředí kyseliny chlorovodíkové (měřeno v křemenné kyvetě optické dráhy 1 cm)

Následně bylo provedeno spektrometrické stanovení inulinu ve vzorku historického extraktu čekanky a třikrát zředěného novodobého vzorku sušeného čekankového kořene. Koncentrace inulinu ve vzorku byla vypočítána dosazením naměřených absorbancí vzorků do rovnice kalibrační křivky

$$A_{530} = 2,20 \cdot 10^{-3} \cdot c \text{ [mg dm}^{-3}\text{]} \quad (4.1)$$

Získané koncentrace byly vynásobeny ředěním. Pro historický i novodobý vzorek bylo započítáno ředění desetkrát a pro novodobý navíc ještě ředění třikrát. Výsledky stanovení jsou uvedeny v tab. 4.1.

Tabulka 4.1

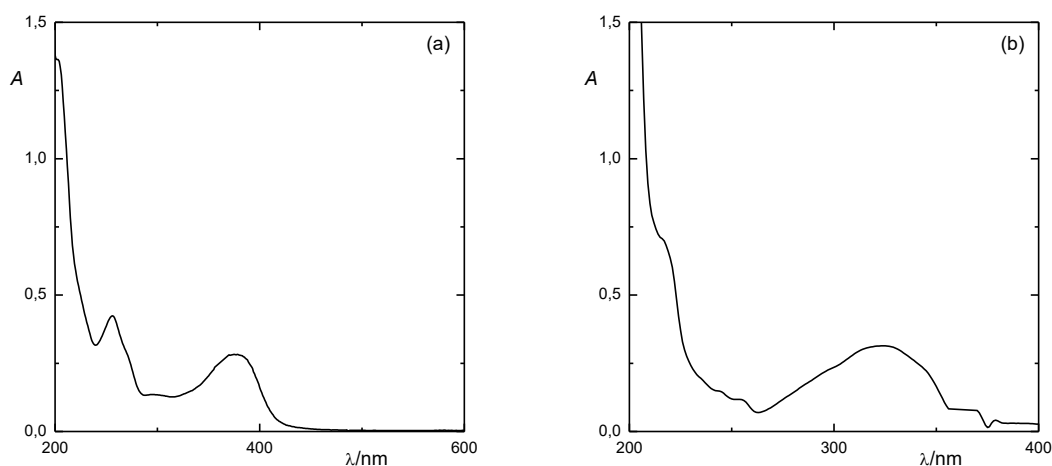
Spektrometrické stanovení inulinu ve studovaných vzorcích (H) historickém a (N) novodobém: naměřené absorbance reakčního produktu inulinu s β -indolyloctovou kyselinou v prostředí koncentrované kyseliny chlorovodíkové při 530 nm, koncentrace podle rovnice (4.1), dopočítaná koncentrace vzhledem k ředění, množství inulinu, navážka vzorku a procentuální zastoupení inulinu ve vzorku

	Vzorek	
	Historický	Novodobý
A_{530}	0,067257	0,15511
$c(\text{inulin}) / \text{mg dm}^{-3}$	30,6	70,5
$c(\text{inulin, před ředěním}) / \text{mg dm}^{-3}$	$3,06 \cdot 10^2$	$2,12 \cdot 10^3$
$m(\text{inulin}) / \text{mg}$	7,64	52,9
$m(\text{vzorek}) / \text{mg}$	102,61	100,87
$w(\text{inulin}) / \%$	7,45	52,4

Stanovený obsah inulinu v novodobém kořeni čekanky je v souladu s údaji uvedenými v literatuře³². Nižší obsah inulinu v historickém čekankovém extraktu je pravděpodobně způsoben degradací sacharidů vlivem tepelných procesů během přípravy extraktu.

4.3 Měření UV/VIS spekter vybraných chemotaxonomických markerů a výběr vhodných vlnových délek pro detekci

Pro roztoky vybraných chemotaxonomických markerů, uvedených v tab. 4.2 byla změřena UV/VIS spektra ethanolických roztoků, z nichž byla zjištěna vlnová délka maxima. Ukázka UV/VIS spekter je na obr. 4.3.



Obr. 4.3 UV/VIS spektrum zředěného roztoku (a) kvercetinu a (b) umbeliferonu o koncentraci 10 mg dm^{-3} v prostředí 96% ethanolu (měřeno v křemenných kyvetách optické dráhy 1 cm)

Tabulka 4.2

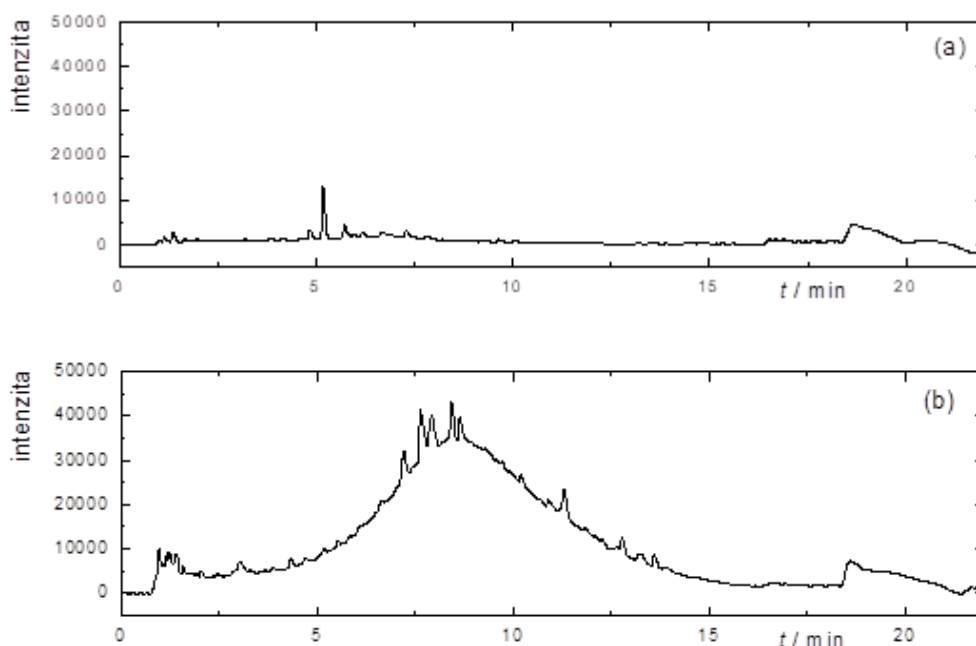
Vybrané chemotaxonomické markery, jejich CASRN a vlnová délka maxima zjištěná z UV/VIS spekter měřených v prostředí 96% ethanolu v křemenné kyvetě optické dráhy 1 cm

Standard	CASRN	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$
čekanková kyselina	[6537-80-0]	330
eskuletin	[305-01-1]	360
eskulin	[531-75-9]	338
fenidon	[92-43-3]	245
D-(–)-chinová kyselina	[77-95-2]	nemá
kávová kyselina	[331-39-5]	218
kofein	[58-08-2]	273
kvercetin	[117-39-5]	256
β -sitosterol	[83-46-5]	352
syringaldehyd	[134-96-3]	304
theofylin	[58-55-9]	270
umbeliferon	[93-35-6]	323

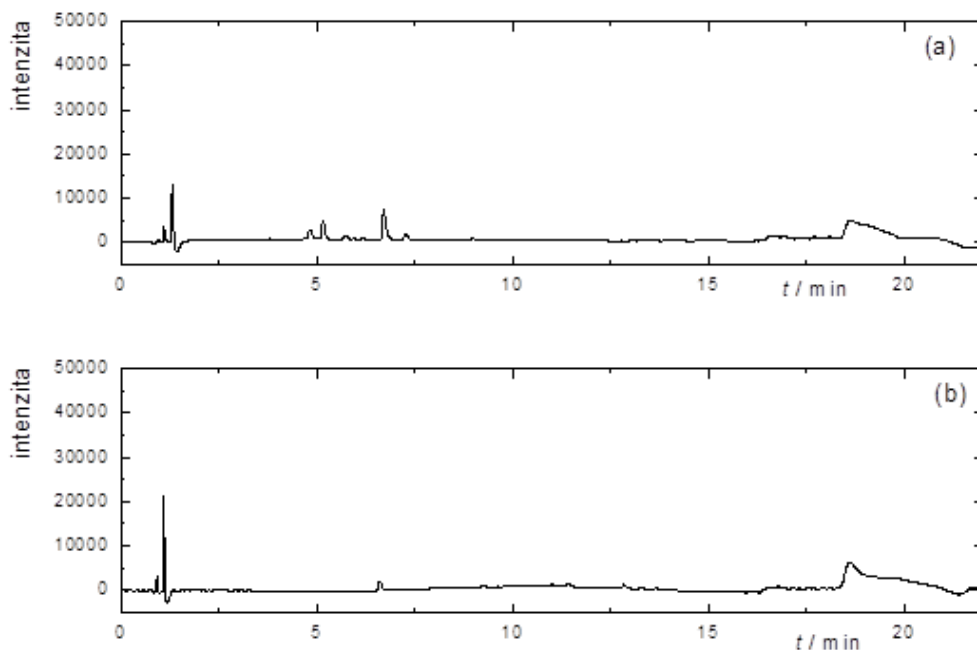
Na základě provedených měření UV/VIS spekter a informací z literatury²⁶ byly pro následující HPLC analýzu s UV/VIS detekcí vybrány jako vhodné vlnové délky detekce 254 a 320 nm.

4.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV/VIS detekcí

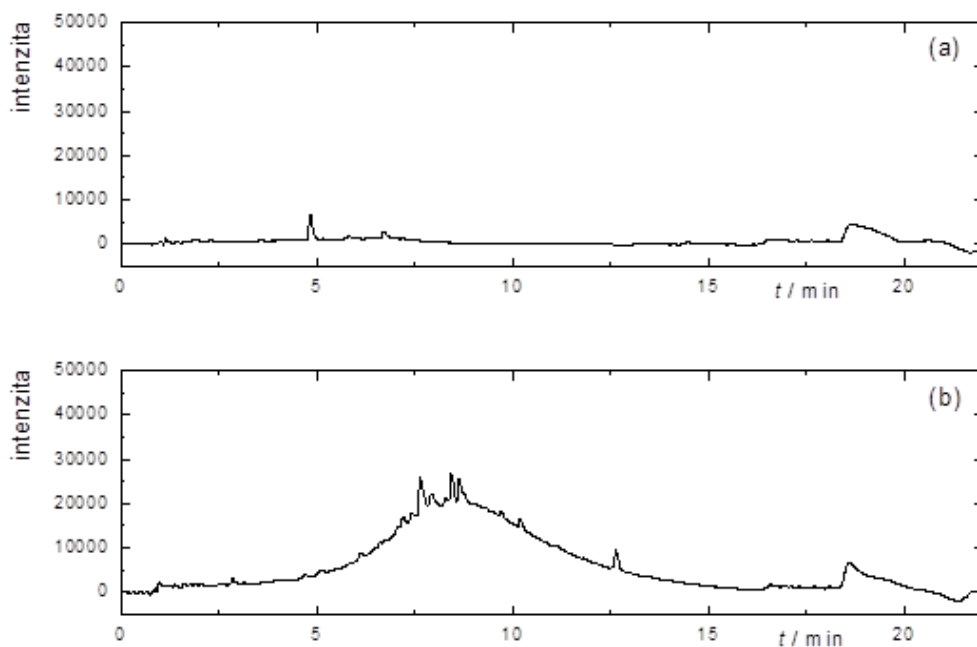
Analýza novodobého vzorku sušeného kořene čekanky a vzorku historického čekankového extraktu, extrahovaných různými rozpouštědly (voda, 50% ethanol, 96% ethanol), byla provedena pomocí HPLC s UV/VIS detekcí pomocí DAD detektoru. Z naměřených údajů byly vybrány chromatogramy při vlnové délce 254 nm (obr. 4.5 a 4.6) a vlnové délce 320 nm (obr. 4.7 a 4.8).



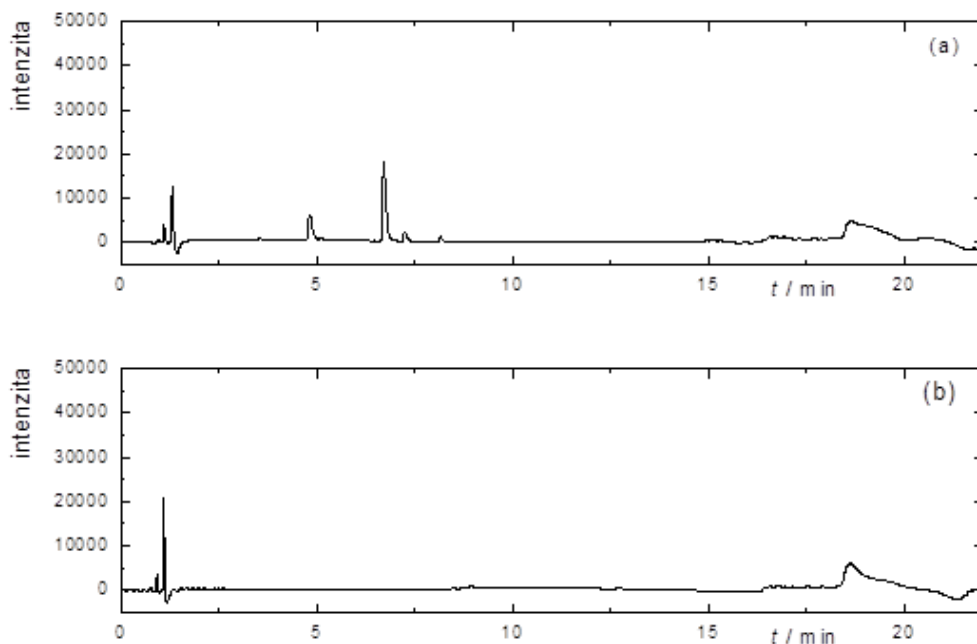
Obr. 4.5 HPLC-UV/VIS chromatogram extraktu (a) novodobého kořene čekanky a (b) historického extraktu čekanky extrahovaných vodou. Provedeno na koloně Kinetex 2,6 μ Phenyl-Hexyl 100A (100 \times 3,0 mm) s gradientovou elucí (mravenčanový pufr o koncentraci 10⁻² mol dm⁻³ a pH = 2,23 a methanol), průtoková rychlost 0,5 cm³ min⁻¹. Měřeno při 254 nm.



Obr. 4.6 HPLC-UV/VIS chromatogram extraktu (a) novodobého kořene čekanky a (b) historického extraktu čekanky extrahovaných 96% ethanolem. Provedeno na koloně Kinetex 2,6 μ Phenyl-Hexyl 100A (100 \times 3,0 mm) s gradientovou elucí (mravenčanový pufr o koncentraci 10⁻² mol dm⁻³ a pH = 2,23 a methanol), průtoková rychlost 0,5 cm³ min⁻¹. Měřeno při 254 nm.



Obr. 4.7 HPLC-UV/VIS chromatogram extraktu (a) novodobého kořene čekanky a (b) historického extraktu čekanky extrahovaných vodou. Provedeno na koloně Kinetex 2,6 μ Phenyl-Hexyl 100A (100 \times 3,0 mm) s gradientovou elucí (mravenčanový pufr o koncentraci 10⁻² mol dm⁻³ a pH = 2,23 a methanol), průtoková rychlost 0,5 cm³ min⁻¹. Měřeno při 320 nm.



Obr. 4.8 HPLC-UV/VIS chromatogram extraktu (a) novodobého kořene čekanky a (b) historického extraktu čekanky extrahovaných 96% ethanolem. Provedeno na koloně Kinetex 2,6 μ Phenyl-Hexyl 100A (100 \times 3,0 mm) s gradientovou elucí (mravenčanový pufr o koncentraci 10⁻² mol dm⁻³ a pH = 2,23 a methanol), průtoková rychlost 0,5 cm³ min⁻¹. Měřeno při 320 nm.

Na uvedených HPLC-UV/VIS chromatogramech vodného extraktu historického čekankového extraktu je patrné oproti chromatogramům vodného extraktu novodobého čekankového kořene veliké množství překrývajících se píků s mnohem větší intenzitou. To naznačuje větší zastoupení látek rozpustných ve vodě v historickém extraktu. Vyšší intenzita píků a jejich překrytí by mohlo ukazovat na přítomnost ve vodě rozpustných degradačních produktů látek vyskytujících se v extraktu novodobého kořene. Posunutí retenčních časů píků historického extraktu dál oproti píkům v chromatogramu novodobého vzorku by mohlo poukazovat na změny ve struktuře látek vlivem jejich degradace. Větší počet i intenzita píků je u vodných extraktů při vlnové délce 254 nm.

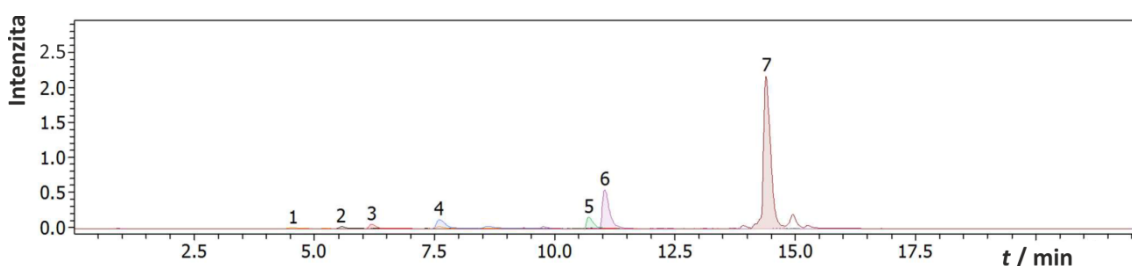
HPLC-UV/VIS chromatogramy ethanolickeho extraktu historického extraktu neobsahují téměř žádné píky, zatímco v chromatogramech ethanolickeho extraktu novodobého kořene čekanky jsou některé píky patrné.

Na odlišnostech v počtu a intenzitě píků v chromatogramech vodného a ethanolickeho extraktu historického čekankového extraktu je vidět závislost úspěšnosti extrakce na volbě vhodného rozpouštědla.

Veliké množství překrývajících se píků v chromatogramech vodného extraktu historického extraktu čekanky vedlo k nutnosti využít pro další analýzu vzorků hmotnostní spektrometrii. Hmotnostní spektrometrie umožňuje navíc jistější určení látek vzhledem k možnosti rozpoznání struktury látek.

4.5 Identifikace chemotaxonomických markerů pomocí HPLC s MS² detekcí

Extrakty novodobého sušeného kořene čekanky a historického extraktu čekanky byly analyzovány pomocí HPLC spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Novodobý čekankový kořen sloužil jako zdroj chemotaxonomických markerů čekanky nedostupných na trhu a zároveň byl ukazatelem vhodnosti rozpouštědel použitých k extrakci látek ze vzorku. Ukázka chromatogramu detekce hlavních seskviterpenových laktonů v extraktu novodobého čekankového kořene je na obr. 4.7.



Obr. 4.7 HPLC-MS chromatogram extrahovaných iontů extraktu novodobého čekankového kořene extrahovaného ethyl-acetátem v negativním módu ESI. Identifikované látky: (1) chlorogenová kyselina, (2) 11 β ,13-dihydrolactucin, (3) lactucin, (4) isochlorogenová kyselina A, (5) 11 β ,13-dihydrolaktukopikrin, (6) laktukopikrin, (7) hydroxylinolová kyselina. Provedeno na koloně Kinetex 2,6 μ Phenyl-Hexyl 100A (100 \times 3,0 mm) s gradientovou elucí (mravenčí kyselina o koncentraci 10⁻² mol dm⁻³ a pH = 3,50 a methanol), průtoková rychlost 0,5 cm³ min⁻¹

V historickém i novodobém vzorku bylo nalezeno veliké množství látek. V pozitivním módu ESI bylo nalezeno 63 látek a v negativním módu ESI 75 látek. V osmnácti případech se jednalo o látku typickou pro čekanku či jiné rostliny (tab. 4.3) a pro některé z těchto látek byla porovnáním s databázemi^{29, 30, 31} a současným provedením tandemové hmotnostní spektrální analýzy s vysokým rozlišením určena jejich struktura, ale pro některé bylo možné určit pouze empirický vzorec.

Tabulka 4.3

Látky nalezené pomocí hmotnostní spektrometrie v HPLC chromatogramu různých extraktů historického extraktu čekanky (H) nebo novodobého čekankového kořene (N), (retenční čas v HPLC, ESI mód, typ iontu, experimentální a teoretický m/z , název a CASRN látky, výskyt v extraktu), provedeno na koloně Kinetex 2,6 μ Phenyl-Hexyl 100A (100 \times 3,0 mm) s gradientovou elucí (mravenčí kyselina o koncentraci 10⁻² mol dm⁻³ a pH = 3,50 a methanol), průtoková rychlost 0,5 cm³ min⁻¹

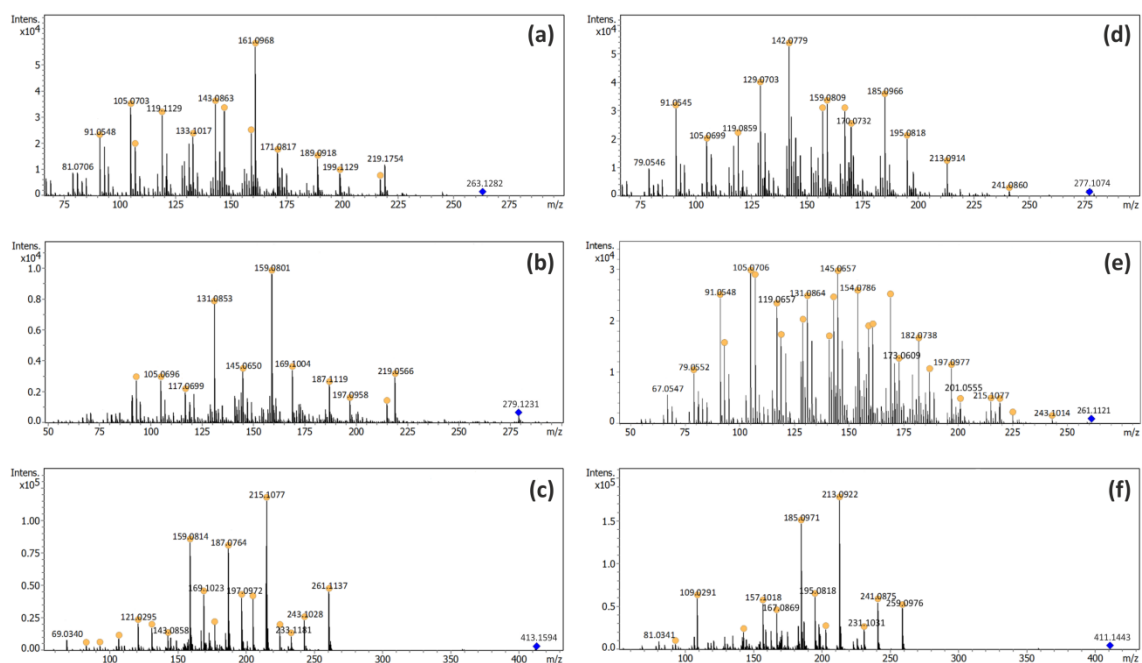
t_r /min	ESI mód	Typ iontu	m/z		Název, CASRN	Přítomnost ve vzorku extrahovaném rozpouštědlem					
			Experimentální	Teoretické		Δ /ppm	hexan	100% ethanol	50% ethanol	ethyl-acetát	voda
5,4	Poz.	[M+H] ⁺	279,1231	279,1227	-1,4	11 β ,13-dihydrolaktucin, [83117-63-9]				N	N
6,1	Poz.	[M+H] ⁺	277,1074	277,1071	-1,3	laktucin, [1891-29-8]				N	
7,3	Poz.	[M+H] ⁺	517,1335	517,1341	1,4	isochlorogenová kyselina A, [2450-53-5]			N		
8,0	Poz.	[M+H] ⁺	263,1282	263,1278	-1,4	11,13-dihydro-8-deoxylaktucin, [7726-34-3]			N		N
8,8	Poz.	[M+H] ⁺	261,1121	261,1121	0,1	8-deoxylaktucin, [65725-10-2]					N
9,7	Poz.	[M+H] ⁺	215,1643	215,1642	-0,5	neurčeno, pravděpodobně C ₁₂ H ₂₂ O ₃	H			N	N
10,6	Poz.	[M+H] ⁺	413,1594	413,1595	0,1	11 β ,13-dihydrolaktukopikrin, [125519-47-3]				N	
10,9	Poz.	[M+H] ⁺	411,1443	411,1438	-1,1	laktukopikrin, [65725-11-3]				N	
11,2	Poz.	[M+H] ⁺	269,1750	269,1747	-1,2	arteinkulton, [88125-07-9]	H, N			N	H, N
15,3	Poz.	[M+H] ⁺	380,3379	380,3384	1,3	neurčeno, pravděpodobně C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O	H, N				N
0,9	Neg.	[M-H] ⁻	341,1089	341,1089	0,1	sacharosa, [57-50-1]	N	N			
1,1	Neg.	[M-H] ⁻	133,0144	133,0142	-1,4	jablečná kyselina, [6915-15-7]			N		N
4,3	Neg.	[M-H] ⁻	353,0885	353,0878	-2,0	chlorogenová kyselina, [327-97-9]	N	N	N	N	N
5,4	Neg.	[M-H] ⁻	277,1087	277,1087	-2,0	11 β ,13-dihydrolaktucin, [83117-63-9]			N	N	N
6,1	Neg.	[M-H] ⁻	275,0923	275,0925	0,8	laktucin, [1891-29-8]				N	
7,2	Neg.	[M-H] ⁻	609,1467	609,1461	-1,0	rutin, [153-18-4]			H		H
7,3	Neg.	[M-H] ⁻	515,1201	515,1195	-1,2	isochlorogenová kyselina A, [2450-53-5]	N	N	N	N	
7,8	Neg.	[M-H] ⁻	593,1520	593,1512	-1,3	nikotiflorin, [17650-84-9]			H		H
8,9	Neg.	[M-H] ⁻	607,1671	607,1668	-0,3	diosmin, [520-27-4]			H		H
9,0	Neg.	[M-H] ⁻	165,9788	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	neurčeno				H, N	
10,4	Neg.	[M-H] ⁻	225,1490	225,1490	2,6	neurčeno, pravděpodobně C ₁₃ H ₂₂ O ₃	H, N				
10,6	Neg.	[M-H] ⁻	411,1454	411,1449	-1,2	11 β ,13-dihydrolaktukopikrin, [125519-47-3]			N	N	
10,9	Neg.	[M-H] ⁻	409,1300	409,1293	-1,7	laktukopikrin, [65725-11-3]	N	N	N	N	
11,0	Neg.	[M-H] ⁻	329,0664	329,0667	1,0	aflatoxin G ₂ , [7241-98-7]			H		H
12,6	Neg.	[M-H] ⁻	194,0838	194,0823	-7,8	neurčeno, pravděpodobně C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	H, N				
14,4	Neg.	[M-H] ⁻	295,2304	295,2279	-8,5	hydroxylinolová kyselina, [30207-02-4]			N	H, N	
15,6	Neg.	[M-H] ⁻	277,2181	277,2173	-2,7	linolenová kyselina, [463-40-1]	N				
15,7	Neg.	[M-H] ⁻	291,2020	291,1966	-18,7	4-(undecyloxy)benzoová kyselina, [15872-44-3]			H		H, N
15,9	Neg.	[M-H] ⁻	279,2340	279,2330	-3,9	linolová kyselina, [60-33-3]	H, N	N			

n.a. nelze aplikovat

Pět pro čekanku charakteristických látek bylo nalezeno v obou analyzovaných vzorcích. Kromě těchto látek byly v obou vzorcích nalezeny i látky vyskytující se v rostlinách běžně (např. linolová kyselina).

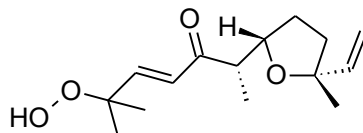
Vybrané seskviterpenoidy a hydroxyskořicové kyseliny, představující chemotaxonomické markery čekanky, byly až na čekankovou kyselinu a lettucenin A nalezeny v novodobém vzorku čekankového kořene. V historickém extraktu čekanky vybrané chemotaxonomické markery nalezeny nebyly a ani nebyly nalezeny jejich možné degradační produkty, což by mohlo být vysvětleno jejich tepelným rozkladem vlivem vaření během přípravy extraktu³³. Jiným vysvětlením by mohl být rozklad vlivem hub a bakterií, jelikož v historickém extraktu čekanky byla jedna látka hmotnostní spektrometrií určena jako aflatoxin G2. Stejně zjištění bylo například popsáno při analýze pečeti ze včelího vosku³⁴.

Tandemová hmotnostní spektra šesti seskviterpenových laktonů identifikovaných v novodobém čekankovém kořeni (obr. 4.8) nebyla dosud za stejných experimentálních podmínek publikována. Na uvedených spektrech je dobře patrné veliké množství fragmentů, vznikajících mnoha možnými způsoby štěpení guajanolidového jádra³⁵.



Obr. 4.8 ESI⁺-MS² spektra produktových iontů vybraných seskviterpenových laktonů (ion prekurzoru značený diamantem): (a) 11,13-dihydro-8-deoxylaktucin, (b) 11 β ,13-dihydrolaktucin, (c) 11 β ,13-dihydro-laktukopikrin, (d) laktucin, (e) 8-deoxylaktucin, (f) laktukopikrin

Jako nový chemotaxonomický marker čekanky byl určen arteinkulton (obr. 4.9), seskviterpenový peroxid, který byl nalezen v novodobém i historickém vzorku. Jedná se o látku vyskytující se v rostlinách čeledi hvězdnicovitých, mezi které patří i čekanka obecná, ale dosud v čekance nebyl popsán^{21, 22, 23}. Poprvé byl objeven v rostlině *Artemisia inculta*, od které se odvíjí i jeho jméno^{36, 37}.



Obr. 4.9 Struktura arteinkultonu (CASRN [88125-07-9])

Pouze v historickém vzorku byly nalezeny další tři látky – flavonové glykosidy (diosmin, nikotiflorin a rutin), které sice nebyly nalezeny v novodobém vzorku kořene čekanky, ale jejich výskyt v čekance lze doložit z literatury^{21, 22, 23}.

Pomocí hmotnostní spektrometrie byly analyzovány i roztoky vybraných chemotaxonomických markerů často se v čekance vyskytujících látek (tab. 4.2), které se ale nepodařilo prokázat v novodobém kořeni čekanky, ani v historickém vzorku extraktu čekanky.

I přesto, že žádný vybraný chemotaxonomický marker nebyl nalezen v historickém extraktu, podařilo se prokázat, že historický vzorek je skutečně extrakt z čekanky. Pro toto tvrzení je důkazem identifikace arteinkultonu, který byl určen jako nový chemotaxonomický marker čekanky, neboť byl nalezen jak v novodobém čekankovém kořeni, tak v historickém čekankovém extraktu. Dalším, i když nepřímým důkazem je identifikace tří flavonových glykosidů v historickém čekankovém extraktu, jejichž výskyt v čekance je ale doložen literaturou^{21, 22, 23}.

5 Závěr

Pomocí HPLC s UV/VIS a MS² detekcí byla provedena kvalitativní analýza historického extraktu čekanky z 18. století. Pomocí této metody byla ověřována autenticita historického extraktu, ve kterém byly hledány chemotaxonomické markery čekanky. Některé standardy chemotaxonomických markerů byly vzhledem k jejich nedostupnosti na trhu nahrazeny analýzou novodobého sušeného čekankového kořene, který byl použit jako jejich zdroj a zároveň byl ukazatelem úspěšnosti extrakce různých rozpouštědel použitých k extrakcím vzorků.

Zda je historický vzorek skutečně extraktem, bylo ověřeno pomocí zkoušky rozpustnosti ve vodě v porovnání s novodobým sušeným čekankovým kořenem.

Spektrometrickou metodou byl v obou vzorcích stanoven inulin. V novodobém sušeném čekankovém kořeni bylo množství inulinu stanoveno na 52,4 %, což je v souladu s literaturou. V historickém extraktu čekanky bylo množství inulinu stanoveno na 7,45 %. Nižší zastoupení inulinu v historickém extraktu čekanky lze vysvětlit tepelnou degradací polysacharidů během vaření při přípravě extraktu.

Na základě naměřených UV/VIS spekter standardů často se v čekance vyskytujících látek a literatury byla pro HPLC-UV/VIS metodu zvolena detekce při 254 a 320 nm. Ze získaných HPLC-UV/VIS chromatogramů byla ověřena úspěšnost extrakce a zvolena vhodná extrakční činidla.

Pomocí HPLC-MS analýzy nebyly v historickém extraktu čekanky nalezeny vybrané chemotaxonomické markery a ani jejich možné degradační produkty, ale v novodobém čekankovém kořeni se je podařilo nalézt všechny kromě čekankové kyseliny a lettuceninu A. Možnou příčinou nepřítomnosti vybraných chemotaxonomických markerů v historickém extraktu čekanky by mohla být jejich degradace vařením při přípravě extraktu a také mikrobiální degradace, které nasvědčuje i zjištěná přítomnost aflatoxinu G₂ v historickém vzorku.

V novodobém i historickém vzorku byl nicméně nalezen nový chemotaxonomický marker čekanky – arteinkulton, seskviterpenový peroxid vyskytující se v rostlinách čeledi hvězdicovité, do které čekanka patří, ale dosud neidentifikovaný v čekance obecné. Dalším důkazem o pravosti historického čekankového extraktu jsou v něm identifikované tři flavonové glykosidy (diosmin, nikotiflorin a rutin), jejichž výskyt v čekance je uveden v literatuře.

Na základě zkoušky rozpustnosti, stanovení inulinu, identifikování arteinkultonu a tří flavonových glykosidů v historickém vzorku lze potvrdit, že analyzovaný historický vzorek je skutečně extraktem čekanky.

Literatura

1. Reynolds, T.: The evolution of chemosystematics. *Phytochemistry* **68**, 2887–2895 (2007).
2. Nesměrák, K.; Kunešová, J.: Farmaceutická historie kapucínského kláštera v Praze na Hradčanech. Část I. Klášterní lékárna. *Česká a slovenská Farmacie* **64**, 79–94 (2015).
3. *Dispensatorium Pharmaceuticum Austriaco-Viennense*. Collegium Pharmaceuticum (eds.), Vienna, Kürner 1729.
4. Jirásek, V.; Starý, F.: *Atlas léčivých rostlin*. 2. vydání. Praha, Státní pedagogické nakladatelství Praha 1989.
5. European Medicines Agency: *Assessment report on Cichorium intybus L., radix* [online]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/cichorii-intybi-radix> (citováno 25.4.2022).
6. Ústav pro jazyk český AV ČR: *Vokabulář webový* [online]. Dostupné z: <https://vokabular.ujc.cas.cz/> (citováno 25.4.2022)
7. Evans, W. C.: *Pharmacognosy*. 16th ed. Edinburgh, Saunders Elsevier 2009.
8. Pliny: *Natural History*. Vol. VI–VII. London, William Heinemann 1951.
9. Vachala, B.: *Ebersův staroegyptský lékařský papyrus*. Praha, Academia 2020.
10. Horace: *Odes and Epodes*. London, Loeb Classical Library 2004.
11. Theophrastus: *Enquiry Into Plants*. Vol. I–II. London, William Heinemann 1916.
12. Benkeblia, N.: *Polysaccharides Natural Fibres in Food and Nutrition*. Boca Raton, CRC Press 2014.
13. Krätz, O.; Vaupel, E.: 1807: Observations regarding chemistry in the Anglo-Saxon world during the Napoleonic period. *Angewandte Chemie – International Edition* **46**, 24–51 (2007).

14. Aisa, H. A.; Xin, X.; Tang, D.: Chemical constituents and their pharmacological activities of plants from *Cichorium* genus. *Chinese Herbal Medicines* **12**, 224–236 (2020).
15. Liu, H.; Wang, Q.; Liu, Y.; Chen, G.; Cui, J.: Antimicrobial and antioxidant activities of *Cichorium intybus* root extract using orthogonal matrix design. *Journal of Food Science* **78**:2, M258–M263 (2013).
16. Bischoff, T. A.; Kelley, C. J.; Karchesy, Y.; Laurantos, M.; Nguyen-Dinh, P.; Arefi, A. G.: Antimalarial activity of lactucin and lactucopicrin: Sesquiterpene lactones isolated from *Cichorium intybus* L. *Journal of Ethnopharmacology* **95**, 455–457 (2004).
17. Bergantin, C.; Maietti, A.; Cavazzini, A.; Pasti, L.; Tedeschi, P.; Brandolini, V.; Marchetti, N.: Bioaccessibility and HPLC-MS/MS chemical characterization of phenolic antioxidants in Red Chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Functional Foods* **33**, 94–102 (2017).
18. Azay-Milhau, J.; Ferrare, K.; Leroy, J.; Aubaterre, J.; Tournier, M.; Lajoix, A.-D.; Tousch, D.: Antihyperglycemic effect of a natural chicoric acid extract of chicory (*Cichorium intybus* L.): A comparative *in vitro* study with the effects of caffeic and ferulic acids. *Journal of Ethnopharmacology* **150**:2, 755–760 (2013).
19. Seto, M.; Miyase, T.; Umehara, K.; Ueno, A.; Hirano, Y.; Otani, N.: Sesquiterpene Lactones from *Cichorium endivia* L. and *C. intybus* L. and Cytotoxic Activity. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **36**:7, 2423–2429 (1988).
20. Van Beek, T. A.; Maas, P.; King, B. M.; Lexlercq, E.; Voragen, A. G. J.; Groot, A.: Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 1035–1038 (1990).
21. Zidorn, C.: Bioprospecting of plant natural products in Schleswig-Holstein (Germany) I: Chemodiversity of the *Cichorieae* tribe (*Asteraceae*) in Schleswig-Holstein. *Phytochemistry Reviews* **18**, 1223–1253 (2019).
22. Sareedenchai, V.; Zidorn, C.: Flavonoids as chemosystematic markers in the tribe *Cichorieae* of the *Asteraceae*. *Biochemical Systematics and Ecology* **38**, 935–957 (2010).

23. Janda, K.; Gutowska, I.; Geszke-Moritz, M.; Jakubczyk, K.: The common cichory (*Cichorium intybus* L.) as a source of extracts with health-promoting properties: A review. *Molecules* **26**:6, 1814 (2021).
24. Seaman, F. C.: Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the *Asteraceae*. *The Botanical Review* **48**:2, 121–594 (1982).
25. Zidorn, C.: Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe *Cichorieae* of the *Asteraceae*. *Phytochemistry* **69**, 2270–2296 (2008).
26. Willeman, H.; Hance, P.; Fertin, A.; Voedts, N.; Duhal, N.; Goossens, J.-F.; Hilbert, J.-L.: A method for the simultaneous determination of chlorogenic acid and sesquiterpene lactone content in industrial chicory root foodstuffs. *Scientific World Journal* **2014**, 583180 (2014).
27. Başaran, U.; Akkbik, M.; Mut, H.; Gülümser, E.; Çopur Doğrusöz, M.; Koçoğlu, S.: High-performance liquid chromatography with refractive index detection for the determination of inulin in chicory roots. *Analytical Letters* **51**:1–2, 83–95 (2018).
28. Heyrovsky, A.: A new method for the determination of inulin in plasma and urine. *Clinica Chimica Acta* **1**, 470–474 (1956).
29. National Library of Medicine: *PubChem* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (citováno 25.4.2022)
30. Royal Society of Chemistry: *ChemSpider* [online]. Dostupné z: <https://www.chemspider.com/> (citováno 25.4.2022)
31. EMBL-EBI: *ChEBI* [online]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/> (citováno 25.4.2022).
32. Wight, A. W.; Van Niekerk, P. J.: Determination of reducing sugars, sucrose, and inulin in chicory root by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31**:2, 282–285 (1983).
33. Fray, U.; Claud, J.; Crelier, S.; Juillerat, M.-A.: UV degradation of sesquiterpene lactones in chicory extract: Kinetics and identification of reaction products by HPLC-MS. *Chimia* **56**:6, 292–293 (2002).

34. Szulc, J.; Jablonskaja, I.; Jabłońska, E.; Ruman, T.; Karbowska-Berent, J.; Gutarowska, B.: Metabolomics and metagenomics characteristic of historic beeswax seals. *International Biodeterioration and Biodegradation* **152**, 105012 (2020).
35. Bicchi, C.; Rubiolo, P.: High-performance liquid chromatographic-particle beam mass spectrometric analysis of sesquiterpene lactones with different carbon skeletons. *Journal of Chromatography A* **727**, 211–221 (1996).
36. Appendino, G.; Gariboldi, P.; Nano, G. M.; Tétényi B.: Tetrahydrofuran-type terpenoids from *Tanacetum vulgare*. *Phytochemistry* **23**:11, 2545–2551 (1984).
37. Khafagy, S. M.; Al-Yahya, M. A.; Ziesche, J.; Bohlmann, F.: An unusual nerolidol derivative from *Artemisia inculta*. *Phytochemistry* **22**:8, 1821–1822 (1983).