

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



David Hrdina

**Analýza historických farmaceutických přípravků
z 18. století s obsahem anýzu**

Analysis of Historical Pharmaceutical Preparations
From the 18th Century Containing Anise

Bakalářská práce

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

Praha 2025

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 2025.

David Hrdina

Abstrakt

Práce se zaměřuje na analýzu tří historických léčivých přípravků z 18. století s obsahem anýzu (anýz vonný, *Pimpinella anisum*). Jako referenční materiál byly zvoleny novodobé plody anýzu a novodobý anýzový olej. Pomocí HPLC s UV/VIS detekcí byl stanoven obsah *trans*-anetholu ve vzorcích, přičemž bylo zjištěno, že v historických vzorcích je *trans*-anethol zastoupen méně než 1 %. Dále byla metodou dvojdimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní detekcí provedena identifikace chemotaxonomických markerů v analyzovaných historických vzorcích. Konečně byl pomocí cílené analýzy metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí prokázován výskyt hlavního chemotaxonomického markeru (*trans*-pseudo-isoeugenyl-2-methylbutyrátu) ve vzorcích. Díky kombinaci uvedených metod se podařilo u všech historických vzorků prokázat jejich autenticitu, jako anýz obsahující léčivé přípravky.

Klíčová slova: *trans*-anethol, anýz, GC×GC, hmotnostní spektrometrie, HPLC, chemotaxonomie

Abstract

The thesis focuses on the analysis of three historical medicinal preparations from the 18th century containing aniseed (*Pimpinella anisum*). Modern aniseed fruits and modern aniseed oil were chosen as reference material. Using HPLC with UV/VIS detection, the *trans*-anethole content of the samples was determined, and it was found that the historical samples contain less than 1% of *trans*-anethole. The identification of chemotaxonomic markers in the analysed historical samples was performed by two-dimensional gas chromatography with mass detection. Finally, the presence of the main chemotaxonomic marker (*trans*-pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate) in the samples was demonstrated by targeted analysis using high-performance liquid chromatography with mass detection. The combination of these methods allowed the authentication of all historical samples as anise-containing medicinal products.

Key words: anise, *trans*-anethole, chemotaxonomy, GC×GC, HPLC, mass spectrometry

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu této práce doc. RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph. D. za odborné rady, profesionální přístup k vedení práce a vstřícnost při konzultacích.

Dále bych chtěl poděkovat Antonu Korbanovi, Ph. D. za změření vzorků metodou GC×GC s hmotnostní detekcí a konzultacemi nad vyhodnocením výsledků. Také bych rád poděkoval RNDr. Martinu Štíchovi, Ph. D. za změření vzorků metodou HPLC s hmotnostní detekcí a poskytnutí výsledků měření. Nakonec bych rád poděkoval Mgr. Tomáši Lenerovi za pomoc při praktické práci v laboratoři a konzultace nad dalším postupem měření.

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Anýz vonný	8
2.1.1	Výskyt a pěstování anýzu	9
2.1.2	Využití anýzu.....	9
2.2	Látky obsažené v anýzu a jejich účinky	10
2.2.1	Fenylpropanoidy.....	12
2.2.2	Terpenoidy.....	13
2.2.3	Flavonoidy.....	15
2.2.4	Kumariny	16
2.2.5	Steroly	18
2.2.6	Organické kyseliny.....	19
2.3	Chemotaxonomické markery pro anýz.....	20
2.4	Metody analýzy látek obsažených v anýzu.....	21
3	Experimentální část	23
3.1	Popis vzorků	23
3.2	Chemikálie.....	24
3.3	Přístroje a metody	25
3.3.1	Příprava roztoků vzorků	25
3.3.2	Měření metodou HPLC s UV/VIS detekcí	25
3.3.4	Měření metodou GC×GC-MS	26
3.3.4	Měření metodou HPLC-MS/MS.....	27
4	Výsledky a diskuze	29
4.1	Stanovení <i>trans</i> -anetholu metodou HPLC s UV/VIS detekcí.....	29
4.2	Identifikace chemotaxonomických markerů metodou GC×GC-MS	34
4.3	Identifikace chemotaxonomických markerů metodou HPLC-MS/MS.....	37
5	Závěr	39

Seznam zkratek a symbolů

A_{257}	plocha píku při měření při 257 nm [$\mu\text{AU min}$]
c	hmotnostní koncentrace [g dm^{-3}]
GC×GC-MS	dvojdimenzionální plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
m	hmotnost [g]
m/z	poměr hmotnosti ku náboji iontu
rpm	otáčky za minutu
SPME	mikroextrakce na tuhou fázi (angl. <i>solid phase microextraction</i>)
t_r	retenční čas [min]
t	teplota [$^{\circ}\text{C}$]
w	hmotnostní procenta [%]

1 Úvod

Cílem této bakalářské práce bylo provést autentizaci tří historických vzorků anýzových přípravků z 18. století pomocí důkazu chemotaxonomických markerů. K řešení tohoto úkolu byl nejprve pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí stanoven obsah *trans*-anetholu ve vzorcích, který je nejvíce zastoupenou složkou v anýzových přípravcích. Následně byl pomocí dvojdimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní detekcí studován výskyt chemotaxonomických markerů ve vzorcích. Konečně byl pomocí cílené analýzy metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí prokazován výskyt hlavních chemotaxonomických markerů ve vzorcích.

2 Teoretická část

2.1 Anýz vonný

Anýz vonný (*Pimpinella anisum* L.; obr. 2.1) je jednoletá rostlina z čeledi miříkovité (*Apiaceae*) neboli okolíčnaté (*Umbelliferae*) [1]. Tato výrazně aromatická rostlina dorůstá výšky 50 cm, dolní listy mají řapíkatý tvar s okrouhle ledvinitou a zastříhávaně zubatou čepelí [2]. Lodyha anýzu je přímá, mělce rýhovaná, oblá a nahoře větvená do jednotlivých květenství, která jsou tvořena okolíky. Okolíky se skládají ze 7 až 15 okolíčků a většinou jim chybí obal. Samotné květy jsou oboupohlavné, paprscité, vyjma pestíku pětičetné a s volnými obaly. Korunní lístky jsou bílé, kalich květu nevýrazný. Kolem dokola květu se nachází paprsky a paprsečky, které jsou společně s korunními lístky vně štětinkaté. Semeník je spodní, složený ze dvou plodolistů, na vrcholku s úzce kuželovitým žláznatým terčem a se dvěma rozestálými čnělkami. Plodem anýzu jsou hnědé ztenčené, přitiskle štětinkaté dvounažky vejčitého tvaru. Zralé dvounažky jsou obtížně rozdělitelné na dvě samostatné části. Vzhled rostliny anýzu je patrný na obr. 2.1.



Obr. 2.1 Anýz vonný (*Pimpinella anisum* L.), vzhled rostliny a jejích částí: (A) olistěná lodyha, (B) lodyha s květy, (1) samčí květ s tyčinkami, (2) pestík, (3) mladý plod, (4) příčný řez plodem (5) podélný řez plodem (převzato z [3])

2.1.1 Výskyt a pěstování anýzu

Původ kulturního anýzu je možné nalézt v bedrníku krétském (*Pimpinella cretica* Hampe) z oblasti Egejského moře [2]. Tato rostlina byla známa již od starověku ve středomořských oblastech a Indii. Byla zmíněna ve spisech Theophrasta nebo Dioskurida [4]. Dnešní anýz byl kultivován v 9. století v Německu.

V dnešní době je pěstování anýzu velmi rozšířené kvůli jeho využití v potravinářství, farmacii nebo kosmetice [5]. Jeho nejvýznamnějšími producenty jsou Turecko, Egypt, Itálie nebo Španělsko a hlavními dovozci jsou Německo a Indie.

Vhodné podmínky pro pěstování anýzu jsou stále teplé klima a sluneční svit. Zároveň je potřeba mít k dispozici půdu relativně bohatou na minerály, která má písčité a jílovité charakter. Bylo dokázáno, že hnojení dusíkem, fosforem a draslíkem vede k lepší vitalitě rostlin. Rostliny mají po přihnojení více listů a plodů nebo dorůstají větších rozměrů.

Tradiční pěstování anýzu je založeno na zasévání semen v dubnu, následně dochází k růstu rostlin, přičemž sklizeň je prováděna na přelomu srpna a září. Plody jsou nejčastěji využívány části a v čase sklizně by měly být tmavé.

2.1.2 Využití anýzu

Anýz se používá jako estrogenní činidlo již po tisíciletí [6]. Ve 30. letech 20. století začaly být z anýzu syntetizovány estrogeny, které se u žen používají ke zvýšení produkce mateřského mléka, sexuální touhy, silnější menstruaci nebo snadnějšímu porodu. Zároveň je jimi možné zmírnit návaly horka, nevolnosti a další příznaky deficitu hormonů u žen v období menopauzy. Estrogenní terapii lze použít i u mužů, protože má za následek zmírnění příznaků klimakteria (období přirozených hormonálních změn).

Mimo léčivých přípravků se části anýzu používají v gastronomii. Anýzová semena jsou například ozdobou specifických italských sušenek a dodávají jim výraznou chuť, esenciální oleje jsou často používány při výrobě likérových cukrovin nebo alkoholických destilátů.

Při přípravě antibakteriálních činidel je v dnešní době globální snaha o vytvoření bylinných extraktů s minimálními vedlejšími účinky [7]. Alkoholové vodné roztoky anýzu byly prokázány jako efektivní antibakteriální činidla. Testovány byly na bakteriálních koloniích *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans* a *Streptococcus salivarius*, které jsou rezistentní vůči antibiotikům a způsobují zubní kazy nebo onemocnění dásní. Tyto kolonie byly

odebrány od dětí ve věku 3 až 5 let z jejich dutiny ústní. Výsledné methanolové a ethanolové extrakty pomocí metody PCR (polymerasová řetězová reakce) ukázaly svůj významný vliv na snížení bakteriální aktivity. Jiná studie dokazuje přítomnost účinných antibakteriálních a antifungicidních látek pomocí HPLC [8]. Tyto látky byly před samotnou analýzou extrahovány z listů anýzu do ethanolu. Výsledky této práce poukazují na možnosti využití anýzu jako cenného přírodního zdroje pro výrobu extraktů s antimikrobiálními účinky. Další studie dokazuje přítomnost stejných látek pomocí metody GC-MS [9]. Jejich aktivita byla následně pozorována měřením optické hustoty, při níž byla měřena ztráta hmotnosti. Výsledkem práce bylo zjištění jisté antimikrobiální aktivity vůči gram pozitivním i gram negativním patogenům.

2.2 Látky obsažené v anýzu a jejich účinky

Sekundární metabolity rostlin jsou díky své slibné a neobvyklé struktuře častým předmětem výzkumu v souvislosti s léčbou chronických onemocnění [10]. Pomocí fytochemických výzkumů byla v anýzu vonném prokázána přítomnost více než tří set různých sloučenin. Hlavními z nich byly struktury fenyylpropanoidů, terpenoidů, flavonoidů, kumarinů, sterolů a organických kyselin. Souhrn hlavních látek obsažených v anýzu je uveden v tabulce 2.1. Významné látky z této tabulky jsou detailněji popsány v následujícím textu.

Tabulka 2.1

Jednotlivé skupiny látek, jejich hlavní zástupci, označení a odkaz na literaturu.

Skupina látek	Hlavní zástupce	CASRN	Citace
Fenylpropanoidy	<i>cis</i> -anethol	[25679–28–1]	[10]
	<i>trans</i> -anethol	[4180–23–8]	[9], [10]
	<i>p</i> -anisaldehyd	[123–11–5]	[9], [10]
	isoeugenol	[97–54–1]	[11]
	estragol	[140–67–0]	[10]
	<i>trans</i> -pseudo-isoeugenyl-2-methylbutyrát	[58989–20–1]	[10]
Terpenoidy	γ -himachalen	[53111–25–4]	[5], [10]
	linalol	[78–70–6]	[9], [10]
	α -pinen	[80–56–8]	[9], [10]
	α -terpineol	[98–55–5]	[10]
Flavonoidy	kempferol	[520–18–3]	[10]
	kvercetin	[117–39–5]	[10]
	naringenin	[480–41–1]	[10]
Kumariny	pimpinellin	[131–12–4]	[10]
	scopoletin	[92–61–5]	[10]
	umbelliferon	[93–35–6]	[10]
Steroly	cykloartenol	[469–38–5]	[10]
	kampesterol	[474–62–4]	[10]
	α -spinasterol	[481–18–5]	[10]
Organické kyseliny	anisová kyselina	[100–09–4]	[11]
	kávová kyselina	[331–39–5]	[10], [11]
	<i>m</i> -salicylová kyselina	[99–06–9]	[10]
	<i>o</i> -salicylová kyselina	[69–72–7]	[10]
	<i>trans</i> -skořicová kyselina	[140–10–3]	[10]
	vanilová kyselina	[121–34–6]	[10]
Methoxysloučeniny	anisol	[100–66–3]	[9], [11]

2.2.1 Fenylpropanoidy

Fenylpropanoidy jsou chemické sloučeniny odvozené od šestiuhlíkatého fenylového zbytku s navázaným tříuhlíkatým řetězcem. Na zbylých uhlících aromatického jádra zároveň mohou obsahovat různé funkční skupiny [9, 10].

Jako biologicky aktivní látky přispívají k odpovědím rostlin na biotické i abiotické podněty [12]. Slouží jako indikátory rostlinného stresu, který je vyvolaný kombinací nedostatku světla nebo živin. Zároveň jsou důležitými mediátory při obraně proti škůdcům. Zlepšují také rozmnožovací schopnosti rostlin a na jejich základě mají rostliny možnost kultivovat nové druhy.

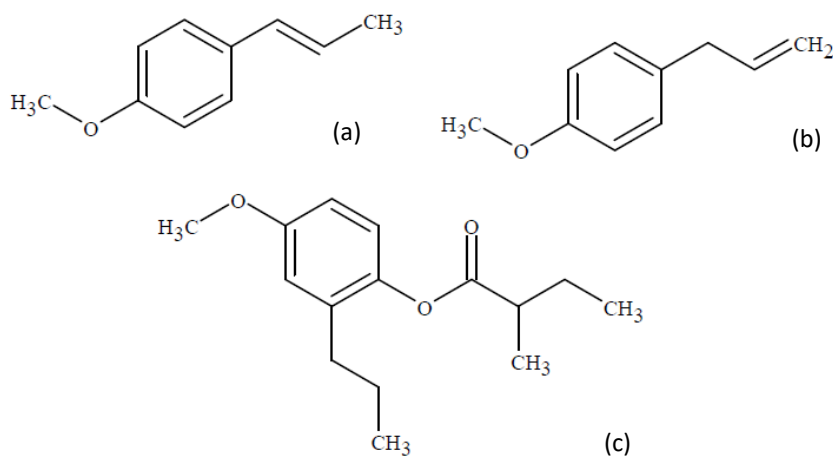
Chemická struktura fenylpropanoidů může být velmi rozmanitá díky možnostem modifikace a posílení aromatického jádra. Vytváření nových derivátů se uskutečňuje v tzv. šikimátové dráze. Tato dráha probíhá intracelulárně v plastidech a je regulována pomocí transkripčního faktoru dihydroxyacetonfosfátu. Pomocí aromatických aminokyselinových lyás jsou do místa syntézy přivedeny molekuly fenylalaninu a tyrosinu. Následně probíhá sled několika kaskádových reakcí, které pomocí kombinace reduktas, oxygenas a transferas vytváří jednotlivé deriváty. Tyto deriváty poté hrají důležitou roli v dalších biochemických procesech v rostlině a zároveň jsou charakteristické pro každý rostlinný druh. Šikimátovou dráhu využívají rostliny, houby nebo bakterie, ale pro člověka a ostatní savce není známá, proto je pro ně nutné přijímat fenylalanin a tyrosin v potravě.

Nejvíce zastoupenou látkou v anýzu je fenylpropanoid *trans*-anethol [5]. Druhou nejvíce zastoupenou látkou je estragol (methylchavikol) a chemotaxonomicky specifickou látkou pro rostliny anýzu je *trans*-pseudoisoeugenyl-2-methylbutyrát. Struktury těchto látek jsou znázorněny na obr. 2.2.

Trans-anethol je sloučenina obsahující methoxyskupinu a propenovou skupinu na aromatickém jádře [13]. Je to těkavá kapalina zodpovědná za charakteristickou vůni anýzu nebo fenyklu. Díky své chuti může být přidávána jako dochucovadlo do sladkých pokrmů nebo alkoholických destilátů. Pomocí radioizotopového značení ¹⁴C bylo potvrzeno, že se jedná o látku obecně uznanou za bezpečnou, protože 88 % z přijaté dávky člověkem bylo během dvou dní metabolizováno a vyloučeno močí nebo vydýcháno ve formě oxidu uhličitého.

Estragol je strukturně velmi podobný *trans*-anetholu, jediný rozdíl mezi těmito dvěma sloučeninami je v poloze dvojné vazby na propenyllovém zbytku. Jedná se o látku, která má farmakologické účinky, nicméně ve větší míře může způsobovat závažné problémy [14].

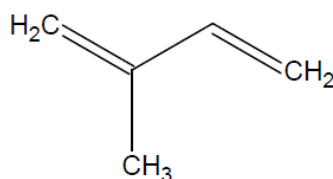
Konkrétně může mít genotoxické a karcinogenní účinky na lidský organismus, a proto byl v roce 2008 Evropskou unií přijat zákaz přidávání estragolu jako dochucovadla do potravin.



Obr. 2.2 Chemické struktury vybraných fenylpropanoidů: (a) *trans*-anethol, (b) estragol, (c) *trans*-pseudo-isoeugenyl-2-methylbutyrát

2.2.2 Terpenoidy

Terpenoidy bývají jinak označovány jako isoprenoidy, protože jejich základní strukturální jednotkou je molekula isoprenu, která je znázorněna na obr. 2.3 [15].



Obr. 2.3 Chemická struktura isoprenu (CASRN [78–79–5])

Tato skupina látek obsahuje více než 40 000 různých struktur, což z ní dělá největší skupinou známých rostlinných metabolitů. V rostlinách podporují jejich růst, vývoj a celkovou funkci metabolismu. Mají specifické funkce, kterými pomáhají ke komunikaci rostliny s jinými organismy kvůli reprodukci nebo případné obraně. Tyto interakce způsobují terpenoidní formy jako jsou atraktanty, repelenty, toxiny nebo abiotika. Terpenoidy se využívají jako farmaka, doplňky stravy ve formě vitamínů nebo pesticidy. Různí zástupci mohou mít mnoho různých chemických a fyzikálních vlastností jako například lipofilní nebo hydrofilní charakter či

cyklickou nebo acyklickou formu. Terpenoidy se dále dělí podle počtu strukturálních jednotek isoprenu na hemiterpenoidy, monoterpenoidy nebo seskviterpenoidy, přičemž všechny látky uvedené v tabulce 2.1 patří do skupiny monoterpenoidů nebo seskviterpenoidů a obsahují právě dvě nebo tři strukturální jednotky isoprenu.

Terpenoidy jsou v organismu syntetizovány ze dvou izomerních pětiuhlíkatých prekurzorů, které jsou produktem dvou různých metabolických drah. První drahou je mevalonátová dráha, která je uskutečňována v cytosolu buňky a druhou drahou je dráha 2-*C*-methylerythritol-4-fosfátová, která probíhá v plastidech. Procesy syntézy zároveň probíhají pomocí různých enzymů jako terpenoidsyntasy nebo prenyltransferasy.

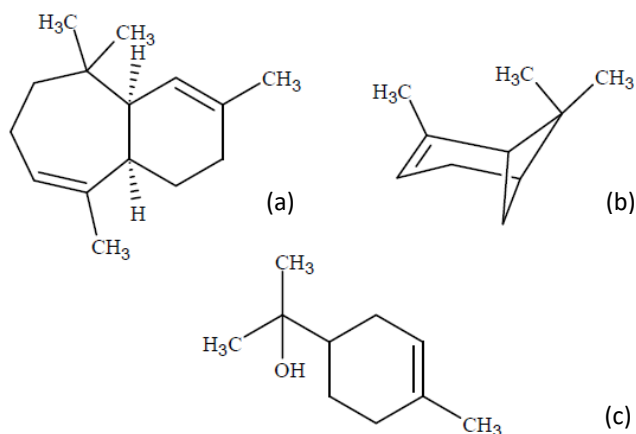
Terpenoidy jsou dobrými antioxidanty v organismech [16]. V lidském těle je 1–3 % přijatého kyslíku přeměněno na superoxid nebo jinou formu reaktivních forem kyslíku. Tyto formy jsou důležité například pro zabíjení mikroorganismů, buněčnou signalizaci a genovou transkripci, ale zároveň způsobují kardiovaskulární onemocnění nebo rakovinu. V těle jsou reaktivní formy kyslíku kromě působení antioxidantů odstraňovány i pomocí enzymů superoxidodismutasa nebo katalasa. Antioxidanty lze přijímat v potravě například z ovoce nebo zeleniny.

V anýzu se jako nejvíce zastoupený terpenoid (2,1–8,3 % z celkového obsahu terpenoidů) vyskytuje γ -himachalen (obr. 2.4) [5]. Jedná se o seskviterpenoid, který ve své molekule obsahuje pouze atomy uhlíku a vodíku. Přítomnost γ -himachalenu a jeho dalších derivátů v rostlině může zodpovídat za její antibakteriální aktivitu [17].

Další terpenoid, který v anýzu již není tak hojně zastoupený, je α -pinen [5]. Tato látka patří mezi monoterpenoidy a má bicyklickou strukturu složenou ze dvou jednotek isoprenu (obr. 2.4) [18]. Po staletí se využívá k léčbě infekcí dýchací soustavy a důležitou roli hraje do dneška v dochucování pokrmů. K jeho biosyntéze dochází pomocí kondenzace dvou isoprenových jednotek, které vytvoří prekurzor. Ten je následně cyklizací přeměněn ve finální strukturu díky pinensyntase. Důležitou roli ve výzkumu této látky hraje její schopnost tvořit enantiomery (optické izomery), které mají odlišné vlastnosti. Pravotočivý (+)- α -pinen má obecně lepší antimikrobiální a protizánětlivé účinky než levotočivý (-)- α -pinen. Ten má na druhou stranu antivirové účinky, které pravotočivý enantiomer postrádá.

Posledním zmíněným terpenoidem je α -terpineol, který se vyskytuje v mnoha rostlinných druzích a není tedy specifický pro anýz [19]. Jedná se o terciární monoterpenoidní alkohol (obr. 2.4). Oproti ostatním výše zmíněným terpenoidům se v jeho struktuře nachází i jiný atom než uhlík nebo vodík, konkrétně kyslík ve formě hydroxylové skupiny. Kromě izomeru α se terpineol může vyskytovat i ve formě β , γ a δ . Všechny tyto zbylé izomery se ale v přírodě

nenachází v takovém měřítku jako α -terpineol, proto jsou spíše syntetického původu. Ze směsi různých izomerů lze α -terpineol dostat frakční destilací. Klasický proces syntézy α -terpineolu probíhá hydratací výše zmíněného α -pinenu ve vodném roztoku minerální kyseliny. Během tohoto procesu vznikají i další vedlejší produkty, ale ty mohou být částečně dehydratovány a vznikne tak α -terpineol. Další možností syntézy této látky je pomocí biotransformační dráhy z jiných monoterpenoidů (například z limonenu).



Obr. 2.4 Chemické struktury vybraných terpenoidů: (a) γ -himachalen, (b) α -pinen, (c) α -terpineol

2.2.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou fenolické látky, které je možné získat z různých rostlin [20]. Jsou vytvářeny z aminokyselin fenyalaninu a cytosinu společně s malonátem, který zároveň hraje důležitou roli v Krebsově cyklu. Základní strukturou flavonoidů je flavanové jádro (obr. 2.5), které je složeno z 15 atomů uhlíku. Obecně se v rostlinách vyskytují ve svých glykosidovaných formách.

Jakožto skupina obsahují přes 8000 různých struktur a v rostlinách hrají důležitou roli především jako antioxidanty. Slouží tedy k odstraňování reaktivních forem kyslíku, které mohou ničit buňky. Jejich přítomnost podporuje pestré zbarvení listů, květů a ovoce například do modra, červena nebo oranžova. Vyskytují se v ovoci a zelenině, dále v nejrůznějších medicínálních rostlinách nebo nápojích, konkrétně v červeném víně a čaji. Díky zbarvování částí rostlin dávají signály opylovačům, zároveň ale zajišťují obranu proti škůdcům.

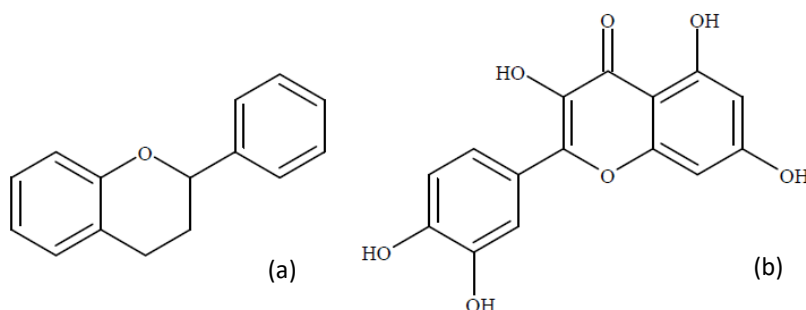
Ve světelné fázi fotosyntézy se flavonoidy uplatňují jako katalyzátory a fungují také jako ochrana proti oxidativnímu stresu, který je způsobován reaktivními formami kyslíku

z fotosyntetického elektronového transportu. Díky své schopnosti absorbovat UV záření chrání rostlinu i proti slunečnímu svitu.

Flavonoidy jsou sice považovány za nenutriční látky, nicméně jejich příjem může být poměrně vyšší než příjem jiných antioxidantů jako jsou vitamíny nebo karotenoidy. Konkrétně se příjem flavonoidů může pohybovat v rozmezí 50–800 mg/den, zatímco příjem vitamínu C kolem 70 mg/den a příjem β -karotenu pouze v rozmezí 2–3 mg/den.

Epidemiologické studie poukazují na to, že flavonoidy mohou hrát významnou roli při onemocněních souvisejících s arteriosklerózou [21]. Neurodegenerativní a cévní mozková onemocnění jsou jedny z hlavních příčin smrti ve světě kvůli 8% úmrtnosti. Proto je třeba hledat možné způsoby léčby. Studie ukázaly, že kvercetin a jemu podobné flavonoidy vykazují významnou cytoprotektivní schopnost a mohly by být hlavní molekuly pro vývoj léčiv s antiischemickými účinky.

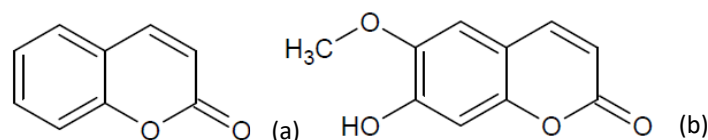
Kvercetin (obr. 2.5) je považován jako účinný antioxidant, ale existují i zmínky o takzvaném kvercetinovém paradoxu [22]. Jedná se o jev, při kterém je sice oxidací kvercetinu zabráněno poškození DNA v buňce, ale vzniklá oxidovaná forma tohoto flavonoidu je reaktivní vůči thiolům a tím je pro buňku sama toxická. Lze tedy říci, že účinky kvercetinu jako antioxidantu v buňce nejsou zcela užitečné a jeho nadbytečný příjem nemusí mít na organismus pozitivní dopad.



Obr. 2.5 Chemická struktura (a) flavanového jádra a (b) kvercetinu

2.2.4 Kumariny

Kumariny jsou přírodní látky na bázi benzopyronů, skládají se ze dvou benzenových cyklů, z nichž v jednom je zabudován kyslík a na sousedním atomu je navázaná ketoskupina [23]. Struktura základního kumarinu, od něhož jsou odvozeny všechny deriváty je uvedena na obr. 2.6.



Obr. 2.6 Chemická struktura (a) kumarinu a (b) scopoletinu

První kumarin byl izolován v roce 1820 a nedlouho poté z něj díky jeho sladké vůni začaly být vyráběny parfémů. Kromě toho se kumariny využívají v kosmetice nebo jako aroma v tabáku a alkoholických nápojích. Nejdůležitější význam nicméně mají v medicíně a organické chemii. Bylo zjištěno, že kumariny jsou díky své vysoké farmakologické aktivitě, nízké toxicitě a malému množství vedlejších účinků vhodnými základy léčivých přípravků.

Kumarin a jeho deriváty lze nalézt ve všech rostlinných částech u stovek druhů. Rod *Apiaceae* (do kterého spadá i anýz vonný) obsahuje ze všech rodů největší množství těchto látek. Jsou syntetizovány z fenyloalaninu pomocí šikimové kyseliny. Téměř všechny přírodní kumariny mají na svém sedmém uhlíku oxygenovaný substituent. Jsou charakteristické svojí schopností absorbovat UV záření, výsledkem tohoto pohlcení je charakteristická modrá fluorescence. Pro izolaci kumarinů je využívána například Soxhletova extrakce, superkritická fluidní extrakce nebo kapilární elektroforéza. Pro jejich izolaci a kvantifikaci jsou využívány různé druhy chromatografií (papírová, na tenké vrstvě, plynová nebo vysokoúčinná kapalinová), titrací nebo spektrofotometrických metod. Díky svým charakteristickým chromoforům a silné absorpci kolem vlnové délky 300 nm je možné je detegovat například UV-VIS detektorem.

Kumariny je možné v rostlinách nalézt i v jejich seskviterpenových podobách [24]. Jedná se o látky, které mají na kumarinovém základu navázaný terpenový řetězec obsahující tři podjednotky isoprenu. Díky své specifické struktuře často slouží jako chemotaxonomické markery a také jsou zkoumány pro svoje možné farmakologické využití.

Jedním ze zástupců kumarinů je scopoletin (obr. 2.6) [25]. Jde o žluto-béžovou krystalickou látku, která ve své struktuře obsahuje kromě základního kumarinu ještě methoxylovou a hydroxylovou skupinu. Patří do skupiny fytoalexinů, což jsou sloučeniny o nízké molekulové hmotnosti, které jsou v rostlinách syntetizovány *de novo* a často mají obrannou funkci v organismu. Scopoletin konkrétně funguje proti mikrobiálním útokům a jiným stresům jako mechanické poškození nebo dehydratace. Jeho biosyntéza je podmíněna právě působením vnějších faktorů a díky své rychlé tvorbě je považován za nejúčinnější látku ze skupiny

kumarinů. Jedna studie ukazuje na jeho možné využití jako složky léčivých přípravků proti rakovině, protože vyvolává normální množení lymfocytů [26].

2.2.5 Steroly

Steroly jsou organické molekuly, které mají společný základ ve formě čtyř uhlíkatých kruhů o celkovém počtu 19 uhlíků, dále obsahují v poloze 3 hydroxylovou skupinu a v poloze 17 mají navázaný alifatický řetězec (obr. 2.7) [27]. Jednotlivé steroly se od sebe odlišují polohou dvojných vazeb a strukturou alifatického řetězce.

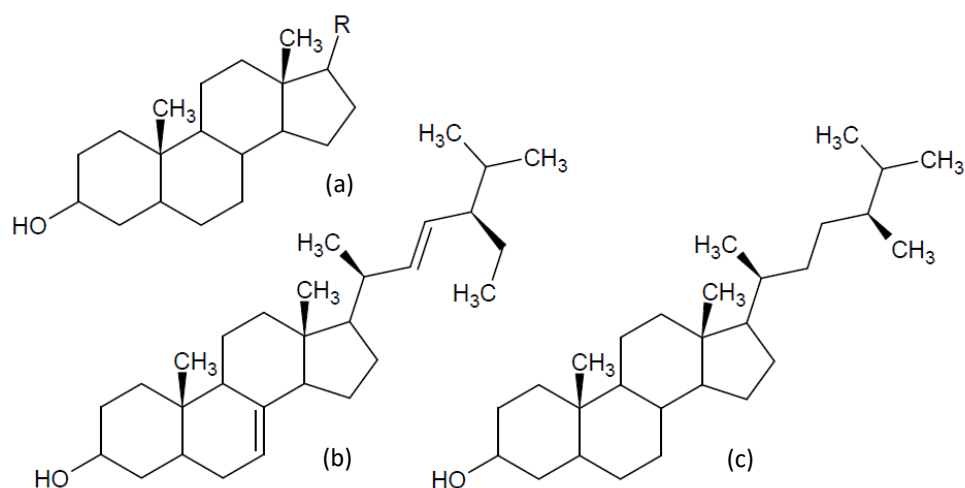
Steroly jsou primárními součástmi membrány eukaryotické buňky a hrají důležitou roli v regulaci a signalizaci dějů probíhajících na membráně [28]. Regulují tekutost a propustnost fosfolipidové dvojvrstvy, zároveň jsou prekurzory oxidovaných steroidů, které rostlina potřebuje k růstu a vývoji. Vhodné složení sterolů v membráně je zásadní pro optimální enzymatickou aktivitu a transport metabolitů. Jsou syntetizovány přes mevalonátovou dráhu, která probíhá v isoprenoidovém metabolismu. Hlavními konečnými produkty biosyntézy ve vyšších rostlinách jsou cholesterol a kampesterol. Nejvíce rostlinných sterolů je nalezeno ve své volné podobě, tedy s β -hydroxylovou skupinou na třetím uhlíku.

Bylo dokázáno, že tyto látky jsou efektivní ve snižování obsahu cholesterolu a lipoproteinového cholesterolu v krvi savců [27]. Toto snižování přináší různé zdravotní benefity, a proto se využívají v různých farmaceutických přípravcích. Kromě toho jsou využívány i v pokrmech nebo kosmetice. Jejich struktura podmiňuje nízkou rozpustnost v olejích a zároveň nerozpustnost ve vodě. Tím se velmi omezuje jejich použití v pokrmech, a proto jsou zkoumány možnosti jejich strukturní modifikace. Hlavní funkční skupinou je hydroxylová skupina na třetím uhlíku, tato skupina je předmětem zájmu, kvůli její možné esterifikaci. Pomocí esterifikace lze navázat na atom kyslíku hydrofobní mastnou kyselinu, čímž by došlo k vytvoření látky lépe rozpustné v oleji. Ke zvýšení hydrofilního charakteru lze na tento kyslík navázat hydrofilní molekuly (například vícesytné alkoholy nebo fosfolipidy). Nicméně je potřeba dbát na fakt, že v případě provedení chemické modifikace sterolu může dojít ke snížení schopnosti odstraňovat cholesterol v krvi. Je tedy nutné najít optimální cestu pro vytvoření modifikovaných látek tak, aby splňovaly obě kritéria.

Podle literatury je nejvíce zastoupeným sterolem v anýzu vonném α -spinasterol (obr. 2.7) [10]. Tato látka dokáže překonat hematoencefalickou bariéru a má například protizánětlivé účinky [29]. Mechanismy těchto účinků fungují na bázi inhibice cyklooxygenas a tlumení předzánětlivých cytokinů a jiných mediátorů. Nicméně hlavním důvodem zájmu

o tuto sloučeninu je její schopnost bránit organismus proti onemocnění *diabetes mellitus*. Konkrétně pomáhá díky tomu, že způsobuje vyšší sekreci inzulínu a snižuje jeho odolnost, zároveň zvyšuje příjem glukosy ve svalových buňkách a zabraňuje její absorpci ve střevě. Také chrání ledviny v organismu, který je postižen tímto onemocněním. Jedná se o dostupnou látku, která nemá potvrzené nežádoucí účinky a funguje již při poměrně nízkých dávkách.

Kampesterol je jeden z nejběžnějších rostlinných sterolů [30]. Jeho struktura (obr. 2.7) je velmi podobná molekule cholesterolu, proto je s ním přes lidské střevo konkurenčně absorbován. Dokáže regulovat přenašečové proteiny, metabolismus tuků včetně jejich syntézy, esterifikaci cholesterolu nebo skládání lipoproteinů. Zároveň byly zaznamenány jeho protinádorové účinky nebo schopnost zpomalit působení leukémie, karcinomu jater nebo prostaty. Mohl by být i užitečnou součástí léčiva proti rakovině vaječníku.



Obr. 2.7 Chemická struktura (a) obecná struktura sterolů (symbol R označuje alifatický řetězec),
(b) α-spinasterol, (c) kampesterol

2.2.6 Organické kyseliny

Organické kyseliny jsou sloučeniny obsahující ve své struktuře karboxylovou skupinu. Jsou rozšířeny ve všech částech rostlin a jsou velmi důležitou součástí těkavých olejů [10]. Mohou obsahovat různé strukturní rysy jako například aromatické jádro nebo alifatický polykarboxylový řetězec. Na organismus mají protizánětlivé a antioxidační účinky. Jejich identifikace je možná pomocí chromatografických metod. V anýzu se vyskytuje celá řada organických kyselin, nicméně žádná z nich není pro anýz zcela unikátní [10, 11].

2.3 Chemotaxonomické markery pro anýz

Chemotaxonomie se zabývá rozdělením a identifikací rostlin na základě jejich chemického složení [31]. První zmínky o této vědní disciplíně pochází z počátku 19. století a dodnes je využívána k rozlišení jednotlivých rostlinných druhů pomocí jejich charakteristických složek [32]. Mezi hlavní metody, kterými lze určit chemotaxonomické markery patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s různými typy detekce (UV/VIS, NMR nebo MS), plynová chromatografie s různými typy detekce, tenkovrstvá chromatografie a elektroforéza.

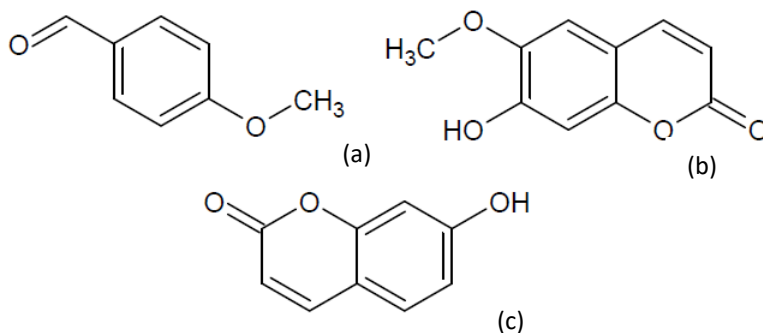
Jako chemotaxonomický marker se nejčastěji volí látka ze čtyř základních skupin: fenoly, alkaloidy, terpenoidy a neproteinové aminokyseliny [31]. Dále jsou tyto látky děleny podle významu v rostlinném organismu na primární a sekundární metabolity. Primární metabolity jsou součástí základních metabolických drah, v rostlině podporují její růst a vývoj. V přírodě se vyskytují velmi často, proto nemají velký význam pro chemotaxonomickou klasifikaci. Naopak sekundární metabolity bývají specifické pro jednotlivé druhy rostlin a na základě jejich výskytu tedy lze určit, o jakou rostlinu by se mohlo jednat. Rostlina tyto metabolity využívá k obraně proti škůdcům a vnějším vlivům.

V této práci byly jako chemotaxonomické markery anýzu zvoleny na základě literatury sloučeniny uvedené v tabulce 2.2. Látky, jejichž struktura nebyla uvedena v předchozím textu, jsou znázorněny níže (obr. 2.8). Jedná se o sloučeniny ze skupin fenylypropanoidů, kumarinů a terpenoidů.

Tabulka 2.2

Vybrané chemotaxonomické markery anýzu zařazené do jednotlivých skupin, jejich CASRN a odkaz na literaturu.

Skupina	Látka	CASRN	Citace
fenylpropanoidy	<i>trans</i> -anethol	[4180–23–8]	[9], [10]
	<i>p</i> -anisaldehyd	[123–11–5]	[9], [10]
	estragol	[140–67–0]	[10]
	<i>trans</i> -pseudoisoeugenyl-2-methylbutyrát	[58989–20–1]	[5]
terpenoidy	γ -himachalen	[53111–25–4]	[5], [10]
kumariny	esculetin	[305–01–1]	[33]
	scopoletin	[92–61–5]	[10]
	umbelliferon	[93–35–6]	[10]



Obr. 2.8 Chemické struktury dosud neznázorněných chemotaxonomických markerů:

(a) *p*-anisaldehyd, (b) esculetin, (c) umbelliferon

2.4 Metody analýzy látek obsažených v anýzu

Anýz obsahuje velké množství sloučenin o různých strukturách a biologických funkcích, proto je při jeho analýze výhodné využití separačních metod. Mezi nejčastější metody patří vysokoúčinná kapalinová, plynová nebo tenkovrstvá chromatografie.

Dawoud a kol. [8] zkoumali extrakt z listů anýzu pomocí metody HPLC s UV detekcí. Zaměřili se na sloučeniny s bioaktivním potenciálem, konkrétně alkaloidy a saponiny. Nejprve provedli extrakci vzorků ve směsi 20 ml methanolu a 5 ml kyseliny chlorovodíkové. Po extrakci byla provedena filtrace, a poté byl vzorek připraven k analýze. Jako mobilní fázi použili směs 0,1% octové kyseliny a methanolu. Pro měření použili gradientovou eluci na koloně Purospher Star RP-18 (250×4,60 mm; 5 μm). Měření probíhalo s průtokem 0,8 ml min⁻¹ po dobu 60 minut. Pro identifikaci a stanovení jednotlivých složek byly kromě vzorku změřeny i standardy jednotlivých látek. Výsledky ukázaly, že nejvíce zastoupenými látkami v listech jsou alkaloidy (22,34 mg/g), saponiny (15,1 mg/g), taniny (26,9 mg/g) a fenoly (13,4 mg/g).

Výskyt chlorogenové kyseliny v anýzu ve své práci řešili Marques a kol. [34]. K identifikaci a následné kvantifikaci použili nejprve HPLC s UV detekcí při 325 nebo 280 nm. Separace probíhala na koloně ODS-C18 (250×4.6 mm, 5 μm) s binární gradientovou elucí, jejíž složku A tvořila směs 10 mM kyseliny citronové (pH = 2,5) a methanolu v poměru 80:20 (v/v) a složkou B byl methanol. Měření probíhalo s průtokem 1,0 ml min⁻¹ po dobu 60 minut. Potvrzení správnosti měření bylo provedeno následnou hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací. Celkem bylo nalezeno devět izomerů chlorogenové kyseliny, přičemž nejvíce zastoupená (45 %) byla 5-kafeoylchinová kyselina.

Obaid a kol. [35] použili k analýze oleje z anýzu metody TLC, HPLC a GC-MS. Ke kvalitativní analýze byla využita metoda TLC na destičkách se silikagelem jako stacionární fází. Jako mobilní fáze byla využita směs toluen:ethylacetát 95:5 (v/v), detekce byla provedena pod UV lampou a následně byly skvrny vizualizovány jodovými parami. Pro preparativní HPLC s reverzní fází byla použita kolona C18-ODS (250×4,6 mm, 5 µm) a jako mobilní fáze byly zvoleny dva roztoky. Roztok A měl složení methanol:octová kyselina:destilovaná voda 10:2:88 (v/v/v) a roztok B se skládal ze stejných látek v poměru 90:3:7. Aparatura pro GC-MS byla sestavena z kapilární kolony od firmy Agilent (30 m×0,25 mm; 0,25 µm). Teplota nástřiku byla 250 °C a jako nosný plyn bylo použito helium o průtokové rychlosti 1,5 ml min⁻¹. Výsledky TLC potvrdily přítomnost *trans*-anetholu pomocí shodného retenčního času a následného hnědého zabarvení skvrny v jodových parách. Tato metoda je zároveň nejrychlejší a nejefektivnější pro kvalitativní analýzu. Pomocí HPLC byl dokázán pouze pík *trans*-anetholu. Nejvíce látek bylo identifikováno pomocí metody GC-MS. Jako nejvíce zastoupený v anýzovém oleji byl prokázán *trans*-anethol (96,8 %) následovaný γ -himachalenem (1,84 %). Další látky (estragol nebo cyklohexen) byly zastoupené méně než z jednoho procenta.

3 Experimentální část

3.1 Popis vzorků

Analyzované vzorky historických pozůstatků léčivých přípravků s obsahem anýzu pocházely ze sbírky Národního muzea v Praze; dále jsou uváděny pod příslušnými inventárními čísly. Vzorky byly odebrány přímo z původních barokních lékárnických nádob (obr. 3.1).

Vzorek H2-4430 byl získán z nádoby z čirého skla, kapkovitého tvaru na úzké kruhové noze, celkové výšky 105 mm. Nádobka je uzavřena jen volně nasazeným koženým víčkem. Obsah identifikuje latinský nápis „Ol: Anif:“, tedy „Oleum anisi“, v českém překladu „Anýzový olej“. Z nádoby bylo odebráno několik kousků ztuhlého pozůstatku anýzového oleje.

Vzorek H2-4766 byl získán z dřevěné nádoby ve tvaru válce o výšce 140 mm a průměru 90 mm. Nádoba je opatřena nápisem, který lze číst jako „Confect: Anif:“, tedy „Confectio anisi“, v českém překladu „Anýzový konfekt“. Vzorek obsahu byl odebrán odsypáním z nádoby.

Vzorek H2-4923 pocházel z lahve z čirého skla, výšky 120 mm a průměru 70 mm, uzavřené koženým uzávěrem. Nádoba je opatřena nápisem, psaným dobovými alchymicko-lékařnickými značkami, které lze číst „Spiritus salis armoniaci anisatus“, v českém překladu „Anýzový líh se salmiakem“. Po opatrném sejmutí koženého uzávěru byla lahev vypláchnuta třikrát asi 5 ml methanolu a spojené výplachy byly následně ponechány odpařit do sucha.

Odebrané vzorky byly uchovávány ve skleněných nádobách ve tmě a před analýzou homogenizovány v porcelánové třecí misce.



Obr. 3.1 Původní barokní lékárenské nádoby, z nichž byly získány analyzované vzorky historických léčivých přípravků (a) *Oleum anisi* (inv. č. H2-4430), (b) *Confectio anisi* (inv. č. H2-4766), (c) *Spiritus salis armoniaci anisatus* (inv. č. H2-4923)

3.2 Chemikálie

Pro porovnání historických vzorků s novodobými zdroji obsahujícími anýz byly využity anýzový olej (*Pimpinella anisum*, Čína) a sušené anýzové plody (Grešík, ČR, šarže: 010824). Pro kvantifikaci *trans*-anetholu ve vzorcích byl využit standard *trans*-anetholu (Pharmaceutical Secondary Standard, Sigma-Aldrich). Při přípravě roztoků pro měření byl pro rozpouštění i extrakci vzorků využit methanol (LC-MS Grade, Fisher Chemical).

Při měření HPLC s UV/VIS detekcí, resp. hmotnostní detekcí, byla jako složka A mobilní fáze použita voda Milli-Q, což je deionizovaná voda o měrné vodivosti $< 0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$, která byla získána z přístroje Milli-Q (Millipore, USA). Jako složka B byl použit methanol (LC-MS Grade, Fisher Chemical).

Pro měření GC×GC-MS bylo použito jako nosný plyn helium. Ke chlazení kolony byl použit kapalný dusík.

3.3 Přístroje a metody

3.3.1 Příprava roztoků vzorků

Novodobý anýzový plod a historický vzorek H2-4766 bylo nutné před samotným měřením homogenizovat pomocí tloučku v třecí misce. Ze zhomogenizovaného materiálu bylo odvažováno okolo 100 mg vzorku přesně. Navážka byla kvantitativně převedena do plastové mikrozkušavky se šroubovacím uzávěrem. Poté bylo přidáno 1,5 ml methanolu a zkumavka byla umístěna do třepačky na dobu 30 minut při frekvenci 1000 rpm. Poté byl obsah zcentrifugován po dobu 2 minuty při frekvenci 10000 rpm. Následně byl supernatant zfiltrován přes stříkačkový membránový filtr (0,2 μm , CA-membrána) do vialky se skleněnou vložkou o objemu 100 μl .

Ostatní měřené vzorky byly nejprve naváženy a následně rozpuštěny v methanolu. Všechny byly dobře rozpustné, a tak nebylo potřeba jejich zahřívání nebo umístění do ultrazvuku.

3.3.2 Měření metodou HPLC s UV/VIS detekcí

Všechna měření probíhala na přístroji UHPLC Nexera XR s detektorem s diodovým polem a fluorescenčním detektorem s kolonou SupelcosilTM LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm). Mobilní fáze obsahovala jako složku A vodu Milli-Q a jako složku B methanol. Měření probíhala isokraticky v poměru složek mobilní fáze A:B = 80:20 (v/v). Průtoková rychlost byla 1,0 ml min⁻¹ a nástřikový objem 1 μl . Teplota kolony byla 30 °C s detekcí při vlnové délce 257 nm.

Pro stanovení *trans*-anetholu bylo nejprve provedeno proměření kalibrační závislosti. Byl připraven zásobní roztok z navážky 114 mg *trans*-anetholu, která byla rozpuštěna v 50ml odměrné baňce v methanolu (tím byl získán roztok o koncentraci 2280 mg dm⁻³). Následně byly vhodným ředěním methanolem připraveny do 50ml odměrných baněk kalibrační roztoky o koncentracích 0,5, 2,5, 5, 10 a 50 mg dm⁻³. Při vyhodnocení byla jako signál používána plocha píku *trans*-anetholu.

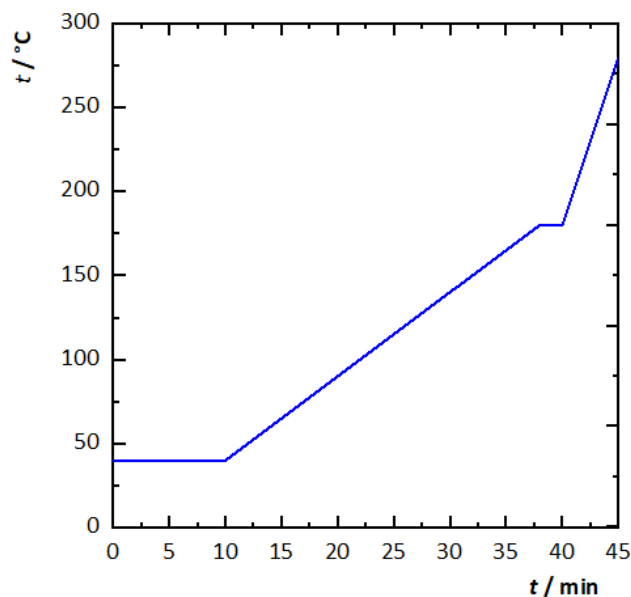
Pro ověření možného záchytu *trans*-anetholu na používaném stříkačkovém filtru při přípravě roztoků byla provedena dvě měření roztoku standardu *trans*-anetholu o koncentraci 25 mg dm⁻³, jeden z nich byl rovnou pipetován do vialky, druhý byl přes filtr pipetován do vložky ve vialce.

Při stanovení *trans*-anetholu ve vzorcích (historických i novodobých referenčních materiálech) byly využity roztoky připravené podle odst. 3.3.1.

3.3.4 Měření metodou GC×GC-MS

K záchytu těkavých složek vzorků byla použita metoda head-space. Vzorek o množství asi 200 mg byl umístěn do uzavřené 2ml skleněné vialky, která byla zahřívána ve vodní lázni při 70 °C po dobu 15 minut. Těkavé látky byly extrahovány metodou SPME na vlákne o složení Carboxen/PDMS o průměru 85 μm (firma Supelco) z kovové slitiny. Vlákno je barevně označeno jako světle modré. Doba extrakce na vlákne byla 15 minut.

Měření byla provedena na přístroji GCMS-QP2010 Plus od firmy Shimadzu se dvěma kolonami. První kolonou byla nepolární kolona SLB-5MS (30 m×0,25 mm; 0,25 μm). Druhá kolona byla polární kolona SolGel-Wax (3 m×0,1 mm; 0,1 μm). Obě kolony byly spojeny kapilárou o délce 2 m a průměru 0,1 mm. Nástřiková teplota byla 250 °C, desorpční čas vzorku 1 minuta a lineární rychlost helia jako nosného plynu 20 cm s⁻¹. Byl zvolen gradientový program (obr. 3.2) s postupným nárůstem teploty a celková doba měření byla 60 minut. Detekce byla provedena ve skenovacím módu a byla nastavena pro ionty o *m/z* v hodnotách 33 až 400. Rychlost skenu detektoru byla 50 ms na jeden sken. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 200 °C a teplota iontového rozhraní na 250 °C. Ke zpracování a vyhodnocení chromatogramů a MS spekter byl použit software Postrun Analysis. Naměřená spektra byla porovnána s knihovnou hmotnostních spekter NIST/EPA/NIH 02 [37] a v úvahu byla vzata pouze spektra s podobností > 70 %.



Obř. 3.2 Graf znázorňující gradientový průběh nárůstu teploty na koloně při měření dvojdimenzionální plynovou chromatografií

3.3.4 Měření metodou HPLC-MS/MS

Pro HPLC-MS/MS byl použit LC systém Agilent 1290 Infinity II. Měření probíhalo na koloně Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm), temperované na teplotu 30 °C. Byl použit binární gradientový program, složkou A byla Milli-Q voda a složkou B methanol. Celkový čas analýzy byl 45 minut, gradientový program je uveden v tabulce 3.1. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,0 ml min⁻¹. Objem nástřiku vzorku byl 5 μl. Detekce tandemovou hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením byla provedena na přístroji Bruker QqTOF řízeném softwarem Compass otof Control 4.0 (Bruker Daltonics, Německo). Pro zpracování dat byl použit software Compass DataAnalysis 4.4 (Build 200.55.2969) (Bruker Daltonics, Německo). Data ESI-MS² byla shromážděna v režimu pozitivních i negativních iontů; skeny se pohybovaly od *m/z* 50 do *m/z* 1000. Napětí kapiláry bylo 2800 V. Teplota sušícího plynu byla 220 °C a jeho průtok byl 3,0 dm³ min⁻¹.

Tabulka 3.1

Gradientový program použitý při měření vzorků s obsahem anýzu metodou HPLC-MS/MS. Složky gradientu: (A) Milli-Q voda, (B) methanol. Celková doba analýzy 45 minut.

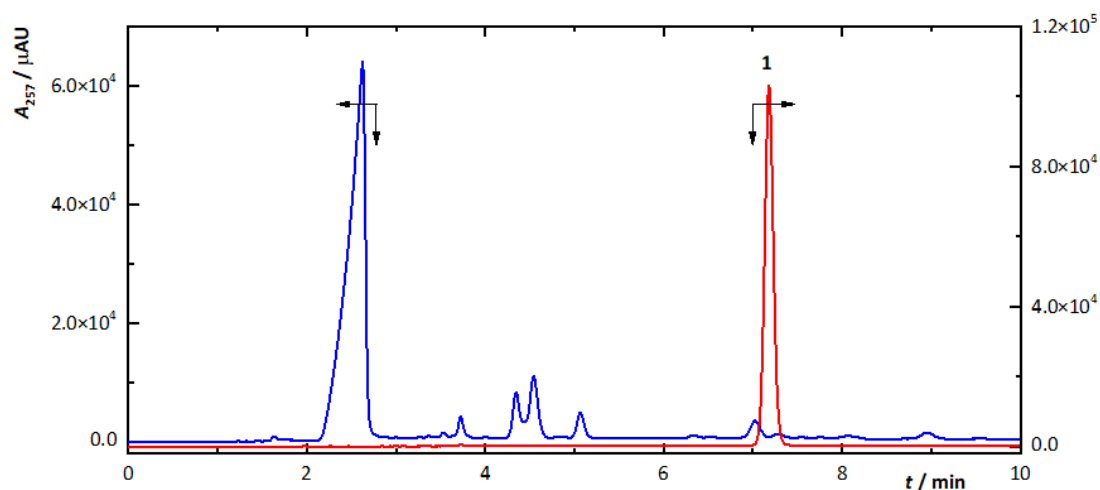
Čas / min	Obsah / %	
	Složka A	Složka B
0	50	50
8	50	50
28	20	80
38	20	80
40	50	50
45	50	50

4 Výsledky a diskuze

4.1 Stanovení *trans*-anetholu metodou HPLC s UV/VIS detekcí

Pro stanovení obsahu *trans*-anetholu v jednotlivých studovaných vzorcích byla využita metoda podle Jurada a kol. [36]. Měření bylo prováděno na koloně Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) s isokratickou elucí. Mobilní fází byla směs methanolu a vody o poměru 80:20 (v/v), průtoková rychlost byla 1,0 ml min⁻¹.

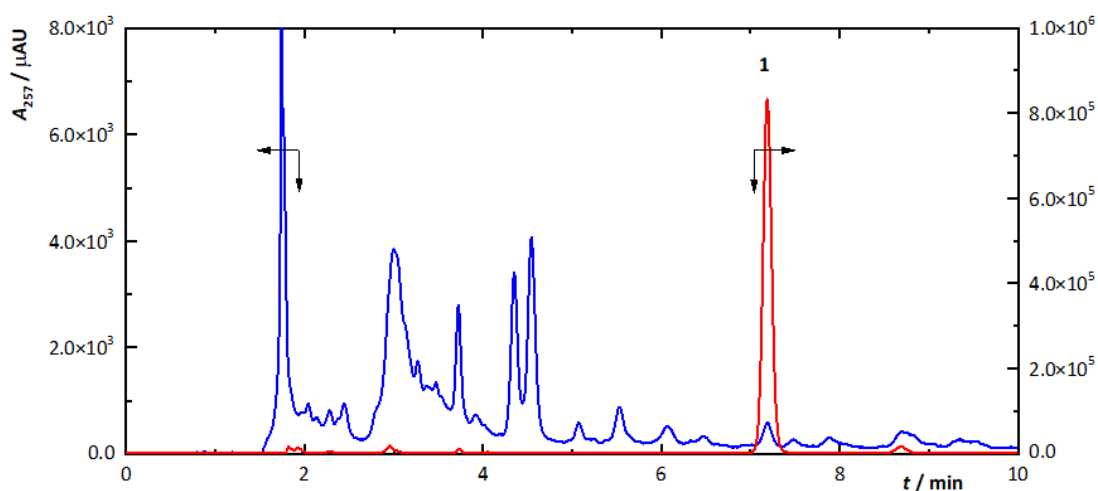
Nejprve byl proměřen chromatogram standardu *trans*-anetholu, a bylo zjištěno, že jeho retenční čas činí 7,17 minut. Následně byly proměřeny chromatogramy methanolicých roztoků novodobého a historického anýzového oleje (vzorek H2-4760), obě měření probíhala po dobu 30 minut a srovnání obou výsledných chromatogramů je uvedeno na obr. 4.1.



Obr. 4.1 HPLC-UV/VIS chromatogramy methanolicých roztoků historického anýzového oleje (vzorek H2-4760, modře) a novodobého oleje (červeně). Provedeno na koloně Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) s isokratickou elucí mobilní fází methanol:voda 80:20 (v/v), průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹. Detekce při 257 nm. Pík označen jako (1) odpovídá signálu *trans*-anetholu.

Získaný chromatogram pro historický anýzový olej obsahuje více intenzivních píků, než chromatogram pro novodobý olej. To může být způsobeno nečistotami ve vzorku oproti novodobému oleji, který by měl mít vyšší čistotu. Zároveň je patrné, že si píky *trans*-anetholu vzájemně neodpovídají úplně přesně. Podle standardu je přesnější hodnota pro vzorek novodobého oleje. Předpokládalo se, že *trans*-anethol v historickém píku odpovídal píku těsně před retenčním časem *trans*-anetholu v novodobém píku. Odchylna může být způsobena chybou přístroje nebo kontaminací vzorku.

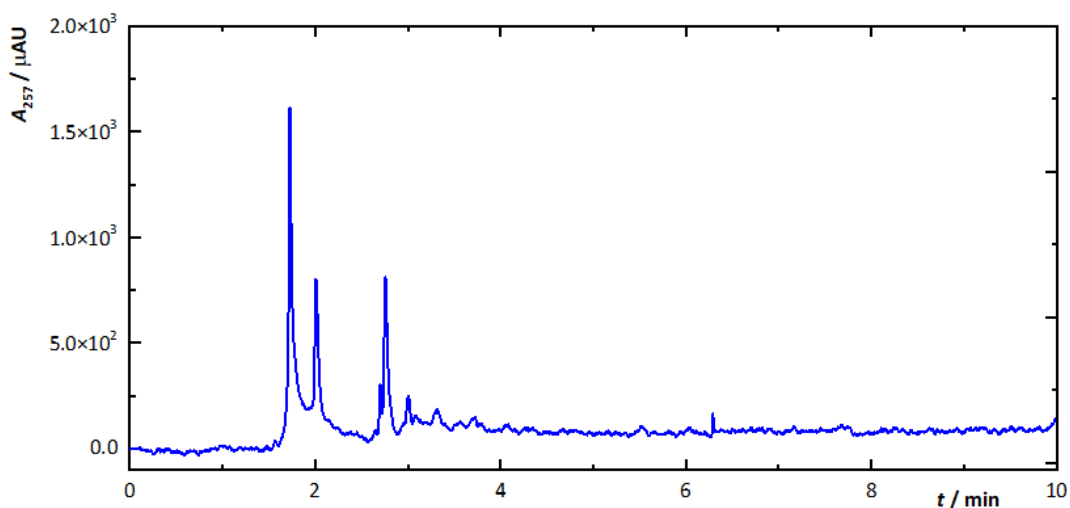
Následně byly měřeny extrakty historického plodu anýzu (vzorek H2-4766) a novodobého anýzového plodu. Měření probíhala po dobu 45 minut a srovnání výsledných chromatogramů je uvedeno na obr. 4.2.



Obr. 4.2 HPLC-UV/VIS chromatogramy extraktu historického plodu anýzu (vzorek H2-4766, modře) a extraktu novodobého plodu (červeně). Provedeno na koloně Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) s isokratickou elucí mobilní fází methanol:voda 80:20 (v/v), průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹. Detekce při 257 nm. Pík označen jako (1) odpovídá signálu *trans*-anetholu.

Na chromatogramu je možné vidět, že vzorek historického plodu obsahuje kromě *trans*-anetholu mnoho dalších látek, které eluovaly dříve než *trans*-anethol. To samé platí i pro vzorek novodobého plodu, nicméně ostatní signály lze špatně rozpoznat z chromatogramu kvůli vysoké intenzitě *trans*-anetholu. Jeho vysoká intenzita způsobila nepatrnost ostatních píků. Porovnáním obou chromatogramů lze vypořadovat, že se píky *trans*-anetholu nachází v totožném místě a je tím ověřena správná identifikace této látky.

Dále byl proměřen chromatogram historického vzorku anýzového lihu (vzorek H2-4923) po dobu 45 minut a výsledný chromatogram je znázorněn na obr. 4.3.



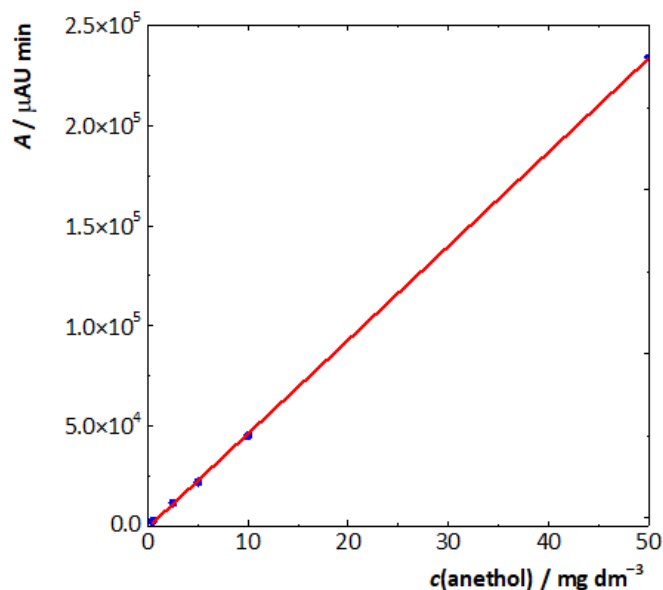
Obr. 4.3 HPLC-UV/VIS chromatogram extraktu historického vzorku anýzového lihu (vzorek H2-4923). Provedeno na koloně Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) s isokratickou elucí mobilní fází methanol:voda 80:20 (v/v), průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹. Detekce při 257 nm.

V chromatogramu tohoto historického vzorku nebyl nalezen pík *trans*-anetholu, je tedy možné, že daný vzorek neobsahoval anýz nebo ho obsahoval v tak nízké koncentraci, že ho nebylo možné detekovat. Ostatní píky byly velmi málo intenzivní a nacházely se do času 4 minuty.

Pro kvantifikaci obsahu *trans*-anetholu byla proměřena kalibrační závislost založená na standardu (obr. 4.4), kterou lze popsat rovnicí přímky:

$$A[\mu\text{AU min}] = 4690 c(\textit{trans}\text{-anethol}) [\text{mg dm}^{-3}] \quad (4.1)$$

Koeficient determinace této závislosti měl hodnotu 0,9999, tedy lze tvrdit, že kalibrační závislost je přesně vytvořená a je dobrým výchozím parametrem pro kvantifikaci *trans*-anetholu v jednotlivých vzorcích. Vypočítaný limit detekce měl hodnotu 0,59 mg dm⁻³ a limit kvantifikace hodnotu 1,94 mg dm⁻³.



Obr. 4.4 Kalibrační závislost pro stanovení *trans*-anetholu metodou HPLC-UV/VIS. Provedeno na koloně Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) s isokratickou elucí mobilní fázi methanol:voda 80:20 (v/v), průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹. Detekce při 257 nm.

Před stanovením obsahu *trans*-anetholu ve vzorcích bylo provedeno měření k ověření možného zachytu *trans*-anetholu na používaném filtru. Proměřením obsahu *trans*-anetholu v roztoku, který byl filtrován, a následným porovnáním s nefiltrovaným identickým roztokem bylo potvrzeno, že použití filtru nemá na měření vliv a nezachytává měřitelné množství *trans*-anetholu.

Následně bylo provedeno stanovení *trans*-anetholu v historických i novodobých vzorcích. Vzhledem k vysoké koncentraci *trans*-anetholu v extraktech novodobého anýzového plodu a oleje bylo nutné tyto roztoky naředit (přibližně třicetkrát). Výsledky stanovení *trans*-anetholu v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v tabulce 4.1. V historickém vzorku H2-4923 nebyl *trans*-anethol nalezen (byl tedy pod limitem detekce).

Tabulka 4.1

Stanovený obsah *trans*-anetholu metodou HPLC-UV/VIS v historických pozůstatcích farmak z 18. století a novodobém referenčním materiálu.

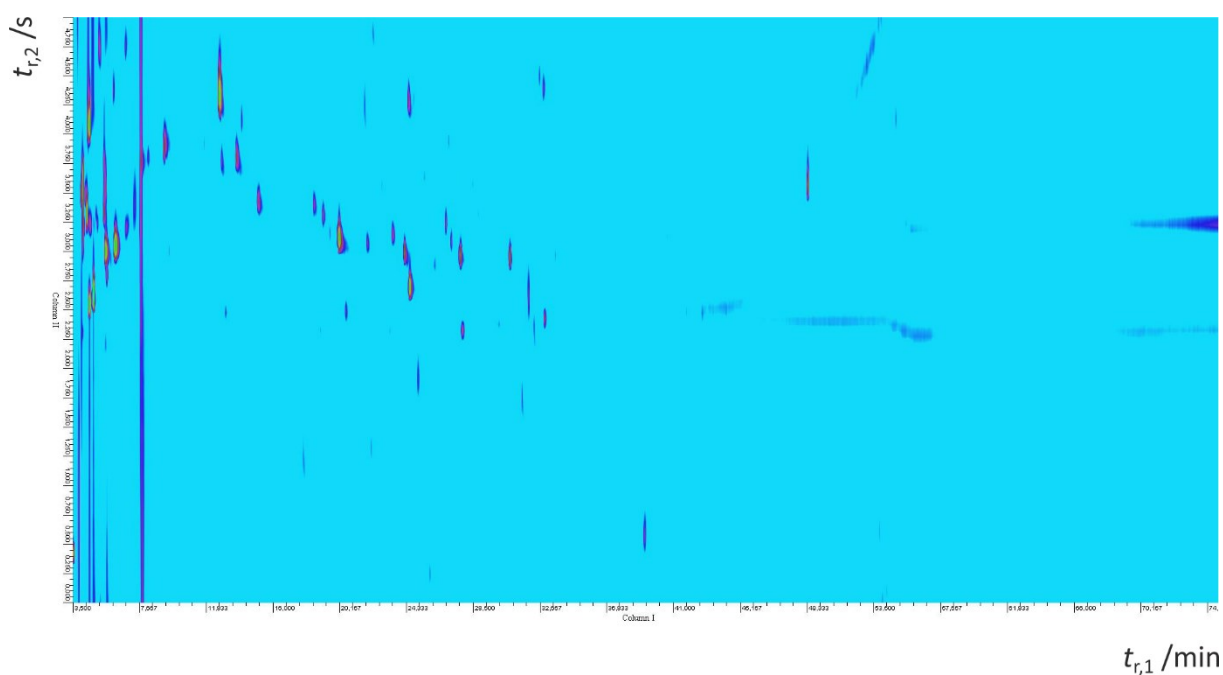
Vzorek	$m_{\text{vzorek}} / \text{mg}$	$m_{\text{anethol}} / \text{mg}$	$w_{\text{anethol}} / \%$
novodobý olej	9,40	8,44	86,9
historický olej H2-4430	6,61	$2,80 \cdot 10^{-2}$	0,410
novodobý plod	100,50	1,91	1,89
historický plod H2-4766	100,40	$1,23 \cdot 10^{-3}$	< LOQ

Nejvyšší zastoupení *trans*-anetholu bylo stanoveno v novodobém vzorku anýzového oleje, celkem 86,9 %. Olej je forma, ve které lze kvůli jeho získávání, použití a účinkům očekávat vysoký obsah těkavých složek. Podle literatury se *trans*-anethol nachází v oleji až z 96,8 %, takže je možné, že se v tomto vzorku nachází v tak vysokém množství. Ve vzorku novodobého plodu anýzu bylo stanoveno 1,89 % *trans*-anetholu. Tento vzorek tedy kromě *trans*-anetholu obsahoval jiné látky především ze sušeného plodu. Mezi těmito látkami lze hledat molekuly bílkovin, tuků nebo sacharidů, které jsou základními stavebními kameny organismů a přirozeně se tedy nachází v anýzovém plodu.

V historických vzorcích anýzového oleje (H2-4430) a plodu anýzu (H2-4766) bylo stanoveno méně než 1 % *trans*-anetholu, takže lze předpokládat, že většina této látky již degradovala nebo vytékala během staletí ze vzorku. Hodnota koncentrace *trans*-anetholu pro vzorek historického plodu (H2-4766) je sice nad limitem detekce, ale pod limitem kvantifikace. Nelze tedy s jistotou dopočítat obsah *trans*-anetholu v tomto vzorku.

4.2 Identifikace chemotaxonomických markerů metodou GC×GC-MS

K identifikaci možných těkavých chemotaxonomických markerů anýzu byla zvolena metoda GC×GC-MS po provedení SPME z head-space prostoru. Pracovní podmínky vycházely z publikace Matsushita a kol. [38]. Na obr. 4.5 je uveden příklad získaného dvojdimenzionálního chromatogramu. V tabulce 4.2 je uveden výčet sloučenin, které byly nalezeny ve více než jednom vzorku nebo jsou charakteristické pro jinou rostlinu než anýz a jejich uvedení v tabulce je dále vysvětleno.



Obr. 4.5 Dvojdimenzionální chromatogram vzorku H2-4766 získaný metodou GC×GC-MS (experimentální údaje uvedeny v odd. 3.3.4)

Tabulka 4.2

Sloučeniny identifikované pomocí dvojdimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, jejich CASRN, retenční časy na první ($t_{r,1}$) a druhé ($t_{r,2}$) koloně, shoda s databází [37] a výskyt v jednotlivých vzorcích. Označení NP odpovídá novodobému plodu a označení NO novodobému oleji. Symbol \checkmark značí, že se daná sloučenina v daném vzorku vyskytuje.

Sloučenina, CASRN	$t_{r,1}$ / min	$t_{r,2}$ / s	Shoda s [37]	Výskyt				
				NP	NO	4766	4430	4923
acetaldehyd, 75-07-0	4,00	2,3	940	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
ethanol, 64-17-5	4,33	3,3	972	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
aceton, 67-64-1	4,42	4,6	950	\checkmark		\checkmark	\checkmark	\checkmark
methylisokyanid, 593-75-9	4,42	4,1	963			\checkmark	\checkmark	\checkmark
isopropylalkohol, 67-63-0	4,50	3,3	927	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
methyl-acetát, 79-20-9	4,75	2,6	931		\checkmark	\checkmark		
butan-2,3-dion, 431-03-8	5,42	3,8	946	\checkmark		\checkmark	\checkmark	\checkmark
<i>n</i> -hexan, 110-54-3	5,42	3,3	909		\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
butan-2-on, 78-93-3	5,50	3,0	945	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
2-methylfuran, 534-22-5	5,50	5,0	833	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
trichlormethan, 67-66-3	6,00	4,3	929			\checkmark		\checkmark
(<i>E</i>)-but-2-enal, 123-73-9	6,75	4,8	810	\checkmark		\checkmark		
2-methylbutanal, 96-17-3	7,00	3,1	913	\checkmark	\checkmark			
butan-1-ol, 71-36-3	7,33	3,4	860			\checkmark	\checkmark	
octová kyselina, 64-19-7	7,67	3,5	941	\checkmark		\checkmark	\checkmark	\checkmark
pentan-2-on, 107-87-9	7,67	3,8	877	\checkmark	\checkmark	\checkmark		\checkmark
pentanal, 110-62-3	8,08	3,9	937	\checkmark	\checkmark	\checkmark		
toluen, 108-88-3	11,58	4,0	892		\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
hexanal, 66-25-1	13,67	3,8	957	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
heptanal, 111-71-7	19,08	3,3	704	\checkmark	\checkmark	\checkmark		
octan (<i>Z</i>)-hex-2-en-1-ylu, 10094-40-3	19,42	3,2	834	\checkmark		\checkmark		\checkmark
α -pinen, 80-56-8	20,50	2,5	929		\checkmark	\checkmark	\checkmark	
camphen, 79-92-5	21,25	2,6	764		\checkmark	\checkmark		
5-methyl-2,3-dihydrofuran-2-on, 108-29-2	21,67	4,5	761	\checkmark		\checkmark		
benzaldehyd, 100-52-7	22,08	1,3	748		\checkmark	\checkmark		
acetát α -hydroxyisomáselné kyseliny, 80-55-7	22,17	4,9	749	\checkmark		\checkmark		
6-methylhept-5-en-2-on, 110-93-0	22,75	3,6	745	\checkmark	\checkmark			
oktanal, 124-13-0	23,42	3,1	944		\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
2-ethylhexan-1-ol, 104-76-7	24,42	4,4	889	\checkmark		\checkmark	\checkmark	\checkmark
<i>o</i> -cymen, 527-84-4	24,42	2,1	925		\checkmark		\checkmark	
(-)-limonen, 5989-54-8	24,50	2,7	899	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark
(+)-limonen, 5989-27-5	24,50	2,7	922	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	

Tabulka 4.2 pokračuje na další straně.

Pokračování tabulky 4.2 z předchozí strany.

Sloučenina, CASRN	$t_{r,1}$ / min	$t_{r,2}$ / s	Shoda s [37]	Výskyt				
				NP	NO	4766	4430	4923
5-ethenyl-5-methyl-2,3-dihydrofuran-2-on, 1073-11-6	25,00	2,2	803	√		√		√
2-hydroxy-4,4,6-trimethyl-3-cyklo- hexen-1-ylmethanol, 6252-34-2	26,25	4,1	761		√		√	
fenchon, 1195-79-5	26,75	3,3	941			√		
linalol, 78-70-6	26,92	4,0	772	√	√	√		
nonanal, 124-19-6	27,08	3,1	705	√	√		√	√
(1 <i>R</i> -endo)-1,3,3-trimethyl- bicyklo[2.2.1]heptan-2-ol, 2217-02-9	27,92	4,1	939		√	√	√	
α -kampholenal, 4501-58-0	28,08	3,5	928		√		√	
pinokarvon, 30460-92-5	29,33	3,8	879		√		√	
endo-borneol, 507-70-0	29,67	4,6	933		√		√	
(<i>R,R</i>)-(+)-2,4-dimethylheptan-1-ol, 18450-73-2	29,92	4,6	723				√	√
$\alpha,\alpha,4$ -trimethyl-benzenmethanol, 1197-01-9	30,17	1,1	893		√		√	
estragol, 140-67-0	30,25	4,0	866	√	√			√
benzothiazol, 95-16-9	31,50	1,9	798	√		√	√	√
karvon, 99-49-0	31,67	4,2	847	√			√	
<i>p</i> -anisaldehyd, 123-11-5	31,92	2,6	814	√	√	√	√	√
anethol, 104-46-1	32,83	4,5	939	√	√	√	√	√
γ -himachalen, 53111-25-4	37,50	2,9	854	√	√		√	
β -bisabolen, 495-61-4	38,58	2,9	861	√	√			
ethyl <i>iso</i> -allocholát, 101230-69-7	41,33	3,2	704	√			√	
ester kyseliny 9,12,15-octadecatrienoové a 2-fenyl-1,3-dioxan-5-ylu, 56700-76-6	41,33	3,2	703	√			√	√
dioktylester kyseliny adipové, 103-23-1	48,58	3,3	820	√		√	√	√
3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)-oktadekan, 55282-12-7	52,50	4,4	704	√		√	√	
supraen, 7683-64-9	53,75	3,9	897	√			√	

Mezi sloučeniny, které byly nalezeny ve všech pěti měřených vzorcích patří acetaldehyd, ethanol, isopropylalkohol, butan-2-on, 2-methylfuran, hexanal a *S*-limonen. Kromě *S*-limonenu (což je monoterpenoid velmi často obsažený v rostlinných materiálech) jsou všechny sloučeniny nízkomolekulární a jejich výskyt je v přírodě běžný.

Z chemotaxonomických markerů anýzu byly nalezeny sloučeniny *trans*-anethol, estragol, *p*-anisaldehyd a γ -himachalen. Přítomnost *trans*-anetholu a *p*-anisaldehydu byla potvrzena ve všech vzorcích. Touto metodou byl tedy *trans*-anethol nalezen i v historickém vzorku

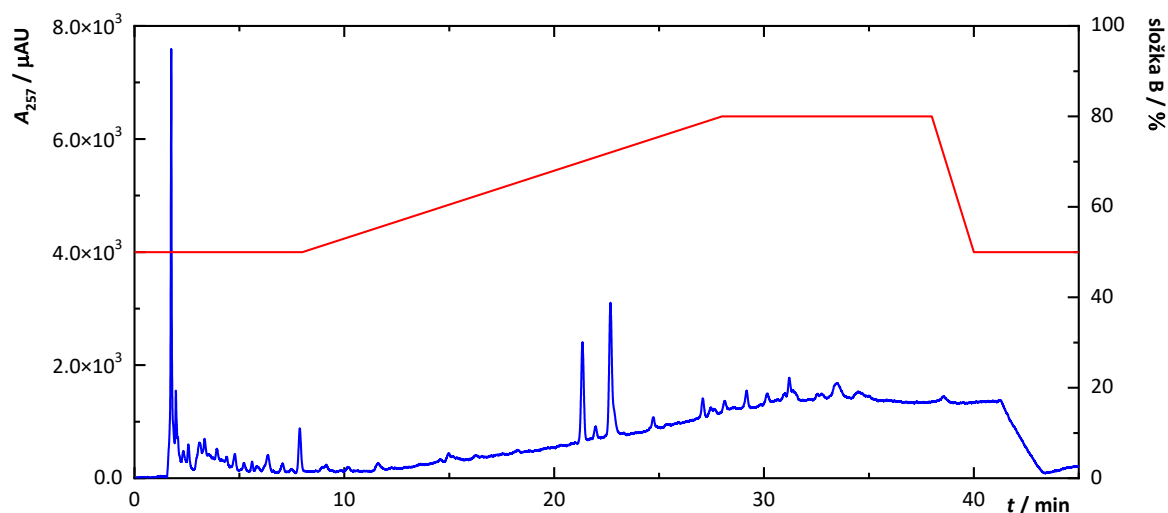
anýzovaného lihu (H2-4923), v němž se pomocí HPLC-UV/VIS nepodařil prokázat (odst. 4.1). Tím je tedy potvrzena autenticita i tohoto historického vzorku.

Fenchon, což je chemotaxonomický marker pro fenykl, byl nalezen pouze ve vzorku historického plodu. Zároveň nelze tvrdit, že se tato sloučenina nemůže vyskytovat i v anýzu, takže i tento výsledek potvrzuje autenticitu anýzových přípravků.

V historických vzorcích anýzového plodu (H2-4766) a anýzového lihu (H2-4923) byl nalezen trichlormethan. Nejedná se o typickou látku, která se vyskytuje v rostlinných materiálech, takže její výskyt lze považovat za zvláštní. Pravděpodobně může být dán faktem, že se kvůli ochraně muzeálních exponátů používají různé insekticidy [39]. Jedná se tedy o sekundární kontaminaci vzorků.

4.3 Identifikace chemotaxonomických markerů metodou HPLC-MS/MS

Protože metodou GC×GC-MS nebyl nalezen hlavní chemotaxonomický marker anýzu, *trans*-pseudoisoeugenyl-2-methylbutyrát, byla provedena cílená analýza hlavních chemotaxonomických markerů rovněž metodou HPLC-MS/MS. Pro lepší separaci píků byla pro novodobé i historické vzorky vyvinuta gradientová eluce, při níž obsah methanolové složky mobilní fáze začínal na 50 %, oproti v odst. 4.1 použité isokratické eluci, kde byl obsah methanolu 80 %. Díky snížení methanolu v mobilní fázi byla snížena její eluční síla, a proto měly analyty více času na vzájemnou separaci (obr. 4.6).



Obr. 4.6 HPLC-UV/VIS chromatogram methanolického extraktu novodobého plodu anýzu (modře), separovaný na koloně Supelcosil™ LC-18 (250×4,6 mm, 5 μm) s gradientovou elucí, složky mobilní fáze (A) voda a (B) methanol. Průběh gradientu znázorňuje červená závislost. Průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹. Detekce při 257 nm.

Vyvinutá gradientová metoda byla použita pro separaci analytů s MS/MS detekcí a v naměřených chromatogramech byly cíleně hledány vybrané chemotaxonomické markery anýzu (odd. 2.3). Byly analyzovány vzorky H2-4766 a H2-4923 a novodobý plod anýzu. Z hledaných chemotaxonomických markerů se podařilo identifikovat pouze *p*-anisaldehyd a pro anýz velmi typický *trans*-pseudoisoeugenyl-2-methylbutyrát a to pouze ve vzorku H2-4766 a v novodobém plodu anýzu (tabulka 4.3). Ostatní chemotaxonomické markery se tímto měřením nepodařilo identifikovat, protože patrně za daných podmínek nedochází k jejich ionizaci.

Tabulka 4.3

Sloučeniny cíleně identifikované pomocí HPLC-MS/MS, jejich CASRN, retenční čas, *m/z* molekulových a fragmentových iontů, a výskyt v jednotlivých vzorcích. Označení NP odpovídá novodobému plodu. Symbol √ značí, že se daná sloučenina v daném vzorku vyskytuje.

Sloučenina, CASRN	<i>t_r</i> /min	<i>m/z</i>		Výskyt	
		[M+H] ⁺	fragmentové ionty	NP	4766
<i>p</i> -anisaldehyd, 123-11-5	30,1	137,0600	249	√	√
<i>trans</i> -pseudoisoeugenyl-2-methylbutyrát, 58989-20-1	30,1	249,1490	165; 150; 137; 124; 109	√	√

5 Závěr

V práci byla využita kombinace několika analytických metod pro autentizaci tří historických vzorků s obsahem anýzu (plod anýzu, anýzový olej a anýzový líh). Jako referenční materiály byly použity novodobé plody anýzu a anýzový olej.

Nejprve byla vyvinuta metoda HPLC-UV/VIS pro stanovení obsahu *trans*-anetholu, která umožnila kvantifikovat obsah této pro anýz typické látky ve vzorcích. V historickém vzorku anýzového oleje (H2-4430) byl obsah *trans*-anetholu stanoven na 0,41 %, což je výrazně méně než v novodobém anýzovém oleji, v němž byl obsah této látky stanoven na 86,9 %. Pravděpodobně došlo během času k vytěkání *trans*-anetholu z historického vzorku. Podobný výsledek byl zjištěn pro historický vzorek plodu anýzu (H2-4766), kde byl obsah *trans*-anetholu pod limitem kvantifikace, oproti novodobému plodu, kde byl obsah této látky stanoven na 1,89 %. V historickém vzorku anýzového lihu (H2-4923) nebyl *trans*-anethol nalezen, resp. byl pod limitem detekce.

V další části práce byla využita metoda dvojdimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro identifikaci zejména těkavých chemotaxonomických markerů anýzu. Touto metodou byl prokázán *trans*-anethol i v historickém vzorku anýzového lihu (H2-4923). Z dalších chemotaxonomických markerů byl, vedle celé řady dalších identifikovaných látek, prokázán *p*-anisaldehyd ve všech třech historických vzorcích, estragol v historickém anýzovém lihu (H2-4923) a γ -himachalen v historickém anýzovém oleji (H2-4430). Tato zjištění tedy potvrzují autenticitu historických vzorků jako anýz obsahujících přípravků.

V poslední části práce byla vyvinuta gradientová HPLC-MS/MS pro cílenou analýzu hlavních chemotaxonomických markerů, díky níž se podařilo v historickém anýzovém plodu (H2-4766) prokázat jak *p*-anisaldehyd, tak hlavní marker anýzu *trans*-pseudoisoeugenyl-2-methylbutyrát.

Přestože řada pro anýz typických látek během staletí z analyzovaných historických pozůstatků léčiv vytěkala, umožnila zvolená kombinace analytických metod prokázat obsah anýzu v těchto vzorcích i po více než 250 letech od jejich přípravy.

Literatura

- [1] Novák, F. A.: *Farmaceutická botanika*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství 1958
- [2] Jirásek, V.; Starý, F.: *Atlas léčivých rostlin*. 2. vydání, Praha: Státní pedagogické nakladatelství 1989
- [3] Thomé, O. W.: *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Band III*. 2. Aufl. Gera, Reuss 1905
- [4] Evans, W. C.; Trease, G. E.: *Trease and Evans Pharmacognosy*. 16th Ed., Edinburgh: Saunders/Elsevier 2009
- [5] Spinozzi, E.; Zeni, V.; Di Giovanni, F.; Marmugi, M.; Baldassarri, C.; Mazzara, M.; Ferrati, M.; Ricciardi, R.; Canale, A.; Lucchi, A.; Petrelli, R.; Maggi, F.; Benelli, G.: Aniseed, *Pimpinella anisum*, as a source of new agrochemicals: Phytochemistry and insights on insecticide and acaricide development. *Agriculture Communications* 2023, **1**(1), 100003. DOI: 10.1016/j.agrcom.2023.100003
- [6] Puleo, M. A.: Fennel and anise as estrogenic agents. *Journal of Ethnopharmacology* 1980, **2**(4), 337–344. DOI: 10.1016/s0378-8741(80)81015-4
- [7] Lavaee, F.; Moqadas, A.; Modarresi, F.; Nowrouzi, M.: The effect of *Pimpinella anisum* and *Origanum vulgare* extracts against *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, and *Streptococcus salivarius*. *Journal of Dentistry* 2022, **23**(1), 113–120. DOI: 10.30476/DENTJODS.2021.85691.1145
- [8] Dawoud, T.; Ameen, F.: Unveiling the bioactive potential of *Pimpinella anisum* L. leaf extracts: Chromatographic profiling, antimicrobial efficiency and cytotoxicity analysis. *Biomedical Chromatography* 2023, **37**(12), e5739. DOI: 10.1002/bmc.5739
- [9] Dumitrescu, E.; Muselin, F.; Tîrziu, E.; Folescu, M.; Dumitrescu, C. S.; Orboi, D. M.; Cristina, R. T.: *Pimpinella anisum* L. essential oil a valuable antibacterial and antifungal alternative. *Plants* 2023, **12**(13), 2428. DOI: 10.3390/plants12132428
- [10] Wu, J.; Cao, Z.; Hassan, S. S.; Zhang, H.; Ishaq, M.; Yu, X.; Yan, S.; Xiao, X.; Jin, H.–Z.: Emerging biopharmaceuticals from *Pimpinella* genus. *Molecules* 2023, **28**(4), 1571. DOI: 10.3390/molecules28041571
- [11] Kubo, I.; Fujita, K.; Nihei, K.: Antimicrobial activity of anethole and related compounds from aniseed. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008, **88**(2), 242–247. DOI: 10.1002/jsfa.3079
- [12] Vogt, T.: Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 2010, **3**(1), 2–20. DOI: 10.1093/mp/ssp106
- [13] Newberne, P.; Smith, R. L.; Doull, J.; Goodman, J. I.; Mundro, I. C.; Portoghese, P. S.; Wagner, B. M.; Weil, C. S.; Woods, L. A.; Adams, T. B.; Lucas, C. D.; Ford, R. A.: The FEMA GRAS assessment of *trans*-anethole used as a flavouring substance. *Food and Chemical Toxicology* 1999, **37**(1), 789–811. DOI: 10.1016/s0278-6915(99)00037-x
- [14] Raffo, A.; Nicoli, S.; Leclercq, C.: Quantification of estragole in fennel herbal teas: Implications on the assessment of dietary exposure to estragole. *Food and Chemical Toxicology* 2011, **49**(2), 370–375. DOI: 10.1016/j.fct.2010.11.011

- [15] Bohlmann, J.; Keeling, C. I.: Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal* 2008, **54**(4), 656–669. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03449.x
- [16] Grassmann, J.: Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins and Hormones* 2005, **72**, 505–535. DOI: 10.1016/S0083-6729(05)72015-X
- [17] Sanad, H.; Belattmania, Z.; Nafis, A.; Hassouani, M.; Mazoir, N.; Reani, A.; Hassani, L.; Vasconcelos, V.; Sabour, B.: Chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the marine cyanolichen *Lichina pygmaea* volatile compounds. *Marine Drugs* 2022, **20**(3), 169. DOI: 10.3390/md20030169
- [18] Allenspach, M.; Steuer, C.: α -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry* 2021, **190**, 112857. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.112857
- [19] Sales, A.; Felipe, O. L.; Bicas, L. J.: Production, properties, and applications of α -terpineol. *Food and Bioprocess Technology* 2020, **13**(8), 1261–1279. DOI: 10.1007/s11947-020-02461-6
- [20] Pietta, P.-G.: Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 2000, **63**(7), 1035–1042. DOI: 10.1021/np9904509
- [21] Dajas, F.; Rivera-Megret, F.; Blasina, F.; Arredondo, F.; Abin-Carriquiry, J. A.; Costa, G.; Echeverry, C.; Lafon, L.; Heizen, H.; Ferreira, M.; Morquio, A: Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003, **36**(12), 1613–1620. DOI: 10.1590/s0100-879x2003001200002
- [22] Boots W., A.; Li, H.; Schins, R. P. F.; Duffin, R.; Heemskerk, J. W. M.; Bast, A.; Haenen, G. R. M. M.: The quercetin paradox. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007, **222**(1), 89–96. DOI: 10.1016/j.taap.2007.04.004
- [23] Matos, M. J.; Santana, L.; Uriarte, E.; Abreu, A. O.; Molina, E.; Yordi, G. E.: Coumarins — an important class of phytochemicals. In: *Phytochemicals – Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. A. V. Rao, L. G. Rao (ed.). InTech, 2015. DOI: 10.5772/59982
- [24] Gliszczynska, A.; Brodelius P. E.: Sesquiterpene coumarins. *Phytochemistry Reviews* 2012, **11**(1), 77–96. DOI: 10.1007/s11101-011-9220-6
- [25] Gnonlonfin, G. J. B.; Sanni, A.; Brimer, L.: Review scopoletin – a coumarin phytoalexin with medicinal properties. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2012, **31**(1), 47–56. DOI: 10.1080/07352689.2011.616039
- [26] Manuele, M. G.; Ferraro, G.; Arcos, M. L. B.; López, P.; Cremaschi, G.; Anesini, C.: Comparative immunomodulatory effect of scopoletin on tumoral and normal lymphocytes. *Life Sciences* 2006, **79**(21), 2043–2048. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.06.045
- [27] He, W.-S.; Zhu, H.; Chen, Z.-Y.: Plant sterols: chemical and enzymatic structural modifications and effects on their cholesterol-lowering activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018, **66**(12), 3047–3062. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00059
- [28] Schaller, H.: The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research* 2003, **42**(3), 163–175. DOI: 10.1016/s0163-7827(02)00047-4
- [29] Majeed, M.; Ahmad, F.; Mundkur, L.; Appian, S.: Pharmacology of α -spinasterol, a phytosterol with nutraceutical values: A review. *Phytotherapy Research* 2022, **36**(10), 3681–3690. DOI: 10.1002/ptr.7560
- [30] Bae, H.; Park, S.; Yang, C.; Song, G.; Lim, W.: Disruption of endoplasmic reticulum and ROS production in human ovarian cancer by campesterol. *Antioxidants* 2021, **10**(3), 379. DOI: 10.3390/antiox10030379

- [31] Singh, R.: Chemotaxonomy: A tool for plant classification. *Journal of Medicinal Plants Studies* 2016, **4**(2), 90–93.
- [32] Reynolds, T.: The evolution of chemosystematics. *Phytochemistry* 2007, **68**(22–24), 2887–2895. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.06.027
- [33] Rossi, M.; Caruso, F.; Thieke, N.; Belli, S.; Kim, A.; Damiani, E.; Morresi, C.; Bacchetti, T.: Examining the antioxidant and superoxide radical scavenging activity of anise, (*Pimpinella anisum* L. seeds), esculetin, and 4-methyl-esculetin using X-ray diffraction, hydrodynamic voltammetry and DFT methods. *Pharmaceuticals* 2023, **17**(1). DOI: 10.3390/ph17010067
- [34] Marques, V.; Farah, A.: Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry* 2009, **113**(4), 1370–1376. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.086
- [35] Obaid, A.; Al-Janabi, J. K. A.; Taj-Aldin, W. R.: Chemical composition and bioactivity characteristics of *Pimpinella anisum* essential oil against *Trichophyton rubrum*. *Journal of Global Pharma Technology* 2017, **8**(9), 44–56.
- [36] Jurado, J. M.; Alcázar, A.; Pablos, F.; Martín, M. J.: Determination of anethole in aniseed drinks. *Chromatographia* 2006, **64**(3–4), 223–226. DOI: 10.1365/s10337-006-0001-0
- [37] <https://chemdata.nist.gov/> {navštívěno 2. 5. 2025}
- [38] Matsushita, T.; Zhao, J.J.; Igura, N.; Shimoda, M.: Authentication of commercial spices based on the similarities between gas chromatographic fingerprints. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2018, **98**(8), 2989–3000. DOI: 10.1002/jsfa.8797
- [39] Goldberg, L.: A history of pest control measures in the Anthropology Collections, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. *Journal of the American Institute for Conservation* 1996, **35**(1), 23–43. DOI:10.1179/019713