

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Stanovení vybraných boswellových kyselin v pryskyřici  
kadidlovníku pravého a ve výrobcích z této pryskyřice  
metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie se  
spektrofotometrickou detekcí**

Bakalářská práce

**Václav Hinterhölz**

Školitel: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2024

Hinterhölz, V., 2024: Stanovení vybraných boswellových kyselin v pryskyřici kadidlovníku pravého a ve výrobcích z této pryskyřice metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. [Determination of selected boswellic acids in frankincense resin and its products by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. Bc. Thesis, in Czech.] – 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

This bachelor thesis deals with the development and validation of a method for the determination of 2 boswellic acids (11-keto- $\beta$ -boswellic acid and 3-o-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid) in frankincense resin according to the requirements of the European Pharmacopoeia (version 11.0). The method was subsequently used to evaluate the quality of samples of the resin from the Dhofar region of Oman and tinctures made from it. The method was then optimized and validated to reduce the analysis time and cost. Finally, the optimized method was used to analyze differently colored parts of the resin and the relationship of the resin color to the content of selected boswellic acids was evaluated.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 12. 4. 2024

.....

Václav Hinterhölz

## **Poděkování**

Velice rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Davidu Kahounovi za jeho přátelský přístup, odborné vedení, cenné rady a za všechny předané zkušenosti. Především bych ale vyzdvihl trpělivost a ochotu se vším kdykoliv pomoci.

Za poskytnuté vzorky, skvělou spolupráci a cenné rady patří velké díky MVDr. Aleně Vaníčkové, Ph.D. a společnosti 1. Aromaterapeutická KH a.s.

Závěrem bych rád poděkoval své rodině a kamarádům za velkou podporu a hlavně trpělivost.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
1.1	Kadidlovník .....	2
1.2	Boswellové kyseliny a jejich využití .....	5
1.3	Metody stanovení boswellových kyselin .....	8
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>13</b>
3.1	Chemikálie .....	13
3.2	Přístroje a spotřební materiál .....	13
3.3	Příprava roztoků .....	14
3.3.1	Příprava mobilních fází .....	14
3.3.2	Příprava roztoků standardů a pracovních roztoků.....	15
3.3.3	Příprava vzorků.....	15
3.3.4	Příprava roztoků pro validaci lékopisné metody.....	16
3.3.5	Příprava roztoků pro validaci nové metody.....	16
3.3.6	Příprava roztoků pro hodnocení vlivu barvy pryskyřice na obsah KBA a AKBA.....	18
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze</b> .....	<b>20</b>
4.1	Stanovení KBA a AKBA dle podmínek Evropského lékopisu .....	20
4.2	Stanovení KBA a AKBA moderní LC .....	23
4.2.1	Optimalizace nové metody .....	24
4.2.2	Validace nové metody .....	28
4.3	Porovnání lékopisné a nové metody .....	29
4.3.1	Časová a finanční náročnost.....	29
4.3.2	Výsledky metod.....	30
4.4	Vliv barvy na obsah KBA a AKBA .....	32
<b>5</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Seznam symbolů a zkratk</b> .....	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy</b> .....	<b>44</b>
8.1	Validace linearity kalibrační křivky KBA - část 1/2 .....	44
8.2	Validace linearity kalibrační křivky AKBA - část 1/2 .....	46

# 1 Úvod

Léčivé rostliny vždy měly a stále mají velmi široké využití při léčbě různých onemocnění. Tradiční bylinná medicína nemá uplatnění pouze při samotné léčbě, ale i v prevenci a je také předmětem výzkumu a vývoje nových farmaceutických přípravků.

Kadidlovník (boswellie) patří mezi nejvýznamnější léčivé stromy tradiční asijské medicíny a podobné důležitosti se těší i v mnoha afrických zemích. Pryskyřice z kadidlovníku je totiž v těchto oblastech světa nejen jednou z nejpoužívanějších fytotherapeutickou substancí, ale má i široké využití v rituálních obřadech a náboženství. V dřívějších dobách byla pro své vlastnosti a omezenou dostupnost považována za jedno z největších bohatství, a dokonce byla ceněna podobně jako zlato či hedvábí. Ve svém složení obsahuje též terpenoidy, seskviterpenoidy, diterpenoidy, triterpenoidy a boswellové kyseliny a jejich deriváty, z nichž hlavní a pro tuto bakalářskou práci významné, jsou 2 pentacyklické triterpenické kyseliny 11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina a 3-o-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina. Obsah mnoha terpenických látek, využívaných v podobě rostlinných silic, zaručuje specifitu vůně i některé terapeutické účinky pryskyřice. Z hlediska léčebných účinků je však rozhodující především obsah boswellových kyselin, protože vykazují řadu biologických účinků, např. antiflogistické, antiartrotické, antidiabetické, antibakteriální, antioxidační, protirakovinotvorné a mnoho dalších.

Vhodnou metodou pro stanovení obsahu boswellových kyselin v pryskyřici kadidlovníku je vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci se spektrofotometrickou detekcí. Tato metoda je běžně využívána pro kontrolu kvality pryskyřice a je rovněž vyžadována v příslušné monografii Evropského lékopisu (verze 11.0) (dále jen Ph. Eur.) pro stanovení obsahu 11-keto- $\beta$ -boswellové kyseliny a 3-o-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellové kyseliny v pryskyřici indické (*Olibanum indicum*).

Tato bakalářská práce je zaměřena na zavedení a validaci analytické metody pro stanovení 2 vybraných boswellových kyselin (11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina a 3-o-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina) ve vzorcích pryskyřice kadidlovníku pravého (*Boswellia sacra*) z Ománu z oblasti Dhofar podle požadavků Ph. Eur. V další části práce byla provedena optimalizace metody s důrazem na podstatné zkrácení doby analýzy a snížení nákladů. Nakonec byla optimalizovaná metoda použita pro analýzu různě zbarvených částí pryskyřice a byla hodnocena souvislost vlivu barvy pryskyřice na obsah vybraných boswellových kyselin.

## 1.1 Kadidlovník

Olibanum, frankincense či kadidlo – to vše jsou názvy pro pryskyřici získávanou ze stromů kadidlovníku (*Boswellia*). Kadidlovník je středně velký listnatý opadavý strom z čeledi březulovitých (*Burseraceae*), dorůstající obvykle výšky cca 5 m. Nejvíce se mu daří na odlehlých a hůře přístupných místech. Někdy se může rozrůstat z jednoho základního kmene do více kmenů a svým vzhledem tak může připomínat spíše keř. Větve jsou obklopeny drobnými zelenými lichozpeřenými listy. Z jara se začínají objevovat buď krémově bílé, nebo žlutavé pětičetné květy a po nich následují hnědé tobolky, které v sobě ukrývají semena kadidlovníku [1, 2].

Tento strom, jehož domovským prostředím je převážně oblast Středního východu, Indie a Afriky, obsahuje ve svém dřevu a kůře kanálky s vonnými pryskyřicemi. Tato pryskyřice se získává šetrným odborným naříznutím tenké, stále se odlupující kůry, po kterém začne strom ronit mléčné pryskyřičné slzy, a ty na vzduchu pomalu ztuhnou a vysuší se [3]. Udává se, že strom kadidlovníku, než se z něho začne nařezáváním získávat pryskyřice, by měl být minimálně 8 let starý. Řezy musí být prováděny přesně a šetrně speciálním nožem a uváděná délka řezu je 4–8 cm a hloubka řezu se uvádí 1 mm, ale musí se brát také v potaz průměr kmene stromu [4, 5]. Při nadměrném porušení kůry strom odumře, a proto se musí člověk k porostům kadidlovníku chovat mimořádně odpovědně. O šetrný sběr kadidla se starají muži z horských kmenů a ženy se starají o výrobu a prodej různých kosmetických a léčivých přípravků (masti, tinktury, oleje a parfémy) či vykuřovadel. Sběrači se obvykle vracejí pro kadidlo až po 3 měsících od naříznutí kůry a sběr je prováděn maximálně 2x ročně. Jedná se však pouze o doporučení odborníků. Například Ománci v průběhu sklizně nařezávají kůru stromu 3x ve čtrnáctidenních intervalech a až poté provedou samotnou sklizeň. Sběr kadidla však provádějí pouze 1x ročně – před obdobím monzunových dešťů. Ztuhlé kadidlo sbírají ručně a třídí jej dle kvality a barvy. Plně vzrostlý kadidlovník běžně vyprodukuje 50–1800 g kadidla za sezónu v závislosti na velikosti stromu, intenzitě a frekvenci sběru [5]. Obecně kadidlo obsahuje cca 60–80 % frakce rozpustné v alkoholu, 15–20 % frakce rozpustné ve vodě, 5–7 % rostlinných silic a stejně tak polysacharidové frakce či v omezené míře přístupné polymerní látky [2, 6].

Silice získávané z kadidla jsou hojně využívány při aromaterapii nebo při výrobě parfémů již několik tisíc let. Tyto rostlinné silice mají také antioxidační, antifungální či antibakteriální účinky [4]. Například světle žlutá rostlinná silice je vyráběna parní destilací kadidla z *Boswellia sacra* a její hlavní složkou je oktylacetát (cca 60 %) dále pak 1-oktanol

(cca 12 %),  $\alpha$ -pinen (cca 11 %) atd. Naproti tomu rostlinná silice získávaná parní destilací kadidla z *Boswellia serrata* je bezbarvá a jako hlavní složku obsahuje  $\alpha$ -pinen (cca 45 %), dále pak  $\alpha$ -thujen (cca 12 %), methylchavikol (cca 11 %) atd. Procentuální zastoupení těchto složek je však závislé na kvalitě a stáří kadidla [7, 8].

Nejvýznamnější část Ománu, kde se pěstuje kadidlovník, je jižní provincie Dhofar. Nejvyšší druh kadidla zvané Hojari pochází z oblasti hor Jebel Samhan v provincii Salalah a města Hasik. V Ománu nejčastěji používají rozdělení na 4 základní druhy kadidla podle místa jeho výskytu, ale někdy jej označují jednoduše jen podle čísel. Nejvyšší kadidlo neboli zelené Hojari, lze na trhu nalézt pod názvem Number One [9]. Kadidlo se dále může ještě dělit dle jeho barvy, velikosti, tvaru nebo třeba doby sběru. Omán si velice váží svého přírodního bohatství, a proto je vývoz surového kadidla upraven tamními zákony. Některé zdroje uvádějí, že země jako Omán či Jemen vyvezou ročně cca 3 000 tun kadidla do země jako je Írán atp. [4]. Nejvíce kadidla je v dnešní době vyváženo ze Somálska a Etiopie, ale na úkor nadměrného a hlavně nekontrolovaného sběru, čímž dochází ke zbytečnému poškozování a úhynu stromů [1, 2]. Na Obr. 1 je pro bližší představu fotografie stromu kadidlovníku v jeho přirozeném prostředí.



Obr. 1: Strom kadidlovníku v přirozeném prostředí [10].

Existuje nejméně 25 známých druhů kadidlovníků [11]. Každý druh kadidlovníku obsahuje kadidlo, které má pro daný druh specifickou vůni, vzhled i účinky. To je způsobeno převážně klimatickými podmínkami a kvalitou půdy. Optimální pro jejich růst je teplé počasí s minimálními srážkami. Stromy rostoucí v dosahu moře a také monzunových dešťů se vyznačují méně kvalitní pryskyřicí. Naopak stromy rostoucí pomaleji v suché a kamenité půdě se vyznačují kvalitnější pryskyřicí s vyšším obsahem účinných látek [2, 12, 13].

Mezi nejznámější druhy na Arabském poloostrově se řadí *Boswellia sacra*, v Indii *Boswellia serrata*, v Etiopii *Boswellia papyrifera* a *Boswellia rivae*, v severní Africe a Somálsku *Boswellia carterii* a *Boswellia frereana* aj. Druhové rozlišení je velmi důležité pro zachování hospodářsky významných a ohrožených druhů [2, 6].

*Boswellia sacra* neboli kadidlovník pravý je nejvýznamnější druh kadidla v Ománu. Díky své vynikající kvalitě a tržní hodnotě, která se u vysoce kvalitního kadidla pohybuje až v řádu stovek dolarů za kilogram, se pro obyvatele Dhofaru jedná o podstatný zdroj jejich obživy. Velký význam pro ekonomiku Ománu má export kadidla a výrobků z něj vyrobených – např. podle údajů Světové banky za rok 2020 činil celkový vývoz těchto komodit z této země 33,479 miliard USD [14]. *Boswellia serrata* se hojně využívá v ayurvédské medicíně a v Evropě jako součást různých kloubních preparátů jak pro lidi, tak i pro zvířata. *Boswellia carterii* se svým vzhledem velmi podobá ománskému *Boswellia sacra*, a tak bývá bohužel velmi často nabízena právě jako ománské kadidlo, které má výrazně vyšší cenu a hlavně kvalitu [1, 4].

V dřívějších dobách bylo kadidlo používáno při různých náboženských rituálech, jelikož se traduje, že jeho voňavý bílý kouř s tóny citrusů uklidňuje bohy. Například starověké záznamy uvádějí, že za jeden rok se v babylonském chrámu spálilo 2,5 tuny kadidla. V současné době má největší spotřebu kadidla katolická církev při obřadech [1, 15].

V dnešní době musí bohužel některé druhy kadidlovníků čelit různým negativním vlivům, které souvisí s lidskou činností. Jedná se například o nadměrné kácení stromů, výstavbu různých budov nebo záření z telefonních věží [2]. Mezi další faktory, které negativně ovlivňují růst kadidlovníků, se řadí nadměrná pastva dobytka nebo měnící se klimatické podmínky, jako je neustále se zvyšující teplota a rapidní ubývání srážek. V rámci snahy o záchranu takto ohrožených druhů kadidlovníků vznikl záchranný program s cílem mapování stávajícího stavu a jeho následnému monitoringu. Na základě získaných dat byla pro tyto



kadidlovníky zřízena rezervace nesoucí název Wadi Dowkah Frankincense Park, která se nachází cca 40 km severně od Salalahu a svou rozlohou zaujímá cca 5 km<sup>2</sup> [2, 16].

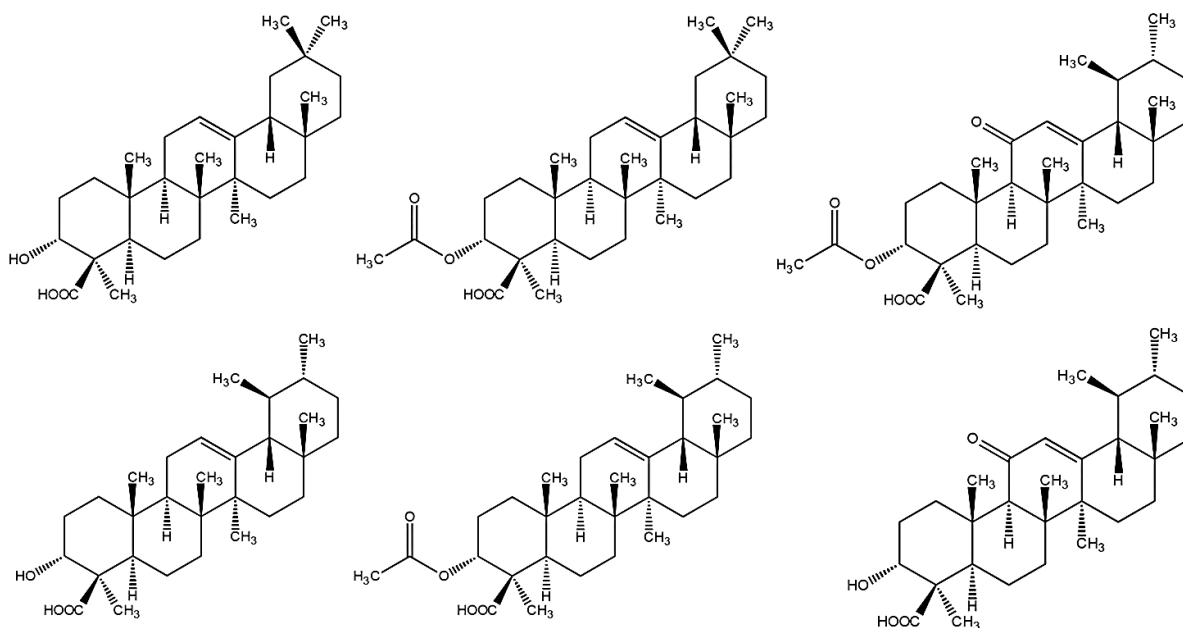
Hedvábná či Stříbrná stezka jsou známé po celém světě, ale Kadidlová stezka vedoucí z Asie do Evropy již tak známá není. Přitom se jedná o jednu z nejstarších a nejdůležitějších obchodních cest historie. Vaky naplněné kadidlem byly přepravovány za pomoci oslů a velbloudů do námořních přístavů, odkud zboží směřovalo do dalších zemí světa. Tento obchod s kadidlem ale také podléhal clu, které bylo důrazně vymáháno. Některé cesty karavan, čítajících stovky zvířat, vedly z Ománu nebo Jemenu přes Rub al-Chálí – v překladu „Pustá končina“ – největší souvislou poušť světa [17]. Tato cesta byla velice náročná a hlavně nebezpečná, a proto v okolí nejfrekventovanějších cest vznikla místa zvaná Karavanserai [18]. Jedná se o orientální starověké zájezdní hostince, které poskytovaly karavanám ochranu před lupiči, možnost občerstvení či přenocování. Bezpochyby nejznámější Karavanserai je Ubar u vesnice Shisr, kde měly karavany poslední možnost zastavit a doplnit zásoby před vstupem do pouště Rub al-Chálí. Dle legend byl Ubar proslulý bohatstvím natolik, že byly jeho ulice dlážděny zlatem a všude byla cítit vůně kadidla, ale později byl prý Ubar zničen Bohem kvůli jeho pyšným obyvatelům. V dnešní době z většiny Karavanserai zbyly již jen trosky a rozvaliny. Někde v blízkosti této stezky měl také údajně stát bájný palác královny ze Sáby, který byl postaven v luxusním orientálním stylu. V roce 2000 byly památky Kadidlové stezky zapsány do seznamu světového dědictví UNESCO [8, 19].

Zhruba před dvěma tisíci lety mělo kadidlo stejnou cenu jako zlato či hedvábí, a proto také bylo nalezeno v hrobkách egyptských faraonů. Také je třeba zmínit známý biblický příběh o Ježíšovi a Třech králich (Mudrci z Východu). Právě Tři králové (Kašpar, Melichar a Baltazar) se přišli poklonit Ježíši nedlouho po jeho narození a uctili ho třemi vzácnými dary: zlatem, myrhou a kadidlem. Tyto tři vzácné dary představují Ježíšovo poslání a úděl. Zlato pro krále, myrha pro mrtvé a kadidlo pro bohy.

## 1.2 Boswellové kyseliny a jejich využití

Boswellové kyseliny jsou sloučeniny lipofilní povahy nerozpustné ve vodě. Jedná se o biologicky aktivní pentacyklické triterpenové kyseliny. Z chemického hlediska se dělí na  $\beta$ -boswellové kyseliny (ursanový typ) a  $\alpha$ -boswellové kyseliny (oleanový typ), které se od sebe liší pozicí methylové skupiny na 19. a 20. uhlíku [11]. Boswellové kyseliny obsahují 6 důležitých, blízce příbuzných izomerů, které je obtížné od sebe oddělit. Jsou to 3-o-acetyl-

11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina (AKBA), 11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina (KBA), acetylované  $\alpha$  a  $\beta$  boswellové kyseliny (ABA) a  $\alpha$  a  $\beta$  boswellové kyseliny (BA). Na Obr. 2 jsou pro bližší představu uvedeny strukturní vzorce těchto boswellových kyselin [11].



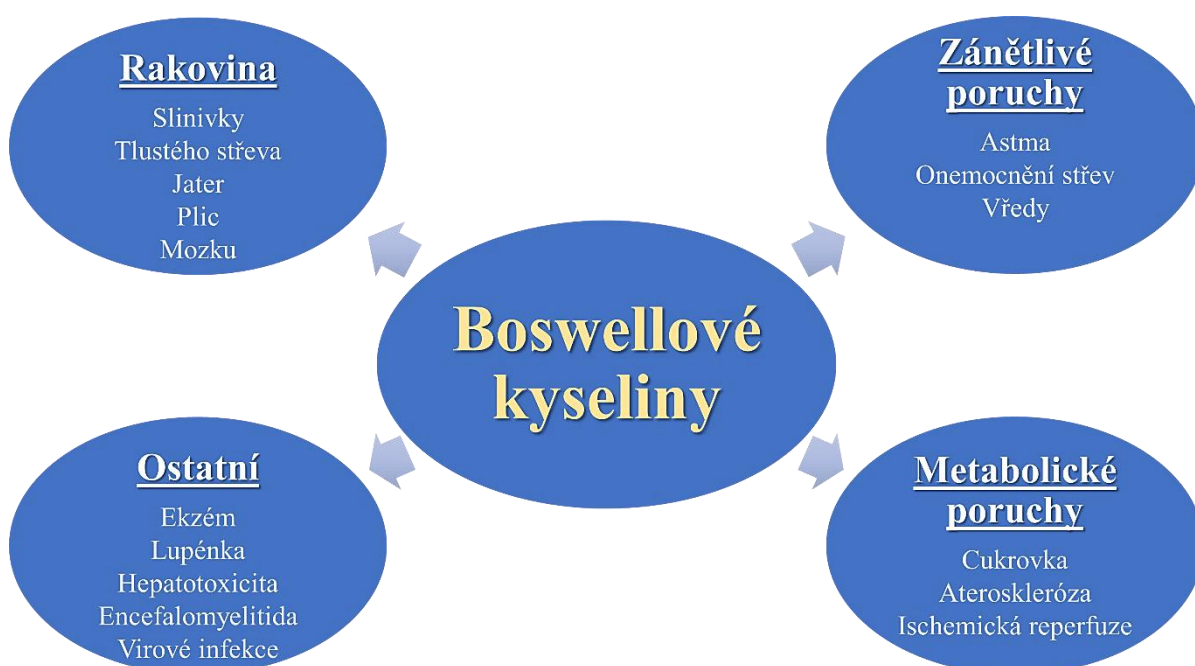
Obr. 2: Strukturní vzorce 6 nejdůležitějších boswellových kyselin – převzato z [20] a upraveno. Zleva  $\alpha$ -boswellová kyselina, 3-o-acetyl- $\alpha$ -boswellová kyselina, 3-o-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina,  $\beta$ -boswellová kyselina, 3-o-acetyl- $\beta$ -boswellová kyselina, 11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina.

Neustále se zvyšující míra rezistence vůči antibiotikům nebo vysoká cena mnoha léků, zejména v málo rozvinutých zemích, vede v těchto oblastech k daleko většímu využití tradiční medicíny. Obecně jsou zde přírodní produkty považovány za bezpečnější než syntetická léčiva, a tak není divu, že roste zájem o další rozvoj používání látek, jako je například kadidlo. Kadidlo využitelné pro účely léčby či prevence produkují především čtyři hlavní druhy kadidlovníků, kterými jsou *Boswellia sacra*, *Boswellia serrata*, *Boswellia frereana* a *Boswellia carterii*. Obsah boswellových kyselin v pryskyřici kadidlovníku je však závislý na několika faktorech, kterými jsou oblast výskytu stromu, stáří stromu, metoda sběru pryskyřice, roční období a skladovací podmínky [21].

Při léčbě chronických onemocnění je používána široká paleta rostlinných přípravků z kadidla, jelikož tyto přípravky mají minimální vedlejší účinky. Na trhu je lze získat např. ve formě masti, oleje, tinktury, tablety, kapsle nebo bez úpravy jako surovou pryskyřici [4].

Lékaři tradiční indické medicíny v dřívějších dobách hojně využívali kadidlo při léčbě astmatu, artritidy, žaludečních vředů nebo kožních onemocnění. V dnešní době již několik studií potvrdilo, že pryskyřice z kadidlovníku má antiflogistické, antimikrobiální, antidiabetické, antikoagulační a imunomodulační účinky [4, 8].

Tradiční čínská medicína využívá pozitivních účinků kadidla na podporu krevního oběhu, ke zmírnění bolesti a k uvolnění svalů. Některé studie uvádějí pozitivní účinky kadidla také proti jaterním, žaludečním, neurologickým a kožním poruchám či astmatu [8, 22]. Nelze opomenout ani některé klinické studie na základě kterých byly prokázány pozitivní účinky také proti karcinomům, gliomům, nádorům močového měchýře a mozku [11, 23]. Dokonce existují již první výzkumy na využití pryskyřice v nanotechnologiích. Nanočástice mají jedinečné vlastnosti, jako je velký povrch a flexibilní fyzikálně-chemické vlastnosti. Navázáním AKBA na povrch nanočástic zlata či stříbra byly pozorovány antiflogistické či analgetické účinky [4]. Na Obr. 3 jsou přehledněji znázorněny pozitivní účinky boswellových kyselin podle nejnovějších studií.



Obr. 3: Pozitivní účinky boswellových kyselin proti různým chronickým onemocněním – převzato z [24] a upraveno.

Při léčbě zánětlivých onemocnění pomocí boswellových kyselin se využívá alosterické neredoxní inhibice 5-lipoxygenázy (5-LOX) – prozánětlivý enzym. Pomocí proteinu aktivujícího enzym 5-LOX, který váže substrát na jaderné membráně, je iniciována biosyntéza

leukotrienů z kyseliny arachidonové. Právě leukotrieny mají největší význam při různých zánětech a alergiích. Nejlepší výsledky inhibice 5-LOX vykazoval inhibitor AKBA [6, 25].

Účinky kadidla *Boswellia serrata* byly také již hodnoceny u pacientů trpících ulcerózní kolitidou – zánětem tlustého střeva. Přípravek vyrobený z tohoto kadidla (300 mg třikrát denně po dobu 6 týdnů) byl podáván 20 pacientům a dalším 10 pacientům byl pro kontrolu podáván sulfasalazin – přípravek s protizánětlivými účinky – (1 g třikrát denně po dobu 6 týdnů). Z 20 pacientů léčených kadidlem *Boswellia serrata* vykazovalo zlepšení 18 pacientů. V kontrolní skupině 6 z 10 pacientů mělo srovnatelné výsledky se stejnými parametry. Tento pilotní výzkum ukázal, že přípravek z kadidla *Boswellia serrata* by mohl být účinný při léčbě ulcerózní kolitidy, a to s minimem vedlejších účinků, ale pro větší průkaznost je zapotřebí ještě dalšího výzkumu se širším okruhem pacientů [21, 26].

### 1.3 Metody stanovení boswellových kyselin

Pro stanovení boswellových kyselin jsou v dnešní době nejvíce používány metody separační. Největší uplatnění z široké oblasti separačních metod pro tyto účely však téměř výhradně nacházejí metody chromatografické, což jsou fyzikálně-chemické metody využívající rozdílné distribuce dělených látek mezi různé nemísitelné fáze. Jedná se například o tenkovrstvou chromatografii (TLC), plynovou chromatografii (GC) nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). Metody TLC jsou využívány zejména pro rychlou orientační kvalitativní analýzu, metody GC a HPLC zase téměř výhradně pro kvantitativní analýzu. Při izolaci boswellových kyselin z pryskyřice kadidlovníku se využívá alkalicko-acidického zpracování alkoholového extraktu, což má za úkol poskytnout boswellové kyseliny o vyšší čistotě, jelikož jsou tyto látky hojně využívány ve farmaceutickém průmyslu [7, 27].

Pro provedení úspěšné chromatografické separace je vždy nezbytné mj. zvolit vhodnou stacionární fázi (SF) a současně i vhodnou mobilní fázi (MF). Správně zvolená kombinace SF a MF je totiž naprosto zásadní pro co nejlepší rozdělení separovaných látek a zároveň i pro co nejlepší tvar chromatografických píků, které mají být úzké a symetrické. Pro dosažení vhodných chromatografických podmínek je při vývoji nové metody prováděna optimalizace chromatografické separace. Jedná se o série měření provedených za různých nastavení parametrů, které ovlivňují separaci za účelem dosažení požadovaného cíle – zvýšení rozlišení, zvýšení symetrie píků, zvýšení retenčního faktoru, snížení doby analýzy, snížení meze kvantifikace aj. Optimalizovanými parametry, kterými mají být tyto cíle dosaženy, mohou

být: typ SF, velikost částic SF, rozměry kolony, složení MF, objem nástřiku vzorku, rychlost toku MF, ... [28].

Metody TLC umožňují díky své finanční i instrumentální nenáročnosti provádět základní kvalitativní analýzu, např. rozlišení jednotlivých druhů kadidlovníku. V případě práce [29] byla jako eluční činidlo použita směs rozpouštědel pentan a diethylether (2:1) s 1% kyselinou octovou. Chromatogramy byly analyzovány za použití UV záření o vlnové délce 254 nm a s pomocí vizualizačního činidla, kterým byl anisaldehyd. Ve výsledku byl jako specifický biomarker *Boswellia sacra* shledán  $\beta$ -karyofylenoxid.

Hlavním cílem práce [30] byla izolace a identifikace boswellových kyselin. Pomocí TLC byl úspěšně zkoumán výběr vhodného rozpouštědla a proces extrakce boswellových kyselin z pryskyřice kadidlovníku. Byla provedena extrakce pomocí 10 rozpouštědel a s přihlédnutím i na ekonomické hledisko, byl jako nejvhodnější rozpouštědlo vybrán ethanol. Jako nejvhodnější proces extrakce byla vybrána macerace.

V práci [31] bylo provedeno porovnání metod HPTLC a HPLC při stanovení KBA a AKBA ze vzorku *Boswellia serrata*. Pro stanovení obou analytů byl vyvinut přímý test HPTLC za použití UV záření o vlnové délce 254 nm. Stanovené množství KBA a AKBA ve vzorku z *Boswellia serrata* bylo cca 3,3 % a 4,6 % pomocí HPTLC a 3,03 % a 3,87 % pomocí HPLC při téměř shodné vlnové délce 250 nm. Byl tedy zjištěn minimální rozdíl v kvantifikaci KBA a AKBA těmito výše zmíněnými metodami.

Vzhledem k mnoha nejistotám ohledně botanické identifikace a složitosti směsí triterpenických kyselin obsažených v pryskyřici kadidlovníku jsou v posledních letech vyvíjeny stále nové metody. V práci [32] byla představena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí využívající diodového pole (HPLC-PDA) za účelem odhalení rozdílů ve složení triterpenových kyselin a zajistit tak průkazné geografické rozlišení různých druhů kadidlovníků. Tato metoda využívala kapalinový chromatograf (Waters Alliance 2690), chromatografickou kolonu (Phenomenex Synergi MAX-RP 80; 150 × 4,6 mm; 4 mm), průtok MF 1 ml/min a spektrofotometrický detektor pracující při vlnové délce 210 nm. Doba analýzy činila cca 40 min.

V práci [33], která se týkala nejen druhového rozlišení kadidlovníků, ale i hodnocení účinnosti jejich pryskyřic proti rakovinným buňkám prsu, byla představena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS). Bylo analyzováno 41 různých vzorků od 9 různých druhů kadidlovníků. Například *Boswellia*

*sacra* vykazoval průměrný obsah AKBA v kadidle 31,3 µg/mg a *Boswellia serrata* pouze 11,8 µg/mg. Co se týče účinnosti boswellových kyselin proti rakovinným buňkám, byla prokázána zvyšující se cytotoxická aktivita proti buňkám rakoviny prsu se zvyšující se koncentrací boswellových kyselin. Analýza HPLC-MS/MS byla provedena na kapalinovém chromatografu (Agilent 1260 Infinity) ve spojení s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (Applied Biosystems API 2000) pomocí ionizace elektrosprejem (ESI) v negativním režimu. Byla použita chromatografická kolona pracující systémem obrácených fází (Dr. Maisch ReproSil-Pur Basic-C18 HD; 125 × 3 mm; 3 µm) při průtoku MF 0,6 ml/min.

Rozdíl v obsahu boswellových kyselin mezi *Boswellia sacra* a *Boswellia serrata* byl zkoumán v práci [34]. Kvalifikace a kvantifikace ve vzorcích z *Boswellia sacra* získaných z Etiopie a z *Boswellia serrata* získaných z Indie byla provedena pomocí HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu (Agilent 1200 Infinity) vybaveném kolonou s reverzní fází (Phenomenex Luna C18; 150 mm × 3,0 mm; 3 µm) při průtoku MF 0,2 ml/min. Hmotnostní detekce byla provedena pomocí iontové pasti (Agilent 6330 Series) vybavené elektrosprejem (ESI) pracujícím v negativním režimu. Zjištěný obsah KBA ve vzorku *Boswellia sacra* byl  $21,26 \pm 0,76$  g/kg a ve vzorku *Boswellia serrata* byl  $19,03 \pm 1,41$  g/kg suchého vzorku pryskyřice. Zjištěný obsah AKBA ve vzorku *Boswellia sacra* byl  $42,41 \pm 2,79$  g/kg a ve vzorku *Boswellia serrata* byl  $4,04 \pm 0,49$  g/kg suchého vzorku pryskyřice. Celkový obsah hlavních boswellových kyselin byl vyšší u *Boswellia sacra* než u *Boswellia serrata*.

Cílem práce [35] bylo vyvinout rychlou isokratickou HPLC metodu pro identifikaci KBA a AKBA ve výrobcích vyskytujících se na trhu. Analýza byla provedena pomocí HPLC systému Shimadzu se spektrofotometrickým detektorem (SPD-10A/10Ai) a chromatografickou kolonou (Nouryon Kromasil 100 C18; 250 mm × 4,6 mm; 5 µm). Retenční čas pro KBA byl 4,30 min a pro AKBA 7,11 min. Vyvinutá metoda poskytovala lineární kalibrační křivky v rozmezí 11,66–58,30 µg/ml pro KBA a 6,50–32,50 µg/ml pro AKBA.

Stanovení KBA a AKBA bylo již prováděno nejen v pryskyřicích kadidlovníků a výrobků z nich vyrobených, ale i v séru lidské plazmy. Při léčbě peritumorálního edému bylo totiž zjištěno, že výtažky z kadidla *Boswellia serrata* představují silný doplňkový bylinný lék [36]. V rámci tohoto výzkumu byla úspěšně vyvinuta vysoce citlivá HPLC-MS metoda umožňující spolehlivou kvantifikaci obou těchto analytů. Analýza byla provedena na chromatografu Agilent 1200 Infinity za použití kolony (Thermo Hypersil BDS RP C18;

100 mm × 4 mm, 3 µm). Celková doba analýzy činila 35 min při průtoku MF 0,4 ml/min. Hmotnostní detekce byla provedena na trojitém kvadrupólu Agilent 6410 vybaveném elektrosprejem (ESI) pracujícím v negativním režimu. Metoda byla úspěšně zvalidována v koncentračním rozsahu od 5,0 ng/ml do 3000 ng/ml.

Metoda GC je metoda vhodná zejména pro stanovení těkavých látek. Podmínkou použití této metody je, aby stanovované látky byly zplynitelné a termostabilní až do teploty cca 400 °C. V práci [37] byla zkoumána podobnost rostlinných silic vyrobených z *Boswellia dalzielii* vyskytující se v Burkině Faso a Nigérii. Bylo zjištěno, že rostlinné silice z Burkiny Faso jsou velmi podobné těm z Nigérie v dominanci  $\alpha$ -pinenu, avšak v rostlinných silicích z Nigérie je navíc zastoupeno významné množství seskviterpenů. Analýza byla provedena pomocí GC-MS, kde byl využit chromatograf (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra) s kapilární kolonou (Phenomenex ZB-5ms) a pomocí GC-FID, kde byl využit chromatograf (Shimadzu GC 2010) s plamenovým ionizačním detektorem a kapilární kolona (Phenomenex ZB-5).

Cílem práce [38] byla kvalifikace charakteristických složek kadidla v komerčně prodávaném vzorku a následné potvrzení přítomnosti těchto složek v archeologickém vzorku kadidla. Analýza byla provedena pomocí GC-MS, kde byl použit chromatograf (Varian Saturn 3900) s kapilární kolonou (Varian CP-Sil 8 CB; 30 m × 0,25 mm; 0,25 µm) a hmotnostní spektrometr (Varian 2100 T). Závěrem byly úspěšně identifikovány chemické markery kadidla z komerčního vzorku, které byly detekovány také v archeologickém vzorku, kde byly mimo jiné přítomny i produkty degradace těchto markerů.

Předmětem dosavadního výzkumu bylo i hledání podmínek selektivní extrakce a následné identifikace především diterpenů a triterpenoidů z kadidla *Boswellia papyrifera* [39]. Extrakce byla provedena extrakčními postupy jako jsou Soxhletova extrakce pomocí hexanu a superkritická extrakce pomocí CO<sub>2</sub>. Větších výtěžků extrakce (~ 25 %) bylo dosaženo vlivem delší doby extrakce a působením vyššího tlaku. Následná analýza pomocí GC-MS byla provedena na chromatografu (Thermo Trace 1300) s hmotnostní detekcí jednoduchým kvadrupólem (Thermo ISQ 7000) s chromatografickou kolonou (Agilent DB-5MS; 30 m × 0,25 mm; 0,25 µm). Pomocí této metody bylo úspěšně identifikováno 21 sloučenin (rostlinné silice, alkoholy, diterpeny, triterpenoidy aj.) s relativní plochou píku > 1 %. Nejvyšších hodnot relativní plochy píku bylo dosaženo v případě incensolu (36 %) či acetátu incensolu (17–20 %).

## 2 Cíl práce

Cíl práce definovaný v zadávacím protokolu bakalářské práce se sestává z těchto níže uvedených dílčích cílů práce:

- 1) Vypracovat literární rešerši na dané téma.
- 2) Vypracovat analytickou metodu na stanovení vybraných boswellových kyselin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí včetně provedení základní optimalizace této analytické metody.
- 3) Provést validaci analytické metody pro použití na analýzu modelových vzorků neobsahujících přírodní matrici.
- 4) Provést validaci analytické metody pro použití na analýzu reálných vzorků obsahujících vybranou přírodní matrici (pryskyřice, tinktura apod.).
- 5) Stanovení vybraných boswellových kyselin ve vizuálně rozdílných částech pryskyřice kadidlovníku pravého pro účely hodnocení její kvality.



## 3 Materiál a metody

### 3.1 Chemikálie

- Standardy analytů:
  - 11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina (KBA)  
(M = 470,68 g/mol, čistota  $\geq$  95 %, CAS: 17019-92-0, Sigma Aldrich)
  - 3-o-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina (AKBA)  
(M = 512,72 g/mol, čistota  $\geq$  94 %, CAS: 67416-61-9, Sigma Aldrich)
  - Tinktura  
(KADIDLO EXTRAKT, doplněk stravy, 1. Aromaterapeutická KH a.s.)
  - Kadidlo  
(OMÁNSKÉ KADIDLO HOJARI, doplněk stravy & pryskyřice pro meditace a vykuřování 1. Aromaterapeutická KH a.s.)
- Rozpouštědla:
  - Acetonitril (Gradient Grade VWR)
  - Methanol (Gradient Grade VWR)
  - Kyselina orthofosforečná (čistota 85 %, Merck)
  - Deionizovaná voda vyrobená přístrojem Water purification systém Smart2Pure (Thermo Scientific)

### 3.2 Přístroje a spotřební materiál

- Kapalinový chromatograf (Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific)
- Chromatografické kolony (Phenomenex LUNA C18; 250  $\times$  4,6 mm; 5  $\mu$ m a Thermo ACCLAIM RSLC 120 C18; 100  $\times$  3,0 mm; 2,2  $\mu$ m)
- Analytické váhy (MS105DU, METTLER TOLEDO)
- Centrifuga (3–30 k, Sigma Aldrich)
- Sada automatických pipet v rozsahu 10–100  $\mu$ l, 100–1000  $\mu$ l a 1–10 ml (Research Plus Eppendorf)
- Sada mikrostříkaček Hamilton
- Výrobník deionizované vody (Smart2Pure, Thermo Scientific)
- Ultrazvuková lázeň (U5C600THD, VWR)
- Odměrné sklo, třída přesnosti A (Fisherbrand)

- Třecí misky s tloučkem
- Kopist
- Špičky pro pipety, parafilm, chromatografické krimpovací vialky, krimpovací víčka, centrifugační zkumavky a eppendorfy
- Ovládání systému HPLC-UV/VIS a vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno pomocí programu Chromeleon (verze 7.2.8, Thermo Scientific)
- Validace linearity kalibračních křivek byla provedena pomocí programu EffiValidation (verze 4.0.124.0, EffiChem)

### **3.3 Příprava roztoků**

#### **3.3.1 Příprava mobilních fází**

Mobilními fázemi, které byly zvoleny na základě požadavků Ph. Eur., byly mobilní fáze A o složení 0,1% kyselina orthofosforečná v deionizované vodě (MF-A) a mobilní fáze B o složení 0,1% kyselina orthofosforečná v acetonitrilu (MF-B).

MF-A byla připravována dle potřeby většinou do 250ml skleněné odměrné baňky určené pouze pro přípravu mobilních fází. Do 250ml skleněné odměrné baňky bylo nalito menší množství deionizované vody a bylo přidáno 250  $\mu$ l 85% kyseliny orthofosforečné. Následně byla odměrná baňka doplněna deionizovanou vodou po rysku. Takto připravená MF-A byla přelita do suché zásobní lahve určené pro skladování mobilních fází. MF-A musela být připravována vždy čerstvá.

MF-B byla připravována dle potřeby většinou do 1 000ml skleněné odměrné baňky určené pouze pro přípravu mobilních fází. Do 1 000ml skleněné odměrné baňky bylo nalito menší množství acetonitrilu a byl přidán 1 ml 85% kyseliny orthofosforečné. Následně byla odměrná baňka doplněna acetonitrem po rysku. Takto připravená MF-B byla přelita do suché zásobní lahve určené pro skladování mobilních fází.

Směsný roztok MF, používaný pro účely ředění roztoků standardů i vzorků, byl připravován dle potřeby většinou do 100ml skleněné odměrné baňky. Do 100ml skleněné odměrné baňky bylo odpipetováno 16 ml MF-A a odměrná baňka byla následně doplněna MF-B po rysku.

### 3.3.2 Příprava roztoků standardů a pracovních roztoků

Zásobní roztok KBA ( $ZR_{KBA}$ ) o koncentraci 50,4 mg/l byl připraven navážením 2,52 mg standardu do 50ml odměrné baňky a rozpuštěním v methanolu. Takto připravený roztok byl rozdělen do 4 zásobních lahviček a uchováván v chladničce.

Zásobní roztok AKBA ( $ZR_{AKBA}$ ) o koncentraci 50,4 mg/l byl připraven navážením 2,52 mg standardu do 50ml odměrné baňky a rozpuštěním v methanolu. Takto připravený roztok byl rozdělen do 4 zásobních lahviček a uchováván v chladničce.

Porovnávací roztok standardů ( $PR_{ST}$ ) o koncentraci každého analytu 5 mg/l byl připraven odpipetováním 992  $\mu$ l  $ZR_{KBA}$  a 992  $\mu$ l  $ZR_{AKBA}$  do 10ml odměrné baňky, která byla doplněna roztokem MF po rysku. Takto připravený roztok byl ponechán v odměrné baňce a uchováván v chladničce.

Směsný roztok standardů ( $SR_{ST}$ ) o koncentraci 25 mg/l byl připraven odpipetováním 4,96 ml  $ZR_{KBA}$  a 4,96 ml  $ZR_{AKBA}$  do 10ml odměrné baňky, která byla následně doplněna methanolem po rysku. Takto připravený roztok byl ponechán v odměrné baňce a uchováván v chladničce.

Směsný 10x zředěný roztok standardů ( $SR_{ST-10x}$ ) o koncentraci 2,5 mg/l byl připraven odpipetováním 0,5 ml  $PR_{ST}$  do 5ml odměrné baňky, která byla následně doplněna methanolem po rysku. Takto připravený roztok byl ponechán v odměrné baňce a uchováván v chladničce.

### 3.3.3 Příprava vzorků

Zásobní roztok pryskyřice ( $ZR_P$ ) byl připraven navážením 1,0020 g reprezentativního vzorku pryskyřice do 100ml odměrné baňky a jako rozpouštědlo byl přidán methanol. Před navažováním je vhodné umístit vzorek pryskyřice na přibližně 30 min do mrazničky a poté jej rozbít kladívkem na menší části. Odměrná baňka byla vložena do ultrazvukové lázně na 60 min. Poté byla doplněna methanolem po rysku a důkladně promíchána. Následně byl obsah z odměrné baňky rozdělen do několika eppendorfek a byl odstředěn po dobu 5 min při relativní odstředivé síle 20 000 RCF. Supernatant byl převeden do několika zásobních lahviček, které byly uchovávány v chladničce.

Zásobní roztok pryskyřice 10x zředěný ( $ZR_{P-10x}$ ) byl připraven odpipetováním 1 ml  $ZR_P$  do 10ml odměrné baňky, která byla doplněna methanolem po rysku a důkladně promíchána.

Pracovní roztok tinktury 100x zř. (PR<sub>T-100x</sub>) byl připraven odpipetováním 100 µl tinktury do 10ml odměrné baňky, která byla doplněna methanolem po rysku a důkladně promíchána.

Pracovní roztok tinktury 1 000x zředěný (PR<sub>T-1 000x</sub>) byl připraven odpipetováním 1 ml PR<sub>T-100x</sub> do 10ml odměrné baňky, která byla doplněna methanolem po rysku a důkladně promíchána.

### 3.3.4 Příprava roztoků pro validaci lékopisné metody

Pro validaci lékopisné metody byla připravena sada roztoků vzorku pryskyřice a tinktury dle Tab. 1 a každá vialka byla dělána v 7 opakováních. Dále byl odpipetován 1 ml PR<sub>ST</sub> do vialky a jako slepý pokus byl odlit 1 ml roztoku MF do vialky.

Tab. 1: Příprava sady roztoků vzorku pryskyřice a tinktury včetně přípravy jejich obohacených vzorků přidavkem standardních látek (spike).

Název vialky	ZR <sub>P</sub> [µl]	PR <sub>T-100x</sub> [µl]	ZR <sub>KBA</sub> [µl]	ZR <sub>AKBA</sub> [µl]	MF [µl]
Pryskyřice 10x	100	–	–	–	900
Pryskyřice 10x + spike 5 mg/l	100	–	99,2	99,2	702
Tinktura 1 000x	–	100	–	–	900
Tinktura 1 000x + spike 5 mg/l	–	100	99,2	99,2	702

### 3.3.5 Příprava roztoků pro validaci nové metody

Pro validaci nové metody byla nejprve připravena orientační řada roztoků standardů (Tab. 2), poté testovací řada standardů (Tab. 3) a nakonec kalibrační řada standardů (Tab. 4). Dále byly připraveny roztoky vzorků pryskyřice a tinktury (Tab. 5).

Tab. 2: Příprava orientační řady standardů.

Název	PR <sub>ST</sub> [µl]	1. vial. [µl]	2. vial. [µl]	3. vial. [µl]	4. vial. [µl]	5. vial. [µl]	6. vial. [µl]	MF [µl]	Konc. [µg/l]
1. vialka	100	–	–	–	–	–	–	900	500
2. vialka	–	100	–	–	–	–	–	900	50
3. vialka	–	–	100	–	–	–	–	900	5
4. vialka	–	–	–	100	–	–	–	900	0,5
5. vialka	–	–	–	–	100	–	–	900	0,05
6. vialka	–	–	–	–	–	100	–	900	0,005

Tab. 3: Příprava testovací řady standardů.

<b>Koncentrace [mg/l]</b>	<b>SR<sub>ST</sub> [μl]</b>	<b>MF [μl]</b>
25	1000	–
10	400	600
5	200	800
2,5	100	900
1	40	960
0,5	20	980
0,25	10	990
0,1	4	996
0,05	2	998
0,025	1	999

Sada kalibračních roztoků byla připravena dle Tab. 4 přímo do chromatografických vialek. Nejprve bylo napipetováno příslušné množství směsi MF, a poté příslušné množství SR<sub>ST</sub>.

Tab. 4: Kalibrační řada standardů

<b>Název vialky</b>	<b>Koncentrace [mg/l]</b>	<b>SR<sub>ST</sub> [μl]</b>	<b>MF [μl]</b>
1.a 1.b 1.c	0,100	4	996
2.a 2.b 2.c	0,250	10	990
3.a 3.b 3.c	0,500	20	980
4.a 4.b 4.c	1,000	40	960
5.a 5.b 5.c	2,500	100	900
6.a 6.b 6.c	5,000	200	800
7.a 7.b 7.c	10,000	400	600
8.a 8.b 8.c	25,000	1000	–

Roztoky vzorků a obohacených vzorků pro účely ověření správnosti a přesnosti metody jsou uvedeny v následující Tab. 5, přičemž každá vialka byla připravena ve 3 opakováních.

Tab. 5: Příprava roztoků vzorků pryskyřice a tinktury – ověření přesnosti a správnosti.

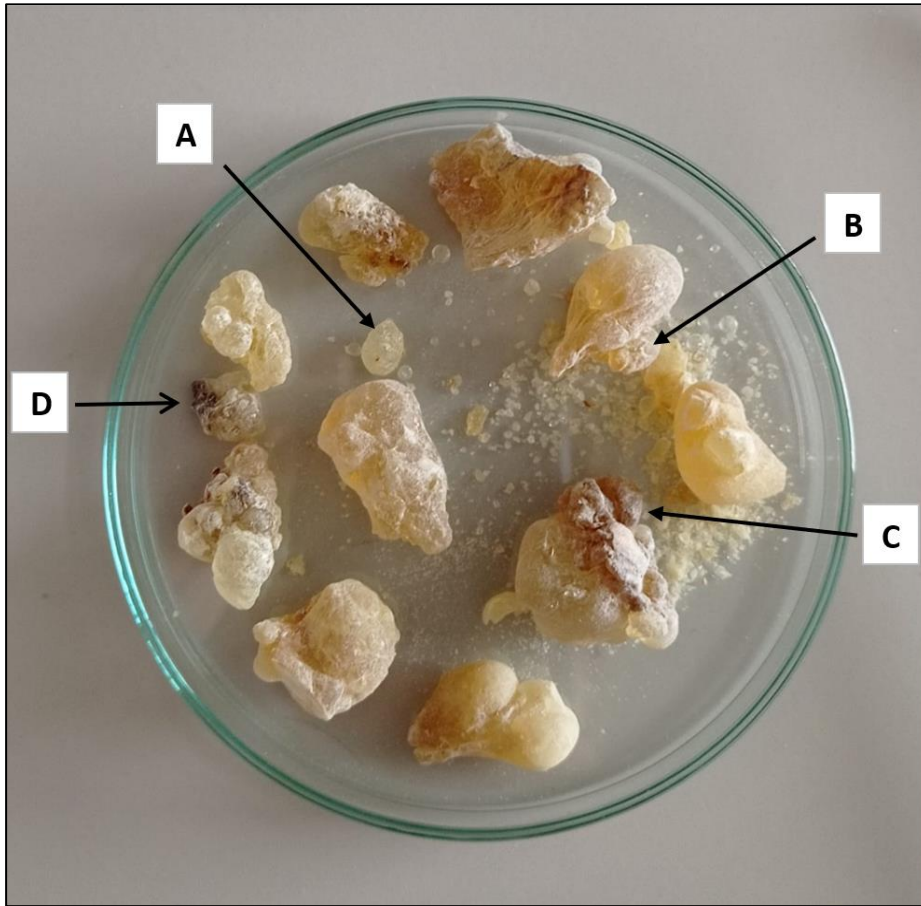
Název vialky	ZR <sub>P</sub> [μl]	ZR <sub>P-10x</sub> [μl]	PR <sub>T-100x</sub> [μl]	PR <sub>T-1000x</sub> [μl]	SR <sub>ST</sub> [μl]	MF [μl]
Pryskyřice 10x	100	–	–	–	–	900
Pryskyřice 10x + spike 5 mg/l	100	–	–	–	200	700
Pryskyřice 100x	–	100	–	–	–	900
Pryskyřice 100x + spike 5 mg/l	–	100	–	–	200	700
Tinktura 1 000x	–	–	100	–	–	900
Tinktura 1 000x + spike 5 mg/l	–	–	100	–	200	700
Tinktura 10 000x	–	–	–	100	–	900
Tinktura 10 000x + spike 5 mg/l	–	–	–	100	200	700

### 3.3.6 Příprava roztoků pro hodnocení vlivu barvy pryskyřice na obsah KBA a AKBA

Byly vybrány 4 různě zbarvené vzorky pryskyřice (viz. Obr. 4) a každý byl vložen do vlastní třecí misky. Třecí misky se vzorky byly na 30 minut vloženy do hlubokomrazicího boxu (–80 °C), a poté byly vzorky v třecích miskách rozmělněny tloučkem. Rozemletý prášek byl kopistkou navážen přímo do eppendorfky, byl přidán 1 ml methanolu a navážka byla rozpuštěna (příprava viz. Tab. 6). Následně bylo všech 12 eppendorfek odstředěno při 20 000 RCF po dobu 10 min. Poté bylo z každé eppendorfky odpipetováno 100 μl supernatantu do vialky obsahující 900 μl MF (Vzorek X 10x) a z každé vialky bylo dále odpipetováno 100 μl do jiné vialky obsahující 900 μl MF (Vzorek X 100x).

Tab. 6: Příprava vzorků různě zbarvených částí pryskyřice.

Zbarvení vzorku pryskyřice	Název vialky	Navážka [g]	Methanol [ml]
Téměř bezbarvá	A1	0,0100	1
	A2	0,0100	
	A3	0,0105	
Světle žlutá	B1	0,0107	
	B2	0,0100	
	B3	0,0100	
Hnědá	C1	0,0100	
	C2	0,0105	
	C3	0,0102	
Téměř černá	D1	0,0106	
	D2	0,0106	
	D3	0,0102	



Obr. 4: Vybrané vzorky pryskyřice.

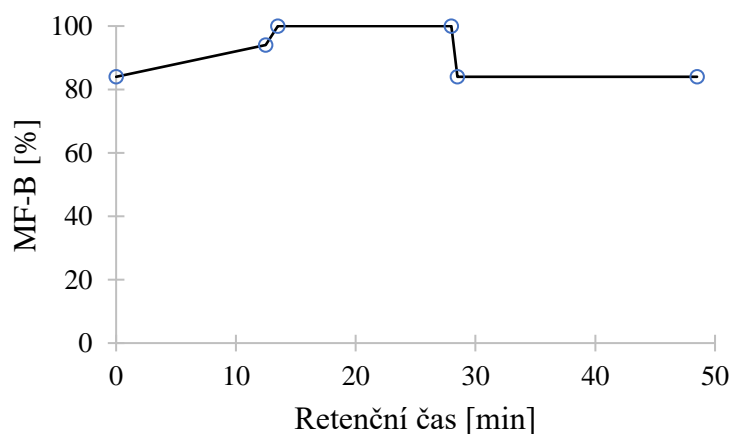
## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Stanovení KBA a AKBA dle podmínek Evropského lékopisu

Boswellové kyseliny KBA a AKBA byly vybrány na základě požadavků spolupracující společnosti 1. Aromaterapeutická KH a.s. Obsah těchto kyselin v pryskyřici indické (*Olibanum Indicum*) získávané z kadidlovníku pilovitého (*Boswellia serrata*) je totiž upravován v příslušné monografii Ph. Eur., stejně jako konkrétní požadavky na jejich analýzu pomocí kapalinové chromatografie. Tyto požadavky uvedené níže byly převzaty jednak pro účely analýzy bez dalších modifikací (dále jen „lékopisná metoda“) a dále jako výchozí podmínky pro optimalizační proces za účelem získání krátké a rychlé moderní HPLC metody s kvantifikací pomocí kalibrační křivky.

#### Podmínky lékopisné metody:

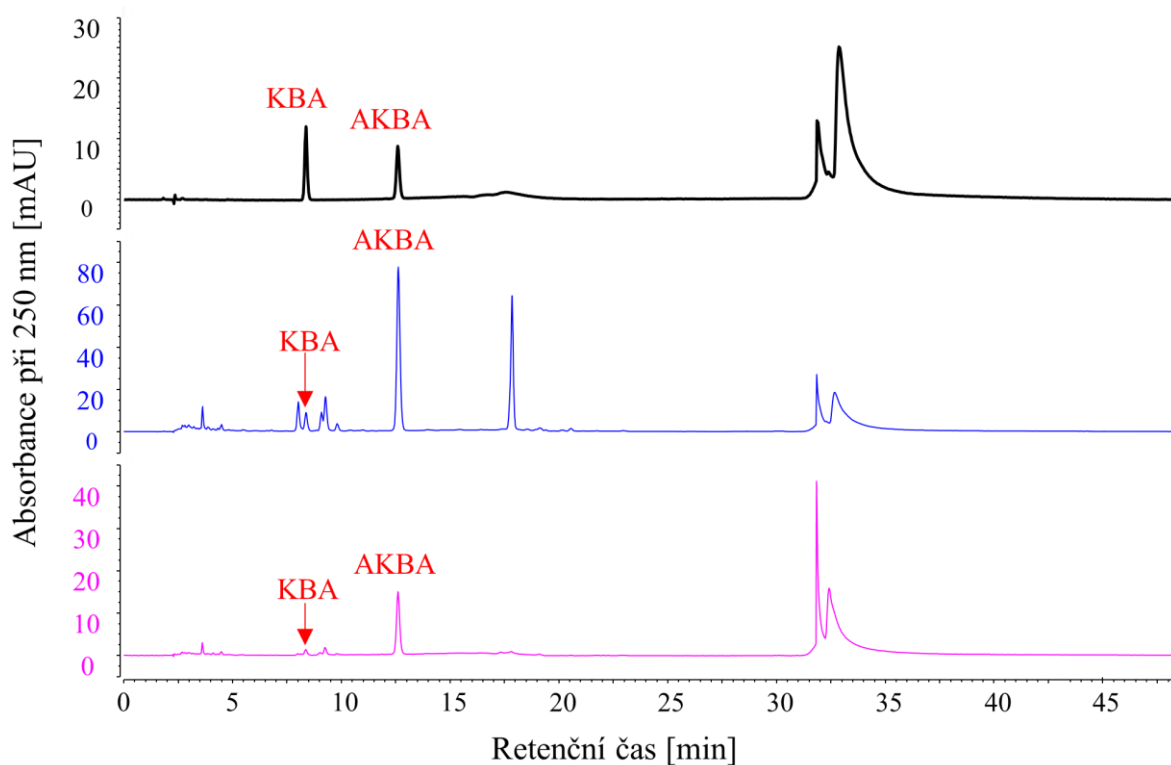
- Chromatografická kolona: Phenomenex LUNA C18; 250 × 4,6 mm; 5 μm
- Mobilní fáze - MF-A: 0,1 % obj. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve vodě  
- MF-B: 0,1 % obj. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v acetonitrilu
- Průtok mobilní fáze: 1 ml/min
- Teplota kolonového prostoru: 35 °C
- Objem nástřiku: 20 μl
- Tlak: 60 bar
- Gradientový program (viz. Obr. 5): 0 min (84 % MF-B); 12,5 min (94 % MF-B); 13,5–28 min (100 % MF-B); 28,5–48,5 min (84 % MF-B)
- Spektrofotometrická detekce: Absorbance při 250 nm
- Doba analýzy: 48,5 min



Obr. 5: Gradientový program – lékopisná metoda.



Požadavky na kvalitu separace jsou v Ph. Eur. rovněž uvedeny. V tomto případě jsou požadovány konkrétní retenční časy obou analytů (KBA ~ 8 min, AKBA ~ 12 min) a jejich minimální rozlišení ( $R_{KBA/AKBA} \geq 6,0$ ). Na Obr. 6 níže jsou uvedeny chromatogramy porovnávacího roztoku standardu (5 mg/l), vzorku pryskyřice zředěného 10x a vzorku tinktury zředěného 1 000x, přičemž Ph. Eur. upravuje pouze obsah obou sledovaných analytů v pryskyřici, a to vždy v množství min. 1,0 % hmot. Z Obr. 6 je patrné, že AKBA je od ostatních sloučenin z matrice chromatograficky oddělena naprosto dostatečně, přičemž KBA eluuje v těsné blízkosti neznámé látky s retenčním časem 8,0 min, ale rozlišení těchto 2 sloučenin dosahuje hodnoty 1,74, což je dostatečné pro účely kvantitativní chromatografické analýzy ( $R_{ij} \geq 1,5$ ). Experimentálně zjištěné hodnoty retenčních časů a rozlišení (Tab. 7) prokazatelně splňují lékopisné požadavky, a tak bylo možné přistoupit k validaci metody.



Obr. 6: Chromatogramy porovnávacího roztoku standardu (5 mg/l) (černý), pryskyřice 10x zř. (modrý) a tinktura 1 000x zř. (růžový) – lékopisná metoda.

Tab. 7: Retenční časy a rozlišení píků KBA a AKBA.

	Parametr	KBA	AKBA
<b>Retenční čas [min]</b>	Experimentálně zjištěno	8,4	12,6
	<b>Lékopisné kritérium</b>	<b>~ 8</b>	<b>~ 12</b>
<b>Rozlišení [1]</b>	Experimentálně zjištěno	17,6	
	<b>Lékopisné kritérium</b>	<b>≥ 6,0</b>	

Za výchozích podmínek lékopisné metody byly analyzovány vzorky dle Tab. 1 (každá vialka v 7 opakováních) včetně PR<sub>ST</sub> a jako slepý pokus byl změřen roztok MF. Způsob kvantifikace KBA a AKBA pomocí kapalinové chromatografie je v monografii pryskyřice indické (*Olibanum Indicum*) poměrně nezvyklý, protože využívá místo kalibrační křivky pouze 1 porovnávací roztok standardu o koncentraci 5 mg/l. Byla provedena základní validace lékopisné metody a výsledky validačních parametrů, jako je správnost a přesnost, jsou přehledně uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8: Správnost a přesnost metody.

<b>Analyt</b>	<b>Pryskyřice 10x</b>		<b>Tinktura 1 000x</b>	
	<b>Správnost</b>	<b>Přesnost</b>	<b>Správnost</b>	<b>Přesnost</b>
	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>
<b>KBA</b>	101	0,85	97	0,83
<b>AKBA</b>	114	1,1	98	1,1
<b>Kritéria přijatelnosti*</b>	<b>80–110</b>	<b>&lt; 7,3</b>	<b>80–110</b>	<b>&lt; 7,3</b>

\*dle AOAC [40].

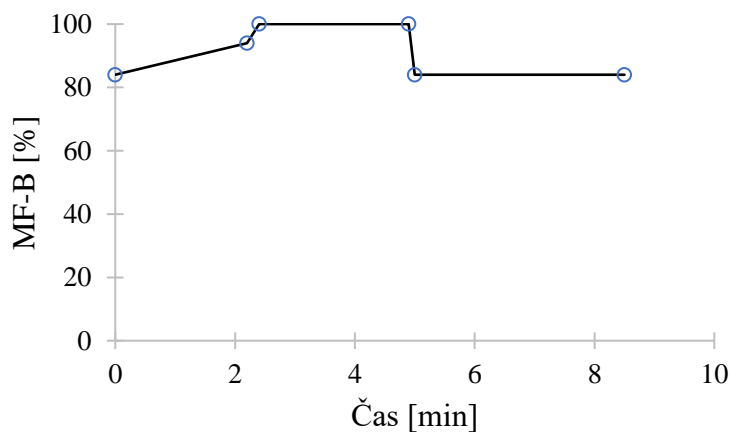
Důvodem nevyhovující hodnoty správnosti metody pro AKBA (114 %) v případě matrice pryskyřice bylo, že koncentrační úroveň v tomto vzorku byla přibližně 10x vyšší než koncentrační úroveň v porovnávacím roztoku standardu (5 mg/l). Při následné validaci nové metody (viz dále), která byla provedena metodou kalibrační křivky, bylo zjištěno, že se tato koncentrační úroveň nachází již mimo lineární oblast kalibrace. Lékopisná metoda využívající kvantifikaci pomocí porovnávacího roztoku standardu (5 mg/l) tedy není vhodná pro všechny typy vzorků. Měl by být definován koncentrační rozsah, ve kterém je daná metoda použitelná s přijatelnou správností a přesností. Tato negativa a rizika lékopisné metody eliminuje metoda využívající ke kvantifikaci kalibrační křivku.

## 4.2 Stanovení KBA a AKBA moderní LC

K vyvinutí nové metody stanovení KBA a AKBA bylo přistoupeno především z časově úsporných a ekonomických důvodů, protože lékopisná metoda je velice časově i finančně náročná. V současné době jsou již běžně dostupné výrazně kratší a užší kolony s malou velikostí částic a možností použití relativně vyšších průtoků MF apod., což umožňuje provedení rychlých chromatografických analýz bez ztráty na kvalitě separace.

Novými výchozími podmínkami pro moderní LC metodu, které byly určeny na základě přepočtení podmínek lékopisné metody dle kalkulatoru přenosu metody HPLC [41] na novou metodu využívající kolonu o jiných parametrech, byly:

- Chrom. kolona: Thermo ACCLAIM RSLC 120 C18; 100 × 3,0 mm; 2,2 μm
- Mobilní fáze - MF-A: 0,1 % obj. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve vodě  
- MF-B: 0,1 % obj. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v acetonitrilu
- Průtok mobilní fáze: 0,97 ml/min
- Teplota kolonového prostoru: 35 °C
- Objem nástřiku: 3,4 μl
- Tlak: 282 bar
- Gradientový program (viz. Obr. 7): 0 min (84 % MF-B); 2,2 min (94 % MF-B); 2,4–4,9 min (100 % MF-B); 5–8,5 min (84 % MF-B)
- Spektrofotometrická detekce: Absorbance při 250 nm
- Doba analýzy: 8,5 min



Obr. 7: Gradientový program – metoda po transferu.

Předmětem optimalizace chromatografických podmínek byly následující parametry: objem nástřiku vzorku, průtok mobilní fáze a doba kondicionace kolony. Optimalizace byla prováděna za účelem dosažení co nejkratší doby analýzy při současném vyhovění kritériu přijatelnosti týkající se minimálního chromatografického rozlišení  $R_{KBA/AKBA} \geq 6,0$  požadovaném v příslušné monografii Ph. Eur. Hodnoceny byly i další relevantní parametry jako symetrie píků nebo stabilita retenčních časů.

#### 4.2.1 Optimalizace nové metody

Nejprve byl optimalizován objem nástřiku za použití roztoku PR<sub>ST</sub> v rozsahu dle Tab. 9. Jako hodnotící parametr byl použit faktor symetrie (dříve nazýván faktor asymetrie) s kritériem přijatelnosti, které bylo rozšířeno z původního rozsahu 0,8–1,5 na aktuální rozsah 0,8–1,8 s platností od 1. 1. 2023 [42]. Objem nástřiku je obecně optimalizován za účelem dosažení co nejnižších mezí kvantifikace. V rámci této bakalářské práce sice nebylo nezbytné dosažení nižších mezí kvantifikace, nicméně pro zhodnocení robustnosti metody a případných možností navýšení objemu nástřiku v budoucnu bylo rozhodnuto provést optimalizaci tohoto parametru. Na základě získaných dat bylo zjištěno, že faktor symetrie píků obou analytů je dostatečný a bez významných trendů v celém testovaném rozsahu objemu nástřiku – od výchozích 3,4  $\mu$ l až do maximálních 100  $\mu$ l. S ohledem na rozměry kolony a další souvislosti (dostatečná odezva, poměrně vysoké koncentrace analytů aj.) byl zvolen nástřik 20  $\mu$ l, který se nachází uprostřed zvoleného rozsahu a zůstal tak zachován stejný nástřik jako u lékopisné metody.

Tab. 9: Optimalizace objemu nástřiku.

Nástřik [ $\mu$ l]	Faktor symetrie [1]	
	KBA	AKBA
3,4	1,21	1,23
5	1,23	1,19
10	1,23	1,20
20	1,22	1,22
50	1,16	1,22
100	1,20	1,25
<b>Kritérium přijatelnosti*</b>	<b>0,8–1,8</b>	

\*dle EDQM [42].

Po optimalizaci objemu nástřiku byl optimalizován průtok mobilní fáze za použití stejného roztoku PR<sub>ST</sub> v rozsahu dle Tab. 10. Průtok mobilní fáze byl optimalizován z důvodu snížení doby analýzy a s tím související úspore nákladů a zvýšení propustnosti vzorků v laboratoři při analýzách větších počtů vzorků. Hodnotícím parametrem při volbě průtoku mobilní fáze často bývá maximální možný tlak mobilní fáze aplikovatelný na celý HPLC systém, který je dán buď chromatografickou kolonou a/nebo chromatografem, podle toho, která hodnota je nižší. Dalším hodnotícím parametrem může být výškový ekvivalent teoretického patra. Moderní chromatografické kolony s velikostí částic cca  $\leq 3,0 \mu\text{m}$  již ale téměř neztrácejí na kvalitě separace vlivem vysokých průtoků, a tak byl hodnotícím parametrem zvolen pouze nejvyšší možný tlak aplikovatelný na použitou kolonu s kritériem přijatelnosti  $< 700 \text{ bar}$ , protože maximální aplikovatelný tlak na daný chromatograf činí  $1\,000 \text{ bar}$ . Na základě získaných dat bylo zjištěno, že i při průtoku  $2 \text{ ml/min}$  je tlak v chromatografu  $418 \text{ bar}$ . S ohledem na nezvratné stárnutí kolony projevující se postupným růstem tlaku při konstantních chromatografických podmínkách a provozní potřeby určité tlakové rezervy, byla jako optimální zvolena hodnota průtoku  $2 \text{ ml/min}$ .

Tab. 10: Optimalizace průtoku mobilní fáze.

<b>Průtok MF [ml/min]</b>	<b>Tlak [bar]</b>
<b>2</b>	418
<b>1,5</b>	313
<b>1</b>	211
<b>Kritérium přijatelnosti</b>	<b>&lt; 700</b>

Poté byla vyzkoušena i isokratická eluce místo gradientové, a to s obsahem MF-B  $84 \%$  a  $90 \%$ . Obě isokratické eluce však poskytovaly koeluuující píky, takže pro další práci byla ponechána gradientová eluce.

Posledním optimalizovaným parametrem byla doba kondicionace kolony, která byla provedena za použití roztoku pryskyřice  $10x + \text{spike } 5 \text{ mg/l}$  dle Tab. 11. Doba kondicionace kolony byla optimalizována za účelem snížení doby analýzy a s tím související úspore nákladů. Obecně platným pravidlem je, že doba kondicionace kolony by měla trvat minimálně takovou dobu, za kterou danou kolonou proteče desetinasobek mrtvého objemu kolony. Experimentálně však bývá zjištěno, že může být použita i kratší doba kondicionace bez negativního vlivu na chromatografickou analýzu. Míra kvality kondicionace může být určena stabilitou retenčních časů, faktorem symetrie a/nebo rozlišením. Pro účely této práce byla hodnotícím parametrem zvolena odchylka retenčního času analytu za dané doby kondicionace

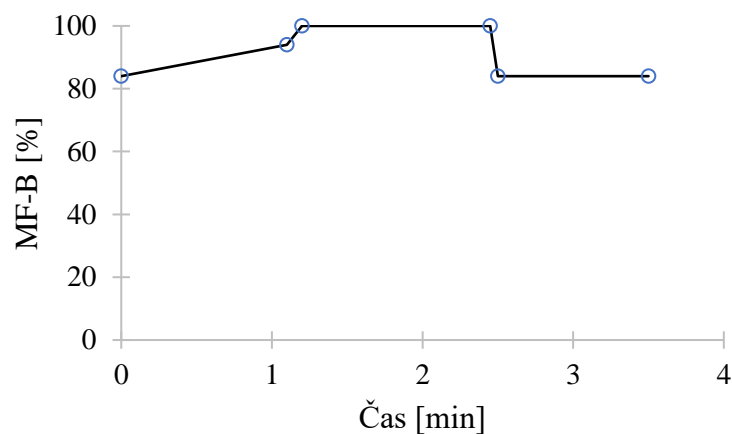
od retenčního času získaného za dostatečně dlouhé kondicionace kolony (5 min). Jako kritérium přijatelnosti byly zvoleny hodnoty opakovatelnosti retenčních časů ( $\pm 0,010$  min pro KBA, resp.  $\pm 0,013$  min pro AKBA) získané v rámci mnoha desítek validačních měření s dobou kondicionace trvající desetinásobek doby mrtvého času. Mrtvý čas kolony 0,28 min byl zjištěn experimentálně, a to analýzou 0,1 % obj. acetonu v MF. Na základě dat uvedených v Tab. 11 byla zvolena doba kondicionace kolony 1 min.

Tab. 11: Optimalizace doby kondicionace kolony.

Doba kondicionace [min]	Retenční čas [min]	
	KBA	AKBA
5	0,960	1,513
4	0,960	1,513
3	0,960	1,513
2	0,957	1,507
1	0,953	1,503
0,5	0,947	1,500
0	0,890	1,433
<b>Kritérium přijatelnosti</b>	<b><math>\pm 0,010</math></b>	<b><math>\pm 0,013</math></b>

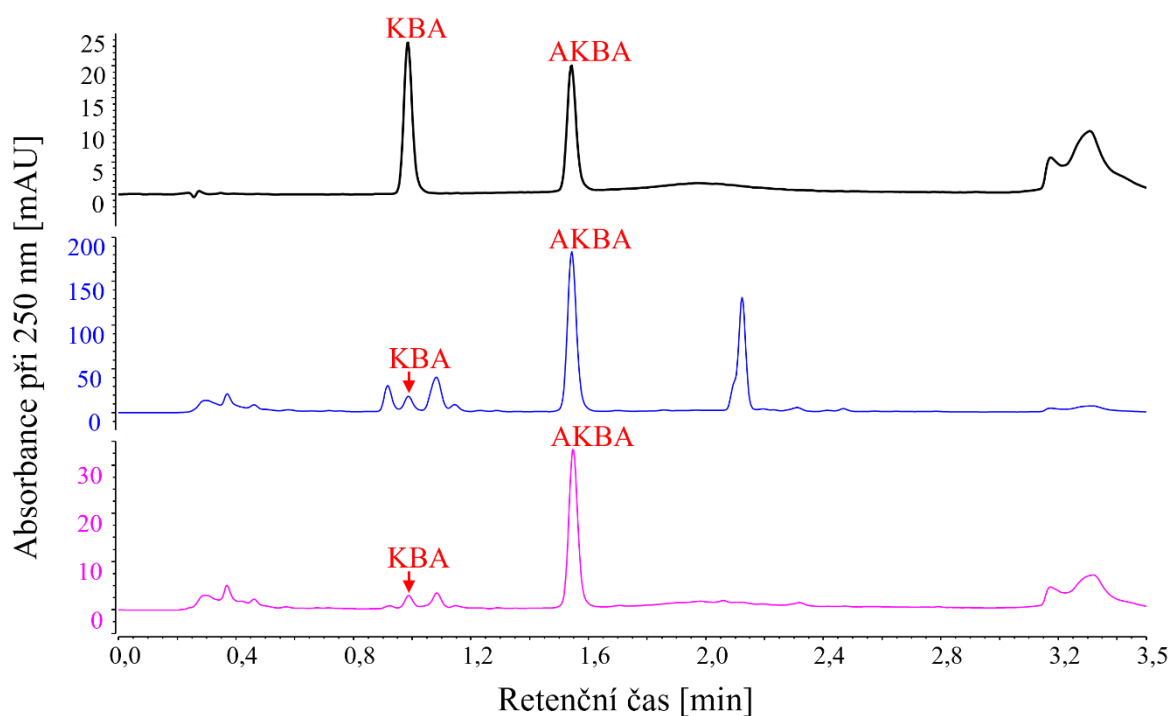
#### **Shrnutí parametrů nové metody po optimalizaci:**

- Chrom. kolona: Thermo ACCLAIM RSLC 120 C18; 100 × 3,0 mm; 2,2  $\mu\text{m}$
- Mobilní fáze - MF-A: 0,1 % obj.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ve vodě  
- MF-B: 0,1 % obj.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  v acetonitrilu
- Průtok mobilní fáze: 2 ml/min
- Teplota kolonového prostoru: 35 °C
- Objem nástřiku: 20  $\mu\text{l}$
- Tlak: 418 bar
- Gradientový program (viz. Obr. 8): 0 min (84 % MF-B); 1,1 min (94 % MF-B); 1,2–2,45 min (100 % MF-B); 2,5–3,5 min (84 % MF-B)
- Spektrofotometrická detekce: Absorbance při 250 nm
- Doba analýzy: 3,5 min



Obr. 8: Gradientový program – nová metoda.

Chromatogramy všech typů měřených vzorků obsahujících analyty, tzn. kalibračního roztoku (5 mg/l), vzorku pryskyřice zředěného 10x a vzorku tinktury zředěného 1 000x, jsou uvedeny na Obr. 9. Vizuálním porovnáním s chromatogramy získanými za podmínek lékopisné metody lze konstatovat, že v případě nové metody nedošlo k zásadním nežádoucím změnám separace. Na základě objektivního porovnání bylo zjištěno, že hodnota rozlišení poklesla z původních 17,6 (lékopisná metoda) na 10,1 (nová metoda), avšak i tato hodnota stále splňuje lékopisné kritérium  $\geq 6,0$ .



Obr. 9: Chromatogramy kalibračního roztoku (5 mg/l) (černý), pryskyřice 10x (modrý) a tinktury 1 000x (růžový) – nová metoda.

#### 4.2.2 Validace nové metody

Po úspěšné optimalizaci parametrů nové metody bylo přistoupeno k její validaci. Nejprve byla změřena orientační řada ředění připravená dle Tab. 2 při maximálním nástřiku 100  $\mu\text{l}$  za účelem zjištění instrumentálních mezí kvantifikace. Tyto meze byly určeny na základě poměru výšky píku (S) k šumu základní linie (N) jako odhad koncentrace analytu poskytující poměr  $S/N = 10$  a jejich hodnoty činí 26  $\mu\text{g/l}$  pro KBA a 33  $\mu\text{g/l}$  pro AKBA. S ohledem na výsledky orientační řady měření byla při nástřiku 20  $\mu\text{l}$  změřena testovací řada ředění připravena dle Tab. 3, aby byly zjištěny přibližné vhodné koncentrační rozsahy pro každý analyt. Nakonec byla změřena kalibrační řada připravená dle Tab. 4. za účelem vlastní validace linearity kalibračních křivek obou analytů. Na základě hodnocení koeficientu determinace s kritériem přijatelnosti  $R^2 \geq 0,9800$  a QC koeficientu s kritériem přijatelnosti  $QC \leq 5,00 \%$  bylo zjištěno, že kalibrační křivky obou analytů jsou dostatečně lineární v rozsahu 0,25–25  $\text{mg/l}$ . Obě kalibrační křivky poskytovaly shodný korelační koeficient 0,99997. V případě QC koeficientu bylo nepatrně lepší hodnoty dosaženo u KBA (0,98 %) než u AKBA (1,01 %), ale tento rozdíl je prakticky zanedbatelný. Primární data včetně detailního vyhodnocení pomocí programu EffiValidation 4 jsou uvedeny v kap. 8.1 Validace linearity kalibrační křivky – KBA, resp. v kap. 8.2 Validace linearity kalibrační křivky – AKBA.

Dále bylo provedeno hodnocení správnosti a přesnosti metody změřením obohacených i neobohacených vzorků pryskyřice a tinktury připravených dle Tab. 5. Výsledky těchto validačních parametrů i jejich kritéria přijatelnosti jsou uvedeny v Tab. 12. Všechny hodnoty obou validačních parametrů obou analytů splňují kritéria přijatelnosti. Nepatrně lepší výsledky validačních parametrů vykazovala KBA. Správnost vyjádřená jako výtěžnost v procentech se pro KBA pohybovala v rozmezí 100–103 %, ale pro AKBA se pohybovala v mírně širším rozmezí 100–106 %. Přesnost vyjádřená jako RSD v procentech se pro KBA i AKBA pohybovala pouze v desetínách procent. Stejný závěr lze nalézt i v práci [35], v níž se správnost pro KBA pohybovala v rozmezí 98–104 %, ale pro AKBA se pohybovala v širším rozmezí 94–106 %. Přesnost se však pohybovala pro KBA a AKBA shodně o 1 řád výše, tj. v jednotkách procent. Při hodnocení těchto validačních parametrů je však nutné brát zřetel na to, že v tomto případě není brána v potaz nehomogenita vzorku, která může být v případě pryskyřice velice rozdílná a může tak být významným faktorem ovlivňujícím nejen výsledek analýzy, ale i jeho nejistotu.



Tab. 12: Výsledky validačních parametrů – přesnost a správnost.

Analyt	Pryskyřice 10x		Pryskyřice 100x		Tinktura 1 000x		Tinktura 10 000x	
	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]
<b>KBA</b>	100	0,022	103	0,35	103	0,38	100	0,59
<b>AKBA</b>	Mimo rozsah kalibrace	Mimo rozsah kalibrace	106	0,48	100	0,12	102	0,57
<b>Kritéria*</b>	<b>80–110</b>	<b>&lt; 7,3</b>	<b>80–110</b>	<b>&lt; 7,3</b>	<b>80–110</b>	<b>&lt; 7,3</b>	<b>80–110</b>	<b>&lt; 7,3</b>

\*dle AOAC [40].

### 4.3 Porovnání lékopisné a nové metody

#### 4.3.1 Časová a finanční náročnost

Ze shrnutí obou metod uvedených v kap. 4.1 a kap. 4.2.1 vyplývá, že doba analýzy byla zkrácena z původních 48,5 min u lékopisné metody na pouhých 3,5 min za použití nově vyvinuté metody. Toto více než řádové zrychlení analýzy s sebou přináší řadu výhod, jako je velice výrazná úspora nákladů či možnost provedení více analýz na daném chromatografu za jednotku času. Konkrétní objektivní porovnání časové i finanční náročnosti obou metod je uvedeno v Tab. 13.

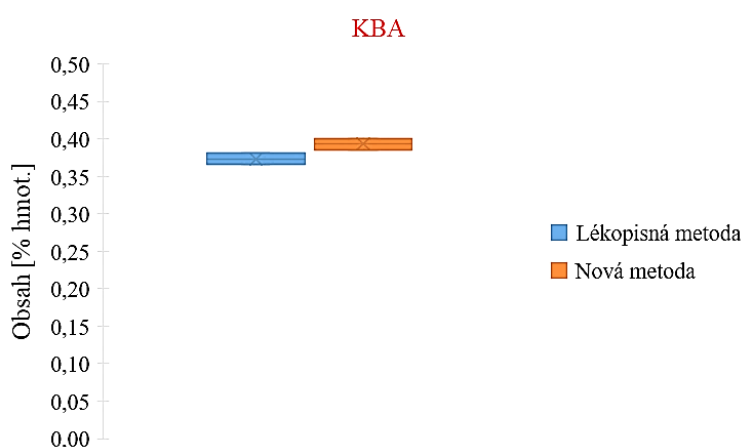
Tab. 13: Časová a finanční náročnost metod.

Metoda	Doba analýzy [min]	Spotřeba acetonitrilu [ml/analýza]	Cena acetonitrilu [Kč/ml]	Cena acetonitrilu na 1 analýzu [Kč]
<b>Lékopisná</b>	48,5	43,9	1,4	61,5
<b>Nová</b>	3,5	6,4		9,0

Z Tab. 13 vyplývá, že cena acetonitrilu na 1 analýzu lékopisnou metodou je 61,5 Kč a cena acetonitrilu na 1 analýzu novou metodou je 9,0 Kč. Nově vyvinutá metoda má tedy ve srovnání s lékopisnou metodou přibližně 7x nižší náklady na acetonitril a je také téměř 14x rychlejší, což má významný dopad na propustnost vzorků laboratoří.

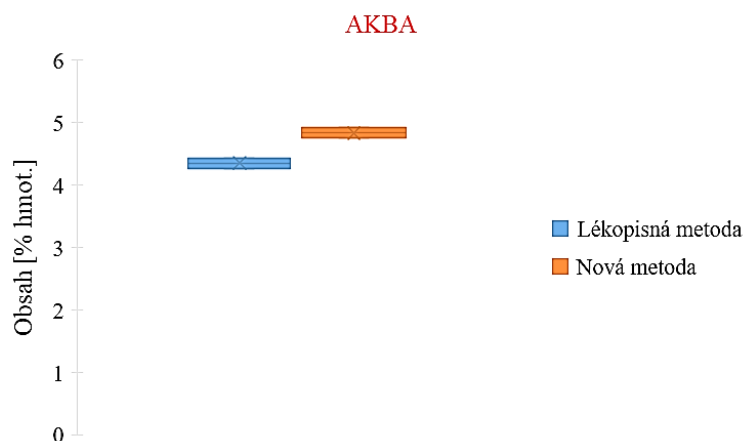
### 4.3.2 Výsledky metod

Z důvodu použití výrazně rozdílných podmínek analýzy (např. chromatografických kolon, gradientového programu, objemu nástřiku vzorku aj.) bylo provedeno i vzájemné porovnání výsledků obou metod. Z Obr. 10 a Obr. 11 je patrné, že střední hodnoty výsledků obou analytů v pryskyřici jsou si blízké, přičemž nová metoda poskytuje nepatrně vyšší výsledky – pro KBA +5,4 %, pro AKBA +11 %. V obou případech sice nedošlo k překryvu intervalů spolehlivosti na hladině významnosti 95 %, čímž nebyla objektivně prokázána shodnost výsledků, ale zároveň je nutné zohlednit i velice dlouhou dobu 4 měsíců mezi jednotlivými měřeními. Takže s ohledem na tuto skutečnost, je rozdíl pouze v řádu jednotek procent velice dobrým výsledkem.



Obr. 10: Stanovení obsahu KBA v pryskyřici lékopisnou metodou a novou metodou.

V případě KBA může být možným vysvětlením, vzhledem k velice blízkým středním hodnotám a úzkým intervalům spolehlivosti, nízký počet opakování (3) a pravděpodobně i možný vliv odparu rozpouštědla z důvodu dlouhého časového odstupu mezi měřeními.



Obr. 11: Stanovení obsahu AKBA v pryskyřici lékopisnou metodou a novou metodou.

Vyšší hodnota obsahu AKBA, získaná lékopisnou metodou využívající kvantifikaci za použití jediného porovnávacího roztoku, je s největší pravděpodobností způsobena příliš vysokou koncentrací analytu v roztoku vzorku. Postup přípravy vzorku k analýze lékopisnou metodou (viz kap. 4.1), stejně jako způsob kvantifikace, je ale závazný a nelze jej modifikovat. V případě nové metody využívající ke kvantifikaci metodu kalibrační křivky je možné jednak zvolit optimální zředění vzorku a zároveň je i provedeno hodnocení linearitu používaného koncentračního rozsahu. Na základě validace nové metody na daném chromatografu bylo totiž zjištěno, že odezva detektoru v této koncentrační oblasti již není lineární.

V následující Tab. 14 jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu boswellových kyselin KBA a AKBA v předložených vzorcích pryskyřice z kadidlovníku pravého (*Boswellia sacra*) a tinktury z ní připravené, a to jak pomocí lékopisné metody, tak pomocí nové metody.

Tab. 14: Stanovení obsahu boswellových kyselin KBA a AKBA.

Analyt	Požadavek Ph. Eur. <sup>A</sup> [% hmot.]	Pryskyřice <sup>B</sup>		Tinktura <sup>C</sup>	
		Lékopisná metoda [% hmot.]	Nová metoda [% hmot.]	Lékopisná metoda [% hmot.]	Nová metoda [% hmot.]
		<b>KBA</b>	≥ 1,0	0,3730 ± 0,0076	0,3932 ± 0,0074
<b>AKBA</b>	≥ 1,0	4,346 ± 0,079	4,830 ± 0,080	0,898 ± 0,015	0,954 ± 0,049

<sup>A</sup> Definováno pro pryskyřici indickou (*Olibanum indicum*) pocházející z kadidlovníku pilovitého (*Boswellia serrata*).

<sup>B</sup> Pryskyřice pocházející z kadidlovníku pravého (*Boswellia sacra*).

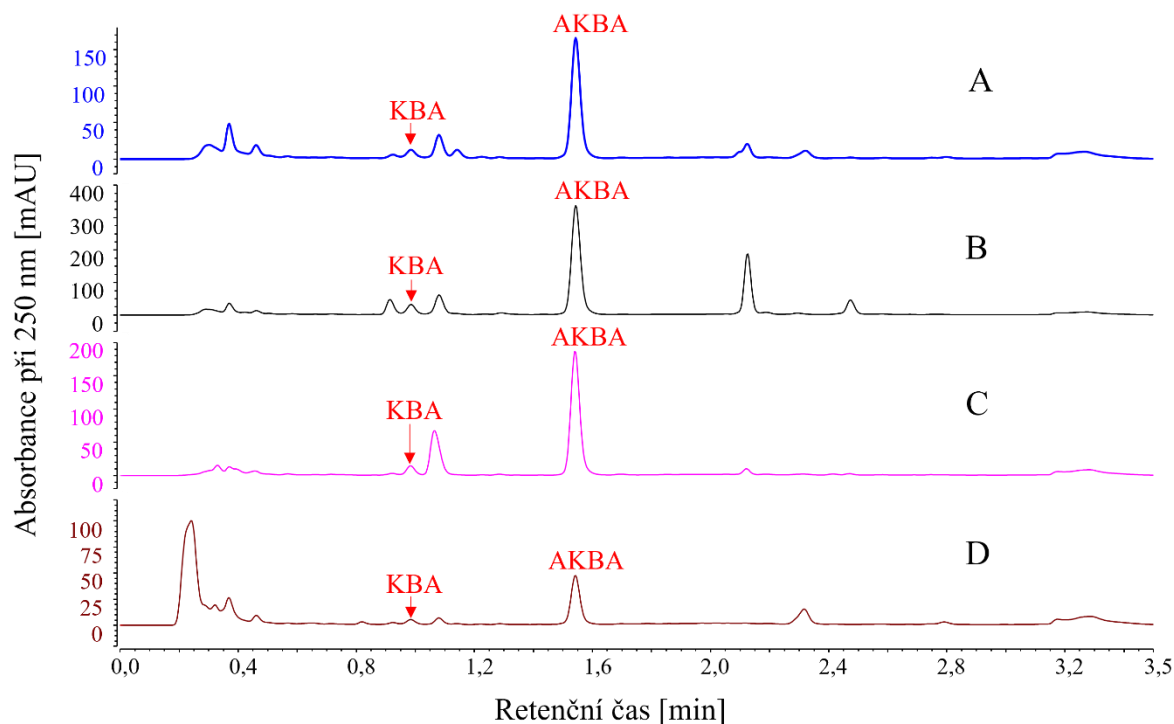
<sup>C</sup> Vyrobeno z pryskyřice pocházející z kadidlovníku pravého (*Boswellia sacra*).

Z Tab. 14 plyne, že obsah KBA v požadovaných vzorcích z pryskyřice i tinktury je přibližně o 1 řád nižší než obsah AKBA, přičemž obsah KBA v pryskyřici nedosahuje minimální požadované hodnoty uvedené v Ph. Eur. Při porovnávání těchto hodnot je však nutné brát v úvahu, že lékopisné požadavky se týkají pryskyřice indické (*Olibanum indicum*) z kadidlovníku pilovitého (*Boswellia serrata*), ale experimentálně zjištěné výsledky v této bakalářské práci se týkají vzorků pryskyřice z kadidlovníku pravého (*Boswellia sacra*). Z tohoto důvodu nelze objektivně hodnotit, zda je předložená pryskyřice kvalitní či nikoliv, protože obsah KBA a AKBA a jejich vzájemný poměr je druhově velice rozdílný, jak je uvedeno v poměrně rozsáhlé studii [33] a diskutováno v následujícím textu. V 11 vzorcích pryskyřic z kadidlovníku pravého (*Boswellia sacra*) bylo zjištěno, že obsah KBA se pohyboval od 0,0996 % hmot. do 0,2834 % hmot. a obsah AKBA se pohyboval od 2,1773 % hmot. do 4,1819 % hmot. V kontextu s hodnotami uvedenými v této studii [33] byl tedy předložený vzorek pryskyřice analyzovaný v rámci této bakalářské práce nejkvalitnější,

alespoň co se obsahu KBA a AKBA v pryskyřici tohoto druhu kadidlovníku týče. Zároveň jsou si v obou pracích velice blízké nejen absolutní hodnoty obsahu obou analytů, ale i jejich vzájemné poměry KBA:AKBA (přibližně 1:10). V uvedené publikaci bylo dále hodnoceno mj. i 7 různých vzorků pryskyřic z kadidlovníku pilovitého (*Boswellia serrata*), přičemž bylo zjištěno, že obsah KBA se pohyboval od 0,3091 % hmot. do 2,2290 % hmot. a obsah AKBA se pohyboval od 0,8068 % hmot. do 1,8962 % hmot. Zde je patrné, že v případě pryskyřice z tohoto druhu kadidlovníku jsou hodnoty obsahu obou analytů blízké hodnotám požadovaných Ph. Eur. a že i jejich vzájemný poměr je přibližně 1:1. Co se týče variability obsahu KBA a AKBA v pryskyřici v závislosti na druhu kadidlovníku, tak v uvedené publikaci byly nalezeny i další mnohem výraznější extrémy – např. v případě pryskyřice z kadidlovníku *Boswellia frereana* byl obsah KBA i AKBA vždy pod mezí kvantifikace metody (0,00026 % hmot., resp. 0,00015 % hmot.), a naopak nejvyšší průměrný obsah obou analytů byl zjištěn v případě pryskyřice z kadidlovníku *Boswellia dalzielli*, a to  $1,1794 \pm 0,2003$  % hmot., resp.  $6,4652 \pm 0,9913$  % hmot.

#### **4.4 Vliv barvy na obsah KBA a AKBA**

Jelikož je kvalita pryskyřice na trhu hodnocena zejména vizuálně pomocí jejího zbarvení [43], které tak určuje její cenu, byl pomocí nové metody hodnocen vliv zbarvení pryskyřice na obsah obou lékopisných boswellových kyselin KBA i AKBA. Výběr a postup přípravy vzorků k analýze je uveden výše (v kap. 3.3.6). Na Obr. 12 jsou zobrazeny chromatogramy 4 různých vzorků pryskyřice vybraných dle jejich zbarvení – od téměř bezbarvé (A) až do téměř černé (D) a v Tab. 15 jsou přehledně uvedeny výsledky této analýzy.

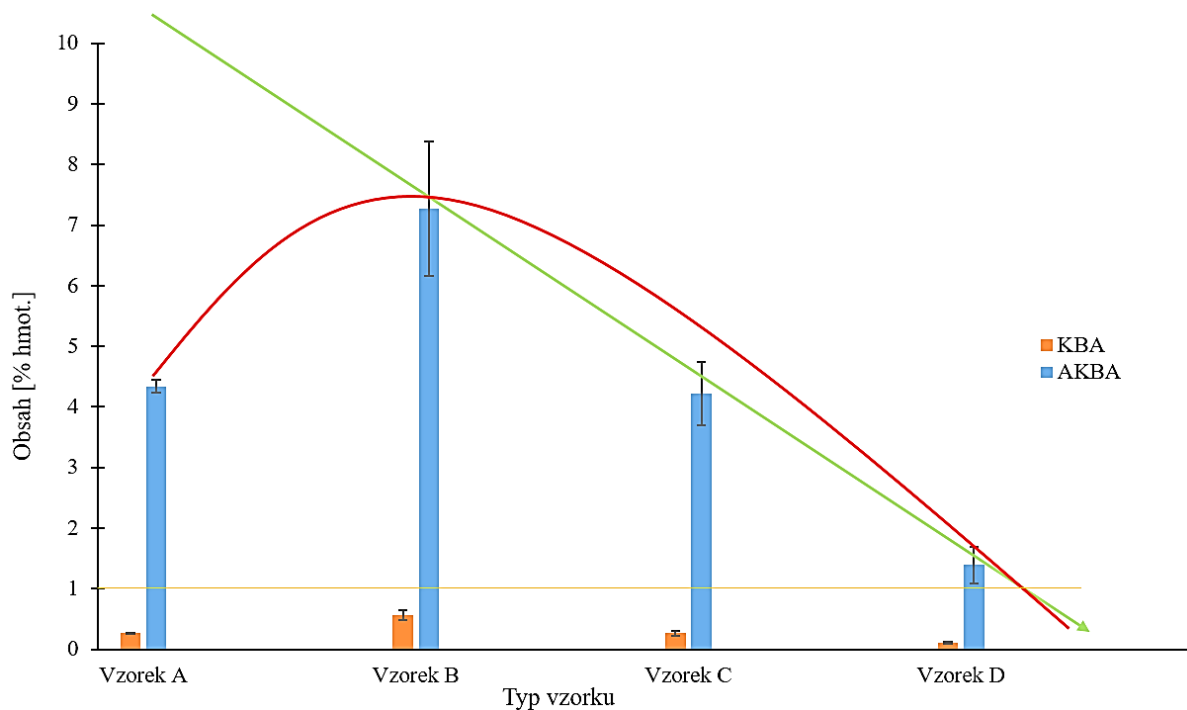


Obr. 12: Chromatogramy rozdílně zbarvených vzorků pryskyřice 10x.

Obecně se tvrdí, že nejsvětlejší pryskyřice je nejkvalitnější, avšak podle výsledků provedených analýz bylo toto obecné tvrzení vyvráceno, alespoň co se obou zástupců lékopisných boswellových kyselin týče. Z Tab. 15 a Obr. 13 vyplývá, že největší obsah KBA i AKBA byl zjištěn překvapivě ve vzorku B (světle žlutém), a nikoliv ve vzorku A (téměř bezbarvém). Pokud by tedy byl obchod s touto komoditou posuzován pouze/zejména podle obsahu lékopisných boswellových kyselin, tak by toto zjištění mohlo mít významný dopad na výběr různě zbarvených forem a jejich cenu.

Tab. 15: Obsah KBA a AKBA v rozdílně zbarvených částech pryskyřice.

Analyt	Zbarvení pryskyřice	Označení	Obsah [% hmot.]	RSD [%]
<b>KBA</b>	Téměř bezbarvá	A	$0,2681 \pm 0,0069$	2,6
	Světle žlutá	B	$0,567 \pm 0,087$	15
	Hnědá	C	$0,263 \pm 0,034$	13
	Téměř černá	D	$0,110 \pm 0,020$	18
<b>AKBA</b>	Téměř bezbarvá	A	$4,33 \pm 0,11$	2,4
	Světle žlutá	B	$7,3 \pm 1,1$	15
	Hnědá	C	$4,22 \pm 0,52$	12
	Téměř černá	D	$1,39 \pm 0,30$	22



Obr. 13: Vliv zbarvení pryskyřice na obsah KBA a AKBA – zelená (předpokládaný trend), červená (experimentálně zjištěný trend) a žlutá (minimální obsah požadovaný Ph. Eur.).

Vliv zbarvení pryskyřice byl zkoumán také v práci [43], kde bylo analyzováno 7 různě zbarvených vzorků pryskyřice získaných z 5 různých oblastí Indie. Tmavě zbarvená pryskyřice vykazovala nejnižší obsah boswellových kyselin (0,8 % hmot. KBA a 0,7 % hmot. AKBA) a naopak největší obsah vykazoval vzorek světle žlutý (8,4 % hmot. KBA a 5,9 % hmot. AKBA). Vzorek vykazující nejvyšší obsah sice byl z testovaných vzorků nejsvětější, ale podle vizuálního hodnocení fotografie v uvedené publikaci se barvou podobal vzorku B testovanému v rámci této bakalářské práce, takže co se týče hodnocení souvislosti mezi barvou a obsahem KBA a AKBA, byla potvrzena shoda se zjištěním v této bakalářské práci. V obou uvedených případech však převažuje obsah KBA, což je ale patrně zapříčiněno rozdílným původem analyzovaných vzorků v práci [43] (*Boswellia serrata*) a v této bakalářské práci (*Boswellia sacra*).

## 5 Závěr

Tato bakalářská práce, zabývající se stanovením obou lékopisných boswellových kyselin v pryskyřici kadidlovníku pravého (*Boswellia sacra*) a ve výrobcích z této pryskyřice, vznikla díky spolupráci se společností 1. Aromaterapeutická KH a.s. Ačkoliv je obsah těchto kyselin upraven v Evropském lékopisu v monografii pryskyřice indické (*Olibanum indicum*) získávané z kadidlovníku pilovitého (*Boswellia serrata*), nepatří tato analýza mezi běžně prováděné analýzy v České republice.

Úvodní část literární rešerše byla zaměřena na shrnutí základních informací o kadidlovníku, jeho pěstování, sběr pryskyřice, export a jeho význam pro člověka. Dále byla diskutována jedna z jeho nejdůležitějších složek, kterou představují farmakologicky i sensoricky významné boswellové kyseliny. Závěrečná část byla zaměřena na širší přehled možností stanovení boswellových kyselin pomocí TLC, GC či HPLC, zejména se zaměřením na obě lékopisem požadované kyseliny KBA a AKBA.

V experimentální části byla nejprve úspěšně zavedena a zvalidována lékopisná chromatografická metoda využívající ke kvantifikaci pouze 1 porovnávací roztok standardu o koncentraci 5 mg/l. Správnost této metody se pohybovala v rozmezí 97–114 % a přesnost v rozmezí 0,83–1,1 %. Vzhledem k časové náročnosti (48,5 min) této lékopisné metody a velkému prostoru pro její optimalizaci, byla vyvinuta nová, výrazně rychlejší (14x) a taktéž výrazně levnější (7x) metoda využívající mnohem účinnější moderní chromatografickou kolonu. I tato nová metoda byla úspěšně zvalidována a následně použita ke stanovení obsahu KBA a AKBA v požadované pryskyřici i tinktuře. Kvantifikace však byla, na rozdíl od lékopisné metody, již provedena pomocí metody kalibrační křivky. Rozsah nové metody činil 0,25–25 mg/l, správnost se pohybovala v rozmezí 100–106 % a přesnost v rozmezí 0,022–0,59 %. Za použití obou těchto metod bylo zjištěno, že obsah KBA (0,37 resp. 0,39 % hmot.) v předloženém vzorku pryskyřice nesplňuje požadavek ( $\geq 1$  % hmot.) uvedený v lékopisu, přičemž v případě AKBA (4,3 resp. 4,8 % hmot.) bylo toto kritérium s dostatečnou rezervou splněno. V tomto případě je však zároveň nutné zohlednit skutečnost, že lékopisné požadavky se týkají pryskyřice z kadidlovníku pilovitého (*Boswellia serrata*), ale experimentálně zjištěné výsledky v této bakalářské práci se týkají vzorků pryskyřice z kadidlovníku pravého (*Boswellia sacra*). Při porovnání s hodnotami uvedenými např. ve studii [33] byl předložený vzorek pryskyřice analyzovaný v rámci této bakalářské práce nejkvalitnější, alespoň co se obsahu KBA a AKBA týče.

Vzhledem ke skutečnosti, že pryskyřice je na trhu hodnocena právě podle jejího zbarvení, bylo na závěr provedeno hodnocení souvislosti její barvy s obsahem KBA a AKBA. Pro tyto účely byly vybrány 4 různě zbarvené vzorky, a to od téměř bezbarvého do téměř černého. Získané výsledky byly poměrně překvapivé, protože nejvyšší obsah těchto vybraných boswellových kyselin nevykazoval téměř bezbarvý vzorek (0,27 % hmot. KBA a 4,3 % hmot. AKBA), jak bylo na základě obecného tvrzení původně předpokládáno, ale vzorek světle žlutý (0,57 % hmot. KBA a 7,3 % hmot. AKBA). Díky výsledkům těchto analýz tak bylo vyvráceno obecné tvrzení, že nejsvětější pryskyřice je nejkvalitnější, alespoň co se lékopisných boswellových kyseliny týče, jelikož světle žlutý vzorek vykazoval přibližně 2x vyšší obsah vybraných boswellových kyselin než vzorek téměř bezbarvý.

S ohledem na poměrně vysokou variabilitu složení vzorků tohoto typu i překvapivá zjištění v rámci této bakalářské práce by mohly být další směry výzkumu orientovány či detailněji zaměřeny např. na hodnocení pryskyřice pocházející z různých druhů kadidlovníků z různých geografických míst a/nebo od různých dodavatelů. Dále by mohl být zkoumán vliv podmínek při uchovávání pryskyřice při skladování nebo dopravě, postupech jejího zpracování nebo pro charakterizaci různých výrobků na trhu.



## 6 Seznam použité literatury

- [1] ENGELS, Gayle. *Frankincense* [online]. [vid. 2023-08-09]. Dostupné z: <https://www.herbalgram.org/resources/herbalgram/issues/88/table-of-contents/herbalgram-88-herb-profile-frankincense/>
- [2] RASHAN, Luay, F. HAKKIM, Mohammed IDREES, Musthafa ESSA, Thirunavukkarasu VELUSAMY, Mohammed AL-BALOSHI, Buthaina AL-BALUSHI, Ali AL JABRI, Mohammed AL-RIZEIQI, Gilles GUILLEMIN a Sidqi Syed ABDO HASSON. Boswellia Gum Resin and Essential Oils: Potential Health Benefits - An Evidence Based Review. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases* [online]. 2019, **9**(2), 53–71 [vid. 2023-11-25]. ISSN 22312722. Dostupné z: doi:10.4103/IJNPND.IJNPND\_11\_19
- [3] FUNGUS, Albicans. Effective of Watery and Alcoholic Extract of Frankincense on the Candida Effective of Watery and Alcoholic Extract of Frankincense on the Candida. 2018, (September).
- [4] KHALIFA, Shaden A.M., Safaa M. KOTB, Shaden H. EL-SEEDI, Lutfun NAHAR, Satyajit D. SARKER, Zhiming GUO, Xiaobo ZOU, Syed G. MUSHARRAF, Amir Reza JASSBI, Ming DU a Hesham R. EL-SEEDI. Frankincense of *Boswellia sacra*: Traditional and modern applied uses, pharmacological activities, and clinical trials. *Industrial Crops and Products* [online]. 2023, **203**, 117106 [vid. 2023-10-27]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2023.117106
- [5] ESHETE, Abeje, Frank J. STERCK a Frans BONGERS. Frankincense production is determined by tree size and tapping frequency and intensity. *Forest Ecology and Management* [online]. 2012, **274**, 136–142 [vid. 2023-10-29]. ISSN 0378-1127. Dostupné z: doi:10.1016/J.FORECO.2012.02.024
- [6] AL-YASIRY, Ali Ridha Mustafa a Bożena KICZOROWSKA. Frankincense – therapeutic properties Kadzidłowiec – właściwości terapeutyczne [online]. 2016, (June). Dostupné z: doi:10.5604/17322693.1200553
- [7] SHAH, Bhahwal Ali, Ghulam Nabi QAZI a Subhash Chandra TANEJA. Boswellic acids: a group of medicinally important compounds. *Natural Product Reports* [online]. 2008, **26**(1), 72–89 [vid. 2023-09-05]. ISSN 02650568. Dostupné z: doi:10.1039/B809437N
- [8] MAKSIMOVIĆ, Zoran. On frankincense (*Olibanum, boswellia* spp., *bursaceae*). *Arhiv za Farmaciju* [online]. 2021, **71**(1), 1–21. ISSN 00041963. Dostupné z: doi:10.5937/ARHFARM71-29280
- [9] SEKU, Kondaiah, Syed Sulaiman HUSSAINI, Mushtaq HUSSAIN, Mohd Asim SIDDIQUI, Narasimha GOLLA, D. RAVINDER a Bhagavanth REDDY G. Synthesis of Frankincense gum stabilized AgNPs by microwave irradiation and their catalytic, antioxidant, and antibacterial properties. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* [online]. 2022, **140**, 115169 [vid. 2023-10-28]. ISSN 1386-9477. Dostupné z: doi:10.1016/J.PHYSE.2022.115169

- [10] *Burseraceae | Description, Characteristics, Family, Major Species, & Facts | Britannica* [online]. [vid. 2023-10-27]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/plant/Burseraceae#ref278480>
- [11] SCHMIECH, Michael, Judith ULRICH, Sophia Johanna LANG, Berthold BÜCHELE, Christian PAETZ, Alexis St GELAIS, Tatiana SYROVETS a Thomas SIMMET. 11 - Keto -  $\alpha$  - Boswellic Acid , a Novel Triterpenoid from *Boswellia* spp . with Chemotaxonomic Potential and Antitumor Activity against Triple - Negative Breast Cancer Cells. 2021, 25–30.
- [12] KARAS, Lukáš, Kateřina HOUŠKOVÁ a Hana HABROVÁ. Germination parameters of *Boswellia sacra* Flueck. seeds and the possibility of their improvement by sorting. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* [online]. 2023, **37**, 100513 [vid. 2023-10-27]. ISSN 2214-7861. Dostupné z: [doi:10.1016/J.JARMAP.2023.100513](https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2023.100513)
- [13] BERHANU, Yonas, Pál VEDELD, Ayana ANGASSA a Jens B. AUNE. The contribution of frankincense to the agro-pastoral household economy and its potential for commercialization - A case from Borana, southern Ethiopia. *Journal of Arid Environments* [online]. 2021, **186**, 104423 [vid. 2023-10-28]. ISSN 0140-1963. Dostupné z: [doi:10.1016/J.JARIDENV.2020.104423](https://doi.org/10.1016/J.JARIDENV.2020.104423)
- [14] *Empowering Omani Frankincense Producers* [online]. 2023 [vid. 2024-03-22]. Dostupné z: <https://www.wipo.int/pressroom/en/stories/oman-2023-frankincense.html>
- [15] *Toxicology - Prof. RNDr. Jiří Patočka, DrSc - Kadidlo a kyselina boswellová* [online]. 2008 [vid. 2023-08-31]. Dostupné z: <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=205>
- [16] *Wadi Dawkah – Natural Park of Frankincense Trees near Salalah - in 2023* [online]. [vid. 2023-08-30]. Dostupné z: <https://www.beautifulsalalah.com/wadi-dawkah-natural-park-of-frankincense-trees-near-salalah/>
- [17] AL KINDI, Mohammed, Vincent CHARPENTIER, Maria PIA MAIORANO, Maya MUSA, Alexia PAVAN, Alan HEWARD, Jérémie VOSGES, Grégor MARCHAND a Martin PICKFORD. Neolithic long-distance exchanges in Southern Arabia: A supposed road for the ‘Jade’ axes. *Journal of Archaeological Science: Reports* [online]. 2021, **39**, 103116 [vid. 2023-10-28]. ISSN 2352-409X. Dostupné z: [doi:10.1016/J.JASREP.2021.103116](https://doi.org/10.1016/J.JASREP.2021.103116)
- [18] *Kadidlo - pouštní města v Negevu - Centrum světového dědictví UNESCO* [online]. [vid. 2023-10-29]. Dostupné z: <https://whc.unesco.org/en/list/1107/>
- [19] *Země kadidla - Centrum světového dědictví UNESCO* [online]. [vid. 2023-10-28]. Dostupné z: <https://whc.unesco.org/en/list/1010/>
- [20] *Analytical Standards of Boswellic Acids and Their Separation* [online]. [vid. 2023-08-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/boswellic-acids>
- [21] ALMEIDA-DA-SILVA, Cássio Luiz Coutinho, Nallusamy SIVAKUMAR, Homer ASADI, Anna CHANG-CHIEN, M. Walid QORONFLEH, David M. OJCIUS a Musthafa Mohamed ESSA. Effects of Frankincense Compounds on Infection,

- Inflammation, and Oral Health. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 4174 [online]. 2022, 27(13), 4174 [vid. 2023-08-30]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES27134174
- [22] FERRARA, T., G. DE VINCENTIIS a F. DI PIERRO. Functional study on Boswellia phytosome as complementary intervention in asthmatic patients. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015, 19(19), 3757–3762. ISSN 11283602.
- [23] ZHENG, Piao, Zhen HUANG, Dong Chang TONG, Qing ZHOU, Sha TIAN, Bo Wei CHEN, Di Min NING, Yin Mei GUO, Wen Hao ZHU, Yan LONG, Wei XIAO, Zhe DENG, Yi Chen LEI a Xue Fei TIAN. Frankincense myrrh attenuates hepatocellular carcinoma by regulating tumor blood vessel development through multiple epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathways. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* [online]. 2022, 14(2), 450 [vid. 2023-08-31]. ISSN 19485204. Dostupné z: doi:10.4251/WJGO.V14.I2.450
- [24] ROY, Nand Kishor, Dey PARAMA, Kishore BANIK, Devivasha BORDOLOI, Amrita Khwairakpam DEVI, Krishan Kumar THAKUR, Ganesan PADMAVATHI, Mehdi SHAKIBAEI, Lu FAN, Gautam SETHI a Ajaikumar B. KUNNUMAKKARA. An Update on Pharmacological Potential of Boswellic Acids against Chronic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 4101 [online]. 2019, 20(17), 4101. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS20174101
- [25] GILBERT, Nathaniel C, Jana GERSTMEIER, Erin E SCHEXNAYDRE, Friedemann BÖRNER, Ulrike GARSCHA, David B NEAU, Oliver WERZ a Marcia E NEWCOMER. Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. *Nature Chemical Biology* [online]. 2020, 16(7), 783–790. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/s41589-020-0544-7
- [26] LANGMEAD, L. a D. S. RAMPTON. Review article: complementary and alternative therapies for inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2006, 23(3), 341–349 [vid. 2023-08-30]. ISSN 1365-2036. Dostupné z: doi:10.1111/J.1365-2036.2006.02761.X
- [27] POUŠKOVÁ, Jitka. UNIVERZITA KARLOVA FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH METOD PRO STANOVENÍ BOSWELLOVÝCH KYSELIN-REŠERŠNÍ PRÁCE BAKALÁŘSKÁ PRÁCE [online]. 2017 [vid. 2024-01-27]. Dostupné z: [https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/85328/BPTX\\_2016\\_2\\_11160\\_0\\_434226\\_0\\_169173.pdf?sequence=1](https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/85328/BPTX_2016_2_11160_0_434226_0_169173.pdf?sequence=1)
- [28] MENDELOVA UNIVERZITA. Kapalínová chromatografie s různými typy detekce pro analýzu biologicky významných látek. *NanoBioMetalNet CZ.1.07/2.4.00/31.0023* [online]. 2017, 18. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-pumucky/UP\\_6\\_Kapalinova\\_chromatografie\\_s\\_ruznymi\\_typy\\_detekce\\_pro\\_analyzu\\_biologicky\\_vyznamnych\\_latek.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-pumucky/UP_6_Kapalinova_chromatografie_s_ruznymi_typy_detekce_pro_analyzu_biologicky_vyznamnych_latek.pdf)
- [29] PAUL, Michael, Gerit BRÜNING, Jochen BERGMANN a Johann JAUCH. A thin-layer chromatography method for the identification of three different olibanum resins (Boswellia serrata, Boswellia papyrifera and Boswellia carterii, respectively, Boswellia

- sacra). *Phytochemical Analysis* [online]. 2012, **23**(2), 184–189. ISSN 10991565. Dostupné z: doi:10.1002/pca.1341
- [30] ARSHIYA, Ms, Zulfeen MOHD, Mohammed Shakir GHOUSE a Syed Kumarul ISLAM. Isolation and Identification of Boswellic Acids by Modern Analytical Techniques [online]. 2021, **11**(2), 98–112. Dostupné z: doi:10.52711/2231-5675.2021.00018
- [31] MEHTA, Meenu, Saurabh SATIJA a Munish GARG. Comparison between HPLC and HPTLC densitometry for the determination of 11-keto- $\beta$ -boswellic acid and 3-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid from *Boswellia serrata* extract. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* [online]. 2016, **50**(3), 418–423. ISSN 00195464. Dostupné z: doi:10.5530/ijper.50.3.15
- [32] GANZERA, Markus a Ikhlas A KHAN. A Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Boswellic Acids in *Boswellia serrata*. 2001, **67**, 778–780.
- [33] SCHMIECH, Michael, Sophia J. LANG, Katharina WERNER, Luay J. RASHAN, Tatiana SYROVETS a Thomas SIMMET. Comparative analysis of pentacyclic triterpenic acid compositions in oleogum resins of different *Boswellia* species and their in vitro cytotoxicity against treatment-resistant human breast cancer cells. *Molecules* [online]. 2019, **24**(11). ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24112153
- [34] MANNINO, Giuseppe, Andrea OCCHIPINTI a Massimo E. MAFFEI. Quantitative Determination of 3-O-Acetyl-11-Keto- $\beta$ -Boswellic Acid (AKBA) and Other Boswellic Acids in *Boswellia sacra* Flueck (syn. *B. carteri* Birdw) and *Boswellia serrata* Roxb. *Molecules* [online]. 2016, **21**(10) [vid. 2024-01-31]. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES21101329
- [35] SHAH, Shailesh A, Ishwarsinh S RATHOD, Bhanubhai N SUHAGIA, Saurabh S PANDYA a Vijay K PARMAR. A Simple High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Estimation of Boswellic Acids from the Market Formulations Containing *Boswellia serrata* Extract. 2008, **46**(September), 735–738.
- [36] GERBETH, Kathleen, Juergen MEINS, Simon KIRSTE, Felix MOMM, Manfred SCHUBERT-ZSILAVECZ a Mona ABDEL-TAWAB. Determination of major boswellic acids in plasma by high-pressure liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2011, **56**(5), 998–1005 [vid. 2024-01-31]. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/J.JPBA.2011.07.026
- [37] DECARLO, Anjanette, Stephen JOHNSON, Noura S DOSOKY a William N SETZER. Chemical Composition of the Oleogum Resin Essential Oils of *Boswellia dalzielii* from Burkina Faso. 2019, 1–14.
- [38] MATHE, Carole, Gérald CULIOLI, Paul ARCHIER a Cathy VIEILLESCHAZES. Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1023**(2), 277–285 [vid. 2024-01-31]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHROMA.2003.10.016

- [39] GUTA, Mulugeta, Huijun TAN a Yaping ZHAO. Selectively extracting oleoresin from *Boswellia papyrifera frankincense* resin by sub- and supercritical CO<sub>2</sub> processes. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2024, **205**, 106135 [vid. 2024-01-31]. ISSN 0896-8446. Dostupné z: doi:10.1016/J.SUPFLU.2023.106135
- [40] *About AOAC INTERNATIONAL - AOAC INTERNATIONAL* [online]. [vid. 2024-02-22]. Dostupné z: <https://www.aoac.org/about-aoac-international/>
- [41] *HPLC Method Transfer Calculator* [online]. [vid. 2024-02-22]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/support/calculators-and-apps/hplc-method-transfer-calculator#gradient>
- [42] *European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare - European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare* [online]. [vid. 2024-02-22]. Dostupné z: <https://www.edqm.eu/en/>
- [43] GUPTA, Madhuri, Shilpi SINGH, Alka KURMI, Suaib LUQMAN, Dharmendra SAIKIA, Moni THOMAS a Prasant Kumar ROUT. Correlation of boswellic acids with antiproliferative, antioxidant and antimicrobial activities of topographically collected *Boswellia serrata* oleo-gum-resin. *Phytomedicine Plus* [online]. 2022, **2**(3), 100289. ISSN 26670313. Dostupné z: doi:10.1016/j.phyplu.2022.100289

## 7 Seznam symbolů a zkratk

5-LOX – 5-lipoxygenáza

ABA – acetylované  $\alpha$  a  $\beta$  boswellové kyseliny

AKBA – 3-o-acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina

AOAC – Asociace oficiální analytické spolupráce

BA –  $\alpha$  a  $\beta$  boswellové kyseliny

C18 – oktadecylsilikagel

CAS – mezinárodně uznávané registrační číslo chemických látek definované společností  
Chemical Abstract service

EDQM – Evropské ředitelství pro kvalitu léčiv a zdravotní péče

ESI – ionizace elektrosprejem

GC – plynová chromatografie

GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

GC-FID – plynová chromatografie s plamenově-ionizační detekcí

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-DAD-ESI-MS/MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodového  
pole spojená s elektrosprejovou ionizací a tandemovou hmotnostní spektrometrií

HPLC-PDA – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodového pole

HPTLC – vysokoúčinná tenkovrstvá kapalinová chromatografie

KBA – 11-keto- $\beta$ -boswellová kyselina

LC – kapalinová chromatografie

MF – mobilní fáze

MS – hmotnostní spektrometrie

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

Ph. Eur. – Evropský lékopis

PR – pracovní roztok

RCF – relativní centrifugační síla

RSD – relativní směrodatná odchylka

SD – směrodatná odchylka

SF – stacionární fáze

SR – směsný roztok

ST – standard

TLC – tenkovrstvá chromatografie

UNESCO – Organizace spojených národů pro výchovu, vědu a kulturu

USD – americký dolar


UV – spektrofotometrická detekce v ultrafialové oblasti

UV/VIS – spektrofotometrická detekce v ultrafialové a viditelné oblasti

ZR – zásobní roztok

## 8 Přílohy

### 8.1 Validace linearity kalibrační křivky KBA - část 1/2

	Linearita - Korelační a QC koeficient - Boswellic acids	EffiChem s.r.o. Purkyňova 649/127 Brno
	<b>KBA</b>	

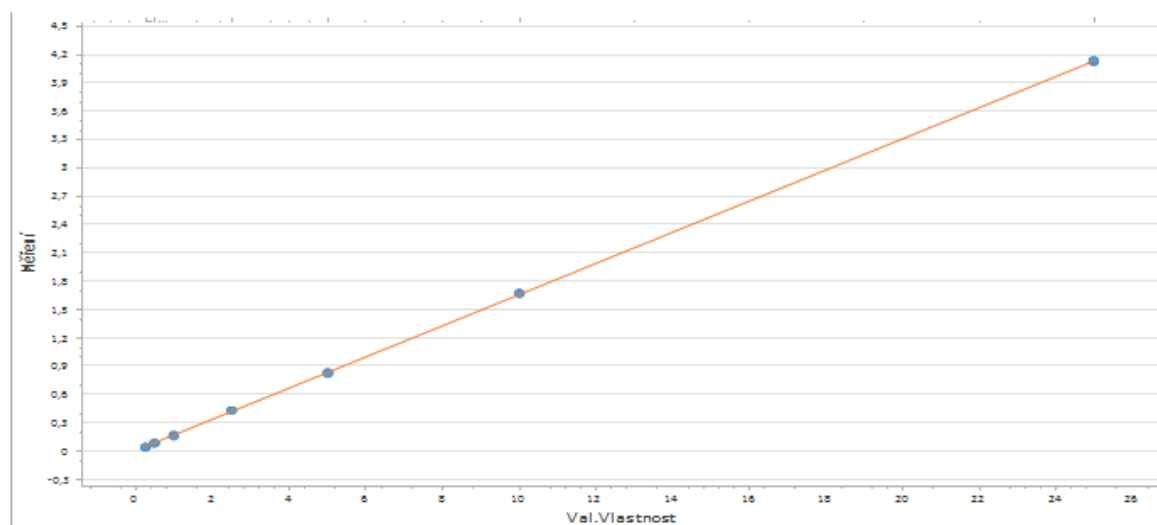
#### Vstupní data

Popis	Val.Vlastnost [mg/l]	Měření 1 [mAU.min]
ST 0,250 mg/l a	0,25	0,0429
ST 0,250 mg/l b	0,25	0,0451
ST 0,250 mg/l c	0,25	0,0439
ST 0,500 mg/l a	0,5	0,0823
ST 0,500 mg/l b	0,5	0,0871
ST 0,500 mg/l c	0,5	0,0905
ST 1,000 mg/l a	1	0,1693
ST 1,000 mg/l b	1	0,1741
ST 1,000 mg/l c	1	0,1619
ST 2,500 mg/l a	2,5	0,4318
ST 2,500 mg/l b	2,5	0,43
ST 2,500 mg/l c	2,5	0,4338
ST 5,000 mg/l a	5	0,8409
ST 5,000 mg/l b	5	0,8276
ST 5,000 mg/l c	5	0,8203
ST 10,000 mg/l a	10	1,6776
ST 10,000 mg/l b	10	1,6762
ST 10,000 mg/l c	10	1,6683
ST 25,000 mg/l a	25	4,1188
ST 25,000 mg/l b	25	4,1206
ST 25,000 mg/l c	25	4,1367

#### Vyhodnocení

Vypočteny R	R <sup>2</sup>	R k testování	Vypočteny QC	QC k testování	Max. hodnota pro úsek (absolutní)	Vypočtená hodnota úseku	Hypotéza
1	0,9999	0,99	0,9807	5	20	0,009	Přijata

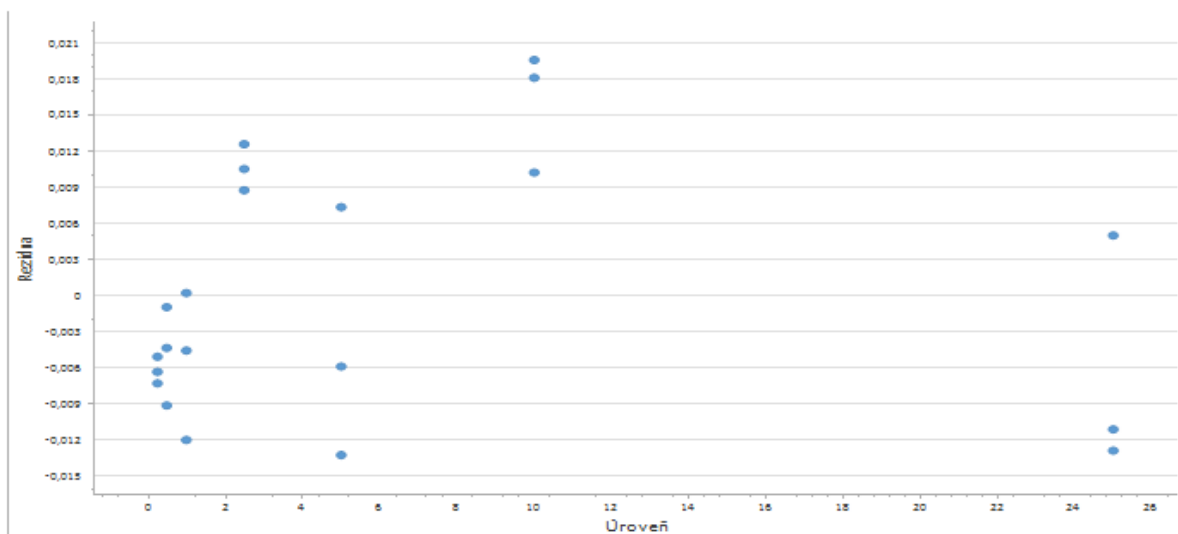
#### Graf





## Validace linearity kalibrační křivky KBA - část 2/2

### Graf reziduí



**Závěr: Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního a QC koeficientu.**

Vypočtená hodnota úseku pro danou přímku vyhovuje kritériu přijatelnosti pro úsek.

Rovnice přímky:  $y=0,009+0,1649 \cdot x$ .

Podpůrná statistika: Úsek (odhad)= 0,008956

Směrnice (odhad)= 0,164909

Směrodatná odchylka úseku (odhad)= 0,002978

Směrodatná odchylka směrnice (odhad)= 0,000279

Interval spolehlivosti pro úsek= (0,002722) - (0,01519)

Interval spolehlivosti pro směrnici= (0,164324) - (0,165493)

Reziduální rozptyl (odhad)= 0,000112


Směrodatná odchylka reziduí (odhad)= 0,010579

Korelační koeficient= 0,999973

$R^2= 0,999945$

QC Koeficient= 0,980688

## 8.2 Validace linearity kalibrační křivky AKBA - část 1/2

	Linearita - Korelační a QC koeficient - Boswellic acids	EffiChem s.r.o. Purkyňova 649/127 Brno
	<b>AKBA</b>	

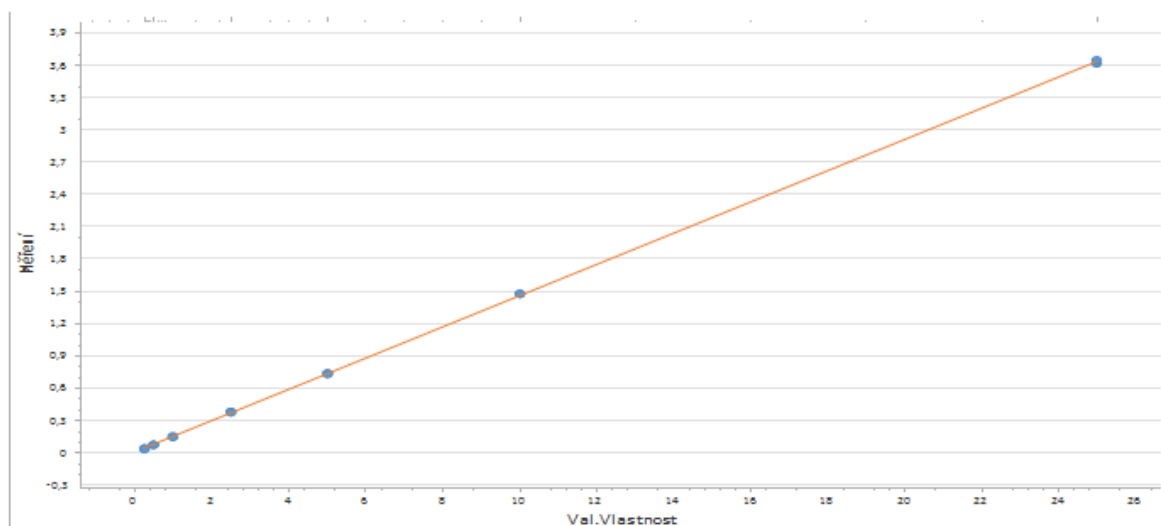
### Vstupní data

Popis	Val. Vlastnost [mg/l]	Měření 1 [mAU.min]
ST 0,250 mg/l a	0,25	0,0402
ST 0,250 mg/l b	0,25	0,0382
ST 0,250 mg/l c	0,25	0,0381
ST 0,500 mg/l a	0,5	0,0747
ST 0,500 mg/l b	0,5	0,0765
ST 0,500 mg/l c	0,5	0,0736
ST 1,000 mg/l a	1	0,1516
ST 1,000 mg/l b	1	0,1502
ST 1,000 mg/l c	1	0,149
ST 2,500 mg/l a	2,5	0,3813
ST 2,500 mg/l b	2,5	0,3805
ST 2,500 mg/l c	2,5	0,3774
ST 5,000 mg/l a	5	0,7387
ST 5,000 mg/l b	5	0,7379
ST 5,000 mg/l c	5	0,7306
ST 10,000 mg/l a	10	1,4746
ST 10,000 mg/l b	10	1,473
ST 10,000 mg/l c	10	1,4734
ST 25,000 mg/l a	25	3,6144
ST 25,000 mg/l b	25	3,6252
ST 25,000 mg/l c	25	3,6435

### Vyhodnocení

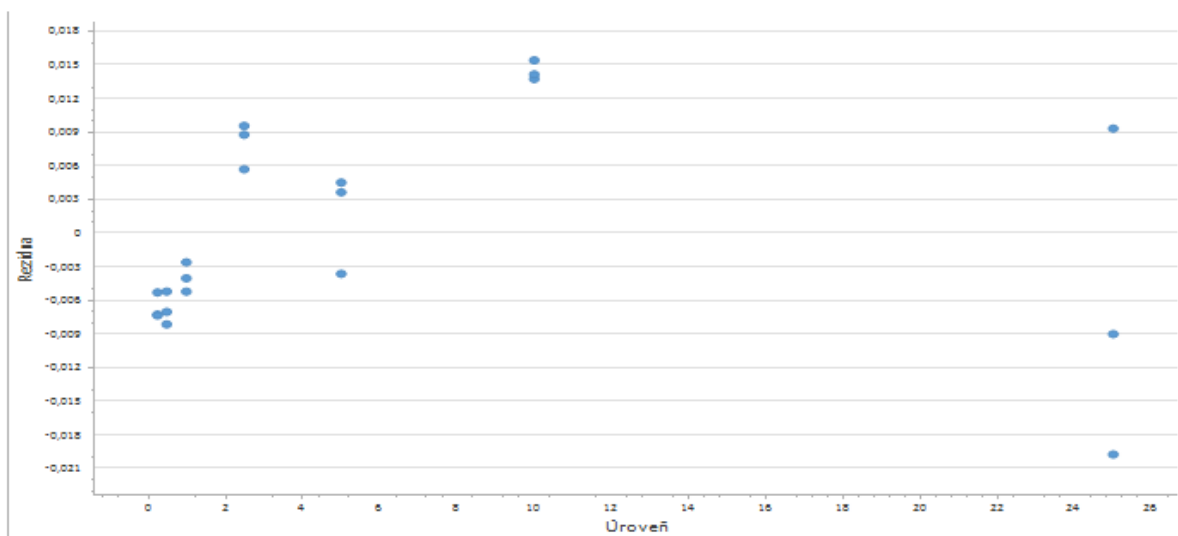
Vypočtený R	R <sup>2</sup>	R k testování	Vypočtený QC	QC k testování	Max. hodnota pro úsek (absolutní)	Vypočtená hodnota úseku	Hypotéza
1	0,9999	0,99	1,0142	5	20	0,0092	Přijata

### Graf



## Validace linearity kalibrační křivky AKBA - část 2/2

### Graf reziduí



**Závěr: Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního a QC koeficientu.**

Vypočtená hodnota úseku pro danou přímkou vyhovuje kritériu přijatelnosti pro úsek.

Rovnice přímky:  $y=0,0092+0,145 \cdot x$ .

Podpůrná statistika: Úsek (odhad)= 0,009237

Směrnice (odhad)= 0,144999

Směrodatná odchylka úseku (odhad)= 0,002712

Směrodatná odchylka směrnice (odhad)= 0,000254

Interval spolehlivosti pro úsek= (0,00356) - (0,014913)

Interval spolehlivosti pro směrnici= (0,144467) - (0,145532)

Reziduální rozptyl (odhad)= 9,3E-05

Směrodatná odchylka reziduí (odhad)= 0,009634

Korelační koeficient= 0,999971

$R^2= 0,999941$

QC Koeficient= 1,014186