

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

Fytochemický výzkum listů *Helianthus annuus* L. II
Phytochemical Study of *Helianthus annuus* L. leaves II

Diplomová práce

Hradec Králové 2007

Soňa Niedobová

Ráda bych touto cestou poděkovala PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a za všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce. Děkuji PharmDr. Zuzaně Řehákové, Ing. Kateřině Kubíkové a Ireně Rejlové za pomoc při testování frakcí a jejich separaci. Doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc. a pracovníkům Katedry biologických a lékařských věd děkuji za pomoc při testování antifungální aktivity. RNDr. Aleně Tiché, Ph.D. a MUDr. Radomíru Hyšplerovi, PhD. z Geronto-metabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové děkuji za analýzu a identifikaci frakce plynovou chromatografií.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy 118/2006/B
BIO.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jen citace z uvedené literatury.

OBSAH

OBSAH	1
1 ÚVOD A CÍL PRÁCE	2
2 TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1 CHARAKTERISTIKA DRUHU	3
2.2 OBSAHOVÉ LÁTKY ROSTLINY	7
2.2.1 <i>Seskviterpeny</i>	7
2.2.2 <i>Seskviterpenické laktony</i>	10
2.2.3 <i>Norsesquiterpeny</i>	15
2.2.4 <i>Spirosesquiterpeny</i>	16
2.2.5 <i>Triterpenoidní saponiny</i>	17
2.2.6 <i>Diterpeny</i>	17
2.3 BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK	18
2.3.1 <i>Alelopatická aktivita</i>	18
2.3.2 <i>Cytotoxická aktivita</i>	19
2.3.3 <i>Imunomodulační a protinádorová aktivita</i>	19
2.3.4 <i>Antifungální aktivita</i>	19
2.3.5 <i>Akutní toxicita</i>	20
2.3.5.1 Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů <i>Tubifex tubifex</i>	20
2.3.6 <i>Antioxidační aktivita</i>	26
2.3.6.1 Stanovení antioxidační aktivity	27
2.4 METODY POUŽITÉ K TESTOVÁNÍ	29
2.4.1 <i>Extrakce</i>	29
2.4.2 <i>Filtrace za sníženého tlaku (odsávání)</i>	29
2.4.3 <i>Odpařování za sníženého tlaku</i>	29
2.4.4 <i>Chromatografie</i>	30
2.4.4.1 <i>Kolonová (sloupcová) chromatografie</i>	30
2.4.4.2 <i>Chromatografie v plošném uspořádání</i>	30
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1 CHARAKTERISTIKA ZPRACOVÁVANÉHO MATERIÁLU	31
3.2 CHEMIKÁLIE, CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL A PŘÍSTROJE	31
3.2.1 <i>Rozpouštědla</i>	31
3.2.2 <i>Chemikálie</i>	31
3.2.3 <i>Chromatografický materiál</i>	31
3.2.4 <i>Přístroje</i>	32
3.2.5 <i>Laboratorní sklo</i>	32
3.2.6 <i>Vývíjecí soustavy a detekční činidla</i>	32
3.3 POSTUP PŘÍPRAVY EXTRAKTU	33
3.4 SCHÉMA ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU	34
3.5 IZOLACE LÁTEK POMOCÍ PREPARATIVNÍ CHROMATOGRAFIE	40
4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ	43
4.1 VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	43
4.1.1 <i>Metoda SIA</i>	43
4.1.2 <i>Metoda FRAP</i>	45
4.2 VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITY	46
4.2.1 <i>Metoda mikrodiluční bujónová v destičkách – M27A-M1 (200 + 10)</i>	46
4.3 VÝSLEDKY MĚŘENÍ AKUTNÍ TOXICITY	47
4.4 VÝSLEDKY DĚLENÍ FRAKCE HEA 22-24/2 (V KROUŽKU) POMOCÍ HPLC	49
5 DISKUSE	53
6 SOUHRN	55
7 LITERATURA	56
8 ANNOTATION OF THE DIPLOMA THESIS	58

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Slunečnice roční patří mezi rostliny široce využívané v zemědělství, potravinářství, farmacii, ale i v lidovém léčitelství. Na základě pozitivních výsledků získaných z pilotní studie prováděné na našem pracovišti v předchozích letech, která se zabývala testováním zástupců čeledi Asteraceae rostoucích na našem území, jsme se tuto rostlinu rozhodli prozkoumat do větších podrobností, a to z hlediska obsahových látek i z hlediska biologických účinků, což byl tedy zároveň i cíl této diplomové práce.

Náplní práce bylo připravit a rozdělit polární extrakt z listové drogy slunečnice za doprovodu biologických testů (bioassay – guided separace), která usměrní izolaci biologicky aktivních metabolitů.

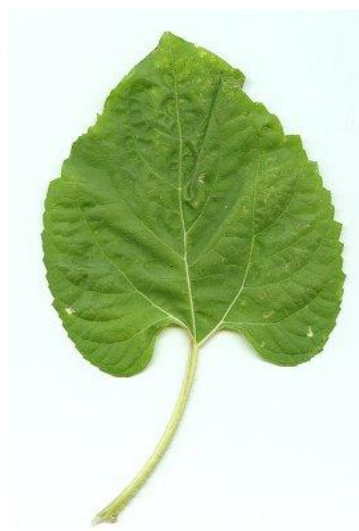
Zároveň bylo cílem vyhledat a shromáždit dostupné informace k obsahovým látkám slunečnice roční.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 CHARAKTERISTIKA DRUHU

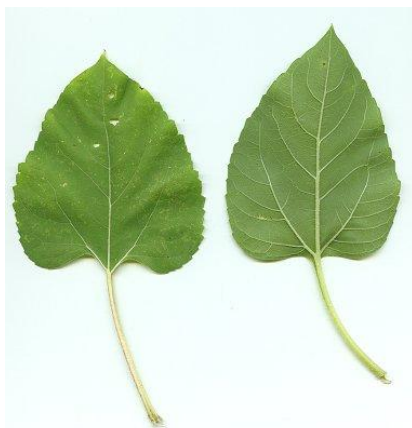


Obr. 1



Obr. 2

Dolní list



Obr. 3²⁹

Horní listy

Český název:	Slunečnice roční
Latinský název:	<i>Helianthus annuus</i> L.
Čeleď:	hvězdnicovité (<i>Asteraceae</i>)
Květenství:	úbor
Plod:	nažky
Listy:	srdčité, střídavé ²⁸

Původ

Slunečnice je původem v Mexiku a USA, odkud ji přivezli Španělé v 16. století. V současnosti je pěstována po celém světě, nejvíce v Argentině, v Evropě hojně na Ukrajině, v Maďarsku, Itálii aj., u nás ve větší míře až ve 20. století.¹

Rostlina a odrůdy

Latinské jméno *Helianthus annuus* se skládá z řeckých slov *helios*, *anthos* (slunce, květ) a *annus* (rok).

Jsou to jednoleté byliny. Hlavní kořen tlustý, hluboce kořenící, s četnými tenkými postranními kořeny. Lodyha přímá, jednoduchá nebo velmi řídké v horní části větvená 0,4 – 2,5 m dlouhá. Listy střídavé, řapík nejčastěji 10–20 cm dlouhý, čepel srdčitě vejčitá až široce trojúhelníkovitá, na vrcholu špičatá až zašpičatělá, na okrajích nepravidelně pilovitá, se širokou mělce až hluboce srdčitou bází, s výraznými 3 hlavními žilkami. Úbory jednotlivé, koncové, obvykle mohutné 15-65 cm v průměru, otáčející se za sluncem (heliotropismus) a během zrání semen se sklánějící. Lůžko úboru ploché nebo mírně vyklenuté, jazykovité květy žluté, v počtu 20-70. Květy terče četné, s korunou trubkovitou, prašníky téměř černé nebo hnědopurpurové. Nažky zčásti obalené plevkami, zploštělé v obrysu obvejčité nebo úzce obvejčité s klínovitou bází, šedavé až téměř černé 5-15 mm dlouhé.¹

Téměř na celém světě se pěstuje řada odrůd, které se liší zejména výškou rostliny a barvou květů od smetanové, přes žlutou, oranžovou až po tmavě červenou. Klasické odrůdy slunečnic uvolňují velké množství pylu, oproti nově vyšlechtěným hybridům, které pyl netvoří. Mezi takové hybridy patří např. tyto odrůdy: *Lemon Aura* je plnokvětá slunečnice s citrónově žlutou barvou květů. *Prado Gold* je oblíbená u pěstitelů květin, neboť se rozvětňuje, dorůstá do výšky 90 cm a může mít až 5 tmavě žlutých květů, které mají v průměru 15 cm. *Sunrich Orange* má pouze jediný květ žluté barvy. Mezi odrůdy, které kvetou červeně, patří např. *Prado Red*, *Double Dandy*, *Red Sun* či *Teddy Bear*.²⁸

Pěstování

Slunečnice roční je světlomilná obvykle krátkodenní rostlina s kultivačním optimem v teplých oblastech, existují však odrůdy snášející chladnější podmínky. Nejlepší výnosy poskytuje na bazických, živinami, zejména dusíkem bohatých, čerstvých půdách a také tam, kde je dostatek opylovačů (hlavně včely). Často pěstována, převážně v nížinách a nejteplejších pahorkatinách.¹

Význam

Je pěstována hlavně pro olejnaté nažky. Olej (obvykle 25-55 % čerstvé váhy nažek) je chutný a lehce stravitelný; je využíván hlavně při přípravě jídel a konzervovaných potravin, v menší míře v tukovém průmyslu (mýdla).¹

Využití

- Léčitelství

Sbírá se a využívá zejména semeno (*Semen helianthi*), někdy i květ (*Flos helianthi*).³¹ Semena obsahují kolem 45 % rostlinného oleje, bílkoviny, glyceridy, steroly a další prvky. Vyrábí se z nich slunečnicový olej, který obsahuje zejména kyselinu linolovou a olejovou. Slunečnicový olej má protisklerotické účinky a je vynikající surovinou pro přípravu léčivých mastí. Užívá se zevně např. při zánětech, zapaření, a vnitřně - 2 až 4 čajové lžičky denně zlepšují ostrost vidění.

Okvětní lístky se používají do čajových směsí pro snížení horečky a míry pocení, podporu trávení a stimulaci činnosti jater, zevně léčí hnisavé kožní afekce, záněty a zapaření. V lékařství se slunečnicové tinktury užívá při malárii, tuberkulóze a při žilních chorobách.

- Kosmetický průmysl

Slunečnicový olej se využívá jako součást do krémových přípravků, kde dodává ochranné a promašťující účinky.

- Potravinářský průmysl

Květy slunečnice jsou podstatným zdrojem medovice a nektaru pro výrobu medu. Semena jsou v našem jídelníčku jako pochutina, přidáváme je do chleba, pečiva, salátů, ale můžeme je jíst samotné, nebo na sladko - obalené v jogurtu. Slunečnicový olej používáme nejvíce za studena do salátů.

- Zemědělství

Slunečnice je využívána jako pícnina pro krmení dobytka a olejnina. Semena se přidávají do směsí hlodavcům, ale i ptákům.

- Malířství

Slunečnicový olej se osvědčil také v malířské technice olejomalby. Dnes se používá jako součást do temperových barev.

Jak ji říkají jinde

V jiných jazycích se slunečnici setkáme pod jmény:

slnečnica (slovensky),

slonecznik (polsky),

sunflower (anglicky),

Sonnenblume (německy),

podsolnečnik (rusky),

zonnebloem (holandsky),

tourne-sol, soleil (francouzsky),

2. Teoretická část

girasole (italsky),
girasol, mirasol (španělsky),
girassol (portugalsky),
iliotropio (řecky),
napraforgó (maďarsky),
solros (švédsky),
solsikke (norsky).²⁸

2.2 OBSAHOVÉ LÁTKY ROSTLINY

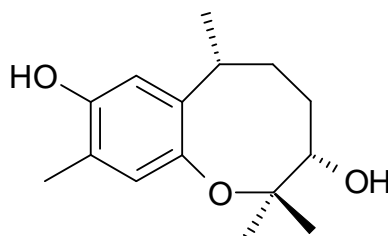
2.2.1 SESKVITERPENY

Seskviterpeny jsou 15-uhlíkaté sloučeniny, které vznikají z tří izoprenových jednotek. Podle uhlíkových skeletů rozlišujeme několik typů seskviterpenů a to acyklické, mono-, bi- a tricyklické. Podle substituentů je členíme na alkoholy, ketony a seskviterpenické laktony.

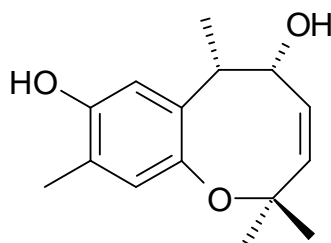
Některé z nich tvoří významnou složku silic nacházející se v rostlinách a podílejí se na terapeutickém účinku.⁵

→ HELIANNANY¹⁰

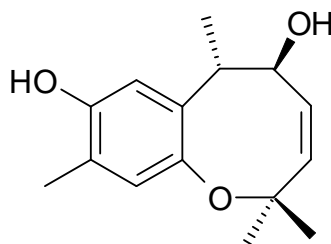
- 7,11 - HELIANNANY



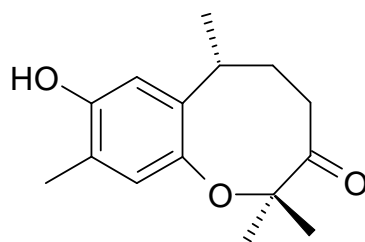
Heliannuol A



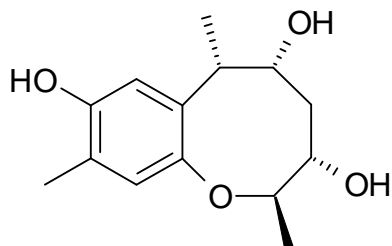
Heliannuol G



Heliannuol H

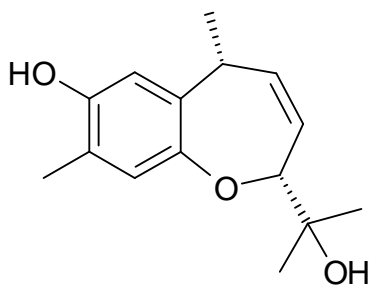


Heliannuol K

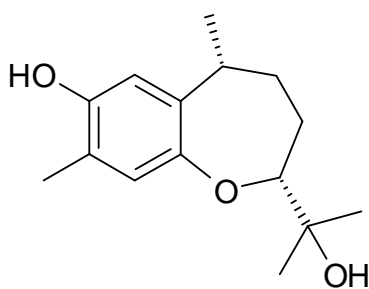


Heliannuol L

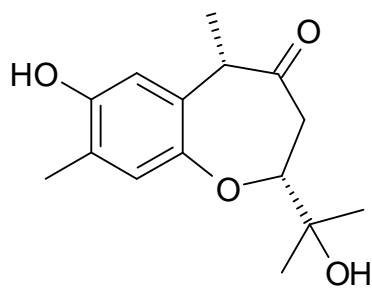
- 7,10 – HELIANNANY



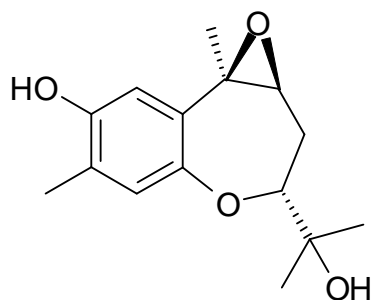
Heliannuol B



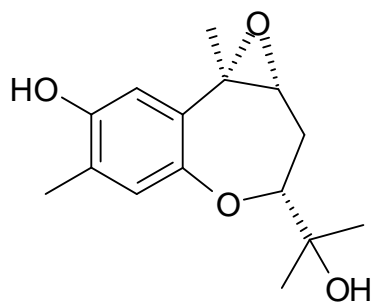
Heliannuol D



Heliannuol F

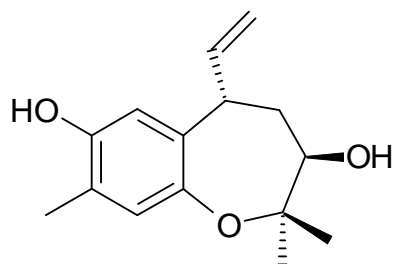


Heliannuol I



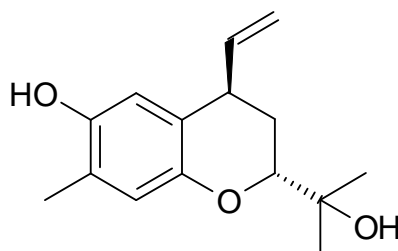
Heliannuol J

- 8,11 – HELIANNANY



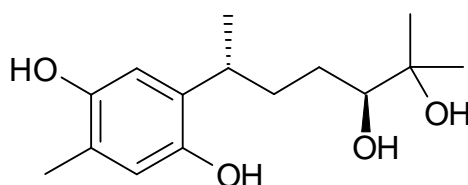
Heliannuol C

- 8, 10 – HELIANNANY

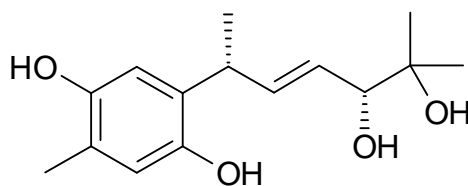


Heliannuol E

→ HELIBISABONOLY¹¹



Helibisabonol A

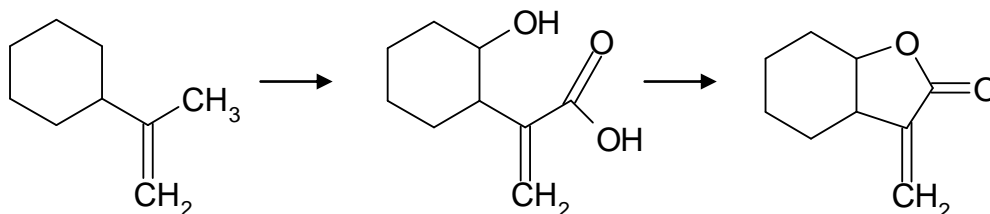


Helibisabonol B

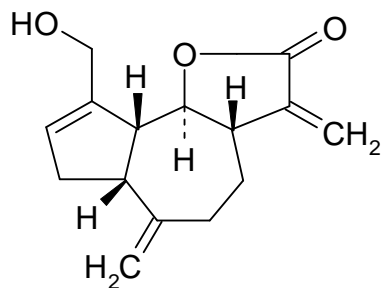
2.2.2 SESKVITERPENICKÉ LAKTONY

V rostlinách čeledi *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Magnoliaceae* a v jiných se vyskytuje velké množství strukturně rozmanitých seskviterpenických laktonů.

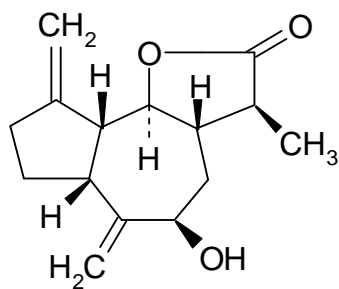
Jedna methylová skupina bočního izopropylenového řetězce se zoxiduje na karboxyl, další oxidací vzniklá hydroxylová skupina zreaguje s karboxylem a utvoří se laktonový kruh.⁵



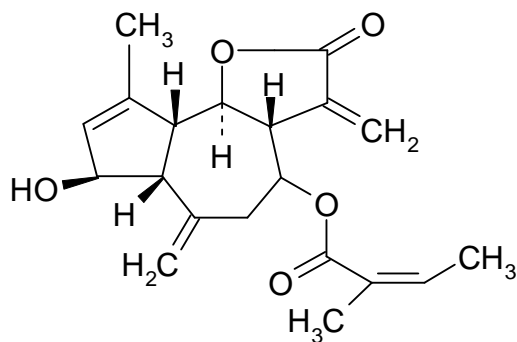
→ ANNUOLIDY^{12, 13}



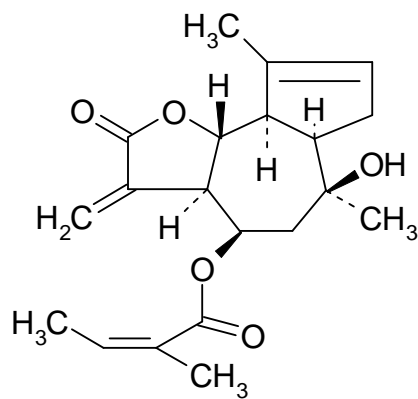
Annuolid A



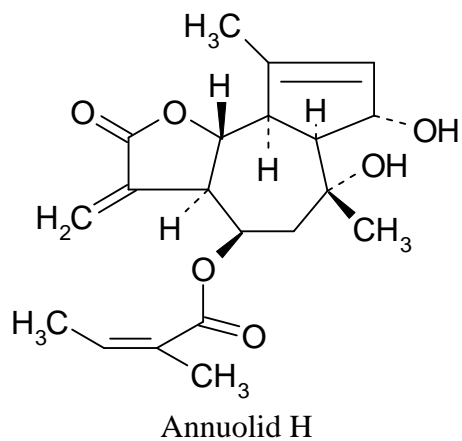
Annuolid D



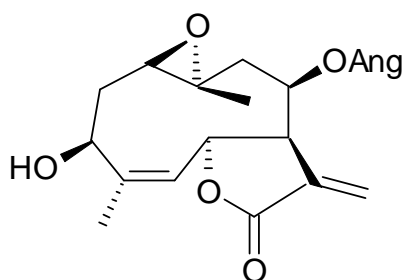
Annuolid F



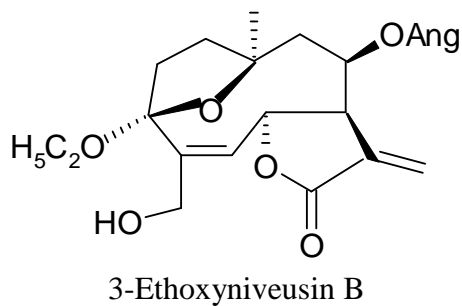
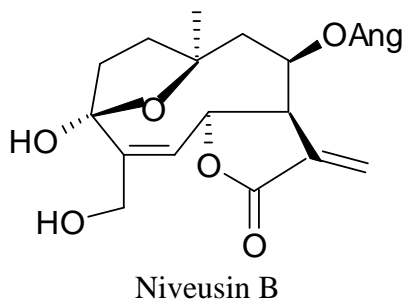
Annuolid G



→ LEPTOKARPIN¹¹

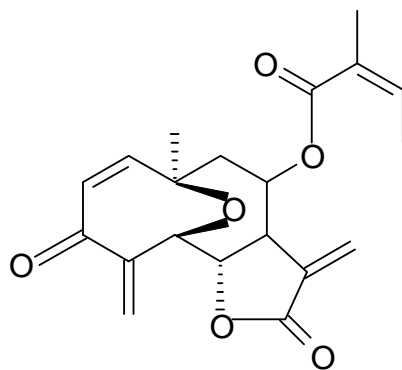


→ GERMAKRANOLIDY¹⁴

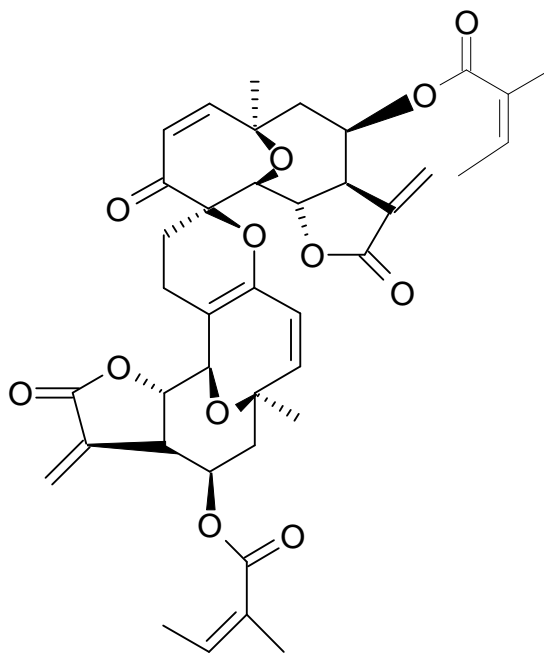


2. Teoretická část

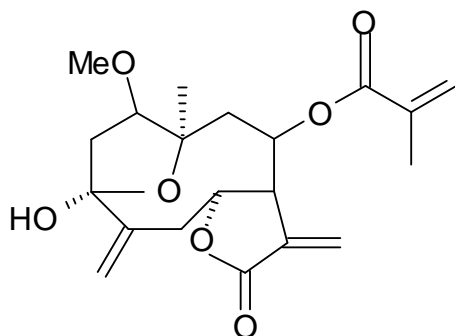
→ HELIVYPOLID F¹³



→ HELIVYPOLID G¹⁵

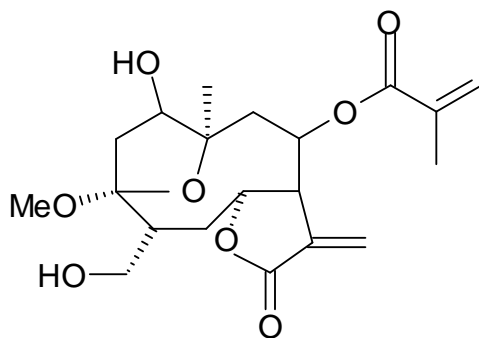


→ HELIVYPOLID H¹³

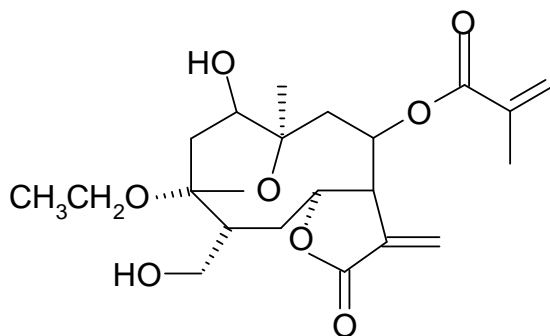


2. Teoretická část

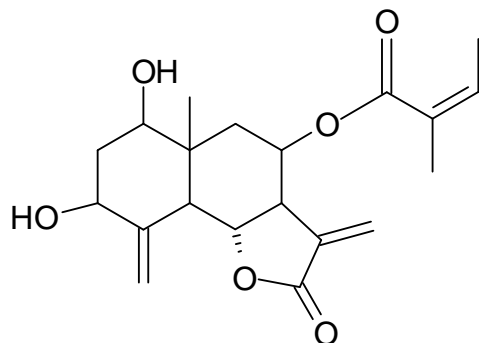
→ HELIVYPOLID I



→ HELIVYPOLID J

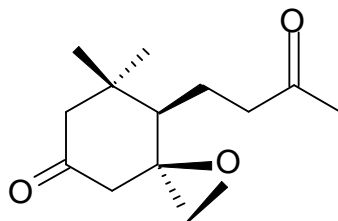


→ HELIEUDESMANOLID A¹³

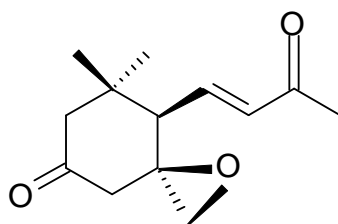


2.2.3 NORSESQUITERPENY

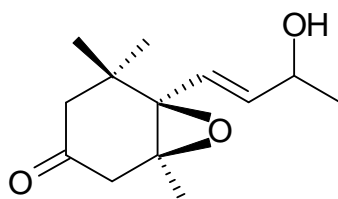
→ ANNUIONY^{16, 11, 17}



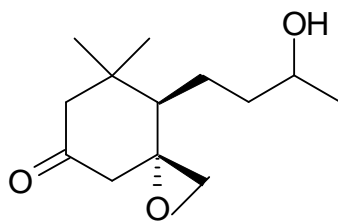
Annuion A



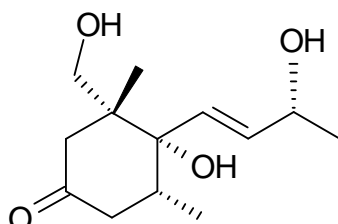
Annuion B



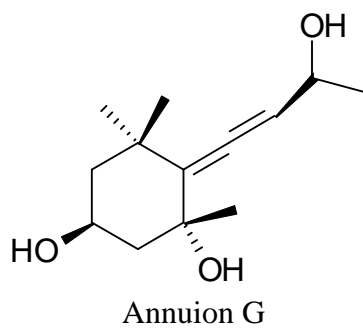
Annuion C



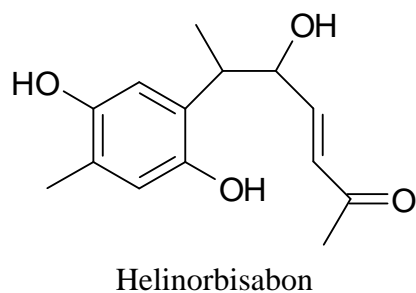
Annuion E



Annuion F

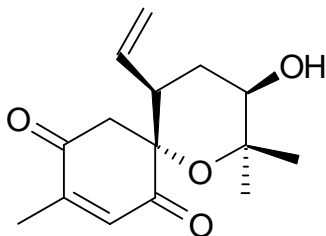


→ NORBISABOLEN¹⁶



2.2.4 SPIROSESQUITERPENY

→ HELIESPIRON A¹⁸



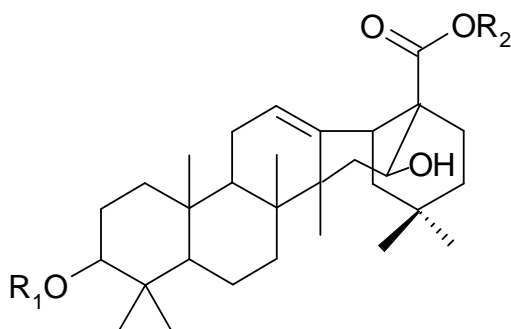
2.2.5 TRITERPENOIDNÍ SAPONINY

Saponiny jsou glykosidy izoprenoidního původu, jejichž vodné roztoky protřepáváním silně pěňí. Jako všechny glykosidy se skládají z lipofilního aglykonu – sapogeninu a hydrofilní sacharidové složky. Podle struktury aglykonu sapogeninu se dělí na steroidní a triterpenoidní.

Na aglykon se glykosidicky nebo ve formě esteru navazuje až 12 monosacharidů nebo uronových kyselin. Oligosacharidovou složku saponinů skoro vždy tvoří běžné cukry a ty jsou vždy navázané na hydroxyl v poloze C3, někdy i na jiném uhlíku. U steroidních saponinů to bývá C26, u triterpenoidních karboxylová skupina na C28.

Aglykony jsou u triterpenoidních saponinů pentacyklické triterpenoidy a dělí se na β -amyrinový, α -amyrinový a lupeolový typ. Cukernou složku glykosidů tvoří zpravidla větší počet molekul sacharidů, které se nejčastěji váží na hydroxyl v poloze C3. Pokud má aglykon na C17 karboxylovou skupinu mohou se na ni ve formě esteru navázat další molekuly cukrů.⁵

→ HELIANTHOSID¹⁹

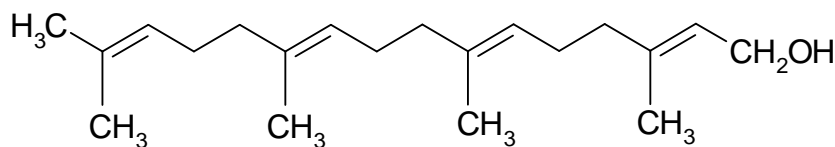


R₁: ←glc(3←1rha)4←1xyl

R₂: ←ara(2←1rha)4←1glc

2.2.6 DITERPENY

Spojením čtyř izoprenoidních jednotek vznikají C₂₀ sloučeniny – diterpeny. Za prekurzor je možné považovat geranylgeraniol.



Cyklizací geranylgeraniolu vznikají cyklické terpeny, které se dělí podle uhlíkového skeletu na monocyklické, bicyklické, tricyklické a tetracyklické (kauranový typ).⁵

→ 2 β ,16 β -*ent*-kaurandiol

→ 15 α ,16 α -epoxy-17 β -*al-ent*-kauran-19-ová kyselina²⁰

2.3 BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK

2.3.1 ALELOPATICKÁ AKTIVITA

Neúměrné užívání herbicidů vede k vzrůstající rezistenci plevelů k látkám jako jsou triaziny a dinitroaniliny, plevel „je stále více podobný“ úrodě kterou napadá a dále také herbicidy znečišťují ovzduší a mohou poškodit zdraví člověka. Alelopatie může pomoci překonat tento problém rozvojem přírodních fyto toxinů z rostlin nebo mikrobů jako herbicidů a používáním syntetických derivátů přírodních produktů jako herbicidů. Rostliny mají svůj vlastní obranný mechanismus a „alelochemikálie“ jsou vlastně přírodní herbicidy. Jedna cesta jak využít alelopatii v zemědělstvím je skrze izolaci, identifikaci a syntézu aktivních sloučenin z těch druhů rostlin, které vykazují alelopatickou aktivitu.¹⁸

Alelopatii obecně je označován specifický vliv jednoho druhu rostlin (donora) na klíčení, růst a vývoj druhého rostlinného druhu (recipienta). Ve většině případů se alelopatické působení projevuje inhibičně. Pouze v některých případech byl zaznamenán stimulační účinek. Inhibiční účinek je zprostředkován produkcí chemických látek rostlinami s alelopatickými vlastnostmi. Na alelopatii se vždy podílí celý komplex chemických látek nejrůznějšího složení (steroidy, silice, terpeny, kumariny, fenoly, alkaloidy, barviva atd.) Tyto látky jsou nejčastěji vylučovány kořeny rostlin nebo se dostávají do prostředí jako výluhy z nadzemních částí rostlin. Mohou se rovněž uvolňovat z rozkládajících se zbytků odumřelých nadzemních částí rostlin a kořenů.³⁰

Vliv alelopatie se projevuje jednak zpomalením až inhibicí klíčení semen ostatních druhů plevelů nebo zpomalením až zastavením růstu a vývoje již vyklíčených rostlin. U některých druhů rostlin byl zjištěn autoinhibiční účinek, prostřednictvím kterého dochází k zabránění vyklíčení vlastních semen v dosahu matečné rostliny. Těmito mechanismy si druh s alelopatickými vlastnostmi zajišťuje, obrazně řečeno, místo pro svou existenci. Experimentálně, v laboratorních podmínkách byla zjištěna alelopatie u celé řady druhů rostlin. V přírodě jsou poměry poněkud složitější, neboť některé chemické inhibitory mohou být v půdě inaktivovány adsorpcí na půdní koloidy.³⁰

Alelopatie se významně podílí na snížení druhové bohatosti plevelů. Vlivem alelopatie dochází ke změnám v dominanci druhů plevelů nebo k jejich vymizení. Snahou současného výzkumu je objasnit alelopatické vlivy rostlin, minimalizovat negativní účinky alelopatie na růst kulturních rostlin a jejich výnos, využít kultivary poskytující zdroj přirozených herbicidů (alelochemikálií) v integrovaném systému ochrany rostlin proti plevelům.³⁰

Pěstovaná slunečnice (*Helianthus annuus*) má velkou alelopatickou aktivitu a inhibuje růst plevele jako je – durman obecný, povijnice, hořčice polní aj. Studie prokázaly, že na pozemku osázeném slunečnicemi je plevel redukován stejně s použitím i bez použití herbicidů.¹⁸

Seskviterpenické laktony se hojně vyskytují v rostlinách. Spolu s diterpeny tvoří největší množství sloučenin izolovaných z rodu *Helianthus*. Byly prováděny biologické zkoušky, kde byl testován vodní extrakt čerstvých listů různých variet *Helianthus annuus*. Bylo prokázáno, že seskviterpenické laktony jsou schopny inhibovat růst rostlin v koncentraci přibližně 10^{-3} M. U helieudesmanolidu A jako jediné sloučeniny byl prokázán stimulační efekt a to v koncentraci nižší než 10^{-3} M. Toto je v přírodě velice zřídka se vyskytující jev. Obdobně se v přírodě jako rostlinné růstové promotory chovají gibereliny, cytokíny, IAA (indol-3-octová kyselina), brasinosteroidy. Účinky helieudesmanolidu A je podobné IAA, který inhibuje růst rostlin v koncentraci 10^{-3} M, ale při nižší koncentraci růst naopak podporuje.¹³

2.3.2 CYTOTOXICKÁ AKTIVITA

Triterpenické saponiny mají řadu zajímavých biologických účinků – protizánětlivý, protinádorový, antivirový, antifungální, imunomodulační, antitrombotický, kardiovaskulární, spermicidní a cytotoxický.

Bylo testováno 21 triterpenických saponinů s cílem zjistit vliv struktury na účinek. Jak ovlivní velikost hydrofilní sacharidové části saponinu cytotoxicitu, testovanou na myších nádorových buňkách. U helianthosidu odštěpením jednoho nebo dvou cukrů z navázaného trisacharidu se získají saponiny s daleko menší cytotoxickou aktivitou.¹⁹

2.3.3 IMUNOMODULAČNÍ A PROTINÁDOROVÁ AKTIVITA

Imunomodulační aktivita byla testována na myších buňkách sleziny, kde byla pozorována jejich proliferace.

Testované látky byly virgaureasaponin E, glycyrrhizin, glycyrrhinová kyselina a ginsenosid Re. Největší mitogenní efekt vyjádřen jako stimulační index SI měl virgaureasaponin E a to $SI = 1,8$ při koncentraci $0,001 \mu\text{g/ml}$. V dalším testu byla zkoumaná pomocí průtokové cytometrie schopnost látek stimulovat proliferaci myších T-buněk thymu. SI glycyrrhizinu bylo $1,3$ pro koncentraci $0,01 \mu\text{g/ml}$, pro virgaureasaponin E bylo $SI = 1,25$ pro koncentraci $0,001 \mu\text{g/ml}$.

Virgaureasaponin E je jediný saponin, který prokazatelně stimuluje proliferaci lidských mononukleárních buněk v periferní krvi ($SI = 1,25 \pm 0,1$) a také uvolňuje TNF α u mikrořágů kostní dřeně myši. Ze všech testovaných látek prokázal nejlepší protinádorovou aktivitu. Při intraperitoneálním podání u myši po dobu 10 dnů (konc. 1 mg/kg) došlo u 6 z 15 myši k celkové regresi nádoru, a u 4 myši byl nádor menší než 10 mm^2 . Jiné koncentrace neměly už tak signifikantní výsledky. Virgaureasaponin E prokázal nejlepší výsledky ze všech testovaných látek s pozitivním účinkem v *in vitro* testech a stejně tak i u nádorových buněk *in vivo*.²¹

2.3.4 ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITA

Jedním z důležitých aspektů testování antifungální aktivity *in vitro* je neexistence univerzální metody použitelné pro všechny typy testovaných látek a hub. Pro testování se používají různé modifikace jednotlivých metod (difúzní, diluční metody a jiné), což má za následek rozdílnost výsledků získaných na různých pracovištích.

Od 80. let bylo vyvíjeno úsilí o vytvoření standardní metody pro testování antimykotik. Výsledkem bylo vytvoření standardní metody M27-P v roce 1992.

Tato metoda byla využita i v Diplomové práci Heleny Jahodářové (2001). Několik vzorků druhů čeledi Asteraceae byly testovány ve třech řádově odlišných koncentracích $0,01$; $0,1$; 1% .²³ Nejúčinnějším rostlinným druhem byla *Leuzea carthamoides*. *In vitro* antifungální aktivitu projevila vůči všem druhům použitých hub. Proti *Candida tropicalis* a *C. glabrata* byla účinná i koncentrace $0,01 \%$. Signifikantní aktivita byla patrná i u druhu *Bellis perrenis*, *Helianthus annuus*, *Tanacetum vulgare*, *Cnicus benedictus*, *Eupatorium cannabinum* a *Xanthium spinosum*.²² Všechny testované extrakty působily *in vitro* v různých koncentracích proti dermatofytům (*Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*).

Byl proveden druhý stupeň testování s větším rozsahem koncentrací vzorků *Bellis perrenis*, *Cnicus benedictus*, *Tanacetum vulgare*, *Helianthus annuus*, *Leuzea carthamoides*. Současně byl i zařazen další kmen dermatofytů *Microsporum gypseum*. Výsledkem bylo upřesnění nejnižší účinné koncentrace vzorku *Leuzea carthamoides* – 0,007 % proti *Candida glabrata*. *Microsporum gypseum* bylo méně citlivé vůči testovaným látkám než *Trichophyton mentagrophytes*.

Rešerše o obsahových látkách produkovaných v rámci jednotlivých skupin neumožňují jednoznačně přisoudit odpovědnost za antifungální aktivitu některé chemické struktury, která je specifická pro aktivní taxony.²³

Esenciální olej získaný z nadzemní části rostliny *Thymus pulegioides*, obsahující hodně karvakrolu a thymolu, byl testován na antifungální aktivitu proti druhům *Candida*, *Aspergillus* a pěti druhům dermafytů. Olej vykázal významnou antifungální aktivitu proti klinicky významným druhům hub. Mechanismem účinku, objasněn pomocí průtokové cytometrie, je hlavně poškození cytoplazmatické membrány a zredukování obsahu ergosterolu.²⁴

Posakonazol jako nový lipofilní antifungální triazol, vykazuje vysokou účinnost i tam, kde nynější triazoly a amfotericin B nezabírají. V souladu s preklinickými studiemi, posakonazol ukázal silnou aktivitu v II a III fázi klinických studií u imunodeficitních pacientů s orofaryngeálními a oesofageálními mykózami, u pacientů s invazivními mykózami a byl rovněž účinný i v profylaxi u rizikových pacientů.²⁵

2.3.5 AKUTNÍ TOXICITA

Úvod

Počet cizorodých látek, které zatěžují lidstvo i veškerý život na Zemi, se v našem životním prostředí stále zvyšuje. Jedná se i o látky, jejichž účinky na živé organismy jsou známy jen z části nebo vůbec ne. První, poměrně rychle získatelný údaj o nebezpečnosti látky poskytuje její akutní toxicita. Její stanovení je časově a finančně velmi nákladné a je nutno utratit velké množství zvířat. Proto se hledají alternativní metody stanovení akutní toxicity, které by ušetřily čas, peníze, zvířata. Měly by však poskytovat adekvátní informace jako pokusy prováděné na obratlovcích.⁶

2.3.5.1 Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*

Vzhledem k tomu, že studie prokázaly u různých skupin látek korelaci mezi akutní toxicitou měřenou různými způsoby a rozdělovacím koeficientem oktanol/voda, je možné předpokládat i korelaci dat stanovených na různých biologických objektech.

Bylo prokázáno, že existuje těsná korelace pro soubor alkoholů mezi LD₅₀ stanovenou na myších a EC₅₀ (zástava pohybu) stanovenou na nitěnkách respektive IGC₅₀ (Inhibition Growth Concentration – koncentrace, inhibující růst) stanovenou na prvocích.

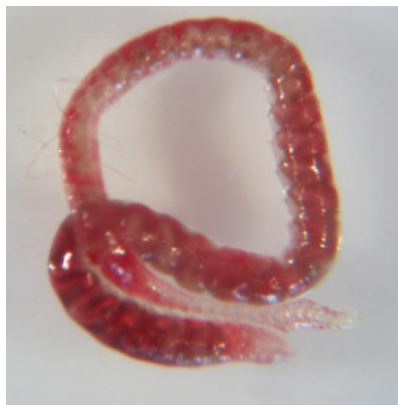
Hlavními přednostmi tohoto alternativního testu jsou jednoduchost, reprodukovatelnost, rychlost a finanční nenáročnost. Vyhovuje i současnému trendu omezování použití obratlovců v pokusech. Nitěnky jsou zmíněny jako objekt pro test toxicity odpadních vod i pro stanovení akutní toxicity jednotlivých chemikálií a chemických přípravků. Byly použity na přelomu 50. a 60. let ke stanovení toxicity pro zásadní práce, které vedly k predikčním metodám typu analýzy QSAR

2. Teoretická část

(Quantitative Structure – Activity Relationships, tj. kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou chemikálií a jejich biologickou účinností).

Testovaný objekt – Nitěnka větší (*Tubifex tubifex*)

Říše: Animalia (živočichové)
Kmen: Annelida (kroužkovci)
Třída: Oligochaeta (máloštětinatci)
Řád: Tubificida
Čeleď: Tubificidae (nitěnkovití)
Druh: *Tubifex tubifex*⁶



Obr.4 (stereomikroskop, měřítko 20 : 1)³²

Mezi suchozemské zástupce máloštětinatců patří žížaly, mezi sladkovodní právě nitěnky.

Jejich životním prostředím jsou toky se značným organickým zatížením, hojný výskyt nitěnek je možné očekávat při ústí kanalizace mlékáren, jatek atp. Vyskytuje se na dně koryt v bahně v kanálkách, které si slizem zpevňují, a to do hloubky okolo 10 cm, ojediněle i v hloubce 40 cm. Na místě výskytu najdeme vždy kolonii čítající tisíce jedinců. Při vyrušení se bleskurychle stahují do komůrek.

Pohybují se kontrakcemi podkožní svaloviny. Jako opora jim slouží štětiny, kterými se zachytávají podkladu. Za potravu jim slouží detrit a bakterie, přičemž nevybírají jednotlivé části potravy, ale pohlcují veškerý materiál na dně. Nestravitelné zbytky pak vyvrhují análním otvorem. Za 24 hodin zpracují množství materiálu rovnající se 4–5 násobku jejich váhy.

Všichni máloštětinatci dýchají celým povrchem těla. U některých druhů je vyvinuto dýchání stěnou střevní, přičemž výměnu vody obstarávají svaly a obrvený epitel na konci střeva. Některé druhy (*Tubifex tubifex*) vydrží dlouhou dobu v prostředí bez kyslíku, a to až desítky dnů (25 dnů při teplotě 10-12 °C, při teplotě 2-3 °C přežívá ještě 30 % jedinců anoxii 48 dnů). Jako zdroj energie je při anoxybióze ve zvýšené míře využíván glykogen (podíl glykolýzy na metabolismu se zvýší 3-4krát).

Metodika testu

Příprava roztoků referenční látky

Pro vnitřní kontrolu správnosti stanovení bylo navrženo použití roztoku dihydrátu chloridu manganatého, jehož indexy akutní toxicity byly stanoveny dlouhodobým sledováním.

Navážka dihydrátu chloridu manganatého (asi 1,8000 g přesně) byla rozpuštěna ve 25 ml odměrné baňce. V této práci byl však použit tetrahydrát chloridu manganatého, jehož navážka byla adekvátně přepočítána na 2,2003 g přibližně přesně na 25 ml vody.

2. Teoretická část

Takto připravený základní roztok byl ředěn následujícím způsobem:
8 ml základního roztoku + 2,1 ml dest. vody (koncentrace 1),
8 ml koncentrace 1 + 2,1 ml. dest. vody (koncentrace 2), atd.
Bylo připraveno 6 ředění.

Příprava roztoků zkoumané látky

Přesně známé množství zkoumané látky se rozpustí v odpovídajícím objemu dest. vody tak, aby vznikl 10 % roztok. Tento roztok je výchozím roztokem pro následující ředění:
9 ml základního roztoku + 3 ml dest. vody (koncentrace 1),
9 ml koncentrace 1 + 3 ml dest. vody (koncentrace 2), atd.
Bylo připraveno vždy 4 – 6 ředění.

Pracovní postup

Měření probíhá při laboratorní teplotě (20 – 25 °C).

Do Petriho misky bylo napipetováno 2 ml pracovního roztoku o nejvyšší koncentraci. Z kolonie bylo rychle, ale šetrně odděleno 6 stejně velkých nitěnek, byly osušeny na filtračním papíru a přeneseny do pracovního roztoku. Zde byly exponovány přesně 3 minuty. Sledovala se zástava pohybu. Stanovil se počet jedinců, u nichž došlo k zástavě pohybu.

Po 3 minutách byly nitěnky rychle vyjmuty, přeneseny do Petriho misky s destilovanou vodou a po 1 minutě se stanovil počet nehybných jedinců.

Použité nitěnky byly vyřazeny a pokus byl opakován, a to celkem třikrát. Pak se pokračovalo s nižšími koncentracemi až po dosažení koncentrace, která nezpůsobila žádnou zástavu pohybu nitěnek. Souběžně se stanovením akutní toxicity sledované látky se stanovovala i akutní toxicita referenční látky, což byl tetrahydrát chloridu manganatého.

Výsledky pokusů byly statisticky vyhodnoceny podle metody Weilové.

Výpočet

Výsledky jsou zatím počty nehybných jedinců nitěnek po expozici přesně 3 minuty u každé koncentrace zkoumané látky. Z těchto hodnot je možné vypočítat EC_{50} podle následujícího vztahu:

$$\log EC_{50} = \log D_a + d(f + 1) \quad (1)$$

kde D_a je nejnižší koncentrace ze čtyř potřebných pro výpočet (viz **Tab. 1**), f tabelovaná konstanta a d početní konstanta, pro níž platí následující rovnice:

$$d = \log R$$

kde R je poměr mezi dvěma následujícími koncentracemi (vyšší koncentrace lomena nižší je vždy větší než 1).

Interval spolehlivosti pro 95 % pravděpodobnost je dán vztahem:

$$L_{1,2} = \log EC_{50} \pm 2\sigma_f d$$

Kde σ_f je tabelovaná konstanta.

Konstanty f jsou tabelovány pro různé sestavy odčítaných výsledků (nehybných jedinců).

2. Teoretická část

Obdobně lze získat hodnotu LC_{50} , kdy jsou k výpočtu použity počty nehybných jedinců odečtených přesně 1 minutu po přenesení červů z roztoku látky do čisté destilované vody.

Pro názornost je uveden příklad výpočtu EC_{50} pro referenční látku, tetrahydrát chloridu manganatého. Vzorový příklad pro konkrétní stanovovaný extrakt bude uveden v Experimentální části.

Navážku 2,003 g tetrahydrátu chloridu manganatého přeneseme do 25 ml odměrné baňky, rozpustíme v malém množství destilované vody a roztok doplníme po rysku. Získáme tak základní roztok $MnCl_2$ o koncentraci 0,088 g/ml. Základní roztok pak ředíme způsobem uvedeným výše a připravíme 6 pracovních roztoků, ve kterých exponujeme červy:

Tab. 1

	Koncentrace (g/ml)	Počet nehybných červů po 3 min. expozice	Počet nehybných červů po 1 min. v dest. vodě
Základní roztok	0,088	6	6
1. ředění	0,0697	6	6
2. ředění	0,0552	6	6
3. ředění	0,0437	6	6
4. ředění	0,0346	6	4
5. ředění	0,0274	1	1
6. ředění	0,0217	0	0

Hodnotu EC_{50} vypočítáme pomocí rovnice (1):

$$\log EC_{50} = \log D_a + d(f + 1)$$

Pro náš případ najdeme v tab.2 pro čtveřici údajů o nehybných nitěnkách 0, 1, 6, 6 hodnoty: $D_a = 0,0217$; $f = 0,33333$; $R = 1,26267$; $d = \log R = 0,101$.

A po dosazení dostaneme rovnici a výsledek:

$$\begin{aligned}\log EC_{50} &= -1,6635 + 0,101(0,33333 + 1) = -1,5289 \\ EC_{50} &= 0,0296 \text{ g/ml}\end{aligned}$$

Pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ můžeme vypočítat interval spolehlivosti pomocí rovnice (3):

$$L_{1,2} = \log EC_{50} \pm 2\sigma_f d$$

$$\text{kde } \log EC_{50} = -1,5289; \sigma_f = 0,16667; d = 0,101$$

$$\text{čili } L_{1,2} = -1,5289 \pm 0,03367$$

Po odlogaritmování můžeme provést zápis EC_{50} ve tvaru 0,0296 (0,0274 – 0,0320) g/ml pro 95 % interval spolehlivosti.

Obdobně se vypočítá i hodnota LC_{50} .⁶

2. Teoretická část

Tab. 2 Kombinace nitěnek a konstant pro výpočet EC₅₀, LC₅₀

Kombinace	f	σf	Kombinace	f	σf
0,0,3,6	1,00000	0,22361	2,1,5,5	0,33333	0,55998
0,0,4,6	0,83333	0,21082	2,1,6,5	0,00000	0,53748
0,0,5,6	0,66667	0,16667	2,2,2,5	1,00000	0,68313
0,0,6,6	0,50000	0,00000	2,2,3,5	0,66667	0,66852
0,1,2,6	1,00000	0,26874	2,2,4,5	0,33333	0,66852
0,1,3,6	0,83333	0,27889	2,2,5,5	0,00000	0,68313
0,1,4,6	0,66667	0,26874	2,3,3,5	0,33333	0,70097
0,1,5,6	0,50000	0,23570	2,3,4,5	0,00000	0,74536
0,1,6,6	0,33333	0,16667	3,0,4,5	1,00000	0,80622
0,2,2,6	0,83333	0,29814	3,0,5,5	0,50000	0,65192
0,2,3,6	0,66667	0,30732	3,0,6,5	0,00000	0,67082
0,2,4,6	0,50000	0,29814	3,1,3,5	1,00000	0,92195
0,2,5,6	0,33333	0,26874	3,1,4,5	0,50000	0,90830
0,2,6,6	0,16667	0,21082	3,1,5,5	0,00000	0,92195
0,3,3,6	0,50000	0,31623	3,2,2,5	1,00000	1,02470
0,3,4,6	0,33333	0,30732	3,2,3,5	0,50000	1,01242
0,3,5,6	1,16667	0,27889	3,2,4,5	0,00000	1,11803
0,3,6,6	0,00000	0,22361	3,3,3,5	0,00000	1,16190
0,4,4,6	0,16667	0,29814	4,0,4,5	1,00000	1,61245
0,4,5,6	0,00000	0,26874	4,0,5,5	0,00000	1,61245
0,0,3,6	1,00000	0,26833	4,1,3,5	1,00000	1,94936
1,0,4,6	0,80000	0,25612	4,1,4,5	0,00000	2,04939
1,0,5,6	0,60000	0,21541	4,2,2,5	1,00000	2,04939
1,0,6,6	0,40000	0,12000	4,2,3,5	0,00000	2,23607
1,1,2,6	1,00000	0,32249	0,0,5,4	1,00000	0,29580
1,1,3,6	0,80000	0,33704	0,0,6,4	0,75000	0,28717
1,1,4,6	0,60000	0,33226	0,1,4,4	1,00000	0,43301
1,1,5,6	0,40000	0,30724	0,1,5,4	0,75000	0,42573
1,1,6,6	0,20000	0,25612	0,1,6,4	0,50000	0,29580
1,2,2,6	0,80000	0,36000	0,2,3,4	1,00000	0,48734
1,2,3,6	0,60000	0,37736	0,2,4,4	0,75000	0,50621
1,2,4,6	0,40000	0,37736	0,2,5,4	0,50000	0,43301
1,2,5,6	0,20000	0,36000	0,2,6,4	0,25000	0,32596
1,2,6,6	0,00000	0,26833	0,3,3,4	0,75000	0,53033
1,3,3,6	0,40000	0,39799	0,3,4,4	0,50000	0,48734
1,3,4,6	0,20000	0,40200	0,3,5,4	0,25000	0,42573
1,3,5,6	0,00000	0,34641	0,3,6,4	0,00000	0,33541
1,4,4,6	0,00000	0,36878	0,4,4,4	0,25000	0,45415
2,0,3,6	1,00000	0,33541	0,4,5,4	0,00000	0,40311
2,0,4,6	0,75000	0,32509	1,0,5,4	1,00000	0,53748
2,0,5,6	0,50000	0,29580	1,0,6,4	0,66667	0,30225
2,0,6,6	0,25000	0,23717	1,1,4,4	1,00000	0,68313
2,1,2,6	1,00000	0,40311	1,1,5,4	0,66667	0,55998
2,1,3,6	0,75000	0,42573	1,1,6,4	0,33333	0,42455
2,1,4,6	0,50000	0,43301	1,2,3,4	1,00000	0,74556
2,1,5,6	0,25000	0,42573	1,2,4,4	0,66667	0,66852
2,1,6,6	0,00000	0,29580	1,2,5,4	0,33333	0,59835
2,2,2,6	0,75000	0,45415	1,2,6,4	0,00000	0,53748
2,2,3,6	0,50000	0,48734	1,3,3,4	0,66667	0,70097
2,2,4,6	0,25000	0,50621	1,3,4,4	0,33333	0,66852
2,2,5,6	0,00000	0,43301	1,3,5,4	0,00000	0,64979
2,3,3,6	0,25000	0,53033	1,4,4,4	0,00000	0,68313
2,3,4,6	0,00000	0,48734	2,0,5,4	1,00000	0,80622
3,0,3,6	1,00000	0,44721	2,0,6,4	0,50000	0,44721
3,0,4,6	0,66667	0,43885	2,1,4,4	1,00000	1,02470
3,0,5,6	0,33333	0,44721	2,1,5,4	0,50000	0,83666
3,0,6,6	0,00000	0,44721	2,1,6,4	0,00000	0,80622

2. Teoretická část

Kombinace	f	σf	Kombinace	f	σf
3,1,2,6	1,00000	0,53748	2,2,3,4	1,00000	1,11803
3,1,3,6	0,66667	0,57090	2,2,4,4	0,50000	1,00000
3,1,4,6	0,33333	0,61464	2,2,5,4	0,00000	1,02470
3,1,5,6	0,00000	0,64979	2,3,3,4	0,50000	1,04881
3,2,2,6	0,66667	0,60858	2,3,4,4	0,00000	1,11803
3,2,3,6	0,33333	0,68313	3,0,5,4	1,00000	1,67332
3,2,4,6	0,00000	0,74536	3,0,6,4	0,00000	1,34164
3,3,3,6	0,00000	0,77460	3,1,4,4	1,00000	2,09762
4,0,3,6	1,00000	0,67082	3,1,5,4	0,00000	1,94936
4,0,4,6	0,50000	0,70711	3,2,3,4	1,00000	2,28035
4,0,5,6	0,00000	0,80622	3,2,4,4	0,00000	2,23607
4,1,2,6	1,00000	0,80622	3,3,3,4	0,00000	2,32379
4,1,3,6	0,50000	0,89443	0,0,6,3	1,00000	0,44721
4,1,4,6	0,00000	1,02470	0,1,5,3	1,00000	0,64979
4,2,2,6	0,50000	0,94868	0,1,6,3	0,66667	0,44721
4,2,3,6	0,00000	1,11803	0,2,4,3	1,00000	0,74536
5,0,3,6	1,00000	1,34164	0,2,5,3	0,66667	0,61464
5,0,4,6	0,00000	1,61245	0,2,6,3	0,33333	0,43885
5,1,2,6	1,00000	1,61245	0,3,3,3	1,00000	0,77460
5,1,3,6	0,00000	1,94936	0,3,4,3	0,66667	0,68313
5,2,2,6	0,00000	2,04939	0,3,5,3	0,33333	0,57090
0,0,4,5	1,00000	0,26833	0,3,6,3	0,00000	0,44721
0,0,5,5	0,80000	0,25612	0,4,4,3	0,33333	0,60858
0,0,6,5	0,60000	0,12000	0,4,5,3	0,00000	0,53748
0,1,3,5	1,00000	0,34641	1,0,6,3	1,00000	0,67082
0,1,4,5	0,80000	0,36000	1,1,5,3	1,00000	0,92195
0,1,5,5	0,60000	0,30724	1,1,6,3	0,50000	0,65192
0,1,6,5	0,40000	0,21541	1,2,4,3	1,00000	1,11803
0,2,2,5	1,00000	0,36873	1,2,5,3	0,50000	0,90830
0,2,3,5	0,80000	0,40200	1,2,6,3	0,00000	0,80622
0,2,4,5	0,60000	0,37736	1,3,3,3	1,00000	1,16190
0,2,5,5	0,40000	0,33226	1,3,4,3	0,50000	1,01242
0,2,6,5	0,20000	0,25612	1,3,5,3	0,00000	0,92195
0,3,3,5	0,60000	0,39799	1,4,4,3	0,00000	1,02470
0,3,4,5	0,40000	0,37736	2,0,6,3	1,00000	1,34164
0,3,5,5	0,20000	0,33704	2,1,5,3	1,00000	1,94936
0,3,6,5	0,00000	0,26833	2,1,6,3	0,00000	1,67332
0,4,4,5	0,20000	0,36600	2,2,4,3	1,00000	2,23607
0,4,5,5	0,00000	0,32249	2,2,5,3	0,00000	2,09762
1,0,4,5	1,00000	0,40311	2,3,3,3	1,00000	2,32379
1,0,5,5	0,75000	0,31869	2,3,4,3	0,00000	2,28035
1,0,6,5	0,50000	0,17678	0,1,6,2	1,00000	0,80622
1,1,3,5	1,00000	0,48734	0,2,5,2	1,00000	1,02470
1,1,4,5	0,75000	0,44896	0,2,6,2	0,50000	0,70711
1,1,5,5	0,50000	0,39528	0,3,4,2	1,00000	1,11803
1,1,6,5	0,25000	0,31869	0,3,5,2	0,50000	0,89443
1,2,2,5	1,00000	0,51235	0,3,6,2	0,00000	0,67082
1,1,3,5	0,75000	0,50156	0,4,4,2	0,50000	0,94868
1,1,4,5	0,50000	0,48088	0,4,5,2	0,00000	0,80622
1,2,5,5	0,25000	0,44896	1,1,6,2	1,00000	1,61245
1,2,6,5	0,00000	0,40311	1,2,5,2	1,00000	2,04939
1,3,3,6	0,50000	0,50621	1,2,6,2	0,00000	1,61245
1,3,4,5	0,25000	0,50156	1,3,4,2	1,00000	2,23607
1,3,5,5	0,00000	0,48734	1,3,5,2	0,00000	1,94936
1,4,4,5	0,00000	0,51235	1,4,4,2	0,00000	2,04936
2,0,4,5	1,00000	0,53748	0,2,6,1	1,00000	1,61245
2,0,5,5	0,66667	0,42455	0,3,5,1	1,00000	1,94936
2,0,6,5	0,33333	0,30225	0,3,6,1	0,00000	1,34164
2,1,3,5	1,00000	0,64979	0,4,4,1	1,00000	2,04939
2,1,4,5	0,66667	0,59835	0,4,5,1	0,00000	1,61295

2.3.6 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

Úvod

V posledních letech bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species – RNS) a že tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Jde o látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami – mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleovými kyselinami) i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako dezinformační agenti, schopní organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit.²

Volný radikál z „normálních“ molekul vzniká trojím způsobem: hemolytickým štěpením kovalentní (dvouelektronové) chemické vazby, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron, nebo přidáním jednoho elektronu k normální molekule – redukcí, nebo naopak ztrátou jednoho elektronu, což je oxidace. Vznik radikálu může být iniciací celého řetězce dalších reakcí. Obecně bývají radikály vysoce reaktivní částice, protože se snaží doplnit si párový elektron, a tak jsou schopné rychle se navázat na jinou strukturu nebo elektron předat jiné molekule nebo jí ho odejmout. Radikálová reakce se tím propaguje do okolí. Teprve reakcí dvou radikálů se nepárové elektrony spojí ve dvojici a vzniká „normální“ molekula.²

Volným radikálům, které vznikají *in vivo* a mají řadu fyziologických funkcí (např. účast v protizánětlivých reakcích, v procesu fagocytosy), se v současnosti věnuje velká pozornost a sleduje se jejich negativní působení na organismus při řadě onemocnění. Jde především o výše zmíněné ROS a RNS. Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Kaskáda reakcí iniciovaná radikály vede k následným změnám ve struktuře buněk, k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu.⁷

Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku se nazývá oxidační stres. Může být vyvolán nadměrnou produkcí RONS, nedostatečnou funkcí antioxidačního ochranného systému nebo kombinací obou těchto nedostatků.² Reparativní procesy v organismu nemohou samy plně eliminovat poškození biomolekul, významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence, tj. redukce příčin jejich vzniku.⁷

Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem exogenních i endogenních volných radikálů, je působení antioxidantů. Jsou to molekuly, které – jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit – mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek.⁷

Kromě endogenních nízkomolekulárních antioxidantů, jako je glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další, se v poslední době do centra pozornosti řadí mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají společně s potravou. Některé potraviny rostlinného původu tak vedle své nutriční a energetické hodnoty mají důležitou roli jako zdroj antioxidantů. K přírodním látkám s antioxidačními účinky, které jsou přijímané potravou, jsou v prvé řadě tradičně řazeny antioxidační vitaminy C, E a karotenoidy. V poslední době se však mnohem větší význam přikládá dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám. Mezi ně patří např. flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína a aromatické a léčivé rostliny. Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší než příjem antioxidačních vitaminů. V řadě experimentálních studií bylo také prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitaminů. Klinické a epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidační aktivitou

2. Teoretická část

látek přijímaných v potravě a prevenci některých onemocnění např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch nebo procesů stárnutí.⁷

Z uvedených důvodů vzrůstá zájem stanovit antioxidační aktivitu různých látek rostlinného původu. Jeden z přístupů ve výzkumu přírodních antioxidantů je testování reaktivity individuálních izolovaných látek vůči jednotlivým volným radikálům. Slouží především k odvození vztahů mezi strukturou a reaktivitou příslušných sloučenin. Většinu přírodních antioxidantů však přijímáme jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy, mohou též na sebe vzájemně působit (synergicky i inhibičně). Proto je také snaha charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků i jako celku. Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita TAA (total antioxidant activity). TAA je parametrem, který kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály. Tento pojem je však v mnoha publikacích používán v širším významu a rozmanitost používaných metod při jejím stanovení je značná.⁷

2.3.6.1 Stanovení antioxidační aktivity

V literatuře lze nalézt velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Obecně mohou být kategorizovány do dvou skupin:

- na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály (př. metoda používající DPPH viz dále);
- na metody posuzující redoxní vlastnosti látek (př. metoda FRAP viz dále).⁷

Princip

Stanovení antioxidační aktivity látek metodou sekvenční injekční analýzy (SIA) se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu.⁸

Počítačem kontrolovaný systém sekvenční injekční analýzy vybavený spektrofotometrickým detektorem diodového pole je používán pro rychlé monitorování a vyhodnocení antioxidační aktivity biologických vzorků. Automatizovaná metoda je založena na známé reakci stabilního 2, 2'- difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálu (DPPH) a antioxidanty v organických nebo vodně-organických médiích, kterou se odbarví roztok DPPH. Tento radikál je zhasen reakcí s antioxidační látkou, která je donorem vodíkového atomu. Pokles absorbance DPPH měřené při 525 nm souvisí s koncentrací antioxidantu v testovaném vzorku (v porovnání se slepým vzorkem provedeným s roztokem voda-ethanol 1 : 1 namísto s testovaným roztokem). Při použití vody jako nosného proudu byly píky DPPH ve vodno-ethanolovém roztoku nepravidelného tvaru. Výsledky byly nereprodukovatelné. Tento problém byl vyřešen nahrazením vody vodným roztokem 50% ethanolu jako nosného proudu.⁸

Příprava roztoků

Pro přípravu vodných roztoků se používá vysoce čištěná deionizovaná voda. Ethanol 50% se před použitím v SIA systému odplyní v ultrazvukové lázni po dobu pěti minut. Roztok slouží jako slepý vzorek a v systému SIA jako nosný proud. Roztok DPPH v 50% ethanolu o koncentraci 0,0001 M se připraví rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% ethanolu ve 100 ml odměrné baňce (k úplnému rozpuštění je třeba použít pětiminutové sonikace) a doplněním vodou na 100 ml. Po dalším pětiminutovém odvzdušnění se odměrná baňka zatemní zabalením do alobalu a uchovává v chladu. Roztok DPPH se připravuje vždy čerstvý, tedy v den měření. Měřený vzorek se připraví rozpuštěním lyofilizátu (frakce) v 50% ethanolu, aby vznikla koncentrace 1 mg/ml, roztok se sonikuje po dobu jedné minuty a důkladně protřepe. Dále se postupným ředěním připraví koncentrace 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml tohoto vzorku. Nižší koncentrace jsou rovněž odplyněny v ultrazvukové lázni.⁸

Přístroje

Měření probíhá na systému pro sekvenční injekční analýzu (SIA) FIA Lab[®] 3000, vybaveným pístovým čerpadlem s objemem 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, mísící cívkou, průtokovou detekční celou, detektorem, halogenovou lampou, spojovacími hadičkami. Zařízení je propojeno s počítačem a prostřednictvím programu FIA Lab for Windows 5.0 se celý proces analýzy řídí. Před začátkem měření se zapne zdroj světla a lampa se nechá 5 minut žhavit, aby byl světelný paprsek konstantní intenzity.

Technika SIA používá princip, jehož charakteristickým rysem jsou oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně (jednorázově) aspirovány do jednonábového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je dopraven do detektoru, tím je jeden cyklus ukončen. V tomto jednoduchém případě je získán výsledný analytický signál ve formě píku, v podstatě se jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem.

Rychlost, jednoduchost, flexibilita a plná automatizace předurčují techniku AIA jako velmi vhodný prostředek všude tam, kde je nutno analyzovat velké série vzorků, sledovat změny koncentrace důležitých analytů v průběhu různých procesů.⁸

Antioxidační účinek je vyjádřen v procentech poklesu absorbance oproti slepému vzorku:

$$C_{\text{prům. vzorku}}/C_{\text{prům. DPPH}} \cdot 100 = X$$

$$100 - X$$

Princip

FRAP metoda je jednoduchá, spolehlivá, spektrofotometrická metoda, založená na schopnosti antioxidantů redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} . Fe^{2+} jsou měřeny spektrofotometricky měřením barevného (modrého) komplexu s 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ), jehož absorpční maximum je při 595nm.²⁷



Postup

Všechny experimenty byly dělány dle článku (O. Firuzi, 2005).²⁶ Na mikrodestičku typu P (Brand 400 μl , Fisher) se nanese do 4 jamek 25 μl látky v různé koncentraci 10-200 μM . Všechny látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu nebo methanolu (3mg/3ml). Nižší koncentrace 200-10 μM byly připraveny ředěním v acetátovém pufru pH 3,6. Reakční FRAP roztok 175 μl , vždy čerstvě připraven a zahřát na 37 $^{\circ}\text{C}$, byl přidán k látkám do třech jamek, do čtvrté pak bylo přidáno 175 μl acetátového pufru (slepý vzorek). Absorbance 595nm byla měřena na přístroji Microplate reader (Anthos 2010) v různých časových intervalech až po dobu 120 min. Změna absorbance $\Delta A_{595\text{nm}}$ byla počítána jako rozdíl absorbance slepého vzorku (substance + acetátový pufr) a směsí (175 μl FRAP roztoku +25 μl acetátového pufru) a absorbance antioxidantů pro každý časový interval. Všechny látky byly testovány nejméně třikrát při 37 $^{\circ}\text{C}$. Hodnota FRAP v čase t byla počítána dle vzorce

$$\text{FRAP}_t (\text{M}) = (\Delta a_t \text{FI} / \Delta a_t \text{Fe}^{2+}) \times 10^{-5}$$

Kde Δa_t FI je změna v časovém intervalu t (4 a 60 minut) vztažená k testované látce při koncentraci 1×10^{-5} M a Δa_t Fe²⁺ je změna absorbance ve stejném časovém intervalu vztažená na železnaté ionty při stejné koncentraci. Jako standardy byly využity známé antioxidanty, jako je trolox, askorbová kyselina nebo (+)-katechin.

Statistická analýza byla vyhodnocena za užití software SigmaPlot 2002 pro Windows verze 8.0.

Přístroje

Jedná se o FRAP metodu modifikovanou za využití mikrodestiček. Destičky typu P 400 μ l, byly získány od firmy Fisher. Všechna měření proběhla na přístroji Microplate reader (Anthos 2010).

2.4 METODY POUŽITÉ K TESTOVÁNÍ

2.4.1 EXTRAKCE

Extrakce je založena na principu distribuce látky mezi dvě fáze a základě jejich různé rozpustnosti. Extrakcí tuhé látky kapalinou se selektivně převádějí některé složky směsi tuhých látek do vhodných rozpouštědel a to buď na základě pouhého fyzikálního principu rozpouštění anebo v kombinaci s chemickou reakcí (např. extrakce alkaloidů roztoky kyselin). Extrakce představuje první krok při izolaci látek.³

2.4.2 FILTRACE ZA SNÍŽENÉHO TLAKU (ODSÁVÁNÍ)

V průběhu filtrace dochází k oddělování pevné fáze od fází ostatních pomocí propustného materiálu, který pevnou fázi zachycuje a dovoluje vstup fázím ostatním. Nejběžnější filtrační operací je odsávání. Při něm se nejčastěji používá Büchnerova nálevka, kdy při práci musí být položen filtr na perforované desce nálevky. Aby dokonale přilnul, lze ho smočit rozpouštědlem (v němž je připraven roztok filtrované látky). Rychlost filtrace je výrazně snížena tím, že k přestupu kapaliny otvory ve filtru dochází prakticky jen v místech, kde je filtrační papír v kontaktu s otvory nálevky. Filtrovanou suspenzi je třeba na filtr pravidelně dolívat, aby byl koláč stále pod hladinou kapaliny a nevznikaly trhliny, které způsobují nestejnou odsátí zbylé kapaliny.³

2.4.3 ODPAŘOVÁNÍ ZA SNÍŽENÉHO TLAKU

Při odpařování je prioritní zájem na získání pevného odparku, nepoškozeného a v žádané konzistenci. Tento postup nalezl uplatnění při zahušťování extraktů, chromatografických frakcí atd. Odparky jsou v současnosti používány velmi obsáhle. Baňka s odpařovanou tekutinou, otáčející se v šikmé poloze kolem své osy je připojena k účinnému vodnímu chladiči prostřednictvím motorové jednotky. Rotací se na vnitřní ploše neustále obnovuje film kapaliny a za současného stejnoměrného ohřevu baňky ve vodní lázni probíhá odpařování z tohoto velkého povrchu stejnoměrně a rychle. K těsnění se používají běžná mazadla, pokud je kontaminace zcela nežádoucí, pak je nutné zvolit např. teflonové manžety. Dostačující zdroj vakua poskytuje chemické membránové čerpadlo, nebo voní vývěva s pod tlakem 1 - 1,5 kPa.³

2.4.4 CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie je fyzikálně-chemický separační proces, používaný k dělení směsi látek na jednotlivé složky. V jeho průběhu se tyto složky (anebo alespoň některá z nich) pohybují nestejnoměrně v systému dvou fází: Stacionární (adsorbent) a mobilní (rozpuštědlo, eluent). Má tři základní fáze: nanesení vzorku, dělicí proces a detekci.³

2.4.4.1 Kolonová (sloupcová) chromatografie

Při kolonové pracovní metodice se směs látek, určená k dělení, vnese vhodným způsobem na adsorbent v chromatografické trubici, na kolonu se vlévá eluent, který z kolony vytéká (a obsahuje komponenty dělené směsi), nazývá se eluát a jímá se po frakcích konstantního objemu.³

2.4.4.2 Chromatografie v plošném uspořádání

Adsorbent (stacionární fáze) je při této metodě nanesen ve vrstvě určité tloušťky na neutrální podložce (skleněná deska, kovová fólie) (tenkovrstvá chromatografie), nebo zároveň podložku tvoří (papírová chromatografie).³

- **Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)**

Dělení směsi látek probíhá na základě kapilárního nasávání rozpouštědla stacionární fází, protože deska je svou dolní hranou ponořena do eluční soustavy v chromatografické nádobě. Přitom se uplatňují podle povahy sorbentů a složení mobilní fáze všechny známé principy chromatografického dělení a to buď každý sám nebo ve vzájemné kombinaci. Tento typ umožňuje výkonné dělení (pracuje se 400 až 3000 teoretickými patry) podle charakteru systému a způsobu provedení. Využití tenkovrstvé chromatografie je hlavně kvalitativně-analytické, tedy pro rychlou kontrolu jiných způsobů dělení (destilace, sloupcové chromatografie, rekrystalizace aj.).³

- **Preparativní chromatografie (PTLC)**

Preparativní chromatografie byla po dlouhou dobu velmi oblíbenou izolační metodou, zejména kvůli své jednoduchosti a univerzálnosti. V poslední době se však dostává do pozadí kvůli rozvoji HPLC. Na rozdíl od ní sel PTLC nevyžaduje drahé vybavení, separace může být provedena rychle a množství izolovaného materiálu je zpravidla v rozmezí 1 mg – 1 g, což stačí pro objasnění struktury. Obecně platí, že pro separaci by směs měla obsahovat maximálně 4 hlavní složky, jinak rozdělení nebude efektivní.

Separace se provádí buď na komerčně dostupných TLC deskách nebo na deskách připravených ručně v laboratořích. U komerčně dostupných TLC se jako sorbenty používá silikagel, hliník, celulóza a jsou většinou tloušťky 0,5; 1,0 a 2,0 mm. Tyto desky mají vysoce specifický, homogenní povrch a dávají vynikající výsledky.

Levnější je příprava vlastních desek v laboratořích, která dovoluje velkou přizpůsobivost co do výběru sorbetu, nabízejí širší možnosti pro experimentování. Lze si také vybrat sorbent s nebo bez UV indikátoru a je možné taky vpravit nějaké aditiva, která zvýší separaci do sorbetu.

Vzorek, který má být dělen se rozpustí v minimu vhodného rozpouštědla. Je možné si tužkou vyznačit (ale nepoškodit sorbent) tenkou linku přibližně 1,5 cm nad koncem desky, aby byl vzorek nanesen rovně v tenké linii. Je to nezbytné, aby se během vyvíjení pak vzorek rozdělil do stejných, vodorovných pásků jednotlivých sloučenin. K nanášení se používá mikrostříkačka, kapilára nebo Pasteurova pipeta.⁴

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 CHARAKTERISTIKA ZPRACOVÁVANÉHO MATERIÁLU

Ke zpracování byly použity sušené listy *Helianthus annuus* L., získané legálním sběrem na poli soukromého zemědělce v obci Rohozec u Kutné Hory v červenci 2004. Rostliny dle čestného prohlášení pěstitele nebyly chemicky ošetřeny. Rostlinný materiál byl sušen na Katedře Farmaceutické botaniky a ekologie a byl drcen na kladivovém mlýnu, jeho konečná hmotnost činila 5 kg. Pro účely této diplomové práce bylo zpracováno 400 g.

3.2 CHEMIKÁLIE, CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL A PŘÍSTROJE

3.2.1 ROZPOUŠTĚDLA

Aqua destillata (aq. destillata)

Chloroform p.a. (CHCl₃)

Ethanol 96 % (Et-OH)

n-Butylalkohol p.a.

Aceton p.a

3.2.2 CHEMIKÁLIE

Síran sodný

2,2'-difeny-1-pikryl hydrazyl radikál (DPPH)

2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ)

Vanilin

Kyselina chloristá

3.2.3 CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL

TLC hliníková fólie silikagel 60 F254 20x20 cm, tloušťka vrstvy 0,2 mm (Merck)

Silufol UV 254/366 – 150x150 mm (Kavalier Sázava)

3.2.4 PŘÍSTROJE

Analytické váhy HR-120
Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER 10P (Bandelin)
Elektrický vaříč Fischer Scientific
UV lampa CAMAG
Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114
Přístroj na měření antioxidační aktivity FIA Lab®
Přístroj na měření antioxidační aktivity Microplate reader (Anthos 2010)
Pumpa Knauer Preparative pump K-1800
Detektor Knauer Dad K-2700
Kolektor Fraction collector B-684
Digitální stopky Q & Q
Počítač

3.2.5 LABORATORNÍ SKLO

Kádinky různých objemů
Zkumavky
Stojan na zkumavky
Destilační baňky
Büchnerova nálevka
Dělicí nálevky
Petriho misky různého průměru
Pipety
Automatická pipeta
Filtrační papír
Pinzeta entomologická

3.2.6 VYVÍJECÍ SOUSTAVY A DETEKČNÍ ČINIDLA

Vyvíjecí soustavy

- S1:** čistý CHCl_3
- S2:** CHCl_3 : Et-OH 7:3
- S3:** CHCl_3 : Et-OH 8:2
- S4:** CHCl_3 : Et-OH 8,5:1,5
- S5:** CHCl_3 : Et-OH 9:1
- S6:** CHCl_3 : Et-OH 6:4

Detekční činidlo **D1:** 1 % roztok vanilinu v čistém Et-OH : 3 % kys. chloristá 1:1

Po postřiku detekčním činidlem byl chromatogram zahříván nad elektrickým vaříčem.

3.3 POSTUP PŘÍPRAVY EXTRAKTU

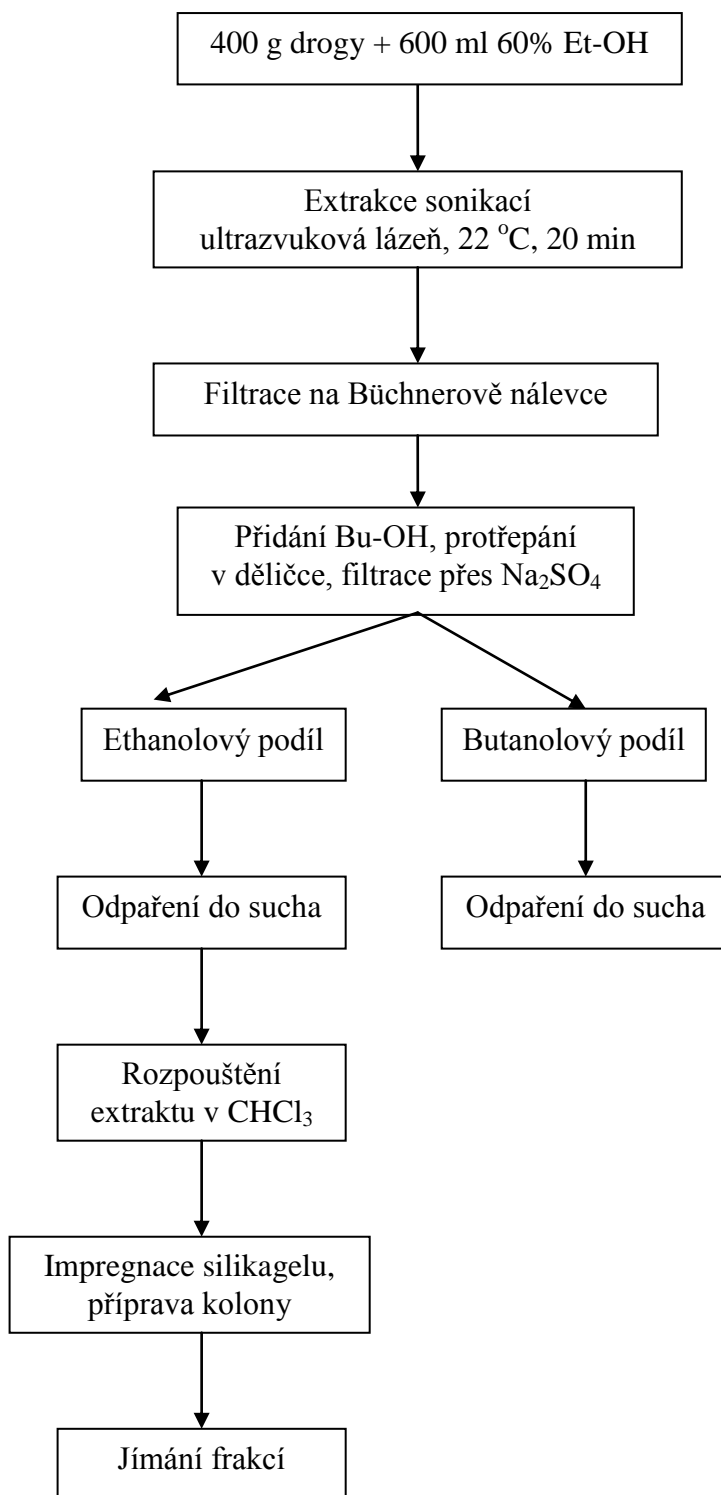
K 400 g drogy bylo přidáno 2,4 l 60% Et-OH (předem připravený zředěním 95% ethanolu a destilované vody). Listy byly spolu s ethanolem přemístěny do Erlenmeyerovy baňky a extrakce probíhala sonikací v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě, stupni intenzity nastaveném na 10, po dobu 20 minut. Poté byl extrakt odfiltrován od pevného podílu drogy na Büchnerově nálevce, použitím vodní vývěvy, a částečně odpařen na vakuové odparce. K 128 ml kapalného extraktu, který byl takto získán, bylo přidáno do dělicí nálevky stejné množství n-butanolu, dohromady bylo vše protřepáno a ponecháno ustát. Poté byl přes síran sodný zfiltrován a oddělen ethanolový podíl a odpařen do sucha na rotační odparce za sníženého tlaku (1,067 kPa) při teplotě do 50 °C.

Takto připravený extrakt bylo možné využít jako výchozí materiál pro separaci obsahových látek sloupcovou chromatografií.

Dělení probíhalo na silikagelové sloupcové koloně. Délka kolony byla 75 cm a průměr 3,5 cm. Bylo zpracováno 5,7527 g suchého extraktu. Silikagel byl zbaven vody zahříváním 4 h při 160 °C a následně upraven na obsah vody 12 %. Množství aktivovaného silikagelu na koloně činilo 400 g. Dále byl připraven roztěr na kolonu. Suchý extrakt byl rozpuštěn v minimálním množství CHCl_3 , poté bylo přidáno 25 g silikagelu a směs byla odpařena do sucha na porcelánové misce, za občasné homogenizace.

Jako eluční činidlo pro silikagelovou kolonu byl použit čistý CHCl_3 . Dále se postupovalo s chloroformem se zvyšujícím se procentem Et-OH a končilo se 95% Et-OH. Bylo získáno 34 frakcí a provedena TLC v soustavě S1, S2, S3 s detekcí D1. Ty, které se ukázaly na základě TLC jako vhodné, byly dále zpracovány.

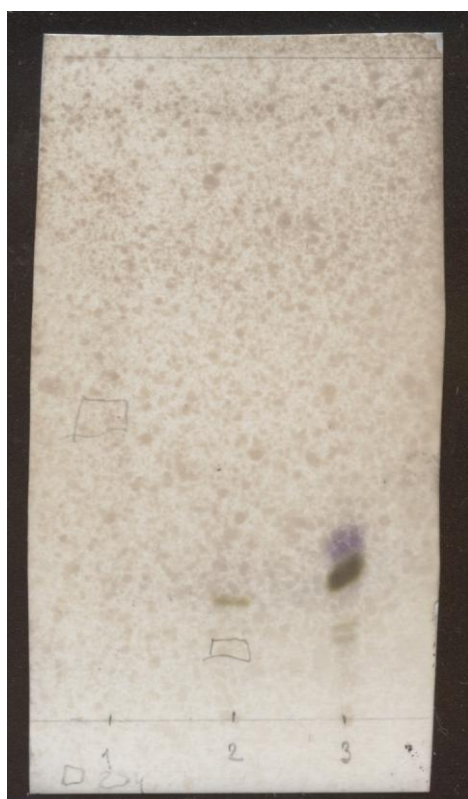
3.4 SCHÉMA ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU



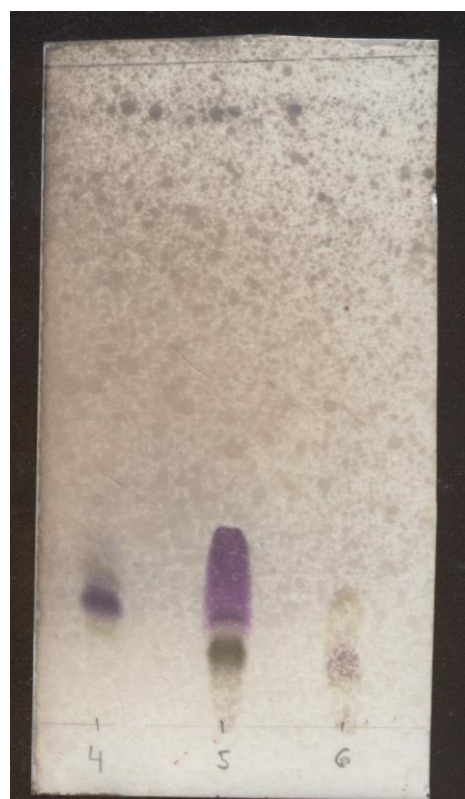
Tab. 3

Číslo frakce	Barva	Chloroform s x % Et-OH
1	světle žlutá	čistý chloroform
2	světle zelená	čistý chloroform
3	tmavě zelená	čistý chloroform
4	hnědo - oranžová	čistý chloroform
5	tmavě zelená	čistý chloroform
6	žluto - zelená	čistý chloroform
7	hnědo - černá	čistý chloroform
8	žluto - hnědá	čistý chloroform
9	světle zelená	1 % Et-OH
10	světle zelená	1 % Et-OH
11	tmavě zelená	2 % Et-OH
12	tmavě zelená	2 % Et-OH
13	zeleno - hnědá	5 % Et-OH
14	světle hnědá	7 % Et-OH
15	oranžovo - hnědá	10 % Et-OH
16	oranžovo - hnědá	10 % Et-OH
17	hnědo - oranžová	10 % Et-OH
18	hnědo - oranžová	12 % Et-OH
19	hnědo - oranžová	12 % Et-OH
20	hnědo - oranžová	15 % Et-OH
21	hnědo - oranžová	25 % Et-OH
22	oranžovo - hnědá	30 % Et-OH
23	oranžovo - žlutá	30 % Et-OH
24	žluto - oranžová	35 % Et-OH
25	tměvě - žlutá	45 % Et-OH
26	tmavě - žlutá	45 % Et-OH
27	tmavě žlutá	45 % Et-OH
28	tmavě žlutá	50 % Et-OH
29	žluto - oranžová	50 % Et-OH
30	žluto - oranžová	50 % Et-OH
31	žluto - oranžová	50 - 60 % Et-OH
32	žluto - oranžová	100 % Et-OH
33	žluto - oranžová	100 % Et-OH
34	světle oranžová	100 % Et-OH

Detekce pod UV $\lambda = 254 \text{ nm}$
 $\lambda = 365 \text{ nm}$



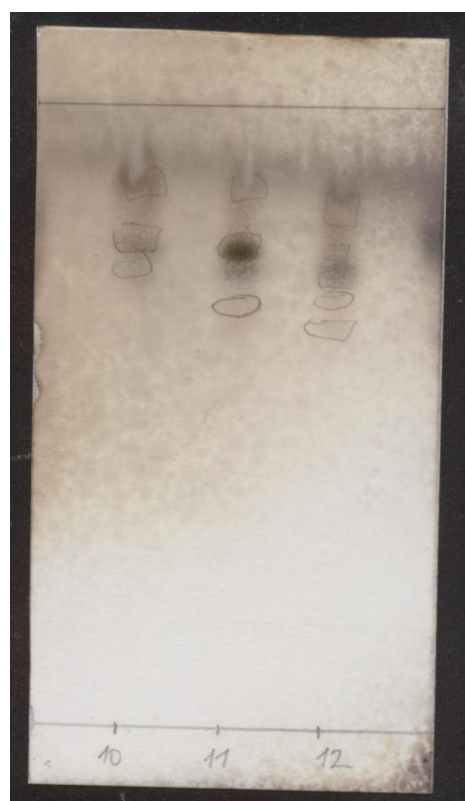
Obr. 5: S1, D1



Obr. 6: S1, D1



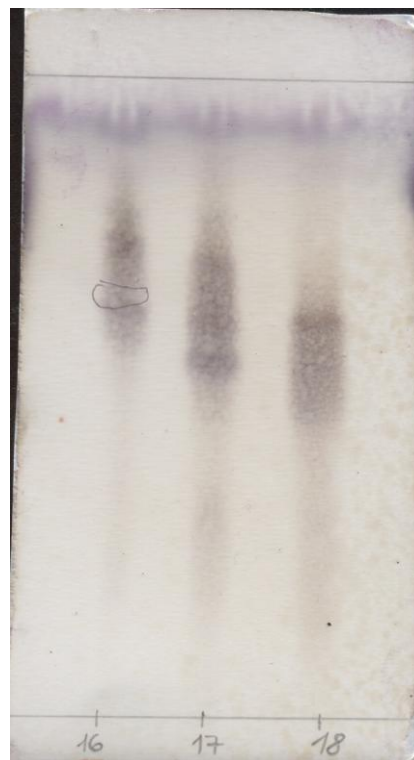
Obr. 7: S3, D1



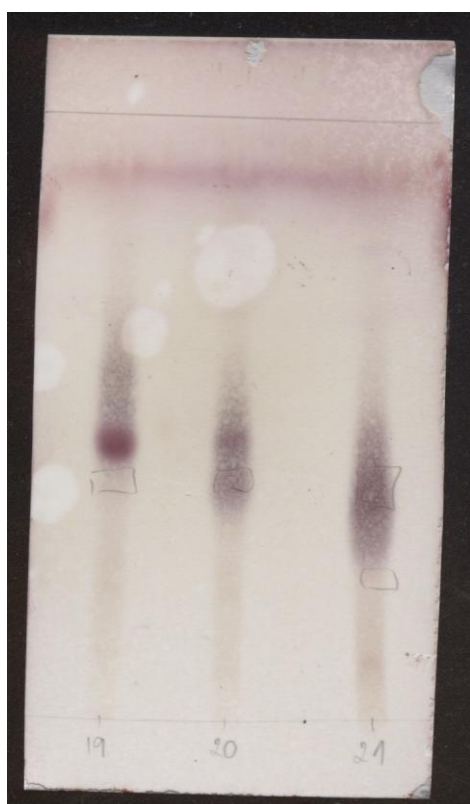
Obr. 8: S3, D1



Obr. 9: S2, D1



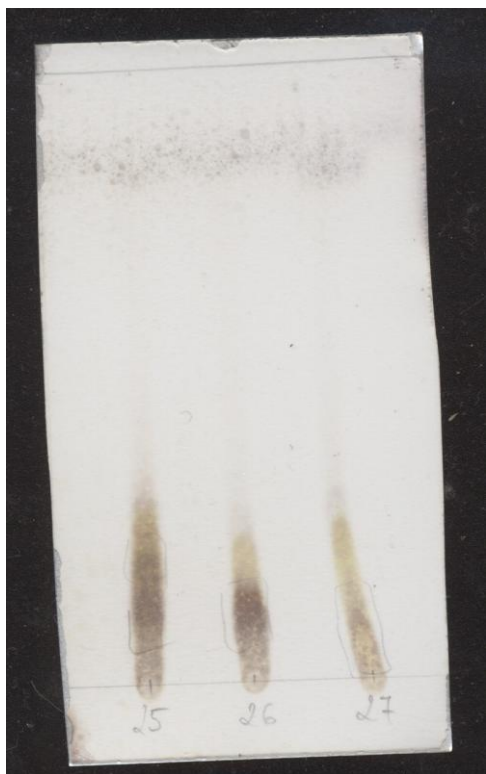
Obr. 10: S3, D1



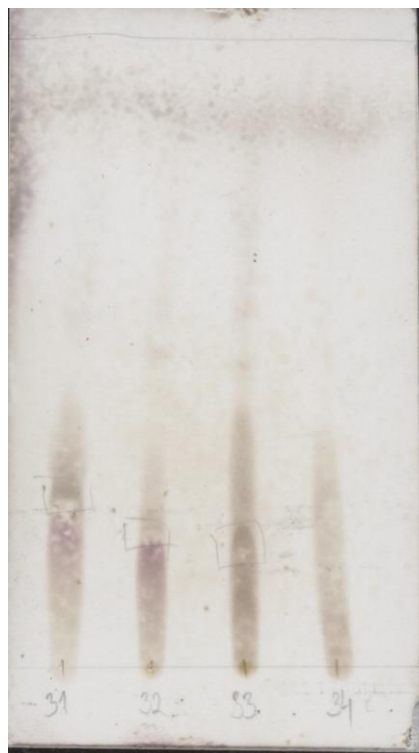
Obr. 11: S3, D1



Obr. 12: S3, D1



Obr. 13: S3, D1



Obr. 14: S3, D1

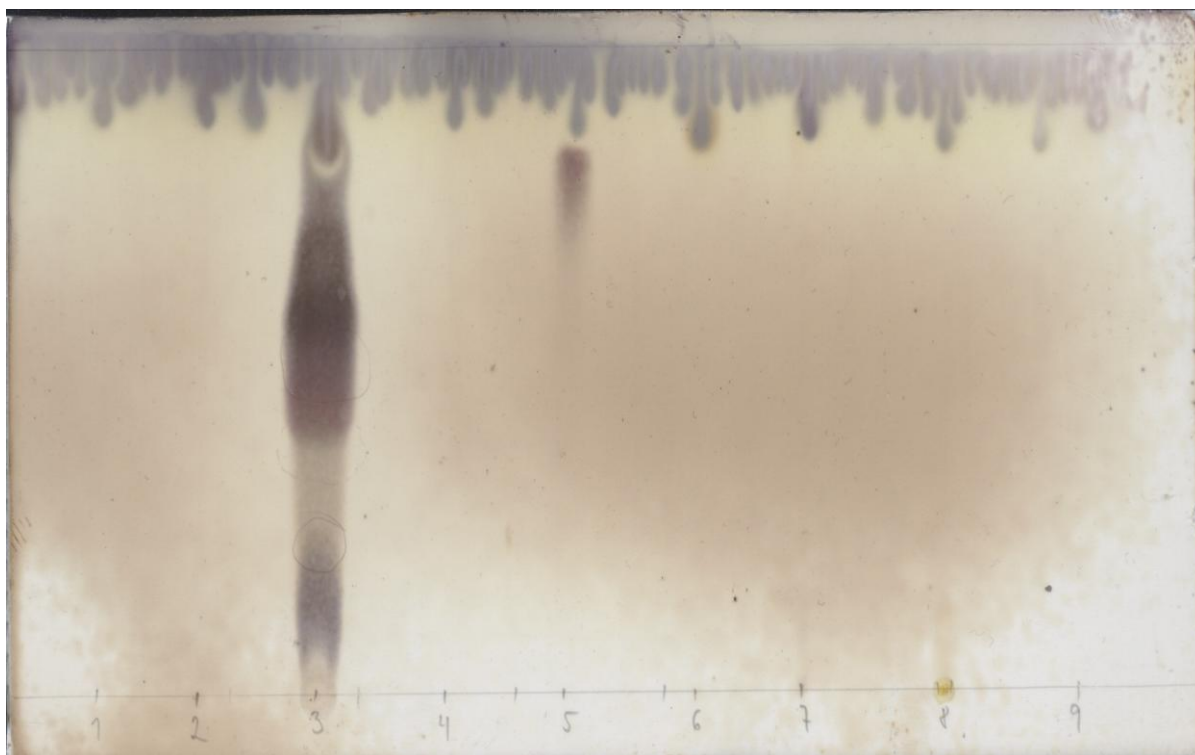


Obr. 15: S3, D1

3. Experimentální část

Frakce HEA 22-24 (vznikla spojením frakce 22., 23., 24. viz dále) byla testována na přítomnost flavonoidů. Na chromatogram byly naneseny tyto látky:

- 1 - kyselina skořicová
- 2 - apigenin
- 3 - vzorek HEA 22-24
- 4 - kyselina chlorogenová
- 5 - kyselina kávová
- 6 - naringenin
- 7 - kvercetin
- 8 - kaempferol



Obr. 16: S6, D1

3.5 IZOLACE LÁTEK POMOCÍ PREPARATIVNÍ CHROMATOGRRAFIE

Sloupcovou chromatografií bylo získáno 34 frakcí, které byly částečně odpařeny na rotační odparce za sníženého tlaku (1,067 kPa) při teplotě do 50 °C. Frakce, které měly porovnáním TLC shodné zastoupení obsahových látek, byly spojeny. Ty, které byly na základě TLC vhodné, byly dále zpracovány.

Spojením 19., 20., 21. frakce vznikla nová s označením HEA 19-21 a spojením 22., 23., 24. frakce vznikla frakce HEA 22-24.

Frakce HEA 19-21 byla odpařena na vakuové odparce do sucha a poté rozpuštěna v 2 ml CHCl_3 . Takto byl získán vzorek k nanášení. Fólie k vyvíjení byly nejdříve impregnovány v soustavě S2 a vysušeny. Vyvíjení chromatogramu probíhalo ve stejné soustavě jako impregnace.

Po vyjmutí a vysušení chromatogramu byly pod UV lampou označeny jednotlivé rozdělené látky (zóny). Chromatogram byl pak rozstříhán na jednotlivé zóny, které byly rozděleny do kádinek s 30 ml CHCl_3 a 10 min se protřepávalo, aby došlo k uvolnění vyizolované látky z fólie. Pak byla tekutina zfiltrována do vytárovaných a označených baněk a odpařena do sucha na vakuové odparce.

U frakce HEA 22-24 byl odparek rozpuštěn v 5 ml CHCl_3 a 1 ml Et-OH. Následný postup byl shodný s HEA 19-21.

VÝSLEDKY

Frakce HEA 19-21:

- Naneseny 3 chromatogramy
- Pod UV lampou (254 nm) zakresleny 3 pruhy
 1. zóna - světle fialový (nejblíže startu)
 2. zóna - tmavě žlutý
 3. zóna - světle žlutý
- Po rozstříhání a zfiltrování
 - kádinka 1: 1. zóna + 15 ml CHCl_3
 - kádinka 2: 2. zóna + 30 ml CHCl_3
 - kádinka 3: 3. zóna + 30 ml CHCl_3
 - kádinka 4: spojená 1. zóna z 2. a 3. chromatogramu + 30 ml CHCl_3
- Po odpaření váha látek
 - 1: $m_1 = 0,0056 \text{ g}$
 - 2: $m_2 = 0,0280 \text{ g}$
 - 3: $m_3 = 0,0291 \text{ g}$
 - 4: $m_4 = 0,0042 \text{ g}$

Frakce HEA 22-24:

- Naneseno 21 chromatogramů
- Pod UV lampou zakresleny 4 pruhy
 - 254 nm: 1. zóna zhasí fluorescenci
 - 365 nm: 2. zóna - fialový
 3. zóna - světle žlutý
 4. zóna - bílý

3. Experimentální část

- Po rozstříhání a zfiltrování kádinka **1, 2, 3, 4** + 50 ml CHCl_3 a 10 ml Et-OH
- Po odpaření váha látek
1: $m_1 = 0,0055$ g
2: $m_2 = 0,0160$ g
3: $m_3 = 0,0146$ g
4: $m_4 = 0,0034$ g

Obě frakce byly naneseny spolu na chromatogram pro srovnání.



Obr. 17: S2, D1 1, 2, 3, 4 patří k HEA 19-21
1, 2, 3, 4 v kroužku patří k HEA 22-24

Po zhodnocení uvedeného chromatogramu byly níže uvedené frakce dále testovány:

1. měření antioxidační aktivity metodou SIA:
frakce HEA 19-21
frakce HEA 22-24
frakce 29

Pozn.: Frakci 29 tvořily všechny dále nezpracované frakce z původní kolony.

2. měření antioxidační aktivity metodou FRAP, dle výsledků měření metodou SIA
3. antifungální aktivita:
frakce HEA 19-21
frakce HEA 22-24
frakce 29

3. Experimentální část

4. akutní toxicita:
frakce 29
vodný podíl (převzat od Zuzany Novosadové, DP 2006)
butanolvý podíl
5. pomocí HPLC rozdělit frakci HEA 22-24/2 v kroužku na dvě látky

4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ

4.1 VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Měření antioxidační aktivity probíhalo na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, při laboratorní teplotě 21 °C.

4.1.1 METODA SIA

Měření probíhalo na systému pro sekvenční injekční analýzu (SIA) FIA Lab[®] 3000. Zařízení je propojeno s počítačem a prostřednictvím programu FIA Lab for Windows 5.0 se celý proces analýzy řídí. V následující tabulce jsou uvedeny naměřené hodnoty.

Tab.4

Název frakce	Naměřené hodnoty	Průměr
Slepý vzorek	0,3963	0,3878
	0,3797	
	0,3873	

Tab.5

Název frakce	Koncentrace (mg/ml)	Naměřené hodnoty	Průměr	Pokles absorbance v %
HEA 19 - 21	1	0,3276	0,3229	16,8
		0,3226		
		0,3184		
	0,5	0,3385	0,3326	14,2
		0,3307		
		0,3286		
	0,25	0,3500	0,3469	10,5
		0,3440		
		0,3466		
	0,1	0,3542	0,3513	9,4
		0,3492		
		0,3504		
HEA 22 - 24	1	0,2497	0,2377	38,7
		0,2319		
		0,2315		
	0,5	0,2780	0,2648	31,7
		0,2578		
		0,2574		
		0,2754		
		0,2595		
		0,2609		

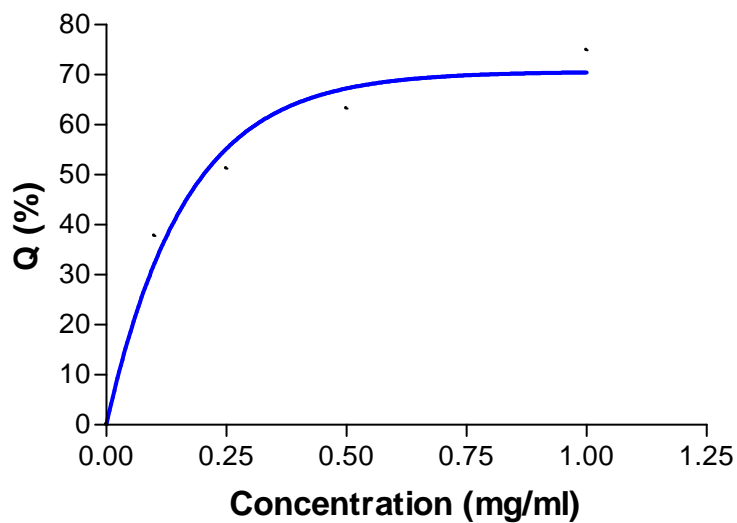
4. Výsledky měření

	0,25	0,3085	0,3010	22,4
		0,2978		
		0,2967		
	0,1	0,3334	0,3269	15,7
		0,3239		
		0,3235		
FRAKCE 29	1	0,1098	0,0973	74,9
		0,0910		
		0,0911		
	0,5	0,1534	0,1429	63,2
		0,1381		
		0,1371		
FRAKCE 29	0,25	0,2028	0,1892	51,2
		0,1818		
		0,1811		
		0,2046		
		0,1823		
		0,1823		
FRAKCE 29	0,1	0,2553	0,2414	37,8
		0,2366		
		0,2356		
		0,0000		
		0,2417		
		0,2377		

Významný pokles absorbance byl naměřen pouze u frakce 29. EC_{50} byla proto vypočítána jen pro tento vzorek.

Frakce 29: $EC_{50} = 0,202$ mg/ml

fr. 29



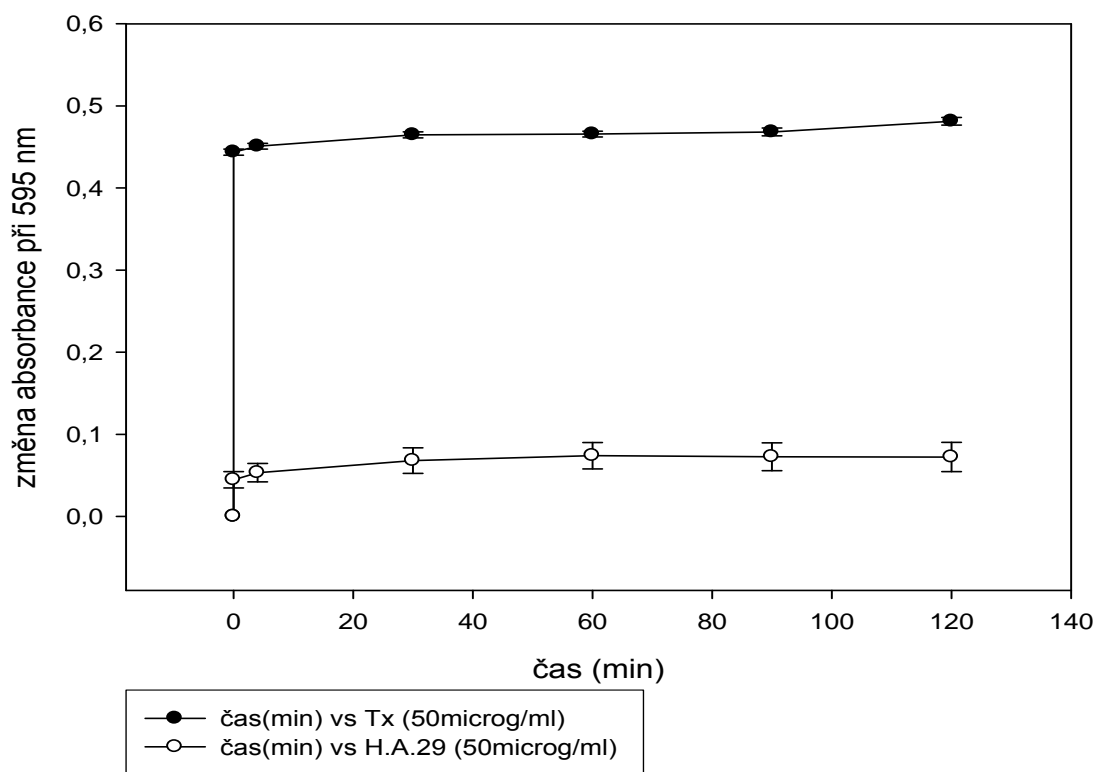
4.1.2 METODA FRAP

K měření byl použit přístroj Microplate reader (Anthos 2010). Podle výsledků měření antioxidační aktivity metodou SIA byla alternativní metodou měřena antioxidační aktivita pouze u frakce 29. V následující tabulce je uvedena změna absorbance za čas za přítomnosti vzorku.

Tab.6

Vzorek č.	FRAP value 4 min (μM)	FRAP value 60 min (μM)
29	1,06	1,45
trolox	16,7	18,16

Graf 1



4.2 VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITY

Měření antifungální aktivity probíhalo ve spolupráci s Katedrou biologických a lékařských věd metodou mikrodilučního bujónového testu.

4.2.1 METODA MIKRODILUČNÍ BUJÓNOVÁ V DESTIČKÁCH – M27A-M1 (200 + 10)

Médium: RPMI 1640 s glutaminem

Délka inkubace: 24 - 48h (u TM 48h-72h)

Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra

Odečítání: vizuální / fotometrické (od 540nm); MIC = IC₈₀ (80% inhibice kontroly)

pH / pufr: 7,0 / MOPS (0,165M)

Teplota: 35°C

Testované kmeny (kód, číslo)

1.**CA1** -*Candida albicans* ATCC 44859

2.**CT** -*Candida tropicalis* 156

3.**CK2** -*Candida krusei* E28

4.**CG** -*Candida glabrata* 20/I

5.**TB** -*Trichosporon beigelii* 1188

6.**TM** -*Trichophyton mentagrophytes* 445

7.**AF** -*Aspergillus fumigatus* 231

8.**AC** -*Absidia corymbifera* 272

Na antifungální aktivitu byla testována pouze frakce 29. V následující tabulce jsou uvedeny naměřené hodnoty MIC/IC80 (μmol.l⁻¹) pro jednotlivé testované kmeny.

Tab.7

KMEN	ČAS	MIC/IC80
CA	24h	>256
	48h	>256
CT	24h	>256
	48h	>256
CK	24h	>256
	48h	>256
CG	24h	>256
	48h	>256
TB	24h	>256
	48h	>256
AF	24h	>256
	48h	>256
AC	24h	>256
	48h	>256
TM	72h	>256
	120h	>256

Z této tabulky tedy vyplývá, že testovaná frakce 29 nemá antifungální aktivitu.

4.3 VÝSLEDKY MĚŘENÍ AKUTNÍ TOXICITY

Stanovení akutní toxicity alternativní metodou zástava pohybu červů *Tubifex tubifex* byla prováděna na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, při laboratorní teplotě 21 °C. Nitěnky byly použity z chovu na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie.

Tab. 8 Výsledky testu akutní toxicity frakce 29

Frakce 29	Koncentrace (g/ml)	Počet nehybných červů po 3 min expozice	Počet nehybných červů po 1 min v destilované vodě
Základní roztok	0,1	6 6 6	6 6 6
1. ředění	0,075	6 6 6	6 6 6
2. ředění	0,0563	6 6 6	6 6 5
3. ředění	0,0422	6 6 5	4 3 3
4. ředění	0,0316	2 3 1	1 1 0
5. ředění	0,0237	1 0 0	0 0 0

Tab. 9 Výsledky testu akutní toxicity vodného podílu

Vodný podíl	Koncentrace (g/ml)	Počet nehybných červů po 3 min expozice	Počet nehybných červů po 1 min v destilované vodě
Základní roztok	0,1	6 6 6	6 6 6
1. ředění	0,075	6 6 6	6 6 6
2. ředění	0,0563	5 6 6	4 5 5
3. ředění	0,0422	3 1 1	3 1 0
4. ředění	0,0316	0 0 0	0 0 0

Tab. 10 Výsledky testu akutní toxicity butanolového podílu

Butanolový podíl	Koncentrace (g/ml)	Počet nehybných červů po 3 min expozice	Počet nehybných červů po 1 min v destilované vodě
Základní roztok	0,1	6 6 6	6 6 6
1. ředění	0,075	6 6 6	6 4 5
2. ředění	0,0563	5 5 6	1 0 0
3. ředění	0,0422	4 2 2	0 0 0
4. ředění	0,0316	0 0 0	0 0 0

4. Výsledky měření

Tab. 11 Výsledky testu akutní toxicity referenční látky

MnCl₂ · 4H₂O	Koncentrace (g/ml)	Počet nehybných červů po 3 min expozice	Počet nehybných červů po 1 min v destilované vodě
Základní roztok	0,088	6 6 6	6 6 6
1. ředění	0,0697	6 6 6	6 6 6
2. ředění	0,0552	6 6 6	6 6 6
3. ředění	0,0437	6 6 6	6 6 6
4. ředění	0,0346	6 6 5	4 4 3
5. ředění	0,0274	1 2 1	0 1 0
6. ředění	0,0217	0 0 0	0 0 0

Tab. 12 Výsledná tabulka testu akutní toxicity

Zkoumaná látka	EC₅₀ (g/ml) (L_{1,2})	LC₅₀ (g/ml) (L_{1,2})
Frakce 29	0,0332 (0,0289 - 0,0382)	0,0409 (0,0349 - 0,0479)
Vodný podíl	0,0458 (0,0407 - 0,0515)	0,0488 (0,0426 - 0,0560)
Butanolový podíl	0,0443 (0,0383 - 0,0511)	0,0673 (0,0606 - 0,0747)
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,0296 (0,0269 - 0,0326)	0,0333 (0,0299 - 0,0371)

Vysvětlivky:

EC₅₀: účinná koncentrace pro zástavu pohybu červů *Tubifex tubifex*

LC₅₀: letální koncentrace pro červy *Tubifex tubifex*

L_{1,2}: interval spolehlivosti pro 95 % pravděpodobnost

Příklad výpočtu EC₅₀ pro sumární extrakt

Hodnotu EC₅₀ vypočítáme pomocí rovnice (1):

$$\log EC_{50} = \log D_a + d(f + 1)$$

Pro náš případ najdeme v **Tab. 2** pro čtveřici údajů o nehybných nitěnkách 1, 2, 6, 6, (viz **Tab. 2**) hodnoty:

$$D_a = 0,0237; f = 0,0000; R = 1,3333; d = \log R = 0,124927879$$

A po dosazení dostaneme rovnici a výsledek:

$$\log EC_{50} = \log 0,0237 + \log 1,3333 (0,0000 + 1)$$

$$\log EC_{50} = -1,5003$$

$$EC_{50} = 0,0316 \text{ g/ml}$$

4. Výsledky měření

Pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ můžeme vypočítat interval spolehlivosti pomocí rovnice (3):

$$L_{1,2} = \log EC_{50} \pm 2\sigma_f d$$

$$\text{Kde } \sigma_f = 0,26833; EC_{50} = 0,0332; d = 0,124927879$$

$$L_{1,2} = \log 0,0332 \pm 2 \cdot 0,268333 \cdot 0,124927879$$

$$L_{1,2} = -1,4789 \pm 0,0670$$

Po odlogaritmování můžeme provést zápis EC_{50} ve tvaru 0,0332 (0,0289 – 0,0382) g/ml pro 95 % interval spolehlivosti.

Výsledná EC_{50} je vždy průměrem ze tří hodnot.

Obdobně se vypočítá i hodnota LC_{50} .⁶

4.4 VÝSLEDKY DĚLENÍ FRAKCE HEA 22-24/2 (V KROUŽKU) POMOCÍ HPLC

Dělení probíhalo na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, při laboratorní teplotě 21 °C. Byly získány dvě frakce, označené Z1 a E2.

Podmínky pro HPLC dělení:

30% methanol + 70 % destilovaná voda isokraticky

Průtok 5 ml/min

Kolona Merck Purosphere-Star, RP18e délka kolony 250 x 10 mm, 5 μ m

Vlnová délka 254 nm

Pumpa Knauer Preparative pump K-1800

Detektor Knauer Dad K-2700

Kolektor Fraction collector B-684

4. Výsledky měření

Látky byly po rozdělení naneseny na chromatogram.



Obr. 18: S2, D1

Tyto frakce byly dále částečně odpařeny na rotační odparce za sníženého tlaku (1,067 kPa) při teplotě do 50 °C, a znovu naneseny na chromatogram spolu s kyselinou palmitovou.



Obr. 19: 2x S5, D1

4. Výsledky měření

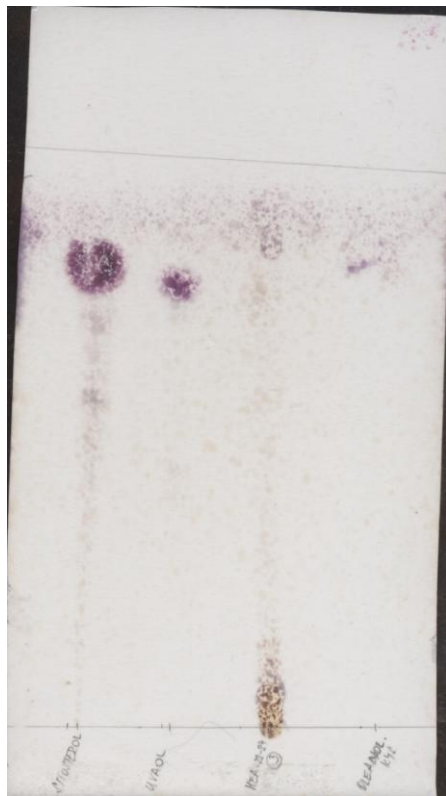
Pro srovnání byly ještě naneseny k frakci HEA 22-24/3 v kroužku na chromatogram tyto látky:

HEA 22-24/3 v kroužku

sitosterol

uvaol

oleanolová kyselina



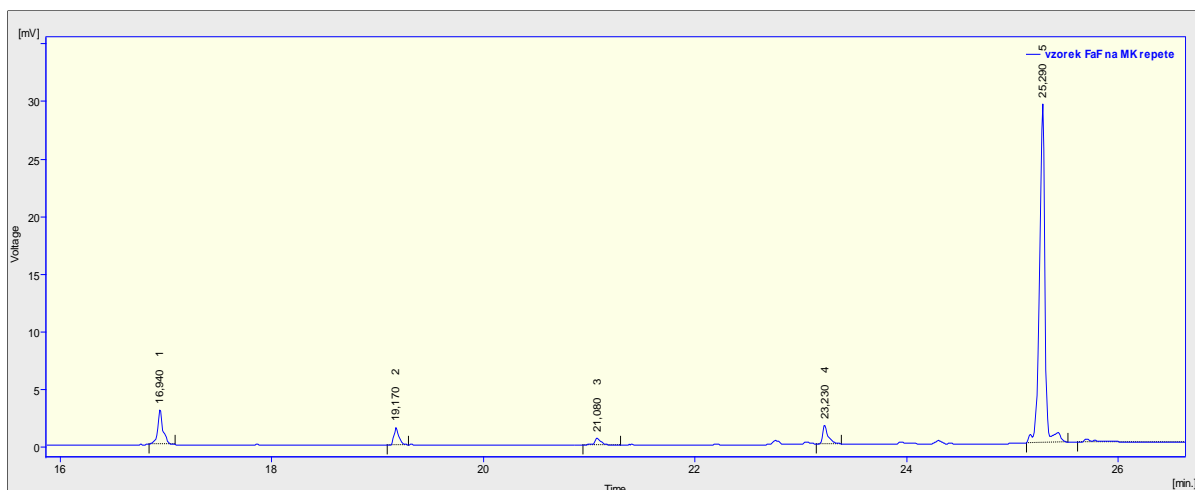
Obr. 20: S5, D1

Po zhodnocení posledního chromatogramu (obr. 20), byla frakce HEA 22-24/3 v kroužku, odeslána na rozbor mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.

Analýza byla provedena na Geronto-metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Vzorek byl derivatizován transesterifikací mastných kyselin na methylestery. Vzniklé methylestery byly identifikovány a stanoveno jejich poměrné zastoupení pomocí plynové chromatografie s plamenionizační detekcí (GC 8000 series, Fisons Instruments).

4. Výsledky měření

Obr. 21: Chromatogram



Tab. 13

Mastná kyselina	Retenční čas	Plocha	Procento
MK se středním řetězcem	16,94	10,743	7,9
MK se středním řetězcem	19,17	4,725	3,6
Kyselina myristová	21,08	2,53	1,9
Kyselina palmitová	23,23	5,891	4,4
Kyselina olejová	25,29	110,617	82,2
Suma		134,506	100

5 DISKUSE

Cílem této diplomové práce bylo podrobněji prozkoumat listy *Helianthus annuus* L. z hlediska obsahových látek, doplněný o základní zhodnocení biologických účinků. Příprava extraktu, separace obsahových látek sloupcovou chromatografií s následnou TLC frakcí, byla provedena v laboratoři na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie.

Náplní pro sloupcovou chromatografií byl zvolen silikagel a jako eluční činidlo byl použit čistý CHCl_3 , ke kterému byl postupně přidáván 95% Et-OH. Při následném testování frakcí TLC byly použity tři vyvíjecí soustavy. Soustava S1 byla tvořena čistým CHCl_3 , soustavy S2 a S3 pak CHCl_3 s přídávkem Et-OH v poměru 7:3 a 8:2. Jako detekční činidlo byl zvolen 1% roztok vanilinu v čistém Et-OH s 3% kyselinou chloristou v poměru 1:1. (Obr. 5 -15)

Porovnáním TLC, z hlediska zastoupení obsahových látek, byly některé frakce shodné, a proto byly spojeny. Jejich další zpracování a izolace látek bylo provedeno pomocí preparativní chromatografie a vyizolované látky byly testovány z hlediska biologických účinků. Testována byla i frakce 29, která vznikla spojením všech dále nezpracovávaných frakcí z původní kolony.

Měření antioxidační aktivity a akutní toxicity bylo provedeno na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Při měření antioxidační aktivity metodou SIA, byl pro následný výpočet EC_{50} důležitý, zejména pokles absorbance u jednotlivých testovaných vzorků. (Tab. 5) Ten byl výrazný pouze u frakce 29, a proto byla hodnota EC_{50} vypočítána jen pro tento vzorek ($\text{EC}_{50} = 0,202 \text{ mg/ml}$). Podle výsledků měření metodou SIA, byla frakce 29 podrobena měření antioxidační aktivity také metodou FRAP. Zde byla její aktivita srovnávána s jedním ze standardů antioxidační aktivity troloxem. (Tab. 6) Hodnota FRAP frakce 29 v čase 4 min je $1,06 \mu\text{M}$ a v čase 60 min $1,45 \mu\text{M}$.

Při testování akutní toxicity alternativní metodou zástavy pohybů červů *Tubifex tubifex* byla na základě získaných výsledků vypočítána efektivní koncentrace. Pohybuje se v rozmezí 0,0332 až 0,0458 g/ml. (Tab. 12) Platí, že čím je nižší hodnota účinné koncentrace pro zástavu pohybů červů *Tubifex tubifex*, tím je daný testovaný vzorek pro nitěnky toxičtější. Efektivní koncentrace EC_{50} je koncentrace, která usmrtí 50 % jedinců *Tubifex tubifex*.

Použitý alternativní test akutní toxicity prováděný na nitěnkách se jevil jako vhodný pro rychlé zjištění biologické aktivity zkoumaného extraktu (stanovení jednotlivého vzorku trvá tři hodiny) a na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie se s úspěchem provádí již řadu let.

Testování antifungální aktivity bylo provedeno na Katedře biologických a lékařských věd. Vzorky HEA 19-21 a HEA 22-24 nešly bohužel upravit tak, aby bylo možné provést test. Zkoušena byla proto jen frakce 29, u níž se ale žádná antifungální aktivita nepotvrdila. (Tab. 7)

Frakce HEA 22-24 byla také testována na přítomnost flavonoidů (Obr. 16). Žádný z nanášených standardů se ale nevyskytuje v našem vzorku HEA 22-24. Za antioxidační aktivitu, která byla testována, zodpovídají pravděpodobně jiné flavonoidy než ty, které byly nanášeny jako standardy na chromatogram.

Frakce HEA 22- 24/2 v kroužku byla, po zhodnocení chromatogramu (Obr.17), na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie dělena pomocí HPLC na dvě látky. Následné provedení TLC ale dokázalo, že separace látek nebyla úspěšná. (Obr. 18 a 19)

Frakce HEA 22-24/3 v kroužku byla spolu s uvaolem, sitosterolem a oleanovou kyselinou nanášena na chromatogram a vyvíjena v soustavě S5. (Obr. 20) Po zhodnocení tohoto chromatogramu, byla tato frakce odeslána na Geronto-metabolickou kliniku Fakultní nemocnice v Hradci Králové na rozbor mastných kyselin pomocí plynové chromatografie. Z provedené analýzy vyplývá (Tab. 13), že

5. Diskuse

největší zastoupení má olejová kyselina 82,2 % a v daleko menší míře pak mastné kyseliny se střením řetězcem, kyselina palmitová a myristová.

6 SOUHRN

Má diplomová práce se týkala fytochemického výzkumu polárního extraktu listů taxonu *Helianthus annuus* L. za doprovodu biologických testů (tzv. bioassay – guided separace) – jednalo se o testy na akutní toxicitu, testy na antioxidační aktivitu (DPPH test, FRAP metoda) a test na antimykotickou aktivitu.

Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazala frakce 29. Frakce 22-24/3, získaná na základě dělení preparativní chromatografií, byla analyzována pomocí plynové chromatografie a byly zde stanoveny kyselina olejová, mastné kyseliny se středním řetězcem, kyselina palmitová a myristová.

7 LITERATURA

1. Slavík, B., Štěpánková, J.: Květena České republiky 7, Vyd. Academia, Praha 2004, s. 325
2. Štípek, S. a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, Vyd. Grada, Praha 2000, s. 21 – 24, s. 69
3. Opletal, L., Drašar, P.: Fytochemické metody, Vyd. Karolinum Praha 1994. s. 38, 45, 49, 50, 57, 63, 83, 95, 103
4. Cannell, R. J. P.: Natural Products Isolation, Vyd. Humona Press Inc, 1998, s. 223 – 226
5. Tomko, J. a kol.: Farmakognózia, Vyd. Osveta, s. 75, 77, 78, 217, 304, ISBN 80-8063-014-3
6. Tichý, M., Rucki, M.: Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*, Pracovní lékařství, 48, 1996, č. 6, s. 225 – 230
7. Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*, Chemické listy 98, 2004, s. 174 – 179
8. Skála, P.: Diplomová práce – Stanovení antioxidační aktivity látek metodou SIA se spektrofotometrickou detekcí, 2003, s. 45 – 49
9. Firuzi, O. et al.: Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by „ferric reducing antioxidant power“ assay and cyclic voltammetry, Biochimica et Biophysica Acta 1721, 2005, s. 174 – 184
10. Macias, F. A. et al.: Heliannanes – a Structure-Activity relationship (SAR) Study, Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals, s. 103 – 124
11. Macias, F. A. et al.: Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick[®], Phytochemistry 61, 2002, s. 687 – 692
12. Macias, F. A. et al.: Structural Elucidation and Chemistry of a Novel Family of Bioactive Sesquiterpenes: Heliannuols, Organic Chemistry, svazek 59, č. 26, 1994, s. 8261 – 8266
13. Macias, F. A. et al.: Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals, Journal of Natural products, svazek 69, č. 5, 2006, s. 795 – 800
14. Spring, O., Albert, K. and Hager, A.: Three biologically active heliangolides from *Helianthus annuus*, Phytochemistry, svazek 21, č. 10, 1982, s. 2551 – 2553
15. Macias, F. A. et al.: Helivypolide G. A novel dimeric bioactive sesquiterpene lactone, ScienceDirect – Tetrahedron Letters, svazek 45, č. 35, 2004, s. 6567 – 6570
16. Macias, F. A. et al.: Bioactive norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity, Phytochemistry, svazek 48, č. 4, 1998, s. 631 – 636
17. Macias, F. A. et al.: Bioactive apocarotenoids annuionones F and G: structural revision of annuionones A, B and E, ScienceDirect – Phytochemistry, svazek 65, č. 22, 2004, s. 3057 – 3063
18. Macias, F. A. et al.: Heliespirone A. The First member of a Novel Family of Bioactive Sesquiterpenes, Tetrahedron Letters 39, 1998, s. 427 – 430
19. Bader, G., Plohmman, B., Hiller, K. and Franz, B.G.: Cytotoxicity of triterpenoid saponins, Pharmazie 51, 1996, s. 414 – 417
20. Suo, M. R. et al.: Two New Diterpenes from *Helianthus annuus* L., Chinese Chemical Letters, svazek 17, č. 1, 2006, s. 45 – 48
21. Plohmman, B., et al.: Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins, Pharmazie 52, 1997, s. 953 – 957
22. Jahodář, L. a kol.: The screening of *in vitro* antifungal activity of *Asteraceae* of Czech provenience, 3rd International Symposium on Natural Druha, Naples, October 2-4, 2003
23. Jahodářová, H.: Diplomová práce 2001
24. Pinto, E., et al.: Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species, Journal of Medical Mikrobiology 55, 2006, s. 1367-1373
25. Groll, Andreas H., et al.: Antifungal efficacy and pharmacodynamics of posaconazole in experimental models of invasive fungal infections, Mycoses 49 (Suppl. 1), 2006, s. 7-16
26. Firuzi, O., et al.: Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by „Ferric reducing antioxidant power“ assay and cyclic voltammetry, Biochimica et Biophysica Acta 1721, 2005, s. 174-184
27. Dejjan, H., et al.: Agric. Food Chemistry, svazek 53, 2005, s. 1841-1856

7. Literatura

28. http://www.slunecnice.cz/text/slunecnice_rocni.html (23. 10. 2006)
29. http://www.missouriplants.com/Yellowalt/Helianthus_annuus_page.html (23. 10. 2006)
30. <http://www.vurv.cz/weeds/cz/druhy/03.html> (10. 10. 2006)
31. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K385.php> (23. 10. 2006)
32. Foto pořízeno na Katedře Farmaceutické botaniky a ekologie

8 ANNOTATION OF THE DIPLOMA THESIS

My diploma thesis was intended on phytochemical study of polar extract of *Helianthus annuus* L. leaves and simultaneously biological tests were done (so-called bioassay – guided separation) – acute toxicity, antioxidant activity (DPPH test, FRAP metod) and antifungal activity.

The Fraction 29 showed the highest antioxidant activity. The Fraction 22-24/3, obtained by preparative chromatography, was analyzed by gas chromatography. This analysis shows present of the oil-acid, the oily acids with a middle chain, the palmitoic acid and the myristic acid.