

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmakognozie

Kandidát **Mgr. Tereza Fábryová**

Školitel **doc. PharmDr. Lenka Tůmová, PhD.**

Název disertační práce **Fytochemická analýza a biologická aktivita řasy *Haematococcus pluvialis* a *Chlorella* sp.**

V současné době představují mikrořasy nový a slibný zdroj různých biologicky aktivních látek. Tato vědecká práce cílí na dva karotenoidy – astaxantin a lutein, o které je zájem v různých průmyslových odvětvích. Dosud vyvinuté výrobní postupy pro získání těchto dvou hodnotných karotenoidových pigmentů však vyžadují náročné procesy, jak časově, tak i z hlediska spotřeby organických rozpouštědel. Tato práce se zabývá dvěma aspekty. Prvním je výzkum a vývoj účinných a na průmyslovou úroveň rozšiřitelných metod izolace cílových karotenoidů z biomasy mikrořas pomocí vysoce účinné protiproudé chromatografie (HPLC). Druhým je hodnocení biologické aktivity astaxantinu a jeho esterů, protože tyto dosud byly málo studovány.

V naší práci byl lutein izolován ze zelené řasy *Chlorella vulgaris* pomocí spodní fáze dvoufázového rozpouštědlového systému složeného z n-heptanu, etanolu a vody (poměr 5:4:1,5, obj./obj./obj.) (LP4), který sloužil jako rozpouštědlo pro extrakci řasové biomasy a zároveň také jako mobilní fáze pro izolaci luteinu pomocí HPLC. Ultrazvuková extrakce biomasy s LP4 po dobu 30 minut vedla k získání extraktu bohatého na lutein (3,20 mg/g sušené biomasy). Celkově byly zpracovány 2 g extraktu *Chlorella vulgaris*, z nichž bylo získáno 60 mg luteinu (čistota 92%). Tento byl dále purifikován pomocí gelové permeační chromatografie, čímž bylo získáno 50 mg luteinu (čistota 97%). Stejná metoda byla také použita pro izolaci luteinu z *Parachlorella kessleri* kmene HY1, čímž se získalo 150 mg luteinu (95% čistota, 97% výtěžek). Dále bylo z mikrořasy *Haematococcus pluvialis* izolováno pět monoesterů astaxantinu pomocí HPLC, kde byla jako mobilní fáze použita spodní fáze dvoufázového rozpouštědlového systému (n-heptan:acetonitril, poměr 5:5, obj./obj.). Závěrečná purifikace pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) poskytla pět derivátů astaxantinu esterifikovaných kyselinou  $\alpha$ -linolenovou (4 mg), kyselinou linolovou (8 mg), kyselinou palmitovou (8 mg), kyselinou olejovou (12 mg) a kyselinou stearovou (1 mg) (98% čistota). K dalšímu zvýšení produktivity byla vyvinuta HPLC metoda s vícenásobným nástřikem, která umožnila získat větší množství astaxantinových esterů, a to kombinací dvou elučních režimů (reverzní a souběžná eluce). V průběhu souběžné eluce byly mobilní i stacionární fáze čerpány současně, tak, aby se doplňovala stacionární fáze, která se ztrácí během každého separačního cyklu.

Astaxantin je silný přírodní antioxidant s prospěšnými biologickými aktivitami, které však byly primárně prokázány u jeho volné (neesterifikované) formy. Přirozený producent astaxantinu, mikrořasa *Haematococcus pluvialis*, však tento pigment syntetizuje většinou ve formě esterů, které byly dosud málo hodnoceny. Aby se přispělo k možnému komerčnímu použití této látky, bylo testováno několik různých biologických aktivit.

Antioxidační, antiparazitická, cytotoxická, antialergická, imunomodulační, antiagregační avazodilatační aktivita, stejně jako schopnost inhibovat tyrosinázu a produkci melaninu, byly vyhodnoceny u extraktu z *Haematococcus pluvialis* a frakcí bohatých na monoestery a diestery astaxantinu izolovaných pomocí HPLC. Pro stanovení antioxidačních a cytotoxických účinků bylo použito také pět již dříve izolovaných derivátů astaxantinu. Signifikantní antioxidační, antityrosinázová a cytotoxická aktivita byly pozorovány u extraktu *Haematococcus pluvialis* společně s frakcí obohacenou o monoestery astaxantinu izolovanou pomocí HPLC. Slabá antioxidační aktivita byla zaznamenána u monoesterů astaxantinu vázaných s kyselinou  $\alpha$ -linolenovou (C18:3), palmitovou (C16:0) a stearovou (C18:0). Astaxantin esterifikovaný

kyselinou olejovou (C18:1) prokázal cytotoxický účinek proti buněčné linii AGS karcinomu žaludka. Astaxantinové estery částečně prokázaly negativní vliv na antioxidační systémy parazitů. Předběžné hodnocení testovaných látek neprokázalo významné změny motility larev, nicméně byl zaznamenán určitý negativní dopad na jejich morfologii. Všechny testované látky vykazaly pouze inhibici antigenem indukovaného uvolňování  $\beta$ -hexosaminidázy při koncentraci 5  $\mu$ M. Žádná z testovaných látek neprokázala imunomodulační, antiagregační ani vazodilatační aktivitu, ani neinhibovala produkci melaninu.