

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Fytochemický výzkum *Helianthus annuus* L. IV
Phytochemical study of *Helianthus annuus* L. IV

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 Macákové a Mgr. Jitce Vytlačilové za pomoc při testování extraktů a jednotlivých frakcí a také všem ostatním pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření dobrých podmínek pro práci. Také bych chtěla poděkovat RNDr. Aleně Tiché, Ph.D. z Geronto-metabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové za provedení GC/MS analýzy.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantové agentury Univerzity Karlovy GA UK 118/2006/ B BIO.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Fytochemický výzkum *Helianthus annuus* L. IV“ vypracovala samostatně a použila jsem jen pramenů, které uvádím v příloženém seznamu literatury.

OBSAH:

<i>I. ÚVOD</i>	8
<i>II. CÍL PRÁCE</i>	11
<i>III. TEORETICKÁ ČÁST</i>	13
1. Botanická charakteristika	14
2. Indikace a využití	16
3. Látky izolované z různých částí rodu <i>Helianthus</i>	18
A. KLÍČKY	18
3.A.1 Alkaloidy.....	18
3.A.2 Fenoly	18
3.A.3 Acetyl-L-karnitin a L-karnitin.....	19
B. SLUPKY	20
3.B.1 Potravinové antioxidanty.....	20
3.B.2 Rostlinné oleje	21
C. LISTY	22
3.C.1 Terpeny.....	22
3.C.1.1 Seskviterpeny.....	22
3.C.1.1.1 Heliannany, helibisabonoly.....	23
3.C.1.1.2 Germakranolidy.....	26
3.C.1.1.3 Guajanolidy	29
3.C.1.1.4 Annuionony (apokarotenoidy)	29
3.C.1.1.5 Eudesmanolidy	30
3.C.1.1.6 Heliespirony (spiroterpeny)	30
3.C.1.2 Diterpeny	30
3.C.1.3 Triterpeny	31
3.C.2 Flavonoidy.....	32
4. Biologická aktivita obsahových látek.....	35
4.1 Antioxidační aktivita	37
4.1.1 Úvod.....	37
4.1.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu	38
4.1.2.1 Princip	38
4.1.2.2 Příprava roztoků.....	38
4.1.2.3 Přístroje	39

4.1.3	Antioxidační aktivita FRAP	39
4.1.3.1	Úvod.....	39
4.1.3.2	Princip metody.....	40
4.1.3.3	Postup.....	40
4.1.3.4	Přístroje	41
4.1.4	Antioxidanty testované <i>in vitro</i>	41
4.2	Antiflogistická aktivita	42
4.2.1	Zánět	42
4.2.2	Modifikace cyklooxygenázové a lipoxygenázové aktivity pomocí Asteridae extraktů a boswellové kyseliny	43
4.2.3	Léčba a prevence zánětů v místech leukocytární infiltrace	43
4.3	Alelopatická aktivita.....	44
4.4	Antimykotická a antimikrobiální aktivita	45
4.5	Akutní toxicita a fototoxicita	46
4.5.1	Úvod.....	46
4.5.2	Popis testovaného organismu	46
4.5.3	Metodika testování.....	47
4.5.3.1	Příprava testované látky	47
4.5.3.2	Příprava experimentálního organismu	47
4.5.4	Postup.....	47
4.5.4.1	Předběžné testy	47
4.5.4.2	Popis pracovního postupu vlastního testu	48
4.5.5	Vyhodnocení	48
4.6	Aktivita karnitinu	48
IV.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	49
1.	Všeobecné postupy.....	50
1.1	Extrakce	50
1.1.1	Macerace	50
1.1.2	Vytřepávání	50
1.2	Filtrace	50
1.3	Odpařování (zahušťování)	51
1.4	Chromatografické metody	51
1.4.1	Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)	51
1.4.2	Sloupcová (kolonová) chromatografie.....	52

2. Potřeby.....	53
2.1 Rozpouštědla.....	53
2.2 Chemikálie.....	53
2.3 Detekční činidla.....	54
2.4 Vyvíjecí soustavy pro chromatografii.....	55
2.5 Chromatografické adsorbenty.....	55
2.6 Přístroje.....	55
3. Izolace.....	56
A. KLÍČKY.....	56
3.A.1 Materiál.....	56
3.A.2 Postup.....	56
3.A.3 Použití extraktu k důkazu alkaloidů.....	56
3.A.4 Závěr.....	56
B. SLUPKY.....	57
3.B.1 Materiál.....	57
3.B.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu.....	57
3.B.2.1 Postup.....	57
3.B.2.2 Schéma přípravy antioxidačního produktu – b).....	59
3.B.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	60
3.B.3.1 Orientační tenkovrstvá chromatografie.....	60
3.B.3.2 Tenkovrstvá chromatografie vzorků z postupu b).....	60
C. LISTY.....	61
3.C.1 Materiál.....	61
3.C.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu.....	61
3.C.2.1 Postup.....	61
3.C.2.2 Schéma extrakce listů.....	62
3.C.3 Sloupcová chromatografie.....	62
3.C.3.1 Provedení první sloupcové chromatografie - orientační.....	62
3.C.3.2 Provedení druhé sloupcové chromatografie.....	64
4. Biologická aktivita – výsledky měření.....	68
4.1 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu.....	68
4.2 Antioxidační aktivita FRAP.....	69
4.3 Stanovení akutní toxicity a fototoxicity.....	70

<i>V. HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUSE</i>	72
1. Monitorování kvalitativního složení extraktů a frakcí pomocí tenkovrstvé chromatografie	73
2. Hodnocení biologické aktivity frakcí ze slupek a listů	75
<i>VI. PŘÍLOHY</i>	77
<i>VII. ZÁVĚR</i>	85
<i>VIII. LITERATURA</i>	87
<i>ABSTRAKT</i>	92
<i>ABSTRACT</i>	93

I. ÚVOD

Slunečnice roční



Obr. 1¹¹

Helianthus annuus L.

Latinský název *Helianthus annuus* se skládá z řeckých slov helios, anthos (slunce, květ) a annus (rok).⁴

Rostlina je pojmenována na počest Helia, řeckého boha Slunce.

Podle legendy se traduje, že vodní nymfa Klythie se beznadějně zamilovala do slunečního boha Helia. Protože on její lásku neopětoval, sedala dnem i nocí na zemi a vyhlížela jeho sluneční vůz. Jakmile se objevil, stále ho sledovala a otáčela se za ním, jak ujížděl po své nebeské dráze. Seděla na zemi tak dlouho, až se její nohy proměnily v kořeny a tělo ve stonek slunečnice, její hlava – zlatavý květ – se neustále otáčí za sluncem. Slunečnice byla pro staré Řeky symbolem stálosti.¹

Slunečnice byla užitkovou a léčivou plodinou, kterou pěstovali a uctívali téměř všichni Indiáni. Pochází pravděpodobně z území Mexika a Peru, odtud se tato rostlina rozšířila až do Jižní a Střední Ameriky.¹ V 16. století přivezli Španělé semena slunečnice do Evropy,⁴ kde slunečnice vešla ve známost nejprve pod jménem *Chrysanthemum flos solis peruvianus* nebo „velká indiánská sluneční květina“. Rostliny se začaly pěstovat jako okrasné v madridské botanické zahradě. V roce 1576 ji vlámský botanik pojmenoval podle toho, že se otáčí za sluncem. Když pronikla do Ruska, začali ji tamní rolníci hnojit a šlechtit. Plody se postupně zvětšovaly a semena se pojídala.¹ Od 18. století se ze slunečnicových semen začal lisovat olej a zralá semena se stala vyhledávanou pochoutkou.⁴ Nyní se pěstuje v řadě zemí, především v teplejších oblastech mírného pásu a v subtropích.¹

Slunečnicový olej je lékopisný. V **Českém lékopise 2005** najdeme odkaz na článek v **ČL 2002** (str. 2812), kde najdeme monografii:

Helianthi oleum raffinatum

Slunečnicový olej čištěný

Synonymum. Helianthi annui oleum raffinatum

Je to mastný olej získaný ze semen druhu *Helianthus annuus* L. lisováním nebo extrakcí a následným čištěním. Může být přidána vhodná antioxidační látka.

Vlastnosti

Čirá, světle žlutá tekutina. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%, mísitelný s etherem petrolejovým (t.v. 40 až 60 °C). Relativní hustota je asi 0,921 a index lomu je asi 1,474.^{6,7}

Pojmenování „Slunečnice“ nenajdeme jen v rostlinné říši, ale i v říši živočišné: Slunečnice pestrá (*Lepomis gibbosus*) je severoamerická sladkovodní ryba z řádu ostnoploutví (*Perciformes*), čeledi okounkovití (*Centrarchidae*).⁴ Tato drobná ryбка s vysokým tělem, která původně obývala vody východní části Severní Ameriky, byla dovezena i do Evropy a v 19. století vysazena do rybníků na Třeboňsku a rozšířila se do slepých ramen řek. Ostrůvkovitě se vyskytuje na řadě míst našeho státu, ale nikde není hojná.¹³

Pojmenování slunečnice v cizích jazycích:⁴

Slnečnica ročná (slov.)	Podsolnečnik (rusky)
Sunflower (angl.)	Słonecznik (polsky)
(die) Sonnenblume (něm.)	Naprafözgő (maďar.)
Tournesol, Soleil (franc.)	Zonnebloem (holand.)
Iliotropio (řecky)	Solros (švédsky)
Girasol, Mirasol (španěl.)	Solsikke (norsky)
Girassol (portug.)	Ayçiçeği (tur.)
Girasole (ital.)	Helianto, Sunfloro (esperanto)

II. CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce:

- vyhledat, doplnit a uspořádat nové dostupné informace o rostlinných metabolitech slunečnice roční a jejich biologické aktivitě
- provést kvalitativní vyhodnocení obsahových látek v klíčcích a slupkách slunečnice roční
- rozdělit ethanolový extrakt z listů slunečnice roční
- u frakcí ze slupek a listů vyhodnotit jejich biologickou aktivitu

Ekonomicky významná rostlina slunečnice roční je objektem dlouhodobého výzkumu, o čemž svědčí velké množství publikovaných informací. Tento rostlinný taxon má širokou škálu využití, a to v zemědělství, potravinářství, farmacii i od dávných dob v lidovém léčitelství.

Práce navazuje na diplomové práce prováděné na této rostlině v předchozích letech. Její náplní je dořešit rozpracovanou problematiku.

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. Botanická charakteristika

Slunečnice roční – zařazení do systému⁵

nadříše	<i>Eukaryota</i> - jaderní
říše	<i>Plantae</i> - rostlinná
oddělení	<i>Magnoliophyta</i> – krytosemenné rostliny
třída	<i>Magnoliopsida</i> - dvouděložné rostliny
podtřída	<i>Asteridae</i>
nadřád	<i>Asteranae</i>
řád	<i>Asterales</i> - hvězdnicotvaré
čeleď	<i>Asteraceae</i> - hvězdnicovité
podčeleď	<i>Asteroideae</i>
tribus	<i>Heliantheae</i>
rod	<i>Helianthus</i> - slunečnice
druh	<i>Helianthus annuus</i> L. - slunečnice roční

Slunečnice roční patří taxonomicky do čeledi Asteraceae, která tvoří druhově nejpočetnější čeleď dvouděložných rostlin.

Je to jednoletá rostlina, jejíž stavba je značně rozmanitá. Slunečnice mohou být až 3 metry vysoké s jedním květem, ale také 30 cm nízké s několika stonky a květy.⁴ Celá je drsně chlupatá, lodyha obvykle nevětvená. Listy jsou velké, střídavé, dolní řapíkaté, horní poněkud menší.² Čepel je široce vejčitá nebo srdčitá s okraji zubatými či pilovitými. Květenstvím je úbor skládající se z květů trubkovitých a jazykovitých, který je podepřen zákrovem z listenů.¹ Úbory dosahují průměru mezi 10 a 40 cm, mohou být jednoduché i plnokvěté. Úbory slunečnice jsou velmi náchylné na plísně a často bývají napadány houbovými patogeny, zejména plísní šedou a hlízenkou obecnou.⁴ Plodem je nažka klínovitého tvaru. Typickým znakem této čeledi je přítomnost zásobního polysacharidu inulinu, který v této skupině nahrazuje obvyklý škrob.¹

Slunečnice dobře roste na slunných, výživných půdách s možností závlahy,¹ orientovaných na jih nebo jihozápad, vyhovuje jí černozem a hnědozem.⁴ Semena vyséváme přímo do půdy na přelomu dubna a května. Vegetační doba je asi 100 – 200 dní. Kvůli možnému poškození větrem je možné vyšší rostliny vyvázat.¹ Lodyha je po dobu růstu vzpřímená, před začátkem kvetení se v horní části ohýbá a pohyb lodyh ustává. Mladá rostlina je heliotropní - její květ míří vzhůru a otáčí se za sluncem. Později ale květ tuto vlastnost ztrácí, neboť díky zrajícím semenům ztěžkne a pod tíhou se kloní k zemi.⁴

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 rozvětvuje, 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.⁴

2. Indikace a využití

Slunečnici roční lze použít k mnoha indikacím. Látky v ní obsažené mají antioxidační, adstringentní, antipyretické, expektorační, antidiarhoické, karminativní, nutritivní, anticholesterolemické a hepatické účinky.¹

Díky své schopnosti absorbovat značné množství vody je rostoucí rostlina mimořádně užitečná při vysušování vlhkých půd. Bažinaté plochy v Holandsku se intenzivním pěstováním slunečnice vysušily a staly obyvatelnými.¹

Využitelné jsou všechny části rostliny. Dobře známý je olej ze semen slunečnice, který je jedním z nejdůležitějších stolních olejů, používaný jak k tepelné úpravě pokrmů, tak i za studena do salátů. Slunečnicový olej (lisovaný za studena) snižuje hladinu cholesterolu v krvi, má antisklerotické účinky.^{1,4} Semena obsahují až 70% polovysychavého oleje s vysokou dietetickou hodnotou, který je vhodný k výrobě ztužených pokrmových tuků, ale také ke konzervaci ryb.¹ Semena dále obsahují organické kyseliny (chlorogenová, citrónová, vinná), bílkoviny, glyceridy, steroly, fosfolipidy, karotenoidy, provitamin A a potaš. Obsažené nenasycené mastné kyseliny působí jako prekurzory prostaglandinů.² Tato semena jsou kromě vitaminů také zdrojem minerálních látek, zlepšují ostrost vidění, účinkují jako nutritivum.¹ Kromě slunečnicových semínek, která jsou přidávána do pečiva, do směsí hlodavcům a ptákům, lze pražením zralých slupek získat náhradu kávy.^{1,4} Slunečnicový olej je základní surovinou pro výrobu mýdel, barev, laků, fermeží a masážních olejů a získává se z něj zelené a žluté barvivo pro barvení látek a vlny.³ Ve farmacii se olej používá jako vehikulum špatně se vstřebávajících léčiv a vitamínů, hydrogenovaný do mastí a náplastí.¹ Slunečnicový olej se osvědčil také v malířské technice olejomalby. Dnes se používá jako součást do temperových barev.⁴

Vláknina lodyh se používají v Číně jako příměsí do hedvábných látek.¹ Slunečnice je využívána jako pícnina pro krmení dobytka a olejnína.⁴ Velmi vydatným krmivem jsou pokrutiny, neboť obsahují až 36% bílkovin. Slunečnice je medonosnou rostlinou.¹

Další části rostliny (květy, listy a stonek) sloužily pro Indiány jako dobrý léčebný prostředek proti srdeční slabosti, revmatismu, horečce a bolestem břicha. O starých Mayích je známo, že svařovali listy a jazykovité květy a odvar pak pili při záchvatech horečky a používali ho jako afrodiziakum.¹ V listech a květech byla nalezena řada látek, jako jsou: flavonoid kvercimeritrin, kumariny, triterpenové saponiny, karotenoidy, anthokyany, třísloviny, cholin, betain, hořký helianthin a minerální látky.² Látky z květů a nekvetoucích vrcholů rostliny snižují horečku a jsou účinné i při záchvatech malárie,³ snižují pocení a mají

antibakteriální účinky. Byla prokázána stimulace jaterní činnosti, zlepšení trávení, účinek proti nadýmání. Květy také podporují vykašlávání, jsou účinné při léčbě bronchitidy, kašle a nachlazení, proto se přidávají do směsí užívaných při plicních onemocněních nebo posilujících trávení. Květy se dají využít i při kožních potížích, kdy se zevně používá odvar k obkladům, na omývání ran, který dezinfikuje a podporuje hojení a má adstringentní účinky.^{1,2}

Je možné využít čtyři druhy lékových forem: prášek z květů, nálev, odvar pro zevní použití a tinkturu.

Příprava odvaru: Jednu polévkovou lžící květové drogy zalijeme ¼ litru studené vody, necháme 6 minut vařit a vyluhovat do vlažné teploty. Poté se používá k obkladům a omývání ran.

Příprava tinktury: Jeden díl drogy zalijeme čtyřmi díly lihu 40%, necháme 10 dní vyluhovat, poté přefiltrujeme. Užívá se 25-40 kapek 2-4x denně.¹

Na potíže se zažíváním, močením, chronickými horečnatými stavy až chronickými bronchitidami, nachlazením a kašlem se používají homeopatické tinktury.²

Droga je zcela bezpečná, žádné kontraindikace nejsou známy.¹

Od 17. století se z Ameriky do Evropy rozšířilo také pěstování tzv. vytrvalé slunečnice hlíznaté - *Helianthus tuberosus* (topinambur). Své jméno získal po indiánském kmeni, u nás se vžil lidový název židovské brambory. Hlízy jsou cenným zdrojem inzulínu a fruktózy, proto jsou vhodné pro diabetiky. Dále se využívá v léčitelství ke zmírnění křečů, ke snížení hladiny cholesterolu v krvi, při bezlepkové dietě, v těhotenství pomáhá při otocích a snižuje rizika předčasného porodu. Topinambur je vytrvalá rostlina nenáročná na pěstování. Hlízy se špatně uchovávají, proto se nedoporučuje je dlouho skladovat, ale dají se sklízet i během zimy. Chuťově se podobají artyčokům.⁴

3. Látky izolované z různých částí rodu Helianthus

Rostliny čeledi Asteraceae se vyznačují tvorbou silic, balzámů a latexu. Dále obsahují deriváty fenypropanu, hlavně kyseliny kávové. V některých rodech byly nalezeny i alkaloidy. V druzích čeledi Asteraceae jsou značně rozšířeny silice. Uloženy jsou buď na povrchu orgánu v typických žláznatých chlupcích, nebo uvnitř orgánu v siličných buňkách nebo kanálcích. Chemické složení silic je různé, ponejvíce převládají terpeny a to monoterpeny jako pinen, kimonem, thujon, cineol, kafr nebo seskviterpeny. Silice obsahující thujon jsou toxické. Rostliny čeledi Asteraceae obsahují další významnou skupinu látek jako např. seskviterpenové laktony. Jedná se o látky hořké, netěkavé nebo částečně těkavé, které nejsou glykosidicky vázané. Seskviterpenové laktony mohou vyvolat kontaktní alergické dermatitidy. V rostlinách této čeledi se taky vyskytují diterpeny, triterpeny, terpenoidní saponiny a polyterpeny. Z fenolických látek jsou v rostlinách hvězdicovitých obsaženy hlavně deriváty kyseliny kávové a flavonoidy, ve kterých převládají charakteristická květní barviva chalkony a aurony.⁵⁰

A. KLÍČKY

3.A.1 Alkaloidy

V různých částech slunečnice byla zkoumána řada látek. Alkaloidy a dusíkaté látky byly již dříve nalezeny v některých rodech čeledi Asteraceae. Zajímalo nás, zda se tyto přírodní látky vyskytují i v klíčcích této rostliny.

Alkaloidy se v rostlině nejčastěji vyskytují ve formě solí s organickými kyselinami.

Pro obecný důkaz alkaloidů v drogách je možné použít srážecí činidla, ke kterým se řadí činidla obsahující v aniontu komplex s těžkým kovem. Takovým činidlem je Mayerovo nebo Dragendorffovo činidlo (D1, str 54).⁴⁷

3.A.2 Fenoly

Jeden z výzkumů se zabýval vztahem mezi spektrálními charakteristikami a fenoly z rostlinných extraktů klíčků i semen obilovin a slunečnice. Extrakce byla provedena 80% isopropanolem, u klíčků (1:100), u semen (1:10). Stanovení fenolů bylo provedeno Folin-

Denisovým činidlem. Výsledky potvrdily možnost kvantitativního stanovení celkového obsahu fenolových látek na základě spektrální charakteristiky rostlinného extraktu., např. při srovnávání extraktů klíčků u ječmene a slunečnice, bylo u ječmene naměřeno maximum pro fenoly při 278 nm, minimum při 305 nm, u slunečnice – maximum při 325 nm a minimum při 295 nm.³⁴

3.A.3 Acetyl-L-karnitin a L-karnitin

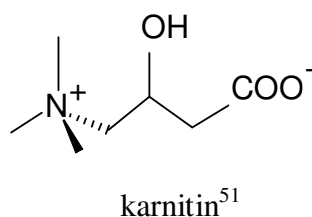
Metoda doprovázená biopostupy za použití „metabolomů“ vede ke zvýšení tvorby acetyl-L-karnitinu (ALCAR) a L-karnitinu (LCAR) v klíčících rostlinných semenech.

Neustálé metabolické toky manipulují s dobou klíčení v přírodních reaktorech, aby se zvýšila dostupnost kyslíku právě tak, jako se poskytlo sterilní prostředí ke změně spotřeby sacharidů a potlačení zpětné vazby glukoneogeneze.

Rozsáhlé změny v mastných kyselinách slunečnicových semen, fosfolipidů a vysoce energetického metabolismu mění prostředí ke klíčení a tyto metabolické změny dosáhnou asi tak tisícinásobného zvýšení v produkci přírodního ALCAR a LCAR semeny.

Rostlinná tkáň má všeobecně nízký obsah tuků, oleje se naopak často hromadí ve velkém množství v semínkách, která mohou udržovat vysoké proudění mastných kyselin do respirace. Ukládání olejů se v různých druzích rostlinných semen výrazně liší, například: druhy ořechů – 60-72 %, slunečnice – 47 %, pšenice – 2 %, hrách – 1,3 % suchého semene.

U slunečnicových semen jsou tukové rezervy uschovány v kotylendonech. Stupně respirace mohou být manipulovány kontrolovaným prostředím, ve kterém semena klíčí. Malá oblast povrchu tkáně se vyznačuje tím, že transport kyslíku do semen je omezen. Byla snaha částečně zvýšit tlak kyslíku okolo klíčících semen. Také bylo žádoucí potlačit zpětnou vazbu glukoneogeneze, aby se minimalizoval metabolismus mastné kyseliny přes LCAR-nezávislý glyoxylátový cyklus. Důkazy ukazují, že klíčící semena slunečnice jsou omezeně vyživována tokem mobilizovaným ze zásob semen.³⁶

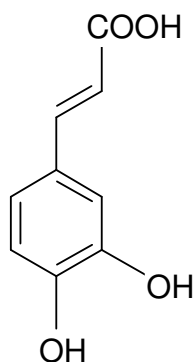


B. SLUPKY

3.B.1 Potravinové antioxidanty

Byla provedena pilotní studie na produkci potravinových antioxidantů ze slupek slunečnicových semen, které byly měřeny pro vlhkost, lipidy, bílkoviny a fenoly. Na začátku bylo hledáno vhodné rozpouštědlo k extrakci fenolů z částečně odtučněných slupek slunečnicových semen (PDS), které musí splňovat následující požadavky: extrahovat co největší množství fenolů a extrahovat co nejmenší množství bílkovin.

Bílkoviny a fenoly jsou všeobecně rozpustné v podobných polárních rozpouštědlech a jejich rozpustnost je silně ovlivněna hodnotou pH roztoku. V tomto speciálním případě byly bílkoviny ze slupek slunečnicových semen mírně rozpustné při kyselém pH, ale vysoce rozpustné při neutrálním nebo zásaditém pH. K defenolizaci PDS byla použita směs ethanol/voda 60:40. Postup k získání antioxidantního produktu byl definován tak, že spočíval v alkalické hydrolyze fenolů z PDS po 60 minutách. Nakonec byla provedena obnova kyseliny kávové tvořené z kyseliny chlorogenové s ethylacetátem. HPLC analýzou (vysokoučinná kapalinová chromatografie) bylo určeno, že získaný extrakt obsahoval 0,56 mg/ml **kyseliny chlorogenové** a 0,26 mg/ml **kyseliny kávové** (obr.2). Z PDS byl získán práškovitý antioxidantní produkt skládající se z 58 % z kyseliny kávové.³⁵



Obr.2: kyselina kávová⁴³

Celkový obsah fenolů ve slunečnicových semenech a slupkách lze stanovit pomocí Folin-Ciocalteuova činidla a antioxidantní aktivitu 80% vodného methanolového extraktu lze určit pomocí β -karoten odbarvující metody.

Antioxidační aktivita ve slunečnicových semenech byla 72,9% a ve slupkách 88,9%. Významně vyšší aktivita slupek je díky vyššímu obsahu fenolů ve slupkách slunečnicových semen (9747 mg/ 100 g) oproti obsahu fenolů v semínku (1601 mg/ 100 g). Slupky slunečnicových semen obsahovaly téměř 10 % fenolů, ze kterých byly 2,2 % **anthokyany**. Výsledky studií potvrdily, že anthokyany mají také silné antioxidační vlastnosti.

Vědci se pokouší definovat strukturní charakteristiku flavonoidů, která přispívá k jejich antioxidační aktivitě. Přítomnost *o*-dihydroxy skupin na kruhu B, výskyt C2-3 dvojné vazby v konjugaci s 4-oxo skupinou na kruhu C, 3- a 5-hydroxy skupiny a 4-oxo skupina na kruzích A a C je spojena s antioxidační aktivitou. U fenolických kyselin jako např. kyselina kávová a chlorogenová se zdá, že jsou aktivnějšími antioxidanty než hydroxyderiváty benzoové kyseliny.⁴²

3.B.2 Rostlinné oleje

Triacylglyceroly (TG) a diacylglyceroly (DG) byly analyzovány v 16 vzorcích rostlinných olejů (např. slunečnice, soja, lněné semeno, kukuřice) pomocí HPLC-MS (vysokoúčinná kapalinová chromatografie - hmotnostní spektrometrie) s použitím atmosférického tlaku chemické ionizace (APCI) a UV detekce při 205 nm. Celkem bylo identifikováno 98 TG a 12 DG.⁴⁵

C. LISTY

3.C.1 Terpeny

Terpeny představují největší a strukturně nejrozmanitější známou skupinu sekundárních metabolitů. Jsou typické především pro rostlinnou říši, ale jsou známy i u jiných forem života. Všechny terpeny a steroidy (biogenetické cesty jsou velmi podobné) je možno formálně odvodit ze základní stavební jednotky – pětiuhlíkatého 2-methylbutadienu (tzv. izoprenu). Podle počtu těchto izoprenových jednotek se obvykle terpeny klasifikují jako: hemiterpeny C_5 , monoterpeny C_{10} , seskviterpeny C_{15} , diterpeny C_{20} , sesterpeny C_{25} , triterpeny C_{30} , karoteny C_{40} .¹⁵

Hemiterpeny se v přírodě vyskytují zřídka. Monoterpeny jsou látky prchavé a získávají se z čerstvého nebo sušeného materiálu destilací s vodou nebo s vodní parou. Seskviterpeny, diterpeny a vyšší jsou většinou neprchavé a izolují se zpravidla extrakcí organickými rozpouštědly.¹⁴

3.C.1.1 Seskviterpeny

Seskviterpeny představují nejpočetnější skupinu terpenoidů. Jsou velmi často přítomny v silicích vyšších rostlin. Podle struktury se dělí na cyklické a acyklické. Cyklické se dále dělí na monocyklické, bicyklické, tricyklické a laktony (α -metylen- γ -laktony).³² Monocyklické jsou typu bisabolanu a germakranu, bicyklické jsou typu kadinanu, guajanu a eudesmanu.¹⁴

Laktony rozdělujeme podle uhlíkatého skeletu na germakranolidy, elemanolidy, guajanolidy, pseudoguajanolidy, eudesmanolidy, xanthanolidy a další.³²

Seskviterpeny ve své hlavní biologicky aktivní formě – laktonu – mohou být prudkými křečovými jedy typu pikrotoxinu či koriamytrinu, gastrointestinálními iritanty typu gossypolu, ale především kontaktními alergeny. Jejich základní patnáctiuhlíkatá struktura je formována do různých typů. Většina toxických a alergenních laktonů patří do skupiny germakranolidů, guajanolidů, pseudoguajanolidů, sekoguajanolidů, sekopseudoguajanolidů, eudesmanolidů a sekoedesmanolidů.¹⁵ Seskviterpenových laktonů již bylo popsáno více než 7000 struktur. Tyto, společně s diterpeny, tvoří nejpočetnější skupinu sloučenin izolovaných z rodu *Helianthus*. Izolované seskviterpenové laktomy představují germakranolidové,

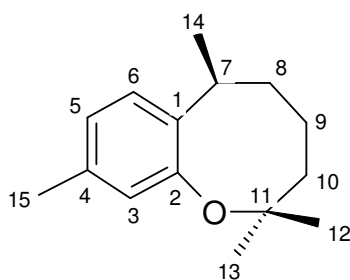
heliangolidové, melampolidové, eudesmanolidové a sekogermakranolidové skelety, nejběžnější jsou germakranolidy a heliangolidy, které mají ve své molekule většinou angeloylový substituent na C-8 s β orientací. Tyto sloučeniny vykazují široké spektrum biologické aktivity, včetně potenciální alelopatie.⁸

Seskviterpenové laktony se velmi hojně vyskytují v čeledi Asteraceae, často jsou hořkými a vonnými metabolity jejich druhů. Vedle řady pozitivních biologických efektů (jsou účinnými látkami významných léčivých rostlin) vykazují některé nežádoucí až toxické či alergenní účinky. V řadě odborných publikací byly popsány alergické kontaktní dermatitidy způsobené seskviterpenovými laktony. Přítomnost exocyklické α -methylenové skupiny je podmínkou vyvolání kontaktní hypersenzitivity (vazba laktonů na aminokyseliny). Toto zjištění přináší závěr o potenciální alergenní aktivitě u více než 400 seskviterpenových laktonů identifikovaných v čeledi Asteraceae. Nicméně i laktony bez methylenové skupiny, ale obsahující epoxyskupinu nebo cyklopentenový kruh, mohou mít též senzibilizující vlastnosti. Seskviterpenové laktony jsou nízkomolekulární látky, jejich schopnost indukovat hypersenzitivitu pozdního typu je podmíněna přímým kontaktem s kůží. Jiná aplikace do organismu obvykle nevyvolá alergickou odezvu. Rozvoj kontaktní alergické dermatitidy závisí individuálně na koncentraci laktonů v rostlině, na jejich senzibilizující kapacitě, četnosti a intenzitě podání i individuální dispozici člověka. Pouze několik druhů Asteraceae obsahujících laktony může vedle pozdní hypersenzitivity způsobit také alergickou reakci časného typu, nicméně nebylo prokázáno, že se jedná o přímou aktivitu těchto látek. Senzibilizující schopnost seskviterpenových laktonů byla prokázána u řady druhů léčivých rostlin – i u *Helianthus annuus* (1,2-anhydrid-4,5-dehydroniveusin A apod.).¹⁵

3.C.1.1.1 Heliannany, helibisabonoly

Heliannany byly izolovány z listů slunečnice. Heliannany představují nový typ seskviterpenů izolovaných ze suchozemských (*Helianthus annuus*) a vodních (*Haliclona fascigera*) organismů. Sdílejí jako společný strukturální rys substituovaný aromatický kruh přikondenzovaný k heterocyklu různé velikosti, který obsahuje kyslík.

Základní heliannanový skelet byl nedávno izolován z mořského organismu, indo-pacifické houby *Haliclona fascigera*.²⁰



(+)-heliannan

Heliannuol A je prvním heliannanem popsaným v literatuře. Byl izolován z listů slunečnice a všechny následující zástupci této skupiny byli izolováni ze stejného zdroje, ale v různých kultivarech (cv.) slunečnice.²⁰

Tab.1: Heliannany izolované ze suchozemských a mořských organismů

Heliannany	původ
Heliannan	<i>Haliclona fascigera</i>
Heliannuol A	<i>Helianthus annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol B	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol C	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol D	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol E	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol F	<i>H. annuus</i> cv. SH-222, cv. VYP
Heliannuol G	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol H	<i>H. annuus</i> cv. SH-222, cv. VYP
Heliannuol I	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol J	<i>H. annuus</i> cv. VYP, cv. Peredovick
Heliannuol K	<i>H. annuus</i> cv. SH-222

Heliannany lze rozdělit na základě chemické struktury na 4 skupiny:^{20,21}

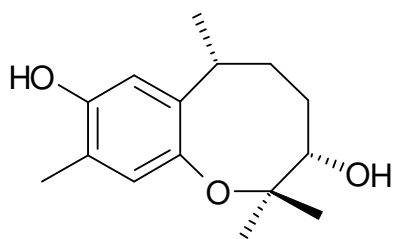
1. **7,11-heliannany:** heliannuol A (obr.3)

heliannuol G

heliannuol H (8 epimer heliannuolu G)

heliannuol K

heliannuol L



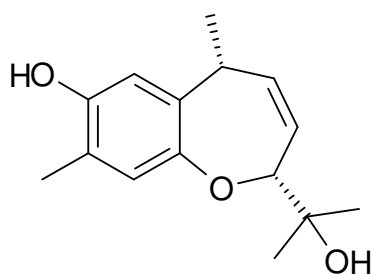
Obr.3: heliannuol A

2. **7,10- heliannany:** heliannuol B (obr.4)

heliannuol D (8,9-hydrogenát heliannuolu B)

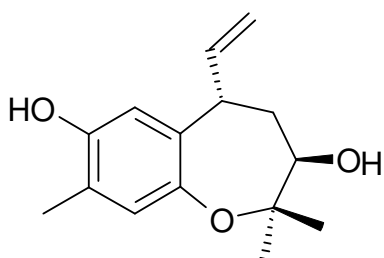
heliannuol F (8-oxo-heliannuol D)

heliannuol I a heliannuol J (7,8 epimery 7,8-epoxy-heliannuolu B)



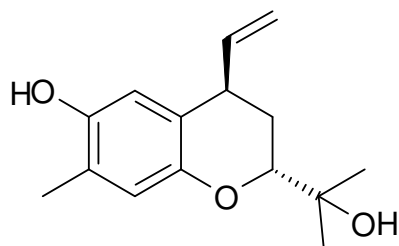
Obr.4: heliannuol B

3. **8,11- heliannany:** heliannuol C (obr.5)



Obr.5: heliannuol C

4. **8,10-heliannany**: heliannuol E (obr.6)

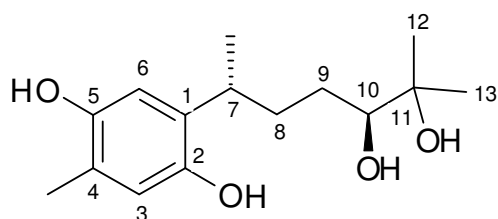


Obr.6: heliannuol E

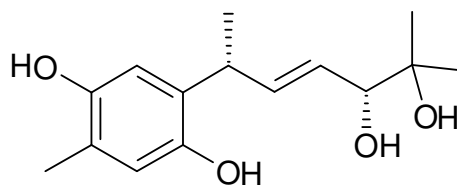
Helibisabonoly jsou otevřené prekurzory heliannanů. Z listů slunečnice byly izolovány helibisabonoly A a B. Oba byly získány jako bezbarvý olej.

U **helibisabonolu A** (obr.7) byla porovnáním dvou nejstabilnějších konformací a experimentálních interakčních konstant potvrzena relativní stereochemie $7R^*$, $10S^*$.

Helibisabonol B (obr.8) se na základě $^1\text{H-NMR}$ analýzy (nukleární magnetická rezonance) liší od helibisabonolu A dvěma signály, které odpovídají vinylové skupině a trans poloze. Relativní stereochemie chirálních center C-7 a C-10 je $7R^*$, $10R^*$.²²



Obr.7: helibisabonol A



Obr.8: helibisabonol B

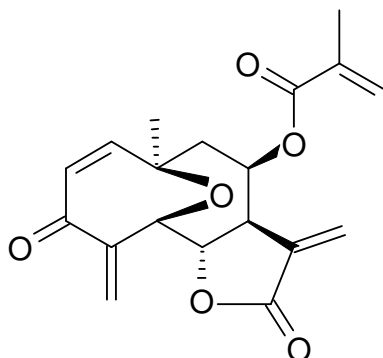
3.C.1.1.2 Germakranolidy

Germakranolidy jsou seskviterpenové laktony (α -metylen- γ -laktony).

Z listů slunečnice byly vyizolovány tyto germakranolidy: helivypolidy B, D, E, F, G, H, I, J.

Helivypolidy B a F (obr.9) byly izolovány z polárních bioaktivních frakcí vodných extraktů čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. Stella. Vodný roztok byl extrahován dichlormethanem a poté ethylacetátem (EtOAc) a tyto extrakty byly biologicky zkoušeny použitím pšeničných etiolizovaných koleoptilů. Dichlormethanový extrakt byl nejaktivnější a byla provedena chromatografie pomocí silikagelu použitím směsi hexan-EtOAc vzrůstající polaritou. Získaná data předpokládají u obou sloučenin přítomnost angeloylového esteru ve své struktuře.

Helivypolid F byl určen jako 8 β -angeloyloxy-5 β ,10 β -epoxy-3-oxo-germakran-1Z,4(15),11(13)-trien-6 α ,12-olid.⁸

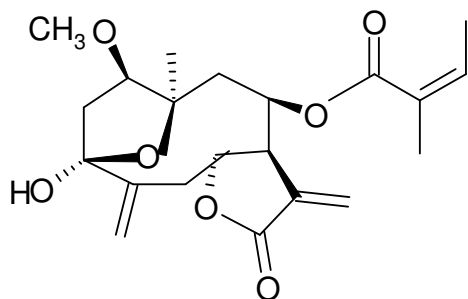


Obr.9: helivypolid F

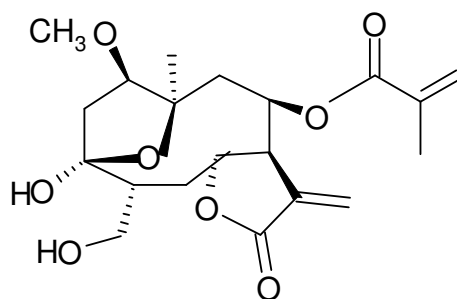
Helivypolid G byl získán z vodného extraktu čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. Stella, který byl reextrahován dichlormethanem. Byl izolován jako nažloutlá amorfnní hmota. Ze spektrálních dat vyplývá, že se jedná o dimer seskviterpenického laktonu.²⁷

Helivypolidy H-J byly izolovány z polárních bioaktivních frakcí vodných extraktů čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. SH-222. ¹H-NMR spektrum helivypolidu H (obr.10) určilo, že se jedná o seskviterpenický lakton s angeloylovým esterem a další methoxy skupinou. Jeho spektroskopická data byla podobná těm od 1-methoxy-4,5-dihydroniveusinu A, což předpokládá lakton furanheliangolidového typu. ¹H-NMR spektrum helivypolidu I bylo podobné spektru 1-methoxy-4,5-dihydroniveusinu A. Jejich rozdíly vedou k závěru, že helivypolid I musí být jeho izomerem, s methoxy skupinou napojenou na jiném místě, ale se stejnou stereochemií. Helivypolid J má ¹H-NMR spektrum podobné helivypolidu I.

Z polárních bioaktivních frakcí vodných extraktů čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. SH-222 byly dále vyizolovány tyto sloučeniny: **1-methoxy-4,5-dihydroniveusin A** (obr.11) a **1,2-anhydroniveusin A**.⁸



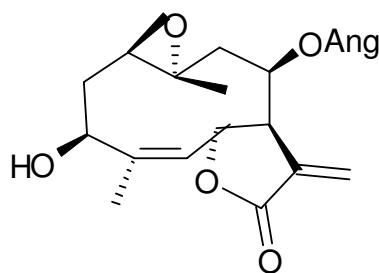
Obr.10: helivypolid H



Obr.11: 1-methoxy-4,5-dihydroniveusin A

1,2-anhydroniveusin A byl již dříve izolován z *Helianthus annuus*. Struktura byla opravena až na základě dat získaných dvourozměrným měřením spekter (^1H - a ^{13}C NMR, g-HSQC (Heteronuclear single quantum correlation)).⁸

Leptokarpin (obr.12) byl získán z dichlormethanového extraktu suchých listů *Helianthus annuus* L. cv. Peredovick společně s heliannuoly a dalšími seskviterpeny.²²



Obr.12: leptokarpin

Mezi germakranolidy vyizolované z listů slunečnice patří heliangolidy typu niveusinu – niveusin A, B, C.

Niveusin B byl získán z extraktu mladých listů a vrchní části stonku *Helianthus annuus* var. *giganteus*, společně s novým germakranolidem **15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticinem** a ethoxyheliangolidem **O-ethylniveusinem B**.

Za účelem objasnění, zda tato poslední sloučenina je přirozeně se vyskytující látkou nebo artefaktem vzniklým za podmínek probíhající extrakce, byl extrakční proces upraven použitím vody a chloroformu, tedy vyloučením alkoholu. Výsledkem bylo zjištění, že se tato sloučenina tvoří během alkoholové extrakce reakcí ethanolu s hydroxylovou skupinou na uhlíku C-3 niveusinu B.

Dalším furanoheliangolidem je **niveusin C**, který byl izolován z *H. niveus*.²⁸

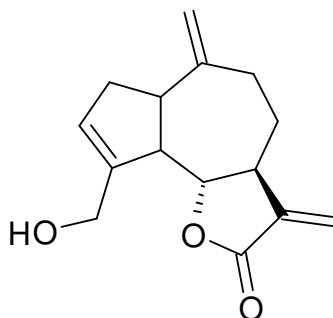
Niveusin B, 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin a $11\beta\text{H}$ -dihydrochamissonin byly izolovány také z polárních bioaktivních frakcí vodných extraktů čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. Stella.⁸

Dále byl izolován nový biologicky aktivní germakranolid **annuithrin, agrophylliny A**.^{8,29}

3.C.1.1.3 Guajanolidy

Guajanolidy jsou také seskviterpenové laktony. Z listů slunečnice byly vyizolovány annuolidy A-E, H.^{8,21}

Z polárních bioaktivních frakcí vodných extraktů čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. Stella a SH-222 byly izolovány **annuolid A** (obr.13) a **H** společně s **8β-angeloyloxycumam branolidem**.⁸



Obr.13: annuolid A

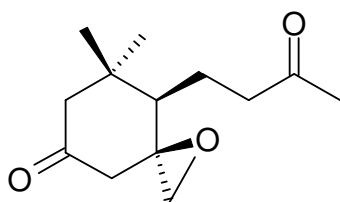
Z koncentrovaného dichlormethanového extraktu z *Helianthus glaucophyllus* a *H. microcephalus* byly získány další tři guajanolidy.²³

3.C.1.1.4 Annuionony (apokarotenoidy)

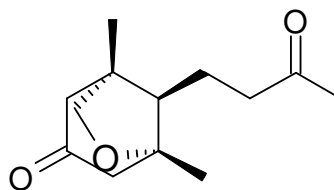
Mnoho apokarotenoidů, sloučenin s méně než čtyřiceti atomy uhlíku, ale s karotenoidní strukturou, byly nalezeny v rostlinných silicích a často souvisejí s vůní rostliny. Syntéza těchto látek probíhá hlavně katabolismem karotenoidů.

Z listů slunečnice byly vyizolovány annuionony A-H.

Polární biologicky aktivní frakce *Helianthus annuus* cv. Stella a SH-222 poskytla osm apokarotenoidů. Dva z nich byly izolovány poprvé jako přírodní produkty (**annuionony F** a **G**). Izolace většího množství annuiononů A a E umožnila realizovat detailnější spektroskopickou studii. Byla navržena opravená struktura pro **annuionony A** (obr.14, 15), **B** a **E**, založená na pečlivé reanalýze nových spektroskopických dat.³⁰



Obr.14: annuionon A (původní struktura)



Obr.15: annuionon A (opravená struktura)

3.C.1.1.5 Eudesmanolidy

Helieudesmanolid A byl izolován z polárních bioaktivních frakcí vodných extraktů čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. SH-222, společně s germakranolidy a guajanolidy.

¹H-NMR spektrum prokázalo hodnoty charakteristické pro seskviterpenický lakton s eudesmanovým skeletem.⁸

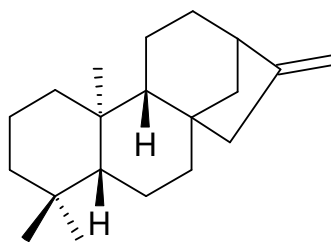
3.C.1.1.6 Heliespirony (spiroterpeny)

Ze středně polární frakce vodného extraktu listů *Helianthus annuus* byly vyizolovány sloučeniny s heliespironovým skeletem - heliespirony A-E.⁴⁶

Heliespiron A je prvním zástupcem nové skupiny látek, který má netypický spirosekviterpenický skelet.²⁴ Struktura **heliespironu C**, který má potenciální alelopatickou aktivitu, byla objasněna pomocí homo- a hetero-nukleární 2D-NMR spektroskopie a krystalografických dat.⁴⁶

3.C.1.2 Diterpeny

Diterpeny jsou látky obsahující 20 uhlíkových atomů,¹⁵ vznikají tedy spojením čtyř izoprenových jednotek. Za jejich prekurzor je možné pokládat geranylgeraniol. Acyklické diterpeny se v přírodě vyskytují zřídka. Cyklizací geranylgeraniolu vznikají cyklické terpeny, které se dělí podle uhlíkového skeletu na monocyklické, bicyklické, tricyklické a tetracyklické.¹⁴ Diterpeny s tetracyklickou strukturou jsou kaurany. V přírodě se většina kauranových derivátů vyskytuje ve formě derivátů kaurenu ((-)-kaur-16-enu). Kaurany jsou v rostlinách široce rozšířené. Vykazují významnou biologickou aktivitu včetně toxicity.¹⁵



kauren

Z *Helianthus annuus* L. byly izolovány dva nové diterpeny: **2 β ,16 β -*ent*-kaurandiol** a **15 α ,16 α -epoxy-17 β -formyl-*ent*-kauran-19-ová kyselina**. Jejich struktury byly určeny spektroskopicky.

Sloučenina 2 β ,16 β -*ent*-kaurandiol byla získána jako bezbarvé krystaly. Předpokládalo se, že se jedná o saturovaný tetracyklický diterpen *ent*-kauranového skeletu, který nese dvě hydroxylové skupiny na bázi jeho strukturního vzorce. Rentgenová difrakce (X-ray diffraction) umožnila určení konfigurace jako (1S, 4R, 7S, 9R, 13R, 14S)-5,5,9,14-tetramethyltetracyklo[11.2.1.01,10.04,9]hexadekan-7,14-diol, která je identická s 2 β ,16 β -*ent*-kaurandiolem.

15 α ,16 α -epoxy-17 β -formyl-*ent*-kauran-19-ová kyselina byla získána jako amorfnní hmota. Z dat ¹H-NMR a ¹³C-NMR byla zjištěna podobnost se známou sloučeninou 15 α ,16 α -epoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-ovou kyselinou, až na hydroxymethylovou skupinu na jejímž místě má tato sloučenina aldehydickou skupinu.²⁶

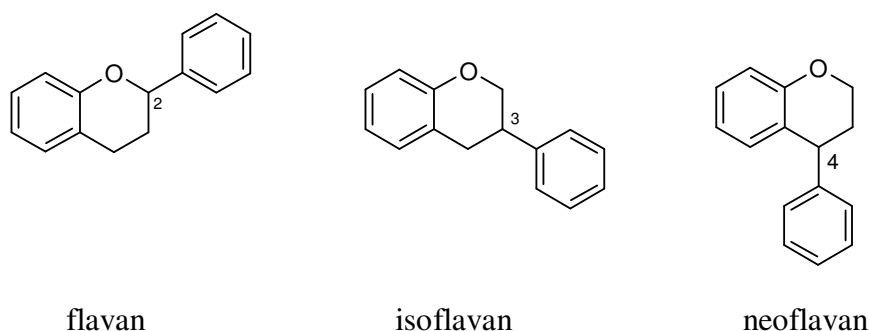
3.C.1.3 Triterpeny

Triterpeny se vyskytují v metabolismu rostlin v různých strukturních formách, vykazují velmi rozličnou biologickou aktivitu, některé jsou také jedovaté.¹⁵

3.C.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou deriváty fenylchromanu, mezi něž patří jednak volné, jednak glykosidicky na cukry vázané katechiny, dihydrochalkony, chalkony, flavanony, isoflavanony, flavanoly, flavony, isoflavony, anthokyanidiny a flavonoly (pořadí podle rostoucího stupně oxidace).¹⁸ Jsou to sekundární rostlinné metabolity, jejichž základem je chroman arylovaný v poloze 2, 3 nebo 4 (Schéma 1). Jednotlivé flavonoidy se navzájem liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích, počtem a polohou methoxylových skupin a napojením cukrů nebo organických kyselin.¹⁴

Schéma 1



Flavonoidy jsou v přírodě velmi rozšířené, vyskytují se však pouze v rostlinné říši. Pokud byly nalezeny v hmyzu nebo v jiných živočiších, dostaly se tam s potravou. Četné flavonoidy mají fyziologické účinky a používají se v medicíně.¹⁸ Neoflavany se vyskytují zřídka a v terapii se nepoužívají.¹⁴

V živém rostlinném organismu se flavonoidy patrně účastní oxidačně redukčních pochodů.¹⁸ Jejich struktura je výhodná pro tvorbu chinoidních struktur a tedy pro jedoelektronové oxidoredukce.¹⁹ Některé flavonoidy mají antioxidační aktivitu.¹⁷ Jako antioxidanty působí protizánětlivě, protinádorově a zasahují do buněčného signálního systému.¹⁹

Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemoragicky a antiedematózně (P-vitaminový účinek).¹⁸ Flavonoidy zlepšují mikrocirkulaci u chronické žilní insuficience.¹⁹ Dále mají antialergickou a antivirovou aktivitu.¹⁷ Brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi, jsou proto podpůrnými prostředky při léčbě infekčních nemocí.¹⁸ Určité flavonoidy vykazují potenciální aktivitu proti velkému množství enzymů. Významný je jejich inhibiční efekt na několik enzymových systémů, které souvisejí s procesy buněčné aktivace jako je proteinkinasa C, proteintyrosinkinasa a fosfolipasa A₂.¹⁷ Jsou schopné inhibovat

hyaluronidázu, lipoxygenázu a lipoperoxidaci.^{18,19} Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S ionty Ca^{2+} tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle.¹⁸ Flavonoidy chelatují železo, takže i tímto mechanismem by mohly tlumit oxidační stres tkáně.¹⁹ Potencují účinek vitamínu C. Mají též účinky choleretické, cholagogní, spasmolytické.¹⁸

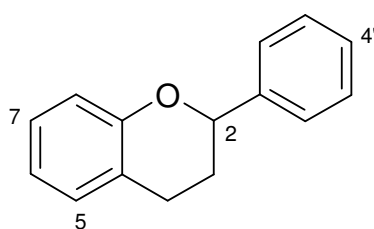
Jsou to netoxické, většinou dobře tolerované látky.¹⁹

Suché listy a květy *Helianthus microcephalus* byly extrahovány dichlormethanem. Zahuštěný extrakt byl nanesen na chromatografickou kolonu a dělen na sloupci silikagelu. Eluován byl směsí hexan-ethylester kyseliny octové o vzrůstající polaritě.

Z extraktu byl získán **5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavan** a izolovány 4 další flavonoidy: **ladanetin, kasticin, eupatin, a mikanin.**²³

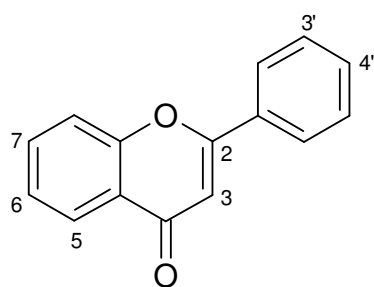
Z listů slunečnice byly také vyizolovány tyto flavonoidy: **tambulin, kukulkanin B, heliannon A-C.**³¹

Flavan	5	7	4'
5-hydroxy-7,4' -dimethoxyflavan	OH	OCH ₃	OCH ₃



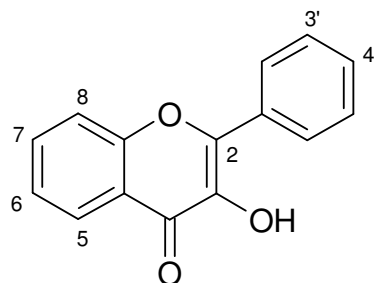
flavan

Flavon	3	5	6	7	3'	4'
ladanetin		OH	OH	OCH ₃		OH
kasticin	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃



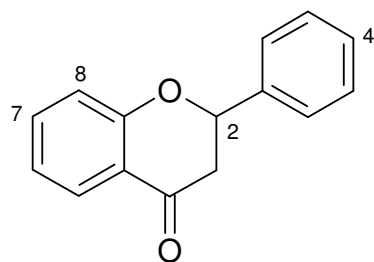
flavon

Flavonol	5	6	7	8	3'	4'
eupatin	OH	OCH ₃	OCH ₃		OH	OCH ₃
mikanin	OH	OCH ₃	OCH ₃			OCH ₃
tambulin	OH		OCH ₃	OCH ₃		OH



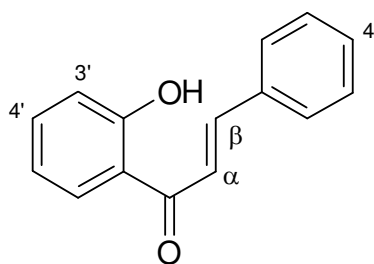
flavonol

Flavanon	7	8	4'
heliannon B	OCH ₃	OCH ₃	OH
heliannon C	OH	OCH ₃	OH



flavanon

Chalkon	4	3'	4'
kukulkanin B	OH	OCH ₃	OH
heliannon A	OH	OCH ₃	OCH ₃



chalkon

4. Biologická aktivita obsahových látek

V dnešní uspěchané době se lidé setkávají se spoustou stresových situací a jsou vystaveni působení nepříznivých faktorů životního prostředí, které jsou zdrojem volných radikálů.

Bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS). Nejvýkonnějším producentem reaktivních metabolitů kyslíku v buňkách jsou membránově vázané enzymy. Jsou to hlavně koenzymy s chinoidní nebo flavinovou strukturou, hemové koenzymy a enzymy s mědí v aktivním centru. Avšak nejvydatnějším zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňce je respirační řetězec mitochondrií.

Tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Jde o látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami. Tyto radikálové metabolity v organismu poškozují mastné kyseliny a lipidy, aminokyseliny a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleové kyseliny; DNA – deoxyribonukleová kyselina) i řadu nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty.¹⁹

Tab.2: Hlavní buněčné cílové struktury pro volné radikály¹⁹

<i>Cíl</i>	<i>Poškození</i>	<i>Následky</i>
nenasycené mastné kyseliny v lipidech	ztráta dvojných vazeb, tvorba reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy)	změněná fluidita lipidů, změny v propustnosti membrán, vliv na membránově vázané enzymy, tvorba chemoatraktivních látek pro makrofágy
proteiny	agregace a síťování, fragmentace a štěpení, modifikace thiolových skupin a benzenových jader aminokyselin, reakce s hemovým železem	změny v transportu iontů, vstup Ca ²⁺ do cytosolu, změny v aktivitě enzymů
DNA	štěpení kruhu deoxyribózy, modifikace a poškození bází, zlomy řetězce, křížové vazby řetězců	mutace, translační chyby, inhibice proteosyntézy

Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky, jsou schopné organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit.

Na přelomu 60. a 70. let byla objasněna peroxidace lipidů katalyzovaná cyklooxygenázou a lipoxygenázou za vzniku biologicky účinných látek (prostaglandinů, tromboxanu a leukotrienů). V 70. letech začal intenzivní výzkum interakce metabolických ROS s proteiny a v 90. letech byla popsána řetězová radikálová reakce v proteinech. Ukázalo se, že oxidované proteiny ztrácejí svou funkci a jsou rychle degradovány. Také DNA se ukázaly jako kritický substrát radikálových reakcí vedoucích k mutagenезi, karcinogenезi a k buněčné smrti.¹⁹

Volné radikály jsou zcela obecným metabolitem v každé buňce a každá buňka musí být vybavena prostředky, které ji před těmito reaktivními látkami chrání.

Vzestup koncentrace kyslíku v zemské atmosféře způsobený před 2,5 miliardami let fotosyntetickou aktivitou sinic musel způsobit stres, který mohly přežít jen druhy, u nichž se vyvinuly mechanismy chránící je před vysoce reaktivním prvkem (a hlavně před jeho metabolity). Organismus používá tři možných typů ochrany:

1. Nejbezpečnějším způsobem je bránit se tvorbě nadměrného množství RONS například regulací aktivity enzymů, které je tvoří (indukovatelná syntéza NO[•]), nebo vychytáváním tranzitních prvků z reaktivních pozic (transferin, feritin).
2. Druhou možností je záchyt a odstranění radikálů, které se již vytvořily. V literatuře se tyto látky označují jako vychytávače či zametače (scavengers), lapače (trappers) a zhášedce (quenchers). Výstižnější je dělení antioxidantů na enzymy a na látky dávající s RONS stálejší a tudíž méně toxické produkty.
3. Na antioxidační ochraně se podílejí též obecné reparační mechanismy poškozených biomolekul. Fosfolipázy odstraňují poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů, oxidačně modifikované proteiny se rozkládají proteolyticky a zvláštní reparační enzymy opravují poškozenou DNA.

Ochrana organismu proti oxidačnímu poškození je systém, ve kterém antioxidanty a celá jejich seskupení vzájemně spolupracují. Funkce jednoho antioxidantu velmi často podmiňuje účinek jiného článku soustavy. Při řadě chorobných stavů dochází nejen k poklesu kapacity antioxidačních systémů, ale i ke zvýšené tvorbě radikálů. Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním RONS se nazývá oxidační stres. K nadměrné tvorbě ROS dochází např. při některých metabolických situacích, při reoxygenaci tkáně po ischemii, po příjmu oxidoredukčně aktivních xenobiotik atd. Také nadměrná syntéza NO[•] je škodlivá.¹⁹

Mnoho experimentálních studií *in vitro* a *in vivo* prokazuje příznivý vliv antioxidantů v různých kombinacích. Na celém světě proběhlo a stále probíhá mnoho klinických studií s antioxidační terapií. Jejich výsledky nejsou jednoznačné nejspíše proto, že oxidační stres je jen jedním z dějů probíhajících při těchto onemocněních. Sledované parametry jsou závislé i na dalších faktorech. Některé klinické studie dokazují, že podáváním antioxidačních látek se sníží riziko vzniku onemocnění nebo se zlepší jeho průběh (ischemická choroba srdeční, ateroskleróza, cévní mozková příhoda, šokový stav, neurologická onemocnění, nádorová bujení a další).¹⁹

4.1 Antioxidační aktivita

4.1.1 Úvod

Antioxidanty jsou chemické látky schopné ukončit řetězové radikálové reakce. Přírodní antioxidanty jsou předmětem zvýšeného zájmu v biologickém výzkumu, medicíně, farmacii a potravní technologii.

Je několik detekčních systémů založených na oxidačně-redukčních reakcích, které jsou vhodné pro stanovení radikály-inaktivujícího účinku antioxidantů přítomných v relativně komplexních vzorcích jako jsou rostlinné extrakty.⁹

V literatuře lze nalézt velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Metody mohou být obecně 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).⁵³

Antioxidační aktivita flavonoidů byla hodnocena proti řadě RONS. Protože antioxidační aktivita flavonoidů se značně mění v závislosti na struktuře hlavního řetězce, rozmanitosti a druhu funkčních skupin přítomných v chemické struktuře, některé studie zavedly vztah mezi strukturou a aktivitou (structure-activity relationships, SAR) pro flavonoidy. Mezi studiemi je však několik nesrovnalostí, které pravděpodobně způsobily rozdílné podmínky při provádění zkoušek. Několik autorů studovalo SAR flavonoidů použitím metod, které jsou běžně používané pro měření totální antioxidační kapacity, jako Troloxu ekvivalentní antioxidační kapacita (TEAC) a absorpční kapacita kyslíkového radikálu (ORAC).¹⁰

4.1.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu

4.1.2.1 Princip

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

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, XV) s antioxidanty v organických nebo vodně-organických médiích, kterou se odbarví roztok DPPH. Tento radikál je zhasen reakcí s antioxidační látkou, která je donorem vodíkového protonu. 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.⁹

4.1.2.2 Příprava roztoků

Pro přípravu vodných roztoků se používá vysoce čištěná neionizovaná 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 suchého extraktu 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.⁹

4.1.2.3 Pístroje

Měření probíhá na systému pro sekvenční injekční analýzu (SIA) FIALab 3000, vybaveným pístovým čerpadlem s objemem 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, mísící cívkou, průtokovou detekční celou, detektorem, halogenovou lampou a spojovacími hadičkami. Zařízení je propojeno s počítačem a prostřednictvím programu FIALab 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. 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. Jedná se o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem.

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

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

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

4.1.3 Antioxidační aktivita FRAP

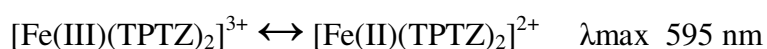
4.1.3.1 Úvod

Jedna z metod, která se běžně používá pro měření totální antioxidační kapacity, je měření antioxidační redukční síly použitím železitých iontů (ferric reducing antioxidant power, FRAP), což je jednoduchá a spolehlivá kolorimetrická metoda, kterou navrhli I.F.Benzi a J.J.Strain. Tato metoda je založena na schopnosti antioxidantů redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} . Zatímco velká část metod používaných k hodnocení SAR flavonoidů měří jejich aktivitu proti oxidantům, FRAP měří přímo redukční schopnost látky.¹⁰

4.1.3.2 Princip metody

Metoda FRAP je jednoduchá, spolehlivá, spektrofotometrická metoda, která je založena na schopnosti antioxidantů redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} . Byla původně navržena k měření totální antioxidační kapacity plazmy a poté použita stejnými autory u ostatních látek. Fe^{2+} ionty jsou měřeny spektrofotometricky stanovením jejich barevného (modrého) komplexu s 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazinem (TPTZ), jehož absorpční maximum je při 595 nm.

Protože antioxidační aktivita látek je přímo úměrná jejich redukční kapacitě, představuje FRAP analýza spolehlivou metodu ke studiu antioxidační aktivity rozmanitých sloučenin. Tato metoda byla často použita k rychlému vyhodnocení totální antioxidační kapacity různých potravin a nápojů a také rozdílných rostlinných extraktů obsahujících flavonoidy. Dále ještě byla použita k hodnocení antioxidační aktivity dietních polyfenolů.¹⁰



4.1.3.3 Postup

Všechny experimenty byly prováděny podle článku (O.Firuzi, 2005). Na mikrodestičku typu P (Brand 400 μl , Fischer) 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 připravený a zahřátý na 37 °C) byl přidán k látkám do třech jamek, do čtvrté pak bylo přidáno 175 μl acetátového pufru (slepý vzorek). Absorbance byla měřena při vlnové délce 595 nm na přístroji Microplate reader (Anthos 2010) v různých časových intervalech až po dobu 120 minut. Změna absorbance $\Delta A_{595\text{nm}}$ byla počítána jako rozdíl absorbance slepého vzorku (substance + acetátový pufr) a směsi (25 μl substance +175 μl FRAP roztoku) a absorbance antioxidantů pro každý časový interval. Všechny látky byly testovány nejméně třikrát při 37°C. FRAP value pro časový interval t (FRAP value _{t}) byl počítán dle vzorce:

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

Kde $\Delta a_t \text{ Fl}$ je změna v časovém intervalu t (4 a 60 minut) vztažená k testované látce při koncentraci $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ a $\Delta a_t \text{ Fe}^{2+}$ 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 použití softwaru SigmaPlot 2002 pro Windows version 8.0.¹⁰

4.1.3.4 Přístroje

Jedná se o FRAP metodu modifikovanou za využití mikrodestiček typu P(destičky Brand 400 µl byly získány od firmy Fischer). Všechna měření proběhla na přístroji Microplate reader (Anthos 2010).¹⁰

4.1.4 Antioxidanty testované *in vitro*

Antioxidanty jsou látky, které se také přidávají do stravy (speciálně do jedlých tuků) za účelem zabránění oxidačnímu procesu. Jako antioxidanty syntetického původu se od začátku 20. století používají butylovaný hydroxyanisol (BHA), butylovaný hydroxytoluen (BHT) a galláty. Protože tyto syntetické přísady do potravin mohou být karcinogenní a způsobit smrtelná onemocnění, velmi rychle se zvýšil zájem o alternativní směsi na přírodní bázi. Mnoho vědeckých článků referuje o různých přírodních fenolech, které zpomalují *in vitro* oxidaci jednoduchých nebo komplexních lipidových matric. Nicméně průmyslové využití přírodních fenolů v čisté formě, případně ve formě extraktu, je v současnosti stále velmi těžké uvést do praxe.³⁵

Rostliny obsahují značný rozsah fenolů, zahrnujících tokoferoly a tokotrienoly. Mnohé rostlinné polyfenoly jsou *in vitro* vynikajícími antioxidanty. Počet fenolických –OH skupin a jejich vzájemná pozice je klíčem k určení antioxidační aktivity. Slunečnicový olej obsahuje velké množství α -tokoferolu, který je jedním z nejaktivnějších *in vitro* antioxidantů. Tokoferoly a tokotrienoly brání peroxidaci lipidů, protože čistí radikály mnohem rychleji, než mohou reagovat s přilehlými mastnými kyselinami nebo membránovými proteiny. Některé fenoly jsou v rostlinách důležitými biosyntetickými prekurzory (např. kyselina kávová pro lignin).

Největší pozornost je věnována flavonoidům, které nejsou pouze antioxidanty, ale mají mnoho dalších účinků *in vitro*. Některé mohou inhibovat cyklooxygenázu 1 a 2, lipoxygenázu a další.⁴³

4.2 Antiflogistická aktivita

4.2.1 Zánět

Zánět je reakcí na místní porušení integrity organismu. Mechanismy zánětu mohou být spuštěny nejen infekčními mikroorganismy, ale také fyzikálními či chemickými vlivy, popřípadě též ischemií tkáně.

Lokálně aktivované leukocyty produkují reaktivní formy kyslíku a proteolytické enzymy, čímž přispívají jak k destrukci mikroorganismů, tak k poškození tkáně postižené zánětem.

Reaktivní formy kyslíku a dusíku hrají v průběhu zánětu dvojí roli:

- Na jedné straně přispívají vazodilatací a antiagregačním účinkem k udržení perfuze zánětem poškozené tkáně. Vazodilatační účinky oxidu dusnatého (NO[•]) mohou přispívat ke zvýšenému prokrvení zánětlivého ložiska a jeho antiagregační účinky mohou snižovat riziko intravaskulární trombózy.

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou důležitou složkou mikrobicidních mechanismů fagocytárních buněk a jejich tvorba může být důležitá i pro aktivaci produkce protizánětlivých cytokinů. Po aktivaci fagocytů je membránový enzymový systém NADPH-oxidázy schopen dramaticky zvýšit buněčnou produkci volných radikálů. Aktivace fagocytů a stimulace NADPH-oxidázy způsobí dramatický vzestup spotřeby kyslíku fagocytem – respirační vzplanutí. Působením NADPH-oxidázy se kyslík redukuje na superoxid. Respirační vzplanutí zahrnuje kromě zvýšené tvorby reaktivních forem kyslíku i vzestup oxidace glukózy. Interakce superoxidu, peroxidu vodíku a iontů železa redukuje kyslík na úroveň hydroxylového radikálu, který pak může působit jako nejsilnější mikrobicidní faktor.

- Na druhé straně může vést zvýšená lokální tvorba ROS k poškození vlastních tkání a systémová nadprodukce NO[•] může hrát důležitou roli v patogenezi často fatální komplikace původně lokalizované infekce, tj. septického šoku. Vazodilatace u septického šoku často nereaguje na obvykle podávané vazokonstrikční látky. Dosavadní studie naznačují, že částečná inhibice tvorby NO[•] při infekci a sepsi může být užitečná a že podání inhibitorů NO-syntázy může přispět k normalizaci krevního oběhu. Úplná inhibice tvorby NO[•] je nebezpečná, protože určitá reziduální tvorba NO[•] je nezbytná pro udržení orgánové perfuze a k inhibici agregace krevních destiček.¹⁹

4.2.2 Modifikace cyklooxygenázové a lipoxygenázové aktivity pomocí Asteridae extraktů a boswellové kyseliny

Zánět je zahájen i podporován nadprodukcí prostaglandinů (PG) a leukotrienů (LT) v poraněných buňkách. PG a LT jsou produkovány samostatně cestou přes oddělené enzymové dráhy známé jako cyklooxygenázové (COX) a lipoxygenázové (LO) dráhy.

Bylo objeveno, že extrakty z rostlin podtřídy Asteridae ukazují selektivní inhibici COX-2 aktivity a/nebo zvyšování COX-1 aktivity. Studie dále prokázaly, že Asteridae extrakty kombinované s boswellovou kyselinou mají synergický inhibiční účinek na COX-2 aktivitu a zároveň inhibují i LO aktivitu. Touto kombinací je COX-2 aktivita inhibována mnohem výrazněji než samotným Asteridae extraktem. Je to překvapující, protože sama boswellová kyselina COX-2 aktivitu neinhibuje. Také LO aktivita je kombinací Asteridae extraktu s boswellovou kyselinou inhibována více než kyselinou samotnou. Navíc samotný Asteridae extrakt LO aktivitu neinhibuje vůbec. Asteridae extrakty naopak COX-1 aktivitu zvyšují. Jsou proto užitečné pro zvrácení COX-1 inhibice, která je způsobená například nesteroidními antiflogistiky.⁴⁴

4.2.3 Léčba a prevence zánětů v místech leukocytární infiltrace

Výtažek ze slunečnicových semen (*Helianthus annuus*) má schopnost snižovat zánětlivé aknézní léze.

K léčbě akné je používán koncentrovaný extrakt ze semen slunečnice, bohatý na polyfenoly, jejichž aktivita vůči radikálům byla hodnocena metodou elektronové magnetické rezonance. Akné je zánětlivé onemocnění s velmi častým výskytem a projevuje se lézemi pokožky v podobě komedonů a papulo-pustulí. Jak už bylo řečeno, lokálně aktivované leukocyty produkují ROS. Tyto reaktivní formy kyslíku hrají důležitou roli při vzniku aknézních lézí. V podstatě se jedná o proces, kdy jsou vícejadernými neutrofily generovány radikály, jež představují ústřední faktory pro vznik zánětu. Aknézní papulo-pustule je ve své podstatě umocněnou lézí, navozenou migrujícími neutrofilními leukocyty. Představa lékařů je taková, že je možné dosáhnout snížení schopnosti pohybu migrujících vícejaderných buněk pomocí orálně podávané netoxické přírodní látky s účinkem proti těmto radikálům. Za tímto účelem byl získán výtažek ze semen slunečnice. U těchto semen bohatých na polyfenoly, které jsou představované zejména fenolovými kyselinami (např. kyselinou chlorogenovou), byla experimentálně vyhodnocena inhibující aktivita vůči migrujícím leukocytům. Polyfenoly mají účinek pouze proti radikálům z leukocytů, nikoli na samotnou pokožku.

Výtažek ze semen slunečnice byl získán využitím odtučněných semen při procesu drcení. Byl zjemněn na prášek, jehož části jsou menší než 0,5 mm. Prášek je extrahován alkoholem (96% ethanol). Extrakt byl připravován v poměru 1 díl na 10 dílů alkoholu po dobu 24 hodin za stálého míchání při běžné teplotě okolního prostředí. Filtrát byl odpařován až do chvíle získání hmoty zbavené rozpouštědla, představujícího samotný extrakt. Ten obsahuje polyfenoly okolo 10% své váhy.

Výsledky ukazují, že kyselina chlorogenová jako hlavní složka polyfenolového extraktu ze slunečnicových semen vykazuje výraznou aktivitu vůči pohybu leukocytů ($IC_{50}=10^{-6}$ mol/l). Taková aktivita umožňuje zabránit hnisavému procesu lézí primárního akné.¹⁶

4.3 Alelopatická aktivita

Alelopatie (allelopathy) je odvětvím aplikovaných věd, které se zaměřuje na biochemické interakce rostlina-rostlina a rostlina-mikroorganismy.²⁴

Problematika plevelů představuje důležitou část zemědělského výzkumu. Neuvážené užívání herbicidů vyústilo v nárůst výskytu rezistence plevelů k některým skupinám herbicidů (jako jsou např. triaziny a dinitroaniliny), dále posun v populaci plevelů směrem k druhům, které jsou blízce příbuzné k plodinám, které napadají. Kromě toho nadměrné používání herbicidů mělo za následek znečištění životního prostředí a přidružená zdravotní rizika.^{21,52}

Je velké množství vyšších rostlin, které prokazují potlačovatelské účinky na další rostliny v jejich okolí, ale pouze některé z nich prokázaly účinky na plevelu a patogenech. Několik studií ukázalo, že druhy slunečnice obsahují chemické substance, které mají alelopatické vlastnosti.⁴¹ Slunečnice roční (*Helianthus annuus*) má velký alelopatický potenciál a inhibuje růst sazenic plevelů. Půdní studie prokázaly, že biomasa plevelů je stejně redukována v kultivarech slunečnic jak s ošetřením, tak i bez ošetření herbicidy. Rostliny mají svoje vlastní obranné mechanismy a alelochemické látky jsou ve skutečnosti přírodními herbicidy. Prostřednictvím izolace, identifikace a syntézy těchto aktivních sloučenin z alelopatických rostlinných druhů je možno využít alelopatii v zemědělství.⁵² Alelopatie může, vývojem pěstovaných druhů s větší schopností potlačovat růst plevelů, použitím přírodních fytotoxinů z rostlin či mikrobů jako herbicidů a užitím syntetických derivátů přírodních látek jako herbicidů, pomoci při těchto problémech.²⁴

Je důležité vyvinout efektivnější a selektivnější extrakční metody k získání biologicky aktivních látek z rostlinných materiálů. Jednou z alternativ je superkritická fluidní extrakce (SFE). SFE metody často zahrnují výzkum mnoha proměnných, které mohou ovlivnit efektivitu extrakce. Při této extrakci byl jako rozpouštědlo použit oxid uhličitý z důvodu jeho relativně nízké kritické teploty, netoxicity, nehořlavosti, dobré rozpouštěcí síly, pro snadnost odstranění z produktu a nízkou cenu. Tato metoda poskytuje čisté extrakty a redukuje použití pro prostředí agresivních rozpouštědel.⁴¹

4.4 Antimykotická a antimikrobiální aktivita

Jedním z důležitých předpokladů testování antimykotické aktivity *in vitro* je neexistence univerzální metody použitelné pro všechny typy testovaných látek a hub.

Terpenoidy získané z *Helianthus annuus* mají antimykotickou aktivitu. Seskviterpenové laktony a diterpenové kyseliny izolované z kultivované slunečnice byly zkoušeny pro jejich účinky na růst dvou ekonomicky důležitých patogenů slunečnice a dalších kulturních plodin. Těmito patogeny jsou *Verticillium dahliae* a *Sclerotinium sclerotiorum*.

Směs dvou diterpenových kyselin, kaurenové a angeloylgrandiflorové, byla nejsilnějším inhibátorem růstu hyf (buněk vláknitých hub tvořících řetězce). Šlechtěním rostoucí množství těchto terpenoidů ve slunečnici může vylepšit přirozenou rezistenci k houbovým patogenům.²⁵

Antimikrobiální aktivita některých biologicky aktivních heliangolidů z *Helianthus annuus* byla testována proti bakteriím a houbám.

Germakranolid 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin byl nejsilnějším inhibátorem proti bakterii (*Bacillus brevis* a *Proteus vulgaris*), zatímco O-ethylniveusin B byl více aktivní proti houbám (*Eremothecium ashbyi*) než niveusin B.²⁸

4.5 Akutní toxicita a fototoxicita

4.5.1 Úvod

Veškerý život na Zemi je zatížen expozicí nebezpečných látek unikajících do přírody. Jedná se i o látky, jejichž účinky na živé organismy jsou známy jen zčásti nebo vůbec. První, poměrně rychle získatelný údaj o nebezpečnosti látky poskytuje její akutní toxicita. Hledají se alternativní metody stanovení akutní toxicity, které by měly poskytovat adekvátní informace jako pokusy prováděné na obratlovcích. Alternativní metody mají v toxikologii a xenobiochemii dlouhou tradici, jsou využívány nejen z důvodů etických, ale i informačních a ekonomických.

Alternativní metody a testy zahrnují nejen využití nižších organismů a rostlin nebo jejich částí, testy *in vitro* s izolovanými buňkami nebo tkáňovými kulturami, ale i počítačové modely, které nejčastěji využívají technik analýzy QSAR nebo toxikokinetických pravidel.

Hlavními přednostmi testu na červecích *Tubifex tubifex* jsou jednoduchost, reprodukovatelnost, rychlost a finanční nenáročnost. Nítěnky 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 (Quantitative Structure – Activity Relationship, tj. kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou chemikálií a jejich biologickou účinností).

Experimentální metodika screeningového testování pomocí *Tubifex tubifex* Müll. je součástí navrženého a propracovávaného testu, který se provádí na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, a je navržena pro ověřování akutní toxicity a fotosenzibilizačních vlastností testovaných látek.

4.5.2 Popis testovaného organismu

Nítěnka obecná (*Tubifex tubifex* Müller) náleží do kmene kroužkoců (Annelida), třídy máloštětinatců (Oligochaeta). Jejich životním prostředím jsou toky se značným organickým znečištěním. Vyskytuje se na dně koryt v bahně v kanálcích, které si slizem zpevňují, a to do hloubky okolo 10 cm. Na místě výskytu najdeme vždy kolonii čítající tisíce jedinců.



Obr.16³³

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 4-5násobku jejich váhy. Všichni máloštětinatci dýchají celým povrchem těla.

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie je *Tubifex tubifex* chován v akváriu s 6 cm vrstvou písku a 8 cm vody. Světelný režim den:noc je 10:14 hodin. Akvárium je 24 hodin denně provzdušňováno, koncentrace kyslíku je 8 mg/l, teplota $20 \pm 2^\circ\text{C}$, pH $7,5 \pm 0,1$.

4.5.3 Metodika testování

Vlastní test probíhá ve 24jamkových mikrotitračních destičkách, což plně odpovídá nejnovějším trendům v ekotoxikologii a screeningové toxikologii vůbec, tj. miniaturizace uspořádání, úspora experimentálních organismů a zároveň daleko menší spotřeba než je při klasickém uspořádání v Petriho miskách.

Při každém pokusu byl zároveň s fotosenzibilizujícími látkami testován chlorid manganatý (MnCl_2) jako standardní toxin, který ověřoval standardnost experimentálních organismů.

4.5.3.1 Příprava testované látky

Množství toxinu odpovídající nejvyšší koncentraci bylo naváženo a rozpuštěno v zábrusové zkumavce v 2% roztoku dimethylsulfoxidu. K rozpuštění byla využita ultrazvuková lázeň. Z tohoto vzorku byly připraveny roztoky o nižší koncentraci tzv. půlovým ředěním.

4.5.3.2 Příprava experimentálního organismu

Den před pokusem bylo z chovu odděleno dostatečné množství máloštětinatců potřebných pro experiment. Nítky byly 24 hodin před pokusem nekrmeny a udržovány při konstantní teplotě 20°C . Pro pokus byli vybráni dospělí jedinci v rozmezí 0,0140 – 0,020 g.

4.5.4 Postup

4.5.4.1 Předběžné testy

U každé testované látky byly nejprve provedeny předběžné testy, které slouží k odhadu citlivosti testovaného organismu k danému toxinu. Při předběžných testech se zkoumá širší rozsah koncentrací. Podle jejich výsledků se zvolí oblast koncentrací k vlastnímu testování tak, aby při nejvyšší koncentraci reagovaly všechny organismy a při nejnižší koncentraci nebyl zasažen žádný organismus.

4.5.4.2 Popis pracovního postupu vlastního testu

Na počátku každého testování je proveden test se standardním toxinem - MnCl_2 . 24jamková destička je vystavena působení toxinu po dobu jedné hodiny celkem v šesti koncentracích a třech paralelních stanoveních. Po uplynutí stanovené doby je vyhodnocena mortalita.

Na základě získání standardních výsledků vyhodnocení mortality standardního toxinu (MnCl_2), jehož indexy akutní toxicity byly stanoveny dlouhodobým sledováním, EC_{50} MnCl_2 byla stanovena 68,04 mmol/l, přistoupíme k vlastnímu testování.

Připravíme koncentrační řadu alespoň dvanácti ředění, které je dosaženo postupným ředěním výchozího koncentrátu testované látky, umístěnou do dvou 24jamkových mikrotitračních destiček ve třech paralelních stanoveních.

Do každé jamky mikrotitrační destičky umístíme šest jedinců. Pod stereomikroskopem ověříme jejich nezávadnost a vitalitu. Posléze přidáme testovaný toxin. Mikrotitrační destičky umístíme pod UV lampu (366nm; $0,3\text{W}\cdot\text{cm}^2$) za standardní teploty $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Při každém experimentu máme zachovány kontroly jedinců bez fotosenzibilizačních látek a zároveň i temnostní kontrolu, tj. vliv fototoxinů bez UV záření.

Po zvolené době ozařování dochází ihned k vyhodnocení pod stereomikroskopem.

4.5.5 Vyhodnocení

Existuje více hodnotících parametrů. V našem případě byly zvoleny dva endpointy – mortalita a poškození.^{48,49}

4.6 Aktivita karnitinu

Acetyl-L-karnitin a L-karnitin ze semen jsou nutraceutika používána k léčbě neuropsychiatrických poruch zahrnujících především Alzheimerovu chorobu, stařecké deprese, nestařecké deprese a schizofrenii. Klinická odpověď u starších pacientů, kteří se léčí antidepresivními látkami se projeví úlevou v průměru okolo dvanácti týdnů. Léčba novějšími antidepresivy se ale projevuje vznikem vedlejších účinků, které jsou u této populace pacientů zneklidňující. Proto je snaha pracovat na vývoji novějších antidepresivních látek. Jedním z kandidátů je acetyl-L-karnitin. Je to molekula, která je organismu vlastní, vyskytuje se v lidském mozku a má jenom velice málo vedlejších účinků.³⁶

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

1. Všeobecné postupy

1.1 Extrakce

Extrakce představuje první krok při izolaci látek.³⁹

Je to dělicí metoda, při níž se využívá rozdílné rozpustnosti jednotlivých složek vzorku v různých rozpouštědlech. Tato metoda je tedy založená na přechodu látky z jedné kapalně fáze do fáze druhé, resp. na přechodu látky z fáze pevné do fáze kapalně. Podle provedení rozeznáváme extrakci tuhé látky kapalinou (př. macerace) a extrakci kapaliny kapalinou (př. vytřepávání) a to buď za studena nebo za zvýšené teploty.³⁸

1.1.1 Macerace

Jedná se o jednostupňovou nebo několikanásobnou extrakci drogy, při níž se pevná fáze rozmíchá s rozpouštědlem a zfiltruje. Stupeň extrakce se pochopitelně zvýší dokonalým rozdrobněním pevné látky, přebytkem rozpouštědla a mícháním,³⁸ které má být v průběhu předepsaného času dostatečně intenzivní. Provádí se v dobře uzavřených, před světlem chráněných nádobách.³⁹

1.1.2 Vytřepávání

Extrakce kapaliny kapalinou je založena na rozdělování rozpuštěné látky (látek) mezi dvě v podstatě nemísitelná rozpouštědla; prvním bývá v převažujícím počtu případů voda, ve druhém odpovídající, dostatečně nemísitelná rozpouštědla. Tento postup je běžně používán k hrubému dělení upraveného sumárního extraktu na frakce, v nichž jsou soustředěny látky o přibližně stejné polaritě.³⁹ Účinnost vytřepávání závisí na rozdělovacím koeficientu dané látky v obou fázích. Látka může být z roztoku extrahována buď jednou nebo opakovanými dávkami rozpouštědla.³⁸ K vytřepávání se používají dělicí nálevky nejlépe hruškovitého tvaru.³⁹

1.2 Filtrace

Filtrace je jednou z nejběžnějších operací; v jejím průběhu dochází k oddělování pevné fáze od fází ostatních pomocí propustného materiálu, který pevnou fází zachycuje a dovoluje vstup fází ostatním.³⁸ Filtrace má být kromě účinnosti dostatečně rychlá, nemá s ní být spojena zbytečná ztráta filtrovaného materiálu.

Filtrace slouží ve fytochemii ke dvěma cílům: k čištění extraktů na jejich cestě vedoucí k získání individuů a k oddělování krystalů od matečných louhů.³⁹

1.3 Odpařování (zahušťování)

Ve fytochemické laboratoři je obvyklejší odpařování za sníženého tlaku.

Největší uplatnění našla rotační vakuová odparka typu Büchi. 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.³⁹

1.4 Chromatografické metody

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 nestejně v systému dvou fází: stacionární (adsorbent) a mobilní (rozpuštědlo, eluent). Má tři základní fáze: nanesení vzorku, dělicí proces a detekci.^{38,39}

Chromatografii lze podle uspořádání aparatury rozdělit na chromatografii v plošném uspořádání (tenkovrstvou, papírovou) a chromatografii kolonovou (sloupcovou).³⁹

1.4.1 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 (komoře). Vyvíjení chromatogramů se provádí zásadně v uzavřených nádobách.³⁸ Oblíbené jsou komerčně vyráběné TLC chromatogramy, kde vrstvička sorbentu obsahuje příměs fluorescenční látky s maximem fluorescence při 254 nm (event. 366 nm).⁴⁰ Přitom se uplatňují podle povahy sorbentu a složení mobilní fáze všechny známé principy chromatografického dělení a to buď každý sám nebo ve vzájemné kombinaci. Tento typ umožňuje výkonné dělení.³⁸

Významnou předností TLC je snadnost detekce bezbarvých látek pomocí univerzálních detekčních činidel. Detekuje se v první fázi ultrafialovým zářením (UV), v druhé fázi

postříkem nesespecifickými činidly. Detekce selektivními nebo specifickými činidly je poslední fází při odkrývání určitého strukturního typu látek.³⁸

1.4.2 Sloupcová (kolonová) 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.³⁹

2. Potřeby

2.1 Rozpouštědla

Diethylether

Ethanol (EtOH)

Ether

Ethylacetát (EtOAc)

Chloroform (CHCl₃)

Methanol

Voda destilovaná (H₂O)

2.2 Chemikálie

Amoniak 25%

α-amyrin

Berberin

2,6-dibromchinonchlorimid

Dusičnan bismutitý

Fast blue B

Hydroxid sodný (NaOH)

Cholesterol

Jodid draselný

Kvercetin

Kyselina chloristá 70% (HClO₄)

Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorovodíková 35% (HCl)

Kyselina kávová

Kyselina mravenčí

Kyselina octová

Kyselina oleanolová

Kyselina palmitová

Kyselina vinná

Rutin

Sitosterol

Vanilin

2.3 Detekční činidla³⁷

D1: detekce alkaloidů a dusíkatých sloučenin

Dragendorffovo činidlo podle Muniera: roztok tetrajodobismutitanu (BiI_4)⁻

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody.

Zásobní roztok byl připraven smícháním roztoku A a B v poměru 1:1 (V/V), který může být uchováván po několik měsíců v lednici.

Postřikovací roztok byl připraven rozpouštěním 10 g kyseliny vinné v 50 ml destilované vody a přidáním 5 ml zásobního roztoku. Alkaloidy jsou po reakci s detekčním činidlem zbarveny oranžově.

D2: detekce fenolických sloučenin

Fast blue salt reagent (FBS)

Fast blue B: 3,3'-dimethoxybiphenyl-4,4'-bis(diazonium)-dichlorid

Roztok A: 0,5 g FBS B bylo rozpuštěno ve 100 ml vody.

Roztok B: 10% ethanolový roztok hydroxidu sodného.

Chromatogram byl nejprve postřikán čerstvě připraveným postřikovacím roztokem A. Po usušení byl chromatogram opět postřikán roztokem B. Vznikají různě zbarvené skvrny.

D3: Vanilinové činidlo

Činidlo bylo připraveno těsně před detekcí smísením roztoku 1% vanilinu v 96% EtOH s 3% kyselinou chloristou v poměru 1:1. Po postřiku činidlem byl chromatogram zahříván při teplotě 200°C. Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě zbarvených skvrn.

D4: Gibbsovo činidlo

2,6-dibromchinonchlorimid

Po postřiku čerstvě připraveným 0,4% methanolovým roztokem 2,6-dibromchinonchlorimidu byl chromatogram umístěn do komory obsahující 25% hydroxid amonný. Fenolické sloučeniny tvoří s činidlem žluté až hnědé skvrny podle doby působení hydroxidu amonného.

D5: UV $\lambda=254$ nm

Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 254 nm. Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě tmavých skvrn, ve kterých je zhasen fluoreskující luminofor vrstvy chromatogramu.

D6: UV $\lambda=366$ nm

Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 366 nm. Pozitivní reakce se projevuje vznikem fluoreskujících skvrn různého zbarvení.

2.4 Vytvájecí soustavy pro chromatografii

S1: CHCl ₃ – EtOH	95:5
S2: EtOAc – HCOOH – CH ₃ COOH – H ₂ O	100:11:11:26
S3: 96% EtOH	
S4: EtOH - CHCl ₃	9:1
S5: EtOH - CHCl ₃	8:2

2.5 Chromatografické adsorbenty

TLC hliníková fólie silikagel 60 F 254 20x20 cm, tloušťka vrstvy 0,2 mm (Merck)

Sephadex LH 20 pro sloupcovou chromatografii

2.6 Přístroje

Digitální stopky Eurochron

Digitální váhy KERN 572-33

Digitální váhy analytické ADA

UV lampa Camag 254/366 nm

Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER 10P

Vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114

Dusíková bomba

3. Izolace

A. KLÍČKY

3.A.1 Materiál

Materiálem byla semena slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.), zakoupena v obchodě (určena jako krmivo pro ptáky).

3.A.2 Postup

100 g slunečnicových semen bylo rozprostřeno na vatou a po dobu pěti dnů pravidelně provlhčováno. Po vyklíčení semen byly klíčky olámany. Bylo získáno 11,697 g klíčků. Těchto cca 11 g se v třence s těrku rozdrobilo a rozetřelo s malým množstvím etheru. Tato hmota byla dána do Erlenmayerovy baňky a zalita etherem (celkové množství použitého etheru bylo 60 ml). Extrakt byl zfiltrován.

3.A.3 Použití extraktu k důkazu alkaloidů

K důkazu alkaloidů byl použit zakoncentrovaný extrakt, který byl nanesen na TLC desku, vedle byl nanesen standard berberinu.

Soustava: S1

Komora: nasycená

Vyvíjení: 1x

Detekce: D1

Chromatogram byl postříkán Dragendorffovým činidlem a bylo pozorováno, zda vzniknou skvrny oranžově červené barvy.

3.A.4 Závěr

Na chromatogramu se objevila pouze charakteristicky zbarvená skvrna standardu a na dráze zkoumaného extraktu se neobjevilo nic. Alkaloidy tedy v extraktu prokázány nebyly.

B. SLUPKY

Slupky ze semen slunečnice byly zkoumány na základě objevení pilotní studie, která se zabývala produkcí potravinových antioxidantů z těchto slupek.



Obr. 17¹²

3.B.1 Materiál

Materiálem byla semena slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.), zakoupena v obchodě (určena jako krmivo pro ptáky).

3.B.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

3.B.2.1 Postup

Ze slunečnicových semen byly vyloupaním získány slupky.

Nejprve byla provedena extrakce 4 g drogy pro orientační zjištění, zda bude v získaném produktu pomocí TLC potvrzena přítomnost kyseliny kávové. Poté byla stejným postupem provedena extrakce většího množství drogy (25 g). Bylo získáno 5 vzorků, u kterých byla dále zkoušena antioxidační aktivita pomocí DPPH radikálu.

a) Postup byl prováděn podle výše zmíněné studie, ze které byla získána informace, že porovnáním složení slupek před a po odtučnění nebyly původní obsahy bílkovin a celkových fenolů změněny.

4 g slupek byly naváženy do 100 ml Erlenmayerovy baňky a rozpuštěny v 80 ml rozpouštědla (EtOH/voda 60:40). Baňka byla překryta alobalem a byla provedena extrakce umístěním do ultrazvukové termostatické lázně při laboratorní teplotě, stupni intenzity 7 po dobu 60 minut. Poté byl obsah doplněn na 100 ml, baňka udržována po dobu 4 hodin v lednici a nakonec byl extrakt přefiltrován filtrací za sníženého tlaku (Büchnerova nálevka pokrytá kotoučkem filtračního papíru) a oddělen tak od pevného podílu.

Do pěti zkumavek bylo odebráno po 1 ml získaného světle žlutého extraktu. Do každé zkumavky byl přidán 1 ml 2,5 N NaOH (odpovídá 5g v 50 ml NaOH). Alkalická hydrolyza byla postupně zastavována okyselením s 1 ml 2,5 N HCl (odpovídá 2,5 ml HCl a 9,14 ml vody). Hydrolyzované časy zkoušení byly od první k páté zkumavce 5, 15, 60, 120 a 180 minut.

Zkumavka č.1 – hydrolyza zastavena po 5 minutách – čirá, tmavá kapalina

č.2 15 - zakalená, světlejší kapalina

č.3 60 - zakalená, tmavší než ve zkumavce č.2

atd.

Tento hydrolyzovaný a okyselený extrakt byl vytřepáván ethylacetátem (A) a diethyletherem (B). Extrakt byl nejprve promyt 3x 3 ml jednoho rozpouštědla (A). Hořejší organická vrstva byla spojena a zbytková vodní vrstva byla následně promyta 3x 3 ml druhého rozpouštědla (B). Podle výsledků studie bylo z ethylacetátového podílu na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku odpařeno rozpouštědlo.

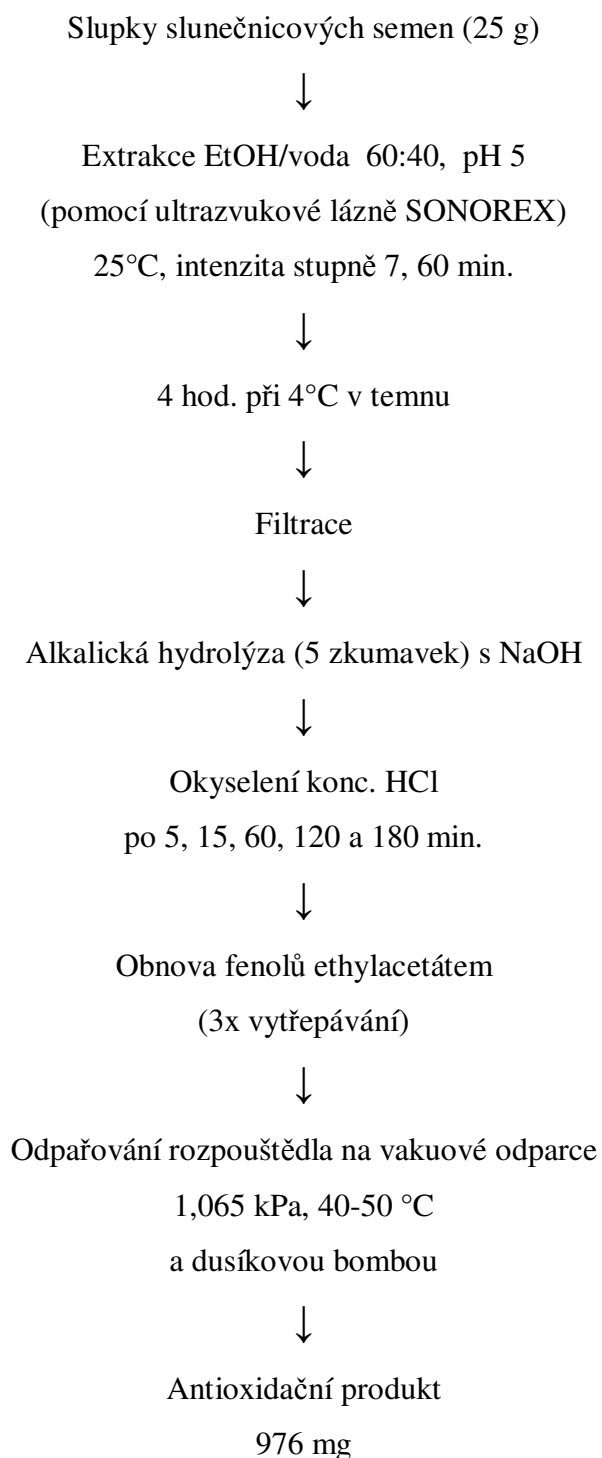
Bylo tak získáno 5 vzorků.

b) K 25 g slupek bylo přidáno 250 ml rozpouštědla (EtOH/voda 60:40). Dále bylo postupováno podle postupu a). Hydrolyzovaný a okyselený extrakt byl vytřepán pouze ethylacetátem a po odpaření bylo získáno celkem 976 mg suchého extraktu (Tab.3).

Tab.3

vzorek č.	1	2	3	4	5
doba hydrolyzy (min.)	5	15	60	120	180
vzhled roztoku	čirá, světloune žlutá	zakalená, oranžovo-okrová, tmavší horní vrstva	zakalená, oranžovo-okrová, tmavší horní vrstva	čirá, žlutá, tmavá horní vrstva	čirá, žlutá, tmavá horní vrstva
suchý extrakt (g)	0,1983	0,2837	0,2131	0,1211	0,1602
celkem	976 mg				

3.B.2.2 Schéma přípravy antioxidačního produktu – b)



3.B.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

3.B.3.1 Orientační tenkovrstvá chromatografie

K důkazu přítomnosti fenolů bylo na TLC desku nanášeno 5 vzorků získaných extrakcí 4 g slupek slunečnicových semen společně se dvěma standardy – kyselinou kávovou a kyselinou chlorogenovou (chromatogram č.1).

Soustava: S2

Komora: nasycená

Vyvíjení: 1x

Detekce: nejprve D5, D6

poté D2

Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou a poté postříkán činidlem na polyfenoly.

Ve všech vzorcích byla detekována kyselina kávová.

3.B.3.2 Tenkovrstvá chromatografie vzorků z postupu b)

Stejně jako u orientační tenkovrstvé chromatografie bylo na TLC desku nanášeno 5 vzorků, které byly získány v postupu b) (z 25 g slupek slunečnicových semen). Byly nanášeny stejné standardy (viz výše).

Soustava: S2

Komora: nasycená

Vyvíjení: 1x

Detekce: nejprve D5, D6

poté D2

Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou a poté postříkán činidlem na polyfenoly (chromatogram č.2).

UV detekce při $\lambda=254$ nm je dokumentována na chromatogramu č.3, kde se objevila tmavá skvrna na dráze standardu kyseliny kávové i všech pěti vzorků. Stejně byla dokumentována i detekce při $\lambda=366$ nm na chromatogramu č.4, kde se pozitivní reakce projevila modře fluoreskujícími skvrnami.

Frakce č.1 byla poslána na GC/MS analýzu. Nebyly detekovány žádné mastné kyseliny.

C. LISTY

3.C.1 Materiál

Ke zpracování byly použity listy slunečnice roční (*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. Výchozí hmotnost drogy použité ke zpracování činila 700 g listů.



Obr. 18

3.C.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

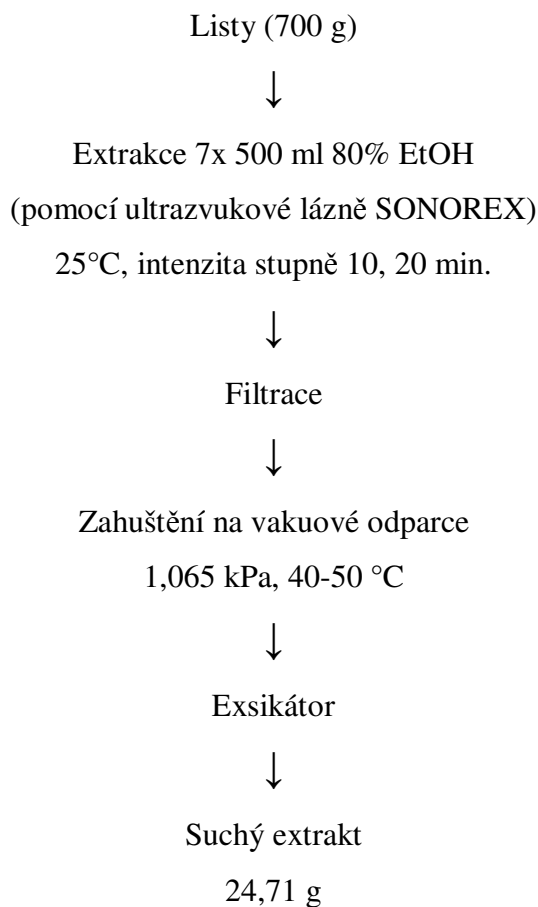
3.C.2.1 Postup

Ke 100 g sušených rozdrobněných listů *Helianthus annuus* L. bylo přidáno 500 ml 80% EtOH (předem připraveného zředěním 96% EtOH s destilovanou vodou). Kádinka byla překryta alobalem a byla provedena extrakce sonikací v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě, stupni intenzity 10 po dobu 20 minut. Poté byl extrakt přefiltrován přes skládanou gázu a oddělen tak od pevného podílu. Tento postup byl proveden celkem 7krát (celková hmotnost extrahované drogy byla 700 g).

Získané filtráty byly spojeny do baňky a zahuštěny na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 40-50 °C, čímž byl odstraněn EtOH a převážná část vody. Chlorofyl zůstal ulpělý na stěnách baňky. Pro jeho alespoň hrubé odstranění byl tmavohnědý zahuštěný extrakt přelit do čisté baňky a dále odpařován. Pro úplné odpaření dosucha byla baňka umístěna do exsíkátoru.

Bylo získáno 24,71 g suchého extraktu. Pevný podíl byl vysušen a ze 100 g drogy bylo získáno 90,5 g sušiny.

3.C.2.2 Schéma extrakce listů



3.C.3 Sloupcová chromatografie

3.C.3.1 Provedení první sloupcové chromatografie - orientační

K 2,5072 g sumárního suchého extraktu bylo přidáno 6 ml 80% EtOH. Pro úplné rozpuštění byla kádinka umístěna na 10 minut do ultrazvukové lázně při stupni intenzity 10. Tento extrakt byl dělen na sloupci Sephadexu LH 20.

16 g Sephadexu LH 20 bylo přelito vrstvou 80% EtOH tak, aby celý objem Sephadexu LH 20 byl ponořen. Sephadex LH 20 byl v rozpouštědle nechán 2 hodiny nabobtnat (poměr nabobtnání 1:2,5). Jeho nalitím při současně mírně otevřeném odtoku byla připravena chromatografická kolona. Ve formě roztoku byla na kolonu nanese pouze polovina připraveného extraktu.

Délka kolony: 26 cm

Průměr kolony: 2,3 cm

Sloupec Sephadexu LH 20: 20 cm

Průtoková rychlost: 79 kapek/min.

Kolona byla kontinuálně vymývána 80% EtOH. Jednotlivé frakce byly jímány podle viditelných barevných zón. Celkem bylo odebráno 10 frakcí.

Tab.4: Sloupcová chromatografie sumárního 80% ethanolového extraktu

Frakce č.	Eluent	Popis frakce
0	80% EtOH	bezbarvá, zakalená
1	80% EtOH	žlutooranžová
1 až 2	80% EtOH	oranžová
2	80% EtOH	červenohnědá (na koloně nejtmaší prstenec)
3	80% EtOH	oranžová
4	80% EtOH	světle oranžová + bílé shluky uvnitř
5	80% EtOH	oranžovozelená + bílé shluky uvnitř
6	80% EtOH	zelená + tmavé shluky uvnitř
7	80% EtOH	žlutozelená
Z	80% EtOH	světle žlutá

U všech frakcí byla provedena tenkovrstvá chromatografie, čímž bylo monitorováno kvalitativní složení frakcí. Při první orientační tenkovrstvé chromatografii se na dráze frakcí 0, 1, 7 a Z neobjevila žádná skvrna. Na další dva chromatogramy byly už nanесeny pouze frakce 1-2 až 6. Každý byl detekován jiným činidlem.

Frakce: 1-2 až 6 (chromatogram č.5, č.6)

Soustava: S3

Komora: nasycená

Chromatogram č.6 byl po postřiku opět umístěn do komory, která byla sycena parami amoniaku.

Vyvíjení: 1x

Detekce: nejprve D5, D6

poté D3 (chromatogram č.5), D4 (chromatogram č.6)

Chromatogramy byly prohlédnuty pod UV lampou a poté postříkány různými činidly.

Na chromatogramech se pozitivní reakce při D5 projevuje vznikem tmavých skvrn, které byly zakresleny kruhem, fluoreskující skvrny při D6 byly zakresleny čtvercem.

Frakce č.4 a 5 obsahovaly bílé shluky, ve frakci č.6 byly shluky tmavé. Na TLC se projevilo, že frakce č.5 a 6 obsahovaly chlorofyl. Na chromatogramu č.6 byly Gibbsovým činidlem ve frakcích č.3, 4 a 5 detekovány fenolové sloučeniny. Modré skvrny viditelné na chromatogramu jsou falešnou reakcí.

Tato chromatografie byla provedena pro orientaci. Cílem bylo zjistit, jak se daný extrakt bude dělit. Všechny frakce obsahovaly hodně látek, nepodařilo se nám tímto dělením získat frakci, která by obsahovala čisté látky.

3.C.3.2 Provedení druhé sloupcové chromatografie

K 2,32 g sumárního suchého extraktu bylo přidáno 40 ml 96% EtOH. Pro úplné rozpuštění byla kádinka umístěna na 30 minut do ultrazvukové lázně při stupni intenzity 10. Odpařením byl extrakt zkoncentrován na nižší objem. Tento extrakt byl dělen na sloupci Sephadexu LH 20.

100 g Sephadexu LH 20 bylo přelito vrstvou 96% EtOH tak, aby celý objem Sephadexu LH 20 byl ponořen. Sephadex LH 20 byl v rozpouštědle nechán 2 hodiny nabobtnat (poměr nabobtnání 1:2,5). Jeho nalitím při současně mírně otevřeném odtoku byla připravena chromatografická kolona. Ve formě roztoku bylo na kolonu nanášeno 16 ml připraveného extraktu.

Délka kolony: 54 cm

Průměr kolony: 4 cm

Sloupec Sephadexu LH 20: 40 cm

Průtoková rychlost: 79 kapek/min.

Kolona byla kontinuálně vymývána 96% EtOH. Jednotlivé frakce byly jímány podle viditelných barevných zón. Celkem bylo odebráno 35 frakcí.

Tab.5: Sloupcová chromatografie ethanového extraktu

Spojené frakce	Frakce č.	Eluent	Popis frakce
	0	96% EtOH	bezbarvá
	1	96% EtOH	běžová
	2	96% EtOH	žlutá
	3	96% EtOH	oranžová
	4	96% EtOH	tmavě oranžová
	5	96% EtOH	oranžovohnědá
	6	96% EtOH	oranžovohnědá
	7	96% EtOH	hnědočervená
	8	96% EtOH	hnědočervená + shluky
	9	96% EtOH	hnědočervená + shluky
	10	96% EtOH	hnědočervená + shluky
	11	96% EtOH	hnědočervená + shluky
	12	96% EtOH	hnědočervená + shluky
13 - 14	13	96% EtOH	červenohnědá +shluky
	13-14	96% EtOH	červenohnědá +shluky
	14	96% EtOH	červenohnědá +shluky
	15	96% EtOH	zelenohnědá
	16	96% EtOH	zelenohnědá
	17	96% EtOH	zelenohnědá
18 - 20	18	96% EtOH	oranžovohnědá
	19	96% EtOH	oranžovohnědá
	20	96% EtOH	oranžovohnědá
21 - 23	21	96% EtOH	oranžová
	22	96% EtOH	oranžová
	23	96% EtOH	oranžová
	24	96% EtOH	oranžová
	25	96% EtOH	žlutooranžová
	26	96% EtOH	žlutá
	27	96% EtOH	žlutá
28 - 35	28	96% EtOH	světle žlutá
	29	96% EtOH	světle žlutá
	30	96% EtOH	světle žlutá
	31	96% EtOH	světle žlutá
	32	96% EtOH	světle žlutá
	33	96% EtOH	světle žlutá
	34	96% EtOH	světle žlutá
	35	96% EtOH	světle žlutá

U všech frakcí byla provedena tenkovrstvá chromatografie, která sloužila jako vodítka pro jejich spojování. Pomocí TLC bylo monitorováno kvalitativní složení frakcí.

Frakce: 0 – 35 (chromatogram č.7, č.8, č.9, č.10)

Soustava: S4

Komora: nasycená

Vyvíjení: 1x

Detekce: nejprve D5, D6
poté D3

Na základě TLC došlo ke spojení těchto frakcí: 13-14, 18-20, 21-23, 28-35. Ostatní frakce zůstaly v původním složení.

Frakce č.8 až 14 obsahovaly bílé drobné shluky. Tyto frakce byly nanášeny na zvláštní chromatogram (č.8). Od frakce č.8 do frakce č.26 se vzorky jevíly zajímavé. Většina frakcí obsahovala chlorofyl.

Dalším krokem byla snaha o získání a identifikaci vysrážené hmoty ve frakcích č.9 a 10, která byla neúspěšná. Usazeninu nebylo možné z filtračního papíru ani vymýt ani seškrabat, ve druhém případě zůstala v pórech frity.

Byla provedena TLC, kde jsme nanášeli frakci č.10 (Vz) společně se standardy různých látek. Na chromatogram č.11 byly vedle frakce č.10 (Vz) nanášeny tyto standardy: kyselina palmitová, kyselina oleanolová, sitosterol a α -amyrin. Na chromatogramu č.12 byly použitými standardy kyselina kávová, rutin a kvercetin. U frakce č.10 (Vz) svítily při detekci D6 spodní skvrna modře, horní oranžově.

Na základě vyhodnocení chromatogramů pod UV lampou se frakce č.18-20 (V20) a frakce č.21-23 (V23) (chromatogram č.9) jevíly výrazně bohatší na obsahové látky. Proto byly (V20 a V23) zkusmo nanášeny se standardy cholesterolu a sitosterolu (chromatogram č.13).

Pro porovnání byla z první chromatografické kolony vzata frakce č.5, z druhé frakce č.14 (chromatogram č.14).

Pro chromatogram č.11 byla mobilní fází směs EtOH - CHCl₃ v poměru 8:2 (S5), pro chromatogramy č.12, 13,14 byla vyvíjecí soustava společná – směs EtOH - CHCl₃ v poměru 9:1 (S4). Detekce byla provedena nejprve pod UV lampou, poté byly všechny chromatogramy postříkány vanilínovým činidlem (D3).

Frakce č.14 byla poslána na GC/MS analýzu (plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie), která byla provedena na Geronto-metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Byla provedena derivatizace vzorků transesterifikací mastných kyselin na methylestery. Vzniklé methylestery byly identifikovány pomocí retenčního času na plynovém chromatografu s plamenoionizační detekcí (GC 8000 series, Fisons Instruments). Byly detekovány stopy těchto mastných kyselin: kyseliny kaprylové, palmitové a olejové. Stanovení jejich poměrného zastoupení nemohlo být provedeno vzhledem k jejich stopovým koncentracím (záznam viz přílohy, str. 84).

4. Biologická aktivita – výsledky měření

4.1 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu

Antioxidační aktivita pomocí DPPH radikálu (metoda SIA) byla stanovována u slupek i u 80% ethanového extraktu z listů slunečnice.

Při testování extraktu ze slupek slunečnicových semen byly použity 3 – 4 mg z každého z pěti získaných vzorků (v postupu b)), které se rozpustily ve stejném množství rozpouštědla (50% EtOH).

Antioxidační aktivita těchto vzorků byla velmi slabá, proto byly vzorky měřeny pouze ve dvou koncentracích. Vzorky nebyly úplně vysušené.

Aktivitu vykázal jen vzorek č.2 a 3 (Tab.6, 7). Významnější pokles absorbance DPPH byl zaznamenán u koncentrovaného vzorku č.2 (19 mg vzorku + 3 ml 50% EtOH) (Tab.8).

Tab.6: vzorek č.2

		1. měření absorbance	2. měření absorbance	3. měření absorbance	průměr	x	100 - x
	DPPH	0,3632	0,3826	0,3713	0,3724		
vzorek	1 mg/ml	0,3661	0,3396	0,3566	0,3541	95,09	4,91
	0,5 mg/ml	0,3654	0,3594	0,3624	0,3624	97,31	2,69

Tab.7: vzorek č.3

		1. měření absorbance	2. měření absorbance	3. měření absorbance	průměr	x	100 - x
	DPPH	0,3632	0,3826	0,3713	0,3724		
vzorek	1 mg/ml	0,3553	0,3539	0,3519	0,3537	94,98	5,02
	0,5 mg/ml	0,3672	0,3629	0,3618	0,3640	97,74	2,26

Tab.8: koncentrovaný vzorek č.2

	1. měření absorbance	2. měření absorbance	3. měření absorbance	průměr	x	100 - x
DPPH	0,3632	0,3826	0,3713	0,3724		
vzorek	0,3478	0,3385	0,2993	0,3285	88,21	11,79

Pro měření antioxidační aktivity látek z 80% ethanolového extraktu z listů slunečnice bylo odebráno potřebné množství získaného sumárního suchého extraktu, který byl rozpuštěn ve stejném množství rozpouštědla (50% EtOH). Postupným ředěním byly připraveny nižší koncentrace.

Tab.9: 80% ethanolový extrakt z listů

		1. měření absorbance	2. měření absorbance	3. měření absorbance	průměr	x	100 - x
	DPPH	0,3831	0,3764	0,3832	0,3809		
vzorek	1 mg/ml	0,0523	0,0562	0,0516	0,0534	14,02	85,98
	0,5 mg/ml	0,0962	0,1001	0,0835	0,0933	24,49	75,51
	0,25 mg/ml	0,1854	0,1906	0,1932	0,1897	49,80	50,20
	0,1 mg/ml	0,2863	0,2872	0,2881	0,2872	75,40	24,60

Viz graf č.1, str.83

Extrakt získaný z listů slunečnice vykazuje významnou antioxidační aktivitu. Pro tento vzorek byla proto pomocí statistického programu GraphPad Prism 3.02 vypočítána hodnota EC_{50} .

$$EC_{50} = 0,274 \text{ mg/ml}$$

4.2 Antioxidační aktivita FRAP

Podle výsledků měření antioxidační aktivity metodou SIA byla alternativní metodou měřena antioxidační aktivita pouze u 80% ethanolového sumárního extraktu z listů slunečnice. V následující tabulce je uvedena změna absorbance za čas za přítomnosti vzorku (Tab.10).

Tab.10: FRAP hodnoty po 4 a 60 minutách u testovaného 80% ethanolového extraktu z listů

H.A. a standardní látky troloxu

Vzorek no.	FRAP _{value 4 min} (μM)	FRAP _{value 60 min} (μM)
H.A. EtOH	6,39	7,1
trolox	20,99	21,32

Viz graf č.2, str.83

4.3 Stanovení akutní toxicity a fototoxicity

Testování fototoxické aktivity probíhalo na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie při teplotě 21°C.

Výsledky byly odečteny bezprostředně po pokusech okulometricky pod mikroskopem. Byla hodnocena mortalita a poškození organismů. Zároveň byly vyhodnocovány i temnostní kontroly, tj. destičky, v nichž se nacházela fotosenzibilizující látka, ale nebyly vystaveny UV záření.

Hodnoty uvedené v následující tabulce (Tab.11) jsou průměrem ze 3 měření.

Tab.11: 80% ethanolvý extrakt z listů

čas	Koncentrace vzorku (mg/ml)								
		7,5	3,75	1,875	0,9375	0,4688	0,2344		
0,5 h	Oz	/	/	/	/	/	/	/	
	K tma	/	/	/	/	/	/	/	
1 h	Oz	66%	0% P	17%	0% P	/	/	/	
		M		M		/	/	/	
	K tma	55%		17%		/	/	/	
		M		M		/	/	/	
2 h	Oz	100%	0% P	83%	0% P	/	/	/	
		M		M		/	/	/	
	K tma	83%		39%		/	/	/	
		M		M		/	/	/	
3 h	Oz	100%	0% P	100%	0% P	/	/	/	
		M		M		/	/	/	
	K tma	100%		66%		/	/	/	
		M		M		/	/	/	
4 h	Oz	100%	0% P	100%	0% P	50%	0%	6%	0%
		M		M		M	P	/	/
	K tma	100%		83%		/	/	/	
		M		M		/	/	/	

Pozn.: Oz – ozáření pod UV lampou (366 nm)

K – kontrola (destičky, které nebyly vystaveny UV záření)

P – poškození *Tubifex tubifex*

M – mortalita *Tubifex tubifex*

U 80% ethanolového sumárního extraktu z listů slunečnice byly zjištěny tyto hodnoty. Žádná koncentrace vzorku nevykázala po 0,5 hod. mortalitu (viz Tab.11 – proškrtnuté buňky). Při koncentraci 7,5 mg/ml byla po 1 hod. mortalita 66%. Po 2 hod. mortalita vzrostla na 100%. Stejně hodnoty byly získány i po 3 a 4 hod. Při koncentraci 3,75 mg/ml byla po 1 hod. mortalita pouze 17%. Po 2 hod. byla však už mortalita 83%. Po 3 a 4 hod. byly výsledky stejné – mortalita nítěnek vzrostla na 100%. Po 4 hod. byla naměřena mortalita i u nižších koncentrací: u koncentrace 1,875 mg/ml byla mortalita nítěnek 50%, u koncentrace 0,9375 mg/ml však pouze 6%. Při všech koncentracích vzorku bylo poškození nulové.

Z výsledků testu vyplývá, že 80% ethanolový sumární extrakt z listů slunečnice je toxický pro jedince *Tubifex tubifex*, ale není fototoxický.

V. HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUSE

Práce byla zaměřena na fytochemický výzkum slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.).

Cílem bylo vyhledat, doplnit a uspořádat nové dostupné informace o rostlinných metabolitech slunečnice roční a jejich biologické aktivitě. Dále provést kvalitativní vyhodnocení obsahových látek v klíčcích a slupkách a rozdělit ethanolový extrakt z listů této rostliny. Poslední část práce se zabývala biologickou aktivitou frakcí ze slupek a listů.

Extrakty a získané frakce z chromatografických kolon byly uchovávány v chladu a chráněny před světlem.

1. Monitorování kvalitativního složení extraktů a frakcí pomocí tenkovrstvé chromatografie

Nejprve byl získán extrakt z klíčků, u kterého byla zkoumána přítomnost alkaloidů. Důkaz byl proveden metodou TLC, kde byl vedle zakoncentrovaného extraktu nanesen standard berberinu. Detekce byla provedena Dragendorffovým činidlem (D1). Alkaloidy v klíčcích prokázány nebyly.

Ze slupek slunečnicových semen byl získán 60% ethanolový extrakt tak, že bylo k 25 g slupek přidáno 250 ml rozpouštědla (EtOH/voda 60:40). Získaný extrakt byl přefiltrován a rozdělen na pět dílů. Ke každému dílu byl přidán hydroxid sodný a alkalická hydrolyza byla postupně zastavována okyselením kyselinou chlorovodíkovou. Hydrolyzované časy zkoušení byly od prvního k pátému vzorku 5, 15, 60, 120 a 180 minut. Takto získané extrakty byly postupně vytřepány ethylacetátem a po odpaření bylo získáno celkem 976 mg suchého extraktu.

Ze slupek slunečnicových semen bylo tedy po extrakci 60% ethanolem získáno 5 vzorků. K důkazu přítomnosti fenolů byly všechny vzorky nanесeny na TLC desku společně se dvěma standardy – kyselinou kávovou a kyselinou chlorogenovou (chromatogram č.1-4). Chromatogramy byly prohlédnuty pod UV lampou. UV detekce při $\lambda=254$ nm je dokumentována na chromatogramu č.3, kde se objevila tmavá skvrna na dráze standardu kyseliny kávové i všech pěti vzorků. Stejně byla dokumentována i detekce při $\lambda=366$ nm na chromatogramu č.4, kde se pozitivní reakce projevila modře fluoreskujícími skvrnami. Chromatogramy č.1, 2 byly po UV detekci postříkány činidlem na polyfenoly (D2).

Na základě provedené tenkovrstvé chromatografie byla ve všech vzorcích detekována kyselina kávová. Frakce č.1 byla poslána na GC/MS analýzu, avšak žádné mastné kyseliny nebyly ve vzorku nalezeny.

Práce pokračovala získáním 80% ethanového suchého extraktu (24,71 g) z listů slunečnice roční. Bylo zpracováno 700 g sušených rozdrobněných listů *Helianthus annuus* L., které byly extrahovány 80% EtOH. Pevný podíl byl vysušen a ze 100 g drogy bylo získáno 90,5 g sušiny.

80% ethanový extrakt z listů slunečnice byl dělen na dvou chromatografických kolonách a získané frakce byly hodnoceny na TLC deskách, čímž bylo monitorováno kvalitativní složení frakcí. V obou případech byl extrakt dělen na sloupci Sephadexu LH 20.

První sloupcová chromatografie byla provedena pro orientaci. Cílem bylo zjistit, jak se daný extrakt bude dělit. Ve formě roztoku byl na kolonu nanesen sumární suchý extrakt z listů rozpuštěný v 80% EtOH. Kolona byla kontinuálně vymývána 80% EtOH. Jednotlivé frakce byly jímány podle viditelných barevných zón. Celkem bylo odebráno 10 frakcí. Frakce č.4 a 5 obsahovaly bílé shluky, ve frakci č.6 byly shluky tmavé. Na TLC se projevilo, že frakce č.5 a 6 obsahovaly chlorofyl. Na chromatogramy č.5 a 6 byly nanесeny frakce 1-2 až 6. Po skončení vyvíjení byly prohlédnuty pod UV lampou. Na chromatogramech se pozitivní reakce při D5 projevuje vznikem tmavých skvrn, které byly zakresleny kruhem, fluoreskující skvrny při D6 byly zakresleny čtvercem. Poté byly postříkány různými činidly – chromatogram č.5 vanilinovým činidlem (D3), chromatogram č.6 Gibbsovým činidlem (D4). Na chromatogramu č.6 byly ve frakcích č.3, 4 a 5 detekovány fenolové sloučeniny, viditelné modré skvrny jsou falešnou reakcí. Všechny frakce obsahovaly hodně látek, nepodařilo se nám tímto dělením získat frakci, která by obsahovala čisté látky.

Na druhou chromatografickou kolonu byl ve formě roztoku nanesen sumární suchý extrakt z listů rozpuštěný v 96% EtOH. Kolona byla kontinuálně vymývána 96% EtOH. Stejně jako v předchozím případě byly jednotlivé frakce jímány podle viditelných barevných zón. Celkem bylo odebráno 35 frakcí. U všech frakcí byla provedena tenkovrstvá chromatografie, která sloužila jako vodítko pro jejich spojování - došlo ke spojení frakcí: 13-14, 18-20, 21-23, 28-35, jak je uvedeno v Tab.5.

Frakce č.8 až 14 obsahovaly bílé drobné shluky. Tyto frakce byly nanесeny na zvláštní chromatogram (č.8). Od frakce č.8 do frakce č.26 se vzorky jevíly zajímavé. Většina frakcí obsahovala chlorofyl.

Dalším krokem byla snaha o získání a identifikaci vysrážené hmoty ve frakcích č.9 a 10, která byla neúspěšná. Usazeninu nebylo možné z filtračního papíru ani vymýt ani seškrabat, ve druhém případě zůstala v pórech frity.

Byla provedena TLC, kde jsme nanесли frakci č.10 (Vz) společně se standardy různých látek. Na chromatogram č.11 byly vedle frakce č.10 (Vz) nanесeny tyto standardy: kyselina palmitová, kyselina oleanolová, sitosterol a α -amyrin. Na chromatogramu č.12 byly použitými standardy kyselina kávová, rutin a kvercetin. U frakce č.10 (Vz) svítala při detekci D6 spodní skvrna modře, horní oranžově.

Na základě vyhodnocení chromatogramů pod UV se frakce č.18-20 (V20) a frakce č.21-23 (V23) (chromatogram č.9) jeví výrazně bohatší na obsahové látky. Proto byly (V20 a V23) zkusmo nanесeny se standardy cholesterolu a sitosterolu (chromatogram č.13).

Pro porovnání byla z první chromatografické kolony vzata frakce č.5, z druhé frakce č.14 (chromatogram č.14).

Pro chromatogram č.11 byla mobilní fází směs EtOH - CHCl₃ v poměru 8:2 (S5), pro chromatogramy č.12, 13,14 byla vyvíjecí soustava společná – směs EtOH - CHCl₃ v poměru 9:1 (S4). Detekce byla provedena nejprve pod UV lampou, poté byly všechny chromatogramy postříkány vanilinovým činidlem (D3).

Frakce č.14 z této kolony byla poslána na GC/MS analýzu. Byly detekovány stopy těchto mastných kyselin: kaprylové, palmitové a olejové. Stanovení jejich poměrného zastoupení nemohlo být provedeno vzhledem k jejich stopovým koncentracím (záznam viz přílohy).

2. Hodnocení biologické aktivity frakcí ze slupek a listů

Při hodnocení frakcí ze slupek a listů byla měřena antioxidační aktivita metodou DPPH, u extraktu z listů i metodou FRAP. Dalším krokem bylo stanovení akutní toxicity a fototoxicity pomocí jedinců *Tubifex tubifex* Müll.

Antioxidační aktivita pomocí DPPH radikálu byla stanovována u slupek i u 80% ethanolového extraktu z listů slunečnice.

Ze slupek slunečnicových semen bylo všech 5 vzorků použito pro měření antioxidační aktivity pomocí metody DPPH s využitím sekvenční injekční analýzy. Antioxidační aktivita těchto vzorků byla velmi slabá, proto byly vzorky měřeny pouze ve dvou koncentracích. Aktivitu vykázal jen vzorek č.2 a 3 (Tab.6, 7). Významnější pokles absorbance DPPH byl zaznamenán u koncentrovaného vzorku č.2 (Tab.8). Vzorky nebyly úplně vysušené.

Pro měření antioxidační aktivity látek z 80% ethanolového extraktu z listů slunečnice bylo odebráno potřebné množství získaného sumárního suchého extraktu, který byl rozpuštěn ve stejném množství rozpouštědla (50% EtOH). Postupným ředěním byly připraveny nižší koncentrace, zároveň byla pro tento vzorek vypočítána hodnota EC_{50} (0,274 mg/ml). Protože extrakt vykázal významnou antioxidační aktivitu, byla tato aktivita následně měřena alternativní metodou FRAP. Po 4 i 60 minutách byla naměřena 3krát nižší než u troloxu. Antioxidační aktivita byla tedy významná.

Pro přehlednost byly výsledky měření antioxidační aktivity zpracovány graficky (viz přílohy, graf č.1, 2).

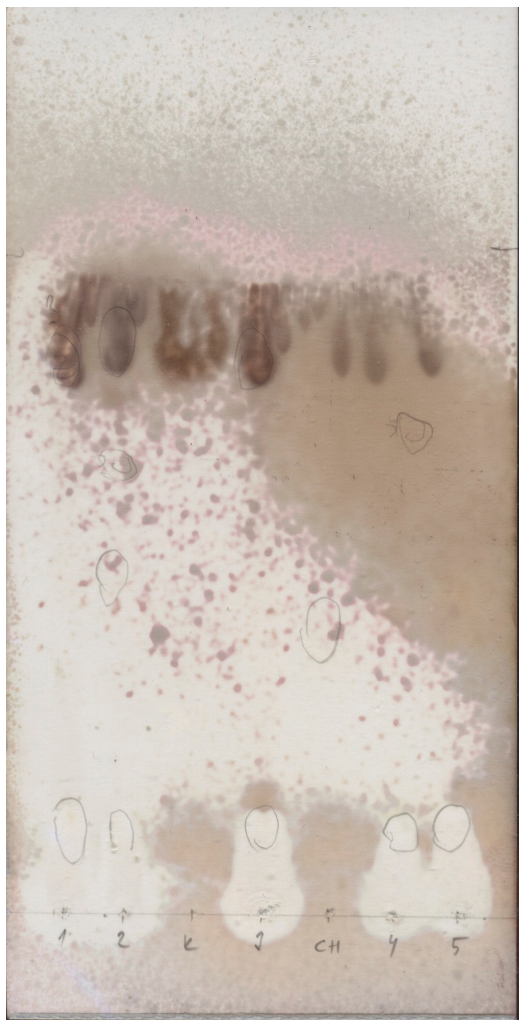
Při měření akutní toxicity a fototoxicity byla hodnocena mortalita a poškození organismů. Zároveň byly vyhodnocovány i temnostní kontroly. Výsledky byly odečteny bezprostředně po pokusech okulometricky pod mikroskopem.

U 80% ethanolového sumárního extraktu z listů slunečnice byly zjištěny tyto hodnoty. Žádná koncentrace vzorku nevykázala po 0,5 hod. mortalitu (viz Tab.11 – proškrtnuté buňky). Při koncentraci 7,5 mg/ml byla po 1 hod. mortalita 66%. Po 2 hod. mortalita vzrostla na 100%. Stejně hodnoty byly získány i po 3 a 4 hod. Při koncentraci 3,75 mg/ml byla po 1 hod. mortalita pouze 17%. Po 2 hod. byla však už mortalita 83%. Po 3 a 4 hod. byly výsledky stejné – mortalita nítěnek vzrostla na 100%. Po 4 hod. byla naměřena mortalita i u nižších koncentrací: u koncentrace 1,875 mg/ml byla mortalita nítěnek 50%, u koncentrace 0,9375 mg/ml však pouze 6%. Při všech koncentracích vzorku bylo poškození nulové.

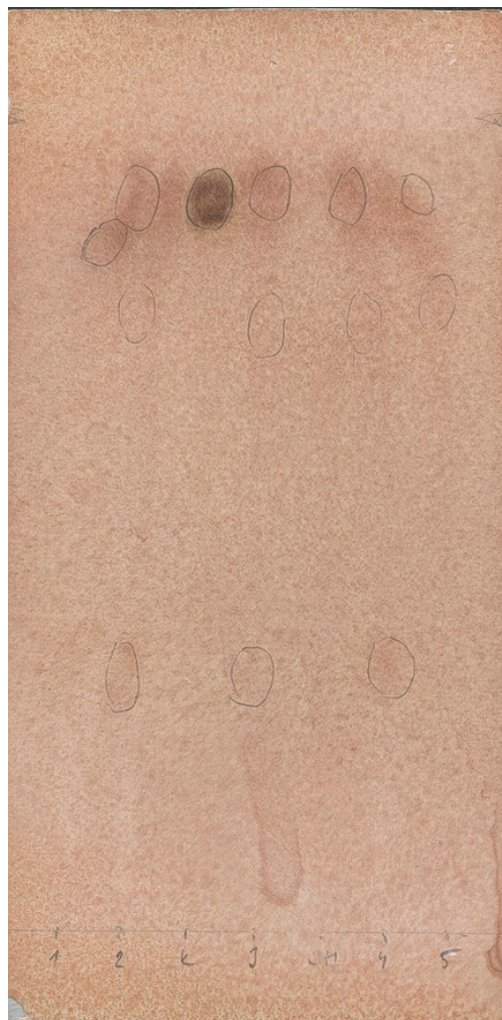
Z výsledků testu vyplývá, že 80% ethanolový sumární extrakt z listů slunečnice je pro jedince *Tubifex tubifex* toxický, ale není fototoxický.

VI. PŘÍLOHY

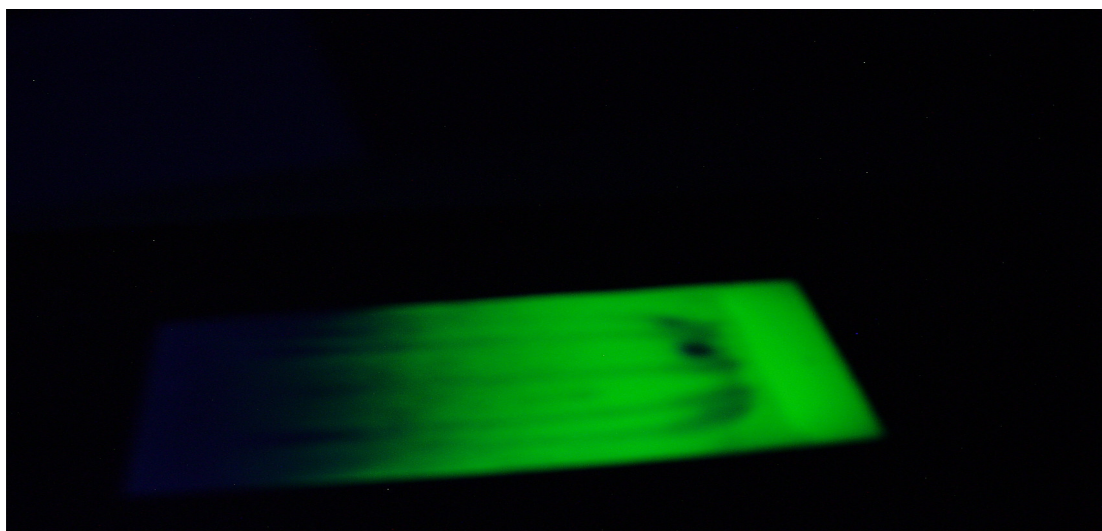
TENKOVRSTVÁ CHROMATOGRRAFIE



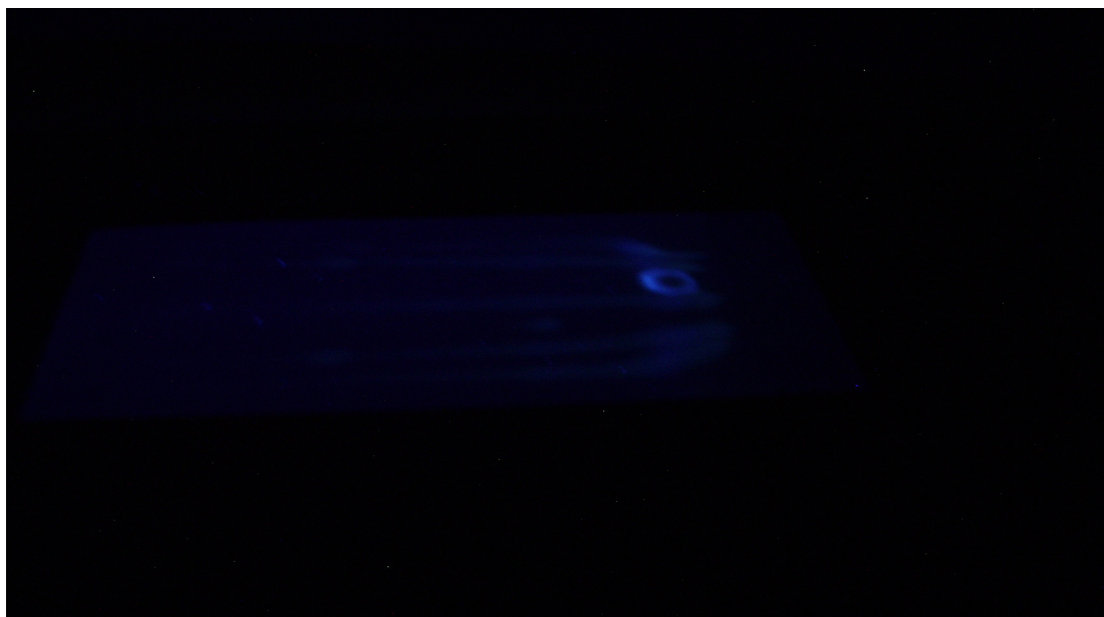
Chromatogram č.1, str.60



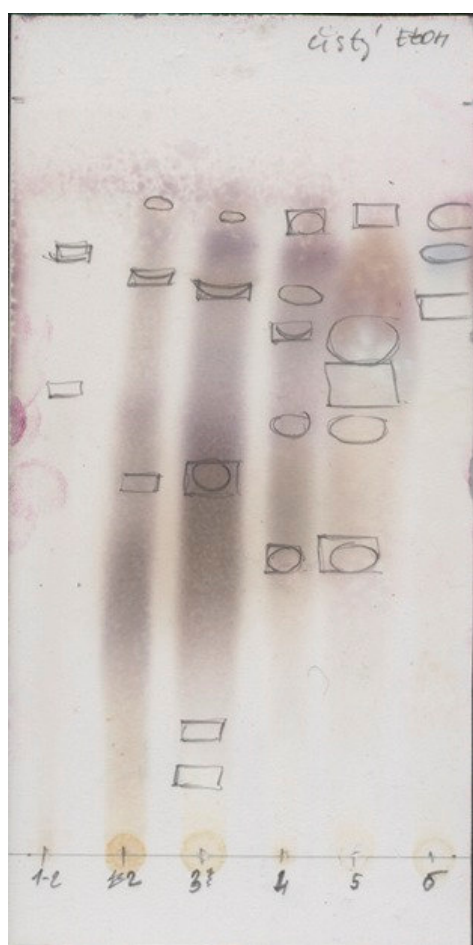
Chromatogram č.2, str.60



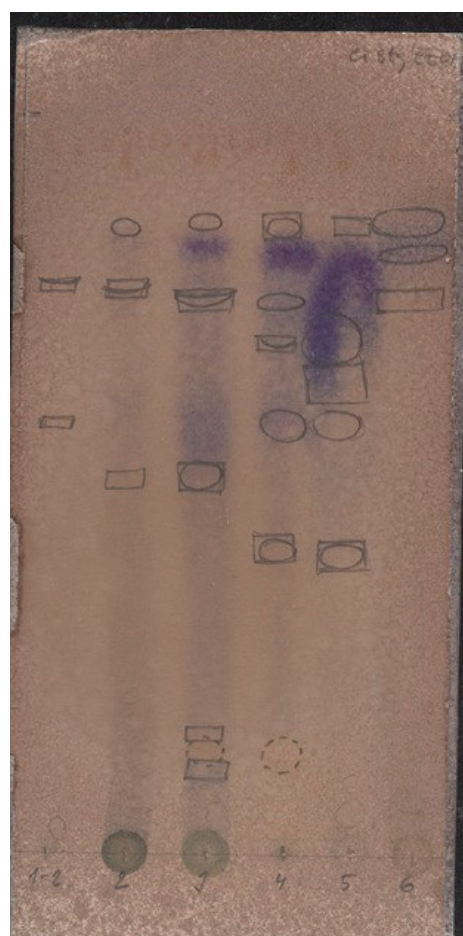
Chromatogram č.3, str.60



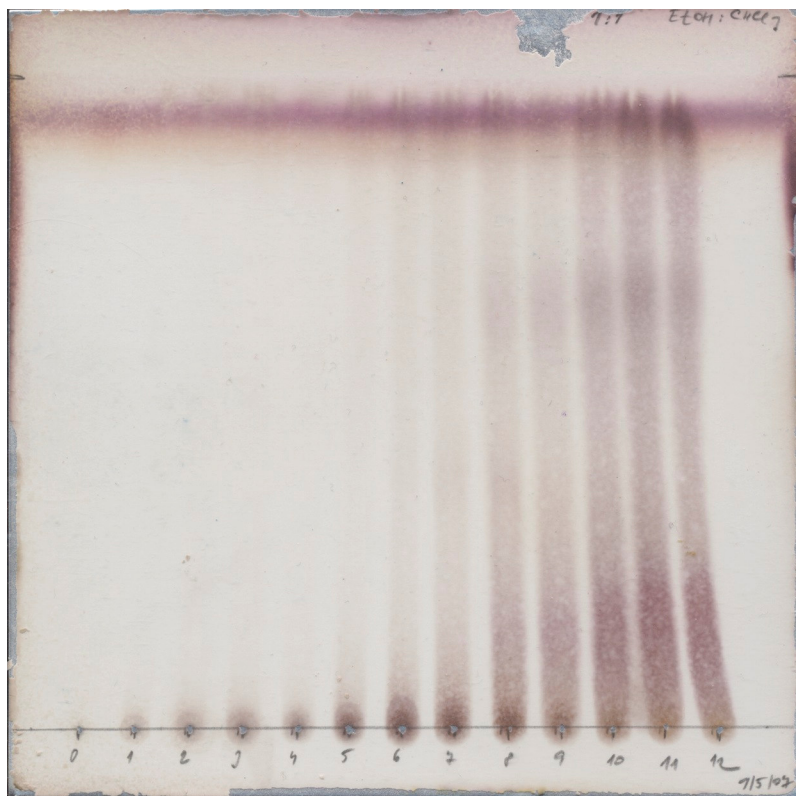
Chromatogram č.4, str.60



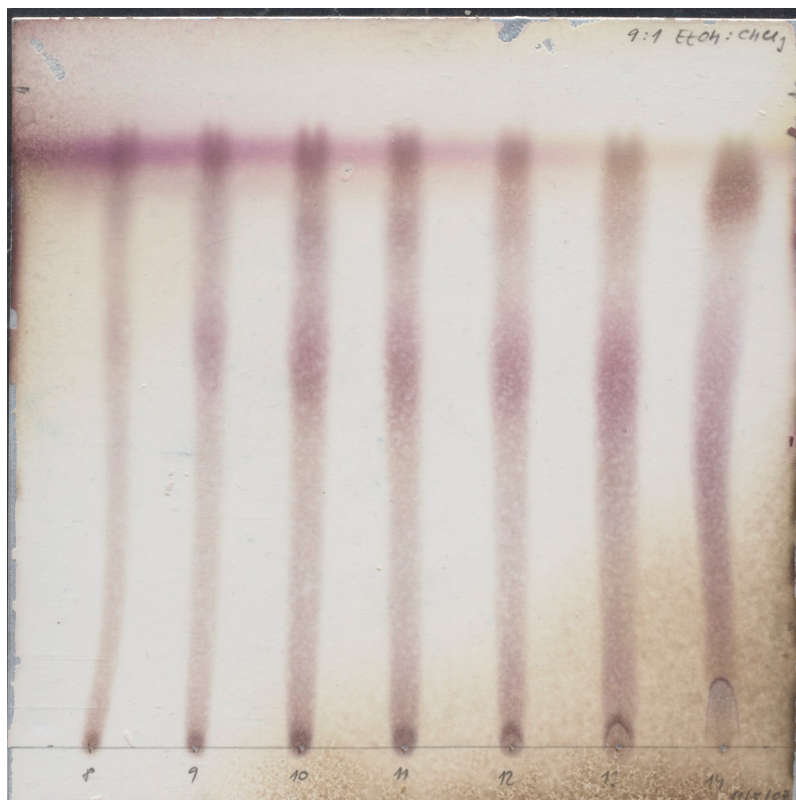
Chromatogram č.5, str.63



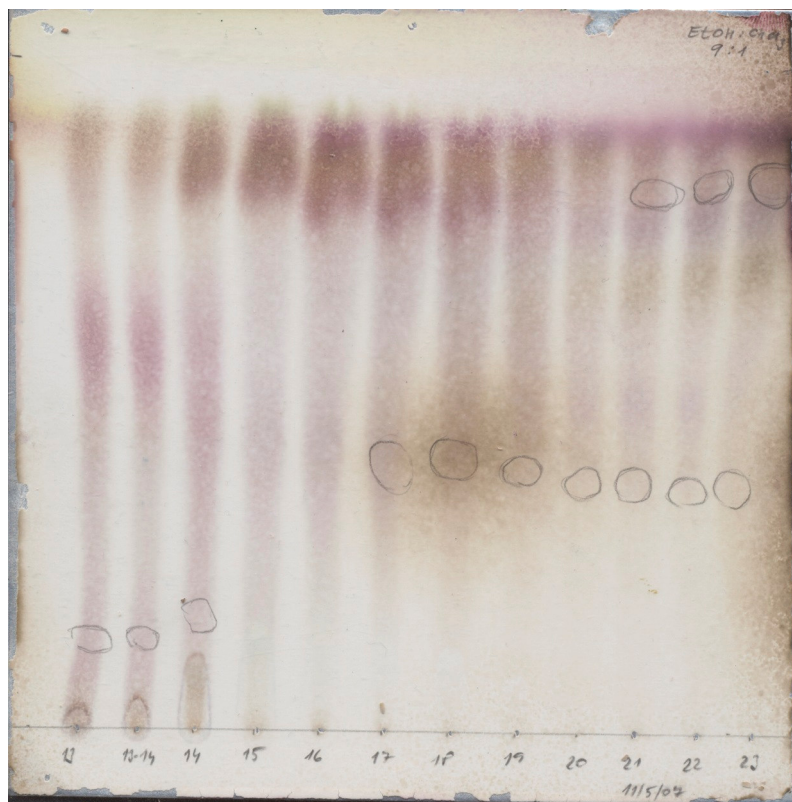
Chromatogram č.6, str.63



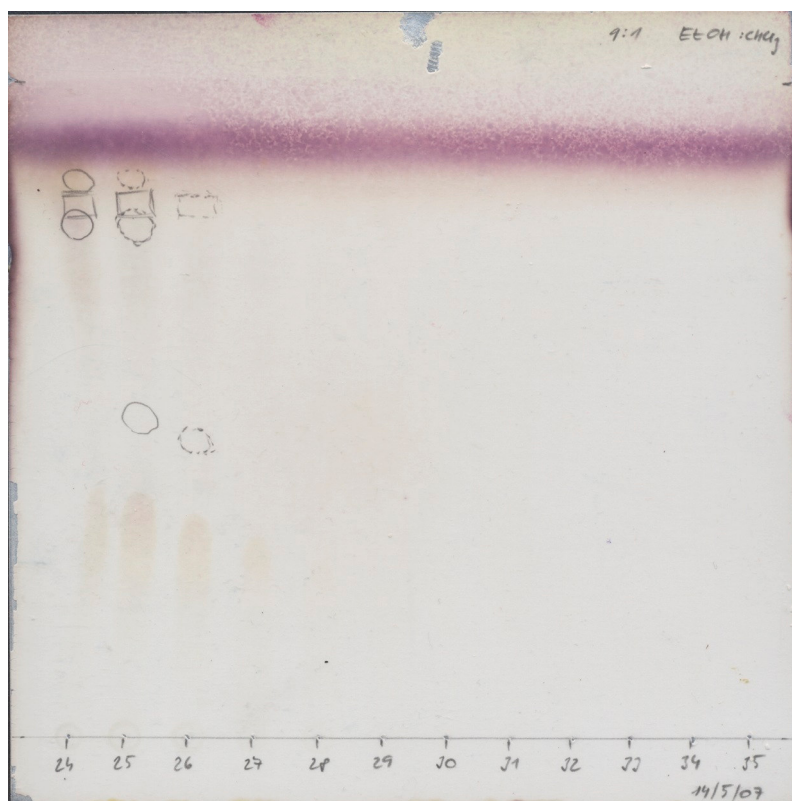
Chromatogram č.7, str.66



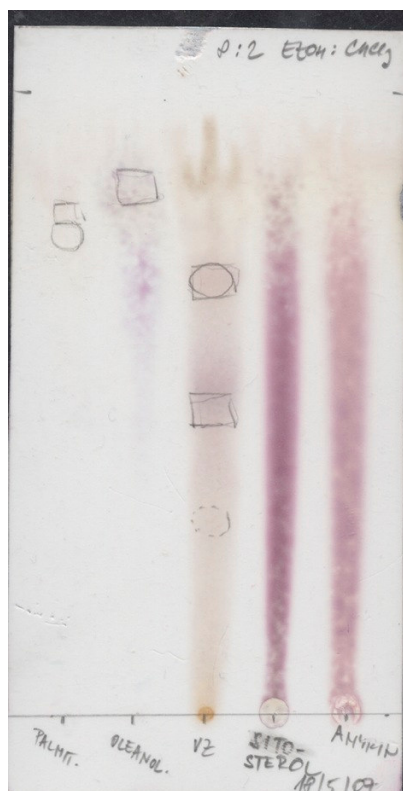
Chromatogram č.8, str.66



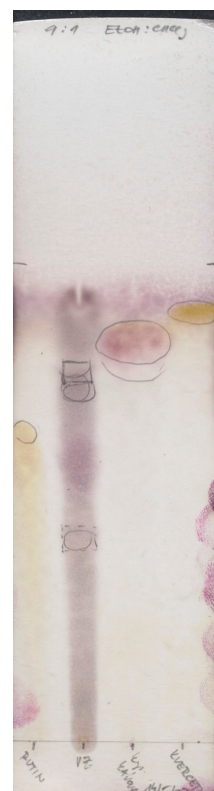
Chromatogram č.9, str.66



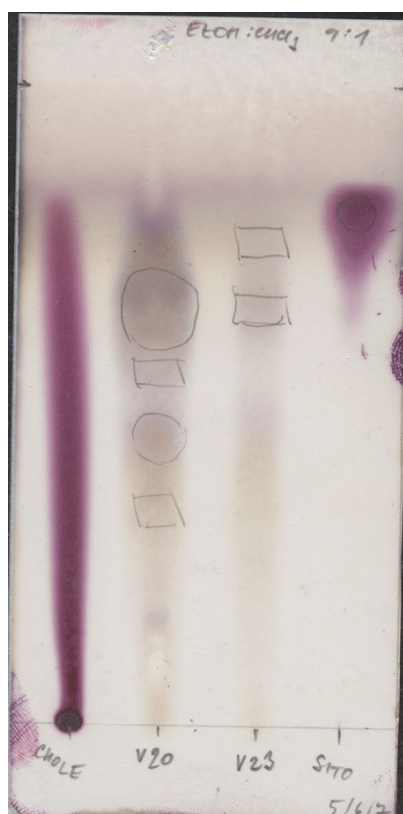
Chromatogram č.10, str.66



Chromatogram č.11, str.66



Chromatogram č.12, str.66

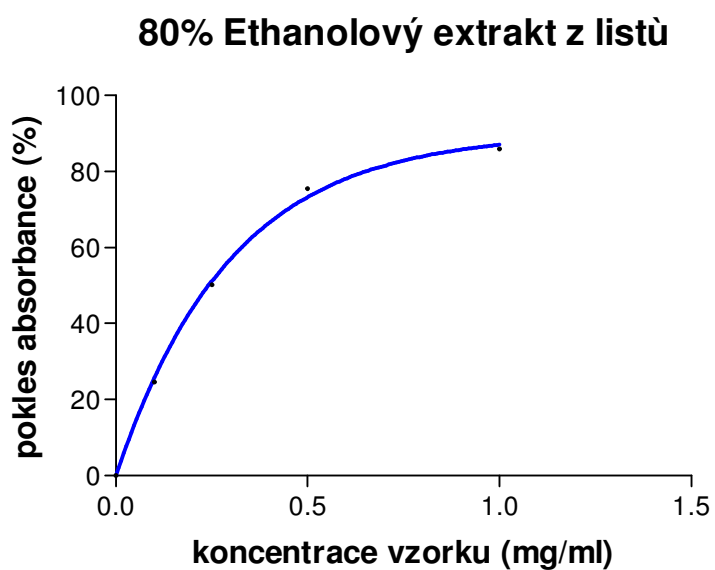


Chromatogram č.13, str.66

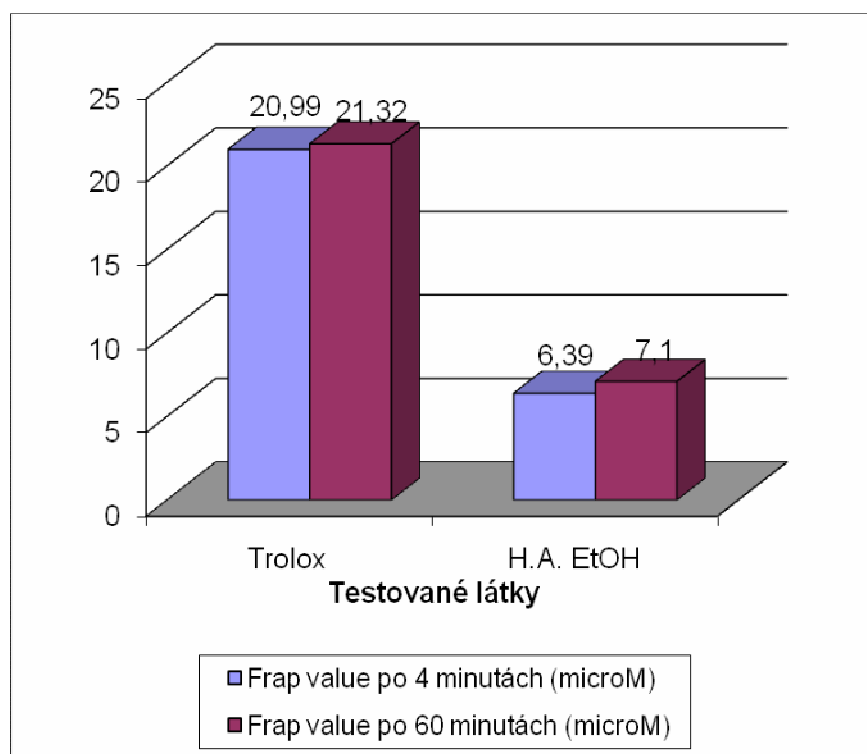


Chromatogram č.14, str.66

Graf č.1

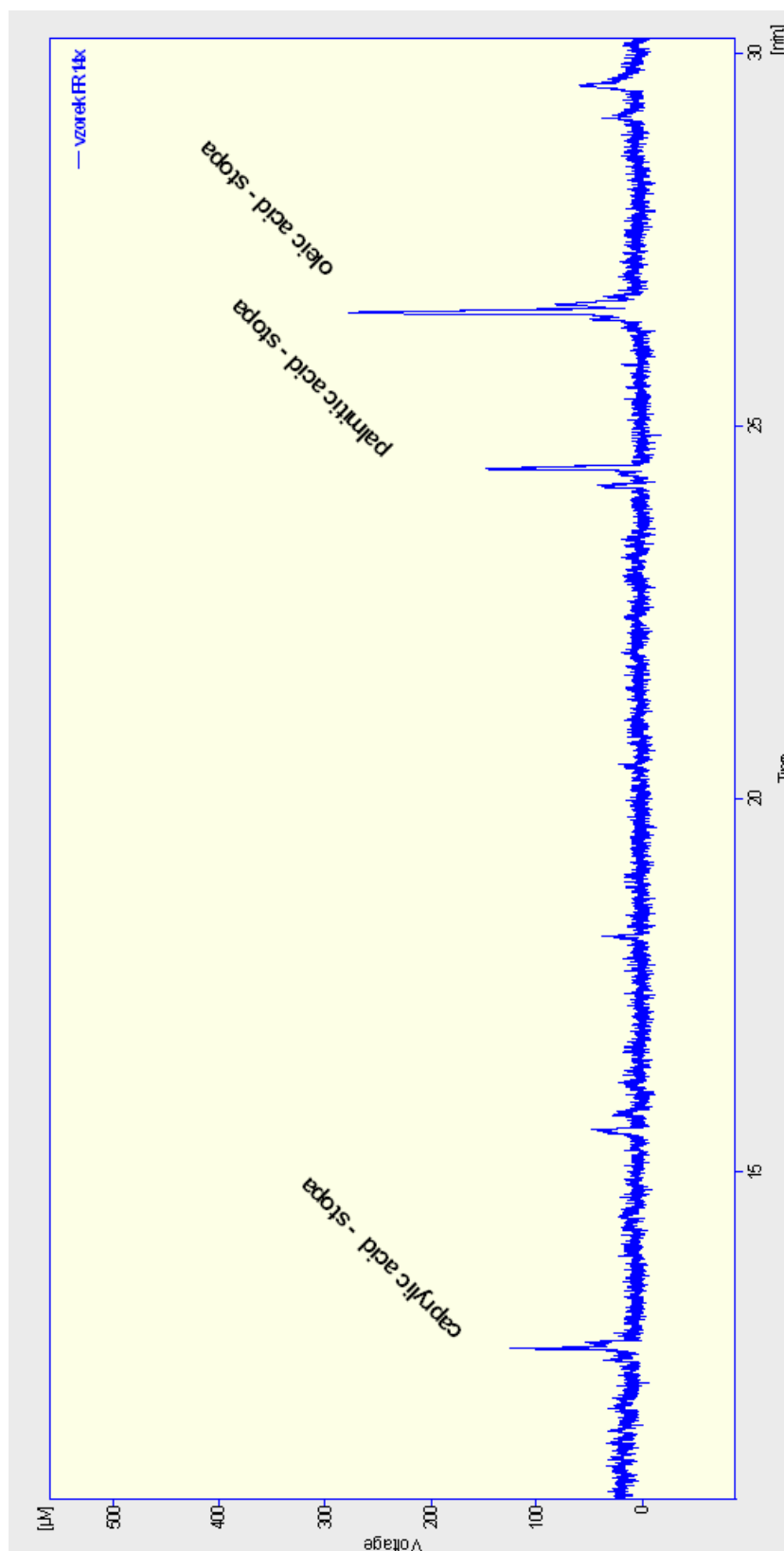


Graf č.2: FRAP hodnoty po 4 a 60 minutách u testovaného 80% ethanolového extraktu z listů H.A. a standardní látky troloxu



ZÁZNAM Z GC/MS ANALÝZY

FRAKCE č. 14, str.67



VII. ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na fytochemický výzkum rostliny *Helianthus annuus* L. Cílem bylo vyhledat, doplnit a uspořádat nové dostupné informace o rostlinných metabolitech slunečnice roční a jejich biologické aktivitě. Dále provést kvalitativní vyhodnocení obsahových látek v klíčcích a slupkách slunečnice roční a rozdělit ethanolový extrakt z listů této rostliny.

Nejprve byl získán extrakt z klíčků, u kterého byla zkoumána přítomnost alkaloidů. Důkaz byl proveden metodou TLC. Alkaloidy v klíčcích prokázány nebyly.

Ze slupek slunečnicových semen bylo po extrakci 60% ethanolem získáno 5 vzorků (díky různé délce trvání alkalické hydrolyzy). Na základě provedené tenkovrstvé chromatografie byla ve všech vzorcích detekována kyselina kávová. Frakce č.1 byla poslána na GC/MS analýzu, avšak žádné mastné kyseliny nebyly ve vzorku nalezeny.

80% ethanolový extrakt z listů slunečnice byl postupně dělen na dvou chromatografických kolonách a získané frakce byly hodnoceny na TLC deskách. Ve frakcích z první chromatografické kolony byly detekovány fenolové sloučeniny, nepodařilo se však získat frakci, která by obsahovala čisté látky. Pomocí TLC bylo monitorováno kvalitativní složení 35 frakcí z druhé chromatografické kolony. Následně byly vybrané frakce spolu se standardy různých látek naneseny na TLC desky. Frakce č.14 z této kolony byla poslána na GC/MS analýzu. Byly detekovány stopy těchto mastných kyselin: kaprylové, palmitové a olejové.

Poslední část práce se zabývala biologickou aktivitou frakcí ze slupek a listů.

Ze slupek slunečnicových semen bylo všech 5 vzorků použito pro měření antioxidační aktivity pomocí metody DPPH s využitím sekvenční injekční analýzy. Antioxidační aktivita vzorků byla velmi slabá. Významnější pokles absorpance DPPH byl zaznamenán u vzorku č.2.

U sumárního 80% ethanolového extraktu z listů slunečnice byla také stanovena antioxidační aktivita pomocí DPPH radikálu, zároveň byla pro tento vzorek vypočítána hodnota EC_{50} (0,274 mg/ml). Protože extrakt vykázal významnou antioxidační aktivitu, byla tato aktivita následně měřena i metodou FRAP. I při měření 80% ethanolového extraktu z listů metodou FRAP byla tato aktivita také významná. Po 4 i 60 minutách byla naměřena 3krát nižší než u troloxu.

Dále byl extrakt zkoušen na akutní toxicitu a fototoxicitu pomocí jedinců *Tubifex tubifex* Müll. Extrakt z listů byl pro jedince *Tubifex tubifex* Müll. toxický, ale nebyl fototoxický.

VIII. LITERATURA

1. Bylinář – informační systém bylin a bylinných přípravků
2. Janča, J., Zentrich, A.J.: Herbář léčivých rostlin 4. Eminent, Praha 1996, s. 287
3. Vermeulen, N.: Encyklopedie bylin a koření. Rebo Production, Čestlice 1999, s. 319
4. <http://www.slunecnice.cz/texty/slunecnice-rocni/>, (30.7.2007)
5. Takhtajan A.L.: Diversity and Classification of Flowering Plants. Columbia University press, New York 1997, s. 642
6. Český lékopis 2002, 3. díl, Grada Publishing a. s., Praha 2002, s. 2812, ISBN 80-247-0464-1
7. Český lékopis 2005, 2. díl, Grada Publishing a. s., Praha 2005, s. 1657, ISBN 80-247-1532-5
8. Macías, F.A., Fernández, A., Varela, R.M., Molinillo, J.M.G., Torres, A., Alves, P.L.C.A.: Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals. *J. Nat. Prod.* **69**, 795-800 (2006).
9. Polášek, M., Skála, P., Opletal, L., Jahodář, L.: Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **379**, 754-758 (2004).
10. Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L.: Evaluation of antioxidant activity of flavonoids by „ferric reducing antioxidant power“ assay and cyclic voltammetry. *Biochim. Biophys. Acta.* **1721** (1-3), 174-184 (2005).
11. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Slune%C4%8Dnice>, (13.6.2007)
12. <http://images.google.cz/>, (1.12.2007)
13. <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id16119/>, (3.1.2008)
14. Tomko, J. et al.: Farmakognózia, učebnica pre farmaceutické fakulty. Osveta, Martin 1989, s. 419
15. Hrdina, V., Hrdina, R., Jahodář, L.: Přírodní jedy a toxiny. Galén, Karolinum, Praha 2004, s. 302
16. Bonne, C., Sincholle, D.: Nouvelles compositions pharmaceutiques ou alimentaires pour traiter ou prevenir les etats inflammatoires lies a une infiltration leucocytaire. Institut National De La Propriété industrielle. FR 2853246-A1, s. 8, 2004.
17. Middleton, E.: Biological properties of flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacog.* **34** (5), 344-348 (1996).
18. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J., Šícha, J.: Obecná farmakognosie II. Sekundární látky. 3. vydání. SPN, Praha 1989, s. 297

19. Štípek, S. et al.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Grada Publishing a. s., Praha 2000, s. 314
20. Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Chinchilla, D., Galindo, J.C.G.: Heliannanes – a structure-activity relationship (SAR) study. In *Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*. CRC Press LLC, 2004, s. 203
21. Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M., Torres, A., Fronczek, F.R.: Structural elucidation and Chemistry of a novel family of bioactive sesquiterpenes: Heliannuols. *J. Org. Chem.* **59** (26), 8261-8266 (1994).
22. Macías, F.A., Torres, A., Galindo, J.C.G., Varela, R.M., Álvarez, J.A., Molinillo, J.M.G.: Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick. *Phytochemistry*. **61**, 687-692 (2002).
23. Gao, F., Wang, H., Madry, T.J.: Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Helianthus* species. *J. Nat. Prod.* **50** (1), 23-29 (1987).
24. Macías, F.A., Varela, R.M., Torres, A., Molinillo, J.M.G.: Heliespirone A. The first member of a novel family of bioactive sesquiterpenes. *Tetrahedron Lett.* **39**, 427-430 (1998).
25. Picman, A.K., Schneider, E.F., Gershenzon, J.: Antifungal activities of sunflower terpenoids. *Biochem. Syst. Ecol.* **18** (5), 325-328 (1990).
26. Suo, M.R., Lu, J.S.Y., Wu, L., Zheng, Q.T.: Two new diterpenes from *Helianthus annuus* L.. *Chin. Chem. Lett.* **17** (1), 45-48 (2006).
27. Macías, F.A., López, A., Varela, R.M., Molinillo, J.M.G., Alves, P.L.C.A., Torres, A.: Helivypolide G. A novel dimeric bioactive sesquiterpene lactone. *Tetrahedron Lett.* **45** (35), 6567-6570 (2004).
28. Spring, O., Albert, K., Hager, A.: Three biologically active heliangolides from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*. **21** (10), 2551-2553 (1982).
29. Spring, O., Albert, K., Gradmann, W.: Annuithrin, a new biologically active germacranolide from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*. **20** (8), 1883-1885 (1981).
30. Macías, F.A., López, A., Varela, R.M., Torres, A., Molinillo, J.M.G.: Bioactive apocarotenoids annuionones F and G: structural revision of annuionones A, B and E. *Phytochemistry*. **65** (22), 3057-3063 (2004).
31. Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Torres, A.: Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry*. **45** (4), 683-687 (1997).
32. <http://faf.vfu.cz/html/txts/seskviterpeny.html>, (1.12.2007)
33. <http://images.google.cz/>, (25.1.2008)

34. Fedenko, V.S.: Correlation of spectral characteristics and content of phenolic compounds in plant extracts. *Fiziol. i Biokhim. Kult. Rast.* **32** (3), 236-239 (2000).
35. De Leonardis, A., Macciola, V., Di Domenico, N.: A first pilot study to produce a food antioxidant from sunflower seed shell (*Helianthus annuus*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **107**, 220-227 (2005).
36. Pettegrew, J.W. et al.: Compounds, compositions and methods for treating neuropsychiatric disorders. U. S. Pat. Appl. Publ. US 2006/0088614 A1, s. 27, 2006.
37. Stahl, E.: *Thin-Layer Chromatography. A laboratory handbook.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1969, s. 1041
38. Hrabálek, A. et al.: *Chemická laboratorní technika pro farmaceuty.* Karolinum, Praha 2000, s.132
39. Opletal, L., Drašar, P.: *Fytochemické metody. 1. Izolace obsahových látek (laboratorní technika).* Karolinum, Praha 1994, s. 142
40. Klimeš, J., Sochor, J., Mokry, M., Kastner, P., Pilařová, P.: *Kontrola léčiv I.* Karolinum, Praha 2002, s. 141
41. Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., Torres, A., Macías, F.A., Martínez de la Ossa, E.: Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. *J. Supercrit. Fluids.* **41**, 43-49 (2007).
42. Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D.: Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* **46** (10), 4113-4117 (1998).
43. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press Inc. fourth edition, New York 2007, s. 851
44. Zhang, P.X., Yacilla, M.T.: Modification of cyclooxygenase and lipoxygenase activity with Asteridae extracts and optionally boswellic acid. *Int. Appl. Publ. PCT.* WO 2004/052299 A2, s. 39, 2004.
45. Holčápek, M., Jandera, P., Zderadička, P., Hrubá, L.: Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils usány high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1010** (2), 195-215 (2003).
46. Macías, F.A., Torres, A., Galindo, J.C.G.: Heliespirones C-E, new spiroterpenes from *Helianthus annuus*. *Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy.* Charles Sturt University, Australia 2005, s. 6

47. Dušek, J., Kašparová, M., Siatka, T., Spilková, J., Tůmová, L.: Praktická cvičení z farmakognosie. Karolinum, Praha 2002, s. 94
48. Soni, A.K., Joshi, P.C.: High sensitivity of Tubifex for Ultraviolet – B. Biochem. Biophys. Research Commun. **231** (3), 818-819 (1997).
49. Vytlačilová, J., Chobot, V., Jahodář, L., Laasko, I., Vuorela, P.: Tubifex tubifex Müll. – photosensitive organism. Cent. Eur. J. Publ. Health. **12** (Suppl), 89-93 (2004).
50. Jahodář, L.: Farmakobotanika, semenné rostliny. Karolinum, Praha 2006, s.258
51. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Karnitin>, (25.1.2008)
52. Macías, F.A., Varela, R.M., Torres, A., Olivia, R.M., Molinillo, J.M.G.: Bioactive norsesquiterpenes from Helianthus annuus with potential allelopathic activity. Phytochemistry. **48** (4), 631-636 (1998).
53. Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chemické listy. **98** (4), 174-179 (2004).

ABSTRAKT

Podlipná, J. **Fytochemický výzkum *Helianthus annuus* L. IV.** Diplomová práce 2008.

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 93 s.

Práce byla zaměřena na fytochemický výzkum rostliny *Helianthus annuus* L. Cílem bylo získání nových informací o rostlinných metabolitech slunečnice roční. Byla snaha provést kvalitativní vyhodnocení obsahových látek v klíčcích a slupkách a rozdělit ethanolový extrakt z listů této rostliny. Nakonec byla u frakcí ze slupek a listů vyhodnocena jejich biologická aktivita.

V extraktu z klíčků alkaloidy detekovány nebyly. Na základě tenkovrstvé chromatografie byla ve slupkách slunečnicových semen detekována kyselina kávová. 80% ethanolový extrakt z listů slunečnice vykázal významnou antioxidační aktivitu, která byla stanovena jak pomocí DPPH radikálu, tak metodou FRAP. Ve frakci č.14 (z druhé chromatografické kolony extraktu z listů) byly nalezeny mastné kyseliny. Extrakt z listů byl toxický pro jedince *Tubifex tubifex* Müll., ale nebyl fototoxický.

ABSTRACT

Podlipná, J. **Phytochemical study of *Helianthus annuus* L. IV.** Diploma thesis 2008.

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 93 pp.

The thesis was focused on phytochemical research of plant *Helianthus annuus* L. The aim of the research was to obtain new information about plant metabolites of sunflower. There was an effort to evaluate the quality of included compounds in sprouts and sunflower seed shells and to divide ethanolic extract from leaves of this plant. Finally the evaluation of biological activity was done from fractions of leaves and shells.

There weren't detected any alkaloids in extract from sprouts. Caffeic acid was detected in sunflower seed shells according to thin-layer chromatography. 80% ethanolic extract from sunflower leaves had significant antioxidant activity which was measured both by DPPH radical and FRAP method. Fat acids were found in fraction No. 14 (from 2nd chromatographic column of extract from leaves). Extract from leaves was toxic for worms *Tubifex tubifex* Müll. but it wasn't phototoxic.