

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Screening biologické aktivity různých druhů rostlin z rodu *Kalanchoe*
Screening of biological activity of various species of the genus *Kalanchoe*

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2023

Thanh Tam Mai

PROHLÁŠENÍ

Tímto prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem a vedením paní PharmDr. Marcely Šafratové, Ph.D.

Veškerá literatura a zdroje, které jsem použila k vypracování diplomové práce, jsou řádně citovány a uvedeny v seznamu použité literatury na konci práce. Tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, květen 2023

Thanh Tam Mai

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Marcelle Šafratové Ph.D. za cenné rady, poskytnuté materiály, a hlavně za trpělivost, ochotu a odborné vedení. Také bych chtěla poděkovat Katedře chemie, Přírodovědné fakulty Univerzity Hradec Králové za poskytnuté rekombinantní enzymy. Na závěr bych chtěla poděkovat celé Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky za veškeré poskytnuté technické a věcné vybavení.

Obsah

1	Seznam zkratek.....	7
3	Seznam obrázků	8
4	Seznam tabulek	9
5	ÚVOD.....	10
6	CÍL PRÁCE.....	12
7	TEORETICKÁ ČÁST.....	13
7.1	Čeleď Crassulaceae.....	13
7.1.1	Rod <i>Kalanchoe</i>	13
7.1.1.1	<i>Kalanchoe delagoensis</i> Eckl. & Zeyh.....	15
7.1.1.2	<i>Kalanchoe fedtschenkoi</i> Raym.-Hamet & H.Perrier.....	16
7.1.1.3	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> Poelln.	17
7.1.1.4	<i>Kalanchoe manginii</i> 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier.....	18
7.1.1.5	<i>Kalanchoe prolifera</i> Raym.-Hamet.	19
7.1.1.6	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.....	19
7.1.1.7	<i>Kalanchoe tomentosa</i> Baker.....	20
7.1.1.8	<i>Kalanchoe crenata</i> (Andrews) Haworth	21
7.1.1.9	<i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym. – Hamet and H. Perrier	22
7.1.1.10	<i>Kalanchoe gastonis-bornieri</i> Raym-Hamet et Perrier.....	22
7.1.2	Biologická aktivita rostlin rodu <i>Kalanchoe</i>	24
7.1.2.1	Cytotoxická/ Protinádorová aktivita.....	24
7.1.2.2	Sedativní aktivita	25
7.1.2.3	Antioxidační a nefroprotektivní účinek	26
7.1.2.4	Antimikrobní aktivita	26
7.1.2.5	Antivirová aktivita.....	28
7.1.2.6	Acetylcholinesterázová inhibiční aktivita	29
7.1.2.7	Protektivní účinky proti anafylaktickému šoku/ Antihistaminové účinky	29
7.1.2.8	Insekticidní a larvicidní aktivita	30
7.1.2.9	Hojení ran	30
7.1.2.10	Antileishmaniální aktivita/ vliv na kožní leishmaniózu.....	31
7.1.2.11	Antiulcerózní aktivita.....	31
7.1.2.12	Anthelmintická aktivita.....	32
7.1.2.13	Antihyperglykemická/antidiabetická aktivita	32
7.1.2.14	Hepatoprotektivní aktivita	33

7.1.2.15	Protizánětlivá aktivita	33
7.1.2.16	Imunosupresivní aktivita	34
8	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
8.1	Chemikálie, rozpouštědla a přístrojové vybavení pro přípravu a hodnocení extraktů druhů <i>Kalanchoe</i>	37
8.1.1	Chemikálie a rozpouštědla	37
8.1.2	Pomocný materiál	37
8.1.3	Chromatografický materiál.....	38
8.1.4	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii.....	38
8.1.5	Přístrojové vybavení	38
8.1.6	Detekce sekundárních metabolitů	38
8.1.6.1	D 1: UV záření o $\lambda = 254$ nm	38
8.1.6.2	D 2: UV záření o $\lambda = 366$ nm	38
8.1.6.3	D3: Dragendorffovo činidlo	38
8.1.6.4	D4: Liebermann-Buchardovo činidlo	38
8.1.6.5	D5: Činidlo s kyselinou fosforečnou a vanilinem.....	39
8.1.6.6	D6: Chlorid hlinitý.....	39
8.1.6.7	D7: 2-Aminoethyldifenylborinát – PEG	39
8.2	Všeobecné postupy	39
8.2.1	Úprava rozpouštědel před používáním	39
8.2.2	Odpařování roztoků a sušení extraktů	39
8.2.3	Obecné podmínky provedení tenkovrstvé chromatografie	39
8.3	Rostlinný materiál	40
8.4	Příprava sumárních extraktů	41
8.5	Příprava sumárního alkaloidního extraktu	41
8.6	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE.....	42
8.6.1	Chemikálie	42
8.6.2	Činidla	42
8.6.3	Tlumivé roztoky (pufry)	42
8.6.4	Přístrojové vybavení a použité programy.....	42
8.6.5	Rekombinantní enzymy	42
8.7	Stanovení inhibičních aktivit.....	43
8.7.1	Stanovení inhibiční aktivity enzymů.....	43
8.7.2	Stanovení inhibiční aktivity extraktů.....	43
8.8	Výsledky.....	44
8.8.1	Přehled chromatogramů jednotlivých sumárních extraktů	44

8.8.1.1	Detekce pod UV o $\lambda = 254$ nm	44
8.8.1.2	Detekce pod UV o $\lambda = 366$ nm	45
8.8.1.3	Detekce alkaloidů	46
8.8.1.4	Důkazy steroidních a terpenických látek.....	47
8.8.1.5	Důkaz steroidních látek	48
8.8.1.6	Důkaz seskviterpenů a flavonoidů.....	49
8.8.1.7	Detekce flavonoidů, seskviterpenů, kumarinů, anthronů a anthranolů	50
8.8.2	Vyhodnocení chromatogramů.....	51
8.8.2.1	D1: Detekce pod UV o $\lambda = 254$ nm.....	51
8.8.2.2	D2: Detekce pod UV o $\lambda = 366$ nm.....	51
8.8.2.3	D3: Důkaz alkaloidů – Dragendorffovo činidlo	51
8.8.2.4	D4: Důkaz steroidů a terpenů – Liebermann-Buchardovo činidlo	51
8.8.2.5	D5: Důkaz steroidních látek – Činidlo s kyselinou fosforečnou a vanilinem	52
8.8.2.6	D6: Důkaz seskviterpenů a flavonoidů – Chlorid hlinitý.....	52
8.8.2.7	D7: Důkaz flavonoidů, kumarinů, anthronů a anthranolů – 2- aminoethyldifenylborinát - PEG	52
8.8.3	Inhibiční aktivita sumárních ethanolových extraktů vůči AChE a BuChE	53
9	Diskuse a Závěr	54
10	Abstrakt	57
11	Abstract	58
12	Použitá literatura.....	59

1 Seznam zkratek

AChe	Acetylcholinesteráza
BuChE	Butyrylcholinesteráza
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
ZLR FaF UK	Zahrada léčivých rostlin Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy

3 Seznam obrázků

Obrázek 1 - <i>Kalanchoe delagoensis</i>	16
Obrázek 2- <i>Kalanchoe fedtschenkoi</i>	17
Obrázek 3 - <i>Kalanchoe blossfeldiana</i>	18
Obrázek 4 - <i>Kalanchoe manginii</i> 'Wendy'	18
Obrázek 5 - <i>Kalanchoe prolifera</i>	19
Obrázek 6 - <i>Kalanchoe pinnata</i>	20
Obrázek 7 - <i>Kalanchoe tomentosa</i>	21
Obrázek 8 - <i>Kalanchoe crenata</i>	21
Obrázek 9 - <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	22
Obrázek 10 - <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i>	23
Obrázek 11 - Některé chemické struktury bufadienolidů rostlin <i>Kalanchoe</i>	35
Obrázek 12 - Některé chemické struktury flavonoidů rostlin <i>Kalanchoe</i>	36
Obrázek 13 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D1: UV záření o $\lambda = 254$ nm	44
Obrázek 14 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D1: UV záření o $\lambda = 254$ nm	44
Obrázek 15 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D2: UV záření o $\lambda = 366$ nm	45
Obrázek 16 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D2: UV záření o $\lambda = 366$ nm	45
Obrázek 17 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D3: Dragendorffovo činidlo	46
Obrázek 18 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D3: Dragendorffovo činidlo	46
Obrázek 19 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D4: Liebermann-Buchardovo činidlo	47
Obrázek 20 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D4: Liebermann-Buchardovo činidlo	47
Obrázek 21 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D5: Činidlo s kyselinou fosforečnou a vanilinem.....	48
Obrázek 22 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D5: Činidlo s kyselinou fosforečnou a vanilinem.....	48
Obrázek 23 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D6: Chlorid hlinitý	49
Obrázek 24 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D6: Chlorid hlinitý	49
Obrázek 25 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D7: 2-Aminoethyldifenylborinát – PEG	50
Obrázek 26 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D7: 2-Aminoethyldifenylborinát – PEG	50

4 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Taxonomické zařazení.....	15
Tabulka 2 - Cytotoxická/ Protinádorová aktivita	25
Tabulka 3 - Sedativní aktivita.....	25
Tabulka 4 - Antioxidační a nefroprotektivní účinek	26
Tabulka 5 - Antimikrobní aktivita	27
Tabulka 6 - Antivirová aktivity	28
Tabulka 7 - Anticholinesterázová inhibiční aktivita.....	29
Tabulka 8 - Protektivní účinky proti anafylaktickému šoku/ Antihistaminové účinky	29
Tabulka 9 - Insekticidní a larvicidní aktivita.....	30
Tabulka 11 - Hojení ran	30
Tabulka 12 - Antileishmaniální účinky/ vliv na kožní leishmaniózu	31
Tabulka 13 - Antiulcerózní aktivita	31
Tabulka 14 - Anthelmintická aktivita.....	32
Tabulka 15 - Antihyperglykemická/ antidiabetická aktivita	32
Tabulka 16 - Hepatoprotektivní aktivita.....	33
Tabulka 17 - Protizánětlivá aktivita	33
Tabulka 18 - Imunosupresivní aktivita.....	34
Tabulka 19 - Přehled použitého rostlinného materiálu, jejich označení a přehled hmotností získaných sumárních a alkaloidních extraktů	40
Tabulka 20 - D1: Detekce pod UV o $\lambda = 254$ nm	51
Tabulka 21 – D2: Detekce pod UV o $\lambda = 366$ nm	51
Tabulka 22 - D3: Důkaz alkaloidů – Dragendorffovo činidlo	51
Tabulka 23 - D4: Důkaz steroidů a terpenů – Liebermann-Buchardovo činidlo	51
Tabulka 24 - D5: Důkaz steroidních látek – Činidlo s kyselinou fosforečnou a vanilinem	52
Tabulka 25 - D6: Důkaz seskviterpenů a flavonoidů – Chlorid hlinitý	52
Tabulka 26 - D7: Důkaz flavonoidů, kumarinů, anthronů a anthranolů – 2-aminoethyldifenylborinát - PEG	52
Tabulka 27 - Inhibiční aktivita sumárních ethanolových extraktů vůči AChE a BuChE.....	53

5 ÚVOD

Odhadem je na světě 500 000 druhů rostlin a pouze 5 % z nich bylo farmakologicky studováno, což z rostlin dělá potenciální zdroj nových léčiv. Znalosti léčivých účinků rostlin jsou převzaty z tradiční medicíny a týkají se hlavně přípravků na bázi surových extraktů. Podle WHO přibližně 80% světové populace z ekonomicky rozvojových zemí jsou stále závislé na rostlinách a produktech jejich metabolismu jako zdroji primární péče. Uvádí se, že za posledních 30 let více jak 60 % nových aktivních substancí pochází právě z přírodních zdrojů nebo jejich syntéza byla inspirována přírodními produkty, ale stále většina organických molekul z primárních zdrojů nebyla chemicky popsána.¹⁻³

Rod *Kalanchoe* byl poprvé popsán botanikem Michelelem Adansonem v roce 1763 a zahrnuje okolo 150 druhů. V některých oblastech je stále uznáváno rozdělení rodu do tří sekcí: *Kalanchoe*, *Bryophyllum* a *Kitchingia*, které byly poprvé zmíněny botaniky Mannoni a Boiteau v roce 1947. Nálevy, kataplazmy, šťávy nebo i obklady z drčených listů jsou široce používány v tradiční čínské, indické (ajurvédské) a antroposofické medicíně po celém světě, zejména v zemích jako Indie, Čína, Jižní Afrika a Brazílie.^{4,5}

Díky rozdílné stavbě buněk i jednotlivých částí rostlinného těla (soubor vakuol, buněčné stěny, plastidů, idioblastů, mléčnic a dalších) jsou rostliny schopny v sobě hromadit produkty sekundárního metabolismu. Sekundární metabolity mají význam v ochraně rostliny před predátory, houbami, mikroby, viry a jsou také nosiči farmakologického účinku rostliny. Množství a složení sekundárních metabolitů v rostlině se liší podle toho, zda je rostlina pěstovaná nebo divoce rostoucí, závisí také na abiotických podmínkách, ročním období, jednotlivých částech rostliny a fázi růstu. Mezi sekundární metabolity patří: alkaloidy, flavonoidy, fenoly, terpeny, steroidy, kyanogenní glykosidy, iridoidy, a další látky.^{2,6}

Hlavními sekundárními metabolity rodu *Kalanchoe* jsou bufadienolidy a flavonoidy. Bufadienolidy se byly poprvé identifikovány v jedu ropuchy, podle které nesou taky své jméno, ale mohou se vyskytovat i v jiných živočišných a rostlinných organismech, jako je rod *Kalanchoe*. Chemická struktura bufadienolidů se skládá z C-24 skupiny steroidů a obsahují šestičlenný laktonový (α -pyronový) kruh v poloze C-17 β . Z farmakologického hlediska mohou být potenciální skupinou steroidních hormonů s cytotoxickými, antivirotickými, antimikrobiálními a svalově relaxačními účinky. Flavonoidy se běžně vyskytují v listech, semenech, stoncích, květech a plodech krytosemenných rostlin. U rodu *Kalanchoe* jsou nejvíce studovány flavonoidy z listů. Flavonoidy jsou metabolity pocházející ze spojení šikimátové (1 \times derivát kyseliny skořicové) a acetátové (3 \times malonylkoenzym A) cesty, obsahují strukturní typ C₆-C₃-C₆. Nejčastějšími flavonoidy, které jsou popsány v rostlinách rodu *Kalanchoe*, jsou glykosylové deriváty kvercetinu, kempferolu, eupafolinu a patuletinu a jsou zodpovědné za antioxidační, antimikrobiální, antivirové, protizánětlivé, gastroprotektivní, anticholinesterasové a další účinky.^{3,5,7}

Pro zahájení fytochemických studií je potřeba dle literatury zvolit rostlinný zdroj s významnou aktivitou (podporové tradičním používáním a vědeckým výzkumem) a je potřeba zajistit dostupnost rostlinného materiálu. Rostliny rodu *Kalanchoe* jsou potenciálními

kandidáty, mají širokou škálu terapeutických účinků, a kromě pohlavního rozmnožování se dokáží množit i asexuálně. Schopnost snadného množení ze semen, listových řízků, oddělených nebo zraněných listů a adventivních pupenů, které se nacházejí na okrajích listů je přímo obsažen v názvu rodu *Kalanchoe*. Předpokládá se, že název „Kalanchoe“ pochází z čínštiny „Kalan Chauhuy“, což v překladu znamená „který padá a roste“. ⁵

6 CÍL PRÁCE

Náplní této diplomové práce bylo:

- Zpracování literární rešerše
- Příprava sumárních ethanolových a ethylacetátových alkaloidních extraktů rodu *Kalanchoe*: *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh., *Kalanchoe fedtschekoi* Raym.-Hamet & H.Perrier, *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. a *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier
- Fytochemická analýza extraktů důkazovými reakcemi se zaměřením na steroidní látky a alkaloidy, vyhodnocení výsledků a porovnání s vyhledanou literaturou
- Stanovení biologické aktivity alkaloidních extraktů na inhibici acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BuChE) a vyhodnocení výsledků
- Vyhodnocení celkových dosažených výsledků

7 TEORETICKÁ ČÁST

7.1 Čeleď Crassulaceae (Tlusticovité)

Rostliny z čeledi Crassulaceae jsou dvouděložné vytrvalé rostliny, typicky bylinného charakteru, mohou však být i keře, polokeře a stromy. Čeleď Crassulaceae je příbuzná s čeledí Saxifragaceae (Lomikamenovité), ale liší se isomerickými cyklickými květy s volnými plodolisty.⁸⁻¹⁰

Listy jsou obvykle jednoduché, střídavé, přisedlé, bez palistů, ale vyskytují se i vstřícné, řapíkaté nebo přeslenité listy. Nejčastěji jsou sdružené do růžic. Čepel listu je celokrajná, vroubkovaná nebo laločnatá. Rostliny jsou lysé nebo některé druhy obsahují žláznaté chlupy na povrchu listu. Povrch listu je často pokrytý modrobílým voskem vylučovaným z epidermis, který plní funkci zadržování vody v rostlině. Květy jsou oboupohlavní, aktinomorfní, dvoudomé, tří-, čtyř- až pětičetné, nejčastěji uspořádané v kruzích. Tvoří vrcholičnaté, vzácněji hroznovité květenství. Plodem je měchýřek, který může být blanitý nebo dřevnatý. Semena jsou drobná s olejovým endospermem.⁸⁻¹⁰

Čeleď je celosvětově rozšířena, nejvíce zástupců se vyskytuje v mírných a tropických oblastech, kde se vyskytují zejména v horských oblastech. Zahrnuje celkem 35 rodů s přibližně 1400 druhy.⁸

Svým neobvyklým vzhledem a barevností se často pěstují jako okrasné rostliny, které jsou nenáročné a vyžadují minimální péči.¹⁰

Kromě okrasného účelu mají potenciál i v medicíně, protože vykazují antioxidační, antihyperglykemické, antimikrobiální, antiulcerogenní, protirakovinné, protizánětlivé, analgetické, hepatoprotektivní, antinociceptivní, antiartritické, antimalarické, insekticidní, antihypertenzivní, antitrombotické a myometrické účinky.¹¹

Ze studií na různých zástupcích čeledi Crassulaceae se podařilo vyizolovat flavonoidy, steroly, triterpenoidy, fenolické sloučeniny a bufadienolidy.¹¹

Nejvýznamnější rody čeledi Crassulaceae patří *Sedum*, *Crassula*, *Echeveria*, *Kalanchoe*, *Rhodiola*, *Sempervivum*, *Tylecodon*, *Aeonium*, *Dudleya*.¹¹

7.1.1 Rod Kalanchoe

Druhy rodu *Kalanchoe* jsou typicky vzpřímené rostoucí keře nebo byliny, které se vyskytují v subtropických a tropických oblastech, nejvíce jsou zastoupené na Madagaskaru, v Africe, Brazílii, Asii a v Austrálii. Jsou to vytrvalé rostliny s hustými a zelenými listy. Květy jsou drobné a sdružené ve shlucích, běžně jsou různě zbarvené, nejčastěji jsou červené, žluté, růžové, oranžové nebo bílé.^{3, 4, 10, 12-14} Rod *Kalanchoe* zahrnuje kolem 150 druhů rostlin.¹²

Z různých fytochemických studií tohoto rodu byla izolována celá řada sekundárních metabolitů různého typu jako např. flavonoidy, alkaloidy, fenolové kyseliny, saponiny, anthokyany, kumariny, bufadienolidy, triterpeny, steroly a další.^{10, 14}

Přítomností kardiotoxických bufadienolidů je celá rostlina jedovatá, kdy nejvyšší obsah bufadienolidů je v květech. U nekontrolovaného nepohlavního rozmnožování pomocí dceřiných rostlinek rostoucích na okrajích listů při silnějším otřesu opadají na zem a ihned se zakořeňují. Právě tyto rostlinné části mohou být příčinou otrav některých hospodářských zvířat např. v Austrálii.^{12, 15, 16}

Dnes se pěstují zejména jako pokojové a okrasné rostliny. V lidovém léčitelství se používají nadzemní části a šťáva z rostlin k léčbě zánětů, alergií, kožních onemocnění. Výtažky z rostlin se užívají vnitřně k léčbě žaludečních vředů, astmatu, infekcí, nádorů a k regulaci krevního cukru.^{12, 14} Tyto rostliny jsou podrobeny celé řadě studií, kde vykazují zajímavé farmakologické aktivity (anthelmintické, imunosupresivní, protizánětlivé, cytotoxické, antihyperglykemické, hepatoprotektivní, nefroprotektivní, antioxidační, antimikrobiální, analgetické, antikonvulzivní, antipyretické, antihistaminové). Výše zmíněné farmakologické aktivity jsou připisovány většinou flavonoidům a bufadienolidům, které se řadí mezi hlavní sekundární metabolity nalezené v extraktech rodu *Kalanchoe*. Bufadienolidy se pojí hlavně s cytotoxickými, antivirovými, antimikrobiálními, antioxidačními a svalově relaxačními aktivitami. Flavonoidy jsou uváděny jako protizánětlivé látky a látky napomáhající při hojení ran, dále mají antioxidační, antimikrobiální, antivirové, leishmanicidní a další účinky, preventivně působí také proti kardiovaskulárním a neurodegenerativním onemocněním.^{5, 11, 14, 17}

Historie členění rodu *Kalanchoe*

V první půlce 20.století byl rod *Kalanchoe* rozdělen do tří sekcí: *Kalanchoe*, *Bryophyllum* a *Kitchingia*. Rozlišovaly se podle tvaru kalichu a korunní trubice, místo napojení tyčinek ke koruně, poměrem délky semeníku k délce čnělky, prostorového uspořádání rostliny a tvaru stopky.^{4, 18}

Název rodu *Bryophyllum* je převzat z řečtiny a znamená „klíčící list“. Pro tyto rostliny jsou charakteristické převislé květy, ohnutá květní stopka, zvonkovitý nebo kulatý kalich, srostlé kališní lístky, korunní trubice je zúžena nad semeníkem, nitky tyčinek jsou bazálně srostlé s korunou, čnělka je výrazně delší než semeník, má čtyřhranné nebo půlkruhové šupinovitě nektarium. U většiny druhů *Bryophyllum* se nacházejí na okrajích listu adventivní pupeny a druhy mají haploidní počet chromozomů (17). Vyskytují se převážně na Madagaskaru, kromě druhu *Bryophyllum pinnatum*.^{4, 18, 19}

Zástupci rodu *Kalanchoe* se vyznačují vzpřímenými květy, přímou květní stopkou, válcovitým tvarem kalichu, nesrostlými kališními lístky nebo srostlými pouze v polovině své délky, rovnou korunní trubicí, nitky tyčinek jsou srostlé s korunou centrálně nebo po délce, čnělka je kratší než semeník, lineárním šupinovitým nektariem. Na listech nejsou žádné

adventivní pupeny. Základní počet chromozomů je 18. Tyto rostliny rostou na africkém kontinentu a na jihu Madagaskaru.^{4, 18}

Pár druhů rodu *Kitchingia* bylo zahrnuto do rodu *Bryophyllum*, jsou pro ně typické trubkovité květy, které nejsou v blízkosti otvoru trubice zúžené.^{4, 18}

Odborná botanická společnost zabývající se touto problematikou se shodla na tom, že všechny výše jmenované druhy jednotlivých dřívě rodů se nově zařazují do jednoho společného rodu *Kalanchoe*.^{4, 18}

Taxonomické zařazení²⁰

Říše	<i>Plantae</i>	Rostliny
Podříše	<i>Tracheobionta</i>	Cévnaté rostliny
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i>	Krytosemenné
Třída	<i>Rosopsida</i>	Vyšší dvouděložné
Řád	<i>Saxifragales</i>	Lomikamenotvaré
Čeleď	<i>Crassulaceae</i>	Tlusticovité
Rod	<i>Kalanchoe</i>	Kolopejka

Tabulka 1 - Taxonomické zařazení²⁰

7.1.1.1 *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh. (syn. *Kalanchoe tubiflora* Raym.-Hamet.)

Kultivar připomínající tvarem lustr pochází z Madagaskaru a dorůstá do výšky dvou metrů. Jedná se o dvouletou až vytrvalou lysou rostlinu. Stonek je vzpřímený, nevětvený většinou šedavé nebo růžovo-šedavé barvy s přisedlými, dužnatými, šedozelenými a válcovitými listy na vrcholu (Obr.1). Rostlina je známá svým vegetativním rozmnožováním, kdy na koncích stonku na listech tvoří adventivní pupeny, které se oddělí od mateřské rostliny, spadnou na zem, zapustí kořeny a vyrostou z nich nové rostliny. Převíslé květy jsou nejčastěji růžové, fialové, oranžové a červené barvy se zvonkovitým kalichem a trubkovitou korunou. Květenstvím jsou hustá lata. Hnědě zbarvená semena jsou drobná a jsou unášena větrem a vodou.^{16, 21, 22}

Z ethanolového extraktu z celé rostliny *K. delagoensis* byly izolovány bufadienolidy (bryofyllin A, bersaldegenin- 1,3,5- orthoacetát a bersaldegenin-1-acetát) a kardenolidové látky (kalantubosid A a B). Tyto látky jsou zodpovědné za cytotoxickou aktivitu proti čtyřem lidským rakovinným buněčným liniím: A549 (adenokarcinom plic), Cal-27 (orální adenoskvamózní karcinom), A2058 (melanom) a HL-60 (promyelocytární leukémie). Navíc bufadienolidy (daigremontianin a bersaldegenin- 1,3,5- orthoacetát) mají také silné sedativní účinky, které u myši při vyšších dávkách vyvolávají paralýzu a křečovitě svalové kontrakce. Fenolické sloučeniny (myricetin a malvidin), nalezené v extraktech, vykazují antioxidační, protizánětlivé a antifungální účinky (*Aspergillus ochraceus*). V některých zdrojích se setkáme i s potvrzením přítomnosti alkaloidních látek, konkrétní strukturní typy nebyly popsány. Dnes

je pěstována především jako pokojová rostlina, ale např. v Brazíli se stále užívá pro své hojící účinky. Rostlina má široké využití v lidovém léčitelství, kde se používá k léčbě infekcí, revmatismu, zánětů a hypertenze.^{3, 5, 10, 21, 23}



Obrázek 1 - *Kalanchoe delagoensis*²⁴

7.1.1.2 *Kalanchoe fedtschenkoi* Raym.-Hamet & H.Perrier

Sukulentní rostlina původem z Madagaskaru je pojmenován podle ruského botanika Borise Alexejeviče Fedčenko (1872-1947). Vytrvalá lysá rostlina dorůstající výšky 50 cm, roste především v suchých, kamenitých oblastech a na skalách. Stonek je přímý, dlouhý 20-30 cm a purpurově zbarvený. Listy jsou dužnaté, pokryté voskem s obvejčitým až okrouhlým tvarem a vyskytují se na koncích stonku. Mladé listy jsou světle modrozeleně zbarvené s purpurově zvýrazněným lemem. Květy jsou převislé s úzce zvonkovitou oranžovou nebo červenou korunou a tvoří chocholičnatá květenství (Obr. 2). Tyto rostliny mají drobná semena a jsou pěstovány především jako okrasné. V Brazílii se používá jako analgetikum.^{25, 26}

Ethanolový extrakt z nadzemní části včetně dřevnatých stonků, ethanolový extrakt z nadzemní části bez dřevnatých stonků a ethanolový extrakt pouze z dřevnatých stonků rostliny *Kalanchoe fedtschenkoi* byly podrobeny testování proti patogenům ESKAPE (tato zkratka se pojí s názvy šesti vysoce virulentních a na antibiotika rezistentních bakteriálních patogenů: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter spp.*), které jsou zodpovědné za většinu nozokomiálních infekcí na celém světě. Všechny tři zmíněné extrakty vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti třem patogenům z šesti: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* a *Pseudomonas aeruginosae*. Antimikrobiální aktivitu vykazují flavonoidy a fenolické sloučeniny, konkrétně kvercetin, kempferol a kyselina kávová.²⁶



Obrázek 2- *Kalanchoe fedtschenkoi*²⁷

7.1.1.3 *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.

Druh pocházející z Madagaskaru je známý jako Vánoční kalanchoe. Jedná se o víceletý keř nebo polokeř dorůstající výšky 15-40 cm s tmavě zelenými, vroubkovanými a dužnatými listy. Květy jsou malé, paprscité a žlutě zbarvené, vyskytují se ve shlucích a tvoří okoličnatá květenství (Obr. 3).²⁸⁻³⁰

Ze studií vyplývá, že ethanolový extrakt z nadzemní části *K. blossfeldiana* má potenciál v léčbě rakoviny a bakteriálních infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheria*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus hirae*) a gramnegativními bakteriemi (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), dále má protizánětlivé, analgetické, diuretické, hepatoprotektivní, antioxidační účinky. Extrakty z nadzemní části rostliny obsahují flavonoidy (kvercetin, kvercetin-3-O- β -D-glukosid), fenolické sloučeniny, třísloviny, steroly (stigmasterol a β -sitosterol), triterpeny, alkaloidy, kardioaktivní glykosidy, kumariny, anthokyaniny a další látky. Obsah sekundárních metabolitů se liší podle zbarvení květů. Pěstuje se jako pokojová a okrasná rostlina.^{10, 12, 28, 31, 32}



Obrázek 3 - *Kalanchoe blossfeldiana*³³

7.1.1.4 *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier

Rostlina původem z Madagaskaru je přezdívána „madagaskarský zvonek“ dorůstá výšky až 30 cm. Stonek je dužnatý s kopinatými až obvejčitými listy, které jsou na okrajích zubaté nebo vroubkované. Zvonkovité květy jsou převislé a růžově nebo červeně zbarvené se žlutým zakončením (Obr. 4). Pěstuje se především jako okrasná rostlina.³⁴⁻³⁷



Obrázek 4 - *Kalanchoe manginii* 'Wendy'³⁸

7.1.1.5 *Kalanchoe prolifera* Raym.-Hamet.

Je to vytrvalá sukulentní rostlina, která roste v tropických oblastech na kamenitých půdách a dorůstá výšky až 3 m. Lodyha je vzpřímená, čtyřhranná, nevětvená a dřevnatá. Řapíkaté a zpeřené listy jsou masité, robustní, gumovité s fialovými a zubatými okraji (Obr. 5). Květenstvím je lata a je tvořeno až 700 květy. Červené zbarvené květy jsou zvonkovitého tvaru. Listy se v tradiční medicíně v Indonésii užívají k léčbě horečky, infekcí, revmatismu a kožních onemocnění.^{39, 40}



Obrázek 5 - *Kalanchoe prolifera*^{41, 42}

7.1.1.6 *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

Je to vytrvalý keř dorůstající výšky 1 – 1,5 m. Stonek je dutý, větvený s fialovým nádechem. Listy jsou vstřícné, lichozpeřené s kopinatou čepelí a vroubkovaným, načervenalé zbarveným okrajem. Květenstvím je lata s mnoha převislými červenými nebo fialovými květy zvonkovitého tvaru (Obr. 6).^{43, 44}

Rostlina obsahuje řadu biologicky aktivních látek: flavonoidy, bufadienolidy, fenoly, saponiny, třísloviny, triterpeny, steroidy, alkaloidy, lipidy a další. S oblibou se využívá v ajurvédské, čínské a antroposofické medicíně k léčbě zánětů, infekcí, kašle, astmatu, ledvinových kamenů, vředů, alergií, průjmům, dny, žloutenky, bolesti hlavy a několika dalších onemocnění. Vykazuje mnoho farmakologických účinků: protizánětlivý, hepatoprotektivní, antidiabetický, protinádorový, protialergický, antimikrobiální, antivirotický, antioxidační, nefroprotektivní, insekticidní, antiulcerózní, anthelmintický, acetylcholinesterázový, antileishmaniózní, tokolytický. S širokým spektrem terapeutických účinků je tato rostlina nejstudovanějším druhem rodu *Kalanchoe* s nejvyšším počtem odborných článků a je také uvedena v Německém homeopatickém lékopisu (HAB) 2014 a v brazilském Seznamu

71 léčivých rostlin, které vypracovalo Brazílské ministerstvo zdravotnictví v roce 2009 (The National List of Plants of Interest to the Unified Health System – RENISUS).^{5, 10, 45, 46}

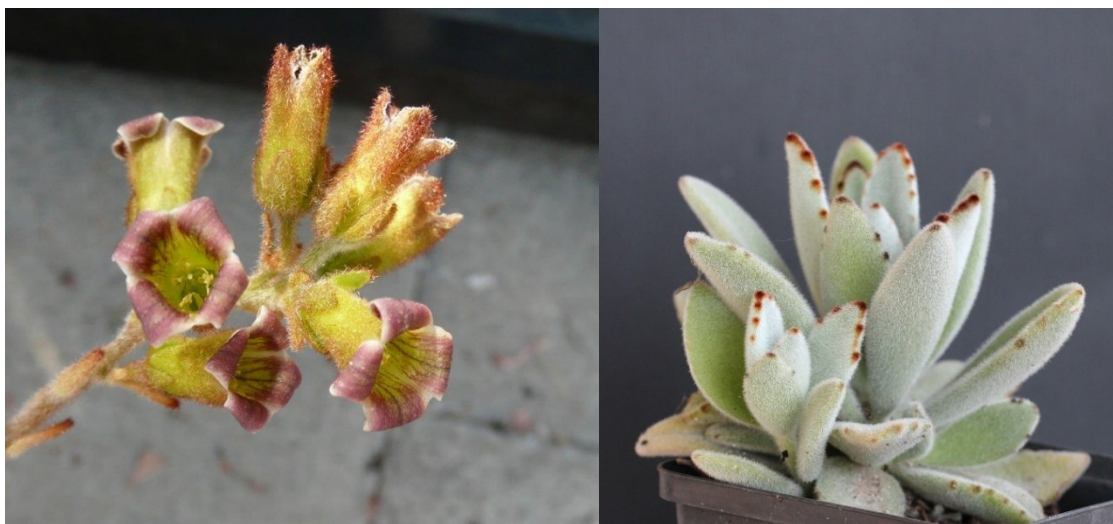


Obrázek 6 - *Kalanchoe pinnata*⁴⁷

7.1.1.7 *Kalanchoe tomentosa* Baker

V přírodě tato sukulentní rostlina může dosáhnout výšky až 1 m. Lodyha je vzpřímená, dřevnatá, rozvětvená a pokrytá chlupy. Svým vzhledem je známá jako „antistresová rostlina“ kvůli měkkým bělavým až modrozeleným chloupkům, které pokrývají listy (Obr. 7). Listy střídavé, přisedlé, oválné, masité a na vrcholu jsou uspořádané do růžic. Okraje listu jsou zaoblené nebo zubaté s hnědavým nádechem. „*Tomentosa*“ je v překladu z latiny hustě vlněný nebo sametový, husté chloupky na povrchu listu snižují transpiraci vody z jejich povrchu. Květenstvím je lata složená z vidličnatě větvených postranních větvíček. Květy jsou drobné a zvonkovité.^{4, 48, 49}

Mezi hlavní obsahové látky této rostliny můžeme zařadit flavonoidy, které vykazují protinádorové účinky.^{5, 50}



Obrázek 7 - *Kalanchoe tomentosa* ^{51, 52}

7.1.1.8 *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (syn. *K. brasiliensis* Camb.)

Brazilská vytrvalá bylina dorůstá výšky 30–200 cm. Jemně žláznatě chlupatá lodyha je přímá, dužnatá, lysá a téměř nevětvená. Zelené až nahnědlé listy jsou vstřícné, krátce řapíkaté, tvarově vejčité až kopistovité, nepravidelné a jsou seskupené ve spodní části lodyhy. Okraj listu je vroubkovaný. Květenství tvoří 30–100 květů a je latnaté. Květy jsou čtyřčetné a typicky žlutě, naoranžověle nebo červeně zbarvené (Obr. 8). ^{53, 54}

Hlavní obsahové látky v této rostlině jsou flavonoidy. Mají antioxidační, antibakteriální, protizánětlivé, imunosupresivní, antidiabetické, gastroprotektivní účinky a vykazuje AChE inhibiční aktivitu. V Africe se listy doporučují k hojení pupečnickových ran u novorozenců. ^{3, 10, 54}



Obrázek 8 - *Kalanchoe crenata* ⁵⁵

7.1.1.9 *Kalanchoe daigremontiana* Raym. – Hamet and H. Perrier

Sukulent přezdívaný jako „matka tisíců“ nebo „dávlova páteř“ je robustní rostlina dorůstající výšky až 1 m. Stonek je vzpřímený, jednoduchý a málo větvený. Horní a spodní strana listu je různě zbarvená, horní strana je leskle zelená nebo bronzová a spodní strana je nepravidelně skvrnitá a šedozeleně, zeleně nebo hnědě zbarvená. Na okrajích listů vyrůstají adventivní pupeny, které po malém otřesu rostliny spadnou na zem a zakoření se (Obr. 9). Šedofialové květy mají trubkovitý tvar.^{56, 57}

Vzhledem k jednoduchému množení se podařilo vykultivovat mnoho hybridů této rostliny, příkladem je *Kalanchoe daigremontiana* x *delagoensis*. Kromě okrasného účelu se používala v tradiční medicíně k léčbě artritidy, žaludečních vředů, revmatismu, kašle, horečky a úzkosti. Z rostliny byly izolovány flavonoidy, bufadienolidy, steroly, fenolické sloučeniny, polysacharidy a lipidy. Vyznačují se antivirovými, sedativními, protinádorovými, insekticidními a larvicidními účinky.^{3, 5, 10, 46, 58}



Obrázek 9 - *Kalanchoe daigremontiana*⁵⁹

7.1.1.10 *Kalanchoe gastonis-bornieri* Raym-Hamet et Perrier

Vytrvalý sukulent dorůstá výšky až 70 cm. Stonky jsou vzpřímené, hladké a šedivé barvy. Listy jsou řapíkaté, široce vejčité, skvrnité, uspořádané v bazálních růžicích a pokryté voskovitým bílým povlakem, který plní účel ochrany před přímým slunečním zářením (Obr. 10). Okraje listů jsou tupě vroubkované. Květenství je lata s převislými, zvonkovitými a žlutě zbarvenými květy.^{60, 61}

Ve vodném extraktu z celé rostliny (hlavně extrakt z podzemních částí rostliny) byly detekovány lignany, které mají potenciál v léčbě benigní hyperplazie prostaty. Jsou známy svými protizánětlivými, antioxidačními, larvicidními a AChE inhibičními účinky. V Latinské

Americe se v tradiční medicíně užíval vodný extrakt z rostlin jako hormonální antikoncepce, dále také při léčbě močových a vaginálních infekcí. V Ekvádoru má využití také proti prvokům rodu *Leishmania*.⁶²⁻⁶⁴



Obrázek 10 - *Kalanchoe gastonis-bonnierii*⁶⁵

7.1.2 Biologická aktivita rostlin rodu *Kalanchoe*

7.1.2.1 Cytotoxická/ Protinádorová aktivita

Sekundární metabolity	Obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Bufadienolidy	Kalantubosid A (11) Kalantubosid B (12) Bryofyllin A (7) Bersaldegenin-1,3,5- <i>o</i> -acetát (9) Bersaldegenin- 1-acetát (13)	Protinádorová aktivita na karcinom plic, ústní dutiny, melanom a leukémii	<i>Kalanchoe delagoensis</i> Eckl. & Zeyh.	Ethanolový extrakt z celé rostliny	5
Flavonoidy	Glykosidy kvercetinu, kempferolu a myricetinu	Aktivita na HeLa buňky (karcinom děložního čípku), také na buněčné linie rakoviny jater HEPG2, karcinom tlustého střeva HCT-116, dlaždicového HEP-2 hlavy a krku a rakoviny prsu MCF-7	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> Pollen.	Ethanolový extrakt z nadzemních částí rostliny	14
Bufadienolidy	Bersaldegenin-1,3,5- <i>o</i> -acetát (9) Daigremontianin (10)	Protinádorová aktivita na Raji buňky (lymfoblastoidní buňky) – virus Epstein-Barrové	<i>Kalanchoe daigremontiana</i> x <i>delagoensis</i>	Extrakt z listů	5, 10, 46
Flavonoidy	Astragalin (34) Afzelin (30) Kempferol (35)	Cytotoxicita proti buňkám myší leukémie P-388	<i>Kalanchoe tomentosa</i> Baker	Methanolový a ethyl-acetátový extrakt z listů	5, 50

Sekundární metabolity	Obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Bufadienolidy	Bryofylin A, B, C (7,8,16)	Protinádorová aktivita na karcinom plic, tračníku a nosofaryngeální karcinom, Raji buňky	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Šťáva z listů	5, 10, 46
	Bersaldegenin-3-acetát (14)	Protinádorová aktivita na karcinom plic, karcinom ústní dutiny, melanom a leukémii a Raji buňky			
Flavonoidy	Kvercetin (24) Astragalin (34) Afzelin (30) Kempferol (35) Isokvercitrin (28) Kvercetin-3-O-soforosid (36)	Cytotoxicita proti buňkám myší leukemie P-388	<i>Kalanchoe prolifera</i> Raym. - Hamet	Methanolový extrakt z listů	5, 39

Tabulka 2 - Cytotoxická/ Protinádorová aktivita

7.1.2.2 Sedativní aktivita

Klasifikace sloučeniny	Obsahové látka	Druh	Část rostliny	Literatura
Bufadienolidy	Daigremontianin (10) Bersaldegenin- 1,3,5-o-acetát (9)	<i>Kalanchoe delagoensis</i> Eckl. & Zeyh. <i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym. – Hamet and H. Perrier	Extrakt z listů	10

Tabulka 3 - Sedativní aktivita

7.1.2.3 Antioxidační a nefroprotektivní účinek

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Flavonoidy	Myricetin a malvidin	Antioxidační aktivita	<i>Kalanchoe delagoensis</i> Eckl. & Zeyh.	Ethanolový extrakt z nadzemních částí rostliny	23
Flavonoidy	Kvercitrin (25) Kvercetin-3-O- α -L-arabinopyranosyl (1- \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (26) α -rhamnoisorobin (32)	Chrání ledviny krysy před histopatologickými změnami vyvolanými gentamycinem Antioxidační aktivita	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Vodný extrakt z listů	5, 46

Tabulka 4 - Antioxidační a nefroprotektivní účinek

7.1.2.4 Antimikrobní aktivita

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Působí proti:	Druh	Část rostliny	Literatura
Flavonoidy	Glykosidy kvercetinu, kempferolu a myricetinu	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus hirae</i> <i>Corynebacterium diphtheria</i>	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> Pollen.	Ethanolový extrakt z nadzemní části rostliny	14
Flavonoidy Fenolické sloučeniny	Kvercetin (24) Kempferol (35) Kyselina kávová	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Kalanchoe fedtschenkoi</i> Raym.-Hamet & H.Perrier	Ethanolový extrakt z nadzemní části rostliny	26

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Působí proti:	Druh	Část rostliny	Literatura
Flavonoidy	Myricetin a malvidin	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Kalanchoe delagoensis</i> Eckl. & Zeyh.	Ethanolový extrakt z nadzemních částí rostliny	23
Flavonoidy	5-methyl-4,5,7-trihydroxyflavon 3, 4, 5, 7-tetrahydroxy-5-methyl-5-propenamin anthokyanidin α-rhamnoisorobin (32)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> Vyšší antibakteriální aktivita než u ciprofloxacinu proti <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Methanolový, ethanolový a ethylacetátový extrakt z listu Methanolový, chloroformový a vodný roztok z kořenů	10, 14, 26, 46
Flavonoidy		<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>S. aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>B. subtilis</i> <i>Candida albicans</i>	<i>Kalanchoe crenata</i> (Andrews) Haworth	Vodně methanolový, extrakt a šťáva z listů Extrakt z palmového vína z listů	26, 66

Tabulka 5 - Antimikrobní aktivita

7.1.2.5 Antivirová aktivita

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Bufadienolidy Flavonoidy	Bryofyllin A (7) Bryofyllin C (16) Bersaldegenin-3-acetát (14) Kvercetin (24)	Inhibiční účinky na Epstein-Barrový virus Aktivita proti viru hepatitidy C, viru herpes simplex, viru japonské encefalitidy	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Methanolový extrakt z listů	5, 10, 46
Flavonoidy	Kempferol-3-O-β-D-xylopyranosyl (1->2)-α-L-rhamnopyranosid (22) Kvercetin-3-O-β-D-xylopyranosyl (1->2)-α-L-rhamnopyranosid (23)	Antiherpesviróvá aktivita	<i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym. – Hamet and H. Perrier	Vodný extrakt z listů	5, 57

Tabulka 6 - Antivirová aktivity

7.1.2.6 Acetylcholinesterázová inhibiční aktivita

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Flavonoidy	3,7-di-O- α -L-raminopyranosyl-8-methoxykvercetin 3,7,-di-O- α -L-raminopyranosyl-8-methoxykemferol	Inhibiční vlastnosti cholinesterázy v experimentech prováděných s <i>rectus abdominis</i> izolovaným ze žab	<i>Kalanchoe crenata</i> (Andrews) Haworth	Vodně ethanolový extrakt z čerstvých listů	67
Flavonoidy	Kvercetin (24) Luteolin Isorhamnetin Luteolin-7-glukosid	Neuroprotektivní účinek (neurotoxická způsobená chloridem hlinitým u potkanů) Acetylcholinesterázová aktivita	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Ethylacetátový extrakt z listů	5, 67
Flavonoidy	3,7-di-O- α -L-raminopyranosyl-8-methoxykvercetin 3,7,-di-O- α -L-raminopyranosyl-8-methoxykemferol	Acetylcholinesterázová aktivita	<i>Kalanchoe gastonis-bornieri</i> Raym-Hamet et Perrier	Extrakt z listů	10, 67

Tabulka 7 - Anticholinesterázová inhibiční aktivita

7.1.2.7 Protektivní účinky proti anafylaktickému šoku/ Antihistaminové účinky

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Flavonoidy	Kvercitrin (25)	Zabránil fatální anafylaxi u 75% léčených zvířat	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Čerstvé listy Vodný extrakt z listů	5, 46

Tabulka 8 - Protektivní účinky proti anafylaktickému šoku/ Antihistaminové účinky

7.1.2.8 Insekticidní a larvicidní aktivita

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Druh	Část rostliny	Literatura
Bufadienolidy	Bryofyllin A, B (7,8)	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Methanolový, n-hexanový, ethylacetátový extrakt z listů	10, 67
Bufadienolidy	Daigromontianin (10)	<i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym. – Hamet and H. Perrier	Methanolový extrakt z listů	10
Bufadienolidy	Daigremontianin (10)	<i>Kalanchoe delagoensis</i> Eckl. & Zeyh.	Methanolový extrakt z listů	10

Tabulka 9 - Insekticidní a larvicidní aktivita

7.1.2.9 Hojení ran

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Flavonoidy	Kvercetin-3-O- α -L-arabinopyranosyl (1->2)- α -L-rhamnopyranosid (26)	Zvířata ošetřená krémem obsahující tento flavonoid vykazovala 97,5 \pm 0,8% hojení 12.den léčby	<i>K. pinnata</i> (Lam.) Pers.	Ethanolový extrakt z listů	5, 46

Tabulka 10 - Hojení ran

7.1.2.10 Antileishmaniální aktivita/ vliv na kožní leishmaniózu (*Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis promastigotes*)

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Druh	Část rostliny	Literatura
Flavonoidy	<p>Kvercitrin (25)</p> <p>Kvercetin-3-O-α-L-arabinopyranosyl (1->2)-α-L-rhamnopyranosid (26)</p> <p>Kvercetin (24)</p> <p>4',5-dihydroxy-3',8-dimethoxyflavon-7-O-β-D-glukopyranosid (29)</p> <p>Kapinnatosid (Kemferol-3-O-α-L-arabinopyranosyl (1->2)-α-L-rhamnopyranosid) (31)</p> <p>Afzelin (30)</p>	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Vodný extrakt z listů	5, 10, 46

Tabulka 11 - Antileishmaniální účinky/ vliv na kožní leishmaniózu

7.1.2.11 Antiulcerózní aktivita

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Flavonoidy	<p>Kvercetin-3-O-α-L-arabinopyranosyl (1->2)-α-L-rhamnopyranosid (26)</p> <p>Kvercitrin (25)</p>	Ochranný účinek proti žaludečním lézím vyvolané aspirinem, indometacinem, serotoninem, reserpinem, stresem a ethanolem	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	<p>Methanolový extrakt z listů</p> <p>Vodně ethanolový extrakt z listů</p>	5, 10

Tabulka 12 - Antiulcerózní aktivita

7.1.2.12 Anthelmintická aktivita

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Test provedený na:	Druh	Část rostliny	Literatura
Polyfenolické látky	Třísloviny	<i>Pheretima posthuma</i> <i>Ascaridia galli</i>	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers. Smrtelná dávka při koncentraci 100mg/ml za kratší čas než referenční lék: Piperazin citrát	Chloroformový, methanolvý a vodný extrakt z kořene	46

Tabulka 13 - Anthelmintická aktivita

7.1.2.13 Antihyperglykemická/antidiabetická aktivita

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Flavonoidy	Kvercetin (24) Keampferol (35)	Antidiabetická aktivita	<i>Kalanchoe crenata</i> (Andrews) Haworth	Vodně ethanolový extrakt z rostliny	10, 68
Flavonoidy	Kvercitrin (25) Kvercetin-3-O- α -L-arabinopyranosyl (1->2)- α -L-rhamnopyranosid (26) 3',4'-dimehoxykvercetin (33)	Inhibice α -glukosidázy pro léčbu diabetu mellitu II. typu	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Vodný extrakt z listů Vodně ethanolový extrakt z rostliny	5

Tabulka 14 - Antihyperglykemická/ antidiabetická aktivita

7.1.2.14 Hepatoprotektivní aktivita

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
-----	-----	Test na krysách proti hepatotoxicitě vyvolané CCl ₄	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> Pollen.	Ethanolový extrakt z nadzemní části rostliny	31
-----	-----	Test na krysách proti hepatotoxicitě vyvolané CCl ₄	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Šťáva z čerstvých listů a ethanolový extrakt	10, 46

Vysvětlivky: ----- = V literatuře nebylo uvedeno, jaké látky jsou zodpovědné za hepatoprotektivní aktivitu

Tabulka 15 - Hepatoprotektivní aktivita

7.1.2.15 Protizánětlivá aktivita

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Organické soli	Kalanchosin dimalát	Protizánětlivá aktivita	<i>Kalanchoe crenata</i> (Andrews) Haworth	Extrakt z listů získaných před obdobím květu Lyofilizovaná šťáva <i>K. brasiliensis</i> rozpuštěná ve vodě	10
Flavonoidy	Kvercetin-3-O- α -L-arabinopyranosyl (1->2)- α -L-rhamnopyranosid (26)	Inhibice COX-1 a COX-2 Inhibice fosfodiesterázy 4 (PDE4)	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Vodný a methanolový extrakt z listů	5

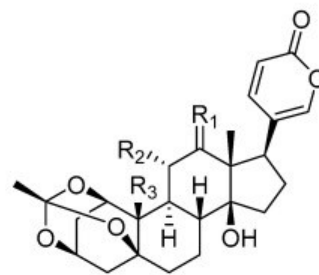
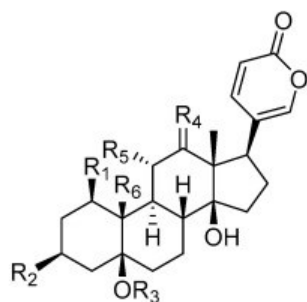
Tabulka 16 - Protizánětlivá aktivita

7.1.2.16 Imunosupresivní aktivita

Sekundární metabolity	Hlavní obsahové látky	Aktivita	Druh	Část rostliny	Literatura
Flavonoidy	<p>Kalambrosid A (patuletin-3-O-(4''-O-acetyl-α-L-rhamnopyranosyl)-7-O-(2'''-O-acetyl-α-L-rhamnopyranosid) (19)</p> <p>Kalambrosid B (patuletin-3-rhamnosid-7-(2'''-acetylramnosid) (20)</p> <p>Patuletin 3-O-(4''-O-acetyl-α-L-rhamnopyranosyl)-7-O-(3'''-O-acetyl-α-L-rhamnopyranosid) (21)</p>	Inhibice proliferace lidských lymfocytů	<i>Kalanchoe crenata</i> (Adrews) Haw.	Šťáva z čerstvých listů a stonků	5
Flavonoidy	<p>Kvercetin (24)</p> <p>Kvercitrin (25)</p> <p>Kvercetin-3-O-α-L-arabinopyranosyl (1->2)-α-L-rhamnopyranosid (26)</p> <p>Miquelianin (27)</p> <p>Isokvercitrin (28)</p>	<p>Inhibice proliferace lymfocytů</p> <p>Poprvé hlášeno pro <i>K. pinnata</i> imunosuprese lymfocytů myší</p>	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	Extrakt z listů	5

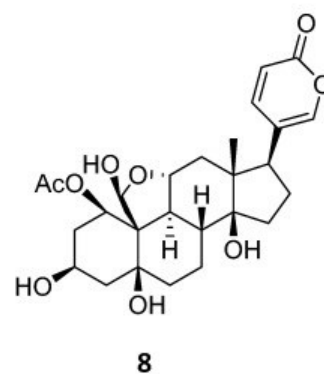
Tabulka 17 - Imunosupresivní aktivita

V následujícím přehledu jsou vyobrazeny výše zmíněné chemické struktury bufadienolidů (Obr. 11) a flavonoidů (Obr. 12) rostlin *Kalanchoe*.

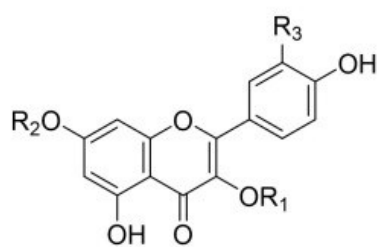


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	H		H	H ₂	H	CHO
2	H		H	H ₂	H	CHO
3	H		H	O	H	CHO
4	H		Ac	H ₂	H	CHO
5	H	OH	H	H ₂	H	CHO
6	H	OAc	H	H ₂	H	CHO
11	H		H	O	OH	CHO
12	H		H	O	OH	CHO
13	OAc	OH	H	H ₂	H	CHO
14	OH	OAc	H	H ₂	H	CHO
15	OH	OAc	H	H ₂	H	CH ₃
17	OH	OH	H	H ₂	H	CHO

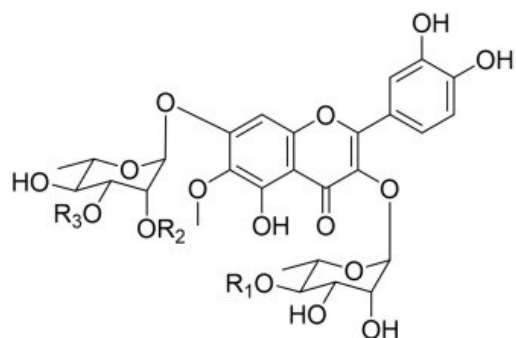
	R ₁	R ₂	R ₃
7	H ₂	OH	CHO
9	H ₂	H	CHO
10	O	OH	CHO
16	H ₂	OH	CH ₂ OH
18	O	OH	CH ₂ OH



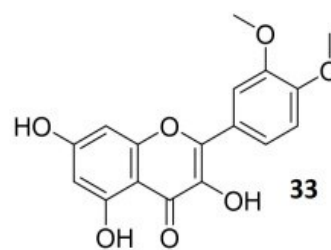
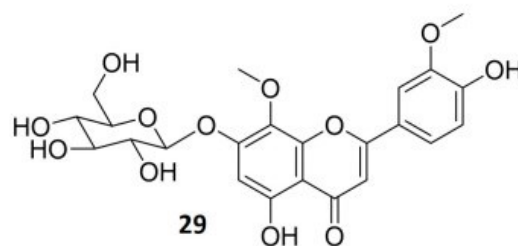
Obrázek 11 - Některé chemické struktury bufadienolidů rostlin *Kalanchoe* ⁵



	R ₁	R ₂	R ₃
22	Xyl(1→2)Rha	H	H
23	Xyl(1→2)Rha	H	OH
24	H	H	OH
25	Rha	H	OH
26	Ara(1→2)Rha	H	OH
27	Glc	H	OH
28	Glu	H	OH
30	Rha	H	H
31	Ara(1→2)Rha	H	H
32	H	Rha	H
34	Glu	H	H
35	H	H	H
36	Glu(1→2)Glu	H	OH
37	Rha(1→6)Glu	H	OH



	R ₁	R ₂	R ₃
19	Ac	Ac	H
20	H	Ac	H
21	Ac	H	Ac



Obrázek 12 - Některé chemické struktury flavonoidů rostlin *Kalanchoe* ⁵

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Chemikálie, rozpouštědla a přístrojové vybavení pro přípravu a hodnocení extraktů druhů *Kalanchoe*

8.1.1 Chemikálie a rozpouštědla

Acetanhydrid č. (Sigma Aldrich, Praha)

2-aminoethyldifenylborinát č. (Fluka, Bukurešť, Rumunsko)

Destilovaná voda (H₂O)

Dusičnan bismutitý zásaditý p. a. (Sigma Aldrich, Praha)

Ethanol 96% denaturovaný metanolem (EtOH), (Ing. Švec – Penta, Praha)

Ethylacetát p. a. (EtOAc) (Lachner s.r.o.)

Hexan p. a. (Penta a.s.)

Chlorid hlinitý č. (Lachema, Brno)

Chloroform p. a. (CHCl₃), (Ing. Švec – Penta, Praha)

Jodid draselný č. (Sigma Aldrich, Praha)

Kyselina fosforečná č. (Fluka, Bukurešť, Rumunsko)

2% kyselina chlorovodíková (HCl)

Kyselina sírová 96% p. a. (Ing. Švec – Penta)

Kyselina vinná č. (Ing. Švec – Penta, Praha)

Methanol (MeOH) (Ing. Švec – Penta, Praha)

Polyethylenglykol 4000 č. (Sigma Aldrich, Praha) (PEG 4000)

10% uhličitan sodný (Na₂CO₃) (Ing. Švec – Penta, Praha)

Vanilin (Fluka, Bukurešť, Rumunsko)

8.1.2 Pomocný materiál

Křemelina

Vata

Síran sodný bezvodý (Na₂SO₄) (Ing. Švec – Penta, Praha)

Vlíselin

8.1.3 Chromatografický materiál

TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Německo) – pro analytické účely byly použity desky o výšce 10 cm a variabilní šířce podle počtu analyzovaných vzorků.

8.1.4 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: To-MeOH-Et₂NH = 95:10:5

S 2: To-CHCl₃-MeOH-Et₂NH = 70:25:10:5

8.1.5 Přístrojové vybavení

Vakuová rotační odparka Heidolph – Hei-VAP Advantage G1

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)

Odpařování vzduchem na jehle Maxima-R

Magnetická míchačka s topením Heidolph – MR Hei-Standard

Váha laboratorní Sartorius

Elektrický laboratorní mlýnek IKA A11 basic (IKA – WERKE GMBH & CO. KG, Staufen, Německo)

8.1.6 Detekce sekundárních metabolitů

8.1.6.1 D 1: UV záření o $\lambda = 254$ nm

Přítomnost sekundárních metabolitů se projevila vznikem tmavých skvrn různé intenzity, při kterých došlo ke zhášení fluoreskujícího barviva na desce chromatogramu.

8.1.6.2 D 2: UV záření o $\lambda = 366$ nm

Přítomnost sekundárních metabolitů se projevila vznikem barevných skvrn různé intenzity na desce chromatogramu.

8.1.6.3 D3: Dragendorffovo činidlo (důkaz alkaloidů)

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

Roztok B: 16 g jodidu draselného se rozpustilo ve 40 ml destilované vody. Zásobní roztok byl připraven smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1 : 1 (v/v). Roztok může být uchováván několik měsíců v lednici. Detekční roztok byl připraven rozpuštěním 10 g kyseliny vinné v 50 ml destilované vody a doplněn přidáním 5 ml zásobního roztoku.

V přítomnosti alkaloidů se skvrny zbarvily s detekčním činidlem oranžově.

8.1.6.4 D4: Liebermann-Buchardovo činidlo (důkaz steroidů a terpenů)

5 ml acetanhydridu bylo za chlazení opatrně smícháno s 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Tato směs byla pomalu přidávána do 50 ml ochlazeného absolutního ethanolu. Činidlo bylo připraveno těsně před použitím. Po postřiku byl chromatogram zahříván 10 minut při 100 °C.

Při pozitivní reakci vznikly fluoreskující skvrny, které byly viditelné při $\lambda = 366 \text{ nm}$.

8.1.6.5 D5: Činidlo s kyselinou fosforečnou a vanilinem (důkaz steroidních látek)

Činidlo bylo připraveno smísením 1 g vanilinu ve 100 ml 50 % kyseliny fosforečné. Chromatogram byl po postřiku zahříván 10 minut na 110 °C, dokud nedošlo ke změně v intenzitě skvrn.

8.1.6.6 D6: Chlorid hlinitý (důkaz seskviterpenů a flavonoidů)

Chromatogram byl postříkán 5 % roztokem chloridu hlinitého v EtOH a zahříván 10 – 15 min na 120 °C. Pozitivní reakce se projevila při UV $\lambda = 366 \text{ nm}$.

V případě seskviterpenů byla viditelná fialová nebo hnědá, žlutá či zelená fluorescence. Zatímco v případě flavonoidů se okamžitě objevila žlutá nebo hnědá barva.

8.1.6.7 D7: 2-Aminoethyldifenylborinát – PEG (Důkaz flavonoidů, kumarinů, anthronů a anthranolů)

Chromatogram byl nejprve postříkán 1 % MeOH roztokem 2-aminoethyldifenylborinátu a následně 5 % EtOH roztokem PEG 4000. Při UV $\lambda = 366 \text{ nm}$ se pozitivní reakce projevila vznikem intenzivní žluté, oranžové a zelené fluorescence u flavonoidů, modré u kumarinů a intenzivně žluté u anthronů a anthranolů.

8.2 Všeobecné postupy

8.2.1 Úprava rozpouštědel před používáním

Všechna rozpouštědla využívaná během experimentální části, byla před použitím predestilována. Nejprve byl zachycen destilační předek, což činí asi 5 % původního objemu. Dále následovalo zachycení hlavní frakce, přičemž bylo predestilováno maximálně 90 % původního objemu rozpouštědla. Daná rozpouštědla byla poté uchovávána v souladu s předpisy ve správně označených širokhrdlých lahvích, chráněných před světlem

8.2.2 Odpařování roztoků a sušení extraktů

Rozpouštědla byla z rostlinných extraktů v baňce odpařována za sníženého tlaku pomocí vakuové rotační odparce Heidolph – Hei-VAP Advantage G1 ve vodní lázni, která byla vytemperovaná na teplotu mezi 40 až 50 °C.

8.2.3 Obecné podmínky provedení tenkovrstvé chromatografie

Vzorky pro tenkovrstvou chromatografii byly připraveny rozpuštěním 10 mg extraktu v 1 ml MeOH. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna vzestupným způsobem v chromatografických komorách sycených po dobu 20 minut parami mobilních soustav. Vzorky extraktů byly nanášené v čárce – aplikací předem připravených MeOH roztoků o koncentraci 10 mg/ml, počet nanášení 3x. Dráhy jednotlivých vzorků rostlin 1 – 7 uvedených v Tabulce 19

měřily 80 mm. Pro detekci byly použity vyvíjecí směsi S1 a S2. Jednotlivé detekce byly prováděny detekčními činidly D1 – D7.

8.3 Rostlinný materiál

Rostlinným materiálem pro přípravu extraktů byly sušené nařezané drogy rodu *Kalanchoe*, které byly získány ze Zahrady léčivých rostlin Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Sušené nařezané drogy byly uchovávány v mrazícím boxu a před přípravou extraktů byly ponechány na laboratorním stole při pokojové teplotě do rozmrznutí.

Označení	Rostlina	Rostl. část	Hmotnost drogy [g]	Hmotnost sumárního extraktu [g]	Hmotnost alkaloidního extraktu [g]	Výtěžnost alkaloidů (%)
AL-755	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> Poelln.	kořen	13,6500	1,570	N	N
AL-756	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> Poelln.	květ + nať	50,5400	6,940	0,0125	0,025
AL-757	<i>Kalanchoe manginii</i> 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier	květ a nať	43,3585	3,625	0,0216	0,050
AL-758	<i>Kalanchoe manginii</i> 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier	kořen	9,8100	1,000	N	N
AL-759	<i>Kalanchoe delagoensis</i> Eckl. & Zeyh.	květ	18,5658	1,969	0,0290	0,156
AL-761	<i>Kalanchoe fedtschekoi</i> Raym.-Hamet & H.Perrier	kořen	14,4753	2,390	N	N
AL-762	<i>Kalanchoe fedtschekoi</i> Raym.-Hamet & H.Perrier	květ a nať	49,5945	6,860	N	N

Vysvětlivka: N – nebyl připraven alkaloidní extrakt

Tabulka 18 - Přehled použitého rostlinného materiálu, jejich označení a přehled hmotností získaných sumárních a alkaloidních extraktů

8.4 Příprava sumárních extraktů

Jednotlivé usušené části rostlinných drog se nejprve zvážíly a poté byly rozemlety elektrickým laboratorním mlýnkem na velikost částic ca 1 až 2 mm. Rozemleté drogy byly převedeny do Erlenmayerovy baňky a byly zality dostatečným množstvím EtOH 96% tak, aby byly ponořeny a nad ní bylo alespoň 3 cm kapaliny. Do Erlenmayerovy baňky byly vloženy varné kamínky a obsah baňky se vařil 20 minut pod zpětných chladičem na vodní lázni, po této době se vyjmula baňka z vodní lázně a 15 minut se ponechala zchladnout. Droga v průběhu chladnutí sedimentovala na dně baňky a tekutina byla zfiltrována do předem zvážené odměrné baňky přes filtr ze silnějšího vliselinu. Toto vyvaření bylo provedeno dohromady třikrát. Spojené filtráty byly nakonec přefiltrovány přes vrstvu (2 cm) neutrální křemeliny ve filtračním tubusu za pomoci vakua. Následně byly přefiltrované extrakty odpařeny na vakuové rotační odparce tak aby bylo výsledného extraktu cca 20 ml, ze kterého bylo odebráno 5 ml do vytárované penicilinky na důkazové reakce. Odebrané sumární EtOH výtřepky se v penicilince odpařily do sucha na vodní lázni při cca 50 °C. Dosušení vzorků bylo provedeno v exikátoru po dobu 24 hodin nad aktivovanými sušícími perlami silikagelu. Penicilinky se po vysušení nad perlami silikagelu označily přiřazeným číslem vzorku ve formě AL-755 až AL-762.

8.5 Příprava sumárního alkaloidního extraktu

Zbylé odpařené ethanolové extrakty byly rozpuštěny v cca 100ml 2 % HCl za pomoci ultrazvukové lázně SONOREX a sonifikovány při normální teplotě a stupni 10 po dobu 5 minut. Zakalená tekutina byla vakuově zfiltrována přes malý tubus s nízkou vrstvou neutrální křemeliny. Čirý filtrát byl zředěn 40-50 ml destilovanou vodou a byl 2× výtřepán s 1/4 svého objemu předestilovaným n-hexanem, tím byly odstraněny nežádoucí nečistoty. Do vodné kyselá vrstvy bylo přidáno malé množství EtOAc a poté zalkalizováno 10 % roztokem Na₂CO₃ na pH 9-10. Zalkalizovaný roztok byl výtřepán 3× ¼ svého objemu předestilovaným EtOAc. Spojené EtOAc výtřepky byly v zabroušené baňce smíchány a protřepány s malým množstvím (2-5g) bezvodého Na₂SO₄ až do vyčeření kapaliny, čímž byl roztok zbaven vody. Alkaloidní roztok byl nakonec zfiltrován přes filtrační papír do předem zvážené baňky a do sucha odpařen na vakuové odparce.

U vzorků, kde byla prokázána přítomnost alkaloidů pomocí kontrolní TLC byl jejich odparek zvážen, rozpuštěn v malém množství EtOAc a rozplněn do 2-3 zvážených injekčních ampulek tak, aby v prvních dvou ampulkách bylo 10-12mg v každé ampulce a ve 3. ampulce zbytek výtřepku. Rozpouštědlo bylo odstraněno z ampulek na jehle v proudu vzduchu. Označené ampulky byly dosušeny ve vakuovém exsikátoru nad perlami silikagelu a nakonec zváženy.

8.6 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů vůči AChE a BuChE

8.6.1 Chemikálie

Acetylthiocholin jodid p.a., (ATChI), (Sigma Aldrich s.r.o.)

Butyrylthiocholin jodid p.a., (BuTChI), (Sigma Aldrich s.r.o.)

Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p.a., (KH₂PO₄), (Lach-Ner, Neratovice)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a., (NaH₂PO₄), (ing. Švec –Penta, Praha)

Dimethylsulfoxid p.a., (DMSO), (Sigma Aldrich, Německo)

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98%, (DTNB), (Sigma Aldrich, Praha)

Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p.a., (NaH₂PO₄), (ing. Švec – Penta. Praha)

Galanthamin hydrobromid 95% (Changsha Organic Herb Inc., China)

Huperzin A 95% (TAZHONGHUI – Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Fysostigmin (eserin) (Sigma Aldrich s.r.o.)

8.6.2 Činidla

Roztok 5 mM DTNB

Roztok 10 mM ATChI

Roztok 10 mM BuTChI

8.6.3 Tlumivé roztoky (pufry)

100 mM fosfátový pufr (pH 7,4)

8.6.4 Přístrojové vybavení a použité programy

Reader SynergyTM HT Multi. Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

Třepačka VWR standard analog shaker 1000 (VWR, Radnor, Pensylvánie, USA)

Program pro vyhodnocení statistických dat GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

8.6.5 Rekombinantní enzymy

Enzymy použité pro změření biologické aktivity jednotlivých sumárních extraktů byly připravovány rekombinantní technologií na Katedře chemie, Přírodovědné fakulty Univerzity

Hradec Králové. Používá se médium obsahující enzymy, které se v čas potřeby naředí 100 mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 tak, aby hodnota absorbance byla pro AChE 0,08–0,15 a pro BuChE 0,15–0,20. Médium je rozpipetováno do Eppendorf zkumavek. Následně je médium zamrazeno a uchováváno v mrazícím boxu při teplotě -22 °C do doby použití.

8.7 Stanovení inhibičních aktivit

8.7.1 Stanovení inhibiční aktivity enzymů

Ke stanovení vlastní inhibiční aktivity jednotlivých enzymů Ellmanovou spektrofotometrickou metodou bylo do 6 jamek mikrotitrační destičky napipetováno 8,3 μ l média a přidáno 283 μ l 5 mM DTNB a 8,3 μ l DMSO. Vše bylo po dobu jedné minuty promícháváno na mikrotřepačce a poté byla směs inkubována v komoře readeru při teplotě 37 °C po dobu 5 minut. Po této inkubaci bylo přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu. Po uplynutí dvou minut byla při vlnové délce 412 nm proměřena absorbance výsledného produktu. V průběhu analýzy byl sledován nárůst absorbance za jednu minutu.

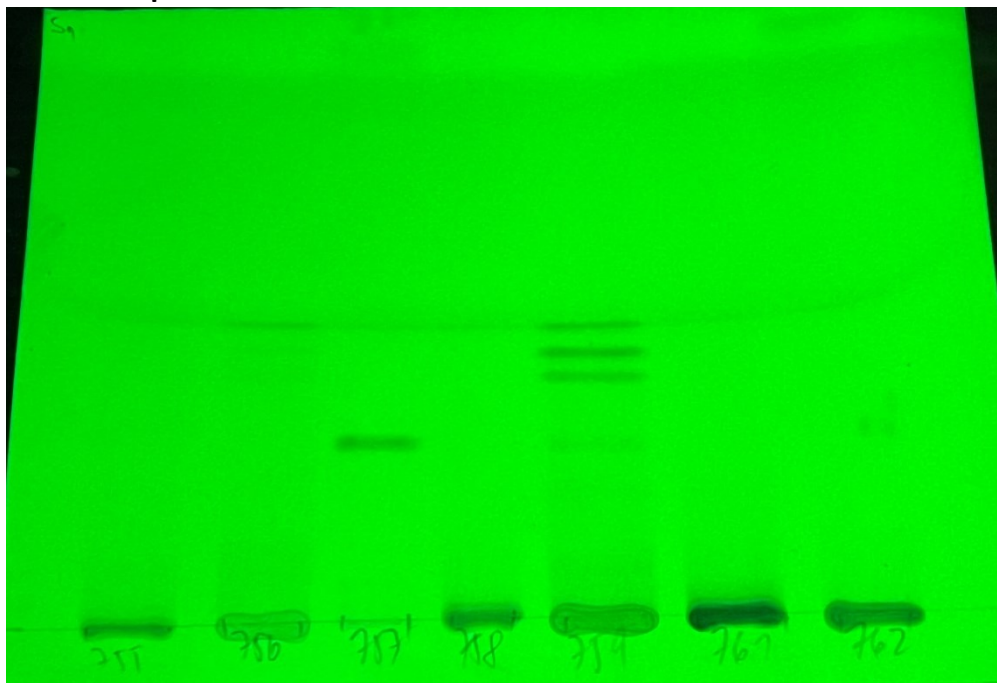
8.7.2 Stanovení inhibiční aktivity extraktů

Stanovení inhibiční aktivity extraktů bylo provedeno téměř stejným způsobem, který je použit pro stanovení inhibiční aktivity enzymu, jen s tím rozdílem, že místo čistého DMSO se přidává roztok vzorku v DMSO. Nejprve se provádí screeningové měření, kdy se všechny extrakty měří při koncentraci 50 μ g/ml. U extraktů, které vykazovaly při této koncentraci inhibiční potenciál vyšší než 60 %, je dále stanovena hodnota IC₅₀. Shodný je rovněž způsob měření. Jediným rozdílem je, že místo 8,3 μ l DMSO se pipetuje roztok extraktu o příslušné koncentraci. Pro každou koncentraci bylo použito 6 jamek (1 řada) a do poslední řady byl pipetován DMSO namísto měřeného extraktu, který slouží jako slepý vzorek.

8.8 Výsledky

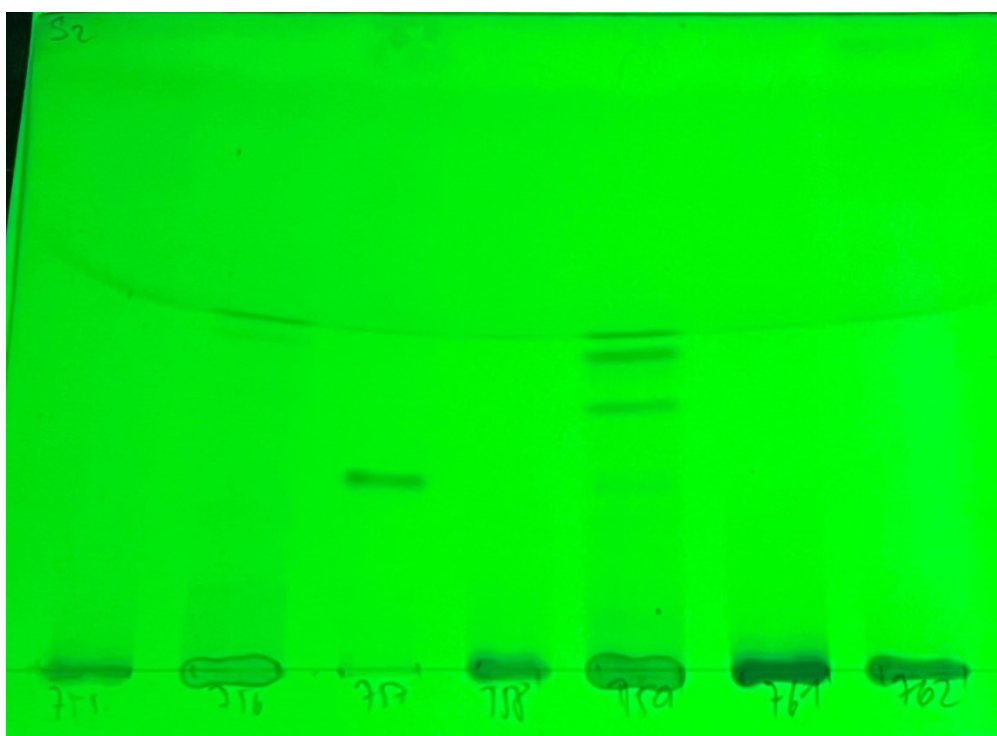
8.8.1 Přehled chromatogramů jednotlivých sumárních extraktů

8.8.1.1 Detekce pod UV o $\lambda = 254$ nm



AL 755 756 757 758 759 761 762

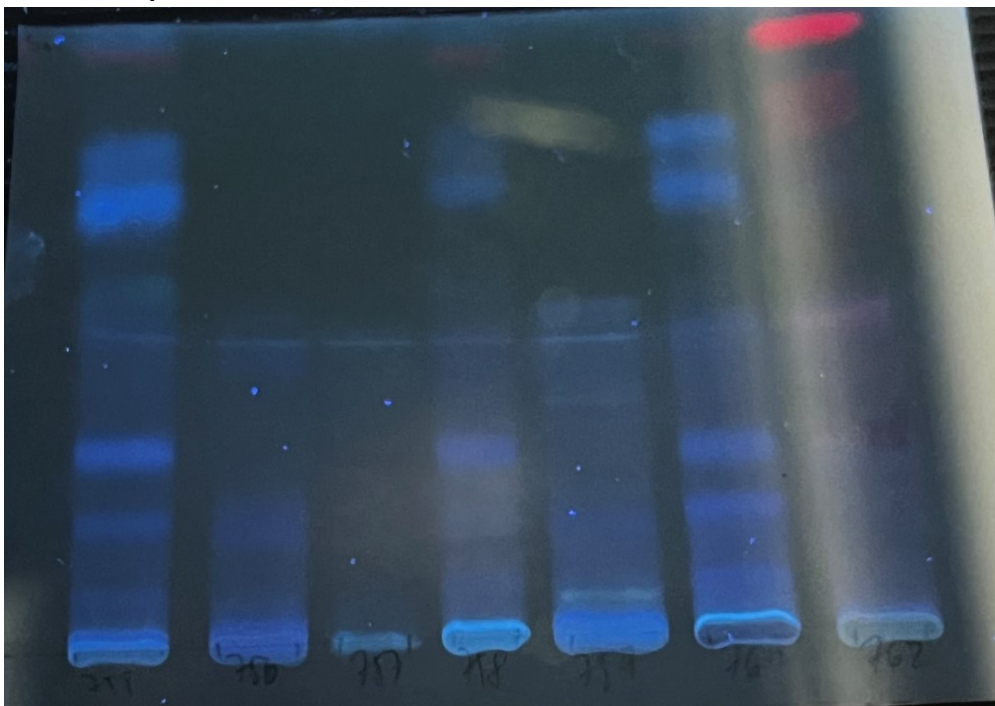
Obrázek 13 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D1: UV záření o $\lambda = 254$ nm



AL 755 756 757 758 759 761 762

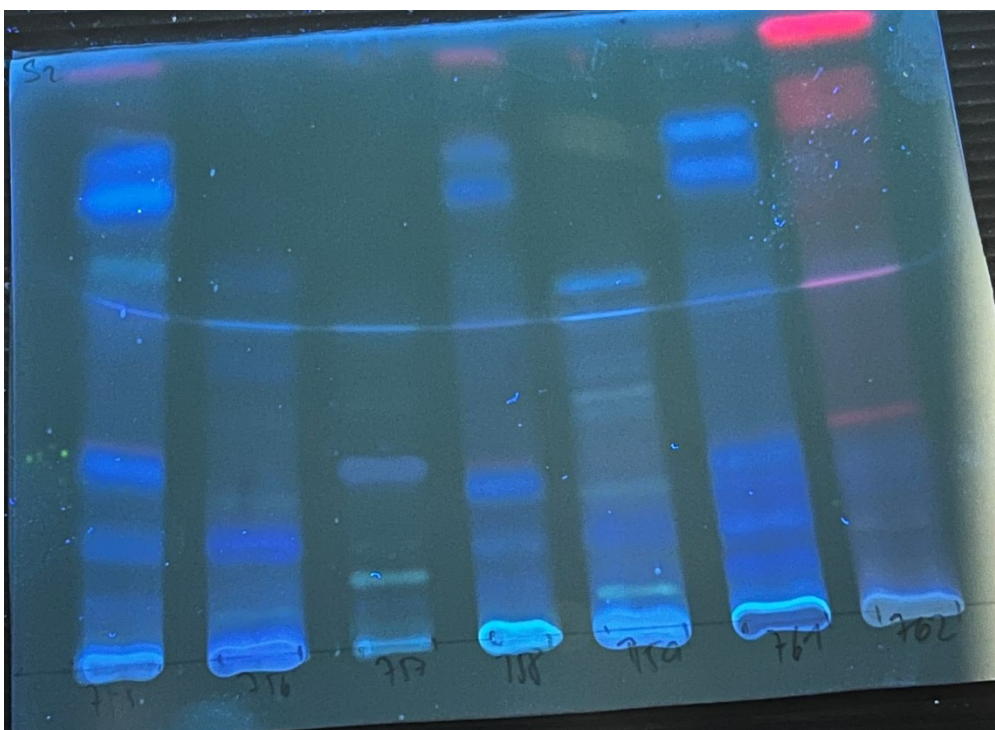
Obrázek 14 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D1: UV záření o $\lambda = 254$ nm

8.8.1.2 Detekce pod UV o $\lambda = 366$ nm



AL 755 756 757 758 759 761 762

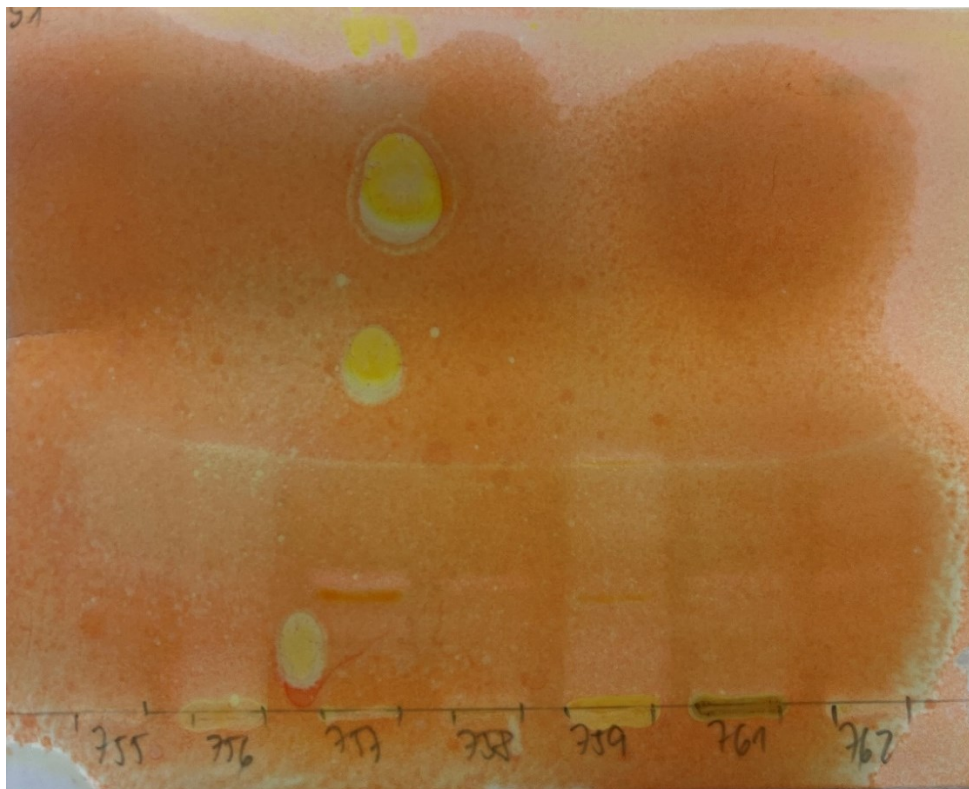
Obrázek 15 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D2: UV záření o $\lambda = 366$ nm



AL 755 756 757 758 759 761 762

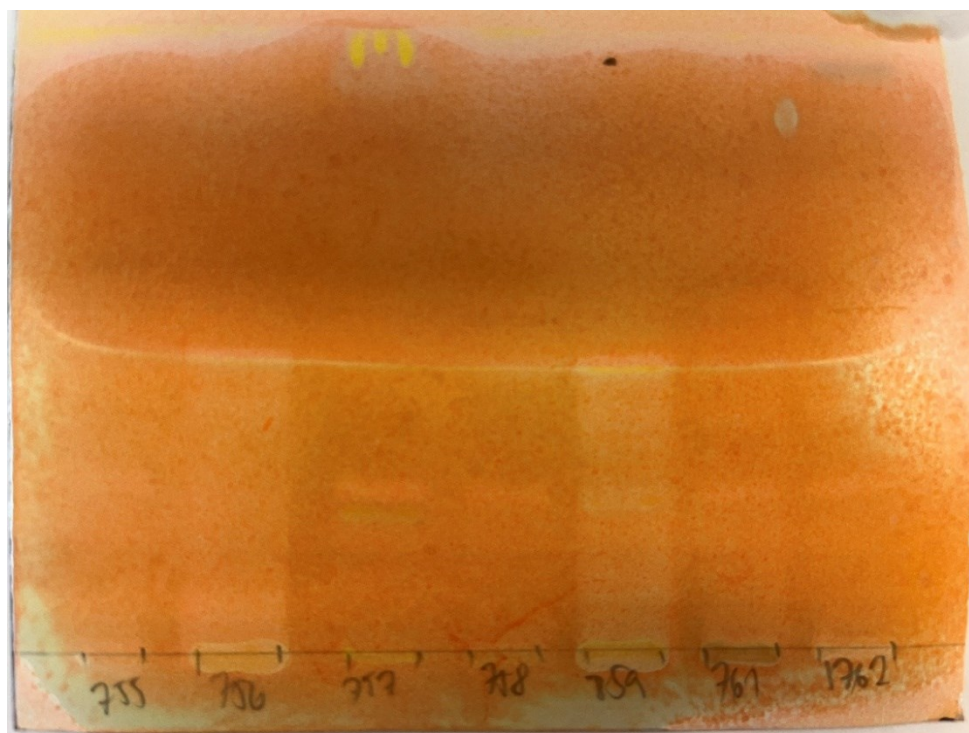
Obrázek 16 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D2: UV záření o $\lambda = 366$ nm

8.8.1.3 Detekce alkaloidů



AL 755 756 757 758 759 761 762

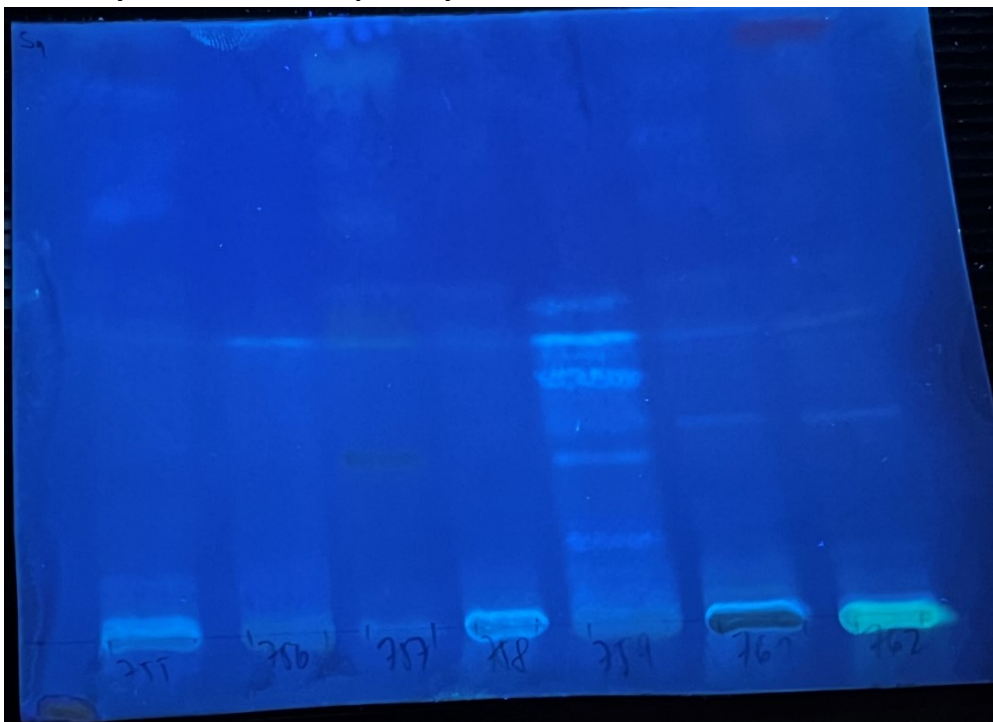
Obrázek 17 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D3: Dragendorffovo činidlo



AL 755 756 757 758 759 761 762

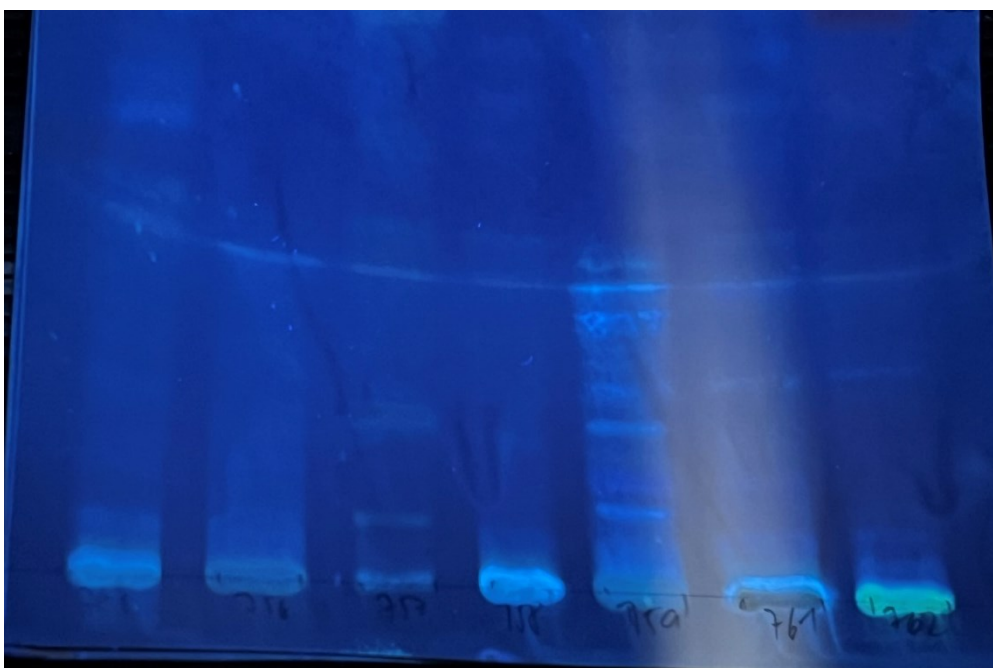
Obrázek 18 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D3: Dragendorffovo činidlo

8.8.1.4 Důkazy steroidních a terpenických látek



AL 755 756 757 758 759 761 762

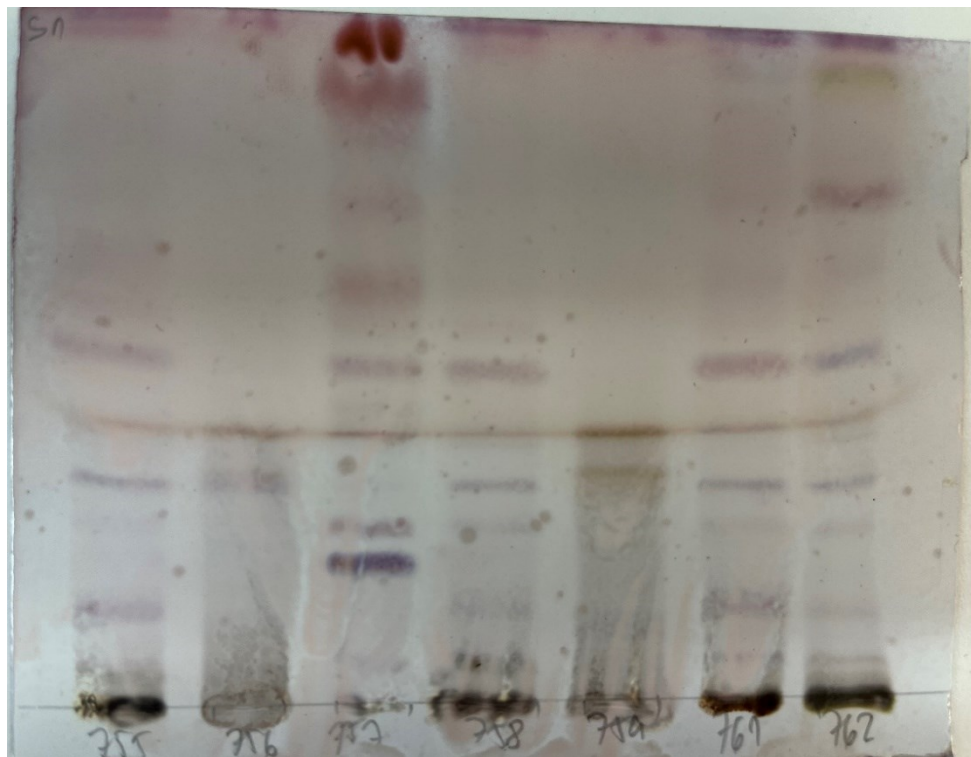
Obrázek 19 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D4: Liebermann-Buchardovo činidlo



AL 755 756 757 758 759 761 762

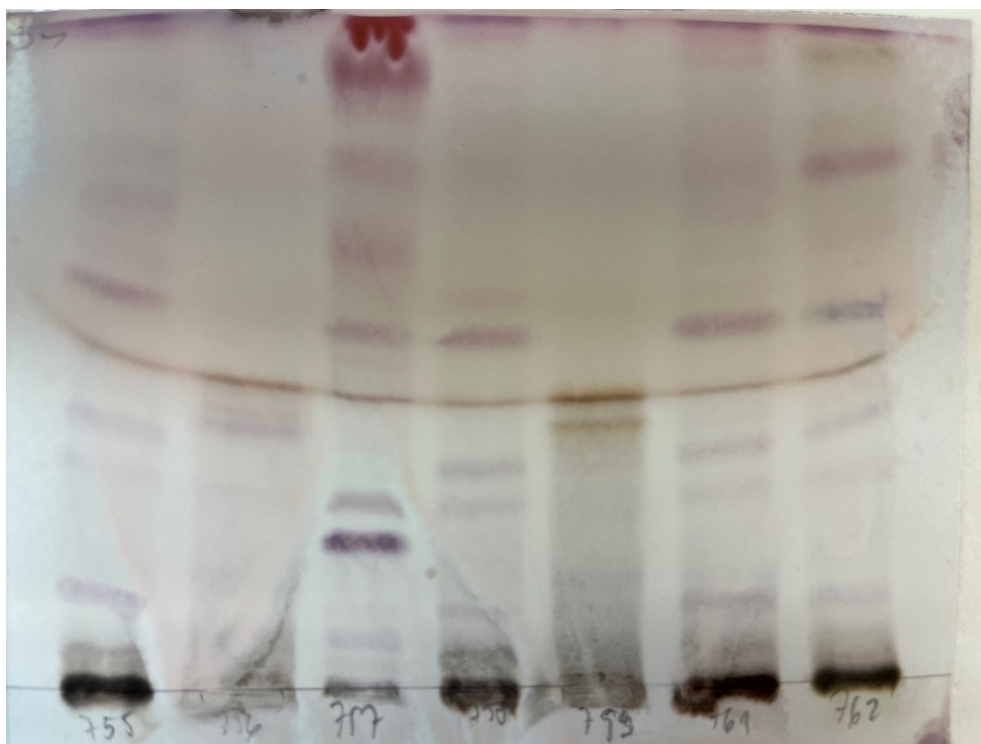
Obrázek 20 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D4: Liebermann-Buchardovo činidlo

8.8.1.5 Důkaz steroidních látek



AL 755 756 757 758 759 761 762

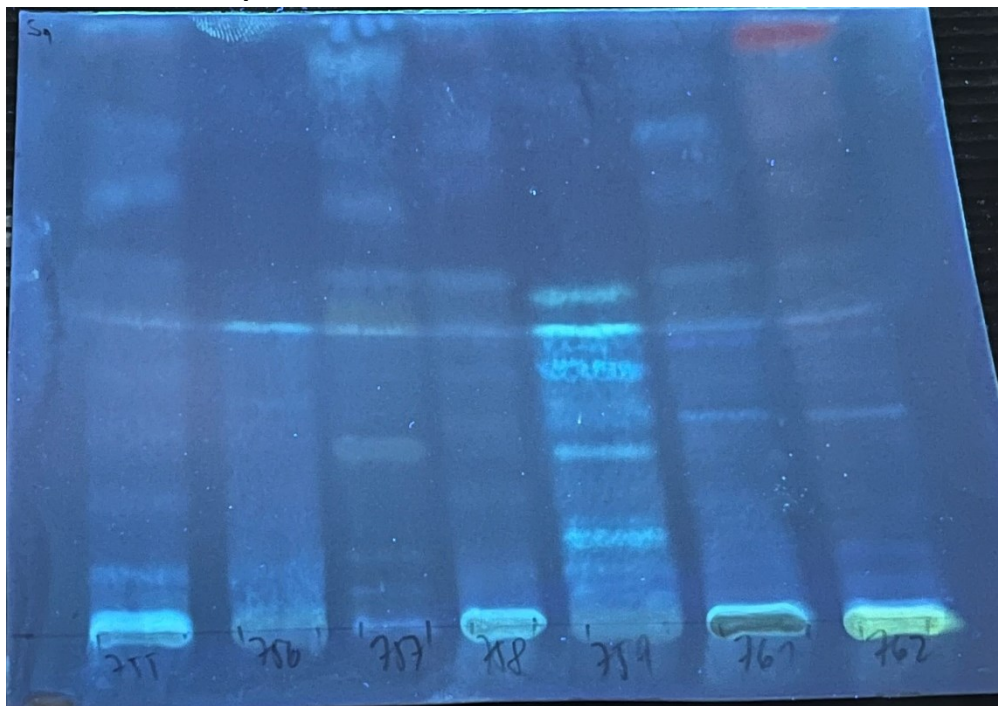
Obrázek 21 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D5: Činidlo s kyselinou fosforečnou a vanilinem



AL 755 756 757 758 759 761 762

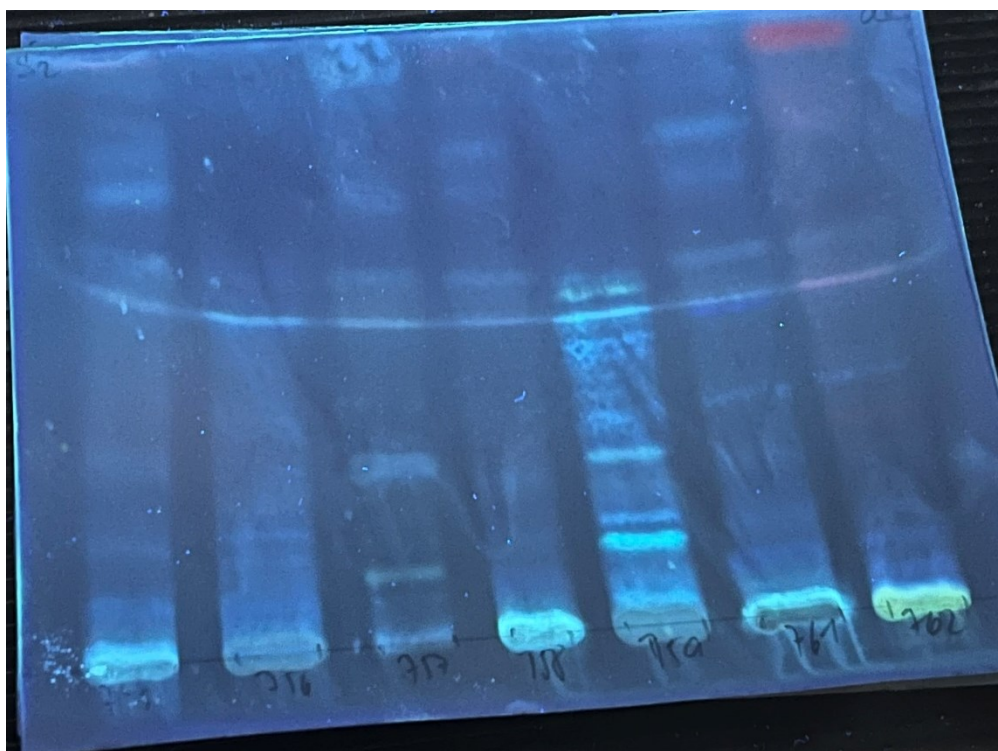
Obrázek 22 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D5: Činidlo s kyselinou fosforečnou a vanilinem

8.8.1.6 Důkaz seskviterpenů a flavonoidů



AL 755 756 757 758 759 761 762

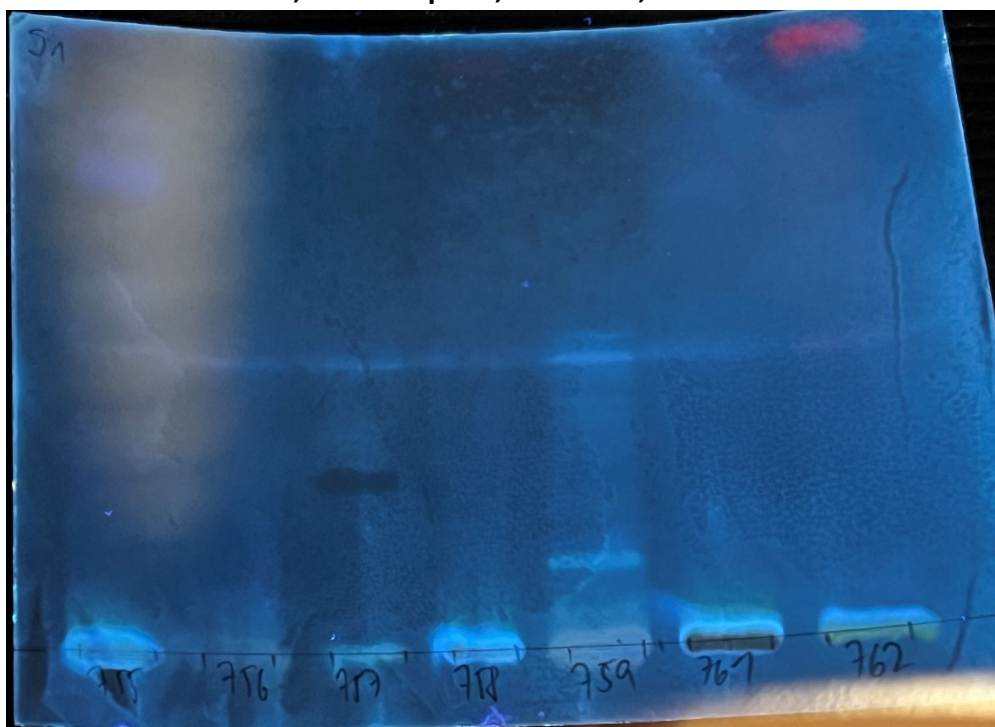
Obrázek 23 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D6: Chlorid hlinitý



AL 755 756 757 758 759 761 762

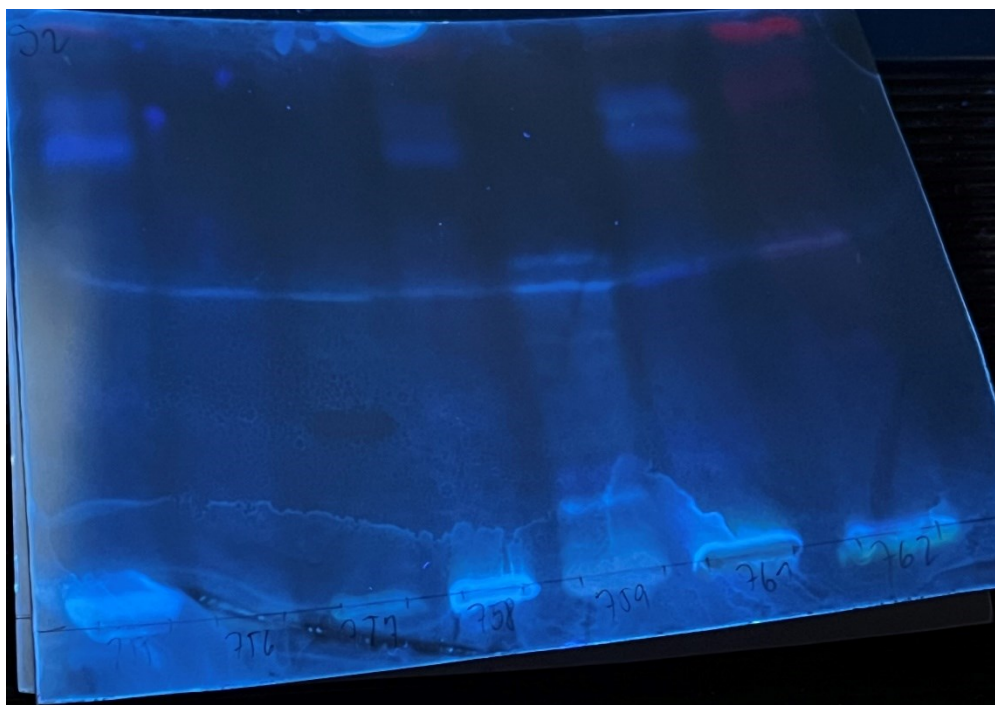
Obrázek 24 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D6: Chlorid hlinitý

8.8.1.7 Detekce flavonoidů, seskviterpenů, kumarinů, anthronů a anthranolů



AL 755 756 757 758 759 761 762

Obrázek 25 - S1 vyvíjecí soustava pro TLC a D7: 2-Aminoethyldifenylborinát – PEG



AL 755 756 757 758 759 761 762

Obrázek 26 - S2 vyvíjecí soustava pro TLC a D7: 2-Aminoethyldifenylborinát – PEG

8.8.2 Vyhodnocení chromatogramů

8.8.2.1 D1: Detekce pod UV o $\lambda = 254$ nm

Vyvíjecí soustava pro TLC	AL-755	AL-756	AL-757	AL-758	AL-759	AL-761	AL-762
S1	+	+	+	+	+(4)	+	+
S2	+	+	+	+	+(4)	+	+

Vysvětlivky: + = přítomnost sekundárního metabolitu a počet zaznamenaných skvrn na chromatogramu, - = nepřítomnost sekundárních metabolitů

Tabulka 19 - D1: Detekce pod UV o $\lambda = 254$ nm

8.8.2.2 D2: Detekce pod UV o $\lambda = 366$ nm

Vyvíjecí soustava pro TLC	AL-755	AL-756	AL-757	AL-758	AL-759	AL-761	AL-762
S1	+(5)	+(2)	+	+(5)	+	+(6)	+(4)
S2	+(7)	+(2)	+(3)	+(6)	+(5)	+(6)	+(4)

Vysvětlivky: + = přítomnost sekundárního metabolitu a počet zaznamenaných skvrn na chromatogramu, - = nepřítomnost sekundárních metabolitů

Tabulka 20 – D2: Detekce pod UV o $\lambda = 366$ nm

8.8.2.3 D3: Důkaz alkaloidů – Dragendorffovo činidlo

Vyvíjecí soustava pro TLC	AL-755	AL-756	AL-757	AL-758	AL-759	AL-761	AL-762
S1	-	+	+(5)	-	+	-	-
S2	-	+	+(2)	-	+	-	-

Vysvětlivky: + = přítomnost sekundárního metabolitu a počet zaznamenaných skvrn na chromatogramu, - = nepřítomnost sekundárních metabolitů

Tabulka 21 - D3: Důkaz alkaloidů – Dragendorffovo činidlo

8.8.2.4 D4: Důkaz steroidů a terpenů – Liebermann-Buchardovo činidlo

Vyvíjecí soustava pro TLC	AL-755	AL-756	AL-757	AL-758	AL-759	AL-761	AL-762
S1	+	-	-	+	+(5)	+(2)	+(2)
S2	+	+	+(2)	+	+(6)	+(2)	+(2)

Vysvětlivky: + = přítomnost sekundárního metabolitu a počet zaznamenaných skvrn na chromatogramu, - = nepřítomnost sekundárních metabolitů

Tabulka 22 - D4: Důkaz steroidů a terpenů – Liebermann-Buchardovo činidlo

8.8.2.5 D5: Důkaz steroidních látek – Činidlo s kyselinou fosforečnou a vanilinem

Vyvíjecí soustava pro TLC	AL-755	AL-756	AL-757	AL-758	AL-759	AL-761	AL-762
S1	+ (7)	+ (3)	+ (7)	+ (7)	+ (4)	+ (7)	+ (9)
S2	+ (6)	+ (2)	+ (8)	+ (5)	+ (3)	+ (7)	+ (7)

Vysvětlivky: + = přítomnost sekundárního metabolitu a počet zaznamenaných skvrn na chromatogramu,
- = nepřítomnost sekundárních metabolitů

Tabulka 23 - D5: Důkaz steroidních látek – Činidlo s kyselinou fosforečnou a vanilinem

8.8.2.6 D6: Důkaz seskviterpenů a flavonoidů – Chlorid hlinitý

Vyvíjecí soustava pro TLC	AL-755	AL-756	AL-757	AL-758	AL-759	AL-761	AL-762
S1	+ (2)	+	-	+	+ (5)	+	+
S2	+	+	+	+	+ (6)	+	+

Vysvětlivky: + = přítomnost sekundárního metabolitu a počet zaznamenaných skvrn na chromatogramu,
- = nepřítomnost sekundárních metabolitů

Tabulka 24 - D6: Důkaz seskviterpenů a flavonoidů – Chlorid hlinitý

8.8.2.7 D7: Důkaz flavonoidů, kumarinů, anthronů a anthranolů – 2-aminoethyldifenylborinát - PEG

Vyvíjecí soustava pro TLC	AL-755	AL-756	AL-757	AL-758	AL-759	AL-761	AL-762
S1	+	-	+	+	+ (3)	+	+ (2)
S2	+ (3)	-	+	+ (3)	+ (5)	+ (3)	+ (3)

Vysvětlivky: + = přítomnost sekundárního metabolitu a počet zaznamenaných skvrn na chromatogramu,
- = nepřítomnost sekundárních metabolitů

Tabulka 25 - D7: Důkaz flavonoidů, kumarinů, anthronů a anthranolů – 2-aminoethyldifenylborinát - PEG

8.8.3 Inhibiční aktivita sumárních ethanolových extraktů vůči AChE a BuChE

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky měření inhibiční aktivity vůči rekombinantním enzymům. U rostlinných extraktů, které během screeningu při koncentraci 50 μ g/ml vykazovaly aktivitu více než 60 % byla změřena hodnota IC₅₀.

Označení vzorku	% inhibice AChE (50 μ g/ml)	IC ₅₀ AChE μ g/ml	% inhibice BuChE (50 μ g/ml)	IC ₅₀ BuChE μ g/ml
AL-755	36,57 \pm 0,45	>100	10,13 \pm 1,44	>100
AL-756	18,11 \pm 0,80	>100	25,30 \pm 2,36	>100
AL-757	4,09 \pm 0,22	>100	2,81 \pm 1,28	>100
AL-758	40,26 \pm 0,64	>100	22,14 \pm 0,92	>100
AL-759	34,18 \pm 0,52	>100	14,25 \pm 1,38	>100
AL-761	15,36 \pm 0,89	>100	22,36 \pm 2,45	>100
AL-762	9,48 \pm 1,86	>100	6,37 \pm 2,54	>100
Galanthamin st	-	2,01 \pm 0,14	-	33,69 \pm 2,66
Huperzin A st	-	0,04 \pm 0,01	-	-
Fysostigmin st	-	0,20 \pm 0,01	-	0,30 \pm 0,01

Vysvětlivka: st = standard

Tabulka 26 - Inhibiční aktivita sumárních ethanolových extraktů vůči AChE a BuChE

9 Diskuse a Závěr

Rostliny rodu *Kalanchoe* jsou známy obsahem flavonoidů, bufadienolidů, fenolových kyselin, saponinů, anthokyanů, kumarinů, triterpenů, alkaloidů, sterolů a dalších látek. Nejvíce studovaným druhem tohoto rodu je *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., ostatní druhy z tohoto rodu jsou opomíjeny a zanedbávány. Cílem této diplomové práce byl fytochemický screening biologické aktivity různých rostlinných částí se zaměřením na aromatické a alkaloidní sekundární metabolity čtyř druhů rodu *Kalanchoe*: *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh., *Kalanchoe fedtschenkoi* Raym.-Hamet & H.Perrier, *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. a *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier. Připravené sumární EtOH extrakty byly podrobeny důkazovým reakcím na TLC.

Základní detekcí, která byla použita byla detekce pod UV různých vlnových délek. Na základě hodnocení pod vlnovou délkou UV 254 nm došlo ke zhášení záření u vzorků AL 756, 757 a 759, na základě těchto výsledků lze predikovat přítomnost sloučenin obsahujících dvojnou vazbu a zhášejších přítomný indikátor na TLC desce. Fluorescence objevující se při vlnové délce UV 366 nm je důkazem aromatických sloučenin přítomných v extraktu. Mezi sekundární metabolity, které fluoreskují pod UV o $\lambda = 366$ nm, patří např. flavonoidy, kumariny, fenolické kyseliny. Právě přítomnost flavonoidních látek byla i prokázána v rámci různých fytochemických studií. Dalšími látkami, které byly v rámci výzkumných prací dokázány byly bufadienolidy a látky steroidního charakteru, které však nejsou vidět pod UV 254 a 366 nebo tvoří slabě fluoreskující skvrny.

Další zvolenou metodou detekce bylo použití Dragendorffova činidla, které slouží k detekci alkaloidních látek. V rámci některých studií byla uváděna přítomnost fenathrenových alkaloidů. Prokázání nebo naopak vyvrácení této skutečnosti byl jedním z cílů této práce. Vznik oranžové skvrny, které mohou signalizovat přítomnost látek obsahujících dusík, po detekci Dragendorffovým činidlem se objevil u třech rostlinných extraktů: *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (AL-756 – extrakt z květů a natí), *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier (AL-757 – extrakt z květů a natí) a *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh. (AL-759 - extrakt z květů).

Ostatní zvolená činidla byla volena, tak aby se prokázala přítomnost bufadienolidů, pro které neexistuje žádné konkrétní derivatizační činidlo, a dalších aromatických látek. Použitím Liebermann-Buchardova činidla a UV o $\lambda = 366$ nm byla při pozitivní reakci prokázána přítomnost steroidních a terpenických látek. S nejvyšší intenzitou fluoreskující skvrny byly zaznamenány (seřazeny sestupně) u extraktu z květů a natí *Kalanchoe fedtschenkoi* Raym.-Hamet. & H.Perrier (AL-762), dále u extraktu z kořene *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier (AL-758), u extraktu z kořene *Kalanchoe fedtschenkoi* Raym.-Hamet. & H.Perrier (AL-761) a u extraktu z kořene *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (AL-755). Nejvyšším počtem zaznamenaných fluoreskujících skvrn na dráze bylo zaregistrováno u extraktu z květů *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh (AL-759). Obsah steroidů a terpenů nebyl tímto činidlem potvrzen u extraktu z květů a natí *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (AL-756) a extraktu z květů a natí *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier (AL-757). Tato zjištění neodpovídají zjištění z literatury, která naopak uvádí nejvyšší obsah bufadienolidů v květech.

Liebermann-Buchardovo činidlo vykazuje pozitivní reakci také v přítomnosti terpenických látek, rod *Kalanchoe* z terpenických látek obsahuje dle literatury triterpeny. Na základě těchto zjištění byla použita další činidla, která pomohla v odlišení steroidních struktur od terpenických, flavonoidních a dalších aromatických látek.

Obsah seskviterpenů a flavonoidů byl potvrzen při užití D6 – chloridu hlinitého u rostlinného extraktu z květů, natí a kořenů *Kalanchoe fedtschenkoii* Raym.-Hamet. & H.Perrier (AL-761, AL-762). Žluto-zelené fluorescence s potvrzením výskytu seskviterpenů byl zaznamenán u rostlinných extraktů z květů *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh. (AL-759), rostlinného extraktu z kořene *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier (AL-758) a rostlinného extraktu z kořene *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (AL-755). Žádnou nebo slabou fluorescenci vykazoval rostlinný extrakt z květů a natí *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (AL-756) a rostlinný extrakt z květu a natí *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier (AL-757). Výše zmíněná zjištění jsou v souladu s literaturou, která přítomnost flavonoidních látek v extraktech z rodu *Kalanchoe* popisuje. V žádné dosud publikované literatuře není zmíněn obsah seskviterpenů v rostlinách rodu *Kalanchoe*.

Po postřiku detekčním činidlem s 2-aminoethyl-difenylborinát-PEG 4000 a následnou detekcí pod UV o $\lambda = 366$ nm a byl potvrzen obsah flavonoidů a kumarinů u rostlinného extraktu z květů, natí a kořenů *Kalanchoe fedtschenkoii* Raym.-Hamet. & H.Perrier (AL-761, AL-762). Dále byla prokázána přítomnost flavonoidů u rostlinných extraktů z květů a natí *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier (AL-757), u rostlinného extraktu z květů *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh. (AL-759) a u rostlinného extraktu z kořenů *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (AL-755). Modrá fluorescence, která je charakteristická pro kumariny se vyskytovala u extraktu z kořenů *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier (AL-758) a extraktu z kořenů *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (AL-755). Výskyt flavonoidů a kumarinů bylo v souladu s literaturou. Flavonoidy v rostlinách rodu *Kalanchoe* vykazují antimikrobní, protizánětlivé, antioxidační, cytotoxické a další účinky. Rostlinný extrakt z květů a natí *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. na rozdíl od kořenů nevykazoval žádnou fluorescenci.

U všech rostlinných extraktů ze čtyř testovaných rostlin na startu i po celé dráze vykazují steroidní látky s detekčním činidlem obsahující kyselinu fosforečnou a vanilin. Při porovnání jednotlivých rostlinných částí v rámci jedné rostliny ale i mezi druhy dochází v některých případech k výrazným rozdílům v rámci složení extraktů. Nejslabší intenzita skvrn byla zaznamenána u rostlinného extraktu z květů a natí *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (AL-756), který v porovnání s kořenem vykazuje méně steroidních látek. Dalším extraktem chudým na přítomnost steroidních struktur byl extrakt z květů *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh. (AL-759). Steroidní látky u rodu *Kalanchoe* zastupují hlavně bufadienolidy a steroly. Zajímavé výsledky přinesl rostlinný extrakt z celé rostliny *Kalanchoe fedtschenkoii* Raym.-Hamet. & H.Perrier (AL-761, AL-762) a *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet. & H.Perrier s nejvyšším počtem skvrn na dráze, který potvrdil přítomnost steroidních látek. V obou dvou případech se potvrdila zjištění z literatury o výskytu bufadienolidů především v nadzemních částech rostlin. Hlavní obsahové látky *Kalanchoe fedtschenkoii* Raym.-Hamet. & H.Perrier jsou

flavonoidy a fenolické sloučeniny, konkrétní typ steroidních látek nebyl dosud zmíněn, ale dle zjištění, můžeme předpokládat přítomnost bufadienolidů.

EtOH sumární extrakty byly také použity ke stanovení cholinesterásové inhibiční aktivity. V porovnání s referenčními látkami galanthaminem, fysostigminem a huperzinem A nepřinesly extrakty uspokojivé výsledky, jejich inhibiční aktivita nepřesahovala 60 % a proto nebyla stanovena hodnota IC_{50} . Kromě alkaloidů mohou být za cholinesterásovou inhibiční aktivitu taktéž zodpovědné flavonoidy a bufadienolidy, které byly publikovány v odborném článku⁶⁷ a potvrzeny u tří rostlin rodu *Kalanchoe*: *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth, *Kalanchoe gastonis-bornieri* Raym-Hamet et Perrier a *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. V rámci naší studie však tato aktivita nebyla potvrzena.

Jednotlivé zkoumané druhy nebyly doposud fytochemicky významně zpracované, proto by bylo zajímavé se této problematice dále věnovat a zaměřit se i na další biologické aktivity, jako je například cytotoxická aktivita, která je u přítomných metabolitů v některých případech zmiňována. Jako nejvhodnější druh pro fytochemické práce se jeví *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier z podrobených důkazových reakcí obsahuje alkaloidy, steroidní látky, flavonoidy, triterpeny a kumariny. O této rostlině nebyla doposud publikována žádná literatura ohledně její biologické aktivity. Pro svůj bohatý zdroj obsahových látek je vhodná pro další analýzy.

10 Abstrakt

Mai T. T.: Screening biologické aktivity různých druhů rostlin z rodu *Kalanchoe*. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2023.

Náplní této diplomové práce byl screening biologické aktivity sušených květů, natí a kořenů čtyř druhů rostlin rodu *Kalanchoe*: *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh., *Kalanchoe fedtschenkoi* Raym.-Hamet & H.Perrier, *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. a *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier. Vyvařením sušených částí rostlin s ethanolem byly získány ethanolové sumární extrakty, které byly podrobeny kontrolnímu TLC na detekci přítomnosti alkaloidů za pomoci Dragendorffova činidla. Přítomnost alkaloidů se potvrdila u druhů *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln., *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier, *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh. Dále byly podrobeny důkazovým reakcím k identifikaci obsahových látek na TLC. V porovnání s literaturou byla potvrzena přítomnost flavonoidů, steroidních látek, kumarinů, triterpenů a alkaloidů u většiny rostlinných extraktů. Zanedbatelné výsledky přinesly rostlinné extrakty *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. (AL-756 – extrakt z květů a natí) a *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym. - Hamet & H.Perrier (AL-757 – extrakt z květů a natí) při detekci s činidly: chlorid hlinitý a 2- aminoethyl-difenylborinát – PEG.

Při stanovení inhibiční aktivity vůči cholinesterásám podle Ellmanovy metody byly ethanolové sumární extrakty vybraných rostlin neaktivní v porovnání se standardy. Jako referenční látky pro porovnání inhibičních aktivit extraktů vůči AChE a BuChE byly použity galanthamin, huperzin A a fysostigmin. Kromě alkaloidů mohou být za cholinesterásovou inhibiční aktivitu také zodpovědné flavonoidy, které byly publikovány v odborném článku a potvrzeny u tří rostlin rodu *Kalanchoe*: *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth, *Kalanchoe gastonis-bornieri* Raym-Hamet et Perrier a *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

Klíčové slova: *Kalanchoe* – kořeny – nať – alkaloidní extrakty – GC/MS analýza – biologická aktivita - acetylcholinesterasa – butyrylcholinesterasa

11 Abstract

Mai T. T.: Screening of biological activity of various species of the genus *Kalanchoe*, Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical botany, Hradec Králové 2023.

The content of this diploma thesis was the screening of the biological activity of dried flowers, stems and roots of four species from plants of the genus *Kalanchoe*: *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh., *Kalanchoe fedschenkoi* Raym.-Hamet & H.Perrier, *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. and *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier. By boiling the dried parts of the plants with ethanol, the summary ethanolic extracts were obtained, which were subjected to control TLC to detect the presence of alkaloids using Dragendorff's reagent. The presence of alkaloids was confirmed in the species *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln, *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier and *Kalanchoe delagoensis* Eckl. & Zeyh. Furthermore, they were subjected to evidence reactions to identify the substances contained on TLC. In comparison with the literature, the presence of flavonoids, steroids substances, coumarins, triterpenes and alkaloids was confirmed in most plant extracts. Plants extracts of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln (AL-756 – extract from flowers and stems) and *Kalanchoe manginii* 'Wendy' Raym.-Hamet & H.Perrier (AL-757 – extract from flowers and stems) produced negligible results with detection reagents: aluminum chloride and 2-aminoethyldiphenylborinate-PEG.

The ethanolic summary extracts of selected plants were inactive in the cholinesterases inhibitory assays using Ellman's method compared to the standards. Galantamine, huperzine A and physostigmine were used as reference substances for comparing the inhibitory activities of the extracts against AChE and BuChE.

In addition to alkaloids, flavonoids may also be responsible for cholinesterase inhibitory activity, which were published in research and was confirmed in three plants of the genus *Kalanchoe*: *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth, *Kalanchoe gastonis-bornieri* Raym-Hamet et Perrier and *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

Key words: *Kalanchoe* - roots – aerial parts - alkaloidal extracts - GC/MS analysis - biological activity - acetylcholinesterase – butyrylcholinesterase

12 Použitá literatura

(1) Lozano-Milo E., García-Pérez P., Gallego P. P.: Narrative review of production of antioxidants and anticancer compounds from *Bryophyllum* spp.(*Kalanchoe*) using plant cell tissue culture. *Longhua Chin. Med* 2020, 3, 1-11.

(2) Jahodář L.: *Farmaceuticky významné semenné rostliny*; Charles University in Prague, Karolinum Press, 2022.

(3) Kolodziejczyk-Czepas J., Stochmal A.: Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. *Phytochem Rev* 2017, 16 (6), 1155-1171. DOI: 10.1007/s11101-017-9525-1 From NLM.

(4) Zoya A.-B.: *Kalanchoe*. *Cactus and Succulent Journal* 2009, 81 (6), 268-276. DOI: 10.2985/015.081.0601.

(5) Nascimento L., Casanova L. M., Costa S. S.: Bioactive Compounds from *Kalanchoe* Genus Potentially Useful for the Development of New Drugs. *Life (Basel)* 2023, 13 (3). DOI: 10.3390/life13030646 From NLM.

(6) Koutská B.: *Ekologická role sekundárních metabolitů druhů z čeledi Asteraceae*. Univerzita Karlova v Praze, 2015.

(7) Cahlíková L.: *Biogeneze přírodních látek, Fenolické látky, Přírodní látky odvozené od kyseliny šikimátové*. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, 2023.

(8) Grulich V.: *CRASSULACEAE J. St.-Hil. - tlusticovité/tučnolistovité*. 2013. <https://botany.cz/cs/crassulaceae/> (staženo 8.1.2023)

(9) Thiede J., Egli U.: *Crassulaceae*. In *Flowering Plants· Eudicots*, Springer, 2007; pp 83-118.

(10) Milad R., El-Ahmady S., Singab A. N.: Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): a review of its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties. *European Journal of Medicinal Plants* 2014, 4 (1), 86.

- (11) Eid O., Gonaid M.: Crassulaceae (chemistry and pharmacology)-A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018, 4 (2), 234-240.
- (12) Vargas A., Herrera I., Nualart N., Guézou A., Gómez-Bellver C., Freire E., Jaramillo Díaz P., López-Pujol J.: The Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae) in Ecuador: From Gardens to the Wild. *Plants (Basel)* 2022, 11 (13). DOI: 10.3390/plants11131746 From NLM.
- (13) Smith G., Volmer P. A.: *Kalanchoe* species poisoning in pets. *VETERINARY MEDICINE-BONNER SPRINGS THEN EDWARDSVILLE*- 2004, 99, 933-936.
- (14) Stefanowicz-Hajduk J., Hering A., Gucwa M., Hałasa R., Soluch A., Kowalczyk M., Stochmal A., Ochocka R.: Biological activities of leaf extracts from selected *Kalanchoe* species and their relationship with bufadienolides content. *Pharm Biol* 2020, 58 (1), 732-740. DOI: 10.1080/13880209.2020.1795208 From NLM.
- (15) Gwaltney-Brant S. M.: Chapter 39 - Christmastime Plants. In *Small Animal Toxicology (Third Edition)*, Peterson M. E., Talcott P. A. Eds.; W.B. Saunders, 2013; pp 499-511.
- (16) [https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Bryophyllum_delagoense_\(Mother-of-millions\).htm](https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Bryophyllum_delagoense_(Mother-of-millions).htm) (staženo 10.1.2023)
- (17) Gulati K., Rai N., Chaudhary S., Ray A.: Chapter 6 - Nutraceuticals in Respiratory Disorders. In *Nutraceuticals*, Gupta R. C. Ed.; Academic Press, 2016; pp 75-86.
- (18) Chernetskyy M.: Problems in nomenclature and systematics in the subfamily *Kalanchoideae* (Crassulaceae) over the years. *Acta Agrobotanica* 2011, 64 (4).
- (19) Rak J.: *Péče o pokojové rostliny 2*; Nakladatelství Slovart, 1997.
- (20) <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id104805/> (staženo 8.5.2023)
- (21) Svobodová V.: *KALANCHOE DELAGOENSIS* Eckl. et Zeyh. - kolopojka. 2011. <https://botany.cz/cs/kalanchoe-delagoensis/> (staženo 10.1.2023)
- (22) Palmer B., Rafter M.: *Bryophyllum delagoense* (Ecklon & Zehner) Schinz, mother-of-millions. *Biological control of weeds in Australia*. CSIRO Publishing, Melbourne 2012, 99-107.

- (23) García-Pérez P., Ayuso M., Lozano-Milo E., Pereira C., Dias M. I., Ivanov M., Calhelha R. C., Soković M., Ferreira I. C. F. R., Barros L., Gallego P. P.: Phenolic profiling and in vitro bioactivities of three medicinal *Bryophyllum* plants. *Industrial Crops and Products* 2021, 162, 113241. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113241>.
- (24) http://www.lifile.com/Encyclopedia/SUCCULENTS/Family/Crassulaceae/14419/Bryophyllum_delagoense (staženo 8.3.2023)
- (25) Svobodová V.: *KALANCHOE FEDTSCHENKOI* Raym.-Hamet et H. Perrier - kolopojka Fedčenkova. 2010. <https://botany.cz/cs/kalanchoe-fedtschenkoi/> (staženo 10.1.2023)
- (26) Richwagen N., Lyles J. T., Dale B. L. F., Quave C. L.: Antibacterial Activity of *Kalanchoe mortagei* and *K. fedtschenkoi* Against ESKAPE Pathogens. *Front Pharmacol* 2019, 10, 67. DOI: 10.3389/fphar.2019.00067 From NLM.
- (27) http://www.lifile.com/Encyclopedia/SUCCULENTS/Family/Crassulaceae/29091/Kalanchoe_fedtschenkoi (staženo 8.3.2023)
- (28) Mendonça F. S., Nascimento N. C. F., Almeida V. M., Braga T. C., Ribeiro D. P., Chaves H. A. S., Silva Filho G. B., Riet-Correa F.: An outbreak of poisoning by *Kalanchoe blossfeldiana* in cattle in northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 2018, 50 (3), 693-696. DOI: 10.1007/s11250-017-1465-7.
- (29) <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/86-kalanchoe-blossfeldiana-kolopejka> (staženo 8.3.2023)
- (30) Strauß F., Waechterová D.: *Nejlepší pokojové rostliny*; Knižní klub, 2005.
- (31) El-Shamy A., Fathy F. I., Abdel-Rahman E. H., Sabry M. M.: Phytochemical, biological and botanical studies of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. *Int J Pharm Photon* 2013, 104, 189-205.
- (32) Manasa G. C., Kumari M. P., Nagesh M., Manohar N.: Evaluation of the phytochemical, antiproliferative, antioxidant, antibacterial activities of *Kalanchoe blossfeldiana* leaves. *World Journal of Pharmaceutical Research* 2015, 4 (12), 1201-1214.

- (33) <https://thegardeningcook.com/wp-content/uploads/2019/01/yellow-kalanchoe.jpg>
(staženo 8.3.2023)
- (34) Huang C.-H., Chu C.-Y.: Inheritance of leaf and flower morphologies in *Kalanchoe* spp. *Euphytica* 2016, 213 (1), 4. DOI: 10.1007/s10681-016-1807-y.
- (35) Greiner K., Weber D. A.: *Pokožové rostliny jak je neznáte*; Nakladatelství Svojtka & Co., s.r.o., 2004.
- (36) *Pokožové a balkonové rostliny, Pro krásnou atmosféru bydlení*; Nakladatelství Svojtka & Co., s.r.o., 2009.
- (37) Jelínková I.: *Kalanchoe manginii* 'Wendy'. Atlas květin, 2011.
<https://www.atlasbotani.eu/index.php?detail&cislo=421> (staženo 9.3.2023)
- (38) <https://i.pinimg.com/736x/c4/1f/b5/c41fb589d7136b8db220fa1ccac1250a.jpg> (staženo 9.3.2023)
- (39) Aisyah L. S., Yun Y. F., Herlina T., Julaeha E., Zainuddin A., Nurfarida I., Hidayat A. T., Supratman U., Shiono Y.: Flavonoid compounds from the leaves of *Kalanchoe prolifera* and their cytotoxic activity against P-388 murine leukemia cells. *Natural Product Sciences* 2017, 23 (2), 139-145.
- (40) <https://www.giromagicactusandsucculents.com/kalanchoe-prolifera/> (staženo 3.5.2023)
- (41) https://bioone.org/ContentImages/Journals/brad/2018/36/brad.n36.2018.a3/graphic/f02_22.jpg (staženo 3.5.2023)
- (42) <https://www.siracactus.it/wp-content/uploads/2022/11/Siracactus-Succulente-Kalanchoe-prolifera-3.jpg> (staženo 3.5.2023)
- (43) Svobodová V.: *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. Botany.cz, 2013.
<https://botany.cz/cs/kalanchoe-pinnata/> (staženo 4.5.2023)
- (44) Pattewar S. V.: *Kalanchoe pinnata*: phytochemical and pharmacological profile. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2012, 3 (4), 993.

- (45) Mahor A.K., Pandey V.K., Singh P.P., Swarnkar R.: Phytochemical and Pharmacological Profile of the Magical Medicinal Herb: *Kalanchoe pinnata*. *ECRONICON* 2022, 25-40.
- (46) Prasad A. K., Kumar S., Iyer S. V., Sudani R. J., Vaidya S. K.: Pharmacognostical, phytochemical and pharmacological review on *Bryophyllum pinnata*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2012, 3 (3), 423-433.
- (47) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/ff/Starr_070308-5336_Kalanchoe_pinnata.jpg/360px-Starr_070308-5336_Kalanchoe_pinnata.jpg (staženo 4.5.2023)
- (48) Grulich V.: *Kalanchoe tomentosa* Baker - kolopojka. 2016. <https://botany.cz/cs/kalanchoe-tomentosa/> (staženo 6.5.2023)
- (49) <https://www.giromagicactusandsucculents.com/kalanchoe-tomentosa/> (staženo 3.5.2023)
- (50) Aisyah L. S., Yun Y. F., Julaeha E., Herlina T., Zainuddin A., Hermawan W., Supratman U., Hayashi H.: Flavonoids from the fresh leaves of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae). *Open Chemistry Journal* 2015, 2 (1).
- (51) https://www.crassulaceae.ch/img/b1740e545b7c52d5c273a3f3cc4098c4_k-tomentosa-chocolate-soldier-3.jpg (staženo 3.5.2023)
- (52) <https://www.foudecactus.com/2022/04/kalanchoe-tomentosa.html> (staženo 3.5.2023)
- (53) Hoskovec L.: *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haw. - kolopojka. Botany.cz, 2015. <https://botany.cz/cs/kalanchoe-crenata/> (staženo 3.5.2023)
- (54) Mayorga O. A. S., da Costa Y. F. G., da Silva J. B., Scio E., Ferreira A. L. P., de Sousa O. V., Alves M. S.: *Kalanchoe brasiliensis* Cambess., a Promising Natural Source of Antioxidant and Antibiotic Agents against Multidrug-Resistant Pathogens for the Treatment of *Salmonella* Gastroenteritis. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 9245951. DOI: 10.1155/2019/9245951 From NLM.

- (55) https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9f/Kalanchoe_crenata_MS_10667.jpg/800px-Kalanchoe_crenata_MS_10667.jpg (staženo 4.5.2023)
- (56) Domenico P.: Effective microorganisms for germination and root growth in *Kalanchoe daigremontiana*. *World Journal of Advanced Research and Reviews* 2019, 3 (3), 047-053.
- (57) Ürményi F. G., Saraiva G. D., Casanova L. M., Matos A. D., de Magalhães Camargo L. M., Romanos M. T., Costa S. S.: Anti-HSV-1 and HSV-2 Flavonoids and a New Kaempferol Triglycoside from the Medicinal Plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Chem Biodivers* 2016, 13 (12), 1707-1714. DOI: 10.1002/cbdv.201600127 From NLM.
- (58) Anisimov M. M., Gerasimenko N. I., Chaikina E. L., Serebryakov Y. M.: Biological activity of metabolites of the herb *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet de la Bathie) Jacobs et Perr. *Biology Bulletin* 2009, 36 (6), 568-574. DOI: 10.1134/S1062359009060041.
- (59) <https://arthropodafotos.de/pictures/plan/15FUC1654o.jpg> (staženo 4.5.2023)
- (60) Smith G. F., Wolff E., Thoumin L.: The taxonomy and nomenclature of *Kalanchoe gastonis-bonnierii* Raym.-Hamet & H. Perrier (Crassulaceae subfam. *Kalanchooideae*), with biographical notes on Gaston Eugène Marie Bonnier (1853–1922). *Bradleya* 2020, 2020 (38), 94-103.
- (61) Lucas E. J.: Plate 451. *Bryophyllum Gastonis-Bonnierii* Crassulaceae. *Curtis's Botanical Magazine* 2002, 19 (4), 227-231.
- (62) Palumbo A., Casanova L. M., Corrêa M. F. P., Da Costa N. M., Nasciutti L. E., Costa S. S.: Potential therapeutic effects of underground parts of *Kalanchoe gastonis-bonnierii* on benign prostatic hyperplasia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019.
- (63) Costa S. S., Corrêa M. F. P., Casanova L. M.: A new triglycosyl flavonoid isolated from leaf juice of *Kalanchoe gastonis-bonnierii* (Crassulaceae). *Natural Product Communications* 2015, 10 (3), 1934578X1501000314.
- (64) Feitosa C. M., Freitas R. M., Luz N. N. N., Bezerra M. Z. B., Trevisan M. T. S.: Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Brazilian Journal of Biology* 2011, 71.

(65) <https://succulentalley.com/wp-content/uploads/2022/05/Kalanchoe-gastonis-bonniericare.jpeg> (staženo 5.5.2023)

(66) Akinsulire O. R., Aibinu I. E., Adenipekun T., Adelowotan T., Odugbemi T.: In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2007, 4 (3), 338-344. From NLM.

(67) Trevisan M. T. S., Bezerra M. Z. B., Santiago G. M. P., Feitosa C. M., Verpoorte R., Braz Filho R.: Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. *Química Nova* 2006, 29, 415-418.

(68) Costa S. S., Muzitano M. F., Camargo L. M. M., Coutinho M. A. S.: Therapeutic potential of *Kalanchoe* species: flavonoids and other secondary metabolites. *Natural Product Communications* 2008, 3 (12), 1934578X0800301236.