

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

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Bioassay guided separace metabolitů
vybraného rostlinného druhu – *Evolvulus alsinoides***

Školitel: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové, 2009

Mgr. František Červenka

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu výzkumného centra LN00B125/D MŠMT a grantového projektu 169/2004/B-BIO/FAF Grantové agentury Univerzity Karlovy.

Za odborné vedení a poskytnutí cenných rad bych rád poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Luďku Jahodářovi, CSc., dále doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. a členům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie FAF UK.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

.....
Mgr. František Červenka

OBSAH

	Seznam použitých zkratk	7
1.	Úvod a cíl práce	8
2.	Teoretická část	10
2.1.	Charakteristika rostliny <i>Evolvulus alsinoides</i> L.	11
2.1.1.	Zařazení rostliny do systému	11
2.1.2.	Charakteristika čeledi Convolvulaceae	11
2.1.3.	Botanické druhové názvosloví	12
2.1.4.	Botanická charakteristika rostliny (výskyt a variety)	12
2.1.5.	Známé obsahové látky	14
2.1.6.	Další předpokládané obsahové látky	16
2.1.6.1.	Alkaloidy	16
2.1.6.2.	Flavonoidy a jejich deriváty	18
2.1.6.3.	Kumariny	20
2.1.6.4.	Fenolové kyseliny	20
2.1.7.	Účinky <i>Evolvulus alsinoides</i> L.	20
2.2.	Přípravky obsahující <i>Evolvulus alsinoides</i> L.	22
2.2.1.	Mentat [®]	22
2.2.2.	Anxocare [®]	23
2.2.3.	Evocen [®]	24
2.2.4.	Brain Tonic [®]	24
2.3.	Biologická aktivita hledaných látek	24
2.3.1.	Deriváty tropanových alkaloidů	24
2.3.2.	Námelové alkaloidy	25
2.3.3.	Pyrolizidinové alkaloidy	25
2.3.4.	Flavonoidy	25
2.3.5.	Kumariny	26
2.4.	Nootropní aktivita rostlinných preparátů	28
2.4.1.	Nootropika	29
2.4.2.	Kognitiva	29
2.4.3.	Neuroprotektiva	29
3.	Experimentální část	31
3.1.	Laboratorní potřeby a pomůcky	32
3.1.1.	Chemikálie a rozpouštědla	32
3.1.2.	Eluční soustavy (mobilní fáze) pro TLC	33
3.1.3.	Detekční činidla	33
3.1.4.	Chromatografický a separační materiál	34
3.1.5.	Přístroje a laboratorní technika	34
3.2.	Použité extrakční metody, separace a strukturní analýzy	35
3.2.1.	Perkolace	35
3.2.2.	Extrakce za využití ultrazvuku	35

3.2.3.	Vytřepávání.....	36
3.2.4.	Sloupcová chromatografie	36
3.2.5.	Tenkvrstvá chromatografie.....	37
3.2.6.	Odpařování rozpouštědel z extraktů a vzorků	37
3.2.7.	Homogenizace	37
3.2.8.	Měření fyzikálně-chemických vlastností	38
3.2.9.	Hodnocení biologické aktivity	39
3.3.	Rostlinný materiál a jeho extrakce	39
3.3.1.	Postup přípravy surového extraktu a základní separace	39
3.4.	Chromatografická separace polárního zbytku	41
3.4.1.	Separace polárního zbytku na sloupci polyamidu	42
3.4.2.	Sloupcová chromatografie FFL na silikagelové koloně	44
3.4.2.1.	Separace spojené frakce 6-7 – izolace látky 1	45
3.4.2.2.	Separace frakce 8 – izolace látky 2.....	46
3.4.2.3.	Separace spojené FFL 1-26 na silikagelové koloně	48
3.4.2.4.	Preparativní chromatografie antioxidačně neaktivnějších frakcí z FFL.....	49
3.4.3.	Separace FPFL – hrubé dělení na silikagelové koloně	50
3.4.3.1.	Separace části FPFLHD1 na silikagelové koloně.....	53
3.4.3.2.	Separace FPFLHD1 - izolace frakce bohaté na skopolin	57
3.5.	Chromatografická separace frakce etherové	60
3.5.1.	Sloupcová chromatografie	60
3.5.1.1.	Čištění spojené frakce 15-23	61
3.5.1.2.	Čištění spojené frakce 26-50 – izolace látky 1	61
3.5.1.3.	Čištění spojených frakcí 51-62 a 63-69 – izolace látek 1 a 2.....	62
3.5.1.4.	Čištění spojených frakcí 70-85 a 86-92 – izolace látek 1 a 2.....	63
3.5.1.5.	Čištění spojené frakce 93-117	64
3.6.	Chromatografická separace frakce petroletherové	65
3.6.1.	Sloupcová chromatografie	65
3.6.1.1.	Čištění spojených frakcí 3-4 a 5-7 – izolace látek 5, 6	66
3.6.1.2.	Čištění spojené frakce 15-16 – izolace látky 7	66
3.6.1.3.	Čištění spojené frakce 36-40 – izolace látky 8, 9, 10	67
3.7.	Charakteristika čistých látek vyizolovaných z taxonu <i>E. alsinoides</i> L.	68
3.7.1.	Látka 1 - Skopoletin	68
3.7.2.	Látka 2 - Umbelliferon	72
3.7.3.	Látka 3 – Skopolin	76
3.7.4.	Látka 4 - 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol	80
3.7.5.	Látka 5 a 6 - 8-methyldekanová kyselina a olejová kyselina	84
3.7.6.	Látka 7 - ester ferulové kyseliny s lineárními alkoholy C14 - C17	86
3.7.7.	Látka 8, 9, 10 - palmitová, stearová a heptadekanová kyselina – směs ...	87
3.8.	Kvantitativní stanovení vyizolovaných obsahových látek	90
3.8.1.	Kvantitativní stanovení kumarinů	90

3.8.2.	Kvantitativní stanovení 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu	91
3.9.	Hodnocení biologické aktivity <i>Evolvulus alsinoides</i> L.	94
3.9.1.	Antioxidační aktivita a stanovení obsahu fenolových látek.....	94
3.9.1.1.	Antioxidační aktivita testovaná <i>in vitro</i> DPPH testem	94
3.9.1.2.	Antioxidační aktivita testovaná <i>in vitro</i> FRAP testem	98
3.9.2.	Antiagregační aktivita - Agregometrie	100
3.9.2.1.	Postup měření.....	100
3.9.2.2.	Stanovení IC ₅₀ skopoletinu a umbelliferonu	102
3.9.3.	Alternativní testy akutní toxicity – zástava pohybu <i>Tubifex tubifex</i> Müll...	103
3.9.4.	Test akutní toxicity (mortality) a fototoxického poškození povrchu <i>Tubifex tubifex</i> Müll.	104
3.9.4.1.	Testovací organismy	104
3.9.4.2.	Průběh experimentu.....	104
3.9.5.	Antifungální aktivita stanovená diluční metodou	106
4.	Výsledky a diskuse	107
5.	Závěr.....	114
6.	Použité informační zdroje.....	116
7.	Publikované práce, prezentace, finanční podpory.....	126
8.	Souhrn	129
9.	Summary	133

Seznam použitých zkratk

ACH	Acetylcholin
ACHE	Acetylcholinesterasa
Aq	Vodný
ASA	Acetylosalicylová kyselina
CFL	Celkové fenolové látky
DAD	Detektor diodového pole - Diode array detector
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2'-diphenyl-1-pikrylhydrazyl radikál
EtAc	Ethylacetát
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
Expon.	Exponování
FEt ₂ O	Frakce etherová
FFL	Frakce fenolových látek
FPe	Frakce petroletherová
FPFL	Frakce prostá fenolových látek
FRAP	Ferric reducing antioxidant potential
GABA	Gama-aminomáselná kyselina
GC-FID	Gas Chromatography- Flame Ionization Detector
GIT	Gastrointestinální trakt
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie - High-performance liquid chromatography
k.	Kyselina
Koef.	Koeficient
konc.	Koncentrovaný
MeOH	Methanol
MK	Mastná kyselina
MS	Hmotnostní spektroskopie
Neexpon.	Neexponování
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	Nukleární magnetická rezonance
Pe	Petrolether
PZ	Polární zbytek
rozp.	Rozpuštěný
SIA	Sekvenční injekční analýza
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultrafialové

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

V současné době dochází u průmyslově vyspělých národů k výraznému rozvoji civilizačních chorob, mezi které patří neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova nemoc), poruchy kognitivních funkcí, demence, poškození mozku v důsledku hypoxie, ischemie a různé typy intoxikací spojené s poškozením mozkových buněk.

U řady klasických látek, které se používají v terapii poruch kognitivních funkcí, se během léčby často vyskytují nežádoucí účinky. Ty mohou vést ke snížení účinnosti léčby, neboť ji pacient odmítá a snižuje se compliance. Z těchto důvodů je nutné snižovat dávky léčiva často pod terapeuticky účinné koncentrace a v ojedinělých případech je nutné léčbu vysadit. Snahou farmaceutického průmyslu je vyvíjet stále novější a bezpečnější léčiva, která by měla méně nežádoucích účinků a byla pro pacienta výhodnější. Jednou z cest je využití přírodních látek rostlinného původu a jejich formulace do definovaných léčivých přípravků. V řadě případů je totiž komplex látek účinnější než izolované či synteticky získané látky. Řada poznatků o používání těchto přírodních preparátů pochází z publikovaných etnofarmakologických údajů tradiční asijské medicíny (čínské, indické, japonské), kde je patrný pozitivní efekt těchto přípravků na kognitivní funkce. Velké množství klinických studií prokázalo pozitivní působení rostlinných přípravků na zlepšení kognitivních funkcí s minimem vedlejších a nežádoucích účinků. Působení přírodních přípravků je komplexní a jednotlivé látky působí různými mechanismy. Velkému zájmu se v posledních letech těší rostliny a standardizované přípravky z *Ginkgo biloba* L., *Centella asiatica* (L.) Urban, *Bacopa monniera* L., *Evolvulus alsinoides* L. a dalších rostlin. Významného použití při léčbě poruch kognitivních funkcí také dosáhly čisté izolované látky galanthamin, vinpocetin a huperzin A.

Rostlina *Evolvulus alsinoides* patří k jedněm z nejméně prostudovaných zástupců rostlin používaných při léčbě neurodegenerativních onemocnění. Větší podíl údajů, které jsou o této rostlině známy, pochází z poznatků zjištěných při užívání v tradičním lidovém léčitelství, a proto nejsou účinky dostatečně vědecky podloženy. Rostlina je k léčebným účelům používána již po staletí a hojného použití se těší v oblastech jihovýchodní Asie. S jejím používáním se můžeme setkat již v Ájúrvédě. Z důvodu nedostatečného množství poznatků o obsahových látkách a jejich biologických účincích se *Evolvulus alsinoides* stal předmětem zájmu našeho vědeckého týmu.

Cílem práce bylo:

1. Rozšířit poznatky o obsahových látkách taxonu.
2. Posoudit biologickou aktivitu získaných frakcí a vyzolovaných čistých látek.
3. Stanovit charakteristické metabolity rostliny a provést jejich kvantifikaci.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Charakteristika rostliny *Evolvulus alsinoides* L.

2.1.1. Zařazení rostliny do systému

Říše: Plantae

Odd.: Magnoliophyta

Tř.: Magnoliopsida

Podtř.: Asteridae

Řád: Convolvulales

Čeleď: Convolvulaceae

Rod: *Evolvulus*

Druh: *Evolvulus alsinoides*

2.1.2. Charakteristika čeledi Convolvulaceae

Jedná se převážně o vytrvalé, vzácně jednoleté rostliny, které jsou poléhavé nebo ovíjivé, výjimečně se jedná o polokeře nebo nízké keře. Často obsahují článkované mléčnice nebo sekreční kanálky. Kořeny jsou vřetenovité nebo se jedná o větvený, plazivý až dužnatý oddenek. Listy jsou střídavé, bez palistů, řapíkaté až přisedlé a poseté trichomy. Květy jsou ve vrcholičnatých květenstvích nebo jsou jednotlivé, oboupohlavné, většinou pravidelné, různobalné a 5četné. Kalich je srostlý do 1/3 s jednotlivými kališními cípy, které jsou nestejně dlouhé. Korunní cípy jsou po celé délce srostlé, koruna je po celé délce 3 - 5laločná, bez šupinovitých emergencí. Tyčinek je 5, jsou přímé a na bázi nitkami přirostlé ke korunní trubce. Semeník je z 2 - 5 plodolistů, svrchní, 2 - 4 pouzdrý, každé semenné pouzdro se 2 - 4 vajíčky. Plodem je vejcovitá nebo kulovitá tobolka, většinou pukavá, zřídka se poltící na 4 tvrdky. Čeleď zahrnuje asi 35 - 40 rodů a okolo 950 druhů rostoucích především v mírných až tropických pásmech. [1]

Obr. č. 1: *Evolvulus alsinoides* L. [2]



2.1.3. Botanické druhové názvosloví [2, 3]

Odborné latinské: *Evolvulus alsinoides* L.

Variety: *E. alsinoides* var. *angustifolius* Thorr.

E. alsinoides var. *debilis* (Kunth) van Ooststr.

E. alsinoides var. *alsinoides*

E. alsinoides var. *decumbescens* (R. Brown) van Ooststr.

Odborné české: Evolvulus kuříčkovitý

Tradiční názvosloví: Vishnugrandi (Višnuova stopa) - Sanskrtský název

Shankpushpi - v Ájurvédě

Shankhahuli, Supushpi

2.1.4. Botanická charakteristika rostliny (výskyt a variety)

Jedná se o vytrvalou rostlinu s krátkým dřevnatým a větveným oddenkem. Lodyhy jsou jednoleté, dorůstají délky více než 30 cm, často jsou poléhavé, šlahounovité a hustě ochlupené. Listy jsou malé (max. 25 × 10 mm), celokrajné,

eliptické, kopinaté a hustě chlupaté. Řapík je drobný nebo skoro chybí a listy jsou pak přisedlé. Květy jsou modré, jednotlivé a vyrůstají v paždí listů. Stopka je dlouhá a axiální. Koruna je zřetelně nálevkovitě tvarovaná a srostlá z pěti lístků. Kalich je čtyřlaločný, kopinatý a špičatě čárkovitý. Plody jsou kulovité tobolky. Semena jsou čtyři a jsou holá. Rostlina kvete od ledna do srpna, doba květu se může lišit v závislosti na lokalitě. [2, 4, 5]

Rostlina je rozšířena v tropických a subtropických oblastech do nadmořské výšky 2000 m. Velké hojnosti se těší v oblastech jihovýchodní Asie. Zde se vyskytuje jako plevelná rostlina jak na suchých travnatých místech, tak i v částečně vlhkých oblastech okolo řek a cest. [6, 7, 8]

V několika studiích byly sledovány morfologické změny způsobené různými vlivy stanoviště výskytu rostliny. Byly sledovány zejména barevné změny květů od modré přes růžovou k bílé, změna morfologie stonku, změna hmotnosti semen a další charakteristiky. Bylo zjištěno, že rostliny s modrými květy rostou na suchých a skalnatých stanovištích a mají vyšší obsah prolinu. Byly také sledovány změny růstu a tvorby biomasy při aplikaci umělých hnojiv. [9, 10, 11, 12, 13]

V literatuře se můžeme setkat s několika varietami, které se mohou lišit obsahovými látkami a účinky. Jedná se o *E. alsinoides* var. *angustifolius* Thorr., *E. alsinoides* var. *debilis* (Kunth) van Ooststr., *E. alsinoides* var. *alsinoides*, *E. alsinoides* var. *decumbescens* (R. Brown) van Ooststr.

V praxi se můžeme hojně setkat se záměnou či přímo falšováním *E. alsinoides* jinými druhy. Touto problematikou se přímo zabývá Institut pro identifikaci surových drog. Při ověřování třinácti vzorků Shankpushpi od různých dodavatelů (farmaceutické společnosti, obchodníci) bylo zjištěno, že pouze jeden ze vzorků je *E. alsinoides*. Ve většině případů se jednalo o *Convolvulus microphyllus* Sieb. ex Spreng, *Indigofera cardifolia* Heyne, popřípadě směs těchto rostlin. Je tedy nutno po dodavateli požadovat list o verifikaci a prokázání původu rostliny, neboť jednotlivé vzorky se mohou lišit obsahovými látkami a účinky [14]. S nesprávnými názvy Shankpushpi se můžeme setkat i na řadě internetových stránek [15]. S problematikou záměn zřejmě souvisí okolnost, že v Ájurvedě jsou jako Shankpushpi označovány také rostliny *Convolvulus pluricaulis*, *Clitoria ternatea* a *Canscora decussata*. [16]

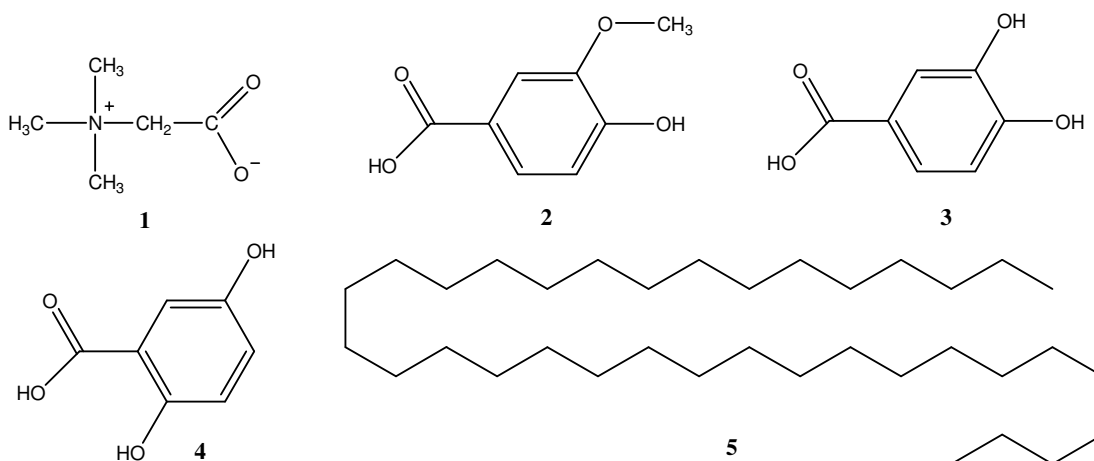
2.1.5. Známé obsahové látky

Rostlina je známá z tradiční medicíny již po staletí, přesto nejsou obsahové látky příliš prozkoumány. V literatuře je uváděn obsah alkaloidu evolvinu, dosud neznámé struktury, dále přítomnost silice blíže neurčeného složení, betainu (1), tříslovin, cukrů, proteinů, aminokyselin, fenolových kyselin (p-hydroxybenzoová, kávová, vanilová (2), protokatechová (3) a gentisová (4) kyselina), pentatriakontanu (5), triakontanu, β -sitosterolu (6), glykoflavonu, 4'-methoxyvitexinu (7), chloridu draselného a proteinů. Extrakt vykazuje pozitivní reakci na látky fenolového typu. Byla prokázána přítomnost řady derivátů flavonoidů - kvercetinu, kemferolu, apigeninu a nově byly izolovány evolvoid A (8), což je strukturou 2,3,4-trihydroxy-3-methylbutyl-3-[3-hydroxy-4-(2,3,4-trihydroxy-2-methylbutoxy)-phenyl]-2-propenoat a evolvoid B (9), strukturou methyl ester 1,3-di-O-caffeoyl chinové kyseliny. [2, 4, 17, 18, 19]

Při hodnocení obsahu oleje v semenech několika rostlin čeledi Convolvulaceae včetně *Evolvulus alsinoides* pomocí chromatografie s využitím reverzní fáze bylo v semenech stanoveno 6,7 – 16,5 % oleje. Bližší hodnocení prokázalo 8,4 % palmitové kyseliny, 14,8 % stearové kyseliny, 4,4 % olejové kyseliny, 4,3 % linolové kyseliny, 23,8 % linolenové kyseliny, 37,8 % arachidonové kyseliny a 6,5 % behemové kyseliny. [20]

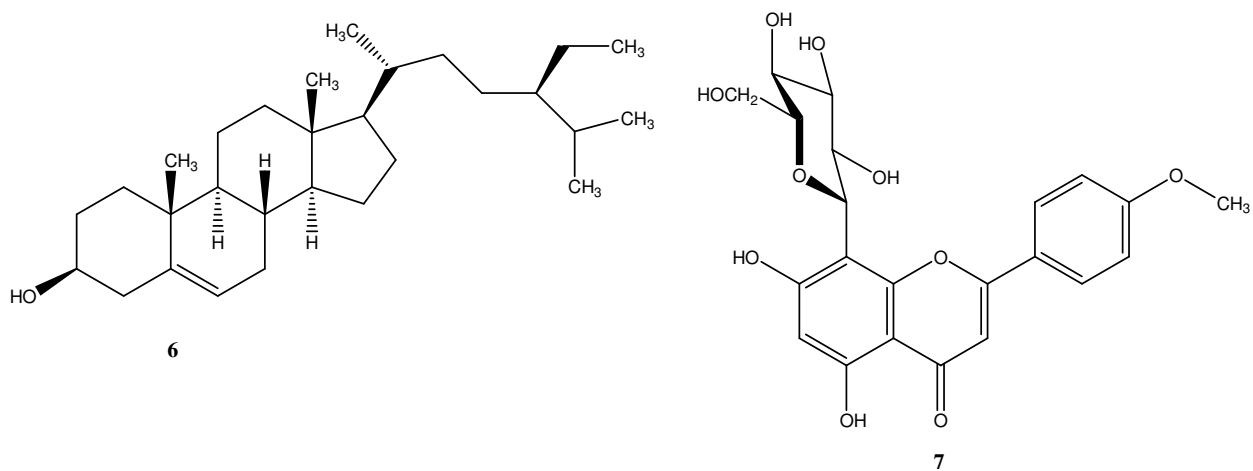
Vzorec č. 1 – 5:

[betain(1), vanilová(2) k., protokatechová(3) k., gentisová(4) k., pentatriakontan(5)]



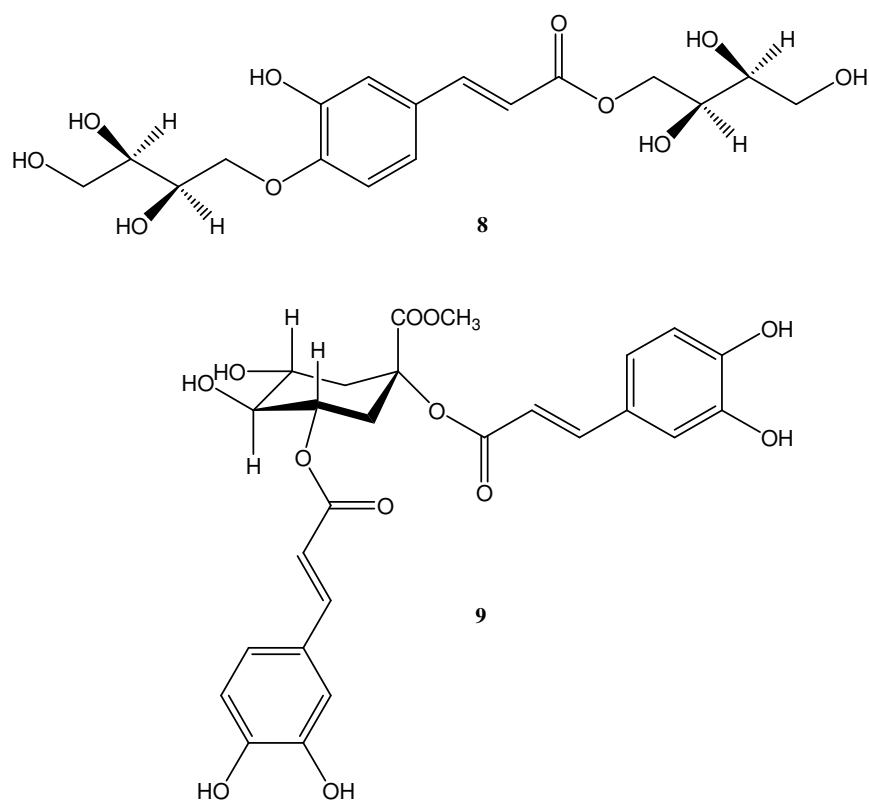
Vzorec č. 6 – 7:

[β -sitosterol(6), 4'-methoxyvitexin(7)]



Vzorec č. 8 – 9:

[evolvoid A (8), evolvoid B(9)]



2.1.6. Další předpokládané obsahové látky

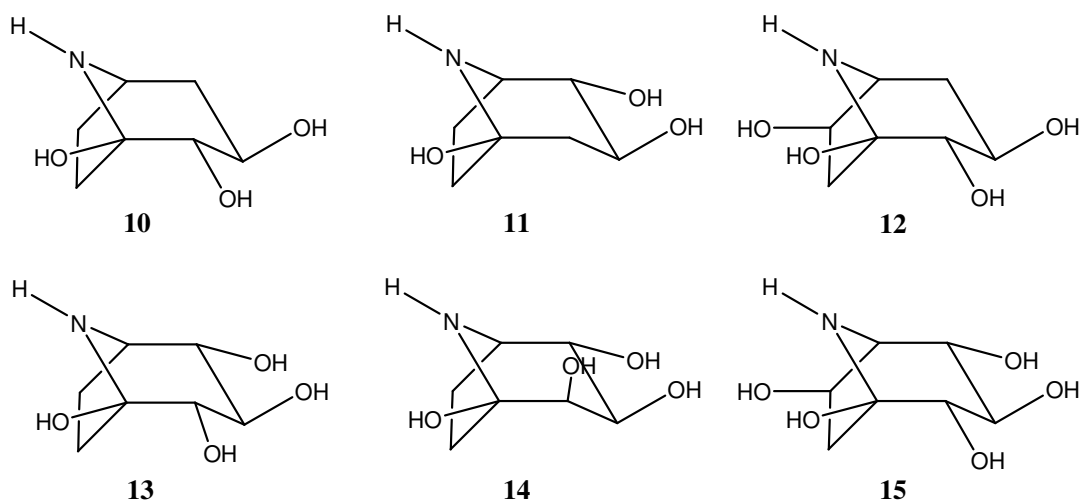
2.1.6.1. Alkaloidy

V čeledi Convolvulaceae je popisována přítomnost alkaloidů tropanového (kalysteginy, konvolvin, konvalidin, konvolamin) a ergolinového typu. Obsah těchto alkaloidů je velmi významným chemotaxonomickým znakem této čeledi. [21]

Kalysteginy jako zástupci tropanových alkaloidů jsou deriváty norpseudotropanu vznikajícího metabolickou přeměnou putrescinu přes tropinon a pseudotropin. V molekule kalysteginů se dále v různých polohách vyskytuje 3-5 OH skupin, jedná se tedy o polyhydroxynortropany. Poprvé byly izolovány z kořenů *Calystegia sepium* (Convolvulaceae) a plodů *Nicandra physalodes* Boehm (Solanaceae). Od té doby se je podařilo nalézt v čeledi Solanaceae, Erythroxylaceae, Euphorbiaceae a dalších. Vyskytují se v celé části rostliny. Při studiu 65 druhů z čeledi Convolvulaceae byl jejich výskyt prokázán pouze u 30 druhů. Následná studie se 129 druhy prokázala přítomnost kalysteginů v 62 sledovaných druzích. Jejich výskyt v *Evolvulus alsinoides* není doposud popisován, byly prokázány v příbuzných druzích jako je *Convolvulus arvensis* L. (A₃, A₅, B₂, B₃, B₄), *Evolvulus argyreus* Choisy (B₂). V současné době je známo několik typů kalysteginů označovaných písmeny a číslicí A₃, A₅, A₆, B₁, B₂, B₃, C₁ a C₂. Jejich přítomnost není vázána jen na tropanové alkaloidy, vyskytují se také v přítomnosti ergolinových, pyrrolizidinových a indolizidinových alkaloidů. [22, 23, 24, 25, 26]

Vzorec č. 10 – 15:

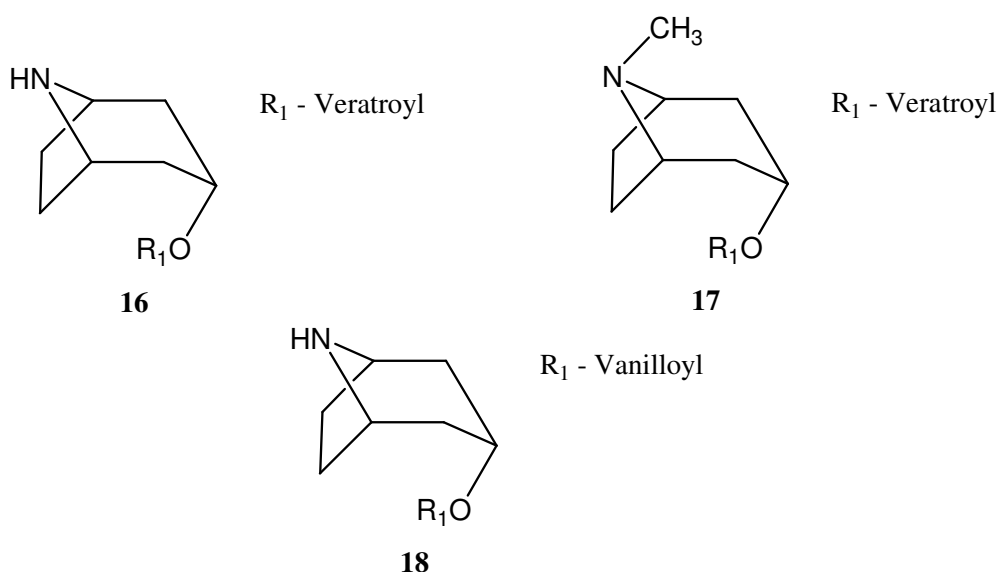
[kalysteginy A₃(10), A₅(11), B₁(12), B₂(13), B₃(14), C₁(15)]



Konvolvin (3-veratroylnortropin) (**16**), **konvalidin** (3-vanilloylnortropin) (**17**), **konvolamin** (3-veratroyltropin) (**18**), představují další skupinu alkaloidů nalezených v čeledi Convolvulaceae. Jejich výskyt v *E. alsinoides* není doposud popisován, byly prokázány v příbuzném druhu *Evolvulus sericeus* [27, 28]. V celé rostlině *E. alsinoides* je uváděn obsah alkaloidu evolvinu (shankhpushpinu), jehož struktura není doposud objasněna, je možné, že bude podobná struktuře výše zmíněných alkaloidů. [29]

Vzorec č. 16 – 18:

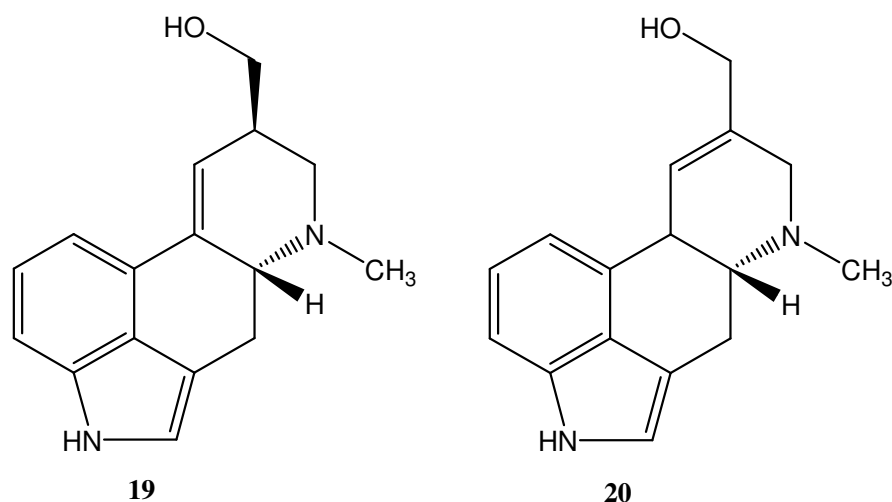
[konvolvin(**16**), konvalidin(**17**), konvolamin(**18**)]



Námelové alkaloidy byly prokázány v čeledi Convolvulaceae u zástupců *Convolvulus* a *Ipomoea*. Alkaloidy jsou detekovatelné v celé rostlině, v semenech bývá obsah vyšší. U druhu *Ipomoea parasitica* byla v semenech prokázána přítomnost lysergolu a elymoklavinu [18, 30]. Podle některých výsledků lze usuzovat, že na produkci alkaloidů rostlinami se mohou podílet některé druhy hub. Tyto předpoklady potvrzuje i pokus, v němž byly rostlině *Ipomoea asarifolia* Roem & Schult aplikovány fungicidy. Po jejich aplikaci bylo pozorováno vymizení přítomnosti námelových alkaloidů [31]. Při sledování výskytu alkaloidů u 45 druhů rodu *Ipomoea* byla přítomnost ergolinu prokázána jen u 20 % zástupců, lysergol (**19**) byl prokázán u čtyř zástupců a elymoklavin (**20**) u sedmi zástupců. Koncentrace námelových alkaloidů se pohybovala v rozmezí 0,004 % u *I. pes-caprae* po 0,16 % u *I. parasitica* [32].

Vzorec č. 19 – 20:

[lysergol(19), elymoklavin(20)]



Některé zdroje také uvádí obsah **pyrrolizidinových alkaloidů** v čeledi Convolvulaceae. Jejich obsah byl potvrzen u druhu *Ipomoea hederifolia*, jedná se o ipangulin A a B. V semenech byla potvrzena přítomnost ipangulinu A, v kořenech byl nalezen ipangulin B, nadzemní část obsahovala oba typy alkaloidů. [33]

2.1.6.2. Flavonoidy a jejich deriváty

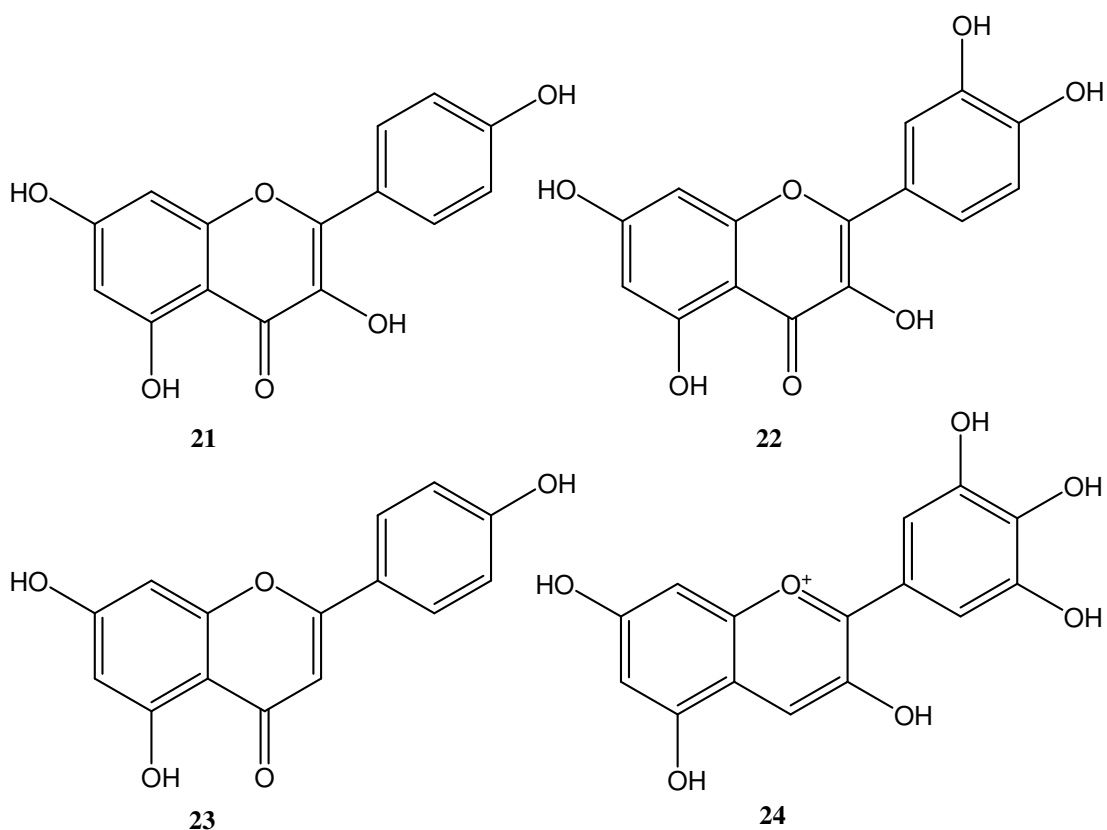
Při fytochemickém hodnocení několika léčivých rostlin byla na základě TLC potvrzena v *E. alsinoides* přítomnost dalších flavonoidních glykosidů odvozených od kemferolu (**21**), kvercetinu (**22**) a apigeninu (**23**). Jednalo se např. o kemferol-3-glukosid a kemferol-3-rutosid [34]. Tyto flavonoidy jsou běžně rozšířeny v čeledi Convolvulaceae jak ve formě methylderivátů, tak ve formě glykosidů. [35]

V čeledi Convolvulaceae byla také prokázána přítomnost sulfatovaných forem flavonoidů kvercetinsulfátu a kemferolsulfátu. Přítomnost těchto látek byla objevena v rostlinách *Ipomoea regnellii* a *I. reticulata* [36]. Jejich výskyt v této čeledi není tak častý, přesto je možno se v několika pracích o jejich přítomnosti dočíst. [37]

Květy rodu *Evolvulus* obsahují anthokyanová barviva. Jedná se o deriváty delfinidinu (**24**), který je součástí komplexu vytvářejícího modré zbarvení květů a má právě základ ve struktuře flavonoidů. Na molekulu delfinidinu se dále váže kávová a malonová kyselina spolu s jednotkami glukosy [38, 39]. V květech *Evolvulus pilosus* byl ve struktuře barviva identifikován apigenin-7-glukosid a derivát delfinidinu. [40, 41]

Vzorec č. 21 – 24:

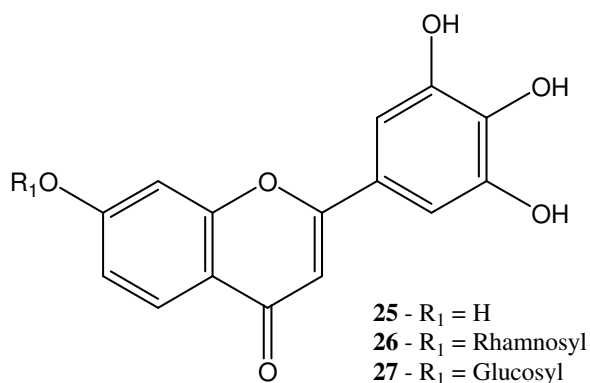
[kemferol (**21**), kvercetin (**22**) apigenin (**23**) delphinidin (**24**)] [18]



Z *E. alsinoides* a příbuzného druhu *E. nummularius* byly izolovány flavony a jejich glykosidy - robinetin (3',4',5',7-tetrahydroxyflavonon) (**25**), evolvulosid A (7-O- α -L-rhamnopyranosid) (**26**) a evolvulosid B (7-O- β -D-glukopyranosid) (**27**). [19, 42]

Vzorec č. 25 – 27:

[3',4',5',7-tetrahydroxyflavonon(**25**), evolvulosid A(**26**) a evolvulosid B(**27**)]



2.1.6.3. Kumariny

Na základě HPTLC stanovení přípravků obsahujících Shankhpushpi lze usuzovat na přítomnost kumarinu skopoletinu. Z provedeného hodnocení však není jednoznačně patrné, která z rostlin byla ke stanovení použita. Článek připouští, že v Ájurvédě jsou jako Shankhpushpi označovány rostliny *Convolvulus pluricaulis*, *Evolvulus alsinoides*, *Clitoria ternatea* a *Canscora decussata*. Autor dodává, že většina výrobců rostlinných preparátů používá *Convolvulus pluricaulis* a pravděpodobně byla také hodnocena tato rostlina. Ve všech testovaných vzorcích přípravku byl skopoletin prokázán, spolu s ním byly patrné další blíže neurčené modře fluoreskující skvrny [16].

Přítomnost kumarinů skopoletinu a umbelliferonu byla také prokázána v čeledi Convolvulaceae u *Convolvulus arvensis* [43].

2.1.6.4. Fenolové kyseliny

V druhu *Convolvulus arvensis* byla zjištěna přítomnost řady fenolových kyselin, z nichž byly identifikovány protokatechová, kávová, gentisová, p-hydroxybenzoová, p-kumarová, syringová, vanilová, ferulová, chlorogenová a salicylová kyselina [43].

2.1.7. Účinky *Evolvulus alsinoides* L.

Rostlina je tradičně používána v indické medicíně jako mozkové tonikum při léčbě neurodegenerativních onemocnění, astmatu a amnesie. Patří tedy do skupiny nootropik a působí také jako adaptogen [44]. Dále je používána pro své protikřečové, antioxidantní, protizánětlivé a protikrevácivé účinky [45, 46, 47, 48].

Evolvulus alsinoides je také obsažen v několika přípravcích s nootropní a tonickou aktivitou (Brain tonic[®], Brahmi Ghrita[®], Mind Care[®], Mentat[®], Anxocare[®]) [49, 50]. V poslední době byl vyvinut nový přípravek Evocen[®] [51]. Tento kombinovaný preparát byl na trh uveden firmou Avicenna Company ve spolupráci s Katedrou farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové [52].

Obsažený alkaloid evolvin má popisovanou sympatomimetickou aktivitu [2]. Dále se rostlina používá ve formě odvarů s kmínem a mlékem při horečkách a malárii. Listy jsou přidávány do cigaret, užívaných při astmatu a chronické bronchitidě. Odvary s *Ocimum sanctum* jsou podávány při horečkách, nechutenství a průjmech. Je uváděno, že olej ze semen se používá jako derivans vlasové pokožky. [2, 4]

Na myších Sprague-Dawley bylo hodnoceno adaptogenní působení ethanolového extraktu *E. alsinoides* na ovlivnění akutního a chronického stresu. Akutní stres byl působen znehybněním motorických funkcí po dobu 150 minut. Chronický stres byl působen různými typy stresorů po dobu 7 hodin denně. Stres vyvolal tvorbu žaludečních vředů, zvýšení hladiny kortikosteronu a hladiny plazmatické kreatininy. Myším bylo podáváno 100, 200, 400 mg/kg ethanolového extraktu. Již dávka 200 mg/kg vykazovala zlepšení sledovaných stresových ukazatelů. Extrakt *E. alsinoides* (zejména izolované látky evolvoid A a B) vykazoval podobnou adaptogenní aktivitu jako známý adaptogen *Panax quinquefolium* L. (100 mg/kg). Při podávání extraktu myším bylo zjištěno pozitivní působení na léčbu demence vyvolané působením skopolaminu. [19, 44]

V dalším z pokusů byly hodnoceny tři čínské rostliny tradičně používané k léčbě neurodegenerativních onemocnění (*Sida cordifolia* L., *E. alsinoides*, *Cynodon dactylon* (L.) Pers.). Byl hodnocen jak ethanolový, tak vodný extrakt. U všech extraktů bylo sledováno antioxidační působení na ABTS radikál (2,2'-azinobis-3-etylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina). Hodnocení ovlivnění spontánní peroxidace lipidů bylo prováděno s homogenizátem mozkové tkáně myši. Pořadí antioxidační aktivity ethanolových extraktů bylo následující: *S. cordifolia* (IC₅₀ 16,07 µg/ml) > *E. alsinoides* (IC₅₀ 33,39 µg/ml) > *C. dactylon* (IC₅₀ 78,62 µg/ml). U vodného extraktu bylo pořadí následující: *E. alsinoides* (IC₅₀ 172,25 µg/ml) > *C. dactylon* (IC₅₀ 273,64 µg/ml) > *S. cordifolia* (IC₅₀ 342,82 µg/ml). Peroxidaci lipidů ovlivnil vodný extrakt následujícím způsobem: *E. alsinoides* (IC₅₀ 89,23 µg/ml) > *S. cordifolia* (IC₅₀ 126,78 µg/ml) > *C. dactylon* (IC₅₀ 608,31 µg/ml). Ze zjištěných výsledků je patrné, že *E. alsinoides* má z vybraných rostlin nejvyšší antioxidační působení. [45]

Pokusem na myších bylo prokázáno protizánětlivé působení extraktu *E. alsinoides*. Zánětlivé změny byly vyvolány Freundovým adjuvans aplikovaným podkožně na levé noze. Hodnocena byla proliferace lymfocytů a histopatologicky synoviální proliferace. Extrakt vykazoval zmírnění zánětu a otoku. Také byla zjištěna nižší hladina NO. Extrakt tedy vykazuje jisté imunopresivní účinky a je ho možné použít např. k léčbě artritidy. [46]

Při časté opakované kombinaci Shankpushpi a fenytoinu bylo pozorováno snížení plazmatické koncentrace fenytoinu a jeho antiepileptické aktivity. Při porovnávání antiepileptické aktivity Shankpushpi a placebo byla naopak u Shankpushpi prokázána signifikantní antiepileptická aktivita v porovnání s placebem. [53]

Extrakt z *E. alsinoides* vykazuje významnou antibakteriální účinnost. Methanolový extrakt prokázal účinnost proti *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. Naproti tomu acetonový extrakt vykazoval slabou aktivitu zejména proti *Escherichia coli*. Test byl hodnocen proti standardní řadě antibiotik. [54]

Methanolový extrakt *E. alsinoides* prokázal významnou antifungální aktivitu proti *Sclerospora graminicola*, která působí ochmýřenou plíseň perlorodek. Bylo testováno 38 druhů z 30 čeledí a porovnávání bylo provedeno proti standardním preparátům. [55]

U methanolového extraktu Shankpushpi bylo zjištěno významné neurofarmakologické působení. Byly pozorovány změny v chování, snížení spontánní motorické aktivity, hypotermie, potenciace barbiturátového spánku a snížení agresivního chování. Rostlina působí celkově antidepresivně. Bylo také prokázáno významné antagonistické působení vůči působení látek typu amfetaminu. Jako Shankpushpi je zde však uváděn *Convolvulus microphyllus* Sieb ex Spreng. [56]

V testech bylo rovněž zjištěno příznivé působení extraktu z různých druhů *Evolvulus* na růst vlasů a snížení jejich vypadávání. [57]

2.2. Přípravky obsahující *Evolvulus alsinoides* L.

2.2.1. Mentat[®]

Mentat (označení BR-16A) je produktem společnosti Himalaya. Obsahuje 24 druhů rostlin a je upraven do podoby tablet. Mentat tvoří převážně extrakty z následujících rostlin - *Bacopa monnieri*, *Centella asiatica*, *Withania somnifera*, *Evolvulus alsinoides*, *Nardostachys jatamansi*, *Valeriana wallichii*, *Embelia ribes*, *Prunus amygdalus*, *Acorus calamus*, *Terminalia chebula*, *Embllica officinalis*, *Tinospora cordifolia*, *Celastrus paniculatus*, *Oroxylum indicum* a další [58, 59]. Mechanismus působení na zlepšení mentálních funkcí spočívá ve zlepšení GABAergní neurotransmise. Zlepšuje aktivitu muskarinových a cholinergních receptorů v mozkové kůře. V řadě provedených klinických studií bylo zjištěno, že Mentat zlepšuje paměť, poruchy mentální retardace, učení, koncentraci a zvyšuje odolnost vůči stresu. Pomáhá snižovat hladinu endogenních inhibitorů MAO (monoaminoxidasy). Vykazuje také signifikantní zlepšení poruch doprovázejících Parkinsonovu nemoc a to zlepšením dopaminergní postsynaptické aktivity.

Při pokusech provedených na bílých myších Wistar byl hodnocen pocit úzkosti vyvolaný vhodným testem. Myším bylo podáváno postupně 50-500 mg/kg Mentatu.

Bylo pozorováno snížení úzkosti u testovaných jedinců a zlepšení učení při podávání skopolaminu [59]. Podobných výsledků dosáhl Achliya Girish S. na albinotických myších pomocí Morrisova modelu [60].

Mentat byl také podroben klinickému hodnocení na 31 pacientech ve věku mezi 23-42 roky trpících různými typy epilepsie. Většina z nich byli pacienti již užívající nějakou předchozí léčbu. Pacienti užívali dvě tablety Mentatu denně spolu s jejich předchozí léčbou po dobu 6 týdnů. U pacientů bylo pozorováno snížení frekvence záchvatů a nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky. [61]

BR-16A prokázal při pokusech provedených na myších (druh Laca) působení proti stresu, předpokládaný mechanismus působení je ovlivnění GABAergní transmise. Stres byl vyvolán držením myši o samotě. Porovnávací skupině byl již 5 dní před zahájením experimentu podáván BR-16A. Dále bylo také sledováno ovlivnění barbiturátového spánku, lokomoční aktivity a analgesie. Denní dávka 100 a 200 mg/kg výrazně zlepšila odolnost vůči stresu a zkrátila dobu spánku po barbiturátu působením na GABAergní neurotransmisi v mozku. [62]

Při pokusech provedených na myších vystavených působení gamapaprsků a dostávajících odlišnou dávku extraktu z Mentatu byla pozorována nižší mortalita, zlepšení GIT poruch a zlepšení poškození kůže. Nejlepší výsledky byly pozorovány při denní dávce 80 mg/den. Mentat má tedy výrazné radioprotektivní působení. [63]

Zlepšení učení myší bylo prokázáno podáváním Mentatu v řadě dalších testů. Bylo zjištěno, že Mentat zvyšuje působení dopaminu na postsynaptických receptorech, ale neovlivňuje aktivitu dopaminových autoreceptorů. [64, 65]

2.2.2. Anxocare[®]

Přípravek Anxocare je převážně používán ve veterinární medicíně. Snižuje hyperaktivní a agresivní chování. Přípravek je složen z extraktů z následujících rostlin: *Bacopa monnieri*, *Centella asiatica*, *Withania somnifera*, *Evolvulus alsinoides*, *Prunus amygdalus*, *Acorus calamus*, *Terminalia chebula*, *Embilica officinalis*, *Tinospora cordifolia*, *Celastrus paniculatus*, *Oroxylum indicum*, *Nardostachys jatamansi*, *Valeriana wallichii* a *Embilia ribes*. Podávání přípravku psům v dávce 3 tablet 2x denně snížilo po 15 dnech celkové skóre agresivity o 34,5 %. Již po 5 dnech bylo pozorovatelné snížení agresivity. V testu bylo hodnoceno 30 různých typů agresivity a bylo použito několik druhů psích plemen. [66, 67]

2.2.3. Evocen[®]

Jedná se o přípravek vzniklý ve spolupráci firmy Avicenna Company a Katedry farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty UK. Přípravek vykazuje značné antioxidační účinky a pozitivně ovlivňuje funkce mozku. Obsahuje extrakt z rostlin *Centella asiatica* a *Evolvulus alsinoides*.

Evocen zlepšuje poznávací funkce, zvyšuje schopnost koncentrace a přispívá k překonání stavů časté zapomnětlivosti. Zároveň potlačuje stavy úzkosti. Pentacyklické triterpeny (saponiny), které *Centella asiatica* obsahuje, současně zvyšují syntézu kolagenu a příznivě působí na cévní systém. *Evolvulus alsinoides* působí jako adaptogen, potlačuje stavy úzkosti a má celkově zklidňující efekt. Současně stimuluje poznávací a intelektuální funkce. [51, 52]

2.2.4. Brain Tonic[®]

Přípravek je složen z extraktů rostlin *Evolvulus alsinoides*, *Bacopa monnieri* a *Celastrus paniculatus*.

Působí pozitivně na zlepšení paměti, zlepšuje poškozené mozkové funkce, odstraňuje pocit úzkosti, psychického vypětí a depresivní stavy. [68]

Evolvulus alsinoides je součástí řady dalších přípravků používaných obecně na léčbu poruch kognitivních funkcí. Mezi tyto přípravky patří např. *Pedi tone natural herbal tonic*[®] a *Mukta vati*[®]. [69, 70]

2.3. Biologická aktivita hledaných látek

2.3.1. Deriváty tropanových alkaloidů

Jedná se o estery tropinu, hydroxytropinu, skopinu a ekgoninu s organickými kyselinami (tropová k., benzoová k., skořicová k. a další).

Tropanové alkaloidy vykazují psychotropní účinky, působí jako parasympatolytika a v závislosti na dávce tlumí či povzbuzují CNS. Mají také antiemetické, antiastmatické účinky a působí jako antiparkinsonika. [71]

V čeledi Convolvulaceae byla popsána přítomnost následujících alkaloidů tropanového typu - kalysteginy, konvolvin, konvalidin, konvolamin.

Kalysteginy izolované z kořenů *Convolvulus arvensis* prokázaly v řadě testů významnou inhibiční aktivitu glukosidas a galaktosidas. Tyto účinky lze využít při léčbě některých virových a nádorových onemocnění. Trihydroxyalkaloid kalystegin A₃ způsobuje středně silnou inhibici β-glukosidas (K_i = 4.3 x 10⁻⁵ M) a slabou inhibici α-galaktosidas (K_i = 1.9 x 10⁻⁴ M). Kalysteginy skupiny B vykazují inhibiční aktivitu

vůči β -glukosidase ($K_i = 3 \times 10^{-6}$ M) a α -galaktosidase ($K_i = 7 \times 10^{-6}$ M). [72, 73]

2.3.2. Námelové alkaloidy

Jedná se zejména o produkty hub *Aspergillus*, *Penicillium* a *Rhizopus*. Alkaloidy byly také nalezeny v rostlinách v rodech *Ipomoea*, *Rivea* a *Convolvulus*. U alkaloidů lze pozorovat sympatolytické účinky (ergotamin) spojené se snížením krevního tlaku, sedativní a psychotomimetické působení (LSD). Předávkování námelovými alkaloidy (ergotismus) se projevuje konvulzivní a gangrenózní formou. Při konvulzivní formě převládají spastické kontraktury končetin. Při gangrenózní formě dochází k vazokonstrukci vedoucí v těžkých případech ke gangréně a ztrátě končetin. [71]

2.3.3. Pyrrolizidinové alkaloidy

Pyrrolizidinové alkaloidy se vyskytují v rodech čeledí Asteraceae, Fabaceae, Boraginaceae a také v některých zástupcích čeledi Convolvulaceae. Jedná se o esterově vázané alkaloidy tvořené bicyklickým pyrrolizidinovým skeletem a necikovou kyselinou. Alkaloidy jsou toxické ve formě terciárních bazí, které jsou nepolární a snadno pronikají membránami. Při detoxikačním procesu dochází ke vzniku kovalentní vazby pyrrolových derivátů s DNA a RNA. Působí hepatotoxicky, pneumotoxicky, neurotoxicky, karcinogenně a mutagenně. Klinicky dochází ke vzniku cirhózy a ascitu. Klíčovým syndromem je rozvoj venookluzivního onemocnění. [74, 75]

2.3.4. Flavonoidy

Jedná se deriváty fenylochromanu. Účinky záleží na počtu a poloze substituentů a na napojení cukrů a organických kyselin. V živém organismu se zapojují do oxidačně-redukčních procesů a jsou důležitými zametači volných radikálů. Mají schopnost normalizovat permeabilitu kapilár, vykazují protizánětlivou a antialergickou aktivitu, pravděpodobně díky působení na metabolismus arachidonové kyseliny. Flavonoidy dále vykazují estrogení, antiflogistickou, spasmolytickou, antihepatotoxickou, antimikrobiální, antivirovou, antifertilitní, antimutagení, antitrombotickou a vasoprotektivní aktivitu. Inhibují také velké množství enzymů, např. hyaluronidasu a brání tak šíření toxinů tkáněmi. [71, 76]

U flavonoidů byla také zjištěna inhibiční acetylcholinesterasová aktivita. V provedeném testu se 180 léčivými rostlinami vykazoval nejvyšší inhibiční aktivitu ethylacetátový extrakt z *Agrimonia pilosa* Ledeb. Následnou izolací byly získány 4 nejvíce aktivní látky (tilirosid, 3-methoxyquercetin, quercitrin a quercetin).

Signifikantní acetylcholinesterasová aktivita IC_{50} izolovaných látek byla 23,5 μ M, 37,9 μ M, 66,9 μ M a 19,8 μ M. Nejvyšší aktivitu tedy vykazoval quercetin. Klinicky používaná látka takrin má IC_{50} 0,1 μ M a berberin má IC_{50} 0,1 μ M. Aktivita byla hodnocena spektrofotometricky za použití Ellmanovy metody. [77]

Podle výsledků řady studií není mechanismus působení quercetinu přesně znám. Podle studie Heo H. J. a kol. může být způsoben ochranou neuronů před oxidačním stresem působícím nervové poškození. [78]

Quercetin podávaný myším intoxikovaným ethanolem prokázal signifikantní zlepšení učení a paměťových schopností myší. [79]

Quercetin byl také vyhodnocen díky své MAO inhibiční aktivitě jako vhodný podpůrný prostředek při podávání spolu s L-Dopou při léčbě Parkinsonovy nemoci a léčbě nežádoucích extrapyramidových účinků haloperidolu. [80, 81]

Nobiletin (flavonoid izolovaný z citrusů) vykazoval v testech provedených na myších významné působení na zlepšení paměťových funkcí bulb-ektomizovaných myší. Pravděpodobný mechanismus účinku spočívá v antagonismu N-methyl-D-aspartátu (NMDA) na receptorech a aktivaci kinas v oblasti hipokampu. [82, 83]

Flavonoidy izolované ze *Scutellaria baicalensis* Georgi podávané v dávce 35 mg/kg po dobu 20 dní výrazně zlepšily neuropatii a poruchy učení ischemizovaných krys druhu Sprague–Dawley. Hlavním místem působení byl hippokampus a mozková kůra. [84]

2.3.5. Kumariny

Jedná se o deriváty o-kumarové kyseliny vyskytující se buď ve volné formě, nebo glykosidicky vázané s cukry. K základní struktuře může být navíc přikondenzován furanový nebo pyranový cyklus. Jejich účinek je závislý na nenasyceném laktonovém kruhu. Nejčastěji jsou kumariny spojovány s antikoagulační aktivitou. Ta však není příliš významná, protože při průchodu GIT dochází k inaktivaci kumarinů a výsledný antikoagulační efekt je velmi slabý. Výjimkou je dikumarol, který působí jako antagonist vitamínu K a brzdí tvorbu protrombinu.

Kumarinům lze připisovat následující účinky: antiagregační, spasmolytické, antimikrobiální, fototoxické, hypnotické, antifungální, antiprotozoální, antioxidační, kardiotonické, venotonické, insekticidní, abortivní a antimutagenní. Ovlivňují také gastrointestinální trakt a tlumí CNS.

Mezi jejich nejvýznamnější toxické účinky lze zařadit fototoxicitu furanokumarinů. Furanokumariny senzibilizují pokožku na sluneční záření a působí

silné zarudnutí pokožky a alergické reakce. Furanokumariny dále podléhají cykloadici s pyrimidinovými bázemi DNA a narušují párování bází v DNA. Mají tedy mutagenní a karcinogenní aktivitu. [71, 76]

Kumariny mají také schopnost inhibovat toxické působení beta-amyloidu při rozvoji Alzheimerovy nemoci. Při podávání extraktu z *Angelica gigas* Nakai (0,1% roztok) po dobu 4 týdnů bylo zjištěno snížení tvorby beta-amyloidu indukovaného intracerebroventrikulární injekcí 410 pmol beta-amyloidu. Preventivní působení bylo také zjištěno při podávání izolovaného kumarinu decursinolu z *A. gigas* v koncentraci 0,001 – 0,004 % beze změny pohybové aktivity. [85]

Další provedené testy prokázaly schopnost kumarinů inhibovat aktivitu acetylcholinesterasy. Pozitivní působení bylo zjištěno u nodakeninu izolovaného z kořene *Angelica gigas*. Nodakenin v dávce 10 mg/kg u myši signifikantně zlepšil poškození kognitivních funkcí vyvolané podáváním skopolaminu. Nodakenin prokázal *in vitro* inhibiční aktivitu acetylcholinesterasy po dobu 6 hodin. [86]

Acetylcholinesterasová aktivita byla také zjištěna u skopoletinu a jeho glykosidu skopolinu. U obou látek byla předpokládána na základě provedeného virtuálního screeningu pomocí 3D modelu. Na základě těchto výsledků byla provedena izolace skopolinu a skopoletinu ze *Scopolia carniolica* Jaqc. a obě substance byly podrobeny enzymové analýze za použití Ellmanova činidla a mikrotitračních destiček. Výsledkem testu bylo prokázání střední, zato signifikantní, na dávce závislé a dlouhodobé inhibice acetylcholinesterasy. Zjištěná hodnota IC_{50} skopoletinu byla 168 μ M, IC_{50} hodnota galanthaminu se pohybuje mezi 1-2,5 μ M. Jedny z prvních *in vivo* testů provedených na krysím mozku prokázaly zvýšení intracelulární koncentrace acetylcholinu o 170 – 300 % při podání testovaných látek v koncentraci 2 μ mol. Galanthamin podávaný jako pozitivní kontrola vykazoval při použití stejné koncentrace stejnou aktivitu jako skopoletin. [87]

Antifungální aktivita byla zjištěna u skopolinu a dalších kumarinů. Při kombinaci s antifungálními látkami bylo zjištěno synergické působení skopoletinu. [88, 89]

Skopoletin v dalších testech prokázal velké množství účinků, mezi které patří protizánětlivé a antiproliferativní účinky, inhibice tvorby oxidu dusnatého, prostaglandin synthasy a inhibice monoamin oxidasy. [90, 91, 92, 93, 94, 95]

2.4. Nootropní aktivita rostlinných preparátů

Zdraví současné populace je silně poznamenáno rozvojem tzv. civilizačních chorob. Tento stav je spojován s životním stylem obyvatel a zhoršováním kvality životního prostředí v obecné míře po celé planetě, zvláště však v průmyslově vyspělých zemích. Mezi tyto choroby patří také poruchy kognitivních funkcí mozku, které jsou doprovázeny poruchami paměti, učení, poznávání, orientace, pozornosti apod. Tyto poruchy jsou spojeny s řadou organických či toxických poškození mozku, dále s Alzheimerovou nemocí, různými typy demencí, psychotickými stavy, hypoxií, ischemií mozku, intoxikací alkoholem, metabolickým stresem, tvorbou apolipoproteinu, deficitem neurotransmiterů, intoxikací hliníkem apod. [96]

Jednou z nejzávažnějších demencí je Alzheimerova nemoc. První případ výskytu této nemoci byl jako jeden z kuriózních případů popsán v roce 1907 německým psychiatrem Aloisem Alzheimerem. Od té doby výskyt onemocnění narůstá a např. v Americe toto onemocnění již přesáhlo počet 4 milionů nemocných. Postihuje převážně lidi nad 65 let a četnost výskytu se každým rokem v důsledku stárnutí populace zvyšuje. Nemoc je provázena degenerativními změnami v mozkové tkáni a tvorbou patologických bílkovin. Je snížena aktivita mozkové acetylcholintransferasy, což vede k nedostatečné tvorbě acetylcholinu (ACH). V důsledku těchto změn dochází k poruše kognitivních funkcí a k degeneraci cholinergních neuronů. Léčba spočívá v ovlivnění cholinergního systému v mozku. V praxi dosáhlo největšího uplatnění použití inhibitorů acetylcholinesterasy (ACHE) a nekompetitivních inhibitorů receptorů N-methyl-D-aspartátu (NMDA) excitačních aminokyselin (memantin). [97, 98, 99]

Léčiva ovlivňující kognitivní funkce působí fyziologickými cestami, účinek nastává až po delší době a jejich užívání nevede k návyku. Léčiva lze rozdělit do tří skupin – nootropika, kognitiva, neuroprotektiva. Hranice skupin se částečně překrývají a jeden přípravek lze často zařadit do více skupin. Je to dáno podobným mechanismem účinku jednotlivých léčiv, popřípadě má léčivo více mechanismů účinku. Ačkoliv se objevují názory a argumenty, že účinek těchto přípravků je snadno zpochybnitelný a jejich užívání nevede k přesvědčivým výsledkům, bylo v celé řadě kontrolovaných studií prokázáno pozitivní působení těchto přípravků na zlepšení mozkových funkcí. [100, 101]

2.4.1. Nootropika

Jedná se o skupinu látek, které zlepšují narušené metabolické funkce mozku např. obnovou oxidačně – redukčních funkcí a glukosového metabolismu. Používají se při léčbě následků poškození mozku, traumatech, cévních mozkových příhodách, akutních intoxikacích apod. Tyto stavy se projevují dezorientací, zmateností a poruchami koncentrace na určitou činnost. Účinnost při chronických projevech (demence) však není dostatečně ověřena. Léčiva se podávají během léčby a dále pak 2 - 3 týdny po odeznění sledovaných poruch. Obecně lze říci, že nootropika působí aktivaci energetického metabolismu nervových buněk a chrání buněčné membrány. Významnou úlohu v mechanismu vzniku poruch hraje také ovlivnění GABA receptorů. Řadíme sem piracetam, pyritinol, meklofenoxát, klomethiazol, leviracetam a další. Nově se sem také řadí inhibitory NMDA receptorů – memantin. [97, 99, 100, 102, 103]

2.4.2. Kognitiva

Jedná se o látky, které zlepšují funkci centrálního cholinergního systému. Patří sem centrálně působící inhibitory ACHE, agonisté ACH receptorů a prekurzory ACH. Společným znakem těchto léčiv je, že zvyšují koncentraci ACH v místech nervových synapsí v mozku. Léčiva patřící do této skupiny se významně uplatňují při léčbě Alzheimerovy nemoci. [97, 100, 102]

Z prekurzorů ACH se perspektivní ukázalo podávání cholinu. Jeho nevýhodou je, že pot léčeného nepříjemně páchne rybinou. Z těchto důvodů se podávají prekurzory cholinu např. lecithin. Tyto látky se musí podávat po dobu až 6 měsíců v dávkách 25 - 50 g denně. Lecithin se také objevuje jako součást různých potravních doplňků.

Inhibitory ACHE zvyšují biologickou dostupnost ACH inhibicí jeho odbourávání v místě nervových spojů. Do této skupiny patří takrin, selegilin, námelové alkaloidy, nicergolin a další.

2.4.3. Neuroprotektiva

Jedná se o látky, které různými mechanismy chrání nervové buňky a jejich fyziologické funkce před poškozením. Řadíme sem zametače volných radikálů („scavengery“), blokátory ionotropních receptorů excitačních aminokyselin, blokátory napěťově řízených kalciových kanálů, protizánětlivá léčiva, látky působící jako nervové růstové hormony nebo jejich prekurzory apod. Volné radikály představují díky své vysoké reaktivitě významné nebezpečí poškození buněk. Jsou to látky, které vznikají během buněčného metabolismu v procesu oxidace a redukce a jejich výskyt

v buňce je přísně kontrolován. Účastní se řady důležitých reakcí a jejich přítomnost je v regulovatelné míře pro tělo potřebná. Na jejich odbourávání se podílí enzym superoxid dismutasa, peroxidasa a katalasa a látky jako glutathion, askorbová kyselina, taurin, tokoferol, karotenoidy a další. Stárnutím organismu se aktivita těchto kontrolních mechanismů snižuje a volné radikály se pak účastní řady patologických procesů včetně cerebrovaskulárních poruch vedoucích k poruchám kognitivních funkcí. Používání přípravků s antioxidačním působením pomáhá snížit riziko nadbytku volných radikálů a jejich patologické působení. [102]

Působení přírodních přípravků je komplexní, jednotlivé látky působí různými mechanismy a někdy lze jen stěží zařadit jednotlivé přípravky do skupiny kognitiv, nootropik nebo neuroprotektiv. Rostlinné metabolity se také staly výchozími strukturami pro přípravu řady molekul používaných v této oblasti. [104]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Laboratorní potřeby a pomůcky

3.1.1. Chemikálie a rozpouštědla

- aceton p. a.
- anilin č.
- n-butanol p. a.
- diethylether p. a.
- ethanol 95% denaturovaný 5 % methanolu
- ethylacetát p. a.
- fosforečná kyselina 85% p. a.
- chlorid manganatý tetrahydrát p. a.
- chloristá kyselina 70% č.
- chloroform p. a.
- isopropanol p. a.
- methanol p. a.
- mléčná kyselina č.
- mravenčí kyselina 85-87% č.
- ninhydrin p. a.
- octová kyselina 99,8% p. a.
- petrolether (40-60 °C) č.
- sírová kyselina 96% p. a.
- toluen p. a.
- vanilin 99%
- standardy L-aminokyselin (čistota p. a.): alanin, arginin, asparagin, asparagová kyselina, cystein, fenylalanin, glutamin, glutamová kyselina, glycin, histidin, leucin, lysin, methionin, prolin, serin, tryptofan, tyrosin, valin
- standardy cukrů (čistota p. a.): fruktosa, glukosa, ribosa, sacharosa
- standardy flavonoidů (čistota p. a.): aeskulin, apigenin, hesperetin, hesperidin, kemferol, kvercetin, kvercitrin, naringenin, rutin
- standardy kyselin (čistota p. a.): chlorogenová k., ferulová k., kávová k., o-kumarová k., skořicová k., vanilová k.
- standardy kumarinů (čistota p. a.): 4-hydroxykumarin, 6-methylkumarin, skopoletin, umbelliferon
- standardy mastných kyselin (čistota p. a.): palmitová k., stearová k., olejová k..

3.1.2. Eluční soustavy (mobilní fáze) pro TLC

S1 - CHCl₃

S2 - CHCl₃ : EtOH – 95:5

S3 - CHCl₃ : EtOH – 9:1

S4 - CHCl₃ : EtOH – 9:1, 6x eluce

S5 - CHCl₃ : EtOH – 8:2

S6 - CHCl₃ : EtOH – 8:2, 2x eluce

S7 - CHCl₃ : MeOH – 95:5

S8 - CHCl₃ : MeOH – 9:1

S9 - CHCl₃ : MeOH – 8:2

S10 - CHCl₃ : MeOH – 7:3

S11 - CHCl₃ : toluen – 9:1

S12 - petrolether : toluen – 50:50

S13 - toluen : ethylacetát – 9:1

S14 - CHCl₃ : EtOH : toluen – 92:3:5

S15 - isopropanol : aceton : 0,1 M mléčná k. – 4:4:2

S16 - n-butanol : octová k. : voda – 4:1:2

S17 - ethylacetát : mravenčí k. : octová k. : voda – 100:11:11:26

3.1.3. Detekční činidla [105, 106]

○ D1 - UV 254 nm

○ D2 - UV 365 nm

○ D3 - 3 ml 1% roztoku vanilinu v EtOH + 0,5 ml 10% sírové k. konc., po postřiku zahřát na 105 °C, důkaz alkoholů, fenolů, steroidů, silic

○ D4 - anilin - difenylamin - H₃PO₄ - aceton – 2 ml + 2 g + 10 ml + 100 ml - po postřiku zahřát na 85 °C - činidlo na redukující cukry

○ D5 - Pauliho činidlo - 1 g sulfanilové k. rozpuštěný v 10 ml 12N HCl se smísí s 10 ml 4,5% NaNO₂ aq. (0 °C), po 15 minutách se přidá 20 ml 10% NaCO₃, důkaz fenolů, aminů, heterocyklů

○ D6 - β-aminoethylester difenylborité k. - 1% MeOH roztok, detekce při 365 nm, důkaz flavonoidů

○ D7 - ninhydrin - kollidin – (roztok I – 50 ml 0,2% roztoku ninhydrinu v EtOH +10 ml ledové octové k. + 2 ml 2,4,6-kollidinu; roztok II – 1% roztok Cu(NO₃)₂ v EtOH, před použitím se roztok I a II smísí v poměru 5:3, po postřiku zahřát 1-2 min. při 105 °C. důkaz aminokyselin

- D8 - anisaldehyd - sírová k. – 1 ml sírové k. konc. je přidán do roztoku 0,5 ml anisaldehydu v 50 ml octové k., po postřiku zahřát na 105 °C, detekce na cukry, steroidy, terpeny
- D9 – fosfomolybdenová k. – 10% roztok v EtOH, po postřiku zahřát na 120 °C, detekce na redukující látky
- D10 - anilin - ftalát – 0,93 g anilinu a 1,66 g o-ftalové k. se rozpustí ve 100 ml n-butanolu nasyceného vodou, detekce na redukující cukry
- D 11 - anisidin - ftalát – 0,1 M roztok p-anisidinu a ftalové k. v 95% EtOH, detekce na redukující cukry
- D 12 - KOH - 5% MeOH roztok KOH, po postřiku pozorování v UV 365 nm, důkaz kumarinů, anthrachinonů
- D 13 - Jodoplatičitan draselný – 3 ml 10 % roztoku hexachloroplatinové kyseliny se smísí s 97 ml vody a 100 ml 6 % vodného roztoku jodidu draselného, důkaz alkaloidů a jiných dusíkatých sloučenin
- D 14 - Dragendorffovo činidlo – Roztok A: 850 mg zásaditého dusičnanu bismutitého se smísí se 40 ml vody a přidá se 10 ml octové kyseliny, roztok B: 8 g jodidu draselného se rozpustí ve 20 ml vody. Zásobní roztok se získá smísením stejných objemů roztoku A a B. Před detekcí se ředí v poměru 10 ml zásobního roztoku, 20 ml kyseliny octové 99 %, 100 ml vody, důkaz alkaloidů

3.1.4. Chromatografický a separační materiál

Silikagel 40/160, 100/200, 200/400 aktivovaný, deaktivovaný (Lachema Brno)

Sephadex LH-20 (Sigma Aldrich)

Diaion HP-20 (polyaromatická pryskyřice pro hydrofóbní látky, Supelco)

Polyamid 0,1-0,2 mm (příprava z perel)

TLC hliníkové desky, Silikagel 60 F₂₅₄ (Merck)

TLC skleněné desky Silikagel 60 (Merck)

3.1.5. Přístroje a laboratorní technika

○ Vakuová odparka Laborota 20 Heidolph

○ Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114

○ Vodní lázeň Büchi Waterbath B-480

○ Horkovzdušná sušárna HS 31A

○ Topná deska Fischer Scientific 100H

○ UV Lampa Camag 254/365 nm

○ Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10 P (Bandelin)

- Digitální váhy Kern 572, 440-35A, 440-49
- Digitální váhy analytické AND HR-120
- Centrifuga Boeco U-32R
- Třepačka IKA MSI Minishaker
- Varná deska Heidolph MR 3001K
- Digitální stopky Eurochron
- Digitální fotoaparát Fomei
- Microplate reader Anthos 2010
- UV spektrofotometr Shimadzu 1601
- Mikrovýhřevný stolek Boetius
- Polarimetr Bellingham – ADP220 Stanley Ltd.
- IČ spektrofotometr Nicolet Impact 400
- Camag TLC Scanner 3 a nanášecí zařízení Linomat 5 firmy Camag
- Analyzátor EA 1110 CHNS-O Carlo Erba Instruments
- HPLC Merck, WellChrom pumpa K-1800, detektor DAD K-2700
- GC Fissons 8000
- MS Turbo Mass Perkin-Elmer
- NMR - Varian Mercury – Vx BB 300
- FIALab 3000 analyser s USB 2000-UV/VIS spektrofotometrem
- Agregometr $[Ca^{2+}]_i$ typ 500-Ca (Chrono-Log Corp., USA)

3.2. Použité extrakční metody, separace a strukturní analýzy

3.2.1. Perkolace

Jedná se o separační metodu, při které dochází ke kontinuální extrakci pevného materiálu protékajícím rozpouštědlem. Nejčastěji se provádí za normální teploty. K tomuto účelu se používají skleněné nádoby kuželového tvaru (tzv. perkolátory). Nejprve se rozdrobněná droga smísí s dostatečným množstvím daného rozpouštědla a ponechá se několik hodin stát. Poté se umístí do perkolátoru, převrství rozpouštědlem, zatíží sítím z nerezové oceli a perkolátor se nechá 2-3 dny v klidu. Rychlost průtoku rozpouštědla odpovídá 1/40 pracovního objemu zařízení za 1 hodinu. Kontinuálnost extrakce je zajišťována doplňováním čistého rozpouštědla do perkolátoru. [107]

3.2.2. Extrakce za využití ultrazvuku

Metoda je vhodná k extrakci malého množství extraktu na ultrazvukové vodní lázni za pokojové či zvýšené teploty. Jedná se o diskontinuální extrakční metodu.

Rozpouštědlo se po stanovené době extrakce odfiltruje a extrakci je možno opakovat s novou dávkou rozpouštědla až do totálního vyextrahování rostlinného materiálu. Použití ultrazvuku zvyšuje účinnost extrakce z důvodu rozbití buněčných struktur.

3.2.3. Vytřepávání

Tato extrakční metoda je založena na distribuci látek mezi dvě vzájemně nemísitelná rozpouštědla. V jednom z nich se látka musí hromadit více, aby měla extrakce smysl. Metoda se nejčastěji používá na rozdělení celého komplexu látek z extraktu na skupiny látek s různou polaritou. Petrolether se používá na odstranění chlorofylů a látek vysoce nepolárních. Diethylether se následně používá na získání látek se střední polaritou a zbylý extrakt pak obsahuje látky polární.

3.2.4. Sloupcová chromatografie

Kolony určené ke sloupcové chromatografii byly připraveny nalitím suspenze rozpouštědla a adsorbentu do chromatografické trubice. Jako adsorbenty byly použity silikagel 40/160, 100/200 a 200/400 s 10-12 % vody, polyamid 0,1-0,2, diaion HP-20 a sephadex LH-20.

Silikagel:

Silikagel byl aktivován v sušárně 4 hodiny při 160°C. Po zchladnutí byl deaktivován 10 % vody (resp. 12 %) a dokonale promísen. Vzorek byl nanášen na kolonu ve formě roztěru. Roztěr byl připraven smísením rozpuštěného vzorku s dvojnásobným množstvím silikagelu (počítáno na suchý extrakt). Rozpouštědlo bylo odpařeno za zvýšené teploty (do 40°C) a roztěr byl nanesen na kolonu.

Polyamid:

Polyamid byl připraven ze surových polyamidových perel. Perly (60 g) byly 20 minut vařeny s 500 ml koncentrované octové kyseliny pod zpětným chladičem. Po odstavení a zchladnutí byla kyselina odfiltrována, vyvločkový polyamid odsát a promyt vodou do neutrální reakce. Nakonec byl polyamid vysušen a přesítován na velikost 0,1-0,2 mm. Extrakt se nanáší přímo naléváním na sloupec [107]. Polyamid se používá k oddělení látek fenolového typu od zbytku extraktu. Na sloupec se extrakt nanáší ve vodě, sloupec se pak promývá vodou, aby se vymyly polární látky. Látky fenolového typu se ze sloupce vymyjí ethanolem.

Diaion HP-20:

Extrakt se nanáší přímo naléváním na sloupec diaionu ve vhodném rozpouštědle. Principem dělení je schopnost diaionu vázat ve vodném roztoku extraktu látky nepolárního charakteru, ostatní látky (polární látky, např. cukry) lze ze

sloupce vymýt vodou. Fenolové látky se ze sloupce diaionu vymyjí ethanolem a sloupec lze pak znovu použít.

Sephadex LH-20:

Před nalitím do kolony se nechá sephadex 2-3 hodiny bobtnat ve zvoleném rozpouštědle a poté se suspenze naplní do kolony. Extrakt se nanáší přímo naléváním na sloupec sephadexu.

3.2.5. Tenkovrstvá chromatografie

Kontrolní TLC

Chromatografie byla prováděna vzestupným, jednosměrným vyvíjením TLC desek v komoře nasycené parami mobilní fáze. Roztoky byly nanášeny v koncentraci 1-2 % pomocí kapilár nebo za pomoci nanášecího zařízení Linomat 5 v atmosféře dusíku. Hodnocení bylo prováděno za použití UV lampy Camag poskytující UV záření 254 a 365 nm a přístrojově pomocí UV detektoru denzitometru Camag TLC Scanner 3. Další hodnocení bylo provedeno za využití detekčních činidel.

Preparativní TLC

Preparativní chromatografie byly prováděny na komerčních skleněných deskách Silikagel 60 (Merck) a na deskách připravených nalitím silikagelu LS 5/40 s 13 % sádry. Desky byly před použitím promyty vyvinutím v MeOH. Extrakt v rozpouštědle byl nanášen pomocí nanášecího zařízení Linomat 5 a programu Wincats (firma Camag) v jednom pruhu. Vyvíjení desek probíhalo klasickou metodou, tedy vzestupně. Po vyvinutí byly odpovídající zóny vyškrabány a vyextrahovány vhodným rozpouštědlem.

3.2.6. Odpařování rozpouštědel z extraktů a vzorků

Odpařování velkých objemů rozpouštědel z extraktů probíhalo na zařízení Laborota 20 firmy Heidolph za sníženého tlaku 1,3 kPa. Menší objemy rozpouštědel byly odpařeny na rotační vakuové odparce Büchi Rotavapor R-114 za sníženého tlaku 1,3 kPa. Mikromnožství těkavých rozpouštědel byla odpařena v proudu dusíku. Dosušení extraktů probíhalo ponecháním extraktu v exsikátoru za sníženého tlaku (700 Pa) nad bezvodými perlami silikagelu po dobu 15 hodin.

3.2.7. Homogenizace

Rozpouštění vzorků, homogenizace suspenzí a mikroextrakce byly prováděny v ultrazvukové lázni Sonorex Super 10P.

3.2.8. Měření fyzikálně-chemických vlastností

- Teploty tání (t.t.) byly stanoveny na mikrovýhřevném stolku Boetius, nejsou standardně korigované.
- Měření optické otáčivosti bylo provedeno na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK na přístroji Bellingham – ADP220 Stanley Ltd. v 1 ml kyvetě délky 10 cm.
- Měření infračervených spekter bylo provedeno na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK na spektrofotometru Nicolet Impact 400 v tabletě KBr.
- Měření UV spekter skvrn na TLC bylo provedeno pomocí UV detektoru přístroje Camag TLC Scanner 3 za použití programu Wincats verze 1.2.6 se současným využitím nanášecího zařízení Linomat 5. UV spektra čistých látek byla měřena v methanolu pomocí spektrofotometru Shimadzu UV-1601 za použití programu UV-Probe verze 1.10.
- Elementární analýza byla provedena na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv FaF UK na analyzátoru EA 1110 CHNS-O Carlo Erba Instruments.
- Kvantitativní HPLC stanovení kumarinů bylo provedeno na přístroji Merck, WellChrom pumpa K-1800, detektor DAD K-2700, kolona Merck, Purospher RP₁₈ endcapped, 5 μm, 250x 4mm, předkolony Tessek, SGX C₁₈, CGC 30 x 3mm, 7 μm.
- Kvantitativní stanovení polyolu bylo provedeno na zařízení GC Fissons 8000 s detekcí FID na pracovišti ve Fakultní nemocnici v HK (Laboratoř gerontologické a metabolické kliniky FNHK, MUDr. Radomír Hyšpler, PhD).
- GC/MS analýza byla provedena na přístroji Turbo Mass Perkin-Elmer metodou studené transmethylace ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.
- Měření NMR spekter (nukleární magnetická rezonance) bylo provedeno na přístroji Varian Mercury – Vx BB 300 v Laboratoři struktury a interakcí biologicky aktivních molekul FaF UK v Hradci Králové (¹H NMR 300 MHz a ¹³C NMR 75,46 MHz). Spektra byla měřena v CDCl₃, CDCl₃-D₂O a CD₃OD. Chemické posuny jsou vztaženy k referenční látce tetramethylsilanu pomocí zbytkového rozpouštědla a jsou uvedeny v jednotkách ppm. Interakční konstanty jsou udány v jednotkách Hz.
¹H data jsou uvedena v pořadí: chemický posun, počet protonů, multiplicita (s-singlet, d-dublet, dd-dublet dubletů, t-triplet, m-multiplet, b-rozšíření signálu, overlapped - překryv s jiným signálem), interakční konstanty – Hz, ¹³C data jsou uvedena jako výčet chemických posunů.

3.2.9. Hodnocení biologické aktivity

- Hodnocení antioxidační aktivity DPPH testem bylo provedeno na přístroji FIALab 3000 analyser (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA), s pístovým čerpadlem o objemu 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, USB 2000-UV/VIS spektrofotometrem se zdrojem světla LS-1 (Ocean Optics, USA), SMA-Z průtokovou celou (1cm délka) za použití programu FIALab pro Windows verze 5.9.126.
- Hodnocení antioxidační aktivity FRAP testem bylo provedeno v 96 jamkových destičkách na přístroji Antos microplate reader 2010 a programu Winread.
- Hodnocení antiagregační aktivity bylo provedeno za použití agregometru Bornova typu - Whole blood lumi-agregometer $[Ca^{2+}]_i$ typ 500-Ca (výr. Chrono-Log Corp., USA) s využitím softwaru Aggro/Link verze 4.75.

3.3. Rostlinný materiál a jeho extrakce

Suchá droga původem z Indie byla dodána firmou Avicenna Company, spol. s.r.o, Nad vršovskou horou 88/4, 101 01, Praha 10. Totožnost drogy byla potvrzena listem o verifikaci dodaným výrobcem. Droga byla tvořena řezanou natí.

3.3.1. Postup přípravy surového extraktu a základní separace

K extrakci bylo použito 8,8 kg řezané natě. Ta byla provlhčena 95% ethanolem (EtOH), dána do perkolátoru a po 3 dnech perkolována 95% EtOH v poměru 1:15. Celkové množství získaného extraktu bylo 123 litrů. Po odpaření rozpouštědla z extraktu (extrakt byl vizuálně tmavě zelený a viskózní) následovalo jeho vytřepávání do různě polárních rozpouštědel. Extrakt zbavený rozpouštědla byl rozpuštěn v 4800 ml methanolu (MeOH) a po přidání 1200 ml vody byl extrakt vytřepán 4x 1400 ml petroletheru (Pe). Spojené petroletherové frakce (FPe) byly zbaveny rozpouštědla na vakuové odparce.

Zbylý extrakt byl zbaven stop petroletheru probubláváním dusíkem. Extrakt byl dále rozpuštěn v 1200 ml 95% EtOH a za tepla (40 °C) a míchání bylo přidáno 4800 ml vody. Vyloučila se hnědozelená pryskyřičnatá hmota, která byla odfiltrována a promyta malým množstvím 20% EtOH.

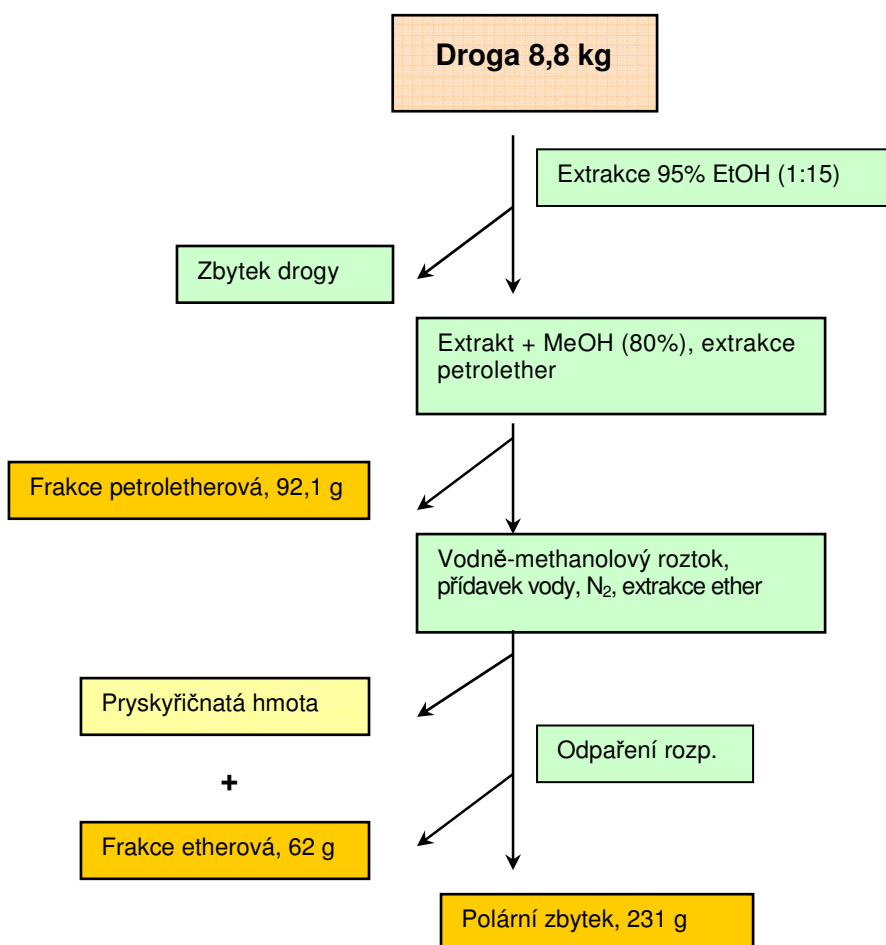
Zbylý extrakt byl zbaven organického rozpouštědla (40 °C, vakuová odparka), doplněn vodou na 6900 ml a po zchlazení vytřepán 5x 1300 ml etheru (Et₂O). Etherové fáze byly spojeny a rozpouštědlo bylo odpařeno. Na základě TLC byla spojena frakce etherová (FEt₂O) s pryskyřičnatou hmotou (celkem 69,7 g). Ether byl

ze zbylého extraktu při 30-40 °C odstraněn zaváděním dusíku do extraktu a následně byl extrakt za sníženého tlaku zbaven rozpouštědla – jedná se o polární zbytek (PZ).

Tab. č. 1: Výtěžky jednotlivých částí:

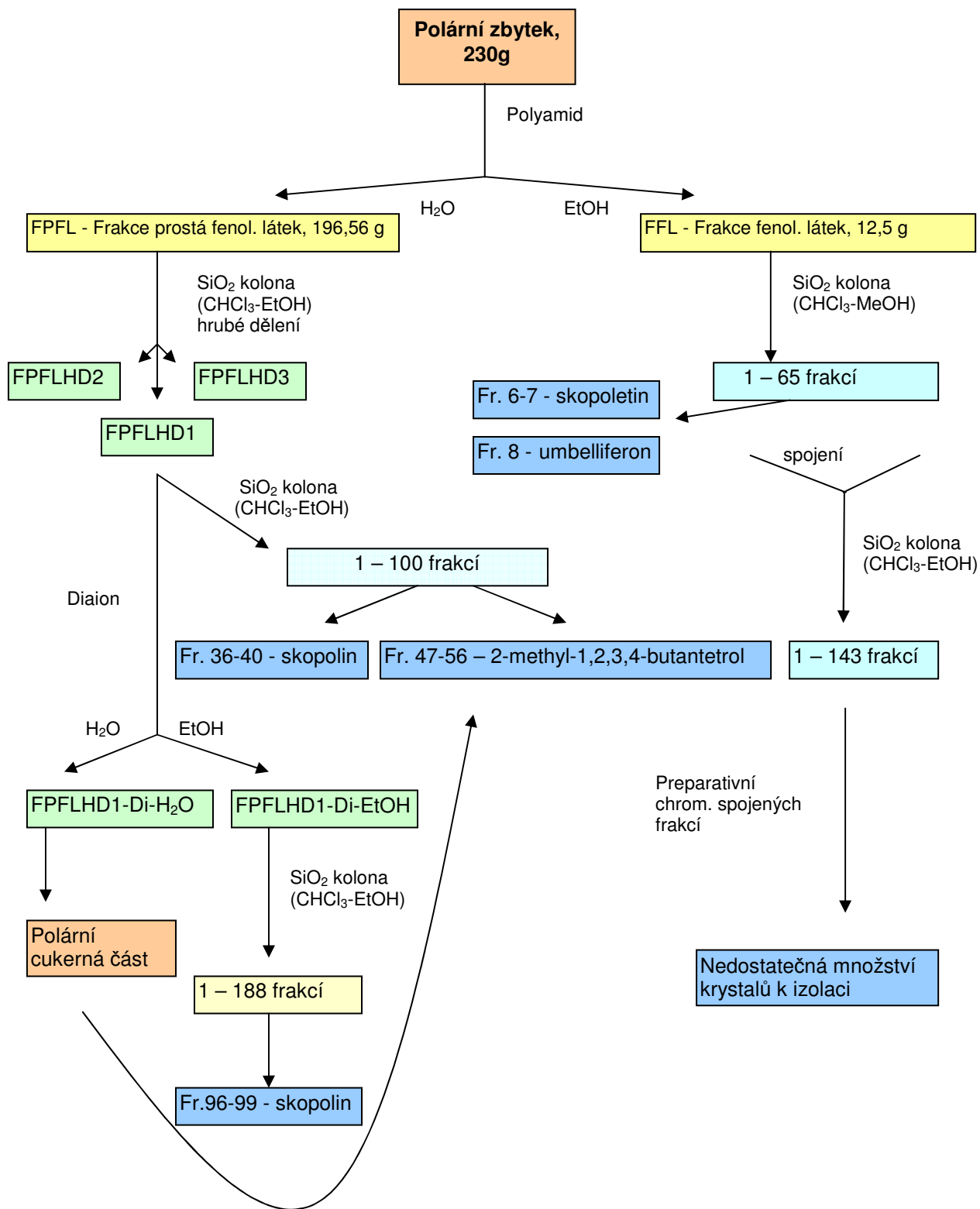
Část extraktu	Hmotnost	Popis
Frakce petroletherová	92,1 g	Tmavě zelený, řídce olejovitý
Frakce etherová	69,7 g	Tmavě hnědý, olejovitý
Polární zbytek (PZ)	231 g	Hnědý, řídce olejovitý

Obr. č. 2: Grafické znázornění základního extrakčního postupu



3.4. Chromatografická separace polárního zbytku

Obr. č. 3: Schéma separačního procesu:



3.4.1. Separace polárního zbytku na sloupci polyamidu

Předem připravený 1 kg polyamidu (viz. kapitola 3.2.4) byl vysušen a přesítován na velikost částic 0,1-0,2 mm. Takto připravený polyamid byl suspendován ve vodě a nalit do kolony. 230 g polárního zbytku bylo rozpuštěno ve vodě na 7% roztok, ten byl přefiltrován přes vatou, kde byly zachyceny pevné částice nerozpuštěných látek a filtrát byl nalit postupně na kolonu.

Tab. č. 2: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Polyamid 0,1-0,2 mm, 770 g
Dělicí vrstva	:	1050 x 64 mm
Mrtvý objem	:	3200 ml
Nanáška	:	230 g

Po odečtení části mrtvého objemu (2000 ml) byla zachycena vodná frakce. Sloupec polyamidu byl promyt 7000 ml destilované vody a celkem bylo získáno 8200 ml frakce prosté fenolových látek (FPFL).

Sloupec byl dále promýván 95% EtOH a při 2/3 promytí kolony začala být zachycována frakce fenolových látek (FFL). Do kolony bylo nalito celkem 7500 ml EtOH. Z kolony bylo zachyceno celkem 5000 ml FFL. Obě frakce (FPFL, FFL) byly zbaveny rozpouštědla na vakuové odparce.

Tab. č. 3: Zisk z dělení

Podíl	Odparek (g)
Zbytek na filtru	1,05
FFL	12,5
FPFL	196,5

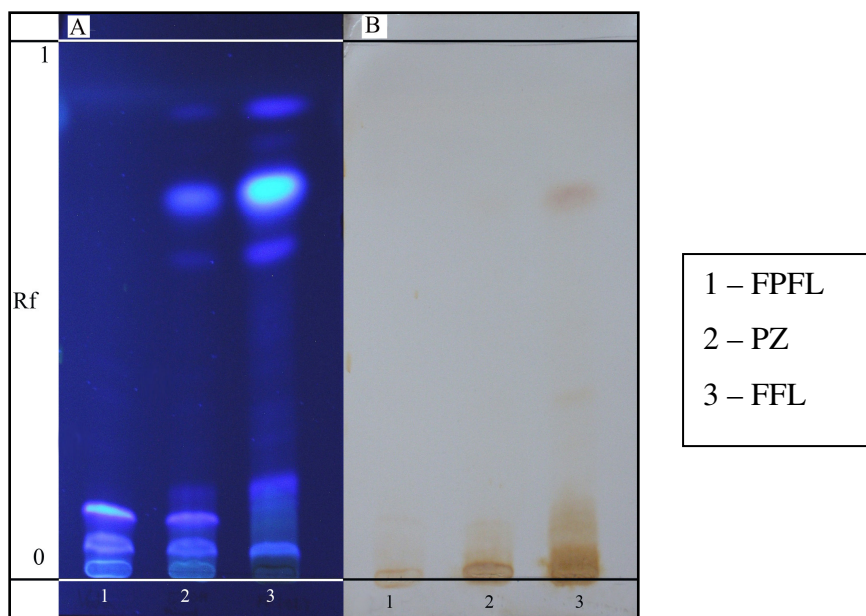
Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent : TLC Al-desky, Silikagel 60 F₂₅₄

Eluční soustava : S8

Detekce : A – D2, B – D5

Obr. č. 4:



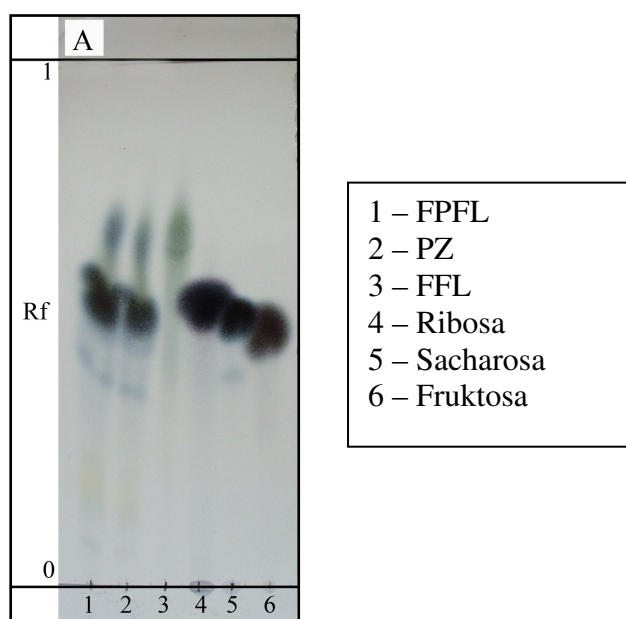
TLC důkaz cukrů

Adsorbent : TLC Al-desky, Silikagel 60 F₂₅₄

Eluční soustava : S15

Detekce : A – D4

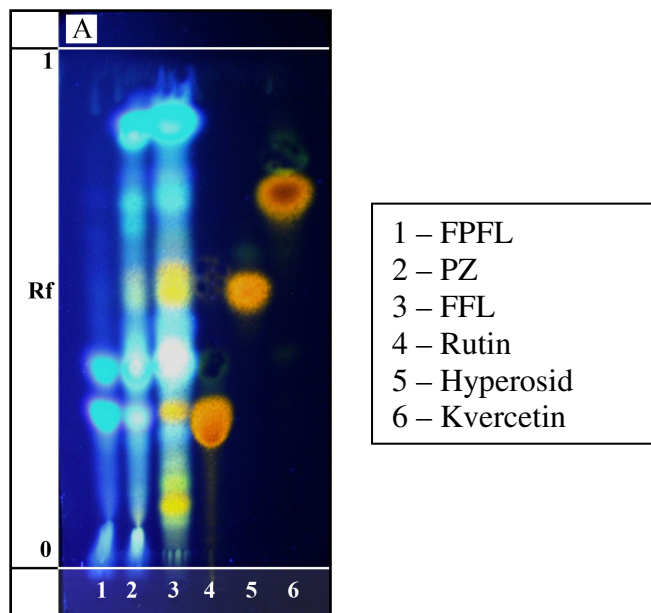
Obr. č. 5:



TLC důkaz fenolových látek:

Adsorbent : TLC Al-desky, Silikagel 60 F₂₅₄
Eluční soustava : S17
Detekce : A – D6

Obr. č. 6:



3.4.2. Sloupcová chromatografie FFL na silikagelové koloně

Tab. č. 4: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Silikagel L 100/200, 1200 g, 12 % vody
Dělicí vrstva	:	950 x 64 mm
Mrtvý objem	:	2100 ml CHCl ₃
Nanáška	:	10,5 g
Frakce zachycovány po 400 ml		

Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent : TLC Al-desky, Silikagel 60 F₂₅₄
Eluční soustava : S8 - *frakce 1-35*:
S17 - *frakce 35-65*
Detekce : D1, D2, D3

Tab. č. 5: Přehled frakcí

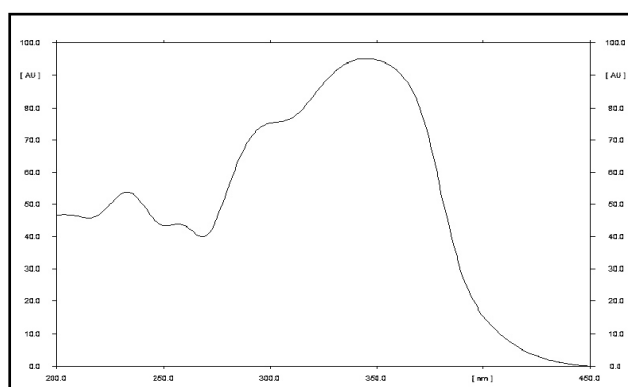
Eluční soustava CHCl ₃ :MeOH	Získané frakce	Spojeno dle TLC		
100 : 0	0	1750 ml mrtvého objemu		
99 : 1	1	0-1		
98 : 2	2	2	3	
95 : 5	3 - 9	4 - 5	6 - 7 – (1)	8 – (2)
90 : 10	10 - 11	9 – 15	16	
80 : 20	12 - 19	17	18	19 - 20
70 : 30	20 - 34	21	23	26 - 29
		22	24 - 25	30 - 32
50 : 50	35 - 54	33 - 37	40 - 45	47 - 49
		38 - 39	46	50 - 54
0 : 100	55 - 65	55 – 61	62 - 65	

Frakce 1-65 byly na základě TLC analýzy spojeny do 26 kvalitativně odlišných frakcí.

3.4.2.1. Separace spojené frakce 6-7 – izolace látky 1

Spojená frakce 6-7 představovala 60 mg směsi několika látek na TLC patrných třemi skvrnami s majoritní skvrnou o hodnotě R_f 0,54 v mobilní fázi S7. Majoritní skvrna vykazovala pod UV 365 nm intenzivní modrou fluorescenci. Po postřiku činidlem D5 se látka barví intenzivně červeně (důkaz na fenolové látce). Po postřiku chromatogramu činidlem D12 dojde k barevnému posunu fluorescence z modré na žlutou barvu. Spojená frakce byla podrobena trojnásobné rekrystalizaci za horka ve směsi CHCl₃:MeOH – 20:80 a vzniklé krystaly byly následně odsáty na mikrofiltračním zařízení. Čistící operací bylo získáno 25 mg krystalů jehlicovitého tvaru a bílé barvy, získané čisté látky 1. Čistota byla ověřena pomocí TLC a HPLC. U skvrny bylo změřeno na chromatogramu UV spektrum pomocí UV detektoru denzitometru Camag TLC scanner 3. Látka vykazovala při spektrofotometrické analýze v UV oblasti 4 maxima a 2 minima. (λ_{\max} – 234, 258, 300, 349 nm a λ_{\min} – 215, 270 nm).

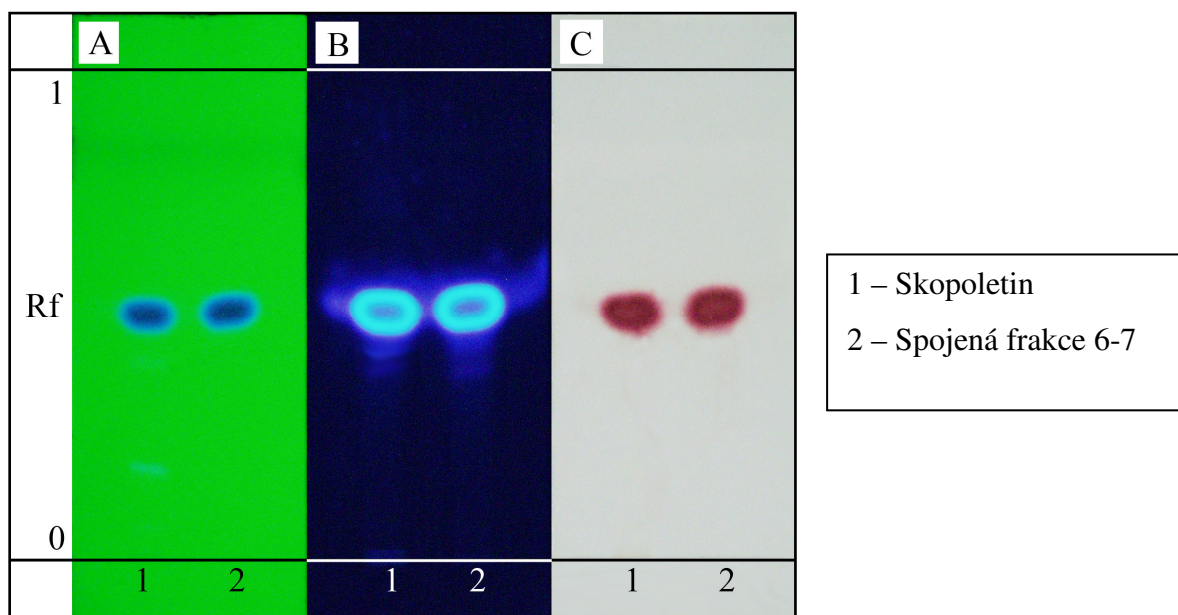
Obr. č. 7: UV spektrum látky 1



Eluční soustava: S2

Detekce: A – D1, B – D2, C – D5

Obr. č. 8: TLC látky 1



Látka **1** byla odeslána na ^1H a ^{13}C NMR analýzu a byla identifikována na základě měření jako **skopoletin**. Výsledky měření a fyzikálně-chemické vlastnosti viz. kap. 3.7.1. izolované látky.

3.4.2.2. Separace frakce 8 – izolace látky 2

Frakce 8 představovala 84 mg směsi převážně dvou látek patrných na TLC skvrnami s Rf hodnotami 0,54 a 0,44 v mobilní fázi S7. Obě skvrny vykazovaly pod UV 365 nm intenzivní modrou fluorescence, přitom fluorescence skvrny o nižší Rf hodnotě byla intenzivnější a skvrna s vyšším Rf odpovídala skopoletinu. Po postřiku činidlem D5 se obě látky barví intenzivně červeně (důkaz na fenolové látky). Po postřiku chromatogramu činidlem D12 dojde k barevnému posunu fluorescence z modré na žlutou barvu. Frakce byla podrobena několikanásobné rekrystalizaci v MeOH za horka a následnému odsátí vzniklých krystalů na mikrofiltračním zařízení. Čistící operace byla značně ztrátová a získaná látka obsahovala stále znečištěniny.

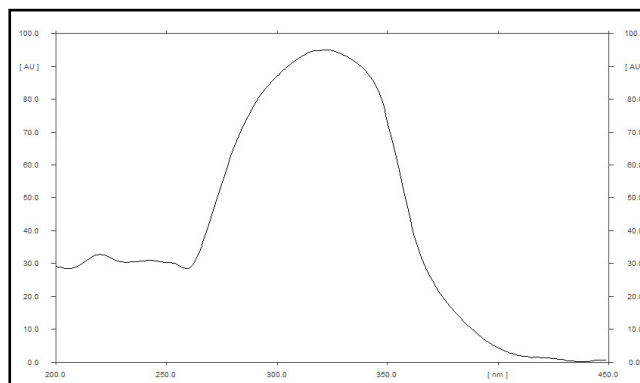
Vyčištění proběhlo sloupcovou chromatografií za následujících níže uvedených podmínek (viz. tab. č. 6):

Tab. č. 6: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Silikagel L 40/160, 50 g, 10 % vody
Dělicí vrstva	:	350 x 18 mm
Mrtvý objem	:	80 ml CHCl ₃
Nanáška	:	50 g
Frakce zachycovány po 100 ml		

Po spojení stejných frakcí byly získány dva hlavní podíly. První část obsahovala několik mg látky **1**, druhá část obsahovala hlavní látku z frakce 8, látku **2**. Frakce s látkou **2** byla podrobena rekrystalizaci za horka v MeOH a bylo získáno 33 mg bílých krystalů čisté látky **2**. Čistota byla ověřena pomocí TLC (R_f hodnota v mobilní fázi S8 byla 0,75) a HPLC. U skvrny bylo změřeno UV spektrum pomocí UV detektoru denzitometru Camag TLC scanner 3. Látka vykazovala při spektrofotometrické analýze v UV oblasti λ_{\max} 220 a 322 nm a λ_{\min} 232 a 259 nm.

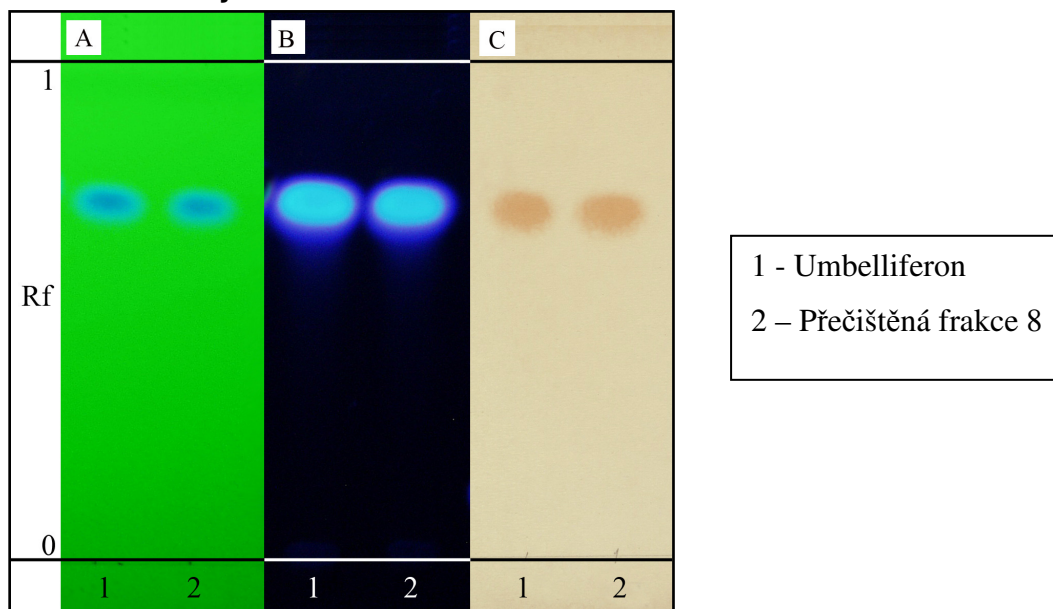
Obr. č. 9: UV spektrum látky 2



Eluční soustava: S3

Detekce: A – D1, B – D2, C – D5

Obr. č. 10: TLC látky 2



Látka **2** byla odeslána na ^1H a ^{13}C NMR analýzu a byla identifikována na základě měření jako **umbelliferon**. Výsledky měření a fyzikálně-chemické vlastnosti viz. kap. 3.7.2. izolované látky.

Z frakce 1-26 z se nepodařilo vyizolovat další čisté látky a bylo rozhodnuto o spojení získaných frakcí a opakování chromatografie za jiných podmínek.

3.4.2.3. Separace spojené FFL 1-26 na silikagelové koloně

Tab. č. 7: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Silikagel L 100/200, 308 g, 10 % vody
Dělicí vrstva	:	810 x 35 mm
Mrtvý objem	:	510 ml CHCl_3
Nanáška	:	6,5 g
Frakce zachycovány po 100 ml		

Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent	:	TLC Al-desky, Silikagel 60 F ₂₅₄
Eluční soustava	:	S8 - <i>frakce 1-85</i> S9 - <i>frakce 85-143</i>
Detekce	:	D1, D2, D3

Tab. č. 8: Přehled frakcí

Eluční soustava $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$	Zachycené frakce	Spojeno dle TLC		
100 : 0	1- 15	1 - 4 5 - 6	7 - 8 9 - 10	11 - 12 13 - 17
99 : 1	16 - 35	18 - 21 22 - 25	26 - 27 28 - 31	32 - 35
98 : 2	36 - 46	36 - 40	41 - 44	45 - 51
95 : 5	47 - 63	52 - 56	57 - 60	61 - 65
90 : 10	64 - 83	66 - 70 71 - 74		75 - 80 81 - 88
80 : 20	84 - 97	89 - 90 91	92 - 93 94 - 95	96 - 97
60 : 40	98 - 114	98 - 101		106 - 107

Eluční soustava CHCl ₃ :EtOH	Zachycené frakce	Spojeno dle TLC		
		102 - 105	108 - 119	
40 : 60	115 - 129	120 - 124	125 - 128	129 - 134
0 : 100	130 - 143	135 - 142	143	

Frakce 1-143 byly dle TLC analýzy spojeny do 35 kvalitativně odlišných frakcí.

3.4.2.4. Preparativní chromatografie antioxidačně nejaktivnějších frakcí z FFL

Preparativní chromatografie byly prováděny na komerčních skleněných deskách Silikagel 60 (Merck).

3.4.2.4.1. Separace frakce 16:

Separace preparativní chromatografií byla prováděna v mobilní fázi S17, ve které došlo k nejlepšímu oddělení zón. K separaci bylo použito 95 mg suché frakce. Frakce se dělila na 7 částečně oddělených zón, zóny 3,4,5 a zóny 6,7 zůstávaly spojeny. Jednotlivé frakce byly spojeny, vyextrahovány směsí CHCl₃:MeOH 1:1 a ponechány krystalizovat. Z jednotlivých frakcí se nepodařilo získat významnější množství krystalické látky vhodné ke strukturní analýze. Frakce převážně zůstávaly v medovité konzistenci obsahující nepatrné množství krystalů.

3.4.2.4.2. Separace frakce 27:

Separace byla prováděna v mobilní fázi S17, zde došlo k nejlepšímu oddělení zón. Bylo použito 70 mg suché frakce medovité konzistence. Frakce se dělila na 5 částečně oddělených zón, zóny 3,4 zůstávaly spojeny. Jednotlivé frakce byly spojeny, vyextrahovány MeOH a ponechány ke krystalizaci. Z frakcí se nepodařilo získat významnější množství krystalů ke strukturní analýze. Frakce převážně zůstávaly v husté medovité konzistenci obsahující nepatrné množství krystalů.

3.4.2.4.3. Separace frakce 28:

Dělení frakce 28 bylo provedeno v mobilní fázi S17. K dělení bylo použito 80 mg suché frakce medovité konzistence. Frakce se dělila na 6 částečně oddělených zón, zóny 1,2,3 zůstávaly spojeny. Jednotlivé frakce byly spojeny, vyextrahovány MeOH a ponechány ke krystalizaci. Z frakcí se nepodařilo získat významnější

množství krystalů ke strukturní analýze. Frakce byly stále v medovité konzistenci s nepatrným množstvím mikrokystalů.

3.4.2.4.4. Separace frakce 30:

Preparativní chromatografie byla prováděna v mobilní fázi S17. K preparaci bylo použito 103 mg suché frakce 30 medovité konzistence. Frakce se na TLC dělila na 8 částečně oddělených zón, zóny 1, 2 a 4, 5 zůstávaly spojeny, ostatní zóny byly částečně odděleny. Jednotlivé oddělené zóny byly spojeny, vyextrahovány MeOH a ponechány ke krystalizaci. Z frakcí se však nepodařilo získat použitelné množství krystalů ke strukturní analýze. Separované frakce zůstávaly jako v předchozích případech v husté medovité konzistenci obsahující nepatrné množství krystalů.

3.4.3. Separace FPFL – hrubé dělení na silikagelové koloně

Tab. č. 9: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Silikagel L 200/400, 600 g, 10 % vody
Dělicí vrstva	:	400 x 150 mm
Mrtvý objem	:	1100 ml CHCl ₃ :EtOH – 7:3
Nanáška	:	50 g

Při přípravě roztěru na kolonu bylo 50 g extraktu rozpuštěno v 200 ml směsi CHCl₃:EtOH – 7:3. Při rozpouštění se vyloučilo z extraktu větší množství bílých, ve vodě dobře rozpustných krystalů anorganické sloučeniny, která byla později na základě skupinových a selektivních srážecích reakcí identifikována jako Na₂SO₄. Touto operací se také podařilo snížit obsah cukerné složky, komplikující separaci na CC.

Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent	:	TLC Al-desky, Silikagel 60 F ₂₅₄
Eluční soustava	:	S6
Detekce	:	D1, D2, D3

Tab. č. 10: Přehled frakcí

Eluční soustava	Získaná frakce (značení)
CHCl ₃ :EtOH – 7:3 – 4500 ml	FPFLHD1 – 31 g
EtOH – 4500 ml	FPFLHD2 – 7 g
Voda – 4000 ml	FPFLHD3 – 5 g

Odpaření rozpouštědla:

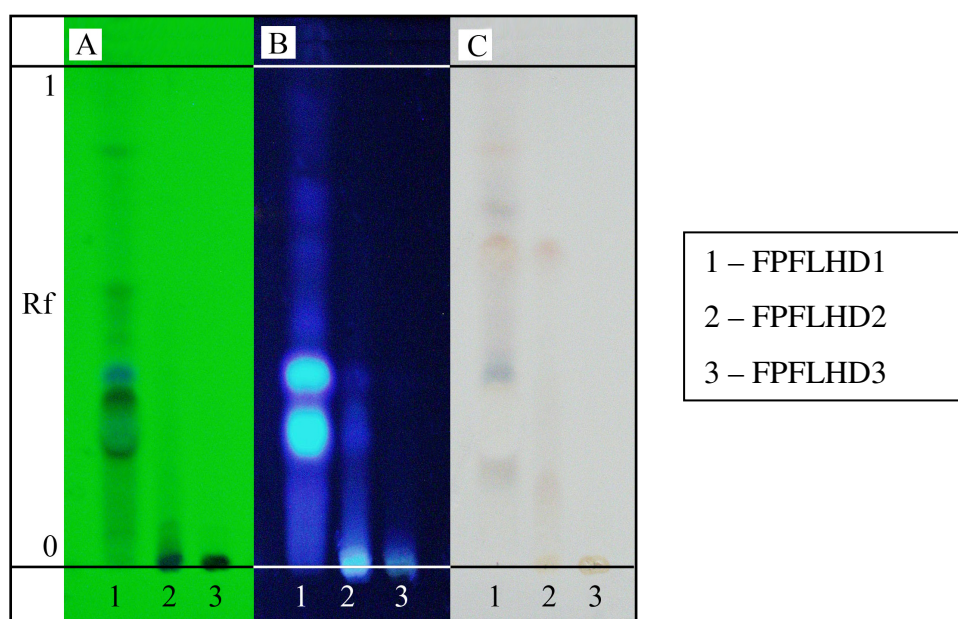
- Ve frakci označené FPFLHD1 byly v UV 365 nm patrné 2 modře fluoreskující skvrny (viz. obr. č. 11). Po přidání MeOH se vyloučilo malé množství bílé sraženiny dobře rozpustné v CHCl_3 , sraženina byla oddělena. Z důvodu jejího malého množství se složení nepodařilo zjistit.
- Ve frakci označené FPFLHD2 byla patrná v UV 365 nm modře fluoreskující skvrna na startu (viz. obr. č. 11), během odpařování rozpouštědla se vyloučila směs krystalů anorganické sloučeniny, která byla dobře rozpustná ve vodě. Látka byla na základě skupinových reakcí identifikovaná jako NaCl.
- Ve frakci označené FPFLHD3 byla patrná pouze skvrna na startu (viz. obr. č. 11).

TLC analýza:

Eluční soustava: S6

Detekce: A – D1, B – D2, C – D3

Obr. č. 11: TLC analýza frakcí FPFLHD1, FPFLHD2, FPFLHD3

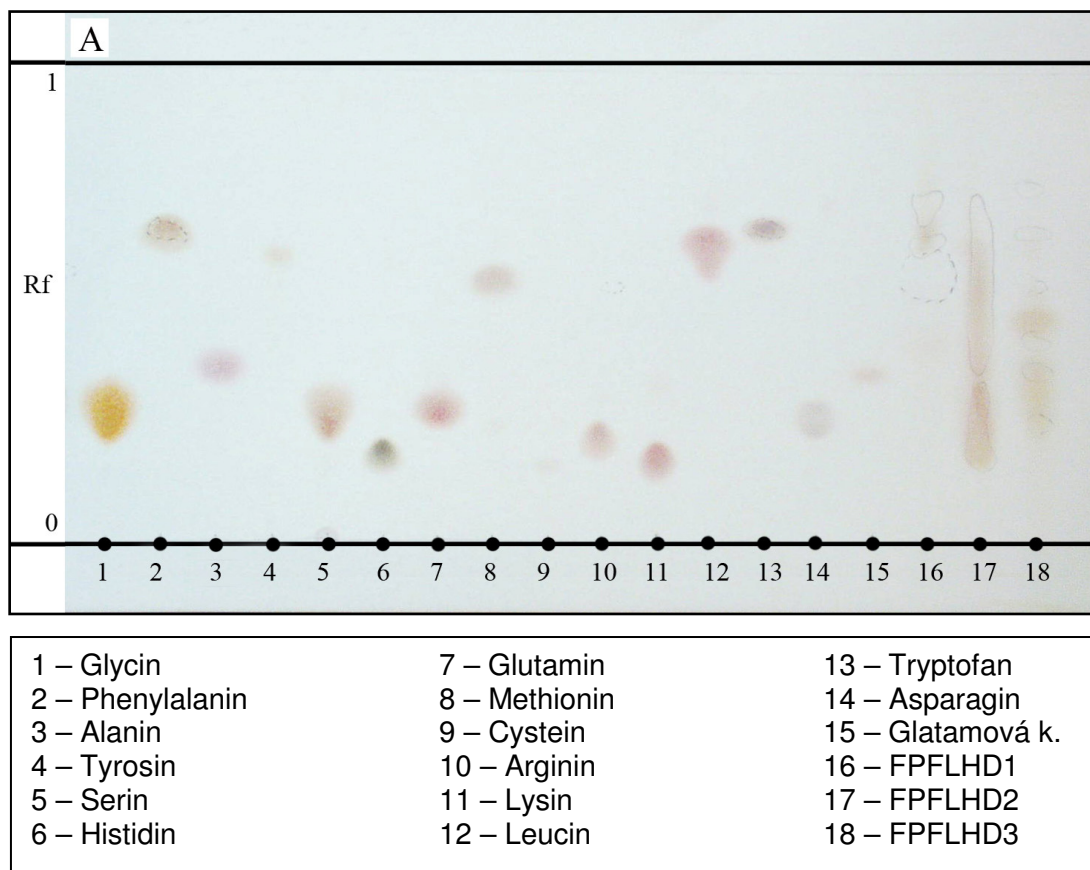


Důkaz aminokyselin

Eluční soustava: S15, 2x

Detekce: A – D7

Obr. č. 12: TLC důkaz aminokyselin

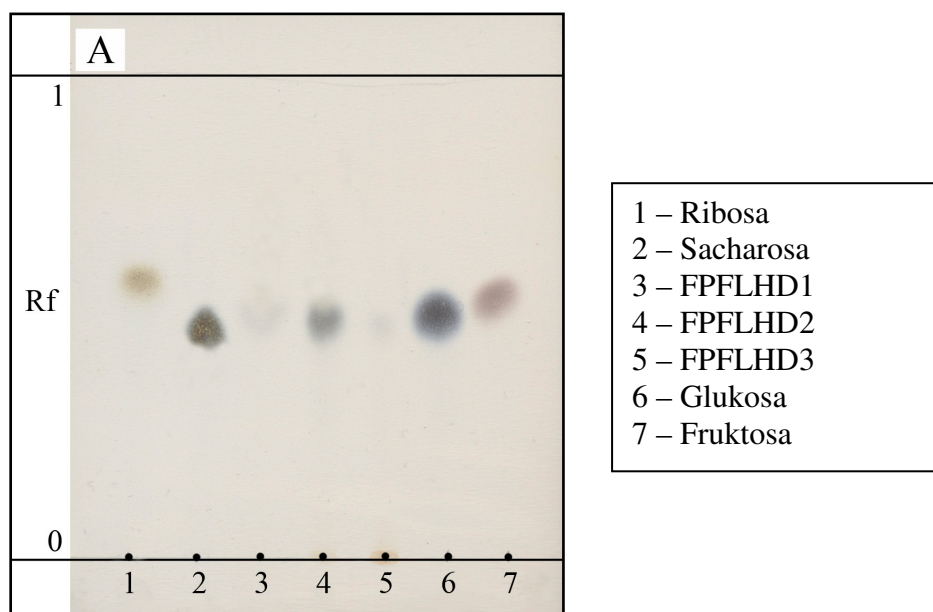


Důkaz cukrů

Eluční soustava: S15

Detekce: A – D4

Obr. č. 13: TLC důkaz cukrů

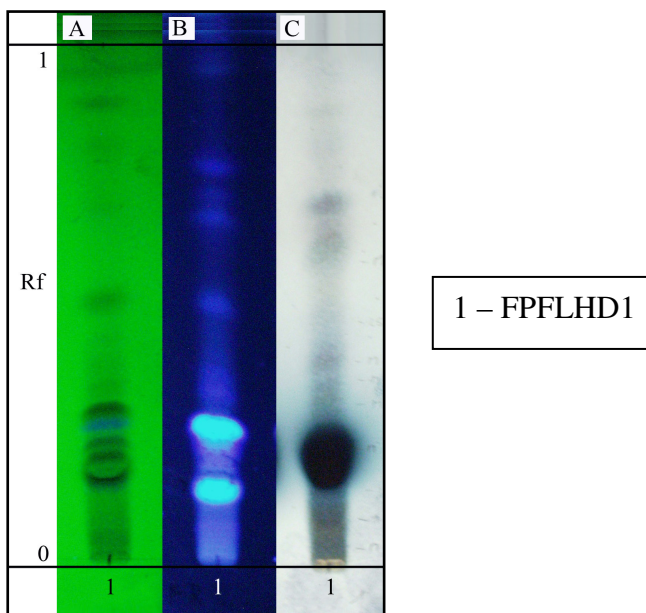


TLC frakce FPFLHD1

Eluční soustava: S4

Detekce: A – D1, B – D2, C – D3

Obr. č. 14: TLC frakce FPFLHD1



3.4.3.1. Separace částí FPFLHD1 na silikagelové koloně

Tab. č. 11: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Silikagel L 40/160, 359 g, 10 % vody
Dělicí vrstva	:	750 x 36 mm
Mrtvý objem	:	485 ml CHCl ₃ :EtOH – 92:8
Nanáška	:	3,6 g
Frakce zachycovány po 100 ml		

Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent	:	TLC Al-desky, Silikagel 60 F ₂₅₄
Eluční soustava	:	S8 - frakce 1-55 S9 - frakce 55-100
Detekce	:	D1, D2, D3

Tab. č. 12: Přehled frakcí

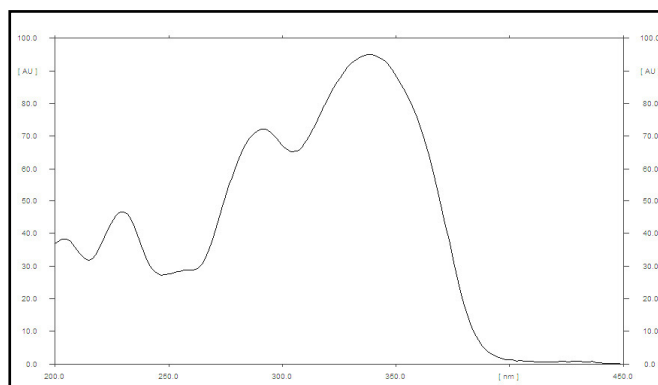
Eluční soustava CHCl ₃ :EtOH	Zachycené frakce	Spojeno dle TLC		
92 : 8	1 – 5	1 - 4		
90 : 10	6 – 15	5 - 6 7	8 - 10 11 - 13	14 - 15 16 - 18
80 : 20	16 – 67	19 - 21 22 - 23 24 - 25 26 - 28	29 - 31 32 - 33 34 - 35 36 - 40 – (3)	41 42 - 46 47 - 56 – (4) 57 - 70
70 : 30	68 – 95	71 - 76	77 - 95	
50 : 50	96 – 100	96 - 100		

Frakce 1-100 byly na základě TLC analýzy spojeny do 22 kvalitativně odlišných frakcí.

3.4.3.1.1. Čištění spojené frakce 36-40 – izolace látky 3

Spojená frakce 36-40 představovala 31 mg znečištěných krystalů modře fluoreskující látky (365 nm). Na TLC v eluční soustavě S5 byla patrná v UV 365 nm majoritní skvrna o hodnotě R_f 0,36, což vylučovalo přítomnost látky **1** a **2**, které byly na čele chromatogramu, R_f hodnota 0,83. Po postřiku TLC činidlem D5 se látka barvila slabě oranžově (lze předpokládat látku fenolového typu). Po postřiku chromatogramu činidlem D12 došlo k barevnému posunu fluorescence z modré na žlutou barvu, reakce byla slabší než v případě látky **1** a **2**. Frakce byla podrobena rekrytalizaci v MeOH za horka a následnému odsátí vzniklých krystalů na mikrofiltračním zařízení. Bylo získáno 15 mg bílých krystalů čisté látky **3**. Čistota byla ověřena pomocí TLC a HPLC. U látky bylo změřeno UV spektrum pomocí UV detektoru denzitometru Camag TLC scanner 3. Látka vykazovala při spektrofotometrické analýze v UV oblasti λ_{\max} 339, 291, 230 nm a λ_{\min} 306, 247, 215 nm.

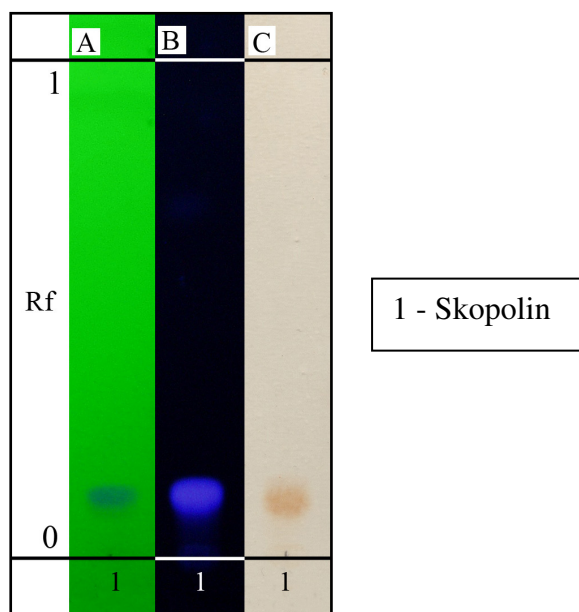
Obr. č. 15: UV spektrum látky 3



Eluční soustava: S3

Detekce: A – D1, B – D2, C – D3

Obr. č. 16: TLC látky 3



Látka **3** byla odeslána na ^1H a ^{13}C NMR analýzu a byla identifikována na základě měření jako **skopolin**. Výsledky měření potvrdila hydrolyza s alkalickým hydroxidem (1M, 30 minut, 50 °C) a následná TLC za využití standardu skopoletinu a glukosy. Shodovala se Rf hodnota glukosy a Rf hodnota aglykonu odpovídala Rf hodnotě skopoletinu. Výsledky měření a fyzikálně-chemické vlastnosti viz. kap. 3.7.3. izolované látky.

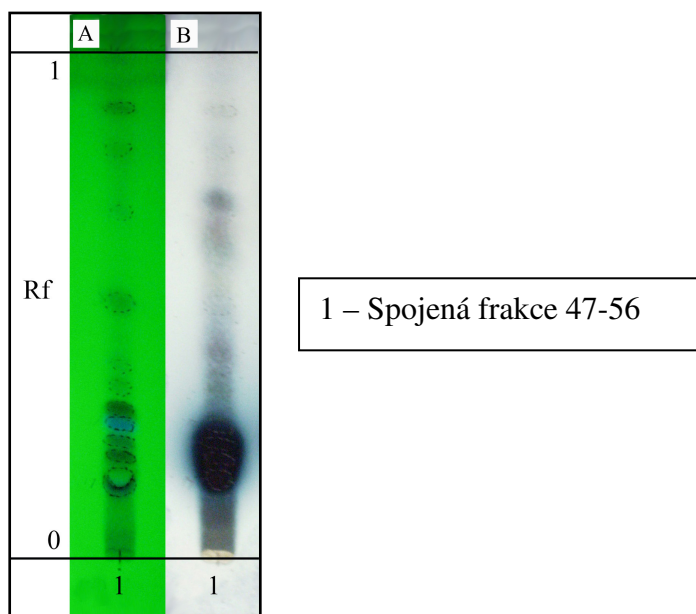
3.4.3.1.2. Čištění spojené frakce 47-56 – izolace látky 4

Spojená frakce 47-56 představovala hmotnostně nejvíce zastoupenou frakci získanou z této sloupcové chromatografie (850 mg). Frakce vytvářela hustě olejovitou kapalinu na TLC vytvářející v UV 254 nm v eluční soustavě S6 několik zhasějících skvrn v oblasti Rf 0,16, jedna ze skvrn s Rf hodnotou 0,26 slabě modře fluoreskovala v UV 254 nm. Po postřiku činidlem D3 byla celá oblast těchto skvrn překryta intenzivně modrou skvrnou.

Eluční soustava: **S6**

Detekce: A – D1, B – D3

Obr. č. 17: TLC frakce 47 – 56



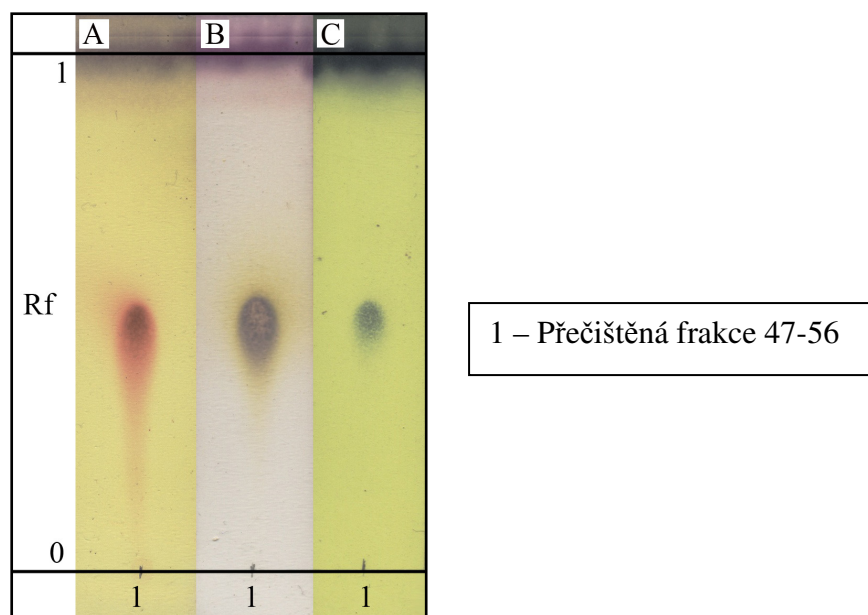
Z frakce uložené v chladu po týdnu vykristalizovaly velké krystaly kosočtverečné soustavy slepené hustým matečným louhem. Krystaly vykazovaly dobrou rozpustnost v EtOH, vodě a špatnou rozpustnost v CHCl_3 . Oddělené krystaly byly rozpuštěny v několika ml 95% EtOH. Přidáním CHCl_3 se vytvořil zákal, který po zahřátí zmizel. Roztok byl ponechán ke krystalizaci v chladu po dobu několika dní. Ve spodní části zkumavky se vytvořily velké bílé krystaly a v horní drobné, nažloutlé krystaly. Spodní krystaly byly odděleny a promyty CHCl_3 – získá látka **4**. Horní krystaly byly rekrystalizovány ve směsi EtOH: CHCl_3 za tvorby stejných krystalů jako látka **4**, byly proto spojeny. Látka také dobře krystalizovala z acetonu.

Látka **4** nebyla v UV 254 a 365 nm aktivní, s činidlem D8 poskytovala pozitivní reakci na cukry (tmavá skvrna na bílém pozadí), reakce s činidly D4, D10, D11 na redukující cukry však byly negativní. S činidlem D9 vytvářela látka modrou skvrnu na žlutém pozadí, nespecifický důkaz alkoholů. Detekce činidlem D5 na látky fenolového typu byla negativní.

Eluční soustava: **S10**

Detekce: A – D3, B – D8, C – D9

Obr. č. 18: TLC látky 4



Bylo získáno 245 mg krystalů této látky. Látka **4** byla odeslána na ^1H a ^{13}C NMR analýzu a byla identifikována na základě měření jako **2-methyl-1,2,3,4-butantetrol**. Výsledky měření a fyzikálně-chemické vlastnosti viz. kap. 3.7.4. izolované látky.

3.4.3.2. Separace FPFLHD1 - izolace frakce bohaté na skopolin

Tab. č. 13: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Diaion HP-20, 250 g
Dělicí vrstva	:	250 x 50 mm
Mrtvý objem	:	300 ml
Nanáška	:	148 g
Zachycené frakce	:	vodná a EtOH

148 g FPFLHD1 bylo rozpuštěno ve 300 ml vody a roztok byl prolit přes sloupec diaionu. Sloupec byl následně promyt 400 ml destilované vody, vodné frakce byly spojeny a odpařeny → vznikla frakce značená **FPFLHD1-Di-H₂O** (obsahovala převážně cukry a ostatní polární látky).

Frakce bohatá na skopolin byla ze sloupce vymyta 300 ml EtOH a sloupec byl obnoven 200 ml destilované vody. Frakce byla odpařena do sucha → vznikla frakce značená **FPFLHD1-Di-EtOH**.

Z důvodů neúplné separace skopolinu z FPFLHD1-Di-H₂O bylo dělení opakováno. Celkem bylo získáno 10,5 g frakce bohaté na skopolin, která byla dále separovaná na sloupci silikagelu.

3.4.3.2.1. Separace FPFLHD1-Di-EtOH bohaté na skopolin

Tab. č. 14: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Silikagel L 100/200, 571 g, 10 % vody
Dělicí vrstva	:	750 x 46 mm
Mrtvý objem	:	1014 ml CHCl ₃
Nanáška	:	7 g
Frakce zachycovány po 100 ml		

Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent	:	TLC Al-desky, Silikagel 60 F ₂₅₄
Eluční soustava	:	S8 - <i>frakce 1-95</i> S9 - <i>frakce 95-188</i>
Detekce	:	D1, D2, D3

Tab. č. 15: Přehled frakcí

Eluční soustava CHCl ₃ :EtOH	Zachycené frakce	Spojeno dle TLC	
99 : 1	1 – 12	1 - 5 6 - 8	9 - 17 18 - 20
98 : 2	13 – 25	21 - 25	
97 : 3	26 – 29	26 - 37	
95 : 5	30 – 47	38 - 42	
90 : 10	48 – 81	43 - 48 49 - 55	56 - 58 59 - 89
85 : 15	82 – 85	90 - 94	95
80 : 20	86 – 122	96 - 99 – (3) 100 - 101	102 - 112 113 - 126

Eluční soustava CHCl ₃ :EtOH	Zachycené frakce	Spojeno dle TLC	
70 : 30	123 – 142	127 - 133 134 - 138	139 - 152
50 : 50	143 – 164	153 - 162	163 - 173
0 : 100	165 – 188	174 175	176 - 180 181 - 188

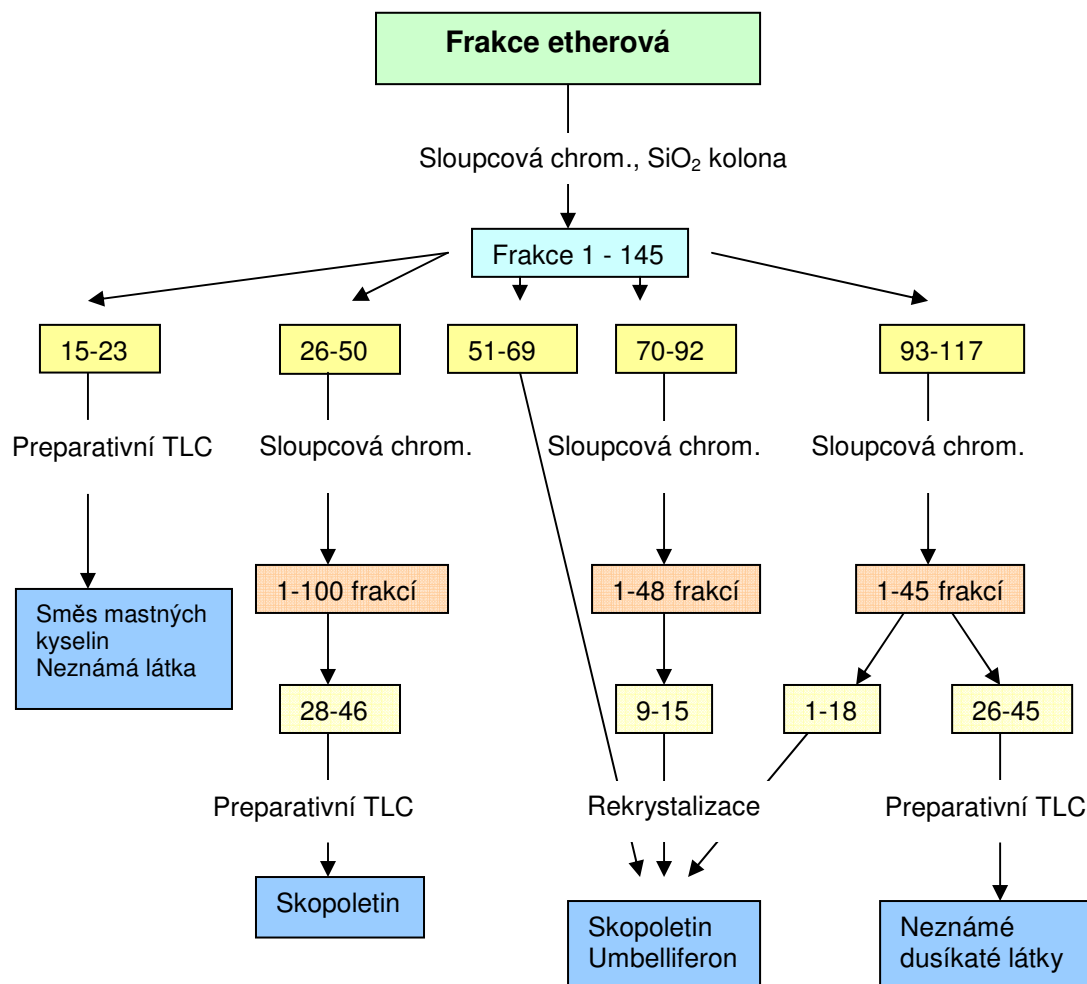
Frakce 1-188 byly dle TLC analýzy spojeny do 26 kvalitativně odlišných frakcí.

3.4.3.2.2. Čištění spojené frakce 96-99 – izolace skopolinu – látky 3

Látka **3** byla izolována již v předešlých separačních postupech, ale získané množství nebylo dostatečné na provedení plánovaných testů. Spojená frakce 96-99 představovala 255 mg znečištěných krystalů modře fluoreskující látky (365 nm) shodné R_f hodnotou se skopolinem. Po postřiku činidlem D5 se obě skvrny barvily slabě oranžově. Po postřiku chromatogramu činidlem D12 došlo k barevnému posunu fluorescence z modré na žlutou barvu. Frakce byla podrobena rekrystalizaci v MeOH za horka a následnému odsátí vzniklých krystalů na mikrofiltračním zařízení. Bylo získáno 187 mg bílých krystalů čisté látky **3**. Čistota byla ověřena pomocí TLC a HPLC.

3.5. Chromatografická separace frakce etherové [108, 109, 110]

Obr. č. 19: Schéma separačního procesu:



3.5.1. Sloupcová chromatografie

Tab. č. 16: Chromatografické podmínky

Adsorbent	: Silikagel L 200/400, 1350 g, 10 % vody
Dělicí vrstva	: 1080 x 60 mm
Mrtvý objem	: 2500 ml
Nanáška	: 69 g
Frakce zachycovány po 250 ml	

Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent : TLC Al-desky, Silikagel 60 F₂₅₄
Eluční soustava : S2 - *Frakce 1-112*
S3 - *Frakce 112-145*
Detekce : D1, D2

Tab. č. 17: Přehled frakcí

Eluční soustava CHCl ₃ + benzín + ethanol	Získané Frakce	Spojené frakce	
65 : 35 : 0	1 - 10	1 - 4	5 - 8
75 : 25 : 0	11 - 14	9 - 14	
82,5 : 17,5 : 0	15 - 49	15 - 23	24 - 25
100 : 0 : 0	50 - 62	26 - 50	51 - 62
98 : 0 : 2	62 - 77	63 - 69	
95 : 0 : 5	78 - 93	70 - 85	86 - 92
90 : 0 : 10	94 - 112	93 - 100	101 - 112
75 : 0 : 25	113 - 145	113 - 117 118 - 125 126 - 129	130 - 133 134 - 145

3.5.1.1. Čištění spojené frakce 15-23

Frakce představovala 0,29 g směsi několika látek na TLC patrných třemi výraznými skvrnami s R_f hodnotami 0,7, 0,55 a 0,47 v eluční soustavě S13 po detekci D1, D2. Z frakce vykristalizovala bílá látka (t.t. 81-90°C), která byla oddělena a podrobena analýze. Podle výsledků TLC analýzy byla totožná s látkou izolovanou z petroletherové frakce 3-4, tedy směsi 8-methyldekanové a olejové kyseliny. Zbylá část extraktu byla podrobena preparativní TLC chromatografii. Bylo získáno 62,4 mg látky mazlavé konzistence, aktivní v UV 365 nm modrou fluorescencí. Z důvodů znečištění a obtížné krystalizace nebylo možno získat dostatek čisté látky ke strukturální analýze.

3.5.1.2. Čištění spojené frakce 26-50 – izolace látky 1

Frakce představovala 6,65 g směsi řady látek na TLC patrných množstvím skvrn s R_f hodnotami 0,21-0,95 v eluční soustavě S14. Frakce byla podrobena sloupcové chromatografii.

Tab. č. 18: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Silikagel L 100/200, 200 g, 10 % vody
Dělicí vrstva	:	840 x 25 mm
Mrtvý objem	:	350 ml
Nanáška	:	6,65 g
Frakce zachycovány po 100 ml		

Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent	:	TLC Al-desky, Silikagel 60 F ₂₅₄
Eluční soustava	:	S14
Detekce	:	D1, D2

Tab. č. 19: Přehled frakcí

Eluční soustava CHCl ₃ :benzín:EtOH	Zachycené frakce	Spojeno dle TLC		
60 : 40 : 0	1 - 24	1 - 5	6 - 14 15	16 - 22 23 - 24
80 : 20 : 0	25 - 46	25 - 27	28 - 46	
100 : 0 : 0	47 - 60	47 - 64		
97,5 : 0 : 2,5	61 - 72			
95 : 0 : 5	73 - 84	65 - 100		
90 : 0 : 10	85 - 92			
85 : 0 : 15	93 - 100			

Významné frakce byly podrobeny preparativní chromatografii. Pouze z frakce 28-46 se podařilo získat dostatečné množství krystalů k analýze (0,49 g). Byla potvrzena přítomnost skopoletinu.

3.5.1.3. Čištění spojených frakcí 51-62 a 63-69 – izolace látek 1 a 2

Obě téměř identické frakce 51-62 (0,93 g) a 63-69 (0,76 g) představovaly směs několika látek na TLC patrných třemi skvrnami s R_f hodnotami 0,44, 0,27 a 0,17 v eluční soustavě S14. Obě horní skvrny vykazovaly pod UV 365 nm výraznou modrou fluorescenci připomínající dříve vyizolované kumariny. Po postřiku činidlem D5 se látka barví intenzivně červeně. Po postřiku chromatogramu činidlem D12 dojde k barevnému posunu fluorescence z modré barvy na žlutou. Skvrny byly porovnány se

známými standardy skopoletinem a umbelliferonem, bylo změřeno UV spektrum. Byla potvrzena přítomnost skopoletinu a umbelliferonu v obou frakcích.

3.5.1.4. Čištění spojených frakcí 70-85 a 86-92 – izolace látek 1 a 2

Obě kvalitativně podobné frakce byly na základě TLC spojeny. Hmotnost vzniklé frakce byla 8,36 g. Na TLC v eluční soustavě S14 byla patrná směs řady látek se čtyřmi výraznými skvrnami s hodnotami R_f 0,72, 0,58, 0,55 a 0,44. R_f hodnoty částečně odpovídaly vyizolovaným kumarinům skopoletinu a umbelliferonu. Frakce byla podrobena sloupcové chromatografii.

Tab. č. 20: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Silikagel L 100/200, 220 g, 10 % vody
Dělicí vrstva	:	310 x 45 mm
Mrtvý objem	:	510 ml
Nanáška	:	8,36 g
Frakce zachycovány po 50 ml		

Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent	:	TLC Al-desky, Silikagel 60 F ₂₅₄
Eluční soustava	:	S14
Detekce	:	D1, D2, D3

Tab. č. 21: Přehled frakcí

Eluční soustava CHCl ₃ : EtOH	Zachycené frakce	Spojeno dle TLC
100 : 0	1 - 47	1 - 2 9 - 15 27 - 28 3 - 8 16 - 26 29 - 38
98 : 2	48	39 - 48

Hlavní podíl látek byl získán preparativní chromatografií ze spojené frakce 9-15, R_f hodnoty látek odpovídaly R_f hodnotám skopoletinu a umbelliferonu.

Preparativní chromatografií spojených frakcí 51-62 a 63-69 a podfrakce 9-15 z frakce 70-92 na litých deskách v eluční soustavě S14 byly získány dvě čisté látky, jejichž struktura byla ověřena na základě NMR, IČ a UV měření jako dříve vyizolované látky **1** a **2** z frakce PZ. Byla tedy potvrzena izolace skopoletinu a umbelliferonu z uvedených frakcí.

3.5.1.5. Čištění spojené frakce 93-117

Frakce byla po spojení podrobena sloupcové chromatografii.

Tab. č. 22: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Silikagel L 100/200, 400 g, 10 % vody
Dělicí vrstva	:	510 x 46 mm
Mrtvý objem	:	915 ml
Nanáška	:	10,19 g
Frakce zachycovány po 250 ml		

Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent	:	TLC Al-desky, Silikagel 60 F ₂₅₄
Eluční soustava	:	S3
Detekce	:	D1, D2

Tab. č. 23: Přehled frakcí

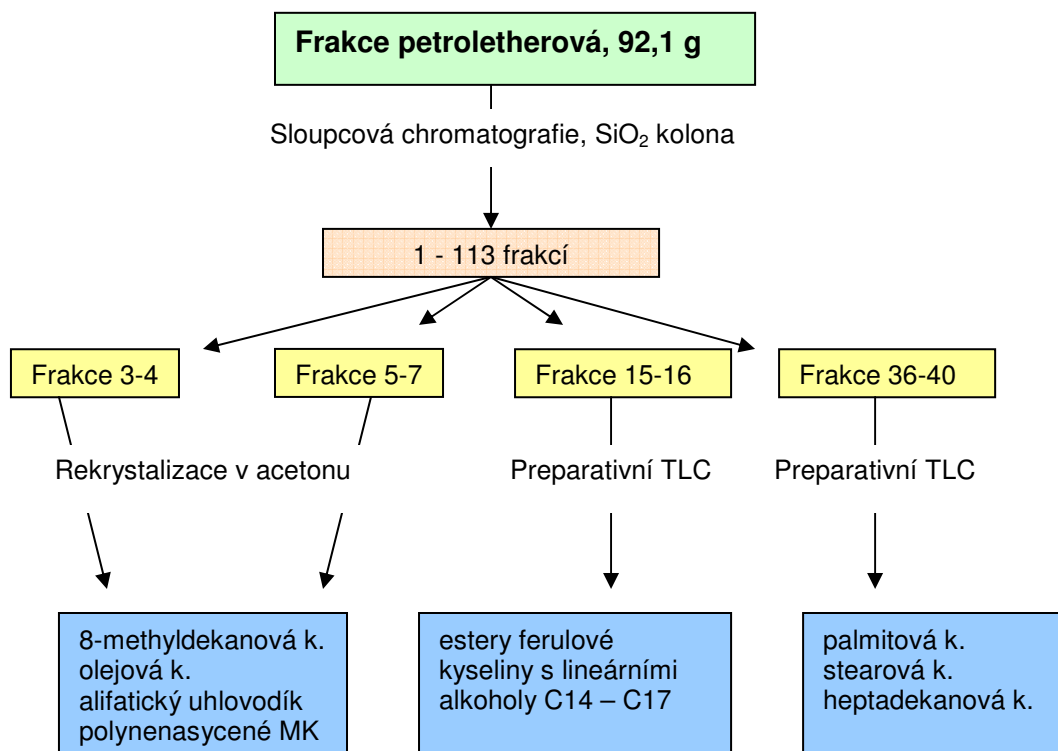
Eluční soustava CHCl ₃ :EtOH	Zachycené frakce	Spojeno dle TLC
100 : 0	1 – 13	1 - 18
92 : 8	14 -18	19 - 25
95 : 5	19 – 37	
90 : 10	38 – 41	26 - 45
80 : 20	42 – 45	

Významné frakce byly podrobny preparativní TLC a HPLC chromatografii. Ve frakci 1-18 se podařilo prokázat přítomnost skopoletinu a umbelliferonu.

Ve spojené frakci 26-45 byla na základě TLC a detekce s činidlem D 13 zjištěna přítomnost dusíkatých látek typu alkaloidů. Frakce byla podrobena HPLC preparativní chromatografii, bylo izolováno jen mikromnožství znečištěné směsi látek, jejichž struktura nebyla doposud určena. Důkaz alkaloidů pomocí činidla D14 byl negativní jak se samotným základním roztokem *E. alsinoides*, tak jednotlivými frakcemi. Přítomnost alkaloidů v tomto extraktu nebyla potvrzena.

3.6. Chromatografická separace frakce petroletherové [111]

Obr. č. 20: Schéma separačního procesu:



3.6.1. Sloupcová chromatografie

Tab. č. 24: Chromatografické podmínky

Adsorbent	:	Silikagel L 100/200, 888 g, 10 % vody
Dělicí vrstva	:	710 x 57 mm
Mrtvý objem	:	1620 ml
Nanáška	:	92,1 g
Frakce zachycovány po 100 ml		

Srovnávací TLC proběhla za následujících podmínek:

Adsorbent	:	TLC Al-desky, Silikagel 60 F ₂₅₄
Eluční soustava	:	S11
Detekce	:	D1, D2

Tab. č. 25: Přehled frakcí

Eluční soustava CHCl ₃ : toluen : ethanol	Získané frakce	Spojené frakce	
75 : 25 : 0	1 - 42	1 - 2 10 3 - 4 11 - 12 5 - 7 13 - 14 8 15 - 16 9 17	18 - 19 20 - 23 24 - 26 27 - 31 32 - 35 36 - 40
100 : 0 : 0	43 - 70	41 - 44 45 - 48	49 - 52 53 - 60
95 : 0 : 5	71 - 107		
90 : 0 : 10	108 - 112	61 - 113	
80 : 0 : 20	113		

3.6.1.1. Čištění spojených frakcí 3-4 a 5-7 – izolace látek 5, 6

Spojené frakce 3-4 (1,32 g) a 5-7 (2,7 g) představovaly dle TLC téměř identické spektrum látek. Na chromatogramu v eluční soustavě S11 bylo patrné několik skvrn v rozmezí hodnot R_f 0,8 – 1 po detekci D1, D2, D3. Po rozpuštění v MeOH se vyloučilo z roztoku malé množství krystalů, které byly rozpustné v CHCl₃. Po provedení série čistících operací (rekrytalizace v acetonu) bylo získáno 13,4 mg krystalů hledané látky. Teplota tání se pohybovala v širokém rozmezí 58 – 82 °C, což naznačovalo přítomnost směsi několika látek, které byly patrné na TCL v eluční soustavě S12 dvěma skvrnami s hodnotami R_f 0,57 a 0,63 při detekci činidlem D9. Látka byla odeslána na GC/MS spektroskopii do FN v Hradci Králové. Ve směsi byla prokázána přítomnost **8-methyldekanové kyseliny**, **olejové kyseliny** a blíže neidentifikovatelných **polynenasycených mastných kyselin** a **alifatického uhlovodíku**. Struktura byla dále ověřena pomocí NMR měření. Výsledky měření a fyzikálně-chemické vlastnosti viz. kap. 3.7.5. izolované látky.

3.6.1.2. Čištění spojené frakce 15-16 – izolace látky 7

Ze spojené frakce 15-16 (0,64 g) se vyloučilo v MeOH malé množství bílých krystalů. Na TLC v eluční soustavě S11 bylo patrné několik zón v oblasti R_f hodnot 0,2 – 0,5 po detekci D1, D2, D3. Byla provedena preparativní chromatografie v eluční soustavě S1. Hledaná látka vytvářela majoritní zónu s hodnotou R_f 0,74. Po provedené rekrytalizaci bylo získáno 7,3 mg bílých krystalů o t.t. 50 – 59 °C. Látka

byla odeslána na NMR analýzu, která prokázala přítomnost **esterů ferulové kyseliny s lineárními alkoholy C14 - C17**. Výsledky měření a fyzikálně-chemické vlastnosti viz. kap. 3.7.6. izolované látky.

3.6.1.3. Čištění spojené frakce 36-40 – izolace látek 8, 9, 10

Ze spojené frakce 36-40 (0,96 g) se vyloučilo v CHCl_3 malé množství krystalů slepených chlorofylem. Frakce byla podrobena preparativní chromatografii v eluční soustavě S2. Kvantitativně byla nejvíce zastoupena třetí zóna s hodnotou R_f 0,7. Rekrystalizací v MeOH se z ní vyloučily mazlavé krystaly bílé barvy (7 mg), teplota tání 42 - 44°C. Porovnávací TLC se standardy mastných kyselin byla nalezena shoda s některými mastnými kyselinami. V eluční soustavě S7 při detekci činidlem D9 měla hledaná látka podobnou R_f hodnotu (0,6) jako palmitová k. R_f 0,64 a stearová k. R_f 0,62. Látka byla odeslána na NMR analýzu, která prokázala přítomnost **palmitové, stearové a heptadekanové kyseliny**. Výsledky měření a fyzikálně-chemické vlastnosti viz. kap. 3.7.7. izolované látky.

Tab. Č. 26: Přehled vyizolovaných látek

Původ z frakce	Název získané látky
PZ - FFL, FEt_2O	Skopoletin
PZ - FFL, FEt_2O	Umbelliferon
PZ - FPFL	Skopolin
PZ - FPFL	2-methyl-1,2,3,4-butantetrol
FPe	8-methyldekanová kyselina
FPe	Olejová kyselina
FPe	Ester ferulové kyseliny s lineárními alkoholy C14 - C17
FPe	Palmitová kyselina
FPe	Stearová kyselina
FPe	Heptadekanová kyselina

3.7. Charakteristika čistých látek vyizolovaných z taxonu *E. alsinoides* L.

3.7.1. Látka 1 - Skopoletin [112, 113, 114]

Změřená t.t.:

199 – 204 °C (tab.: 203 – 205 °C)

Tabelovaná Mh:

192,17

Sumární vzorec:

C₁₀H₈O₄

UV spektroskopie (MeOH):

λ_{max}: 344 nm (log ε 4,279)

297 nm (log ε 3,926)

253 nm (log ε 3,886)

229 nm (log ε 4,335)

210 nm (log ε 4,345)

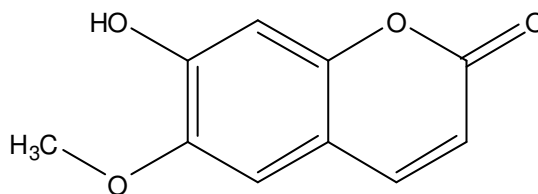
λ_{min}: 307 nm (log ε 3,879)

271 nm (log ε 3,457)

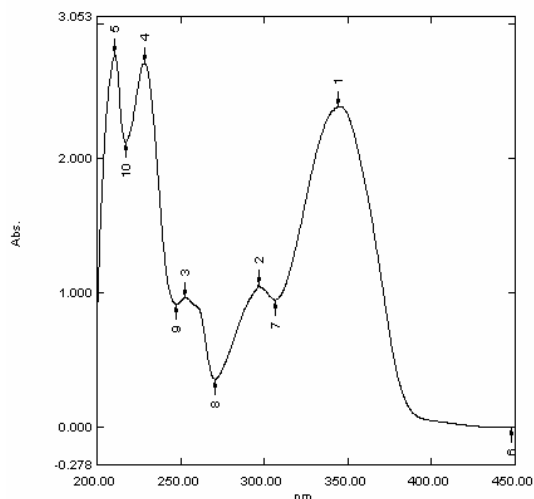
247 nm (log ε 3,864)

217 nm (log ε 4,228)

Vzorec č. 28:



Obr. č. 21:



NMR spektroskopie:

¹H-NMR a ¹³C-NMR data:

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD):

δ 3.89 (3H, s, CH₃O), 6.19 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-3), 6.75 (1H, s, H-8), 7.09 (1H, s, H-5), 7.83 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-4)

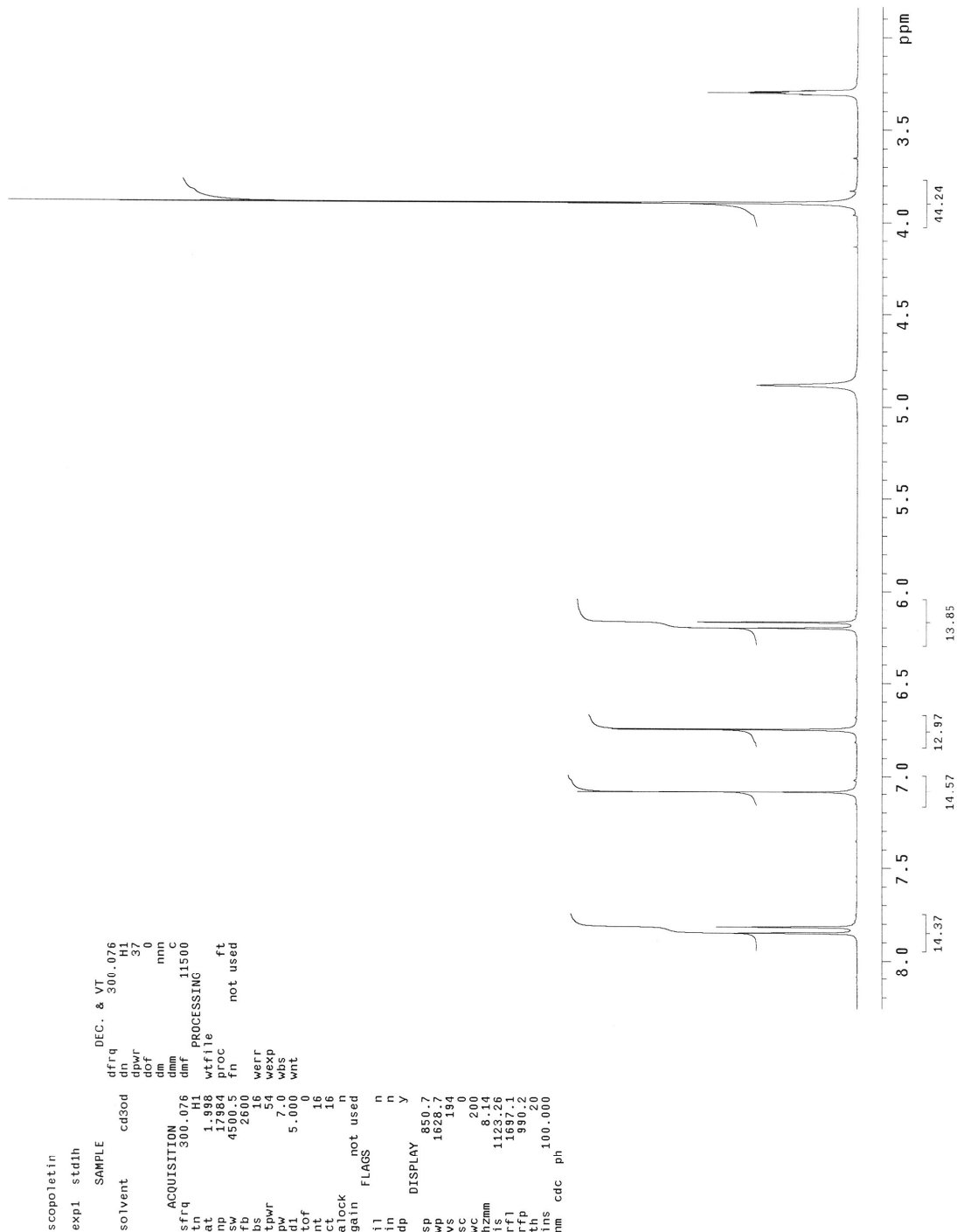
¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD):

δ 56.8 (CH₃O), 103.9 (C-8), 109.9 (C-5), 112.5 (C-4a), 112.6 (C-3), 146.1 (C-4), 147.1 (C-6), 151.4 (C-8a), 152.9 (C-7), 164.0 (C-2)

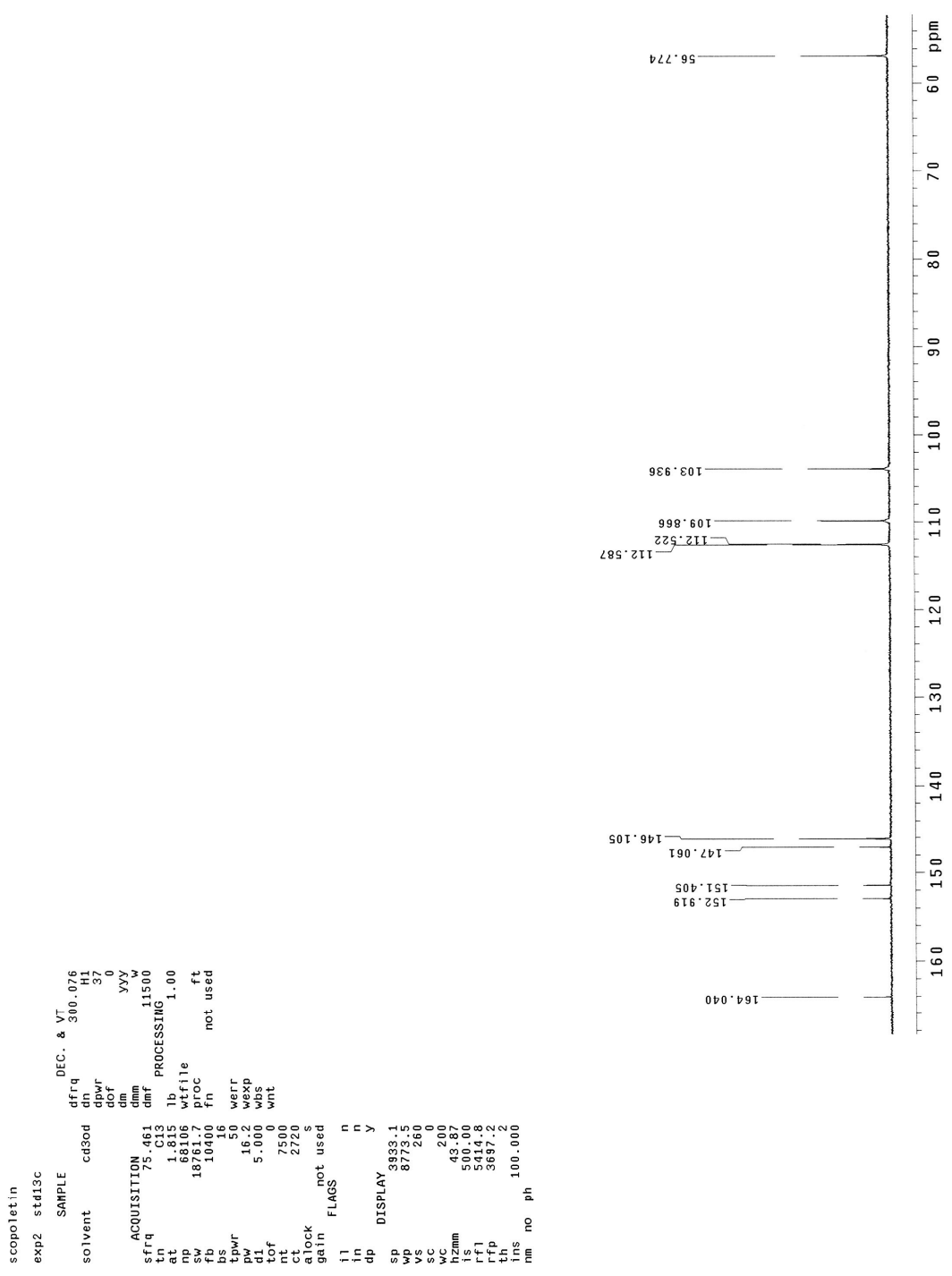
IČ spektroskopie:

Látka vykazovala absorpční pásy v oblasti vlnočtů 3343, 1708, 1609, 1568, 1512, 1436, 1294, 1142 cm⁻¹, KBr disk.

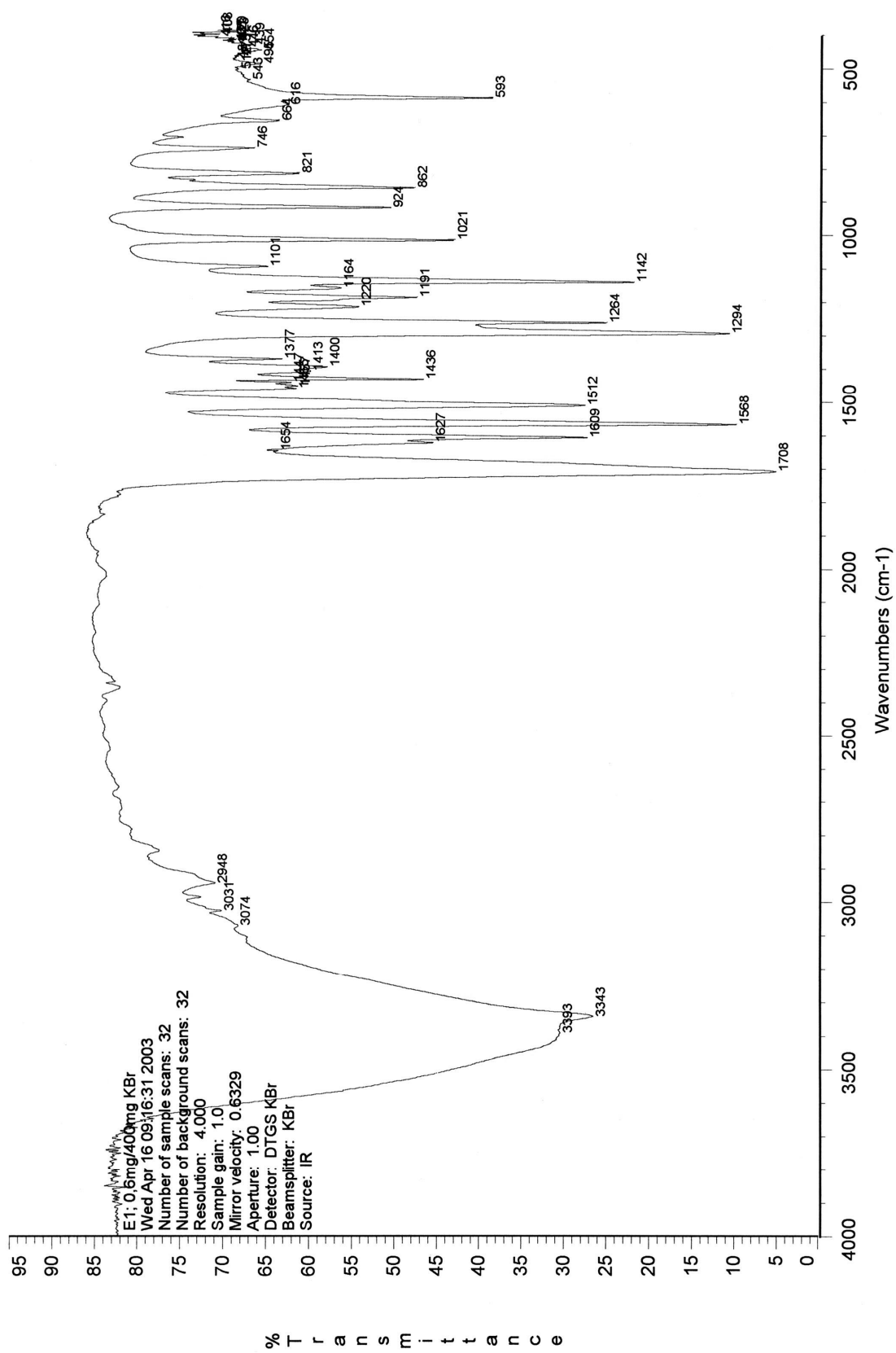
Obr. č. 22: Skopoletin - ¹H NMR spektrum



Obr. č. 23: Skopoletin – ¹³C NMR spektrum



Obr. č. 24: Skopoletin - IČ spektrum



3.7.2. Látka 2 - Umbelliferon [112, 113]

Změřená t.t.:

226 – 229 °C (tab. 230 – 233 °C)

Tabelovaná Mh:

162,15

Sumární vzorec:

C₉H₆O₃

UV spektroskopie (MeOH):

λ_{\max} : 325 nm (log ϵ 4,115)

253 nm (log ϵ 3,307)

216 nm (log ϵ 4,037)

205 nm (log ϵ 4,241)

λ_{\min} : 262 nm (log ϵ 3,075)

251 nm (log ϵ 3,305)

214 nm (log ϵ 4,035)

NMR spektroskopie:

¹H-NMR a ¹³C-NMR data:

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD):

δ 6.16 (1H, *d*, J = 9.5 Hz, H-3), 6.69 (1H, *d*, J = 2.3 Hz, H-8), 6.87 (1H, *dd*, J_1 = 8.5 Hz, J_2 = 2.3 Hz, H-6), 7.43 (1H, *d*, J = 8.5 Hz, H-5), 7.83 (1H, *d*, J = 9.5 Hz, H-4)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD):

δ 103.4 (C-8), 112.3 (C-3), 113.1 (C-10), 114.5 (C-6), 130.7 (C-5), 146.0 (C-4), 157.2 (C-9), 163.1 (C-2), 163.7 (C-7)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 6.18 (1H, *d*, J = 9.5 Hz, H-3), 6.69 (1H, *d*, J = 2.2 Hz, H-8), 6.76 (1H, *dd*, J_1 = 8.5 Hz, J_2 = 2.2 Hz, H-6), 7.49 (1H, *d*, J = 8.5 Hz, H-5), 7.90 (1H, *d*, J = 9.5 Hz, H-4), 10.56 (1H, *bs*, OH)

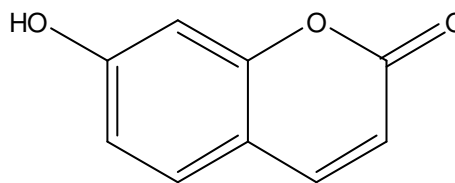
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 102.4 (C-8), 111.50 (C-3), 111.6 (C-10), 113.3 (C-6), 129.9 (C-5), 144.7 (C-4), 155.7 (C-9), 160.7 (C-2), 161.5 (C-7)

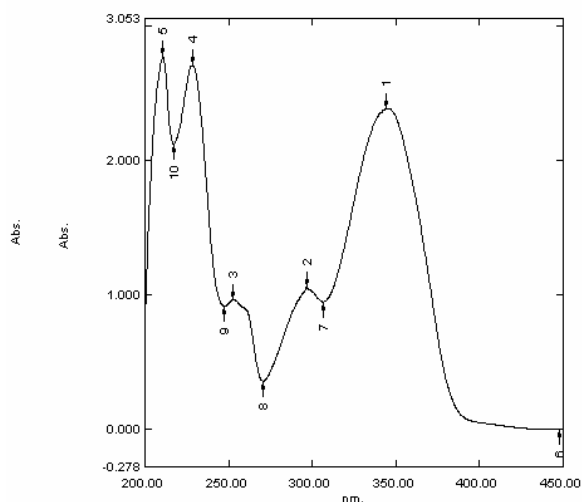
IČ spektroskopie:

Látka vykazovala absorpční pásy v oblasti vlnočtů 3181, 1682, 1604, 1568, 1512, 1412, 1322, 1238, 1137 cm⁻¹, KBr disk.

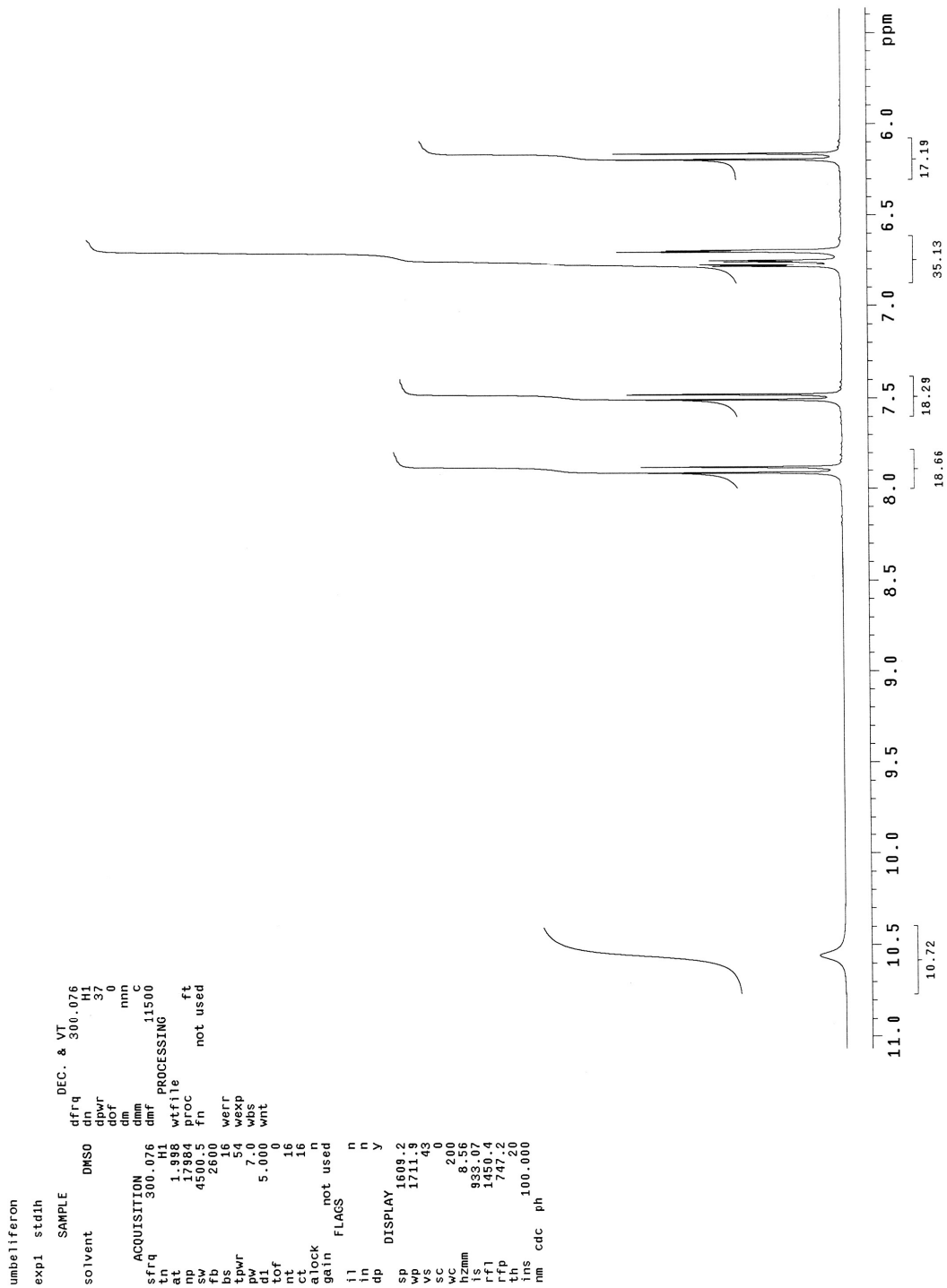
Vzorec č. 29:



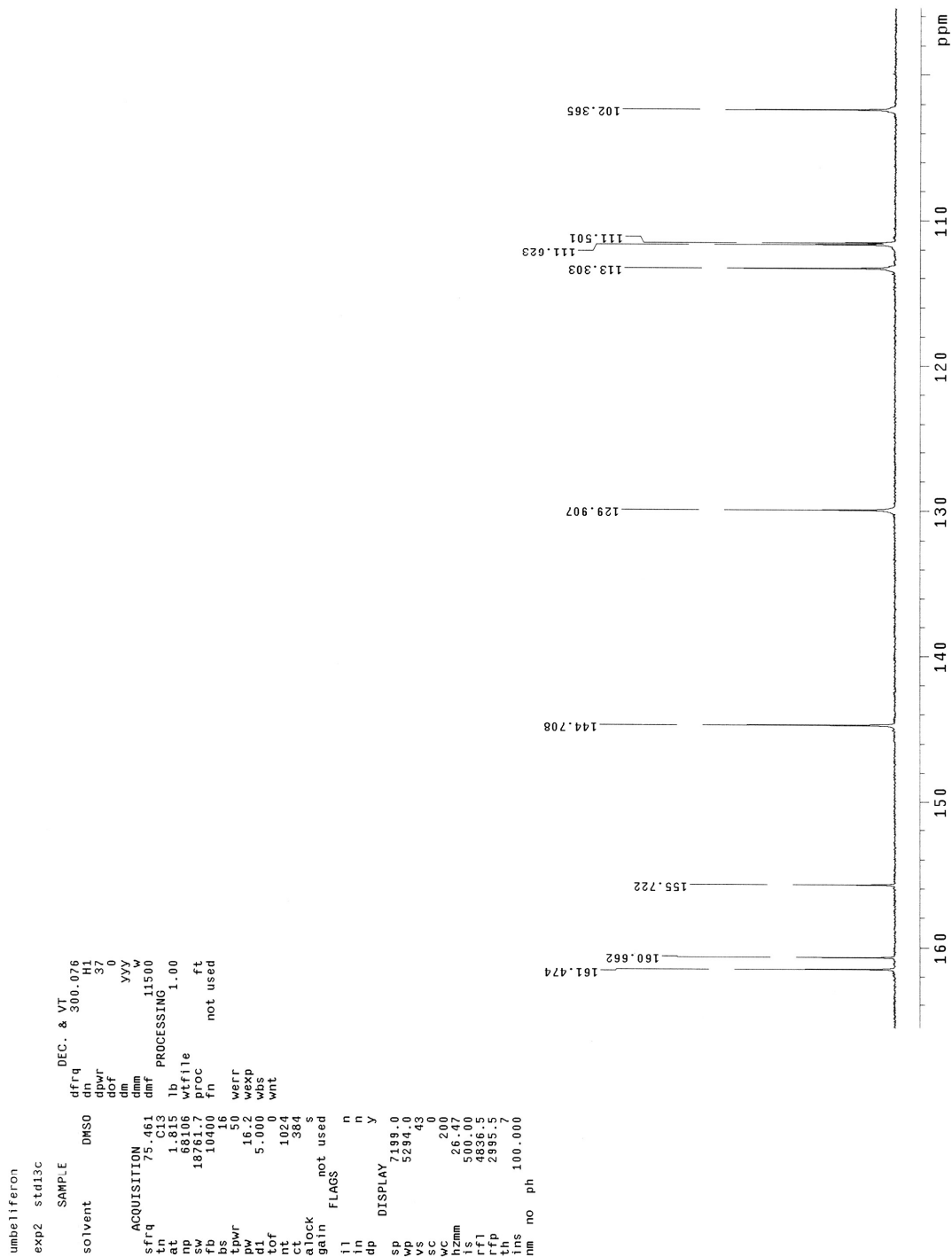
Obr. č. 25:



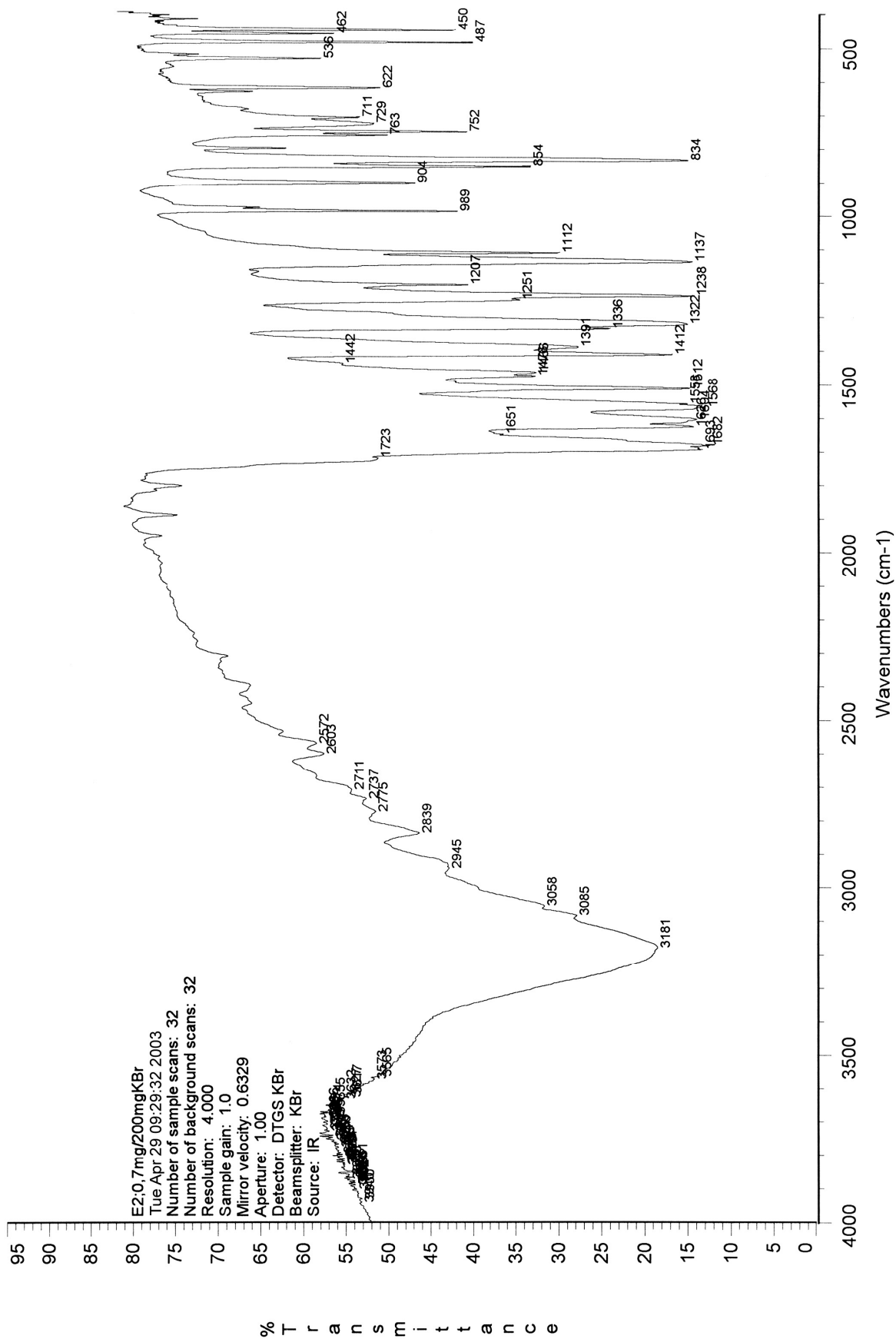
Obr. č. 26: Umbelliferon - ¹H NMR spektrum



Obr. č. 27: Umbelliferon – ¹³C NMR spektrum



Obr. č. 28: Umbelliferon - IČ spektrum



3.7.3. Látka 3 – Skopolin [112, 115]

Změřená t.t.:

222 – 225 °C (tab. 221 – 223 °C)

Tabelovaná Mh:

354,309

Sumární vzorec:

C₁₆H₁₈O₉

UV spektroskopie (MeOH):

λ_{\max} : 332 nm (log ϵ 3,985)

291 nm (log ϵ 3,875)

227 nm (log ϵ 4,184)

208 nm (log ϵ 4,325)

λ_{\min} : 303 nm (log ϵ 3,800)

265 nm (log ϵ 3,503)

216 nm (log ϵ 4,123)

NMR spektroskopie:

¹H-NMR a ¹³C-NMR data:

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD-D₂O):

δ 3.45-3.70 (*m*, glc), 3.76 (1H, *dd*, $J_1 = 12.5$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, H-6 glc), 3.90 (3H, *s*, OCH₃), 3.93 (1H, *dd*, overlap, $J_1 = 12.5$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, H-6 glc), 5.15 (1H, *d*, $J = 7.3$ Hz, H-1 glc), 6.36 (1H, *d*, $J = 9.7$, H-3), 7.15 (1H, *s*, H-8), 7.20 (1H, *s*, H-5) 7.92 (1H, *d*, $J = 9.7$ Hz, H-4)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD-D₂O):

δ 57.1 (OCH₃), 61.6 (C-6'), 70.4 (C-4'), 73.8 (C-2'), 76.6 (C-3'), 77.4 (C-5'), 101.1 (C-1'), 104.4 (C-8), 110.6 (C-5), 114.1 (C-10), 114.7 (C-3), 146.6 (C-4), 147.2 (C-6), 149.9 (C-9), 150.4 (C-7), 165.3 (C-2)

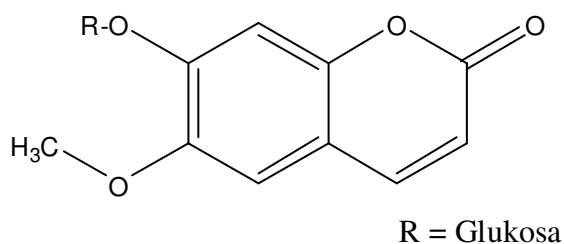
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 3.16-3.72 (*m*, glc), 3.80 (3H, *s*, OCH₃), 5.36 (1H, *d*, $J = 7.3$ Hz, H-1 glc), 6.32 (1H, *d*, $J = 9.5$, H-3), 7.15 (1H, *s*, H-8), 7.28 (1H, *s*, H-5) 7.95 (1H, *d*, $J = 9.6$ Hz, H-4)

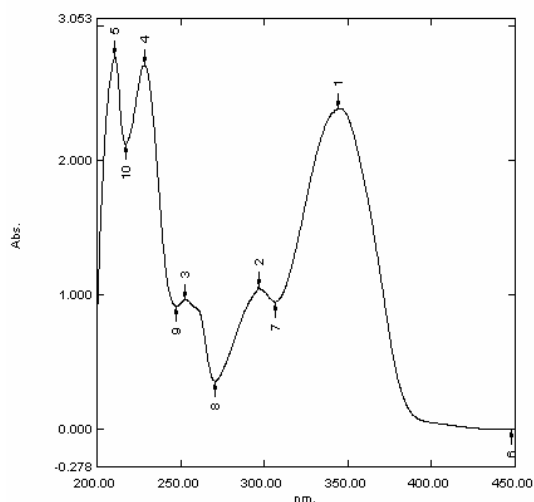
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 52.2 (OCH₃), 60.8 (C-6'), 69.8 (C-4'), 73.3 (C-2'), 77.0 (C-3'), 77.3 (C-5'), 99.8 (C-1'), 103.2 (C-8), 109.8 (C-5), 112.5 (C-10), 113.5 (C-3), 144.4 (C-4), 146.2 (C-6), 149.1 (C-9), 150.1 (C-7), 160.8 (C-2)

Vzorec č. 30:



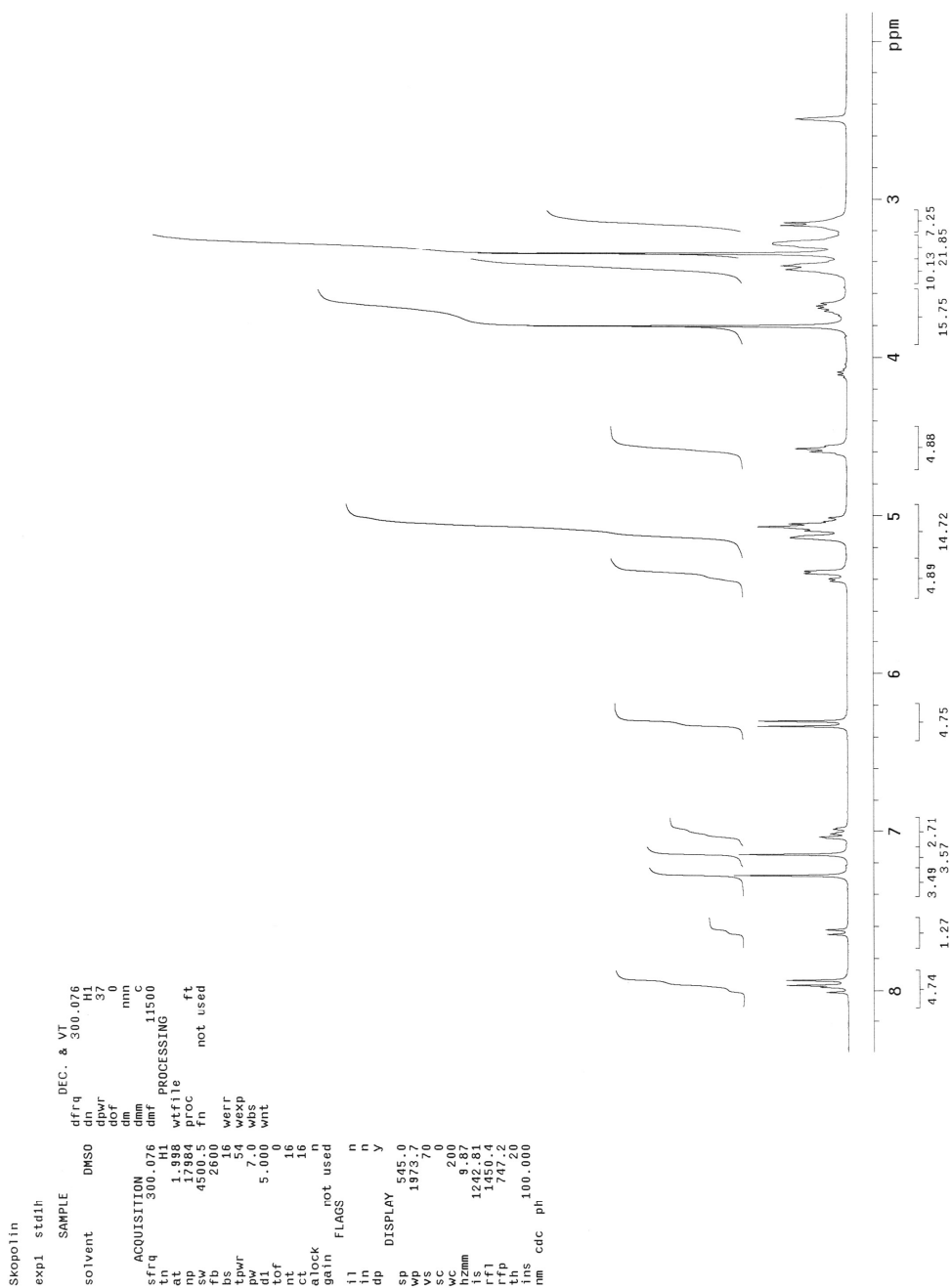
Obr. č. 29:



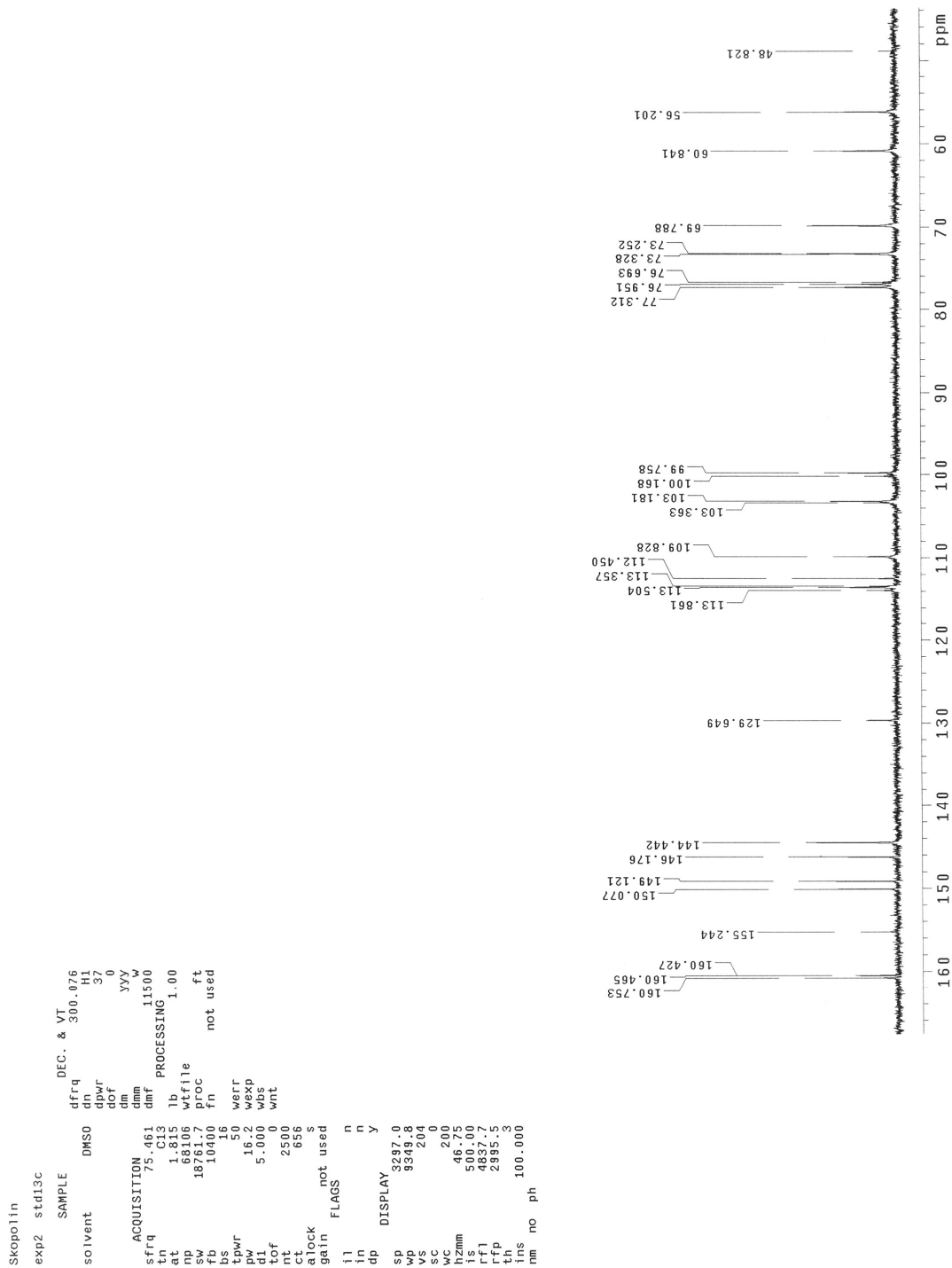
IČ spektroskopie:

Látka vykazovala absorpční pásy v oblasti vlnočtů 3432, 2923, 2885, 1699, 1617, 1567, 1508, 1426, 1391, 1280 cm^{-1} , KBr disk.

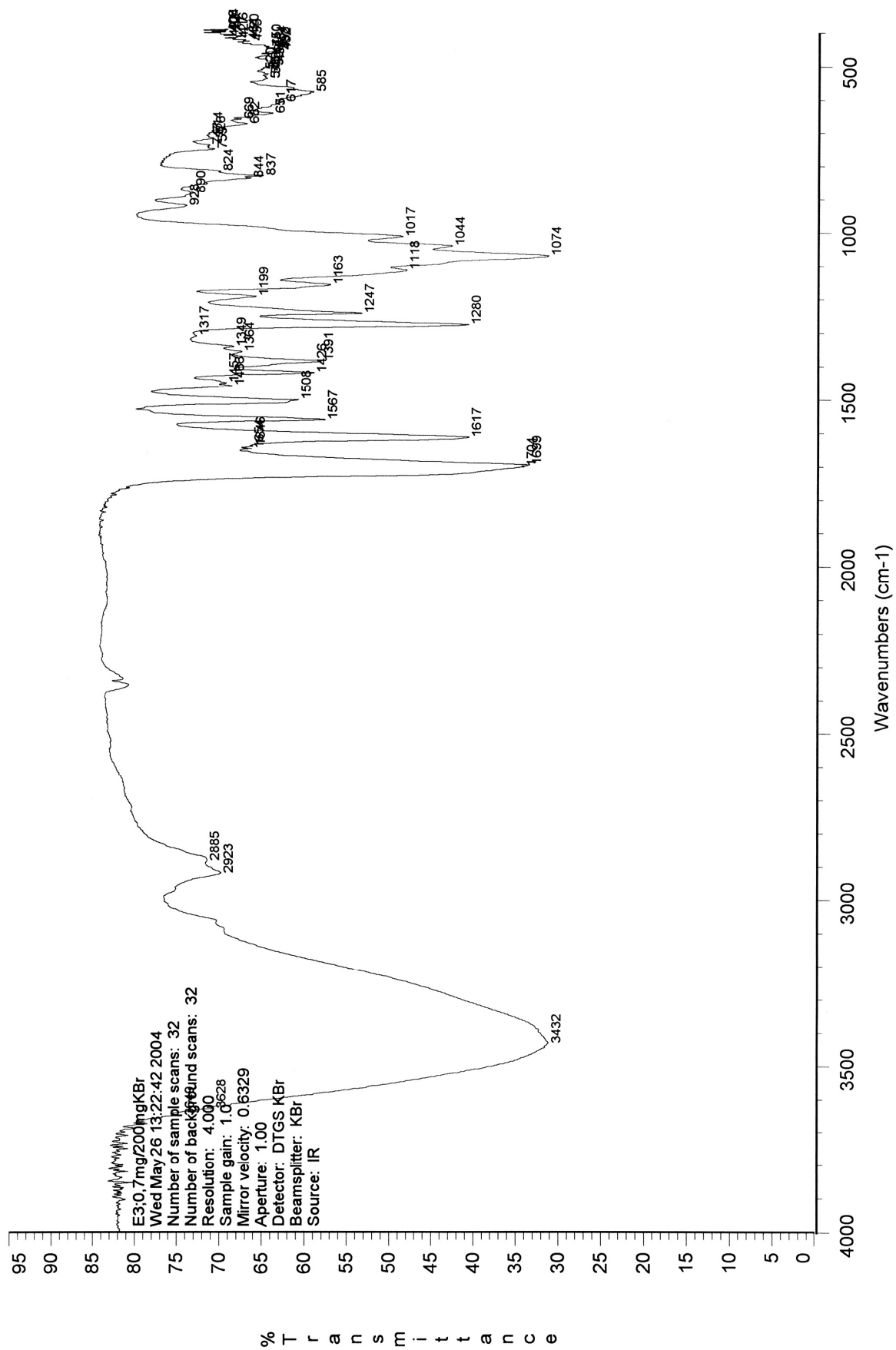
Obr. č. 30: Skopolin - ^1H NMR spektrum



Obr. č. 31: Skopolin – ¹³C NMR spektrum



Obr. č. 32: Skopolin - IČ spektrum



3.7.4. Látka 4 - 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol [112, 116]

Změřená t.t.:

81 – 84 °C (tab. 82 – 83 °C)

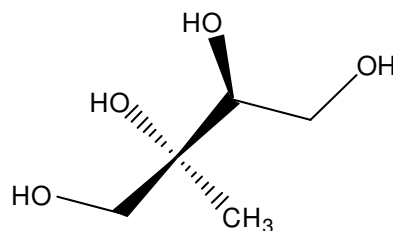
Tabelovaná Mh:

136,146

Sumární vzorec:

C₅H₁₂O₄

Vzorec č. 31:



Tabelovaná hodnota optické otáčivosti:

$[\alpha]_D +21,4$ (c 7 g/100 ml, voda)

Zjištěná molární optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{24} +19,6$ (c 3,5 g/100 ml, voda)

- Optická otáčivost roztoku o koncentraci 35 mg/ml byla měřena v 1 ml kyvetě délky 10 cm při teplotě 24 °C. Byla provedena 3 měření $\alpha = 0,68, 0,68, 0,70$
- Výpočet proveden dle vzorce 1

l = délka kyvety v dm

c = koncentrace roztoku v g/100 ml

$$(1) \quad [\alpha]_D^{24} = \frac{\alpha \times 100}{l \times c}$$

NMR spektroskopie [117]:

¹H-NMR a ¹³C-NMR data:

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD):

δ 1.10 (3H, s, CH₃), 3.43 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H1), 3.52 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H1), 3.64-3.53 (2H, m, H-3, H-4), 3.79 (1H, dd, $J = 9.6$ Hz, $J = 1.9$ Hz, H-4)

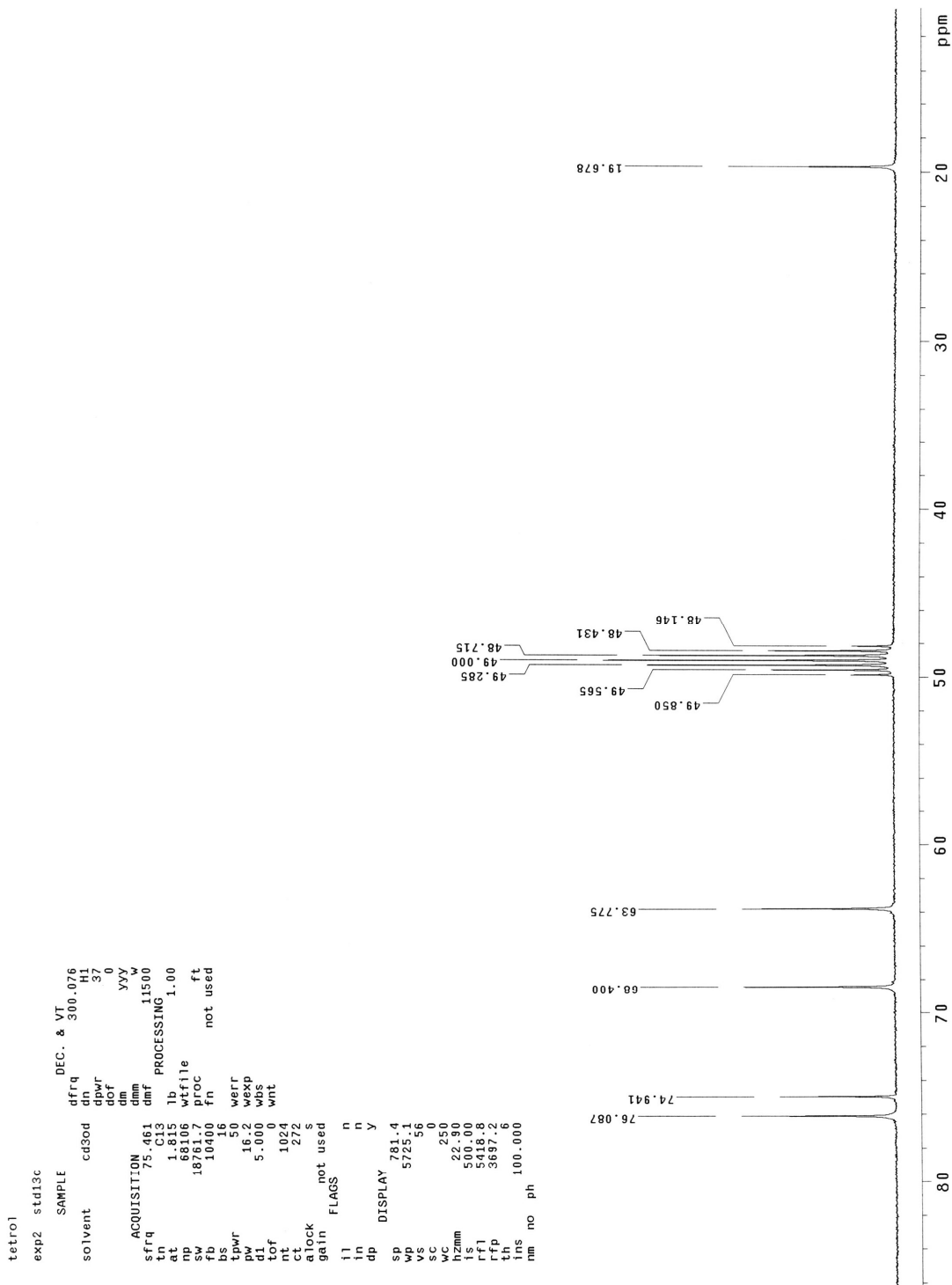
¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD):

δ 19.7 (C-1), 63.8 (C-4), 68.4 (C-1), 74.9 (C-2), 76.1 (C-3)

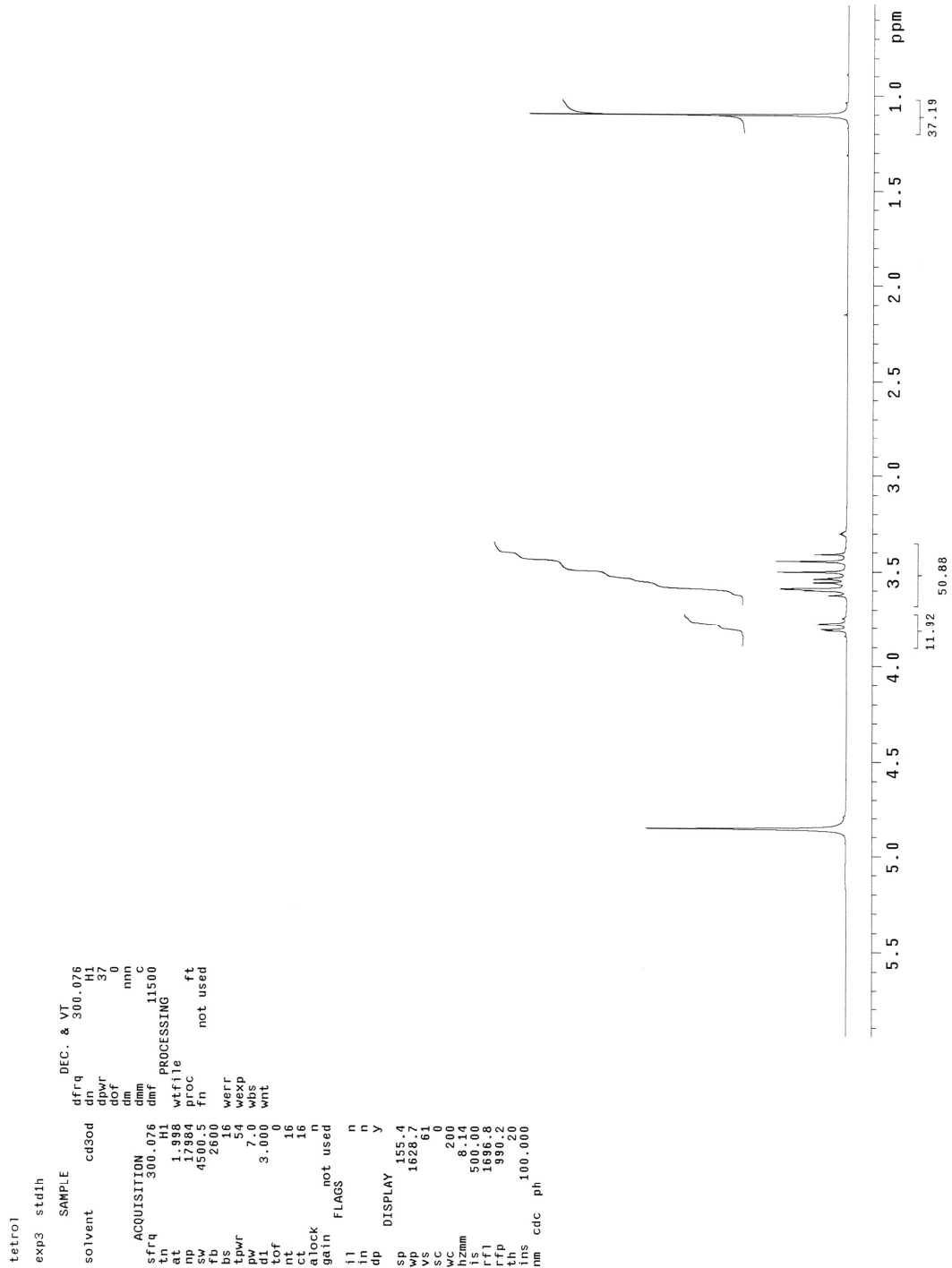
IČ spektroskopie:

Látka vykazovala absorpční pásy v oblasti vlnočtů 3405, 2941, 1464, 1388 cm⁻¹, KBr disk.

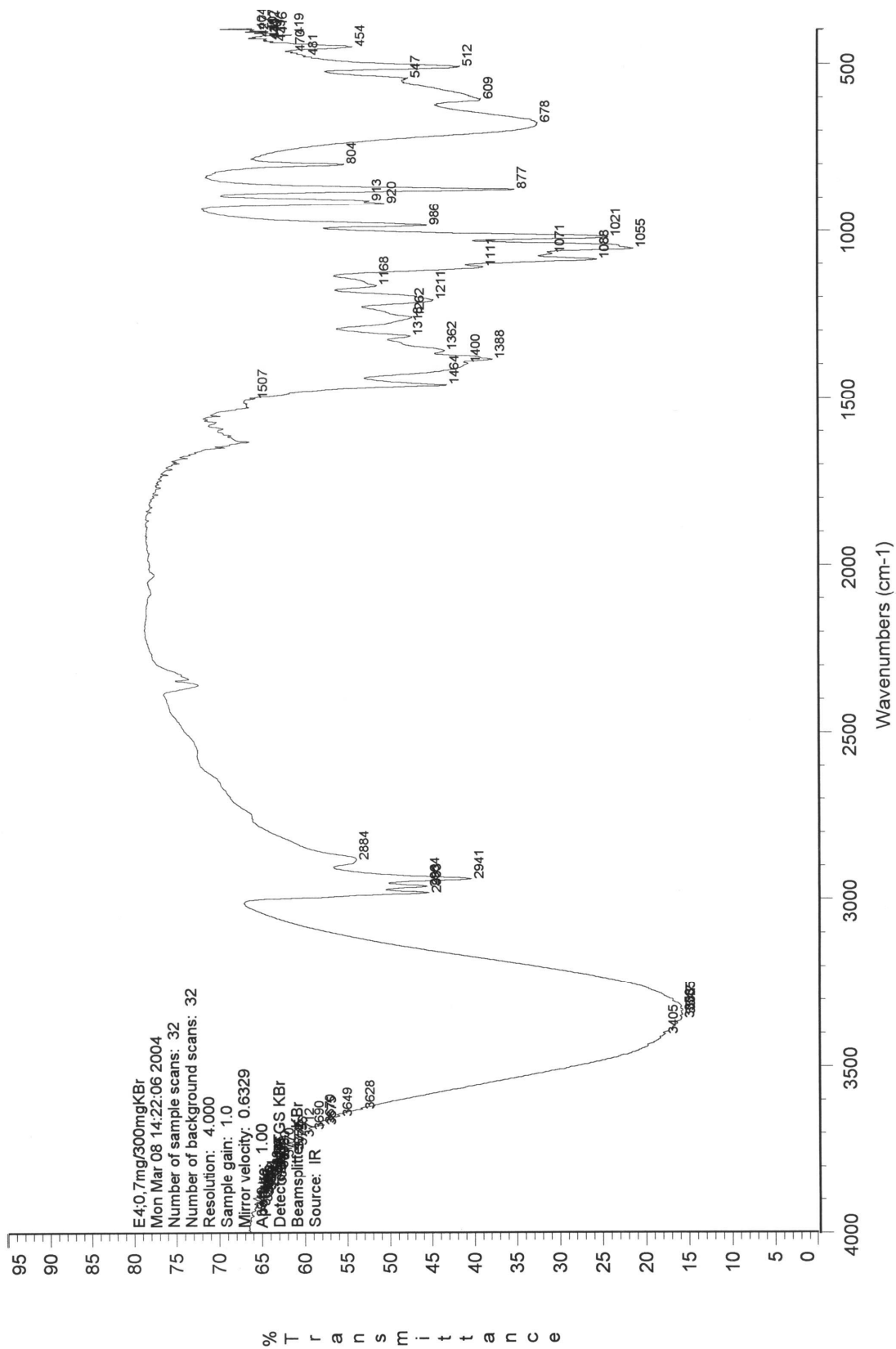
Obr. č. 33: 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol – ¹H NMR spektrum



Obr. č. 34: 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol – ¹³C NMR spektrum



Obr. č. 35: IČ spektrum 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol



3.7.5. Látka 5 a 6 - 8-methyldekanová kyselina a olejová kyselina [112]

➤ *8-methyldekanová kyselina*

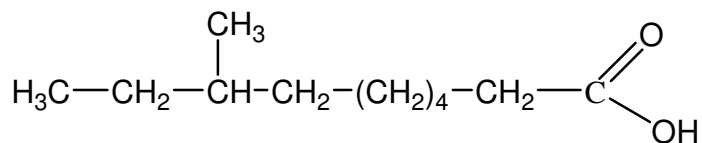
Tabelovaná Mh:

186,3

Sumární vzorec:

$C_{11}H_{22}O_2$

Vzorec č. 32:



➤ *Olejová kyselina*

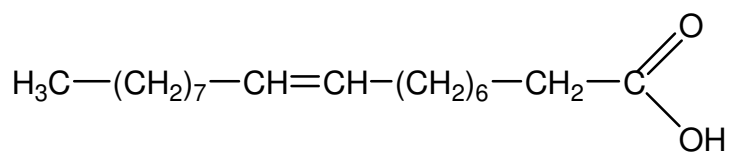
Tabelovaná Mh:

282,46

Sumární vzorec:

$C_{18}H_{34}O_2$

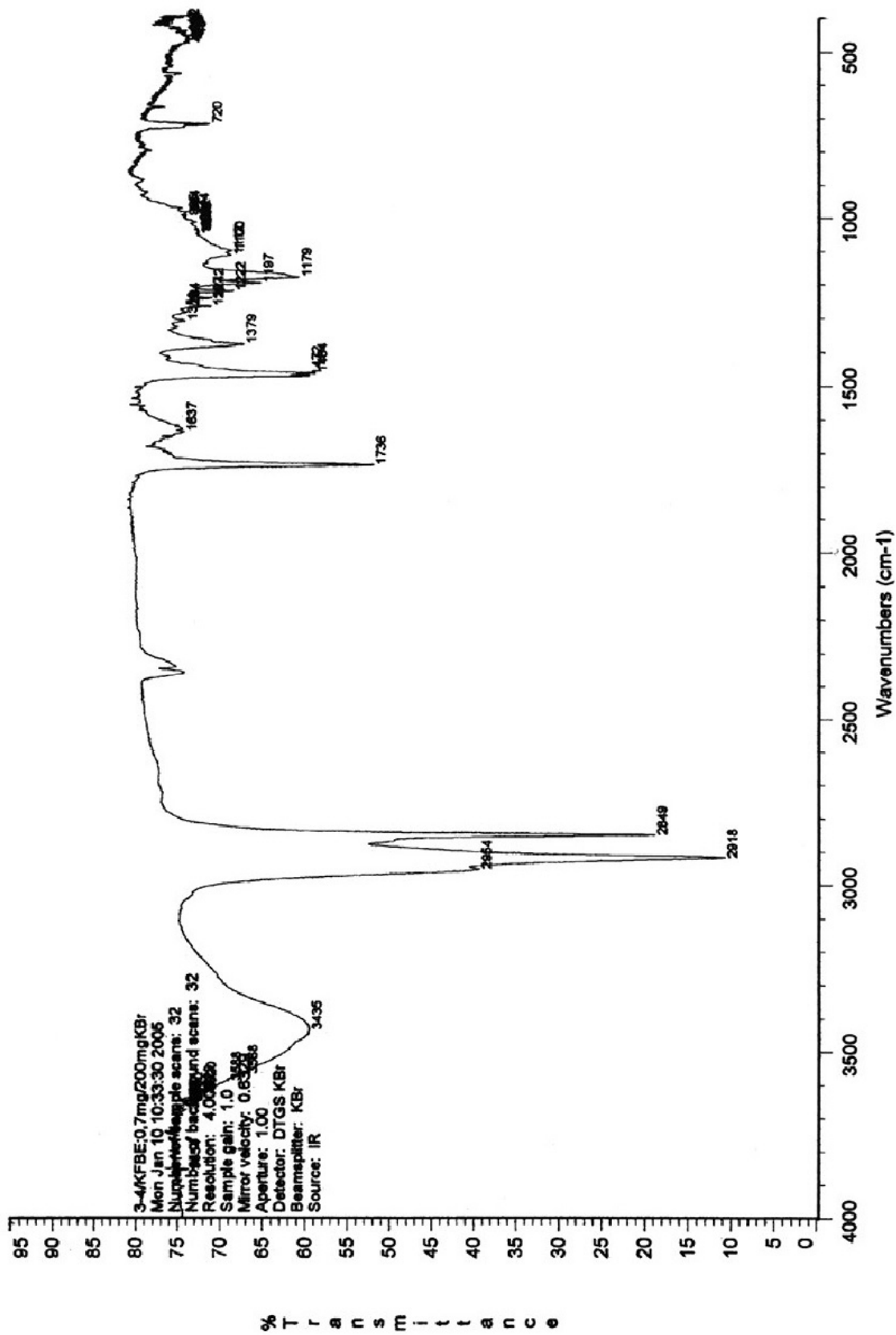
Vzorec č. 33:



IČ spektroskopie směsi:

Směs látek vykazovala absorpční pásy v oblasti vlnočtů $2915, 2849, 1736 \text{ cm}^{-1}$, KBr disk.

Obr. č. 36: IČ spektrum směsi látky 5 a 6



3.7.6. Látka 7 - ester ferulové kyseliny s lineárními alkoholy C14 - C17 [112]

➤ *Ferulová (3-methoxy-4-hydroxyskořicová) kyselina*

Tabelovaná t.t.:

168 – 172 °C

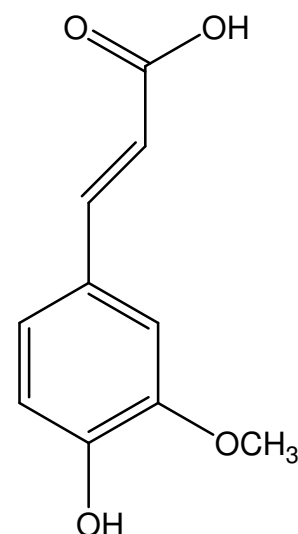
Tabelovaná Mh:

194,18

Sumární vzorec:

C₁₀H₁₀O₄

Vzorec č. 34:



NMR spektroskopie směsi:

¹H-NMR a ¹³C-NMR data:

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 0.85 (*t*, *J* 6.7 Hz, CH₃) 0.88 (*t*, *J* 6.7 Hz, CH₃) 1.16-1.46 (*m*, CH₂), 1.49-1.78 (*m*, CH₂), 3.93 (*s*, OCH₃), 4.11 (*t*, *J* 6.7 Hz, CH₃) 4.18 (*t*, *J* 6.7 Hz, OCH₂), 5.84 (*bs*, OH) 6.29 (*d*, *J* 15.9 Hz, CH) 6.92 (*d* *J* 8.1 Hz, H5) 7.03 (*d*, *J* 1.9 Hz, H2) 7.07 (*dd*, *J*₁ 8.1 Hz, *J*₂ 1.9 Hz, H6) 7.61 (*d*, *J* 15.9 Hz, CH)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ 11.4, 14.1, 19.2, 22.7, 26.0, 27.1, 27.4, 28.0, 28.8, 29.3, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 29.7, 29.7, 30.0, 31.9, 34.4, 36.6, 39.0, 55.9, 64.6, 109.2, 114.7, 115.7, 123.0, 127.0, 144.6, 146.7, 147.8, 167.4

Poloha substituentů skořicové kyseliny byla potvrzena experimenty GHMQC, GHSQC, DPFGNOE.

3.7.7. Látka 8, 9, 10 - palmitová, stearová a heptadekanová kyselina – směs
[112, 118]

➤ *Stearová kyselina*

Tabelovaná t.t.:

67 – 72 °C

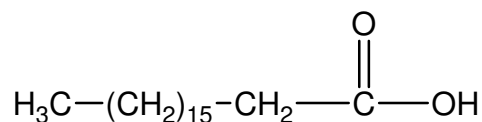
Tabelovaná Mh:

284,48

Sumární vzorec:

C₁₈H₃₆O₂

Vzorec č. 35:



➤ *Palmitová kyselina*

Tabelovaná t.t.:

61 – 62,5 °C

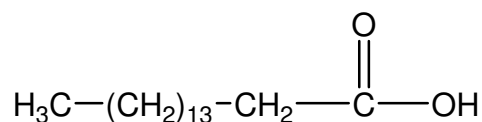
Tabelovaná Mh:

256,46

Sumární vzorec:

C₁₆H₃₂O₂

Vzorec č. 36:



➤ *Heptadekanová (Margarová) kyselina*

Tabelovaná t.t.:

59 – 61 °C

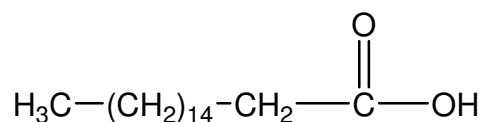
Tabelovaná Mh:

270,45

Sumární vzorec:

C₁₇H₃₄O₂

Vzorec č. 37:



NMR spektroskopie směsi:

¹H-NMR a ¹³C-NMR data:

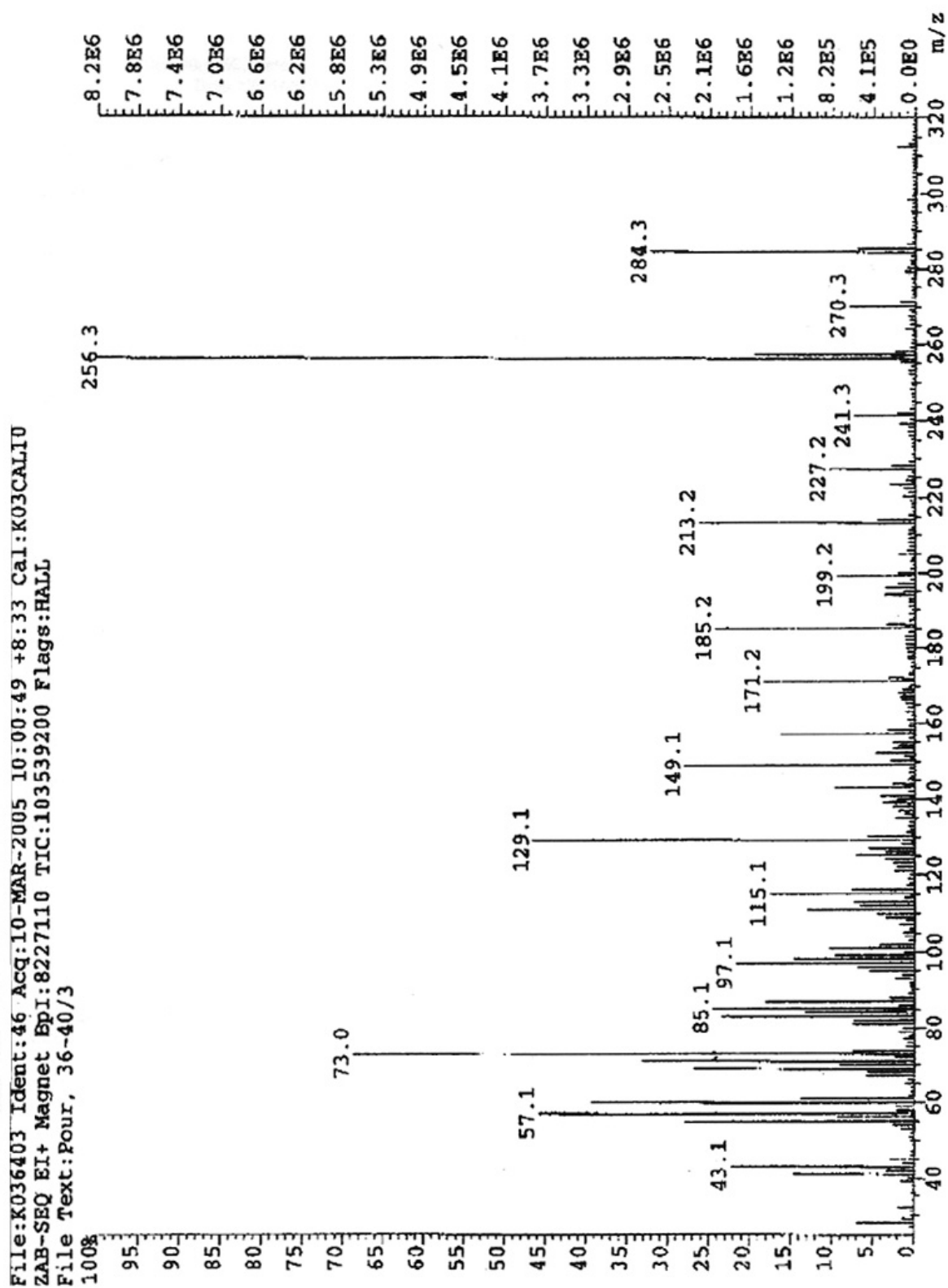
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 0.88 (*t*, *J* 6.7 Hz, CH₃) 0.17-1.40 (*m*, CH₂) 1.55-1.71 (*m*, CH₂), 2.35 (*t*, *J* 7.6 Hz, CH₂)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ 14.1, 22.7, 24.5, 24.7, 28.8, 29.0, 29.2, 29.4, 29.4, 29.6, 29.7, 29.7, 31.9, 33.9, 179.1, 179.1

Obr. č. 37: Záznam hmotnostního spektra směsi látek 7, 8, 9



Hmotnostní spektrum:

Zjištěné molekulové fragmenty: 284.3, 270.3, 256.3, 241.3, 227.2, 213.2, 199.2, 185.2, 171.2, 149.1, 129.1, 115.1, 97.1, 85.1, 73.0, 57.1, 43.1

Ionizace probíhala pomocí elektronové ionizace v pozitivním modu, kdy molekulová hmotnost je určována z tzv. molekulárních iontů M^+ .

Molekulový iont M^+ pro stearovou kyselinu odpovídá $m/z = 284.3$ ($M_h = 284.48$) pro palmitovou kyselinu $m/z = 256.3$ ($M_h = 256.46$), pro heptadekanovou kyselinu $m/z = 270.3$ ($M_h = 270.45$).

Ionty 43.1, 57.1, 71, 85.1, 99, 113 jsou klasické ionty odpovídající alifatické sérii alkylů $[C_nH_{2n+1}]^+$.

Ionty 59, 73.0, 87, 101, 115.1, 129.1, 143, 157, 171.2, 185.2, 199.2, 213.2, 227.2, 241.3 odpovídají alifatické sérii obsahující kyselinu obecného vzorce $[C_nH_{2n-1}O_2]^+$.

3.8. Kvantitativní stanovení vyizolovaných obsahových látek

3.8.1. Kvantitativní stanovení kumarinů

Stanovení bylo provedeno HPLC analýzou připravených extraktů za spektrofotometrické detekce stanovovaných látek [119].

Postup extrakce:

K extrakci byla použita suchá, najemno rozemletá droga *E. alsinoides* přesívována přes síto 0,4 mm. Do tří zkumavek bylo naváženo přesně 3x 250,0 mg drogy, která byla převrstvena 10,0 ml 95% EtOH. Extrakce byla provedena po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni při teplotě 50 °C a stupni intenzity 10. Po každé extrakci byl extrakt přefiltrován, zbytek na filtru promyt 3x 5 ml EtOH a znovu extrahován ještě 2x za stejných podmínek. Jednotlivé odpovídající frakce byly spojeny, přefiltrovány přes vatou s křemelinou a odpařeny do sucha (50 °C, vakuová odparka).

Hmotnost byla stanovována po 24 hodinovém sušení extraktu v exsikátoru nad perlami bezvodého silikagelu. Pro měření byly extrakty rozpuštěny v 1,00 ml MeOH a odeslány na HPLC systém.

Tab. č. 27: Přehled frakcí

	Odparek (g)
Extrakt 1	0,0239
Extrakt 2	0,0245
Extrakt 3	0,0243

Tab. č. 28: HPLC podmínky

HPLC systém Merck, WellChrom pumpa K-1800, detektor DAD K-2700	
Kolona	Merck, Purospher RP ₁₈ endcapped, 5 µm, 250 x 4mm
Předkolona	Tessek, SGX C ₁₈ , CGC 30 x 3mm, 7 µm
Vlnová délka	254 nm
Průtok	0,3 ml/min
Mobilní fáze	30% ACN : 70% H ₂ O, isokraticky
Nástřik	20 µl

Kalibrační křivka byla sestrojena ze 3 měření.

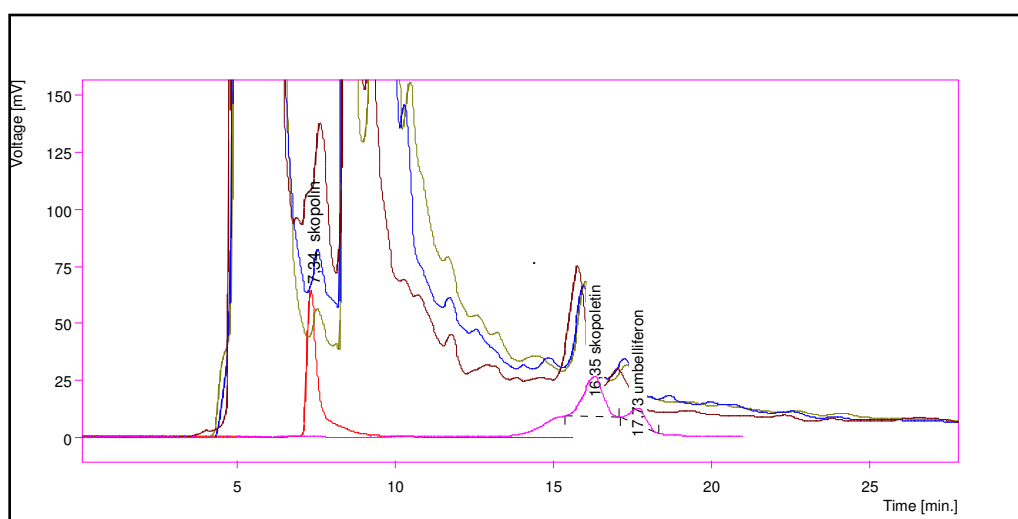
Metoda je od 0,05 mg/ml do 5 mg/ml lineární.

Směrodatná odchylka se pohybovala do 3,5 %.

Tab. č. 29: Obsah látek 1, 2 a 3 v extraktu

Vzorek	Obsah v suché rostlině (%)		
	Skopoletin-1	Umbelliferon-2	Skopolin-3
Extrakt 1	0,0276 ± 0,002	0,026 ± 0,001	0,0091 ± 0,0001
Extrakt 2	0,0266 ± 0,001	0,025 ± 0,001	0,0089 ± 0,0002
Extrakt 3	0,0270 ± 0,001	0,026 ± 0,001	0,0089 ± 0,0002
Průměr	0,0271 ± 0,001	0,0257 ± 0,001	0,0090 ± 0,0002
Rovnice přímky	Y = 18330,8 * X	Y = 5597,4 * X	Y = 14349 * X
Korelační koef.	0,99816	0,99915	0,99935

Obr. č. 38: HPLC stanovení kumarinů



Barva červená, fialová – standardy

Barva zelená – extrakt 1

Barva modrá – extrakt 2

Barva hnědá – extrakt 3

3.8.2. Kvantitativní stanovení 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu

Stanovení bylo provedeno GC-FID analýzou připravených extraktů [120].

Postup extrakce:

Extrakce byla provedena 4x s 250,0 mg suché drogy *E. alsinoides*, která byla předem rozdrovena v třecí misce a přesívána přes síto 0,4 mm. Droga byla přelita 50,0 ml vody a ponechána 2 hodiny na vodní lázni při 50 °C. Poté byla droga macerována 15 hodin a následně přefiltrována. Každý vzorek byl promyt 2x 5 ml vody a zbytek byl 2x extrahován 15,0 ml vody v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut při teplotě 50 °C, stupni intenzity 10. Po filtraci a promytí 3x 5 ml vody byly odpovídající

podíly spojeny a odpařeny do sucha. Z jednotlivých baněk byla stanovovaná látka vyextrahována 6x 5 ml MeOH za účelem snížení obsahu balastních látek. MeOH výtřepky byly odpařeny do sucha a po hodinovém sušení v exsikátoru nad perlami bezvodého silikagelu byly zváženy.

Tab. č. 30: Přehled frakcí

	Odparek (g)
Extrakt 1	0,0374
Extrakt 2	0,0390
Extrakt 3	0,0417
Extrakt 4	0,0391

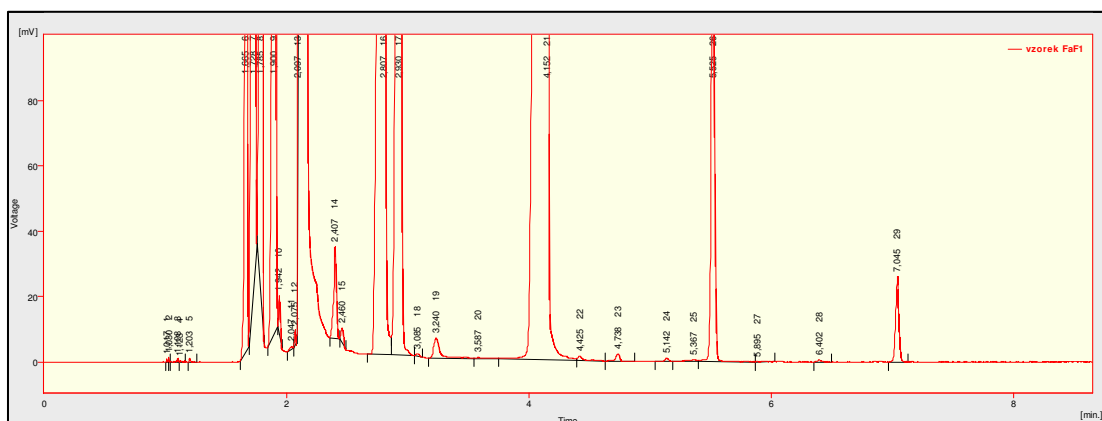
Odparek byl rozpuštěn v 10,0 ml 90% MeOH. K měření bylo do derivatizační vialky odebráno 100 µl roztoku.

Derivatizace a kalibrační křivka

Vzhledem ke struktuře látky a obtížné tvorbě trimethylsilyletherů bylo použito činidlo Tri-Sil TBT (Pierce), 100 µl pyridinového roztoku látky o dané koncentraci bylo derivatizováno 100 µl činidla 1 h při 70°C. Analýza byla provedena na přístroji GC Fissons 8000 s detekcí FID.

Látka tvořila jeden souměrný, neštěpící se pík (viz. obr. č. 39), retenční čas 7 minut, píky předcházející jsou z derivatizační směsi. Koncentrace byla přímo úměrná velikosti plochy pod křivkou detektoru.

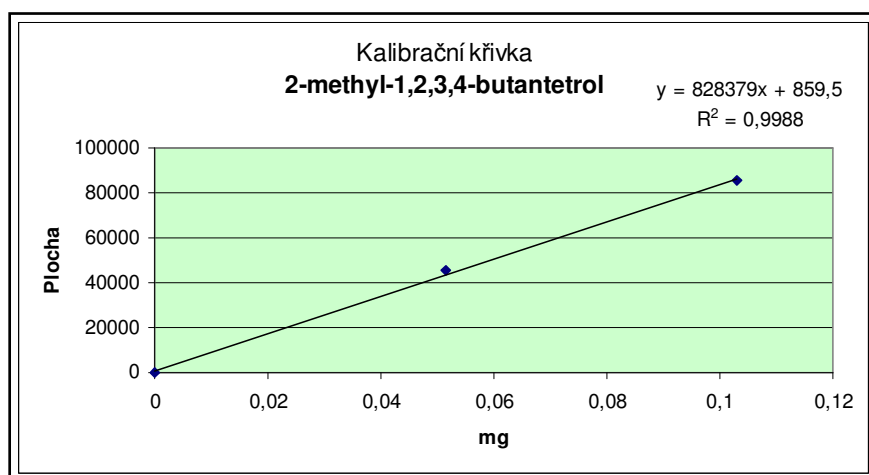
Obr. č. 39: Záznam analýzy GC-FID



Tab. č. 31: Obsah látky 4 v extraktu

Vzorek	Obsah v rostlině (%)
Extrakt 1	0,864 ± 0,002
Extrakt 2	0,876 ± 0,003
Extrakt 3	0,865 ± 0,005
Extrakt 4	0,877 ± 0,006
Průměr	0,870 ± 0,003
Rovnice přímky	$Y = 828379X + 859,5$
Korelační koef.	0,9988

Obr. č. 40: Kalibrační křivka



Suchá nať *E. alsinoides* obsahuje průměrně 0,87 % 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu.

3.9. Hodnocení biologické aktivity *Evolvulus alsinoides* L.

3.9.1. Antioxidační aktivita a stanovení obsahu fenolových látek

3.9.1.1. Antioxidační aktivita testovaná in vitro DPPH testem [121]

Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-diphenyl-1-pikrylhydrazyl radikálu (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku.

Průběh reakce byl vyhodnocen na přístroji FIALab 3000 analyser s pístovým čerpadlem 2,5 ml, šesticestným ventilem, USB 2000-UV/VIS spektrofotometrem, SMA-Z průtokovou celou (1-cm délka), objem nosné cívky 0,6 mm, program FIALab pro Windows verze 5.9.126.

Stanovení probíhá metodou sekvenční injekční analýzy (SIA) se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu.

Pro přípravu roztoků byla použita vysoce čištěná deionizovaná voda. Jako slepý vzorek a nosný proud byl použit na ultrazvuku odplyněný (5 minut) 50% EtOH.

Roztok DPPH v 50% EtOH o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M byl připraven rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% EtOH ve 100ml odměrné baňce. Roztok byl doplněn vodou po rysku a odplyněn na ultrazvuku. Měřený vzorek byl rozpuštěn v 50% EtOH a z něj byly připraveny koncentrace 1, 0,5, 0,25, 0,1 a 0,05, 0,025, 0,01 mg/ml.

3.9.1.1.1. Stanovení obsahu fenolových látek

Metoda stanovení celkového obsahu látek fenolového typu (CFL) je založena na barevné reakci těchto látek s Folin-Ciocalteuovým činidlem (fosfowolframan a fosfomolybdenan sodný), zbarvení se hodnotí spektrofotometricky. Obsah fenolových látek je vyjádřen jako obsah galové kyseliny. [122]

Příprava vzorku: Roztok o koncentraci 5,0 mg/ml byl připraven rozpuštěním 3,0 mg látky ve 100 μ l MeOH a doplněn 5,9 ml vody. Na test bylo ze vzorku odebráno 0,4 ml.

Příprava kalibrační křivky: Roztok standardu byl připraven rozpuštěním 20,0 mg galové kyseliny ve 100,0 ml vody. Na sestavení kalibrační křivky bylo použito 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45 ml základního roztoku.

Odebrané roztoky byly doplněny do 0,5 ml vodou, bylo přidáno 1,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla, po 15 minutách bylo přidáno 1,5 ml koncentrovaného roztoku Na_2CO_3 . Absorbance byla měřena proti porovnávacímu roztoku po 1 hodině stání. Obsah je vyjádřen v % obsahu galové kyseliny.

3.9.1.1.2. Zjištěné hodnoty EC₅₀ testovaných vzorků

Měření bylo provedeno u frakce petroletherové (FPe), etherové (FEt₂O) a polárního zbytku (PZ). Dále u frakce fenolových látek (FFL) a frakce prosté fenolových látek (FPFL) získaných z polyamidu a frakcí vzniklých jejich dělením na silikagelových kolonách. Byly měřeny FFL 12-35, FPFL a dále frakce FPFLHD1, FPFLHD2, FPFLHD3 a FPFLHD1-Di-EtOH 1-26. U frakce etherové byly měřeny spojené frakce 15-23, 26-50, 51-69, 70-92, 93-117. Dále byla DPPH testem hodnocena aktivita čistých látek skopoletinu, skopolinu, umbelliferonu a 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu a také tři směsné frakce izolovaných krystalů (K) získané z frakce petroletherové FPe 3-4K, FPe 15-16K, FPe 36-40K.

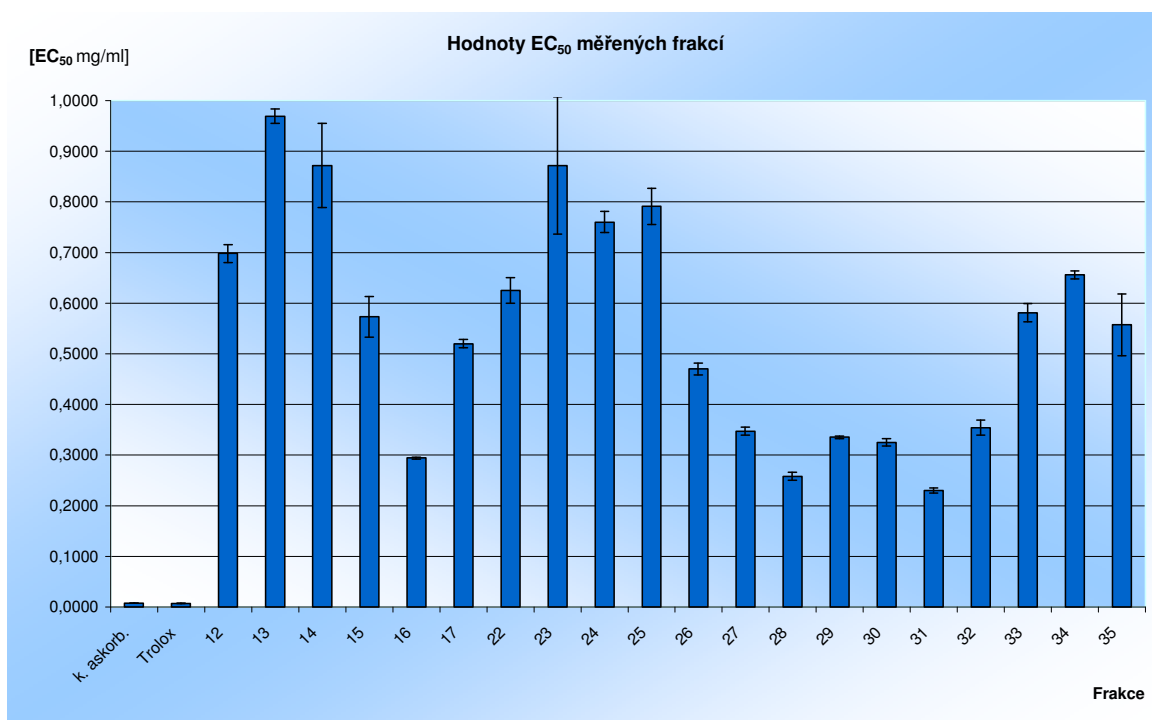
Tab. č. 32: DPPH aktivita základních frakcí

Vzorek	CFL [%]	EC ₅₀ [mg/ml]
PZ	-	> 1
FPe	-	> 1
FEt ₂ O	-	> 1

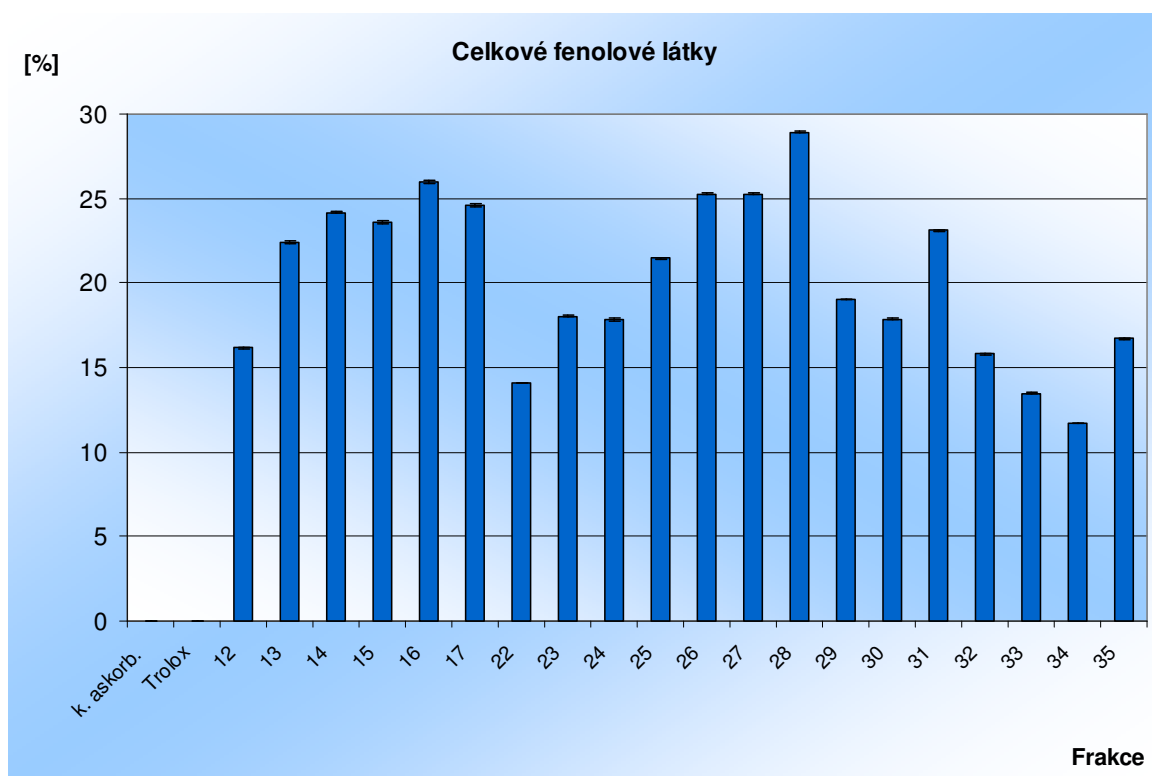
Tab. č. 33: DPPH aktivita měřených frakcí FFL a podfrakcí FPFL

Vzorek	CFL [%]	EC ₅₀ [mg/ml]	Vzorek	CFL [%]	EC ₅₀ [mg/ml]
FFL 12	16,149 ± 0,084	0,698 ± 0,018	FFL 29	19,027 ± 0,027	0,335 ± 0,003
FFL 13	22,417 ± 0,074	0,969 ± 0,014	FFL 30	17,852 ± 0,038	0,325 ± 0,007
FFL 14	24,192 ± 0,027	0,872 ± 0,083	FFL 31	23,104 ± 0,063	0,230 ± 0,005
FFL 15	23,608 ± 0,061	0,573 ± 0,040	FFL 32	15,779 ± 0,057	0,350 ± 0,015
FFL 16	25,990 ± 0,086	0,294 ± 0,002	FFL 33	13,479 ± 0,075	0,581 ± 0,018
FFL 17	24,609 ± 0,073	0,520 ± 0,008	FFL 34	11,721 ± 0,025	0,656 ± 0,008
FFL 18	18,460 ± 0,037	> 1	FFL 35	16,726 ± 0,036	0,557 ± 0,061
FFL 19	14,139 ± 0,049	> 1	Celková FFL	8,851 ± 0,074	0,896 ± 0,012
FFL 20	17,796 ± 0,057	> 1	Celková FPFL	3,257 ± 0,005	> 1
FFL 21	15,741 ± 0,045	> 1	FPFLHD1	3,568 ± 0,039	> 1
FFL 22	14,060 ± 0,012	0,625 ± 0,025	FPFLHD2	3,025 ± 0,053	> 1
FFL 23	18,045 ± 0,067	0,872 ± 0,136	FPFLHD3	2,567 ± 0,016	> 1
FFL 24	17,827 ± 0,076	0,760 ± 0,021	FPFLHD1 Di-H ₂ O	2,684 ± 0,002	> 1
FFL 25	21,465 ± 0,020	0,791 ± 0,036	FPFLHD1 Di-EtOH	8,756 ± 0,022	> 1
FFL 26	25,276 ± 0,050	0,470 ± 0,012			
FFL 27	25,285 ± 0,073	0,347 ± 0,008	Trolox	-	0,0072 ± 0,0002
FFL 28	28,929 ± 0,038	0,258 ± 0,008	Askorbová kyselina	-	0,0077 ± 0,0001

Obr. č. 41: Graf znázornění EC₅₀ měřených frakcí FFL: Frakce s hodnotou EC₅₀ nad 1 mg/ml nejsou v grafu uváděny.



Obr. č. 42: Graf znázornění CFL měřených frakcí FFL



Tab. č. 34: DPPH aktivita měřených podfrakcí FPFLHD1-Di-EtOH 1 – 26

Vzorek	CFL [%]	EC ₅₀ [mg/ml]	Vzorek	CFL [%]	EC ₅₀ [mg/ml]
Fr. 1	6,561 ± 0,027	> 1	Fr. 15	3,692 ± 0,076	> 1
Fr. 2	9,169 ± 0,044	> 1	Fr. 16	7,442 ± 0,010	> 1
Fr. 3	3,230 ± 0,036	> 1	Fr. 17	5,282 ± 0,014	> 1
Fr. 4	8,592 ± 0,033	> 1	Fr. 18	5,470 ± 0,032	> 1
Fr. 5	5,405 ± 0,014	> 1	Fr. 19	6,371 ± 0,026	> 1
Fr. 6	4,430 ± 0,012	> 1	Fr. 20	6,574 ± 0,007	> 1
Fr. 7	6,589 ± 0,011	> 1	Fr. 21	7,777 ± 0,005	> 1
Fr. 8	12,984 ± 0,049	> 1	Fr. 22	10,304 ± 0,025	0,915 ± 0,049
Fr. 9	5,685 ± 0,009	> 1	Fr. 23	12,466 ± 0,043	0,877 ± 0,057
Fr. 10	3,571 ± 0,004	> 1	Fr. 24	8,963 ± 0,026	> 1
Fr. 11	3,270 ± 0,022	> 1	Fr. 25	11,393 ± 0,011	> 1
Fr. 12	2,761 ± 0,016	> 1	Fr. 26	9,153 ± 0,002	> 1
Fr. 13	3,879 ± 0,004	> 1	Trolox		0,0072 ± 0,0002
Fr. 14	4,954 ± 0,010	> 1	Askorbová kyselina		0,0077 ± 0,0001

Tab. č. 35: DPPH aktivita čistých látek

Vzorek	EC ₅₀ μM	EC ₅₀ mg/ml
Skopoletin	> 5204	> 1
Umbelliferon	> 6167	> 1
Skopolin	> 2822	> 1
2-methyl-1,2,3,4-butantetrol	> 7345	> 1
FPe 3-4K*	-	> 1
FPe 15-16K*	-	0,463 ± 0,0277
FPe 36-40K*	-	> 1
Trolox	28,5 ± 0,781	0,0072 ± 0,0002
Askorbová kyselina	43,7 ± 0,603	0,0077 ± 0,0001

*látky byly špatně rozpustné a vytvářely suspenzi

Antioxidační aktivita kumarinů nebyla v DPPH testu ve sledovaných koncentracích zjištěna. Tyto zjištěné výsledky jsou v korelaci s dalšími pokusy prováděnými nezávisle jinými autory [123]. Mírnou antioxidační aktivitu vykazovala směs krystalů FPe 15-16 (estery ferulové kyseliny). Jako standardy byly použity antioxidanty trolox EC₅₀ = 28,5 ± 0,781 μM (0,0072 ± 0,0002 mg/ml) a askorbová kyselina EC₅₀ = 43,7 ± 0,603 μM (0,0077 ± 0,0001 mg/ml).

3.9.1.2. Antioxidační aktivita testovaná in vitro FRAP testem [124, 125]

Metoda FRAP je založena na principu redoxní reakce (ferric reducing antioxidant potential). Při reakci redukuje antioxidant ze vzorku komplex Fe^{3+} -2,4,6-tri-(2-pyridyl-1,2,3-triazin) na Fe^{2+} -TPZP. Nárůst absorbance při vlnové délce 593 nm odpovídá množství komplexu Fe^{2+} -TPZP a je přímo úměrný antioxidační aktivitě vzorku. Metoda se provádí při hodnotě pH 3,6. Metoda hodnotí pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} a nemusí korelovat s antioxidační aktivitou vzorku.

Hodnota FRAP v časovém intervalu t (FRAP hodnota t) byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$\text{FRAP hodnota } t \text{ [M]} = (\Delta a_t \text{ FI} / \Delta a_t \text{ Fe}^{2+}) \times 7,5^{-5}$$

$\Delta a_t \text{ FI}$ – změna absorbance v časovém intervalu 4 a 60 minut

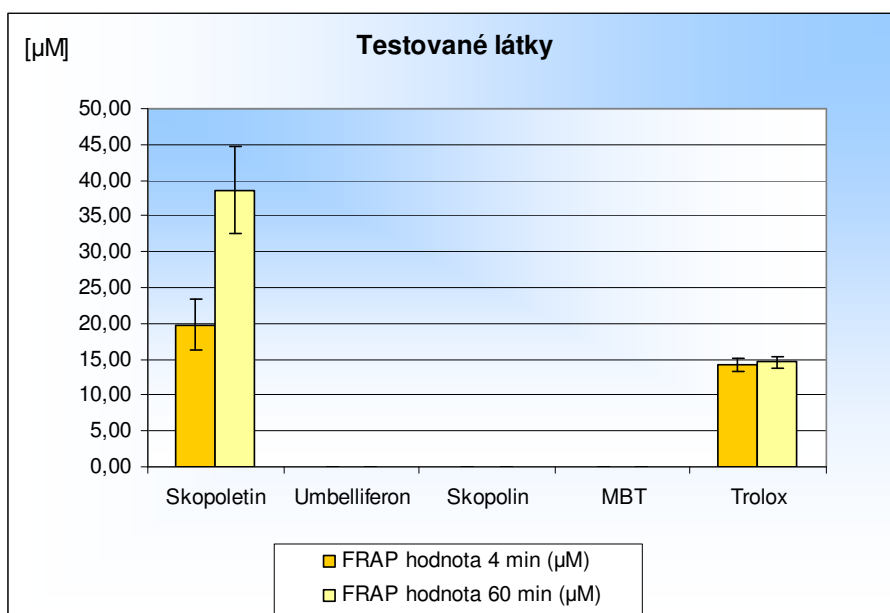
$\Delta a_t \text{ Fe}^{2+}$ – změna absorbance v porovnání s FeCl_3 odpovídající koncentrace v časovém intervalu 4 a 60 minut

Měření bylo provedeno na přístroji microplate reader Anthos 2010 za použití 96-jamkových destiček (Brand 400 μl , Fisher).

Tab. č. 36: FRAP hodnoty testovaných látek v čase 4 a 60 minut

Látka	FRAP hodnota 4 min (μM)	FRAP hodnota 60 min (μM)
Skopoletin	$19,8 \pm 3,6$	$38,6 \pm 6,1$
Umbelliferon	~ 0	~ 0
Skopolin	~ 0	~ 0
2-methyl-1,2,3,4-butantetrol	~ 0	~ 0
Trolox	$14,18 \pm 0,9$	$14,66 \pm 0,8$

Obr. č. 43 : FRAP hodnoty testovaných látek



3.9.2. Antiagregační aktivita - Agregometrie

Testování antiagregační aktivity bylo provedeno zavedeným *in vitro* testem optické agregometrie v PRP (platelets rich plasma - plazma bohatá na destičky) metodou podle Borna [126, 127].

3.9.2.1. Postup měření

Příprava PRP a PPP - (platelets poor plasma - plazma bez destiček):

- krev s citrananem se centrifuguje při 900 ot./min. po dobu 10 min
- získaná vrstva **PRP** se odebere do plastové zkumavky
- zbytek se odstředí 7 min při 4500 ot./min.
- získaná čirá vrstva je **PPP**
- PPP slouží k naředění PRP na požadovaný počet destiček - 250 000/μl a jako referenční vzorek
- v PRP se určí počet destiček, zjistí se objem PRP a PRP se naředí pomocí PPP na požadovanou hodnotu 250 000 trombocytů/μl dle vzorce:

$$V_{PPP} \text{ pro ředění} = \frac{(\text{počet destiček v PRP} \times V_{PRP}) - (2,5 \times V_{PRP})}{2,5}$$

Princip měření:

Měření bylo provedeno za použití agregometru Bornova typu - Whole blood lumi-agregometer [Ca²⁺], typ 500-Ca (výr. Chrono-Log Corp., USA) s využitím softwaru vyhodnocujícího agregační křivku (program Aggro/Link verze 4.75). Jedná se o spektrofotometr s fixní vlnovou délkou a s termostatem udržujícím teplotu během měření na 37 °C (± 0,2 °C). Kontakt destiček je zajišťován mícháním vzorku při 1200 ot./min (± 1,0 %). Paprsek infračerveného záření prochází skrz dvě kyvety, jedna obsahuje PRP a druhá PPP, jako referenci. Křemíkové fotodiody detekují záření prošlé skrz kyvety: PRP je považována za vzorek s 0% transmisí resp. agregací a PPP se 100% transmisí resp. agregací. Rozdíl ve výstupním signálu těchto dvou fotodiód pak odpovídá přesně aktuálnímu stavu transmise resp. agregace měřeného vzorku.

Po přidání agonisty nebo agregační látky do PRP destičky reagují na tento stimul, prodělají tvarovou změnu (zvětší se), tím způsobí pokles průchodu světla a sníží se měřená transmise relativně k PPP. Naměřené údaje se přibližují směrem k PPP, tedy ke 100% transmisí.

Výsledky jsou vyjádřeny v procentech agregace a dány strmostí (směrnicí).

Inkubace PRP s látkou trvala 3 minuty, poté byl přidán agonista agregace destiček a 5 minut byla zaznamenávána probíhající agregace. Jako agonista byla použita arachidonová kyselina (AA) (0,5 mM/ml) dále trombin (0,5 U/ml), adenosindifosfát (ADP) (10 μM/ml) a kolagen (2 μg/ml). Stupeň inhibice byl porovnáván proti negativní kontrole. Testovaná látka se rozpouští v TRIS pH 7,4 nebo v DMSO.

Tab. č. 37: Hodnoty antiagregační aktivity skopoletinu

Vzorek	AA–arachidonová k. 5 μl 0,5 mM/ml	TR–trombin 25 μl 0,5 U/ml	ADP–adenosindifosfát 5 μl 10 μM/ml	COL–kolagen 1 μl 2 μg/ml
Kontrola	100 %	100 %	100 %	100 %
Měření	3,2 %	73 %	22,3 %	4,3 %
Aktivita	96,8 %	27 %	77,7 %	95,7 %

Tab. č. 38: Hodnoty antiagregační aktivity umbelliferonu

Vzorek	AA–arachidonová k. 5 μl, 0,5 mM/ml	TR–trombin 25 μl 0,5 U/ml	ADP–adenosindifosfát 5 μl 10 μM/ml	COL–kolagen 1 μl 2 μg/ml
Kontrola	100 %	100 %	100 %	100 %
Měření	4,8 %	60,6 %	10,6 %	2,3 %
Aktivita	95,2 %	39,4 %	89,4 %	97,7 %

Tab. č. 39: Hodnoty antiagregační aktivity skopolinu

Vzorek	AA–arachidonová k. 5 μl 0,5 mM/ml	TR–trombin 25 μl 0,5 U/ml	ADP–adenosindifosfát 5 μl 10 μM/ml	COL–kolagen 1 μl 2 μg/ml
Kontrola	100 %	100 %	100 %	100 %
Měření	102 %	102,3 %	101 %	96,5 %
Aktivita	0 %	0 %	0 %	3,5 %

Tab. č. 40: Hodnoty antiagregační aktivity 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu

Vzorek	AA–arachidonová k. 5 μl, 0,5 mM/ml	TR–trombin 25 μl 0,5 U/ml	ADP–adenosindifosfát 5 μl 10 μM/ml	COL–kolagen 1 μl 2 μg/ml
Kontrola	100 %	100 %	100 %	100 %
Měření	101,6 %	99,5 %	101,8 %	92,6 %
Aktivita	0 %	0,5 %	0 %	7,4 %

Tab. č. 41: Hodnoty antiagregační aktivity frakce petroletherové - krystaly 15-16

Vzorek	AA–arachidonová k. 5 μ l, 0,5 mM/ml	TR–trombin 25 μ l 0,5 U/ml	ADP–adenosindifosfát 5 μ l 10 μ M/ml	COL–kolagen 1 μ l 2 μ g/ml
Kontrola	100 %	100 %	100 %	100 %
Měření	Neměřeno	neměřeno	neměřeno	16 %
Aktivita*	-	-	-	84 %

* pro malé množství provedeno jen jedno měření

3.9.2.2. Stanovení IC_{50} skopoletinu a umbelliferonu

Měření hodnoty IC_{50} bylo provedeno se skopoletinem a umbelliferonem. Jako agonisté agregace byly použity: arachidonová kyselina (AA) v koncentraci 0,5 mM, ADP o koncentraci 10 μ M a kolagen (COL) o koncentraci 2 μ g/ml. Jako standard byly použity acetylsalicylová kyselina (ASA) a dipyridamol. Hodnoty IC_{50} včetně 95 % konfidenčního intervalu jsou uvedeny v tabulce 42.

Tab. č. 42: Hodnoty IC_{50} sledovaných látek a standardů

Agonista	ADP [mol/l] 95 % interval	COL [mol/l] 95 % interval	AA [mol/l] 95 % interval
Skopoletin	$1,5 \cdot 10^{-3}$ ($8,4 \cdot 10^{-4}$ - $2,6 \cdot 10^{-3}$)	$3,9 \cdot 10^{-4}$ ($2,98 \cdot 10^{-4}$ - $5,1 \cdot 10^{-4}$)	$4,06 \cdot 10^{-4}$ ($3,95 \cdot 10^{-4}$ - $4,16 \cdot 10^{-4}$)
Umbelliferon	$2,47 \cdot 10^{-3}$ ($2,4 \cdot 10^{-3}$ - $2,53 \cdot 10^{-3}$)	$1,48 \cdot 10^{-3}$ ($1,23 \cdot 10^{-3}$ - $1,77 \cdot 10^{-3}$)	$1,2 \cdot 10^{-3}$ ($3,58 \cdot 10^{-4}$ - $4,03 \cdot 10^{-3}$)
ASA	-	$8,48 \cdot 10^{-5}$ ($7,4 \cdot 10^{-5}$ - $9,6 \cdot 10^{-5}$)	$1,61 \cdot 10^{-5}$ ($1,5 \cdot 10^{-5}$ - $1,7 \cdot 10^{-5}$)
Dipyridamol	$1,225 \cdot 10^{-4}$ ($1,1 \cdot 10^{-4}$ - $1,36 \cdot 10^{-4}$)	-	-

3.9.3. Alternativní testy akutní toxicity – zástava pohybu *Tubifex tubifex* Müll.

Jedná se o alternativní, screeningovou metodu používající jako testovací organismus kroužkovce *Tubifex tubifex* Müll., hodnotí se zástava pohybu a akutní toxicita (mortalita) po expozici kroužkovců testované látky podle vypracované metody dle Tichého [128]. Metoda podává první průkazné výsledky akutní toxicity sledované látky.

Test podle vypracované metody byl proveden s následujícími extrakty: PZ, FFL, FPFL a FPe. Jako referenční látka byl použit $MnCl_2 \cdot 4H_2O$. Pro zvýšení rozpustnosti FPe byl použit roztok s příměsí 1 % a 5 % DMSO.

Tab. č. 43: EC₅₀ PZ spolu s 95% intervalem spolehlivosti

Polární zbytek	
1% roztok – 0,01 g/ml neaktivní	Porovnávací roztok $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
2% roztok – 0,02 g/ml neaktivní	
3% roztok – 0,03 g/ml aktivní	
EC ₅₀ =0,0186 g/ml (0,0210 – 0,0166)	EC ₅₀ = 0,0296 g/ml (0,0320 – 0,0274)
LC ₅₀ =0,0169 g/ml (0,0185 – 0,0155)	LC ₅₀ = 0,0324 g/ml (0,0353 – 0,0298)

Tab. č. 44: EC₅₀ FFF s 95% intervalem spolehlivosti

Frakce fenolových látek	
1% roztok – 0,01 g/ml aktivní	Porovnávací roztok $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
EC ₅₀ =0,00244 g/ml (0,00277 – 0,00216)	
LC ₅₀ =0,00230 g/ml (0,00260 – 0,00205)	
	EC ₅₀ = 0,0296 g/ml (0,0320 – 0,0274)
	LC ₅₀ = 0,0324 g/ml (0,0353 – 0,0298)

Tab. č. 45: EC₅₀ FPFL spolu s 95% intervalem spolehlivosti

Frakce prostá fenolových látek	
1% roztok – 0,01 g/ml neaktivní	Porovnávací roztok $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
5% roztok – 0,05 g/ml aktivní	
EC ₅₀ =0,0261 g/ml (0,0310 – 0,0218)	
LC ₅₀ =0,0273 g/ml (0,0324 – 0,0230)	EC ₅₀ = 0,0296 g/ml (0,0320 – 0,0274)
	LC ₅₀ = 0,0324 g/ml (0,0353 – 0,0298)

Tab. č. 46: EC₅₀ FPe spolu s 95% intervalem spolehlivosti

Frakce petroletherová	
10% roztok s 1% DMSO – neaktivní	Porovnávací roztok MnCl ₂ .4H ₂ O
10% roztok s 5% DMSO – aktivní (pravděpodobně poškození nitěnek DMSO)	EC ₅₀ = 0,0296 g/ml (0,0320 – 0,0274) LC ₅₀ = 0,0324 g/ml (0,0353 – 0,0298)

3.9.4. Test akutní toxicity (mortality) a fototoxického poškození povrchu *Tubifex tubifex* Müll.

Jedná se opět o screeningovou metodu používající jako testovací organismus kroužkovce *Tubifex tubifex* Müll., hodnotí se akutní toxicita (mortalita) a fototoxicita působená testovanou látkou (poškození povrchu jedinců). [129, 130]

3.9.4.1. Testovací organismy

K testu byly použity nitěnky chované v akváriu ve 4 cm vrstvě písku s 8 cm čerstvé vody, koncentrace rozpuštěného kyslíku byla minimálně 8 mg/ml, pH 7,5 ± 0,1. V akváriu bylo zajišťováno vzduchování, udržován cyklus 10 h světla a 14 h tmy a teplota 20 °C. Testovaní jedinci nebyli krmeni a byli drženi ve tmě při teplotě 20 ± 0,1 °C po dobu 24 h před průběhem experimentu.

3.9.4.2. Průběh experimentu

Z testovaných látek (skopoletin, umbelliferon, skopolin) byla připravena vodná mikrosuspenze sonikací na ultrazvukové vodní lázni po dobu 0,5 h. Testovaní jedinci byli umístěni do 24 jamkových destiček, 6 jedinců v každé jamce. Do každé jamky byla přidána odpovídající koncentrace testované látky a set byl umístěn na 10 minut do tmy. Od každé látky bylo připraveno 6 ředění (koeficient ředění 1/2), každé ředění bylo testováno 3x a každý pokus byl 3x opakován. Organismy byly exponovány 0,5 nebo 2 h v UV 365 nm, hustotou záření 0,3 mW/cm². Kontrolní skupina jedinců byla po celou dobu experimentu držena ve tmě. Mortalita byla stanovena bezprostředně po ukončení exponování. Jako negativní kontrola byla použita čistá voda. Citlivost organismů byla stanovena roztokem MnCl₂, jeho mortalita byla stanovena po 1 hodině testování. Vyhodnocení testu se skopolinem a umbelliferonem bylo zopakováno po 24 hodinách.

Tab. č. 47: Výsledky testu fototoxicity - skopoletin

Skopoletin - testované koncentrace: 7,5 – 0,2344 mM/l		
0,5 h expozice	Mortalita [%]	Poškození [%]
Expon. (fototoxicita)	0	0
Neexpon. (kontrola, akutní toxicita)	0	0
2 h expozice	Mortalita [%]	Poškození [%]
Expon. (fototoxicita)	0	7,5 mM – 30 %, 3,75 mM – 17 %
Neexpon. (kontrola, akutní toxicita)	0	7,5 mM – 17 %

Tab. č. 48: Výsledky testu fototoxicity - skopolin

Skopolin - testované koncentrace: 7,5 – 0,2344 mM/l		
0,5 h expozice	Mortalita [%]	Poškození [%]
Expon. (fototoxicita)	0	0
Neexpon. (kontrola, akutní toxicita)	0	0
2 h expozice	Mortalita [%]	Poškození [%]
Expon. (fototoxicita)	0	0
Neexpon. (kontrola, akutní toxicita)	0	0
Vyhodnocení po 24 hodinách od počátku experimentu:		
neexponování :		
v konc. 7,5 – 0,9375 mM reagovaly pouze nadměrným vyloučením slizu		
0% mortalita 0% poškození		
exponování :		
konc. 7,5 mM	83% mortalita	100% poškození
konc. 3,75mM	50% mortalita	60% poškození
konc. 1,875 mM	0 mortalita	17% poškození

Tab. č. 49: Výsledky testu fototoxicity - umbelliferon

Umbelliferon - testované koncentrace: 10 – 0,3125 mM/l		
0,5 h expozice	Mortalita [%]	Poškození [%]
Expon. (fototoxicita)	0	0
Neexpon. (kontrola, akutní toxicita)	0	0
2 h expozice	Mortalita [%]	Poškození [%]
Expon. (fototoxicita)	0	0
Neexpon. (kontrola, akutní toxicita)	0	0

Vyhodnocení po 24 hodinách od počátku experimentu:		
neexponování :		
v konc. 10 mM a 5 mM	100% mortalita	0% poškození
v konc. 2,5 – 0,3125 mM	0% mortalita	0% poškození
exponování :		
konc. 10, 5 a 2,5 mM	83% mortalita	0% poškození
konc. 1,25 mM	33% mortalita	0% poškození
konc. 0,625 – 0,3125 mM	0% mortalita	7% poškození

3.9.5. Antifungální aktivita stanovená diluční metodou

Metoda je založena na stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), která představuje nejnižší koncentraci antifungálně účinné látky působící inhibici růstu testovaného kmene. Provádí se v bujónových nebo agarových půdách obsahujících klesající koncentraci testovaných látek nebo standardu. Jedná se o *in vitro* metodu.

V testu byla zvolena mikrodiluční metoda představovaná standardním testem M27-A [131]. Byly použity následující pro člověka patogenní kmeny - *Candida albicans* (CA), *C. tropicalis* (CT), *C. krusei* (CK), *C. glabrata* (CG), *Trichosporon beigellii* (TB), *Absidia corymbifera* (AC) a *Trichophyton mentagrophytes* (TM) var. *mentagrophytes*.

K testu byly použity frakce polární zbytek (**PZ**), frakce fenolových látek (**FFL**), frakce prostá fenolových látek (**FPFL**) a frakce etherová (**FEt₂O**). Jako standard byl použit ketokonazol.

Z testovaných frakcí FFL a FEt₂O inhibovaly růst *Candida albicans*, *C. krusei*, *Absidia corymbifera* v koncentraci 10 mg/ml po dobu 24 a 48 h a *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* v koncentraci 1 mg/ml po dobu 72 a 120 h.

Tab. č. 50: Výsledky antifungální aktivity testovaných vzorků

Kmen	MIC mg/ml			
	PZ	FFL	FPFL	FEt ₂ O
CA 24, 48 h	> 10, > 10	10, 10	> 10, > 10	10, 10
CT 24, 48 h	> 10, > 10	> 10, > 10	> 10, > 10	> 10, > 10
CK 24, 48 h	> 10, > 10	10, 10	> 10, > 10	10, 10
CG 24, 48 h	> 10, > 10	> 10, > 10	> 10, > 10	> 10, > 10
TB 24, 48 h	> 10, > 10	> 10, > 10	> 10, > 10	> 10, > 10
AC 24, 48 h	> 10, > 10	10, 10	> 10, > 10	10, 10
TM 72, 120 h	> 10, > 10	1, 1	> 10, > 10	1, 1

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Výzkumná práce se zabývá farmakobotanickým hodnocením nadzemní části málo prostudovaného taxonu *Evolvulus alsinoides* L. z čeledi Convolvulaceae, který se používá při léčbě neurodegenerativních onemocnění a poruch paměti. Dále je používán pro své protikřečové, antioxidační a protikrvácivé účinky [2, 44, 45, 46, 47, 48]. Je součástí přípravků s nootropním a adaptogenním působením (Mentat[®], Anxocare[®]) [49, 50, 58, 59, 60, 61, 68, 69, 70]. V poslední době byl na trh firmou Avicenna Company ve spolupráci s Katedrou farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové uveden kombinovaný přípravek Evocen[®] [51, 52].

Obsahové látky této rostliny nejsou příliš známé, není známo, jakým mechanismem působí na zlepšení paměti a které látky jsou za toto působení odpovědné. V literatuře je uváděn v celé rostlině obsah alkaloidu evolvinu, dosud neznámé struktury, dále přítomnost silice, betainu, tříslovin, cukrů, proteinů, aminokyselin, fenolových kyselin (p-hydroxybenzoová, vanilová, protokatechová a gentisová kyselina), pentatriakontanu, triakontanu, β -sitosterolu, glykoflavonu, 4'-methoxyvitexinu, chloridu draselného a proteinů. Extrakt vykazuje pozitivní reakci na látky fenolového typu. [2, 4, 17, 18, 19]

Studována byla suchá nať této rostliny původem z Indie, která byla dodána firmou Avicenna Company s.r.o. Záměrem práce bylo rozšířit poznatky o obsahových látkách rostliny, posoudit biologickou aktivitu frakcí, izolovaných látek a stanovit charakteristické metabolity rostliny.

V první části projektu byl připraven základní extrakt z rostliny *E. alsinoides* perkolací 8,8 kg sušené natě 95% ethanolem. Zahuštěný extrakt medovité konzistence byl rozdělen na tři základní části metodou vytřepání mezi různě polární rozpouštědla (petrolether, ether). Vytřepáním methanolového roztoku extraktu petroletherem byla získána fáze 92,1 g. Vytřepáním vodného roztoku extraktu etherem byla získána fáze 69,7 g. Zbylý extrakt byl zbaven rozpouštědla a představoval polární zbytek o hmotnosti 231 g.

Zpracování tří hlavních částí bylo provedeno metodami sloupcové chromatografie. V průběhu dělení extraktu byla prováděna bioassay-guided separace vybraných částí extraktu (test antioxidační aktivity, antiagregační aktivity, akutní toxicity, fototoxicity a antifungální aktivity). U vybraných frakcí byl stanoven obsah fenolových látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Byl také stanoven kvantitativní obsah získaných obsahových látek v celkovém extraktu HPLC a GC/FID metodami.

K prvotní separaci byla vybrána hmotnostně nejvíce zastoupená a na látky bohatá polární část extraktu označená jako polární zbytek (PZ) představující 231 g. Extrakt (230 g) byl rozdělen na sloupci polyamidu (0,1-0,2 mm, 770 g) na frakci prostou fenolových látek (196,5 g) a na frakci fenolových látek (12,5 g). Obě frakce byly dále v několika stupních separovány na sloupcích silikagelu.

Frakce fenolových látek byla podrobena kolonové chromatografii (CC) na silikagelové koloně (L 100/200, 1200 g, 12 % vody). Bylo získáno 65 frakcí, které byly spojeny do 26 kvalitativně odlišných frakcí. Ze spojené frakce 6 a 7 se podařilo získat 25 mg krystalů bílé barvy - látka 1. Látka 1 vykazovala při spektrofotometrické analýze v UV oblasti 4 maxima a 2 minima. (λ_{\max} – 234, 258, 300, 349 nm a λ_{\min} – 215, 270 nm). Látka 1 byla na základě ^1H a ^{13}C NMR analýzy identifikována jako skopoletin. Frakce 8 byla vyčištěna CC v mikroměřítku a následnou rekrystalizací hledané látky bylo získáno 33 mg bílých krystalů čisté látky 2. Látka 2 vykazovala při spektrofotometrické analýze v UV oblasti λ_{\max} 220 a 322 nm a λ_{\min} 232 a 259 nm. Látka 2 byla na základě ^1H a ^{13}C NMR analýzy identifikována jako umbelliferon. Ostatní frakce (1-5, 9-26) byly opětovně spojeny a podrobena nové CC (silikagel L 100/200, 308 g, 10 % vody). Bylo získáno 143 frakcí spojených do 35 kvalitativně odlišných frakcí. Z jednotlivých frakcí se nepodařilo za použití čistících operací získat významné množství krystalů. Frakce byly podrobena hodnocení antioxidační aktivity, viz níže.

Frakce prostá fenolových látek byla podrobena hrubému dělení na silikagelové koloně (L 200/400, 600 g, 10 % vody) a byla tak rozdělena na tři podíly značené FPFLHD1 (31 g), FPFLHD2 (7 g), FPFLHD3 (5 g). Při přípravě na kolonu se vyloučilo z frakce prosté fenolových látek značné množství bílých krystalů anorganické látky identifikovaných jako Na_2SO_4 . Frakce FPFLHD1 byla podrobena CC na silikagelové koloně (L 40/160, 359 g, 10 % vody). Získané frakce 1-100 byly spojeny do 22 kvalitativně odlišných frakcí. Ze spojené frakce 36-40 bylo získáno 15 mg bílých krystalů čisté látky 3. Látka 3 vykazovala při spektrofotometrické analýze v UV oblasti λ_{\max} 339, 291, 230 nm a λ_{\min} 306, 247, 215 nm. Látka 3 byla identifikována na základě ^1H a ^{13}C NMR analýzy jako skopolin. Ze spojené frakce 47-56 vykristalizovaly velké krystaly kosočtverečné soustavy. Rekrystalizací bylo získáno 245 mg látky 4. Následnou ^1H a ^{13}C NMR analýzou byla identifikována jako 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol.

Pro provedení biologického hodnocení byla z frakce značené FPFLHD1 za využití diaionu HP-20 provedena izolace dostatečného množství skopolinu.

Chromatografická separace této frakce byla komplikována vysokým obsahem cukrů a jako nejlepší volbou se ukázal právě diaion HP-20. Díky němu bylo možné kvantitativně oddělit skopolin od cukerného podílu a získat tak dostatek látky pro biologické hodnocení. Frakce FPFLHD1 byla rozdělena na frakci obsahující cukry označenou (FPFLHD1-Di-H₂O) a frakci bohatou na skopolin označenou (FPFLHD1-Di-EtOH), která byla vyčištěna CC (silikagel L 100/200, 571 g, 10 % vody). Celkem bylo získáno 187 mg krystalů skopolinu.

Z etherové frakce bylo CC (silikagel L 200/400, 1350 g, 10 % vody) získáno 145 frakcí. Ze spojené frakce 26-50 byl vyizolován skopoletin. Oba kumariny (skopoletin a umbelliferon) byly prokázány ve frakcích 51-62, 63-69, 70-85 a 86-92. Ve spojené frakci 93-117 resp. její podfrakci 26-45 byla zjištěna přítomnost dusíkatých látek typu alkaloidů. Bylo izolováno jen mikromnožství znečištěné směsi látek, jejichž struktura nebyla doposud určena. Důkaz alkaloidů pomocí Dragendorffova činidla byl negativní. Přítomnost alkaloidů v tomto extraktu nebyla potvrzena. [108, 109, 110]

Analýza frakce petroletherové byla komplikována vysokým obsahem chlorofylu a nepolárních látek. CC (silikagel L 100/200, 888 g, 10 % vody) bylo získáno 113 frakcí. Z frakcí 3-4 a 5-7 (obě frakce obsahovaly identické látky) byly získány 8-methyldekanová a olejová kyselina a dále směs blíže neidentifikovatelných polynenasycených mastných kyselin a alifatického uhlovodíku. Ve spojené frakci 15-16 byla prokázána přítomnost esterů ferulové kyseliny s lineárními alkoholy C14 - C17. Ze spojené frakce 36-40 se preparativní chromatografií podařilo získat směs palmitové, stearové a heptadekanové kyseliny, látky byly identifikovány pomocí plynové chromatografie s MS detekcí. [111]

Celkem bylo z *E. alsinoides* vyizolováno deset látek (viz. tab. č. 26), které byly identifikovány pomocí NMR, GC/MS, UV, IČ a fyzikálně chemických metod jako skopoletin, skopolin, umbelliferon, 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol, ester ferulové kyseliny s vyššími alkoholy a mastné kyseliny (palmitová, stearová, olejová, 8-methyldekanová a heptadekanová). Jedná se o známé látky, z nichž přítomnost skopoletinu, skopolinu, umbelliferonu, 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu, esteru ferulové kyseliny s vyššími alkoholy a mastných kyselin (8-methyldekanové a heptadekanové) není v rostlině popisována. [108, 109, 110, 111]

Přítomnost 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu izolovaného a identifikovaného našim týmem již v roce 2004 byla nezávisle na naší práci prokázána kolektivem indických vědců [19]. Tato látka je v *E. alsinoides* významně zastoupena. Je součástí biogenetického systému syntézy isoprenoidních látek a její význam a konečný

metabolit v *E. alsinoides* se zatím nepodařilo identifikovat. Látka by se mohla pravděpodobně účastnit biogeneze evolvidu A [19].

Analytickými metodami byl stanoven kvantitativní obsah některých získaných látek, které lze použít jako markery sledovaného taxonu. Kvantitativní stanovení kumarinů bylo provedeno HPLC analýzou připravených extraktů za spektrofotometrické detekce stanovovaných látek a použití odpovídajících standardů [119]. Rostlina obsahuje průměrně 0,02 % skopoletinu a umbelliferonu a 0,009 % skopolinu (viz. tab. č. 29).

Kvantitativní stanovení 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu bylo provedeno GC-FID analýzou připravených extraktů v laboratoři gerontologické a metabolické kliniky FN v Hradci Králové. Látka byla derivatizována pomocí činidla Tri-Sil TBT (Pierce). Analýza byla provedena na GC Fissons 8000 s detekcí FID [120]. Rostlina obsahuje průměrně 0,9 % 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu (viz. tab. č. 31).

V průběhu dělení extraktu byla hodnocena biologická účinnost jednotlivých frakcí a získaných látek dostupnými metodami.

Antioxidační aktivita byla stanovena DPPH testem technikou SIA za spektrofotometrické detekce [121] a metodou FRAP [124, 125]. DPPH metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálu (DPPH) se vzorkem. Současně s měřením bylo stanoveno množství fenolových látek v jednotlivých částech extraktu pomocí Folin-Ciocalteuova činidla [122]. Jednotlivé frakce získané z dělení frakce fenolových látek vykazovaly významnější antioxidační aktivitu. Vypočtená hodnota EC_{50} se pohybovala v oblasti 0,2-0,9 mg/ml a jen částečně korelovala se zjištěným obsahem fenolových látek, což může být do jisté míry ovlivněno různými mechanismy působení antioxidantů (viz. tab. č. 33). Nejvyšší antioxidační aktivita v DPPH testu byla zjištěna u frakce číslo 31 (0,230 mg/ml), jejíž obsah fenolových látek byl 23,1 % vztaženo na galovou kyselinu. Nejvyšší obsah fenolových látek (28,9 %) byl stanoven u frakce 28, jejíž antioxidační aktivita byla 0,258 mg/ml. Mírná antioxidační aktivita byla zjištěna u esteru ferulové kyseliny [111]. Použitý standard askorbová kyselina má hodnotu EC_{50} 0,007 mg/ml. Antioxidační aktivita u jednotlivých frakcí získaných dělením frakce prosté fenolových látek nevykazovala v testovaných koncentracích zvýšenou aktivitu (viz. tab. č. 34). Aktivita měřená u skopoletinu, skopolinu, umbelliferonu, 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu a mastných kyselin nevykazovala v testovaných koncentracích významný stupeň účinnosti. Výsledky do jisté míry potvrzují, že směsi látek mají mnohdy větší antioxidační aktivitu nežli jednotlivé izolované látky. Metoda FRAP na stanovení

antioxidační účinnosti je založena na principu redoxní reakce (ferric reducing antioxidant potential). Při reakci redukuje antioxidant ze vzorku komplex Fe^{3+} -2,4,6-tri-(2-pyridyl-1,2,3-triazin) na Fe^{2+} -TPZP. Pozitivní reakce v testu byla zjištěna u skopoletinu, ostatní testované látky (skopolin, umbelliferon a 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol) byly v testu neaktivní (viz. tab. č. 36).

Měření trombocytární antiagregační aktivity proběhlo formou *in vitro* testu v lidské PRP (platelet-rich plasma, plazma bohatá na destičky). Vlastní měření bylo provedeno metodou podle Borna [127] a proběhlo na přístroji Whole blood lumi-agregometer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ typu 500-Ca. Inkubace PRP s látkou trvala 3 minuty, poté byl přidán agonista agregace destiček a 5 minut zaznamenávána probíhající agregace. Jako agonista byla použita arachidonová kyselina (0,5 mM/ml), trombin (0,5 U/ml), adenosin difosfát (10 mM/ml) a kolagen (2 mg/ml). Stupeň inhibice byl porovnáván proti negativní kontrole. Změřená antiagregační aktivita se u sledovaných frakcí (polární zbytek, frakce fenolových látek, frakce prostá fenolových látek, skopolin, 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol) pohybovala do 10 %, což je velmi slabý efekt, vyšší antiagregační účinnost v předběžných testech byla zjištěna u esteru ferulové kyseliny s vyššími alkoholy (více jak 80 %). Významnou antiagregační aktivitu ve zvoleném testu vykazoval pouze skopoletin a umbelliferon (více jak 90 %, viz. tab. č. 37 – 41).

Akutní toxicita byla hodnocena alternativní metodou stanovení akutní toxicity zástavou pohybu *Tubifex tubifex* Müll. Test byl proveden standardním postupem podle Tichého [128] za použití kontrolního roztoku $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Předběžné testy akutní toxicity nevykazovaly zvýšenou toxicitu na testovaný organismus (viz. tab. č. 43 – 46). Aktivita byla zjištěna u 3% vodného roztoku polárního zbytku, u 1% vodného roztoku frakce fenolových látek a u 5 % vodného roztoku frakce prosté fenolových látek. Fototoxicita byla provedena screeningovou metodou používající jako testovací organismus kroužkovce *Tubifex tubifex* Müll., hodnotí se akutní toxicita (mortalita) a fototoxicita působená testovanou látkou (poškození povrchu jedinců) [129,130]. Test fototoxicity byl proveden u látek skopolinu, skopoletinu, umbelliferonu a 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu. Významná fototoxicita byla sledována pouze u skopoletinu, ostatní látky byly v testu neaktivní. U skopoletinu bylo zjištěno při koncentraci 7,5 mM 30 % poškození exponovaných jedinců oproti 17 % u neexponovaných jedinců (viz. tab. č. 47 – 49).

Antifungální aktivita byla provedena ve spolupráci s katedrou biologických a lékařských věd standardním testem M27-A [131]. Byly použity následující pro člověka patogenní kmeny - *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*,

Trichosporon beigellii, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. K testu byly použity frakce polární zbytek, frakce fenolových látek, frakce prostá fenolových látek a frakce etherová. Jako standard byl použit ketokonazol. Z testovaných frakcí pouze frakce fenolových látek a frakce etherová inhibovaly růst *Candida albicans*, *C. krusei*, *Absidia corymbifera* v koncentraci 10 mg/ml po dobu 24 a 48 h a *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* v koncentraci 1 mg/ml po dobu 72 a 120 h (viz. tab. č. 50). Antifungální aktivita kumarinů byla prokázána v několika testech. U skopolinu bylo dokonce prokázáno synergické působení spolu s testovanými léčivy [88, 89].

Z rostliny *E. alsinoides* byly izolovány jako hlavní obsahové látky kumariny skopoletin, skopolin a umbelliferon. V několika jiných pokusech byla u těchto látek prokázána antioxidační účinnost a zejména byl zjištěn vliv na inhibici acetylcholinesterasy [85, 86, 87]. Na základě těchto informací lze usuzovat, že nootropní působení rostliny může být způsobeno obsahem právě těchto kumarinů, zejména pak skopolinu. Svou roli zde také hraje zjištěná antioxidační aktivita prokázaná ve frakcích fenolových látek. Kolektiv Dr. Gupty [19] v provedených testech prokázal signifikantní adaptogenní působení evolvoidu A. Jeho hydrolýzou získali erythritol, lze tedy předpokládat, že námi vyizolovaný 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol je prekurzorem syntézy evolvoidu A a podílí se tak na vzniku látky s adaptogenním působením.

5. ZÁVĚR

- Záměrem práce bylo rozšířit poznatky o obsahových látkách taxonu, posoudit biologickou aktivitu frakcí, izolovaných látek a stanovit charakteristické metabolity rostliny.
- Byl připraven základní extrakt *E. alsinoides* z 8,8 kg suché natě.
- Frakce byly zpracovány metodami sloupcové chromatografie.
- V průběhu dělení extraktu byla prováděna bioassay-guided separace.
- Byl stanoven obsah fenolových látek.
- Z polární části extraktu (polární zbytek) byly získány skopoletin, umbelliferon, skopolin a 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol.
- V etherové frakci byla prokázána přítomnost skopoletinu a umbelliferonu.
- Přítomnost alkaloidů nebyla v extraktu potvrzena.
- V petroletherové frakci byla prokázána 8-methyldekanová a olejová kyselina, směs polynenasycených mastných kyselin a alifatického uhlovodíku, estery ferulové kyseliny s lineárními alkoholy C14 - C17 a směs palmitové, stearové a heptadekanové kyseliny.
- Byl stanoven kvantitativní obsah skopoletinu, umbelliferonu, skopolinu a 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu v celkovém extraktu. Bylo provedeno hodnocení antioxidační aktivity.
- Bylo provedeno měření trombocytární antiagregační aktivity.
- Bylo provedeno hodnocení akutní toxicity a fototoxicity.
- Bylo provedeno hodnocení antifungální aktivity.

6. POUŽITÉ INFORMAČNÍ ZDROJE

- [1] **Slavík B. et al.**, Květena České republiky 6 ed., Praha, Academia, 2000, 770 s.
- [2] **Krishnakumar S. P. R. et al.**, Selected Medicinal Plants of India (A Monograph of Identity, Safety, and Clinical Usage), Bombay, Chemexcil, 1992, 387 s.
- [3] **Khare C. P.**, Indian herbal remedies, Heidelberg, Springer, 2004, 523 s.
- [4] **Daniel M.**, Medical Plants, Enfield, Science publishers, 2006, 250 s.
- [5] **Kirtikar K. R., Basu B. D.**, Indian Medicinal Plants, Bishen Singh Mahendrapal Singh, Dehradun, 1985, 3825 s.
- [6] **Kato N. H.** (2000), Assessment of the allelopathic potential of extracts of *Evolvulus alsinoides*. Weed Res. 40, 343-350.
- [7] **Baveja S. K., Singla R. D.** (1969), Investigation of *Evolvulus alsinoides* (Shankhpushpi). Indian J. Pharm. 32, 108-110.
- [8] **Chopra R. N.**, Indigenous Drugs of India, Calcutta, Academic Publishers, 1982, 816 s.
- [9] **Saharan P., Kasera P. K., Chawan D. D.** (2001), Eco-physiology of *Evolvulus alsinoides* (L.) from Indian Thar desert. Bangladesh J. Botany 30, 57-59.
- [10] **Saharan P., Kasera P. K., Chawan D. D.** (2001), Seed polymorphism and germination behavior of Shankhpushpi (*Evolvulus alsinoides*). Ann. Arid Zone 40, 97-99.
- [11] **Saharan P., Kasera P. K., Chawan D. D.** (2002), A new report on variation in flower colours of *Evolvulus alsinoides* (Shankhpushpi) from the Indian Than desert. J. Econ. Taxon. Botany 26, 21-24.
- [12] **Saharan P., Kasera P. K., Chawan D. D.** (2001), Responce of spacing and fertilizer levels on growth and biomass in Shankhpushpi (*Evolvulus alsinoides*) under dryland farming. J. Econ. Taxon. Botany 25, 309-316.
- [13] **Saharan P., Kasera P. K., Chawan D. D. et al.** (2000), Biology, conservation and mediculture of important medical plants from Indian Thar Desert, J. Med. Arom. Plant Sci. 22-23, 132-443.
- [14] **Singh H. B., Viswanathan M. V.** (2000), Need for authentication of market samples of crude drug Shankhpushpi *Convolvulus microphyllus* J. Med. Arom. Plant Sci. 22-23, 612-618.
- [15] http://www.naturesformulary.com/website_assets/Shankhpushpi.html [cit. 2008-11-11]
- [16] **Kapadia N. S., Acharya N. S., Acharya S. A. et al.** (2006), Use of HPTLC to establish a distinct chemical profile for shankhpushpi and for quantification of scopoletin in *Convolvulus pluricaulis* choisy and in commercial formulations of

- shankhpushpi J. Planar Chromatogr. Mod. TLC 19, 195-199.
- [17] <http://www.sigmaaldrich.com> [cit. 2007-09-16]
- [18] **Harborne J. B., Baxter H.**, Phytochemical dictionary (A Handbook of Bioactive Compounds from Plants), Taylor & Francis, 1993, London, 791 s
- [19] **Gupta P., Akanksha, Siripurapu K. B. et al.** (2007), Anti-stress constituents of *Evolvulus alsinoides*: An ayurvedic crude drug. Chem. Pharm Bull. 55, 771-775.
- [20] **Badami R. C., Thakkar J.** (1984), Minor seed oils XIX: examinations of Convolvulaceae seed oils. Fette Seifen Anstr. 86, 203-204.
- [21] **Schimming T., Siems K. J., Mann P. et al.** (2006), Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. Phytochemistry 66, 469-480.
- [22] **Schimming T., Tofern B., Mann P. et al.** (1998), Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae, Phytochemistry 49, 1989-1995.
- [23] **Goldmann A., Milat M. L., Ducrot P. H. et al.** (1990), Tropane derivatives from *Calystegia sepium*. Phytochemistry 29, 2125-2127.
- [24] **Asano N., Kato A., Oseki K. et al.** (1995), Calystegins of *Physaltes alkekengi* var. *Francheti* (Solanaceae): Structure Determination and their Glycosidase Inhibitory Activities. Eur. J. Biochem. 229, 369-376.
- [25] **Ducrot H. P., Lallemand J. Y.** (1990), Structure of the Calystegines: New alkaloids of the nortropane family. Tetrahedron Lett. 31, 3879-3882.
- [26] **Asano N., Oseki K., Tomioka E. et al.** (1994), N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. Carbohydr. Res. 259, 243-255.
- [27] **Griffin W. J., Linb G. D.** (2000), Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. Phytochemistry 53, 623-637.
- [28] **Simone De R., Margarucci L., Feo De L.** (2008), Tropane alkaloids: an overview. Pharmacologyonline 1, 70-89.
- [29] **Hegnauer R.**, Chemotaxonomie der Pflanzen, Basel, Berlin, Birkhäuser, 1989, Vol. VIII, 718 s
- [30] **Prats D. A., Harborne J. B.** (1993), Allelochemical effects of ergoline alkaloids from *Ipomoea parasitica* on *Heliothis virescens*. Chemoecology 4, 55-61.
- [31] **Kucht S., Groß J., Hussein Y. et al.** (2004), Elimination of ergoline alkaloids following treatment of *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) with fungicides. Planta 219, 619-625.
- [32] **Prats D. A., Harborne J. B.** (1993), New sources of ergoline alkaloids within the genus *Ipomoea*. Biochem. syst. ecol. 21, 455-462.

- [33] **Jenett-Siems K., Kalogaa M., Eich E.** (1993), Ipangulines, the first pyrrolizidine alkaloids from the convolvulaceae. *Phytochemistry* 34, 437-440.
- [34] **Sundaresan V., De-Britto A. J.** (1999), Preliminary phytochemical studies on some medicinal plants of tirunelveli hills. *J. Econ. Taxon. Botany* 23, 377-380.
- [35] **Geetha G. N., Daniel M., Sabnis S. D.** (1986), Chemosystematics of Ipomoea Linn and Some Related Taxa. *Curr. Sci.* 55, 961-965.
- [36] **Mann P., Tofern B., Kaloga M., et al.** (1999), Flavonoid sulfates from the Convolvulaceae. *Phytochemistry* 50, 267-271.
- [37] **Ahmed M., Jain N. et al.** (1993), Two new flavone glycosides from the leaves of *Argyrea speciosa* Convolvulaceae. *J. Chem. Res.* 7, 248.
- [38] **Saito N., Lu T. S., Akaizawa M. et al.** (1994), Acylated pelargonidin glucosides in the maroon flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry* 35, 407-411.
- [39] **Williams A. Ch., Harborne J. B.** (2000), Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- [40] **Figueiredo P., Elhabiri M., Toki K. et al.** (1996), New aspects of anthocyanin complexation, intramolecular copigmentation as a means for colour loss. *Plant Chem.* 41, 301-308.
- [41] **Toki K., Saito N., Kawano K. et al.** (1994), An acylated delphinidin glycoside in the blue flowers of *Evolvulus pilosus*. *Phytochemistry* 36, 609-612.
- [42] **Gupta D. R., Ahmed B., Dhiman R. P.** (1984), A flavone and its two new glycosides from *Evolvulus nummularius*. *Shoyakugaku Zasshi* 38, 341-345.
- [43] **Krzaczek T., Bogucka-Kocka A., Ryn´ D.** (2004), Chromatographical analysis of phenolic compounds in herb *Convolvulus arvensis* L. *Herba Pol.* 50, 17-22.
- [44] **Siripurapu K. B., Gupta P., Bhatia G. et al.** (2005), Adaptogenic and anti-amnesic properties of *Evolvulus alsinoides* in rodents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 424-432.
- [45] **Auddy B., Ferreira M., Blasina F. et al.** (2003), Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *J. Ethnopharmacol.* 84, 131-138.
- [46] **Ganju L., Karan D., Chanda S. et al.** (2003), Immunomodulatory effects of agents of plant origin. *Biomed. Pharmacother.* 57, 296-300.
- [47] **Achliya G. S., Barabde U., Wadodkar S. et al.** (2004), Effect of Bramhi Ghrita, an polyherbal formulation on learning and memory paradigms in experimental animals. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 36, 159-162.

- [48] **Rao J. M., Kumar U. S., Sastry B. S. et al.** (2005), A novel herbal composition for the treatment of gastric ulcer Patent No. WO2005039611, Applic. No. WO2003-IB4807.
- [49] **Kulkarni S. K., Verna A.** (1992), Evidence for nootropic effect of BR-16A (Mentat), a herbal psychotropic preparation, in mice. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 36, 29-34.
- [50] **Kumar A., Kulkarni S. K.** (2006), Protective effect of BR-16A, a polyherbal preparation against social isolation stress: possible GABAergic mechanism. *Phytother. Res.* 20, 538-541.
- [51] <http://www.avicenna.cz> [cit. 2007-08-25]
- [52] **Jahodář L. et al.** (2004), Závěrečná zpráva o realizaci projektu LN00B125/D MŠMT – Výzkumná centra. Aplikační protokol přípravku Evocen, Hradec Králové
- [53] **Dandekar U. P., Chandra R. S., Dalvi S. S. et al.** (1992), Analysis of a clinically important interaction between phenytoin and Shankhpushpi, an Ayurvedic preparation. *J. Ethnopharmacol.* 35, 285-288.
- [54] **Tharan N. T., Vadivu R., Palanisamy M. et al.** (2003), Antibacterial activity of *Evolvulus alsinoides*. *Indian drugs* 40, 585-586.
- [55] **Deepak S. A. Oros G., Sathyanarayana S. G. et al.** (2005), Antisporulant activity of leaf extracts of Indian plants against *Sclerospora graminicola* causing downy mildew disease of pearl millet. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 38, 31-39.
- [56] **Pawar S. A., Dhuley J. N., Naik S. R.** (2001), Neuropharmacology of an Extract derived from *Convolvulus microphyllus*. *Pharm. Biol.* 39, 253-258.
- [57] **Austin D. F.** (2008), *Evolvulus alsinoides* (Convolvulaceae): An American herb in the Old World. *J. Ethnopharmacol.* 117, 185-198.
- [58] <http://www.himalayahealthcare.com/products/mentat.htm> [cit. 2007-11-25]
- [59] **Verma A., Kulkarni S. K.** (1991), Effect of a Herbal Psychotropic Preparation, BR-16A (Mentat), on Performance of Mice on Elevated Plus-Maze. *Indian J. Exp. Bio.* 29, 1120.
- [60] **Achliya G. S., Barabde U., Wadodkar S. et al.** (2004), Effect of Bramhi Ghrita, an polyherbal formulation on learning and memory paradigms in experimental animals. *Indian J. Pharmacol.* 36, 159-162.
- [61] **Moharana D., Moharana S.** (1994), A Clinical Trial of Mentat in Patients with Various Types of Epilepsy. *Probe* 33, 160-162.
- [62] **Kumar A., Kulkarni S. K.** (2006), Protective effect of BR-16A, a polyherbal

preparation against social isolation stress: possible GABAergic mechanism. *Phytother. Res.* 20, 538-541.

- [63] **Jagetia G. C., Baliga M. S.** (2003), Treatment of mice with a herbal preparation (Mentat) protects against radiation-induced mortality. *Phytother. Res.* 17, 876-881.
- [64] **Andrade C., Sudha S., Venkataraman B. V.** (2000), Herbal Treatments for ECS-Induced Memory Deficits: A Review of Research and a Discussion on Animal Models. *The J. Ect.* 16, 144-156.
- [65] **Andrade C., Raj T., Udaya H. B. et al.** (1994), Effect of BR-16A on alpha-2 adrenergic, dopamine autoreceptor and dopamine postsynaptic receptor functioning. *Indian J. Pharmacol.* 26, 292-295.
- [66] **Umesh K. G., Suryanarayana T.** (2000), Preliminary evaluation of herbal drug Anxocare in management of dominance aggression in dogs. *Indian Veter. Med. J.* 24, 259-260.
- [67] **Dodman N. H., Donnelly R., Shuster L. et al.** (1996), Use of fluoxetine to treat dominance aggression in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 1585-1587.
- [68] <http://www.herbalremedies.com/brainton60ca.html> [cit. 2007-09-26]
- [69] <http://www.herbalremedies.com/pedi-tone.html> [cit. 2007-09-26]
- [70] <http://www.herbscanheal.co.uk/muktavati.htm> [cit. 2007-09-26]
- [71] **Tomko J. et al.**, *Farmakognózia*, 2. vydání, Martin, Osveta, 1999, 422 s.
- [72] **Molyneux R. J., Pan Y. T., Goldmann A. et al.** (1993), Calystegins, a novel class of alkaloid glycosidase inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 81-88.
- [73] **Asano N., Kato A., Oseki K. et al.** (1995), Calystegins of Physaltes alkekengi var. Francheti (Solanaceae), Structure Determination and their Glycosidase Inhibitory Activities. *Eur. J. Biochem.* 229, 369-376.
- [74] **Jahodář L.**, Rostlinné jedy in **Hrdina V. et al.**, *Přírodní toxiny a jedy*, Praha, Galén a Karolinum, 2004, s. 22-90.
- [75] **Zhanga F., Wanga Ch., Xionga A. et al.** (2007), Quantitative analysis of total retronecine esters-type pyrrolizidine alkaloids in plant by high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 605, 94-101.
- [76] <http://faf.vfu.cz/html/index2.html> [2007-09-20]
- [77] **Jung M., Park M.** (2007), Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* 12, 2130-2139.
- [78] **Heo H. J., Kim D. O., Choi S. J. et al.** (2004), Apple Phenolics Protect *in Vitro* Oxidative Stress-induced Neuronal Cell Death. *J. Food Sci.* 69, 357-360.

- [79] **Singh A., Naidu P. S., Kulkarni S. K.** (2003), Reversal of aging and chronic ethanol –induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid. *Free Radic. Res.* 37, 1245-1252.
- [80] **Singh A., Pattipati S.** (2003), Quercetin potentiates L-Dopa Reversal of Drug Induced Catalepsy in Rats: Possible COMT/MAO inhibition. *Pharmacology* 68, 81-88.
- [81] **Naidu P. S., Kulkarni S. K.** (2004), Quercetin, a bioflavonoid, reverses haloperidol induced catalepsy *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 26, 323-326.
- [82] **Nakajima A., Yamakuni T., Haraguchi M. et al.** (2007), Nobiletin, a Citrus Flavonoid That Improves Memory Impairment, Rescues Bulbectomy-Induced Cholinergic Neurodegeneration in Mice. *J. Pharmacol. Sci.* 105, 122-126.
- [83] **Nakajima A., Yamakuni T., Matsuzaki K. et al.** (2007), Nobiletin, a Citrus Flavonoid, Reverses Learning Impairment Associated with N-Methyl-D-aspartate Receptor Antagonism by Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 784-790.
- [84] **Shang Y., Cheng J., Qi J. et al.** (2005), Scutellaria flavonoid reduced memory dysfunction and neuronal injury caused by permanent global ischemia in rats. *Pharmacol. Biochem. Be.* 82, 67-73.
- [85] **Yan J. J., Kim D. H., Moon Y. S. et al.** (2004), Protection against beta-amyloid peptide-induced memory impairment with long-term administration of extract of *Angelica gigas* or decursinol in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 25-30.
- [86] **Kim D. H., Kim Y., Kim Y. C. et al.** (2007), Nodakenin, a coumarin compound, ameliorates scopolamine-induced memory disruption in mice. *Life Sci.* 80, 1944-1950.
- [87] **Rollinger J. M., Hornick A., Langer T. et al.** (2004), Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Scopolin and Scopoletin Discovered by Virtual Screening of Natural Products. *J. Med. Chem.* 47, 6248-6254.
- [88] **Prats E., Bazzalo M. E., León A. et al.** (2006), Fungitoxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*. A way to overcome sunflower head rot. *Euphytica* 147, 451-460.
- [89] **Carpinella M. C., Ferrayoli C. G., Palacios S. M.** (2005), Antifungal Synergistic Effect of Scopoletin, a Hydroxycoumarin Isolated from *Melia azedarach* L. Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2922 -2927.
- [90] **Muschiatti L., Gorzalczany S., Ferraro G., et al.** (2001), Phenolic compounds

with antiinflammatory activity from *Eupatorium buniifolium*. *Planta Med.* 67, 743-744.

- [91] **Calixto J. B., Otuki M. F., Santos A. R.** (2003), Antiinflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B. *Planta Med.* 69, 973-983.
- [92] **Fujioka T., Furumi K., Fujii H. et al.** (1999), Antiproliferative constituents from umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* 47, 96-100.
- [93] **Kim N. Y., Pae H. O., Ko Y. S. et al.** (1999), *In vitro* inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituents from *Fraxinus rhynchophylla*. *Planta Med.* 65, 656-658.
- [94] **Kang T. H., Pae H. O., Jeong S. J. et al.** (1999), An inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituent from *Artemisia feddei*. *Planta Med.* 65, 400-403.
- [95] **Farah M. H., Samuelsson G.** (1992), Pharmacologically active phenylpropanoids from *Senra incana*. *Planta Med.* 58, 14-18.
- [96] **Červenka F., Jahodář L.** (2006), Rostlinné metabolity jako nootropika a kognitiva. *Čes. Slov. Farm.* 55, 219-229.
- [97] **Benešová O., Krejčí I., Pavlík A.**, Nootropic drugs, Praha, Avicenum, 1991, 202 s.
- [98] **Patočka J.** (1999), Kyselina domoová, neurotoxin způsobující ztrátu krátkodobé paměti. *Psychiatrie* 3, 23-24.
- [99] **Jiráček R.** (2006), Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. *Psychiat. pro Praxi* 1, 8-11.
- [100] **Vinař O.**, In *Farmakologie* (Katzung, B. G., ed.), Jinočany, H&H, 1994, 425-427.
- [101] **Opatřilová R., Sokolová P.** (2004), Analytické hodnocení potenciálních nootropik. *Čes. Slov. Farm.* 53, 42-46.
- [102] **Patočka J., Strunecká A.** (2001), *Ginkgo biloba* L. (jinan dvoulaločný) – symbol životní síly. *Psychiatrie* 4, 261-264.
- [103] **Ling D. S., Benardo L. S.** (2005), Nootropic Agents Enhance the Recruitment of Fast GABA_A Inhibition in Rat Neocortex. *Cereb. Cortex* 15, 921-928.
- [104] **Kidd P. M.** (1999), A review of nutrients and botanicals in the Integrative Management of Cognitive Dysfunction. *Altern. Med. Rev.* 4, 144-161.
- [105] **Stahl E.**, Thin-layer chromatography (A laboratory Handbook), Second edition,

- New York, Springer, 1969, 1041 s.
- [106] **Lábler L., Schwarz V. et al.**, Chromatografie na tenké vrstvě, Praha, Nakladatelství československé akademie věd, 1965, 465 s.
- [107] **Opletal L., Drašar P.**, Fytochemické metody, Praha, Karolinum, 1994, 142 s.
- [108] **Římanová E.**, Fytochemický výzkum *Evolvulus alsinoides* I, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2003, 48 s
- [109] **Matějková P. K.**, Fytochemický výzkum *Evolvulus alsinoides* II, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2004, 58 s.
- [110] **Balhárková E.**, Fytochemický výzkum *Evolvulus alsinoides* III, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2005, 59 s.
- [111] **Svačinová J.**, Fytochemický výzkum *Evolvulus alsinoides* IV, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2006, 122 s.
- [112] CrossFire Beilstein [databáze online]. Elsevier MDL [cit. 2007-09-15]. Dostupné z URL: http://www.mdli.com/products/knowledge/crossfire_beilstein/.
- [113] **Zolek T., Paradowska K., Wawer I.** (2003), ¹³C CP MAS NMR and GIAO-CHF calculations of coumarins Solid State. Nucl. Magn. Reson. 23, 77-87.
- [114] **Nowak S., Dzido T. H., Soczewinski E. et al.** (2002), Quantitative determination of coumarins, flavonoids and chlorogenic acid in the leaves and underground parts of some species of genus *Scopolia* Jacq. Acta Pol. Pharm. 59, 259-263.
- [115] **Lee J. H., Ku C. H., Baek N. I. et al.** (2004), Phytochemical constituents from *Diodia teres*. Arch. Pharm. Res. 27, 40-43.
- [116] **Kis K., Wungsintaweekul J., Eisenreich W. et al.** (2000), An efficient preparation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphoric acid and its derivatives. J. Org. Chem. 65, 587-592.
- [117] **Fontana A., Messina R., Spinella A. et al.** (2000), Simple and versatile synthesis of branched polyols: (+)-2-C-methylerythritol and (+)-2-C-methylthreitol. Tetrahedron Lett. 41, 7559-7562.
- [118] **Badami R. C., Thakkar M. J. et al.** (1984), Minor Seed Oils XIX: Examination of Convolvulaceae Seed Oils. Fette Seifen Anstr. 86, 203-204.
- [119] **Hawryl M. A., Soczewinski E., Dzido T. H.** (2000), Separation of coumarins from *Archangelica officinalis* in high-performance liquid chromatography and

- thin-layer chromatography systems. J. Chromatogr. 886, 75-81.
- [120] **Wang W., Gyorgy V., Dommissie R. et al.** (2004), Fragmentation study of diastereoisomeric 2-methyltetrols, oxidation products of isoprene, as their trimethylsilyl ethers, using gas chromatography/ion trap mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Sp. 18, 1787-1797.
- [121] **Polasek M., Skala P., Opletal L. et al.** (2004), 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.
- [122] Československý lékopis, 4. vydání, svazek 1, Praha, Avicenum, 1987, s. 105
- [123] **Shaw C. Y., Chen C. H., Hsu C. C. et al.** (2003), Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. Phytoter. Res. 17, 823-825.
- [124] **Paulová H., Bochořáková H., Táborská H.** (2004), Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro* Chem. Listy 98, 174-179.
- [125] **Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M. et al.** (2002), Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. J. Agric. Food Chem. 50, 3122-3128.
- [126] **Jun D.**, Látky přírodního původu ovlivňující trombocytární agregaci u člověka (*in vitro*). Disertační práce, Univerzita obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové, Hradec Králové, 2005, 82 s.
- [127] **Born G. V. R.** (1962), Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature 194, 927-929.
- [128] **Tichý M., Marián R.** (1996), Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií, Zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*. Pracov. Léč. 48, 225-230.
- [129] **Vytlačilová J., Chobot V., Jahodář L. et al.** (2004), *Tubifex tubifex* Müll. – photosensitive organism. Cent. Eur. J. Publ. Health 12, 89-93.
- [130] **Chobot V., Vytlačilová J., Kubicová L. et al.** (2006), Phototoxic activity of a thiophene polyacetylene from *Leuzea carthamoides*. Fitoterapia 77, 194-198.
- [131] **Riesselman M. H., Hazen K. C., Cutler J. E.** (2000), Determination of Antifungal MICs by a Rapid Susceptibility Assay. J. Clin. Microbiol. 38, 333-340.

7. PUBLIKOVANÉ PRÁCE, PREZENTACE, FINANČNÍ PODPORY

Publikace v časopisech:

Cervenka F., Koleckar V., Rehakova Z., Jahodar L., Kunes J., Opletal L., Hyspler R., Jun D., Kuca K. (2008), Evaluation of natural substances from *Evolvulus alsinoides* L. with the purpose of determining their antioxidant potency, J. Enzym. Inhib. Med. Ch. 23, 574-578.

Červenka F., Jahodář L. (2006), Rostlinné metabolity jako nootropika a kognitiva, Čes. Slov. Farm. 55, 219-229.

Koleckar V., Opletal L., Brojerova E., Rehakova Z., Cervenka F., Kubikova K., Kuca K., Jun D., Polasek M., Kunes J., Jahodar L. (2008), Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteraceae and Cichoriaceae, J. Enzym. Inhib. Med. Ch., 23, 218-224.

Koleckar V., Brojerova E., Rehakova Z., Kubikova K., Cervenka F., Kuca K., Jun D., Hronek M., Opletalova V., Opletal L. (2008), *In Vitro* Antiplatelet Activity of Flavonoids from *Leuzea Carthamoides*, Drug Chem. Toxicol., 31, 27-35.

Konference:

Červenka, F., Řeháková, Z., Brojerová, E., Kolečkář, V., Vytlačilová, J., Jahodář, L., *Evolvulus alsinoides* – Phytochemical analysis, DPhG Jahrestagung – Joint Meeting 2006, Marburg, Germany, 4-7 October 2006, ISBN 3-89703-685-1, s. 106.

Kolečkář V., Brojerová E., Opletal L., Řeháková Z., Kubíková K., Červenka F., Kuneš J., Jun D., Jahodář L., Polášek M., Antioxidative and antiaggregating flavonoids from *Leuzea carthamoides*, DPhG Jahrestagung – Joint Meeting 2006, Marburg, Germany, 4-7 October 2006, ISBN 3-89703-685-1, s. 105.

Červenka F., Pour M., Opletal L., Jahodář L. (2005), Pharmacobotanical evaluation and analysis of *Evolvulus alsinoides*, J. Scitech. 1, 128. 1st International Mediterranean Pharmacy Congress, Mersin, Turkey, 28-31 October 2005.

Červenka F., Jahodář L., Karlíčková J., Pour M., Opletal L., Chemická a biologická analýza taxonu *Evolvulus alsinoides*, Syntéza a analýza léčiv, Sborník 34. konference, Brno, 12.-14. září 2005, ISBN 80-7305-533-3, s. 47.

Karlíčková J., Svačinová J., Červenka F., Pour M., Kuneš J., Fytochemická studie extraktu *Evolvulus alsinoides* a jeho biologická aktivita, Syntéza a analýza léčiv, Sborník 34. konference, Brno, 12.-14. září 2005, ISBN 80-7305-533-3, s. 71.

Červenka F., Víchová P., Kolečkář V., Pour M., Opletal L., Jahodář L., *Evolvulus alsinoides* – Pharmacobotanical Evaluation, Joint Meeting of the Austrian, Czech and German Pharmaceutical Societies, Regensburg, Německo, 6-9 October 2004, ISBN 3-00-014723-3, s. 89.

Červenka F., Jun D., Ryglová H., Pour M., Opletal L., Jahodář L., *Evolvulus alsinoides* – Chemická a biologická analýza, Sborník 32. konference Syntéza a analýza léčiv, 16.-19. září 2003, Velké Karlovice, ISBN 80-900306-5-3, s.43.

Grantová podpora:

Projekt výzkumného centra LN00B125/D MŠMT

Grantový projekt 169/2004/B-BIO/FAF Grantové agentury Univerzity Karlovy

8. SOUHRN

Výzkumná práce se zabývá farmakobotanickým hodnocením nadzemní části taxonu *Evolvulus alsinoides* L. Tato rostlina je součástí přípravků s nootropním a adaptogenním působením. Studována byla suchá nať původem z Indie. Záměrem práce bylo rozšířit poznatky o obsahových látkách taxonu, posoudit biologickou aktivitu frakcí, izolovaných látek a stanovit charakteristické metabolity rostliny.

V první části projektu byl připraven základní extrakt z rostliny *E. alsinoides*. Extrakt byl rozdělen na tři základní části vytřepáním mezi různě polární rozpouštědla (petrolether, ether). Vytřepáním methanolového roztoku extraktu petroletherem byla získána frakce o hmotnosti 92,1 g. Vytřepáním vodného roztoku extraktu etherem byla získána frakce o hmotnosti 69,7 g. Zbylý extrakt byl zbaven rozpouštědla a představoval polární zbytek o hmotnosti 231 g.

Frakce byly zpracovány metodami sloupcové chromatografie (CC). V průběhu dělení extraktu byla prováděna bioassay-guided separace vybraných částí extraktu (test akutní toxicity, fototoxicity, antioxidační aktivity, antiagregační aktivity a antifungální aktivity). U vybraných frakcí byl stanoven obsah fenolových látek reakcí s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Byl také stanoven kvantitativní obsah získaných obsahových látek v celkovém extraktu HPLC a GC/FID metodami.

Frakce značená jako polární zbytek (230 g) byla podrobena CC na sloupci polyamidu. Byla získána frakce prostá fenolových látek (196,5 g) a frakce fenolových látek (12,5 g).

Frakce fenolových látek byla podrobena CC na silikagelu. Bylo získáno 65 frakcí, které byly spojeny do 26 kvalitativně odlišných frakcí. Ze spojené frakce 6 a 7 se podařilo získat 25 mg skopoletinu. Z frakce 8 bylo získáno 33 mg umbelliferonu. Ostatní frakce (1-5, 9-26) byly opětovně spojeny a podrobeny nové CC na silikagelu. Bylo získáno 143 frakcí spojených do 35 kvalitativně odlišných frakcí. Z těchto frakcí se nepodařilo získat významné množství nových krystalů. Frakce byly podrobeny hodnocení antioxidační aktivity.

Z frakce prosté fenolových látek vykryštalizovaly bílé krystaly identifikované jako Na_2SO_4 . Tato frakce byla podrobena hrubému dělení na silikagelové koloně a byla rozdělena na tři podíly označené FPFLHD1 (31 g), FPFLHD2 (7 g), FPFLHD3 (5 g). Frakce FPFLHD1 byla podrobena CC na silikagelové koloně. Získané frakce 1-100 byly spojeny do 22 kvalitativně odlišných frakcí. Ze spojené frakce 36-40 bylo získáno 15 mg skopolinu. Z frakce 47-56 vykryštalizovaly velké krystaly kosočtverečné soustavy (245 mg) látky 4. Krystaly byly identifikovány jako 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol.

Pro provedení biologického hodnocení byla z FPFLHD1 za využití diaionu HP-20 provedena izolace dostatečného množství skopolinu. Z frakce FPFLHD1 bylo získáno 187 mg krystalů skopolinu.

Z etherové frakce bylo CC získáno 145 frakcí. Ze spojené frakce 26-50 byl vyzolován skopoletin. Oba kumariny (skopoletin a umbelliferon) byly prokázány ve frakcích 51-62, 63-69, 70-85 a 86-92. V podfrakci 26-45 (spojené frakce 93-117) byla zjištěna přítomnost dusíkatých látek typu alkaloidů. Byla izolována jen směs značně znečištěných látek, jejichž struktura nebyla doposud určena. Důkaz alkaloidů pomocí Dragendorffova činidla byl negativní. Přítomnost alkaloidů v tomto extraktu nebyla zatím potvrzena.

Analýza frakce petroletherové byla komplikována vysokým obsahem chlorofylu a nepolárních látek. CC bylo získáno 113 frakcí. Ze spojených frakcí 3-4 a 5-7 byly získány 8-methyldekanová a olejová kyselina a směs blíže neidentifikovatelných polynenasycených mastných kyselin a alifatického uhlovodíku. Ve spojené frakci 15-16 byla prokázána přítomnost esterů ferulové kyseliny s lineárními alkoholy C14 - C17. Ze spojené frakce 36-40 se preparativní chromatografií podařilo získat směs palmitové, stearové a heptadekanové kyseliny.

Pomocí HPLC a CG-FID metod byl v rostlině stanoven procentuální obsah skopoletinu (0,0271 %), umbelliferonu (0,0257 %), skopolinu (0,0090 %) a 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu (0,870 %).

Hodnocení antioxidační aktivity bylo provedeno pomocí DPPH testu s použitím sekvenční injekční analýzy. Zároveň bylo stanoveno množství fenolových látek v jednotlivých částech extraktu pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Nejvyšší antioxidační aktivita v DPPH testu byla zjištěna u frakce číslo 31 (0,230 mg/ml, obsah fenolových látek 23,1 %). Nejvyšší obsah fenolových látek (28,9 %) byl stanoven ve frakci 28 (antioxidační aktivita 0,258 mg/ml). Antioxidační aktivita jednotlivých frakcí získaných z dělení frakce fenolových látek se pohybovala v oblasti 0,2-0,9 mg/ml. Antioxidační aktivita parciálních částí extraktu byla vyšší než aktivita samostatných látek, neboť vyzolované čisté látky neprokázaly v testovaných koncentracích významný stupeň účinnosti. Pouze ester ferulové kyseliny vykazoval mírnou antioxidační aktivitu. Kumariny a 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol byly zároveň podrobeny FRAP testu antioxidační aktivity. Skopoletin vykazoval pozitivní výsledek 19,8 μ M po 4 minutách testu v porovnání s 14,18 μ M standardu troloxu.

Měření trombocytární antiagregační aktivity bylo provedeno pomocí *in vitro* testu za využití metody optické agregometrie. Antiagregační aktivita u sledovaných

frakcí (polární zbytek, frakce fenolových látek, frakce prostá fenolových látek, skopolin, 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol) se pohybovala do 10 %, což je velmi slabý efekt. Vyšší antiagregační účinnost vykazoval ester ferulové kyseliny s vyššími alkoholy (více jak 80 %). Významnou antiagregační aktivitu vykazoval skopoletin a umbelliferon (více jak 90 %).

Hodnocení akutní toxicity a fototoxicity byla provedena pomocí kroužkoců *Tubifex tubifex* Müll. Předběžné testy akutní toxicity nevykazovaly zvýšenou toxicitu. Aktivita byla zjištěna u 3% vodného roztoku polárního zbytku, u 1% vodného roztoku frakce fenolových látek a u 5 % vodného roztoku frakce prosté fenolových látek. Fototoxicita byla hodnocena u skopolinu, skopoletinu, umbelliferonu a 2-methyl-1,2,3,4-butantetrolu. Pouze skopoletin prokázal v testu fototoxické působení. Při koncentraci 7,5 mM bylo poškození exponovaných jedinců 30 % proti 17 % u neexponovaných jedinců.

Antifungální aktivita byla stanovena za využití testu M27-A. K testu byly použity frakce polární zbytek, frakce fenolových látek, frakce prostá fenolových látek a frakce etherová. Frakce fenolových látek a frakce etherová inhibovaly růst *Candida albicans*, *C. krusei*, *Absidia corymbifera* v koncentraci 10 mg/ml po dobu 24 a 48 h a *Trichophyton mentagrophytes* v koncentraci 1 mg/ml po dobu 72 a 120 h.

9. SUMMARY

This experimental work deals with pharmaco-botanical evaluation of the aerial part of taxon *Evolvulus alsinoides* L. The plant is a component of formulations with nootropic and adaptogenic activity. A subject of the investigation was a dried herb of the plant, which is of Indian origin. The aim of this work was to extend the knowledge about compounds of the taxon, to evaluate biological activity of the fractions, isolated substances and to determine characteristic metabolites of the plant.

In the first part of the project the crude extract of the plant *E. alsinoides* was prepared by percolation of 8.8 kg of herb with 95% ethanol. The extract was partitioned into three extracts by extracting by two solvents of different polarity (petroleum ether, ether). The first fraction of weight 92.1 g was obtained by extracting of methanolic solution of crude extract with petroleum ether. The second fraction of weight 69.7 g was obtained by extracting of water solution of the crude extract with ether. The remaining solvent was evaporated from the crude extract and this one represented the third part - polar residue, yield 231 g.

The fractions were processed by the methods of column chromatography (CC). The bioassay-guided separation of selected parts of extract (test of acute toxicity, fototoxicity, antioxidant activity, anti-aggregation activity and antifungal activity) was performed during separation of the extract. The content of phenolic compounds of selected fractions was determined by reaction with Folin-Ciocalteu's test solution. The quantitative content of isolated substances in crude extract was established by HPLC and GC/FID methods.

Fraction designated as polar residue (230 g) was subjected to polyamide CC. The fraction of non-phenolic compounds (196.5 g) and the fraction of phenolic compounds (12.5 g) were obtained.

The fraction of phenolic compounds was subjected to Si-gel CC. In total 65 fractions was obtained which were combined into 26 qualitatively different fractions. 25 mg of scopoletin were isolated from combined fraction 6-7. 33 mg of umbelliferone were isolated from fraction 8 of primary extract. The rest of the fractions (1-5, 9-26) was combined again and subjected to new Si-gel CC. In total 143 fractions were obtained which were combined to 35 qualitatively different fractions. The significant amount of new crystals was not obtained from these fractions. The fractions were subjected to evaluation of antioxidant activity.

White crystals identified as Na_2SO_4 were crystallized from the fraction of non-phenolic compounds. This fraction was subjected to the crude separation on Si-gel CC and was fractioned in three parts designated as FPFLHD1 (31 g), FPFLHD2 (7 g),

FPFLHD3 (5 g). Fraction FPFLHD1 was subjected to Si-gel CC. Obtained fractions 1-100 were combined to 22 qualitatively different fractions. 15 mg of scopolin were isolated from combined fraction 36-40. The large crystals of orthorhombic system of substance 4 (245 mg) crystallized from combined fraction 47-56. These crystals were identified as 2-methyl-1,2,3,4-butanetetrol.

For the purposes of biological tests an isolation of sufficient amount of scopolin from fraction FPFLHD1 was performed using diaione HP-20. 187 mg of crystals of scopolin were obtained from fraction FPFLHD1.

In total 145 fractions were obtained on Si-gel CC from ether fraction. Scopoletin was isolated from combined fraction 26-50. Both coumarines (scopoletin and umbelliferone) were proven in combined fractions 51-62, 63-69, 70-85 and 86-92. The presence of nitrogen substances of alkaloids structure was detected in sub-fraction 26-45 (from combined fraction 93-117). Only the mixture of very impure substances that's structure has not been identified yet was isolated. The proof of alkaloids by Dragendorff's reagent was negative. The presence of alkaloids in this extract has not been confirmed yet.

The analysis of petroleum ether fraction was complicated by higher content of chlorophyll and non-polar substances. In total of 113 fractions were obtained CC. 8-methyldecanic acid, oleic acid and the mixture of unidentifiable polyunsaturated fatty acid and aliphatic hydrocarbon were isolated from combined fractions 3-4 and 5-7. The presence of esters of ferulic acid with linear alcohols C14-16 was proved in combined fraction 15-16. The mixture of palmitic, stearic and heptadecanic acid was obtained from combined fraction 36-40 by preparative chromatography.

The content of scopoletin (0.0271 %), umbelliferone (0.0257 %), scopolin (0.0090 %) and 2-methyl-1,2,3,4-butanetetrol (0.870 %) in plant was determined using HPLC and GC-FID methods.

The evaluation of antioxidant activity was performed by DPPH test with the use of Sequential Injection Analysis. Simultaneously the content of phenolic compounds in particular fractions of the extract was determined using Folin-Ciocalteu's reagent. The highest antioxidant activity at DPPH test was determined in fraction 31 (0.230 mg/ml, content of phenolic compounds 23.1 %). The highest content of phenolic compounds (28.9 %) was determined in fraction 28 (antioxidant activity 0.258 mg/ml). The antioxidant activity of partial fractions varied in the interval from 0.2 to 0.9 mg/ml. The antioxidant activity of partial fractions of the extract was higher than the activity of isolated compounds because isolated pure compounds did not show significant

activity at the tested concentrations. Only the ester of ferulic acid showed moderate antioxidant activity. Simultaneously coumarins and 2-methyl-1,2,3,4-butanetetrol were at the same time subjected to FRAP test of antioxidant activity. Scopoletin showed positive result 19.8 μM after 4 minutes of test in comparison to 14.18 μM of standard trolox.

The evaluation of thrombocyte anti-aggregation activity was performed via *in vitro* test using the optic aggregation method. Anti-aggregation activity of monitored fractions (polar residue, fraction of phenolic compounds, fraction of non-phenolic compounds, scopolin, 2-methyl-1,2,3,4-butanetetrol) was about 10 % that is very low effect. The ester of ferulic acid with higher alcohols showed higher anti-aggregation activity caused by collagen (over 80 %). Scopoletin and umbelliferone showed significant anti-aggregation activity (over 90 %).

The evaluation of acute toxicity and phototoxicity was performed using annelidans *Tubifex tubifex* Müll. Preliminary tests of acute toxicity did not show higher toxicity. The activity was found out in 3% water solution of polar residue, 1% water solution of fraction of phenolic compounds and 5% water solution of fraction of non-phenolic compounds. Phototoxicity was evaluated at following compounds - scopolin, scopoletin, umbelliferone and 2-methyl-1,2,3,4-butanetetrol. Only scopoletin showed phototoxic activity. The damage of exposed individuals was 30 % in concentration 7.5 mM in contrast to 17 % of non-exposed individuals.

The antifungal activity was determined using M27-A test. The fraction polar residue, fraction of phenolic compounds, fraction of non-phenolic compounds and ether fraction were used for this test. Fraction of phenolic compounds and ether fraction had inhibited the growth of *Candida albicans*, *C. krusei*, *Absidia corymbifera* in concentration 10 mg/ml for 24 and 48 hours and *Trichophyton mentagrophytes* in concentration 1 mg/ml for 72 and 120 hours.