

8. SOUHRN

130

Výzkumná práce se zabývá farmakobotanickým hodnocením nadzemní části taxonu *Evolvulus alsinoides* L. Tato rostlina je součástí přípravku s nootropním a adaptogenním působením. Studována byla suchá nat puvodem 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 vytrepáním mezi různé polární rozpouštědla (petrolether, ether). Vytrepáním methanolového roztoku extraktu petroletherem byla získána frakce o hmotnosti 92,1 g. Vytrepáním vodného roztoku extraktu etherem byla získána frakce o hmotnosti 69,7 g. Zbýlý 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, antioxidantní 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 podrobena 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 podrobena hodnocení antioxidantní aktivity.

Z frakce prosté fenolových látek vykristalizovaly bílé krystaly identifikované jako Na_2SO_4 . Tato frakce byla podrobena hrubému dělení na silikagelové kolone a byla rozdělena na tři podíly označené FPFLHD1 (31 g), FPFLHD2 (7 g), FPFLHD3 (5 g). Frakce FPFLHD1 byla podrobena CC na silikagelové kolone. 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 vykristalizovaly velké krystaly kosoctverecné soustavy (245 mg) látky 4. Krystaly byly identifikovány jako 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol.

131

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 vyizolován 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 alkaloidu. Byla izolována jen směs značně znečištěných látek, jejichž struktura nebyla doposud určena. Důkaz alkaloidu pomocí Dragendorffova činidla byl negativní. Přítomnost alkaloidu 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 esteru 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 antioxidantní 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 antioxidantní 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 (antioxidantní aktivita 0,258 mg/ml). Antioxidantní aktivita jednotlivých frakcí získaných z dělení frakce fenolových látek se pohybovala v oblasti 0,2-0,9 mg/ml. Antioxidantní aktivita parciálních částí extraktu byla vyšší než aktivita samostatných látek, neboť vyizolované čisté látky neprokázaly v testovaných koncentracích významný stupeň účinnosti. Pouze ester ferulové kyseliny vykazoval mírnou antioxidantní aktivitu. Kumariny a 2-methyl-1,2,3,4-butantetrol byly zároveň podrobeny FRAP testu antioxidantní aktivity. Skopoletin vykazoval pozitivní výsledek 19,8 μM po 4 minutách testu v porovnání s 14,18 μM standardu troloxu.

Měření trombocytární antiagregací aktivity bylo provedeno pomocí *in vitro* testu za využití metody optické agregometrie. Antiagregací aktivity u sledovaných 132

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 antiagregací účinnost vykazoval ester ferulové kyseliny s vyššími alkoholy (více jak 80 %). Významnou antiagregací aktivitu vykazoval skopoletin a umbelliferon (více jak 90 %).

Hodnocení akutní toxicity a fototoxicity byla provedena pomocí kroužkovcu *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.