

SOUHRN

Cílem této diplomové práce bylo najít nejpřínosnější izolační postup pro získání látek z listů slunečnice roční a pokusit se odstranit chlorofyl, kterého bylo v extraktu velké množství a mohl by komplikovat další postup. Náplní druhé části diplomové práce bylo provést biologické hodnocení získaných extraktů.

Nejprve byl připraven ethanolový extrakt z listů *H. annuus* zpracováním 100 g výchozího materiálu, se kterým byla provedena extrakce 400 ml 80% EtOH a následovala filtrace. Extrakce byla zopakována ještě s 200 ml 80% ethanolu, oba filtráty byly spojeny a bylo získáno celkem 360 ml ethanolového extraktu.

Dalším krokem bylo odstranění chlorofylu z tohoto extraktu. 3 ml extraktu bylo podrobeno zkoušce na odstranění chlorofylu. K extraktu se přikapával 15% roztok octanu olovnatého. Vznikla sraženina, která byla odfiltrována. K filtrátu se přikapával nasycený roztok uhličitanu barnatého a opět byla provedena filtrace. Po přidání uhličitanu barnatého se vysrážel chlorofyl. Pro orientaci byla provedena TLC dichlormethan-ethylacetát 80 : 20, chloroform-methanol 80 : 20.

Celé množství sumárního extraktu (347 ml) bylo zbaveno chlorofylu stejnou metodou, která byla odzkoušena nejprve s malým množstvím extraktu, tedy pomocí octanu olovnatého (435 kapek) a následně přidáním uhličitanu barnatého (100 ml + 800 kapek). Po přidání uhličitanu barnatého a přefiltrování bylo získáno 372 ml filtrátu.

Ethanol z extraktu zbaveného chlorofylu byl odpařen na odparce a znovu byla provedena filtrace. Po odstranění ethanolu odpařením bylo získáno 136 ml extraktu a po následné filtraci zůstalo 121 ml vodného extraktu. Vodný extrakt (121 ml) byl vytřepán 3x150 ml chloroformu a filtrace byla provedena přes uhličitan draselný. Byl získán chloroformový a vodný podíl. Vodný podíl byl vytřepán 3x180 ml butanolu. Třetí část butanolu byla nasycena vodou (180 ml butanolu : 18 ml vody, byla použita horní vrstva). Vznikla sraženina ve vodné fázi. Po každém třepání byla provedena filtrace přes uhličitan draselný. I přes tento postup se nepodařilo dostatečně oddělit vodnou a butanolovou vrstvu.

Po odpaření bylo získáno 0,07 g chloroformového podílu, 0,2014 g butanolového podílu bez obsahu vodného podílu, 0,6214 g butanolového podílu s obsahem vodného podílu a 1,0693 g vodného podílu.

Byl spojen butanolový podíl s a bez obsahu vodného podílu (celkem 0,8228 g). Tento butanolový podíl byl dělen na sloupci silikagelu. Kolona byly vymývána nejprve čistým chloroformem, pak chloroform s obsahem 1 % - 70 % methanolu, potom čistý methanol a nakonec EtOH. Bylo získáno 19 frakcí (0-18), které byly na základě 77

prováděné TLC spojovány. Všechny frakce obsahovaly velké množství látek. Nepodařilo se nám tímto dělením získat frakci, která by byla čistá. Jednotlivé frakce byly získány ve velmi malém množství a tak nemohlo být provedeno jejich další dělení.

Pokus o dělení vodného a chloroformového podílu na silikagelu se nezdařil, nebyla nalezena vhodná soustava. Také došlo k velkým ztrátám při vytřepávání a filtraci přes uhlíčitán draselný a tak bylo k dispozici jen malé množství extraktu, které se nanášelo na kolonu.

Sraženina, která byla získána při odstraňování chlorofylu z 10 ml sumárního extraktu po přidání uhlíčitánu barnatého, byla smyta z filtračního papíru 10 ml 50% MetOH. Byl odpařen methanol a zůstal vodný extrakt. Proběhla dekantace sraženého chlorofylu. Vodný extrakt byl vytřepán 2x5 ml chloroformu. Byl získán chloroformový a vodný výtřep. Vodný podíl byl vytřepán s butanolem a předpokládal se získání vodného a butanolového podílu. Tyto podíly nebyly získány, protože se neoddělil butanol a voda. Směs vodného a butanolového podílu byla odpařena na odparce a odparek byl rozpuštěn v 80% EtOH a uskladněn v ledničce. Byla provedena TLC chloroformového, butanolového a vodného podílu. Všechny podíly obsahovaly velké množství látek, ale na další dělení nebylo k dispozici dostatečné množství těchto podílů.

Tento postup A byl dost náročný a zdlouhavý (odstraňování chlorofylu). Během odstraňování chlorofylu došlo k velkým ztrátám extraktu. Přesto se nepodařilo jeho úplné odstranění. Zbytky byly ještě odhaleny po provedení TLC. Díky velkým ztrátám extraktu nemohlo být provedeno další dělení frakcí z kolony, protože byly získány ve velmi malém množství. Po tomto nezdařilém pokusu byla snaha najít jinou metodu, která by byla méně pracná.

U postupu B byl k extrakci použit dichlormethan. Listy byly umístěny do nádob a mírně stlačeny. Do nádob byl nalit dichlormethan tak, aby celý obsah byl ponořen (celkem bylo použito 12 l dichlormethanu). Nádoby byly uloženy ve tmě při pokojové teplotě po dobu šesti dnů (probíhala macerace). Po šesti dnech byl získán dichlormethanový extrakt, který byl přefiltrován, aby byly odstraněny případné zbytky drogy. Následovalo odpaření dichlormethanu na odparce, čímž bylo získáno 64,6465 g suchého extraktu.

Byla provedena orientační sloupcová chromatografie sumárního dichlormethanového extraktu na sloupci silikagelu. Bylo děleno 0,15 g extraktu. Kolona byla vymývána n-hexanem (65 ml), pak bylo přidáno 10 % acetonu (135 ml), 20 % acetonu (105 ml). 78

Bylo odebráno 21 frakcí, poté se kolona ucpala. Tato orientační chromatografie byla provedena, aby se zjistilo, jak se daný extrakt bude dělit.

Byla provedena také orientační sloupcová chromatografie sumárního dichlormethanového extraktu (0,2 g) na sloupci Sephadexu. Kolona byla vymývána 80% EtOH (180 ml). Bylo odebráno 12 frakcí. Na základě TLC byly spojeny frakce: 2 + 3, 4 + 5, 6 + 7. Extrakt se na této koloně nedělil.

Potom bylo 18,83 g dichlormethanového extraktu děleno na sloupci silikagelu. Kolona byla vymývána n-hexanem a postupně byl přidáván aceton (25 %-100 %) a nakonec 95% ethanol. Bylo odebráno 16 frakcí. Spojování frakcí probíhalo na základě TLC.

Frakce číslo 2 a 3 obsahovaly tmavé klky, číslo 5 a 6 amorfni bílou hmotu. Ve frakcích 9 a 11 se vytvořila mezifáze. Frakce 11 obsahovala také drobné krystalky a frakce 12 bílé kousky. Spojené frakce (8, 9, 10, 11) byly vytřepány v dělicí nálevce a bylo očekáváno rozvrstvení na dvě fáze, což neproběhlo. Frakce číslo 7 obsahovala hodně chlorofylu. Frakce číslo 7 byla odpařena a suchý odpárek váží 8,92 g. Suchý odpárek frakcí 8-11 váží 1,6012 g. Odpárek 12 + 13 váží 0,4076 g.

Kolona sloužila pouze k hrubému dělení a vzniklo pět frakcí: frakce A (0 + 1 + 2 + 3 + 4), frakce B (5 + 6, obsah amorfni bílé hmoty), frakce C (7, chlorofylová frakce: 8,92 g), frakce D (8 + 9 + 10 + 11, obsah mezifáze, 1,6012 g), frakce E (12 + 13, 0,4079 g).

Dalším krokem byla identifikace bílé amorfni hmoty, která byla přítomna ve frakcích číslo 5 a 6. Předpokládali jsme, že je to kyselina kaurenová³³, kterou vyizolovali kolegové z květů slunečnice (na pohled to byly téměř identické hmoty). Byla provedena TLC, kde byly naneseny frakce 5, 6 a standard kyseliny kaurenové. Avšak náš předpoklad nebyl potvrzen. Frakce 5 a 6 byly poslány na GC/MS analýzu. Byla provedena tzv. studená transmethylace. Extrakt byl rozpuštěn v heptanu a třepán s roztokem methanolu s hydroxidem draselným (2 mol/l). Byla provedena analýza vzniklých methylesterů na přístroji GC/MS Turbo Mass firmy Perkin-Elmer. Frakce 5 a 6 se od sebe významně nelišily. Tyto frakce obsahovaly 8-methyldekanovou kyselinu, olejovou kyselinu, eikosanovou kyselinu, dokosanovou kyselinu, hemikosanovou kyselinu, heptakosanovou kyselinu, alifatický uhlovodík a PUFA.

Vysušené listy po předchozí extrakci dichlormethanem byly reextrahovány EtOH v mixéru. 50 g listů bylo vložen do mixéru a zalito 150 ml 80% EtOH. Extrakce probíhala 5 min. (kontrolovali jsme, zda se mixér nezahřívá na více než 40 °C, popř. byl na chvíli vypnut). Vznikla hustá kaše, proto bylo přidáno znovu 300 ml EtOH. Po 79

mixování byla provedena filtrace. Celkem bylo získáno 275,5 ml extraktu, po odpaření bylo získáno 5,3151 g suchého extraktu. Trochu tohoto extraktu bylo rozpuštěno v petroletheru, na dně zůstal nános. Jelikož nebylo k dispozici víc petroletheru, abychom zjistili, zda se nános po dalším přidání tohoto rozpouštědla rozpustí, odsáli jsme petrolether a přidali jiná rozpouštědla. Po přidání n-hexanu se nános nerozpustil, přidali jsme tedy chloroform a poté aceton, avšak nános se nerozpustil. Po přidání těchto tří rozpouštědel vznikla zelená suspenze se žlutými klky na dně. Žluté klky byly odděleny a byla snaha je rozpustit ve směsi vody a methanolu, což se částečně podařilo. Vznikla žlutá suspenze s drobnými žlutými kousky. Tato suspenze byla uložena do ledničky.

Silikagel z kolony po dělení sumárního dichlormethanového extraktu byl macerován jeden den 1,25 l 80% EtOH. Bylo získáno 480 ml extraktu. Byla provedena filtrace a výsledné množství extraktu bylo 425 ml. Po odpaření EtOH bylo získáno 0,104 g suchého extraktu.

Bylo provedeno další dělení. Na kolonu byly nanесeny spojené frakce D a E, extrakt z macerace silikagelu z kolony a předpokládalo se nanесení extraktu z mixéru. Na základě orientační TLC bylo zjištěno velké množství látek v extraktu z mixéru, proto tento extrakt nebyl spojen s frakcemi, které byly určeny k dělení. Tento extrakt byl uložen do ledničky.

Kolona byla vymývána postupně: n-hexan-CHCl₃ 1 : 1, n-hexan-CHCl₃ 1 : 3, CHCl₃, CHCl₃-MetOH 9 : 1, 8 : 2, 7 : 3, 6 : 4, 5 : 5, 4 : 6, 3 : 7, EtOH. Tyto frakce byly uloženy do ledničky. Byla provedena detekce na steroly, steroidy, triterpenové glykosidy, cukry, terpeny, fenolické sloučeniny, laktony, redukující látky. Detekce na tyto látky byla provedena v jednotlivých frakcích, které pocházely z dělení sumárního dichlormethanového extraktu, než byly spojeny do frakcí A-E.

Vyvíjecí soustavy pro chromatografii pro frakci 0-6 byla směs n-hexan-aceton 85 : 15, pro frakci 7-13 byla mobilní fáze směs n-hexan-aceton 1 : 1. Jako chromatografický adsorbent sloužil Silufol UV 254 nm.

Ve frakcích 3, 4, 7, 8, 9, 10 a 12 byly detekovány steroly, steroidy a triterpeny (frakce 0-6 chromatogram č.10, frakce 7-13 chromatogram č.11). Cukry, steroidy, terpeny byl detekovány ve frakcích 0, 1, 2a, 2b, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 (frakce 0-6 chromatogram č.12). Fenolické sloučeniny byly detekovány ve frakcích 2a, 2b, 3, 7, 8, 10, 11, 12, 13 (frakce 0-6 chromatogram č.13). Detekce na karboxylové sloučeniny se 80

nezdařila, i když byla prováděna dvakrát. Laktony byly detekovány ve frakcích 2a, 2b, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 (frakce 0-6 chromatogram č.14, frakce 7-13 chromatogram č.15).

Ve druhé části diplomové práce bylo provedeno biologické hodnocení získaných extraktů. Byla stanovena akutní toxicita sumárního dichlormethanového extraktu (ten se však úplně nerozpustil ve vodě, byl tedy testován ve formě suspenze), ethanolového extraktu získaného extrakcí v mixéru, frakce C z dělení sumárního dichlormethanového extraktu. Byl připraven základní roztok zkoumané látky o koncentraci 0,1 g/ml. Základní roztok byl pak náležitým způsobem ředěn. Ředění bylo prováděno dokud nitěnky reagovaly na roztok. Po provedeném výpočtu nám vyšla hodnota pro efektivní i letální koncentraci ethanolového extraktu zástavy pohybu červů *Tubifex tubifex* stejná (0,0415 g/ml). Sumární dichlormethanový extrakt ani frakce C v tomto testu nevykázaly akutní toxicitu. U sumárního extraktu se objevil jen zpomalený pohyb červů *Tubifex tubifex*, je možné, že výsledek provedeného testu byl ovlivněn tím, že měřený roztok byl ve formě suspenze.

Dalším krokem bylo stanovení antioxidační aktivity chloroformového a butanolového podílu (z postupu A po odstranění chlorofylu), sumárního dichlormethanového extraktu (nebyl zcela rozpuštěn), ethanolového extraktu z mixéru a frakce C (byla měřena ve formě suspenze).

Významnou antioxidační aktivitu má ethanolový extrakt.

Ethanolový extrakt se z hlediska biologické aktivity projevil jako nejperspektivnější, proto bude podroben dalšímu testování.

Další droga bude zpracována stejným postupem jako byl získán ethanolový extrakt a ten bude dělen sloupcovou chromatografií pro získání obsahových látek polárního charakteru.

Zkušební metoda pro odstranění chlorofylu se v tomto případě bohužel neosvědčila.