

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

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Fytochemický výzkum listů *Helianthus annuus*  
Phytochemical study of *Helianthus annuus* leaves

Hradec Králové  
květen 2006

Zuzana Novosadová

Děkuji PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a rady při tvorbě této práce a také kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření dobrých podmínek pro práci a přátelského prostředí. Také bych chtěla poděkovat Mudr. R. Hyšplerovi, Ph.D., laboratoř Kliniky gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové za provedení GC/MS analýzy.

## OBSAH:

<b>I. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>II. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>11</b>
<b>III. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
<b>1. Botanická charakteristika a využití</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Látky izolované z listů <i>Helianthus annuus</i></b> .....	<b>17</b>
2.1 Seskviterpeny .....	17
2.1.1 Heliannany, helibisabonoly .....	17
2.1.1.1 Izolace heliannanů a helibisabonolů z listů <i>H. annuus</i> L. cv. Peredovick, <i>H. annuus</i> cv. SH-222, cv. VYP .....	18
2.1.2 Germakranolidy .....	19
2.1.2.1 Izolace helivypolidu G z listů <i>H. annuus</i> cv. Stella.....	19
2.1.2.2 Izolace helivypolidů D a E z listů <i>H. annuus</i> L. cv. Peredovick.....	20
2.1.2.3 Izolace heliangolidů typu niveusinu z listů <i>H. annuus</i> var. giganteus.....	21
2.1.2.4 Izolace argophyllinů A, B a heliangolidů typu niveusinu z listů <i>H. annuus</i> L. cv. giganteus .....	21
2.1.2.5 Izolace leptokarpinu z listů <i>H. annuus</i> L. cv. Peredovick.....	23
2.1.3 Guajanolidy.....	24
2.1.3.1 Izolace annuolidů A-E z listů <i>H. annuus</i> L. var SH-222.....	24
2.1.3.2 Izolace annuolidu E z listů <i>H. annuus</i> L. cv. Peredovick .....	24
2.1.3.3 Izolace 8β-angeloiloxicumambranolidu z listů <i>H. annuus</i> L. cv. Peredovick.....	25
2.1.4 Annuionony (apokarotenoidy) .....	25
2.1.4.1 Izolace annuiononů A-H z listů <i>H. annuus</i> cv. Stella .....	25
2.1.4.2 Izolace annuiononu H z listů <i>H. annuus</i> L. cv. Suncross-42 .....	26
2.1.4.3 Izolace annuiononů A-C a helinorbisabonu z listů <i>H.</i> <i>annuus</i> var. SH-222 a var. VYP .....	26
2.1.4.4 Izolace annuiononu E z listů <i>H. annuus</i> L. cv. Peredoovick.....	27
2.1.4.5 Izolace dehydrovomifoliolu z listů <i>H. annuus</i> L. cv. Peredovick.....	27

2.1.5 Heliespirony (spiroterpeny) .....	28
2.1.5.1 Izolace heliespironů z listů <i>H. annuus</i> cv. Atila .....	28
2.2 Flavonoidy .....	28
2.2.1 Flavanony .....	29
2.2.2 Chalkony .....	29
2.2.3 Flavonoly .....	29
<b>3. Biologická aktivita obsahových látek .....</b>	<b>30</b>
3.1 Alelopatická aktivita .....	30
3.1.1 Úvod .....	30
3.1.2 Biologické testy .....	31
3.1.2.1 Biologický test s etiolizovanými pšeničnými koleoptily .....	31
3.1.2.2 Biologický test s Petriho miskami .....	32
3.1.3 Heliannony, helibisabonoly .....	32
3.1.4 Germakranolidy .....	33
3.1.5 Guajanolidy .....	34
3.1.6 Annuionony .....	34
3.1.7 Heliespirony .....	35
3.1.8 Flavonoidy .....	35
3.2 Alternativní metoda stanovení akutní toxicity extraktů: zástava pohybu červů <i>Tubifex tubifex</i> .....	36
3.2.1 Úvod .....	36
3.2.2 Popis testovaného organismu .....	37
3.2.3 Chemikálie používané při testu .....	37
3.2.4 Metodika testu .....	37
3.2.4.1 Příprava roztoků referenční látky .....	38
3.2.4.2 Příprava roztoků stanovované látky .....	38
3.2.4.3 Pracovní postup .....	38
3.2.4.4 Výpočet .....	39
3.3 Stanovení antioxidační aktivity .....	40
3.3.1 Úvod .....	40
3.3.2 Princip .....	40
3.3.2.1 Příprava roztoků .....	41
3.3.2.2 Přístroje .....	41

<b>4.Extrakční, separační a strukturně analytické postupy .....</b>	<b>43</b>
<b><i>IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY .....</i></b>	<b>45</b>
<b>1. Všeobecné postupy .....</b>	<b>46</b>
1.1 Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii .....	46
1.2 Příprava roztěru .....	46
1.3 Sloupcová chromatografie .....	46
1.4 Orientační tenkovrstvá chromatografie (TLC) .....	46
1.5 Odpařování frakcí .....	46
<b>2. Potřeby .....</b>	<b>47</b>
2.1 Rozpouštědla .....	47
2.2 Chemikálie .....	47
2.3 Detekční činidla .....	48
2.4 Vytvářecí soustavy pro chromatografii .....	49
2.5 Přístroje .....	50
<b>3. Izolace .....</b>	<b>51</b>
3.1 Postup A .....	51
3.1.1 Extrakce listů .....	51
3.1.1.1 Schéma extrakce listů .....	51
3.1.1.2 Materiál .....	51
3.1.1.3 Postup .....	52
3.1.2 Odstranění chlorofylu .....	52
3.1.2.1 Postup .....	52
3.1.3 Další zpracování chlorofylu-zbaveného extraktu .....	53
3.1.3.1 Postup .....	53
3.1.3.2 Schéma zpracování extraktu .....	53
3.1.4 Sloupcová chromatografie .....	54
3.1.4.1 Sloupcová chromatografie butanolového podílu .....	54
3.1.4.2 Sloupcová chromatografie vodného a chloroformového podílu .....	55
3.1.5 Zpracování sraženiny z filtru .....	55
3.1.5.1 Schéma zpracování sraženiny .....	55
3.1.5.2 Postup .....	56

3.1.6 Závěr .....	56
3.2 Postup B .....	56
3.2.1 Extrakce listů .....	56
3.2.1.1 Schéma extrakce listů .....	56
3.2.1.2 Materiál.....	56
3.2.2 Sloupcová chromatografie .....	57
3.2.2.1 Orientační sloupcová chromatografie sumárního dichlormethanového extraktu na sloupci silikagelu.....	57
3.2.2.2 Orientační sloupcová chromatografie sumárního dichlormethanového extraktu na sloupci Sephadexu .....	58
3.2.2.3 Sloupcová chromatografie sumárního dichlormethanového extraktu .....	58
3.2.3 Extrakce listů v mixéru .....	61
3.2.3.1 Schéma extrakce .....	61
3.2.3.2 Materiál.....	61
3.2.3.3 Postup.....	61
3.2.4 Macerace silikagelu z kolony .....	62
3.2.4.1 Schéma macerace.....	62
3.2.4.2 Materiál.....	62
3.2.4.3 Postup.....	62
3.2.5 Sloupcová chromatografie frakcí D a E a extraktu z macerace silikagelu .....	63
3.2.6 Detekce na steroly, steroidy, triterpenové glykosidy, cukry, terpeny, fenolické sloučeniny, laktony, redukující látky .....	65
3.2.6.1 Postup a vyhodnocení detekce:.....	65
<b>4. Biologická aktivita .....</b>	<b>67</b>
4.1 Stanovení akutní toxicity .....	67
4.1.1 Referenční látka .....	67
4.1.2 Zkoumaná látka.....	69
4.2 Stanovení antioxidační aktivity .....	72
<b>V. SOUHRN .....</b>	<b>75</b>
<b>VI. PŘÍLOHY.....</b>	<b>81</b>



# **I. ÚVOD**



## Slunečnice roční, *Helianthus annuus*

Tato rostlina, pěstovaná americkými Indiány již před 3000 lety, je pojmenována na počest Helia, řeckého boha Slunce. V 15. století byly, tehdy ještě drobnokvětými, slunečnicemi korunovány aztécké kněžky Slunce. Do Evropy přivezli slunečnici Španělé v 16. století, ale stále ještě to byly jen drobnokvěté slunečnice. Teprve když se slunečnice dostala do Ruska, objevila se tam jako dědičná odchylka, vzniklá srůstem několika stonků, dnešní velkokvětá slunečnice. Rusové s oblibou kupují slunečnicová semena, louskají je mezi zuby a slupky vyplivují kolem sebe.



Všechny části slunečnice jsou využitelné. Dřeň z lodyh je jedním z nejlehčích materiálů, Číňané ji používali při akupresuře ve formě doutnajících kuželíků a při výrobě hedvábí i provazů. Schopnost slunečnice rychle čerpat vodu z půdy využívají při kultivaci mokřin Holanďané.<sup>1</sup>

Olej z plodů slunečnice je jedním z nejdůležitějších stolních olejů na zeměkouli. Používá se na pečení a tvoří součást mnoha potravin, např. margarínů.

Tento olej je nejen chutný, ale i zdravý, protože snižuje obsah cholesterolu v krvi. Slunečnicový olej je základní surovinou pro výrobu mýdel, barev, masážních olejů a získává se z něj zelené až žluté barvivo pro barvení látek a vlny.<sup>2</sup>

Slunečnice byla v Čechách a na Moravě pěstována již od poloviny 19. století, převážně však jako pícnina, ať již v čistých porostech nebo ve směskách. Pěstování slunečnice jako olejniny dlouho brzdil běžný názor, že v našich podmínkách nedozrává, a kromě toho je velmi náročná na ruční práci. A tak pokusy o rozšíření slunečnice jako olejniny ve 20. a později v 50. letech nebyly úspěšné.

K oživení zájmu o slunečnici došlo pak až v 80. letech, k čemuž přispělo zavádění nových výkonných a ranějších hybridů, plně mechanizovaných technologií pěstování, větší zájem o slunečnicový olej.<sup>3</sup>

Slunečnice patří mezi světové hospodářské rostliny. Slouží jako potrava pro zvířata, získává se z ní olej, med. Je široce rozšířená, hlavně se pěstuje v Kanadě, Mexiku, USA.<sup>4</sup>

Slunečnicový olej je lékopisný. V Českém lékopise 2002 najdeme monografii:  
Helianthi oleum raffinatum

Slunečnicový olej čištěný

Syn. Helianthi annui oleum raffinatum

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

Vlastnosti: čirá světle žlutá tekutina. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%, mísitelný s etherem petrolejovým (t.v. 40 až 60 °C). Relativní hustota je asi 0,921 a index lomu je asi 1,474.<sup>5</sup>

## **II. CÍL PRÁCE**

V současné uspěchané době na nás všude číhá spousta stresových situací a také nepříznivých faktorů životního prostředí, které jsou zdrojem volných radikálů. Ty jsou zodpovědné za poškození buněk. Proto je neustálá snaha najít vhodné antioxidanty právě z rostlinných zdrojů, které by tomuto ničení zabraňovaly. Antioxidanty rostlinného původu jsou používány již po staletí. Moderní metody výzkumu, včetně Katedry farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, přivedly k využití některé taxony (např. *Leuzea carthamoides*, Asteraceae). Slunečnice roční, kterou se ve své diplomové práci zabývám, byla zahrnuta do pilotní studie této katedry prováděné mimo jiné i na čeledi Asteraceae, která se konkrétně u této čeledi zabývala studiem antimykotické aktivity.<sup>6</sup>

U této rostliny bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení této aktivity a to nás vedlo k tomu, abychom se jí začali dále zabývat.

Cílem této diplomové práce bylo najít nejpřínosnější izolační postup pro získání látek z listů 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.

### **III. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1. Botanická charakteristika a využití

Slunečnice roční přísluší botanicky do řádu Asterales, čeledi Asteraceae (hvězdnicovité). Kulturní typ slunečnice *Helianthus annuus* L. patří do sekce annui. Celkově rod *Helianthus* v různých oblastech naší zeměkoule je reprezentován asi 260 jednoletými a víceletými druhy, z nichž nejrozšířenější je jednoletý kulturní druh *Helianthus annuus* L. a vytrvalý *Helianthus tuberosus* L. (topinambur). Slunečnice je plodinou teplé části mírného pásma. Relativně je rostlinou teplomilnou a suchovzdornou. Má širokou schopnost adaptace díky svým biologickým vlastnostem. Prakticky stejné hybridy jsou pěstovány v Evropě, Asii, Africe, Austrálii nebo v Severní a Jižní Americe. Má vysokou absorpční schopnost v přijímání živin. Významný podíl na tom má dobře tvořený kořenový systém.<sup>7</sup>

Díky němu má poměrně vysokou odolnost proti suchu a je schopna přijímat vodu a živiny z hlubších vrstev půdy. Kořeny slunečnice se velmi silně větví. Největší množství postranních kořenů vyrůstá z kořene hlavního a nachází se 25-40 cm pod povrchem ornice. Kulový kořen proniká až do hloubky 1,5 m.

Lodyha je po dobu růstu vzpřímená, před začátkem kvetení se v horní části ohýbá. Lodyha a listy jsou charakterizovány výrazným heliotropismem (otáčení za sluncem). Na začátku kvetení pohyb lodyh ustává. Rozkvetlé úbory jsou pak nakloněny na východ. Velikost listů způsobuje souvislé zapojení porostu, které v pozdějších fázích vývoje působí na potlačení růstu plevelů.

Květy slunečnice jsou uspořádány do úboru. Slunečnice vytváří oboupohlavní trubkovité květy a bezpohlavní jazykovité květy. Trubkovité květy jsou velmi početné, jsou protandrické, takže prašníky prorůstají dříve než blizna. Slunečnice je výrazně cizosprašná. Podmínkou oplození a konečného počtu nažek je nejen dobré opylení, ale i dobré zásobení vodou a živinami. Nejlépe vyvinuté nažky jsou na periférii úboru, nejhůře vyvinuté ve středu úboru.

U slunečnice rozlišujeme 4 základní morfologicky dobře definovatelné růstové a vývojové fáze:

1. fáze vzcházení
2. fáze vegetativního růstu

3. fáze hvězdičky a kvetení

4. fáze tvorby a zrání nažek.<sup>8</sup>

Slunečnice roční je velmi statná jednoletá rostlina, dorůstající běžně výšky až 2,5 m. Celá je drsně chlupatá. Lodyha bývá obvykle nevětvená, listy jsou velké, široce vejčité, dolní řapíkaté, horní poněkud menší. Jednotlivé úbory se nacházejí na vrcholku lodyhy, mají průměr 20 až 25 cm, někdy dokonce i větší. Jazykovité květy jsou zlatožluté, lůžko je ploché s obvejčitými nažkami. Celé květenství je obvykle skloněné. Kveté od srpna do října. Slunečnice je běžně pěstovaná olejodárná rostlina, výjimečně zplaňuje. Předmětem sběru a užití je semeno, potřebné k výrobě jedlého oleje. Méně často se setkáváme s využitím květu (*Flos Helianthi*), ale používání je stále častější a dlužno říci oprávněné.

Semena obsahují kolem 45 % oleje, bílkoviny, glyceridy, steroly, fosfolipidy, karotenoidy, organické kyseliny (citronová, vinná, chlorogenová). V listech a žlutých květech byl nalezen flavonoid quercimeritrin, kumarinové glykosidy, triterpenové saponiny, karotenoidy, antokyany, třísloviny, cholin, betain, hořký helianthin, minerální látky.<sup>9</sup>

### **Základní charakteristiky slunečnice**

Původ: Střední Amerika, do Evropy dovezena v 16. století

Rozvoj pěstování: od 18. století (bývalé Rusko)

Introdukce do ČSR: 1920

Pojmenování: Slunečnice roční

*Helianthus annuus*

Sunflower (angl.)

Tournesol (franc.)

Sonnenblume (něm.)

Naprafozgó (maďar.)

Podsolnečník (SNS)

Girassol (port.)

Typy slunečnice: olejná, cukrářská, silážní, okrasná

Fotoperiodická reakce: rostlina krátkého dne

Fixace uhlíku: skupina C<sub>3</sub>

Délka lodyhy: 40-200 cm

Listová plocha: do 7000 cm<sup>2</sup> (střední list 250-400 cm<sup>2</sup>)

Květ: úbor v průměru 15-25 cm

Počet trubkovitých květů: v úboru 500-3000

Plod: nažka

Fotosyntetická účinnost: asi 30 mg CO<sub>2</sub> na 100 cm<sup>2</sup> za 1 hod

Čistý fotosyntetický výkon: 10-18 g m<sup>2</sup> za den

Hodnota transpirace: 150 mg h<sup>-1</sup> m<sup>2</sup>

Nároky na teplo: 6.-9. měsíc

Potřeba dešťových srážek: 450 – 500 mm

Vyšší nároky na vodu: prvních 30 dnů vegetace, 15-20 dnů před kvetením, 10-15 dnů po odkvětu

Vegetační období: 120-150 dní<sup>7</sup>



## 2. Látky izolované z listů *Helianthus annuus*

Slunečnice je bohatým zdrojem seskviterpenů, obzvláště seskviterpenových laktonů. Slunečnice byla široce studována a to vedlo k izolaci a chemické charakterizaci fenolických sloučenin (derivátů kyseliny benzoové, kumarinů, flavonoidů), diterpenů a triterpenů.<sup>10</sup>

### 2.1 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou patnáctiuhlíkaté sloučeniny. Vznikají spojením tří isoprenových jednotek. Představují nejpočetnější skupinu terpenoidů. Jsou velmi často přítomny v silicích vyšších rostlin. Významnou skupinu tvoří seskviterpenové laktony, charakteristické přítomností  $\gamma$ -laktonu v molekule. Laktony jsou hojně zastoupeny v čeledích Asteraceae, Apiaceae, Menispermaceae. Jsou i v houbách a mechorostech. Jsou uloženy v žláznatých trichomech listů, stonků a květních listenů. V podzemních orgánech jsou jen výjimečně. Drogy s obsahem hořkých laktonů se v lidovém léčitelství používají jako amara, tonika a stomachika.

Seskviterpeny se dělí podle struktury na acyklické a cyklické. Cyklické se dále dělí na monocyklické, bicyklické, tricyklické a laktony ( $\alpha$ -metylen- $\gamma$ -laktony). Laktony rozdělujeme podle uhlíkatého skeletu na germakranolidy, elemanolidy, guajanolidy a další.<sup>11</sup>

#### 2.1.1 Heliannany, helibisabonoly

Heliannany jsou novým typem seskviterpenů izolovaných z pozemských (*Helianthus annuus*) a vodních (*Haliclona fascigera*) organismů. Sdílejí jako společný strukturální rys substituovaný aromatický kruh spojený s heterocyklem různé velikosti, který obsahuje kyslík.

Heliannany lze rozdělit na základě chemické struktury na 4 skupiny:

1. 7,11-heliannany: **heliannuol A** (obr.1), **heliannuol G** a jeho 8 epimer (**heliannuol H**) a **heliannuol K**
2. 7,10-heliannany: **heliannuol B** a jeho 8,9-hydrogenát **heliannuol D** (obr.2), **8-oxo heliannuol D** (**heliannuol F**) a 7,8 epimery **7,8-epoxy heliannuolu B** (**heliannuol I** a **heliannuol J**)
3. 8,11-heliannany: **heliannuol C** (obr.3)

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

**Heliannuol A** je prvním heliannanem uveřejněným v literatuře. Byl vyizolován z listů slunečnice. Všichni následující členové této skupiny byli izolováni ze stejného zdroje, ale z odlišných variet slunečnice. K velkému překvapení, žádný z heliannuolů nebyl zatím vyizolován z dalších pozemských zdrojů. Nicméně základní skelet heliannanu byl izolován také z mořské houby *Haliclona fasciata*.

Absolutní konfigurace **heliannuolu A** byla zjištěna jako 7R, 10S. Toto stanovení bylo později potvrzeno pomocí asymetrické syntézy enantiomeru (+)-**heliannuolu A**. Biogenetická úvaha umožnila zjistit absolutní stereochemii zbytku členů skupiny heliannanů (s výjimkou **heliannuolu C**). Nedávno byla uveřejněna totální syntéza **heliannuolu E** a potvrdila předešlé ustanovení absolutní stereochemie. Absolutní stereochemie mořských heliannanů byla navrhována právě jako opačná: 7S, ale založena na stejném biogenetickém základě.<sup>10</sup>

##### 2.1.1.1 Izolace heliannanů a helibisabonolů z listů *H. annuus* L. cv. Peredovick, *H. annuus* cv. SH-222, cv. VYP

Dichlormethanový extrakt suchých listů *H. annuus* L. cv. Peredovick poskytl **heliannuoly A, C, D, F, G, H, I, L, J** a **helibisabonoly A a B**.<sup>12</sup>

*H. annuus* cv. SH-222 poskytl **heliannuoly A, B, C, D, E, F, G, H, I, K**. Heliannuoly **F, H, J** byly izolovány také z *H. annuus* cv. VYP.<sup>10</sup>

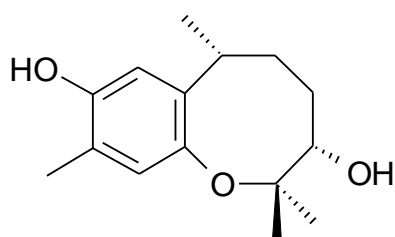
##### Rostlinný materiál:

Listy *Helianthus annuus* cv. SH-222, cv. VYP, cv. Peredovick

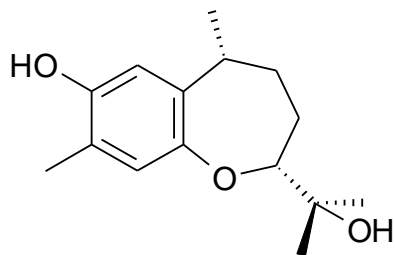
##### Izolace:

Suché listy *H. annuus* cv. Peredovick (1,7 kg) byly máčeny v dichlormethanu (čerstvá rostlina-dichlormethan 1 : 3) po dobu 24 hod, při 25 °C ve tmě. Dichlormethanový extrakt byl dělen suchou flash chromatografií na silikagelu, mobilní fází byla směs n-hexan-aceton stoupající polarity. Bylo získáno 123 frakcí (po 50 ml), které byly redukovány do 7 frakcí (A-G) po srovnání pomocí tenkovrstvé chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC). Biologické testy odlišných frakcí s dvouděložnými rostlinami *Lactuca sativa* a *Lepidium sativum* a jednoděložnými *Allium cepa* a *Hordeum vulgare* umožnilo vybrat frakci D pro další studie. Frakce D

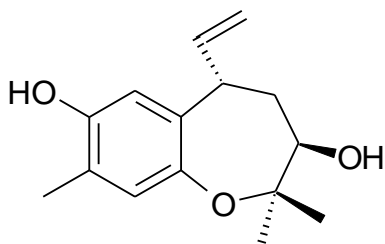
byla dělena na sloupci silikagelu a vymývána směsí n-hexan-aceton stoupající polarity. Po separaci s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) byly získány sloučeniny **heliannuol A** (3,3 mg), **heliannuol C** (2,0 mg), **heliannuol D** (2,3 mg), **heliannuol F** (1,8 mg), **heliannuol G** (1,6 mg), **heliannuol H** (1,7 mg), **heliannuol I** (3,4 mg), **heliannuol L** (1,0 mg), **helibisabonol A** (3,2 mg) a **helibisabonol B** (3,1 mg). Objasnění struktury bylo založeno na extenzivních spektrálních a teoretických studiích.<sup>12</sup>



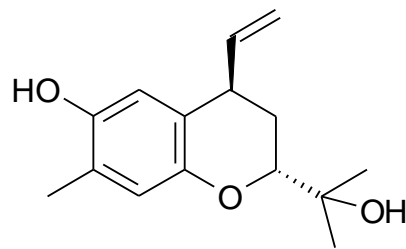
Obr.1: heliannuol A



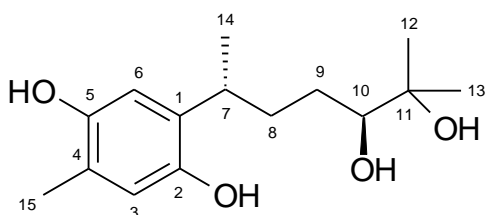
Obr.2: heliannuol D



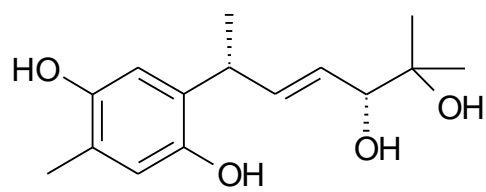
Obr.3: heliannuol C



Obr.4: heliannuol E



Obr.5: helibisabonol A



Obr.6: helibisabonol B

## 2.1.2 Germakranolidy

### 2.1.2.1 Izolace helivypolidu G z listů *H. annuus* cv. Stella

V etapě pokračujícího výzkumu nových alelochemikálií z *H. annuus* byl vyizolován nový dimerický biologicky aktivní seskviterpenový lakton **helivypolid G**. **Helivypolid**

**G** má spojené dva monomery pomocí spirocyklického dihydropyranového kruhu. Byl izolován jako nažloutlá amorfni hmota ze středně polární frakce.

### **Rostlinný materiál:**

Čerstvé listy *H. annuus* cv. Stella

### **Izolace:**

Listy byly extrahovány ve vodě po 24 hod při pokojové teplotě, ve tmě. Vodný extrakt byl reextrahován dichlormethanem při pokojové teplotě. Organické rozpouštědlo bylo odstraněno odpařením za sníženého tlaku. Extrakt byl dělen na sloupci silikagelu, byl eluován směsí hexan-ethylacetát (100 : 1 až 1 : 1). Poté byl přečištěn HPLC. Mobilní fází byla směs hexan-aceton (4 : 1). Takto byl získán **helivypolid G**.<sup>13</sup>

### **2.1.2.2 Izolace helivypolidů D a E z listů *H. annuus* L. cv. Peredovick**

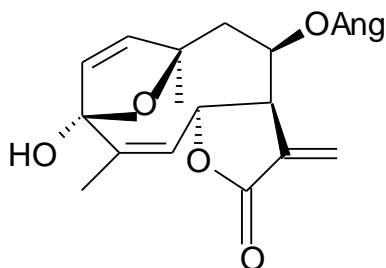
Dále byly získány dva nové seskviterpenové laktony, **helivypolidy D a E**.

### **Rostlinný materiál:**

Listy *H. annuus* L. cv. Peredovick

### **Izolace:**

Pro izolaci **helivypolidů D** (obr.7) a **E** byl použit stejný postup jako pro izolaci heliannanů. Tyto helivypolidy byly získány z frakce C pomocí HPLC.<sup>14</sup>



Obr.7: helivypolid D

### 2.1.2.3 Izolace heliangolidů typu niveusinu z listů *H. annuus* var. *giganteus*

Již dříve byla uveřejněna izolace biologicky aktivního furanoheliangolidu, který byl totožný s niveusinem C z *Helianthus niveus*, sloučenina, která byla také nalezena v *Helianthus maximiliani*. Pozdější výzkum substancí inhibující růst z mladých listů a horní části stonku *Helianthus a.* vyústil v extrakci tří dodatečných seskviterpenových laktonů: známou sloučeninu **niveusin B** a nový **germakranolid tifruticinového typu a 3-ethoxyniveusin B**. Později bylo prokázáno, že ethoxyheliangolid byl vytvořen z niveusinu B během ethanolové extrakce.

#### **Rostlinný materiál:**

*Helianthus annuus* var. *giganteus* byl pěstován ve skleníku 3-4 týdny. Listy a horní části stonku byly použity pro izolaci látek.

#### **Izolace:**

Listy a horní části stonku byly extrahovány ethanolem. Extrakt byl chromatograficky dělen. K eluci byl použit petrolether (frakce 1-5), petrolether-chloroform (1 : 1) (frakce 6-10), chloroform (frakce 11-15), chloroform-ethanol (49 : 1) (frakce 16-20), chloroform-ethanol (19 : 1) (frakce 21-25) a chloroform-ethanol (9 : 1) (frakce 26-28). Frakce 16-20 poskytla heliangolidy **niveusin C** a **B**. Frakce 21-25 poskytla **germakranolid tifruticinového typu**. Z frakce 11-15 byl vyizolován **ethoxyheliangolid**. Pozdější přečišťování bylo uskutečněno pomocí HPLC (voda-methanol 20 : 80).

Poté bylo použito upravené extrakční metody s vodou a chloroformem. Byla snaha vyhnout se použití alkoholu. Byla provedena upravená extrakce: rostlina byla homogenizována ve vodě, filtrována a extrahována chloroformem. Surový extrakt byl čištěn pomocí TLC (dichlormethan-aceton-ethylacetát 5 : 4 : 1). Takto bylo dokázáno, že ethoxyheliangolid vznikl jen při ethanolové extrakci.<sup>15</sup>

### 2.1.2.4 Izolace argophyllinů A, B a heliangolidů typu niveusinu z listů *H. annuus* L. cv. *giganteus*

Chemickou analýzou (HPLC analýza) pryskyřičného obsahu mechanicky sbíraných glandulárních trichomů z povrchu listů slunečnice byla zjištěna existence šesti seskviterpenových laktonů. Ke známým heliangolidům **niveusinu C**, **15-hydroxy-3-**

**dehydrodesoxyfruticinu a argophyllinu B**, tři nové germakranolidy typu **niveusinu A** (**1-methoxy-4,5-dihydroniveusin A**, **1,2-anhydridoniveusin A**, **1,2-anhydrido-4,5-dihydroniveusin A**) byly izolovány a charakterizovány. Předchozí výzkum seskviterpenových laktonů ze slunečnice poskytl dvě dodatečné sloučeniny, **niveusin B** a **argophyllin A**.

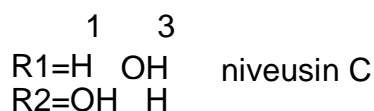
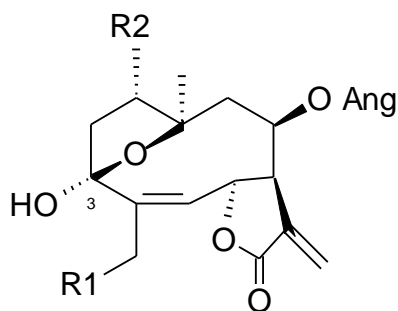
### **Rostlinný materiál:**

Hlavové glandulární trichomy byly sbírány z povrchu čerstvých, vzduchem čištěných listů *H. annuus* L. cv. giganteus.

### **Izolace:**

Seskviterpenové laktony slunečnice jsou lokalizovány v kutikulární vrstvě speciálního typu glandulárních trichomů na povrchu listu. Proto bylo také nutné upravit podmínky extrakce. Pro HPLC analýzu pryskyřičného obsahu bylo nejméně 10 trichomů inkubováno v methanolu. Po centrifugaci byla analyzována alikvotní část supernatantu a poskytla šest píků v HPLC elučním diagramu při vlnové délce 225 nm. TLC separace (dichlormethan-aceton-ethylacetát 5 : 4 : 1) téhož extraktu poskytla pět skvrn, které obsahovaly šest sloučenin, jak bylo prokázáno také HPLC. Použití dalších rozpouštědel (např. chloroform, dichlormethan, aceton, methylkyanid) pro extrakci trichomů nepřineslo žádné dodatečné sloučeniny.

Pro spektroskopické měření byly listy slunečnice (140 g) extrahovány dichlormethanem (3x200 ml, 30 min.) při pokojové teplotě. Filtrovaný extrakt byl odpařen ve vakuu a poskytl 1,8 g tmavě hnědé sirupovité hmoty. Extrakt byl rozpuštěn v dichlormethanu, adsorbován na silikagel 60 (10 g) a eluován ve skleněném filtru G<sub>4</sub> při sníženém tlaku. Byly získány frakce 1-4 (dichlormethan, 100 ml), frakce 5-10 (dichlormethan-methanol 19 : 1, 150 ml), frakce 11-12 (methanol 50 ml). Frakce 5-10 byly spojeny a odpařeny ve vakuu, rozpuštěny v methanolu a přečištěny pomocí HPLC.<sup>16</sup>



Obr.8: niveusin C

Seskviterpenové laktony jsou nízkomolekulární látky, jejich schopnost indukovat hypersenzitivitu pozdního typu je podmíněna přímým kontaktem s kůží. Jiná aplikace do organismu obvykle nevyvolává alergickou odezvu. Rozvoj kontaktní dermatitidy závisí individuálně na koncentraci laktonů v rostlině, na jejich senzibilizující kapacitě, četnosti a intenzitě aplikace i individuální dispozici člověka.

Senzibilizující schopnost seskviterpenových laktonů byla prokázána u řady druhů léčivých rostlin: *Helianthus annuus* – slunečnice roční (1,2-anhydrido-4,5-dehydroniveusin apod.)<sup>17</sup>

#### 2.1.2.5 Izolace leptokarpinu z listů *H. annuus* L. cv. Peredovick

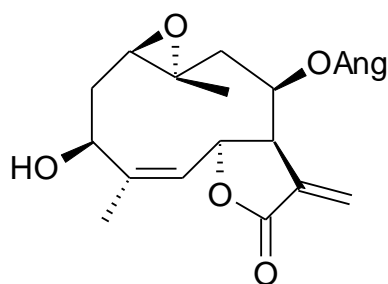
Dichlormethanový extrakt suchých listů *H. annuus* poskytl seskviterpenový lakton **leptokarpin**.

#### **Rostlinný materiál:**

Suché listy *Helianthus annuus* L cv. Peredovick

#### **Izolace:**

**Leptokarpin** byl získán stejnou metodou jako heliannany. Byl získán z frakce D pomocí HPLC.<sup>12</sup>



Obr.9: leptokarpin

### 2.1.3 Guajanolidy

#### 2.1.3.1 Izolace annuolidů A-E z listů *H. annuus* L. var SH-222

Ze středně polární frakce bylo izolováno pět guajanolidů: **annuolidy A-E**.

#### Rostlinný materiál:

Listy *H. annuus* L. var. SH-222

#### Izolace:

Čerstvé listy (6 kg) byly máčeny ve vodě po 24 hod při 25 °C ve tmě. Vodný extrakt byl reextrahován 8x0,5 l dichlormethanu pro každý litr vody. Kombinovaný extrakt byl sušen nad síranem sodným a odpařen ve vakuu. Bylo získáno 16 g surového extraktu, který byl dělen na sloupci silikagelu. Byl vymýván směsí n-hexan-ethylacetát stoupající polarity. Tak bylo získáno 170 frakcí po 50 ml, které byly redukovány na 17 frakcí. Frakce 8 byla dělena na silikagelu a poskytla **annuolidy A-E**.<sup>18</sup>

#### 2.1.3.2 Izolace annuolidu E z listů *H. annuus* L. cv. Peredovick

Dichlormethanový extrakt suchých listů *H. annuus* L. cv. Peredovick poskytl seskviterpenový lakton **annuolid E**.

#### Rostlinný materiál:

Suché listy *H. annuus* cv. Peredovick



### **Izolace:**

**Annuolid E** byl získán stejnou metodou jako heliannany. Tato sloučenina byla získána z frakce D pomocí HPLC.<sup>12</sup>

### **2.1.3.3 Izolace 8 $\beta$ -angeloiloxicumambranolidu z listů *H. annuus* L. cv. Peredovick**

#### **Rostlinný materiál:**

Suché listy *H. annuus* L. cv. Peredovick

#### **Izolace:**

Listy *H. annuus* byly extrahovány dichlormethanem. Surový extrakt byl dělen na sloupci silikagelu (flash chromatografií). Mobilní fází byla směs hexan-aceton stoupající polarity. Středně polární frakce poskytla **8 $\beta$ -angeloiloxicumambranolid**.<sup>14</sup>

### **2.1.4 Annuionony (apokarotenoidy)**

Mnoho apokarotenoidů, sloučeniny s méně než čtyřiceti uhlíkovými atomy, ale se strukturou jako karotenoidy, byly nalezeny v rostlinných esenciálních olejích a často souvisejí s vůní rostliny. Syntéza těchto sloučenin probíhá hlavně katabolismem karotenoidů.

#### **2.1.4.1 Izolace annuiononů A-H z listů *H. annuus* cv. Stella**

Polární biologicky aktivní frakce *Helianthus annuus* poskytla osm apokarotenoidů: **annuionony A-H** (annuionony jsou také řazeny mezi apokarotenoidy), dva z nich izolované poprvé jako přírodní produkty (**annuionony F a G**).

#### **Rostlinný materiál:**

Čerstvé listy *H. annuus* cv. Stella

### **Izolace:**

Čerstvé listy *H. annuus* byly extrahovány vodou při pokojové teplotě po 24 hod. Tento vodný extrakt byl reextrahován methylenchloridem a ethylacetátem. Odlišné frakce, které byly získány, byly prozkoumány. Frakce, které měly vyšší hladinu biologické aktivity, byly děleny na sloupci silikagelu, mobilní fází byla směs hexan-ethylacetát stoupající polarity. Získané frakce byly testovány pomocí testu s etiolizovanými pšeničnými koleoptily.<sup>19</sup>

#### **2.1.4.2 Izolace annuiononu H z listů *H. annuus* L. cv. Suncross-42**

Z vodného extraktu listů slunečnice byl izolován biologicky aktivní **annuionon H**.

### **Rostlinný materiál:**

Listy *H. annuus* L. cv. Suncross-42 byly sbírány během třetí vývojové etapy (rostlina 1 m vysoká s květy, 1 měsíc před sklizní. Listy byly před extrakcí sušeny a rozdrobněny.

### **Izolace:**

Suché listy byly extrahovány vodou (listy-voda 1 : 3) po 24 hod při pokojové teplotě. Vodný extrakt byl reextrahován dichlormethanem. Dichlormethanová frakce byla dělena pomocí HPLC. Takto byl vyizolován **annuionon H**. Strukturální objasnění bylo provedeno pomocí <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektrálních studií.<sup>20</sup>

#### **2.1.4.3 Izolace annuiononů A-C a helinorbisabonu z listů *H. annuus* var. SH-222 a var. VYP**

Biologicky aktivní norseskviterpeny byly izolovány také z *Helianthus annuus* var. SH-222 a var. VYP (tři nové typy bisnorseskviterpenových laktonů **annuionony A-C** a nový norbisabolen **helinorbisabon**).

### **Rostlinný materiál:**

Listy *Helianthus annuus* L. var. SH-222 a var. VYP byly sbírány v září během třetí rostlinné vývojové etapy (rostlina 1,2 m vysoká s květy, měsíc před sklizní).

### Izolace:

Pro izolaci **annuiononů A-C** a **helinorbisabonu** byl použit stejný postup jako při izolaci **annuolidů A-E**. Tyto sloučeniny byly získány ze středně polární frakce. **Annuionon A** byl izolován jako bezbarvý olej. **Annuionony B a C** jsou také bezbarvé oleje. **Helinorbisabon** je nažloutlý olej.<sup>21</sup>

#### 2.1.4.4 Izolace annuiononu E z listů *H. annuus* L. cv. Peredovick

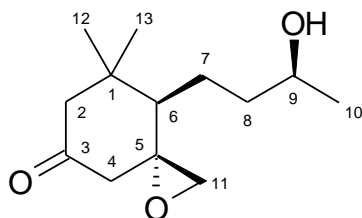
Také dichlormethanový extrakt suchých listů *H. annuus* L. cv. Peredovick poskytl bisnorseskviterpen **annuionon E**.

### Rostlinný materiál:

Suché listy *H. annuus* cv. Peredovick

### Izolace:

Pro izolaci **annuiononu E** byl použit stejný postup jako pro izolaci heliannanů. Tento annuionon byl vyizolován z frakce D.<sup>12</sup>



Obr.10: annuionon E

#### 2.1.4.5 Izolace dehydrovomifoliolu z listů *H. annuus* L. cv. Peredovick

### Rostlinný materiál:

Suché listy *H. annuus* L. cv. Peredovick

### Izolace:

Listy *H. annuus* byly extrahovány dichlormethanem. Surový extrakt byl dělen na sloupci silikagelu (flash chromatografií). Mobilní fází byla směs hexan-aceton

stoupající polarity. Středně polární frakce poskytla bisnorseskviterpen (+)-**dehydrovomifoliol**.<sup>14</sup>

### 2.1.5 Heliespirony (spiroterpeny)

#### 2.1.5.1 Izolace heliespironů z listů *H. annuus* cv. Atila

Ze středně polární frakce vodného extraktu listů *H. annuus* byly vyizolovány tři sloučeniny s heliespironovým skeletem: **heliespirony C, D a E**. Struktura **heliespironu C**, který má potenciální alelopatickou aktivitu, byla objasněna pomocí homo- a heteronukleární 2D-NMR spektroskopie a krystalografických dat. **Heliespirony D a E** jsou zatím stále ještě studovány. Již dříve byly ze slunečnice vyizolovány **heliespirony A a B**.

#### Rostlinný materiál:

Listy *H. annuus* cv. Atila

#### Izolace:

Listy (25 kg) byly máčeny ve vodě (voda-rostlina 1 : 3) po 24 hod, při 25 °C ve tmě. Vodná fáze byla extrahována 0,5 l dichlormethanu na 1 l vody. Kombinovaný extrakt byl sušen nad síranem sodným a odpařen ve vakuu. Bylo získáno 11,5 g surového extraktu. Ten byl dělen na sloupci silikagelu za použití hexanu, ethyletheru, ethylacetátu, methanolu, vody. Byly získány frakce A1-A6. Všechny frakce byly testovány pomocí testu s koleoptily. Největší aktivitu vykazovaly frakce A2 a A3. Biologicky aktivní frakce A3 byla dělena na silikagelu a eluována směsí chloroform-aceton (9 : 1). Po HPLC separaci byly získány **heliespirony C, D a E**.<sup>22</sup>

## 2.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou deriváty fenylochromanu. Základem je chroman substituovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany). Vyskytují se jen v rostlinné říši, a to nejčastěji flavany. Hromadí se v listech, květech a plodech. Jsou typické především pro čeleď Fabaceae. Jsou to sloučeniny, které vznikají oběma hlavními cestami: cesta acetátová i šikimová.<sup>23</sup>

Také biologicky aktivní flavonoidy byly vyizolovány z listů slunečnice.

### **Rostlinný materiál:**

Listy *Helianthus annuus* L. var. VYP

### **Izolace:**

Listy (1,7 kg) byly máčeny ve vodě (rostlina-rozpouštědlo 1 : 3) po 24 hod, při teplotě 25 °C a ve tmě. Vodný extrakt byl reextrahován 8x1,0 l dichlormethanu pro každý 1,2 l vody. Kombinovaný extrakt byl sušen nad síranem sodným a odpařen ve vakuu. Takto bylo získáno 24 g surového extraktu, který byl dělen na sloupci silikagelu, mobilní fází byla směs n-hexan-ethylacetát stoupající polarity. Bylo získáno 192 frakcí po 50 ml, které byly redukovány na 30 frakcí po srovnání pomocí TLC. Středně polární frakce byla chromatograficky dělena na silikagelu a eluována hexan-aceton (7 : 3) a hexan-aceton (6 : 4) a pak znovu dělena pomocí HPLC, kde mobilní fází byla směs hexan-aceton (6 : 4). Takto byly získány: **tambulin** (4 mg), **kukulkanin B** (6 mg), **heliannon A** (5 mg), **heliannon B** (5 mg), **heliannon C** (3 mg).

#### ***2.2.1 Flavanony***

Mezi flavanony patří **heliannon B** a **C**.

#### ***2.2.2 Chalkony***

**Kukulkanin B**

#### ***2.2.3 Flavonoly***

**Tambulin**<sup>24</sup>

## **3. Biologická aktivita obsahových látek**

### **3.1 Alelopatická aktivita**

#### **3.1.1 Úvod**

Neuvážené užití herbicidů vyústilo ve vzrůstající incidenci rezistence plevelu k některým skupinám herbicidů. Studie alelopatických interakcí může pomoci překonat takovéto problémy skrze rozvoj variet majících větší schopnost zničit plevel. Užitím přírodních fyto toxinů z rostlin nebo mikrobů jako herbicidů a užitím syntetických derivátů přírodních produktů jako herbicidů. Rostliny mají svůj vlastní obranný mechanismus a alelochemikálie jsou ve skutečnosti přírodními herbicidy. Jedna cesta k užití alelopatie v zemědělství je skrze izolaci, identifikaci a syntézu aktivních sloučenin z alelopatických rostlinných druhů.

Byla zahájena studie alelopatické aktivity u slunečnice (u různých variet). Výsledkem těchto studií byl popis a charakterizace, kromě jednoduchých fenolů, triterpenů a steroidů, seskviterpenových laktonů, hlavně germakranolidů a jednoduchých guajanolidů. Dále byly izolovány a popsány flavonoidy, diterpeny a nová skupina seskviterpenů označována jako heliannuoly. Slunečnicové druhy jsou alelopatické, např. *Helianthus rigidus* vykazuje autotoxicitu. *Helianthus annuus* má velký alelopatický potenciál a inhibuje růst plevelových sazenic.<sup>21</sup>

Nejsamozřejmější je přímé užití alelochemikálií jako nových herbicidů, které mají nový cíl působení.

Hlavním problémem přímého užití alelopatických jednotek jako herbicidů je nízké množství sloučenin obvykle získaných (s výjimkou těch, které pocházejí z bakteriálních kultur, které mohou být kontinuálně produkovány).

Alelopatická aktivita jednotlivých sloučenin byla zkoumána pomocí biologického testu s etiolizovanými pšeničnými koleoptily a biologického testu s Petriho miskami.<sup>10</sup>

### 3.1.2 Biologické testy

#### 3.1.2.1 Biologický test s etiolizovanými pšeničnými koleoptily

##### **Postup A:**

Semena pšenice (*Triticum aestivum* L. cv. Cortex) byla naseta do Petriho misky. Rostla ve tmě po čtyři dny při teplotě 24 °C. Etiolizované sazenice byly vyjmuty z misky a byly vybrány sazenice stejné velikosti. Vybrané sazenice byly umístěny ve Van der Wij guillotine a horní 2 mm byly odstraněny. Další 4 mm byly využity pro test. Byly ponechány ve vodném výživném pufru na jednu hodinu k synchronizaci růstu. Matečný roztok čistých sloučenin byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) a naředěn k náležité koncentraci. Fosfáto-citrátovým pufrem byla hodnota pH upravena na 5,6. Konečná maximální koncentrace DMSO byla 0,5 %. Následující koncentrace byly získány naředěním. Test byl prováděn v 10ml zkumavkách: 5 koleoptilů bylo přidáno do každé zkumavky obsahující 2 ml testovaného roztoku. Prováděly se tři pokusy pro každý testovaný roztok. Zkumavky byly vloženy do centrifugy a točeny po 24 hod, při 22 °C ve tmě. Všechny manipulace byly prováděny pod zeleným bezpečnostním světlem. Koleoptily byly měřeny digitalizací jejich fotografických obrazů a data byla statisticky vyhodnocena.<sup>10</sup>

##### **Postup B:**

Semeno pšenice (*Triticum aestivum* L. cv. Duro) bylo naseto do Petriho misky (průměr 15 cm). Bylo zavlažováno vodou a rostlo ve tmě, při 22 °C po 3 dny. Kořeny byly odstraněny a také horní 2 mm byly odstříhány a odstraněny. Další 4 mm byly využity pro test. Sloučeniny byly předrozpuštěny v DMSO a zředěny k finální koncentraci pro test s maximem jedné desetiny procenta DMSO. Byla prováděna také paralelní kontrola. Surové extrakty, frakce nebo čisté sloučeniny, které byly použity pro testování biologické aktivity, byly dány do zkumavek. Test byl prováděn duplicitně. Fosfáto-citrátový pufr (2 ml) byl přidán do každé zkumavky, bylo udržováno pH 5,6. Následovalo přemístění pěti koleoptilů do každé zkumavky, zkumavky rotovaly v centrifuze po 24 hod při 22 °C ve tmě. Data jsou prezentována jako procenta rozdílu od kontroly. Nula představuje kontrolu, pozitivní hodnoty představují stimulaci studovaných parametrů, negativní hodnoty představují inhibici.<sup>12</sup>

### 3.1.2.2 Biologický test s Petriho miskami

Byla použita semena hlávkového salátu (*Lactuca sativa* L. cv. Roman), řeřichy (*Lepidium sativum* L. cv. Común) a cibule (*Allium cepa* L. cv. Valenciana), pšenice a ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Všechna poškozená a velikostně nevyhovující semena byla odstraněna a pro test byla vybrána jednotná semena. Test byl uskutečněn v Petriho misce, která měla průměr 9 cm. 25 semen z každého druhu bylo umístěno do misky, s výjimkou *Hordeum vulgare* (10 semen do misky) s 5 ml testovaného roztoku a inkubováno ve tmě při 25 °C. Test byl prováděn ve čtyřech kopiích u každé koncentrace. Čas klíčení a růstu se lišil pro každý rostlinný druh. *Lepidium sativum* – 3 dny, *Lactuca sativa* a *Hordeum vulgare* – 5 dní a *Allium cepa* 7 dní. Matečný roztok pro test (0,01 M) byl připraven s použitím DMSO a potom naředěn na 0,0001 M použitím 10 mM MES (2-(N-morfolino)ethansulfonové kyseliny). Následující roztok byl získán naředěním udržující jednoprocenní koncentraci DMSO. Byla prováděna paralelní kontrola. Všechny pH hodnoty byly upraveny na 6 před testem. Všechny produkty byly přečištěny před testem pomocí HPLC. Minimální stupeň čistoty byl 99 %. Data byla prezentována v podobě, kdy nula představovala kontrolu, pozitivní hodnoty představovaly stimulaci a negativní hodnoty inhibici.<sup>10</sup>

### 3.1.3 Heliannany, helibisabonoly

Byla odhalena aktivita heliannuolů izolovaných ze slunečnice použitím testu s Petriho miskami. Protože nebyl žádný přístup k vzorku heliannanu, který byl vyizolován z vodních organismů, studie byla limitována na heliannuoly, které byly izolovány pracovníky této studie. Pracovníci měli přístup k několika možným biogenetickým prekurzorům heliannuolů (**helibisabonol A**), izolovaných a později syntetizovaných pracovníky studie, které byly také zahrnuty v těchto studiích. Nedávno byl upraven další biologický test založený na použití etiolizovaných pšeničných koleoptilů (postup A).

Byl sledován vliv heterocyklu na klíčení hlávkového salátu. Bylo pozorováno jak heterocyklické sloučeniny **heliannuol A** a **C** jsou aktivní, zatímco sloučeniny s otevřeným kruhem **helibisabonol A** a **B** jsou neaktivní. Také byl pozorován vliv velikosti kruhu na klíčení hlávkového salátu. Byl sledován vztah mezi aktivitou a velikostí kruhu.



- 1) Inhibující vliv na růst byl pozorován obvykle u dvouděložných - hlávkový salát (*Lactuca sativa*) a řeřichy (*Lepidium sativum*). Na druhé straně, růst jednoděložných - ječmene (*Hordeum vulgare*) a cibule (*Allium cepa*) byl také inhibován.
- 2) Přítomnost heterocyklického kruhu je rozhodující pro aktivitu. Mnoho heliannuolů je aktivních na dvouděložné a/nebo jednoděložné. Jsou také aktivní v testu s etiolizovanými pšeničnými koleoptily. Avšak když byly zkoušeny odpovídající prekurzory s otevřeným kruhem **helibisabonol A** a **B** a další příbuzné sloučeniny získané syntézou, byly shledány neaktivní v testu s Petriho miskami a vykazovaly také nižší aktivitu v testu s etiolizovanými pšeničnými koleoptily
- 3) Velikost kruhu heterocyklu je klíčovým faktorem: v testu s Petriho miskami osmičlenný kruh měl větší aktivitu než sedmičlenný. Toto také platí v testu s pšeničnými koleoptily.
- 4) Pozice hydroxylové skupiny také ovlivňuje aktivitu. Ty sloučeniny s hydroxylovou skupinou umístěnou na heterocyklickém kruhu (7,11-helinannuoly a 8,11-heliannuoly) jsou více aktivní než ty s hydroxylovou skupinou na isopropylovém řetězci (7,10-heliannuoly).
- 5) Pokud srovnáme 8,11-heliannuoly s 7,11-heliannuoly, přítomnost vinylového řetězce také zesiluje aktivitu.
- 6) Konečně stereochemie chirálních center je velmi důležitá pro biologickou aktivitu. Srovnání efektu **heliannuolu G** a jeho epimeru na C-8 **heliannuolu H** ukázalo velkou odlišnost v aktivitě u těchto sloučenin.<sup>10</sup>

Seskviterpen **heliannuol A**, **D** a **helibisabonol A** významně inhibují růst etiolizovaných pšeničných koleoptilů.<sup>12</sup>

### 3.1.4 Germakranolidy

Biologická aktivita heliangolidů byla určena pomocí testu s použitím *Avena sativa* a byly provedeny antimikrobiální testy. Byla prokázána lineární redukce růstu v testu s pšeničnými koleoptily. Antimikrobiální aktivita byla testována proti bakteriím a

houbám. **Germakranolid tifruticinového** typu byl nejsilnějším inhibitorem proti bakteriím, zatímco **ethoxyheliangolid** byl více aktivní proti houbám než **niveusin B**.<sup>15</sup>

**Helivypolid G** inhibuje růst pšeničných koleoptilů.<sup>13</sup> **Helivypolidy D a E** mají inhibiční vliv na klíčení a růst stonku a kořene u *Lactuca sativa* cv. Roman.<sup>14</sup>

**Leptokarpin** inhibuje růst pšeničných koleoptilů. Aktivita **leptokarpinu** je dána flexibilitou jeho molekuly. Bylo uveřejněno, že rozdílné prostorové uspořádání, které molekuly mohou zaujmout, hraje důležitou roli v aktivitě, stejně tak přítomnost dvou elektrofilních funkcí:  $\alpha$ -methylen- $\gamma$ -laktón a oxyranový kruh.<sup>12</sup>

### 3.1.5 Guajanolidy

U série vodných roztoků **annuolidů A-E** v koncentracích  $10^{-4}$  -  $10^{-9}$  byl testován jejich efekt na klíčení a růst dvouděložných *Lactuca sativa* var. Nigra a jednoděložných *Hordeum vulgare*. Všech pět guajanolidů vykazovalo potenciální alelopatickou aktivitu.<sup>18</sup>

### 3.1.6 Annuionony

K odhadu alelopatické aktivity byl studován efekt izolovaných sloučenin v různých koncentracích ( $10^{-4}$  –  $10^{-9}$  M) na kořeny a výhonky *Lactuca sativa*, *Lepidium sativum*, *Allium cepa* a *Hordeum vulgare*. Nejvýznamnější efekt na dvouděložné druhy: *Lactuca sativa* a *Lepidium sativum* měl **annuionon B**, který stimuloval růst kořene řechy v nízkých koncentracích ( $10^{-8}$  M - 47%,  $10^{-9}$  M - 32 %). **Helinorbisabon** vykazoval silný inhibiční efekt na klíčení hlávkového salátu ve všech testovaných koncentracích. **Annuionon A** inhibuje klíčení *Allium cepa*, ale stimuluje růst kořene.

Všechny tyto sloučeniny vykazují významnou alelopatickou aktivitu proti jednoděložným rostlinám.<sup>21</sup>

Také **annuionon H** může být použit jako potenciální rostlinný růstový inhibitor. Tato sloučenina může sloužit jako vzor pro syntézu nových herbicidů s novým cílem působení.

Růst a tudíž suchá biomasa pěti testovaných plevelů byla významně redukována působením **annuiononu H** v různých koncentracích ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  M). Inhibující efekt je na dávce závislý: vzestup koncentrace znamená i vzestup fyto toxického efektu. Mezi pěti testovanými plevely *Phalaris minor* vykazoval vyšší toleranci. Široce rozšířené plevely, speciálně *Rumex dentatus* a *Chenopodium album* vykazovaly maximální ztrátu suché hmotnosti.<sup>20</sup>

### 3.1.7 Heliespiromy

Heliespiromy byly podrobeny testu s pšeničnými koleoptily. **Heliespiron C** vykazoval výraznou alelopatickou aktivitu.<sup>22</sup>

### 3.1.8 Flavonoidy

K odhadu alelopatické aktivity byl studován vliv série vodných roztoků izolovaných sloučenin v koncentracích  $10^{-4}$ - $10^{-9}$  M na růst stonku a kořene u semen *Lycopersicon esculentum* a *Hordeum vulgare*. **Tambulin** neovlivňoval klíčení ani růst kořene u obou druhů. Ale inhiboval růst stonku u obou druhů. **Kukulkanin B** a **heliannon A** mají velice podobnou strukturu, avšak jejich aktivita je rozdílná. **Heliannon A** inhibuje klíčení obou druhů a růst stonku *Hordeum vulgare*. **Kukulkanin B** inhibuje růst stonku *Lycopersicon esculentum*. **Heliannon B** a **C** inhibují růst stonku a kořene *Lycopersicon esculentum*. Flavonoidy vyizolované ze slunečnice tedy mají významnou alelopatickou aktivitu.<sup>24</sup>

## **3.2 Alternativní metoda stanovení akutní toxicity extraktů: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex***

### **3.2.1 Úvod**

Celé lidstvo a vlastně veškerý život na Zemi je zatížen expozicí nebezpečným látkám unikajícím do přírody. Jedná se i o látky, jejichž účinky na živé organismy jsou známy jen zčásti nebo vůbec ne. Stávající metody určování nebezpečnosti látek jsou nákladné a zdoluhavé. První, poměrně rychle získatelný údaj o nebezpečnosti látky poskytuje její akutní toxicita. Hledají se alternativní metody stanovení akutní toxicity, které by ušetřily čas, peníze, zvířata. Tyto metody by měly poskytovat adekvátní informace jako pokusy prováděné na obratlovcích.

Vzhledem k tomu, že studie prokázaly u různých skupin látek korelaci mezi akutní toxicitou měřenou různými způsoby a rozdělovacím koeficientem oktanol/voda, je možné předpokládat i korelaci dat stanovených na různých biologických objektech.

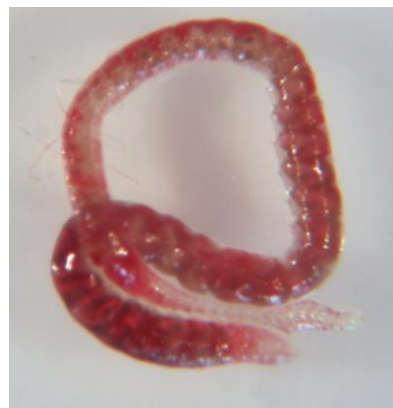
Bylo prokázáno, že existuje těsná korelace pro soubor alkoholů mezi LD<sub>50</sub> stanovenou na myších a EC<sub>50</sub> (zástava pohybu) stanovenou na nitěnkách, respektive IGC<sub>50</sub> (Inhibition Growth Concentration-koncentrace inhibující růst) stanovenou na prvocích. Hlavními přednostmi testu na červech *Tubifex tubifex* jsou jednoduchost, reprodukovatelnost, rychlost a finanční nenáročnost. Nitěnky jsou zmíněny jako objekt pro test toxicity odpadních vod i pro stanovení akutní toxicity jednotlivých chemikálií a chemických přípravků. Byly použity na přelomu 50. a 60. let ke stanovení toxicity pro zásadní práce, které vedly k predikčním metodám typu analýzy QSAR (Quantitative Structure –Activity Relationship, tj. kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou chemikálií a jejich biologickou účinností).<sup>25</sup>

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

Alternativní metody mají v toxikologii a xenobiochemii již dlouhou tradici, jsou využívány z etických důvodů, ale i informačních a ekonomických. Je vyžadováno nalezení takových metod a technik, které by poskytly hlavně rychle a s nižšími finančními náklady informace o nebezpečnosti nově produkovaných a popisovaných látkách. I velmi hrubá, aproximativní informace je často důležitá.<sup>26</sup>

### 3.2.2 Popis testovaného organismu

Nitěnka větší (*Tubifex tubifex*) náleží do kmenu kroužkovců (Annelida), třídy máloštětinatců (Oligochaeta). Jejich životním prostředím jsou toky se značným organickým zatížením, hojný výskyt nitěnek je možné očekávat při ústí kanalizace mlékáren, jatek atp. Vyskytuje se na dně koryt v bahně v kanálcích, které si slizem zpevňují, a to do hloubky okolo 10 cm, ojediněle i v hloubce 40 cm.



Obr.11: *Tubifex tubifex*

Stereomikroskop 20 : 1

Na místě výskytu najdeme vždy kolonii čítající tisíce jedinců.

Pohybují se kontrakcemi podkožní svaloviny. Jako opora jim slouží štětiny, kterými se zachytávají podkladu. Za potravu jim slouží detrit a bakterie, přičemž nevybírají jednotlivé části potravy, ale pohlcují veškerý materiál na dně. Nestravitelné zbytky pak vyvrhují análním otvorem. Za 24 hodin zpracují množství materiálu rovnající se 4-5násobku jejich váhy. Všichni máloštětinatci dýchají celým povrchem těla. U některých druhů je vyvinuto dýchání stěnou střevní, přičemž výměnu vody obstarávají svaly a obrvený epitel na konci střeva. Některé druhy (*Tubifex tubifex*) vydrží dlouhou dobu v prostředí bez kyslíku, a to až desítky dnů (25 dnů při teplotě 10-12 °C, při teplotě 2-3 °C přežívá ještě 30 % jedinců anoxii 48 dnů). Jako zdroj energie je při anoxybióze ve zvýšené míře využíván glykogen (podíl glykolýzy na metabolismu se zvýší 3-4krát).<sup>25</sup>

Trávicí soustava máloštětinatců může být diferencovaná na ústa, hltan, jícen, žláznatý žaludek, žvýkací žaludek, střevo a řitní otvor. Pro cévní soustavu je typická přítomnost tzv. pomocných (auxiliárních) srdcí vytvořených z obloukovitých postranních cév v přední části těla. Máloštětinatci jsou většinou hermafroditi.<sup>27</sup>

### 3.2.3 Chemikálie používané při testu

destilovaná voda, tetrahydrát chloridu manganatého, stanovovaná látka

### 3.2.4 Metodika testu

Test se používá pro testování biologické aktivity látek rozpustných ve vodě a na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové jsme jej používali i na testování mikrosuspenzí. Testuje se roztok zkoumané látky a roztok referenční látky. Pro ověření správnosti

testování byla stanovena akutní toxicita dihydrátu chloridu manganatého jeho průběžným testováním v letech 1992-1993. Kromě toho byla souběžně se stanovením akutní toxicity nasycených alkoholů tato sůl testována způsobem, který umožnil stanovit rozptyl výsledků jak při každém stanovení, tak mezi různými dny. Z celkového počtu 72 měření byla stanovena hodnota EC<sub>50</sub> pro zástavu pohybu červů a LC<sub>50</sub> pro letální koncentraci, včetně intervalů spolehlivosti pro hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$ :

$$\log EC_{50} = -0,845 \pm 0,0326 \text{ (mol/l)}$$

$$\log LC_{50} = -0,726 \pm 0,0390 \text{ (mol/l)}$$

Tyto hodnoty slouží jako vnitřní kontrola správnosti testování akutní toxicity pomocí červů *Tubifex tubifex*.

#### **3.2.4.1 Příprava roztoků referenční látky**

Navážka dihydrátu chloridu manganatého (asi 1,8000 g přesně) měla být rozpuštěna ve 25ml odměrné baňce. V laboratoři byl k dispozici pouze tetrahydrát chloridu manganatého, tudíž navážka byla přepočtena na 2,2003 g přibližně přesně a rozpuštěna ve 25 ml destilované vody. Takto získaný základní roztok byl naředěn následujícím způsobem:

8 ml základního roztoku + 2,1 ml destilované vody ... koncentrace 1

8 ml koncentrace 1 + 2,1 ml destilované vody ... koncentrace 2

Bylo připraveno 6 ředění.

#### **3.2.4.2 Příprava roztoků stanovované látky**

Byly připraveny 2 ml 10% roztoku extraktu (základní roztok). Základní roztok byl ředěn následujícím způsobem:

0,9 ml základního roztoku + 0,3 ml destilované vody ... koncentrace 1

0,9 ml koncentrace 1 + 0,3 ml destilované vody ... koncentrace 2

Ředění bylo prováděno, dokud nitěnky reagovaly na roztok.

#### **3.2.4.3 Pracovní postup**

Měření probíhalo při laboratorní teplotě (20-25 °C). Do Petriho misky byl napipetován 1 ml pracovního roztoku o nejvyšší koncentraci. Z kolonie bylo rychle, ale šetrně odděleno 6 stejně velkých nitěnek, byly osušeny na filtračním papíře a přeneseny do pracovního roztoku. Zde byly exponovány přesně 3 minuty. Sledovala se zástava pohybu. Stanovil se počet jedinců, u nichž došlo k zástavě pohybu.

Po 3 minutách byly nitěnky rychle vyjmuty, přeneseny do Petriho misky s pitnou vodou a po 1 minutě se stanovil počet nehybných jedinců. Použité nitěnky byly vyřazeny a pokus byl opakován, a to celkem třikrát. Pak se pokračovalo s nižšími koncentracemi až po dosažení koncentrace, která nezpůsobila žádnou zástavu pohybu nitěnek. Souběžně se stanovením akutní toxicity sledované látky se stanovovala i akutní toxicita referenční látky.

Výsledky pokusů byly statisticky vyhodnoceny podle metody Weilové.

#### 3.2.4.4 Výpočet

Výsledky jsou zatím počty nehybných jedinců nitěnek po expozici přesně tři minuty u každé koncentrace zkoumané látky. Z těchto hodnot je možné vypočítat  $EC_{50}$  podle následujícího vztahu:

$$\log EC_{50} = \log D_A + d (f + 1) \quad (1)$$

kde  $D_A$  je nejnižší koncentrace ze čtyř potřebných pro výpočet,  $f$  tabelovaná konstanta a  $d$  početní konstanta:

$$d = \log R \quad (2)$$

kde  $R$  je poměr mezi dvěma následujícími koncentracemi (vyšší koncentrace lomena nižší je vždy větší než jedna)

Interval spolehlivosti pro 95% pravděpodobnost je dán vztahem:

$$L_{1,2} = \log EC_{50} \pm 2 \sigma_f d \quad (3)$$

kde  $\sigma_f$  je tabelovaná konstanta.

Konstanty  $f$  jsou tabelovány pro různé sestavy odčítaných výsledků (nehybných jedinců). Obdobně lze získat hodnotu  $LC_{50}$ , kdy jsou k výpočtu použity počty nehybných jedinců odečtených přesně 1 minutu po přenesení červů z roztoku látky do čisté pitné vody.<sup>25</sup>

### 3.3 Stanovení antioxidační aktivity

#### 3.3.1 Úvod

Oxidativní procesy odehrávající se v živých organismech vedou k tvorbě vysoce reaktivních volných radikálů, které způsobují zrychlené stárnutí živých buněk a zvyšují riziko zhoršení zdraví včetně spuštění rakoviny. Antioxidanty jsou chemické látky schopné ukončit řetězové radikálové reakce. Má se za to, že přírodní antioxidanty mají velký význam v lidské stravě, zejména ve vztahu k prevenci rakoviny a kardiovaskulárních chorob. Proto jsou přírodní antioxidanty předmětem zvýšeného zájmu v biologickém výzkumu, medicíně a farmacii.<sup>28</sup>

Reaktivní kyslíkové formy jako superoxidový radikál, peroxid vodíku, hydroxylový radikál jsou v přírodě cytotoxické a poškozují proteiny, lipidy, pigmenty a DNA. Antioxidační enzymy jako superoxidodismutáza, kataláza, askorbátperoxidáza a glutathionreduktáza zametají reaktivní kyslíkové formy v rostlinách. Aktivita různých antioxidačních enzymů se zvyšuje jako odpověď na sucho a teplotu.

Antioxidační systémy jsou nutné pro živé organismy v aerobním prostředí. Kyslík je potenciálně toxický, může být transformován metabolickou aktivitou do reaktivnější formy jako je superoxid, peroxid vodíku, jednoduchý kyslík a hydroxylový radikál, které jsou obecně známy jako reaktivní kyslíkové druhy. Superoxiddismutáza, nutná složka ochranného mechanismu živých organismů, vykonává speciální ochranu v rostlinách pod nepříznivými životními podmínkami- ROS jsou tvořeny během mnoha stresových situací.<sup>29</sup>

Je několik detekčních systémů založených na oxidačně-redukční reakci, které jsou vhodné pro stanovení radikály-inaktivujících účinků antioxidantů přítomných v relativně komplexních vzorcích jako jsou rostlinné extrakty.

Sloučeniny vykazující se v oxidačních procesech inaktivací nebo zhášením volných radikálů jsou nazývány jako primární antioxidanty.

Tato metoda má umožnit výběr extraktů perspektivních z hlediska obsahu antioxidačních látek, které by poté bylo možno podrobněji zkoumat.

#### 3.3.2 Princip

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



Počítačem kontrolovaný systém sekvenční injekční analýzy vybavený spektrofotometrickým detektorem diodového pole je používán pro rychlé monitorování a vyhodnocení antioxidační aktivity biologických vzorků. Automatizovaná metoda je založena na známé reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálu (DPPH, **XV**) s antioxidanty v organických nebo vodně-organických médiích, kterou se odbarví roztok DPPH. Tento radikál je zhasen reakcí s antioxidační látkou, která je donorem vodíkového atomu. Pokles absorbance DPPH měřené při 525 nm souvisí s koncentrací antioxidantu v testovaném vzorku (v porovnání se slepým vzorkem provedeným s roztokem voda-ethanol 1 : 1 namísto s testovaným roztokem. Při použití vody jako nosného proudu byly píky DPPH ve vodno-ethanolovém roztoku nepravidelného tvaru. Výsledky byly nereprodukovatelné. Tento problém byl vyřešen nahrazením vody vodným roztokem 50% ethanolu) jako nosného proudu.

### **3.3.2.1 Příprava roztoků**

Pro přípravu vodných roztoků se používá vysoce čištěná deionizovaná voda. Ethanol 50% se před použitím v SIA systému odplyní v ultrazvukové lázni po dobu pěti minut. Roztok slouží jako slepý vzorek a v systému SIA jako nosný proud. Roztok DPPH v 50% ethanolu o koncentraci 0,0001 M se připraví rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% ethanolu ve 100ml odměrné baňce (k úplnému rozpuštění je třeba použít pětiminutové sonikace) a doplněním vodou na 100 ml. Po dalším pětiminutovém odvzdušnění se odměrná baňka zatemní zabalením do alobalu a uchovává v chladu. Roztok DPPH se připravuje vždy čerstvý, tedy v den měření. Měřený vzorek se připraví rozpuštěním lyofilizátu v 50% ethanolu, aby vznikla koncentrace 1 mg/ml, roztok se sonikuje po dobu jedné minuty a důkladně protřepe. Dále se postupným ředěním připraví koncentrace 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml tohoto vzorku. Nižší koncentrace jsou rovněž odplyněny v ultrazvukové lázni.

### **3.3.2.2 Přístroje**

Měření probíhá na systému pro sekvenční injekční analýzu (SIA) FIALab 3000, vybaveným pístovým čerpadlem s objemem 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, mísící cívkou, průtokovou detekční celou, detektorem, halogenovou lampou, spojovacími hadičkami. Zařízení je propojeno s počítačem a prostřednictvím programu FIALab for Windows 5.0 se celý proces analýzy řídí. Před začátkem měření se zapne

zdroj světla a lampa se nechá 5 minut žhavit, aby byl světelný paprsek konstantní intenzity.

Technika SIA používá princip, jehož charakteristickým rysem jsou oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně (jednorázově) aspirovány do jednokanálového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je dopraven do detektoru, tím je jeden cyklus ukončen. V tomto jednoduchém případě je získán výsledný analytický signál ve formě píku, v podstatě se jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem.

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

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

$$\frac{C_{\text{prům. vzorku}}}{C_{\text{prům. DPPH}}} \cdot 100 = X$$
$$100 - X^{28}$$

## **4.Extrakční, separační a strukturně analytické postupy**

### **Macerace**

Macerace je představována jednostupňovou nebo několikanásobnou extrakcí drogy za protřepávání nebo míchání, které má být v průběhu předepsaného času dostatečně intenzivní. Provádí se v dobře uzavřených, před světlem chráněných nádobách. Směs se po uplynutí doby (několika dnech) kolíruje a droga vylisuje. Macerace patří mezi diskontinuální extrakce.

### **Filtrace**

Filtrace je jednou z nejběžnějších operací, v jejím průběhu dochází k oddělování pevné fáze od fází ostatních pomocí propustného materiálu, který pevnou fázi zachycuje a dovoluje vstup fází ostatním. Filtrace má být kromě účinnosti dostatečně rychlá, nemá s ní být spojena zbytečná ztráta filtrovaného materiálu, a proto je třeba vždy uvážlivě přistupovat k volbě velikosti zařízení. Filtrační rychlost je přímo úměrná hydrostatickému tlaku kapaliny, je tedy účelné udržovat na filtru hladinu v optimální výši.

### **Chromatografie**

Chromatografie je fyzikálně-chemický separační proces, používaný k dělení směsi látek na jednotlivé složky. V jeho průběhu se tyto složky (anebo alespoň některá z nich) pohybují nestejněměrně v systému dvou fází: stacionární (adsorbent) a mobilní (rozpouštědlo, eluent). Má tři základní fáze: nanesení vzorku, dělicí proces a detekci. Podle metody separačního procesu lze chromatografii rozdělit na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou a afinitní. Chromatografii lze také rozdělit podle uspořádání aparatury na kolonovou a v plošném uspořádání.

### **Tenkvrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)**

Dělení směsi látek probíhá na základě kapilárního nasávání rozpouštědla stacionární fází, protože deska je svou dolní hranou ponořena do eluční soustavy v chromatografické nádobě. Přitom se uplatňují podle povahy sorbetu a složení mobilní fáze všechny známé principy chromatografického dělení a to buď každý sám nebo ve vzájemné kombinaci. Tento typ umožňuje výkonné dělení.

### **Kolonová chromatografie**

Při kolonové pracovní metodice se směs látek, určená k dělení, vnese vhodným způsobem na adsorbent v chromatografické trubici, na kolonu se vlévá eluent, který z kolony vytéká (a obsahuje komponenty dělené směsi), nazývá se eluát a jímá se po frakcích konstantního objemu.<sup>30</sup>

## **IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY**

# **1. Všeobecné postupy**

## **1.1 Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii**

Silikagel L 0,1 – 0,2 mm (LACHEMA) byl 4 hod aktivován v sušárně při 160 °C ve vrstvě menší než 2 cm. Po vychladnutí byl deaktivován na 12 % obsahu vody.

## **1.2 Příprava roztěru**

Extrakt, který měl být nanesen na kolonu, byl rozpuštěn v rozpouštědle, ve kterém se nejlépe rozpouští. Do odpařovací misky se navážilo potřebné množství silikagelu. Miska se umístila na vodní lázeň a na silikagel se nalilo malé množství rozpuštěného extraktu. Silikagel se míchal až do odpaření rozpouštědla z extraktu. Tímto způsobem se pokračovalo až do úplného odpaření rozpouštědla z extraktu. Tak byl získán silikagel nasycený extraktem a ten se nanášel na kolonu.

## **1.3 Sloupcová chromatografie**

Chromatografická kolona byla připravena nalitím suspenze adsorbentu ve vhodném rozpouštědle do chromatografické kolony při současně mírně otevřeném odtoku. Po naplnění byl na hladinu nanesen suchý roztěr vzorku s adsorbentem. Sloupcová chromatografie byla prováděna způsobem stupňovité eluce.

## **1.4 Orientační tenkovrstvá chromatografie (TLC)**

Byla prováděna vzestupným způsobem v chromatografických komorách, které byly předem syceny parami eluční soustavy.

## **1.5 Odpařování frakcí**

Roztoky byly odpařovány za sníženého tlaku (cca 1,6 kPa) a teploty kolem 50 °C na vakuové rotační odparce.

## **2. Potřeby**

### **2.1 Rozpouštědla**

Aceton

Butanol (ButOH)

Dichlormethan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )

Ethanol (EtOH)

Hexan

Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ )

Methanol (MetOH)

Petrolether

Voda destilovaná

### **2.2 Chemikálie**

Acetanhydrid

Anilin

Fast Blue B salt

Glukoza

Hydroxid draselný (KOH)

Hydroxid sodný (NaOH)

Hydroxylamin chlorid

Chlorid manganatý - tetrahydrát

Chlorid železitý ( $\text{FeCl}_3$ )

Kyselina chlorovodíková

Kyselina octová

Kyselina sírová

Octan olovnatý

Uhličitan barnatý

Uhličitan draselný

Vanilin

## 2.3 Detekční činidla

### **D1: detekce na steroly, steroidy a triterpeny**

Liebermann-Burchardovo činidlo: acetanhydrid a kyselina sírová. Před použitím bylo opatrně za chlazení smícháno 5 ml acetanhydridu s 5 ml koncentrované kyseliny sírové a získaná směs opatrně přidána do 50 ml ochlazeného absolutního ethanolu. Chromatogram byl zahříván při teplotě 100 °C asi 7 min. a vyhodnocen pod UV světlem při vlnové délce 365 nm. Při pozitivní reakci vznikají fluoreskující skvrny.

### **D2: detekce na cukry, steroidy, terpeny**

Do roztoku 0,5 ml anisaldehydu v 50 ml kyseliny octové byl přidán 1 ml kyseliny sírové. Chromatogram byl zahříván na 100-105 °C než různě barevné skvrny dosáhly maximální intenzity.

### **D3: detekce na fenolické sloučeniny**

Fast Blue B salt

Postřikovací roztok A: čerstvě připravený 0,5% vodný roztok Fast Blue B salt

Postřikovací roztok B: 0,1 N hydroxid sodný

Chromatogram je nejprve postříkán postřikovacím roztokem A, po usušení chromatogramu postřikovacím roztokem B. Vznikají různě zbarvené skvrny.

### **D4: detekce na karboxylové kyseliny**

Schweppovo činidlo: glukóza a anilín

Roztok A: 10% vodný roztok glukózy

Roztok B: 10% ethanolový roztok anilínu

Činidlo bylo připraveno smícháním roztoků A a B (po 20 ml) a naředěno na 100 ml n-butanolem. Chromatogram byl zahříván po deset minut na 115 °C. Vznikají červené až hnědé skvrny.

### **D5: detekce na laktony**

Roztok A: byl připraven rozpuštěním 20 g chloridu hydroxylaminu v 50 ml vody a doplněním do 200 ml ethanolu.



Roztok B: byl připraven rozpuštěním 50 g hydroxidu draselného v minimálním množství vody a zředěním na 500 ml ethanolem.

Postřikovací roztok I : byl získán smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 1 : 2 a odfiltrováním vyloučeného chloridu draselného.

Postřikovací roztok II : byl získán rozpuštěním 10 g chloridu železitého ve 20 ml 35% HCl a protřepáním s 200 ml diethyletheru do vzniku homogenního roztoku.

K detekci byl použit nejprve postřikovací roztok I, po usušení chromatogramu pak postřikovací roztok II. Vznikají různě zbarvené skvrny.<sup>31</sup>

Pozn. Všechna detekční činidla byla připravována v množství, které bylo potřebné k dané detekci.

#### **D6: UV $\lambda=254$ nm**

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

#### **D7: UV $\lambda=365$ nm**

Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 365 nm. Pozitivní reakce se projevuje vznikem fluoreskujících skvrn různého zbarvení.

#### **D8: Vanilinové činidlo**

Činidlo bylo připraveno těsně před detekcí smísením roztoku 1% vanilinu v 95% EtOH s 98% kyselinou sírovou v poměru 10 : 1. Po postřiku činidlem byl chromatogram zahříván při teplotě 120 °C asi 7 min. Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě zbarvených skvrn.<sup>32</sup>

### **2.4 Vytváření soustav pro chromatografii**

S1: CHCl<sub>3</sub>-MetOH 99,5 : 0,5

S2: CHCl<sub>3</sub>-MetOH 95 : 5

S3: CHCl<sub>3</sub>-MetOH 9 : 1

S4: n-hexan-aceton 85 : 15

S5: n-hexan-aceton 1 : 1

## **2.5 Přístroje**

Digitální stopky Eurochron

Digitální váhy KERN 572-33

Digitální váhy analytické ADA

Mixér Asistent M 2600-600W

UV lampa Camag 254/366 nm

Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER 10P

Horkovzdušná sušárna HS 31A

Vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114

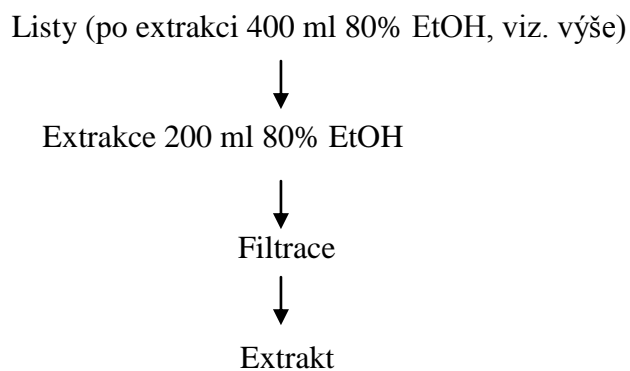
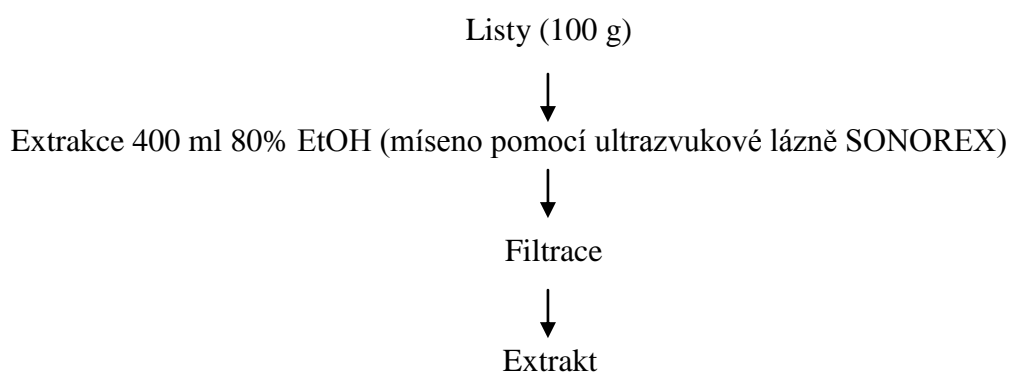
## 3. Izolace

### 3.1 Postup A

Prvním krokem této metody je odstranění chlorofylu a teprve potom pokus o izolaci látek.

#### 3.1.1 Extrakce listů

##### 3.1.1.1 Schéma extrakce listů



Oba extrakty byly spojeny.

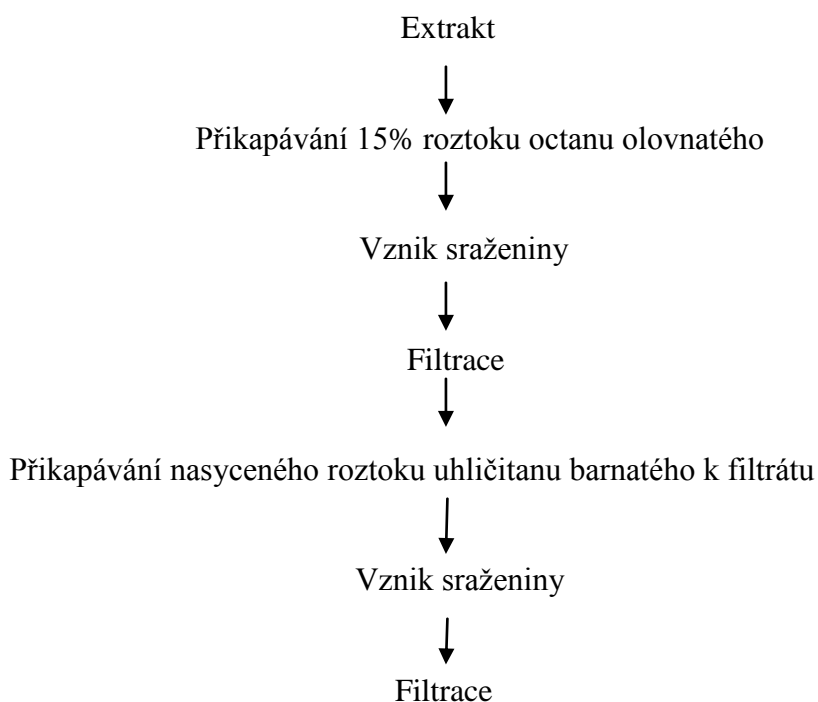
##### 3.1.1.2 Materiál

Materiálem pro izolaci byly sušené listy slunečnice roční (*Helianthus annuus*)

### 3.1.1.3 Postup

100 g na vzduchu sušených, rozdrobněných listů bylo extrahováno 400 ml 80% EtOH (30 minut v ultrazvukové lázni). Po extrakci byla provedena filtrace. Po filtraci se přidalo ke stejným listům 200 ml 80% ethanolu, následovala extrakce a filtrace. Oba filtráty byly spojeny (celkem 360 ml). Dalším krokem bylo odstranění chlorofylu z filtrátu.

### 3.1.2 Odstranění chlorofylu



#### 3.1.2.1 Postup

Nejprve bylo 3 ml extraktu podrobena 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, ale roztok zůstal stále ještě zelený, zežloutl až po filtraci. Pro orientaci byla provedena TLC, mobilní fází byla směs dichlormethan-ethylacetát 80 : 20 a chloroform-methanol 80 : 20.

Po vyzkoušení této metody s malým množstvím extraktu byla tato metoda provedena ještě jednou za použití 10 ml sumárního extraktu. Nejprve byly přidány tři kapky, pak ještě jednou tři kapky a nakonec pět kapek octanu olovnatého, po každém přidání octanu olovnatého vznikla sraženina, která byla odfiltrována. Na závěr bylo přidáno

k filtrátu velké množství uhličitanu barnatého, vznikla sraženina. Byla provedena filtrace. Sraženina byla z filtru smyta methanolem a uložena v ledničce pro další zpracování (viz. níže).

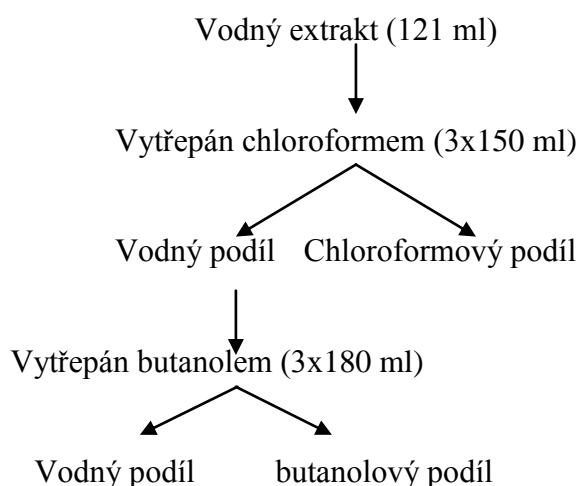
Celé množství sumárního extraktu (347 ml) bylo zbaveno chlorofylu stejnou metodou, která byla vyzkoušena nejprve s malým množstvím extraktu, tedy pomocí octanu olovnatého (435 kapek) a následně přidáním uhličitanu barnatého (100 ml + 800 kapek). Po přidání uhličitanu barnatého a přefiltrování bylo získáno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

### 3.1.3 Další zpracování chlorofylu-zbaveného extraktu

#### 3.1.3.1 Postup

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 se 180 ml butanolu a následně ještě 2x180 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 (po každém třepání byl použit nový uhličitan draselný). Nepodařilo se dostatečně oddělit vodnou a butanolovou vrstvu.

#### 3.1.3.2 Schéma zpracování extraktu



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

1,0693 g vodného podílu

### 3.1.4 Sloupcová chromatografie

#### 3.1.4.1 Sloupcová chromatografie butanolového podílu

0,8228 g butanolového podílu (spojen butanolový podíl s a bez obsahu vodného podílu) bylo děleno na sloupci silikagelu.

Délka kolony: 20 cm

Průměr kolony: 2,7 cm

Suchý extrakt byl rozpuštěn v chloroformu a na kolonu byl nanesen ve formě roztěru.

**Tab.1 Sloupcová chromatografie n-butanolového výtřepku na silikagelu**

<b>Spojené frakce</b>	<b>Frakce</b>	<b>Eluční soustava</b>	<b>Popis frakce</b>
<b>0 + 1 + 2</b>	<b>0</b>	Chloroform	oranžová
	<b>1</b>	1% methanol	
	<b>2</b>	5% methanol	
<b>3 + 4 + 5 + 6</b>	<b>3</b>	10% methanol	žlutooranžová
	<b>4</b>	20% methanol	
	<b>5</b>	20% methanol	
	<b>6</b>	20% methanol	
<b>7</b>	<b>7</b>	30% methanol	světle žlutá
<b>8</b>	<b>8</b>	40% methanol	tmavě žlutá
<b>9 + 10 + 11 + 12</b>	<b>9</b>	40% methanol	světle žlutá
	<b>10</b>	40% methanol	
	<b>11</b>	40% methanol	
	<b>12</b>	40% methanol	
<b>13 + 14 + 15</b>	<b>13</b>	50% methanol	oranžová + bílé krystalky
	<b>14</b>	50% methanol	
	<b>15</b>	60% methanol	
<b>16 + 17</b>	<b>16</b>	70% methanol	žlutá
	<b>17</b>	100% methanol	
<b>18</b>	<b>18</b>	EtOH	světle žlutá

Kvalitativní složení frakcí bylo monitorováno tenkovrstvou chromatografií, která sloužila jako vodítka pro jejich spojování. Všechny frakce obsahovaly hodně látek,

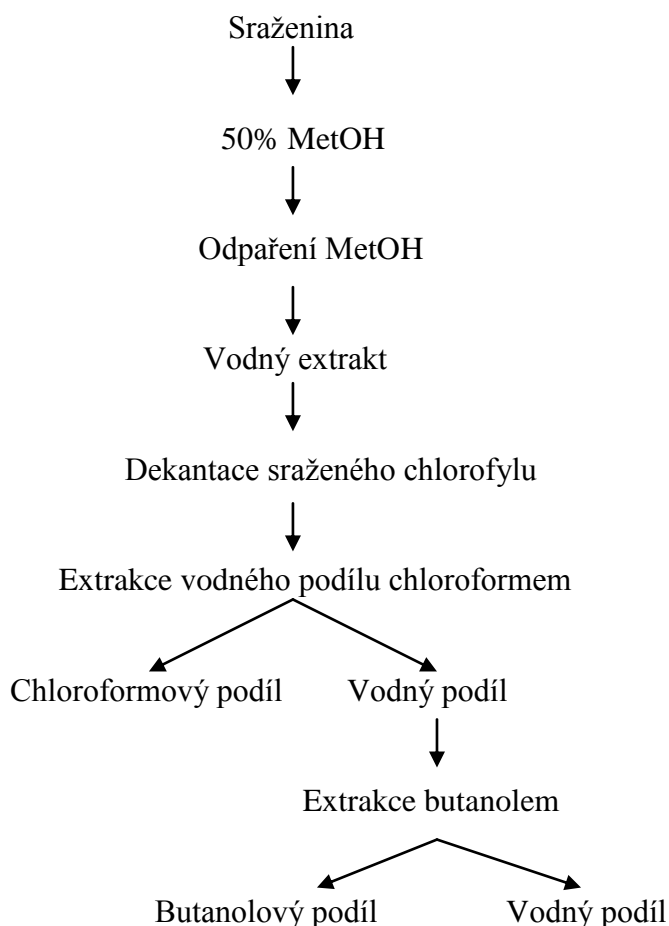
nepodařilo se nám tímto dělením získat frakci, která by byla čistá. Jednotlivé frakce byly získány ve velmi malém množství a tudíž se nemohlo pokračovat v jejich dalším dělení.

### 3.1.4.2 Sloupcová chromatografie vodného a chloroformového podílu

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 tudíž bylo k dispozici jen malé množství extraktu, které se nanášelo na kolonu.

### 3.1.5 Zpracování sraženiny z filtru

#### 3.1.5.1 Schéma zpracování sraženiny



### 3.1.5.2 Postup

Sraženina, která byla získána při odstraňování chlorofylu z 10 ml sumárního extraktu po přidání uhličitanu 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 výtřeppek. Vodný podíl byl vytřepáván s butanolem a předpokládalo 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 do ledničky. 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.

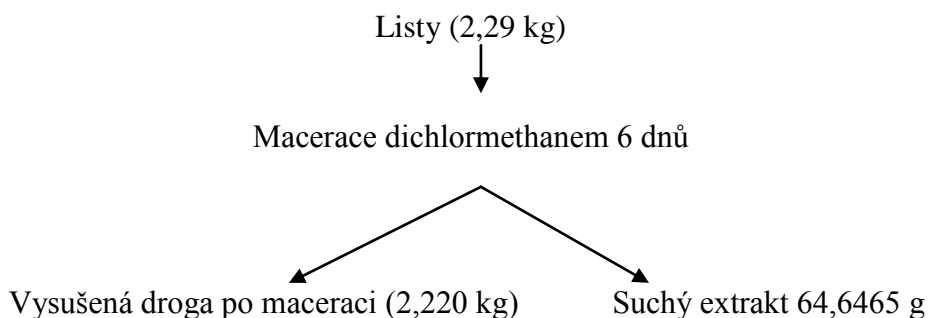
### 3.1.6 Závěr

Tento postup A byl dost náročný a zdoluhavý (odstraňování chlorofylu). Během odstraňování chlorofylu došlo k velkým ztrátám extraktu. Přesto se nepodařilo jeho úplné odstranění. Zbytky byly ještě odhaleny pomocí TLC. Díky velkým ztrátám extraktu nemohlo být provedeno další dělení frakcí z kolony, protože byly získány ve velmi malém množství. Postup A byl velmi pracný a zdoluhavý, proto byla snaha najít vhodnější postup.

## 3.2 Postup B

### 3.2.1 Extrakce listů

#### 3.2.1.1 Schéma extrakce listů



#### 3.2.1.2 Materiál



Materiálem pro izolaci byly sušené listy slunečnice roční (*Helianthus annuus*)

### 3.2.1.3 Postup

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.

### 3.2.2 Sloupcová chromatografie

#### 3.2.2.1 Orientační sloupcová chromatografie sumárního dichlormethanového extraktu na sloupci silikagelu

0,15 g suchého extraktu bylo děleno na sloupci silikagelu.

Délka kolony: 16 cm

Průměr kolony: 2 cm

Extrakt byl nanášen ve formě roztěru. Kolona byla vymývána n-hexanem (65 ml), pak bylo přidáno 10 % acetonu (135 ml), 20 % acetonu (105 ml). Bylo odebráno 21 frakcí, poté se kolona ucpala a nemohli jsme pokračovat v dalším odebrání frakcí.

**Tab.2 Sloupcová chromatografie sumárního dichlormethanového extraktu**

<b>Frakce</b>	<b>Eluční soustava</b>	<b>Popis frakce</b>
1	n-hexan	bezbarvá
2	n-hexan	bezbarvá
3	n-hexan	žlutá
4	n-hexan	žlutá
5	n-hexan	oranžová
6	n-hexan	světle oranžová
7	n-hexan	žlutá
8	10 % aceton	bezbarvá
9	10 % aceton	bezbarvá
10	10 % aceton	oranžová, amorfni hmota uvnitř
11	10 % aceton	zelená až černá
12	10 % aceton	zelená až černá
13	10 % aceton	zelená až černá
14	10 % aceton	světle zelená
15	20 % aceton	světle zelená

16	20 % aceton	žlutá
17	20 % aceton	žlutá
18	20 % aceton	nazelenalá
19	20 % aceton	zelená
20	20 % aceton	zelená
21	20 % aceton	zelená

Tato chromatografie byla provedena pro orientaci. Cílem bylo zjistit, jak se daný extrakt bude dělit.

### 3.2.2.2 Orientační sloupcová chromatografie sumárního dichlormethanového extraktu na sloupci Sephadexu

0,2 g extraktu bylo děleno na sloupci Sephadexu.

Délka kolony: 40 cm

Průměr kolony: 2,5 cm

Sloupec Sephadexu: 32 cm

Kolona byla vymývána 80% EtOH (180 ml). Bylo odebráno 12 frakcí. Na základě TLC byly spojeny frakce: 2 + 3

4 + 5

6 + 7

**Tab.3 Sloupcová chromatografie sumárního dichlormethanového extraktu**

Spojené frakce	Frakce	Eluční soustava	Popis frakce
1	1	EtOH 80 %	slabě zelená
2 + 3	2	EtOH 80 %	světle zelená
	3	EtOH 80 %	světle zelená
4 + 5	4	EtOH 80 %	zelená
	5	EtOH 80 %	zelená
6 + 7	6	EtOH 80 %	zelená
	7	EtOH 80 %	zelená
8	8	EtOH 80 %	slabě zelená
9	9	EtOH 80 %	slabě zelená
10	10	EtOH 80 %	slabě zelená
11	11	EtOH 80 %	bezbarvá
12	12	EtOH 80 %	bezbarvá

Extrakt se na této koloně nedělil.

### 3.2.2.3 Sloupcová chromatografie sumárního dichlormethanového extraktu

18,83 g extraktu bylo děleno na sloupci silikagelu. Extrakt byl nanášen ve formě roztěru. Extrakt byl rozpuštěn v n-hexanu a byl připraven roztěr (58 g).

Délka kolony: 27 cm

Průměr kolony: 7,5 cm

Počet kapek za minutu: 132

Kolona byla vymývána n-hexanem a postupně byl přidáván aceton:

n-hexan:	4000 ml
n-hexan-aceton 3 : 1	2000 ml
n-hexan-aceton 1 : 1	1750 ml
n-hexan-aceton 1 : 3	3000 ml
100% aceton	2000 ml
95% ethanol	1500 ml

Bylo odebráno 16 frakcí. Spojování frakcí probíhalo na základě TLC.

**Tab.4 Sloupcová chromatografie sumárního extraktu**

Spojené frakce	Frakce	Eluční soustava	Popis frakce
0	0	n-hexan	nažloutlá
1	1	n-hexan	oranžová
2a + 2b	2	n-hexan	červená, tmavé kousky
3	3	n-hexan	oranžová, tmavé kousky
4	4	n-hexan	oranžová
5	5	aceton 25 %	světle žlutá, amorf. hmota
6	6	aceton 25 %	světle žlutá, amorf. hmota
7	7	aceton 25 %	černá
8 + 9 + 10 + 11	8	aceton 25 %	černá
	9	aceton 50 %	tmavě zelená
	10	aceton 50 %	zelenočerná
	11	aceton 50 %	hnědá
12 + 13	12	aceton 75 %	tmavě zelená, bílé kousky
	13	aceton 100 %	černá
14	14	EtOH 95 %	hnědá

Kvalitativní složení frakcí bylo monitorováno tenkovrstvou chromatografií, která sloužila jako vodítko pro jejich spojování:

Frakce: 0-6 (chromatogram č.1, č.2)

Soustava: S4

Komora: nasycená

Vyvíjení: 1x

Detekce: nejprve D8, pak D6 (chromatogram č.1)

nejprve D8, pak D7 (chromatogram č.2)

Frakce: 7-13 (chromatogram č.3, č.4)

Soustava: S3

Komora: nasycená

Vyvíjení: 1x

Detekce: nejprve D8, pak D6 (chromatogram č.3)

nejprve D8, pak D7 (chromatogram č.4)

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

Dalším krokem byla identifikace bílé amorfni hmoty, která byla přítomna ve frakcích 5 a 6. Předpokládali jsme, že je to kyselina *ent*-kaur-16-en-19-ová<sup>33</sup>, kterou vyizolovali kolegové z květů slunečnice (na pohled to byly téměř identické hmoty). Byla provedena TLC, kde jsme nanесли frakce 5, 6 a standard kyseliny kaurenové (chromatogram č.5). Mobilní fázi byla směs chloroform-methanol 95 : 5. Detekce byla provedena vanilinovým činidlem. Avšak náš předpoklad nebyl potvrzen. Proto byly frakce 5 a 6 poslány na GC/MS analýzu (záznam viz. přílohy).

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 kyselinu 8-methyldekanovou, kyselinu olejovou, kyselinu eikosanovou, kyselinu dokosanovou, kyselinu hemikosanovou, kyselinu heptakosanovou, alifatický uhlovodík, PUFA (polynenasycené mastné kyseliny).

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)

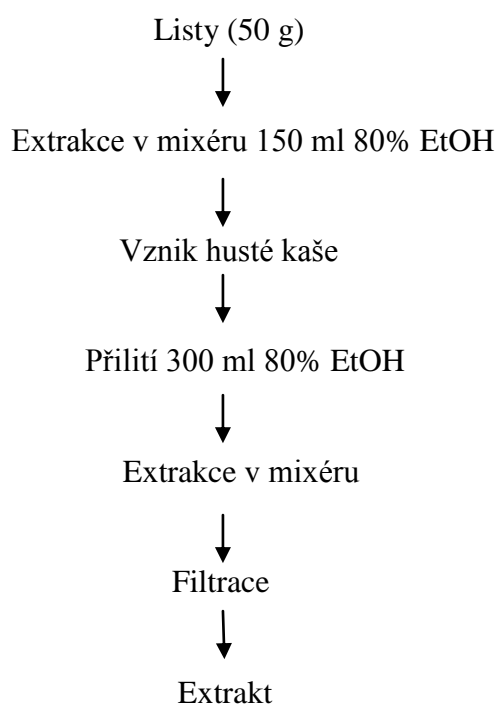
Frakce C: 7 (chlorofylová frakce: 8,92 g)

Frakce D: 8 + 9 + 10 + 11 (obsah mezifáze, 1,6012 g)

Frakce E: 12 + 13 (0,4079 g)

### 3.2.3 Extrakce listů v mixéru

#### 3.2.3.1 Schéma extrakce



#### 3.2.3.2 Materiál

Materiálem pro extrakci byly vysušené listy slunečnice roční po předchozí extrakci dichlormethanem.

#### 3.2.3.3 Postup

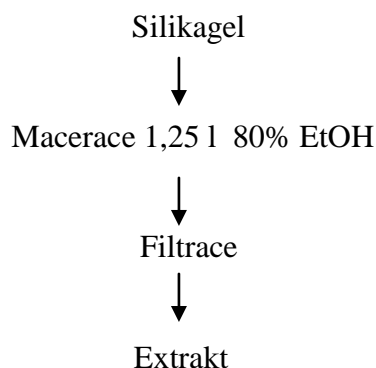
Vysušené listy po předchozí extrakci dichlormethanem byly reextrahovány EtOH v mixéru. 50 g listů bylo vloženo do mixéru a zalito 150 ml 80% EtOH. Extrakce probíhala 5 min. (kontrolovali jsme, zda se mixér nezahřívá na více než 40 °C, popř. byl na chvíli vypnut). Vznikla hustá kaše, proto bylo přidáno znovu 300 ml 80% EtOH. Po mixování byla provedena filtrace. Celkem bylo získáno 275,5 ml extraktu, po odpaření

bylo získáno 5,3151 g suchého extraktu. Po provedení orientační TLC bylo zjištěno, že tento extrakt obsahuje značné množství látek a tak úkolem dalšího diplomanta bude zabývat se tímto extraktem.

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, byl přidán 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 k pozdějšímu zpracování.

### **3.2.4 Macerace silikagelu z kolony**

#### **3.2.4.1 Schéma macerace**



#### **3.2.4.2 Materiál**

Materiálem pro maceraci byl silikagel z kolony po dělení celkového množství dichlormethanového extraktu.

#### **3.2.4.3 Postup**

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. Tento extrakt byl spojen s frakcemi D a E, které pochází z dělení

sumárního dichlormethanového extraktu a byla provedena další sloupcová chromatografie.

### **3.2.5 Sloupcová chromatografie frakcí D a E a extraktu z macerace silikagelu**

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.

Spojené frakce D a E a extrakt po maceraci silikagelu z kolony (celkem 2,1128 g) bylo nanесeno na kolonu ve formě roztěru. Na přípravu roztěru bylo použito 5 g silikagelu.

Délka kolony: 52 cm

Průměr kolony: 3 cm

Sloupec silikagelu: 32 cm

Množství silikagelu: 100 g

Kolona byla vymývána postupně:

**Tab.5**

<b>Eluční soustava</b>	<b>Poměr rozpouštědel</b>	<b>množství v ml</b>
n-hexan:chloroform	1 : 1	3000 ml
n-hexan:chloroform	1 : 3	2400 ml
chloroform		850 ml
Chloroform:methanol	9 : 1	370 ml
Chloroform:methanol	8 : 2	100 ml
Chloroform:methanol	7 : 3	100 ml
Chloroform:methanol	6 : 4	600 ml
Chloroform:methanol	5 : 5	200 ml
Chloroform:methanol	4 : 6	200 ml
Chloroform:methanol	3 : 7	100 ml
EtOH		400 ml

**Tab.6 Sloupcová chromatografie**

<b>Frakce</b>	<b>Eluční soustava</b>	<b>Popis frakce</b>
1	n-hexan:chloroform 1 : 1	bezbarvá
2	n-hexan:chloroform 1 : 1	žlutooranžová
3	n-hexan:chloroform 1 : 1	černozelená
4	n-hexan:chloroform 1 : 1	hnědožlutá
5	n-hexan:chloroform 1 : 1	hnědožlutá
6	n-hexan:chloroform 1 : 1	černozelená,bílé kousky
7	n-hexan:chloroform 1 : 1	černozelená
8	n-hexan:chloroform 1 : 1	žlutozelená
9	n-hexan:chloroform 1 : 1	hnědočerná
10	n-hexan:chloroform 1 : 3	hnědočerná
11	n-hexan:chloroform 1 : 3	hnědočerná
12	n-hexan:chloroform 1 : 3	hnědožlutá
13	chloroform	černohnědá
14	chloroform	žlutohnědá
15	chloroform:methanol 9 : 1	žlutohnědá
16	chloroform:methanol 9 : 1	černohnědá
17	chloroform:methanol 8 : 2	zelenohnědá,bílé kousky
18	chloroform:methanol 7 : 3	hnědá
19	chloroform:methanol 6 : 4	žlutohnědá,bílé kousky
20	chloroform:methanol 5 : 5	žlutá,zakalená
21	chloroform:methanol 4 : 6	žlutá,zakalená
22	chloroform:methanol 3 : 7	žlutá,průhledná
23	EtOH	žlutá,průhledná

Kvalitativní složení frakcí bylo monitorováno tenkovrstvou chromatografií, která sloužila jako vodítko pro jejich spojování:

Frakce: 1-13 (chromatogram č.6, č.7)

Soustava: S1

Komora: nasycená

Vyvíjení: 1x

Detekce: nejprve D8, pak D6 (chromatogram č.6)

nejprve D8, pak D7 (chromatogram č.7)

Frakce: 14-23 (chromatogram č.8)

Soustava: S2

Komora: nasycená

Vyvíjení: 1x

Detekce: nejprve D8, pak D6



Na základě TLC došlo ke spojení frakcí: 0-2, 3-6, 9-12, 13-15, 15-17, 18-23. Frakce 7, 8 zůstaly v původním složení.

Byla provedena TLC spojených frakcí (chromatogram č.9):

Soustava: S2

Komora: nasycená

Vyvíjení: 1x

Detekce: nejprve D8, pak D6

Po tomto dělení jsem se už těmito frakcemi nezabývala. Zůstaly uskladněny v ledničce.

### ***3.2.6 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.

#### **3.2.6.1 Postup a vyhodnocení detekce:**

Vyvíjecí soustavy pro chromatografii: pro frakci 0-6: n-hexan-aceton 85 : 15 (S4)

pro frakci 7-13: n-hexan-aceton 1 : 1 (S5)

Chromatografický adsorbent: Silufol UV 254 nm

**Tab.7 Detekce na steroly, steroidy, triterpenové glykosidy, cukry, terpeny, fenolické sloučeniny, laktony, redukující látky**

<b>Frakce</b>	<b>D1-počet skvrn</b>	<b>D2-počet skvrn</b>	<b>D3-počet skvrn</b>	<b>D4-počet skvrn</b>	<b>D5-počet skvrn</b>
0	0	1 na startu + 6	0	0	0
1	0	1 na startu	0	0	0
2a	0	1 na startu + 1	1	0	1 na startu + 5
2b	0	1 na startu + 1	1	0	1 na startu + 5
3	1	1 na startu + 3	1	0	1 na startu + 2
4	2	1 na startu + 5	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0

**Tab.8 Detekce na steroly, steroidy, triterpenové glykosidy, cukry, terpeny, fenolické sloučeniny, laktony, redukující látky**

<b>Frakce</b>	<b>D1-počet skvrn</b>	<b>D2-počet skvrn</b>	<b>D3-počet skvrn</b>	<b>D4-počet skvrn</b>	<b>D5-počet skvrn</b>
7	1	4	3	0	3
8	2	5	3	0	2
9	1	4	0	0	2
10	1	6	1	0	4
11	0	2	2	0	4
12	4	8	2	0	1
13	0	2	1	0	1

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 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).

## 4. Biologická aktivita

### 4.1 Stanovení akutní toxicity

#### 4.1.1 Referenční látka

Navážka 2,2008 g tetrahydrátu chloridu manganatého byla přenesena do 25ml odměrné baňky, rozpuštěna v malém množství destilované vody a roztok byl doplněn po rysku. Tak byl získán základní roztok o koncentraci 0,445 mol/l.

Základní roztok byl pak zředěn způsobem uvedeným v teoretické části. Bylo připraveno šest pracovních roztoků, ve kterých byli červi exponováni.

Tab.9

Ředění	Koncentrace (mol/l)	Počet nehybných červů po 3 min. expozice	Počet nehybných červů po 1min v pitné vodě
Základní roztok	0,445	6, 6, 6	6, 6, 6
1. ředění	0,352	6, 6, 6	6, 6, 6
2. ředění	0,279	6, 6, 6	6, 6, 6
3. ředění	0,221	6, 6, 6	6, 6, 6
4. ředění	0,175	6, 6, 6	5, 6, 4
5. ředění	0,139	1, 0, 1	1, 0, 0
6. ředění	0,110	0, 0, 0	0, 0, 0

Hodnotu  $EC_{50}$  jsme vypočítali pomocí rovnice (1):

$$\log EC_{50} = \log D_A + d (f + 1)$$

V tabulce bylo nalezeno pro čtveřici údajů o nehybných nitěnkách 0, 1, 6, 6 hodnoty  $D_A = 0,110$        $f = 0,333$        $R = 1,26$        $D = \log R = 0,100$

Po dosazení:  $\log EC_{50} = -0,9586 + 0,1 (0,333 + 1) = -0,8253$

$$EC_{50} = 0,150 \text{ mol/l}$$

Pro hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$  může být vypočítán interval spolehlivosti pomocí rovnice (3):

$$L_{1,2} = \log EC_{50} \pm 2d\sigma_f = -0,8253 \pm 0,03334$$

$$\text{Kde } \sigma_f = 0,1667$$

$$\log EC_{50} = -0,8253$$

$$d = 0,1$$

**Tab.10**

Koncentrace (g/ml)	Počet nehybných červů po 3 min. expozice	Počet nehybných červů po 1min v pitné vodě
0,0880	6, 6, 6	6, 6, 6
0,0697	6, 6, 6	6, 6, 6
0,0552	6, 6, 6	6, 6, 6
0,0437	6, 6, 6	6, 6, 6
0,0346	6, 6, 6	4, 4, 4
0,0274	1, 1, 1	0, 0, 0
0,0217	0, 0, 0	0, 0, 0

**Výpočet  $EC_{50}$ :**

**1. měření**

$$\log EC_{50} = \log D_A + d (f + 1)$$

$$\log EC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,33333 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0296 \text{ g/ml}$$

**2. měření**

$$\log EC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,5 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0308 \text{ g/ml}$$

**3. měření**

$$\log EC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,33333 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0296 \text{ g/ml}$$

**Průměrná hodnota  $EC_{50}$ :**

$$EC_{50} = 0,03 \text{ g/ml}$$

**Interval spolehlivosti  $EC_{50}$  pro 95% pravděpodobnost:**

$$L_{1,2} = \log EC_{50} \pm 2\sigma_f d$$

$$L_{1,2} = -1,5229 \pm 0,03017$$

$$EC_{50} = 0,03 (0,028 - 0,0322) \text{ mol/l}$$

### **Výpočet LC<sub>50</sub>:**

#### **1. měření**

$$\log LC_{50} = \log D_A + d (f + 1)$$

$$\log LC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,5 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0308 \text{ g/ml}$$

#### **2. měření**

$$\log LC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,5 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0308 \text{ g/ml}$$

#### **3. měření**

$$\log LC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,83333 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0333 \text{ g/ml}$$

#### **Průměrná hodnota:**

$$LC_{50} = 0,0316 \text{ g/ml}$$

#### **Interval spolehlivosti LC<sub>50</sub> pro 95% pravděpodobnost:**

$$L_{1,2} = -1,5 \pm 0,03017$$

$$LC_{50} = 0,0316 (0,0295 - 0,0339)$$

### **4.1.2 Zkoumaná látka**

Byl připraven základní roztok zkoumané látky o koncentraci 0,1 g/ml. Základní roztok byl pak ředěn způsobem uvedeným v teoretické části. Ředění bylo prováděno dokud nitěnky reagovaly na roztok. Byl testován sumární dichlormethanový extrakt, který se však úplně nerozpustil ve vodě a vznikla suspenze, která byla testována. Dále byl testován ethanolový extrakt vzniklý extrakcí listů v mixéru a frakce C, která byla z

kolony odebrána při dělení sumárního dichlormethanového extraktu (obsahovala hodně chlorofylu).

**Tab.11 Sumární dichlormethanový extrakt**

Ředění	Koncentrace g/ml	Počet nehybných nitěnek po 3 min. expozice	Počet nehybných nitěnek po 1 min. v pitné vodě
Základní roztok	0,1	0, 0, 0 pohyb se zpomalil	0, 0, 0

**Tab.12 Frakce C**

Ředění	Koncentrace g/ml	Počet nehybných nitěnek po 3 min. expozice	Počet nehybných nitěnek po 1 min. v pitné vodě
Základní roztok	0,1	0, 0, 0	0, 0, 0

**Tab.13 Ethanolový extrakt (mixér)**

Ředění	Koncentrace g/ml	Počet nehybných nitěnek po 3 min. expozice	Počet nehybných nitěnek po 1 min. v pitné vodě
Základní roztok	0,1	6, 6, 6	6, 6, 6
1. ředění	0,075	6, 6, 5	5, 6, 5
2. ředění	0,0563	6, 6, 5	6, 6, 6
3. ředění	0,0422	3, 2, 3	3, 3, 3
4. ředění	0,0316	1, 1, 1	1, 0, 0
5. ředění	0,0237	0, 0, 0	0, 0, 0

### Výpočet EC<sub>50</sub>:

#### 1. měření

$$\log EC_{50} = \log D_A + d (f + 1)$$

$$\log EC_{50} = \log 0,0237 + 0,1249 (0,83333 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0402 \text{ g/ml}$$

#### 2. měření

$$\log EC_{50} = \log 0,0237 + 0,1249 (1 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0421 \text{ g/ml}$$

### **3. měření**

$$\log EC_{50} = \log 0,0237 + 0,1249 (1 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0421 \text{ g/ml}$$

### **Průměrná hodnota $EC_{50}$ :**

$$EC_{50} = 0,0415 \text{ g/ml}$$

### **Interval spolehlivosti $EC_{50}$ pro 95% pravděpodobnost:**

$$L_{1,2} = -1,3824 \pm 0,0745$$

$$EC_{50} = 0,0415 (0,0349 - 0,0492)$$

### **Výpočet $LC_{50}$ :**

#### **1. měření**

$$\log LC_{50} = \log 0,0237 + 0,1249 (0,83333 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0402 \text{ g/ml}$$

#### **2. měření**

$$\log LC_{50} = \log 0,0237 + 0,1249 (1 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0421 \text{ g/ml}$$

#### **3. měření**

$$\log LC_{50} = 0,0421 \text{ g/ml}$$

### **Průměrná hodnota $LC_{50}$ :**

$$LC_{50} = 0,0415 \text{ g/ml}$$

### Interval spolehlivosti $LC_{50}$ pro 95% pravděpodobnost:

$$L_{1,2} = -1,3824 \pm 0,0605$$

Hodnota  $LC_{50}$  a v závorce intervaly spolehlivosti pro 95% pravděpodobnost u ethanolového extraktu:

$$LC_{50} = 0,0415 ( 0,0361 - 0,0477) \text{ g/ml}$$

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.

## 4.2 Stanovení antioxidační aktivity

**Tab.14 Chloroformový podíl (z izolačního postupu A)**

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,3811	0,3872	0,4056	0,3913		
vzorek 1mg/ml	0,2100	0,1662	0,1136	0,1633	41,7249	58,2751
vzorek 0,5mg/ml	0,2616	0,2490	0,1541	0,2216	56,6275	43,3725
vzorek 0,25mg/ml	0,3806	0,3471	0,2983	0,3420	87,4068	12,5932
vzorek 0,1mg/ml	0,3829	0,3747	0,3396	0,3657	93,4603	6,5397
vzorek 0,05 mg/ml	0,3262	0,3522	0,3999	0,3594	91,8485	8,1515

**Viz. graf č.1**



**Tab.15 Butanolvý podíl (z izolačního postupu A)**

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,3811	0,3872	0,4056	0,3913		
vzorek 1mg/ml	0,3612	0,3503	0,3259	0,3458	88,3800	11,6230
vzorek 0,5mg/ml	0,3790	0,3709	0,3494	0,3665	93,7013	6,2987
vzorek 0,25mg/ml	0,3870	0,3766	0,3550	0,3729	95,2990	4,7012

Viz. graf č.2

**Tab.16 Sumární dichlormethanový extrakt**

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,4358	0,4373	0,4251	0,4327		
vzorek 1mg/ml	Nerozpuštěné kousky, nedalo se změřit					
vzorek 0,5mg/ml	0,3148	0,3018	0,3018	0,3061	70,7419	29,2581
vzorek 0,25mg/ml	0,3308	0,3249	0,3192	0,3249	75,0867	24,9133
vzorek 0,1mg/ml	0,3679	0,3701	0,3649	0,3676	84,9549	15,0451

Viz. graf č.3

Pozn.: Tento extrakt nebyl čirý, obsahoval nerozpuštěné kousky-možná chyba měření.

**Tab.17 Ethanolový extrakt z mixéru**

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,4358	0,4373	0,4251	0,4327		
vzorek 1mg/ml	0,0723	0,0691	0,0677	0,0697	16,1082	83,8918
vzorek 0,5mg/ml	0,1450	0,1483	0,1145	0,1462	33,7878	66,2122
vzorek 0,25mg/ml	0,2378	0,2393	0,2302	0,2358	54,4950	45,5050
vzorek 0,1mg/ml	0,3500	0,3402	0,3371	0,3424	79,1310	20,8690

Viz. graf č.4

**Tab.18 Frakce C**

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,0,4358	0,4373	0,4251	0,4327		
vzorek	0,5690	0,5510	0,5753	0,5651		

1mg/ml						
vzorek 0,5mg/ml	0,4393	0,4466	0,4389	0,4416		
vzorek 0,25mg/ml	0,4171	0,4240	0,4275	0,4229		
vzorek 0,1mg/ml	0,4151	0,4187	0,4079	0,4139		

Pozn.: Frakce C byla měřena v podobě suspenze (obsahovala nerozpuštěné kousky), měření mohlo být zatíženo chybou.

Významnou antioxidační aktivitu má ethanolový extrakt.

## **V. 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 podrobena 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

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 uhlíčan 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 uhličitanu 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 výtřepek. Vodný podíl byl vytřepán s butanolem a předpokládá 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).

Bylo odebráno 21 frakcí, poté se kolona ucplala. 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 odparek váží 8,92 g. Suchý odparek frakcí 8-11 váží 1,6012 g. Odparek 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 kaurenová<sup>33</sup>, kterou vyizolovali kolegové z květů slunečnice (na pohled to byly téměř identické hmoty). Byla provedena TLC, kde byly nanесeny 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 vloženo 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

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 nanášeny spojené frakce D a E, extrakt z macerace silikagelu z kolony a předpokládalo se nanášení 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-CHCl<sub>3</sub> 1 : 1, n-hexan-CHCl<sub>3</sub> 1 : 3, CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-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 byly 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

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.

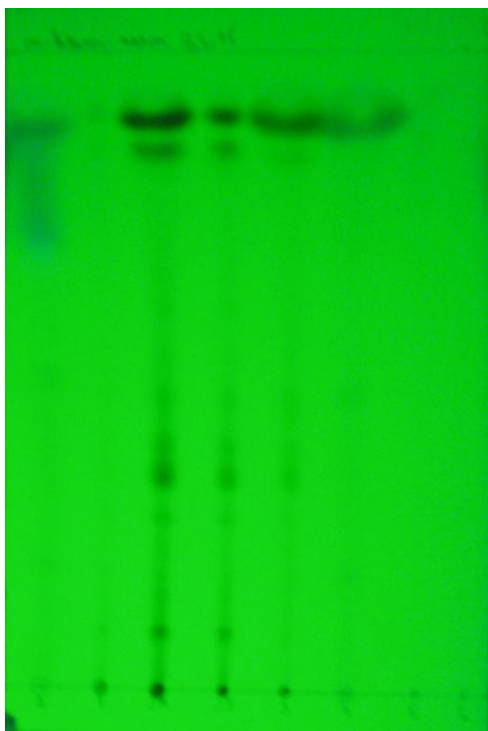
Ethanolový extrakt se z hlediska biologické aktivity projevil jako nejperspektivnější, proto bude podroben dalšímu testování.

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

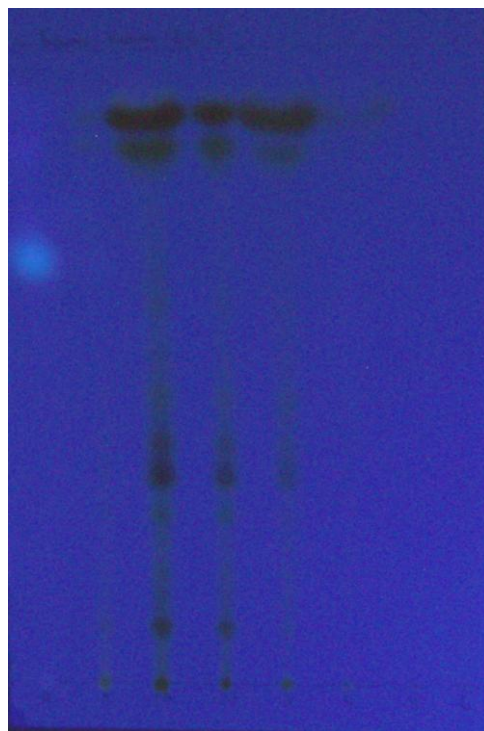
Zkušební metoda pro odstranění chlorofylu se v tomto případě bohužel neosvědčila.



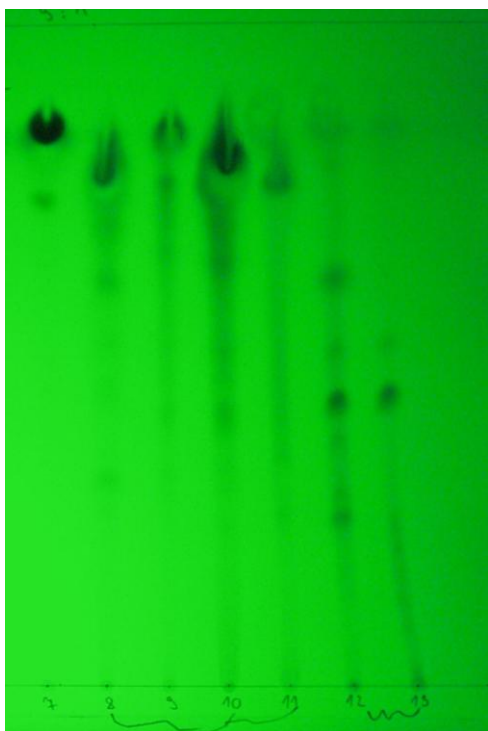
## **VI. PŘÍLOHY**



**Chromatogram č.1**



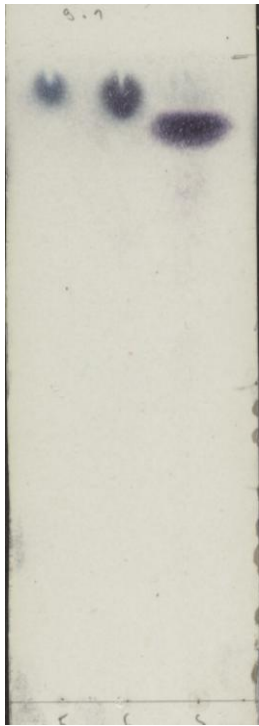
**Chromatogram č.2**



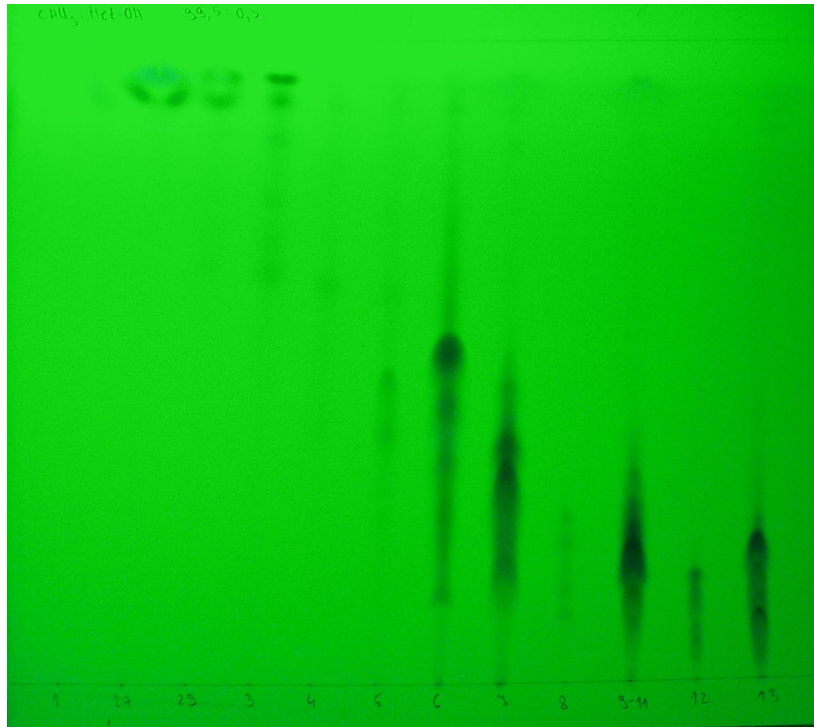
**Chromatogram č.3**



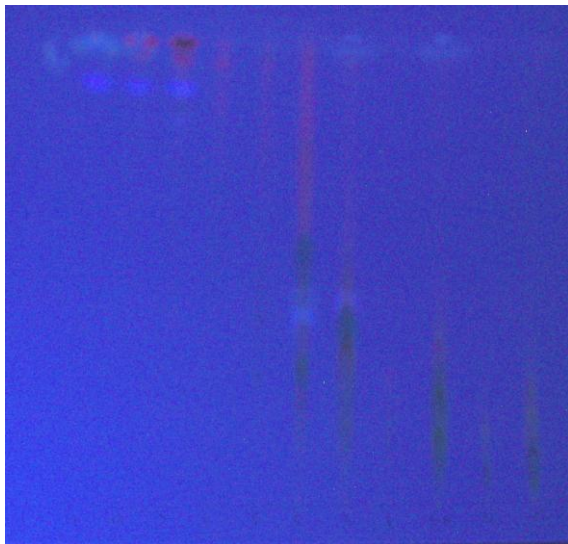
**Chromatogram č.4**



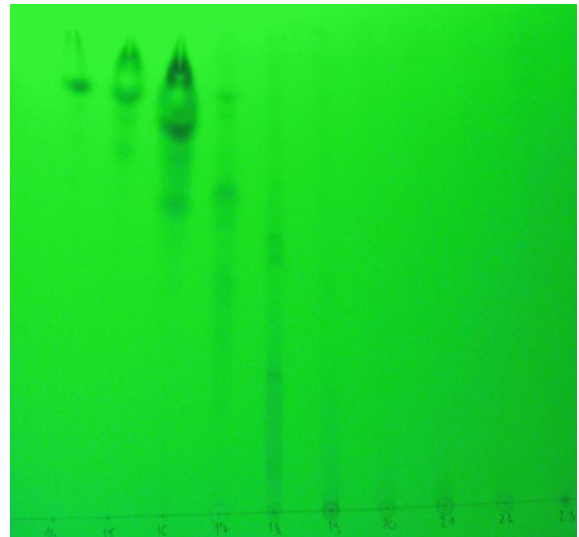
**Chromatogram č.5**



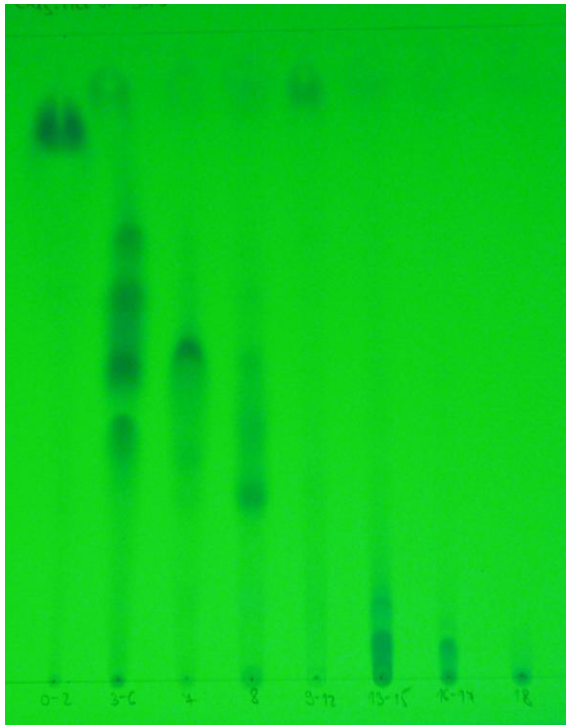
**Chromatogram č.6**



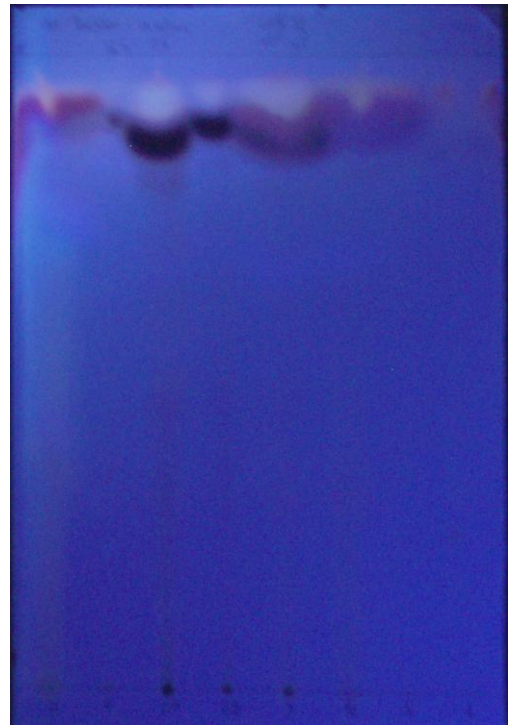
**Chromatogram č.7**



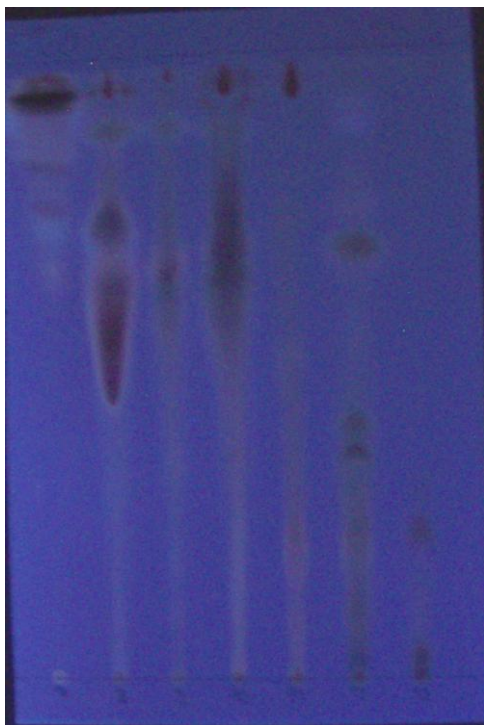
**Chromatogram č.8**



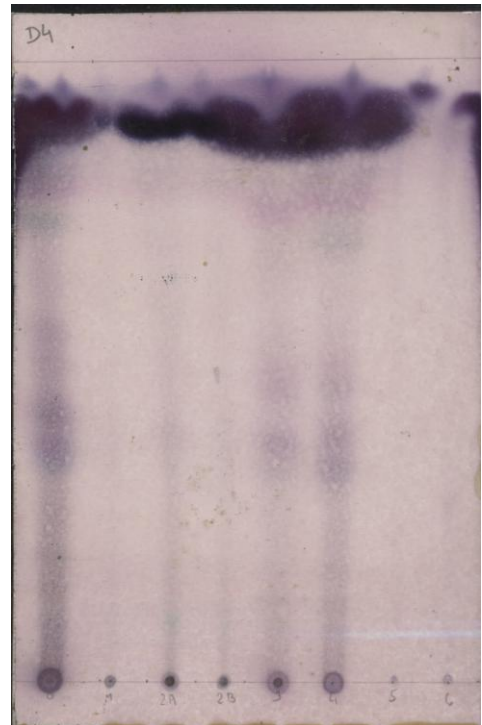
**Chromatogram č.9**



**Chromatogram č.10**



**Chromatogram č.11**

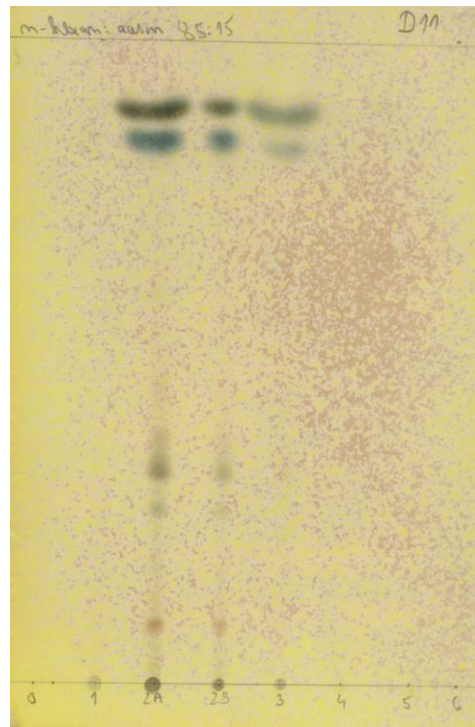


**Chromatogram č.12**

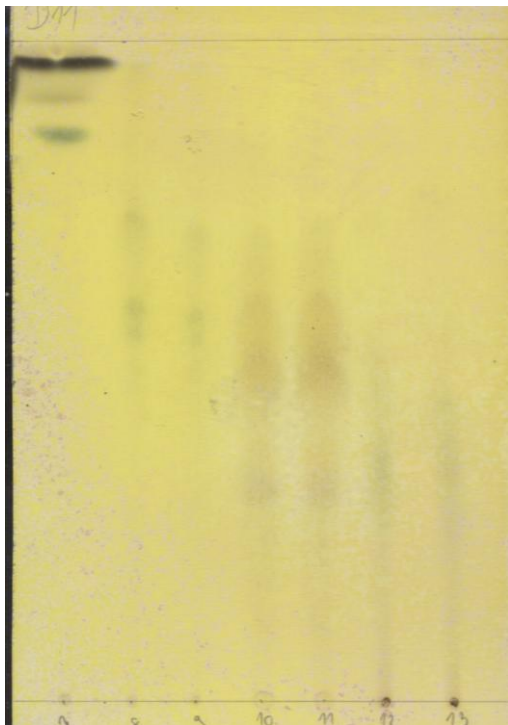




**Chromatogram č.13**



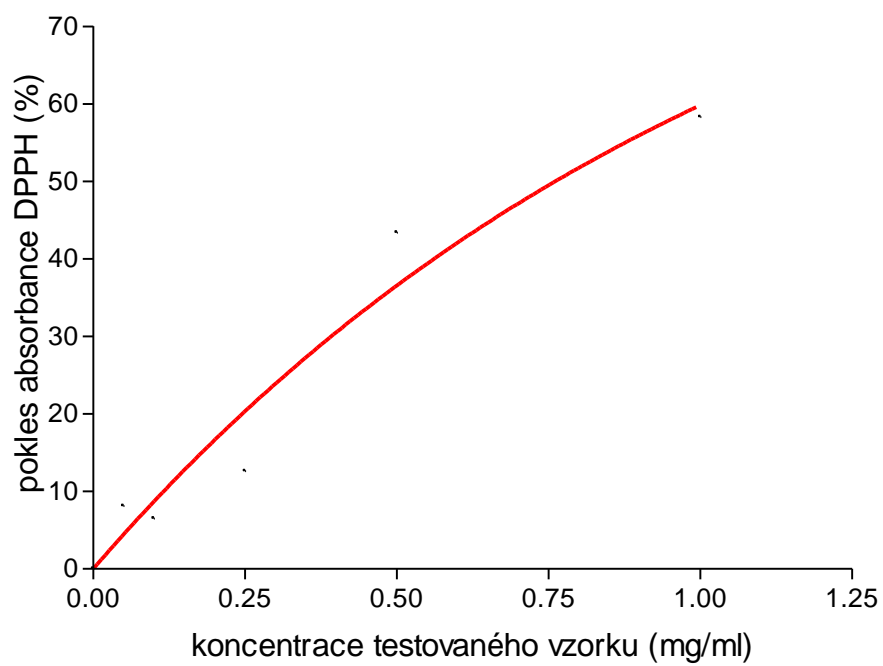
**Chromatogram č.14**



**Chromatogram č.15**

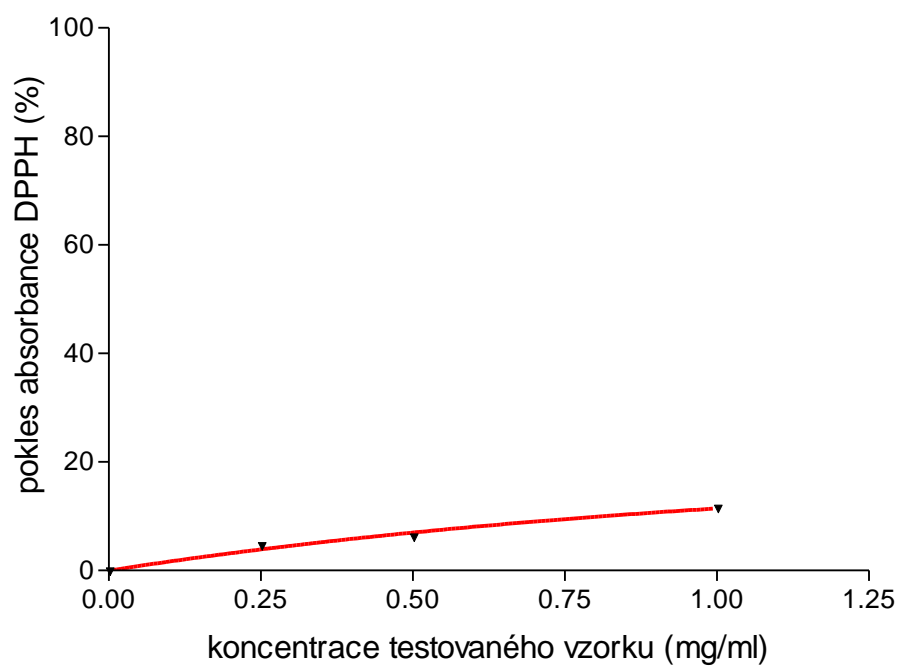
**Graf č.1**

**Chloroformový podíl**



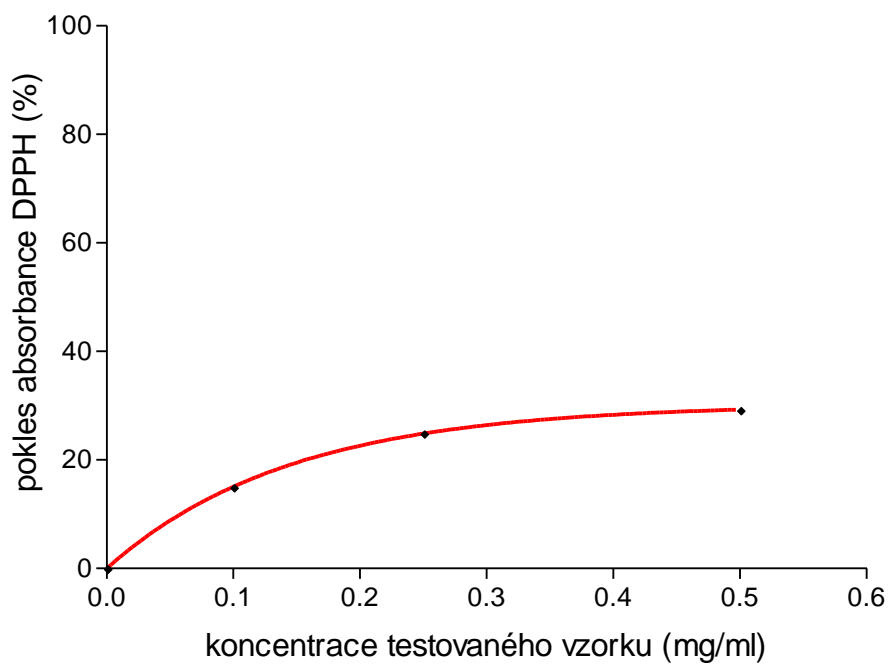
**Graf č.2**

**Butanolvý podíl**



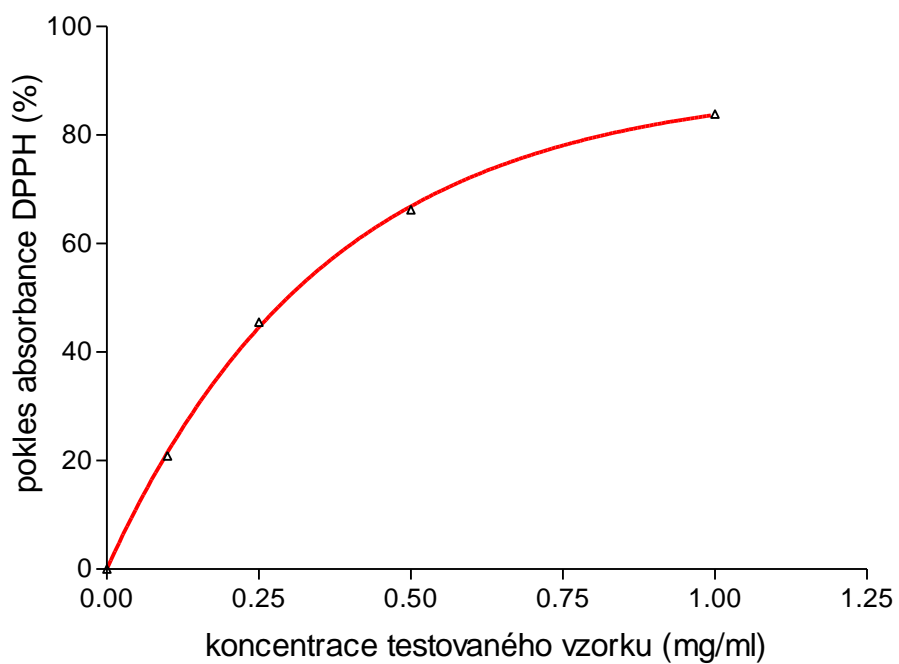
**Graf č.3**

**Sumární dichlormethanový extrakt**



**Graf č.4**

**Ethanolový extrakt z mixéru**



**ZÁZNAM Z GC/MS ANALÝZY**

**FRAKCE č.5**



## **ZÁZNAM Z GC/MS ANALÝZY**

### **FRAKCE č.6**

## **VII. LITERATURA**

1. Bremnessová, L.: Bylinář. Fortuna Print, Praha 1995, s.76
2. Vermeulen, N.: Encyklopedie bylin a koření. Rebo Production, 1999, s.144,145
3. Jirátko, J., Veverka, K., Šedivý, J.: Ochrana slunečnice proti chorobám a škůdcům. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1996, ISSN 0862-3562, s.5
4. Wiersema, J.H., León, B.: World Economic Plants. A standard reference. CRC Press, 1999, pp.254
5. ČL 2002, 3. díl, Grada Publishing a.s. 2002, ISBN 80-247-0464-1, s.2812
6. Jahodář L., Buchta V., Ryglová H., Jun D., Opletal L.: The screening of in vitro antifungal activity of Asteraceae of Czech provenience. 3rd Int. Symposium of Natural Drugs, Proceedings, 249-253, Naples, 2-4 October 2004
7. Kováčik, A.: Základy pěstování slunečnice. Institut výchovy a vzdělávání ministerstva zemědělství ČR, Praha 1993, ISBN 80-7105-043-1, s.3, 8, 11, 38, 39, 40
8. Kováčik, A.: Biologie a technologie pěstování slunečnice. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997, s.13
9. Janča, J., Zentrich, A.J.: Herbář léčivých rostlin 4. Eminent 1996, s.220
10. Macias, A.F., Molinillo, J.M.G., Chinchilla, D.: Heliannanes- a Structure-Activity Relationship (SAR) Study. Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals, pp.103-120
11. <http://faf.vfu.cz/html/txts/seskviterpeny.html>
12. Macias, A.F., Torres, A., Galindo, J.L.G.: Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick. Phytochemistry, Vol. 61, 2002, pp. 687-692
13. Macias, A.F., López, A., Varela, R.M.: Helivypolide G. A novel dimeric bioactive sesquiterpene lactone. Tetrahedron Letters, Vol. 45, No 35, August 2004, pp. 6567-6570

14. Macias, A.F., Oliva, R.M., Varela, R.M.: Allelochemicals from sunflower leaves cv. Peredovick. *Phytochemistry*, Vol. 52, 1999, pp 613-621
15. Spring, A.O., Gradmann, W.: Three Biologically Active Heliangolides from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, Vol. 21, No. 10, 1982, pp. 2551-2553
16. Spring, A.O., Gradmann, W.: Sesquiterpene Lactones of the Capitulate Glandular Trichomes of *Helianthus Annuus*. *Phytochemistry*, Vol. 28, No. 3, 1989, pp.745-749
17. Jahodář L., Klečáková J.: Toxicita hvězdnicovitých s přihlédnutím k farmaceuticky významným druhům. *Chemické listy* 93, 1999, s. 320-326
18. Macias, A.F., Varela, R.M., Torres, A.: Potential Allelopathic Guaianolides from Cultivar Sunflower Leaves, Var. SH-222. *Phytochemistry*, Vol. 34, No. 3, 1993, pp.669-674
19. Macias, A.F., López, A., Varela, R.M.: Bioactive apocarotenoids annuionones F and G: structural revision of annuionones A, B, and E. *Phytochemistry*, Vol. 65, No. 22, November 2004, pp.3057-3063
20. Tehmina, A., Rukhsana, B.: A bioactive annuionone from sunflower leaves. *Phytochemistry*, Vol. 66, No. 16, August 2005, pp.1919-1921
21. Macias, A.F., Varela R.M., Torres, A.: Bioactive Norsesquiterpenes From *Helianthus Annuus* with Potential Allelopathic Activity. *Phytochemistry*, Vol. 48, No. 4, 1998, pp.631-636
22. Macias, A.F., Torres, A., Galindo, J.L.G.: Heliespirones C-E, new spiroterpenes from *Helianthus annuus*. *Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy*, eds JDI Harper, M An, H Wu and JH Kent, Charles Sturt University, Wagga Wagga, NSW, Australia, August 2005, ISBN 1864671688, pp.1-6
23. Hubík, J.: *Obecná farmakognosie II, Sekundární látky*. 3. vydání, Praha, SPN 1989, s.31-34
24. Macias, A.F., Molinillo, J.M.G., Torres, A.: Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry*, Vol. 45, No. 4, 1997, pp.683-687

25. Tichý, M., Rucki, M.: Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*. Pracovní lékařství, 48, 1996, No. 6, s.225-230
26. Tichý, M., Benfenati, E.: Alternativní metody testování toxicity od nitěnek k počítačům. Pracovní lékařství, Repetitorium, 1998, s.66-68
27. Sedlák, E.: Zoologie bezobratlých, Masarykova univerzita Brno, 2003, ISBN 80-210-2892-0, s.71
28. Skála, P.: Diplomová práce-Stanovení antioxidační aktivity látek metodou sekvenční injekční analýzy (SIA) se spektrofotometrickou detekcí. 2003, s.45-49
29. Singh, D.V., Sairam, R.K., Srivastava, G.C.: Activity of Antioxidant enzymes in Leaves and Bracts of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Indian J. Plant Physiol., Vol. 9, No. 1, Jan-March 2004, pp.36-41
30. Opletal, L., Drašar, P.: Fotochemické metody. 1. Izolace obsahových látek (laboratorní technika).Karolinum, Praha 1994, ISBN 382-110-94, s.38, 45, 49, 102, 83, 95
31. Stahl, E.: Thin –Layer Chromatography, A Laboratory Handbook. Springer Berlin, Berlin-Heidelberg-New York 1969, ISBN 3-540-04736-0, s.1042
32. Lábler, L., Schwarz, V.: Chromatografie na tenké vrstvě, Nakladatelství ČSAV Praha 1965, s.468
33. Jahodář, L., Řeháková, Z., Pour, M., Opletal, L.: Phytochemical study of *Helianthus annuus* L.: Phytochemicals and their biological activity, stať ve sborníku, In: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies PACIFICHEM 2005; Honolulu, Hawai, December 15-20, 2005 US, 2005, s.165