

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

**FYTOCHEMICKÝ VÝZKUM *ADHATODA VASICA* III.**  
**(Rigorózní práce)**

**Lenka**

**Dundelová**

**Hradec Králové 2006**  
**Jahodář Csc.**

**Školitel: Prof. RNDr. Luděk**

Ráda bych touto cestou poděkovala Prof. RNDr. Lud'ku Jahodářovi, Csc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky k této rigorózní práci a PharmDr. Janě Klečákové, Ph.D. za rady a obětavou pomoc při řešení problémů převážně technického rázu. Děkuji rovněž celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za všestrannou pomoc a vytvoření velmi přátelské atmosféry.

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci vypracovala samostatně a použila pouze citovanou literaturu.

## OBSAH

<b>I .ÚVOD A CÍL PRÁCE .....</b>	<b>6</b>
<b>II .LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>8</b>
<b>II.1 Botanická charakteristika.....</b>	<b>9</b>
II.1.1 Systematické zařazení <i>Adhatoda vasica</i> NESS. ....	9
II.1.2 Charakteristika druhu .....	9
II.1.3 Charakteristika Obsahových látek.....	10
II.1.3.1 Alkaloidy.....	10
II.1.3.1.1 Chinazolinové alkaloidy.....	10
II.1.3.1.2 Pyrrolidinonové alkaloidy .....	12
II.1.3.2 Flavonoidy a flavonoidní glykosidy.....	13
II.1.3.3 Chalkony a chalkonové glykosidy .....	13
II.1.3.4 Silice.....	14
II.1.3.5 Další obsahové látky .....	14
II.1.3.5.1 Monokarboxylové kyseliny.....	14
II.1.3.5.2 Alkoholy a ketony .....	14
II.1.3.5.3 Ethylglykosidy .....	15
<b>II.2 Biologické účinky .....</b>	<b>15</b>

II.2.1 Tradiční použití .....	15
II.2.2 Účinek na respirační systém.....	15
II.2.3 Uterostimulační a abortivní účinky .....	16
II.2.4 Antituberkulotická aktivita.....	16
II.2.5 Antibakteriální účinky.....	16
II.2.6 Hypoglykemický účinek .....	16
II.2.7 Toxicita .....	17
<b>III .ZPRACOVÁNÍ ROSTLINNÉHO MATERIÁLU .....</b>	<b>18</b>
<b>III.1 Chemikálie, chromatografický materiál a přístroje .....</b>	<b>18</b>
III.1.1 Chemikálie .....	18
III.1.2 Chromatografický materiál .....	16
III.1.3 Přístroje.....	16
<b>III.2 Přehled mobilních fází, detekčních činidel a standardů pro TLC.....</b>	<b>16</b>
III.2.1 Chromatografické soustavy .....	16
III.2.2 Detekční činidla .....	16
III.2.3 Standardy .....	17
<b>III.3 Zpracování rostlinného materiálu .....</b>	<b>18</b>
III.3.1 SCHÉMA I. ....	18
III.3.2 Práce s matečnými louhy L3.....	19
III.3.2.1 TLC1 .....	19
III.3.2.2 TLC2.....	20
III.3.2.3 TLC 3.....	22
III.3.3 SCHÉMA II. ....	23
III.3.4 ZPRACOVÁNÍ 1. ETHYLACETÁTOVÉHO PODÍLU .....	24
III.3.4.1 TLC4.....	24
III.3.4.2 Výsledky denzitometrického měření .....	25
III.3.4.3 PREPARATIVNÍ HPLC č. 1.....	27
III.3.4.4 TLC 5.....	29
III.3.4.5 Příprava čerstvého extraktu .....	29
III.3.4.6 Výsledky denzitometrického měření .....	29
III.3.4.7 PREPARATIVNÍ HPLC č. 2.....	33

III.3.4.8 TLC 12 .....	35
III.3.4.9 Výsledky denzitometrického měření .....	35
<b>IV .DISKUZE .....</b>	<b>38</b>
<b>V .ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ.....</b>	<b>43</b>
<b>VI .POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>45</b>

## **I .ÚVOD A CÍL PRÁCE**

Tato rigorózní práce navazuje na diplomovou práci Fytochemický výzkum *Adhatoda vasica* II.

Diplomová práce byla zaměřena na izolaci biologicky účinných látek ze sušené nati *Adhatoda vasica*, zvláště chinazolinových alkaloidů, jejich identifikaci, charakteristiku fyzikálně chemických vlastností a porovnání výsledků s literárními údaji. V rámci této činnosti byl izolován alkaloid, označený jako L3 se strukturou příbuznou vasicinu, která byla určena jako 3S,7-dihydroxyvasicinolon. Z důvodu malého množství materiálu nebylo možno s látkou dále pracovat.<sup>(29)</sup>

Cílem této rigorózní práce bylo pokračovat v izolačních postupech alkaloidu označeného L3, posoudit jeho stabilitu, případně popsat degradační produkty a získat tak zpracovatelné množství, které by bylo možno použít k dalším testům a ověřit tak jeho případnou biologickou aktivitu.

## **II .LITERÁRNÍ PŘEHLED**



## **II.1 BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA** ***JUSTICIA ADHATODA*.L SYN. *ADHATODA VASICA* NESS.**

Použitý rostlinný materiál byl zahraničním dodavatelem označen synonymickým názvem *Adhatoda vasica* NESS., proto je tento název v dalším textu upřednostňován.

### **II.1.1 SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ *ADHATODA VASICA* NESS. <sup>(1)</sup>**

- ŘÍŠE – Plantae  
ODDĚLENÍ – Magnoliophyta  
TŘÍDA – Magnoliopsida  
PODTŘÍDA – Asteridae  
NADŘÁD – Lamiales  
ŘÁD – Scrophulariales  
ČELEĎ – Acanthaceae  
ROD – *Justicia* L.  
DRUH – *Justicia adhatoda* L. - synonymum – *Adhatoda vasica* NESS.

### **II.1.2 CHARAKTERISTIKA DRUHU**

#### ***Justicia Adhatoda* L. syn. *Adhatoda vasica* NESS.**

Je to vytrvalý hustý 1-2,5 m vysoký keř, někdy budící dojem malého stromu, vyskytující se po celé Indii a v Himalájích do nadmořské výšky 1300m.n.m. Kmen a větve mají hladkou popelavě zbarvenou kůru. Listy vyrůstají vstřícně, jsou světle zelené barvy, voskované, po obou stranách hladké, široce kopinaté s krátkými řapíky, dlouhé 7-17cm a 2,5-8cm široké.

Na epidermis listů jsou přítomny dvou až třibuněčné bradavičnaté trichomy a malé žláznaté trichomy. V mezofylu listu se nachází krystaly šťavelanu vápenatého. Květenství tvoří stopkaté klasy vyrůstající z vnějších paždí listů, květní lůžko je obaleno třemi velikými listeny. Květy jsou vstřícné, kalich je pěticípý, koruna zvonovitá s krátkou trubkou a širokým hrdlem. Horní pysk je klenutý, spodní široký a hluboce třídílný, oba jsou bílé s purpurovými pruhy na spodní části, popřípadě růžové či purpurové.

Tyčinky mají dlouhé nitky se dvěma prašníky.

Plodem je malá tobolka se čtyřmi hladkými semeny. <sup>(2)</sup>

Drogu tvoří čerstvé či sušené listy. Sušením listy nabývají kalně hnědé barvy, charakteristické vůně a výrazně hořké chuti. <sup>(3)</sup>

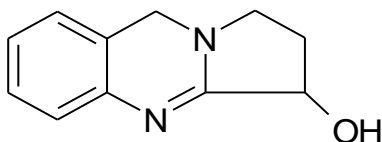
### II.1.3 CHARAKTERISTIKA OBSAHOVÝCH LÁTEK

#### II.1.3.1 Alkaloidy

V rostlině byly identifikovány chinazolinové alkaloidy a pyrolidinonové alkaloidy.

##### II.1.3.1.1 Chinazolinové alkaloidy<sup>(47)</sup>

###### Vasicin (peganin)



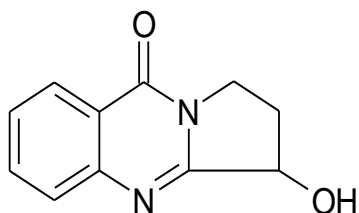
Vasicin je hlavním rostlinným alkaloidem, který se nachází převážně v listech rostliny. Je opticky aktivní a v rostlině se nachází obvykle jako racemát.

Optická otáčivost S-formy je  $[\alpha]_D^{14} -254$  (2.44 %  $\text{CHCl}_3$ ).

Hodnota teploty tání je 211- 212 °C.

Látka je chemicky nestabilní, podléhá fotochemické oxidaci, při které přechází na vasicinon. <sup>(5)</sup>

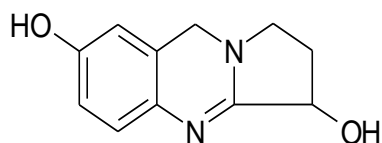
###### Vasicinon



Je to druhý nejhojněji zastoupený alkaloid, nachází se v listech rostliny, v malém zastoupení i v květech. Je opticky aktivní, naměřená optická otáčivost  $[\alpha]_D -129$  ( $\text{CHCl}_3$ ) až  $[\alpha]_D -78$  ( $\text{CHCl}_3$ ) se pravděpodobně vztahuje k racemátu.

Hodnota teploty tání je 200-201 °C.

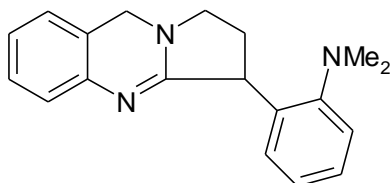
*Vasicinol*



Nachází se v kořenech, listech a semenech, je opticky aktivní.

Hodnota teploty tání je 270-273 °C.

*Vasicolin*

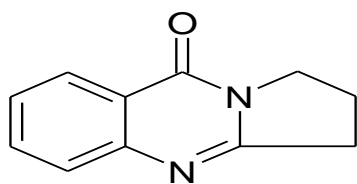


Nachází se ve všech částech rostliny, hodnota teploty tání je 135 °C

*Vasicinin*

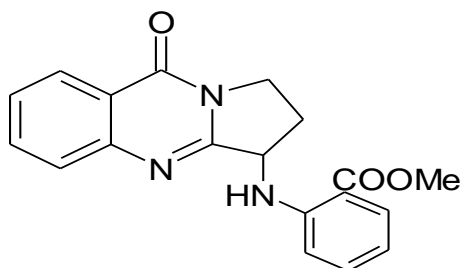
Byl izolován z květenství, teplota tání je 208 °C.

*Vasicinolon*



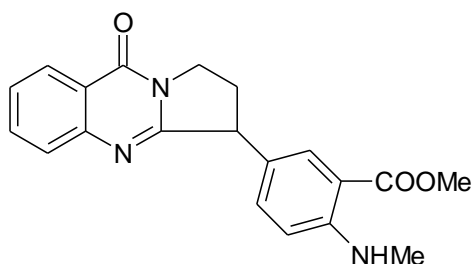
Nachází se v kořenech rostliny, teplota tání činí 279 °C.

*Vasnetin*



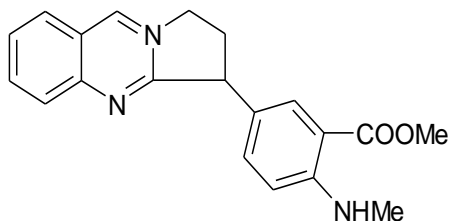
Alkaloid byl izolován z listů. Teplota tání se pohybuje v rozmezí 185-187 °C.

*Anisotin*



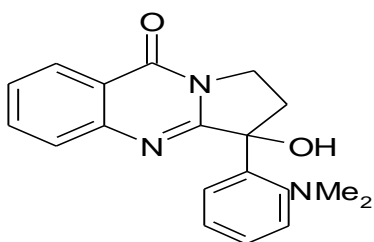
Nachází se v listech, teplota tání se pohybuje v rozmezí 189-190 °C.

### Adhatodin



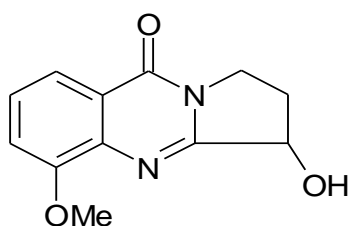
Nachází se ve všech částech rostliny, teplota tání je 183 °C

### Demethoxyaniflorin



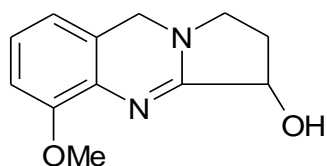
Alkaloid se nachází v listech. Teplota tání se pohybuje v rozmezí 128-129 °C.

### Adhvasinon



Alkaloid byl získán izolací z listů. Není opticky aktivní.

### 1,2,3,9-Tetrahydro-5-methoxypyrrolo[2,1-b]quinazolin-3-ol

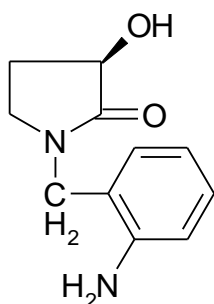


Nachází se v listech ve formě racemátu, hodnota teploty tání se pohybuje v rozmezí 224-225 °C.

### 1-phenyl-2-methyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolinon

#### II.1.3.1.2 Pyrrolidinonové alkaloidy

### Vasicol



Alkaloid byl izolován z kořenů, je opticky aktivní. Změřená teplota tání se pohybuje v rozmezí 133-134°C.

*Acetamido-dihydropyridoindol*

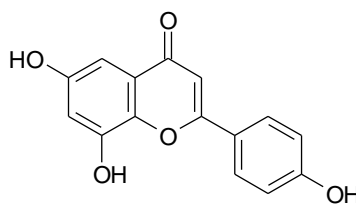
### II.1.3.2 Flavonoidy a flavonoidní glykosidy <sup>(7) (8)</sup>

*Apigenin*

A jeho C-glukosidy

*Vitexin*

*Isovitexin*



apigenin

*Xylosilvitexin*

*Rhamnosilvitexin*

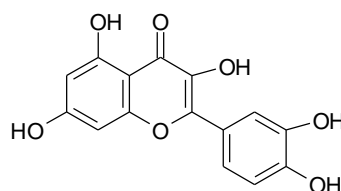
C-glykosid *Violanthin*

*Kvercetin*

*Astragalin*

*Kempferol*

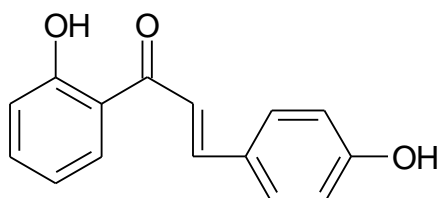
a jeho glykosidy



kvercetin

### II.1.3.3 Chalkony a chalkonové glykosidy

*2',4-Dihydroxychalkon*



*2'-Hydroxy-4-methoxychalkon*

*2'-hydroxy-4-glukosyloxychalkon*

### **II.1.3.4 Silice**

Nachází se v listech a květech rostliny, obě mají světle žlutou barvu a nepříjemný zápach.

Silice květů se skládá ze 36-ti komponent. Silice listů je tvořena směsí více než 50-ti látek.<sup>(6)</sup>

### **II.1.3.5 Další obsahové látky**

*II.1.3.5.1 Monokarboxylové kyseliny<sup>(10)</sup>*

*linolenová*

*arachidonová*

*linoleová*

*palmitová*

*olejová*

*II.1.3.5.2 Alkoholy a ketony*

V nadzemních částech rostliny<sup>(11) (12)</sup>

29-methyltrikontan-1-ol

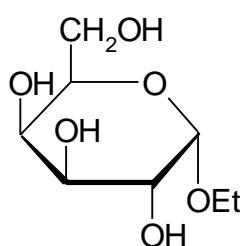
37-hydroxy-29-methyl-1-triakontanol

37-hydroxy,hexatetrakont-1-en-15-on

hentetrakontan-19-on

### II.1.3.5.3 Ethylglykosidy

#### *Eleutherosid C*



Nachází se ve všech částech rostliny, teplota tání činí 140 °C. <sup>(11)</sup>

ve formě  $\alpha$ -D-pyranosy

#### *Ethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid*

## II.2 BIOLOGICKÉ ÚČINKY

### II.2.1 TRADIČNÍ POUŽITÍ

*Adhatoda vasica* je v oblastech svého výskytu tradičně užívána jako léčivá rostlina. Pomocí přípravků z listů a kořenů jsou léčena onemocnění respiračního systému od kašle a chřipky po bronchitidu a astma. V tradiční čínské medicíně je užívána při krvácivých stavech, například lokálním krvácení při peptickém vředu či hemeroidech nebo menorrhagii.

Nejčastějšími lékovými formami jsou sirupy, tinktury, odvary a extrakty. Čerstvá šťáva z listů je tradičně pomocným lékem TBC.

### II.2.2 ÚČINEK NA RESPIRAČNÍ SYSTÉM

Nositelem účinku jsou alkaloidy, převážně vasicin a vasicinon. Vasicin vykazuje bronchodilatační aktivitu srovnatelnou s theophyllinem. Vasicinon vykazuje in vivo bronchokonstrikční aktivitu. Při podání obou alkaloidů v poměru 1:1 dochází k potenciaci bronchodilatačního účinku.<sup>(15) (16)</sup>

Po podání standardizovaného extraktu morčatům, byla prokázána po p.o. podání antitussická aktivita srovnatelná s kodeinem, po iv. podání 1/20 až 1/40 této aktivity.<sup>(17)</sup>

### **II.2.3 UTEROSTIMULAČNÍ A ABORTIVNÍ ÚČINKY**

Výrazné uterotonické účinky byly zjištěny u alkaloidu vasicinu, jenž má srovnatelné stimulační účinky na dělohu jako oxytocin.<sup>(17)</sup> Vyvolává rytmické kontrakce myometria různých živočišných druhů, včetně člověka.<sup>(15)</sup> Suchý extrakt podávaný krysám vykázal 100% abortivní účinnost.<sup>(18)</sup> Za mechanismus účinku je považován zásah do systému na úrovni uvolňování prostaglandinů.<sup>(20) (21)(22)</sup>

### **II.2.4 ANTITUBERKULOTICKÁ AKTIVITA**

V listech obsažené silice inhibují růst některých kmenů *Mycobacterium tuberculosis* při podání v množství 2 – 20 µg/mg.<sup>(24)</sup>

Bromhexin a ambroxol, syntetické deriváty vasicinu, působí jako pH dependentní růstové inhibitory *M.tuberculosis*. Jsou vhodné jako podpůrné prostředky při léčbě tuberkulózy.<sup>(25)</sup>

### **II.2.5 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY**

Při testování methanolických extraktů z *Adhatoda vasica* vykázala alkaloidní frakce výraznou antibakteriální aktivitu. Jako citlivé se ukázali G+ bakterie *Str.foecalis*, *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis* a G- bakterie *E.coli*.<sup>(26)</sup>

Během testování rostlinných extraktů pro použití k dezinfekci vody byla prokázána nejvyšší antibakteriální účinnost při pH 6,5.<sup>(27)</sup>

Vysokou účinnost proti bakteriím a kvasinkám mají také rostlinné silice z květů i listů.<sup>(28)</sup>

### **II.2.6 HYPOGLYKEMICKÝ ÚČINEK**



Systematické podávání syntetických derivátů vasicinu snižuje abnormální hladiny glykoproteinů v moči diabetiků.<sup>(29)</sup>

Ethanolický extrakt byl úspěšně testován na hypoglykemickou aktivitu u králíků a krys.<sup>(30) (31)</sup>

## **II.2.7 TOXICITA**

Extrakty jsou obecně považovány za bezpečné při humánním užití. Mezi nežádoucí účinky po užití vysokých dávek patří dráždění, zvracení a průjem,<sup>(39)</sup> listy jsou toxické pro nižší formy života.<sup>(40)</sup>

Reprodukční toxicita nebyla potvrzena.<sup>(22)</sup>

# III .ZPRACOVÁNÍ ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

## III.1 CHEMIKÁLIE, CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL A PŘÍSTROJE

### III.1.1 CHEMIKÁLIE

- Diethylether p.a.
- Dusičnan bismutitý č. ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ )
- Ethanol 70% destilovaný (EtOH 70%)
- Ethanol 96% destilovaný (EtOH 96%)
- Ethylacetát p.a. (EtAc)
- Hexakynoželezitan draselný č. ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )
- Hydroxid amonný 26% ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )
- Chlorid železitý č. ( $\text{FeCl}_3$ )

- Chloroform p.a. ( $\text{CHCl}_3$ )
- Jodid draselný (KI)
- Kyselina chloristá 3% č. ( $\text{HClO}_4$ )
- Kyselina mravenčí p.a. ( $\text{HCOOH}$ )
- Kyselina octová 99.8% p.a. ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  ledová)
- Methanol p.a. (MeOH)
- Vanilin 99% č.
- Xylen p.a (Xy)

### III.1.2 CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL

- TLC desky – aluminiové
  - Silica Gel 60 F<sub>254</sub> – 200x200mm (MERCK)
  - Silica Gel 60 – 200x200mm (MERCK)

Pro kontrolní TLC byl zvolen objem nanášek 10 $\mu$ l respektive 20 $\mu$ l .

Pro standardní nanášky byl zvolen objem 10, 20 a 40 $\mu$ l

### III.1.3 PŘÍSTROJE

- rotační vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114
- detekční UV lampa Camag 254/366nm
- ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin)
- LINOMAT 5 – nanesení standardní nanášky sušené proudem dusíku
- CAMAG TLC scanner 3 – detekce vyvinutých chromatogramů, proměření UV spekter
- HPLC – Knauer Preparative pump K-1800
  - BUCHI Fraction collector B-484
  - Detektor MERCK KNAUER
  - Kolona HIBAR, PRE-PACKED COLUMN RT 250x25mm, 7 $\mu$ m,  
náplň LiChrosorb RP – 18

## III.2 PŘEHLED MOBILNÍCH FÁZÍ, DETEKČNÍCH ČINIDEL A STANDARDŮ PRO TLC

### III.2.1 CHROMATOGRAFICKÉ SOUSTAVY

S1 – CHCl <sub>3</sub> : MeOH	85:15
S2 – CHCl <sub>3</sub> : MeOH	80: 20
S3 – CHCl <sub>3</sub> : MeOH	75:25
S4 – CHCl <sub>3</sub> : MeOH	70:30

### III.2.2 DETEKČNÍ ČINIDLA

V první fázi byla detekce prováděna expozicí chromatogramu paprskům UV254 a UV366.

D1 – Dragendorfovo činidlo

zásobní roztok – roztok 1+ roztok 2 smístit v poměru 1:1

roztok 1- 0,85g bazického Bi (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> + 10ml CH<sub>3</sub>COOH ledové + 40ml H<sub>2</sub>O

roztok 2- 8g KI + 30ml H<sub>2</sub>O

V čas potřeby se zásobní roztok naředí 2ml CH<sub>3</sub>COOH ledové + 10ml H<sub>2</sub>O

D2 – 1% roztok vanilinu v EtOH + 3% HClO<sub>4</sub> v poměru 1:1

po postřiku zahřát na cca 100°C

D3 – 1g KI se povaří s 50ml H<sub>2</sub>O a 2ml CH<sub>3</sub>COOH, dokud se nerozpustí. Poté se doplní H<sub>2</sub>O na 100ml.

### **III.2.3 STANDARDY**

Vasicin – získán izolací na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Faf UK v HK.

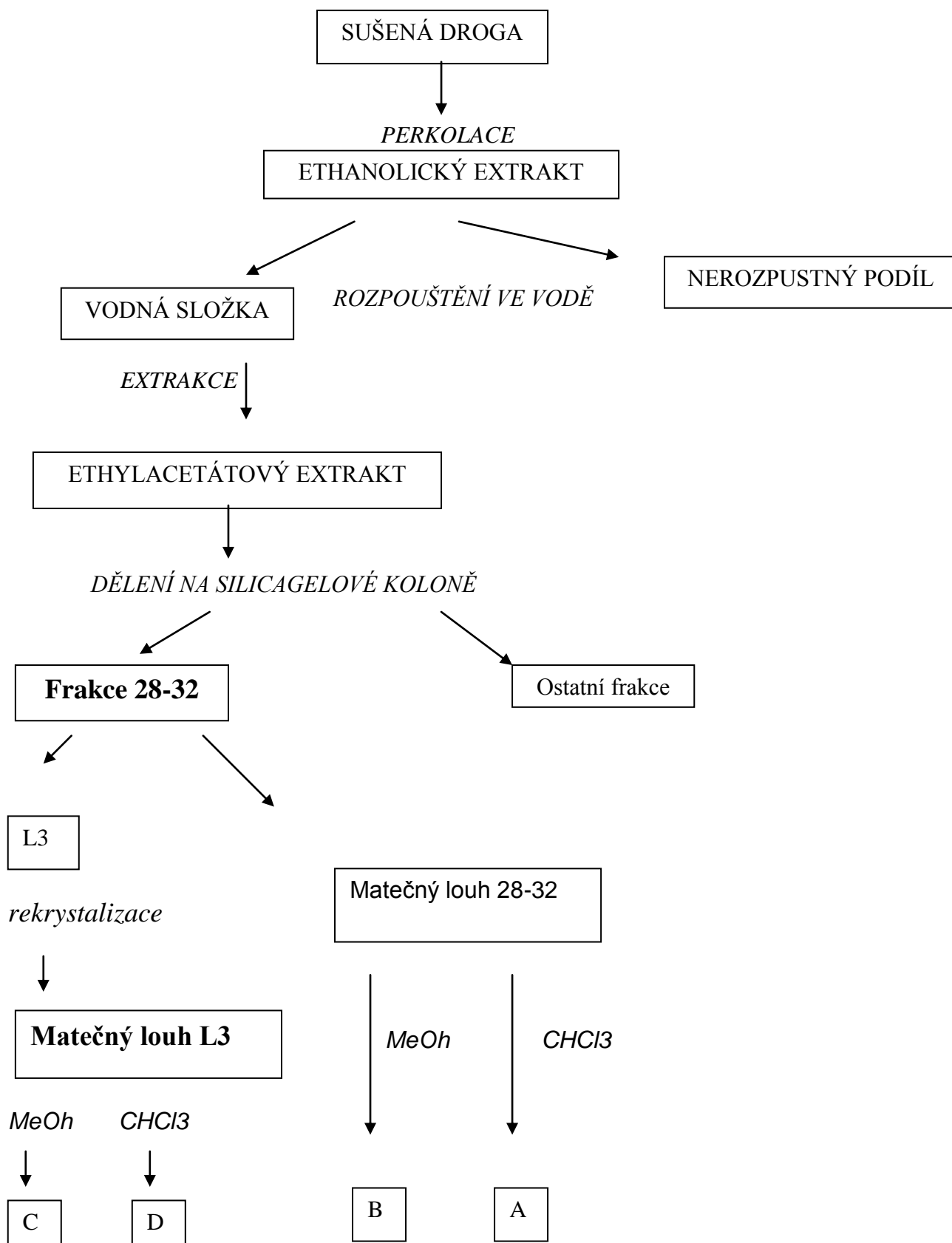
Vasicinon - získán izolací na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Faf UK v HK.

L3 – získána izolací v Diplomové práci <sup>(29)</sup> na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Faf UK v HK.

Standardy alkaloidů byly nanášeny ve formě 1% methanolických roztoků.

### III.3 ZPRACOVÁNÍ ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

#### III.3.1 SCHÉMA I.



### III.3.2 PRÁCE S MATEČNÝMI LOUHY L3

K práci byly použity matečné louhy z frakcí 28-32, po dělení na silikagelové koloně, v nichž se vyskytovala L3.

Provedena orientační TLC 3 s matečnými louhy z frakce 28-32 z kolony a matečným louhem po rekrystalizaci L3.

#### III.3.2.1 TLC1

Adsorbent - Silica Gel F254

Mobilní fáze – S1

Detekce – UV 254, D2

Standard – L3 konc. 2,28%

Nanáška – matečný lough frakce 28-32 z kolony ( $f_{28-32}$ )  
matečný lough L3 po rekrystalizaci ( $ML_{L3}$ )

Obr. č. 1

schéma TLC1



Rf standardu L3 je 0,53

Vzorky přečištěny využitím rozdílné rozpustnosti látek v  $\text{CHCl}_3$  a MeOH. Všechny vzorky rozpuštěny nejprve v přebytku  $\text{CHCl}_3$ , roztok odfiltrován a nerozpustný zbytek rozpuštěn v MeOH. Poté provedena TLC 4.

### III.3.2.2 TLC2

Adsorbent - Silica Gel F254

Mobilní fáze – S3

Detekce – UV 254, D1

Standard – L3 konc. 2,28%

Nanáška - A – ( $f_{28-32}$ ) v  $\text{CHCl}_3$

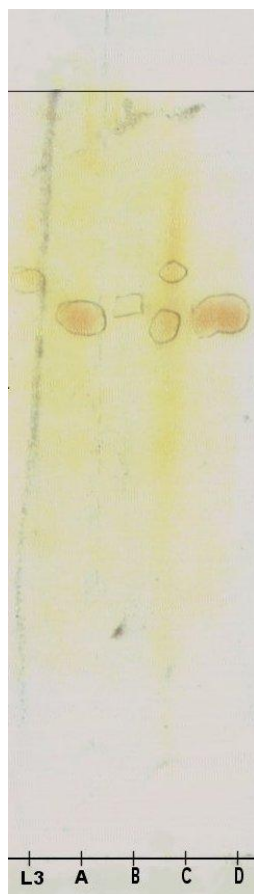
B – ( $f_{28-32}$ ) v MeOH

C - ( $\text{ML}_{L3}$ ) v MeOH

D – ( $\text{ML}_{L3}$ ) v  $\text{CHCl}_3$

Obr. č. 2

Schéma TLC2





Ve frakcích rozpustných v  $\text{CHCl}_3$  byly po detekci UV přítomny skvrny s  $R_f$  hodnotou 0,7, které se po detekci činidlem D1 a následném zahřátí zbarvily do oranžova.  $R_f$  standardu byla 0,76, v žádném z ostatních vzorků není přítomna látka se stejnou  $R_f$  hodnotou, vzorek C se dělí na dvě skvrny s  $R_f$  0,77 a  $R_f$  0,66 a vzorek B  $R_f$  0,72.

U látek s  $R_f$  hodnotou 0,7 provedena detekce dalšími činidly

D2 NEGATIVNÍ

D3 NEGATIVNÍ

Objemnější vzorek D, ponechán krystalizovat, se získanými krystaly provedena TLC 3

### III.3.2.3 TLC 3

Adsorbent - Silica Gel F254

Mobilní fáze – S2

Detekce – UV 254, D1

Standard – L3 (izolovaná v DP), konc. 2,28%

Nanáška – vzorek D

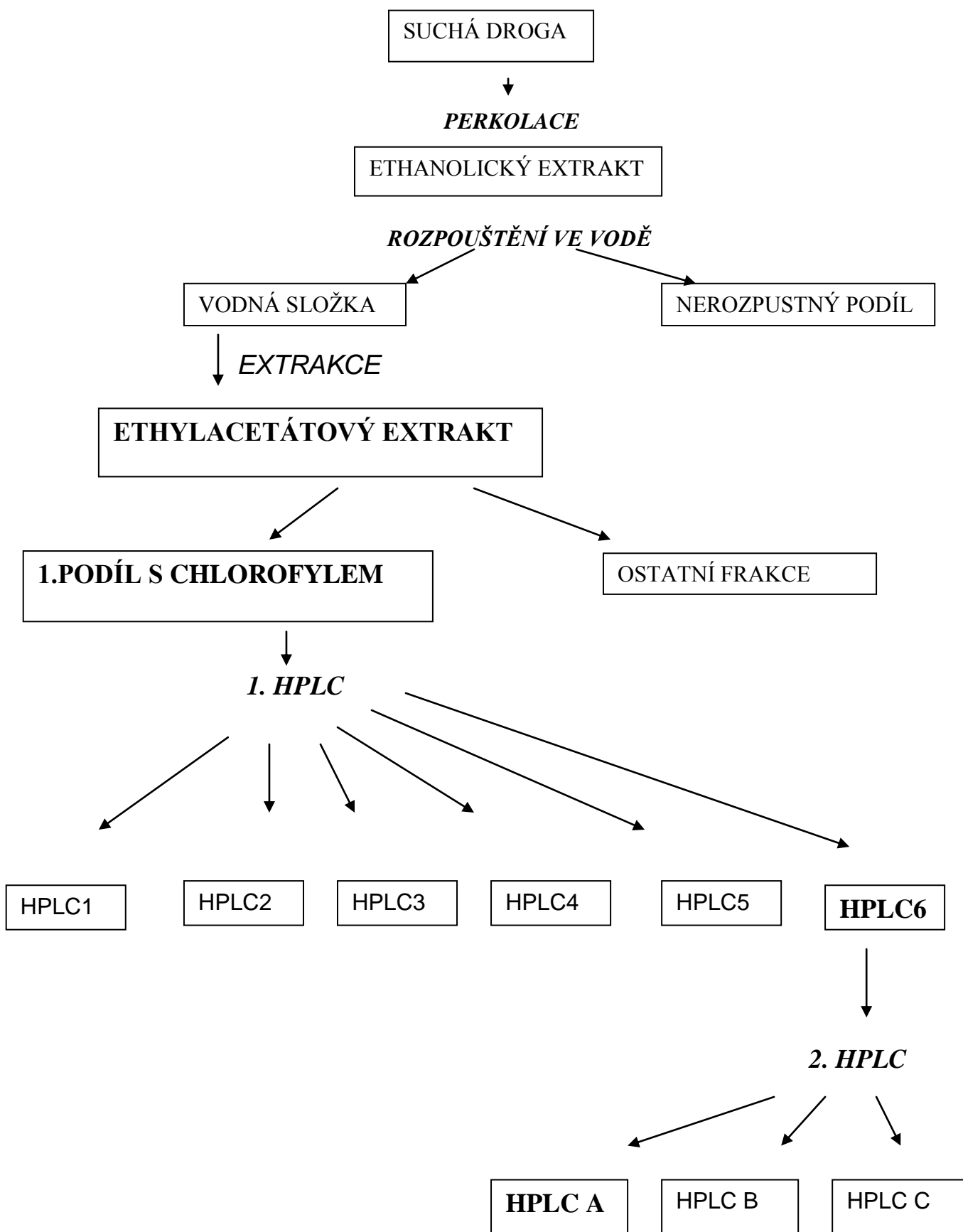
Obr. č. 3

Schéma TLC3



Rf hodnoty 0,67 L3 i krystalů korespondují, po detekci činidlem D1 a zahřátí se skvrna odpovídající krystalům zbarvila oranžově.

### III.3.3 SCHÉMA II.



### III.3.4 ZPRACOVÁNÍ 1. ETHYLACETÁTOVÉHO PODÍLU

Výchozí množství materiálu činilo 1,0561g suchého extraktu. Pro ověření přítomnosti L3 v extraktu a míry degračních procesů byla provedena TLC1.

#### III.3.4.1 TLC4

Adsorbent - Silica Gel F254

Mobilní fáze S1

Detekce – UV 254, denzitometr při 280nm, Dragendorfovo činidlo

Standard – L3 (izolovaná v DP), konc. 2,28%

Nanáška – EtAc Extrakt v konc. 0,96%, linomat 20 $\mu$ l

Obr. č. 4

Schéma TLC4



### III.3.4.2 Výsledky denzitometrického měření

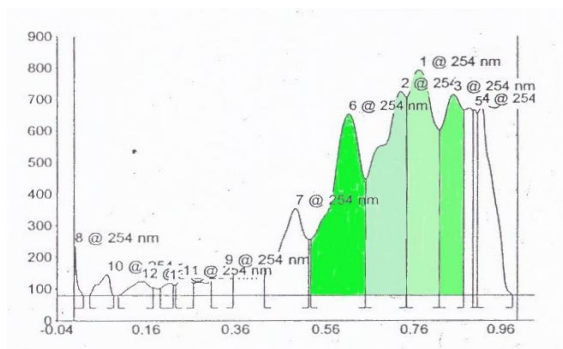
Obr. č. 5

Tabulka hodnocení chromatogramu EtAc extraktu

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	0.0	0.00	155.5	3.48	0.02	0.2	1198.3	0.39	8
2	0.04	0.4	0.07	66.1	1.48	0.09	0.3	2499.1	0.81	10
3	0.10	0.3	0.15	44.1	0.99	0.18	24.1	2845.4	0.92	12
4	0.19	22.4	0.21	38.8	0.87	0.22	33.8	1290.7	0.42	13
5	0.23	33.6	0.24	52.5	1.17	0.27	39.4	2324.8	0.76	11
6	0.31	44.4	0.34	85.8	1.92	0.36	64.9	4475.3	1.45	9
7	0.43	86.9	0.49	275.2	6.15	0.52	176.5	22860.6	7.43	7
8	0.53	176.1	0.61	574.1	12.84	0.65	367.8	61114.8	19.85	6
9	0.65	367.8	0.73	645.6	14.44	0.74	628.4	62673.6	20.36	2
10	0.75	628.1	0.77	713.1	15.95	0.82	523.6	62670.3	20.36	1
11	0.82	523.6	0.85	635.6	14.21	0.88	585.6	43898.1	14.26	3
12	0.90	585.7	0.90	587.9	13.15	0.91	575.0	8164.9	2.65	5
13	0.91	575.0	0.92	597.3	13.36	0.99	0.8	31861.4	10.35	4

Obr. č. 6

Hodnocení chromatogramu EtAc extraktu



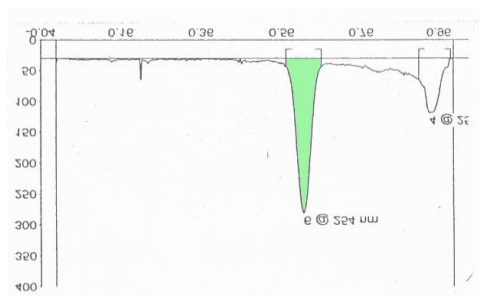
Obr. č. 7

Tabulka hodnocení chromatogramu L3

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
Peak deleted by operator										
1	0.57	13.2	0.62	251.3	73.76	0.66	12.1	13497.7	70.98	6
Peak deleted by operator										
2m	0.91	34.6	0.94	89.4	26.24	0.99	0.3	5519.4	29.02	4

Obr. č. 8

Hodnocení chromatogramu L3



UV detekce prokázala přítomnost velkého množství látek, i skvrnu s Rf hodnotou v oblasti Rf standardu, pro ověření přítomnosti L3 bylo použito UV spekter.

Na základě denzitometrické detekce vytipovány čtyři zajímavé látky, s největším poměrným zastoupením, pro další zpracování. Jedná se o látky označené jako 1, 2, 3 a 6.

Látka č 1 s absorpčním maximem v oblasti 276nm. Rf 0,77

Látka č 2 s absorpčním maximem v oblasti 315nm. Rf 0,73

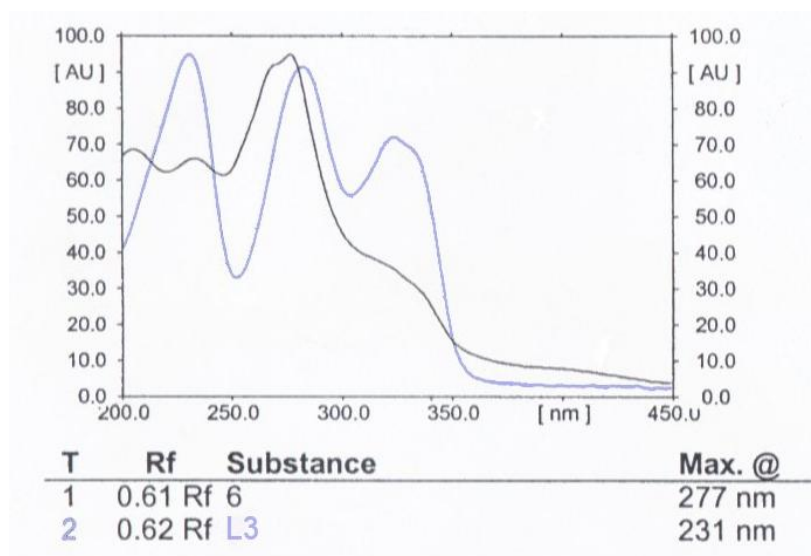
Látka č 3 s absorpčním maximem v oblasti 297nm. Rf 0,85

Látka č. 6, s absorpčním maximem v oblasti 277nm. Rf 0,61

standard L3 má Rf 0,62, velmi blízko L6

Obr. č. 9

### UV spektrum látky č.6 a standardu L3



Po neúspěšném pokusu o krystalizaci použita pro separaci jednotlivých složek ze zbylého extraktu preparativní HPLC1.

### **III.3.4.3 PREPARATIVNÍ HPLC č. 1**

Izokratická HPLC

Mobilní fáze H<sub>2</sub>O : MeOH 50:50

Rychlost 18ml/min

Pumpa : KNAUER Preparative pump K-1800

Detektor : MERCK KNAUER

Sběrač : BUCHI B-484 Fraction collector

Kolona : MERCK, HIBAR PRE-PACKED COLUMN RT 250x25mm, LiCHrosorb RP18,  
7μm

Celý extrakt rozdělen na šest frakcí, které byly označeny jako Hplc 1 – 6.

Hplc1



Po zahuštění jednotlivých frakcí byla provedena TLC 5

Aby bylo možno orientačně určit zda jsou zkoumané látky původní, nebo zda jde o degradační produkty, byl připraven srovnávací extrakt z čisté drogy.

### III.3.4.4 TLC 5

Adsorbent - Silica Gel F254

Mobilní fáze – S1

Detekce – UV 254, denzitometr při 280nm

Standard – L3 (izolovaná v DP)

vasicinon

Nanáška – HPLC 1-6 a krystaly z HPLC 6, linomat 20 $\mu$ l

Čerstvý extrakt, linomat 20 $\mu$ l

### III.3.4.5 Příprava čerstvého extraktu

1g sušené nati *Adhatoda vasica*, stejný jako pro celou extrakci, byl extrahován do 5ml EtOH 70% za studena po dobu 30min v ultrazvukové lázni, poté byl extrakt odfiltrován a doplněn lihem (70%) do 10ml.

### III.3.4.6 Výsledky denzitometrického měření

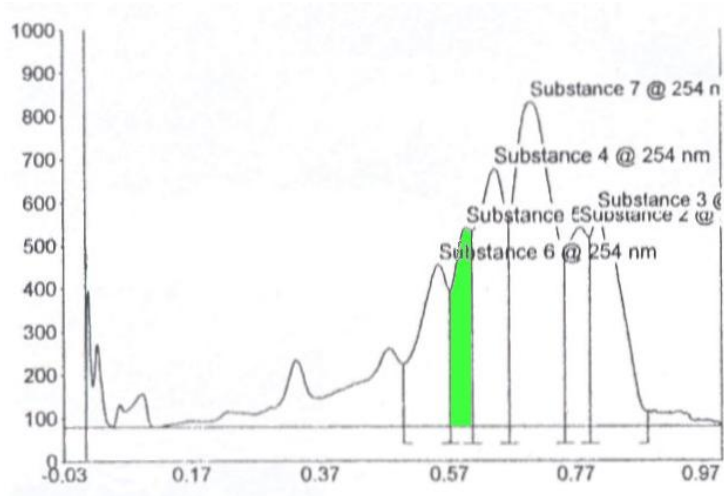
Obr. č. 11

Tabulka hodnocení chromatogramu dráhy odpovídající HPLC 5

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.50	144.3	0.55	374.3	11.93	0.57	313.2	28975.4	12.17	Substance 6
2	0.57	313.2	0.59	459.8	14.65	0.60	453.0	20937.2	8.80	Substance 5
3	0.60	453.0	0.64	597.4	19.04	0.66	489.8	44518.7	18.70	Substance 4
4	0.66	489.8	0.70	751.3	23.94	0.75	409.6	78357.7	32.92	Substance 7
5	0.75	409.6	0.77	460.7	14.68	0.79	436.7	26040.5	10.94	Substance 2
6	0.79	436.7	0.80	494.2	15.75	0.88	33.3	39226.0	16.48	Substance 3

Obr. č. 12

Hodnocení chromatogramu dráhy odpovídající HPLC 5



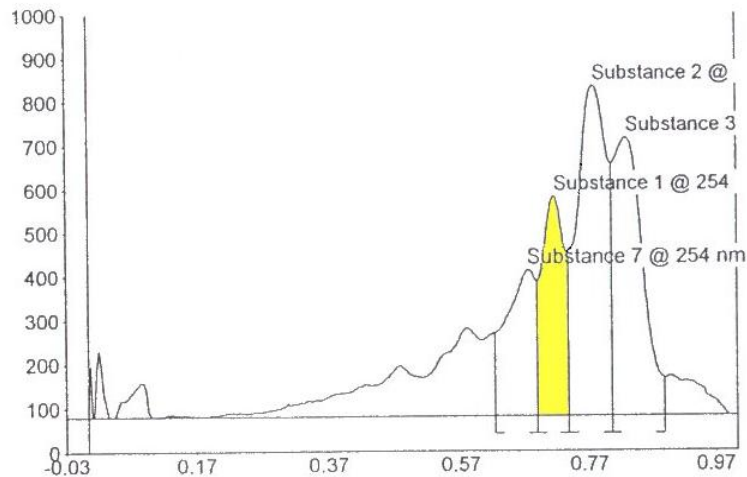
Obr. č. 13

Tabulka hodnocení chromatogramu dráhy odpovídající HPLC 6

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.62	190.0	0.67	334.2	15.00	0.68	308.3	25687.9	15.54	Substance 7
2	0.68	308.3	0.71	502.0	22.53	0.73	359.3	29842.3	18.05	Substance 1
3	0.73	359.3	0.77	755.9	33.93	0.80	577.2	60072.2	36.34	Substance 2
4	0.80	577.2	0.83	635.8	28.54	0.88	87.0	49683.9	30.06	Substance 3

Obr. č. 14

Hodnocení chromatogramu dráhy odpovídající HPLC 6



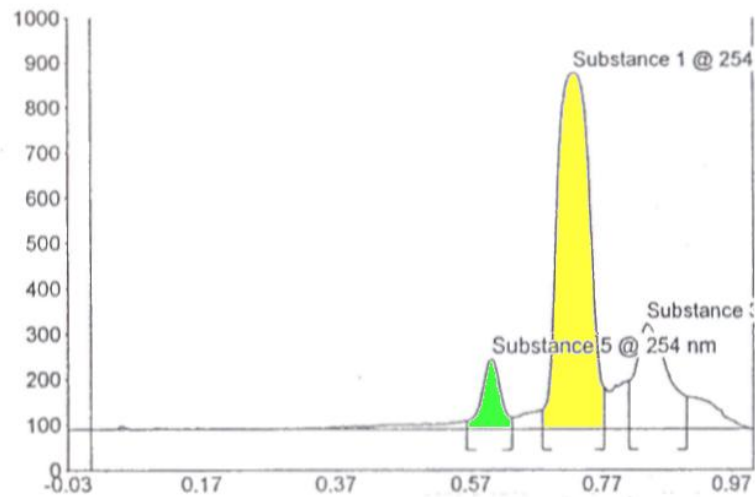
Obr. č. 15

Tabulka hodnocení chromatogramu dráhy odpovídající krystalům z HPLC 6

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.56	17.8	0.60	155.3	13.19	0.63	26.4	7448.8	8.08	Substance 5
Peak deleted by operator										
2	0.67	41.9	0.72	789.1	67.04	0.77	89.1	65403.9	70.93	Substance 1
Peak deleted by operator										
3	0.81	107.2	0.83	232.7	19.77	0.90	71.1	19353.8	20.99	Substance 3

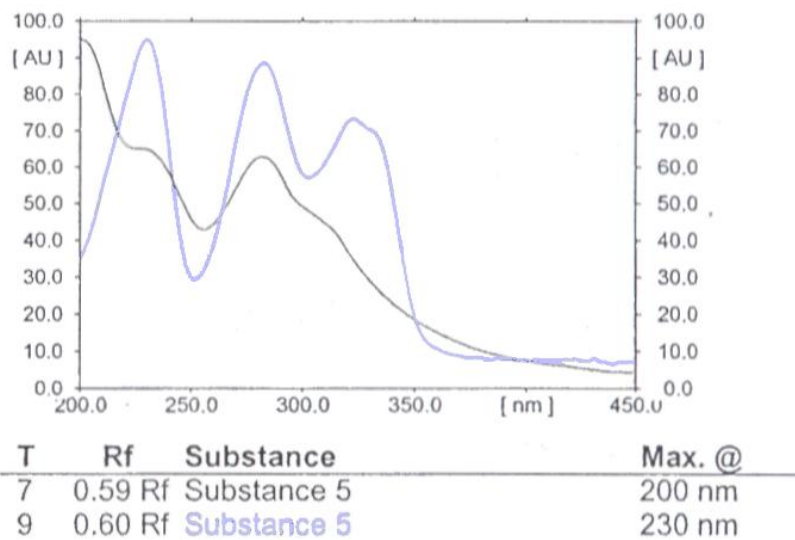
Obr. č. 16

Hodnocení chromatogramu dráhy odpovídající krystalům z HPLC 6



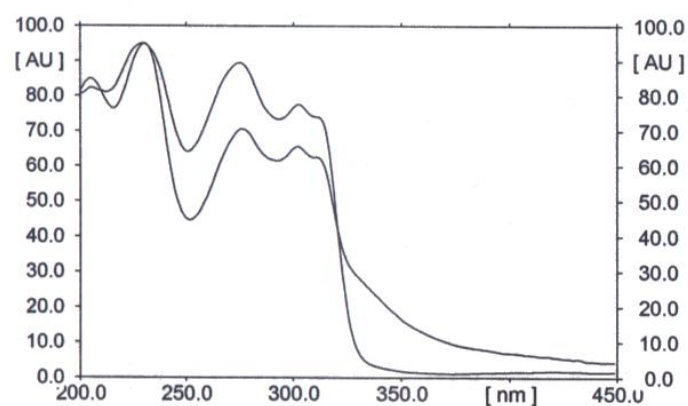
Obr. č. 17

UV spektrum Substance 5



Obr. č. 18

UV spektrum Substance 1



T	Rf	Substance	Max. @
8	0.71 Rf	Substance 1	230 nm
9	0.72 Rf	Substance 1	230 nm

Frakce HPLC 5 je směsí více látek, jako zajímavá se jevila látka označená jako Substance 5 s Rf 0,56, jejíž UV spektrum (obr. 17, modrá křivka) je ve velmi dobré shodě s UV spektrem L3 (obr.9, modrá křivka). Rf L3 v této soustavě je 0,6. Pro příliš malé množství materiálu, nebyla frakce dále zpracovávána.

Ve frakci HPLC 6 se nachází výrazná látka s Rf hodnotou 0,7 označená jako Substance 1, stejná látka se nacházela i v dráze odpovídající krystalům z HPLC 6, Rf hodnoty 0,71 a 0,72 korespondují, UV spektra jsou si velmi blízká. Opětovný pokus o krystalizaci nepřinesl uspokojivé výsledky. Proto byly obě frakce spojeny a dále děleny pomocí preparativní HPLC2.

### **III.3.4.7 PREPARATIVNÍ HPLC č. 2**

Přečištění frakce HPLC 6, dělen hlavní pík

Izokratická HPLC

Mobilní fáze H<sub>2</sub>O : MeOH 50:50

Rychlost 18ml/min

Pumpa : KNAUER Preparative pump K-1800

Detektor: MERCK KNAUER

Sběrač : BUCHI B-484 Fraction collector

Kolona : MERCK, HIBAR PRE-PACKED COLUMN RT 250x25mm, LiCHrosorb RP18,  
7µm

Získány celkem tři frakce, které byly označeny jako H6 1-3.

H6 1 retenční čas 15min

H6 2 retenční čas 17,2min

H6 3 retenční čas 18,6min

Hplc2

Po zahuštění jednotlivých frakcí provedena TLC 12

### III.3.4.8 TLC 12

Adsorbent - Silica Gel F254

Mobilní fáze – S4

Detekce – denzitometr při 280nm

Nanáška – H6 1 – konc., linomat 40 $\mu$ l

H6 2 - konc., linomat 40 $\mu$ l

H6 3 - konc., linomat 40 $\mu$ l

H6 1 – dil., linomat 20 $\mu$ l

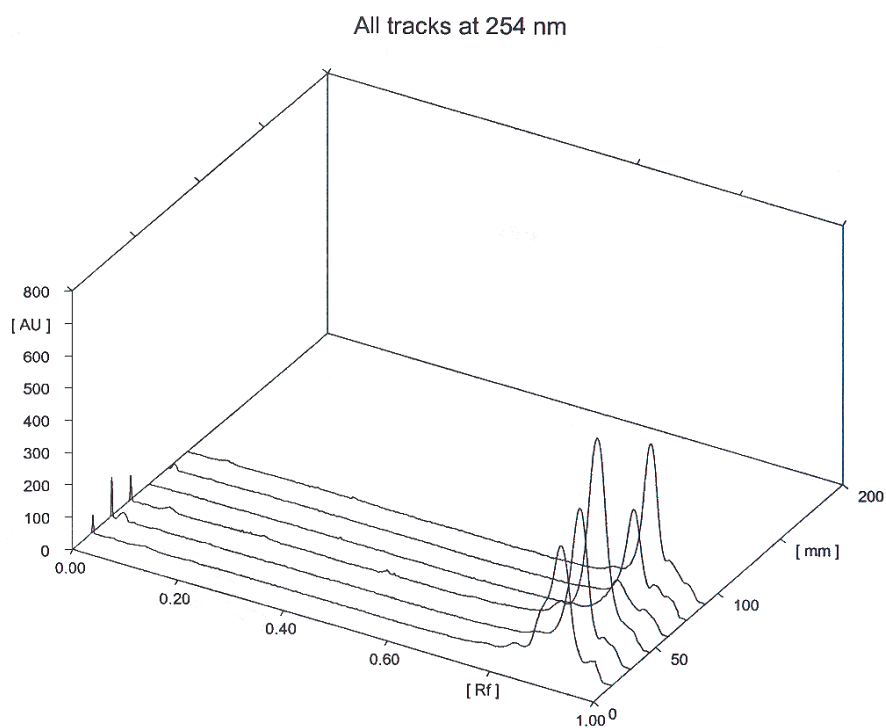
H6 2 – dil., linomat 20 $\mu$ l

H6 3 – dil., linomat 20 $\mu$ l

### III.3.4.9 Výsledky denzitometrického měření

Obr. č. 20

Hodnocení chromatogramu dráhy odpovídající Substanci 1



Obr. č. 21

Tabulka hodnocení chromatogramu dráhy 1-6 odpovídající nejvyšším píkům

Track	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
H6 1 konc.	0,83	40,1	0,90	383,5	78,42	0,95	45,4	29283,7	88,93	Substance 1
H6 2 konc.	0,84	33,8	0,90	448,5	80,65	0,94	64,6	27085,5	85,90	Substance 1
H6 3 konc.	0,84	77,3	0,90	613,3	88,08	0,95	71,8	40036,5	92,12	Substance 1
H6 4 dil.	0,85	22,1	0,90	128,6	67,23	0,94	53,3	10123,5	79,71	Substance 1
H6 5 dil.	0,84	20,5	0,90	292,6	65,77	0,93	64,5	15692,1	75,78	Substance 1
H6 6 dil.	0,84	35,9	0,89	444,0	76,61	0,92	95,5	22648,4	79,92	Substance 1

Obr. č. 22

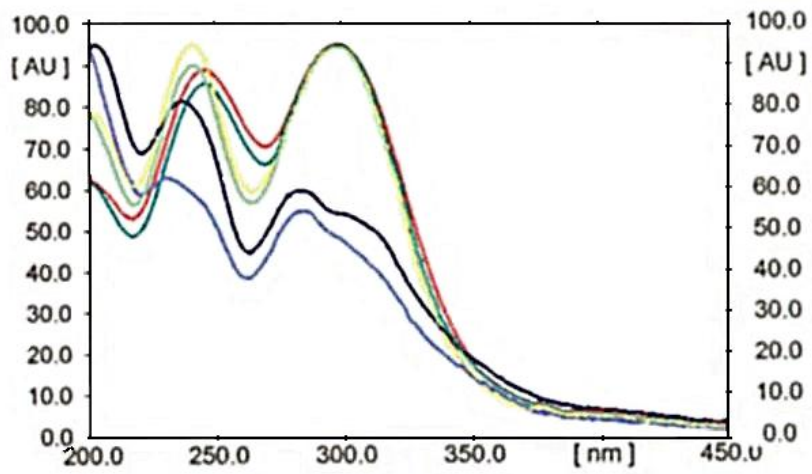
Tabulka hodnocení chromatogramu drah odpovídajících Substanci 1

T	Rf	Substance	Max. @
1 <sub>konc.</sub>	0.90 Rf	Substance 1	203 nm
2 <sub>konc.</sub>	0.90 Rf	Substance 1	241 nm
3 <sub>konc.</sub>	0.90 Rf	Substance 1	299 nm
1 <sub>dil.</sub>	0.90 Rf	Substance 1	200 nm
2 <sub>dil.</sub>	0.90 Rf	Substance 1	299 nm
3 <sub>dil.</sub>	0.89 Rf	Substance 1	299 nm



Obr. č. 23

UV spektra drah odpovídajících Substanci 1



Reakce Substance 1 ve všech drahách H6 1-3 s čínidly D1 a D2 negativní.  
Pro příliš malé množství materiálu byla práce v tomto bodě ukončena.

## **IV .DISKUZE**

Využití léčivých účinků *Adhatoda vasica* NESS. má v indickém léčitelství dlouhou tradici. Za hlavního nositele biologických účinků byly označeny chinazolinové alkaloidy, hlavně vasicin a vasicinolon. Vzhledem k tomu, že většina výzkumných prací, která byla prováděna v místě výskytu rostliny, jihovýchodní Asii, má rozporuplné a málo reprodukovatelné závěry, je v současnosti prováděn další výzkum s cílem získání více validních výsledků. Katedra farmaceutické botaniky a ekologie je zapojena do výzkumné práce, jejímž cílem je určit a popsat jednotlivé obsahové látky v souladu se západními vědeckými standardy a izolovat je v čisté formě, aby bylo možno testovat jejich případnou biologickou aktivitu.

Během diplomové práce *Fytochemický výzkum Adhatoda vasica II.*<sup>(29)</sup>, na kterou tato práce navazuje, byla izolována bílá krystalická látka označená jako L3, která byla na základě výsledků měření <sup>13</sup>CNMR a <sup>1</sup>HNMR spekter určena jako chinazolinový alkaloid, se strukturou příbuznou vasicinu. Další analýzy na Katedře organické a anorganické chemie předpokládanou strukturu *3S,7-dihydroxyvasicinolonu* potvrdily a konečná syntéza přinesla látku shodné struktury, ta je nyní předmětem biologických pokusů. Vzhledem k tomu, že chinazolinové alkaloidy vasicin a vasicinon jsou známy jako látky biologicky aktivní, je pravděpodobné, že i tato látka by mohla mít též podobné vlastnosti.

V rigorózní práci bylo pokračováno v izolačních postupech diplomové práce s cílem získat zpracovatelné množství krystalů alkaloidu označeného jako L3, *3S,7-dihydroxyvasicinolonu*, které by bylo možno použít k dalším převážně biologickým testům a ověřit tak jeho případnou biologickou aktivitu. Proto byly shromážděny všechny meziprodukty získané v průběhu předchozí extrakce, které by mohly alkaloid označený L3 obsahovat, a byly dále zpracovávány s cílem izolovat další krystaly L3, popřípadě další látky. Vzhledem k tomu, že chinazolinové alkaloidy vasicin, vasicinon atd. jsou známy jako látky nestálé, snadno podléhající oxidačním procesům, zvláště pod vlivem slunečního záření a zvýšené teploty<sup>(4)</sup>, očekávala se přítomnost degradačních produktů L3 i v použitých vzorcích.

Jako první byly vybrány matečné louhy, ze kterých byla látka získána krystalizací. Jedná se o zbytek frakce 28-32 (f<sub>28-32</sub>) získané dělením na silicagelové koloně a matečný luh L3 (ML<sub>L3</sub>), odpadní produkt při přečišťování L3 rekrystalizací (viz. schéma 1). Všechny tyto

vzorky byly skladovány v lednici ve formě zahuštěných roztoků po dobu asi šesti měsíců. Pro ověření přítomnosti L3 v roztocích  $f_{28-32}$  a  $ML_{L3}$  byla provedena orientační TLC1 (viz. Obr.1). Skvrna s  $R_f$  okolo 0,53 odpovídající standardu (L3), se nacházela v obou vzorcích, po detekci činidlem D2 se však obě skvrny barvily fialově, zatímco L3 s činidlem D2 nereaguje.

Pro další práci byly vzorky přečištěny využitím rozdílné rozpustnosti látek v chloroformu a methanolu. Dosud byla používána jako rozpouštědlo směs methanolu a chloroformu v poměru 85:15. Protože L3 je špatně rozpustná v chloroformu, byly nejprve všechny vzorky rozpuštěny v chloroformu a přefiltrovány a nerozpustný zbytek byl rozpuštěn v přebytku methanolu. Poté byla se všemi frakcemi provedena TLC2 (viz. Obr.2.), vzorky byly označeny A  $f_{28-32}$  v  $CHCl_3$ ; B  $f_{28-32}$  v MeOH; C  $ML_{L3}$  v MeOH; D  $ML_{L3}$  v  $CHCl_3$ . Ve frakcích rozpuštěných v chloroformu (A, D) byly pod UV lampou jasné skvrny s  $R_f$  0,7, které se po detekci činidlem D1 barvily do oranžova. L3 měla  $R_f$  0,76 a s činidlem D1 nereaguje. V methanolickeém roztoku B, byla jedna skvrna s  $R_f$  0,72 nereagující s D1 a v MeOH roztoku C se vydělily dvě skvrny s  $R_f$  0,77 a 0,66 barvících se do oranžova po detekci D1. U látek s  $R_f$  0,77, rozpuštěných v chloroformu (ze vz. A,D) byla provedena orientační detekce činidly D2 a D3, všechny reakce byly negativní.

Objemnější vzorek D byl ponechán krystalizovat, ze získanými drobnými bílými krystaly byla provedena TLC3 (viz. Obr. 3).  $R_f$  hodnoty 0,67 L3 i krystalů korespondují, po detekci činidlem D1 a zahřátí se skvrna odpovídající krystalům ze vzorku D barví oranžově, L3 nereaguje. Látky tedy nejspíše nejsou totožné, pravděpodobně by se mohlo jednat o další alkaloid, který se chová v soustavě S2 stejně jako L3, zatímco v polárnější soustavě S3 zůstává blíže startu. Pozitivní reakce s činidlem D1 po zahřátí by tomu také nasvědčovala. Vzhledem k tomu, že látka byla získána z matečného louhu po izolaci L3, který byl delší dobu skladován v lednici a alkaloidy *Adhatoda vasica* jsou známy jako nestálé látky<sup>(4)</sup>, je velmi pravděpodobné že se jedná o degradační produkt L3. Vzhledem k malému množství materiálu nebylo možno tento předpoklad ověřit a práce byla v tomto bodě ukončena.

Dalším vzorkem, který byl vybrán jako potenciální zdroj L3, byl první podíl ethylacetátového extraktu (viz. Schéma 2), který byl během předchozí extrakce vyřazen pro příliš vysoký obsah chlorofylu. Tento podíl byl po předchozí extrakci zahuštěn na

vakuové odparce a skladován v lednici. Množství výchozího materiálu činilo 1,056g suchého extraktu.

Vzhledem k již konstatované nestabilitě alkaloidů, byla nejprve provedena srovnávací TLC se standardem L3, aby prokázala, zda je alkaloid ve frakci přítomen. Protože se jednalo o velmi bohatý extrakt, nebylo možné hodnotit chromatogram vizuálně pod UV lampou a k detkci bylo využito denzitometrie. Jako zajímavá se jevila oblast s Rf hodnotami 0,53–0,82 odpovídající čtyřem píkům. P1 s  $\lambda$  max 276nm a Rf 0,77; P2 s  $\lambda$  max 315nm a Rf 0,73; P3 s  $\lambda$  max 297nm a Rf 0,85; P6 s  $\lambda$  max 277nm a Rf 0,61. (viz obr. č. 5,6) Rf standardu v soustavě byla 0,62. Protože Rf P6 a L3 jsou velmi blízké, byla porovnána UV spektra (viz. Obr. č.9). Ukázalo se, že UV spektra látek se neshodují, vykazují však některé společné znaky a je možné, že by mohlo jít o posuny způsobené vlivem nečistot.

Pokus o krystalizaci z extraktu nebyl úspěšný a k separaci byla použita preparativní HPLC. Izokratickou HPLC1 s mobilní fází voda:methanol 1:1 byl extrakt rozdělen na šest frakcí, které byly označeny jako HPLC 1-6 (viz obr. č. 10). Po zahuštění byly vzorky ponechány krystalizovat. Získány byly pouze velice špinavé krystaly, které vypadly z frakcí HPLC 6 a v malém množství i z HPLC5. Všechny frakce a roztok získaných krystalů byly nanесeny na TLC5. Pro srovnání, zda se jedná o látky původní, nebo o degradační produkty byl připraven čerstvý ethanolický extrakt ze sušené drogy. Jako standardy byly nanесeny vasicinon a L3.

Vizuální hodnocení chromatogramu pod UV ukázalo, že se jedná o směsi látek, navíc výrazně znečištěné chlorofylem, původnost látek v suché droze tak nebylo možné posoudit. Pro denzitometrické hodnocení byly vybrány frakce, které měly tendenci krystalizovat, tj. HPLC5 a HPLC6 a roztok získaných krystalů, ve kterých byla patrná výrazná skvrna s Rf blízko cíle.

Výsledky denzitometrického proměření těchto drah ukázaly, že ve frakci HPLC 5 se nachází látka s Rf 0,56 označená jako Substance 5 (viz obr. č. 11,12,15,16) s čistým UV spektrem  $\lambda$  max 230nm (obr. č. 17), které je v dobré shodě s UV spektrem L3  $\lambda$  max 231nm (obr. č. 9). Rf L3 v této soustavě je 0,61. Látka označená jako Substance 5 se nacházela také v dráze odpovídající krystalům z HPLC 6 její Rf hodnota je 0,6, UV spektrum se ale liší (obr. č. 17). Vzhledem k malému množství materiálu nebylo možno

potvrdit přítomnost L3 ve frakci HPLC 5 případně v krystalech z HPLC 6 a práce musela být ukončena.

Ve frakci HPLC 6 se nacházela výrazná látka označená jako Substance 1 s  $R_f$  0,71 a  $\lambda_{max}$  230nm (viz obr. č. 13-16). Látka s blízkou  $R_f$  0,71 a velice blízkým UV spektrem  $\lambda_{max}$  230nm (viz obr. č. 18) tvořila majoritní podíl frakce odpovídající krystalům, které vypadly z HPLC 6. Byl proto zopakován pokus o krystalizaci, bylo sice získáno malé množství krystalů, byly však natolik znečištěné, že byly znovu rozpuštěny a pro separaci této látky byla zvolena preparativní HPLC2.

Výchozího materiálu pro preparativní HPLC2 bylo cca 0,3g ve formě suchého extraktu. Rozdělen byl do tří frakcí označených H<sub>6</sub> 1-3 s retenčními časy H<sub>6</sub> 1 – 15min, H<sub>6</sub> 2 - 17,2min a H<sub>6</sub> 3 - 18,6min (viz obr. č. 19). Po zahuštění byla provedena TLC 6, nanášena byla každá frakce dvakrát, vždy v nižší (20  $\mu$ l) a vyšší (40  $\mu$ l) koncentraci, označeno jako dil. respektive konc. K detekci byla využita opět denzitometrie.

Ve všech vzorcích byla detekována látka označená jako Substance 1 (viz obr. č. 20,21) s  $R_f$  0,9, což odpovídá  $R_f$  L3 v použité dělicí soustavě (S4). UV spektra Substance 1 z jednotlivých drah se neshodují, avšak spektra H<sub>6</sub> 2 (konc. i dil.) a H<sub>6</sub> 3(konc. i dil.) vykazují některé shodné rysy (viz obr. č. 23) jako absorpční maxima v oblasti okolo 240 a 300 nm a minima v oblasti okolo 220 a 250-270 nm. Je možné, že posuny ve spektrech jsou způsobeny vlivem nečistot. UV spektrum L3 (viz obr. č. 9) není ve shodě ani s jedním ze spekter H<sub>6</sub> 1-3. Je možné, že by se mohlo jednat o nějakou další látku, možná degradační produkt L3.

Pro možnost potvrzení alkaloidní struktury byla provedena detekce činidly D1 a D2 na chromatogramu TLC6. Reakce s oběma činidly byla negativní, stejně se však chová i L3. Z důvodu malého množství materiálu byla práce v tomto bodě ukončena.

## **V .ZÁVĚREČNÉ SHRnutí**

Úkolem této rigorózní práce bylo získat zpracovatelné množství krystalů L3, určené jako *3S,7-dihydroxyvasicinolon*, z meziproduktů získaných v průběhu jeho izolace v rámci diplomové práce <sup>(29)</sup>, posoudit jeho stabilitu, popřípadě popsat jeho degradační produkty. Zhodnocením získaných vzorků bylo dosaženo těchto výsledků.

1. V matečných loužích L3 (*3S,7-dihydroxyvasicinolon*) byly detekovány látky, chovající se jako alkaloidy, žádná však nevykazovala shodné chování s L3. Je pravděpodobné, že se jedná o jeho degradační produkty.
2. Ve frakci 5 získané izokratickou HPLC ethylacetátového extraktu se nacházela látka, která vykazovala stejné charakteristiky (R<sub>f</sub>, UV spektrum, reakce s detekčními činidly) jako L3 (*3S,7-dihydroxyvasicinolon*).
3. Přítomnost L3 (*3S,7-dihydroxyvasicinolon*) nemohla být potvrzena z důvodu malého množství materiálu.
4. Ve frakci HPLC 6 se nacházela látka, jejíž některé fyzikálně-chemické charakteristiky odpovídaly vlastnostem dříve izolovaných alkaloidů.
5. Totožnost této látky nemohla být určena, neboť se ani po přečištění pomocí preparativní HPLC nepodařilo získat zpracovatelné množství čistých krystalů.



## **VI .POUŽITÁ LITERATURA**

1. Takhtajan A. *Diversity and Classification of Flowering plants*. 1.vydání. New York, Chichester, West Sussex: Columbia University press, 1996. 643 s. ISBN 0-231-10098-1(c1)
2. Durkee L. H. *part IX. Family 177. Acanthaceae. in Woodson E. Jr.; Schery R.W. and collaborators. Flora of Panama*. Ann. Missouri Bot. Gard. 65, pp.155-284 (1978), z databáze J Astor.
3. *Dictionary of natural products on CD-ROM*. London: Chapman and Hall. 1998. vol. 6:2
4. Chowdhury B.K. *Photochemical Oxidation of Vasicine and Related Compounds*. Indian J. Chem. 26B, pp. 688-689 (1987)
5. Ahmed El-Sawi S.; Abd El-Megeed Hashem F.; Ali, A.M. *Flavonoids and antimicrobial volatiles from Adhatoda vasica Ness*. Pharm. Pharmacol. Lett. 9, pp. 52-56 (1999)
6. Huq M.E.; Ikram M.; Warsi S.A. *Chemical composition of Adhatoda vasica Linn. II*. Pakistan J. sci. Ind. Res. 10, pp. 224-225 (1967) převzato z (28)
7. Hubík J.; Dušek J.; Spilková A.; Šícha J. *Obecná farmakognosie II., sekundární látky*. 3. vydání. Praha: SPN, 1986. 297 s.
8. Abd EL-Megeed Hashem F.; Ahmed Elsawi S. *Isoquinoline and quinazoline alkaloids of Adhatoda vasica*. Pharm. Pharmacol. Lett. 8, pp. 167-169 (1998)
9. Singh R.S.; Misra T.N.; Pandey H.S.; Singh B.P. *A new aliphatic alcohol from Adhatoda vasica*. Fitoterapia 63, pp. 262-263 (1992)
10. Singh R.S.; Misra T.N.; Pandey H.S.; Singh B.P. *Aliphatic hydroxyketones from Adhatoda vasica*. Phytochemistry. 30, pp. 3799-801 (1991)
11. Atal C.K. *Chemistry and pharmacology of vasicine - A new oxytoxic and abortifacient*. Regional Research Laboratory, Jammu Tawi (1980) převzato z (28)
12. Bhalla H. L.; Nimbkar A. Y. *Preformulation studies. III. Vasicinone, a bronchodilatory alkaloid from Adhatoda vasica Ness (absorption, potency and toxicity studies)*. Drug Dev. Ind. Pharm. 8, pp. 833-46 (1982) z Chem. Abstr. 98:46740
13. Gupta O.P.; Sharma M.L.; Ray Ghatak B.J.; Atal C.K. *Potent uterine activity of alkaloid vasicine*. Ind. J.Med.Res. 10, pp. 865-871 (1977) převzato z (28)
14. Jayant N. Dhuley. *Antitussive activity of Adhatoda vasica extract on mechanical or chemical stimulation-induced coughing in animals*. J. Ethnopharmacol., 67, pp. 361-364 (1999) převzato z Medline

15. Prakash A. O.; Saxena V.; Shukla S.; Tewari R. K.; Mathur S., Gupta A.; Sharma S.; Matrhur R., *Anti-implantation activity of some indigenous plants in rats*. Acta. Eur. Fertil., 16, pp. 441-8 (1985) převzato z Medline
16. Chandhoke Nimmi. *Vasicine, The alkaloid of Adhatoda vasica – a novel abortifacient*. Indian Drugs. 42, pp. 425-9 (1987) z Chem. Abstr. 108:723
17. Gupta O. P.; Anand K. K.; Ghatak B. J. Ray; Atal C. K. *Vasicine, alkaloid of Adhatoda vasica, a promising uterotonic abortifacient*. Indian J. Exp. Biol. 16, pp. 1075-7 (1978), z Chem. Abstr. 90:48435
18. Shri P. R. Krishnaukumar et al. Eds. *Selected Medicinal Plants of India (A Monograph of Identity, Safety and Clinical Usage.)* 1. vydání. Bombay: Chemexcil, 1992. 354 s.
19. Burgos R.; Forcelledo M.; Wagner H.; Muller A.; Hancke J.; Wikman G.; Croxato H. *Non-abortion effect of Adhatoda vasica spissum leaf extract by oral administration in rats*. Phytomedicine. 4, pp. 145-149 (1997)
20. Grange J. M.; Snell N. J. *Activity of bromhexine and ambroxol, semi-synthetic derivatives of vasicine from The Indian shrub Adhatoda vasica, against Mycobacterium tuberculosis in vitro*. J. Ethnofarmacol. 50, pp. 49-53 (1996) převzato z Medline
21. Brantner A. H.; Chakraborty A., *In vitro antibacterial activity of alkaloids isolated from Adhatoda vasica Ness*. Pharm. Pharmacol. Lett. 8, pp. 137-139 (1998)
22. Kumar Sheo; Gopal Krishna, *Screening of plant species for inhibition of bacterial population of raw water*. J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. A34, pp. 975-987 (1999) z Chem. Abst. 130:342673
23. Clamp J. R.; Hartog M.; Shelley J. H. *Carbohydrate-containing materials in urine from diabetics subjects*. Clin. Sci. 56, pp. 193-6 (1979)
24. Modak, A.T.; Rao M.M.R. *Hypoglycaemic activity of non-nitrogenous principle from The leaves of Adhatoda vasica Ness*. Ind. J. Pharm. 28, pp. 105-106 (1966) převzato z Medline (28)
25. Dhar M.L.; Dhar M.M.; Dhawan B.N.; Mehrotra B.N.; Ray C. *Screening of Indian plants for biological activity: part I*. Ind. J. Exp. Biol. 6, pp. 232-247 (1968) převzato z (28)
26. Suwal V.K. *Medicinal plants of Nepal*. Kathamadu: GNMF, 1976. pp. 8-9 převzato z (28)
27. Dymock W.; Waeden C.J.H.; Hooper D. *Pharmacographia Indica, A history of principal drugs of vegetable origin*. London: Paul, Trech, Trubner Co. Ltd, 1890. pp. 50-54 převzato z (28)

28. Cleason U. P.; Malmfors T.; Wikman G.; Bruhn J. G. *Adhatoda vasica: a critical review of ethnopharmacological and toxicological data*. J. Ethnopharmacol. 72, pp. 1-20 (2000)

29. Dundelová L., *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2003