UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

OBSAHOVÉ LÁTKY KVĚTŮ *HELIANTHUS ANNUUS* L.

(Rigorózní práce)

Hradce Králové 2006 Jiří Dresler

Chtěl bych touto cestou poděkovat prof. RNDr. Luďku Jahodářovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a všestrannou pomoc při vypracování této rigorózní práce. Mé poděkování patří i celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie.

OBSAH

1. Úvod a cíl práce……...….4
2. Literární část…….6
   2.1. Dosavadní poznatky o obs. látkách jazyk. květů *Helianthus annuus* L……7
3. Experimentální část…….12
   3.1. Charakteristika zpracovávaného materiálu……..13
   3.2. Chemikálie, chromatografický materiál a přístroje…….13
   3.3. Zpracování ethanolického extraktu jazykovitých květů……..16
      3.3.1. Zpracování suspenze ethanolického extraktu……16
      3.3.2. Zpracování suspenze krystalů K1…….18
      3.3.3. Zpracování suspenze krystalů K3…….28
4. Hodnocení výsledků a diskuze……30
5. Souhrn…….34
6. Literatura…….36

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Tato rigorózní práce navazuje na mou diplomovou práci "Fytochemická studie *Helianthus annuus* L.*"* Cílem této diplomové práce byla analýza jazykovitých květu a plodových lůžek *Helianthus annuus* L., čili extrakce rozemleté drogy, separace a následná identifikace obsahových látek. Jazykovité květy byly extrahovány ethanolem a dále byla z technických důvodů a časových důvodů zpracovávána pouze část tohoto extraktu. Tato část byla postupně rozdělena na chloroformový, butanolový extrakt a vodný zbytek. Butanolový extrakt byl pak dělen na molekulovém sítě Sephadex LH 20.

Z frakcí tohoto dělení byla izolována látka, jež byla na základě chemické struktury určena jako kyselina kaurenová. Z dalších frakcí získaných tímto dělení byla na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie izolována látky, jejíž chem. struktura byla nejprve určena pravděpodobně jako cholestan-5,22-dien-2-ol (3β,22E). Následnou analýzou se zjistilo, že se jedná o stigmasterol.

Nezpracovávaná část ethanolického extraktu jazykovitých květů byla po celou dobu analýz uložena v lednici. V průběhu doby vlastní analýzy zpracovávaného extraktu jazykovitých květů došlo k vypadávání většího množství krystalické látky. Jejich analýza nebyla provedena.

Úkolem rigorózní práce bylo provést fytochemickou analýzu zbývající části ethanolického extraktu jazykovitých květů *Helianthus annuus* L., s výhledem k izolaci jiných kaurenových derivátů než samotné kyseliny kaurenové.

2. LITERÁRNÍ ČÁST

2.1. DOSAVADNÍ POZNATKY O OBSAHOVÝCH LÁTKÁCH JAZYKOVITÝCH KVĚTŮ *HELIANTHUS ANNUUS* L.

Helianthus annuus L. - slunečnice roční- je jednoletá bylina z čeledi *Asteraceae*, řádu *Asterales*. Roslina má vzpřímenou, olistěnou a většinou jednoduchou nebo i více úbory zakončenou, odstálou a drsně chlupatou lodyhou, která je na povrchu zelená a uvnitř vyplněna bělavou dření. Lůžko úborů je skoro ploché, plevkami porostlé a tyto plevky v době zralosti obklopují nažky. Veliké úbory měří v průměru 10 až 50 cm, skládají se v terči až ze 2000 oboupohlavných, hnědých, pětičetných kvítků a na okraji je jazykovitá, zlatožlutá, 6 - 10 cm dlouhá a až 2 cm široká koruna. Rostlina je rozšířena v řadě zemí, především v teplých oblastech mírného pásu a v subtropech jako olejnina a pícnina[1,2,3,5].

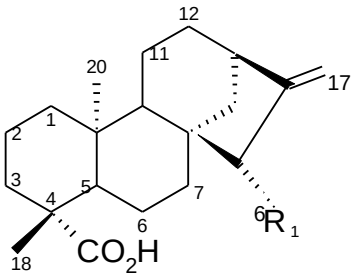
Slunečnice roční je bohatým zdrojem seskviterpenů, zejména seskviterpenických laktonů. Vzhledem k její ekonomické důležitosti, je slunečnice rozsáhle studována. Byly izolovány a chemicky charakterizovány fenolické sloučeniny (kumariny, flavonoidy, diterpeny a triterpeny)[2].

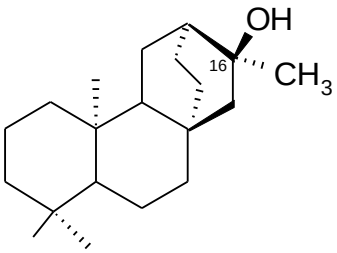
Jednou z nejbohatších skupin sekundárních metabolitů v *Helianthus annuus L.* jsou seskviterpenické laktony. Jejich přítomností u zástupců cévnatých rostlin je charakterizována především čeleď *Asteraceae*. U rostlin této čeleďi se vyskytují často v žláznatých trichomech listů, stonků a květenství. Tyto sloučeniny jsou charakterizovány hořkou chutí. V *Helianthus annuus L.* se nacházejí seskviterpenické laktony typu germakranolidů[4]. Z této skupiny látek byla identifikována celá řada sloučenin, např. agrophyllin A a B, niveusin A,B a C atd[6,7,8,9]. Většina těchto látek však byla identifikována v listech, pouze některé práce[6] popisují jejich výskyt v celých rostlinách, takže existuje důvodné podezření, že v jazykovitých květech se tyto látky vůbec nevyskytují.

Skupinou prokazatelně se vyskytující v jazykovitých květech jsou kaureny. Kaurany jsou tetracyklické diterpeny. Vyskytují se jako hydrogenované kaurany nebo jako kaureny. Jsou intermediárními metabolity v syntéze gibberellinů, důležitých

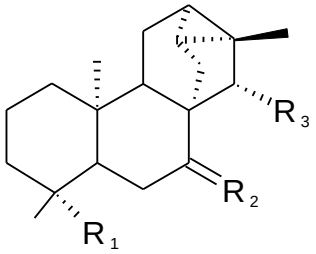
růstových faktorů, a některých diterpenických alkaloidů. Kaurany jsou poměrně rozšířené sloučeniny a jako prekurzory gibberellinů se objevují v celé rostlinné říši[5,10].

ALFATAFTA[6] prokázal v květenstvích tyto látky: kyselina *ent*-kaur-16-en-19-ová, angelyester kyseliny grandiflorové, kyselina grandiflorová. PYREK[11, 12] izoloval z jazykovitých květů *ent*-trachyloban-19-ovou kyselinu spolu s *ent*-kaur-16-en-19-ovou kyselinou. Později izoloval z jazykovitých květů i estery těchto dvou kyselin s thujanolem, *ent*-kaur-16-en-19-al, *ent*-trachyloban-19-al, *ent*-kauran -16β-ol, *ent*-kauran-16α-ol, *ent*-kauran-16β,19-diol, *ent*-atisan-16α-ol a *ent*-atisan-16β-ol. Za majoritní diterpen považuje kyselinu trachyloban-19-ovou kyselinu, ostatní její deriváty jsou pak minoritním doprovodem těchto látek. ALFATAFTA[6] izoloval l7-oxo-trachyloban-15α,19-diol a kyselinu 15α-hydroxytrachyloban-19-ovou.

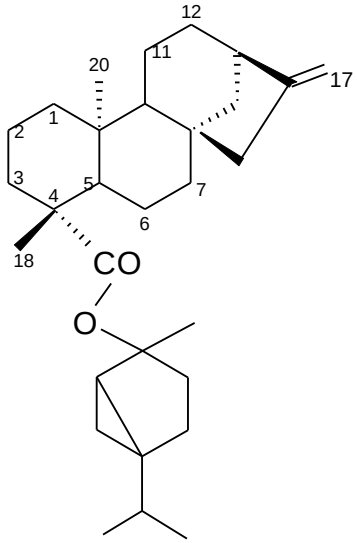




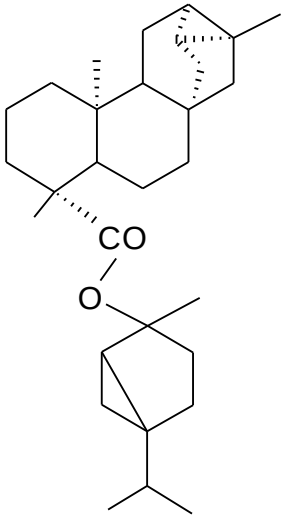
kyselina ent-kaur-16-en-19-ová R1=H ent-atisan-16α-ol
kyselina grandiflorová R1=OH
angelát kys. grandiflorové R1=OAng
(ester s kyselinou angelikovou)



kyselina trachyloban-19-ová R1=COOH R2=H R3=H
kyselina 15α-hydroxytrachyloban-19-ová R1=COOH R2=H R3=OH
7-oxo-trachyloban-15α,19-diol R1=CH2OH R2=O R3=OH



ester thujanolu a kyseliny
ent-kaur-16-en-19-ové



ester thujanolu a kyseliny
ent-trachaloban-19-ové

Vzhledem k četnosti výskytů kaurenů a i samotné kyseliny kaurenové v rostlinné říši, byla prokázána celá řada biologických aktivit této skupiny látek.

U kyseliny kauren-19-ové byla zaznamenána antimikrobiální aktivita[19]. Je aktivní proti *Bacillus subtilis* (0,313 μg.ml^{-1})[20,21], *Staphylococcus aureus* (12,5 μg.ml^{-1})[19,20,22], *Mycobacterium smegmatis* (6,25 μg.ml^{-1})[19,20] (ale ne proti *M. tuberculosis* a *M. avium*)[21], *Saccharomyces cerevisiae* [20], *E. coli*[23] *a Candida albicans*[13] (ačkoliv zdroj 16 uvádí, že je daná kyselina je k tomuto organismu neaktivní). Naproti tomu methylester kyseliny kauren-19-ové je mnohem méně antimikrobiálně účinný (například proti *Mycobacterium smegmatis* (25 μg.ml^{-1}, ale proti *S. aureus* není účinný vůbec). Pro srovnání streptomycin inhiboval růst těchto organismů v koncentracích 0,78 a 3,1 μg.ml^{-1} [19].

Kyselina kauren-19-ová vykazovala aktivitu proti protozoálnímu bičíkovci *Trypanosoma cruzi,* původci Chagasovy nemoci. Tato látka vykazovala i aktivitu proti měkkýši *Biomphalaria gabata,* mezihostitelem schistozomózy. Kaurenová kyselina se ukázala jako účinná proti larvám *Homeosa electellum*, *H. zea*, *H. virescens* a *Pectinophora gossypiela*[10].

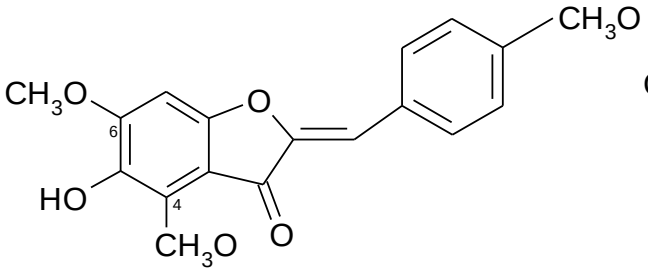
Směs dvou diterpenových kyselin, kaurenové a angeloylgrandiflorové, se ukázala jako silný inhibitor růstu vláknitých stélek hub *Verticillium dahlie, Sclerotinium sclerotiorum*[10].

Kaurenová kyselina vykazovala též antifertilní aktivitu u primátů[10].

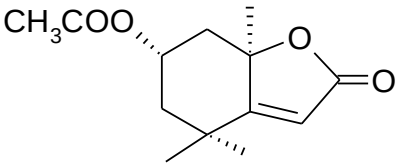
Testování cytotoxicity kaurenové kyseliny bylo provedeno na garnátech (IC_{50} 2,03 μg/ml, 16 μg/ml) a různých buněčných liniích (myší lymfatické leukémie, karcinomu prsu, plic, střeva, ovarií, prostaty a kůže)[10].

Z látek typu triterpenů byla izolována celá řada např. sitosterol, , isofukosterol, neophytadien, Δ^7-tirucallol, triterpenický sekotirucallan helianol a sunpolennol[13,14,15]. Tyto látky byly izolována z pylových zrn. BADER[16] izoloval z celých rostlin látky skupiny β-amyrinu bidesmosidy helianthosid 1, 2 a 3.

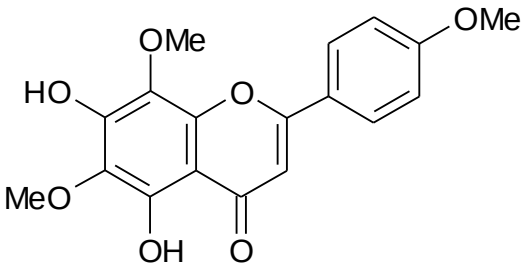
Ze skupiny látek flavonoidů-auronů ALFATAFTA[6] prokázal v květenstvích 5-hydroxy-4,6,4´-trimethoxyauron a PYREK[12] izoloval z jazykovitých květů loliolid acetát. Ze skupiny flavonolů potvrdil ALFATAFTA[6] izolací z květenství přítomnost flavonolu nevadensinu.



5-hydroxy-4,6,4´-trimethoxyauron

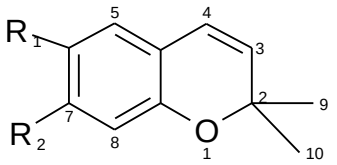


loliolid acetát



nevadensin

SATOH[17] izoloval z úborových lůžek sloučeniny typu benzopyranů. Byly identifikovány jako demethoxyencecalin (6-acetyl-2,2-dimethyl-1,2-benzopyran) a demethylencecalin (6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethyl-1,2-benzopyran).



demethoxyencecalin	$R_1=CH_3CO$	$R_2=H$
demethylencecalin	$R_1=CH_3CO$	$R_2=OH$

U těchto látek z extraktu úborových lůžek byla prokázána antimykotická aktivita. Testovanou houbou byla *Pyricularia oryzae*. Stejné výsledky vykazovaly také extrakty získané z celých květenství[17].

Z pylových zrn byla také identifikována celá řada sloučenin lipidového typu[13,28].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. CHARAKTERISTIKA ZPRACOVÁVANÉHO MATERIÁLU

Výchozím materiálem bylo 190 g rozemletých jazykovitých květů *Helianthus annuus L.* Suchý rostlinný materiál byl jednočlennou perkolací extrahován 60% ethanolem v perkolátoru. Extrakce probíhala tak dlouho, dokud perkolát vykazoval vážitelný zbytek. Extrakt byl rozdělen na dvě části. První byla zpracována v diplomové práci. Zbývající část byla ponechána po delší dobu ke krystalizaci za snížené teploty a tato část byla předmětem zkoumání této práce.

3.2. CHEMIKÁLIE, CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL A PŘÍSTROJE

3.2.1. Chemikálie

Rozpouštědla

AQUA DESTILLATA

DICHLORMETHAN p.a.

BUTANOL p.a.

ETHANOL 96%

METHANOL p.a.

ETHYLESTER KYSELINY OCTOVÉ p.a.

CHLOROFORM p.a.

ACETON p.a.

METHYL ETHYL KETON p.a.

KYSELINA MRAVENČÍ p.a.

KYSELINA OCTOVÁ p.a.

Detekční činidla

vanilinové činidlo (směs 1% ethanolického roztoku vanilinu a 3% kys. chloristé v poměru 1:1; obě složky se smísí před použitím; po postřiku se chromatogram zahřívá při 105 ^{o}C do doby, než se vybarví skvrny)

kyselina sírová (5% vodný roztok s ethanolem 1:1)

3.2.2. Chromatografický materiál

TLC aluminium sheets 20x20 cm silica gel F_{254} MERCK

3.2.3. Přístroje

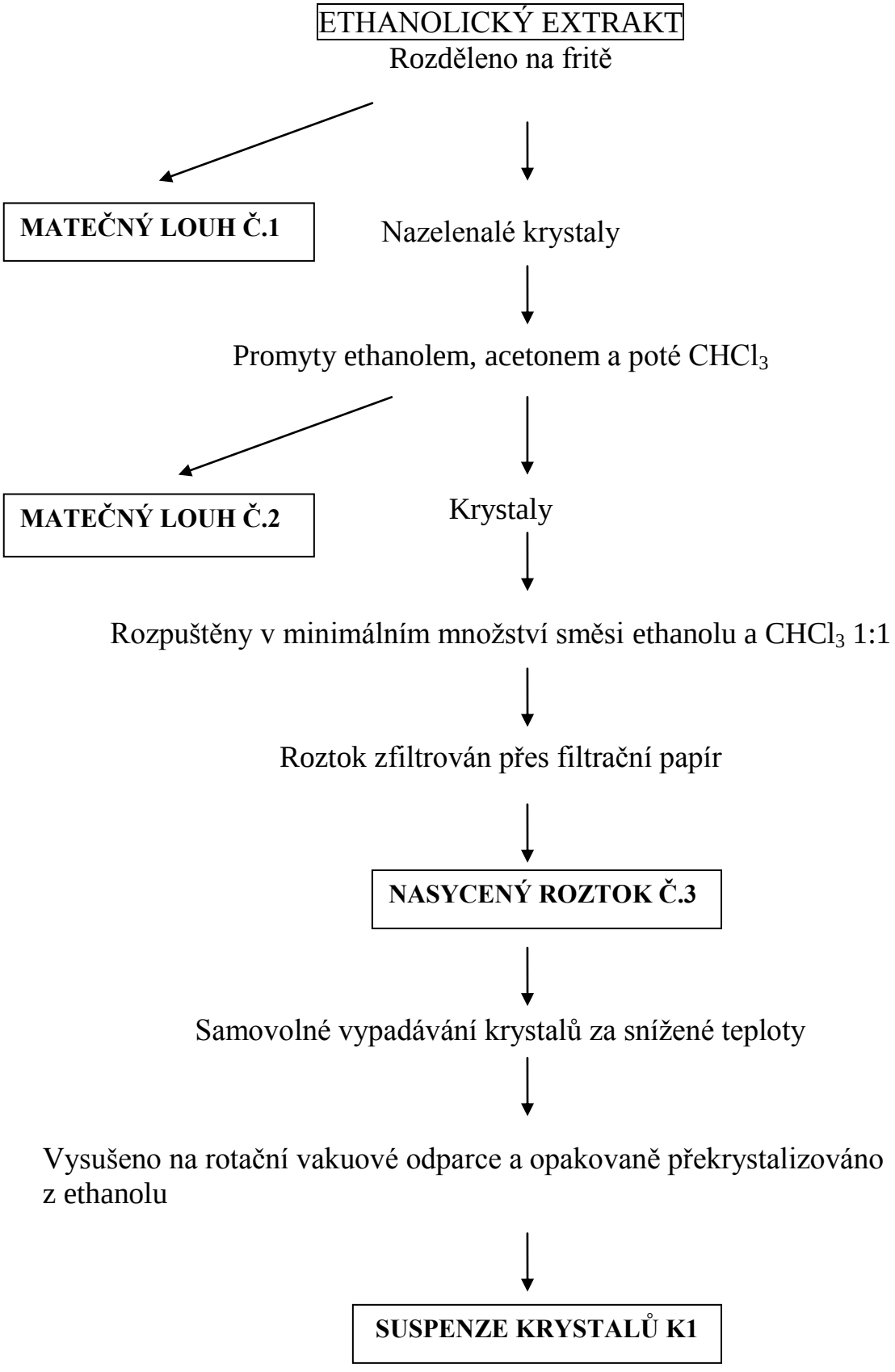
1. **UV lampa** CAMAG 254 a 366 nm
2. **NMR** Varian Mercury – Vx BB 300 – Faf UK v HK
3. **Mikrovýhřevný stolek Boëtius** k zjištění teploty tání

PŘEHLED MOBILNÍCH FÁZÍ

Chromatografické soustavy

S1-	$CHCl_3$	čistý
S2-	Ethylacetát	čistý
S3-	Butanol:kyselina octová:voda	4:1:5
S4-	Ethylacetát:methyl ethyl keton:kyselina mravenčí:voda	50:30:10:10
S5-	CH_2Cl_2:ethylacetát	1:1
S6-	CH_2Cl_2: ethylacetát	4:1
S7-	CH_2Cl_2: ethylacetát	9:1
S8-	CH_2Cl_2	čistý
S9-	Ethanol	čistý
S10-	Ethanol: $CHCl_3$	7:3
S11-	Ethanol: $CHCl_3$	1:1

SCHÉMA ZPRACOVÁNÍ ETHANOLICKÉHO EXTRAKTU JAZYKOVITÝCH KVĚTŮ



3.3. ZPRACOVÁNÍ ETHANOLICKÉHO EXTRAKTU JAZYKOVITÝCH KVĚTŮ

3.3.1. Zpracování suspenze ethanolického extraktu

Ze zbylé, nezpracovávané části ethanolického extraktu jazykovitých květů po čase stání v lednici vypadlo větší množství krystalické látky. Tyto krystaly jsou velice dobře rozpustné v ethylacetátu a chloroformu, hůře rozpustné v methanolu a ethanolu a nerozpustné v acetonu a vodě.

Suspenze byla separována na fritě. Byl oddělen matečný louh č.1. Vzniklé krystaly byly promyty 10 ml acetonu, ani ten je však nezbavil slabě zeleného nádechu. Tyto krystaly pak byly dále promyty malým množstvím ethanolu a poté chloroformu. Promytím acetonem, ethanolem a chloroformem vznikl matečný louh č.2. Tímto způsobem pročištěné krystaly byly převedeny do směsi ethanol chloroform 1:1 za mírně zvýšené teploty za vzniku nasycené roztoku. Nasycený roztok byl zfiltrován přes filtrační papír. Na filtračním papíře zůstaly olejovité kapičky, dobře rozpustné ve vodě. Přefiltrovaný roztok byl dále zahuštěn a vypadlo z něj větší množství krystalů K1.

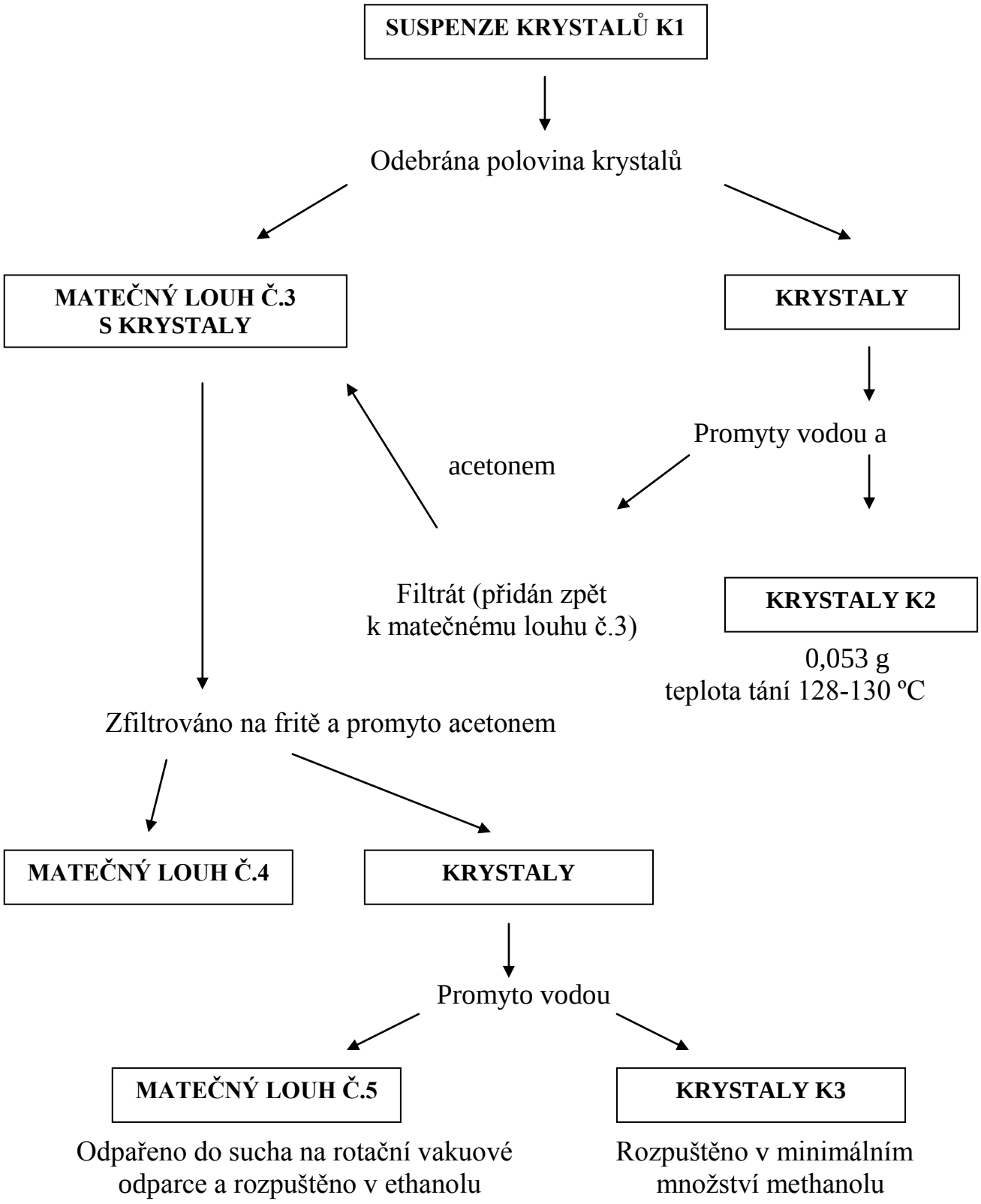
Krystaly byly opakovaně překrystalizovány z ethanolu za snížení teploty a byla provedena TLC v soustavách S1, S2, S3 a S4, dále TLC spolu s kyselinou kaurenovou a směsí s obsahem stigmasterolu v soustavách S5, S6 a S7. Krystaly K1 nejsou detekovatelné pouze pod UV, proto bylo přistoupeno k detekci vanilinovým činidlem. Přítomnost jak kyseliny kaurenové, tak stigmasterolu nebyla v daných krystalech potvrzena, ale ani vyvrácena z důvodu blízkých hodnot R_F. Jelikož se již dříve jako dobrá vyvíjecí soustava pro kaurenové deriváty osvědčila monosložková mobilní fáze (CH_2Cl_2). Byla provedena TLC v S8 kyseliny kaurenové, směsi kyseliny kaurenové s krystaly K1, samotnými krystaly K1 a směsí obsahující stigmasterol (viz chromatogram č.1).

Z chromatogramu vyplývá, že krystaly K1 nejsou chemicky jednotnou látkou. Pro identifikaci struktury K1 bylo proto nutné tyto krystaly dále přečistit.

Chromatogram č.1: 1:kyselina kaurenová, 2:směs kyseliny kaurenová +K1, 3:K1 a 4: směs s obsahem stigmasterolu, mobilní fáze CH_2Cl_2 a ethylacetát 4:1

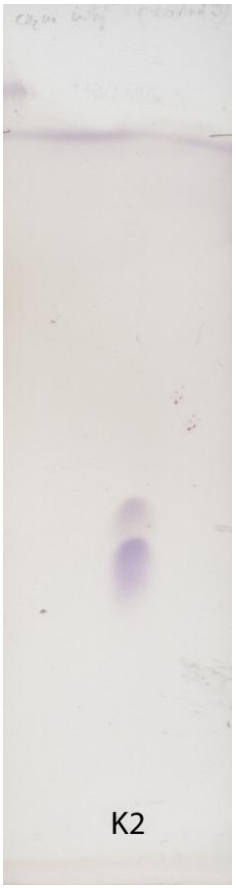
3.3.2 Zpracování suspenze krystalů K1

SCHÉMA ZPRACOVÁNÍ SUSPENZE KRYSTALŮ K1



Jelikož látky tvořící krystaly K1 nevykazovaly potřebnou absorpci v UV spektru, aby mohly být rozděleny pomocí HPLC s UV detektorem, byla jako separační metoda těchto krystalů zvoleno počištění rozpouštědly, v nichž byly původní krystaly ze sumárního ethanolického extraktu jazykovitých květů nerozpustné.

Z nasyceného roztoku krystalů K1 v ethanolu jsme odebrali polovinu krystalů, ty promývali na fritě postupně vodou a acetonem, ve kterých jsou K1 nerozpustné, filtrát přidali zpět k matečnému louhu č.3. Na fritě zůstala téměř bílá krystalická látka, která byla vysušena a dána do exsikátoru. Hmotnost získaných suchých krystalů činila 0,053 g. Byla provedna TLC krystalů K2 v S8 (viz chomatogram č.2), vyvíjeno třikrát . Chromatogram potvrdil přítomnost min. dvou sloučenin. Látky nejsou detekovatelné pouze pod UV, proto je přistoupeno k detekci vanilinovým činidlem.

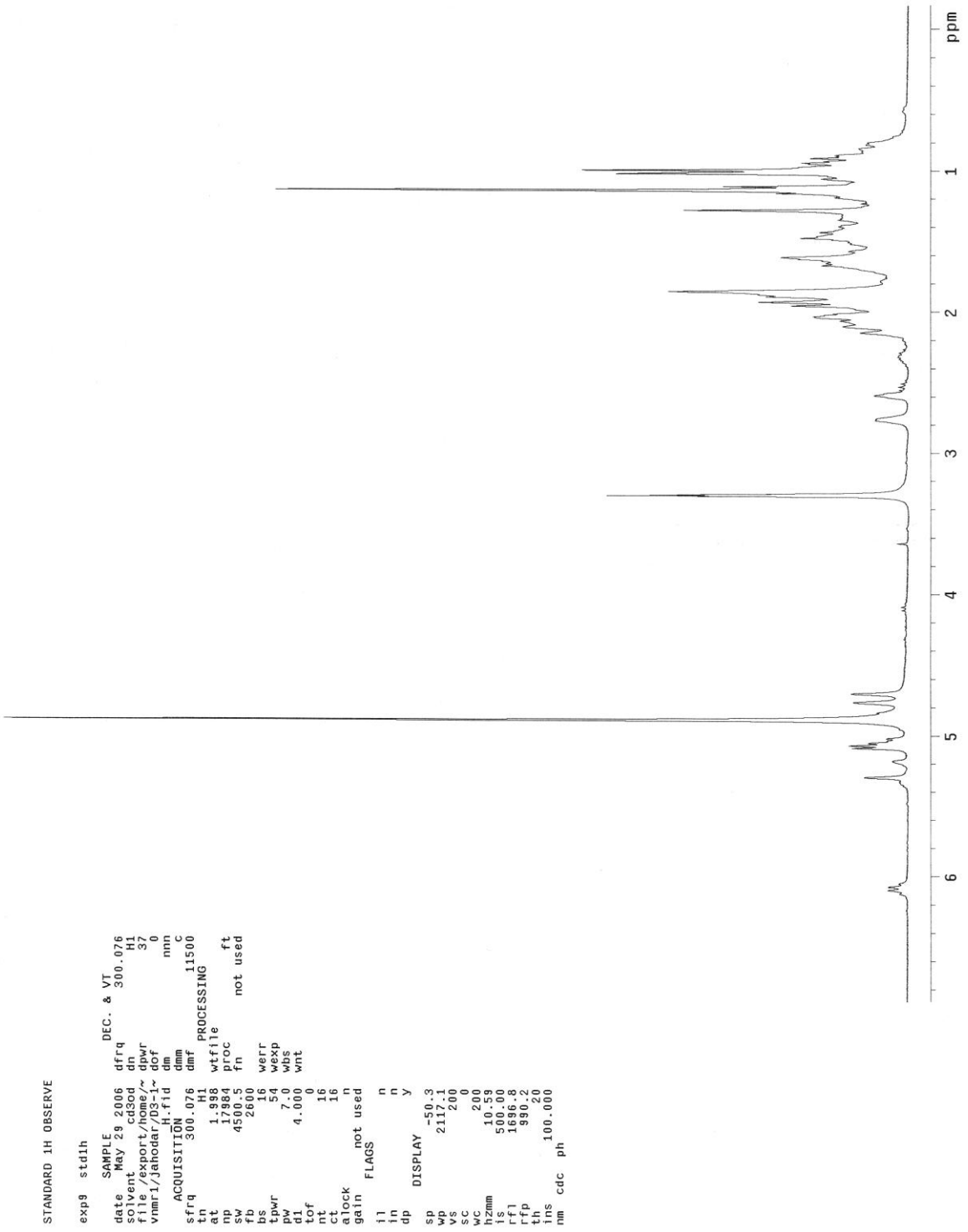


Chromatogram č.2: K2, mobilní fáze CH_2Cl_2 vyvíjeno třikrát.

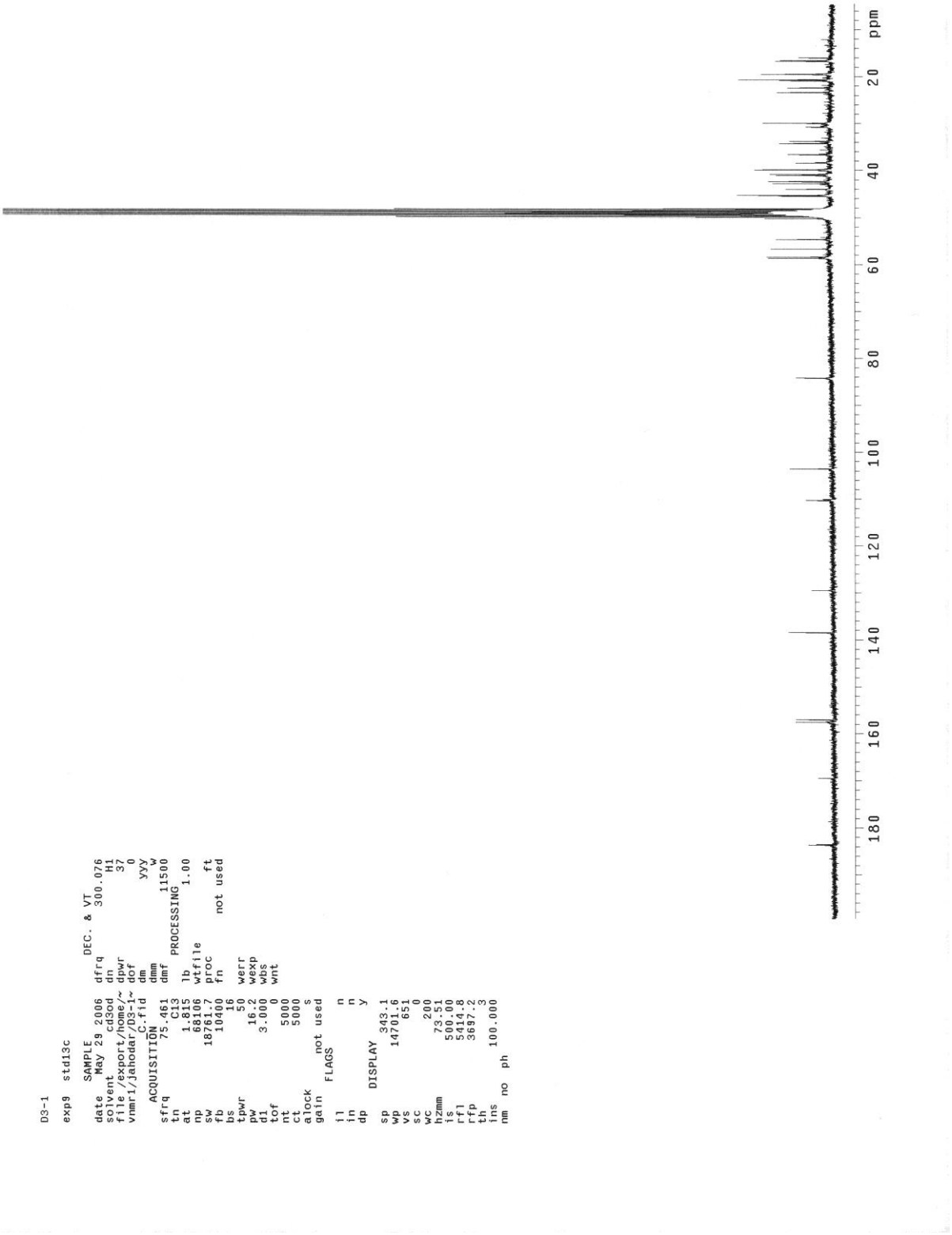
Byla rovněž povedena TLC těchto krystalů spolu s čistější formou směsi s obsahem stigmasterolu v S8 (viz chromatogram č.3). Chromatogram nepotvrdil totožnost neznámých látek se stigmasterolem.

Chromatogram č.3: 1:K2, 2:směs s obsahem stigmasterolu, mobilní fáze CH_2Cl_2

Teplota tání neznámé krystalické látky ležela v rozmezí 128 – 130 °C. 14 miligramů této neznámé krystalické látky bylo odeslána na KAOCH k proměření ^{1}H (viz záznam č.1) a ^{13}C (záznam č.2 a 3) NMR spekter k ozřejmění chemické struktury pod názvem D 3.1

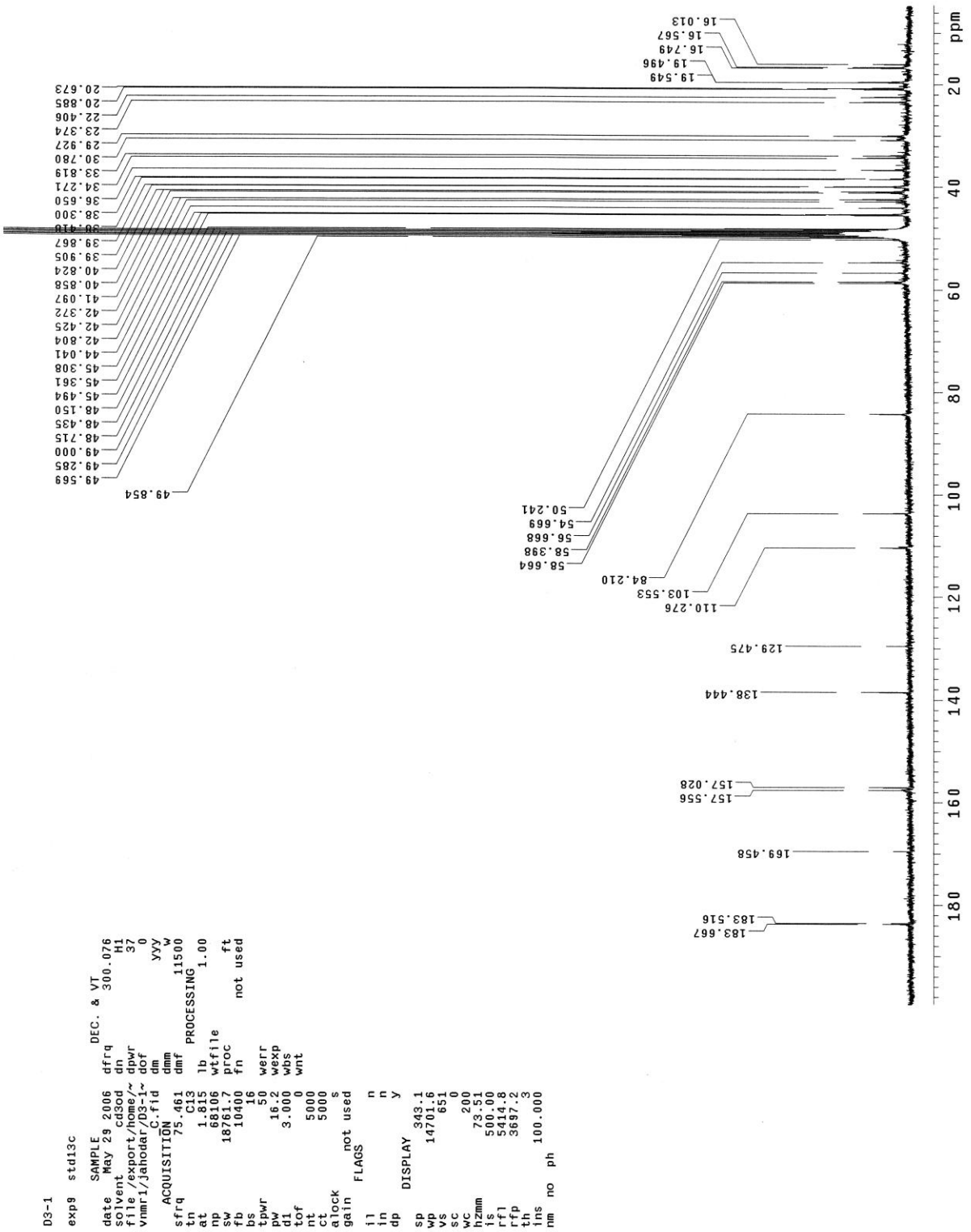


Záznam č.1: ^{1}H NMR spektrum vzorku D 3.1. (K2 krystaly), měřeno v methanolu. Popis na straně 25.



<u>Záznam č.2</u>: ^{13}C NMR spektrum vzorku D 3.1. (K2 krystaly), měřeno v methanolu.

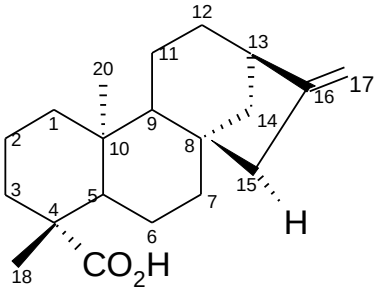
Popis na straně 25.



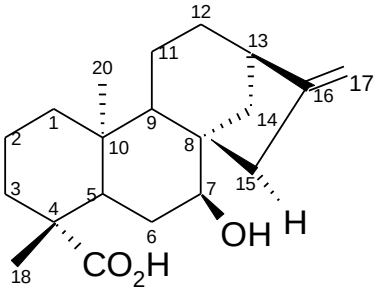
Záznam č.3: ^{13}C NMR spektrum vzorku D 3.1. (K2 krystaly) s hodnotami signálů ppm, měřeno v methanolu. Popis na straně 25.

Naměřená spektra vzorku byla konfrontována s údaji spekter kaurenových derivátů (kys. Kaurenová a deriváty 2,3 a 4) (viz tabulka.č.1).

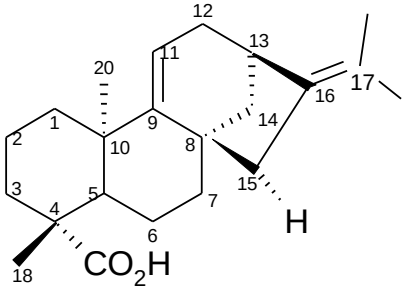
Látky pro měření refenčních ^{13}C NMR signálů ppm



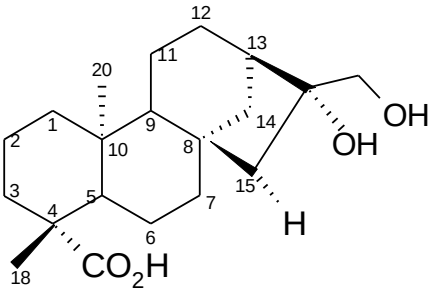
kyselina kaurenová



derivát 2



derivát 3



derivát 4

uhlík	1	2	3	4	4	
					16α-	16β-
1	40.7	40.4	40.5	41.3	42.1	41.8
2	19.1	19.1	20.1	20.1	19.1	19.0
3	37.7	37.8	38.2	39.0	38.1	38.0
4	43.2	43.2	43.4	44.1	43.9	43.7
5	57.0	49.1	48.4	57.2	56.9	56.8
6	21.8	29.7	18.3	23.2	22.2	21.5
7	41.3	77.1	46.7	43.0	40.7	40.6
8	44.2	48.3	44.7	45.2	44.7	43.4
9	55.1	47.2	160.6	56.5	55.8	56.0
10	39.7	39.4	39.0	40.3	39.5	39.4
11	18.4	17.9	117.3	19.2	18.6	18.9
12	33.1	33.5	72.6	27.0	26.2	26.5
13	43.8	43.7	46.1	46.1	45.4	40.5
14	39.7	38.7	40.3	38.0	37.3	37.9
15	48.9	45.3	29.1	54.1	53.2	52.3
16	155.8	155.1	152.3	81.9	81.9	79.8
17	103.0	103.7	108.5	66.7	66.4	69.7
18	28.9	28.7	28.2	29.6	28.7	28.6
19	184.9	160.0	183.2	180.5	180.1	180.3
20	15.6	15.5	23.5	16.2	16.0	15.1

Tabulka č.1: Referenční ^{13}C NMR signály ppm kaurenové kyseliny (sloupec 1) a kaurenových derivátů označených jako derivát 2, 3 a 4 (sloupce 2,3 a 4),měřeno v $CDCl_3$[23].

Výsledné spektrum ^{13}C (viz záznam č.3) NMR bylo porovnáváno s referenčními ^{13}C NMR signály ppm kaurenové kyseliny (viz tabulka č.1). Přesto, že náš vzorek byl měřen v methanolu a získaná spekta pro porovnání byla měřena v $CDCl_3$ a lze tedy očekávat mírný posun hodnot ppm, téměř s jistotou je možné tvrdit, že vzorek obsahuje kaurenové deriváty nebo látky strukturně velice blízké. Podrobnější identifikace je ale poměrně značně ztížena tím, že vzorek není chemicky čistým individuem, ale jedná se o směs dvou látek (počet peaků okolo 40 – kyselina kaurenová má 20 uhlíků), což bylo dokázáno i TLC (viz chromatogram č.3). Vzhledem k velice drobným posunům pak lze i s určitou pravděpodobností tvrdit, že strukturní příbuznost látek v této směsi je více než blízká.

Na základě signálů byla programem MestRe-C23 potvrzena přítomnost těchto skupin:

- signál 183,7 a 183,5 ppm – karboxylový uhlík

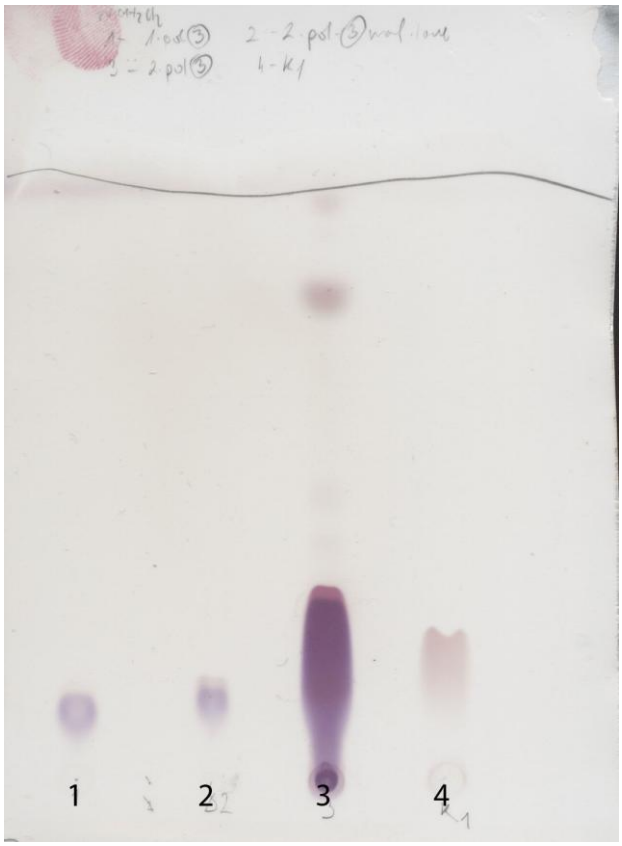
- signál 157,6 a 157,1 ppm – nehydrogenovaný uhlík C16, z něhož vychází dvojná vazba.
- signál 103,6 ppm – hydrogenovaný uhlík C_{17}.

Je možné, že některý z uhlíků je hydroxylovaný.

Ze spektra ^{1}H je absencí charakteristického singletu 3,63 ppm methyl či methylenového uhlíku vyvrácena přítomnost esterifikované karboxylové skupiny.

Matečný louh č.3 byl zfiltrován na fritě a krystaly promyty acetonem (byl získán matečný louh č.4) a poté tyto krystaly promyty vodou (získán matečný louh č.5). Matečný louh č.5 byl postupně zbaven vody opakovaným přidáváním a odpařováním ethanolu na rotační vakuové odparce. Takto vysušený byl rozpuštěn v minimálním množství ethanolu. Krystaly, které zůstaly na fritě byly vysušeny, označeny jako K3 a rozpuštěny v minimálním množství methanolu a ponechány ke krystalizaci v lednici.

Byla provedena TLC v S8 s krystaly K2 rozpuštěných v methanolu, čistého matečného louhu krystalů K3, krystaly K3 s jejich matečným louhem a kyselinou kaurenovou (viz chromatogram č.4). Z chromatogramu je patrné, že zatímco v případě K2 se nám podařilo získat relativně čistou látku, v případě krystalů K3 se jednou o směs, dále je zřejmé, že K2 není totožná s kyselinou kaurenovu.



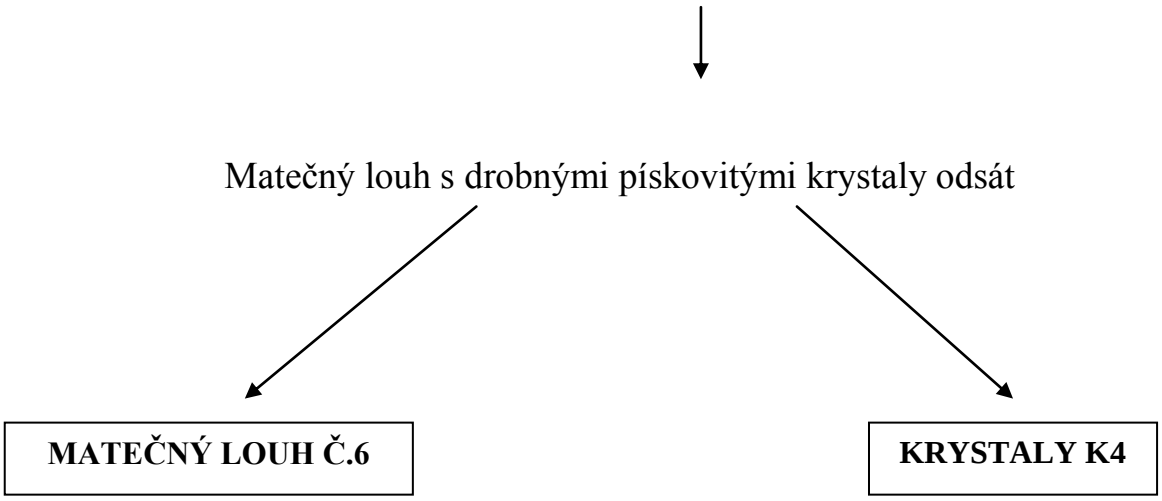
Chromatogram č.4: 1:K2 v methanolu, 2:matečný louh K3, 3:roztok K3 a 4: kyselina kaurenová, mobilní fáze CH_2Cl_2

3.3.3. Zpracování suspenze krystalů K3

SCHÉMA ZPRACOVÁNÍ SUSPENZE KRYSTALŮ K3

NASYCENÝ ROZTOK KRYSTALŮ K3

Vypadávají 2 typy krystalů: jehličky o velikosti asi 2 mm a drobné pískovité krystaly



Po určité době stání nasyceného methanolického roztoku krystalů K3 vypadly z tohoto roztoku dva typy krystalů: jehličky o velikosti asi 2 mm a drobné pískovité krystaly.

Ze suspenze matečného louhu K3 jsme se pokusili pomocí kapiláry zakončenou smotečkem vaty odsát matečný louh s drobnými pískovitými krystalky. Takto připravené jehličkovité krystaly (označeny jako krystaly K4) byly vysušeny a uloženy do exsikátoru.

Jehličkovité krystaly K4 byly rozpuštěny v methanolu a provedena TLC v S8 s K2 (viz chromatogram č.5). Krystaly K4 nejsou detekovatelné pouze pod UV, proto je přistoupeno k detekci vanilinovým činidlem.

Chromatogram byl vyvíjen třikrát a je z něj patrné že K4 je zřejmě čistá látka a že se nejedná o shodnou látku s K2. Dále je možno říci, že v se nejedná ani o kyselinu kaurenovou nebo stigmasterol, neboť R_F těchto látek je větší, než skvrny látek v K2 (viz chromatogramy č.3 a 4). Krystaly K4 byly odeslány na KAOCH na ^{1}H a ^{13}C NMR k ozřejmění chemické struktury pod názvem D 3.2. V současnosti probíhá analýza těchto krystalů.

Chromatogram č.5: 1:K2 v methanolu, 2:K4, mobilní fáze CH_2Cl_2 vyvíjeno třikrát.

4. HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

Slunečnice roční je bezpochyby jedna z nejvýznamnějších hospodářských rostlin a proto nepřekvapí, že přitahuje pozornost vědců již od nepaměti. Tato rostlina je zkoumána jednak z hlediska ekologicko–zemědělského s cílem zvýšení produkce a ochrany před škůdci, ale také kvůli potenciálnímu využití jejích obsahových látek v oblasti medicíny.

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy vybrala tuto rostlinu na základě screeningových antifungálních testů extraktů jednotlivých rostlinných druhů z čeledi *Asteraceae*. Tyto testy poukázaly na poměrně dobré antimykotické vlastnosti některých zástupců této čeledi, z nichž extrakt z *Helianthus annuus L.* se jevil jako velice perspektivní pro další výzkum. Ačkoliv byl *Helianthus annuus L.* podroben za posledních 30 let intenzivnímu fytochemickému zkoumání, nebylo příliš mnoho prací týkající se antifungálních účinků jak extraktů, tak jednotlivých látek z ní izolovaných. Pro zkoumání byly tehdy vybrány jazykovité květy, listy a úborová lůžka.

Jazykovité květy poměrně detailně zkoumal PYREK[6,13] a byl popsán výskyt kaurenových diterpenů a auronu loliolidu acetátu. Za hlavní sekundární metabolit ze skupiny kaurenů se považuje kyselina trachyloban-19-ová. Dále byla popsána přítomnost řady dalších kaurenů jako minoritní doprovod výše uvedené sloučeniny. Žádné jiné práce na téma obsahových látek jazykovitých květů *Helianthus annuus L.* nebyly publikovány. Z těchto důvodů se fytochemická studie jazykovitých květů jevila jako velice perspektivní.

Vzhledem k literární rešerši a obecným znalostem o obsahových látkách byla pro zpracování jazykovitých květů navržena jednočlenná perkolace 60% ethanolem. Tento extrakt byl rozdělen na dvě části, z nichž jedna byla zpracována v rámci diplomové práce. Středem našeho zájmu byla tehdy butanolová fáze, kde bylo možno očekávat výskyt kaurenových derivát. Ta byla dělena sloupcovou chromatografií na molekulovém sítě Sephadex LH 20. V této fázi byla taky na základě ^{13}C a ^{1}H NMR analýzy identifikovány kyselina kaurenová a stigmasterol.

V jazykovitých květech byla tedy potvrzena pouze přítomnost kyseliny kaurenové, ačkoliv kvantitativně nejvýznamnějším kauranem je kyselina trachyloban-19-ová[11,12]. Nebyl tehdy prokázán žádný minoritní kauran, což se dalo vysvětlit nízkým obsahem těchto sloučenin v jazykovitých květech a množství krystalů námi získané bylo příliš malé na to, aby byly tyto sloučeniny zachyceny v identifikovatelném

množství. Přítomnost v literatuře uváděného loliolid acetátu ani jiných flavonoidů rovněž nebyla potvrzena.

Druhá, nezpracovávaná část ethanolického extraktu jazykovitých květů byla po celou dobu analýz uložena v lednici. V průběhu doby vlastní analýzy zpracovávaného extraktu jazykovitých květů došlo k vypadávání většího množství krystalické látky. Její analýza tehdy nebyla dokončena a byla předmětem mé rigorózní práce.

Toto množství krystalů bylo zfiltrováno na fritě. Vzhledem k tomu, že se jednalo o látku za sumárního extraktu, byl zde reálný předpoklad, že se jedná směs látek. Bylo zvoleno promývání rozpouštědly, v nichž dané krystaly nebyly rozpustné vůbec nebo jen velice omezeně. Krystaly byly promyty ethanolem, acetonem a nakonec chloroformem. Těmito promytími ztratily krystaly slabě nazelenalý nádech. V dalším kroku byly takto promyté krystaly převedeny do nasyceného roztoku ve směsi ethanol-chloroform. Za snížené teploty z roztoku vypadly krystaly (označeny jako K1), jenž byly poté opakovaně překrystalizovány z nasyceného roztoku ethanolu. TLC naznačila, že výsledkem těchto purifikačních metod je stále poměrně bohatá směs látek. Bylo proto nutno přistoupit k dalším separačním krokům. Jelikož krystaly nevykazovaly absorbci v UV, nebylo tak možno separovat pomocí HPLC.

Zhruba polovina krystalů K1 byla odebrána a promyta acetonem a poté vodou. Bylo získáno 0,053 g krystalů. Byla provedena TLC těchto krystalů spolu s kyselinou kauenovou a stigmasterolem, látkami jež byly na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie v jazykovitých květech již dříve prokázány. Z TLC (viz chromatogramy číslo 2 a 4) bylo patrné, že krystaly K2 neobsahují ani jednu z těchto látek. TLC samotných krystalů K2 vyvíjené třikrát (viz chomatogram č.2) pak ukázalo, že se jedná o směs minimálně dvou látek. Teplota tání této látky ležela v rozmezí 128 – 130 °C. Krystaly K2 byly odeslány na KAOCH k proměření ^{1}H (viz záznam č.1) a ^{13}C (záznam č.2 a 3) NMR.

^{13}C NMR v podstatě potvrdila přítomnost dvou látek. Signály 183,7 a 183,5 ppm potvrdily přítomnost karboxylového uhlíku. Signály 157,6 a 157,1 ppm potvrdily přítomnost uhlíku C_{16} s dvojnou vazbou. Shoda peaků ^{13}C NMR krystalů K2 s peaky spektra kyseliny kaurenové uvedeného v literatuře (viz tabulka č.1) pak definitivně potvrzuje hypotézu, že se jedná o látky velice příbuzné. ^{1}H NMR spektrum krystalů K2 je velice obtížně interpretovatelné, ale jednoznačná nepřítomnost singletu 3,63 ppm methyl či methylenového uhlíku vyvrací přítomnost esterifikace karboxylové skupiny. To je poněkud v rozporu s literárními údaji, neboť v jazykovitých květech byly popsány

estery kaurenů především s kyselinou angelikovou a thujanolem. Vysvětlením by mohla být kvantitativně podstatně menší přítomnost těchto esterů v porovnání s jejich volnými kyselinami. Bližší determinace struktury z výsledků NMR spekter není možná právě z důvodů chemické příbuznosti těchto dvou sloučenin. Lze uvažovat, částečně na základě možných posunů ve spektru, o přítomnosti hydroxylových skupin vázaných na kaurenový skelet. Teoreticky by se mohlo jednat o kyselinu grandiflorovou nebo *ent*-atisan-16-ol popřípadě jejich deriváty. Jako nejpravděpodobnější se však rýsuje možnost, že jednou z látek směsi je kyselina trachyloban-19-ová, která je v literatuře uváděna jako majoritní kaurenový derivát jazykovitých listů.
Pro jednoznačné ozřejmění jejich struktury však bude třeba jiných analytických přístupů. Možným řešením by bylo užití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím hmotnostního spektrometru jako detektoru nebo tandemové hmotnostní spektrometrie.

Jelikož předchozím postupem nebylo získáno chemicky čisté individuum (krystaly K2), byla druhá polovina krystalů K1 v matečném louhu podrobena dalšímu přečišťování. Byly opět promyty vodou, acetonem a překrystalizovány z methanolu. TLC však prokázalo, že se stále ještě jedná o poměrně bohatou směs (viz chromatogram č. 4). Po určité době stání však z nasyceného methanolického roztoku vypadávají dva typy krystalů: jehličky o velikosti asi 2 mm a drobné pískovité krystaly. Jehličkovité krystaly (označeny jako K4) se jeví po trojitém vyvíjení na TLC spolu s krystaly K2 (viz chromatogram č.4) jako čistá látka. Z chromatogramu dále vyplývý, že v případě krystalů K2 a K4 se nejedná o chemicky shodné látky (K2 má nižší hodnotu R_F). Dále je možno konstatovat, že v případě krystalů K4 se nejedná ani o kyselinu kaurenovou ani o stigmasterol, neboť jejich skvrny mají vyšší hodnoty R_F ve srovnání s krystaly K2 (viz chromatogramy č. 3 a 4). Krystaly K4 byly odeslány na k ^{1}H a ^{13}C NMR. Jejich analýza v současnosti probíhá.

5. SOUHRN

Cílem této práce bylo provést fytochemickou analýzu zbývající části ethanolického extraktu jazykovitých květů *Helianthus annuus* L.

Výsledky lze shrnout takto:

1. Suspenze krystalů ethanolické extraktu byla zpracovávána filtrací na fritě a pročišťována. Byly získány dva vzorky: krystaly K2 a krystaly K4.
2. V případě krystalů K2 se jedná o směs dvou látek, s nichž ani jedna pravděpodobně není shodná se samotnou kyselinou kaurenovou nebo stigmasterolem. Z výsledků NMR je zřejmé, že obě látky jsou kyselině kaurenové chemicky velice podobné, nejedná se však o její estery.
3. Krystaly K4 se dle TLC jevily odlišné od jak krystalů K2, tak i od kyseliny kaurenové a stigmasterolu. NMR analýza krystalů K4 s současnosti probíhá.

6. LITERATURA

1. Valíček P. a kolekiv, *Užitkové rostliny tropů a subtropů* Academia Praha, str. 127 (2002)
2. Hrouda L., Skalický V., *Květena České republiky* Academia Praha, díl 7 (1990)
3. Bruneton J., *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medical Plants,* Intercept Ltd Andover England, (1995)
4. Leifertová I., Baloun J., *Farmaceutická botanika* Státní pedagogiké nakladatelství Praha, str. 146 (1990)
5. Ali A. Alfatafta, et al., Phytochemistry *31*, 4109-41137 (1992)
6. Melek F. R., Gage D. A. Gershenzon J. and Marby T. J., Phytochemistry *24*, 1537 (1985)
7. Spring O., Benz T. and Ilg M., , Phytochemistry *28*, 745-7491(1989)
8. Spring O., Albert K. and Hager A., Phytochemistry *21*, 2551-2553 (1982)
9. Ghisalberti E. L., Fitoterapia *68*, 303-325 (1997)
10. Pyrek J. St., Tetrahedron *26*, 5029-5032 (1970)
11. Pyrek J. St., J.of Nat. Products *47*, 822-827 (1984) J.Nat. Prod.
12. Ukiya M., Akihisa T., Tokuda H., et al, , J. Agric. Food Chem. *51*, 2949-2957 (2003)
13. Ukiya M., Akihisa T., Tokuda H. et al., J. Nat. Produkt *66*, 1476-1479 (2003)
14. Schulz S., Arsene C., Tauber M.et al, Phytochemistry *54*, 325-336 (2000)
15. Bader G., Zieschang M., Wagner K., Grundemann E., Hiller K., Planta Med. *57(5)*, 471-4 (1991)
16. Satoh A., Utanuta H., Ishizuka M., Endo N., Tsuji M., Nishimura H., Biosci. Biotech. Biochem. *60(4)*, 664-665 (1996)
17. Schulz S., Arsene C., Tauber M.et al, Phytochemistry *54*, 325-336 (2000)
18. Mitscher L. A. Rao G. S., Veysoglu T., Drake S., Haas T., J. Nat. Prod.*46*, 745 (1983)
19. Oguntimein B. O., Fitoterapia *58*, 411 (1987)
20. Slimetad R., Marston A., Mavi S., Hostettmann K., Planta Med. *61*, 562 (1995)
21. Mathur S. B., Garcia Tello P., Fermin C. M., Mora-Arellano V., Latinoamer. Quim. *6*, 275 (1975)
22. Nakano M., Fukushima M., Azuma H., J.Food Hyg. Soc. Jap. *36*, 22 (1995)
23. Silva EA et al., Phytochemistry. *5*, 397-400 (1999)