

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Fytochemický výzkum listů *Helianthus annuus* L. III

Phytochemical study of *Helianthus annuus* L. leaves III

Diplomová práce

Ráda bych touto cestou poděkovala PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále bych poděkovala Ing. Kateřině Kubíkové a PharmDr. Zuzaně Řehákové za poskytnutí informací i všem ostatním pracovníkům katedry, kteří mi s prací pomohli.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantové agentury Univerzity Karlovy GA UK 118/2006/ B BIO.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma “Fytochemický výzkum listů *Helianthus annuus* III” vypracovala samostatně a použila jsem jen pramenů, které uvádím v příloženém seznamu literatury.

Obsah:

I.	Úvod.....	7
II.	Cíl práce.....	10
III.	Teoretická část.....	11
1.	Botanická charakteristika.....	11
2.	Látky izolované z listů rodu <i>Helianthus</i>	14
2.1.	Terpenoidy (isoprenoidy).....	14
2.1.1.	Seskviterpeny.....	14
2.1.1.1.	Guajanolidy.....	16
2.1.1.2.	Germakranolidy.....	18
2.1.1.3.	Heliannany.....	22
2.1.1.4.	Annuiionony (apokarotenoidy).....	27
2.1.1.5.	Heliespirony.....	29
2.1.1.6.	Eudesmanolidy.....	29
2.1.2.	Diterpeny.....	30
2.2.	Flavonoidy.....	32
3.	Biologická aktivita obsahových látek.....	35
3.1.	Alelopatická aktivita.....	35
3.1.1.	Úvod.....	35
3.1.2.	Biologické testy.....	36
3.1.2.1.	Test etiolizovaných koleoptilů.....	36
3.1.2.2.	Test na Petriho miskách (seed germination bioassay).....	37
3.1.3.	Guajanolidy.....	38
3.1.4.	Germakranolidy.....	39
3.1.5.	Heliannany.....	41
3.1.6.	Annuiionony (apokarotenoidy).....	42
3.1.7.	Heliespirony.....	44
3.1.8.	Eudesmanolidy.....	44
3.2.	Cytotoxicita.....	44
3.2.1.	Úvod.....	44
3.2.2.	Biologické testy.....	45
3.2.2.1.	<i>In vitro</i> cytotoxické testy a hemolytický účinek.....	45
3.2.2.2.	Testy na imunomodulační a protinádorové účinky.....	46

3.2.3.	Cytotoxicita triterpenoidních saponinů.....	51
3.2.4.	Imunomodulační a protinádorové účinky triterpenoidních saponinů	54
IV.	Experimentální část a výsledky	58
1.	Všeobecné postupy	58
1.1.	Extrakce	58
1.2.	Macerace	58
1.3.	Vytřepávání.....	59
1.4.	Filtrace	59
1.5.	Chromatografické metody	60
1.5.1.	Tenkvrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)	61
1.5.2.	Kolonová (sloupcová) chromatografie	62
1.5.3.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	62
1.6.	Odpařování (zahušťování)	63
2.	Potřeby	63
2.1.	Rozpouštědla.....	63
2.2.	Chemikálie	64
2.3.	Detekční činidla	64
2.4.	Vyvíjecí soustavy.....	67
2.5.	Chromatografické absorbenty	67
2.6.	Přístroje.....	68
3.	Izolace	68
3.1.	Materiál	68
3.2.	Extrakce drogy a zpracování extraktu	68
3.3.	Provedení první sloupcové chromatografie	71
3.3.1.	Příprava roztěru.....	71
3.3.2.	Sloupcová chromatografie	71
3.3.3.	Odpařování frakcí	71
3.3.4.	Orientační tenkovrstvá chromatografie (TLC)	73
3.3.5.	Detekce získaných frakcí	76
3.4.	Provedení druhé sloupcové chromatografie	83
3.4.1.	Příprava materiálu pro druhou sloupcovou kolonu.....	83
3.4.2.	Nanesení vzorku a provedení chromatografie	83
3.4.3.	Orientační tenkovrstvá chromatografie	84

4.	Biologická aktivita.....	86
4.1.	Použitý materiál	88
4.2.	Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu	90
4.2.1.	Princip.....	90
4.2.2.	Příprava roztoků.....	90
4.2.3.	Přístroje.....	91
4.2.4.	Výsledky měření	92
4.3.	Antioxidační aktivita FRAP.....	94
4.3.1.	Princip metody.....	94
4.3.2.	Postup.....	95
4.3.3.	Přístroje.....	96
4.3.4.	Výsledky měření	96
V.	Hodnocení výsledků a diskuse.....	98
1.	Hodnocení tenkovrstvou chromatografií	98
2.	Hodnocení antioxidační aktivity	99
VI.	Souhrn.....	101
VII.	Použitá literatura	102
VIII.	Annotation of the diploma thesis	105

I. ÚVOD



Obr. 1: Květy slunečnice³⁹

Slunečnice roční

Slunečnice roční, *Helianthus annuus*, pěstovaná americkými Indiány již před 3000 lety, je pojmenována na počest Helia, řeckého boha Slunce. Během 15. století byly tehdy ještě drobnokvětými slunečnicemi korunovány aztécké kněžky Slunce.

Do Evropy přivezli drobnokvětou slunečnici Španělé v 16. století. Později v Rusku se objevila u slunečnice dědičná odchylka, vzniklá srůstem několika stonků, a vznikla tak nám dobře známá velkokvětá slunečnice.

Všechny části slunečnice jsou využitelné. Dřeň z lodyh představuje jeden z nejlehčích přírodních materiálů vůbec. Číňané ji používají při akupresuře ve formě doutnajících kuželíků a rovněž při výrobě hedvábí i provazů.¹

Během jednoho století se rozšířila po celé Evropě jako okrasná rostlina. Od 18. století se ze slunečnicových semen začal lisovat olej a zralá semena se stala vyhledávanou pochoutkou.²

Slunečnice je schopna rychle čerpat vodu z půdy svými kořeny. Této vlastnosti využívají například Holanďané při kultivaci zamokřených území.¹

Slunečnici lze pěstovat na jakékoli pro vodu dobře propustné půdě, nejlépe však na hlinité. Listy, které lze dobře usušit, a poupata slunečnic se sbírají podle potřeby. Zralé terče se odřezávají, jakmile se začnou ohýbat, a zavěšují se v suchém prostředí, dokud se nažky nazačnou samy uvolňovat. Lodyhy se sklízají až na podzim.¹

Sbírá se zejména semeno (*Semen helianthi*), někdy i okvěť (*Flos helianthi*).³

Semena obsahují až 45% oleje, dále bílkoviny, glyceridy, steroly, fosfolipidy, karotenoidy, organické kyseliny (citrónová, vinná, chlorogenová), lecitin a provitamin A.³ Ze semen se vyrábí slunečnicový olej, který obsahuje vysoký podíl nenasycených mastných kyselin (zejména kyselinu linolovou a olejovou).⁴ Slunečnicová semena v množství 2 až 4 čajové lžičky denně zlepšují ostrost vidění.³

Ve farmacii je důležitou technologickou surovinou.³⁴ V Českém lékopise 2002 je uveden článek *Helianthi oleum raffinatum* (slunečnicový olej čištěný). Jedná se o mastný olej získaný lisováním nebo extrakcí a následným čištěním. Je to čirá světle žlutá tekutina. Je prakticky nerozpustný ve vodě a v lihu 96%, mísitelný s etherem petrolejovým. Relativní hustota je 0,921 a index lomu je asi 1,474. Skladuje se ve zcela naplněných, vzduchotěsných nádobách, chráněn před světlem.¹²

V květech a stejně tak i v listech je obsažen flavonoid quercimeritrin, kumarínové glykosidy, triterpenové saponiny, karotenoidy, antokyany, trísloviny, cholin, xantofyly, solantová kyselina, betain, helianthin a minerální látky. Slunečnicový květ snižuje horečku, vylepšuje trávení, snižuje pocení, stimuluje činnost jater, zevně léčí hnisavé kožní afekce, záněty a zapaření. V lékařství se slunečnicové tinktury užívalo při malárii, tuberkulóze a při žilních chorobách. Květ se podává ve formě prášku (asi 5 g denně) nebo ve formě nálevu či ve formě tinktury (2x až 4x denně po 25 až 40 kapkách).³ Čaj z listů má adstringentní, diuretické a expektorační účinky, užívá se při horečkách. Rozdrčené listy se užívají jako obklad na bolavá místa, otoky, hadí uštknutí a pokousání pavoukem. Čaj z květů se používal při léčbě malárie a plicních onemocnění. Kvetoucí vrcholky a semena mají antipyretické, výživné a stomachické účinky. Semenům se také přiřazuje účinek diuretický a expektorační. S úspěchem byl užíván při léčbě mnohých plicních chorob. Odvar z kořene se používal jako hřejivý oplach při revmatických problémech a bolestech.⁵

V kosmetickém průmyslu se slunečnicový olej využívá jako součást do krémových přípravků, kde dodává ochranné a promašťující účinky.²

Široké spektrum využití nachází slunečnice zejména v kuchyni a celkově v domácnosti. Semena se luští z nažek a jedí syrová nebo pražená. Klíčící rostliny je možné přidat do salátů, a také na obložené chleby. Délka klíčku však nesmí přesahovat 6 mm, protože rostlina pak získává trpkou chuť. Surová poupata slunečnice, nebo spíše nerozvinuté mladé úbory, se jedí v salátech nebo se duší a podávají jako artyčoky.¹ Pražená semena se používala jako náhrada kávy.⁶

Květy slunečnice jsou podstatným zdrojem medovice a nektaru pro výrobu medu. Slunečnicový olej se používá nejvíce za studena do salátů.² Řapíky listů se dají vařit a smíchat k ostatními jídly.⁵

V zemědělství slunečnice je využívána jako píce pro krmení dobytka a olejní.² Mírně snižuje tvorbu mléka, ale zvyšuje jeho tučnost.⁷ Celé nažky se dají využít jako krmivo pro drůbež, aby se zvýšil snes vajec.¹

Slunečnice jako okrasná plodina tvoří součást květinových vazeb a zkrášluje v letních měsících zahrádku.²

Slunečnicový olej se osvědčil také v malířské technice olejomalby. Dnes se používá jako součást do temperových barev.² Z květů lze vařením získat například žluté barvivo.¹

Před několika lety bylo zjištěno, že slupky by se mohli používat jako paliva.⁶ Slunečnicový olej je vhodný pro různá průmyslová užití, včetně produkce biodieselu a za tímto účelem je slunečnice pěstována v určitých částech Evropy (hlavně ve Francii).⁸ Lodyhy byly používány jako zdroj průmyslového vlákna. Některé státy zkoušejí využití vlákna v papíře.⁶

II. CÍL PRÁCE

Pro pozitivní výsledky získané provedenou předchozí pilotní studií, byla zvolena slunečnice roční k dalšímu zkoumání. Mým úkolem bylo připravit sumární extrakt z listů slunečnice, rozdělit ho na jednotlivé frakce a provést vyhodnocení těchto frakcí na základě skupinových detekčních činidel a testů na antioxidační aktivitu.

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA

Zařazení do systému:

říše: *Plantae* (rostliny)

oddělení: *Magnoliophyta* (rostliny krytosemenné)

třída: *Magnoliopsida* (vyšší dvouděložné rostliny)

podtřída: *Asteridae*

nadřád: *Asteranae*

řád: *Asterales* (hvězdicovité)

čeleď: *Asteraceae* (hvězdicovité)

podčeleď: *Asteroideae*

tribus: *Heliantheae*

rod: *Helianthus*

druh: *Helianthus annuus* L.⁴¹



Obr. 2: Listy slunečnice

Slunečnice (*Helianthus* L., 1753) je rod vysokých bylin z čeledi hvězdicovitých. Celý rod obsahuje přibližně 55 až 67 druhů.⁹ Slunečnice je původně ze Severní Ameriky, druhotně však roste či je pěstována téměř po celém světě.⁴

Mezi slunečnicemi nalezneme jednoleté i vytrvalé rostliny, 30 až 300 cm vysoké. Mají silný, chlupatý stonek s velkými, řapíkatými, zubatými listy. Níže rostoucí listy jsou střídavé, oválné nebo srdčité, listy při vrcholu stonku jsou užší a střídavé.⁹ Kořenový systém u jednoletých druhů je obvykle hluboký, u vytrvalých zpravidla vytvořeny oddenky, někdy hlízovitě ztlustlé, nebo křulový hlavní kořen.²²

Podčeleď *Asteroideae* je typická tvorbou jazykovitých i trubkovitých květů obojakých i jednopohlavných i jalových, uspořádaných na úborovém lůžku jako paprsek a terč. Mléčnice se obvykle nevyskytují.³⁴

trubkovité květy terče: ♀ * K0 [C(5) A5] $\overline{G(2)}$

jazykovité květy paprsku: ♀ ↓ (♀ ♂) K0 [C(5) A5] $\overline{G(2)}$

sterilní jazykovité květy paprsku³⁴: ↓ K0 C(5)

Velké úbory se žlutými jazýčkovitými květy vyrůstají na konci stonku.⁹ Úbory vyrůstají jednotlivě na konci větví nebo v řídkém květenství, zpravidla velké, stopkaté. Zákrov je polokulovitý až široce miskovitý, zákrovní listeny jsou ve 2 – 4 řadách.²²

Okrajové jazykovité květy jsou sterilní, nápadné, žluté, velmi vzácně fialové až purpurové; květy terče jsou oboupohlavné, trubkovité, žluté nebo částečně či zcela purpurově naběhlé.²²

Plody jsou čtyřboké zploštělé nažky s olejnatými semeny.⁷ Chmýr je tvořený 2 prodlouženými paprsky, někdy redukovanými na šupiny.²² Slunečnice se množí semeny, která se sází na jaře do hloubky asi 2,5 cm.⁴

Mladá rostlina je heliotropní, tzn. že květy se otáčejí za sluncem. Až při dozrávání semen úbor postupně těžkne a sklání se k zemi.⁹

Rostlina vyžaduje slunné stanoviště orientované na jih nebo jihozápad, vyhovuje jí černozem a hnědozem s dobrou zásobou živin. Slunečnice je poměrně náročná na vodu, ale nesnáší vysokou hladinu spodní vody. V dobře vyhnojené půdě narůstá do větší výšky a také květy mají větší průměr. Rostlina nezakořeňuje hluboko.²

Téměř na celém světě se pěstuje řada odrůd, které se liší zejména výškou rostliny a barvou květů. Klasické odrůdy slunečnic uvolňují velké množství pylu, oproti nově vyšlechtěným hybridům, které pyl netvoří. Mezi takové hybridy patří např. tyto odrůdy: Lemon Aura je plnokvětá slunečnice s citrónově žlutou barvou květů. Prado Gold je oblíbená u pěstitelů květin, neboť se rozvětňuje, dorůstá do výšky 90 cm a může mít až 5 tmavě žlutých květů, které mají v průměru 15 cm. Sunrich Orange má pouze jediný květ žluté barvy. Mezi odrůdy, které kvetou červeně, patří např. Prado Red, Double Dandy, Red Sun či Teddy Bear.²

Shrnutí:

Výška: 0,3 – 3,0 m

List: chlupatý, kopinatý, řapíkatý, střídavý, zubovitý

Barva listu: zelená

Květ: úbor, základní druh má velký terč žluté či hnědé barvy a výrazné jazykovité květy v několika řadách, jasně žluté barvy, existují i kultivary poloplňné a plně

Barva květu: červená, dvoubarevná, oranžová, tmavě hnědá, žlutá/zlatá

Plod: nažka

Barva plodu: černá, stříbrná/šedá
Nároky na půdu: humózní, výživná
Nároky na světlo: plné slunce
Nároky na vlhkost: vyšší
Kvetení: červenec až srpen
Zralost: září až říjen
Výsev: duben až květen¹⁰

2. LÁTKY IZOLOVANÉ Z LISTŮ RODU *HELIANTHUS*

2.1. Terpenoidy (isoprenoidy)

Největší a strukturně nejrozmanitější skupinou látek jsou terpenoidy. Nižší prchavé složky silic byly známy už ve starověku a používaly se především pro svoji vůni. Získávaly se destilací, a proto se označovaly také jako éterické oleje. Poté se zjistilo, že éterické oleje jsou mnohosložkové směsi, ve kterých kromě terpenů se vyskytují i fenylypropanové deriváty a mnohé jiné látky.²⁹

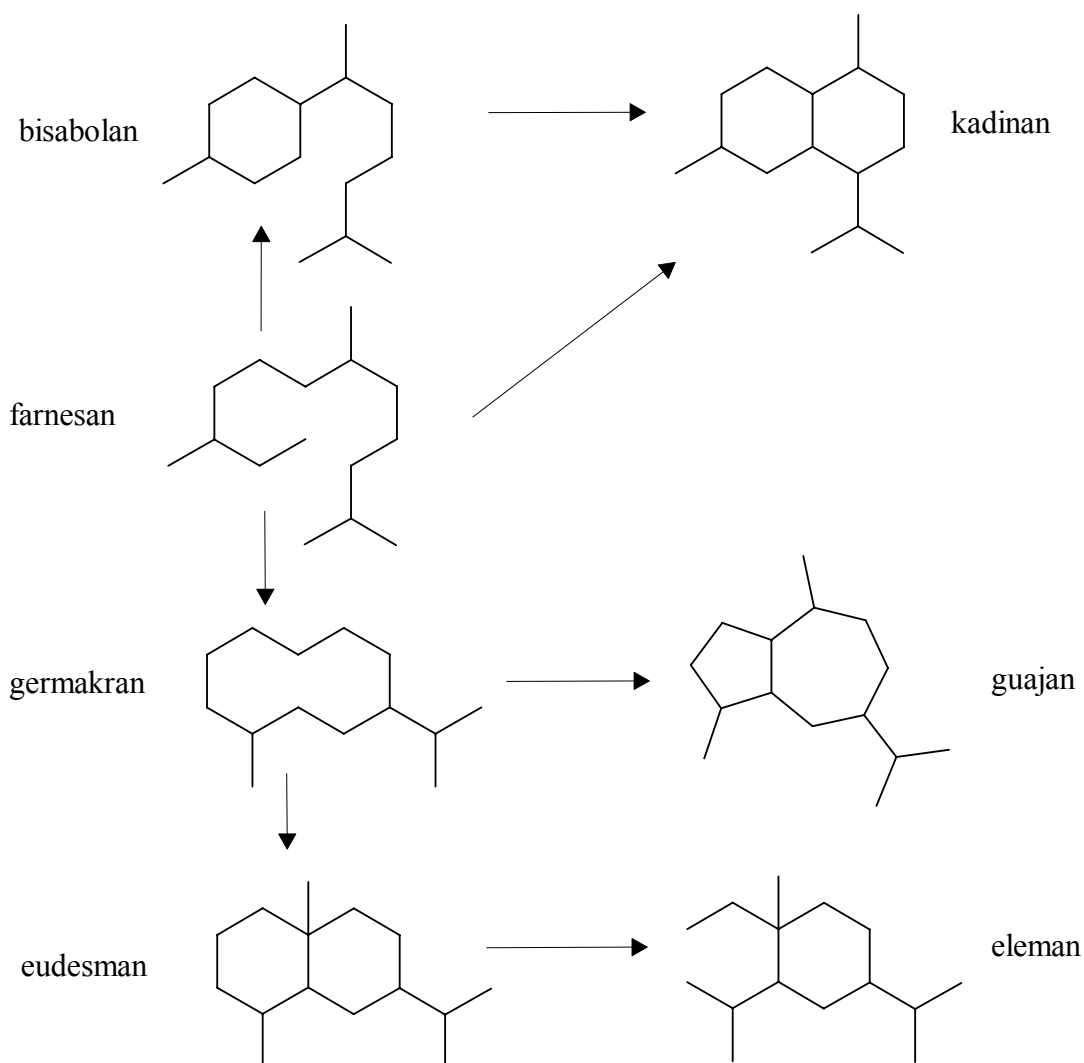
Terpenoidy jsou přírodní látky, základní uhlíkový skelet lze formálně rozložit na jednotky isoprenu (2-methylbutadienu). Spojováním isoprenových jednotek vznikají tak monoterpeny až polyterpeny, struktury alifatické i cyklické, uhlovodíky i kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, ketony, aldehydy, karboxylové kyseliny, ethery) a mnoho dalších přírodních látek, např. steroly.³⁰

Monoterpeny jsou látky prchavé a získávají se z čerstvého anebo sušeného materiálu destilací s vodou anebo s vodní parou. Seskviterpenoidy (C15-sloučeniny), diterpenoidy (C20-sloučeniny) a vyšší jsou většinou neprchavé a izolují se zpravidla extrakcí organickými rozpouštědly. Hemiterpeny se v přírodě vyskytují zřídka.²⁹

2.1.1. Seskviterpeny

Seskviterpeny tvoří nejpočetnější skupinu terpenů. Mají bi- až tetracyklickou strukturu. Monocyklické jsou typy bisabolanu a germakranu, bicyklické typu kadinanu, eudesmanu a guajanu (Schéma 1). Jsou častou součástí silic, tvoří hořčiny čeledi *Asteraceae*.³⁰ Základní skelet seskviterpenů obsahuje zpravidla 15 uhlíkových atomů.²⁹

Schéma 1: Typy seskviterpenů

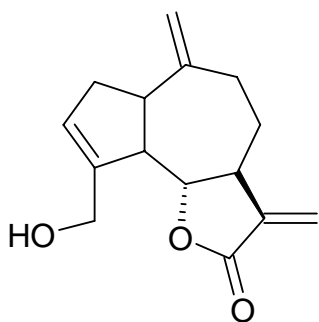


Seskviterpenické laktony jsou široce rozšířené v rostlinách. Bylo již popsáno více než 7000 struktur. Tyto, společně s diterpeny, tvoří nejpočetnější skupinu sloučenin izolovaných z rodu *Helianthus*. Izolované seskviterpenické laktony představují germakranolidové, heliangolidové, melampolidové, eudesmanolidové a sekogermakranolidové skelety, nejběžnějšími jsou germakranolidy a heliangolidy (včetně furanheliangolidů), představující ve své molekule nejčastěji angeloylový substituent na C-8 s β orientací. Tyto sloučeniny vykazují široké spektrum biologické aktivity, včetně potenciální alelopatie.²⁶

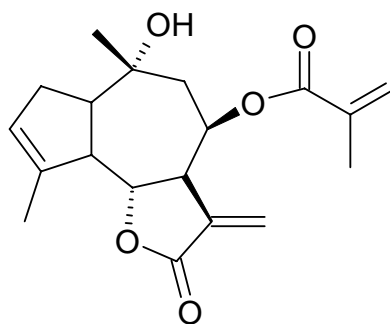
2.1.1.1. Guajanolidy

Annuolidy A – E byly získány ze středně polárních frakcí vodné extrakce čerstvých listů *Helianthus annuus* L. var. SH-222 společně s heliannuoly A – D.²¹

Annuolid A (Obr. 3) byl též získán z polární bioaktivní frakce vodného extraktu čerstvých listů *Helianthus annuus* var. cv. SH-222 a Stella společně s dalšími dvěma guajanolidy: **8β-angeloyloxykumambranolid** (Obr. 4) a **annuolid H** (Obr. 6).²⁶

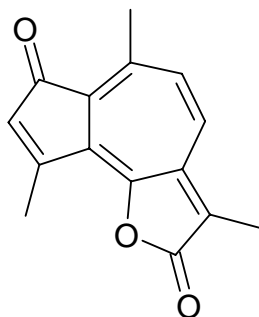


Obr. 3: Annuolid A



Obr. 4: 8β-angeloyloxykumambranolid

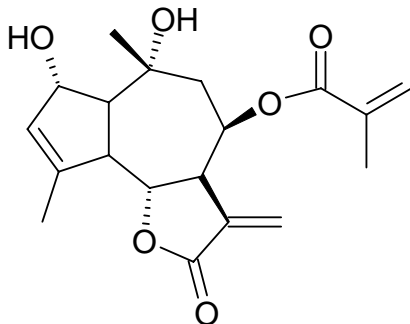
Z koncentrovaného dichlormethanového (CH_2Cl_2) extraktu z *Helianthus glaucophyllus* a *H. microcephalus* byly získány tři guajanolidy (Obr. 7 - Obr. 9). Z posledního druhu byly navíc získány další dva guajanolidy (Obr. 10) a plně konjugovaný guajanolid **malaphyllidin** (Obr. 5), který byl již dříve izolován z *Ferula macrophylla*.¹³



Obr. 5: Malaphyllidin

Annuolid H (Obr. 6) byl izolován jako bezbarvý olej, jeho sumární vzorec je $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$. ^1H NMR (nukleární magnetická resonance) spektrum ukázalo signály

odpovídající seskviterpenickému laktonu guajanového typu s α -methylen- γ -laktonem. Získaná data umožnila stanovení struktury, 8β -angeloyloxy- $2\alpha,10\alpha$ -dihydroxyguajano-3(4),11(13)dien- $6\alpha,12$ -olid.²⁶



Obr. 6: Annuolid H

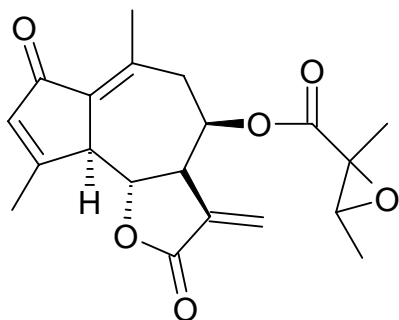
Sloučenina 1 (Obr. 7) byla v obou rostlinách nejvíce zastoupena. Její sumární vzorec je $C_{20}H_{22}O_6$.

Spektrální vlastnosti **sloučeniny 2** (Obr. 8) ukázaly, že se jedná též o guajanolid nesoucí epoxidovaný boční řetězec. ($C_{20}H_{24}O_7$).

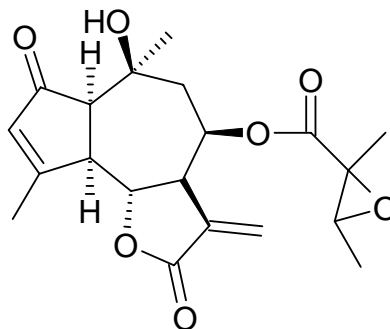
Spektrální analýza **sloučeniny 3** (Obr. 9) prokázala podobnou strukturu se sloučeninou 1. Její sumární vzorec odpovídá $C_{20}H_{24}O_7$.

Struktura **sloučeniny 4** (Obr. 10a) byla získána na základě spektrálních dat a odpovídá sumárnímu vzorci $C_{15}H_{14}O_3$.

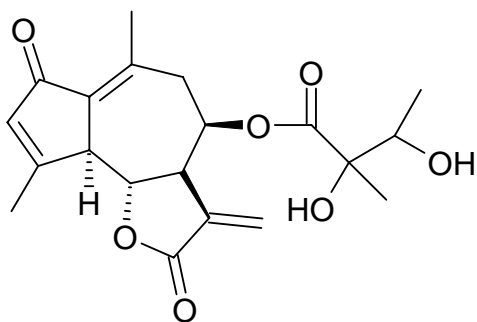
Data z 1H -NMR ukázala, že **sloučenina 5** (Obr. 10b) má podobný guajanolidový skelet jako sloučenina 4, sloučenina 5 má navíc jednu hydroxylovou skupinu. ($C_{15}H_{14}O_4$).¹³



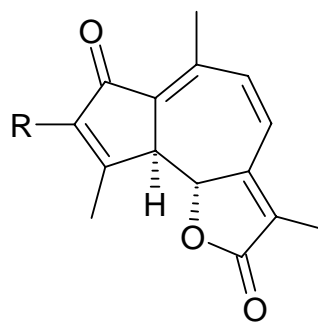
Obr. 7: Sloučenina 1



Obr. 8: Sloučenina 2



Obr. 9: Sloučenina 3



a R=H

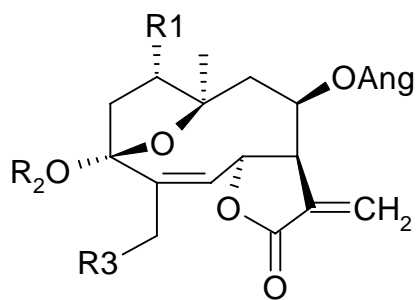
b R=OH

Obr. 10: Sloučenina 4 (a) a 5 (b)

2.1.1.2. Germakranolidy

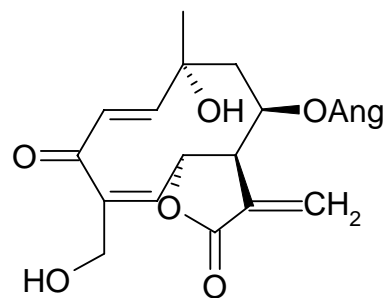
Z extraktu mladých listů a vrchní části stonku *Helianthus annuus* var. *giganteus* byl získán furanoheliangolid, identický s **niveusinem C** (Obr. 11a) izolovaným z *H. niveus*, **niveusin B** (Obr. 11c), nový germakranolid **15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin** (Obr. 12) a **ethoxyheliangolid (O-ethylniveusin B)** (Obr. 11b).¹⁵ Za účelem objasnění zda tato poslední sloučenina je přirozeně se vyskytující látkou nebo artefaktem vzniklým za podmínek probíhající extrakce, byl extrakční proces upraven použitím vody a chloroformu, tedy vyloučením alkoholu. Výsledkem bylo zjištění, že se tato sloučenina tvoří během alkoholové extrakce reakcí ethanolu s hydroxy skupinou na uhlíku C-3 niveusinu B.

Uvedené struktury se opírají o data získaná z IČ (infračervená spektrofotometrie), ¹H, ¹³C NMR měření a z dat MS (hmotnostní spektrometrie).¹⁵



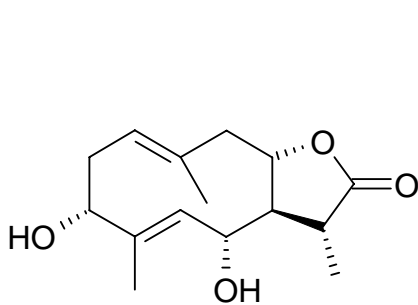
	a	b	c	
R1	OH	H	H	a - niveusin C
R2	H	CH ₂ CH ₃	H	b - O-ethylniveusin B
R3	H	OH	OH	c - niveusin B

Obr. 11

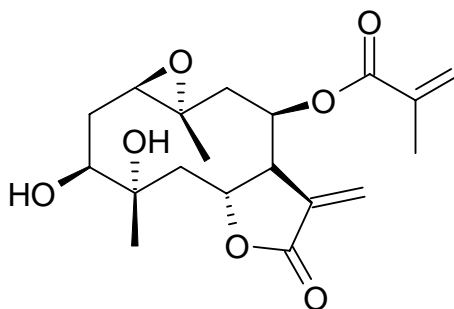


Obr. 12: 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin

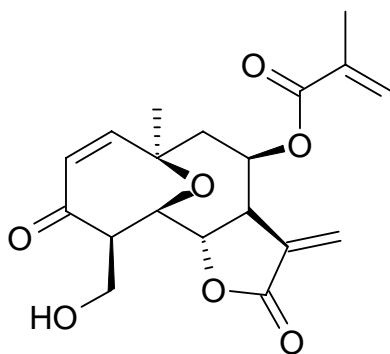
Niveusin B a 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin byly izolovány i z polární bioaktivní frakce vodného extraktu čerstvých listů *Helianthus annuus* var. cv. SH-222 a Stella spolu s dalšími germakranolidy: **helivypolid F** (Obr. 17), **11βH-dihydrochamissonin** (Obr. 13), **1,2-anhydroniveusin A** (Obr. 20), **1-methoxy-4,5-dihydroniveusin A** (Obr. 19a), **helivypolid H** (Obr. 18), **I** (Obr. 19b) a **J** (Obr. 19c), **argophyllin A** (Obr. 14) a **helivypolid B** (Obr. 15).²⁶



Obr. 13: 11βH-dihydrochamissonin



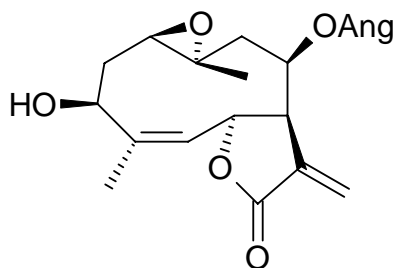
Obr. 14: Argophyllin A



Obr. 15: Helivypolid B

Z CH_2Cl_2 extratu surového vodného extraktu čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. Stella byl získán **helivypolid G**. Byl izolován jako amorfni nažloutlá pevná látka, které odpovídá sumární vzorec $\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{O}_{12}$. Ze spektrálních dat vyplývá, že se jedná o dimer seskviterpenického laktonu.¹⁴

Leptokarpin (Obr. 16) byl získán z dichlormethanového extraktu suchých listů *Helianthus annuus* L. cv. Peredovick společně s heliannuoly a dalšími seskviterpeny.¹⁶



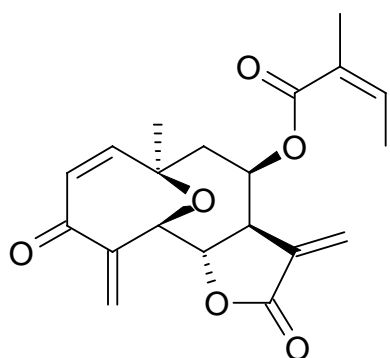
Obr. 16: Leptokarpin

Helivypolid F (Obr. 17) byl izolován jako bezbarvý olej. Získaná data jsou v souladu se sumárním vzorcem $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$ a předpokládají přítomnost angeloylového esteru ve své struktuře. Sloučenina byla určena jako 8 β -angeloyloxy-5 β ,10 β -epoxy-3-oxogermakran-1Z,4(15),11(13)-trien-6 α ,12-olid.²⁶

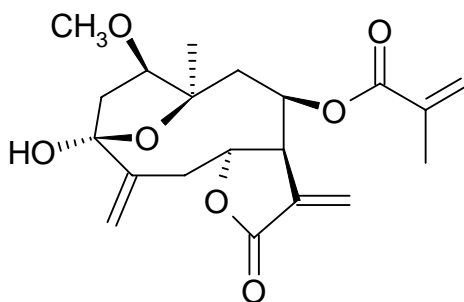
Helivypolid H (Obr. 18) byl izolován jako bezbarvý olej. Jeho ^1H NMR spektrum určilo, že se jedná o seskviterpenický lakton s angeloylovým esterem a další methoxylovou skupinou. Jeho spektroskopická data byla podobná těm od 1-methoxy-4,5-dihydroniveusinu A (Obr. 19a), což předpokládá lakton furanheliangolidového typu. Sloučenina byla určena jako 8 β -angeloyloxy-3 β ,10 β -epoxy-3 α -hydroxy-1 β -methoxygermakran-4(15),11(13)-dien-6 α ,12-olid.²⁶

Helivypolid I (Obr. 19b) byl izolován jako bezbarvý olej a jeho MS prokázalo sumární vzorec $C_{21}H_{30}O_8$. 1H NMR spektrum bylo podobné spektru 1-methoxy-4,5-dihydroniveusinu A. Jejich rozdíly vedou k závěru, že helivypolid I musí být jeho isomerem, s methoxylovou skupinou napojenou na jiném místě, ale se stejnou stereochemií. Helivypolid I je 8 β -angeloyloxy-3 β ,10 β -epoxy-1 β ,15-dihydroxy-3 α -methoxy-4 β -H-germakra-11(13)-en-6 α ,12-olid.²⁶

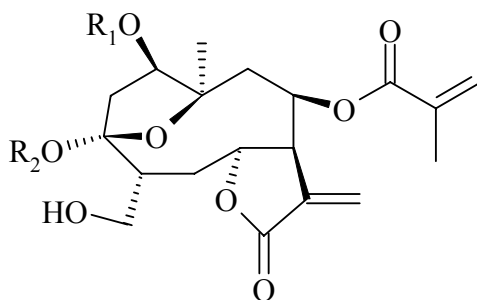
Helivypolid J (Obr. 19c) má sumární vzorec $C_{22}H_{32}O_8$. 1H NMR spektrum je podobné helivypolidu I. Tato sloučenina byla stanovena jako 8 β -angeloyloxy-3 β ,10 β -epoxy-3 α -ethoxy-1 β ,15-dihydroxy-4 β -H-germakra-11(13)-en-6 α ,12-olid.²⁶



Obr. 17: Helivypolid F



Obr. 18: Helivypolid H

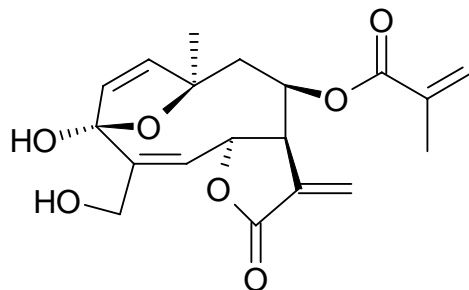


- a: R1=CH₃, R2=H
- b: R1=H , R2=CH₃
- c: R1=H , R2=CH₂CH₃

Obr. 19: 1-methoxy-4,5-dihydroniveusinu A (a), helivypolid I (b), helivypolid J (c)

Analytická data sloučeniny na Obr. 19a odpovídají dané struktuře a spektroskopická data odpovídají sloučenině 1-methoxy-4,5-dihydroniveusinu A již dříve izolované z *Helianthus annuus*.²⁶

1,2-anhydroniveusin A (Obr. 20) byl již dříve izolován z *Helianthus annuus*. Některá data byla opravena v souladu s daty získanými dvourozměrným ^1H - ^{13}C NMR g-HSQC (Heteronuclear single quantum correlation).²⁶



Obr. 20: 1,2-anhydroniveusin A

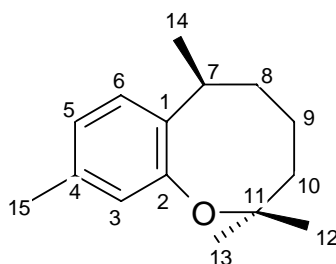
2.1.1.3. Heliannany

Heliannany představují nový typ seskviterpenů izolovaných ze suchozemských (*Helianthus annuus*) a mořských (*Haliclona fascigera*) organismů. Sdílejí jako společný strukturální prvek substituovaný aromatický kruh přikondenzovaný k různě velkému heterocyklu obsahujícímu kyslík.²⁸

Heliannuol A (Obr. 21) je prvním heliannanem popsáným v literatuře. Byl izolován z listů slunečnice a všechny následující zástupci této skupiny byli izolováni ze stejného zdroje, ale v různých varietách slunečnice. Překvapivě dosud žádné heliannuoly nebyly izolovány z jiných suchozemských zdrojů. Avšak základní heliannanový skelet byl nedávno izolován z mořského organismu, indo-pacifické houby *Haliclona fascigera*. Heliannany izolované z různých zdrojů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1); nové heliannany byly izolovány z jiných variet slunečnice. Heliannan má jiný původ než ostatní zástupci heliannanové skupiny.²⁸

Tab. 1: Heliannany izolované ze suchozemských a mořských organismů

Heliannany	Původ
Heliannan	<i>Haliclona fascigera</i>
Heliannuol A (Obr. 21)	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol B (Obr. 22)	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol C (Obr. 23)	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol D (Obr. 22)	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol E (Obr. 24)	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol F (Obr. 22)	<i>H. annuus</i> cv. SH-222, cv. VYP
Heliannuol G (Obr. 21)	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol H (Obr. 21)	<i>H. annuus</i> cv. SH-222, cv. VYP
Heliannuol I (Obr. 22)	<i>H. annuus</i> cv. SH-222
Heliannuol J (Obr. 22)	<i>H. annuus</i> cv. VYP, cv. Peredovick
Heliannuol K (Obr. 21)	<i>H. annuus</i> cv. SH-222



(+)-heliannan

CH₂Cl₂ extrakt ze suchých listů *Helianthus annuus* L cv. Peredovick byl nanesen na silikagel chromatografické kolony a byl eluován směsí hexan-aceton se vyrůstající polaritou. Ze středně polární frakce byly získány mimo jiné tyto sloučeniny: heliannuoly A, C, D, F, G, H, I a L, helibisabonol A a B.¹⁶

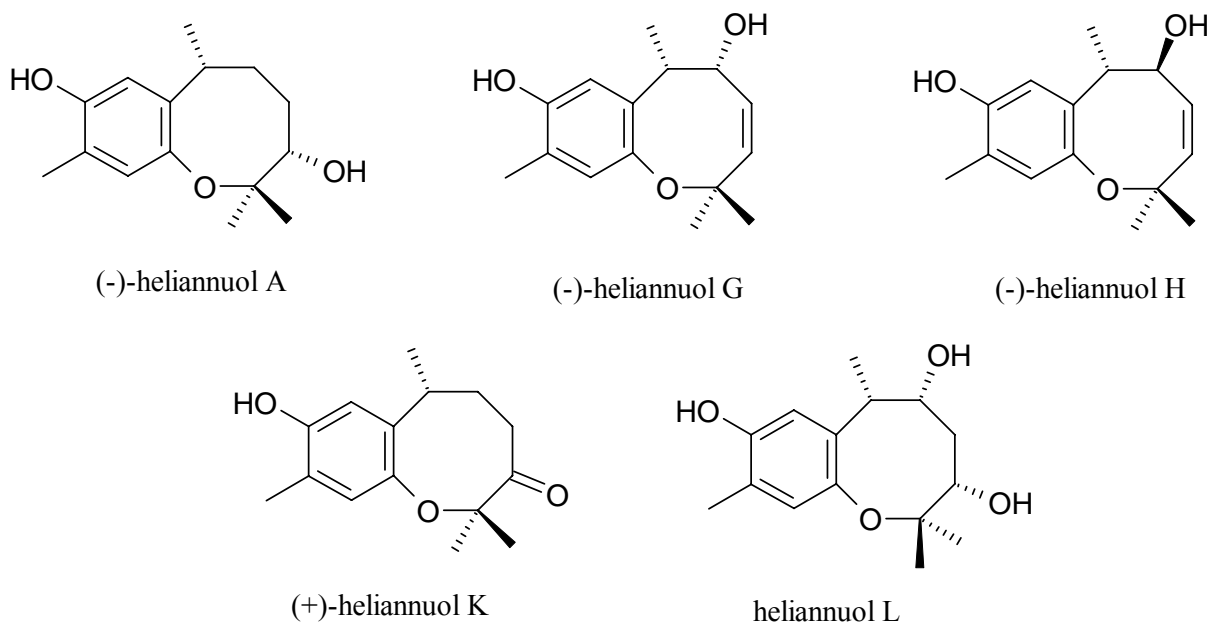
7,11-heliannany (Obr. 21)

Heliannuoly A, G, H, K, L^{21,28}

Heliannuol A byl izolován jako významnější složka středně polární bioaktivní frakce získané vodnou extrakcí čerstvých listů *H. annuus* L. var. SH-222. Tato

sloučenina obsahuje osmičlenný kruh kondenzovaný s benzenovým jádrem. Za pokojové teploty existuje jako směs konformerů.²¹

Sumární vzorec heliannolu L je $C_{15}H_{22}O_4$, byl získán jako bezbarvý olej. Byla provedena konformační studie čtyř možných isomerů. Na základě porovnání experimentálních hodnot, daná sloučenina odpovídá zázorněné konformaci. Relativní stereochemie na chirálních centrech C-7 a C-8 byla stanovena jako $7S^*,8R^*$.¹⁶



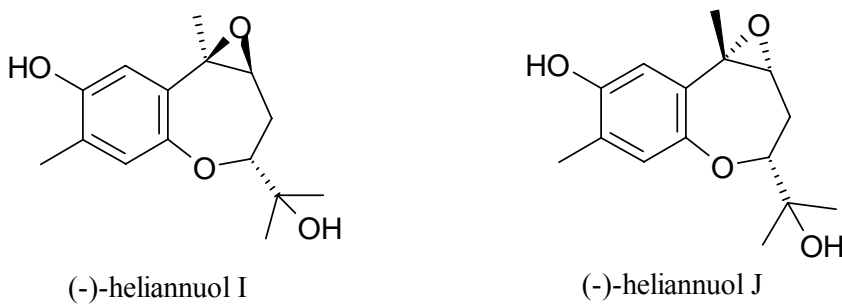
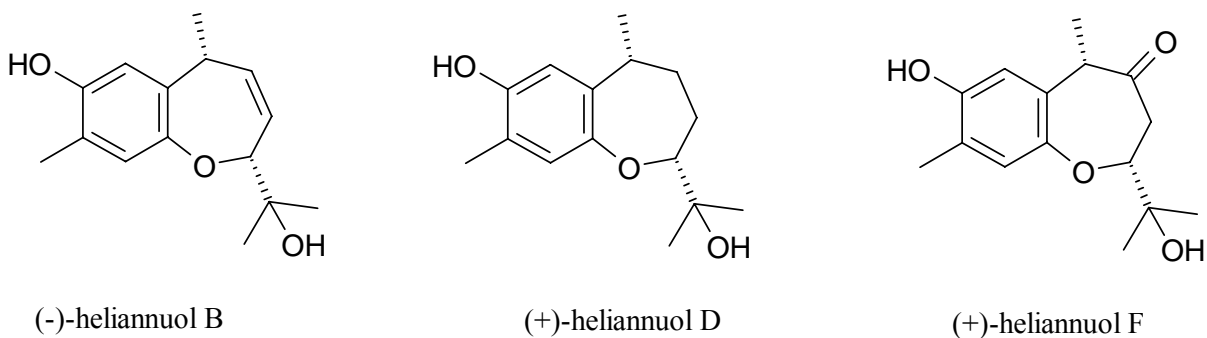
Obr. 21: 7,11-heliannany

7,10-heliannany (Obr. 22)

Heliannoly B, D, F, I, J^{21,28}

Heliannol B byl získán jako bezbarvý olej, jedná se o seskviterpen s 8 stupni nenasycenosti, jeho sumární vzorec je $C_{15}H_{20}O_3$.²¹

Heliannol D byl izolován jako bezbarvé krystaly, jeho sumární vzorec je $C_{15}H_{22}O_3$.²¹

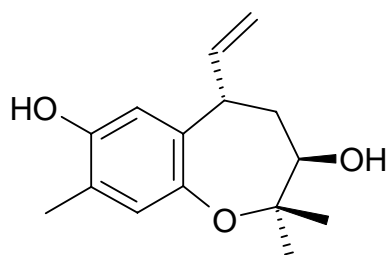


Obr. 22: 7,10-heliannany

8,11-heliannany

Heliannuol C (Obr. 23)

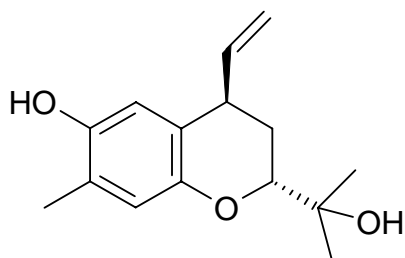
Byl izolován jako bezbarvý olej o sumárním vzorci C₁₅H₂₂O₃.²¹



Obr. 23: Heliannuol C

8,10-heliannany

Heliannuol E (Obr. 24)²⁸



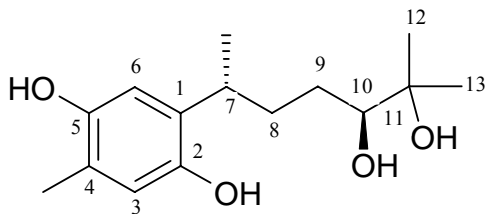
Obr. 24: Heliannuol E

Helibisabonoly

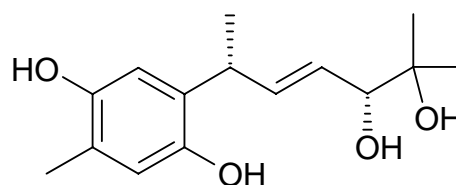
Helibisabonol A, B^{16,28}

Helibisabonol A (Obr. 25) byl získán jako bezbarvý olej. Ze spektrální analýzy byl odvozen sumární vzorec C₁₅H₂₄O₄. Porovnáním dvou nejstabilnějších konformací (7R*, 10S* a 7R*, 10R*) a experimentálních interakčních konstant byla potvrzena relativní stereochemie 7R*, 10S*.¹⁶

Helibisabonol B (Obr. 26) byl získán jako bezbarvý olej. Na základě analýzy 1H-NMR se liší od helibisabonolu A dvěma signály, které odpovídají vinylové skupině a trans poloze. Relativní stereochemie chirálních center C-7 a C-10 je 7R*, 10R*. Sumární vzorec je C₁₅H₂₂O₄.¹⁶



Obr. 25: Helibisabonol A

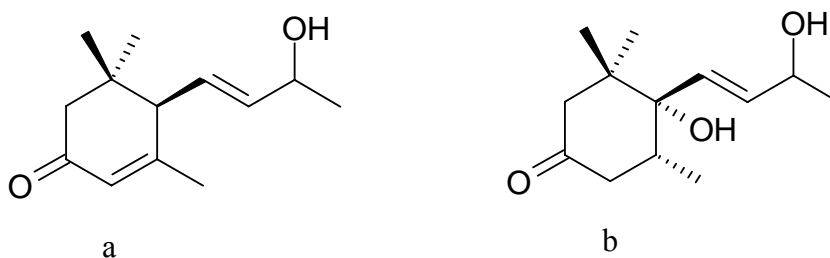


Obr. 26: Helibisabonol B

2.1.1.4. Annuionony (apokarotenoidy)

Mnoho apokarotenoidů, sloučenin s méně než 40 atomy uhlíku, ale s karotenoidní strukturou, se nalézají v rostlinných silicích a jsou často zodpovědné za chuť rostlin a některé jsou netěkavé. Syntéza těchto látek probíhá hlavně prostřednictvím katabolismu karotenoidů.¹⁷

Ze středně polární bioaktivní frakce dichlormethanových extraktů vodného extraktu čerstvých listů *H. annuus* var VYP a SH-222 byly izolovány sloučeniny **annuionon A** (Obr. 28a), **annuionon B** (Obr. 28b), **annuionon C** (Obr. 28c), **helinorbisabon** (Obr. 30) a dva další apokarotenoidy (Obr. 27).²⁷



Obr. 27: Sloučenina 6 (a) a sloučenina 7 (b)

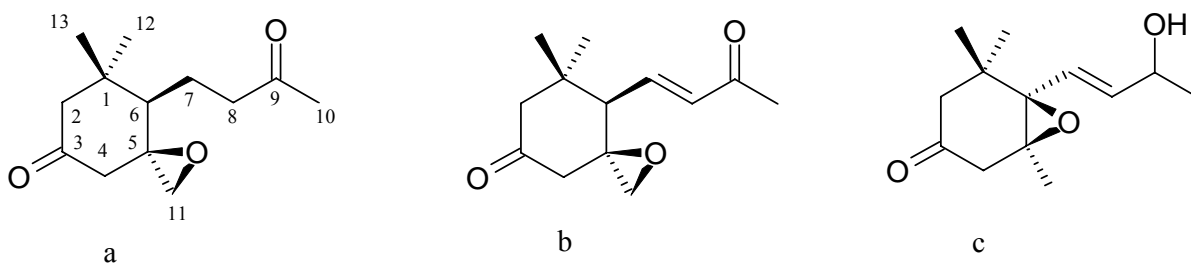
Annuiionon A byl získán také z polární bioaktivní vodné frakce *Helianthus annuus* cv. Stella a SH-222 společně s **annuiononem E** (Obr. 29a), **annuiononem F** (Obr. 29b), **annuiononem G** (Obr. 29c) a dalšími sloučeninami.¹⁷

Bisnorseskviterpen annuionon E byl též izolován z dichlormethanového extraktu suchých listů *H. annuus* L. cv. Peredovic.¹⁶

Annuiionon A (Obr. 28a) byl izolován jako bezbarvý olej. Sumární vzorec byl stanoven jako $C_{13}H_{20}O_3$. Sloučenina obsahuje oxiranový kruh mezi C-5 a C-11.²⁷ Relativní stereochemie annuiononu A na C-1, C-5 a C-6 odpovídá $1S^*$, $5R^*$, $6R^*$.¹⁷

Annuiionon B (Obr. 28b) byl získán jako bezbarvý olej, jeho sumární vzorec je $C_{13}H_{18}O_3$.

Annuiionon C (Obr. 28c) byl izolován jako bezbarvý olej, jeho sumární vzorec je $C_{13}H_{20}O_3$.²⁷



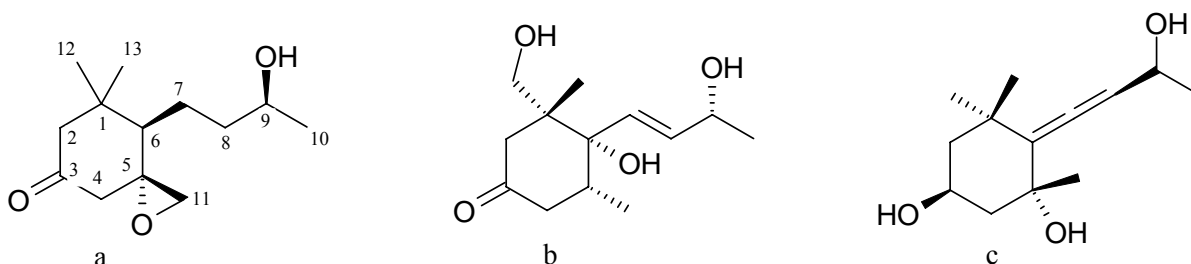
Obr. 28: Annuionon A (a), annuionon B (b), annuionon C (c)

Relativní stereochemie annuiononu E (Obr. 29a) na C-1, C-5, C-6 odpovídá 1S*, 5R*, 6R*.¹⁷ Byl izolován jako bezbarvý olej. Jeho sumární vzorec je C₁₃H₂₂O₃.¹⁶

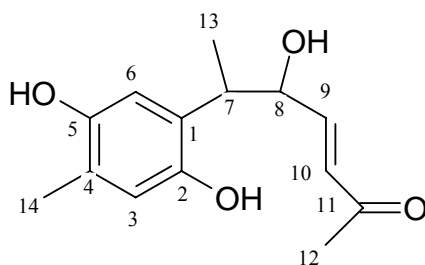
Annuionon F (Obr. 29b) byl izolován jako bezbarvý olej. Jeho sumární vzorec je C₁₃H₂₂O₄.¹⁷

Annuionon G (Obr. 29c) byl izolován jako bezbarvý olej. Jeho sumární vzorec je C₁₃H₂₂O₃.¹⁷

Helinorbisabon (Obr. 30) byl získán jako nažloutlý olej. ¹³C NMR a hmotnostní spektrum prokázaly přítomnost 14 uhlíků a sumární vzorec C₁₄H₁₈O₄.²⁷



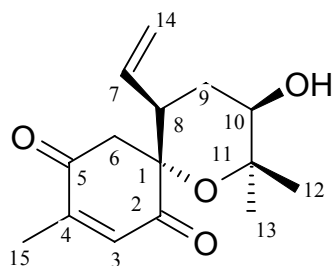
Obr. 29: Annuionon E (a), annuionon F (b), annuionon G (c)



Obr. 30: Helinorbisabon

2.1.1.5. Heliespiromy

Vodný extrakt čerstvých listů *Helianthus annuus* L. var. SH-222 byl vytřepán do CH_2Cl_2 . Z chromatografické kolony byl získán **heliespiron A** (Obr. 31) jako nažloutlý olej. Z dat spektrálních analýz byl ověřen sumární vzorec $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$. Tato látka má netypický spirosekviterpenický skelet a je prvním zástupcem nové skupiny látek.¹⁸

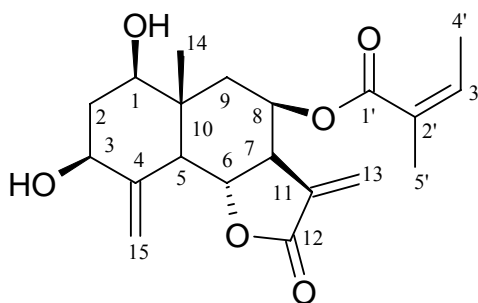


Obr. 31: Heliespiron A

2.1.1.6. Eudesmanolidy

Helieudesmanolid A (Obr. 32) byl izolován z polární bioaktivní frakce vodního extraktu čerstvých listů *Helianthus annuus* var. cv. SH-222 a Stella, společně s guajanolidy a germakranolidy.

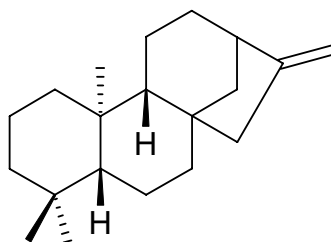
Tato sloučenina byla izolovaná jako bezbarvý olej, její sumární vzorec byl určen jako $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$. ^1H NMR spektrum prokázalo hodnoty charakteristické pro seskviterpenický lakton s eudesmanovým skeletem. Zjištěná struktura je 8 β -angeloyoxy-1 β ,3 β -dihydroxyeudesman-4(15),11(13)-dien-6 α ,12-olid.²⁶



Obr. 32: Helieudesmanolid A

2.1.2. Diterpeny

Spojením čtyř izoprenoidních jednotek vznikají C₂₀-sloučeniny – diterpeny.²⁹ Bicyklické a tricyklické diterpeny vycházejí patrně z tetracyklického kaurenu. Odvozují se od něj gibbereliny, rostlinné hormony aj.³⁰

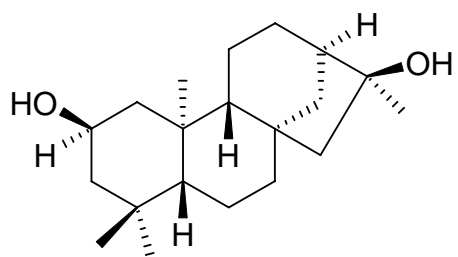


Kauren

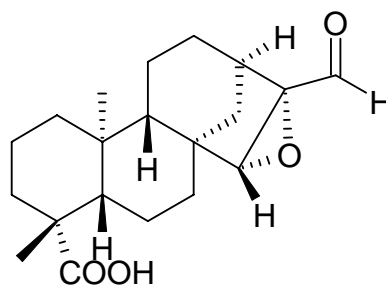
Dva nové diterpeny, **2β,16β-*ent*-kaurandiol** (Obr. 33) a **15α,16α-epoxy-17β-formyl-*ent*-kauran-19-ová kyselina** (Obr. 34), byly izolovány z *Helianthus annuus* L., jejich struktury byly určeny spektroskopicky.

První sloučenina byla získána jako bezbarvé krystaly. Její sumární vzorec je C₂₀H₃₄O₂. Předpokládalo se, že se jedná o saturovaný tetracyklický diterpen *ent*-kauranového skeletu, který nese dvě hydroxylové skupiny na bázi jeho strukturního vzorce. Rentgenová difrakce (X-ray diffraction) umožnila určení konfigurace jako (1S, 4R, 7S, 9R, 13R, 14S)-5, 5, 9, 14-tetramethyltetracyklo[11. 2. 1. 01, 10. 04, 9]hexadekan-7, 14-diol, která je identická s **2β,16β-*ent*-kaurandiolem**.

Druhá sloučenina byla získána jako amorfní hmota o sumárním vzorci C₂₀H₂₈O₄. Z dat ¹H-NMR a ¹³C-NMR byla zjištěna podobnost se známou sloučeninou **15α,16α-epoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-ovou kyselinou**, až na hydroxymethylovou skupinu na jejímž místě má tato sloučenina aldehydickou skupinu.²⁵



Obr. 33: 2β,16β-*ent*-kaurandiol

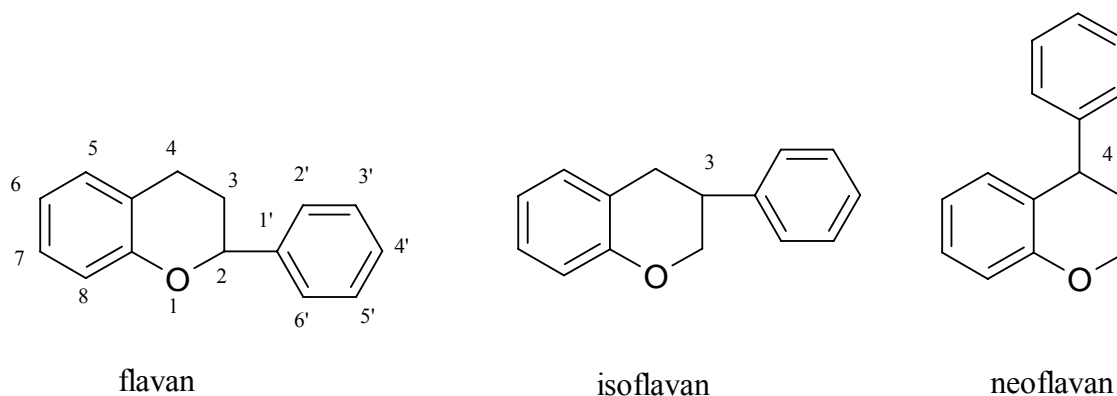


Obr. 34: 15α,16α-epoxy-17β-formyl-*ent*-kauran-19-ová kyselina

2.2. Flavonoidy

Flavonoidy jsou deriváty fenylchromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany) nebo 4 (neoflavany) (Schéma 2). Vyskytují se jen v rostlinné říši, a to nejčastěji flavany, řidčeji isoflavany; neoflavany se vyskytují zřídka a v terapii se nepoužívají.²⁹

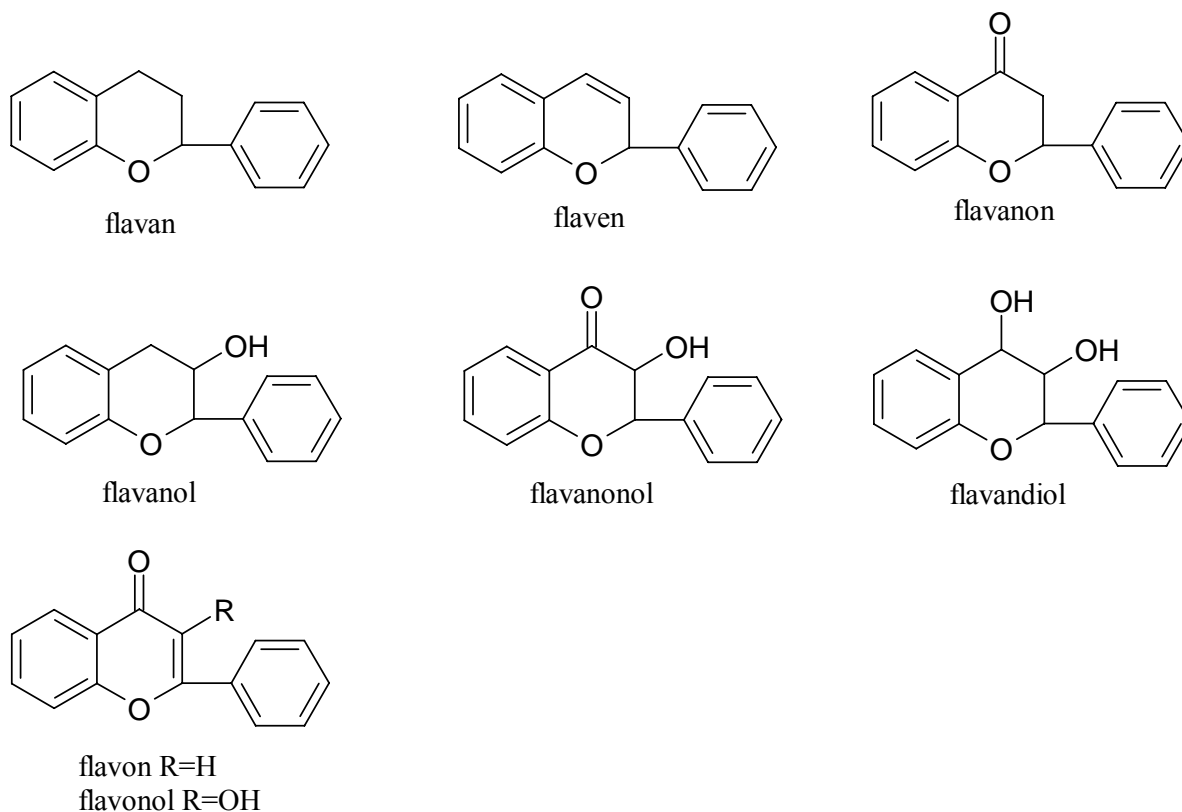
Schéma 2



Podle stupně oxidace pyranového kruhu se flavany dělí do několika skupin (Schéma 3).³¹

Flavany jsou v přírodě hojně rozšířeny v cévnatých rostlinách. Zvláště významné jsou flavonoidy (deriváty 4-oxoflavanu) – flavony, flavonoly a flavanony, a katechinové třísloviny – deriváty flavanu. Jednotlivé flavonoidy se navzájem liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin.^{29,31}

Schéma 3: Deriváty flavanu



Z CH_2Cl_2 extraktu z *H. microcephalus* byly izolovány, mimo jiné, **5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavan** (Obr. 35) a 4 další flavonoidy (Obr. 36).

Suché listy a květy *H. microcephalus* byly extrahovány CH_2Cl_2 . Zahuštěný extrakt byl nanesen na silikagel chromatografické kolony a eluován směsí hexan-ethyl ester kyseliny octové o vzrůstající polaritě. Byl získán **ladanetin** (Obr. 36a), **eupatin** (Obr. 36b), **kasticin** (Obr. 36c) a **mikanin** (Obr. 36d).¹³

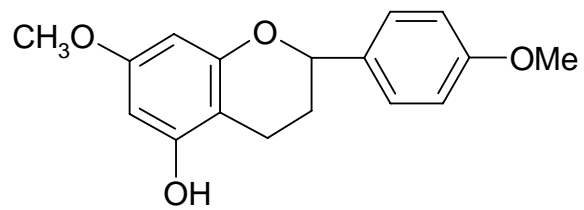
Flavan: 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavan

Flavon: ladanetin

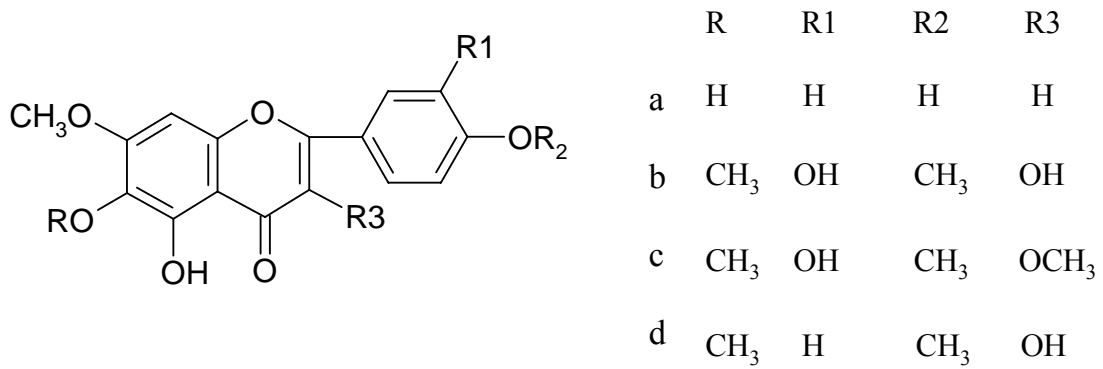
Flavonol: eupatin

kasticin

mikanin



Obr. 35: 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavan



Obr. 36: Flavonoidy

3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK

3.1. Alelopatická aktivita

3.1.1. Úvod

Kultivace slunečnice je převážně zaměřena na produkci oleje a hraje důležitou roli v jižních částech Evropy. Biochemické výzkumy prováděné na slunečnici odhalily, že tento druh (*Helianthus annuus*) je bohatým zdrojem seskviterpenoidů a dalších rostlinných metabolitů s širokým spektrem biologické aktivity; přesto se málo ví o funkcích těchto sloučenin. Nedávné výzkumy ukázaly, že slunečnice může aktivně ovlivňovat růst okolních rostlin, ale mechanismus těchto alelopatických efektů není znám.

Problematika plevelů představuje důležitou část zemědělského výzkumu. Jako důsledek tohoto výzkumu bylo od roku 1950 vyvinuto mnoho chemických látek a jejich využití bylo velmi rozšířeno. Navzdory moderním kontrolním metodám, dokonce i v rozvinutých zemích, které jsou silně závislé na chemických herbicidech, jsou ztráty zásluhou plevelů, včetně ztrát výnosů a kvality, poměrně vysoké.²¹

Nekritické užívání herbicidů mělo za následek a) nárůst výskytu rezistence plevelů na skupiny herbicidů jako jsou triaziny a dinitroaniliny, b) posun v populaci plevelů směrem k druhům, které jsou blízce příbuzné k plodinám, které napadají a c) znečištění životního prostředí a sdružená zdravotní rizika.^{21,27}

Alelopatie (allelopathy), objevující se odvětví aplikovaných věd, které se zaměřuje na biochemické interakce rostlina-rostlina a rostlina-mikroorganismy, může pomoci při překonávání těchto problémů pomocí vývoje pěstovaných druhů s větší schopností potlačovat růst plevelů, použitím přírodních fyto toxinů z rostlin či mikrobů jako herbicidů a užití syntetických derivátů přírodních látek jako herbicidů.¹⁸

Rostliny mají svoje vlastní obranné mechanismy a alelochemické látky jsou vlastně přírodními herbicidy. Jednen způsob využití alelopatie v zemědělství je prostřednictvím izolace, identifikace a syntézy aktivních sloučenin z alelopatických rostlinných druhů.²⁷

Druhy slunečnice jsou alelopatické, vlastně některé z nich, jako *Helianthus rigidus*, vykazují autotoxicitu. Pěstované slunečnice (*Helianthus annuus*) mají velký alelopatický potenciál a inhibují růst sazenic plevelů např. *Cissampelos pareira*, durmanu obecného, hořčice rolní a dalších. Půdní studie prokázaly, že biomasa plevelů je stejně redukována v kultivarech slunečnic jak s ošetřením tak i bez ošetření herbicidy.²⁷

Vzhledem k tomu, že existuje široká rozmanitost strukturních typů alelopatických sloučenin, byla zahájena systematická studie alelopatické aktivity (Structure-Activity Relationship, SAR) kultivarů slunečnice za účelem vyhodnotit jejich potenciál jako zdroj alelopatických zástupců a následně jako vzory přírodních herbicidů.¹⁸

3.1.2. Biologické testy

3.1.2.1. Test etiolizovaných koleoptilů

Pšeničná semena (*Triticum aestivum* L. cv. Duro), zasetá v Petriho miskách o průměru 15 cm a navlhčená vodou, rostla v temnu při 22±1 °C po 3 dny. Z výhonků byly odstraněny kořeny a semena. Následně byly umístěny pod Van der Weijho gilotinu a apikální 2 mm byly uříznuty a odstraněny. Následující 4 mm koleoptilů byly odloučeny a použity pro biologickou zkoušku. Veškerá manipulace byla provedena pod zeleným bezpečnostním světlem (green safelight). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a naředěny na koncentraci požadovanou pro danou zkoušku s maximální koncentrací 0,1% DMSO. Souběžně proběhly kontrolní zkoušky.

Surové extrakty, frakce nebo čisté sloučeniny, u kterých byla zjišťována biologická aktivita, byly umístěny do zkumavek. Zkouška byla provedena dvojmo. Do každé zkumavky byl přidán fosfáto-citrátový pufr (2 ml) o pH 5,6 a obsahující 2% sacharózu. Po vložení pěti koleoptilů do každé zkumavky (tři zkumavky pro každé zředění) se tyto zkumavky umístily do rolleru a ponechaly se otáčet ve tmě při 0,25 otáčkách za minutu po dobu 24 hodin při 22 °C. Koleoptily byly měřeny pomocí digitalizace jejich fotografických zobrazení. Data byla statisticky zpracována a prezentována v procentuálním vyjádření proti kontrolním vzorkům. Nula znamená

kontrolní vzorek, pozitivní hodnoty představují stimulaci sledovaných parametrů a negativní hodnoty pak inhibici.^{16,17,26}

Jinou variantou tohoto testu bylo použití pšeničných semen *Triticum aestivum* L. cv. Cortex. Ta byla umístěna do Petriho misek vyplněných filtračním papírem Whatman #1. Nechala se růst ve tmě při 24 °C po dobu 4 dnů. Etiolizované sazenice byly odstraněny z misek a rozříděny dle velikosti. Vybrané etiolizované sazenice byly umístěny pod Van der Wijho gilotinu a vrchní 2 mm byly odříznuty a odstraněny. Následující 4 mm byly použity pro biologickou zkoušku.

V této variantě biologické zkoušky se roztoky zkoumaných sloučenin naředily na požadované koncentrace avšak s konečnou maximální koncentrací 0,5% DMSO.²⁸

3.1.2.2. Test na Petriho miskách (seed germination bioassay)

V této zkoušce byla použita semena salátu (*Lactuca sativa* L.), řeřichy (*Lepidium sativum* L.), cibule (*Allium cepa* L.) pšenice a ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Všechna podprůměrná nebo poškozená semena byla vyřazena a ta vybraná byla rovnoměrně rozříděna. Biologická zkouška byla provedena na Petriho miskách o průměru 9 cm s využitím filtračního papíru Whatman #1 jako podložky.

Obecný postup sazenicové biologické zkoušky je následující: 25 semen každého druhu bylo umístěno na misku, kromě *Hordeum vulgare* (10 semen na misku), s 5 ml testovaného roztoku. Takto byly inkubovány ve tmě při 25 °C. Pro každou koncentraci testovaného roztoku byly vytvořeny čtyři kopie. Klíčení a doba růstu je pro každý druh rostlin různý: *Lepidium sativum*, 3 dny; *Lactuca sativa* a *Hordeum vulgare*, 5 dní; *Allium cepa*, 7 dní.

Matečný roztok (10^{-2} M) byl připraven použitím DMSO, následně byl naředěn na 10^{-4} M použitím 10 mM 2-[N-morfolino]ethansulfonové kyseliny (MES). Následné roztoky byly získány rozpuštěním při zachované koncentraci 1% DMSO. Byly provedeny souběžné kontrolní testy. Všechny hodnoty pH byly nastaveny na 6,0 před zkouškou.

Data byla vyhodnocena porovnáním s kontrolním vzorkem. Nula představuje kontrolní vzorek, pozitivní hodnoty znamenají stimulaci a negativní pak inhibici.²⁸

V jiné variantě byly vybrány jednoděložné druhy *Triticum aestivum* L. (pšenice) a *Allium cepa* L. (cibule) a dvouděložné druhy *Lycopersicon esculentum* Will. (rajče), *Lepidium sativum* L. (řeřicha) a *Lactuca sativa* L. (salát).

Klíčení a růst probíhal ve vodném roztoku při kontrolovaném pH použitím 10^{-2} M MES a 1 M NaOH (pH 6,0). Sloučeniny, které měly být testovány, byly rozpuštěny v DMSO (0,1; 0,02; 0,01 a 0,002 M). K těmto roztokům byl přidán pufr (5 μ l DMSO roztoku/ml pufru) tak, aby bylo dosaženo testovací koncentrace pro každou sloučeninu (5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} a 10^{-5} M). Počet semen v každé Petriho misce závisel na jejich velikosti. Pro rajče, salát, řeřichu a cibuli bylo použito 25 semen a 10 pro pšenici. Do každé Petriho misky bylo přidáno 5 ml kontrolního (vnitřního) referenčního roztoku. Pro rajče, řeřichu, cibuli a salát (100 semen) byly vytvořeny čtyři kopie; pro pšenici 10 kopií (100 semen).

Po přidání semen a vodného roztoku, byly Petriho misky uzavřeny parafilmem, aby byl zajištěn model uzavřeného systému. Semena byla dále inkubována při 25 °C v Memmert ICE 700 komoře v kontrolovaném růstovém prostředí a ve tmě. Biologická zkouška trvala 4 dny u řeřichy, 5 dní u salátu, rajčete a pšenice, a 7 dní u cibule. Po růstu byly rostliny zmrazeny na -10 °C po dobu 24 hodin k zabránění následného růstu během měřicího procesu.

Jako vnitřní reference byl použit komerční herbicid Logran, kombinace *N*-(1,1-dimethylethyl)-*N'*-ethyl-6-(methylthio)-1,3,5-triazine-2,4-diamin (Terbutryn, 59,4%) a 2-(2-chloroethoxy)-*N*-[[4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)amino]carbonyl]benzensulfonamid (Triasulfuron, 0,6%). Byl použit ve stejných koncentracích (5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} a 10^{-5} M) a za stejných podmínek. Kontrolní vzorky (pufrované vodné roztoky s DMSO a bez testovaných látek) byly použity pro všechny zkoušené rostlinné druhy.²⁶

3.1.3. Guajanolidy

Guajanolidy izolované z čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. SH-222 a Stella byly zkoušeny za použití testu etiolizovaných pšeničných koleoptilů v rozsahu od 10^{-3} do 10^{-6} M.²⁶

8β -angeloyloxykumambranolid (Obr. 4) a germakranolid helivypolid F (Obr. 17) dosáhly dohromady inhibici růstu při 10^{-3} M.²⁶

V rámci guajanolidů, 8β-angeloyloxykumambranolid byl nejaktivnější (-98% při 10⁻³ M, IC₅₀=0,15 mM); zatímco annuolid H (Obr. 6), se sekundární hydroxylovou skupinou na C-2, vykazoval menší aktivitu (-82%). Annuolid A (Obr. 3), který postrádá angeloxy skupinu na C-8, prokázal dobrou aktivitu při vysoké koncentraci (-90% při 10⁻³ M, IC₅₀=0,37 mM) a významný účinek při nejnižší testované koncentraci (-35% při 10⁻⁶ M).²⁶

3.1.4. Germakranolidy

Biologická aktivita sloučenin izolovaných z *H. annuus* byla stanovena na testu ovesných koleoptilů a pomocí antimikrobiálních testů.

Lineární redukce růstu v testu ovesných koleoptilů při koncentraci 100 μM byla 80% (± 6) pro 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin (Obr. 12), 57% (±9) pro ethoxyheliangolid (Obr. 11b) a 61% (± 6) pro niveusin B (Obr. 11c).

Antimikrobiální aktivita byla testována proti bakteriím a houbám. 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin měl nejsilnější inhibiční účinek proti bakteriím (MIC: 15 μg/ml na *Bacillus brevis*; 50 μg/ml na *Proteus vulgaris*; 95 μg/ml na *Eremothecium ashbyi*), zatímco ethoxyheliangolid vykazoval vyšší aktivitu proti houbám (MIC: 40 μg/ml na *B. brevis*; 85 μg/ml na *P. vulgaris*; 65 μg/ml na *E. ashbyi*), pak niveusin B (MIC: 35 μg/ml na *B. brevis*; 87 μg/ml na *P. vulgaris*; 98 μg/ml na *E. ashbyi*).¹⁵

Seskviterpenický lakton leptokarpin (Obr. 16), izolovaný ze sušených listů *H. annuus* L. cv. Peredovick, inhiboval růst pšeničných koleoptilů. Jeho biologická aktivita byla testována za použití metody etiolizovaných pšeničných koleoptilů v rozsahu 10⁻⁴ – 10⁻⁶ M. Jejich růst byl inhibován z 18% u 10⁻⁴ M roztoku leptokarpinu.

Pozorovaná aktivita leptokarpinu může mít souvislost s flexibilitou jeho molekuly. Rozdílná prostorová uspořádání, která může molekula zaujmout, hrají důležitou roli v aktivitě, stejně tak jako přítomnost dvou elektrofilních funkčních skupin: α-methylen-γ-lakton a oxiranový kruh.¹⁶

Germakranolidy izolované z čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. SH-222 a Stella byly testovány za použití zkoušky etiolizovaných pšeničných koleoptilů, nejaktivnější sloučeniny byly testovány na terčících standardních druhů (*Lepidium sativum*, *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum* a *Triticum aestivum*) od 5×10⁻⁴ do 10⁻⁵ M. Sloučeniny s největší fytotoxickou aktivitou byly helivypolid F (Obr.

17) a 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin (Obr. 12), obě sloučeniny mají karbonylovou skupinu na C-3 konjugovanou se dvěma dvojnými vazbami.²⁶

Niveusin C, 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin, 11 β H-dihydrochamissonin, argophyllin A, helivypolid F a H-J a 1,2-anhydroniveusin A (kromě 1-methoxy-4,5-dihydroniveusin A díky malému množství, které bylo získáno) byly testovány použitím etiolizovaných pšeničných koleoptilů v rozsahu koncentrací od 10⁻³ do 10⁻⁶ M. Helivypolid H (Obr. 18) byl testován při 10⁻⁴ M vzhledem k jeho malému množství. Analýza souboru dat umožnila rozdělení seskviterpenických laktonů do dvou různých skupin, jmenovitě G1 a G2. Skupina G1 obsahuje ty sloučeniny, které vykazovaly hodnoty IC₅₀ nižší než 10⁻³ M, a G2 obsahuje sloučeniny méně aktivní. G2 je tvořena méně aktivními sloučeninami 11 β H-dihydrochamissoninem (Obr. 13), argophyllinem A (Obr. 14), helivypolidem J (Obr. 19c) a eudesmanolidem helieudesmanolid A (Obr. 32). 11 β H-dihydrochamissonin je jediná sloučenina v této skupině, která má laktonovou skupinu umístěnou mezi uhlíky C-7 a C-8.²⁶

V případě furanheliangolidů, niveusin B (Obr. 11c) měl nejvyšší aktivitu (-92% při 10⁻³M), zatímco blízké příbuzná sloučenina 1,2-anhydroniveusin A (Obr. 20), která obsahuje dvojnou vazbu mezi uhlíky C-1 a C-2, měla mírně nižší stupeň aktivity při vyšších koncentracích. Skupina připojená na C-3 pravděpodobně hraje důležitou roli v aktivitě sloučeniny.

Z pohledu fyto toxické aktivity, čtyři neaktivnější sloučeniny z předchozí biologické zkoušky (guajanolid 8 β -angeoxyloxy cumambranolid, helivypolid F, niveusin B a 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin) byly testovány za použití terčů standardních druhů *Lepidium sativum* L., *Allium cepa* L., *Lactuca sativa* L., *Lycopersicon esculentum* Will. a *Triticum aestivum* L. v koncentracích od 5.10⁻⁴ do 10⁻⁵ M.²⁶

Nejvýznamnější hodnoty získané u salátu byly nalezeny pro růst kořene nebo výhonku se sloučeninami helivypolid F a 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin. Málo účinku bylo pozorováno na klíčení rajčat, ale podstatný efekt na růst kořene rajčat byl zaznamenán u helivypolidu F (-32%). Helivypolid F, niveusin B a 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin také prokázaly inhibiční účinky (okolo 20% při 5 \times 10⁻⁴ M) na vývoj výhonků těchto druhů.

Vyšší fyto toxicita byla pozorována na cibuli. Helivypolid F a 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin vykazovaly podstatný inhibiční účinek na kořenový růst (-54% při 5 \times 10⁻⁴ M), který přetrval i po zředění. Helivypolid F také prokázal účinek na růst výhonku (-20% při 5 \times 10⁻⁴ M).

U všech druhů se projeví sloučeniny helivypolid F a 15-hydroxy-3-dehydrodeoxyfruticin jako nejvíce fyto toxické, příčinou v obou případech je karbonyl na uhlíku C-3 konjugovaný se dvěma dvojnými vazbami. Je také zajímavostí, že helivypolid F má selektivní růst stimulační vlastnosti na kořeny salátu, ale nevykazuje tento účinek u rajčete ani u cibule.²⁶

3.1.5. Heliannany

Tyto látky sdílejí jako společný strukturní prvek substituovaný aromatický kruh kondenzovaný s různě velkým heterocyklem obsahujícím kyslík. Nezvyklost této struktury a fyto toxické vlastnosti některých členů této skupiny dovolují uskutečnit studii vztahu struktura-aktivita (SAR).²⁸

Heliannany získané ze sušených listů *H. annuus* L. cv. Peredovick inhibovaly růst pšeničných koleoptilů. Sloučeniny byly testovány za použití etiolizovaných pšeničných koleoptilů v rozsahu koncentrací 10^{-4} – 10^{-6} M, helibisabonol A byl též testován při 10^{-3} M.

Růst etiolizovaných pšeničných koleoptilů byl významně inhibován ($P < 0,01$) z 33 a 23% respektive s 10^{-4} M roztokem heliannolu A (Obr. 21) a heliannolu D (Obr. 22). Zatímco helibisabonol A (Obr. 25) růst inhiboval z 27% při koncentraci 10^{-3} M.¹⁶

Při testování alelopatické aktivity heliannolu A, B, C a D, izolovaných z listů *H. annuus* L. var. SH-222 a VYP, proti dvouděložným (*Lactuca sativa* a *Lepidium sativum*) a jednoděložným druhům (*Hordeum vulgare* a *Triticum aestivum*) v rozsahu koncentrací 10^{-4} – 10^{-9} M byla zjištěna významná bioaktivita, zvláště u heliannolu A a D. Tyto výsledky naznačují, že by heliannoly A – D mohly být součástí obranných mechanismů slunečnice proti dvouděložným druhům. V důsledku toho jsou vynikajícími kandidáty jako modely přírodních herbicidních látek s jistým (druhově) specifickým účinkem proti dvouděložným druhům.²¹

Aktivita skupiny heliannolů izolovaných ze slunečnice byla vyhodnocena použitím biologické zkoušky na Petriho miskách s terčíky standardizovaných jednoděložných a dvouděložných druhů. Prekurzory heliannolů (helibisabonol A) byly také zahrnuty do této studie. Dále byla uskutečněna další biologická zkouška založená na použití etiolizovaných pšeničných koleoptilů.²⁸

Na základě získaných dat a porovnáním bioaktivity jednotlivých sloučenin, lze výsledky shrnout do několika závěrů:

- a) Jako všeobecné chování lze pokládat inhibiční účinky pozorované obvykle u dvouděložných druhů, salátu (*Lactuca sativa*) a řeřichy (*Lepidium sativum*). Na druhou stranu, byl inhibován i růst jednoděložných (ječmene, *Hordeum vulgare*, a cibule, *Allium cepa*).
- b) Přítomnost heterocyklického kruhu je rozhodující pro aktivitu. Většina heliannuolů vykazovala aktivitu vůči dvou- a/nebo jednoděložným druhům. Byly také aktivní v biologické zkoušce etiolizovaných pšeničných koleoptilů. Avšak, když byly zkoušeny odpovídající prekurzory s otevřeným řetězcem, helibisabonol A a B a další související sloučeniny získané syntézou, bylo zjištěno, že jsou neaktivní v biologické zkoušce v Petriho miskách a vykazovaly také nižší aktivitu u testu na koleoptilech.
- c) Velikost heterocyklického kruhu je klíčovým faktorem: pořadí klesající aktivity v biologické zkoušce v Petriho miskách je osmičlenný > sedmičlenný > šestičlenný. Toto platí i u biologické zkoušky na koleoptilech.
- d) Poloha hydroxylové skupiny také ovlivňuje aktivitu. Sloučeniny s hydroxylovou skupinou umístěnou na heterocyklickém kruhu (7,11-heliannuoly, Obr. 21, a 8,11-heliannuoly, Obr. 23) jsou více aktivní než ty, které mají hydroxylovou skupinu na iso-propylové straně řetězce (7,10-heliannuoly, Obr. 22). Při porovnání 8,11-heliannuolů s 7,11-heliannuoly se zjistilo, že přítomnost vinylové části řetězce také zvyšuje aktivitu.
- e) Konečně, stereochemie každého chirálního centra je klíčová v bioaktivitě. Porovnáním účinků heliannuolu G s jeho epimerem na C-8 heliannuolem H se prokázal velký rozdíl v aktivitě mezi oběma sloučeninami.²⁸

3.1.6. Annuionony (apokarotenoidy)

Annuionony izolované z *H. annuus* L. cv. Stella a SH-222 byly testovány za použití etiolizovaných pšeničných koleoptilů v rozsahu koncentrací 10^{-3} – 10^{-6} M. Jejich růst byl významně inhibován ($P < 0,01$) sloučeninami annuionon G (Obr. 29c) (-67% , 10^{-3} M; -41% , 10^{-4} M), annuionon A (Obr. 28a) (-58% , 10^{-3} ; -56% , 10^{-4} M; -53% , 10^{-5} M) a

annuionon E (Obr. 29a) (-65%, 10^{-3} M; -40%, 10^{-4} M). Aktivita annuiononu A a annuiononu E může souviset s přítomností bicycklického etheru.¹⁷

Z *Helianthus annuus* var. SH-222 a VYP bylo izolováno šest norseskviterpenů, které jsou potenciálně alelopatické. Tyto sloučeniny vykazují zřetelnou selektivitu (parametrů a druhů) vůči jednoděložným druhům s průměrným inhibičním účinkem -45% na klíčení *Allium cepa* a průměrným stimulačním účinkem 50% na růst kořene *A. cepa* a *Hordeum vulgare* v rozsahu koncentrací 10^{-5} – 10^{-9} M.²⁷

Za účelem vyhodnocení jejich potenciální alelopoatické aktivity, byl studován efekt serie vodných roztoků (10^{-4} – 10^{-9} M) izolovaných sloučenin na kořeny a délku výhonků *Lactuca sativa*, *Lepidium sativum*, *Allium cepa* a *Hordeum vulgare*.²⁷

Nejvýznamnější účinky pozorované na dvouděložných družích (*L. sativa* a *L. sativum*) byly získány s annuiononem B, který stimuloval růst kořene *L. sativum* při nízké koncentraci (10^{-8} M, 47%; 10^{-9} , 32%), a s helinorbisabonem (Obr. 30), který vykázal výrazný inhibiční efekt na klíčení *L. sativa* při všech testovaných koncentracích (průměrně -50%).

Zřetelná selektivita (parametrů a druhů) byla pozorována u jednoděložných druhů. Sloučenina 6 (Obr. 27a) a annuionon A inhibovaly (sloučenina 6: 10^{-4} M, -38%; annuionon A: 10^{-4} M, -47%) klíčení *Allium cepa*, ale stimulovaly (sloučenina 6: 10^{-4} M, 63%; 10^{-8} M, 54%; annuionon A: 10^{-4} M, 42%; 10^{-5} M, 48%; 10^{-6} M, 49%) růst kořene. Avšak, pouze stimulační účinek na růst kořene a výhonku byl pozorován na *Hordeum vulgare*. V tomto případě, annuionon C (Obr. 28c) a helinorbisabon (Obr. 30) stimulovaly růst kořene v průměru z 35% a 40% respektive v koncentrační řadě 10^{-5} - 10^{-9} M. Pouze helinorbisabon působil na růst výhonku *H. vulgare* (průměrně 30%).

Výše uvedená zjištění nasvědčují tomu, že uvedené sloučeniny pravděpodobně jsou významně spojeny s alelopatickou aktivitou kultivarů slunečnice na jednoděložné druhy. Na základě těchto účinků, lze shrnout, že sloučenina 6 a annuionon A, částečně i helinorbisabon, jsou dobrými kandidáty jako vzory potenciálních herbicidů s možným využitím jako nové generace přírodních agrochemikálií ke kontrole jednoděložných plevelů.²⁷

3.1.7. Heliespiroony

Heliespiron A (Obr. 31), izolovaný z čerstvých listů *H. annuus* L. var. SH-222, je zvláště zajímavý, protože se stal prvním členem nové skupiny bioaktivních seskviterpenů s potenciální alelopatickou aktivitou.

Na základě výsledků z provedených biologických zkoušek, je tato látka pravděpodobně zapojena do alelopatické aktivity kultivarů slunečnice.¹⁸

3.1.8. Eudesmanolidy

Helieudesmanolid A (Obr. 32), izolovaný z čerstvých listů *Helianthus annuus* cv. SH-222 a Stella spolu s dalšími sloučeninami, byl testován za požití zkoušky etiolizovaných pšeničných koleoptilů v rozsahu koncentrací od 10^{-3} do 10^{-6} M.

Tato sloučenina byla jediným eudesmanem a jako jediná vykazovala stimulační efekt při koncentracích nižších než 10^{-3} M. Je neobvyklé pro přírodní látku, aby byla rostlinným růstovým promotorem, v literatuře se to považuje za ojedinělý jev. Obvyklé (přírodní) rostlinné růstové promotory jsou IAA (kyselina indol-3-octová), gibbereliny, cytokiny, ethylen a brassinosteroidy. Chování této sloučeniny bylo podobné chování IAA, která inhibuje růst etiolizovaných pšeničných koleoptilů při 10^{-3} M a podporuje růst při nižších koncentracích. Podpora rostlinné produkce plodin má podstatný význam v celosvětové produkci potravin. Kdykoliv by produkce plodin vzorstla nebo byla zrychlena, mohlo by to vést k ekonomickým úsporám. Krátší období, po které je plodina v půdě, také znamená i menší vystavení vlivu fytopatogenům.²⁶

3.2. Cytotoxicita

3.2.1. Úvod

Za poslední dvě desetiletí vzrostl zájem o triterpenoidní saponiny díky širokému rozsahu biologického uplatnění. Několik saponinů prokázalo protizánětlivé, protinádorové, antivirové, antifugální, imunomodulační, antitrombotické,

kardiovaskulární, spermicidní a molluscicidní účinky. V několika studiích bylo popsáno cytotoxické a antineoplastické chování určitých saponinů, ale zatím žádný průzkum nepopsal vliv uhlohydrátů u významného počtu glykosidů.

Na základě tohoto podkladu bylo v první studii prozkoumáno 21 triterpenoidních saponinů obsahující různé uhlohydrátové podíly a jejich cytotoxické účinky proti dvěma myším nádorovým buněčným liniím *in vitro*. Hemolytický index byl zkoušen z pohledu možného vzájemného vzáhu cytotoxicita/hemolytický index. Cílem této studie bylo prokázat uhlohydrátovou závislost ve vztahu struktura-aktivita a získat informace o cytotoxicitě jako základ pro následné studie o imunomodulačních účincích *in vitro* a *in vivo*.³²

Ve druhé studii bylo testováno několik mono- a bisdesmosidických saponinů, stejně tak i acylglykosidů polygalakové nebo echinocystové kyseliny, pro jejich cytotoxickou aktivitu na myších liniích nádorových buněk *in vitro*. Bylo zjištěno, že intenzita těchto účinků může být ovlivňována uhlohydrátovými podíly. Zmíněné triterpenoidní glykosidy, společně s triterpenoidy glycyrrhizinem, glycyrrhetinovou kyselinou a ginsenosidem Re, byly testovány na imunomodulační účinek *in vitro*. U některých saponinů byl zkoumán imunomodulační protinádorový účinek *in vivo*.³³

3.2.2. Biologické testy

3.2.2.1. *In vitro* cytotoxické testy a hemolytický účinek

Buněčné linie

Buňky P-815 a YAC-1 byly zakoupeny od „German Collection of Microorganisms and Cell Cultures“ (Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur), Braunschweig. Buňky byly inkubovány při 37 °C s 10% CO₂ v DMEM mediu (Dulbecco's modified eagles medium) doplněném 10% teplem inaktivovaným fetálním telecím sérem a 1% penicilin/streptomycinovým roztokem.

Buňky P-815

10⁴ P-815 buněk bylo inkubováno v 96 jamkách mikrotitrační destičky s různou koncentrací testovaných látek nebo s kontrolním médiem po dobu 48 hodin. Testované

látky byly rozpuštěny v DMEM mediu nebo v max. 0,05% DMSO v DMEM. Poté byla stanovena cytotoxicita pomocí 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromidu (MTT) modifikované kolorimetrické mikrometody podle Moosmanna. Zánik buněk v každé jamce byl měřen v mikrodestičkách fotometru při 540 nm. Každá sloučenina byla testována osminásobně při minimálně třech koncentracích. Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z poklesu směrnice udané jako procento úbytku absorpance vůči kontrolám (logaritmus koncentrace).

Buňky YAC-1

5000 YAC-1 buněk bylo inkubováno v 96 jamkách mikrotitrační destičky s různou koncentrací testovaných látek nebo s kontrolním médiem po dobu 48 hodin. Testované látky byly rozpuštěny v DMEM mediu nebo v max. 0,05% DMSO v DMEM. Po centrifugaci destičky při 1000 g po dobu 10 min. bylo přidáno 100 μ l roztoku (pH 10,2) 20 mM nitrofenylfosfátu doplněného o 2 mM $MgCl_2$, 100 mM Triton X, 200 mM diethanolamin. Destička se 60 min. třepala, barevná reakce byla pak zastavena přidáním 100 μ l 0,5 M NaOH do každé jamky. Zánik buněk v každé jamce byl měřen v mikrodestičkách fotometru při 405 nm. Každá sloučenina byla testována osminásobně při minimálně třech koncentracích. Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z poklesu směrnice udané jako procento poklesu absorpance vůči kontrolám (logaritmus koncentrace).

Hemolytický index

5 μ l suspenze lidských krevních erytrocytů (směs 20 μ l lidské krve se 4 μ l 3,8% citrátu sodného v 300 μ l roztoku 0,9% chloridu sodného) a 5 μ l testovaných látek v PBS rozpuštěných v různých koncentracích bylo smícháno na mikroskopické destičce (Olympus CH2, zvětšení: 400 \times). Hemolytický index byl stanoven porovnáním koncentračních hodnot se standardním saponinem ÖAB (HI 30000) v daném čase.³²

3.2.2.2. Testy na imunomodulační a protinádorové účinky

Stanovení endotoxinů (LPS)

Stanovení endotoxinů bylo provedeno Pyrogenním testem.³³

Zvířata

Samice DBA/2, CD 1 a BDF 1 myši, staré 6 – 10 týdnů, byly zakoupeny od Charles River Wiga.³³

Buněčné linie

Buňky P 815, YAC 1 a L929 byly zakoupeny od Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM). Buňky sarkomu 180 byly získány od American Type Culture Collection.³³

Příprava buněk myší sleziny a brzlíku

Buňky byly získány ze samic myši DBA/2. Byly asepticky odebrány ze sleziny nebo brzlíku. Erythrocyty byly odstraněny hypotonickou lýzou (NH₄Cl/Tris pufr, pH 7,2).³³

Příprava lidských monocytů a granulocytů

Heparinizovaná periferní krev od zdravých dárců vrstvená přes Polymorphprep (Nycomed) byla centrifugována po dobu 35 min. při 450×g. Po gradientové centrifugaci byly obě skupiny monocytů a granulocytů rozděleny s následným vymýváním monocytů kultivačním médiem. Frakce granulocytů byla nejprve byla pročištěna roztokem 0,45% NaCl a po té byla promyta kultivačním médiem.³³

Média a kultivační podmínky

Jako standardní kultivační médium bylo použito DMEM, doplněné o 10% teplem inaktivované fetální telecí sérum, 2 mmol glutaminu, 4,5 g/l glukózy, 3,7 g/l NaHCO₃ a 1% penicilinu (10000 U/ml)/streptomycinu (10000 µg/ml). Kultivační médium makrofágů bylo složeno z DMEM 55%, 5% koňského séra, 10% fetálního telecího séra a 30% sterilního L929 supernatantu s M-CSF (10⁶ L929 buněk/100 ml; inkubovaných 14 dní). Tkáňové kultury byly inkubovány při 37 °C v 10% CO₂ atmosféře.³³

Lymfocyty transformační test (LTT)

Buňky (5×10⁵ slezinných, brzlíkových nebo lidských monocytů) byly inkubovány trojmo s testovanými vzorky po dobu 48 hodin v mikrotitračních destičkách. Testované látky byly rozpuštěny v DMEM médiu nebo v max. 0,05%

DMSO v DMEM. Byl přidán ^3H -tymidin ($0,4 \mu\text{Ci}/\text{jamku}$) a kultury byly inkubovány dalších 18 hodin. Buňky byly získány pomocí přístroje Skatronu a přidání ^3H -tymidinu bylo měřeno pomocí počítadla. Účinek byl vypočítán jako stimulační index ve vztahu ke kontrole. Statistické vyhodnocení bylo provedeno použitím Studentského t-testu.³³

Stanovení lymfocytární populace

Myší lymfocyty byly připraveny a kultivovány jak bylo popsáno v lymfocytárním transformačním testu. Po 72 hodinové inkubaci byly buňky promyty v PBS. K buňkám byl přidán PBS ($50 \mu\text{l}$ obsahujících $0,1\%$ NaN_3 a $0,1\%$ BSA), pak $50 \mu\text{l}$ protilátek selektivních vůči B-buňkám (anti-Ly 5, konjugovaný FITC) a protilátek selektivních vůči T-buňkám (myší anti CD 3, konjugovaný PE) (2% každé protilátky v PBS). Po 30 min. byly buňky promyty v PBS a poté vybrány pomocí FACS-scanu (Becton Dickinson). Vyhodnocení počtu B- a T-buněk bylo provedeno na softwaru Lysis II.³³

Kultivace makrofágů myší kostní dřeně

Asepticky odloučená kostní dřeň ze stehenních kostí z DBA/2 myší byly promyty 5 ml DMEM (pomocí injekční stříkačky 18). Po určení vitálních buněk pomocí trypanové modře, 10^7 buněk bylo přemístěno do sterilních teflonových nádobek, obsahujících 100 ml makrofágového kultivačního média. Po destidenní inkubaci byly získány diferencované makrofágy.³³

Fagocytární assay

Makrofágy kostní dřeně (10^5 buněk) byly inkubovány s testovými vzorky trojmo v mikrotitračních destičkách po dobu 15 hodin. Ulpělé makrofágy byly promyty, k nim bylo přidáno $200 \mu\text{l}/\text{jamku}$ roztoku zymosan/luminol ($0,5 \mu\text{mol}/\text{l}$ luminolu a $100 \mu\text{g}$ zymosanu/ jamku v DMEM bez fenolové červeně). Fagocytóza byla stanovena chemoluminiscenčním měřením ve snímači mikrotitračních destiček.

Chemoluminiscence byla zaznamenávána po dobu 2 hodin, bylo vypočteno procento nárůstu chemoluminiscence.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno použitím Studentského t-testu.

Tato assay byla provedena stejným způsobem s 2×10^5 lidskými monocyty a granulocyty. Na rozdíl od myších makrofágů, kultivační médium RPMI 1640 bylo

doplněno o 10% lidské sérum. Inkubační doba pro monocyty byla 15 hodin a pro granulocyty 4 hodiny.³³

Indukce cytotoxických makrofágů

Makrofágy (2×10^5 buněk) přilnuly za 2 hodiny k mikrotitrační destičce. Nepřilnuté buňky byly odstraněny vymytím kultivačním médiem. Přichycené makrofágy byly inkubovány s testovými vzorky, 2 jednotky/ml rekombinantního myšího γ interferonu a 1×10^4 P 815 nádorových buněk po dobu 40 hodin. Analýza byla provedena trojmo pro každou koncentraci. Pak bylo přidáno ke kulturám 0,4 μ Ci/jamku 3 H-tymidinu po další 4 hodiny. Buňky byly získány jak bylo již popsáno. Výsledky byly dány inhibicí růstu nádorových buněk (%). Pro statistické vyhodnocení byl využit Studentský t-test.³³

Uvolnění TNF α z makrofágů

Makrofágy (2×10^5 buněk) přilnuly za 2 hodin k mikrotitrační destičce. Nepřilnuté buňky byly odstraněny vymytím médiem. Přichycené makrofágy byly inkubovány s testovými vzorky po 4 hodiny trojmo. Po centrifugaci bylo 100 μ l z každé jamky přesunuto do jiné mikrotitrační destičky obsahující 10^4 na TNF α sensitivních L929 buněk v 100 μ l médiu v každé jamce. Buňky byly inkubovány 44 hodin. Pak bylo přidáno ke kulturám 0,4 μ Ci/jamku 3 H-tymidinu po další 4 hodiny. Po zmrazení destičky byly buňky získány jak bylo již popsáno. Inhibice růstu L929 buněk (%) je ve shodě s mírou uvolnění TNF α . Statistické vyhodnocení bylo provedeno použitím Studentského t-testu.³³

IL-2 Elisa

Slezinné buňky (5×10^5) byly inkubovány s testovanými vzorky trojmo po dobu 72 hodin v mikrotitrační destičce. Po centrifugaci bylo 50 μ l supernatantu přesunuto do jiné mikrotitrační destičky obsahující potkaní protimyšší IL-2 protilátky (50 μ l v každé jamce 2 μ g/ml roztoku protilátek v 0,1 M NaHCO₃, pH 8,2, po 12 h; pak zastaveno pomocí PBS/FCS). Destička byla 6 \times promyta PBS/Tween (1 l PBS + 0,5 ml Tweenu) a pak bylo přidáno 100 μ l biotinového roztoku potkanních protimyšších IL-2 protilátek (1 μ g/ml). Po 45 min. inkubaci byla destička 8 \times promyta, poté bylo přidáno 100 μ l avidinové peroxidasy (2,5 μ g/ml). Destička byla promyta a byl přidán ABTS roztok (150 μ g v 500 ml 0,1 M kyseliny citronové, pH 4,35) s 0,01% H₂O₂. Barevná reakce

byla zastavena použitím DMF/SDS a destička byla snímána v destičkovém fotometru při 405 nm.³³

Sarkom 180

Růst nádoru byl indukován po i.p. injekci cca. 10^7 buněk sarkomu 180 BDF1 myším. Nádor byl udržován pravidelnou pasáží (i.p.) výpotku (cca. 10^7 buněk sarkomu 180) u BDF1 myši každý týden. Testování bylo provedeno s.c. inokulací 0,1 ml výpotku (cca. 10^7 buněk sarkomu 180) do pravého třísla CD1 myši (15 myši/skupina). Testované vzorky rozpuštěné v solném roztoku nebo v max. 0,5% DMSO byly aplikovány i.p. denně od 1. do 10. dne, počínaje 24 hodin po inokulaci. Růst nádoru byl sledován měřením velikosti nádoru pomocí posuvného měřidla 10., 15., 20. a 30. den, poté byly myši usmrceny. Stupeň inhibice byl vypočítán porovnáním hmotnosti nádoru léčené skupiny se skupinou neléčenou kontrolní (solný roztok nebo 0,5% DMSO v solném roztoku).

Statistické vyhodnocení bylo provedeno použitím Mann-Whitneyho testu.³³

DBA/2-MC.SC-1 fibrosarkom

Nádor byl indukován během 3 měsíců u DBA/2 myši s.c. aplikací 3-methylcholanthrenu (0,5 mg v olivovém oleji/myš). Nádor byl udržován s.c. transplantací nádorových kusů (cca. 1 mm^3) do pravého třísla DBA/2 myši každý 4.-5. týden. Stejný postup byl proveden i u protinádorového testu. Léčba byla provedena i.p. aplikací testovaných vzorků a solného roztoku kontrolní skupině (15 myši v každé skupině) třikrát do týdne, počínaje 24 hodin po nádorové transplantaci. Růst nádoru byl popsán určením jeho velikosti pomocí posuvného měřidla 15., 20., 25. a 30. den.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Mann-Whitneyho testu.³³

Ex vivo analýzy

Myši byly léčeny i.p. aplikací sloučeniny 1 v koncentraci 1 mg/kg po 5 dnů. Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou, které byl aplikován solný roztok. Životaschopnost byla stanovena za použití trypanové modře.³³

Ex vivo proliferace slezinných buněk a buněk kostní dřene

Buňky sleziny a kostní dřene byly izolovány dle výše zmíněného postupu. Buňky kostní dřene (2×10^5) nebo buňky sleziny (5×10^5 /jamka) byly inkubovány

společně s 0,4 μCi /jamka v destičce 18 hodin. Buňky byly získány dle výše zmíněného postupu. Proliferace buněk pak byla porovnána s kontrolní skupinou.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno použitím Studentského t-testu.³³

Ex vivo stimulace NK-buněk (Natural Killer)

Slezinné buňky (5×10^5) byly inkubovány s 5×10^3 YAC 1 nádorovými buňkami v každé jamce 48 hodin (5 jamek pro každou myš). Pak byla destička centrifugována a byla stanovena aktivita alkalické fosfatasy YAC 1 buněk pomocí nitrofenylfosfátu dle výše uvedeného postupu. Byla zjištěna vzájemná korelace mezi aktivitou NK-buněk a snížením počtu YAC 1 buněk.³³

Ex vivo fagocytóza buněk kostní dřeně

Tato analýza byla provedena s 2×10^5 buňkami kostní dřeně v každé jamce jak bylo výše popsáno (4 jamky pro každou myš).³³

Stanovení koncentrace TNF α v krvi

Lipopolysacharid (50 μg) byl aplikována i.p. každé myši (ošetřené a kontrolní skupině) k uvolnění TNF α . Pod anestézií byla po 1 hodině odebrána krev srdeční punkcí. Po centrifugaci byla stanovena koncentrace TNF α v plazmě pomocí ELISA testu podobného IL-2 ELISA. Koncentrace TNF α byla porovnána mezi léčenou a kontrolní skupinou.³³

3.2.3. Cytotoxicita triterpenoidních saponinů

Na nativních saponinech ze *Solidago virgaurea* L., *Heteropappus altaicus* (Willd.) Novopokr., *H. biennis* (Ldb.) Tamamsch. a *Helianthus annuus* L. (*Asteraceae*) stejně jako na příbuzných uhlohydráty modifikovaných glykosidech kyseliny polygalakové a echinocystové byla zkoumána cytotoxicita související s jejich strukturou pomocí modelů nádorových buněk YAC-1 a P-815. Cytotoxické účinky jsou ovlivněny O-glykosylací jak na uhlíku C-3, tak i na C-28 saponogenu. Hodnoty IC_{50} bisdesmosidů polygalakové kyseliny byly nižší než ty, které odpovídají prosapogenu.

Acylglykosidická uhlohydrátová sekvence 1-fukosa-2 \leftarrow 1-rhamnosa-4 \leftarrow 1-xylosa-3 \leftarrow 1-rhamnosa těchto bisdesmosidů vykazovala nejvyšší cytotoxický účinek. Nezbytná je

jedna glukosová jednotka etherglykosidicky vázaná na C-3 aglykonu, rozdíl v aktivitě disacharidu laminaribosy ve stejné poloze nebyl pozorován. V případě glykosidů echinocystové kyseliny se zdá, že acylglykosidická uhlohydrátová sekvence 1-arabinoza-2←1-ramnosa-4←1-glukóza ovlivňuje míru cytotoxických účinků. Porovnáním koncentrace saponinů s kompletním hemolytickým časem je možné určit hemolytický index. Cytotoxicita proti nádorovým buňkám vztahující se k základní struktuře saponinů je v souladu s hemolytickým účinkem. Cukerný podíl hraje důležitou roli v hemolytickém indexu.³²

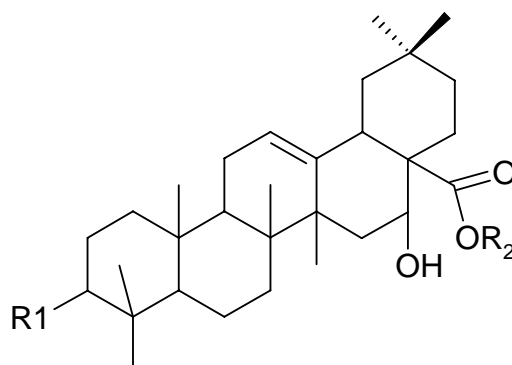
Zkoumané triterpenoidní glykosidy byly charakterizované čtyřmi základními strukturami:

1. kyselina polygalaková-3←1-glukosidy,
2. kyselina polygalaková-3←1-glukosyl-3←1-glukosidy,
3. deriváty kyseliny echinocystové,
4. acylglykosy s volnou hydroxylovou skupinou na C-3 aglykonu.

Mezi skupinou 1 a 2 nebyl pozorován významný rozdíl v cytotoxické aktivitě. Vyšší hodnoty IC₅₀ byly zřejmě po ztrátě etherglykosidicky vázaných cukrů v poloze 3 aglykonu.

Nejpravděpodobnější je, že oligosacharidy spojené acylglykosidicky na karboxylu C-28 kyseliny polygalakové tak i kyseliny echinocystové ovlivňují hodnoty IC₅₀.

Helianthosid 2 (Obr. 37) je nativní saponin z *Helianthus annuus* L., charakterizovaný jako bisdesmosid kyseliny echinocystové. β-glukosidasovým odštěpením koncové glukózy z helianthosidu 2 vznikla **sloučenina 8**. Helianthosid 2 byl přeměněn na **sloučeninu 9** pomocí glukosidasové a rhamnosidasové aktivity naringinasy. **Sloučenina 10** byla získána alkalickou hydrolýzou helianthosidu 2 stejně tak i enzymatickou hydrolýzou pomocí naringinasy.



Obr. 37: Helianthosid 2 a jeho deriváty

Sloučenina	R1	R2	Molekulová hmotnost
Helianthosid 2	$\leftarrow 1\text{glc}(3\leftarrow 1\text{rha})4\leftarrow 1\text{xyl}$	$\leftarrow 1\text{ara}2\leftarrow 1\text{rha}4\leftarrow 1\text{glc}$	1352
Sloučenina 8	$\leftarrow 1\text{glc}(3\leftarrow 1\text{rha})4\leftarrow 1\text{xyl}$	$\leftarrow 1\text{ara}2\leftarrow 1\text{rha}$	1190
Sloučenina 9	$\leftarrow 1\text{glc}(3\leftarrow 1\text{rha})4\leftarrow 1\text{xyl}$	$\leftarrow 1\text{ara}$	1044
Sloučenina 10	$\leftarrow 1\text{glc}(3\leftarrow 1\text{rha})4\leftarrow 1\text{xyl}$	Na	912

V případě glykosidů kyseliny echinocystové, odštěpení jedné nebo dvou cukerných jednotek z acylglykosidicky vázaných trisacharidů vede ke snížení aktivity (helianthosid 2>sloučenina 8>sloučenina 9). Prosapogenin (sloučenina 10) nevykázal významnější rozdíl od helianthosidu 2.³²

Hodnoty HI (hemolytický index) korelují s hodnotami IC₅₀. Glykosidy echinocystové kyseliny (Obr. 37) měly menší hemolytický účinek než glykosidy polygalakové kyseliny. Bylo prokázáno, že cukerné podíly ovlivňují hemolytickou aktivitu.³²

Sloučenina	Buňky P-815	Buňky YAC-1	HI
Helianthosid 2	44,38 ± 4,44	36,98 ± 7,40	15000
Sloučenina 8	92,44 ± 8,40	84,03 ± 8,40	< 2000
Sloučenina 9	> 143,68	143,68 ± 19,16	< 2000
Sloučenina 10	43,86 ± 8,77	21,93 ± 4,39	< 2000

32

3.2.4. Imunomodulační a protinádorové účinky triterpenoidních saponinů

Nativní saponiny ze *Solidago virgaurea* L., *Heteropappus altaicus* (Willd.) Novopokr., *Heteropappus biennis* (Ldb.) Tamamsch. a *Helianthus annuus* L. (*Asteraceae*) stejně tak i příbuzné uhlohydráty modifikované glykosidy polygalakové a echinocystové kyseliny a další komerčně dostupné triterpenoidní saponiny byly zkoumány z pohledu jejich imunomodulačních a protinádorových účinků. Mitogenní účinky mohly být prokázány na myší slezině a buňkách brzlíku, stejně tak i na lidských mononukleárních buňkách *in vitro*. Aktivita makrofágů myší kostní dřeně byla zjišťována v chemoluminiscenční zkoušce, dále byla pozorována indukce cytotoxických makrofágů a uvolnění TNF α z myších makrofágů. Mitogenní a TNF α uvolňující **virgaureasaponin E** (Obr. 38) vykazoval *in vivo* protinádorové účinky u nádorového modelu alogenního sarkomu 180 a nádorového modelu syngenního DBA/2-MC.SC-1 fibrosarkomu. U myší, léčených touto látkou, byla stimulována fagocytóza buněk kostní dřeně a proliferace buněk sleziny a kostní dřeně v *ex vivo* zkoušce, čímž podstatně vzrostla koncentrace TNF α v krvi v porovnání s kontrolní skupinou.

Po určení rozsahu subtoxické koncentrace pomocí cytotoxické analýzy nádorových buněk a hemolytického indexu, byly všechny sloučeniny testovány na koncentraci endotoxinů za použití lyzátu z amebocytů ostrorepa (LAL), protože o endotoxinech je známo, že značně ovlivňují *in vitro* testy. Dále byly testovány pouze sloučeniny prosté endotoxinů.³³

Mitogenní účinky byly testovány na lymfocyty transformačním testu. Proliferace myších slezinných buněk byla zvýšena u virgaureasaponinu E v závislosti na dávce ve velmi nízkých koncentracích od 0,01 $\mu\text{g/ml}$ do 0,1 ng/ml (0,0063 $\mu\text{mol/ml}$ do 0,063 nmol/ml). Stimulační index vzrostl na 1,8. Negativní účinek při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ byl dán cytotoxickým účinkem ve vysokých koncentracích.

V lymfocytovém transformačním testu s buňkami myšího brzlíku byly zjištěny mitogenní T-buňky selektivní účinky. Buňky myšího brzlíku jsou tvořeny >95% T-buňkami, což bylo potvrzeno cytometricky. Virgaureasaponin E a glycyrrhizin mohou významně vyvolávat proliferaci buněk myšího brzlíku. Stimulační index glycyrrhizinu v dávce 0,01 $\mu\text{g/ml}$ byl $1,3 \pm 0,05$ a stimulační index virgaureasaponinu E byl $1,25 \pm 0,05$ v dávce 0,001 $\mu\text{g/ml}$.

Výzkumem cytometrického toku byl zjištěn mitogenní B-buňky selektivní účinek. V buňkách neupravené sleziny z DBA/2 myši byl zjištěn poměr B-buněk/T-buněk 0,8/1,0. Po inkubaci slezinných buněk s virgaureasaponinem E po dobu 72 hodin v koncentraci 0,01 µg/ml byl poměr 1,2/1. Virgaureasaponin E byl schopen také stimulovat proliferaci B-buněk.

Vliv saponinů na makrofágy myši kostní dřeně byl zjišťován v chemoluminiscenční analýze a ve zkoušce indukce cytotoxických makrofágů vypěstovaných v kultuře buněk kostní dřeně.

Ginsenosid Re, deglykosylsaponin 2 a glycyrrhetinová kyselina významně stimulovaly fagocytózu makrofágů myši kostní dřeně. Ale nebyla zjištěna žádná stimulace fagocytů humánních monocytů nebo granulocytů z periferní krve.

Ovlivnění cytokinového systému saponiny bylo testováno v biologickém testu TNF α a ELISA s IL-2. Mitogenní virgaureasaponin E byl schopen významně uvolňovat TNF α z makrofágů myši kostní dřeně. Inhibice růstu L929 fibroblastů senzitivních na TNF α byla 70 \pm 20%.

Žádná látka nevedla k uvolnění IL-2 z lymfocytů myši sleziny.

In vivo protirakovinná aktivita související se saponiny byla hodnocena u dvou myších nádorových modelů: model alogenního sarkomu 180, který je citlivý na imunomodulační sloučeniny, a model syngenního DBA/2-MC.SC-1 fibrosarkomu. Růst nádoru může být ovlivněn na alogenním modelu mohem snadněji než na syngenním, vzhledem k tomu že povrchové antigeny buněk sarkomu 180 mohou být snadněji rozlišené imunitním systémem než buňky fibrosarkomu. Buňky sarkomu 180 byly indukovány, na rozdíl od buněk fibrosarkomu, v odlišném myším kmenu než u testovaných myši.

V modelu sarkomu 180 virgaureasaponin E prokázal nejlepší výsledky ze všech testovaných saponinů v koncentraci od 1 mg/kg/d (i.p. po 10 dnů). U 6 z 15 myši se ukázalo celkové zmenšení nádoru a 4 měly rozsah nádoru menší než 10 mm². Míra inhibice byla 75%. Ostatní koncentrace neměly významnější efekt. Virgaureasaponin D, který se liší od virgaureasaponinu E pouze přidáním β -hydroxymáselné kyseliny na cukerném řetězci na C-28, má podobné protinádorové účinky *in vivo*.³³

Schopnost virgaureasaponinu E redukovat velikost nádoru byla také sledována na modelu syngenního nádoru, methylcholantrenem indukovaného DBA2/MC.SC-1 fibrosarkomu. Na rozdíl od výsledků z nádorového modelu alogenního sarkomu 180,

sloučenina prokázala nejlepší výsledky při koncentraci 0,1 mg/kg/d (i.p. třikrát týdně po dobu 30 dnů) s významnou mírou inhibice 60%.

V *ex vivo* analýzách by mohly být cytotoxické účinky virgaureasaponinu E na nádorové buňky sarkomu 180 nebo fibrosarkomu vyloučen po ošetření DBA/2 myši koncentrací 1 mg/kg/d (i.p.) po dobu 5 dnů a porovnáním s kontrolní skupinou (0,9% NaCl). Nebyly nalezeny zjiřitelné cytotoxické účinky na buňkách sleziny ani kostní dřeně. Životaschopnost a počet buněk byl stejný jako u kontrolní skupiny. Kromě toho proliferace buněk kostní dřeně byla zvýšena o $55 \pm 20\%$ a buněk sleziny o $32 \pm 5\%$. Schopnost buněk kostní dřeně fagocytovat zymosanové částice výrazně vzrostla ve skupině ošetřené virgaureasaponinem E o $320 \pm 40\%$. Stimulace NK-buněk nebyla zjiřtěna. Sloučenina měla TNF α uvolňující účinek *in vitro*. *In vivo* byla schopna zvýšit koncentraci TNF α v krvi po spuštění pomocí LPS.

Na rozdíl od testů cytotoxicity, dosud nebyly zjiřtěny jasné souvislosti mezi strukturou a aktivitou testovaných saponinů. V mnoha testovaných systémech měl virgaureasaponin E stimulační účinky. Bisdesmosidická struktura se dvěma hydroxymáselnými kyselinami na cukerném řetězci na C-28 a dvěma glukózovými jednotkami na C-3 se zdá být důležitá, protože všechny ostatní virgaureasaponiny nevykazují žádnou nebo jen menší aktivitu. Dále nízká koncentrace sloučenin stimulujících proliferaci lymfocytů od 0,01 $\mu\text{g/ml}$ do 0,1 ng/ml se zdá být významným rysem. Lipofilnější sloučeniny stimulují makrofágy při vyšších koncentracích jako proliferaci stimující sloučeniny.

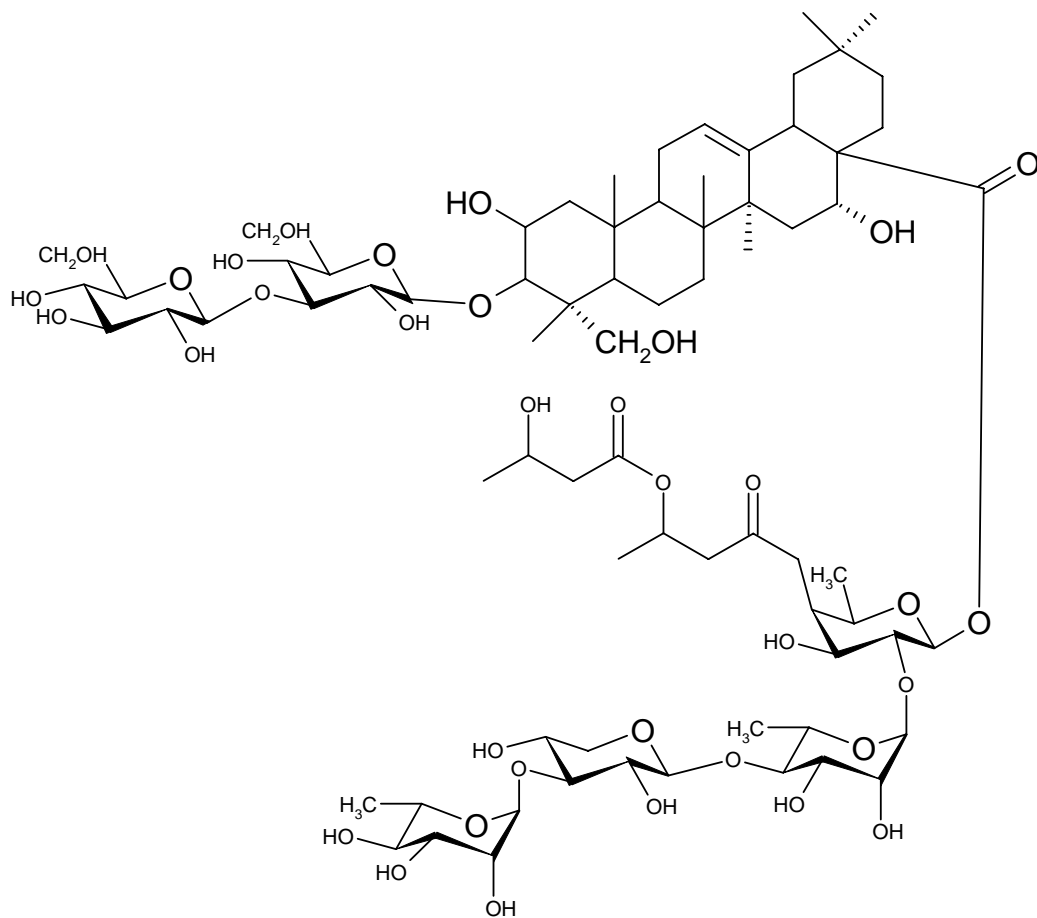
Protinádorový účinek virgaureasaponinu E v *in vivo* modelech může být dán schopností stimulovat uvolňování TNF α , protože buňky sarkomu 180 jsou citlivé na TNF α .

Virgaureasaponin E prokázal nejlepší výsledky ze všech testovaných saponinů s pozitivními účinky jak v *in vitro* testech tak i v *in vivo* nádorových modelech. Schopnost sloučeniny redukovat velikost nádoru stimulací imunitního systému je nejspíše následkem stimulací imunitních parametrů zjiřtěných v *ex vivo* testech.

Ostatní triterpenoidní saponiny popsáné v literatuře vykazovaly schopnost aktivovat cytotoxické makrofágy, cytotoxické T-buňky a NK-buňky a také uvolňovat cytokiny jako IFN- γ , IL-2 a TNF α .³³

Zajímavé pomocné mechanismy protinádorových účinků saponinů jsou popisované jako interakce s lipofilní částí membrány buněk melanomu B16 a uhlohydrátové modulace buněčného povrchu, inhibice reverzní RNA-transkriptázy

nádorových virů, inhibice biosyntézy DNA a RNA nádorových buněk a transmolekulární rekombinace DNA v nádorových buňkách.³³



Obr. 38: Virgaureasaponin E

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

1. VŠEOBECNÉ POSTUPY

1.1. Extrakce

Extrakce je založena na principu distribuce látky mezi dvě fáze na základě jejich různé rozpustnosti.²⁰

Tato metoda je založena na přechodu látky z jedné kapalné fáze do fáze druhé, resp. na přechodu látky z fáze pevné do fáze kapalné. Extrahovat můžeme pevné látky nebo kapaliny a to buď za studena nebo za zvýšené teploty. Extrakce může probíhat nepřerušovaně (kontinuální extrakce) nebo přerušovaně (diskontinuální extrakce). Podle provedení rozeznáváme extrakci tuhé látky kapalinou (macerace, digesce, perkolace) a extrakci kapaliny kapalinou (vytřepávání).²³

1.2. Macerace

Jedná se o extrakční metodu, při níž se pevná fáze rozmíchá s rozpouštědlem a zfiltruje. Stupeň extrakce se pochopitelně zvýší dokonalým rozdrobněním pevné látky, přebytkem rozpouštědla a mícháním.²³

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.²⁰

Tentýž postup prováděný za horka se nazývá digesce.²³

1.3. Vytřepávání

Vytřepávání je nejjednodušší případ extrakce, při kterém nejčastěji používáme dělicí nálevku. Látka může být z roztoku extrahována buď jednou dávkou rozpouštědla (jednoduché vytřepávání), nebo opakovanými dávkami rozpouštědla (opakované vytřepávání). Účinnost vytřepávání závisí na rozdělovacím koeficientu dané látky v obou fázích.²³

1.4. Filtrace

Filtrace je jednou z nejjednodušších operací; v jejím průběhu dochází k oddělování pevné fáze od fází ostatních pomocí prostupného materiálu, který pevnou fázi zachycuje a dovoluje prostup fázím ostatním.

Suspenzi lijeme na filtr (pórovitý materiál), který svými póry propustí pouze kapalinu (filtrát), kdežto pevná částice se zadrží. Filtrace má být dokonalá a rychlá. Dokonalost závisí na tom, jakou látku filtrujeme a na filtru, který používáme. Rychlost je závislá na velikosti filtrační plochy, velikosti pórů, typu filtrované látky, viskozitě rozpouštědla a přetlaku filtrované kapaliny. Nejčastějším materiálem používaným pro filtraci je filtrační papír s vhodnou velikostí pórů. Velikost pórů se volí podle rozměru částic, které chceme odfiltrovat. V některých případech filtrace lze použít i obyčejně vaty.

Nejjednodušším způsobem filtrace je filtrace za normálního tlaku, kdy suspenzi nalijeme na papírový filtr, který je ve skleněné nálevce a jímž filtrát protéká působením gravitace. Filtr může být hladký nebo skládaný tzv. francouzský. Před vlastní filtrací ho smočíme rozpouštědlem, aby přilnul ke stěnám nálevky. Chceme-li filtraci urychlit použijeme skládaný filtr, který má větší povrch.

Druhý často užívaný způsob filtrace je filtrace za sníženého tlaku – odsávání. Používáme k tomu zařízení skládající se Büchnerovy nálevky, která je spojena s odsávací baňkou pomocí konického gumového prstence. Tubus odsávací baňky napojíme přes pojistnou nádobu, která má zabránit vniknutí vody do odsávacího zařízení při poklesu tlaku vody v potrubí, na vodní vývěvu. Perforované dno Büchnerovy nálevky pokryjeme kotoučem filtračního papíru, který má být tak velký,

aby právě pokryl všechny otvory dna. Před filtrací se papír v nálevce navlhčí rozpouštědlem, aby lépe přilnul.²³

Filtrace slouží ve fytochemii ke dvěma cílům: k čištění extraktů na jejich cestě vedoucí k získání individuů a k oddělování krystalů od matečných louhů.²⁰

1.5. Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze.¹⁹

V průběhu separačního procesu se jednotlivé 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.²⁰

Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Hybnou silou v chromatografickém systému je tok mobilní fáze, která unáší ionty nebo molekuly. Při chromatografickém procesu se ustavuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpčí do mobilní fáze. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, tj. čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje.

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které se liší z hlediska povahy

- separačního děje (chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, na molekulových sítích)
- použité techniky (chromatografie sloupcová, papírová, na tenké vrstvě)
- způsobu vyvíjení (chromatografie eluční, vytěšňovací, frontální analýza)
- skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze (chromatografie kapalina-tuhá látka, kapalina-kapalina, plyn-kapalina, plyn-tuhá látka).¹⁹

Primárně lze rozčlenit chromatografické metody podle charakteru mobilní fáze, tj. plynovou chromatografií (GC), kde je mobilní fází inertní plyn, a kapalinovou chromatografií (LC), kde je mobilní fází kapalina. Kapalinová chromatografie může být

realizována v plošném uspořádání (TLC a papírová chromatografie) nebo v kolonovém uspořádání (HPLC).²⁴

1.5.1. Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)

Adsorbent (stacionární fáze) je při této metodě nanesen ve vrstvě určité tloušťky na neutrální podložce (kovová fólie).²⁰ V posledních letech je dávána přednost komerčně vyráběným TLC chromatogramům, kde je chromatografický sorbent s vhodným pojídkem pevně nanesen na hliníkovou fólii nebo na skleněnou desku. Velké oblibě se těší komerčně vyráběné TLC chromatogramy, kde vrstvička sorbentu obsahuje příměs fluorescenční látky s maximem fluorescence při 254 nm (event. 366 nm).²⁴

Roztoky vzorků se nanáší mikropipetami.²³

Dělení látek probíhá na základě kapilárního nasávání rozpouštědla stacionární fází, protože deska je svou dolní hranou ponořena do eluční soustavy v chromatografické nádobě.²⁰

Vyvíjení chromatogramů se provádí zásadně v uzavřených nádobách a prakticky výhradně se realizuje vyvíjení vzestupné nebo téměř vodorovné. Při vzestupném vyvíjení nalévaných vrstev se nalije eluční směs na dno vyvíjecí nádoby (tzv. komory) do výšky kolem 10 mm.²³

Jakmile dosáhne rozpouštědlo naznačeného čela chromatogramu, deska se z komory vyjme a ponechá v dobře táhnoucí digestoři odvětrat.

Výraznou předností TLC je snadnost detekce bezbarvých látek pomocí univerzálních detekčních činidel. Detekuje se v první fázi ultrafialovým zářením na deskách bez UV indikátoru i s indikátorem (UV světlem, 254 a 366 nm). V druhé fázi se detekuje postříkáním nesespecifickými činidly. Detekce selektivními nebo specifickými činidly je poslední fází při odkrývání určitého strukturního typu látek.²³

1.5.2. Kolonová (sloupcová) 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.

Plnění kolon adsorbentem: Trubice se umístí do svislé polohy, na jejím dně (pokud nemá vtavenou fritu) se překryje výpust malým kouskem čisté buničité nebo skelné vaty (mrtvý objem musí být minimální) a adsorbent se vnese několika možnými způsoby. Nejlepší a nejpoužívanější způsob je nalévání řídké suspenze v rozpouštědle.

Vzorek se nanáší v roztoku, je-li směs látek k dělení rozpustná v systému, v němž byl sloupec připraven, nebo ve směsi s adsorbentem (v suchém stavu) zejména u adsorpční a rozdělovací chromatografie a to tehdy, když dělená směs látek není rozpustná v rozpouštědle, v němž byl sloupec připraven, ale v rozpouštědle mnohem polárnějším.

Nejčastěji je používána eluční metoda. Provádí se směsí dvou rozpouštědel rozdílné polarity v eluotropické řadě si blízkých. Eluci látek ze sloupce lze provádět třemi způsoby isokratickou elucí, stupňovitou elucí („skokem“) a gradientovou elucí. U adsorbční chromatografie se začíná s nejméně polárním rozpouštědlem. Jaké rozpouštědlo použít lze zjistit za použití tenkovrstvé chromatografie. Frakce se jímají po stejných objemech a to buď pomocí sběračů (automaticky), anebo ručně. Současně se ze zásobníku doplňuje čistý eluent. Rychlost jímání frakce se upravuje podle typu a velikosti kolony. Rychlost toku se upravuje individuálně podle charakteru prováděného dělení.²⁰

1.5.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

HPLC je především analytická metoda, umožňující reprodukovatelně detekovat nepatrné množství látek za současného kvalitativního a kvantitativního vyhodnocení. Je to jemná analytická obdoba klasické preparativní sloupcové chromatografie.

Reprodukovatelnosti se v případě této chromatografie dosahuje použitím adsorbentu o přesně definované a stejnoměrné zrnitosti, velmi čistých rozpouštědel, konstantního (a

řízeného) průtoku rozpouštědla kolonou (což je zajištěno tlakovou pumpou) a fyzikální detekcí na vysoké úrovni citlivosti. Chromatografické principy, které se zde uplatňují jsou naprosto stejné jako v ostatních chromatografických postupech. Touto chromatografií lze od sebe běžně úspěšně oddělit látky s rozdílem R_f hodnot kolem 0,02.²³

1.6. Odpařování (zahušťování)

Odpařování za sníženého tlaku je ve fytochemické laboratoři podstatně obvyklejší než odpařování za normálního tlaku.

Největší uplatnění našla rotační vakuová odparka typu Büchi. Baňka s odpařovanou tekutinou, otáčející se v šikmé poloze kolem své osy, je připojena k účinnému vodnímu chladiči prostřednictvím motorové jednotky. Rotací se na vnitřní ploše neustále obnovuje film kapaliny a za současného stejnoměrného ohřevu baňky ve vodní lázni probíhá odpařování z tohoto velkého povrchu stejnoměrně a rychle.²⁰

2. POTŘEBY

2.1. Rozpouštědla

Aceton

Ethanol (EtOH)

Chloroform (CHCl₃)

Methanol (MeOH)

n-Butanol (BuOH)

Voda destilovaná (H₂O)

2.2. Chemikálie

1,2-naftochinon-4-sulfonová kyselina
2,6-dibromchinonchlorimid
Acetanhydrid
Anilin
Anisaldehyd
D-glukóza
Diethylether
Dusičnan bismutitý zásaditý
Formaldehyd
Hexakynoželezitan draselný
Hydroxid amonný 25%
Hydroxid draselný
Chlorid draselný
Chlorid hydroxylamina
Chlorid železitý
Jodid draselný
Kyselina 1,2-naftochinon-4-sulfonová
Kyselina chloristá 60%
Kyselina chlorovodíková 36%
Kyselina octová
Kyselina sírová koncentrovaná
Kyselina vinná
Uhličitan sodný
Vanilin

2.3. Detekční činidla

D1: detekce cukrů, steroidů a terpenů

Anisaldehyd - kyselina sírová

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 různé barevné skvrny dosáhly maximální intenzity.³⁶

D2: detekce fenolů

2,6-Dibromchinonchlorimid (Gibbsovo činidlo)

Po postřiku čerstvě připraveným 0,4% methanolvým roztokem 2,6-dibromchinonchlorimidu byl chromatogram postříkán 10% vodným roztokem uhličitanu sodného. Fenolické sloučeniny tvoří s činidlem hnědé skvrny.³⁶

D3: detekce alkaloidů a dusíkatých sloučenin

Drafendorffovo činidlo podle Muniera

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody.

Zásobní roztok byl připraven smícháním roztoku A a B v poměru 1:1 (V/V), který může být uchováván po několik měsíců v lednici.

Postřikovací roztok byl připraven rozpouštěním 10 g kyseliny vinné v 50 ml destilované vody a přidáním 5 ml zásobního roztoku. Alkaloidy jsou po reakci s detekčním činidlem zbarveny oranžově.³⁶

D4: detekce karboxylových sloučenin

Glukóza - anilin (Schweppovo činidlo)

Roztok A: 10% vodný roztok glukózy

Roztok B: 10% ethanolový roztok anilinu

Činidlo bylo připraveno smícháním roztoků A a B (po 20 ml) a zředěno na 100 ml n-butanolem. Chromatogram byl zahříván po 10 minut na 115°C. Vznikají červené až hnědé skvrny.³⁶

D5: detekce redukujících látek (fenoly, aminy, thiosíraný a isothiokvanáty)

Hexakvanoželezitan draselný - chlorid železitý

2% roztok chloridu železitého byl smíchán s 1% roztokem hexakvanoželezitanu draselného (1:1). Činidlo je stálé nejdéle 5 minut. Vznikají modré, resp. zelené skvrny.³⁶

D6: detekce laktonů, esterů, amidů a anhydridů karboxylových kyselin

Hydroxylamin - chlorid železitý

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

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

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

Postřikovací roztok II: byl získán rozpouštěním 10 g chloridu železitého ve 20 ml 35% kyseliny chlorovodíkové a protřepáním s 200 ml diethyletheru do vzniku homogenního roztoku. K detekci byl použit nejprve postřikovací roztok I, po uschnutí chromatogramu pak postřikovací roztok II. Vznikají různě zbarvené skvrny.³⁶

D7: detekce sterolů

1,2-Naftochinon-4-sulfonová kyselina – kyselina chloristá

0,1 g 1,2-naftochinon-4-sulfonové kyseliny bylo rozpuštěno ve 100 ml směsi (20 ml ethanol + 10 ml 60% kyselina chloristá + 1 ml formaldehyd + 9 ml destilovaná voda).

Po postřiku činidlem byl chromatogram zahříván na 70 – 80 °C a byly pozorovány různě barevné skvrny.³⁶

D8: detekce vyšších alkoholů, fenolů, steroidů a silic

Vanilin – kyselina sírová

3 g vanilinu byly rozpuštěny ve 100 ml ethanolu a do roztoku byly přidány 3 ml koncentrované kyseliny sírové. Chromatogram byl zahříván na 110 °C. Vznikají různě barevné skvrny.³⁶

D9: 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.

D10: UV $\lambda=366$ nm

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

D11: vanilinové činidlo

Činidlo bylo připraveno těsně před detekcí smísením roztoku 1% vanilinu v 95% ethanolu s 3% kyselinou chloristou v poměru 1:1. po postřiku byl chromatogram zahříván při teplotě 200 °C asi 1 min. Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě barevných skvrn.

2.4. Vyvíjecí soustavy

S1: čistý chloroform

S2: chloroform : čistý ethanol (8:2)

S3: chloroform : čistý ethanol (7:3)

S4: chloroform : čistý ethanol (6:4)

S5: chloroform : čistý ethanol (1:1)

S6: chloroform : čistý ethanol (3:7)

S7: chloroform : čistý ethanol (19:1)

S8: chloroform : čistý ethanol (1:9)

S9: čistý ethanol

S10: chloroform : čistý ethanol (9:11)

2.5. Chromatografické absorbenty

TLC desky Aluminium sheets 20×20 cm, Silica gel 60 F254, MERCK, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

Silikagel pro sloupcovou chromatografii byl připraven uvedeným způsobem: silikagel L 0,1 – 0,2 mm (LACHEMA) byl 4 hodiny aktivován při 160 °C ve vrstvě menší než 2 cm. Po vychladnutí byl deaktivován na 12% obsahu vody.

2.6. Přístroje

Digitální váhy KERN 572-33

Digitální váhy analytické ADA

UV lampa Camag 254/366 nm

Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER 10P

Vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114

HPLC: pumpa Knauer (Preparative pump K-1800), detektor Knauer (DAD K-2700),
frakční kolektor Büchi (Fraction collector B-684), kolona MERCK Purospher-
Star, RPI8c (250×10 mm, 5 µm, λ=254, 205 nm, průtok 2 ml/min., isokratická
eluce, fáze: 60% MeOH/40% H₂O V/V)

Systém pro sekvenční injekční analýzu FIALab 3000

Microplate reader Anthos 2010

3. IZOLACE

3.1. Materiál

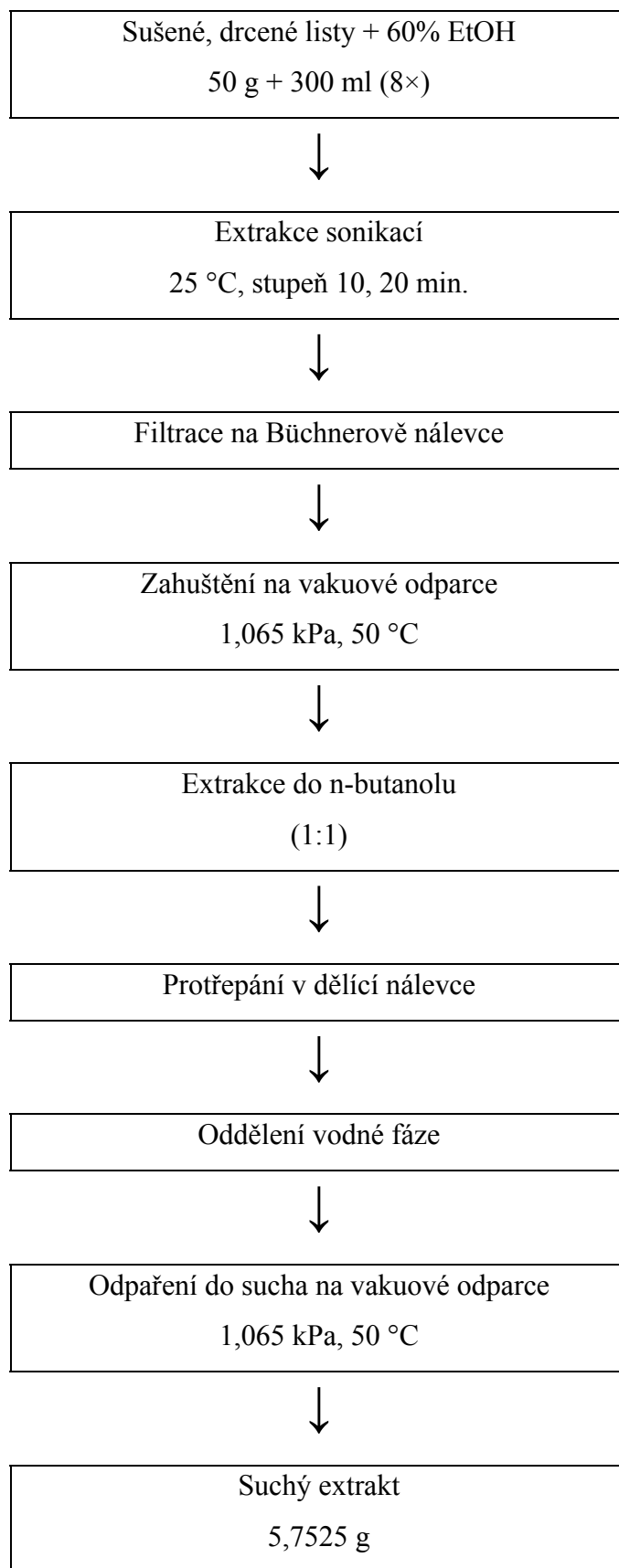
Ke zpracování byly použity listy *Helianthus annuus* L., získané legálním sběrem na poli soukromého zemědělce v obci Rohozec u Kutné Hory v červenci 2004. Rostliny dle čestného prohlášení pěstitele nebyly chemicky ošetřeny. Rostlinným materiálem byl sušen na Katedře Farmaceutické botaniky a ekologie a byl drcen na kladivovém mlýnu. Hmotnost výchozího usušeného a pomletého materiálu činila 5 kg listů.

3.2. Extrakce drogy a zpracování extraktu

K 50 g sušených a rozdrcených listů *Helianthus annuus* L. se přidalo 300 ml 60% ethanolu (předem připraveného zředěním 95% ethanolu s destilovanou vodou). Baňky byly překryty alobalem a extrakce byla provedena sonikací v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě (asi 25 °C) při stupni intenzity 10 po dobu 20 minut. Po ukončení

sonikace se extrakt přefiltroval na Büchnerově nálevce a oddělil tak od pevného podílu. Tento postup byl proveden ještě 7krát (celková hmotnost extrahované drogy byla 400 g).

Spojené filtráty byly zahuštěny na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 50 °C (odstranění ethanolu). K tomuto zahuštěnému extraktu byl přidán n-butanol v poměru 1:1 (extrakt:n-butanol) a směs byla převedena do dělicí baňky. Po protřepání se nechala směs v klidu do zřetelného oddělení dvou vrstev, vodné a n-butanolové. K dalšímu zpracování byl použit vodný podíl, který byl odpařen na rotační odparce do sucha. Bylo tak získáno 5,7527 g suchého extraktu.



3.3. Provedení první sloupcové chromatografie

3.3.1. Příprava roztěru

5,7527 g suchého extraktu bylo rozpuštěno v chloroformu. Do odpařovací misky bylo naváženo 25 g silikagelu a miska byla umístěna na vodní lázeň. K silikagelu byl postupně přidáván roztok extraktu v chloroformu, poté se míchalo až do odpaření rozpouštědla z extraktu. Takto byl získán silikagel nasycený extraktem a ten se nanášel na kolonu. Do nanesení byl extrakt uchováván v chladu a chráněn před světlem.

3.3.2. Sloupcová chromatografie

Chromatografická kolona byla připravena nalitím suspenze adsorbentu (aktivovaného silikagelu) v chloroformu (400 g silikagelu + 800 ml chloroformu) do chromatografické kolony při současně mírně otevřeném odtoku. Po naplnění byl nanesen suchý roztěr vzorku se silikagelem, ten byl následně zatížen filtračním papírem a skleněnými kuličkami.

Sloupcová chromatografie byla prováděna způsobem stupňovité eluce počínaje čistým chloroformem a čistým ethanolem konče.

3.3.3. Odpařování frakcí

Z kolony byly jímány jednotlivé frakce, zprvu podle viditelných zónách, pak po objemu 500 – 550 ml. Každá frakce byla pak zahuštěna na vakuové odparce do objemu přibližně 10 – 15 ml. Celkem bylo získáno 34 frakcí.

Tab. 2: Přehled frakcí získaných z první kolony

číslo frakce	Barva	Eluent	spojené frakce
1	žlutooranžová	čistý CHCl ₃	1.
2	světle zelenožlutá		2.
3	tmavě zelená		3.
4	oranžovohnědá		4.
5	tmavě zelená		
6	zelenohnědá		
7			
8			
9	1% - 2% EtOH v CHCl ₃		5.
10			světle zelenohnědá
11	tmavě zelená	2% EtOH v CHCl ₃	7.
12	šedozeleá		8.
13	tmavě zelená	5% EtOH v CHCl ₃	9.
14	hnědožlutá	7% EtOH v CHCl ₃	10.
15	oranžová	10% EtOH v CHCl ₃	
16	hnědooranžová		
17	hnědočervená		
18			22% EtOH v CHCl ₃
19		15% EtOH v CHCl ₃	12.
20	25% EtOH v CHCl ₃		
21	hnědočervená	25% EtOH v CHCl ₃	13.
22	oranžová	30% EtOH v CHCl ₃	14.
23	světle oranžová		
24	oranžová	35% - 40% EtOH v CHCl ₃	
25	světle oranžová	45% EtOH v CHCl ₃	15.
26			
27			
28	žlutooranžová	50% EtOH v CHCl ₃	
29			
30		50% - 60% EtOH v CHCl ₃	
31			
32	čistý EtOH	čistý EtOH	
33			oranžová
34	světle žlutá		

3.3.4. Orientační tenkovrstvá chromatografie (TLC)

U jednotlivých frakcí byla průběžně prováděna tenkovrstvá chromatografie. Při postřiku bylo použito detekční činidlo D11 (směs kyseliny chloristé 3% a 1% vanilinu v poměru 1:1). Na základě chromatogramů byly některé frakce spojeny. (tab.1)



Obr. 39: První kolona, S1



Obr. 40: První kolona, S1



Obr. 41: První kolona, S1



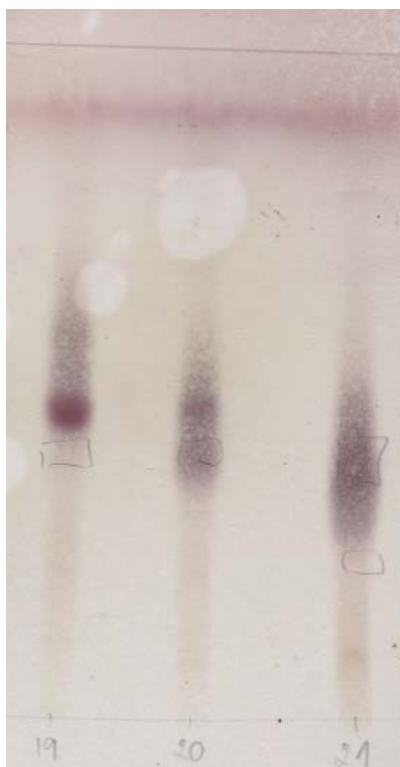
Obr. 42: První kolona, S1



Obr. 43: První kolona, S2



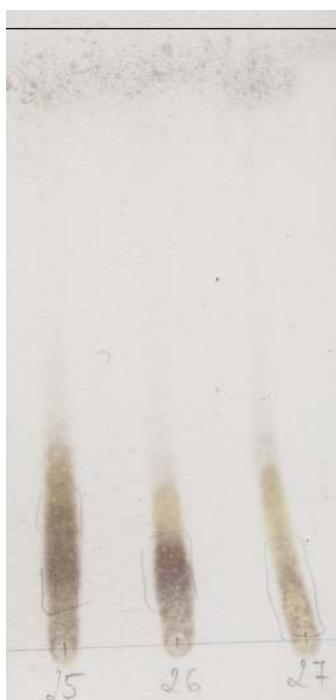
Obr. 44: První kolona, S2



Obr. 45: První kolona, S2



Obr. 46: První kolona, S3



Obr. 47: První kolona, S3



Obr. 48: První kolona, S5

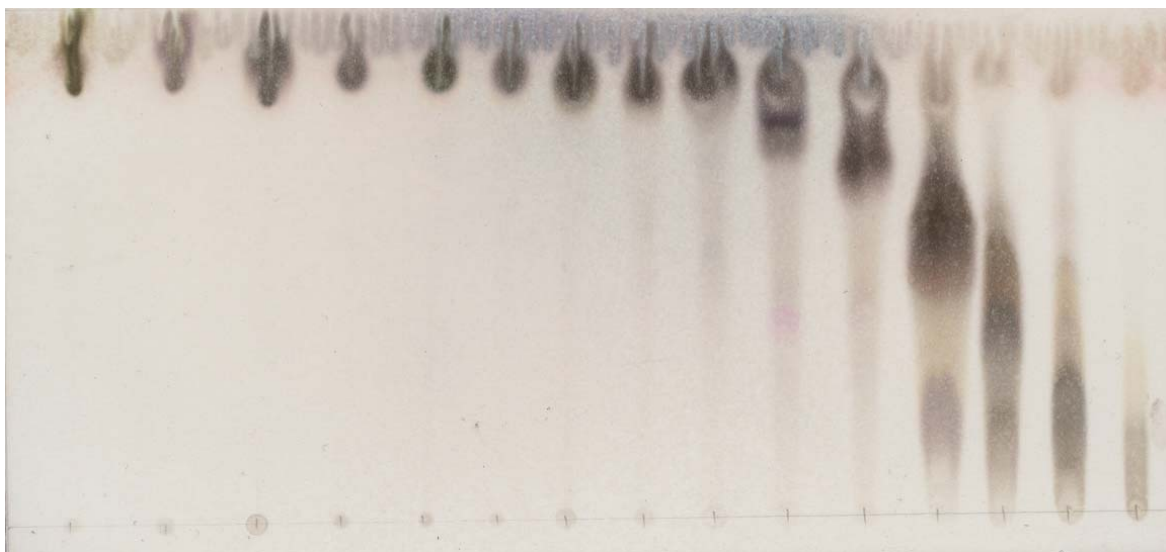


Obr. 49: První kolona, S6

3.3.5. Detekce získaných frakcí

Ze spojených frakcí bylo prvních 15 nanášeno společně na TLC desky a vyvíjeno ve vhodné mobilní fázi (S4). Po té byly desky detekovány pod UV lampou při 254 a 366 nm a pak byly jednotlivé desky postříkány různými detekčními činidly.

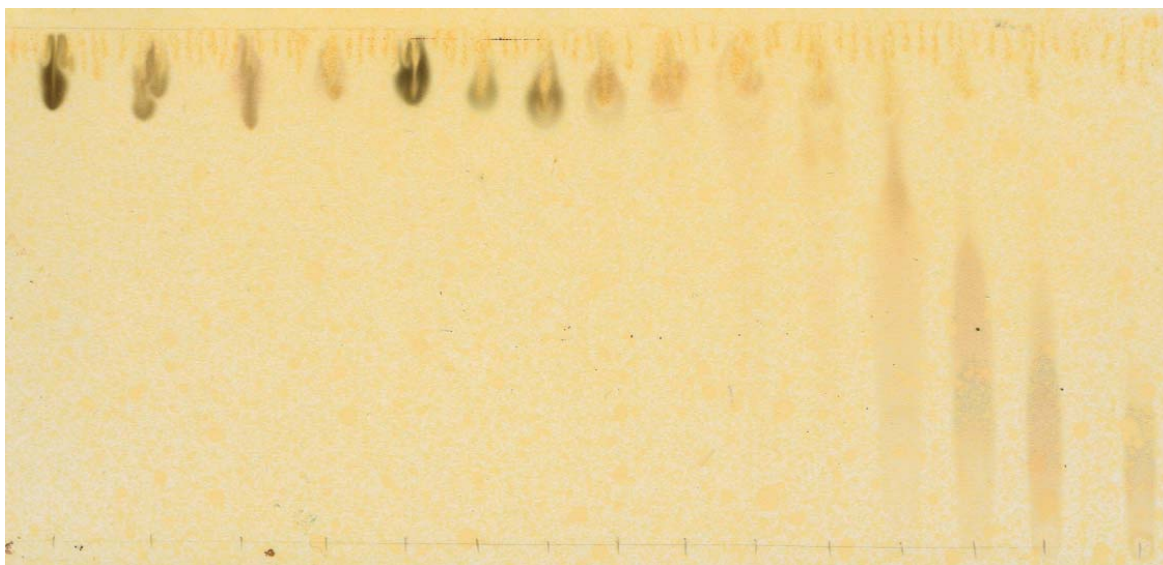
Zbylé frakce nebyly detekovány, protože se nejvíce zajímavé.



Obr. 50: Detekce skupin látek, D1



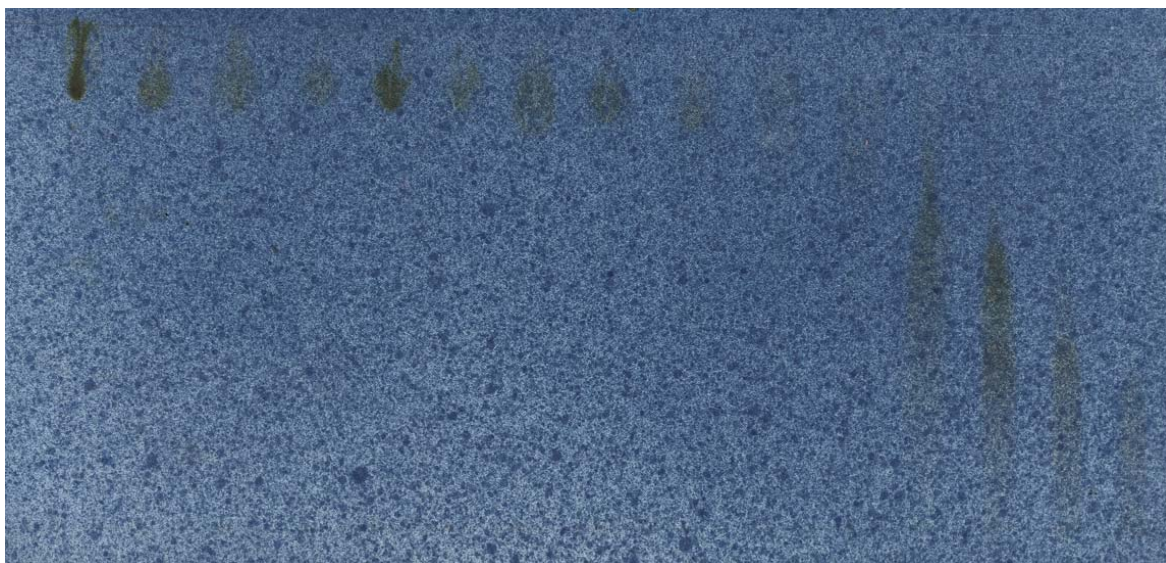
Obr. 51: Detekce skupin látek, D2



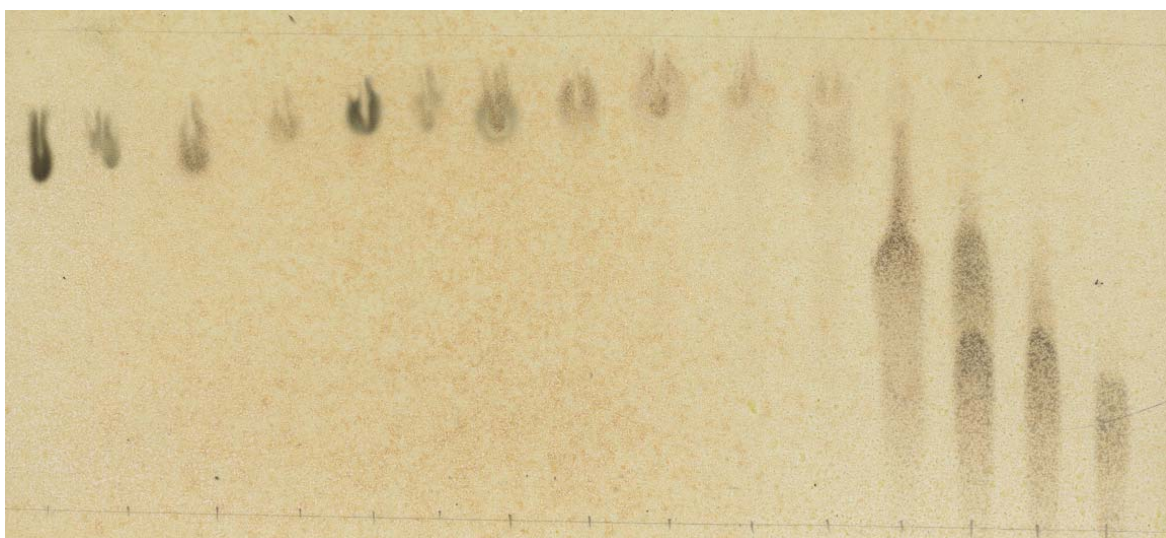
Obr. 52: Detekce skupin látek, D3



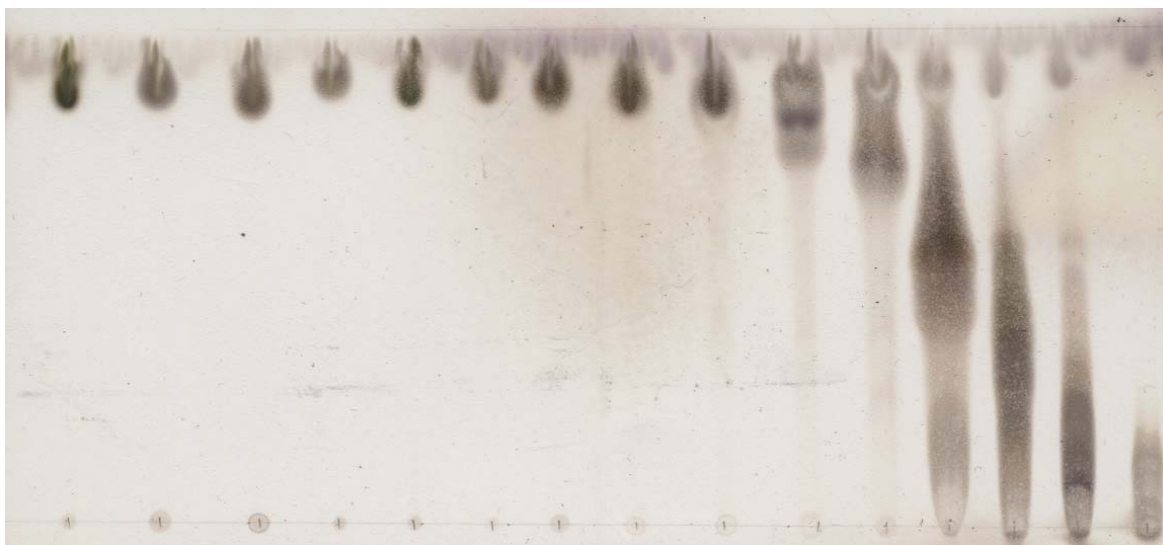
Obr. 53: Detekce skupin látek, D4



Obr. 54: Detekce skupin látek, D5



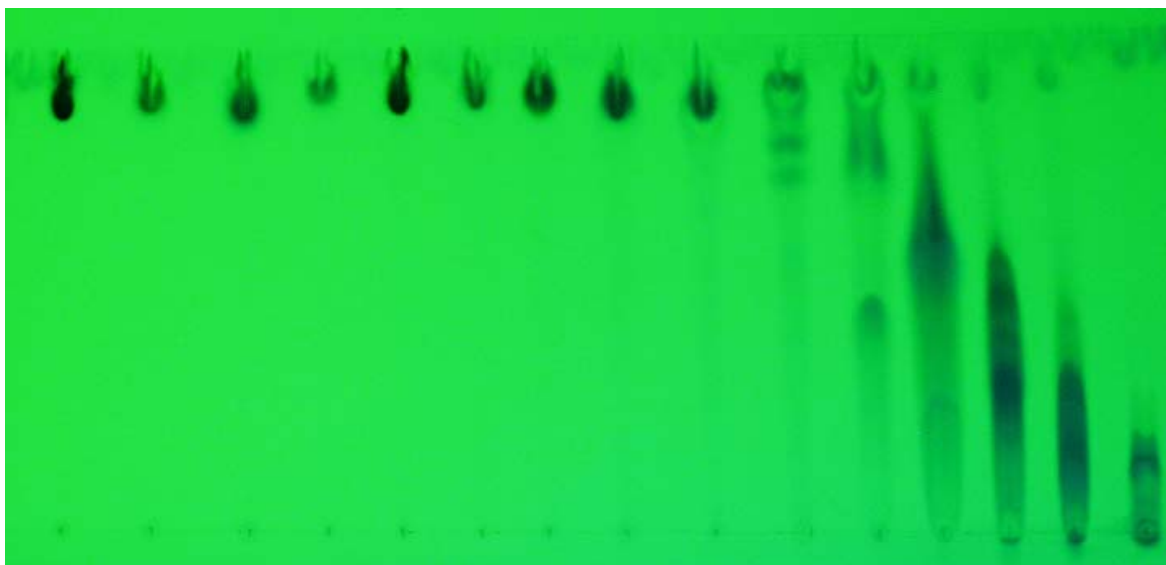
Obr. 55: Detekce skupin látek, D6



Obr. 56: Detekce skupin látek, D7



Obr. 57: Detekce skupin látek, D8



Obr. 58: Detekce pod UV světlem, $\lambda=254\text{nm}$ (D9)



Obr. 59: Detekce pod UV, $\lambda=366\text{ nm}$ (D10)

Tab. 3: Vyhodnocení detekce skupinovými detekčními činidly

	S4, D1	S4, D2	S4, D3	S4, D4	S4, D5	S4, D6	S4, D7	S4, D8	254 nm	366 nm
1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1
2	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0
3	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1
4	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0
5	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0
6	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0
7	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0
8	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0
9	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0
10	ST0, 2	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 2	ST0, 1	ST0, 2	ST0, 0
11	ST0, 2	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 2	ST0, 0
12	ST0, 3	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 3	ST0, 2	ST0, 1	ST0, 1
13	ST0, 3	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 2	ST0, 2	ST0, 2	ST0, 2	ST0, 0
14	ST0, 2	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 3	ST0, 2	ST0, 0
15	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 1	ST0, 0

- ST+ pozitivní reakce při detekci na startu
ST0 nebyla pozorována pozitivní reakce při detekci na startu
X+ počet pozitivních reakcí na detekci na dráze (X=1, 2, 3, ...)
0 žádná pozitivní reakce na detekci na dráze

3.4. Provedení druhé sloupcové chromatografie

3.4.1. Příprava materiálu pro druhou sloupcovou kolonu

Frakce č. 25 – 28 byly spojeny v kapkové baňce o objemu 25 ml a roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce při teplotě 50 °C do konstantní hmotnosti suchého extraktu 0,6959 g. Část této frakce byla odebrána k testování antioxidační aktivity (Tab. 5).

Suchý extrakt byl rozpuštěn ve směsi chloroformu a čistého ethanolu v poměru 7:3. Tento roztok byl pak rozetřen s pěti gramy aktivovaného silikagelu na vodní lázni, směs byla míchána do odpaření rozpouštědla.

3.4.2. Nanesení vzorku a provedení chromatografie

Připravený suchý roztěr byl nanesen na druhou kolonu předem naplněnou směsí silikagelu (75 g) a chloroformu (190 ml). Na horní část byl nanesen filtrační papír a ten byl zatížen skleněnými kuličkami.

Druhá sloupcová chromatografie byla prováděna způsobem stupňovité eluce počínaje čistým chloroformem a čistým ethanolem konče.

Jednotlivé frakce byly jímány zprvu podle viditelných zón, následně pak po objemu 300 – 500 ml. Získané frakce byly postupně odpařovány na rotační vakuové odparce do objemu přibližně 10 – 15 ml. Takto bylo získáno celkem 14 frakcí (Tab. 4).

Tab. 4: Přehled získaných frakcí z druhé kolony

číslo frakce	barva	eluent
1	žlutá	čistý CHCl ₃
2		
3	světle žlutá	čistý CHCl ₃ - 5% EtOH v CHCl ₃
4	žlutá	5% EtOH v CHCl ₃
5	oranžová	5% - 10% EtOH v CHCl ₃
6		10% EtOH v CHCl ₃
7	žlutooranžová	12% - 15% EtOH v CHCl ₃
8		15% EtOH v CHCl ₃
9		20% EtOH v CHCl ₃
10		25% EtOH v CHCl ₃
11		30% EtOH v CHCl ₃
12		35% - 40% EtOH v CHCl ₃
13	světle oranžová	45% - 50% EtOH v CHCl ₃
14	světle žlutá	50% EtOH v CHCl ₃ - čistý EtOH

3.4.3. Orientační tenkovrstvá chromatografie

Jednotlivé frakce z druhé kolony byly postupně naneseny na TLC desky a zdetekovány detekčním činidlem D11 (směs 3% kyseliny chloristé a 1% vanilinu v poměru 1:1).



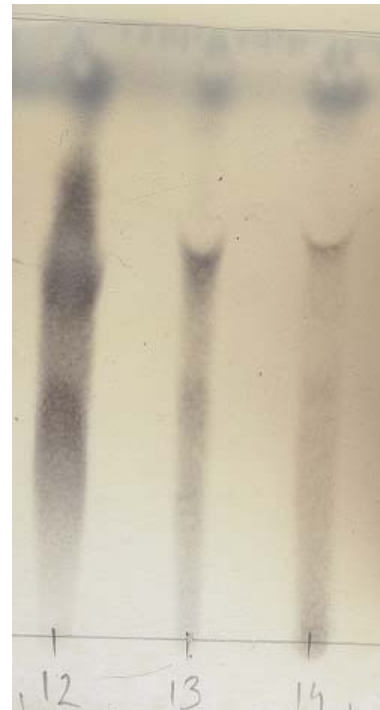
Obr. 60: Druhá kolona, S7



Obr. 61: Druhá kolona, S3



Obr. 62: Druhá kolona, S5



Obr. 63: Druhá kolona, S8

4. BIOLOGICKÁ AKTIVITA

V organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species – RNS) (Schéma 4). Tyto látky mají značný fyziologický i patologický význam. Staly se proto předmětem intenzivního lékařského výzkumu a vědomosti o nich se postupně uplatňují v lékařské praxi. Jsou významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako dezinformační agenti, schopní organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit.³⁵

Schéma 4

Reaktivní formy kyslíku	
<i>Volné radikály</i>	<i>Látky, které nejsou volnými radikály</i>
superoxid, O ₂ · hydroxylový radikál, HO· peroxyl, ROO· alkoxyl, RO· hydroperoxyl, HO ₂ ·	peroxid vodíku, H ₂ O ₂ kyselina chlorná, HOCl ozon, O ₃ singletový kyslík, ¹ O ₂
Reaktivní formy dusíku	
<i>Volné radikály</i>	<i>Látky, které nejsou volnými radikály</i>
oxid dusnatý, NO· oxid dusičitý, NO ₂ ·	nitrosyl, NO ⁺ nitroxid, NO kyselina dusitá, HNO ₂ oxid dusitý, N ₂ O ₃ oxid dusičitý, N ₂ O ₄ nitronium, NO ₂ ⁺ peroxynitrit, ONOO alkylperoxynitrit, ROONO

Antioxidační ochranný systém

Vzestup koncentrace kyslíku v zemské atmosféře způsobený před 2,5 miliardami let fotosyntetickou aktivitou sinic musel způsobit stres, který mohly přežít jen druhy, u

nichž se vyvinuly mechanismy chránící je před vysoce reaktivním prvkem (a hlavně před jeho metabolity). Organismus používá tři možných typů ochrany:

Nejbezpečnějším způsobem je **bránit se tvorbě** nadměrného množství reaktivních forem kyslíku a dusíku například regulací aktivity enzymů, které je tvoří (indukovatelná syntéza NO[•]), nebo vychytáváním tranzitních prvků z reaktivních pozic (transferin, feritin).

Druhou možností je **záchyt a odstranění radikálů**, které se již vytvořily. V literatuře se tyto látky označují jako vychytávače či zametače (scavengers), lapače (trappers) a zhášecí (quenchers). Výstižnější je dělení antioxidantů na enzymy a na látky dávající s reaktivními formami kyslíku a dusíku stálejší a tudíž méně toxické produkty.

Na antioxidační ochraně se podílejí též obecné **reparační mechanismy** poškozených biomolekul. Fosfolipázy odstraňují poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů, oxidačně modifikované proteiny se rozkládají proteolyticky a zvláštní reparační enzymy opravují poškozenou DNA.

Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku se nazývá oxidační stres. Může být vyvolán nadměrnou produkcí RONS, nedostatečnou funkcí antioxidačního ochranného systému nebo kombinací obou těchto nedostatků.³⁵

Oxidační stres, patologická nerovnováha vzniku RONS a jejich odstraňování, je nedílnou součástí řady nemocí a u některých je i primární příčinou chorobného stavu. Při řadě chorobných stavů dochází nejen k poklesu kapacity antioxidačních systémů, ale i ke zvýšené tvorbě radikálů.

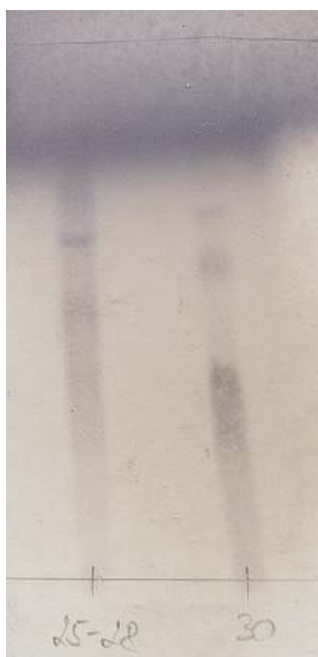
Mnoho experimentálních studií *in vitro* a *in vivo* prokazuje příznivý vliv antioxidantů v různých kombinacích a modelech. Na celém světě proběhlo a stále probíhá mnoho klinických studií s antioxidační terapií lidí. Jejich výsledky nejsou jednoznačné nejspíše proto, že oxidační stres je jen jedním z dějů probíhajících při těchto onemocněních. Sledované parametry jsou závislé i na dalších faktorech. Některé klinické studie dokazují, že podáváním antioxidačních látek se sníží riziko vzniku onemocnění nebo se zlepší jeho průběh (ICHS, ateroskleróza, cévní mozkové příhody, šokový stav, neurologická onemocnění, nádorová bujení, jako je kolorektální karcinom, gynekologické nádory a další).³⁵

4.1. Použitý materiál

Ke zkoumání biologické aktivity byly použity frakce číslo 25-28 (HEA 25-28) a frakce číslo 30 (HEA 30) z první kolony a frakce číslo 6-8 (HEA 6-8) a 10-11 (HEA 10-11) z druhé kolony.

Tab. 5: Hmotnosti získaných extraktů

Frakce	hmotnost suchého extraktu po odpaření (v mg)
HEA 25-28	36,1
HEA 30	48,5
HEA 6-8	142,5
HEA 10-11	29,8



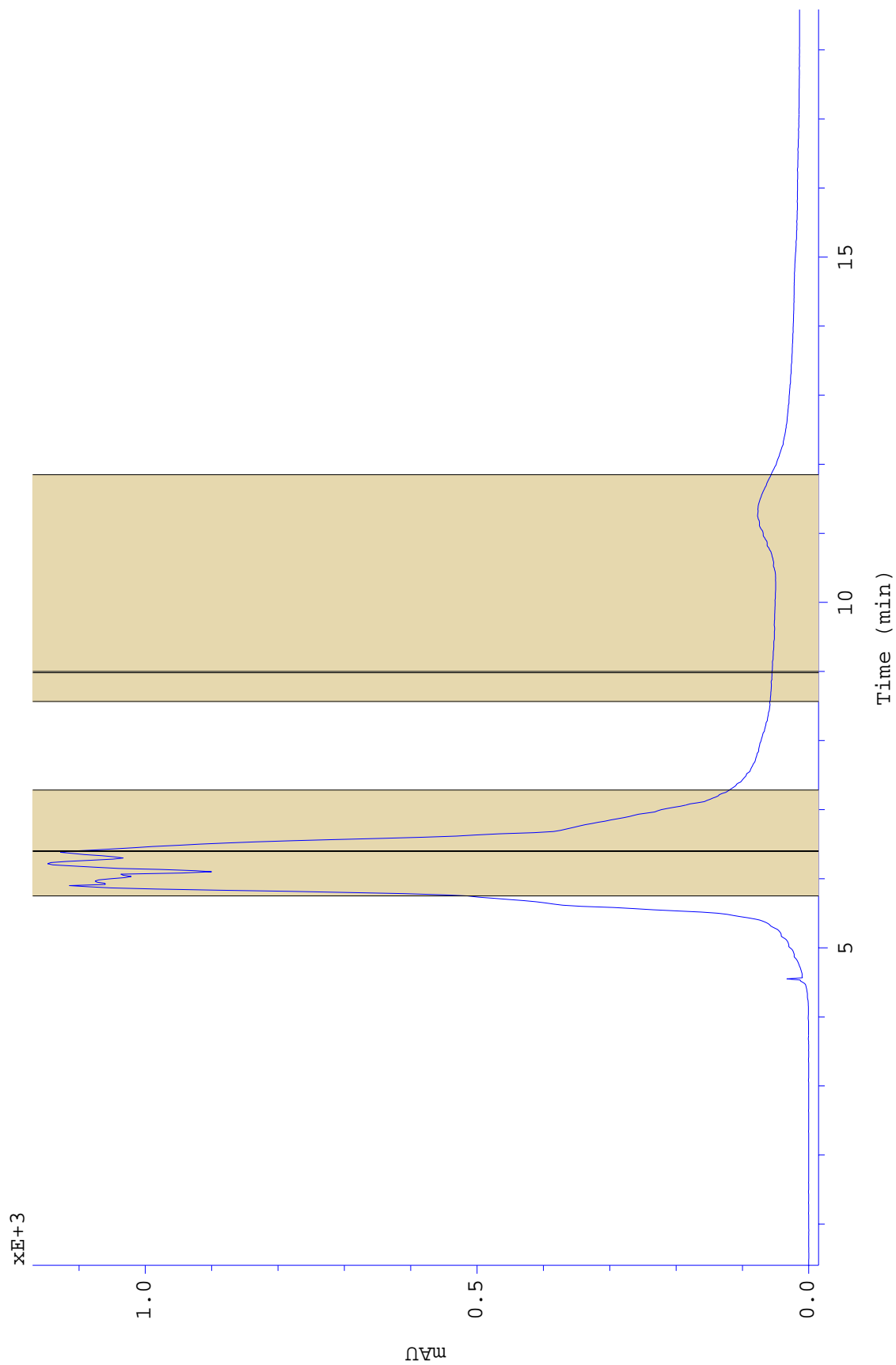
Obr. 64: HEA 25-28, HEA 30; S9



Obr. 65: HEA 6-8, HEA 10-11; S10

Na chromatogramu frakce 10-11 (Obr. 62) bylo detekováno více látek, a proto byla frakce poskytnuta na rozdělení pomocí metody HPLC (Graf 1).

Graf 1: Chromatogram frakce HEA 10-11 z HPLC



4.2. Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu

Z každé frakce (Tab. 5) byly odebrány přibližně 4 mg suchého extraktu, které se rozpustily ve stejném množství rozpouštědla (50% EtOH).

4.2.1. Princip

Stanovení antioxidační aktivity látek bylo provedeno 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 mediích, 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.³⁷

4.2.2. 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 100 ml 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 suchého extraktu v 50% ethanolu, aby vznikla koncentrace 1 mg/ml, roztok se sonikuje po dobu jedné minuty a důkladně protřepe. Dále se postupným ředěním připravují koncentrace 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml tohoto vzorku. Nižší koncentrace jsou rovněž odplyněny v ultrazvukové lázni.³⁷

4.2.3. 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 jednonálového 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.³⁷

Antioxidační účinek je vyjádřen v procentech poklesu absorbance oproti slepému vzorku (Schéma 5).

Schéma 5

$$C_{\text{průr. vzorku}} / C_{\text{průr. DPPH}} \cdot 100 = X$$

$$100 - X$$

4.2.4. Výsledky měření

Tab. 6: HEA 25-28

	DPPH	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,1 mg/ml
1	0,3963	0,0846	0,1162	0,1575	0,2231
2	0,3797	0,0654	0,0930	0,1356	0,2064
3	0,3873	0,0639	0,0966	0,1365	0,2058
Průměr	0,3878	0,0713	0,1019	0,1432	0,2118
pokles aktivity vůči standardu		81,60%	73,70%	63,10%	45,40%

Tab. 7: HEA 30

	DPPH	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,1 mg/ml
1	0,3963	0,0976	0,1510	0,1842	0,2449
2	0,3797	0,0850	0,1279	0,0909	0,2315
3	0,3873	0,0801	0,1287	0,1587	0,2271
Průměr	0,3878	0,0876	0,1359	0,1446	0,2345
pokles aktivity vůči standardu		77,45%	65,00%	62,70%	39,50%

Tab. 8: HEA 6-8

	DPPH	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,1 mg/ml
1	0,3963	0,1420	0,3111	0,2086	0,2512
2	0,3797	0,1142	0,1611	0,1883	0,2353
3	0,3873	0,1171	0,1624	0,1836	0,2338
Průměr	0,3878	0,1244	0,2115	0,1935	0,2401
pokles aktivity vůči standardu		67,90%	45,50%	50,00%	38,00%

Tab. 9: HEA 10-11

	DPPH	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml	0,1 mg/ml
1	0,3963	0,2692	0,2968	0,3229	0,3379
2	0,3797	0,2397	0,2807	0,3131	0,3339
3	0,3873	0,2355	0,2794	0,3079	0,3322
průměr	0,3878	0,2481	0,2856	0,3146	0,3347
pokles aktivity vůči standardu		36,00%	26,40%	18,90%	13,70%

4.3. Antioxidační aktivita FRAP

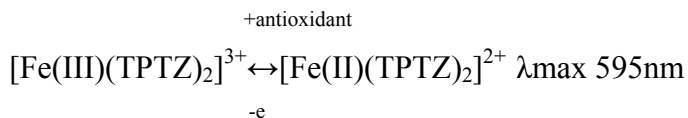
Antioxidační aktivita flavonoidů byla hodnocena proti řadě reaktivních kyslíkových a dusíkových forem jako 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyllový radikál (DPPH), hydroxylové radikály ($\text{OH}\cdot$), superoxid ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxylové radikály ($\text{ROO}\cdot$) a radikály kyseliny chlorné ($\text{ClO}\cdot$). Protože antioxidační aktivita flavonoidů se značně mění v závislosti na struktuře hlavního řetězce, rozmanitosti a druhu funkčních skupin přítomných v chemické struktuře, některé studie zavedly vztah mezi strukturou a aktivitou (structure-activity relationships, SAR) pro flavonoidy. Avšak je zde několik nesrovnalostí mezi studiemi, které pravděpodobně způsobily rozdílné podmínky při provádění zkoušek. Několik autorů studovalo SAR flavonoidů použitím metod, které jsou běžně používané pro měření totální antioxidační kapacity, jako Troloxu ekvivalentní antioxidační kapacita (TEAC) a absorbní kapacita kyslíkového radikálu (ORAC). Jiná metoda běžně používaná pro měření totální antioxidační kapacity je měření antioxidační redukční síly použitím železitých iontů (ferric reducing antioxidant power, FRAP), jednoduchá a spolehlivá kolorimetrická metoda, kterou navrhli I.F. Benzi a J.J. Strain. Tato metoda je založena na schopnosti antioxidantů redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} . Zatímco velká část metod používaných k hodnocení SAR flavonoidů měřením jejich aktivity proti oxidantům, FRAP měří přímo redukční schopnost látky, což je důležitý parametr pro sloučeninu jako antioxidační látku.³⁸

4.3.1. Princip metody

FRAP metoda je založena na měření schopnosti látky redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} , byla původně navržena k měření totální antioxidační kapacity plazmy a po té použita stejnými autory u ostatních látek. Fe^{2+} ionty jsou měřeny spektrofotometricky stanovením jejich barevného komplexu s 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazinem (TPTZ), který má vysokou absorpční schopnost při 595 nm. Protože antioxidační aktivita látek je přímo úměrná jejich redukční kapacitě, představuje FRAP analýza spolehlivou metodu ke studiu antioxidační aktivity rozmanitých sloučenin. Tato metoda byla často použita k rychlému vyhodnocení totální antioxidační kapacity různých potravin a nápojů a také rozdílných

rostlinných extraktů obsahujících flavonoidy. Dále ještě byla použita k hodnocení antioxidační aktivity dietních polyfenolů.

FRAP metoda je jednoduchá, spolehlivá, spektrofotometrická metoda.³⁸



4.3.2. Postup

Na mikrodestičku typu P (Brand 400 μ l, Fisher) se nanese do 4 jamek 25 μ l látky v různé koncentraci 10-200 μ M. Všechny látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu nebo metanolu (3mg/3ml). Nižší koncentrace 200-10 μ M byly připraveny ředěním v acetátovém pufru pH 3,6. Reakční FRAP roztok (175 μ l, vždy čerstvě připravený a zahřátý na 37 °C) byl přidán k látkám do třech jamek, do čtvrté pak bylo přidáno 175 μ l acetátového pufru (slepý vzorek). Absorbance 595nm byla měřena na přístroji Microplate reader (Anthos 2010) v různých časových intervalech až po dobu 120 min. Změna absorbance $\Delta A_{595\text{nm}}$ byla počítána jako rozdíl absorbance slepého vzorku (substance + acetátový pufr) a směsí (175 μ l FRAP roztoku +25 μ l acetátového pufru) a absorbance antioxidantů pro každý časový interval. Všechny látky byly testovány nejméně třikrát při 37 °C. FRAP value pro časový interval t (FRAP value $_t$) byl počítán dle vzorce:

$$\text{FRAP value}_t (\text{M}) = (\Delta a_t \text{Fl} / \Delta a_t \text{Fe}^{2+}) \times 10^{-5}$$

Kde $\Delta a_t \text{Fl}$ je změna v časovém intervalu t (4 a 60 minut) vztažená k testované látce při koncentraci 1×10^{-5} M a $\Delta a_t \text{Fe}^{2+}$ je změna absorbance ve stejném časovém intervalu vztažená na železnaté ionty při stejné koncentraci. Jako standardy byly využity známé antioxidanty, jako je Trolox, askorbová kyselina nebo (+)-katechin.

Statistická analýza byla vyhodnocena za užití software SigmaPlot 2002 pro Windows version 8.0.³⁸

4.3.3. Přístroje

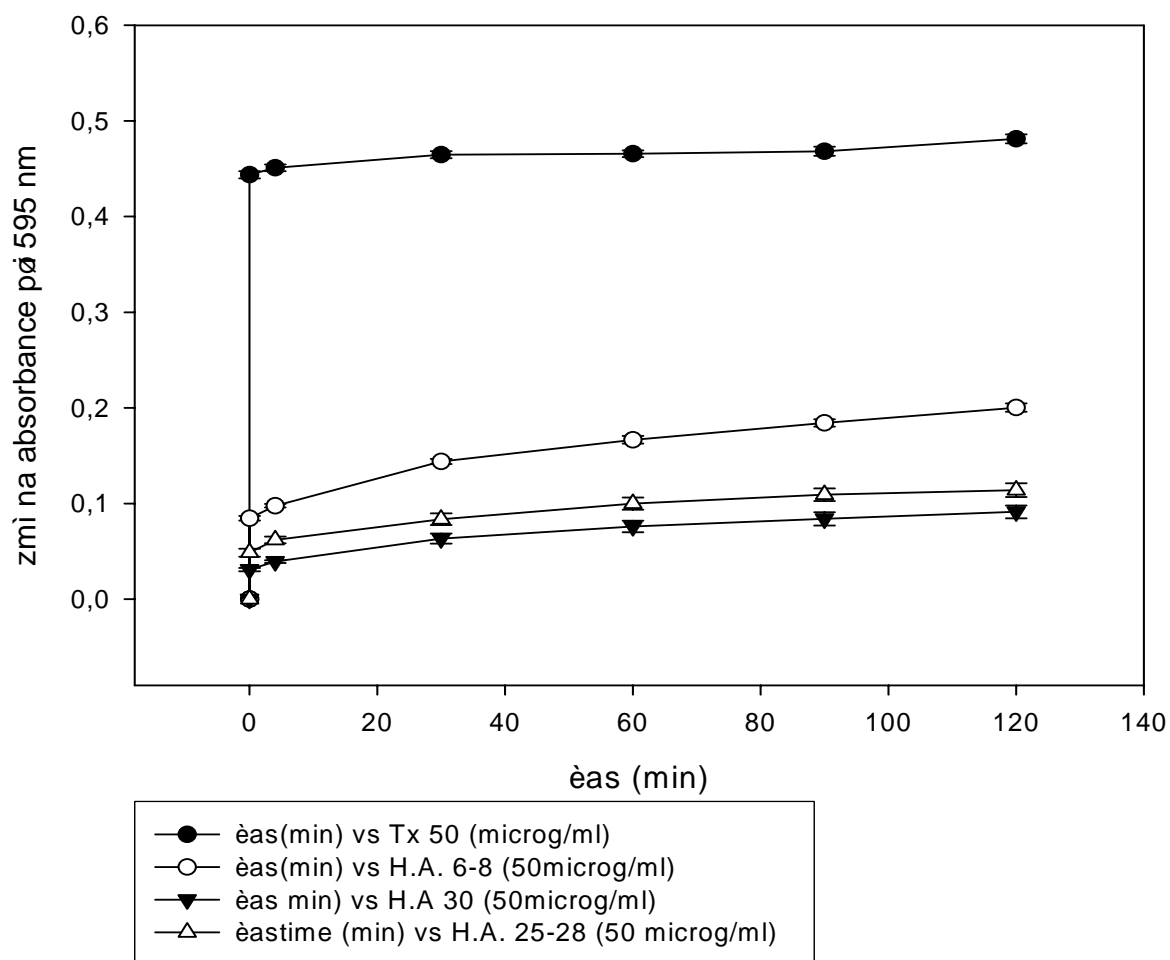
Všechny experimenty byly dělány dle článku (O. Firuzi, 2005). Jedná se o FRAP metdou modifikovanou za využití mikrodestiček (destičky typu P 400 μ l byly získány od firmy Fisher). Všechna měření proběhla na přístroji Microplate reader (Anthos 2010).³⁸

4.3.4. Výsledky měření

Tab. 10

Vzorek no.	FRAP_{value 4 min} (μM)	FRAP_{value 60 min} (μM)
HEA 6-8	2,26	4,75
HEA 30	0,15	1,8
HEA 25-28	1,06	2,7
Trolox	16,7	18,16

Graf 2. FRAP assay: Změna absorbance za čas za přítomnosti extraktů HEA 6-8, 30, 25-28 získaných z *Helinathus annuus*



V. HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUSE

Tato práce byla zaměřena na fytochemický výzkum listů slunečnice roční (*Helianthus annuus*) spolu s hodnocením antioxidační aktivity vybraných frakcí.

Celý postup, od extrakce, přes rozdělení sloupcovou chromatografií až po další zpracování frakcí, byl prováděn s maximální šetrností. Extrakty a získané frakce byly uchovávány v chladu a chráněny před světlem.

1. HODNOCENÍ TENKOVrstvou CHROMATOGRafiÍ

Nejprve byl získán ethanolový extrakt z listů slunečnice, který byl následně vytřepán s n-butanolem. Vodný podíl byl odpařen do sucha. Získaný suchý extrakt z listů slunečnice byl nanesen na silikagel chromatografické kolony a byl eluován směsí chloroform:ethanol o vzrůstající polaritě. Takto bylo získáno celkem 34 frakcí (Tab. 2).

U všech těchto frakcích byla provedena tenkovrstvá chromatografie (Obr. 39 - Obr. 49). Eluční soustavy přibližně odpovídají polaritám jednotlivých frakcí. K postřiku bylo použito detekční činidlo D11. Na základě podobnosti některých frakcí byly tyto spojeny tak, jak je uvedeno v Tab. 2.

K další detekci bylo použito prvních 15 frakcí, které byly následně hodnoceny z hlediska barevných skupinových reakcí. Za tímto účelem byla zvolena chromatografická soustava S4 a 8 barevných skupinových reakcí (D1-D8). Souhrnné vyhodnocení uvádí Tab. 3.

U žádné z detekovaných frakcí nebyla zaznamenána pozitivní reakce na startu.

Při detekci karboxylových sloučenin (D4) nebyla zjištěna žádná pozitivní reakce na dráze (Obr. 53). Tyto látky nebyly v těchto frakcích obsaženy. Naopak u všech ostatních sledovaných frakcí byla zjištěna pozitivní reakce na dráze.

Přítomnost cukrů, steroidů a terpenů různé polarity prokázala detekce činidlem D1 (Obr. 50).

Pomocí činidla D2 byla zjištěna přítomnost fenolů ve všech frakcích (Obr. 51). Přítomnost alkaloidů a dusíkatých látek byla potvrzena postřikem činidlem D3.

Pozitivní reakce na dráze byla pozorovatelná u poloviny ze sledovaných frakcí (Obr. 52).

Postřikem činidla D5 reagovaly všechny frakce pozitivně na přítomnost redukujících látek (Obr. 54).

Všechny frakce měly pozitivní reakci na dráze na přítomnost laktonů, esterů, amidů a anhydridů karboxylových sloučenin, což bylo zjištěno použitím činidla D6 (Obr. 55).

Hojný výskyt sterolů různé polariry byl prokázán pozitivní reakcí na dráze po postřiku činidlem D7 (Obr. 56). Podobně tomu bylo i při detekci vyšších alkoholů, fenolů, steroidů a silic pomocí činidla D8, kdy všechny frakce měly pozitivní reakci na dráze (Obr. 57).

Při pozorování těchto frakcí pod UV lampou při 254 nm, bylo zjištěno, že všechny frakce zhášejí fluorescenci TLC desky (Obr. 58). Při jejich pozorování pod 366 nm byla pozorována modrá fluorescence ve 3 frakcích (Obr. 59).

K dalšímu zpracování a hodnocení byly vybrány a spojeny frakce 25-27 a 28. Část byla odebrána k hodnocení antioxidační aktivity, zbytek byl nanesen a eluován na druhé chromatografické koloně směsí chloroform:ethanol o vzrůstající polaritě. Z této kolony bylo získáno 14 frakcí. Použitím vhodných vyvíjecích soustav a pomocí detekčního činidla D11 byla provedena orientační tenkovrstvá chromatografie těchto frakcí (Obr. 60 - Obr. 63). Na základě těchto TLC byly spojeny frakce 6-8 (HEA 6-8) a 10-11 (HEA 10-11). U těchto frakcích byla hodnocena antioxidační aktivita.

Frakce 10-11 obsahovala více látek (Obr. 62). Na HPLC záznamu (Graf 1) jsou zřetelně vidět dva píky, ale vzhledem k malému množství nebylo možné tyto látky rozdělit.

2. HODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Antioxidační aktivita byla zkoumána u frakcí 25-28 (HEA 25-28) a 30 (HEA 30) získaných z první kolony a frakcí 6-8 a 10-11 z druhé kolony (Tab. 5).

Ke stanovení antioxidační aktivity byly použity dva testy: sekvenční injekční analýza (SIA) pomocí DPPH radikálu a metoda FRAP.

Výsledky měření SIA metodou jsou uvedeny v Tab. 6 - Tab. 9. Největší antioxidační aktivitu prokázal vzorek HEA 25-28, naopak nejmenší aktivita byla naměřena u vzorku HEA 10-11.

V hodnocení aktivity použitím metody FRAP nebyla zahrnuta frakce 10-11 vzhledem k její nízké aktivitě zjištěné v DPPH testu.

Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 10, změnu absorbance za čas znázorňuje Graf 2. Největší aktivita byla zjištěna u HEA 6-8 a nejnižší hodnota antioxidační aktivity byla změřena u vzorku HEA 30.

VI. SOUHRN

Práce byla zaměřena na fytochemický výzkum listů *Helianthus annuus*. Byla provedena extrakce ethanolem, dělení sloupcovou chromatografií a další zpracování vybraných frakcí. K hodnocení obsahových látek zvolených frakcí byla provedena separace s využitím tenkovrstevné chromatografie a identifikace skupinových strukturních typů selektivními detekcemi. Na základě chromatografických analýz byla zaznamenána přítomnost zejména cukrů, steroidů, terpenů, fenolů, laktonů a silic. Druhá část práce se zabývala provedením screeningu antioxidační aktivity vybraných frakcí pomocí DPPH testu a FRAP metody. Významnou antioxidační aktivitu vykazaly frakce HEA 6-8 a HEA 25-28.

VII. POUŽITÁ LITERATURA

1. <http://www.priroda.cz/vytisknout-clanek.php?detail=339>, (22.10.2006)
2. http://www.slunecnice.cz/text/slunecnice_rocni.html, (1.10.2006)
3. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K385.php>, (1.10.2006)
4. <http://www.mineralfit.cz/mineralfit/clanek/1099--slunecnice-symbollem-leta.html>, (17.11.2006)
5. http://montana.plant-life.org/species/heliant_annu.htm, (22.10.2006)
6. <http://plant-materials.nrcs.usda.gov/>, (22.10.2006)
7. http://faf.vfu.cz/vet_bot/docs/roslina/h/heliann.php, (17.11.2006)
8. <http://www.biomatnet.org/secure/Crops/S585.htm>, (17.11.2006)
9. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Slune%C4%8Dnice>, (1.10.2006)
10. <http://www.abecedazahrady.cz/default.aspx?server=1&catalog=1&catitem=777>, (17.11.2006)
11. <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id41534>, (1.10.2006)
12. Český lékopis 2002, 3. díl, Grada Publishing a.s. 2002, s. 2812 ISBN 80-247-0464-1
13. Feng Gao, Huiping Wang, Tom J. Mabry: Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Helianthus* species. *Journal of Natural Products*, Vol. 50, No. 1, pp. 23-29
14. Macías č.2; Macías, F.A., López, A., Varela, R.M., Molinillo, J.M.G., Alves, P.L.C.A., Torres, A.: Helivypolide G. A novel dimeric bioactive sesquiterpene lactone. *Tetrahedron Letters*, Vol. 45, Issue 35, pg. 6567-6570
15. Otmar Spring, Klaus Albert, Achim Hager: Three Biologically active heliangolides from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, Vol. 21, No. 10, pp. 2551-2553
16. Macías, F.A., Torres, A., Galindo, J.L.G., Varela, R.M., Álvarez, J.A., Molinillo, J.M.G.: Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick. *Phytochemistry*, 61, 687-692
17. Macías, F.A., López, A., Varela, R.M., Torres, A., Molinillo, J.M.G.: Bioactive apocarotenoids annuionones F and G: structural revision of annuionones A, B and E. *Phytochemistry*, Vol. 65, Issue 22, pg. 3057-3063
18. Macías, F.A., Varela, R.M., Torres, A., Molinillo, J.M.G.: Heliespirone A. The first member of a novel family of bioactive sesquiterpenes. *Tetrahedron Letters* 39, 427-430
19. Karlíček, R., Polášek, M., Pospíšilová, M., Solich, P.: Analytická chemie pro farmaceuty. Karolinum, Praha 2001, s. 266, 267

20. Opletal, L., Drašar, P.: *Fytochemické metody. 1. Izolace obsahových látek (laboratorní technika)*. Karolinum, Praha 1994, s. 38, 45, 62-63, 83, 95, 103-110, ISBN 382-110-94.
21. Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M., Torres, A., Fronczek, F.R.: Structural elucidation and Chemistry of a novel family of bioactive sesquiterpenes: Heliannuols. *J. Org. Chem.*, 59, 8261-8266
22. Slavík, B., Štěpánková, J. et al.: *Květena České republiky, díl 7*. Academia, Praha 2004., s. 324, ISBN 80-200-1161-7
23. Hrabálek, A. et al.: *Chemická laboratorní technika pro farmaceuty*. Karolinum, Praha 2000, s. 76, 91
24. Klimeš, J., Sochor, J., Mokřý, M., Kastner, P., Pilařová, P.: *Kontrola léčiv I*. Karolinum, Praha 2002, s. 22-24, ISBN 80-246-0419-1
25. Mao Rong Suo, Jun Shan Yang, Yang Lu, Li Wu, Qi Tai Zheng: Two new diterpenes from *Helianthus annuus* L.. *Chinese Chemical Letters*, Vol. 17, No. 1, pp. 45-48
26. Macías, F.A., Fernández, A., Varela, R.M., Molinillo, J.M.G., Torres, A., Alves, P.L.C.A.: Sesquiterpene lactones as allelochemicals. *J. Nat. Prod.*, 69, 795-800
27. Macías, F.A., Varela, R.M., Torres, A., Olivia, R.M., Molinillo, J.M.G.: Bioactive norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity. *Phytochemistry*, Vol. 48, No. 4, pp. 631-636
28. Macías, F.A., Molinillo, J.M.G., Chinchilla, D., Galindo, J.C.G.: Heliannanes – a structure-activity relationship (SAR) study. *Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*, pg. 103-124
29. Tomko, J. et al.: *Farmakognózia, učebnica pre farmaceutické fakulty*. Vydavateľstvo Osveta, Martin 1999, s. 69, 73, 181, 182, ISBN 80-8063-014-3
30. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J.: *Farmakognosie I. Obecná část a primární látky*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1989, s. 23-31
31. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J., Šícha, J.: *Obecná farmakognosie II. Sekundární látky*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1989, s. 31-33.
32. Bader, G., Plohmman, B., Hiller, K., Franz, G.: Cytotoxicity of triterpenoid saponins. *Pharmazie*, 51, 1996, 6
33. Plohmman, B., Bader, G., Hiller, K., Franz, G.: Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins. *Pharmazie*, 52, 1997, 12

34. Jahodář, L.: Farmakobotanika, semenné rostliny. Karolinum, Praha 2006, s. 166, 171, ISBN 80-246-1225-9
35. Štípek, S. et al.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Grada Publishing, Praha 2000, s. 21, 55, 69, 273, ISBN 80-7169-704-4
36. Stahl, E.: Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook, Springer Berlin, Berlin-Heidelberg-New York 1969, 1042 s., ISBN 3-540-04736-0
37. Skála, P.: Diplomová práce – Stanovení antioxidační aktivity látek metodou sekvenční injekční analýzy (SIA) se spektrofotometrickou detekcí. 2003, s. 45-49
38. Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L.: Evaluation of antioxidant activity of flavonoids by „ferric reducing antioxidant power“ assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1721, 2005, pp. 174-184
39. <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id1566/?taxonid=41534>, (1.10.2006)
40. <http://www.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10054>, (1.10.2006)
41. Takhtajan, A. L.: Diversity and Classification of Flowering Plants. Columbia University press, New York, 1997, pp. 642

VIII. ANNOTATION OF THE DIPLOMA THESIS

The thesis was aimed at phytochemical study of *Helianthus annuus* leaves. The extraction with ethanol, chromatography on silica gel columns and other processings of selected fractions were performed. These fractions were analysed using the TLC separation method and the structure selective detection reagents were applied to the TLC plates to evaluate and identify the separated compounds. On the strength of chromatographic analyses mainly saccharides, steroids, terpenes, phenolic compounds, lactones and essential oils were detected. In the second part of the thesis the antioxidant activity of selected fractions was screened with DPPH test and FRAP method. Significant antioxidant activity was detected with fractions HEA 6-8 and HEA 25-28.