

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

---

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Stanovení artemisininu v *Artemisia annua* L.



Hradec Králové, květen 2008

Jana Špundová

Diplomová práce vznikla na základě vlastních experimentálních výsledků a informací získaných z citované literatury.

Děkuji Prof. RNDr. Luďku Jahodářovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a připomínky k teoretické i experimentální části práce a všem pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření dobrých pracovních podmínek, zvláště paní Ireně Rejlové za měření na HPLC chromatografu.

## OBSAH

I. ÚVOD A CÍL PRÁCE .....	7
1. Úvod.....	8
2. Cíl práce .....	8
II. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
1. Botanická charakteristika .....	10
1.1. Charakteristika rodu <i>Artemisia</i> L. ....	10
1.2. Charakteristika druhu <i>Artemisia annua</i> L. ....	11
2. Fytochemická charakteristika.....	13
2.1. Artemisinin .....	13
2.1.1. Distribuce artemisininu v pletivech <i>Artemisia annua</i> L. ....	14
2.1.2. Biosyntéza artemisininu .....	15
2.1.3. Syntéza artemisininu .....	18
2.1.4. Přehled o metodách stanovení artemisininu .....	19
2.2. Silice .....	20
3. Biologická aktivita obsahových látek .....	22
3.1. Antimalarické působení.....	22
3.1.1. Mechanismus účinku artemisininu .....	23
3.2. Působení proti dalším parazitům .....	25
3.3. Onemocnění související s AIDS.....	26
3.4. Protinádorové působení .....	26
3.5. Imunosupresivní působení.....	26
3.6. Anestetické působení.....	27
3.7. Antiarytmické působení .....	27
3.8. Působení silice .....	27

4. Pěstování <i>Artemisia annua</i> L. a faktory ovlivňující produkci rostliny a artemisininu .....	28
III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY .....	29
1. Potřeby .....	30
1.1. Chemikálie.....	30
1.2. Laboratorní přístroje .....	31
1.3. Laboratorní pomůcky .....	31
1.4. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii .....	31
1.5. Chromatografické adsorbenty .....	31
2. Pracovní postup a výsledky.....	32
2.1. Materiál .....	32
2.2. Extrakce drogy .....	32
2.3. Zkoušky totožnosti – identifikace artemisininu tenkovrstvou chromatografií .....	33
2.3.1. Postup tenkovrstvé chromatografie.....	33
2.3.2. Výsledky tenkovrstvé chromatografie .....	33
2.4. Stanovení obsahu artemisininu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií .....	35
2.4.1. Příprava standardu a vzorku.....	35
2.4.2. HPLC podmínky .....	35
2.4.3. Kalibrační křivka .....	36
2.4.4. HPLC záznamy .....	37
2.4.5. Výsledky HPLC stanovení.....	41
2.5. Ztráta sušením .....	42
2.5.1. Postup zkoušky .....	42
2.5.2. Výsledky ztráty sušením .....	42

2.6. Obsah artemisininu vztažený na ztrátu sušením.....	43
2.7. Zkoušky totožnosti – identifikace tujonu a artemisininu tenkovrstvou chromatografií .....	43
2.7.1. Postup tenkovrstvé chromatografie.....	43
2.7.2. Výsledky tenkovrstvé chromatografie .....	44
IV. DISKUSE .....	46
V. SOUHRN .....	50
VI. LITERARURA .....	52
ABSTRAKT .....	57

## **I. ÚVOD A CÍL PRÁCE**

## 1. ÚVOD

Význam rostlin v terapii, zejména jako surovin pro přípravu a výrobu léčiv, dnes po období určité stagnace opět stoupá. Je to dáno některými výsledky moderní vědy, ale také prostým faktem, že rostlinné léčivo je připraveno – na rozdíl od léčiv vyráběných totální syntézou – z obnovitelné suroviny. Kromě toho existují některá vitálně důležitá léčiva, u nichž jsme odkázáni na rostlinnou surovinu proto, že není znám ekonomicky únosný způsob jejich syntetické výroby [1].

Pelyňek roční patří mezi rostliny s významnou antimalarickou aktivitou. V tradiční čínské medicíně je používán více než 2000 let. První zmínka o antimalarickém působení pelyňku je popsána v díle Zhouhou Bei Ji Fang ("The Handbook of Prescriptions for Emergency Treatments") z poloviny 4. st. n. l., jejímž autorem je Ge Hong [2].

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je stanovení obsahu artemisininu v pelyňku ročním (*Artemisia annua* L.) české produkce v průběhu vegetačního cyklu.

Zadavatelem úkolu byla konkrétní soukromá firma, která má ve svém výrobním programu produkci a zpracování této drogy. Přáním firmy bylo nezveřejnit její identifikační znaky.



## **II. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1. BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA

## 1.1. Charakteristika rodu *Artemisia* L.

Ordo *Asterales* – hvězdnicotvaré

*Asteraceae* – hvězdnicovité

*Artemisia* L. – pelyněk

Více či méně aromatické jednoleté nebo vytrvalé, lysé nebo plstnaté byliny nebo polokeře (mimo naše území vzácně i keře). Listy střídavé, jednoduché a často bohatě členěné, řidčeji celistvé, zpravidla dolní a střední listy řapíkaté a horní přisedlé. Úbory v hroznech nebo klasech, zpravidla skládajících bohaté latovité květenství, většinou velmi početné, řidčeji v krátkých jednoduchých hroznech nebo strboulech, víceméně drobné, kulovité nebo vejcovité; zákrov 2 – 5řadý, zákrovní listeny střechovitě uspořádané, přitisklé, na okraji velmi často suchomázdřitě lemované; lůžko úboru mírně vypouklé, bez plevek, lysé nebo vlnaté. Všechny květy trubkovité, žluté nebo načervenalé; okrajové samičí s velmi úzkou, niťovitě trubkovitou 5cípou korunou, středové květy oboupohlavné nebo funkčně samčí (nesoucí sterilní pestík), s trubkovitou až nálevkovitou korunou s 5 rozestálými cípy; prašníky na vrcholu s kopinatým, čárkovitým nebo šídlovitým přívěskem; pylová zrna téměř kulovitá, u stepních (anemogamních) druhů hladká, u horských (entomogamních) druhů jemně osténkatá a poněkud lepkavá; bliznová ramena okrajových květů často prodloužená. Nažky válcovité nebo obvejcovité, zpravidla alespoň částečně smáčklé, hladké, jemně rýhované nebo nanejvýš se 2 mírně vystouplými žebry; chmýr chybí, výjimečně zbytky kalicha v podobě nepatrného suchomázdřitého lemu.

Početný rod s téměř 400 druhy vesměs na severní polokouli, s těžištěm rozšíření ve stepních až polopouštních oblastech Evropy, Asie a Severní Ameriky (jednotlivé druhy rostou i v Jižní Americe, subsaharské Africe a na Havaji); celá řada druhů se druhotně rozšířila mimo svůj původní areál neúmyslným či dokonce úmyslným lidským přičiněním. Na území ČR bylo dosud zjištěno celkem 17 druhů, z toho 5 – 7 autochtonních nebo charakteru archeofytů, ostatní jako neofyty.

Pelyňky obsahují řadu hořčin, zejména seskviterpenické laktony artemisin, artemisinin, artabsin a dimerní absinthin (rod *Scirphidium*), v četných olejových

žlázkách na vegetativních částech i v úborech se vyskytují silice monoterpenické nebo seskviterpenické povahy (thujon, thujylalkohol, cineol apod.), dále třísloviny, organické kyseliny apod. Měly již v minulosti význam (v mnoha případech přetrvávající) jako léčivé rostliny, některé z nich se používají jako koření, případně jejich výtažky využívá potravinářský průmysl při výrobě vín (vermutů) a likérů. V současnosti je využití v potravinářství již jen omezené a v mnoha zemích je použití extraktů s obsahem těchto dráždivých látek již zakázáno. Pro farmaceutické účely je používána droga Absinthii herba, která je uvedena v Českém lékopise 2005.

U některých druhů pelyňků byl zjištěn alelopatický účinek na okolní vegetaci. Pravděpodobně jej způsobují jak silice, uvolňované z rostlin do vzduchu a absorbované do suché půdy, tak i hořčiny, smývané do půdy srážkami. Z našich pelyňků byl takový účinek ověřován u *Artemisia absinthium* L.

Druhy pelyňku vyskytující se na území ČR:

*Artemisia vulgaris* L. – pelyněk černobýl

*Artemisia absinthium* L. – pelyněk pravý

*Artemisia verlotiorum* L. – pelyněk Verlotů

*Artemisia abortanum* L. – pelyněk brotan

*Artemisia annua* L. – pelyněk roční

*Artemisia dracunculus* L. – pelyněk kozalec, estragon [3].

## **1.2. Charakteristika druhu *Artemisia annua* L.**

*Artemisia annua* L. – pelyněk roční

Jednoleté, silně aromatické byliny. Lodyha přímá, 30 – 100 cm dlouhá, od dolní ½ prutovitě větvená, zelená, s roztroušenými drobnými přisedlými žlázkami, často červeně naběhlá. Listy 2 – 3x peřenosečné s úkrojky v jedné rovině, přisedlé, v obrysu vejčité, v horní části někdy s nevýraznými celistvými laloky, na bázi ouškaté (ouška 1 – 2x peřenosečná), svěže zelené až žlutozelené; listové úkrojky 1. řádu víceméně rovnoměrně rozmístěné, neúplně vstřícné, kopinaté, úkrojky posledního řádu 3 – 4 mm dlouhé, 1,5 – 2,0 mm široké s rovnoběžnými okraji, na vrcholu náhle zúžené do krátké, zahnuté špičky, interlobia křídlatá, střední lodyžní listy až 12 cm dlouhé a 10 cm široké. Úbory kulovité, 2,0 – 2,5 mm v průměru, krátce stopkaté, nicí, skládající velmi bohaté

rozkladité latovité listenaté květenství, listeny 1 – 2x peřenosečné; zákrovní listeny lysé, vejčité, široce blanitě lemované; lůžko úboru lysé. Květy žlutavé; okrajových samičích květů 10 – 20, s korunou niťovitou, hustě žláznatou; středové květy oboupohlavné, v počtu 12 – 30, s korunou úzce nálevkovitou až trubkovitou, lysou, 1,0 mm dlouhou, elipsoidní, z boku smáčknuté, světle šedě až olivově nazelenalé [3].

#### *Ekologie a cenologie*

Rumiště, okraje komunikací, skládky zeminy, říční navigace, řidčeji roste jako plevel v polních kulturách. Dává přednost těžkým, čerstvě vlhkým nebo vysychavým půdám, ale objeví se i na písčítých nebo štěrkovitých substrátech; nejčastěji na dusíkem bohatých, slunných místech. Na území ČR (na rozdíl např. od jižního Slovenska) zřejmě nažky dozrávají jen omezeně, takže se zatím expanzivně nešíří. Prokázáno bylo šíření s travním semenem, obilovinami a olejinami, textilními surovinami, zřídka i s rudou. V různých typech ruderalní a plevelové vegetace třídy *Chenopodietea* [3].

#### *Rozšíření v ČR*

Na území ČR byl poprvé zaznamenán v roce 1874 v Brně – Zábrdovicích, v Čechách v roce 1897 v Praze na Maninách. Od té doby byl zjištěn na řadě lokalit v termofytiku a nižším mezofytiku, zejména ve větších sídlech a na nádražích. Výskyt má často pouze přechodný charakter, nicméně lokalit v poslední době spíše poněkud přibývá [3].

#### *Celkové rozšíření*

Pochází ze střední a východní Asie od severního Iráku až po jižní Sibiř a Nepál, na východ do Japonska a na Tchaj-wan. Druhotný areál zabírá jižní a střední Evropu, Severní Ameriku (USA a Kanada) i Jižní Ameriku (Argentina) [3].

## 2. FYTOCHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA

Mezi hořčinami je v pelyňku ročním přítomen ze skupiny seskviterpenických laktonů hlavně artemisinin a z derivátů pak kyselina arteannuinová, arteannuin B, dihydroartemisinin [3].

Komponentami silice jsou např. artemisia keton, isoartemisia keton, 1,8-cineol a camphor [2]. Dále jsou v silici přítomny monoterpeny  $\alpha$ -pinen a  $\beta$ -pinen, kamphen, myrcen a sabinen a seskviterpen  $\beta$ -karyophyllen [3].

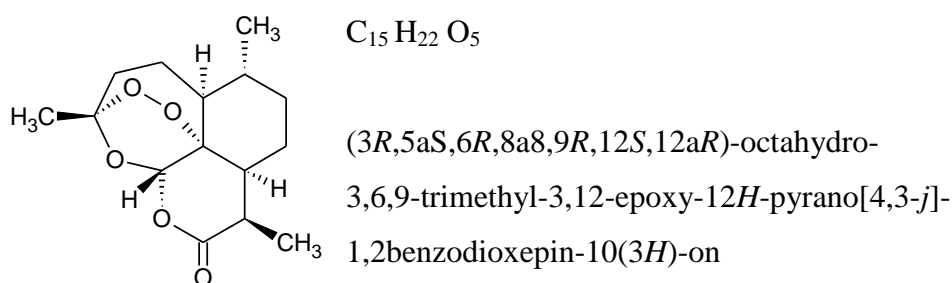
Dalšími složkami jsou sacharidy, stopy glykosidů, pryskyřice [3], kumariny [4].

### 2.1. Artemisinin

Artemisinin je endoperoxidický seskviterpenický lakton, který byl izolován z rostliny v čisté formě v roce 1972 [2]. Jeho struktura byla určena v roce 1979 difrakční rentgenovou analýzou. Artemisinin má jedinečnou strukturu obsahující vzácný segment  $-O-O-C-O-C-O-C=O$  a doposud žádná taková obdobná struktura nebyla nalezena mezi přírodními produkty [5].

Je to látka poměrně stabilní při pokojové teplotě ve srovnání s některými dalšími peroxidickými látkami. Tvoří bezbarvé jehlicovité krystaly a může být uskladňována po mnoho let [5].

Je rozpustný v chloroformu, petroletheru; jeho bod tání je  $156 - 157^{\circ}\text{C}$  a molekulová hmotnost  $M_R$  282,34 [6].



Obr. 1: Struktura artemisininu

### **2.1.1. Distribuce artemisininu v pletivech *Artemisia annua* L.**

Artemisinin se nachází v nadzemních částech rostliny, nejvíce v listech a květenstvích. Malé množství je přítomno v lodyze a žádné množství v pylu a kořenech. Výskyt artemisininu v semenech je v důsledku přítomnosti květních zbytků [7].

V roce 1993 a 1995 byly publikovány zprávy o objevu speciálních buněčných struktur, glandulárních trichomů, přítomných na povrchu listů, lodyhy a květenství. Ukázalo se, že tyto struktury jsou depy artemisininu [7]. Někteří výzkumníci také předpokládají možnou syntézu artemisininu uvnitř glandulárních trichomů [8].

Koncentrace artemisininu se mění v průběhu rozvoje rostliny během vegetativní fáze a při přechodu do fáze kvetení. Relativní změny v koncentraci artemisininu mezi jednotlivými částmi se zdají být docela podobné mezi ekotypy. Různé studie ukazují širokou proměnlivost v obsahu artemisininu, který se pohybuje v rozsahu od 0,01% do asi 1,0% a přibližující se 1,5% [8].

#### *Distribuce mezi jednotlivými částmi*

V USA bylo zjištěno, že před kvetením je obsaženo celkového artemisininu v listech asi 89% a v postranních větvích asi pouze 10%. V horních listech obsah artemisininu činil 0,15%, v postranních výhoncích 0,04%, stopové množství bylo přítomno v hlavní lodyze a žádné množství v kořenech. 0,04% artemisininu bylo obsaženo v semenech [9].

Pozdější skleníkové a polní experimenty, ve kterých byly rostliny sklizeny od vegetativního stádia po kvetení a tvorbu semen ukázaly podobné rozdělení artemisininu ve vegetativním stádiu. Koncentrace artemisininu v květenství byla čtyř až jedenáctinásobná v porovnání s listy. Artemisinin obsažený v semenech byl převážně spojený s květními zbytky a úlomky rostliny [10].

#### *Změny obsahu artemisininu v průběhu času*

Většina výzkumníků zjistila, že koncentrace artemisininu v listech stoupá v průběhu vývoje rostliny ve vegetativní fázi. V některých experimentech dosáhla koncentrace artemisininu vrcholu před kvetením [11, 12, 39].

Jiní pracovníci, ač souhlasí se stoupající koncentrací během vegetativní fáze zjistili, že artemisinin dosahuje vrcholu později během plného rozkvetu. Tyto rozdíly mohou být přisuzovány klimatickým podmínkám, ekotypu, kultivačním praktikám nebo to může být způsobeno kombinací všech těchto faktorů [10, 13, 14].

Ačkoli znalost času píku artemisininu je jedna z důležitých podmínek k dosažení maximálního výnosu, není to dostačující. Musí to být spojeno se znalostí změn probíhajících v rostlině, ke kterým dochází v průběhu jejího dalšího zpracování [8].

### *Obsahový profil rostliny*

V polním experimentu v USA s pelyňkem ročním čínského původu byly odebrány listy v horní, střední a dolní části rostliny. Vzorky byly odebrány ve vegetativní fázi před kvetením. Koncentrace artemisininu byla dvojnásobná v horní části rostliny oproti částem středním a dolním.

Podobný polní experiment byl provedený v Austrálii (Tasmánie) s jugoslávským a čínským druhem při hustotě růstu 10 rostlin/m<sup>2</sup>. Listy jugoslávského druhu byly sklizeny od brzké vegetativní fáze do fáze plného kvetení. Vzorky byly odebrány z každé čtvrtiny lodyhy od vrcholu po dolní část rostliny. Ve vegetativní fázi právě před kvetením byla koncentrace artemisininu velmi podobná v každé čtvrtině rostliny. Nejranější sklizeň čínského druhu byla provedena v době pučení. Zde koncentrace stoupala od vrcholu po dolní část od 0,12%; 0,17%; 0,19% po 0,22%.

V jiné studii v USA byly odebrány listy šesti čínských klonů z horní, střední a dolní části lodyh ve fázi vegetativní a ve fázi kvetení. Artemisinin byl rozložen rovnoměrně.

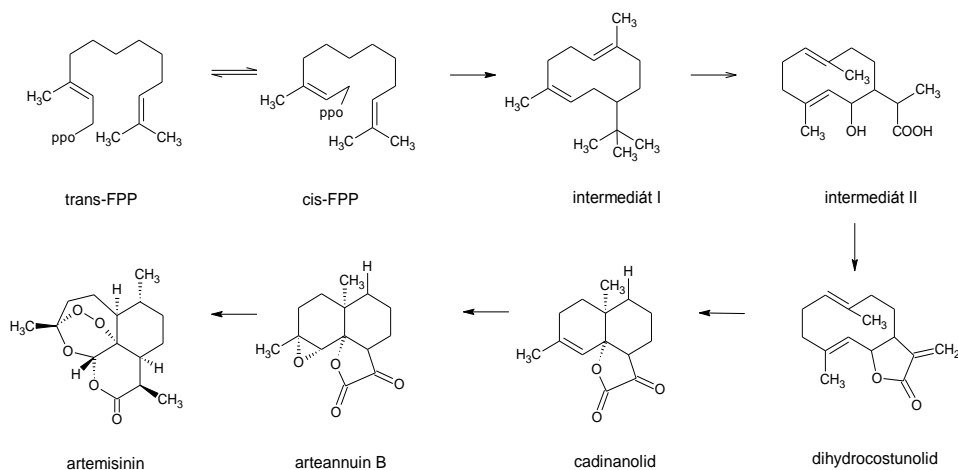
Je zřejmé, že u různých druhů pelyňku ročního jsou odlišnosti v distribuci artemisininu. Rozdílné výsledky těchto studií mohou být dány rostlinnou hustotou [8].

#### **2.1.2. Biosyntéza artemisininu**

Znalosti biosyntetické cesty artemisininu, rozdělení prekurzorů a příbuzných látek jsou velmi užitečné a mohou pomoci ke zvýšení výtěžku látky. Úplná biosyntetická cesta pro artemisinin a některé z jeho prekurzorů ještě nebyla potvrzena [15].

Důležitou roli v biosyntetické cestě artemisininu hraje arteannuinová (artemisinová) kyselina [16].

Haung Jung et al. (1988) a Akhila et al. (1987, 1990) studovali kompletní cestu biosyntézy artemisininu [16]. Byla předpokládána následující cesta: farnesylpropylphosphat (FPP), dihydrocostunolid, cadinanolid, arteannuin B, artemisinin.



Obr. 2: Biosyntéza artemisininu navržená Haung Jung et al. a Akhila et al.

Akhilovi studie neoznačily arteannuinovou kyselinu jako prekurzor artemisininu. Ale po použití  $C^{14}$  označujícího arteannuinovou kyselinu ve větvičkách pelyňku ročního, byla radioaktivita pozorována u arteannuinu B i artemisininu; bylo navrženo, že arteannuinová kyselina je běžný prekurzor jak arteannuinu B tak artemisininu [17].

Brown v r. 1994 ve vztahu k biosyntéze artemisininu izoloval dvě sloučeniny, secocadinan a dihydroxycadinanolid, který pak podstupuje Grobsovu fragmentaci poskytující enol formu secocadinanu. Secocadinan pak podstupuje enzymatickou oxygenaci poskytující artemisiten, který je redukován na artemisinin. Tato hypotéza není podporována žádným biochemickým důkazem, ačkoli je to chemicky proveditelné [18].

Sangwan et al. (1993) dosáhli přeměny arteannuinové kyseliny na arteannuin B a artemisinin za použití *in vitro* a *in vivo* systému. Arteannuinová kyselina byla převedena na arteannuin B (1,58%) a artemisinin (3,59%). Začlenění  $Fe^{2+}$ , 2 – oxoglutarátu a



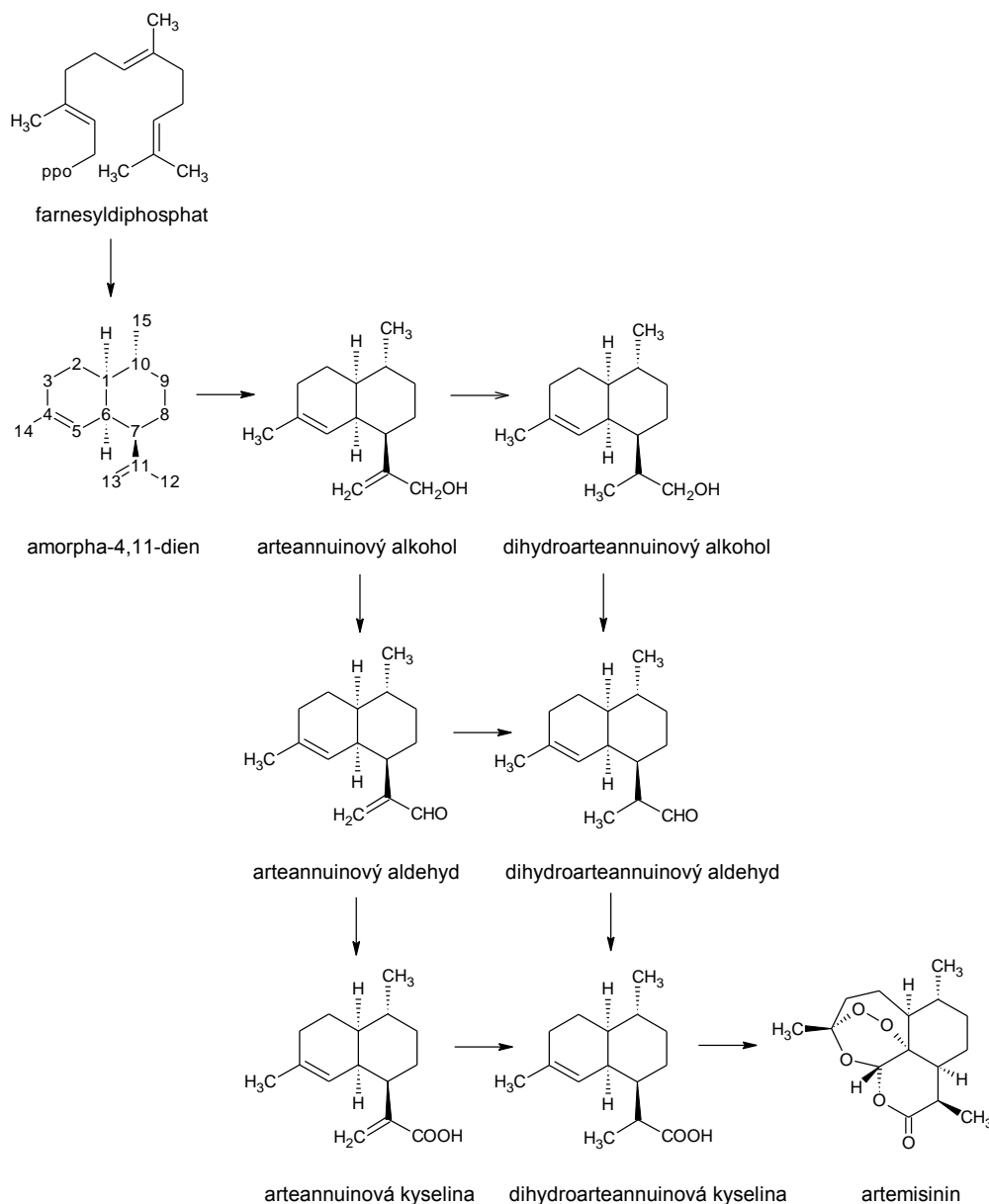
NADPH do *in vitro* systému zlepšilo přeměnu arteannuinové kyseliny na artemisinin. Peroxidas křenu v přítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dále zvýšila výtěžek arteannuinu B (4,68%) a artemisininu (7,19%) [17].

Nicméně Woerdenbag et al. (1992) zaznamenali rychlý rozklad artemisininu inkubovaného v médiu s peroxidasovou aktivitou; to poukazuje na jeho nestabilitu směrem k těmto enzymům [19].

Během posledních šesti let byla objasněna důležitá chybějící část biosyntézy artemisininu v rostlině. Všechny nedávno identifikované meziproducty, amorpha-4,11-dien, arteannuinový alkohol, arteannuinový aldehyd a dihydroarteannuinový aldehyd, byly přítomny v silici extrahované z listů a v extraktech získaných z glandulárních trichomů. Vzhledem ke struktuře a konfiguraci se amorpha-4,11-dien zdá být vhodným kandidátem na první meziproduct v biosyntéze artemisininu.

V prvním kroku biosyntézy podléhá amorpha-4,11-dien hydroxylaci na C12 za přítomnosti cytochromu P450. Vzniklý arteannuinový alkohol je oxidován na C12 buď cytochromem P450 nebo enzymem dehydrogenasa za vzniku arteannuinové kyseliny. Redukcí dvojně vazby mezi C11 a C13 vzniká dihydroarteannuinová kyselina, která je neenzymaticky převedena na artemisinin.

Možnou alternativou může být redukce dvojně vazby mezi C11 a C13 v arteannuinovém alkoholu nebo arteannuinovém aldehydu za vzniku dihydroarteannuinového alkoholu nebo dihydroarteannuinového aldehydu jako meziproductů [20]. Schéma biosyntézy je uvedeno na obrázku 3 na následující straně.



Obr. 3: Biosyntéza podle Bertea et al.

### 2.1.3. Syntéza artemisininu

Vzhledem k tomu, že obsah artemisininu v pelyňku ročním je relativně nízký, je velká pozornost v oblasti výzkumu věnována chemické syntéze [2]. Doposud bylo zaznamenáno přes devět syntetických cest. Většina z nich byla založena na fotooxidační reakci se zavedením klíčového peroxidového segmentu [5].

E.g. Schmid a Hofheinz (1983) převedli isopulegol na artemisinin ve 13 syntetických krocích s celkovým výtěžkem 5%. Xing – Xiang Xu et al. (1986)

zaznamenali schéma pro syntézu artemisininu, kde spouštěcí látkou byl citronellal. Avery et al. (1992) použili 10 syntetických kroků zahrnujících ozonolýzu vinylsilanu s pulegonem jako spouštěcí sloučeninou [2].

Syntéza artemisininu je velmi složitá, neekonomická a komerčně nerealizovatelná, proto planě rostoucí rostliny nebo pěstování pelyňku ročního zůstávají jediným zdrojem produkce artemisininu [21].

#### **2.1.4. Přehled o metodách stanovení artemisininu**

##### Konvenční metody

- a) chromatografie na tenké vrstvě (TLC)
- b) vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí (HPLC-UV) a elektrochemickou detekcí (HPLC-EC)
- c) plynová chromatografie (GC)
- d) plynová chromatografie (GC) kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (MS)
- e) MS/MS

Metoda TLC není spolehlivá pro kvantitativní stanovení artemisininu pro špatnou detekovatelnost skvrn a interferenci dalších složek rostliny. Je užitečnou zkušební metodou pouze pro obohacení obtížných metod. GC je také používána pro analýzu artemisininu. Artemisinin je však sloučenina termolabilní a v koloně dochází k jejímu rozkladu. Stabilitní studie ukázaly, že artemisinin je stabilní do 150°C a při teplotě od 180°C do 200°C se rozkládá na řadu produktů. HPLC-UV je často používanou metodou, ale přítomnost dalších složek v surovém extraktu, které absorbují při nízkých vlnových délkách, může způsobit zastínění píku artemisininu. Artemisinin je pro HPLC-UV potřeba derivatizovat z důvodu nepřítomnosti chromoforů. HPLC-EC je nejcitlivější metodou pro detekci a kvantitativní stanovení artemisininu a nevyžaduje derivatizaci a čištění vzorku. Funk et al. (1980) jako první ukázali selektivitu a citlivost této metody při detekci a kvantitativním stanovení peroxidů. Tato metoda je vysoce citlivá i pro nanogramové hladiny artemisininu. Je 100x více citlivou metodou než HPLC-UV. Je také specifická pro sloučeniny artemisininu příbuzné, které mají ve své struktuře peroxidový můstek. Během elektrochemické detekce nedochází k interferenci

dalších složek rostlinného extraktu, což je problém TLC a HPLC-UV metod. HPLC-EC byla srovnávána s GC; obě metody umožnily dobrou separaci artemisininu. Avšak HPLC-EC je 10x více citlivou metodou než GC. Pro rutinní analýzu artemisininu byla vyvinuta HPLC na reverzní fázi (HPLC-RP). Byly zkoušeny různé kombinace detekce při použití HPLC-RP. Jednou z dalších možností je HPLC s polarografickou detekcí. [16].

### Nekonvenční metody

- a) RIA (Radioimmunoassay)
- b) ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay)

Konvenční metody jsou pro artemisinin specifické, ale nejsou dost citlivé pro detekci hladin v malých vzorcích rostlinných tkání z mladých sazenic a z buněčných nebo tkáňových kultur. Metody RIA a ELISA jsou více citlivé a vysoce specifické.

Ačkoli metoda RIA je více citlivá než metody konvenční, použití radioaktivních sloučenin představuje řadu problémů; specifické získávání a požadavky, problematická stabilita, vysoká cena, zdravotní rizika. Metoda ELISA je citlivá jako RIA a bezpečnější. Ferreira a Janick (1996) při této metodě derivatizovali artemisinin na karboxymethylether dihydroartemisininu ve třech krocích a spojili jej s BSA (hovězí krevní albumin). Tento komplex byl injikován do králíků, kde vytvořil polyklonální protilátky vhodné pro detekci artemisininu. Množství artemisininu ve vzorku bylo 1,5 ng/ml [16].

## **2.2. Silice**

Koncentrace silice je nejvyšší v době kvetení [8].

Silice nadzemních částí rostliny, okvětních lístků, listů a lodyh, má světle žlutou barvu a kořeněnou vůni. Obsah silice v jednotlivých částech rostliny se liší. Největší množství bylo zjištěno v okvětních lístcích (1,8%), o něco méně v listech (1,5%) a pouze 0,2% v lodyze (získáno z čerstvých vzorků rostliny).

Pomocí analýzy GC-MS bylo identifikováno 93 složek. Silice okvětních lístků a listů je bohatá na monoterpeny (asi 50%). Hlavní podíl silice okvětních lístků zaujímá *trans*-sabinol, paramentha-1,4(8)-dien-3-ol a 1,8-cineol. Camphor, 1,8-cineol a

germacran D jsou hlavními složkami silice listů. Seskviterpeny jsou v porovnání s monoterpeny přítomny jen v malém množství (do asi 8%).

Silice získaná z lodyhy je naopak bohatá na seskviterpeny (asi 40%), malé množství zaujímají monoterpeny (asi 5%). Se silicí z okvěti a/nebo listů sdílí 62 složek. Hlavními složkami jsou caryophyllen oxid, 9-epi-caryophyll-1(12),8(15)-dien-14-ol a  $\beta$ -caryophyllen.

Celkem 55 složek, včetně arteannuinových alkoholů (*cis* a *trans*), bylo nalezeno ve všech třech částech rostliny. Zajímavá je přítomnost dihydroarteannuinové kyseliny v okvětních lístcích a listech, ale ne v lodyze. Tyto látky hrají důležitou roli v biosyntéze artemisininu jako prekurzory (viz kap. 2.1.2.).

Další složkou silice získané z nadzemních částí je artemisia keton. Bylo provedeno srovnání okrasných druhů pelyňku ročního vyskytujících se v Číně a dalších asijských zemích, Evropě a Americe s druhy bohatými na artemisinin vietnamského a čínského původu. Bylo zjištěno, že silice okrasných druhů je charakteristická hojností artemisia ketonu, kdežto u druhů bohatých na artemisinin artemisia keton chyběl [22].

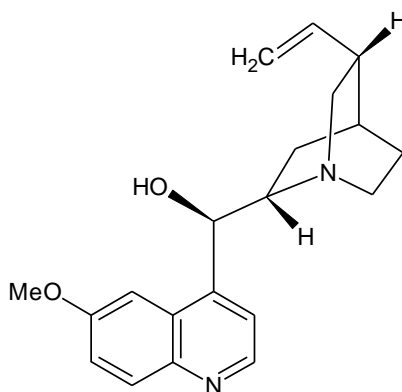
Přítomnost silice byla zjištěna i v kořenech v množství 0,25% (získáno ze sušených vzorků). Tato silice má tmavě hnědou barvu a příjemnou vůni. GC-MS analýzou bylo určeno 52 složek, z nichž velký podíl tvoří seskviterpeny (asi 70%) a mono- a diterpeny jsou přítomny v nízké koncentraci (0,5%). Hlavními složkami silice jsou *cis*-arteannuinový alkohol,  $\beta$ -farnesen,  $\beta$ -malein a  $\beta$ -caryophyllen [23].

### 3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK

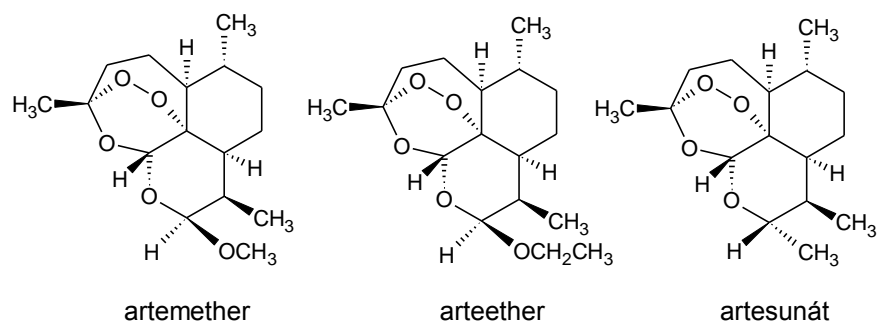
#### 3.1. Antimalarické působení

Artemisinin, známý též jako qinghaosu, je látka, která se využívá v čínské tradiční medicíně jako prostředek proti malárii. Malárie je parazitární onemocnění, které je endemické převážně v tropických oblastech – tedy tam, kde teplota a potřebná vlhkost dovolují vektoru choroby, komáru rodu *Anopheles*, normální existenci a množení. Artemisinin je velmi rychle účinná schizontocidní látka proti *Plasmodium falciparum* a *P. vivax*, včetně chlorochinrezistentních a centrálních forem malárie. Likviduje parazitární podstatně rychleji než jakékoli jiné antimalarikum [24].

Antimalarická léčiva pocházející z pelyňku ročního mají mnoho výhod: rychlé snížení horečky, rychlé odstranění parazitů z krevního řečiště a žádné závažné vedlejší účinky. WHO doporučuje v případě výskytu multirezistentních kmenů plazmodií používat kombinovanou terapii, která je tvořena deriváty chininu a deriváty artemisininu (artemether, artesunát, arteether) [2].



Obr. 4: Struktura chininu



Obr. 5: Struktura derivátů artemisininu

### 3.1.1. Mechanismus účinku artemisininu

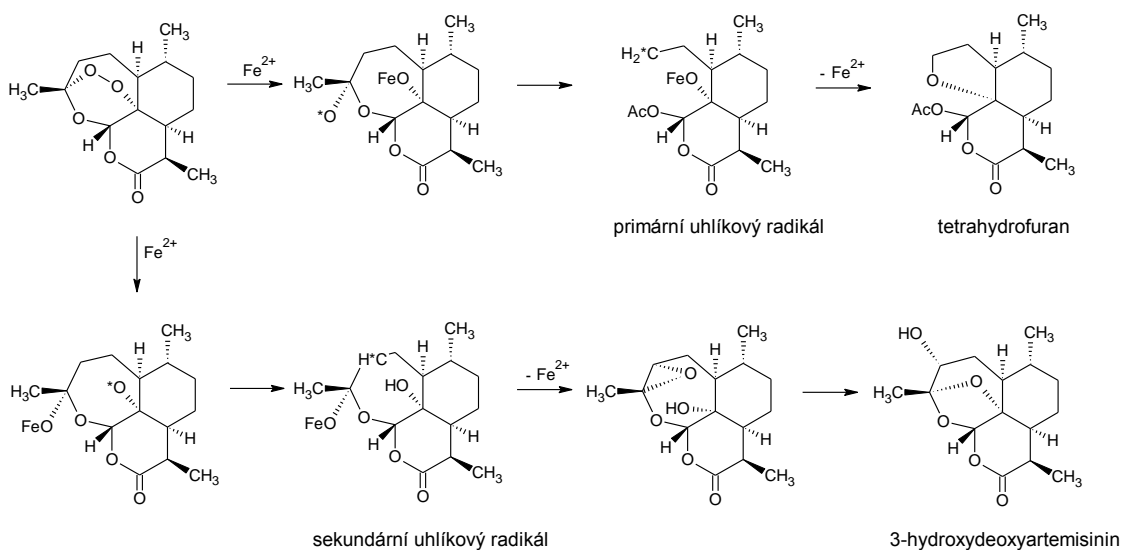
Je zřejmé, že antimalarický mechanismus účinku artemisininu je odlišný od jiných antimalarik, i když mechanismus účinku chininu a dalších syntetických alkaloidních antimalarických léčiv nebyl doposud zcela objasněn. Od objevu artemisininu je potvrzení mechanismu účinku na molekulární úrovni zajímavou otázkou, ačkoli je to velmi obtížná úloha [25].

Artemisinin a jeho deriváty ničí parazity rychleji než jiné antimalarické látky díky jejich jedinečnému farmakodynamickému působení. Jsou toxické k parazitu v nanomolárních koncentracích. To způsobuje strukturální změny v erytrocytárním stadiu parazita ovlivněním membrán obklopujících potravní vakuolu, jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum a nukleoplasmu. Artemisinin se lokalizuje ve specifických membránách parazita. Tyto změny vedou k tvorbě autofágových vakuol a ke ztrátě cytoplasmy, což parazita ničí [16, 26]. Předpokládá se, že zabití parazita artemisininem a jeho deriváty je zprostředkováno produkcí cytotoxických látek jako jsou volné radikály a reaktivní aldehydy [27].

Funkce peroxidového můstku přítomného v artemisininu a jemu příbuzných sloučeninách je zásadní pro antimalarickou aktivitu a výsledky *in vitro* studií ukazují, že karbonylová skupina není pro antimalarický účinek nezbytná [28]. Artemisininové deriváty, kterým chybí endoperoxidový můstek, zdroj volného kyslíkového radikálu, postrádají antimalarickou aktivitu [29, 30]. *In vitro* antimalarická aktivita artemisininu a artesunátu je zvýšena vysokým kyslíkovým napětím a přidáním dalších sloučenin tvořících volný radikál jako je doxorubicin, miconazol [31], casteicin a artemitin [32].

Podobně antioxidanty (zhášači volných radikálů) jako je  $\alpha$ -tokoferol, katalasa, dithiothreitol [31], sůl kyseliny askorbové a redukovaný glutathion [33] blokují antimalarickou aktivitu.

Artemisinin se sám stává volným radikálem v reakci katalyzované železem. Biochemické působení artemisininu závisí na dvou po sobě následujících krocích. První krok, aktivace, zahrnuje železem zprostředkované rozštěpení endoperoxidového můstku. Tvoří se tak nestabilní organický volný radikál a/nebo jiný elektrofilní meziprodukt [16]. Vznikají dva hlavní produkty, tetrahydrofuran a 3-hydroxydeoxyartemisinin. Na základě těchto poznatků byl navržen mechanismus radikálové reakce, přičemž reakční mechanismus postupuje přes krátce žijící kyslíkový radikál a následně přes primární a sekundární uhlíkový radikál [5].



Obr. 6: Mechanismus radikálové reakce

Druhý krok, alkylace, zahrnuje tvorbu kovalentních vazeb mezi léčivem a bílkovinou parazita [34].



### 3.2. Působení proti dalším parazitům

Experimentální a klinické studie odhalily, že artemisinin a jeho deriváty artemether a artesunát nejsou pouze antimalarickými léčivy, ale také užitečnými látkami v řadě dalších parazitárních onemocnění. V 70. letech byla na zvířecích modelech potvrzena vyšší antiparazitární aktivita u artemetheru a artesunátu než u artemisininu [2].

#### *Schistosoma japonicum, S. mansoni, S. haematobium*

Stejně jako u antimalarických léčiv vzniká tolerance nebo rezistence k praziquantelu. Proto jsou potřebné nové léky pro léčbu schistosomóz. Experimentální výsledky ukazují, že artemether, artesunát a další deriváty jsou více účinné než artemisinin. Tyto látky účinně zničily parazity žijící ve zvířecích modelech, zatímco praziquantel byl neúčinný [5].

#### *Clonorchis sinensis*

Bylo zaznamenáno, že artemisinin a jeho deriváty jsou účinné proti *Clonorchis sinensis*. Zvířecí modely byly vystaveny vlivu parazitů. Po měsíci jim byla perorálně podávána suspenze artemisininu v dávkách 200 – 600 mg/kg v jedno až sedmidenních cyklech; redukce parazitů byla 100%. Při použití perorálně podávaného artemetheru v dávkách 30 – 60 mg/kg v pětidenních cyklech byla redukce 82 – 100%. Nejvíce účinný byl ester dihydroartemisininu; při dávkách 30 mg/kg byla redukce parazitů 100% [5].

#### *Theileria annulata*

Hovězí dobytek infikovaný tímto parazitem byl vyléčen krmivem obsahující čerstvou rostlinu; stejně tak perorální podávání artesunátu (5 mg/kg) vyléčilo 99,24% během 2 – 4 dnů [5].

#### *Toxoplasma gondii*

Infikovaná prasata *Toxoplasma gondii* byla rozdělena do dvou skupin. První skupina byla léčena extraktem z rostliny (60 – 120 g, perorální podání), úspěšnost léčby byla 92,86%. Druhé skupině byl podáván (intravenózně nebo intramuskulárně) 10%

roztok sulfadiazinu sodného a 30% roztok metamizolu; úspěšnost byla pouze 66,67% [5].

### Balantidium coli

*In vitro* a *in vivo* testy ukázaly vyšší účinnost rostliny vůči *Balantidium coli* než metronidazol. Extrakt z rostliny použitý při *in vitro* testu zastavil pohyb parazitů a zničil je během minuty, zatímco u metronidazolu byl pohyb zastaven během 30 minut [5].

### **3.3. Onemocnění související s AIDS**

Artemether byl úspěšně použit v Ugandě pro léčbu onemocnění "White mouth" na 144 pacientech s AIDS infikovaných *Candida albicans*. Pacienti byli denně ošetřeni olejovým roztokem artemetheru (80 mg) podaného orálně; po pěti dnech bylo 94,4% pacientů vyléčeno (136/144), *C. albicans* zmizela. Osm dalších pacientů bylo vyléčeno po 10-ti dnech.

Některé studie ukázaly, že artemether může inhibovat *Toxoplasma gondii* a *Pneumocystis carinii* [5].

### **3.4. Protinádorové působení**

Některé obsahové látky pelyňku ročního jako je artemisinin, arteannuin B, arteannuinová kyselina, artemisiten, flavonoidy a další terpeny ukázaly protinádorovou aktivitu *in vitro*. Bylo zjištěno, že dihydroartemisinin selektivně ničí nádorové buňky v přítomnosti holotransferrinu, který může zvyšovat intracelulární koncentraci železa. Zdravé prsní buňky a bílé krvinky mění nevýznamně. Zdá se, že mechanismus protinádorové a protimalarické aktivity jsou podobné [2].

### **3.5. Imunosupresivní působení**

Obecně, antimalarická léčiva mají imunosupresivní účinek a jsou často používána pro léčbu dermatóz jako chlorochin a hydroxychlorochin pro léčbu lupus erythematosus a četných solárních dermatitid. Imunofarmakologický účinek artemisininu a jeho derivátů byl po dlouhou dobu studován v Číně. Experimentální

výsledky nasvědčovaly, že tyto látky mají imunosupresivní a imunostimulující účinky [5].

### **3.6. Anestetické působení**

Některé ve vodě rozpustné deriváty artemisininu mají místní anestetické účinky [5].

### **3.7. Antiarytmické působení**

Během klinického zkoušení artemisininu jako antimalarického léku bylo pozorováno jeho další cenné působení, ústup tachykardie u pacientů s malárií. Další studie provedené na zvířecích modelech ukázaly zřejmý antiarytmický účinek. Mechanismus účinku je diskutován [5].

### **3.8. Působení silice**

Silice bohatá na 1,8-cineol a camphor výrazně inhibuje růst několika druhů orálních bakterií. Silice získaná z nadzemních částí rostliny i z kořenů vykazuje toxicitu proti hmyzu. Na seskviterpeny bohatá silice se používá v parfumerii jako stabilizátor vonných látek [22].

#### **4. PĚSTOVÁNÍ *ARTEMISIA ANNUA* L. A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI ROSTLINY A ARTEMISININU**

Ačkoli má rostlina původ v relativně mírných zeměpisných šířkách, zdá se, že může efektivně růst i v tropických oblastech [35]. Např. na Madagaskaru bylo získáno přiměřené množství suché listové hmoty s vysokým výnosem artemisininu (asi 40 kg/ha) [36]. Navíc je rostlina velmi adaptabilní a je schopna se přizpůsobit různým typům půdy [8].

Pro pěstování pelyňku ročního je důležitý výběr kvalitního semene. Rostlina by měla mít vysoký poměr listů k lodyze [37].

Při pěstování rostliny na plantážích byl sledován vliv specifických prvků jako je dusík, fosfor a draslík na růst rostliny a obsah artemisininu. Studie provedené v USA (Indiana) ukázaly příznivý vliv dusíkatého hnojiva [38].

Některé druhy pelyňku ročního mohou být citlivé k pH půdy v rozmezí od 5,0 do 5,5. Při použití vápence (10 t/ha) došlo k posunu pH z 5,0 na 5,5; to vedlo ke zvýšení výnosu suché listové hmoty, obsah artemisininu a kyseliny arteannuinové nebyly změnou pH zvýšeny [39].

Optimální doba sklizně závisí na požadované látce, kterou potřebujeme z rostliny získat. Postupy sklizně závisí na klimatických podmínkách oblasti produkce, hlavně na teplotě, vodních srážkách a možná na UV záření [8].

Velký vliv na obsah artemisininu má proces sušení rostliny. Bylo zjištěno, že sušení na přímém slunci vede ke snížení koncentrace artemisininu v porovnání se sušením ve stínu [40]. Naopak sušení na slunci se zdá, že nemá škodlivý vliv na obsah silice [41].

### **III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY**

## 1. POTŘEBY

### 1.1. Chemikálie

standard: Artemisinin, 98%

361593 – 100 mg

ALDRICH

CAS 63968-64-9; FW 282,34; MW 05311

standard: Tujon

$\alpha + \beta$  - thujone

FLUKA

Analysis number 288 156/1 1292

Mr 152,24;  $d_4^{20}$  0,915;  $n_D^{20}$  1,459

izolován z přírodní silice listů cedru

Methanol gradient grade pro chromatografii Li Chrosolv (R)

testován s pomocí HPLC

Merck – Hitachi

n – Hexan p.a.

Methylalkohol p.a. (MeOH)

Chloroform p.a. stabilizovaný ~ 1% ethylalkoholu (CHCl<sub>3</sub>)

Kyselina octová 99,8% p.a. (CH<sub>3</sub>COOH)

Kyselina sírová 96% p.a. (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Anisaldehyd zur Synthese

Toluen p.a. (Tol)

Ethylester kyseliny octové p.a. (EtOAc)

Kyselina fosfomolybdenová p.a.

Hydroxid sodný p.a.

## **1.2. Laboratorní přístroje**

Kuchyňský robot ETA

Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER 10P, BANDELIN

Vakuová rotační odparka Büchi Rotavapor R – 114

Sušárna komorová HS 31 A

Kapalinový chromatograf

Philips PU4100

Detektor: Philips PU4110 UV/VIS

Kolona: Merck, LiChrospher 100, RP18e, 5 $\mu$ m, 250x4mm

Předkolona: Tessek, SGX C18, CGC 30x3mm, 7 $\mu$ m

Linomat 5 (CAMAG)

## **1.3. Laboratorní pomůcky**

skleněné kádinky

skleněné nálevky

odměrné válce

skleněné pipety

Erlenmayerovy baňky

síto č. 500

## **1.4. Využívané soustavy pro tenkovrstvou chromatografii**

Číselné údaje značí objemové díly.

S 1: CHCl<sub>3</sub> – MeOH 99 : 1

S 2: Tol – EtOAc 93 : 7

## **1.5. Chromatografické adsorbenty**

Silikagel MERCK 60 F<sub>254</sub>

## 2. PRACOVNÍ POSTUP A VÝSLEDKY

### 2.1. Materiál

Nat' pelyňku ročního (*Artemisia annua* L., čeleď *Asteraceae*) byla sbírána v roce 2006 z kultur pěstovaných v České republice. Sběr byl proveden ve čtyřech různých vegetačních obdobích. Nat' byla sušena na zastíněné ploše volně na vzduchu.

Tab. 1: Doba sklizně rostliny

Vzorek	Datum sklizně	Vegetační období
I	3.7.2006	intenzivní vegetační růst
II	12.7.2006	počátek butonizace (nasazení pupat)
III	4.9.2006	po odkvětu
IV	30.9.2006	zralost plodů

### 2.2. Extrakce drogy

Droga byla pomleta bez hlavní osy a proseta přes síto č. 500. Do dvou baněk bylo naváženo 2 x 1,5 g drogy z každého vzorku, zalito 2 x 200 ml hexanu, dáno na 2 hodiny do lázně 50°C a necháno stát přes noc 15 hodin. Ráno byly baňky dány na 10 minut do ultrazvukové lázně o teplotě 22°C a frekvenci 35 Hz. Extrakty byly přes papírový filtr přefiltrovány do dvou baněk. Každý extrakt byl promyt 2 x 30 ml hexanu. Po odpaření do sucha na vakuové rotační odparce byl obsah rozpuštěn v 10 ml methanolu a přefiltrován do menších baněk. Baňky byly promyty ještě 2 x 2 ml methanolu a odpařeny do sucha [21].

Takto připravené suché extrakty byly použity pro identifikaci artemisininu tenkovrstvou chromatografií (TLC) a pro kvantitativní stanovení artemisininu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).



## **2.3. Zkoušky totožnosti – identifikace artemisininu tenkovrstvou chromatografií**

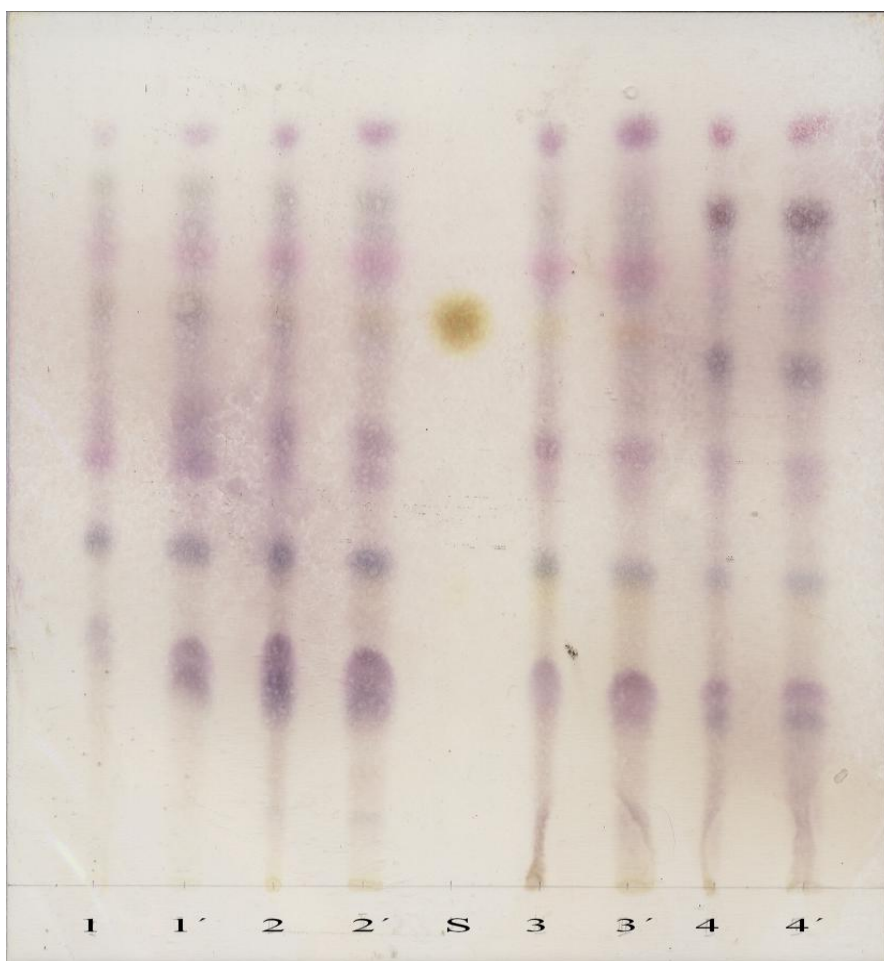
### **2.3.1. Postup tenkovrstvé chromatografie**

Suché extrakty byly rozpuštěny v 1 ml methanolu. Na chromatogram byly naneseny standard artemisininu o koncentraci 0,3 mg/ml a jednotlivé vzorky (I / 1, I / 2, II / 1, II / 2, III / 1, III / 2, IV / 1 a IV / 2). Jako mobilní fáze byla použita směs chloroformu a methanolu v poměru 99 : 1. K detekci byla použita směs kyseliny octové ledové, kyseliny sírové koncentrované a anisaldehydu v poměru 50 : 1 : 0,5. Po postřiku byl chromatogram zahřátý na 100°C [21].

### **2.3.2. Výsledky tenkovrstvé chromatografie**

Artemisinin reagoval vznikem hnědé skvrny.  $R_F$  standardu artemisininu bylo 0,66, přičemž ve vzorku se vyskytovala skvrna s  $R_F$  0,65. Podle polohy a barvy skvrn na chromatogramu lze předpokládat, že artemisinin je přítomen. Záznam chromatogramu 1 je uveden na následující straně.

Chromatogram 1: frakce 1, 1', 2, 2', 3, 3', 4, 4' a standardu artemisininu



Popis: 1, 1' - vzorky I/1 a I/2

2, 2' - vzorky II/1 a II/2

3, 3' - vzorky III/1 a III/2

4, 4' - vzorky IV/1 a IV/2

S - standard artemisininu

Mobilní fáze S 1:  $\text{CHCl}_3$  – MeOH (99 : 1)

Stacionární fáze: Silikagel MERCK 60 F<sub>254</sub>

Detekce:  $\text{CH}_3\text{COOH}$  –  $\text{H}_2\text{SO}_4$  – anisaldehyd (50 : 1 : 0,5)

## 2.4. Stanovení obsahu artemisininu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

### 2.4.1. Příprava standardu a vzorku

Příprava standardu: 5 mg artemisininu bylo naváženo do odměrné baňky na 10 ml a doplněno po rysku methanolem. Z tohoto základního roztoku byly připraveny tři ředění pro sestavení kalibrační křivky. Ze základního roztoku byly odebrány 1; 0,5 a 0,2 ml, ke každé koncentraci byly přidány 4 ml 0,2% roztoku NaOH a vloženo na vodní lázeň 45°C na 30 minut. Po ochlazení byly baňky doplněny 0,08 M kyselinou octovou po rysku. Vzorky byly změřeny na HPLC chromatografu podle metody viz [42].

Příprava vzorku: Suché extrakty (viz kap. 2.2.) byly rozpuštěny ve 2 ml methanolu. 1 ml extraktu byl převeden do odměrné baňky na 10 ml, přidány 4 ml 0,2% roztoku NaOH a vloženo na vodní lázeň 45°C na 30 minut. Po ochlazení byly baňky doplněny 0,08 M kyselinou octovou po rysku. Vzorky byly změřeny na HPLC chromatografu podle metody viz [42].

U každého vzorku byla provedena dvě HPLC stanovení. V případě rozptylu hodnot by bylo provedeno další měření.

### 2.4.2. HPLC podmínky

Philips PU4100

Detektor: Philips PU4110 UV/VIS

Kolona: Merck, LiChrospher 100, RP18e, 5 $\mu$ m, 250x4mm

Předkolona: Tessek, SGX C18, CGC 30x3mm, 7 $\mu$ m

Vlnová délka: 295nm

Průtok: 1,0 ml/min

Fáze: A - 0,01M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 45% MeOH / B - 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 45% MeOH

50% A : 50% B isokraticky

Nástřík: 20 $\mu$ l

### 2.4.3. Kalibrační křivka

Kalibrační křivka byla sestrojena ze 3 analýz na každé ze 3 koncentračních úrovní.

Rovnice přímky.  $Y = 23721,6 \times X$   $r = 0,99348$

Metoda je od 0,01mg/ml do 0,05mg/ml lineární.

Wed, 13th Dec, 2006 9:33:10

ART61106

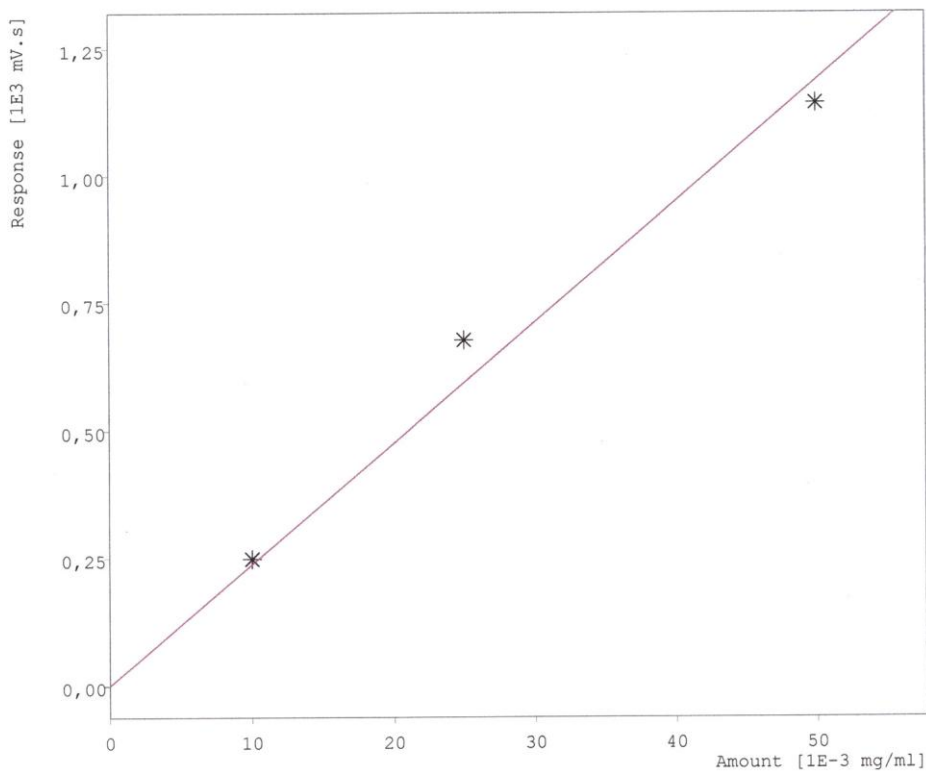
Page 1

artemisinin - 5,995 min.

Substance Levels

Lv	Response	Amount	Lvl Res Factor
1	1142,3111	5,000E-02	4,4E-05
2	676,3806	2,500E-02	3,7E-05
3	247,7155	1,000E-02	4,0E-05
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

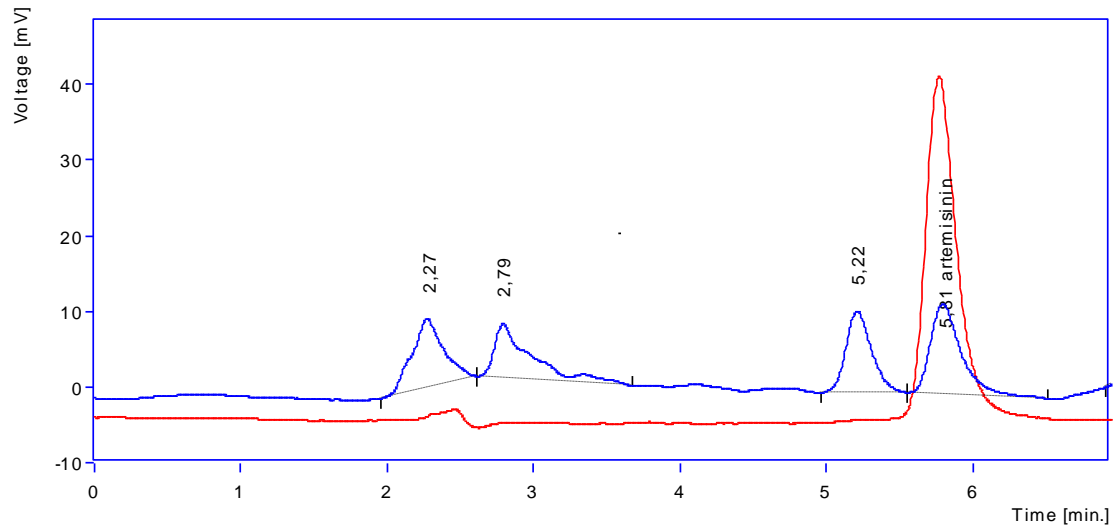
Peak Type : **Ordnr**  
Left Window : **0,5 min.**  
Right Window : **0,5 min.**  
Response Base : **Area**  
Curve Fit Type : **Linear**  
Zero Type : **Curve from Zero**  
Subst. Equation :  **$Y = 23721,6 * X$**   
Correlation Coef. : **0,99348**  
Saved Resp. Fact. : **0,000042156**



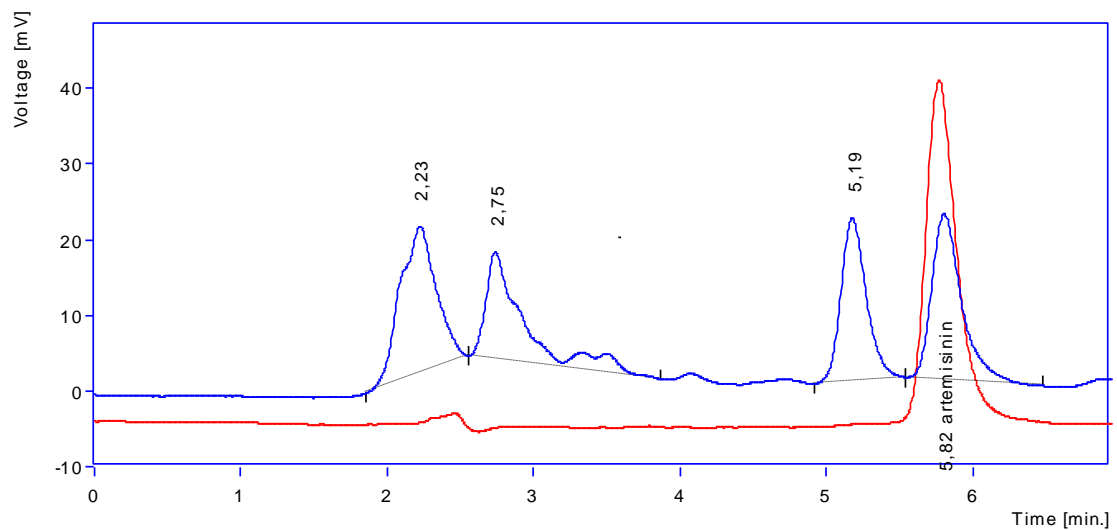
Obr. 7: Kalibrační křivka

#### 2.4.4. HPLC záznamy

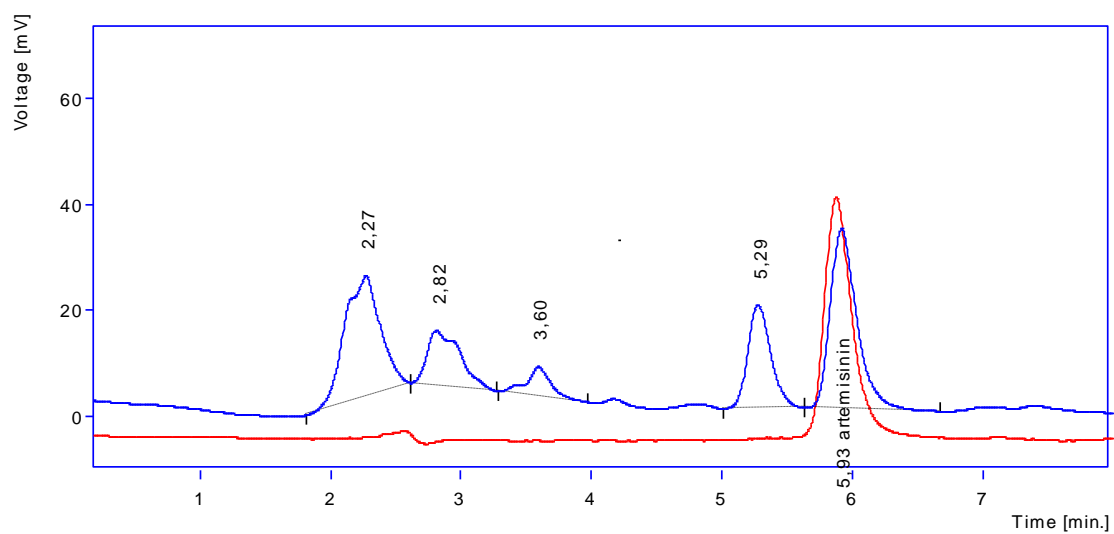
— vzorek  
— standard



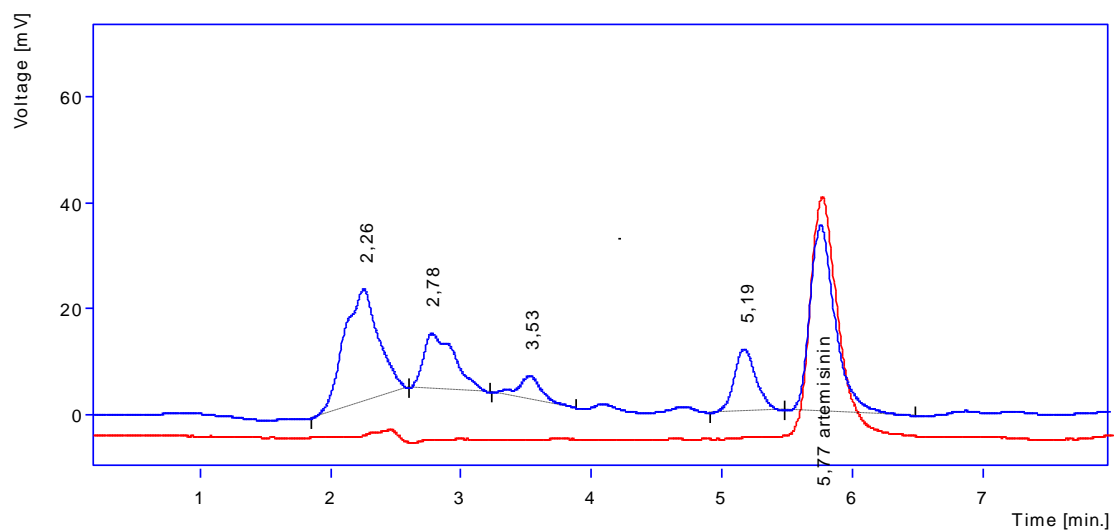
Obr. 8: HPLC chromatogram: vzorek I / 1



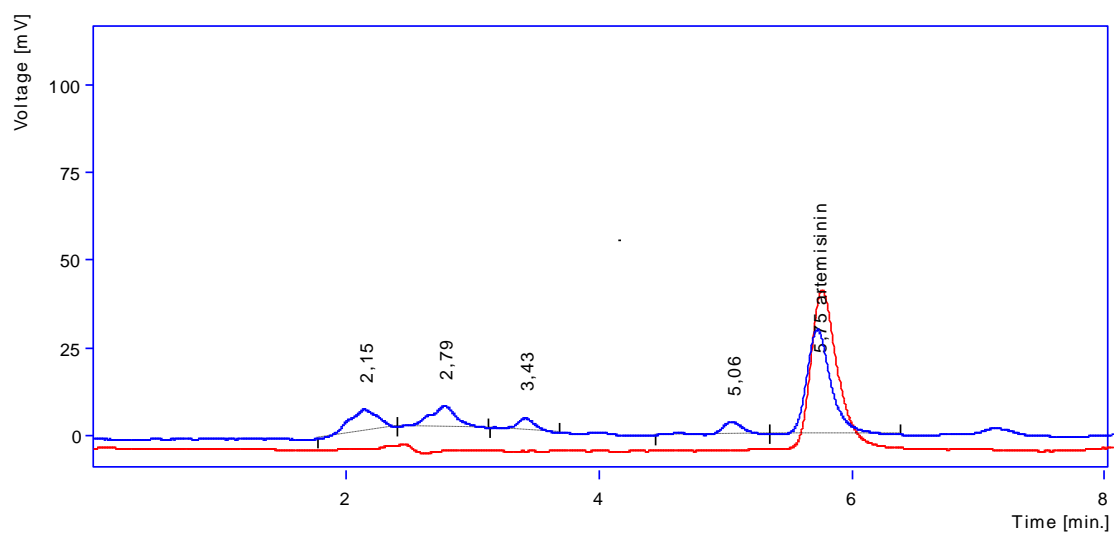
Obr. 9: HPLC chromatogram: vzorek I / 2



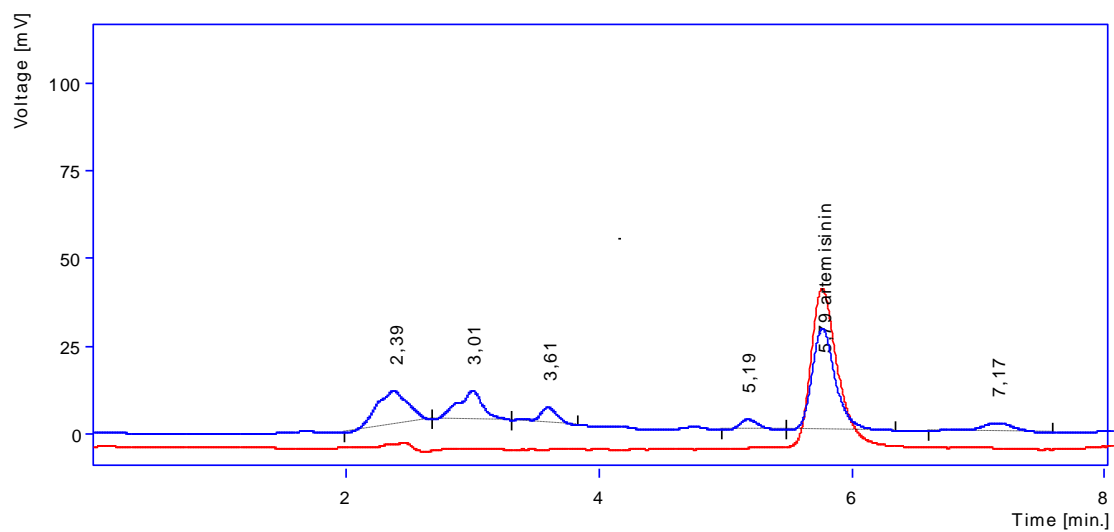
Obr. 10: HPLC chromatogram: vzorek II / 1



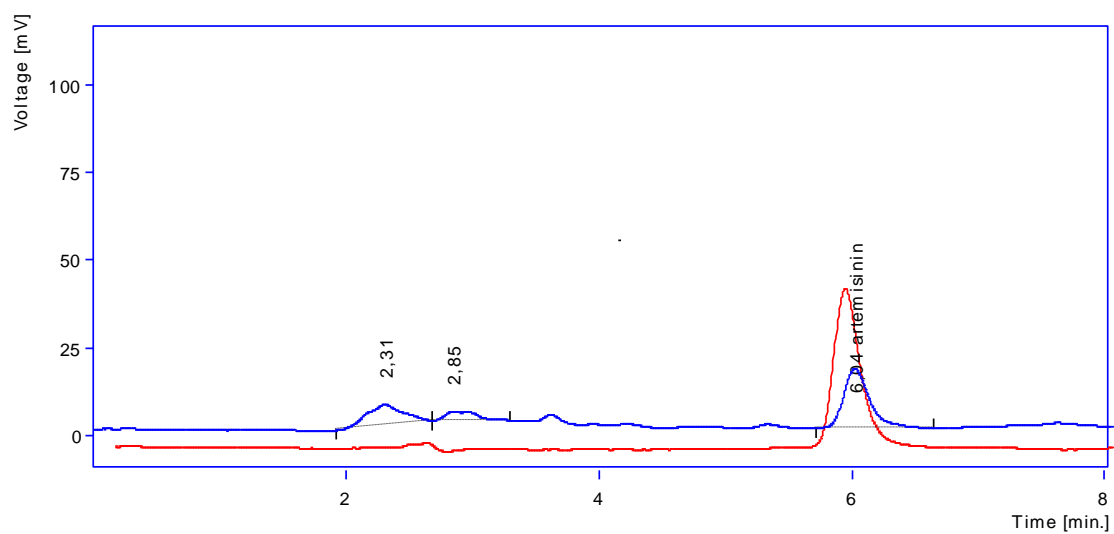
Obr. 11: HPLC chromatogram: vzorek II / 2



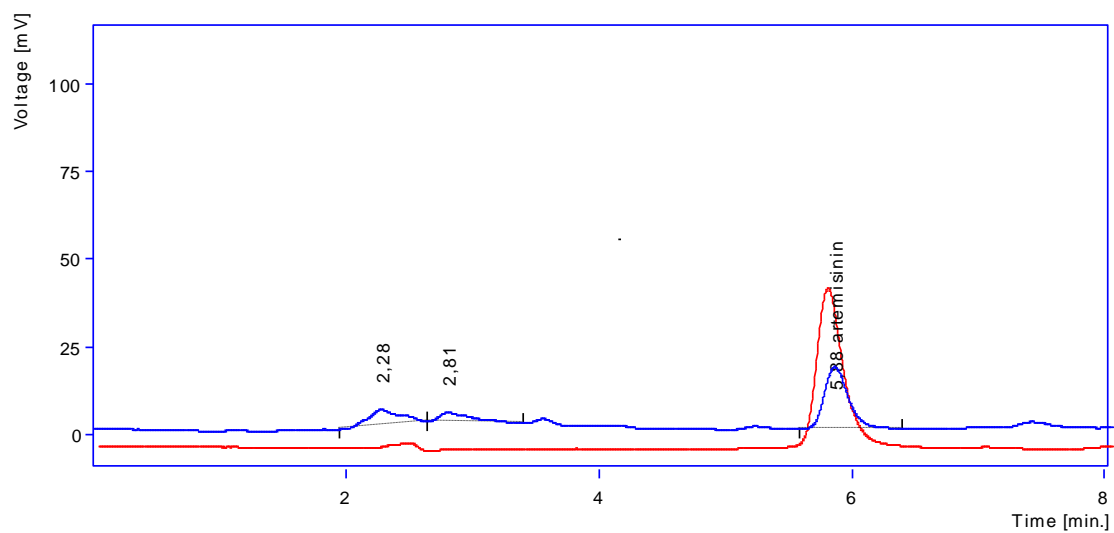
Obr. 12: HPLC chromatogram: vzorek III / 1



Obr. 13: HPLC chromatogram: vzorek III / 2



Obr. 14: HPLC chromatogram: vzorek IV / 1



Obr. 15: HPLC chromatogram: vzorek IV / 2



## 2.4.5 Výsledky HPLC stanovení

Tab. 2: Obsah artemisininu v % hm

<b>Vzorek</b>	<b>% hm</b>	<b>mg z 1,5 g drogy</b>
I / 1	0,010	0,150
	0,012	0,180
I / 2	0,014	0,210
	0,013	0,195
II / 1	0,029	0,435
	0,028	0,420
II / 2	0,027	0,405
	0,027	0,405
III / 1	0,023	0,345
	0,023	0,345
III / 2	0,022	0,330
	0,022	0,330
IV / 1	0,013	0,195
	0,013	0,195
IV / 2	0,013	0,195
	0,014	0,210

## 2.5. Ztráta sušením

### 2.5.1. Postup zkoušky

Nejvýše 10%; 1,000 g práškované drogy (355) byl navážen do předem vysušené váženky. Droga byla sušena 2 hodiny v sušárně při 100°C až 105°C. Sušení bylo provedeno do konstantní hmotnosti [43].

### 2.5.2. Výsledky ztráty sušením

Tab. 3: Ztráta sušením

Vzorek	Navážka drogy (g)	Hm. drogy po vysušení (g)	Ztráta sušením (%)
I / 1. stanovení	1,0074	0,9314	7,54
I / 2. stanovení	1,0071	0,9320	7,46
II / 1. stanovení	1,0016	0,9279	7,36
II / 2. stanovení	1,0006	0,9281	7,25
III / 1. stanovení	1,0056	0,9256	7,96
III / 2. stanovení	1,0058	0,9273	7,80
IV / 1. stanovení	1,0035	0,9318	7,14
IV / 2. stanovení	1,0022	0,9308	7,12

## 2.6. Obsah artemisininu vztažený na ztrátu sušením

Tab. 4: Obsah artemisininu v % hm

Vzorek	% hm	% hm Ø	Ztráta sušením (%)	Ztráta sušením Ø (%)	Obsah artemisininu (%)	mg z 1,5 g drogy
I / 1	0,010	0,011	7,54		0,012	0,180
	0,012					
I / 2	0,014	0,014	7,46	7,50	0,015	0,225
	0,013					
II / 1	0,029	0,029	7,36		0,031	0,465
	0,028					
II / 2	0,027	0,027	7,25	7,31	0,029	0,435
	0,027					
III / 1	0,023	0,023	7,96		0,025	0,375
	0,023					
III / 2	0,022	0,022	7,80	7,88	0,024	0,360
	0,022					
IV / 1	0,013	0,013	7,14		0,014	0,210
	0,013					
IV / 2	0,013	0,014	7,12	7,13	0,015	0,225
	0,014					

## 2.7. Zkoušky totožnosti – identifikace tujonu a artemisininu tenkovrstvou chromatografií

Rod *Artemisia* L. je známý obsahem tujonu. Pro doplnění byla provedena tenkovrstvá chromatografie za použití standardu tujonu.

### 2.7.1. Postup tenkovrstvé chromatografie

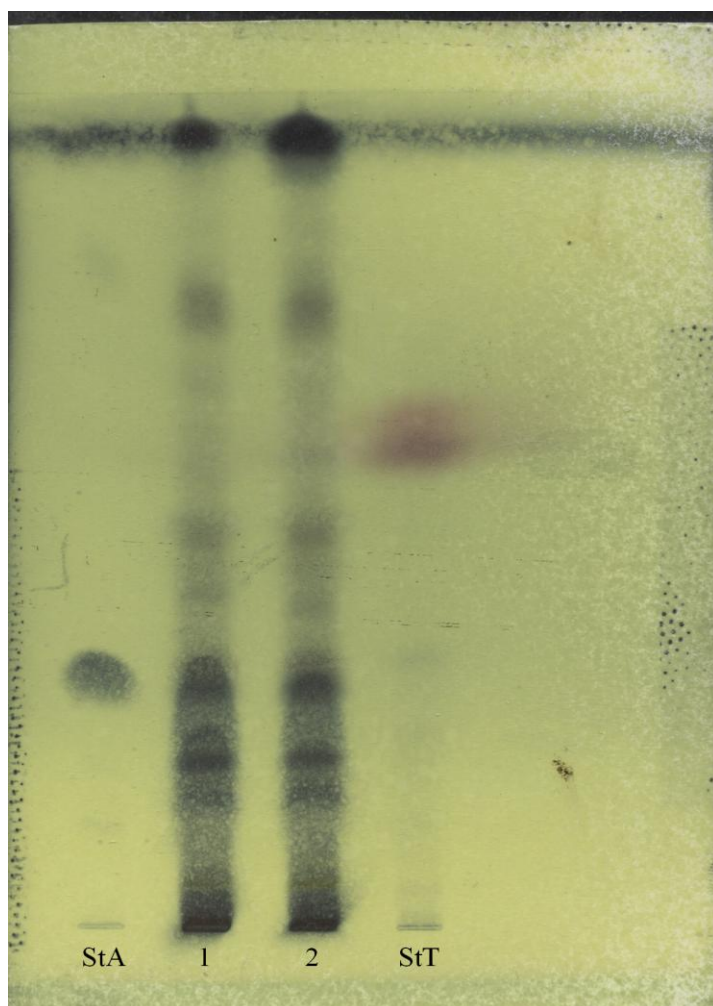
Suchý extrakt byl rozpuštěn v 1ml methanolu. Na chromatogram byly nanášeny standard artemisininu 0,3 mg/ml, standard tujonu 5 mg/ml a vzorky II a III. Nanášení bylo provedeno pomocí přístroje Linomat 5, nanášené množství bylo 20µl. Jako mobilní fáze byla použita směs toluenu a ethylacetátu v poměru 93 : 7. K detekci bylo použito 10 ml 20% ethanolického roztoku fosfomolybdenové kyseliny. Po postřiku byl chromatogram zahřátý na 5 minut na 100°C [44].

### 2.7.2. Výsledky tenkovrstvé chromatografie

Artemisinin reagoval vznikem tmavě modré skvrny.  $R_F$  standardu artemisininu bylo 0,31, přičemž ve vzorku se vyskytovala skvrna s  $R_F$  0,28. Podle polohy a barvy skvrn na chromatogramu lze předpokládat, že artemisinin je přítomen.

Tujon reagoval vznikem fialovo-hnědé skvrny.  $R_F$  standardu tujonu bylo 0,55. V případě tujonu jsou výsledky nejednoznačné, ale lze předpokládat, že stopy tujonu jsou přítomny. Záznam chromatogramu 2 je uveden na následující straně.

Chromatogram 2: frakce 1, 2 a standardu artemisininu a tujonu



Popis: StA – standard artemisininu

1 – vzorek II

2 – vzorek III

StT – standard tujonu

Mobilní fáze S 2: Tol – EtOAc (93 : 7)

Stacionární fáze: Silikagel MERCK 60 F<sub>254</sub>

Detekce: 20% ethanolický roztok fosfomolybdenové kyseliny

## **IV. DISKUSE**

Malárie je velkým zdravotním problémem mnoha tropických oblastí. Podle odhadů WHO je každý rok nakaženo touto parazitární nemocí více než 500 milionů lidí a 2 miliony lidí ročně umírá [5]. Toto onemocnění je endemické převážně v oblastech, kde teplota a potřebná vlhkost dovolují vektoru choroby, komáru rodu *Anopheles*, normální existenci a množení [24]. První antimalarické léčivo chinin bylo izolováno v roce 1820 z kůry chinovníku [2]. Tato látka je nyní po výskytu forem plazmodií rezistentních na chlorochin společně s artemisininem lékem první volby.

Artemisinin, známý též jako qinghaosu, je velmi rychle účinná schizontocidní látka proti *Plasmodium falciparum* a *P. vivax*, včetně chlorochinrezistentních a centrálních forem malárie. Likviduje parazitární podstatně rychleji než jakékoli jiné antimalarikum [24]. WHO doporučuje v případě výskytu multirezistentních kmenů plazmodií používat kombinovanou terapii, která je tvořena deriváty chininu a deriváty artemisininu (artemether, artesunát, arteether) [2]. Zdrojem artemisininu je pelyněk roční (*Artemisia annua* L., čeleď *Asteraceae*). Jelikož je syntéza artemisininu velmi složitá a neekonomická, zůstávají planě rostoucí rostliny pelyňku ročního a jeho pěstování na plantážích jediným zdrojem produkce artemisininu [21].

Tato práce byla zaměřena na stanovení obsahu artemisininu v pelyňku ročním české produkce v průběhu vegetačního cyklu. Nať byla sbírána v roce 2006 ve čtyřech různých vegetačních obdobích – období intenzivního vegetačního růstu, nasazení pupat, období po odkvětu rostliny a období zralosti plodů. Pro přípravu extraktů byla použita nať usušená na zastíněné ploše volně na vzduchu. Extrahováno bylo macerací po dobu 17 hodin (viz kap. 2.2.). Po filtraci byly extrakty odpařeny do sucha. U extraktů byla provedena identifikace artemisininu tenkovrstvou chromatografií za použití standardu artemisininu. Suché extrakty byly rozpuštěny v methanolu a separovány na silikagelu. Mobilní fázi tvořil chloroform – methanol (99 : 1). Po postřiku detekčním činidlem ( $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{anisaldehyd}$  50 : 1 : 0,5) byly u jednotlivých vzorků viditelné skvrny, které odpovídaly polohou i barvou skvrně standardu artemisininu (viz chrom. 1). Původní metoda používá eluční směs kyseliny trifluoroctové a acetonitrilu. Z důvodu bezpečnosti byla metoda modifikována použitím směsi chloroformu a methanolu s dobrou separační účinností.

Následně bylo provedeno stanovení obsahu artemisininu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (HPLC-RP) s využitím isokratické eluce a spektrofotometrické detekce při vlnové délce 295 nm. V aplikačním listu Merck je uvedena vlnová délka 260 nm. Po provedení několika předběžných měření se ukázalo

výhodnější použít vlnovou délku 295 nm, kdy reakční produkt vykazoval největší absorpenci. Původní metoda byla dále modifikována v zařazení předkolony Tessek do chromatografického procesu. Pro sestavení kalibrační křivky byly připraveny standard artemisininu ve třech ředěních. Každý vzorek byl změřen ze dvou navážek a extrakcí; při neshodě byla provedena nová navážka, extrakce a měření. Pro upřesnění výsledků byla stanovena ztráta sušením. Nejvyšší obsah artemisininu byl zjištěn ve vzorku II. Výsledná hodnota hmotnostních procent pro tento vzorek byla 0,030%; vzorek byl získán sběrem v období nasazení poupát (počátek butonizace). Druhý nejvyšší obsah měl vzorek III (0,023%); vzorek byl získán sběrem rostliny v období po jejím odkvětu. Nejnižší obsah artemisininu měl vzorek I a IV (0,014% a 0,015%). Tyto vzorky byly získány sběrem v období intenzivního vegetačního růstu a v období zralosti plodů.

Koncentrace artemisininu se mění v průběhu rozvoje rostliny během vegetativní fáze a při přechodu do fáze kvetení. Relativní změny v koncentraci artemisininu mezi jednotlivými částmi se zdají být docela podobné mezi ekotypy. Různé studie ukazují širokou proměnlivost v obsahu artemisininu, který se pohybuje v rozsahu od 0,01% do asi 1,0% a přibližující se 1,5% [8]. V USA bylo zjištěno, že před kvetením je obsaženo celkového artemisininu v listech asi 89% a v postranních větvích asi pouze 10%. V horních listech obsah artemisininu činil 0,15%, v postranních výhoncích 0,04%, stopové množství bylo přítomno v hlavní lodyze a žádné množství v kořenech. 0,04% artemisininu bylo obsaženo v semenech [9]. Pozdější skleníkové a polní experimenty, ve kterých byly rostliny sklizeny od vegetativního stádia po kvetení a tvorbu semen ukázaly podobné rozdělení artemisininu ve vegetativním stádiu. Koncentrace artemisininu v květenství byla čtyř až jedenáctinásobná v porovnání s listy. Artemisinin obsažený v semenech byl převážně spojený s květními zbytky a úlomky rostliny [10]. Většina výzkumníků zjistila, že koncentrace artemisininu v listech stoupá v průběhu vývoje rostliny ve vegetativní fázi. V některých experimentech dosáhla koncentrace artemisininu vrcholu před kvetením [11, 12, 39]. Jiní pracovníci, ač souhlasí se stoupající koncentrací během vegetativní fáze zjistili, že artemisinin dosahuje vrcholu později během plného rozkvětu. Tyto rozdíly mohou být přisuzovány klimatickým podmínkám, ekotypu, kultivačním praktikám nebo to může být způsobeno kombinací všech těchto faktorů [10, 13, 14].

V této práci zjištěný obsah artemisininu je relativně nízký v porovnání s výše citovanými pracemi. Důvody pro to mohou být různé, např. klimatické podmínky, charakter osiva, kultivační postupy, způsob analytického stanovení. Pro HPLC



stanovení artemisininu byla publikována řada metod, které se liší způsobem extrakce s využitím nepolárních látek, a to macerace hexanem a extrakce petroletherem v Soxhletově přístroji [21, 42, 45]. Z důvodu dostupnosti byla využita macerace hexanem. Metody se dále liší složením mobilní fáze [42, 45, 47]. Na základě zkušeností byly pro stanovení artemisininu zvoleny metody, které vycházely z publikovaných prací [21, 42, 45, 46, 47] a současně metody modifikované podle nejnovějších poznatků o charakteru látky a také možnosti, které poskytuje přístrojové vybavení katedry farmaceutické botaniky a ekologie.

Jelikož je rod *Artemisia* L. známý obsahem tujonu, byla pro doplnění provedena tenkovrstvá chromatografie pro zjištění jeho přítomnosti v droze. Na chromatogram byly nanášeny extrakty vzorků II a III a standardy tujonu a artemisininu. Mobilní fází tvořil toluen – ethylacetát (93 : 7). Po postřiku detekčním činidlem (20% ethanolický roztok kys. fosfomolybdenové) byly viditelné skvrny odpovídající barvou i polohou standardu artemisininu. V případě tujonu byly výsledky nejednoznačné, ale lze předpokládat, že stopy tujonu jsou přítomny (viz chrom. 2).

## **V. SOUHRN**

Tato diplomová práce byla zaměřena na stanovení obsahu artemisininu v pelyňku ročním v průběhu vegetačního cyklu. Rostlina byla pěstována na území České republiky v roce 2006 a sbírána ve čtyřech různých vegetačních obdobích (období intenzivního vegetačního růstu, nasazení pupat, období po odkvětu a období zralosti plodů).

1,5 g usušené a pomleté nati bylo zalito 200 ml hexanu, dáno na 2 hodiny do lázně 50°C a necháno stát přes noc 15 hodin. Získaný extrakt zelené barvy byl přefiltrován a promyt 2 x 30 ml hexanu. Po odpaření do sucha byl obsah rozpuštěn v 10 ml methanolu, přefiltrován a promyt ještě 2 x 2 ml methanolu a odpařen do sucha. Z každého vzorku drogy byly připraveny dva extrakty.

U extraktů byla provedena identifikace artemisininu tenkovrstvou chromatografií za použití standardu artemisininu. Mobilní fázi tvořil chloroform – methanol (99 : 1). Po postřiku detekčním činidlem ( $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{anisaldehyd}$  50 : 1 : 0,5) byly u jednotlivých vzorků viditelné skvrny, které odpovídaly polohou i barvou skvrně standardu.

Dále bylo provedeno stanovení obsahu artemisininu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s využitím isokratické eluce a spektrofotometrické detekce při vlnové délce 295 nm. Byly připraveny standard artemisininu ve třech ředěních pro sestavení kalibrační křivky a vzorky z jednotlivých extraktů. Pro upřesnění výsledků byla stanovena ztráta sušením. Nejvyšší obsah artemisininu byl zjištěn ve vzorku II. Výsledná hodnota hmotnostních procent pro vzorek II byla 0,030%. Tento vzorek byl získán sběrem v období nasazení pupat. Druhý nejvyšší obsah měl vzorek III (0,023%); vzorek byl získán sběrem v období po odkvětu rostliny. Nejnižší obsah artemisininu měl vzorek I a IV (0,014% a 0,015%). Tyto vzorky byly získány sběrem v období intenzivního vegetačního růstu a v období zralosti plodů.

Jelikož je rod *Artemisia* L. (pelyněk) známý obsahem tujonu, byla pro doplnění provedena tenkovrstvá chromatografie pro zjištění jeho přítomnosti v droze. Na chromatogram byly nanášeny extrakty vzorků II a III a standardy tujonu a artemisininu. Mobilní fázi tvořil toluen – ethylacetát (93 : 7). Po postřiku detekčním činidlem (20% ethanolický roztok kys. fosfomolybdenové) byly viditelné skvrny odpovídající barvou i polohou standardu artemisininu. V případě tujonu byly výsledky nejednoznačné, ale lze předpokládat, že stopy tujonu jsou přítomny.

## **VI. LITERARURA**

1. Leifertová, I., Baloun, J.: Farmaceutická botanika, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1990, s. 7
2. Namdeo, A. G., Mahadik, K. R., Kadam, S. S.: Antimalarial drug – *Artemisia annua*. Phcog. Mag., 2006, 2 (6), s. 106 – 111
3. Slavík, B., Štěpánková, J.: Květena ČR 7, Nakladatelství Akademie věd České republiky, 2004, s. 163 - 177
4. World Health Organization , Regional Office for the Western Pacific, MANILA, 1998 s. 35
5. Ying, L., Yu – Lin, W.: An over four millennium story behind qinghaosu (artemisinin) – a fantastic antimalarial drug from a traditional chinese herb. Curr. Med. Chem., 2003, 10 (21), s. 2197 – 2230
6. Steglich, W., Fugmann, B., Lang – Fugmann, S.: ROMPP Encyclopedia Natural Products. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2000, s. 537
7. Ferreira, J. F. S., Janick, J.: Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*, in Janick, J. (ed.), Progress in new crops. ASHS Press, Arlington, VA, 1996, s. 579 – 584
8. Laughlin, J. C., Heazlewood, G. N., Beattie, B. M.: Cultivation of *Artemisia annua* L. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles, 2002, 18 (Artemisia), s. 159 – 195
9. Charles, D. J., Simon, J. E., Wood, K. V., Heinstejn, P.: Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extract. J. Nat. Prod., 1990, 53, s. 157 – 160
10. Ferreira, J. F., Simon, J. E., Janick, J.: Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. Planta Med., 1995, 61, s. 167 – 170
11. Liersch, R., Soicke, C., Stehr, C., Tüllner, H. V.: Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. Planta Med., 1986, 52, s. 387 – 390
12. Woerdenbag, H. J., Pras, N., Chan, N. G., Bang, B. T., Bos, R., van Uden, W. et al.: Artemisinin related sesquiterpenes and essential oils in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. Planta Med., 1994, 60, s. 272 – 275
13. Singh, A., Vishwakarma, R. A., Husain, A.: Evaluation of *Artemisia annua* strains for higher artemisinin production. Planta Med., 1988, 54, s. 475 – 476
14. Morales, M. R., Charles, D. J., Simon, J. E.: Seasonal accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. Acta Hort., 1993, 344, s. 416 - 420

15. Wang, Y., Xia, Z., Zhou, F., Wu, Y., Huang, J.: Studies on biosynthesis of artemisinin: the key intermediate – artemisinic acid in biosynthesis of artemisinin and arteannuin B. *Acta Chim. Sin.*, 1988, 46, s. 1152; Chem. Abstr. 110, 111841j, (1988)
16. Dhingra, V., Rao, K. V., Narasu, M. L.: Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci.*, 1999, 66 (4), s. 279 – 300
17. Sangwan, R. S., Agarwal, K., Luthra, R., Thakur, R. S., Singh – Sangwan, N.: Biotransformation of arteannuic acid into arteannuin- $\beta$  and artemisinin in *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 1993, 34, s. 1301 – 1302
18. Brown, G. D.: Cadinanes from *Artemisia annua* that may be intermediates in the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry*, 1994, 36, s. 637
19. Woerdenbag, H. J., Pras, N., van Uden, W., de Boer, A., Batterman, S., Visser, J. F.: High peroxidase activity in cell cultures of *Artemisia annua* with minute artemisinin contents. *Nat. Prod. Lett.*, 1992, 1, s. 121 – 128
20. Bouwmeester, H. J., Berteaux, C., de Kraker, J. W., Verstappen, F., Franssen, M.: Research to improve artemisinin production for use in the preparation of anti-malarial drugs, in Bogers, R. J., Craker, L. E., Langer, D. (eds.), *Medicinal and Aromatic Plants*, s. 275 – 290, 2006 Springer
21. Bhandari, P., Gupta, A. P., Singh, B., Kaul, V. K.: Simultaneous densitometric determination of artemisinin, artemisinic acid and arteannuin-B in *Artemisia annua* using reversed-phase thin layer chromatography. *J. Sep. Sci.*, 2005, 28 (17), s. 2288 – 2292
22. Goel, D., Singh, V., Ali, M., Mallavarupu, G. R., Kumar, S.: Essential oils of petal, leaf and stem of the antimalarial plant *Artemisia annua*. *J. Nat. Med.*, 2007, 61, s. 187 – 191
23. Goel, D., Goel, R., Singh, V., Ali, M., Mallavarupu, G. R., Kumar, S.: Composition of the essential oil from the root of *Artemisia annua*. *J. Nat. Med.*, 2007, 61, 458 – 461
24. Lincová, D., Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, 2002, s. 492
25. Frederich, M., Dogne, J. – M., Angenot, L., de Mol, P.: New trends in anti-malarial agents. *Curr. Med. Chem.*, 2002, 9, s. 1435
26. Maeno, Y., Toyoshima, T., Fujioka, H., Ito, Y., Meshnick, S. R., Benakis, A., Milhous, W. K., Aikawa, M.: Morphologic effects of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1993, 49, s. 485 – 491

27. Zhang, F., Gosser, D. K., Meshnick, S. R. Jr.: Hemin – catalyzed decomposition of artemisinin (qinghaosu). *Biochem. Pharmacol.*, 1992, 43, s. 1805 – 1809
28. Jung, M., Li, X., Bustos, D. A., Elsohly, H. N., McChesney, J. D., Milhous, W. K.: Synthesis and antimalarial activity (+)-deoxoartemisinin. *J. Med. Chem.*, 1990, 33, s. 1516 – 1518
29. Brossi, A., Venugopalan, B., Domingues, G. L., Yeh, H. J. C., Flippen – Anderson, J. L., Buchs, P., Luo, X. D., Milhous, W., Peters, W.: Arteether, a new antimalarial drug: synthesis and antimalarial properties. *J. Med. Chem.*, 1988, 31, s. 645 – 650
30. Klayman, D. L.: Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Qinghaosu Sci.*, 1985, 228, 1049 – 1055
31. Krungkrai, S. R., Yuthavong, Y.: The antomalarial action qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress on *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 81, s. 710 – 714
32. Elford, B. C., Roberts, M. F., Phillipson, J. D., Wilson, R. J.: Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 81, s. 434 – 436
33. Meshnick, S. R., Tsang, T. W., Lin, F. B., Pan, H. Z., Chang, C. n., Kuypers, F. Chin, D., Lubin, B.: Activated oxygen mediates the antimalarial activity of qinghaosu. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1989, 313, s. 95 – 104
34. Yang, Y. L., Asawamahesakda, W., Meshnick, S. R.: Alkylation of human albumin by the antimalarial artemisinin. *Biochem. Pharmacol.*, 1993, 46, 336 – 339
35. Wang, C. W.: The forests of China, with a survey of grassland and vegetations. In Harvard Univ. Maria Moors Cabot Foundation No. 5, Harvard. Univ., Cambridge, MA, 1961
36. Magalhaes, P. M., Delabays, N.: The selection of *Artemisia annua* L. for cultivation in intertropical regions, in Pank F. (ed.), *Proceedings of an International Symposium on Breeding Research on Medecinal and Aromatic Plants*. Quedlinburg, Germany, 1996, s. 185 – 188
37. Ferreira, J. F., Simon, J. E., Janick, J.: *Artemisia annua*: Botany, Horticulture, Pharmacology. *Hort. Rev.*, 1997, 19, s. 319 – 371
38. Simon, J. E., Charles, D., Cebert, E., Grant L., Janick J., Whipkey, A.: *Artemisia annua* L.: a promising aromatic and medicinal, in Janick, J., Simon, J. E. (eds.), *Adv. New Crops*, 1990, s. 522 – 526

39. Laughlin, J. C.: Effect of agronomic practises on plant yield and antimalarial constituents of *Artemisia annua* L. Acta Hort, 1993, 331, s. 53 - 61
40. Charles, D. J., Simon, J. E., Shock, C. C., Feibert, E. B., Smith, R. M.: Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua* L., in Janick, J., Simon, J. E. (eds.), New crops, 1993, s. 640 – 642
41. Charles, D. J., Cebert, E., Simon, J. E.: Characterization of the essential oil of *Artemisia annua* L. J. Ess. Oil Res., 1991, 3, s. 33 – 39
42. Zhao, S., Zeng, M.: Determination of Qing Hau Su in *Artemisia annua* L. by high performance liquid chromatography. Yaowu-Fenxi-Zazhi, 1986, 6 (1), s. 3 – 5 (abstrakt převzat z RCS Publishing dne 7.4.2008)
43. Český lékopis 2005, 2. díl, Grada 2005, s. 881
44. Wagner, H., Bladt, S.: Plant and drug analysis. A Thin Layer Chromatography, Springer, 1996, s. 90
45. Erdemoglu, N., Orhan, I., Kartal, M., Bani, B.: Determination of artemisinin in selected *Artemisia* L. species of Turkey by reversed phase HPLC. Rec. Nat. Prod., 2007, 1, s. 36 – 43
46. Aplikační list Merck
47. Quian, G., Yang, Y., Ren, Q.: Determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. by reversed phase HPLC. J. Liq. Chrom., 2005, 28, s. 705 – 712



## ABSTRAKT

Úkolem této diplomové práce bylo stanovení obsahu artemisininu v pelyňku ročním (*Artemisia annua* L.) v průběhu vegetačního cyklu. Rostlina byla pěstována na území České republiky v roce 2006 a sbírána ve čtyřech různých vegetačních obdobích (období intenzivního vegetačního růstu, nasazení pupat, období po odkvětu a období zralosti plodů). Pro stanovení byla použita nat' usušená na zastíněné ploše volně na vzduchu. Z jednotlivých vzorků drogy byly připraveny extrakty. Extrahováno bylo hexanem po dobu 17 hodin a zfiltrováno. Přítomnost artemisininu v droze byla potvrzena tenkovrstvou chromatografií za použití standardu artemisininu. Obsah artemisininu byl stanoven vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s využitím isokratické eluce a spektrofotometrické detekce při vlnové délce 295 nm. Největší obsah artemisininu byl zjištěn ve vzorku, který byl získán sběrem v období nasazení pupat (0,030%).

This studies describes the determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. cultivated in Czech Republic in 2006. Plant was harvested in four vegetative stages (intensive vegetative growth stage, bud formation, cease bloom stage and maturity seed stage). Plant was shade dried on the air and extracted with an organic solvent hexane for 17 hours and then filtrated. Artemisinin was confirmed by thin layer chromatography with artemisinin standard use. The concentration of artemisinin was determined by reversed phase high performance liquid chromatography with constant constitution of mobil phase and UV detection with wave length 295 nm. Maximum artemisinin concentration occurred at the bud formation stage (0,030%).