

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

---

Studium antrachinonových sekundárních metabolitů  
hub rodu *Geosmithia*

Rigorózní práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Zdena Křesinová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala RNDr. Janě Olšovské, Ph.D., kolektivu Laboratoře genetiky, fyziologie a bioinženýrství hub a mé rodině, kteří mě ve všem podporovali.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. listopadu 2009

Mgr. Zdena Křesinová

**Klíčová slova:** *Geosmithia lavendula*, optimalizace metod SPE, HPLC, UPLC

**Předmětová hesla:** separace a identifikace metabolitů, kvntitativní a kvalitativní zastoupení tetrahydroxy- a pentahydroxyderivátů antrachinonů v extraktech fermentačních kapalin,

## SEZNAM ZKRATEK

AcOH	kyselina octová	SPE	extrakce na pevné fázi
AQ	antrachinony	$t$	čas
$c$	koncentrace	$t_r$	retenční čas
CZD	Czapek-Dox medium	TFA	kyselina trifluoroctová
CZE	kapilární zónová elektroforéza	TLC	tenkovrstevná chromatografie
EtOAc	ethylester kyseliny octové	TMS	trimethylsilyl-
FID	plamenově-ionizační detektor	UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie	UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast
glc	glukóza	v/v	poměr objemů
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie		
inj.	dávkovaný objem		
IR	infračervená spektrometrie		
L/L	extrakce kapalinou		
LOD	limit detekce		
LOQ	limit kvantifikace		
MEA	malt-extrakt medium		
MeOH	methanol		
MF	mobilní fáze		
MS	hmotnostní spektrometrie		
$n$	počet opakování		
NMR	nukleární magnetická rezonance		
PDA	detektor diodového pole		
RSD	relativní směrodatná odchylka		
SD	směrodatná odchylka		

# OBSAH

Seznam zkratek	5
Obsah	6
Předmluva	7
1 Úvod	8
1.1. Obecná charakterizace antrachinonů	8
1.2. Produkce a distribuce antrachinonů v přírodě	9
1.3. Houba <i>Geosmithia levendula</i>	10
1.4. Metody používané k analýze hydroxantrachinonů	10
2 Výsledky a diskuze	13
2.1. Izolace antrachinonových metabolitů a jejich identifikace	13
2.2. Vývoj chromatografických metod pro 3 hlavní metabolity	14
2.3. Reprodukovatelnost retence	15
2.4. Stanovení kalibračních závislostí	16
2.5. Správnost a přesnost	16
2.6. Stanovení výtěžnosti metody SPE	17
2.7. Stanovení obsahu metabolitů v myceliu	17
2.8. Produkce antrachinonů v čase kultivace	18
2.9. Srovnání produkce metabolitů 1T, 1P a 2T kmene MK 1108 s devíti vybranými kmeny <i>Geosmithia</i>	19
3 Závěr	21
4 Literatura	22
5 Příloha	28

## PŘEDMLUVA

Studium sekundárních metabolitů houby *Geosmithia lavendula* je součástí rozsáhleji koncipovaného projektu, který se zabývá taxonomickou studií hub žijících v asociaci s kůrovci. V průběhu tohoto projektu byla izolována celá řada kmenů hub, z nichž pro první analytické studie byla vybrána vřeckovýtrusá hyfomyceta rodu *Geosmithia*<sup>1</sup>.

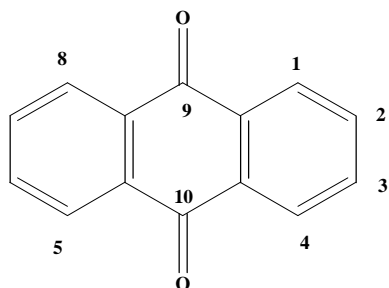
Houby řádu *Hypocreales* (stejně jako *Geosmithia*) jsou známy produkcí řady biologicky aktivních látek<sup>2</sup>. Studium spektra sekundárních metabolitů těchto hub a jejich biologických aktivit může tedy vést k nalezení důležitých a přínosných látek a v neposlední řadě pomůže také k odhalení ekologické role těchto hub v požercích kůrovců.

První výsledky analýz metabolitů druhu houby *Geosmithia lavendula* ukázaly, že výrazný fialový pigment media je tvořen řadou polyhydroxylovaných antrachinonů, jejichž produkce je u dobře kultivovatelných druhů hub (jako jsou *Geosmithia* spp.) velmi vzácná. Sekundární antrachinonové metabolity houby *Geosmithia lavendula*, případně ostatních druhů rodu *Geosmithia*, mají široké potenciální využití.

Tato práce byla v první části zaměřena na izolaci metabolitů houby *Geosmithia lavendula* kmene MK 1108. Metabolity bylo nutno získat v dostatečném množství a čistotě umožňující jejich plnou charakterizaci a testování jejich biologických aktivit. Druhá část práce byla zaměřena na vypracování analytických metod a postupů, umožňujících efektivní izolaci, kvantifikaci a kvalifikaci metabolitů v biologických matricích.

# 1 ÚVOD

## 1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ANTRACHINONŮ



Společným strukturálním rysem antrachinonů je antracenový tricyklický skelet substituovaný dvěma keto-skupinami v poloze 9 a 10. V přírodě se často vyskytují antrachinonové sloučeniny obsahující hydroxylové skupiny, které mohou být v některých případech na skeletu společně s dalšími funkčními skupinami.

Obrázek 1 – Struktura antrachinonu

Barevné antrachinonové pigmenty, jako jsou např. alizarin, purpurin a xantopurpurin, sehrály v minulosti důležitou roli především v barvířství, kde byly známy a používány již od dob starého Řecka.

Díky svým širokým biologickým účinkům (v literatuře jsou popsány např. účinky antimikrobiální<sup>3</sup>, fungicidní<sup>1,4</sup>, antimalarické<sup>5</sup>, repelentní<sup>6</sup>, antioxidantní<sup>7</sup>, hypotenzní<sup>8</sup>, analgetické<sup>6</sup>, protileukemické<sup>9</sup>, mutagenní<sup>7</sup>) jsou některé antrachinony využívány ve farmacii. Antracyklická glykosidická antibiotika daunorubicin, doxorubicin a epirubicin jsou pro své cytotoxické účinky používány v protinádorové léčbě<sup>10</sup>. Hypericin (naftodiantron) a pseudohypericin se používají k léčbě depresí<sup>11</sup>, emodin působí jako antidotum při otravě benzimidazolovými fungicidy<sup>12</sup>. Pro své laxativní účinky mají antrachinony místo v lidovém léčitelství (odvar z listů seny, reveň atd.).

Dihydroxyantrachinony slouží jako silné odpuzovače proti mnohým škůdcům, např. termitům<sup>13</sup>, ptákům (antrachinonový repelent<sup>14</sup> Flight Control™), nebo textilním škůdcům (extrakt *Rubia tinctorum*<sup>15</sup> se využívá k průmyslové ochraně koberců a jiných textilií). Další typy dihydroxyantrachinonů jsou v současné době považovány za perspektivní odpuzovače a jsou předmětem dalších studií<sup>16</sup>.



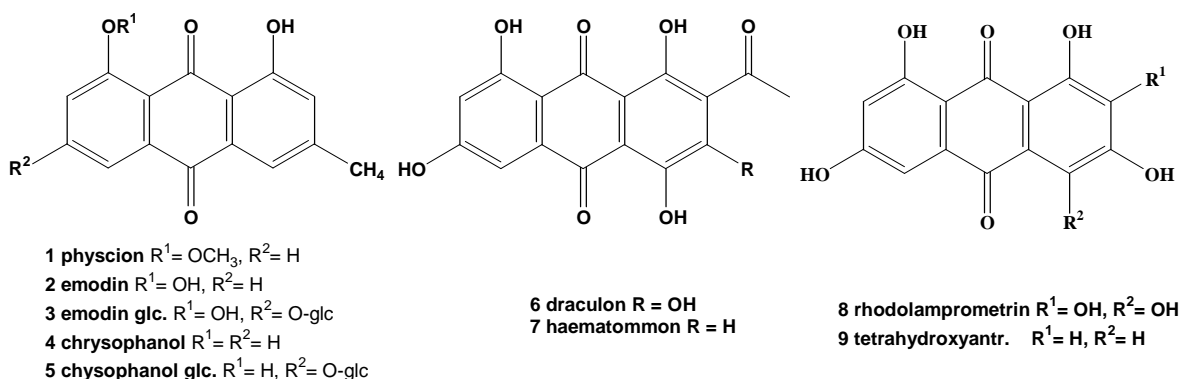
## 1.2 PRODUKCE A DISTRIBUCE ANTRACHINONŮ V PŘÍRODĚ

Volné a glykosilované antrachinony (nejčastěji spojené etherovou vazbou s glukózou) jsou v přírodě produkovány některými rostlinami, houbami a lišejníky. U rostlin jsou antrachinony (obrázek 2) hojně zastoupeny v čeledích rdesnovitých<sup>17</sup> (*Polygonaceae*), kořenovitých (*Rubiceae*)<sup>18</sup>, řešetlákovitých (*Rhamaceae*)<sup>19</sup> a liliovitých (*Liliaceae*)<sup>20</sup>. Tradiční čínská medicína využívá rostliny reveň (*Rheum* spp.), která obsahuje velké množství antrachinonových derivátů (obrázek 2).

Z tropického lišejníku *Melanotheca cruenta* byl izolován pentahydroxyantrachinon – draculon<sup>21</sup> a již dříve popsán antrachinon haematomon<sup>22</sup> (viz. obrázek 2). Lišejník *Curvularia lunata*<sup>23</sup> produkuje 3 typy antrachinonů (helminthosporin, emodin a cynodontin). Extrakt z tohoto lišejníku obsahuje 70 % cynodontinu, který slouží jako prekurzor syntézy barviv (CI disperze Blue 7 a CI acid green 28).

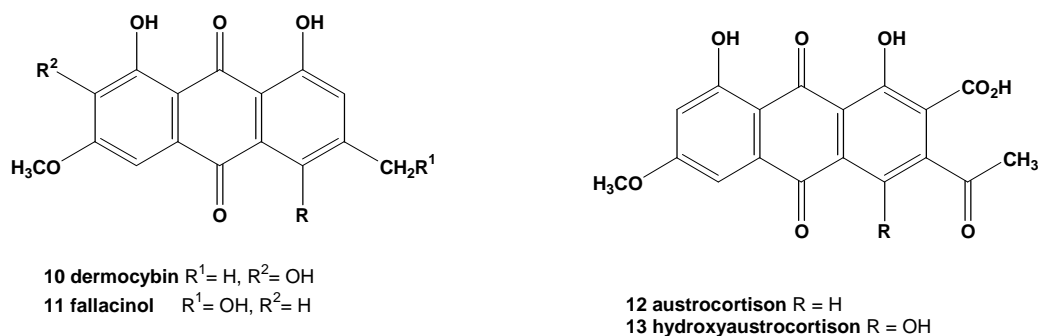
U živočichů je antrachinonová produkce popsána pouze u malého množství případů, které jsou prezentovány velmi odlišnými druhy jako jsou některé mořské lilije<sup>24</sup>, několik druhů hmyzu<sup>25</sup> a ostnokožci<sup>26</sup>. Ti vytvářejí složitější molekuly pigmentů, z nichž některé (obrázek 2) se vyskytují také u hub.

Bakteriální produkce antrachinonů je popsána pouze u několika málo druhů, jako je například *Streptomyces corchorusii*<sup>27</sup> a *Xenorhabdus luniniscens*<sup>28</sup>.



**Obrázek 2** – Antrachinonové pigmenty reveně (1-5), lišejníků (6,7) a živočichů (8,9)

Hydroxylované antrachinonové pigmenty se hojně vyskytují jako sekundární metabolity u některých zástupců říše hub. Houby *Dermocybe* spp.<sup>29</sup>, *Aspergillus* spp.<sup>30</sup>, *Microphaeropsis* spp.<sup>31</sup>, *Trichoderma viride*<sup>32</sup>, *Cochliobolus heterostrophus*<sup>33</sup> a *Cortinarius* spp.<sup>31</sup> produkují několik strukturně velmi podobných antrachinonových derivátů, z nichž některé jsou uvedeny na obrázku 3.



**Obrázek 3** – Zastupci antrachinonových sekundárních metabolitů hub

### 1.3 HOUBA *GEOSMITHIA LAVENDULA*

Typickým hostitelem hub rodu *Geosmithia* (*Ascomycota: Hypocreales*) je kůrovec *Hypoborus ficus*<sup>34</sup>, napadající smokvoň (*Ficus carica*). *Geosmithia lavendula* je jedním ze tří druhů rodu *Geosmithia* (zatím bylo izolováno okolo 30 druhů<sup>35</sup>) produkujících červeno-fialového pigmenty do média a konidií. Poprvé byla popsána v roce 1948 jako houba pocházející z laboratorní kontaminace v USA<sup>36</sup>. Poslední výzkumy prokázaly, že se jedná o velmi rozšířený druh houby, asociující s kůrovci v oblasti Středozevního moře.

### 1.4 METODY POUŽÍVANÉ K ANALÝZE HYDROXYANTRACHINONŮ

Pro orientační detekci přítomnosti antrachinonů (např. po separaci chromatografií na tenké vrstvě) lze využít selektivních reakcí antrachinonů s činidly (např. amoniakem nebo 10% KOH), založených na změně barvy v závislosti na pH. Pro svou jednoduchost a instrumentální nenáročnost je běžně využívanou metodou identity a čistoty vzorků metoda TLC. V identifikaci antrachinonových sekundárních metabolitů hub se využívá hlavně její

dvoudimenzionální uspořádání<sup>37</sup>. V literatuře<sup>38</sup> je např. popsáno kvantitativní stanovení čtyř hlavních antrachinonových derivátů z extraktu *Rheum emodi* metodou vysokoúčinné tenkovrstevné chromatografie.

Spektrálními metodami sloužícími pro přesnou kvalifikaci antrachinonů je např. infračervená spektrometrie, molekulová absorpční spektrometrie a UV/VIS spektrometrie. Spolehlivými metodami určení struktury, a to i bez předpokladu existence knihoven spekter, jsou metody <sup>13</sup>C a <sup>1</sup>H nukleární magnetické rezonance a metody hmotnostní spektrometrie.

Výhod elektromigračních metod (nízká spotřeba vzorků, vysoká rychlost analýzy, malé množství rozpouštědel) se využívá při analýzách antrachinonových základů barev historických materiálů<sup>39</sup>, v analýzách přírodních barev využívaných v průmyslu<sup>40</sup> a pro stanovení obsahů rostlinných extraktů<sup>41</sup>.

Vzhledem k polárním vlastnostem hydroxylovaných derivátů antrachinonů se plynové chromatografie hydroxylovaných antrachinonů využívá spíše okrajově a většinou až po nutné derivatizaci polárních skupin (nejčastěji trimethylsilylací)<sup>42</sup>. Plynová chromatografie je nejčastěji spojena s hmotnostním detektorem<sup>40,15</sup>.

Mnohem častěji se pro kvantifikaci a kvalifikaci využívá metod HPLC na reverzních fázích. Tabulka 1 uvádí vybrané separace polyhydroxylovaných antrachinonů. Vzhledem k faktu, že mikroorganismy (v některých případech i vyšší rostliny) často produkují více typů hydroxyantrachinonů s podobnou strukturou a často i retenčním chováním, je kladen důraz na vyvíjení metod dostatečně selektivních pro všechny složky extraktu. Pro tyto separace jsou velmi vhodné kolony, které mají dostatečně deaktivovaný silikagelový nosič<sup>43</sup>. Hydroxyantrachinony jsou díky hydroxyskupinám látky slabě kyselé povahy, a proto se s výhodou při jejich separaci používají převážně mobilní fáze o nižším pH<sup>44,47,49</sup>. Charakteristická UV spektra jednotlivých hydroxylovaných antrachinonů mohou být při chromatografickém uspořádání s PDA detektorem použita jako další identifikační nástroj analytů.

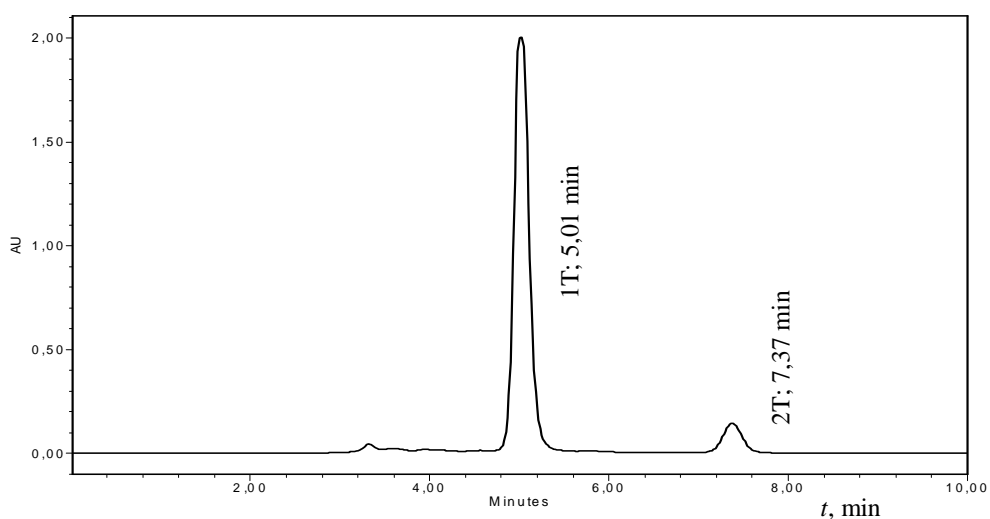
**Tabulka 1** – Vybrané analytické metody pro stanovení hydroxyantrachinonů a jejich derivátů

Metoda	Vzorek	Počet separovaných analytů	Kolona	Mobilní fáze	Detekce	Lit.
CZE	Extrakt <i>Rheum</i> spp. a <i>Polygonum</i> spp.	5 AQ derivátů	-	35 mM fosfátový pufr (pH 11) s 20 μM beta-cykloextrinu	UV/VIS 254 nm	40
GC	Směs standardů	TMS - hydroxyantrachinony	OV-1	He	MS	15
GC	Extrakt kořene <i>Polygonum multiflorum</i>	5 AQ TMS - hydroxyderivátů	EC 5 (kapilární kolona)	He	FID/MS	41
HPLC	Extrakt <i>Hedyotis diffusa</i>	mono- a di-hydroxy AQ	Pinnacle II C18	0,5% AcOH; MeOH	UV/VIS 280 nm	45
HPLC	Antrachinony mořských živočichů	4 tetrahydroxy AQ, rhodolamprometrin	Shim-Oack ODS	MeOH, H <sub>2</sub> O	UV/VIS 295 nm	42
HPLC	Extrakt <i>Rhubarb</i>	tri- a tetrahydroxy AQ	Inertsil ODS	Fosfátový pufr, ACN	UV/VIS 280 nm	46
HPLC	Extrakt <i>Rhubarb</i>	5 AQ derivátů	Hypersil C18	0,1% HCOOH, MeOH	Fluorescence	47
HPLC	Extrakt <i>Rubia tinctorum</i>	Hydroxy-antrachinony	Alltima end-capped C <sub>18</sub>	amonium formiát:EDTA; ACN	PDA, MS	48
HPLC	Extrakt <i>Reum emodi</i>	Hydroxy AQ a glykosidy AQ	Purosper-Stra RP <sub>18</sub>	1% AcOH, MeOH:ACN	UV/VIS 250 nm	49
UPLC	Extrakt přípravků z <i>Rhubarb</i>	5 AQ derivátů	Acquity BEH C18	0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , MeOH	UV/VIS 250 nm	50
UPLC	Extrakt <i>Polygonum multiflorum</i>	Emodin, physcion a jejich glykosidy	Acquity BEH C18	0,3% AcOH, ACN	PDA	51

## 2 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 2.1 IZOLACE ANTRACHINONOVÝCH METABOLITŮ A JEJICH IDENTIFIKACE

Pro separaci látek obsažených ve fermentační tekutině (15 denní kultivace na CZD mediu) byla použita L/L extrakce EtOAC s AcOH (20:5 v/v). Hrubé zakocentrované extrakty ze tří extrakcí media byly spojeny a separovány nejprve na koloně naplněné siligalem s MF hexan:EtOAC (6:4 v/v) s gradientem AcOH. Krystalizací frakce obsahující žlutý pigment se podařilo izolovat metabolit 1T. Metabolit 2T obsažený v matečném louhu byl izolován v potřebné čistotě semipreparativní HPLC metodou (obrázek 5).



**Obrázek 5 - HPLC chromatografie matečného louhu po krystalizaci 1T metabolitu (frakce 1 kolonové chromatografie); chromatografické podmínky: xTerra Semiprep; A-25 mmol dm<sup>-3</sup> octan amonný, B-methanol; 90 % B; průtok 1,5**

Vzhledem k velkému objemu rozpouštědel a nízké separační účinnosti kolonové chromatografie byla jako výsledná separační metoda hrubých extraktů fermentačních tekutin zvolena metoda na SPE kolonách (C18 sorbent). Eluent SPE kolon (MeOH s gradientem AcOH) byl rozdělen do osmi frakcí, z nichž 3 frakce obsahovaly antrachinony a byly dále purifikovány chromatografickými metodami.

Pro identifikované metabolity nejsou komerčně dostupné standardy, takže pro optimalizaci metod SPE, HPLC a UPLC a také pro úplnou charakterizaci metabolitů bylo nezbytné vypracovat celou řadu extrakčních a izolačních metod vedoucích k získání čistých látek v dostatečném množství.

Z extraktu media kmenu *Geosmithia lavendula* MK 1108 byly chromatografickými a fyzikálními metodami získány 2 majoritní a 3 minoritní metabolity. V rámci této práce byly plně charakterizovány (NMR, MS, IR, UV) majoritní metabolity 1T, 1P a 2T. Tetrahydroxyderivát rhodolamaprometrin 1T (1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyantrachinon) byl dříve popsán v produkci *Trichoderma viridie*<sup>31</sup> a v produkci některých ostnokožců<sup>24</sup>. Pentahydroxyantrachinon 1P (1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyantrachinon) nebyl dosud v literatuře plně charakterizovaný, pouze částečně popsán u mořských lilijců<sup>22</sup>. Minoritní metabolit 2T (1,3,6,8-tetrahydroxyantrachinon).

Metodou MS byla navržena struktura u dalších dvou minoritních metabolitů 2P (2,4,5,6(7),8-pentahydroxyantrachinon- 1-karboxylová kyselina) a 3T (methylether 2,4,5,7(8)-pentahydroxyantrachinon- 1-karboxylová kyselina).

Izolované purifikované analyty byly použity jako chromatografické standardy.

## **2.2 VÝVOJ CHROMATOGRFICKÝCH METOD PRO 3 HLAVNÍ METABOLITY**

Vzhledem k velmi podobné polaritě obou majoritních metabolitů 1T a 1P, lišících se pouze jednou OH skupinou, bylo náročné oba metabolity od sebe rozdělit s dostatečným rozlišením umožňujícím jejich kvantifikaci. Uspokojivého rozlišení (1,52 viz. tab. 2) se podařilo dosáhnout na koloně ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, která se od reverzní fáze C<sub>18</sub> liší vloženou karbamátovou skupinou a vykazuje vyšší selektivitu pro aromatické látky. Podobného rozlišení dokonce s vyšší účinností vyjádřenou počtem teoretických pater se podařilo dosáhnout při HPLC separaci na koloně xTerra, ale celkový čas analýzy byl v porovnání s UPLC metodou více než dvojnásobný. Ačkoliv pro separaci na koloně ACQUITY UPLC BEH C18 bylo použito mobilní fáze o vyšší iontové síle, nepodařilo se dosáhnout uspokojivého

rozlišení analytů 1T a 1P. Zvýšením retardace analytů na koloně docházelo k výraznému zhoršování rozlišení.

**Tabulka 2** - Přehled HPLC a UPLC metod, vyjádření jejich účinnosti počtem teoretických pater a rozlišení metabolitů 1T a 1P

Kolona	MF	Průtok	Retenční char.	Metabolit		
				1P	1T	2T
xTerra C18 (5 μm částice)	13 mmol dm <sup>-3</sup> TFA v H <sub>2</sub> O; ACN	1 ml min <sup>-1</sup> 50% ACN	t <sub>r</sub> (min)	19,06	20,44	36,29
			N	8 907	8 304	7 627
			Rozlišení	1, 62		-
ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 μm)	10 mmol dm <sup>-3</sup> fosfátový pufr; ACN	0,4 ml min <sup>-1</sup> 10% ACN	t <sub>r</sub> (min)	0,50	0,64	-
			N	3 485	3 821	-
			Rozlišení	1, 25		-
ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (1,7 μm)	13 mmol dm <sup>-3</sup> TFA v H <sub>2</sub> O; ACN	0,4 ml min <sup>-1</sup> 27% ACN	t <sub>r</sub> (min)	6,10	6,53	13,45
			N	7 561	7 797	10 362
			Rozlišení	1,52		-

### 2.3 REPRODUKOVATELNOST RETENCE

Reprodukovatelnost retence pro metabolity 1T, 1P a 2T v optimalizované UPLC metodě byla vypočtena na základě 12 měření směsi standardů rozpuštěných v acetonitrilu (koncentrace standardů byla 10 μg ml<sup>-1</sup>).

Z tabulky 3 je patrné, že retenční časy tří metabolitů v metodě UPLC jsou reprodukovatelné (relativní směrodatné odchylky jsou menší než 1%).

**Tabulka 3** – Reprodukovatelnost retence (n = 12) pro 3 metabolity

Metabolit	Retence (min)				
	Průměr	Minimum	Maximum	SD	RSD (%)
1P	6,10	6,06	6,12	0,02	0,30
1T	6,53	6,47	6,57	0,04	0,59
2T	13,45	13,27	13,50	0,08	0,62

## 2.4 STANOVENÍ KALIBRAČNÍCH ZÁVISLOSTÍ

Pro nízké koncentrace metabolitů byly sestrojeny kalibrační křivky v nižším rozmezí, ze kterých byly vypočítány limity detekce a kvantifikace jako 3,3 a 10násobek poměru standardní chyby a směrnice rovnice regrese kalibrační křivky (viz. tabulka 4). Křivek 3 a 4 bylo použito pro kvantifikaci reálných vzorků, u kterých koncentrace AM nepřekročila  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  media.

Vzhledem k nízkým koncentracím metabolitu 2T a téměř shodnému UV spektru s 1T, nebyla sestrojena kalibrační křivka a pro stanovení jeho koncentrací byla použita kalibrační křivka 4.

**Tabulka 4** – Kalibrační křivky antrachinonových derivátů, lineární rozsah a limity detekce a kvantifikace

Metabolit	Přímky	Rozsah ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Rovnice regrese	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
1P	1	1,95 – 1000	$3,18 \times 10^4 x - 1,87 \times 10^4$	0,9996		
1T	2	1,95 – 1000	$3,54 \times 10^4 x - 5,92 \times 10^4$	0,9997		
1P	3	1,95 – 125	$2,93 \times 10^4 x - 2,67 \times 10^4$	0,9998	2,25	6,81
1T	4	1,95 - 125	$3,45 \times 10^4 - 3,53 \times 10^4$	0,9997	2,35	7,13

## 2.5 SPRÁVNOST A PŘESNOST

Parametry UPLC metody správnost a přesnost byly vypočteny na základě analýz metabolitů 1P a 1T na třech koncentračních úrovních v šesti opakování (tabulka 5).

Správnost měření metabolitu 1P se pohybovala od 91,0 do 113,9% s přesností od 1,9 do 8,4%. Správnost měření metabolitu 1T se pohybovala od 97,6 do 138,6% s přesností od 2,1 do 9,4%. Výsledku ukazují, že zvolená UPLC metoda je dostatečně přesná a správná.



**Tabulka 5** – Správnost a přesnost (vyjádřená procenty relativní směrodatné odchylky) UPLC metody (n = 6) pro tři koncentrační úrovně

<b>Parametry</b>	<b>1P</b>			<b>1T</b>		
Nominální koncentrace ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	2,0	62,5	125,0	2,0	62,5	125,0
Nalezená koncentrace ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	2,2	64,3	117,2	2,4	63,3	121,9
Správnost (%)	113,9	105,0	91,0	138,6	97,6	99,4
SD	0,2	1,2	4,1	0,2	2,3	3,2
%RSD	8,4	1,9	3,5	9,4	2,1	2,6

## 2.6 STANOVENÍ VÝTĚŽNOSTI METODY SPE

Pro stanovení obsahu antrachinonových metabolitů v extraktech fermentačních tekutin UPLC metodou, bylo nutné extrakty dostatečně zkoncentrovat a zároveň odstranit rušivý vliv matrice. Pro tyto aplikace byla optimalizována SPE metoda na C18 fázi. Výsledné parametry metody SPE byly nastaveny tak, aby eluce antrachinonových metabolitů byla co největší, a zároveň aby nedocházelo k vymývání většího množství rušivých balastů. Výtěžnost této metody pro dvě koncentrační úrovně odpovídající rozsahu reálných hodnot antrachinonů v médiu byla kvantifikována metodou UPLC a pro oba majoritní metabolity se výtěžnost pohybuje okolo 67 % (tabulka 6).

**Tabulka 6** – Výtěžnost SPE metody pro metabolity 1P a 1T (n = 3) na dvou koncentračních hladinách

<b>Parametry</b>	<b>1P</b>		<b>1T</b>	
Koncentrace analytů ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	10,00	100,00	10,00	100,00
Naměřená koncentrace ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	6,68	67,40	6,67	68,87
Výtěžnost metody (%)	66,83	67,40	66,75	68,87
SD	0,05	0,63	0,08	0,72
%RSD	0,70	0,93	1,18	1,05

## 2.7 STANOVENÍ OBSAHU METABOLITŮ V MYCELIU

Metoda UPLC byla použita pro stanovení obsahu antrachinonů v myceliu kmenu MK 1108. Mycelium bylo homogenizováno a extrahováno pomocí EtOAc a následné úpravy byly shodné s extrakty media.

Mycelium obsahovalo vysoký podíl metabolitu 1P (tabulka 7) a zanedbatelnou koncentraci metabolitu 1T. Jiné metabolity nebyly v extraktu mycelia detekovány. Z tabulky 7 je patrné, že kmen 1108 produkuje významně vyšší množství sekundárních antrachinonových metabolitů do fermentační tekutiny a pro jejich izolaci je tato tekutina tudíž vhodnější než mycelium.

**Tabulka 7** – Koncentrace antrachinonů produkovaných do mycelia ( $C_{myc}$ ), do fermentační kapaliny v 15. dnu kultivace ( $c_{15}$ ) a koncentrace v myceliu vztažená na 1 ml fermentační kapaliny ( $c_0$ ); míra přesnosti 3 paralel vyjádřená %RSD

Metabolit	$c_{myc}$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ mycelia)	$c_0$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ media)*	%RSD	$c_{15}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ media)
1P	2 070	12,42	1,3	75,36
1T	40	0,24	1,1	48,52
2T	-	-	-	0,95

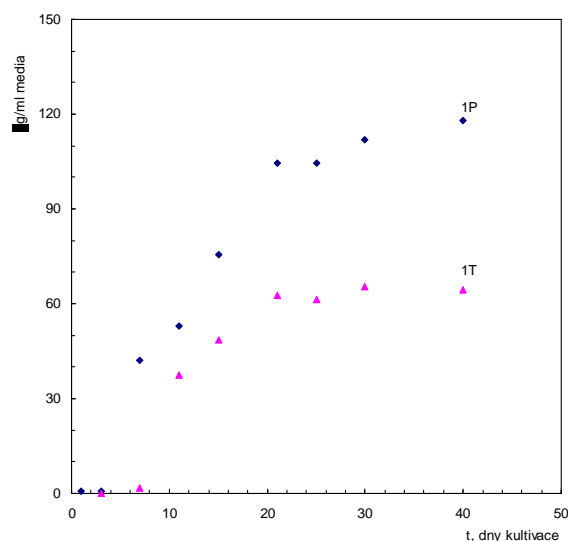
\*Pro přepočítání koncentrace antrachinonů v 1g mycelia na 1ml fermentační kapaliny byl použit vzorec:

$$c_0 = \frac{C_{myc}}{V_{med} / m_{myc}} \quad (\text{rovnice 1})$$

Kde  $c_0$  je koncentrace vztažená na 1 ml media,  $c_{myc}$  je koncentrace v extraktu mycelia ( $\mu\text{g g}^{-1}$  mycelia),  $V_{med}$  je objem media (1 ml),  $m_{myc}$  je hmotnost mycelia na 1 ml media (u MK 1108  $6 \text{ mg ml}^{-1}$ ).

## 2.8 PRODUKCE ANTRACHINONŮ V ČASE KULTIVACE

U kmenu MK 1108 byla určena závislost produkce metabolitů 1T, 1P, 2T a 2P na času kultivace. Z grafu 1 je patrné, že po 21. dnu kultivace již produkce antrachinonů významně nevrůstá. Nejvyšší nárůst koncentrace majoritních acetylovaných metabolitů 1P a 1T mezi 3. a 7. dnem kultivace, zatímco produkci metabolitu 2T



**Graf 1** – Závislost produkce majoritních metabolitů 1T a 1P kmenem MK 1108 na čase kultivace

pozorujeme až od dne 7. a 2P až od 15. dne (tabulka 8). Možná příčina nízkých koncentrací metabolitů bez acetylu 2T a 2P a také poklesu koncentrace 2T ve 40. dnu je, že je houba tyto metabolity využívá jako prekurzory pro syntézu finálních metabolitů 1P a 1T.

**Tabulka 8** – Produkce metabolitů (koncentrace vyjádřená  $\mu\text{g ml}^{-1}$  media) kmenu MK 1108 v čase kultivace; koncentrace jsou průměrné hodnoty ze 4 paralel

Metabolit		Dny kultivace								
		1.	3.	7.	11.	15.	21.	25.*	30.*	40.*
1P	$\mu\text{g ml}^{-1}$	0,55	0,78	41,97	52,92	75,36	104,41	104,34	111,78	118,08
	%RSD	1,5	3,9	4,5	4,4	5,1	0,9	5,8	2,0	1,6
1T	$\mu\text{g ml}^{-1}$	-	stopy	23,96	37,44	48,52	62,53	61,43	65,3	65,37
	%RSD	-	stopy	4	2,9	1,45	1,8	1,4	2,2	2
2P	$\mu\text{g ml}^{-1}$	-	-	0,48	1,07	1,28	2,11	3,32	3,69	0,75
	%RSD	-	-	4,4	4,2	3,3	2,7	4,6	6,8	1,6
2T	$\mu\text{g ml}^{-1}$	-	-	-	-	0,95	1,14	1,48	1,41	1,27
	%RSD	-	-	-	-	3,7	3,8	7,2	2,2	4,6

\* Hodnoty po 21. dnu kultivace byly přepočteny na zakonzentrovávání media vlivem vypařování. Do 21. dne kultivace se tento úbytek běžně zanedbává.

Koncentrace 25.; 30. a 40. dne byly přepočteny dle vztahu:

$$c_0 = c_i \{v_0 - d_i / (v_c - v_s)\} \quad (\text{rovnice 2})$$

Kde  $c_0$  je koncentrace vztažená na původní objem,  $c_i$  koncentrace v  $i$ -tém dni,  $v_0$  původní objem (1 ml),  $d$  konstanta úbytku media pro každý den ( $0,5 \text{ ml den}^{-1}$ ),  $v_c$  celkový objem media na počátku kultivace (50 ml) zmenšený o celkové množství odebrané tekutiny na analýzy  $v_s$  (10 ml).

## 2.9 SROVNÁNÍ PRODUKCE METABOLITŮ 1T, 1P A 2T KMENE MK 1108 S DEVÍTI VYBRANÝMI KMENY *GEOSMITHIA*

Produkce antrachinonových metabolitů vybraného kmenu *Geosmithia lavendula* MK 1108 na dvou typech kultivačních medií (MAE a CZD) po 3 týdnech kultivace byla srovnána s produkcí u dalších sedmi kmenů *Geosmithia* (tabulka 9). V

porovnání s referenčním kmenem, byla produkce 1T a 1P u všech kmenů zanedbatelná a s výjimkou kmene MK 1603c vždy vyšší při kultivaci na MEA mediu. Nejvyšší produkce odpovídající zhruba 20% produkce 1P a 5% produkce 1T byla stanovena u kmene MK 941. Minoritní metabolity 2T a 2P nebyly nalezeny v produkci ani jednoho z devíti kmenů včetně MK 1108 na MEA mediu a metabolit 2T byl ve stopových koncentracích nalezen u kmenu RJ 0258 na MEA mediu.

**Tabulka 9** – Srovnání produkce metabolitů ( $\mu\text{g ml}^{-1}$  media) 1P a 1T na dvou typech medií (MEA, CZD) u sedmi kmenů rodu *Geosmithia* po 21.dnu kultivace; průměr z 5 paralel

Metabolit	MK 1108		MK 941*		MK 1740		RJ 0258*	MK 1689		MK 1760		MK 1603c	
	MEA	CZD	MEA	CZD	MEA	CZD	MEA	MEA	CZD	MEA	CZD	MEA	CZD
<b>1P (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	0,57	<b>104,4</b>	17,8	1,89	5,36	0,94	0,58	0,56	0,53	stopy	stopy	nd	stopy
<b>% RSD</b>	1,49	0,9	3,2	2,8	0,16	1,4	2	0,63	1,07	-	-	-	-
<b>1T (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	d	<b>62,53</b>	2,6	0,94	1,57	0,66	d	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>% RSD</b>		1,8	1	0,23	0,1	1,8		-	-	-	-	-	-

\* kultivace probíhala pouze 14 dní

nd – hodnoty leží pod LOD, d – hodnoty leží pod LOQ

### 3 ZÁVĚR

Z fermentační kapaliny a mycelia houby *Geosmithia lavendula* (kmen MK 1108) bylo izolováno a charakterizováno 5 antrachinonových sekundárních metabolitů. Dva majoritní metabolity 1T (1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyantrachinon) a 1P (1-acetyl-2,4,5,6(7),8-pentahydroxyantrachinon) a tři minoritní metabolity 2T (1,3,6,8-tetrahydroxyantrachinon), 2P (2,4,5,6(7),8-pentahydroxyantrachinon-1-karboxylová kyselina) a 3P (methylether 2,4,5,6(7),8-pentahydroxyantrachinon-1-karboxylová kyselina). Metabolity 1T, 1P a 2T byly plně charakterizovány (NMR, MS, IR, UV), struktura ostatních metabolitů byla navržena pomocí MS.

V rámci optimalizace separačních metod byly vyvinuty dvě HPLC metody a dvě UPLC metody. Pro výslednou UPLC analytickou metodu byl stanoven lineární koncentrační rozsah pro dva majoritní metabolity, limity detekce a kvantifikace, přesnost a správnost měření a reprodukovatelnost retenčních časů.

Semipreparativních HPLC metod a analytické UPLC metody bylo použito pro kvantifikaci metabolitů 1P, 1T a 2T v extraktech fermentační tekutiny a extraktu mycelia, ke stanovení výtěžnosti SPE metody pro extrakty fermentačních tekutin, k určení závislosti produkce metabolitů houbou na čase kultivace a pro srovnání antrachinonové produkce u dalších devíti příbuzných kmenů *Geosmithia*.

V rámci práce bylo izolováno dostatečné množství metabolitů 1T, 1P a 2T, umožňující testování jejich biologických aktivit.

## Literatura

---

- <sup>1</sup> Kubátová, M.; Kolařík, M.; Prášil, K.; Novotný, D.: Bark beetles and their galleries : well know niche for little known fungi, case of *Geosmithia*. *Czech Mycology*, **55**, 1-18 (2004).
- <sup>2</sup> Schirmbock, M.; Lorito, M.; Wang, Y.L.; Hayes, C.K., Arisanatac, I.; Scala, F.; Harman, G.E., Kubicek, C.P.: Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanism involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopatogenic fungi. *Applied and Enviromental Microbiology*, **60**, 4364-4370 (1994).
- <sup>3</sup> Sittie A.A.; Lemmich, E.; Olsen, C.E.; Hviid, L.; Kharazmi, A.; Nkrumah, F.K.; Christensen, S.B.: Structure-activity studies: *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of anthraquinones from *Morinda lucida*. *Planta Medica*, **65**, 259-261 (1999).
- <sup>4</sup> Rath, G.; Ndonzao, M.; Hostettmann, K.: Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida*. *International. Journal of Pharmacogony*, **33**, 107-114 (1995).
- <sup>5</sup> Francois, G.; Steenackers, T., Steglich, W.; Lamottke, K.; Holenz, J.; Bringmann, G.: Vismione H and structurally related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* : structure-activity relationships. *Parasitology Research*, **85**, 582-588 (1999).
- <sup>6</sup> Hroneš, I.: Biologické účinky antrachinonů III – Vliv na mikroorganismy a repelentní působení. *Československá farmacie*, **41**, 217-219 (1992).
- <sup>7</sup> Tripathi, Y.S.; Sharma, M.; Manickam, M.: Rubiadin, a new antioxidant from *Rubia cordifolia*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, **34**, 302-306 (1997).
- <sup>8</sup> Younos, C.; Rolland, A.; Fleurentin, J.; Lanhers, M.; Misslin, R.; Martier, F.: Analgetic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica*, **56**, 430-434 (1990).

- 
- <sup>9</sup> Ismail, N.H.; Ali, A.M.; Aimi, N.; Kitajima, M.; Takayama, H.; Lajia, N.H.: Anthraquinone from *Morinda elliptica*. *Phytochemistry*, **45**, 1723-1725 (1997).
- <sup>10</sup> Lülmann, H.; Mohr, K.; Zielgler, A.; Bieger, D.: *Barevný atlas farmakologie*. Str. 298, Grada Publishing, Praha 2001.
- <sup>11</sup> Brocmoller, J.; Reum, T.; Bauer, S.; Kerb, R.; Hubner, W.D.; Roots, I.: Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry*, **30**, 94-101 (1997).
- <sup>12</sup> Tahara, S.; Matsukura, Y.; Mizutani, J.: Naturally occurring antidotes against benzimidazole fungicides. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Bioscience*, **48**, 757-765 (1997).
- <sup>13</sup> Ganapaty, S.; Thomas, P.S.; Fotso, S.; Laatsch, H.: Antitermitic quinones from *Diospyros sylvatica*. *Phytochemistry*, **65**, 1265-71 (2004).
- <sup>14</sup> Oficiální stránky firmy SePRO, výrobce přípravku Flight Control™ dostupné z URL: <<http://www.flightcontrol.com/howitworks.htm>> [cit. 20.10.2009].
- <sup>15</sup> Nakashima, T. and Doi, C.: Studies on the antimicrobial and moth-proofing efficacies of wool-fabric treated with many kinds vegetable dyes. *Journal of Enviromental Kontrol Technique*, **15**, 91-105 (1997).
- <sup>16</sup> Fraser, H.W.; Fisher, K.H.; Frensch, I.: Bird control on grape and tender fruit farms, factsheet AGDEX 685.730. *Ministry of Agric, Food and Rural affairs*, Ontario.
- <sup>17</sup> Zou, Y.G.; Wang, C.J.; Lin, Y.J.; Guo, J.W.; Deng, Y.W.: Simultaneous determination of anthraquinones in radix *Polygoni multiflori* by capillary gas chromatography coupled with flame ionization and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **1200**, 43-48 (2008).
- <sup>18</sup> Derksen, G.C.H.; Niederländer, H.A.G.; van Beek, T.A.: Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatohraphy A*, **978**, 119-127 (2002).

- 
- <sup>19</sup> Kovacevic, N. and Grubičić, D.: *In vitro* of plants from the Rhamnaceae: shoot propagation and anthraquinones production. *Pharmaceutical Biology*, **43**, 420-424 (2005).
- <sup>20</sup> Saleem, R.; Faizi, Sh.; Siddiqui, Sh. B.; Ahmed, M.; Hussain, S.A.; Qazi, A.; Dar, A.; Ahmad, S.Y.; Qazi, M.H.; Akhtar, S.A.; Hasnain, S.N.: Hypotensive Effect of Chemical Constituents from *Aloe barbadensis*. *Planta Medica*, **67**, 757-760 (2001).
- <sup>21</sup> Mathey, A; Spittle, P; Steglich, W.: Draculone, a new anthraquinone from the tropical lichen *Melanotheca cruenta*. *Zeit Naturforsch*, **57c**, 565-567 (2002).
- <sup>22</sup> Huneck, S.; Culberson, C.F.; Culberson, W.L.; Elix, J.A.: Haematommone, a red pigment from apothecia of *Haematomma puniceum*. *Phytochemistry*, **30**, 917-935 (1991).
- <sup>23</sup> Gill, M.; Raudies, E.; Zu, J.: Pigments of fungi. Part 61, Anhydroflavomannin-9,10-quinone 6,6',8'-tri-O-methyl Ether from an Australian *Dermocybe* Toadstool. *Australian Journal of Chemistry*, **52**, 989-992 (1999).
- <sup>24</sup> Rideout, J.A. and Sutherland, M.D.: Pigments of marine animals XV. Bianthraones and related polyketides from *Lamprometra palmata gyges* and other species of crinoids. *Australian Journal of Chromatography*, **38**, 793-808 (1985).
- <sup>25</sup> Blum, M.S.; Hilker, M.: Chemical protection of insect eggs. In : Hiker, M, Meiners, T (eds), Chemoecology of Insect and Eggs Deposition. *Blackwell Publishing*, Berlin, Oxford (2002).
- <sup>26</sup> Singh, H.; Moore, R.E.; Scheuer, P.J.: Distribution of quinone pigments in echinoderms. *Experientia*, **23** (1967).
- <sup>27</sup> Adinarayana, G.; Venkateshan, M.R.; Bapiraju, V.V.S.N.K.; Sujatha, P.; Premkumar, J.; Ellaiah. P.; Zeeck, A.: Cytotoxic compounds from the marine actinobacterium *Streptomyces corchusii* AUBN(1)/7. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **32**, 295-300 (2006).
- <sup>28</sup> Richardson, W.H.; Schmidt, T.M.; Nelson, K.H: Identification of an anthraquinone pigment and hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminiscens*. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 1602-1605 (1988).
- <sup>29</sup> Gill, M.: Pigments of fungi. *Natural Product Report*. **11**, 67-90 (1994).



- 
- <sup>30</sup> Brown, W.D.; Salvo, J.J.: Isolation and characterization of sexual spore pigments from *Aspergillus niduland*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 979-983 (1994).
- <sup>31</sup> Gill M.: Pigments of fungi. *Natural Product Report*. **16**, 301-317 (1999).
- <sup>32</sup> Betina, V.; Sedmera, P.; Vokoun, J.; Podojil, M.: Anthraquinone pigments from a conidiating mutant of *Trichoderma viride*. *Experientia*, **42** (1986).
- <sup>33</sup> Brauers. G.; Edrada, R.A.; Ebel, R.; Proksch, P.; Sraz, V.; Berg, A.; Grafe, U.; Schachtele, Ch.: Anthraquinones and betaenone derivates from sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: Novel inhibitors of protein kinases. *Journal of Natural Product*, **63** (2000).
- <sup>34</sup> Kolařík, M.; Kubátová, A.; Hulcr, J.; Pažoutová, S.: *Geosmithia* fungi are highly diverse and consistent bark beetle associated: evidence from their community structure in temperate Europe. *Microbial Ecology*, **55** (2008).
- <sup>35</sup> Kolařík, M.: Fascinující svět podkorního hmyzu: houbové symbiózy. *Živa*, **2**, 73-75 (2004).
- <sup>36</sup> Čížková, D.; Kolařík. M.; Kubátová, A.; Pažoutová, S.: Assessing the pathogenic effect of *Fusarium*, *Geosmithia* and *Ophiostoma* fungi from broad-leaved trees. *Folia Microbiologica*, **50**, 59-62 (2005).
- <sup>37</sup> Räsänen, R.; Björk, H.; Hynnien, P.H.: Two-dimensional TLC separation and mass spectrometric identification of anthraquinones isolated from the fungus *Dermocybe sanguinea*. *Zeitschriftfur Naturforschung Teil C- A Journal of Biosciences*, **55**, 195-202 (2000).
- <sup>38</sup> Singh, N.P.; Gupta, A.P.; Sinha, A.K.; Ahuja, P.S.: Hight-performance thin layer chromatography method for quantities determination of four major anthraquinone derivates in *Rheum emodi*. *Journal of Chromotography A*, **1077**, 202-206 (2005).
- <sup>39</sup> Trojanowicz, M.; Wojcik, L.; Urbaniak-Walczak, K.: Identification of natural dyes in historical Coptic textiles by capillary electrophoresis with diode array detection. *Chemia Analityczna*, **48**, 607-620 (2003).

- 
- <sup>40</sup> Puchalska, M.; Orlinska, M.; Ackacha, M.A.; Polec-Pawlak, K.; Jarosz, M.: Identification of anthraquinone coloring matters in natural red dyes by electrospray mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis. *Journal of Mass Spectrometry.*, **38**, 1252-1258 (2003).
- <sup>41</sup> Tukan, K.; Zhang, H.G.; Chen, X.G.; Hu, Z.D.: Determination of five anthraquinones in medicinal plants by capillary zone electrophoresis with beta-cyclodextrin addition. *Journal of Chromatography A*, **1123**, 134-137 (2006).
- <sup>42</sup> Bakolachristianopoulou, M.N.; Papageorgiou, V.P.; Apazidou, K.K.: Gas-chromatographic mass-spectrometric study of the reductive silylation of hydroxyquinones. *Journal of Chromatography.*, **645**, 293-301 (1993).
- <sup>43</sup> Derksen, G.C.H.; Niederländer, H.A.G.; van Beek, T.A.: Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **978**, 119-127 (2002).
- <sup>44</sup> Takahashi, D.; Maoka, T.; Tsushima, M.; Fujitani, K.; Kozuka, M.; Matsuno, T.; Shingu, T.: New Quinone Sulfates from the Crinoids *Tropiometra afra macrodiscus* and *Oxymanthus japonicus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **50**, 1609-1612 (2002).
- <sup>45</sup> Yu, L.; Li, Y.; Guo, X.J.: Simultaneous determination of anthraquinones in *Heydotis diffusa* by LC coupled with UV detection. *Chromatographia*, **70**, 211-215 (2009).
- <sup>46</sup> Komatu, K.; Nagayama, Y.; Tanaka, K.; Ling, Y.; Cai, S-Q.; Omote, T.; Meselhy, M.R.: Comparative study of chemical constituents of rhubarb from different origins. *Chemical & pharmaceutical Bulletin*, **54** (11), 1491-1499 (2006).
- <sup>47</sup> He, D.X.; Chen, B.; Tian, Q.Q.; Yao, S.Z.: Simultaneous determination of five anthraquinones in medicinal plants and pharmaceutical preparations by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **1200**, 43-48 (2008).
- <sup>48</sup> Derksen, G.C.H.; Niederländer, H.A.G.; van Beek, T.A.: Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **978**, 119-127 (2002).

- 
- <sup>49</sup> Verma, S.C.; Singh, N.P.; Sinha, A.K.: Determination and local variations in the quantity of hydroxyanthraquinones and their glycosides in rhizomes of *Rheum emodi* using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1097**, 59-65 (2005).
- <sup>50</sup> Wang, J.B.; Li, H.F.; Jin, C.; Qu, Z.; Xiao, X.H.: Development and validation of a UPLC method for quality control of rhubarb-based medicine: Fast simultaneous determination of five anthraquinone derivatives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **47**, 765-770 (2008).
- <sup>51</sup> Han, L.F., Wu, B., Pan, G.X., Wang, Y.F., Song, X.B., Gao, X.M.: UPLC-PDA analysis for simultaneous quantification of four active compounds in crude and processed rhizome of *Polygonum multiflorum* thumb. *Chromatographia*, **70**, 657-659 (2009).

---

## 5 PŘÍLOHA

*Folia Microbiologica*, **54**, 179 – 187 (2009).

### **Hydroxylated anthraquinones produced by *Geosmithia* species**

Stodůlková, E.; Kolařík, M.; Křesinová, Z.; Kuzma, M.; Šulc, M.; Man, P.; Novák, P.;  
Maršík, P.; Landa, P.; Olšovská, J.; Chudíčková, M.; Pažoutová, S.; Černý, J.; Bella, J.;  
Flieger, M..