Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Katedra organické chemie

# Obsahové látky listu a stonku brusnice borůvky

Simona Hybelbauerová

Dizertační práce

Praha 2009

Tato dizertační práce byla vypracována na katedře organické a jaderné chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2001 - 2009 pod vedením Doc. RNDr. Jana Sejbala, CSc a Ing. Bohumíra Koutka.

# Obsah


1. Úvod ... 5

2. Současný stav studované problematiky ... 7

2.1. Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*) ... 7

2.2. Skupiny přírodních látek vyskytující se v brusnici borůvce ... 8
2.2.1. Flavonoidy ... 9
2.2.1.1. Flavonoly ... 10
2.2.1.2. Flavanoly/ katechiny ... 10
2.2.1.3. Anthokyanidiny ... 10
2.2.1.4. Anthokyaniny ... 11
2.2.1.5. Proanthokyanidiny ... 11
2.2.2. Další fenolické látky ... 12
2.2.3. Fenolické kyseliny ... 12
2.2.4. Sacharidy ... 13
2.2.5. Aminokyseliny ... 13
2.2.6. Izoprenoidy ... 14
2.2.6.1. Monoterpenoidy ... 14
2.2.6.2. Triterpenoidy ... 14
2.2.6.3. Steroidy ... 15

2.3. Obsahové látky brusnice borůvky ... 16
2.3.1. Obsahové látky listu brusnice borůvky ... 16
2.3.1.1. Flavonoidy ... 16
2.3.1.1.1. Flavonoly ... 17
2.3.1.1.2. Flavanoly/ katechiny ... 17
2.3.1.1.3. Anthokyanidiny ... 18
2.3.1.1.4. Anthokyaniny ... 18
2.3.1.1.5. Proanthokyanidiny ... 19
2.3.1.2. Další fenolické látky ... 19
2.3.1.3. Fenolické a další organické kyseliny ... 19
2.3.1.4. Sacharidy ... 20
2.3.1.5. Aminokyseliny ... 20
2.3.1.6. Izoprenoidy ... 20
2.3.1.6.1. Monoterpeny ... 20
2.3.1.6.2. Triterpenoidy ... 20
2.3.1.6.3. Steroidy ... 21
2.3.1.7. Uhlovodíky ... 21
2.3.2. Obsahové látky stonku brusnice borůvky ... 21
2.3.2.1. Anthokyaniny ... 21
2.3.2.2. Fenolické kyseliny ... 22
2.3.2.3. Proanthokyanidiny ... 22
2.3.2.4. Alkaloidy ... 22
2.3.2.5. Izoprenoidy ... 22

3. Motivace a cíle práce ... 23

4. Diskuze a výsledky ... 24

4.1. Postup dělení methanolického extraktu stonku brusnice borůvky ... 24
4.1.1. Rozbor methanolické fáze S4 ... 24
4.1.2. Rozbor hexanové fáze S5 ... 24
4.1.2.1. Určení struktur triterpenoidů ... 25
4.1.2.1.1. Oleananové deriváty ... 26

4.1.2.1.2. Glutanové deriváty ... 33
4.1.2.1.3. Tokoferoly ... 36
4.1.2.1.4. Steroidy ... 37
4.1.3. Rozbor vodné fáze S8 ... 39
4.1.3.1. Určení struktur sacharidů a látek jim strukturně podobných ... 40
4.1.4. Rozbor etherické fáze S9 ... 41
4.1.4.1. Určení struktur sacharidů ... 42
4.1.4.2. Určení struktury alkaloidů ... 45
4.1.4.3. Určení struktury derivátů pentandiolu ... 46

4.2. Postup dělení methanolického extraktu listu brusnice borůvky ... 50
4.2.1. Dělení methanolické fáze L4 ... 50
4.2.2. Dělení hexanové fáze L5 ... 50
4.2.2.1. Určení struktury triterpenoidů ... 51
4.2.2.1.1. Ursanové deriváty ... 51
4.2.3. Dělení vodné fáze L8 ... 55
4.2.3.1. Určení struktury myo-inositolu (79) ... 55
4.2.4. Dělení etherické fáze L9 ... 56
4.2.4.1. Určení struktury flavonoidů ... 56
4.2.4.2. Určení struktury steroidu ... 58

4.3. Přehled izolovaných látek ze stonku a listu brusnice borůvky ... 60

4.4. Příprava standardů: (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (77) a (2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (78) ... 61

4.5. Určení absolutní konfigurace látek 75 a 76 ... 64

5. Experimentální část ... 66

5.1. Obecné poznámky k experimentální části ... 66

5.2. Dělení methanolického extraktu stonku brusnice borůvky ... 68
5.2.1. Dělení methanolické fáze ... 70
5.2.2. Dělení hexanové fáze ... 72
5.2.3. Dělení vodné fáze ... 81
5.2.4. Dělení etherické fáze ... 83

5.3. Dělení methanolického extraktu listu brusnice borůvky ... 96
5.3.1. Dělení chloroformové fáze ... 97
5.3.2. Dělení hexanové fáze ... 99
5.3.3. Dělení vodné fáze ... 106
5.3.4. Dělení etherické fáze ... 107

5.4. Příprava standardů: (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (77) a (2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (78) ... 112
5.4.1. Příprava standardu (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (77) ... 112
5.4.2. Příprava standardu (2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (78) ... 116
5.4.3. Příprava (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (74) ... 118

6. Závěr ... 120

7. Literatura ... 123

# 1. Úvod

Historie bylinkářství sahá svými kořeny až k počátkům lidské existence. Nejranější užívání léčivých bylin bylo pravděpodobně výsledkem postupu „pokus a omyl“. Léčitelé používali k léčení zdravotních potíží nejrůznější dostupné rostliny v sušené formě, ze kterých připravovali např. čaje, kapky, sirupy, nálevy, vývary nebo masti. Různé kultury si vytvořily vlastní bylinkářské tradice, z nichž se postupně vyvinulo lidové léčitelství, které se šířilo, až do nástupu psaného jazyka, ústně.

V období kolem roku 3000 př. n. l. si jednotlivé národy začaly zaznamenávat své vědomosti o léčivých bylinách. Čínský císař Šen-nung (obr. 1) sepsal Kánon o bylinách, ve kterém popisuje 252 bylin, jejich uchovávání a způsob podávání. Mnoho z nich se používá i dnes. Protože tehdy nebyly ještě k dispozici žádné přístroje a pomůcky, prozkoumal každou bylinu, lodyhu i květ pomocí svých očí, nosu a zubů, aby rozlišil jedovaté rostliny od prospěšných a léčivých. Takto průběhem mnoha let nashromáždil tisíce zkušeností a poznatků. Pokud měla bylina příjemnou vůni, nebyla nejspíš jedovatá; páchla-li a chutnala po chaluhách, byla na místě nejvyšší opatrnost. Když našel sladce, hořce nebo kysele chutnající bylinku, byla poživatelná. Pokud chutnala ostře, zapáchala, případně pálila na jazyku, Šen-nung ji odhodil. V 7. st. byl sepsán *Přepracovaný kánon o bylinách* obsahující informace o 844 bylinách, jejich zdroj, sběrné metody, chuť a terapeutické vlastnosti.

*Obr. 1*

Po 27 letech výzkumu byly v roce 1578 dokončeny spisy *Materia medica* (*Li Ščen*), které můžeme označit za vědeckou příručku uvádějící 1800 léčivých bylin. Doplňování herbáře o nejnovější informace a jejich opravy pokračovalo až do současnosti.

Babyloňané měli lékopis s 1400 rostlinami. Egypťané používali přibližně 900 bylin. Starověcí Řekové získali znalosti o bylinkářství z Indie, Babylonu, Egypta i z Číny. V 6. st. př. n. l. založil Pythagoras nábožensko-filozofickou společnost, která seznamovala s nejnovějšími vědomostmi o bylinkách. Hippokratés (460-370 př. n. l.) stavěl své učení na teoretických základech. Vycházel z poznání přírody a spojoval praktickou zkušenost s hypotézami. Vzal v úvahu důležité faktory týkající se stravy, zaměstnání a klimatu s ohledem na nemoc. Věřil v samoléčení pomocí stravy a rostlinné medicíny. Stanovil zásady lékařské etiky, které jsou uznávány i dnes lékaři na celém

světě. Kolem roku 300 př. n. l. byla založena lékařská škola v kulturním centru Alexandrii, kde byla vedena i výuka o bylinném výzkumu.

Ve středověku byla centrem rozvoje vědy Persie. Avicenna (980 – 1037), jemuž je připisován vynález procesu destilace silic, napsal např. *Canon Medicinae* s obsáhlými informacemi o nemocech, lécích a lékařských filozofiích. V Evropě byl v té době pokrok v lékařství brzděn církví. Na pokusy se hledělo nedůvěřivě a nové objevy byly považovány za nebezpečné. Rostlinná medicína se přesto šířila díky bylinkářkám a mnichům v klášterech.

V 15. století nastalo, v souvislosti s rozvojem knihtisku, zlaté období herbářů. V tomto renesančním období byly pečlivěji pozorovány účinky bylinných léčiv a od nedůvěryhodných se upouštělo.

V 19. století se rostliny dostaly do středu hlavního zájmu tehdejších lékárníků – „chemiků“, kteří z nich izolovali čisté látky nebo souhrny látek a bylo tak umožněno koncentrovat léčivé dávky. Objevila se i první syntetická léčiva, která postupně zatlačila drogy (sušené rostliny) do pozadí. Ale stejně rychle jak se v minulém století od léčivých rostlin upouštělo, tak se k nim dnes vracíme, pochopitelně na jiné úrovni poznání, s jinými možnostmi izolace. Jsme svědky podrobného výzkumu nejen tradičních léčivých rostlin, ale i rostlin příbuzných, u kterých se dá očekávat výskyt účinných látek obdobného nebo dokonce ještě vhodnějšího složení. Zkoumají se rostliny chemicky a farmakologicky dosud neznámé. V mnoha zemích světa hraje dodnes rostlinná medicína při léčení hlavní roli. I ve Spojených státech či v západní Evropě je 25 % všech komerčně vyráběných léků na bázi rostlinných složek.[1]

Tato práce pojednává o izolaci sloučenin ze stonku a listu známé rostlliny brusnice borůvky.

# 2. Současný stav studované problematiky

## 2.1. Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*)

Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*) (viz obr. 2) patří do čeledi rostlin vřesovcovité (*Ericaceae*), která zahrnuje zhruba 28 rodů s 500 druhy, ale jen několik málo z nich roste v mírném a subtropickém pásu severní polokoule.[2] U nás roste vzácně v teplých oblastech (upřednostňuje chladnější oblasti), ve středních polohách roztroušeně až velmi hojně a na horách hojně.[3] Patří mezi stínomilné rostliny. Roste na kyselé, málo výživné, humózní a nepříliš suché půdě.[3] Jako jeden z mála druhů rostlin dobře roste i na půdách kontaminovaných těžkými kovy.[4] Keříčky dorůstají až do půlmetrové výšky. Hustě větvené stonky jsou hranaté, zelené. Listy vyrůstají střídavě, jsou vejčité, jemně pilovité, na vrcholu zašpičatělé.[3,5] Roste-li na otevřeném prostranství, horní listy rostliny zčervenají (způsobeno především přítomností glykosidů kyanidinu).[6]

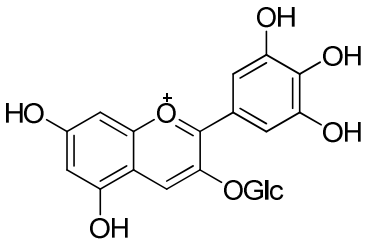
*Obr. 2*

Listy a plody brusnice borůvky se využívají v léčitelství. List se sbírá v období od června do září. Suší se na stinných, dobře větraných místech. Při umělém sušení by teplota neměla přesáhnout 40 °C. Plody se sbírají v době zralosti, od června do července a suší se obdobně jako listy. Teplota při umělém sušení by neměla být vyšší než 45 °C.[3,7]

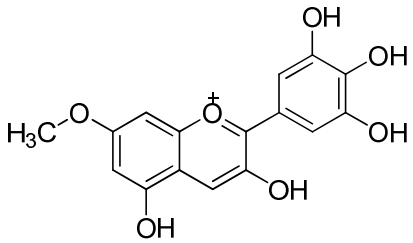
Plody brusnice borůvky mají neobvykle vysoký obsah antioxidantů a jsou bohaté na obsah vitaminu C.[8] Jsou prevencí mnoha nemocí. Osvědčily se proti průjmovým onemocněním, antibakteriálně působí proti *Escherichia coli* a stafylokokům, příznivě působí také na cévní stěny a na regeneraci oční sítnice, dezinfekčně při zánětech ústní dutiny a hrtanu,[3] při respiračních onemocněních.[8] Zvýšená konzumace borůvek je účinná prevence šerosleposti. Působí mírně močopudně, zbavují tělo škodlivin a zlepšují funkci lymfatického systému. Dokonce se o borůvkách hovoří jako o přírodní prevenci rakoviny prostaty a jiných typů rakoviny. V neposlední řadě snižují hladinu cukru a cholesterolu v krvi.

Listy brusnice borůvky mají podobné účinky jako plody. Čaj z listů má příznivý vliv na ledviny a močové cesty, které čistí a dezinfikuje a pomáhá s odvodňováním při přílišném zadržování vody v organismu. Droga také působí svíravě až dezinfekčně. Odvar z listů se osvědčil při střevním kataru, žaludečních křečích, zánětu močového měchýře a tlustého střeva.[3,9] Při vnější aplikaci zmírňuje projevy lupénky a dalších kožních nemocí.

Díky obsahu glukokininů (myrtillin (**1**) a neomyrtillin (**2**)) v listech, které snižují hladinu cukru v krvi, má brusnice borůvka využití v diabetologii jako podpůrný prostředek při cukrovce.[5] Výtažek z listů je obsažen v přípravku Diabetan.[7]




**1**




**2**

## 2.2. Skupiny přírodních látek vyskytující se v brusnici borůvce

V této kapitole se zaměřím pouze na skupiny přírodních látek, u nichž je popsán výskyt v listech či stoncích brusnice borůvky.

### 2.2.1. Flavonoidy

Tato skupina organických sloučenin je strukturně pestrá, celkově zahrnuje cca 4500 sloučenin, a dělíme je na flavony, flavonoly, flavany, flavanoly, isoflavony, anthokyanidiny, anthokyaniny, chalkony a aurony.[10,11]

Obsah těchto sekundárních metabolitů v dřevinách se pohybuje od 1 % až do 33 % jejich sušiny a liší se procento výskytu v různých částech rostliny. Jsou nahromaděny v různých tkáních rostlin a různých částech buňky.[12-14] Přesné umístění odráží jejich chemické vlastnosti a funkci v rostlinné fyziologii a ekologii. Například fenolické glykosidy jsou lokalizovány v hydrofilní části buněk jako jsou vakuoly a apoplasty, zatímco aglykony jsou umístěny v lipofilních částech. Ostatní rozpustné fenoly mohou být v cytoplazmě či v jádře buňky.[12] Flavonoidy jsou často přítomné v epidermálních buňkách listů a v tkáních vystavených UV záření jako je pyl a vrcholový meristem.[15]

Největší množství těchto metabolitů se vyskytuje v kůře, v jádrovém dřevě, kořenech, bázi větví a v poraněných částech.[16] Tvorba flavonoidů v kořenovém základu sazenic a v kořenech rostlin je vyvolána osmotickým tlakem a jedy.[13] Ve stoncích se hromadí flavonoidy s funkcí juvenilní, v reakci na osmotický tlak či nízké teploty.[13] V listech se ukládají u nahosemenných a cévnatých rostlin ve většině případů v nebo pod horní epidermální vrstvou. Stínomilné rostliny hromadí flavonoidy v nižších vrstvách epidermu.[13] U některých rostlin, např. rod *Syzygium*, jsou flavonoidy tvořeny v mesofylních buňkách.[13]

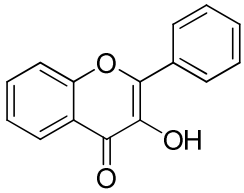
Koncentrace fenolických látek se liší u jednotlivých druhů rostlin, strom od stromu, keřík od keříku, liší se v ročních obdobích a v průběhu vegetačního období.[4,10,13-15,17]

Rostliny produkují zvýšené množství flavonoidů v reakci na okolní stresové faktory jako sucho nebo naopak přemokření, chlad, zranění, nadměrné UV záření či obrana proti houbovým chorobám.[6,13,15] Flavonoidy jsou zkoumány pro jejich antikarcinogenní, antioxidační, antimikrobiální, antimutagenní, protizánětlivé, antiproliferační účinky, protialergenní, protisrážlivé, pozitivně působí na kardiiovaskulární systém, předpokládaný ochranný efekt proti ateroskleroze, pozitivní vliv na noční vidění, působení proti zubnímu kazu, snižování krevního tlaku a snižování funkce některých fyziologických enzymů a receptorů.[4,6,14,18-22] Potravní flavonoidy jsou dokonce považovány za mnohem silnější antioxidanty než vitamin C a E.[14,24]

Na fenolické látky může být pohlíženo také jako na bioukazatele znečištění.[4,12] Podílí se na odezvě rostlin při hromadění těžkých kovů, kdy působí jako antioxidanty schopné „odklízet“ volné radikály produkované kovovými ionty.[4] V monitorovacích studiích změn životního prostředí je široce využíváno sledování zvýšeného obsahu fenolických látek v listech brusnice borůvky v závislosti na hromadění některých prvků.[4] Změny kvantity složení těchto obsahových látek rostlin by mohly být využívány jako varovný indikátor pro okolní ekosystém.[12]

2.2.1.1. Flavonoly

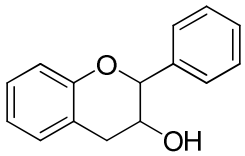
Flavonoly, žluté pigmenty rostlin, jsou deriváty odvozené od základní struktury flavonolu (**3**).[25]



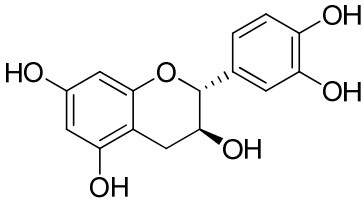

**3**

2.2.1.2. Flavanoly/ katechiny

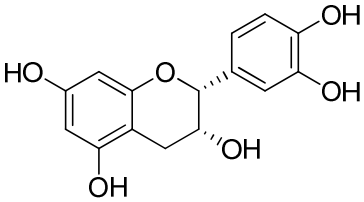
Flavanoly jsou deriváty odvozené od základního skeletu flavanolu (**4**). Katechin (**5**) a epikatechin (**6**) jsou žluté pigmenty, které se ale v přítomnosti alkoholů, silných minerálních kyselin či vázané na tannin stávají sytě modrými.[26]




**4**



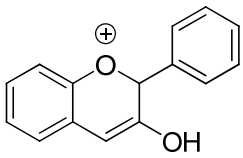

**5**




**6**

2.2.1.3. Anthokyanidiny

Anthokyanidiny tvoří necukernou část anthokyaninů. Jsou odvozeny od základního skeletu anthokyanidinu (**7**).



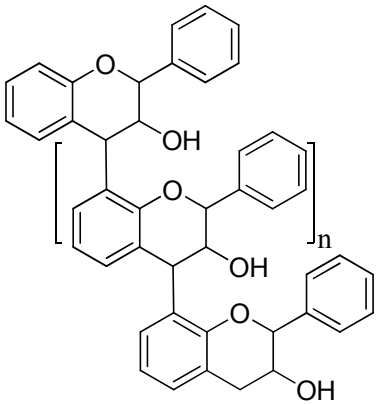
**7**

2.2.1.4. Anthokyaniny

Anthokyaniny jsou glykosylované anthokyanidiny, které jsou syntetizovány z flavonoidů šikimátovou kyselou cestou.[27] Jsou hlavními pigmenty rostlin a ovoce, kde působí jako hmyzí a zvířecí atraktanty.[6] Charakteristické červené, modré nebo nachové zbarvení různých tkání je způsobené rozdílným zastoupením jednotlivých anthokyaninů v rostlinách.

2.2.1.5. Proanthokyanidiny

Proanthokyanidiny jsou v rostlinné říši hojně se vyskytující polyfenoly.[23] Proanthokyanidiny jsou oligomery nebo polymery flavan-3-olu spojené vazbou C4→C8 (**8**).[21,28] Skládají se z různých podjednotek flavan-3-olu, které nazýváme proanthokyanidinové monomery nebo katechiny.[21] Proanthokyanidiny výlučně tvořené z (epi)katechinových jednotek se nazývají prokyanidiny, které jsou nejhojněji se vyskytující látkou této skupiny v rostlinách.[21] Prodelphinidiny jsou složené z (epi)gallokatechinových jednotek.[21]



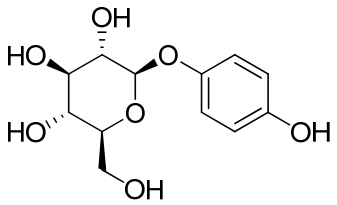
**8**

Proanthokyanidiny jsou odpovědné za svíravou chuť v ovoci jako je grapefruit, broskev, jablko, hruška, borůvky, maliny, ostružiny apod., v nápojích, např. ve víně, jablečném moštu, čaji, pivu atd. a za hořkost čokolády.[21] Role proanthokyanidinů (a

tanninů) při ochraně rostlin se dá vysvětlit jejich svíravou chutí, čímž odrazují býložravce a působí proti pathogenům.[28]

### 2.2.2. Další fenolické látky

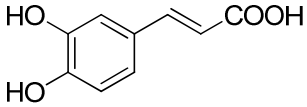
Arbutin (**9**) se hromadí v listech rostlin a je používán v kosmetickém průmyslu jako bělící látka.[29,30] Tento přírodní glykosid aromatické sloučeniny je močopudná, a antioxidační látka, která se používá při léčbě zánětu močových cest.[31]



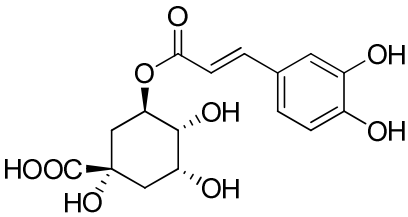

**9**

### 2.2.3. Fenolické kyseliny

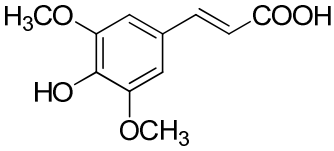
Fenolické kyseliny tvoří velmi významnou skupinu fenolických látek. Fenolické kyseliny se vyskytují v buněčných stěnách a ve vakuolách.[32] Téměř v každé rostlině je popsána přítomnost kyseliny kávové (**10**), často ve formě esteru s chinovou kyselinou – chlorogenová kyselina (**11**).[22] Kávová kyselina (**10**) a chlorogenová kyselina (**11**) působí antioxidačně *in vitro*, mohou snižovat tvorbu mutagenních a karcinogenních *N*-nitroso sloučenin.[22,32,33] Dále chlorogenová kyselina (**11**) inhibuje poškození DNA *in vitro*.[22] Tato pro život velmi důležitá vlastnost je spojena s řadou biologických účinků jako např. antimutagenními, antikarcinogenními, zpomalujícími stárnutí organismu.[32] Deriváty skořicové kyseliny (kávová (**10**), chlorogenová (**11**), sinapová (**12**), ferulová (**13**) a *p*-kumarová kyselina (**14**)) mají silnější antioxidační aktivitu v porovnání s deriváty benzoové kyseliny (p-hydroxybenzoová, vanilová (**15**) a syringová kyselina (**16**)).[32,34,35]



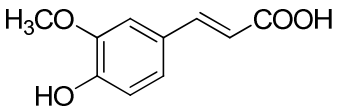

**10**



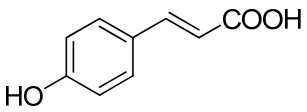

**11**



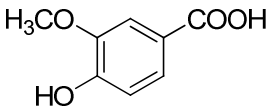

**12**



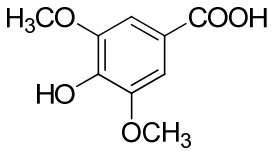

**13**




**14**




**15**




**16**

Stejně jako v případě flavonoidů je koncentrace *p*-kumarové (**14**), kávové (**10**)/ ferulové kyseliny (**13**) vyšší v červených listech oproti zeleným listům. Také je popsána důležitější role fenolických kyselin při fotoochraně rostlin v porovnání s flavonoidy.[6,36-38]

### 2.2.4. Sacharidy

Polyhydroxyaldehydy nebo polyhydroxyketony s minimálně třemi atomy uhlíku, a jejich deriváty, nazývané sacharidy, získávají zelené rostliny fotosyntézou. V organismech slouží sacharidy jako stavební materiál, zdroj energie (zásobní polysacharidy - škrob, celulosa), jsou součástí řady biologicky účinných látek, např. antibiotik.[39]

### 2.2.5. Aminokyseliny

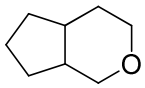
Sloučeniny, které mají ve své molekule přítomnou jak aminoskupinu tak karboxylovou skupinu, nazýváme aminokyseliny. Jsou základními stavebními jednotkami pro syntézu proteinů, enzymů i mnohých vitaminů. Rostliny asimilují pouze L-řadu aminokyselin.[39] Rostliny hromadí aminokyseliny jako reakci na okolní stres: vysoká teplota, mráz, nedostatek vody či naopak přemokření, nedostatek živin a při napadení škůdci.[40]

### 2.2.6. Izoprenoidy

Izoprenoidy, terpenoidy a steroidy, jsou jedny z nejrozšířenějších přírodních látek. Vyskytují se v přírodě jak volné tak vázané ve formě glykosidů či estericky vázané na nižší nebo vyšší alifatické kyseliny.

#### 2.2.6.1. Monoterpenoidy

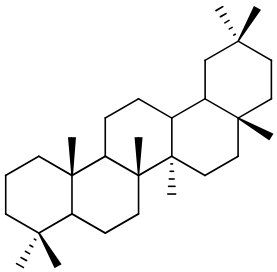
Molekuly monoterpenů jsou složené ze dvou izoprenoidních jednotek. Nejsou výživovou částí potravy. V rostlinách plní funkci chemoatraktantů či chemorepelentů. Mnoho potravinových monoterpenů má protinádorovou aktivitu, ale nejen jako prevence, ale také se podílí na ústupu existujících maligních nádorů.[41] Tato skupina látek je strukturně velmi pestrá. Vzhledem k látkám popsaným v brusnici borůvce se zaměřím pouze na iridiové deriváty. Jejich struktura je odvozena od cyklopentano[C]pyranu (**17**) a jsou biogeneticky a chemotaxonomií na pomezí mezi monoterpeny a alkaloidy. Iridoidy, obvykle ve formě glykosidů, jsou sekundární metabolity suchozemských i mořských rostlin a živočichů. Iridoidy jsou součástí léků: sedativ, antipyretik, léků na kašel.[42] Proto je mnoho výzkumů věnováno těmto fytolátkám, které mají široké rozmezí biologických účinků: kardiovaskulární, antihepatotoxické, hypoglykemické, hypolipidické, protizánětlivé, protikřečové, protinádorové, antivirové a imunomodulační.[42,43]



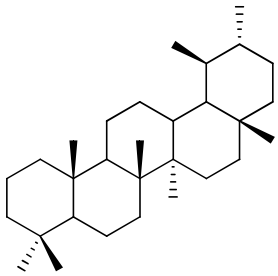
**17**

#### 2.2.6.2. Triterpenoidy

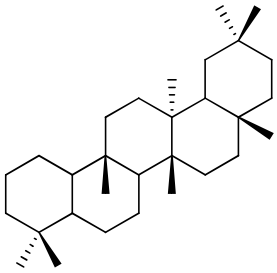
Základní skelet triterpenoidů se skláda ze 30 atomů uhlíku, poskládaný ze 6 izoprenových jednotek, od kterého je odvozena celá řada derivátů. Ze základních struktur triterpenoidů zde uvádím oleananový (**18**), ursanový (**19**) a glutanový skelet (**20**). Triterpenoidy jsou látky s mnoha biologickými účinky: anti-HIV,[44-49] antikarcinogenní,[50-53] cytotoxické,[54-56] antibakteriální, hepatoprotektivní, antialergické,[57-59] protipožerové,[60] neuroprotektivní a antioxidační.[61] Oleanová kyselina (**21**) a ursolová kyselina (**22**) snižují aktivitu enzymu glukosyltransferázy u *Streptococcus mutans* zodpovědného za tvorbu zubního plaku a zubního kazu.[62]



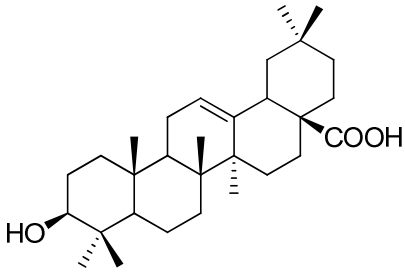
**18**



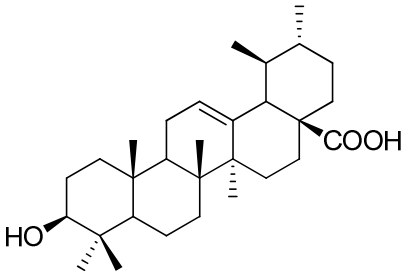
**19**



**20**



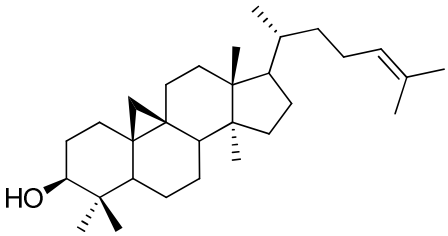

**21**



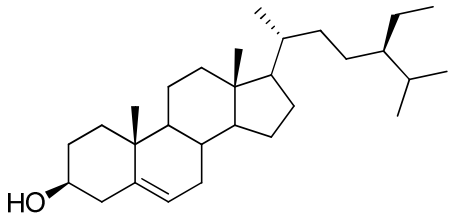

**22**

2.2.6.3. Steroidy

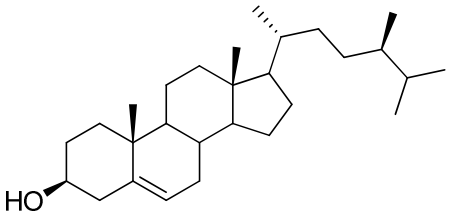
Steroidy biogeneticky vznikají v rostlinách z cykloartenolu (**23**). Jejich struktura je odvozena od základního uhlovodíku steranu (cyklopentanoperhydrofenantrenu). Fytosteroly, 3β-sitosterol (**24**), kampesterol (**25**) a stigmasterol (**26**) jsou součástí rostlinných buněčných membrán.[63] Fytosteroly mají zdraví prospěšné účinky: proti kardiovaskulárním onemocněním, proti stárnutí organismu, antioxidační (nejvyšší aktivitu vykazují tokoferoly), redukující hladinu cholesterolu v krvi, protizánětlivé, protinádorové (především 3β-sitosterol (**24**)), anti-angiogenní, posilující imunitní systém.[63-65]



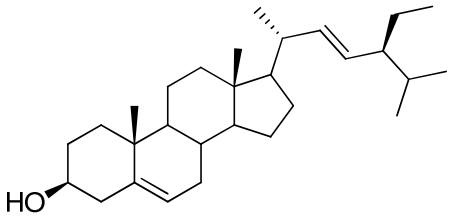
**23**



**24**



**25**



**26**

## 2.3. Obsahové látky brusnice borůvky

Nejvíce prozkoumanou částí rostliny brusnice borůvka jsou pro vysoký obsah antioxidantů plody. V literatuře je uveden výčet fenolických kyselin a anthokyaninů přítomných v borůvkách.[66,67] Z následujícího seznamu látek popsaných v listech a stoncích této rostliny je vidět, že druhé v pořadí zájmu vědeckých prací jsou listy a stonky zůstávají opomíjeny, ačkoli se předpokládá, že složení látek se od listů nebude výrazně lišit. Ve většině vědeckých prací se autoři zaměřují jen na jednu skupinu látek syntetizovaných touto rostlinou, případně porovnávají zastoupení jednotlivých sloučenin (či jejich změny v reakci na vnější podněty). V několika publikacích jsou porovnávána množství látek zastoupených v listu a stonku. Není známa publikace, ve které by se autoři zabývali celkovou chemotaxonomií listu či stonku brusnice borůvky. Tudíž ani nelze porovnat procentuální zastoupení množství jednotlivých typů sloučenin v rostlině. Sekundárními metabolity listu brusnice borůvky jsou flavonoidy, řada fenolikých látek, sacharidy, aminokyseliny, izoprenoidy a uhlovodíky.[4,6,17,40, 68-70]

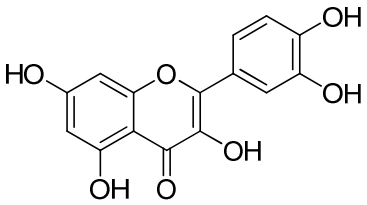
### 2.3.1. Obsahové látky listu brusnice borůvky

2.3.1.1. Flavonoidy

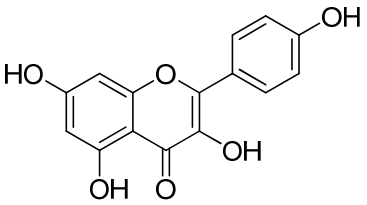
Nejvíce probádanou skupinou organických látek obsažených v brusnici borůvce jsou nízkomolekulární fenolické látky, flavonoidy.

*2.3.1.1.1. Flavonoly*

V literatuře je popsán vyšší obsah flavonolů v červených listech brusnice borůvky v porovnání se zelenými, především quercetinu (**27**) a kaempferolu (**28**).[4,6,12,18,70-72]

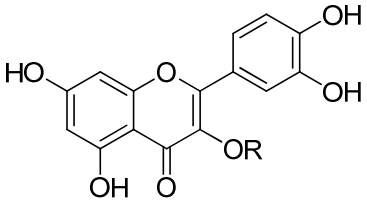



**27**




**28**

Flavonoly jsou v listech brusnice borůvky zastoupeny jak volné, tak vázané ve formě glykosidů: quercetin-3-*O*-arabinosid (**29**) (avicularin), quercetin-3-*O*-glukosid (**30**) (isoquercitrin), quercetin-3-*O*-rhamnosid (**31**) (quercitrin), quercetin-3-*O*--galaktosid (**32**) (hyperosid), quercetin-3-*O*-glukoglukosid (meratin), quercetin-3-*O*--glukuronid (**33**) a astragalin (**34**).[4,12,70-73]



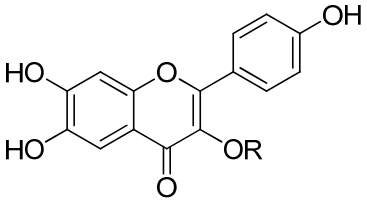

R = Ara **29**

R = Glc **30**

R = Rha **31**

R = Gal **32**

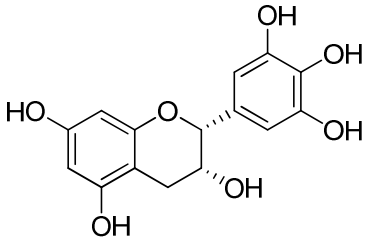
R = Glukuronid **33**




R = Glc **34**

*2.3.1.1.2. Flavanoly/ katechiny*

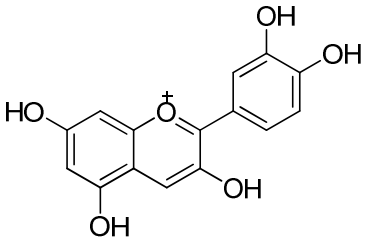
Mezi flavanoly zastoupené v listech brusnice borůvky patří (+)-katechin (**5**),[4,6,12,70,73,74] (-)-epikatechin (**6**)[6,70] a epigallokatechin (**35**).[70]



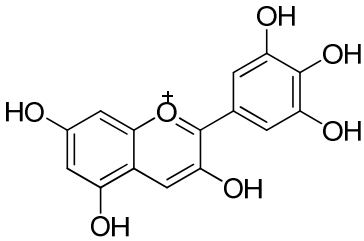

**35**

*2.3.1.1.3. Anthokyanidiny*

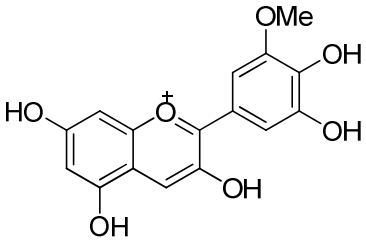
Z této skupiny sloučenin jsou v listech brusnice borůvky zastoupeny kyanidin (**36**), delphinidin (**37**), petunidin (**38**), peonidin (**39**) a malvidin (**40**).[68,70]



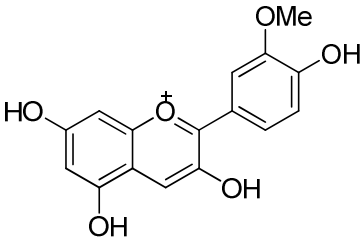

**36**



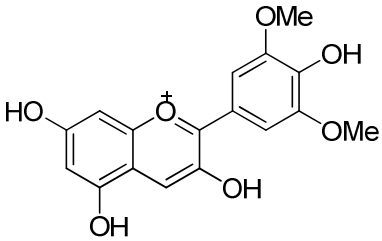

**37**




**38**



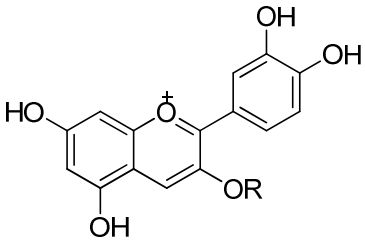

**39**



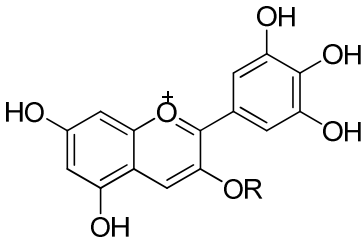

**40**

*2.3.1.1.4. Anthokyaniny*

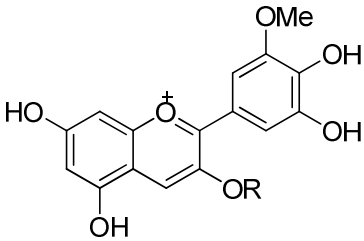
V listech brusnice borůvky je popsána přítomnost anthokyaninů: glykosidy arabinosy, glukosy a galaktosy s kyanidinem **41**, **42**, **43**, delphinidinem **44**, **45**, **46**, petunidinem **47**, **48**, **49**, peonidinem **50**, **51**, **52** a malvidinem **53**, **54**, **55**.[68,70]



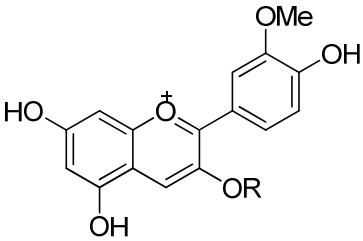
R = Ara **41**
R = Glc **42**
R = Gal **43**



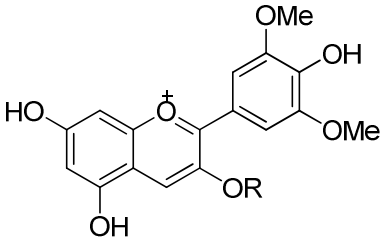
R = Ara **44**
R = Glc **45**
R = Gal **46**



R = Ara **47**
R = Glc **48**
R = Gal **49**



R = Ara **50**
R = Glc **51**
R = Gal **52**



R = Ara **53**
R = Glc **54**
R = Gal **55**

*2.3.1.1.5. Proanthokyanidiny*

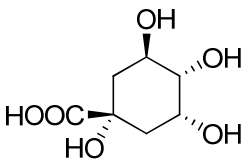
Prokyanidiny a prodelphinidiny patřící do skupiny látek označovaných jako polymerní proanthokyanidiny, jsou v listech brusnice borůvky také popsány.[6,18]

2.3.1.2. Další fenolické látky

Z dalších fenolických látek je v listech brusnice borůvky popsán výskyt arbutinu (**9**), [4,12,70,71,73] hydrochinonu[4,70] a cerylalkoholu.[70]

2.3.1.3. Fenolické a další organické kyseliny

V listech brusnice borůvky se vyskytují organické fenolické kyseliny a jejich deriváty. Jsou to: *p*-kumarová kyselina (**14**),[4,6,12,18,73,74] kávová kyselina (**10**),[4,6,12,18,74] ferulová kyselina (**13**),[6,18] protokatechová kyselina,[74] *p*-hydroxybenzoová kyselina,[74] chlorogenová kyselina (**11**),[4,12,73] vanilová kyselina (**15**),[4,12] chinová kyselina (**56**),[71] benzoová kyselina, citronová kyselina, gallová kyselina, jablečná kyselina a šťavelová kyselina.[70]




**56**

2.3.1.4. Sacharidy

Tato skupina látek je v listech zastoupena sacharosou, glukosou a fruktosou.[69]

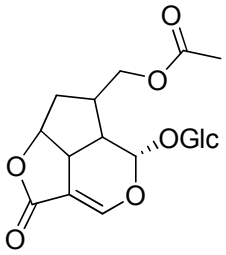
2.3.1.5. Aminokyseliny

V listech brusnice borůvky byl studován obsah aminokyselin. Ze základních aminokyselin jsou v listech přítomny: asparagin, glutamin, asparagová kyselina, serin, glutamová kyselina, arginin, glycin, threonin, alanin, 4-aminomáselná kyselina, prolin a ornithin.[40]

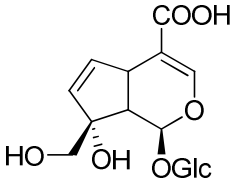
2.3.1.6. Izoprenoidy

*2.3.1.6.1. Monoterpeny*

V listech brusnice borůvky jsou popsány iridiové deriváty asperulosid (**57**) a monotropein (**58**).[70]



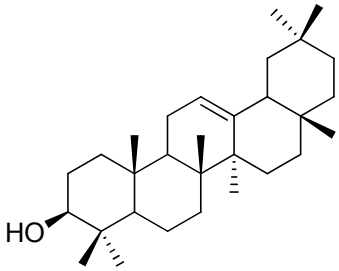

**57**




**58**

*2.3.1.6.2. Triterpenoidy*

Z triterpenoidů jsou v listech brusnice borůvky zastoupeny oleanová kyselina (**21**), ursolová kyselina (**22**) a β-amyrin (**59**).[17,70,71]




**59**

*2.3.1.6.3. Steroidy*

V listech brusnice borůvky jsou obsaženy steroidy 3β-sitosterol (**24**), stigmasterol (**26**) a kampesterol (**25**).[17]

2.3.1.7. Uhlovodíky

V listech brusnice borůvky byl prokázán výskyt uhlovodíku nonakosanu.[70]

### 2.3.2. Obsahové látky stonku brusnice borůvky

Chemotaxonomie stonků brusnice borůvky je v literatuře oproti listům popisována výrazně méně.

V literatuře je popsána studie věnovaná rozdílu v obsahu fenolických látek mezi listy a stonky.[4] Sumárně je ve stoncích obsaženo výrazně menší množství derivátů hydroxyskořicové kyseliny oproti listům a také menší množství flavonoidů, kde ovšem rozdíl není tak výrazný.[4] Z derivátu kyseliny hydroxyskořicové je ve stoncích brusnice borůvky zastoupena ve výrazně menším množství chlorogenová kyselina (**11**), ve větším množství je zastoupena kyselina kávová (**10**). Výrazně v menším množství jsou ve stoncích zastoupeny blíže nespecifikované quercetinové deriváty. V porovnání s listy je ve stoncích obsaženo větší množství flavonoidů.[4]

2.3.2.1. Anthokyaniny

Skupina anthokyaninů je ve stoncích brusnice borůvky zastoupena quercetinovými deriváty.[4]

2.3.2.2. Fenolické kyseliny

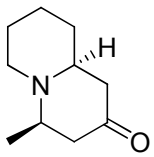
Ve stoncích je popsán obsah fenolických organických kyselin. Mezi ně patří deriváty hydroxyskořicové a *p*-kumarové kyseliny (**14**).[4] Chlorogenová kyselina (**11**) a kávová kyselina (**10**) jsou ve stoncích také popsány.[4]

2.3.2.3. Proanthokyanidiny

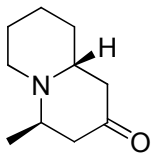
Prokyanidiny, patřící do skupiny látek označovaných jako polymerní proanthokyanidiny, jsou ve stonku také popsány.[18]

2.3.2.4. Alkaloidy

Ve stoncích jsou přítomny i alkaloidy. Konkrétně je popsán obsah epimyrtinu (**60**) a myrtinu (**61**).[70,75]




**60**




**61**

2.3.2.5. Izoprenoidy

V literatuře je popsán obsah izoprenoidů, a to steroidu 3β-sitosterolu (**24**), který je ve stonku zastoupen ve výrazně větším množství než v listech.[17]

# 3. Motivace a cíle práce

Studium přírodních látek je tradiční disciplínou organické chemie, která má bohatou historii. Se zdokonalováním izolačních technik (především různých chromatografií) a identifikačních technik (spektrální metody) jsou studovány obsahové látky různých živých organismů stále podrobněji. S rozvojem technik, umožňujících velmi rychlé stanovení biologických aktivit, se v současné době objevuje i nový trend - cílené hledání biologicky aktivních sloučenin. Extrakt z rostlin je nahrubo frakcionován a u jednotlivých frakcí je zjišťována jejich aktivita, často proti desítkám virů, mikroorganismů a nádorových linií. Zajímavé frakce jsou dále děleny až do nalezení chemického individua(í) zodpovědných za aktivitu.

Pro nezvykle vysoký obsah anthokyaninů a flavonoidů je celosvětově velký zájem o studium těchto obsahových látek plodů brusnice borůvky a jejich účinků především na lidské zdraví. Nejen extrakty z plodů, ale také z listů, jsou součástí řady přípravků používaných v lidovém léčitelství i v medicíně k léčbě močových kamenů, zánětů močových cest a ústní dutiny, kurdějí, kašle, tuberkulózy, průjmových onemocnění a ke snižování hladiny cukru v krvi. Za léčivé účinky extraktů jsou odpovědné nejen flavonoidní látky, ale také izoprenoidní sloučeniny a další. Např. obsah oleanové kyseliny a dalších izoprenoidních sloučenin v listech brusnice borůvky je často v nevědeckých zdrojích zmiňován, avšak chybí vědecké podklady. V publikacích týkajících se přírodních látek jsou obvykle popisovány izolace pouze jednoho typu sloučenin – frakce anthokyaninů, flavonoidů, fenolických látek, sacharidů, izoprenoidů – podle tématiky, kterou se zabývá a pro kterou je vybaveno dané pracoviště.

Cílem této dizertační práce bylo komplexní studium všech obsahových látek, které přejdou do methanolického extraktu jak stonku, tak i listu brusnice borůvky. Prvním dílčím cílem práce bylo prostudovat složení nepolární fáze methanolického extraktu s větší pozorností soustředěnou na izoprenoidní sloučeniny pro jejich známé biologické aktivity. Úkolem bylo identifikovat izolované látky a případně plně charakterizovat nové sloučeniny.

Po prostudování nepolární fáze bylo dalším dílčím cílem studium obsahových látek v polární fázi methanolického extraktu jak stonku, tak i listu brusnice borůvky. Úkolem bylo opět identifikovat izolované sloučeniny a případně plně charakterizovat látky nové, dosud nepopsané.

# 4. Diskuze a výsledky

Na vzduchu sušené stonky i listy brusnice borůvky byly extrahovány methanolem. Následně byly methanolické extrakty **S1**/resp. **L1** v rámci hrubého dělení vysráženy vodou (viz schéma 1 resp. schéma 2). Získaná methanolická fáze **S2/L2** byla poté vysrážena hexanem a vodná fáze **S3**/**L3** byla vysrážena diethyletherem. Byly získány methanolická fáze **S4/L4**, hexanová fáze **S5**/**L5**, vodná fáze **S8**/**L8** a etherická fáze **S9/L9**.

## 4.1. Postup dělení methanolického extraktu stonku brusnice borůvky

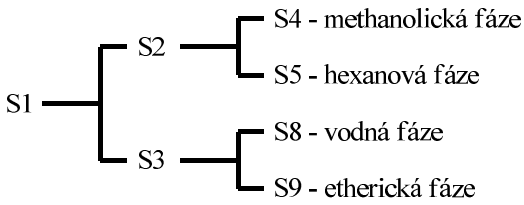



*Schéma 1*

### 4.1.1. Rozbor methanolické fáze S4

V chloroformu rozpustná část methanolické fáze **S4** byla dělena sloupcovou chromatografií. Obsahově zajímavé frakce byly rechromatografovány. Ve frakcích byly přítomny triterpenoidní sloučeniny oleanová kyselina (**21**), ursolová kyselina (**22**) a steroid 3β-sitosterol (**24**).

### 4.1.2. Rozbor hexanové fáze S5

Rozbor frakcí získaných gradientovou sloupcovou chromatografií a následnými rechromatografiemi ukázal na obsah triterpenoidních a steroidních sloučenin. Z triterpenoidních sloučenin jsou v hexanové fázi obsaženy oleananové deriváty: β-amyrin (**59**), oleanová kyselina (**21**) a nová látka 3β,12β-dihydroxyolean-28→13-olid (**62**), ursanové deriváty: α-amyrin (**63**) a ursolová kyselina (**22**), glutanové deriváty: glutinol (**64**), tokoferoly: vitamin E (**65**) a steroid: 3β-sitosterol (**24**).

Sloučenina **62** byla získána chromatografickým dělením hexanové fáze **S5**. Mobilními fázemi Hex : $Et_2O$ 4:1 a 3:1 byla vymyta frakce **S97**, která byla následně

dále chromatograficky dělena. Ze sloupcové chromatografie frakce **S97** byla mobilními fázemi Hex : $Et_2O$ 3:1, 2:1, 1.5:1, 1:1 eluována frakce **S215**, která byla čistá látka **62**.

Byly činěny také pokusy o získání čistého α-amyrinu (**63**) a čisté ursolové kyseliny (**22**) opakovanými krystalizacemi či jemným dělením, které ovšem v tomto případě nebyly úspěšné. Z $^1$H NMR spekter frakcí obsahujících α-amyrin (**63**), β-amyrin (**59**), oleanovou kyselinu (**21**) a ursolovou kyselinu (**22**) byl proveden odhad množství těchto látek v methanolickém extraktu stonku brusnice borůvky (viz tab. I).

Tabulka I. Procentuální zastoupení látek **21**, **22**, **59** a **63** vztažené na methanolický extrakt stonku brusnice borůvky.

| | **63** | **59** | **21** | **22** |
|---|---|---|---|---|
| množství (mg) | 36 | 955 | 190 | 743 |
| % zastoupení | 0.03 % | 0.70 % | 0.14 % | 0.55 % |

Z hexanové fáze byla identifikována struktura následujících látek:

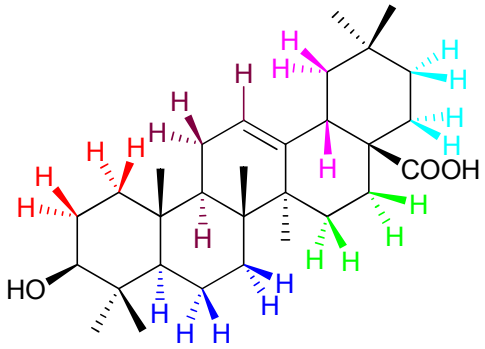
4.1.2.1. Určení struktur triterpenoidů

Pro určení struktury a úplné přiřazení signálů vodíkovým a uhlíkovým atomům triterpenoidních látek jsou zapotřebí 1D i 2D NMR techniky. $^1$H NMR spektra triterpenoidů jsou vzhledem k velkému počtu překrývajících se signálů v oblasti δ 1-2 ppm komplikovaná. Analýzou $^1$H NMR spektra lze přesto získat cenné informace z chemických posunů a interakčních konstant signálů mimo oblast překryvu (přítomnost funkčních skupin, násobných vazeb apod.). Velmi důležitými signály jsou také charakteristické intenzivní signály methylových skupin, jejichž počet příp. multiplicita napoví mnohé o skeletálním typu studované triterpenoidní sloučeniny. Důležité stereochemické informace poskytuje analýza interakčních konstant.[76]

V dekaplovaných $^{13}$C NMR spektrech tvoří signály singlety, obvykle jsou dobře rozlišeny a každému uhlíkovému atomu přísluší jeden signál. Z chemických posunů v $^{13}$C NMR spektru je možné usuzovat na přítomnost např. karbonylových skupin, karboxylových skupin, olefinických uhlíků nebo alifatických uhlíků s elektronegativním substituentem. Pokročilé techniky měření dekaplovaných spekter (např. APT nebo DEPT) umožňují určit počet přímo vázaných vodíkových atomů a rozlišit tak $CH_3$, $CH_2$, CH a C signály.[76]

Použití 2D homokorelovaných spekter (např. COSY, TOCSY, NOESY, ROESY) v kombinaci s heterokorelovanými spektry (např. HSQC, HMBC) umožňuje zcela jednoznačné přiřazení vodíkových a uhlíkových signálů jednotlivým atomům v molekule. Krospíky v COSY spektrech představují korelaci vodíků interagujících po vazbách. TOCSY spektrum ukazuje korelace všech vodíků patřících k jednomu spinovému systému (viz obr. 3). Pomocí COSY a TOCSY spekter lze prokázat spinové systémy, které jsou v molekule triterpenoidu odděleny kvarterními uhlíkovými atomy. Krospíky v NOESY spektru indikují dipolární interakce a představují tedy korelace prostorově blízkých vodíků. Korelaci uhlíkových atomů s jejich přímo vázanými vodíky získáme pomocí jednokvantové koherence v tzv. HSQC experimentu. HMBC experiment poskytuje informace o $^{1}H$-$^{13}C$ konektivitách mezi vodíkovými a uhlíkovými atomy oddělenými dvěma nebo třemi vazbami.[76]

Podrobnou analýzou všech NMR spekter naměřených výše zmíněnými technikami se podařilo určit struktury sloučenin izolovaných v rámci této práce a zároveň bylo provedeno jednoznačné přiřazení jejich vodíkových a uhlíkových signálů.




**21**

*Obr. 3. Příklad spinových systémů v triterpenoidní molekule*

*4.1.2.1.1. Oleananové deriváty*

Oleanová kyselina (**21**)

Analýzou protonového spektra izolované látky (**21**) byla zjištěna přítomnost dvojné vazby, hydroxylové skupiny a sedmi methylových skupin. Na dvojné vazbě je pouze jeden vodík H-12, triplet s chemickým posunem δ 5.28 ppm. Přítomnost hydroxylové skupiny na C-3 potvrzuje multiplet s chemickým posunem 3.22 ppm. V $^{1}H$ NMR spektru je také patrný dublet dubletů (δ 2.82 ppm) patřící vodíku H-18, který svým chemickým posunem ukazuje na přítomnost elektronakceptorové skupiny

v blízkém okolí. Sedm singletů s integrální intenzitou tří vodíků a chemickými posuny 0.78, 0.78, 0.90, 0.91, 0.93, 0.99 a 1.14 ppm odpovídá sedmi methylovým skupinám. $^{13}C$ NMR a DEPT spektra poskytují informaci o počtu 30 atomů uhlíků ve struktuře a jejich charakteru: sedm $CH_3$, deset $CH_2$ a pět CH skupin a osm kvarterních uhlíkových atomů. Z chemických posunů signálů uhlíkových atomů lze soudit na přítomnost karboxylové kyseliny (δ 180.75 ppm), dvojné vazby (δ 143.74 a 122.14 ppm) a hydroxylové skupiny (δ 78.75 ppm). Ze získaných informací je patrné, že se jedná o triterpenoidní strukturu s jednou hydroxylovou skupinou, jednou dvojnou vazbou a jednou karboxylovou skupinou.

Analýzou 2D homokorelovaných spekter (COSY, TOCSY a NOESY) a heterokorelovaných spekter (HSQC, HMBC) bylo provedeno kompletní přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů (viz tab. III). Rozborem HSQC spektra byly získány chemické posuny všech vodíkových atomů, které jsou v protonovém spektru překryté, a to vodíkové atomy v oblasti δ 0.74 – 2.60 ppm.

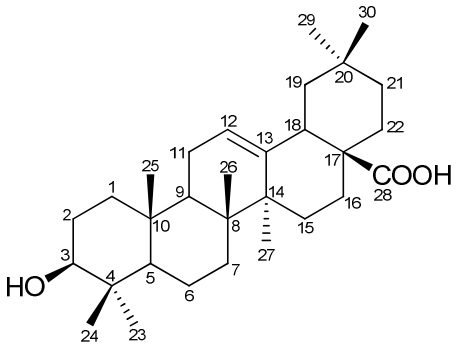
Z kontaktů pozorovaných v NOESY spektru sloučeniny **21** (viz tab. II) byla získána informace o konfiguraci studované struktury.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **21**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **21** má strukturu oleanové kyseliny.[77-82]

Oleanová kyselina (**21**) vykazuje řadu biologických aktivit, např. protinádorovou, apoptosivní (uvolnění a odpadnutí kožního strupu), antioxidativní, cytotoxickou, antiangiogenní, protizánětlivou, hepatoprotektivní a gastroprotektivní aktivitu.[83,84]

Tabulka II. Vybrané NOESY kontakty vodíkových atomů ve sloučenině **21**

| Vodíkový atom | NOESY kontakty |
|---|---|
| H-3α | H-1α, H-2α, H-5α, H-23 |
| H-5α | H-6α, H-6β, H-9α, H-23 |
| H-12 | H-11α, H-11β, H-18β, H-19β |
| H-24β | H-2β, H-6β, H-23, H-25 |
| H-25β | H-1β, H-2β, H-11β, H-26 |
| H-26β | H-6β, H-7β, H-11β, H-15β |
| H-27α | H-7α, H-9α, H-16α, H-22α, H-29 |
| H-29α | H-19α, H-19β, H-21α, H-30 |
| H-30β | H-18β, H-21α, H-21α, H-22β |




**21**

Tabulka III. $^{1}$H a $^{13}$C NMR látky **21**.

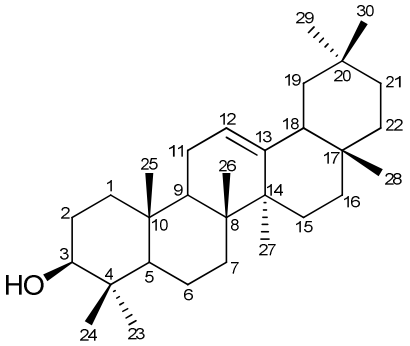
| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 38.31 | 1α | 0.97 |
| | | 1β | 1.61 |
| 2 | 26.69 | 2α | 1.60 |
| | | 2β | 1.60 |
| 3 | 78.75 | 3α | 3.22 (*m*, ∑*J*=16.0 Hz) |
| 4 | 38.56 | | |
| 5 | 55.08 | 5α | 0.74 |
| 6 | 18.18 | 6α | 1.56 |
| | | 6β | 1.42 |
| 7 | 32.57 | 7α | 1.43 |
| | | 7β | 1.30 |
| 8 | 39.09 | | |
| 9 | 47.48 | 9α | 1.54 |
| 10 | 36.86 | | |
| 11 | 23.25 | 11α | 1.88 |
| | | 11β | 1.88 |
| 12 | 122.14 | 12 | 5.28 (*t*, *J*=3.4 Hz) |
| 13 | 143.74 | | |
| 14 | 41.58 | | |
| 15 | 27.53 | 15α | 1.07 |
| | | 15β | 1.72 |
| 16 | 22.88 | 16α | 1.97 (*td*, $J_1$=13.6 Hz, $J_2$=3.6 Hz) |
| | | 16β | 1.60 |
| 17 | 46.25 | | |
| 18 | 41.06 | 18β | 2.82 (*dd*, $J_1$=13.8 Hz, $J_2$=3.8 Hz) |
| 19 | 45.82 | 19α | 1.63 |
| | | 19β | 1.14 |
| 20 | 30.57 | | |
| 21 | 33.72 | 21α | 1.33 |
| | | 21β | 1.21 |
| 22 | 32.39 | 22α | 1.56 |
| | | 22β | 1.75 |
| 23 | 27.86 | 23α | 0.99 (*s*, 3H) |
| 24 | 15.41 | 24β | 0.78 (*s*, 3H) |
| 25 | 15.13 | 25β | 0.91 (*s*, 3H) |
| 26 | 16.67 | 26β | 0.78 (*s*, 3H) |
| 27 | 25.72 | 27α | 1.14 (*s*, 3H) |
| 28 | 180.75 | | |
| 29 | 32.92 | 29α | 0.90 (*s*, 3H) |
| 30 | 23.39 | 30β | 0.93 (*s*, 3H) |

β-Amyrin (**59**)

Analýza 1D a 2D NMR spekter látky **59** je obdobná jako v případě sloučeniny **21**. Kombinací $^{1}H$, $^{13}C$ NMR a DEPT spekter byla získána informace o přítomnosti hydroxylové skupiny na atomu uhlíku C-3 (δ 79.01 ppm) s konfigurací 3β, dvojné vazby na C-12 (δ 145.18 a 121.70 ppm) a osmi methylových skupin. Signál vodíkového atomu H-3α má chemický posun δ 3.22 ppm, signál vodíkového atomu H-12 je triplet s chemickým posunem δ 5.18 ppm a signály vodíkových atomů methylových skupin s integrální intenzitou tří vodíků jsou singlety s chemickým posunem δ 0.79, 0.83, 0.87, 0.87, 0.94, 0.97, 1.00 a dublet s chemickým posunem δ 1.14 ppm (viz tab. IV). V NOESY spektru látky **59** jsou stejné krospíky mezi atomy vodíků jako u látky **21**. Nové jsou zde krospíky vodíkových atomů methylové skupiny H-28β s atomy vodíků H-15α, H-16α, H-18β, H-22α a H-26β.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **59**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **59** má strukturu β-amyrinu.[77,85-91]

β-Amyrin (**59**), stejně jako oleanová kyselina, vykazuje řadu biologických aktivit, např. protinádorovou, apoptosivní (uvolnění a odpadnutí kožního strupu), antioxidativní, cytotoxickou, antiangiogenní, protizánětlivou, hepatoprotektivní a gastroprotektivní aktivitu.[84]




**59**

Tabulka IV. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **59**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 38.56 | 1α | 0.97 |
| | | 1β | 1.62 |
| 2 | 27.21 | 2α | 1.60 |
| | | 2β | 1.60 |
| 3 | 79.01 | 3α | 3.22 (*m*, ∑*J*=16 Hz) |
| 4 | 38.76 | | |
| 5 | 55.14 | 5α | 0.74 |
| 6 | 18.35 | 6α | 1.57 |
| | | 6β | 1.45 |
| 7 | 32.62 | 7α | 1.34 |
| | | 7β | 1.51 |
| 8 | 39.76 | | |
| 9 | 47.61 | 9α | 1.55 |
| 10 | 36.92 | | |
| 11 | 23.51 | 11α | 1.87 |
| | | 11β | 1.87 |
| 12 | 121.70 | 12 | 5.18 (*t*, *J*=3.6 Hz) |
| 13 | 145.18 | | |
| 14 | 41.69 | | |
| 15 | 26.13 | 15α | 0.96 |
| | | 15β | 1.76 |
| 16 | 26.91 | 16α | 1.99 (*td*, $J_1$=13.6, $J_2$=4.4 Hz) |
| | | 16β | 0.80 |
| 17 | 32.47 | | |
| 18 | 47.20 | 18β | 1.94 |
| 19 | 46.80 | 19α | 1.66 (*t*, *J*=13.2 Hz) |
| | | 19β | 1.00 |
| 20 | 31.07 | | |
| 21 | 34.71 | 21α | 1.33 |
| | | 21β | 1.10 |
| 22 | 37.12 | 22α | 1.21 |
| | | 22β | 1.42 |
| 23 | 28.08 | 23α | 1.00 (*s*, 3H) |
| 24 | 15.58 | 24β | 0.79 (*s*, 3H) |
| 25 | 15.49 | 25β | 0.94 (*s*, 3H) |
| 26 | 16.78 | 26β | 0.97 (*s*, 3H) |
| 27 | 25.98 | 27α | 1.14 (*d*, *J*=0.8 Hz, 3H) |
| 28 | 28.39 | 28β | 0.83 (*s*, 3H) |
| 29 | 33.33 | 29α | 0.87 (*s*, 3H) |
| 30 | 23.68 | 30β | 0.87 (*s*, 3H) |

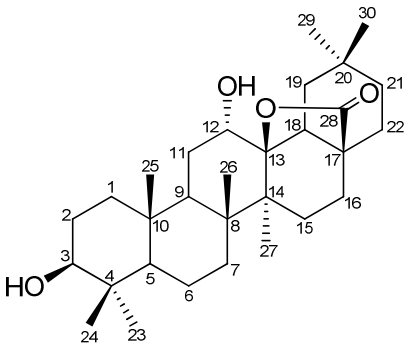
3β,12β-dihydroxyoleanan-28→13β-olid (**62**)

Analýza $^{1}H$ NMR spektra látky **62** ukazuje na přítomnost dvou hydroxylových skupin, o čemž svědčí signál vodíkového atomu H-3α s chemickým posunem δ 3.22 ppm, odpovídající konfiguraci hydroxylové skupiny 3β a signál vodíkového atomu H-12α s chemickým posunem δ 4.20 ppm. Dále byly ve spektru nalezeny intenzivní signály, singlety s integrální intenzitou tří vodíků, odpovídající sedmi methylovým skupinám s chemickým posunem δ 0.78, 0.90, 0.92, 0.99 1.01, 1.20 a

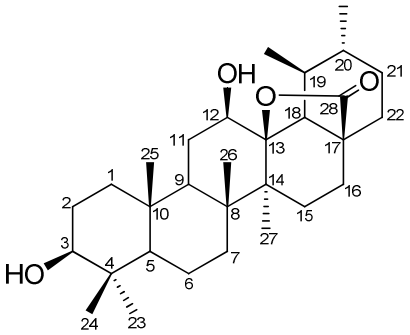
1.42 ppm. Chemický posun signálu vodíkových atomů methylové skupiny H-27 ukazuje na přítomnost elektronakceptorového substituentu v blízkém okolí. V $^{13}C$ NMR a DEPT spektru jsou signály uhlíkových atomů patřící sedmi $CH_3$, deseti $CH_2$ a pěti CH skupinám a osmi kvarterním uhlíkovým atomům. Chemické posuny signálů uhlíkových atomů ukazují přítomnost dvou hydroxylových skupin na C-3 a C-12 (δ 78.07 a 64.57 ppm) a laktonového kruhu C-28→C-13 (δ 91.99 a 179.79 ppm).

Analýzou 2D homokorelovaných spekter (COSY, TOCSY a NOESY) a heterokorelovaných spekter (HSQC, HMBC) bylo provedeno kompletní přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů (viz tab. VI). Konfigurace jednotlivých center je potvrzena především z kontaktů nalezených v NOESY spektru (viz tab. V).

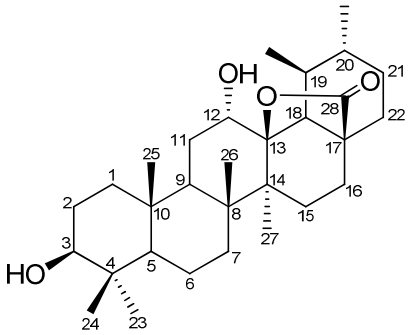
V literatuře je popsán epimer látky **62** 3β,12α-dihydroxyoleanan-28→13β-olid (**66**) s opačnou konfigurací hydroxylové skupiny na C-12.[84,92,93] Přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů struktury **62** v této práci se významně liší oproti přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů struktury **66** v literatuře, především v chemickém posunu signálu C-12 a také chemickým posunem vodíkového signálu H-12. V literatuře je popsána obdobná struktura ursanového typu, kde jsou uvedeny NMR přiřazení obou izomerů: 3β,12β-dihydroxyursan-28→13β-olidu (**67**) a 3β,12α-dihydroxyursan-28→13β-olidu (**68**).[94] Porovnání chemických posunů signálů vodíkových a uhlíkových atomů látek **67** a **68** a následně porovnání chemických posunů v NMR přiřazení signálů látky **62** s chemickými posuny signálů vodíkových a uhlíkových atomů **66** a vzhledem k přihlédnutí ke strukturní odlišnosti oleananové a ursanové struktury byla navržena absolutní konfigurace na C-12 izolované látky **62** jako H-12α.




**66**



**67**

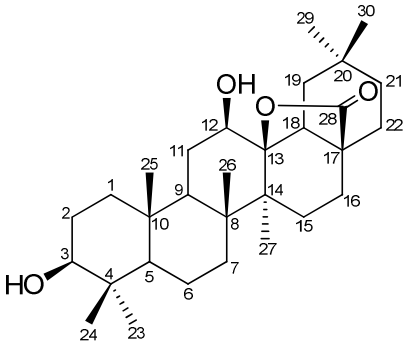


**68**

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **62**. Tato látka dosud nebyla v brusnici borůvce ani v jiné rostlině identifikována a jedná se o látku novou.

Tabulka V. Vybrané NOESY kontakty vodíkových atomů ve sloučenině **62**

| Vodíkový atom | NOESY kontakty |
|---|---|
| H-3α | H-1α, H-5α, H-23α |
| H-5α | H-1α, H-6α, H-7α, H-9α, H-23α |
| H-12α | H-11α, H-18β, H-19α |
| H-23α | H-24β |
| H-24β | H-2β, H-6β, H-25β |
| H-25β | H-2β, H-11β, H-26β |
| H-26β | H-11β, H-15α |
| H-27α | H-9β, H-18β, H-16α, H-21α, H-21β |
| H-29α | H-19α, H-19β, H-21α, H-30β |
| H-30β | H-18β, H-19α, H-22α |



**62**

Tabulka VI. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **62**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 38.25 | 1α | 1.04 |
| | | 1β | 1.70 |
| 2 | 27.06 | 2α | 1.62 |
| | | 2β | 1.62 |
| 3 | 78.07 | 3α | 3.22 (*m*, ∑*J*=16.4 Hz) |
| 4 | 38.53 | | |
| 5 | 54.95 | 5α | 0.78 |
| 6 | 17.96 | 6α | 1.54 |
| | | 6β | 1.42 |
| 7 | 34.11 | 7α | 1.27 |
| | | 7β | 1.55 |
| 8 | 42.68[a] | | |
| 9 | 44.45 | 9α | 1.72 |
| 10 | 36.13 | | |
| 11 | 28.99 | 11α | 1.72 |
| | | 11β | 2.23 |
| 12 | 64.57 | 12α | 4.20 (*dd*, $J_1$=4.0 Hz, $J_2$=2.0 Hz) |
| 13 | 91.99 | | |
| 14 | 42.03[a] | | |
| 15 | 28.66 | 15α | 1.93 |
| | | 15β | 1.18 |
| 16 | 20.95 | 16α | 2.12 |
| | | 16β | 1.25 |
| 17 | 45.21 | | |
| 18 | 51.62 | 18β | 2.00 |
| 19 | 39.44 | 19α | 2.14 |
| | | 19β | 2.00 |
| 20 | 31.42 | | |
| 21 | 33.48 | 21α | 1.34 |
| | | 21β | 1.25 |
| 22 | 26.35 | 22α | 1.66 |
| | | 22β | 1.55 |
| 23 | 27.46 | 23α | 0.99 (*s*, 3H) |
| 24 | 15.01 | 24β | 0.78 (*s*, 3H) |
| 25 | 16.30 | 25β | 0.90 (*s*, 3H) |
| 26 | 18.35 | 26β | 1.20 (*s*, 3H) |
| 27 | 19.82 | 27α | 1.42 (*s*, 3H) |
| 28 | 179.79 | | |
| 29 | 32.74 | 29α | 1.01 (*s*, 3H) |
| 30 | 23.16 | 30β | 0.92 (*s*, 3H) |

[a]signály mohou být zaměněny

*4.1.2.1.2. Glutanové deriváty*

Glutinol (**64**)

Analýzou protonového spektra látky **64** byla získána informace o přítomnosti dvojné vazby C-5 – C-6, hydroxylové skupiny na C-3 a osmi methylových skupin ve struktuře izolované látky. Signál vodíkového atomu na dvojné vazbě H-6 má chemický posun δ 5.63 ppm. Přítomnost hydroxylové skupiny na C-3 potvrzuje signál vodíkového atomu H-3 s chemickým posunem δ 3.47 ppm. Osm singletů s integrální intenzitou tří

vodíků a chemickými posuny δ 0.85, 0.95, 0.99, 1.00, 1.04, 1.09, 1.14 a 1.16 odpovídá osmi methylovým skupinám. $^{13}C$ NMR a DEPT spektra poskytují informaci o počtu 30 atomů uhlíků ve struktuře a jejich charakteru: osm $CH_3$, deset $CH_2$ a pět CH skupin a sedm kvarterních uhlíkových atomů. Také z chemických posunů uhlíkových atomů lze soudit na přítomnost dvojné vazby (δ 141.56 a 122.07 ppm) a hydroxylové skupiny (δ 76.34 ppm). Ze získaných informací je patrné, že se jedná o triterpenoidní strukturu s jednou hydroxylovou skupinou a jednou dvojnou vazbou.

Analýzou 2D homokorelovaných (COSY, TOCSY a NOESY) a heterokorelovaných spekter (HSQC, HMBC) bylo provedeno kompletní přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů a byla získána informace o konfiguraci studované struktury látky **64** (viz tab. VIII). Rozborem HSQC spektra byly získány chemické posuny všech vodíkových atomů, které jsou v protonovém spektru překryté, a to vodíkové atomy v oblasti δ 0.90 – 2.01 ppm.

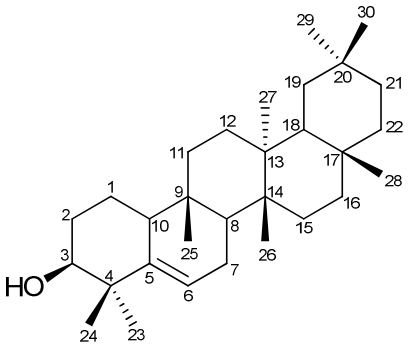
Studiem krospíků v NOESY spektru látky **64** (viz tab. VII) byla získána informace o konfiguraci izolované látky **64**.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **64**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **64** má strukturu glutinolu.[95-98]

Glutinol (**64**) je zodpovědný za protizánětlivé účinky rostliny *Scoparia dulcis*.[99]

Tabulka VII. Vybrané NOESY kontakty vodíkových atomů ve sloučenině **64**

| Vodíkový atom | NOESY kontakty |
|---|---|
| H-3α | H-2β, H-23α, H-24β |
| H-6 | H-7α, H-24β |
| H-23α | H-10α |
| H-25β | H-1β, H-7β, H-11β, H-12β, H-26β |
| H-26β | H-7β, H-18β |
| H-27α | H-8α, H-16α, H-19α |
| H-28β | H-18β, H-19β, H-21β, H-22β, H-30β |
| H-29α | H-19α, H-19β, H-21α, H-21β |
| H-30β | H-19β, H22β |




**64**

Tabulka VIII. $^{1}$H a $^{13}$C NMR látky **64**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 18.18 | 1α | 1.06 |
| | | 1β | 1.49 |
| 2 | 27.78 | 2α | 1.70 |
| | | 2β | 1.86 |
| 3 | 76.34 | 3α | 3.47 (*t*, *J*=3.4 Hz) |
| 4 | 40.81 | | |
| 5 | 141.56 | | |
| 6 | 122.07 | 6 | 5.63 (*bd*, *J*=6.1 Hz) |
| 7 | 23.61 | 7α | 1.86 |
| | | 7β | 2.00 |
| 8 | 47.40 | 8α | 1.52 |
| 9 | 34.81 | | |
| 10 | 49.65 | 10α | 2.00 |
| 11 | 34.58 | 11α | 1.38 |
| | | 11β | 1.54 |
| 12 | 30.33 | 12α | 1.36 |
| | | 12β | 1.44 |
| 13 | 39.27 | | |
| 14 | 37.81 | | |
| 15 | 32.04 | 15α | 1.30 |
| | | 15β | 1.50 |
| 16 | 35.99 | 16α | 1.38 |
| | | 16β | 1.56 |
| 17 | 30.06 | | |
| 18 | 43.02 | 18β | 1.57 |
| 19 | 35.04 | 19α | 1.23 |
| | | 19β | 1.38 |
| 20 | 28.23 | | |
| 21 | 33.08 | 21α | 1.26 |
| | | 21β | 1.48 |
| 22 | 38.93 | 22α | 0.94 |
| | | 22β | 1.52 |
| 23 | 28.92 | 23α | 1.04 (*s*, 3H) |
| 24 | 25.44 | 24β | 1.14 (*s*, 3H) |
| 25 | 16.19 | 25β | 0.85 (*s*, 3H) |
| 26 | 19.60 | 26β | 1.09 (*s*, 3H) |
| 27 | 18.41 | 27α | 1.00 (*s*, 3H) |
| 28 | 32.02 | 28β | 1.16 (*s*, 3H) |
| 29 | 34.51 | 29α | 0.95 (*s*, 3H) |
| 30 | 32.38 | 30β | 0.99 (s, 3H) |

*4.1.2.1.3. Tokoferoly*

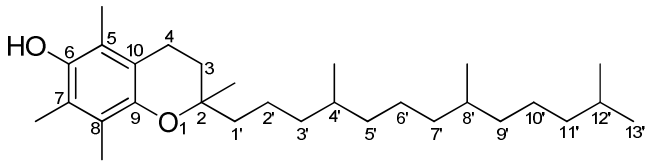
Vitamin E (**65**)

Struktura látky **65** je potvrzena analýzou 1D a 2D NMR spekter. Z $^{1}$H NMR spektra je patrná přítomnost signálů vodíkových atomů tří methylových skupin na aromatickém jádře ve tvaru singletů s integrální intenzitou tří vodíků a chemickými posuny δ 2.11, 2.11 a 2.16 ppm. Čtyři dublety a jeden singlet signálů vodíkových atomů s integrální intenzitou tří vodíků a chemickými posuny δ 0.84, 0.85, 0.87, 0.87 a 1.22 ppm odpovídají pěti methylovým skupinám na alifatickém řetězci. Dále jsou z $^{1}$H NMR spektra patrné signály alifatických vodíkových atomů překryté v oblasti s chemickým posunem δ 1.00 – 1.90 ppm a triplet s chemickým posunem δ 2.60 ppm. Z $^{13}$C NMR a DEPT spektra byla potvrzena informace o počtu a charakteru uhlíkových atomů: osm $CH_3$, jedenáct $CH_2$ a tři CH skupiny a sedm kvarterních uhlíkových atomů.

Analýzou 2D homokorelovaných (COSY, TOCSY a NOESY) a heterokorelovaných spekter (HSQC, HMBC) bylo provedeno přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů látky **65** (viz tab. IX), avšak některé vodíkové a uhlíkové atomy s podobným chemickým signálem nelze rozlišit. Rozborem HSQC spektra jsou získány chemické posuny všech vodíkových atomů, které jsou v protonovém spektru překryty. Informace o $^{1}$H-$^{13}$C konektivitách mezi vodíkovými a uhlíkovými atomy oddělenými dvěma nebo třemi vazbami poskytuje HMBC spektrum. V NOESY spektru jsou zřetelné krospíky vodíkových atomů H-4α a H-4β s vodíkovými atomy methylových skupin na uhlíkových atomech C-5 a C-2 a vodíkovými atomy H-3α a H-3β.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **65**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **65** má strukturu vitaminu E.[100]

Vitamin E (**65**) má schopnost napravovat škody napáchané volnými radikály a předpokládá se jeho role v prevenci Alzheimerovy choroby a rakoviny.[63]




**65**

Tabulka IX. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **65**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 2 | 74.50 | | |
| 3 | 31.52 | 3 | 1.78 (*dt*, $J_1$=11.6 Hz, $J_2$=6.8 Hz, 2H) |
| 4 | 20.74 | 4 | 2.60 (*t*, *J*=6.8 Hz, 2H) |
| 5 | 118.44 | | |
| 6 | 144.50 | | |
| 7 | 120.97 | | |
| 8 | 122.60 | | |
| 9 | 145.51 | | |
| 10 | 117.34 | | |
| 1´ | 39.77 | 1´ | 1.51 (*dd*, $J_1$=13.2 Hz, $J_1$=6.4 Hz, 2H) |
| 2´ | 21.02 | 2´ | 1.38 (2H) |
| 3´ | 37.43[b] | | 1.04[a] (2H) |
| 4´ | 32.69 | 4´ | 1.38 (1H) |
| 5´ | 37.41[b] | | 1.04[a] (2H) |
| 6´ | 24.43 | 6´ | 1.24 (2H) |
| 7´ | 37.26[b] | | 1.24[a] (2H) |
| 8´ | 32.78 | 8´ | 1.38 (1H) |
| 9´ | 37.43[b] | | 1.24[a] (2H) |
| 10´ | 24.79 | 10´ | 1.24 (2H) |
| 11´ | 39.35 | 11´ | 1.13 (2H) |
| 12´ | 27.97 | 12´ | 1.49 (1H) |
| 13´ | 22.62 | 13´ | 0.87 (*d*, *J*=6.4 Hz, 3H) |
| 2-$CH_3$ | 23.78 | | 1.22 (*s*, 3H) |
| 5-$CH_3$ | 11.27 | | 2.11 (*s*, 3H) |
| 7-$CH_3$ | 12.21 | | 2.16 (*s*, 3H) |
| 8-$CH_3$ | 11.77 | | 2.11 (*s*, 3H) |
| 4´-$CH_3$ | 19.74[c] | | 0.85 (*d*, *J*=6.4 Hz, 3H) |
| 8´-$CH_3$ | 19.64[c] | | 0.84 (*d*, *J*=6.4 Hz, 3H) |
| 12´-$CH_3$ | 22.71 | | 0.87 (*d*, *J*=6.4 Hz, 3H) |
| C6-OH | - | | 4.18 *s* |

[a,b,c]signály mohou být zaměněny

*4.1.2.1.4. Steroidy*

3β-Sitosterol (**24**)

Analýzou $^{1}H$ NMR spektra látky **24** byla získána informace o přítomnosti dvojné vazby C-5 – C-6, hydroxylové skupiny na C-3 a šesti methylových skupin. Na dvojné vazbě je pouze jeden vodík H-6, signál vodíkového atomu má chemický posun δ 5.35 ppm. Přítomnost hydroxylové skupiny na C-3 potvrzuje signál vodíkového atomu s chemickým posunem δ 3.50. Dva singlety, tři dublety a jeden triplet s integrální intenzitou tří vodíků a chemickými posuny δ 0.68, 0.81, 0.84, 0.85, 0.92, 1.01 ppm odpovídá šesti methylovým skupinám. Hodnoty interakčních konstant mezi vodíkovými atomy H-20 – H-21, H-25 – H-26, H-25 – H-27, H-28 – H-29 (*J*=6.8 Hz, 7.2 Hz, 6.8 Hz a 7.6 Hz) odpovídají vazbě $CH_3$-CH s volnou rotací. $^{13}C$ NMR a DEPT spektra poskytují informaci o počtu 29 atomů uhlíků ve struktuře a jejich charakteru: šesti $CH_3$, jedenácti $CH_2$ a devíti CH skupin a tří kvarterních uhlíkových atomů. Také

z chemických posunů uhlíkových atomů lze soudit na přítomnost dvojné vazby (δ 140.70 a 121.54 ppm) a hydroxylové skupiny (δ 71.38 ppm). Ze získaných informací je patrné, že se jedná o steroidní strukturu s jednou hydroxylovou skupinou a jednou dvojnou vazbou.

Analýzou 2D homokorelovaných (COSY, TOCSY a NOESY) a heterokorelovaných spekter (HSQC, HMBC) bylo provedeno kompletní přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů a byla získána informace o úplné konfiguraci studované látky (viz tab. XI). Rozborem HSQC spektra jsou získány chemické posuny signálů všech vodíkových atomů, které jsou v protonovém spektru překryté, a to vodíkové atomy v oblasti δ 0.65 – 2.30 ppm.

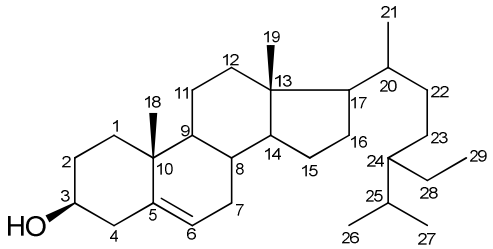
Studiem krospíků v NOESY spektru **24** (viz tab. X) byla získána informace o konfiguraci studované látky **24**.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **24**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **24** má strukturu 3β-sitosterolu.[88,91,101-103]

3β-sitosterol (**24**) vykazuje stejně jako ostatní fytosteroly, zejména kampesterol a stigmasterol, protizánětlivé, antioxidativní, antiangiogenní a antikarcinogenní aktivitu a působí na snížení hladiny cholesterolu.[63,65]

Tabulka X. Vybrané NOESY kontakty vodíkových atomů ve sloučenině **24**

| Vodíkový atom | NOESY kontakty |
|---|---|
| H-3α | H-1α, H-2α, H-4α |
| H-6 | H-4α, H-7α, H-7β |
| H-18α | H-12β, H-14β, H-17β, H-19α, H-20α |
| H-19α | H-1β, H-2β, H-4β, H-7β, H-11β |




**24**

Tabulka XI. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **24**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 37.12 | 1α | 1.09 |
| | | 1β | 1.86 |
| 2 | 31.20 | 2α | 1.83 |
| | | 2β | 1.83 |
| 3 | 71.38 | 3α | 3.50 (*m*, ∑*J*=31.6 Hz) |
| 4 | 41.87 | 4α | 2.27 |
| | | 4β | 2.27 |
| 5 | 140.70 | | |
| 6 | 121.54 | 6 | 5.35 (*dt*, $J_1$=5.6 Hz, $J_2$=1.6 Hz) |
| 7 | 31.77 | 7α | 1.52 |
| | | 7β | 1.98 |
| 8 | 31.76 | 8 | 1.52 |
| 9 | 50.02 | 9 | 0.95 |
| 10 | 36.39 | | |
| 11 | 20.95 | 11α | 1.52 |
| | | 11β | 1.52 |
| 12 | 39.65 | 12 | 1.18 |
| | | 12 | 2.02 |
| 13 | 42.19 | | |
| 14 | 56.64 | 14α | 1.03 |
| 15 | 24.17 | 15 | 1.05 |
| | | 15 | 1.58 |
| 16 | 28.13 | 16 | 1.28 |
| | | 16 | 1.87 |
| 17 | 55.92 | 17 | 1.13 |
| 18 | 11.72 | 18α | 0.68 (*s*, 3H) |
| 19 | 19.25 | 19α | 1.01 (*s*, 3H) |
| 20 | 36.03 | 20 | 1.37 |
| 21 | 18.63 | 21 | 0.92 (*d*, $J_1$=6.8 Hz, 3H) |
| 22 | 33.80 | 22 | 1.03 |
| | | 22 | 1.34 |
| 23 | 25.91 | 23 | 1.17 |
| | | 23 | 1.17 |
| 24 | 45.70 | 24 | 0.95 |
| 25 | 29.00 | 25 | 1.68 |
| 26 | 19.67 | 26 | 0.84 (*d*, $J_1$=7.2 Hz, 3H) |
| 27 | 18.87 | 27 | 0.81 (*d*, $J_1$=6.8 Hz, 3H) |
| 28 | 22.92 | 28 | 1.34 |
| | | 28 | 1.34 |
| 29 | 11.83 | 29 | 0.85 (*t*, $J_1$=7.6 Hz, 3H) |

### 4.1.3. Rozbor vodné fáze S8

Vodná fáze byla chromatograficky dělena a obsahem zajímavé frakce byly dále rechromatografovány. Rozbor vodné fáze ukázal na obsah sacharidů: methyl-β-D--fruktopyranosid (**69**), methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**), methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**), sacharosa (**72**), 2-deoxy-L-ribono-1,4-lakton (**73**), iridoidů: monotropein (**58**) a derivátů pentandiolu: (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**), 4'*R*-(β-D--glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**).

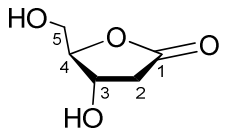
Z této fáze byly izolovány: 2-deoxy-L-ribono-1,4-lakton (**73**) a sacharosa (**72**)

4.1.3.1. Určení struktur sacharidů a látek jim strukturně podobných

2-Deoxy-L-ribono-1,4-lakton (**73**)

V protonovém spektru jsou dobře rozlišené signály v oblasti δ 2.50 – 4.60 ppm, které integrální intenzitou odpovídají 6 vodíkovým atomům. V uhlíkovém spektru je pět signálů. Z DEPT spektra je patrné, že se jedná o dvě $CH_2$ (δ 39.15 a 62.52 ppm) a dvě CH skupiny (δ 69.69 a 90.16 ppm) a jeden karboxylový uhlík (δ 181.38 ppm). Chemický posun 90.16 ppm značí vazbu na kyslík laktonového cyklu. Analýzou multiplicit a interakčních konstant signálů vodíkových atomů, COSY a HSQC spektra bylo provedeno úplné přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů izolované látky **73** (viz tab. XII).

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **73**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **73** má strukturu 2-deoxy-L-ribono-1,4-laktonu.[104,105]




**73**

Tabulka XII. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **73**.

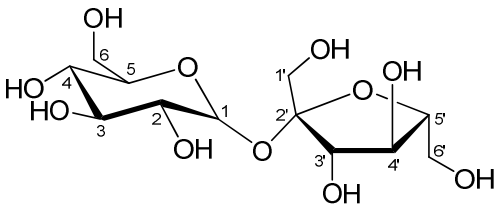
| **Uhlíky** | . | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 181.38 | | |
| 2 | 39.60 | 2 | 2.58 (*dd*, $J_1$=18.8 Hz, $J_2$=2.8 Hz) |
| | | | 3.06 (*dd*, $J_1$=18.8 Hz, $J_2$=7.2 Hz) |
| 3 | 70.14 | 3 | 4.55 (*dt*, $J_1$=7.2 Hz, $J_2$=2.4 Hz) |
| 4 | 90.81 | 4 | 4.58 (*dt*, $J_1$=4.4 Hz, $J_2$=2.8 Hz) |
| 5 | 62.84 | 5 | 3.77 (*dd*, $J_1$=13.2 Hz, $J_2$=4.4 Hz) |
| | | | 3.88 (*dd*, $J_1$=12.8 Hz, $J_2$=3.2 Hz) |

Sacharosa (**72**)

V $^{1}H$ NMR spektru jsou signály vodíkových atomů v rozmezí δ 3.40 – 5.45 ppm patřící 14 vodíkovým atomům, přičemž signály ve tvaru dubletu s chemickým posunem 5.41 ppm a 4.21 ppm odpovídají anomerním vodíkům dvou sacharidových jednotek. $^{13}C$ NMR a DEPT spektra dávají informaci o 12 uhlíkových atomech a jejich charakteru: třech $CH_2$ (δ 62.07, 63.30 a 64.29 ppm) a osmi CH skupinách (δ 71.17, 73.01, 74.34, 74.51, 75.93, 78.35, 83.32 a 94.10 ppm) a jednom kvarterním uhlíkovém atomu (δ 105.62 ppm). Ze sumárního vzorce získaného z MS-ESI $C_{12}H_{22}O_{11}$

je odvozena přítomnost, i na základě chemických posunů uhlíkových atomů, osmi hydroxylových skupin. Na základě analýzy COSY spektra byly získány dva spinové systémy vodíkových atomů. Analýzou multiplicit a interakčních konstant signálů vodíkových atomů, COSY a HSQC spektra bylo provedeno úplné přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů izolované látky **72** (viz tab. XIII).

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **72**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **72** má strukturu sacharosy. [106-108]




**72**

Tabulka XIII. $^{1}$H a $^{13}$C NMR látky **72**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 94.10 | 1 | 5.41 (*d*, *J*=4 Hz) |
| 2 | 73.01 | 2 | 3.56 (*dd*, $J_1$=10.0 Hz, $J_2$=4.0 Hz) |
| 3 | 74.51 | 3 | 3.76 (*bt*, *J*=9.2 Hz) |
| 4 | 71.17 | 4 | 3.47 (*bt*, *J*=9.2 Hz) |
| 5 | 74.34 | 5 | 3.81-3.91 *m* |
| 6 | 62.07 | 6a | 3.81-3.91 *m* |
| | | 6b | 3.81-3.91 *m* |
| 1’ | 63.30 | 1’ | 3.67 (*s*, 2H) |
| 2’ | 105.62 | 2’ | |
| 3’ | 78.35 | 3’ | 4.21 (*d*, *J*=8.8 Hz) |
| 4’ | 75.93 | 4’ | 4.05 (*bt*, *J*=8.8 Hz) |
| 5’ | 83.32 | 5’ | 3.81-3.91 *m* |
| 6’ | 64.29 | 6’a | 3.81-3.91 *m* |
| | | 6’b | 3.81-3.91 *m* |

### 4.1.4. Rozbor etherické fáze S9

Etherická fáze **S9** byla chromatograficky dělena a získané frakce byly následně rechromatografovány. V získaných frakcích byly obsaženy sacharidy: methyl-β-D--fruktopyranosid (**69**), methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**), methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**), 2-deoxy-L-ribono-1,4-lakton (**73**), sacharosa (**72**), iridoid: monotropein (**58**), quercetin (**27**), deriváty pentandiolu: (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**), 4’*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2’*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**) **a** 4’*R*-hydroxypent-2’*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**).

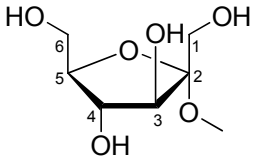
Z této fáze byly izolovány látky **69**, **70**, **71**, **58**, **74**, a dvě nové látky **75**, **76**, které byly z methanolického extraktu stonku brusnice borůvky **S1** izolovány následovně. Methanolický extrakt **S1** byl vysrážen vodou a vzniklá vodná fáze **S3** byla vysrážena diethyletherem. Vzniklá etherická fáze **S9** byla ještě třikrát vysrážena vodou, což vedlo ke vzniku etherické fáze **S21**. Etherická fáze **S21** byla dělena gradientovou sloupcovou chromatografií na reverzním silikagelu. Mobilní fází $H_2O$ : MeOH 1:1 byla eluována frakce **S437**, která byla dále chromatograficky dělena. Mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 20:1 byly eluovány frakce **S479** a **S482**. Frakce **S482** je čistá látka **75**. Frakce **S479** byla dále chromatograficky dělena a mobilní fází $CHCl_3$ byla eluována frakce **S512**, která je čistá látka **76**.

4.1.4.1. Určení struktur sacharidů

Methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**)

V $^1$H NMR spektru jsou signály vodíkových atomů v rozmezí δ 3.60 – 4.15 ppm patřící sedmi vodíkovým atomům a signál s integrální intenzitou tří vodíků a chemickým posunem δ 3.33 ppm odpovídající vodíkům methylové skupiny v methoxy skupině. $^{13}$C NMR a DEPT spektra dávají informaci o sedmi signálech uhlíkových atomů a jejich charakteru: jedné $CH_3$ (δ 50.17 ppm), dvou $CH_2$ (d 59.69 a 63.22 ppm) a třech CH skupin (δ 79.32, 82.02 a 85.24 ppm) a jednom kvarterním uhlíkovém atomu (δ 110.21 ppm). Ze sumárního vzorce získaného z MS-ESI $C_7H_{14}O_6$ i na základě chemických posunů uhlíkových atomů je odvozena přítomnost pěti hydroxylových skupin. Na základě analýzy COSY spektra, HSQC spektra a interakčních konstant v protonovém spektru bylo provedeno úplné přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů izolované látky **70** (viz tab. XIV). Furanosidový cyklus potvrzuje HMBC kontakt vodíkového atomu H-5 na uhlíkový atom C-2.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **70**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **70** má strukturu methyl-α-D-fruktofuranosidu.[106,108,109]




**70**

Tabulka XIV. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **70**.

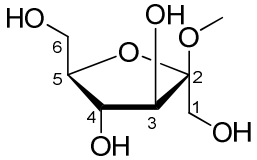
| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 59.69 | 1[a] | 3.80 (*d*, *J*=12.0 Hz) |
| | | 1b | 3.67 (*d*, *J*=12.4 Hz) |
| 2 | 110.21 | | |
| 3 | 82.02 | 3 | 4.11 (*d*, *J*=2.8 Hz) |
| 4 | 79.32 | 4 | 3.96 *m* |
| 5 | 85.24 | 5 | 3.97 *m* |
| 6 | 63.22 | 6[a] | 3.80 *m* |
| | | 6b | 3.70 (*dd*, $J_1$=12.4 Hz, $J_2$=5.6 Hz) |
| OMe | 50.17 | Me | 3.33 *s* |

Methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**)

V $^{1}H$ NMR spektru jsou signály vodíkových atomů v rozmezí δ 3.60 – 4.20 ppm patřící sedmi vodíkovým atomům a signál s integrální intenzitou tří vodíků a chemickým posunem δ 3.33 ppm odpovídající vodíkům methylové skupiny v methoxy skupině. $^{13}C$ NMR a DEPT spektra dávají informaci o sedmi signálech uhlíkových atomů a jejich charakteru: jedné $CH_3$ (δ 50.82 ppm), dvou $CH_2$ (δ 61.66 a 64.58 ppm), a třech CH skupinách (δ 76.92, 78.75 a 83.19 ppm) a jednom kvarterním uhlíku (δ 105.71 ppm). Ze sumárního vzorce získaného z MS-ESI $C_7H_{14}O_6$, i na základě chemických posunů uhlíkových atomů, je odvozena přítomnost pěti hydroxylových skupin. Na základě analýzy COSY spektra, HSQC spektra a interakčních konstant signálů

v protonovém spektru bylo provedeno úplné přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů izolované látky **71** (viz tab. XV). Furanosidový cyklus potvrzuje HMBC kontakt vodíkového atomu H-5 na uhlíkový atom C-2.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **71**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **71** má strukturu methyl-β-D-fruktofuranosidu.[106,108,109]




**71**

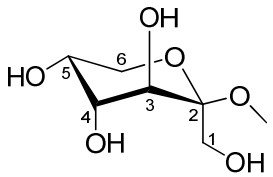
Tabulka XV. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **71**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 61.66 | 1[a] | 3.73 (*d*, *J*=12.4 Hz) |
| | | 1b | 3.65 (*d*, *J*=12.0 Hz) |
| 2 | 105.71 | | |
| 3 | 78.75 | 3 | 4.17 (*d*, *J*=8.4 Hz) |
| 4 | 76.92 | 4 | 4.06 (*bt*, *J*=7.6 Hz) |
| 5 | 83.19 | 5 | 3.86 (*bdt*, $J_1$=7.2 Hz, $J_2$=3.2 Hz) |
| 6 | 64.58 | 6a | 3.81 (*dd*, $J_1$=12.0 Hz, $J_2$=3.2 Hz) |
| | | 6b | 3.65 (*dd*, $J_1$=12.0 Hz, $J_2$=7.2 Hz) |
| OMe | 50.82 | Me | 3.33 *s* |

Methyl-β-D-fruktopyranosid (**69**)

V $^{1}H$ NMR spektru jsou signály vodíkových atomů v rozmezí δ 3.70 – 4.00 ppm patřící sedmi vodíkovým atomům a signál s integrální intenzitou tří vodíků a chemickým posunem δ 3.30 ppm odpovídající vodíkům methylové skupiny v methoxy skupině. $^{13}C$ NMR a DEPT spektra dávají informaci o sedmi signálech uhlíkových atomů a jejich charakteru: jedné $CH_3$ (δ 50.43 ppm), dvou $CH_2$ (δ 62.85 a 65.77 ppm) a třech CH skupinách (δ 70.36, 71.05 a 71.57 ppm) a jednom kvarterním uhlíkovém atomu (δ 102.37 ppm). Ze sumárního vzorce získaného z MS-ESI $C_7H_{14}O_6$, i na základě chemických posunů uhlíkových atomů, je odvozena přítomnost pěti hydroxylových skupin. Na základě analýzy COSY spektra, HSQC spektra a interakčních konstant signálů vodíkových atomů v protonovém spektru bylo provedeno úplné přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů izolované látky **69** (viz tab. XVI).

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **69**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **69** má strukturu methyl-β-D-fruktopyranosidu.[106,108,109]




**69**

Tabulka XVI. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **69**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 62.85 | 1 | 3.79 *s* |
| 2 | 102.37 | | |
| 3 | 70.36 | 3 | 3.93 (*d*, *J*=10.1 Hz) |
| 4 | 71.57 | 4 | 3.86 (*dd*, $J_1$=10.1 Hz, $J_2$= 3.4 Hz) |
| 5 | 71.05 | 5 | 3.99 (*dt*, $J_1$=3.5 Hz, $J_2$=1.5 Hz, $J_3$=1.5 Hz) |
| 6 | 65.77 | 6 | 3.73 (*dd*, $J_1$=12.7 Hz, $J_2$=1.8 Hz) |
| | | | 3.81 (*dd*, $J_1$=12.7 Hz, $J_2$=1.4 Hz) |
| OMe | 50.43 | Me | 3.30 *s* |

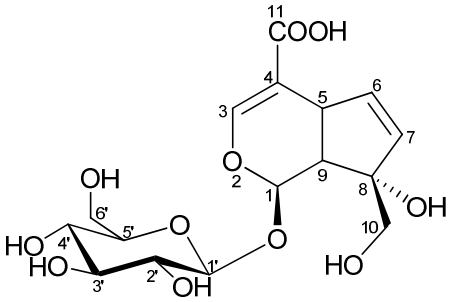
4.1.4.2. Určení struktury alkaloidů

Monotropein (**58**)

Z $^{1}H$ NMR spektra je patrná přítomnost sacharidové jednotky, signály v rozmezí δ 3.26 – 3.96 ppm, které byly přiřazeny na základě rozboru interakčních konstant, odpovídají β-D-glukopyranosidové jednotce. Dále byly ve spektru nalezeny signály vodíkových atomů v oblasti dvojných vazeb s chemickým posunem δ 5.67, 5.74, 6.29 a 7.46 ppm a signál vodíkového atomu s chemickým posunem 2.74 ppm. Studiem interakčních konstant signálů vodíkových atomů v kombinaci s COSY spektrem a HSQC spektrem byly nalezeny spinově interagující systémy a uhlíky přímo vázané na vodíky. Z $^{13}C$ NMR a DEPT spekter je patrná přítomnost šestnácti signálů uhlíkových atomů, z toho dvou $CH_2$ a jedenácti CH skupin a třech kvarterních uhlíků. Chemické posuny signálů uhlíkových atomů ukazují kromě glukosové jednotky na přítomnost COOH skupiny na dvojné vazbě (δ 172.73 ppm), dvou dvojných vazeb (δ 112.38, 133.88, 139.24 a 153.33 ppm), uhlíku nesoucímu dva atomy kyslíku (δ 96.22 ppm) a dvou uhlíkových atomů nesoucích hydroxylovou skupinu (δ 68.39 a 86.82 ppm). Ze znalosti sumárního vzorce z MS-ESI $C_{16}H_{22}O_{11}$ je patrná přítomnost šesti hydroxylových skupin, jedné karboxylové skupiny a dalších třech kyslíkových atomů. Kombinací informací z 1D spekter s 2D spektry byla určena struktura látky **58** a bylo provedeno přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů (viz tab. XVII).

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **58**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **58** má strukturu monotropeinu.[110,111]

Monotropein **58** má nepřímé antinocicepční (protibolestivé) účinky a také má protizánětlivé účinky.[43]




**58**

Tabulka XVII. $^{1}$H a $^{13}$C NMR látky **58**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 96.22 | 1 | 5.67 (*d*, *J*=1.8 Hz) |
| 3 | 153.33 | 3 | 7.46 (*d*, *J*=1.2 Hz) |
| 4 | 112.38 | 4 | |
| 5 | 39.00 | 5 | 3.59 (*m*, ∑*J*=8.0 Hz) |
| 6 | 139.24 | 6 | 6.29 (*dd*, $J_1$=5.7 Hz, $J_2$=2.8 Hz) |
| 7 | 133.88 | 7 | 5.74 (*dd*, $J_1$=5.7 Hz, $J_2$=1.7 Hz) |
| 8 | 86.72 | 8 | |
| 9 | 45.93 | 9 | 2.74 (*dd*, $J_1$=8.0 Hz, $J_2$=2.0 Hz) |
| 10 | 68.39 | 10 | 3.67 (*d*, *J*=11.2 Hz) |
| | | | 3.72 (*d*, *J*=11.2 Hz) |
| 11 | 172.73 | | |
| 1´ | 100.19 | 1´ | 4.83 (*d*, *J*=8.0 Hz) |
| 2´ | 74.60 | 2´ | 3.29 (*dd*, $J_1$=9.2 Hz, $J_2$=8.0 Hz) |
| 3´ | 71.52 | 3´ | 3.41 (*dd*, $J_1$=9.2 Hz, $J_2$=9.2 Hz) |
| 4´ | 77.57 | 4´ | 3.47 *m* |
| 5´ | 78.25 | 5´ | 3.52 *m* |
| 6´ | 62.63 | 6´ | 3.75 (*dd*, $J_1$=12.4 Hz, $J_2$=6.0 Hz) |
| | | | 3.94 (*dd*, $J_1$=12.4 Hz, $J_2$=2.4 Hz) |

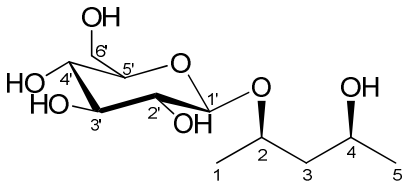
4.1.4.3. Určení struktury derivátů pentandiolu

(2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**)

Z analýzy protonového spektra je patrná přítomnost dvou methylových skupin s chemickým posunem δ 1.18 a 1.21 ppm ve tvaru dubletu s interakční konstantou 6.0 a 6.4 Hz, což značí uskupení $CH_3$-CH. Dále byly nalezeny signály dvou vodíkových atomů s chemickým posunem δ 3.94 a 4.04 ppm. Chemický posun signálů těchto vodíkových atomů naznačuje přítomnost hydroxylové skupiny na uhlíkových atomech, na které jsou tyto vodíkové atomy vázány. Další dva signály vodíkových atomů jsou v alifatické oblasti s chemickým posunem δ 1.49 a 1.82 ppm ve tvaru *td* s interakčními konstatami 5.2 a 13.6 Hz a 8.0 a 14.0 Hz. Interakční konstanty 13.6 Hz a 14.0 Hz odpovídají geminálnímu uspořádání těchto dvou vodíků. Konstanty 5.2 a 8.0 Hz odpovídají vazbě CH-CH s volnou rotací. Dále jsou pak v protonovém spektru signály vodíkových atomů patřící sacharidové jednotce v oblati 3.10 – 4.35 ppm. Z $^{13}$C NMR a

DEPT spekter byla získána informace o celkovém počtu signálů uhlíkových atomů, a to jedenácti, z toho jsou dvě $CH_3$, dvě $CH_2$ a sedm CH skupin. Z chemických posunů signálů uhlíkových atomů byla potvrzena β-D-glukopyranosidová jednotka, dva signály uhlíkových atomů nesoucí hydroxylovou skupinu či vazbu C-O, dvě methylové skupiny a alifatická $CH_2$ skupina. Z HSQC spektra byly k uhlíkovým atomům přiřazeny přímo vázané atomy vodíku. Tyto informace společně s analýzou krospíků v COSY spektru vedly k úplnému přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů (viz tab. XVIII). Spojení β-D-glukopyranosidové jednotky s pentandiolem dokazují krospíky v HMBC spektru, kde vodík H-1' koreluje s uhlíkem C-2 a vodík H-2 koreluje s uhlíkem C-1'. Konfigurace látky **74** byla určena jednak porovnáním NMR dat s literaturou a také porovnáním NMR spekter s NMR spektry připravených standardů **77** a **78** (viz kap. 5.4.).[112]

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **74**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **74** má strukturu (*2R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4--diolu.[112]




**74**

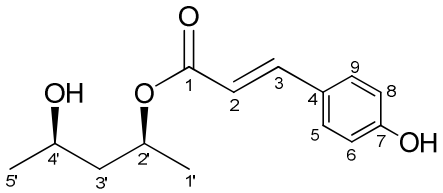
Tabulka XVIII. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **74**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 20.22 | 1 | 1.18 (*d*, *J*=6.0 Hz) |
| 2 | 74.19 | 2 | 3.94 (*m*, ∑*J*=31.6 Hz) |
| 3 | 47.26 | 3 | 1.82 (*bdt*, $J_1$=14.0 Hz, $J_2$=8.0 Hz) |
| | | | 1.49 (*bdt*, $J_1$=13.6 Hz, $J_2$=5.2 Hz) |
| 4 | 66.80 | 4 | 4.05 (*m*, ∑*J*=32.0 Hz) |
| 5 | 23.64 | 5 | 1.21 (*d*, *J*=6.4 Hz) |
| 1' | 102.17 | 1' | 4.34 (*d*, *J*=7.6 Hz) |
| 2' | 75.06 | 2' | 3.13 (*dd*, $J_1$=8.8 Hz, $J_2$=7.6 Hz) |
| 3' | 78.06 | 3' | 3.35 *m* |
| 4' | 71.75 | 4' | 3.27 *m* |
| 5' | 77.92 | 5' | 3.26 *m* |
| 6' | 62.91 | 6' | 3.65 *m* |
| | | | 3.86 *m* |

4’*R*-hydroxypent-2’*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**)

V protonovém spektru jsou signály vodíkových atomů v aromatické oblasti charakteristické pro *p*-disubstituovaný benzen s chemickými posuny δ 7.45 a 6.80 a signály vodíkových atomů na dvojné vazbě s chemickými posuny δ 6.30 a 7.59. Hodnota interakční konstanty signálů vodíkových atomů H-2 a H-3 15.6 Hz (resp. 16 Hz) odpovídá trans uspořádání na dvojné vazbě. Další signály jsou podobné signálům (2*R*,4*S*)-pentandiolového fragmentu z látky **74** s tím, že signál jedné CH skupiny má vyšší posun oproti chemickému posunu v látce **74**, což může být způsobeno esterifikací volné hydroxyskupiny. Z $^{13}$C NMR a DEPT spekter byla získána informace o dvou $CH_3$, jedné $CH_2$ a osmi CH skupin a třech kvarterních uhlíkách. Z chemických posunů signálů uhlíkových atomů je patrná přítomnost karboxylové skupiny (δ 168.80 ppm), dvojné vazby (δ 115.69 a 146.27 ppm) a dvou uhlíkových atomů s vazbou na kyslík (δ 65.65 a 69.97 ppm). Další uhlíkové signály potvrzují přítomnost aromatického kruhu. Analýzou interakčních konstant, přiřazení přímo vázaných vodíků na uhlíkové atomy z HSQC spektra, krospíků v COSY a HMBC spektrech bylo provedeno úplné přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů (viz tab. XIX). Prostorové kontakty a určení absolutní konfigurace je popsáno v kap. 4.5.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **76**. Tato látka dosud nebyla v brusnici borůvce ani v jiné rostlině identifikována a jedná se o látku novou.




**76**

Tabulka XIX. $^{1}$H a $^{13}$C NMR látky **76**.

| No. | $^{13}$C | | $^{1}$H | HMBC |
|---|---|---|---|---|
| | δ (ppm) | mult. | δ (ppm), mult., *J* (Hz) | |
| 1 | 168.80 | s | | H-2,3 |
| 2 | 115.69 | d | 6.30 (*d*, *J*=15.6 Hz) | H-3 |
| 3 | 146.27 | d | 7.59 (*d*, *J*=16.0 Hz) | H-5,9 |
| 4 | 127.20 | s | | H-2,6,8 |
| 5,9 | 131.11 | d | 7.45 (*d*, *J*=8.8 Hz) | H-3,5,9 |
| 6,8 | 116.82 | d | 6.80 (*d*, *J*=8.8 Hz) | |
| 7 | 161.25 | s | | H-5,6,8,9 |
| 1´ | 20.49 | q | 1.31 (*d*, *J*=6.4 Hz) | H-3a´ |
| 2´ | 69.97 | d | 5.14 (*sextet*, *J*=6.4 Hz) | H-1´,3a´,3b´ |
| 3a´ | 46.22 | d | 1.61 (*dt*, $J_1$=13.6 Hz, $J_2$=6.0 Hz) | H-1´,5´ |
| 3b´ | | | 1.92 (*dt*, $J_1$=13.6 Hz, $J_2$=6.8 Hz) | |
| 4´ | 65.65 | d | 3.84 (*m*) | H-3a´,3b´,5´ |
| 5´ | 23.61 | d | 1.20 (*d*, *J*=6.4 Hz) | |

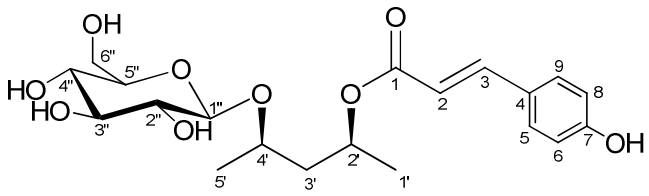
4’*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2’*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**)

Porovnáním protonových a uhlíkových NMR spekter se spektry látek **74** a **76** lze soudit, že látka **75** se skládá z β-D-glukopyranosidové jednotky, (2*S*,4*R*)--pentandiolového fragmentu a *p*-hydroxykumarátu. Kombinací analýz 1D a 2D NMR spekter bylo provedeno úplné přiřazení vodíkových a uhlíkových signálů (viz tab. XX). Propojení jednotlivých částí je patrné z krospíků v HMBC spektru mezi vodíkem H-2’ s uhlíkem C-1, vodíkem H-1’’ s uhlíkem C-4’ a vodíkem H-4’ s uhlíkem C-1’’. Prostorové kontakty a určení absolutní konfigurace je popsáno v kap. 4.5.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **75**. Tato látka dosud nebyla izolována.

V literatuře zabývající se studiem fenolických sloučenin obsažených v listu a stonku brusnice borůvky jsou zmíněny dva neznámé deriváty *p*-kumarové kyseliny.[4] Jistě by bylo zajímavé zjištění, zda se jedná o látky **75** a **76**. Nicméně na našem pracovišti nebyla možnost HPLC analýzy za stejných podmínek.

Deriváty kumarové kyseliny, které jsou, vedle dalších derivátů skořicové kyseliny a derivátů benzoové kyseliny, malou (z hlediska výživové hodnoty), ale významnou složkou potravy pro jejich vysokou antioxidační aktivitu.[32]




**75**

Tabulka XX. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **75**.

| No. | $^{13}C$ | | $^{1}H$ | HMBC |
|---|---|---|---|---|
| | δ (ppm) | mult. | δ (ppm), mult., *J* (Hz) | |
| 1 | 169.02 | s | | H-2,3,2´ |
| 2 | 115.83 | d | 6.29 (*d*, *J*=15.9 Hz) | H-3 |
| 3 | 146.36 | d | 7.59 (*d*, *J*=15.9 Hz) | H-5,9 |
| 4 | 127.19 | s | | H-2,6,8 |
| 5,9 | 131.15 | d | 7.45 (*d*, *J*=8.6 Hz) | H-3,5,9 |
| 6,8 | 116.81 | d | 6.80 (*d*, *J*=8.7 Hz) | H-5,9 |
| 7 | 161.20 | s | | H-5,6,8,9 |
| 1´ | 20.42 | q | 1.31 (*d*, *J*=6.0 Hz) | H-3a´,3b´ |
| 2´ | 70.20 | d | 5.20 (*sextet*, *J*=6.4 Hz) | H-1´,3a´,3b´ |
| 3b´ | 44.35 | t | 2.05 (*dt*, $J_1$=14.0 Hz, $J_2$=6.8 Hz) | H-1´,2´,5´ |
| 3a´ | | | 1.66 (*dt*, $J_1$=14.4 Hz, $J_2$=6.0 Hz) | |
| 4´ | 72.87 | d | 4.00 (*m*) | H-3a´,3b´,5´,1´´ |
| 5´ | 20.15 | q | 1.22 (*d*, *J*=6.4 Hz) | H-3a´,3b´ |
| 1´´ | 102.05 | d | 4.32 (*d*, *J*=7.6 Hz) | H-4´, 2´´ |
| 2´´ | 75.01 | d | 3.15 (*dd*, $J_1$=8.7 Hz, $J_2$= 8.1 Hz) | H-4´´ |
| 3´´ | 78.05 | d | 3.35 | H-2´´ |
| 4´´ | 71.65 | d | 3.27 | H-3´´,5´´ |
| 5´´ | 77.74 | d | 3.26 | H-4´´, 6a´´ |
| 6a´´ | 62.82 | t | 3.68 (*dd*, $J_1$=11.9 Hz, $J_2$=5.2 Hz) | |
| 6b´´ | | | 3.86 (*dd*, $J_1$=11.9 Hz, $J_2$=1.8 Hz) | |

## 4.2. Postup dělení methanolického extraktu listu brusnice borůvky

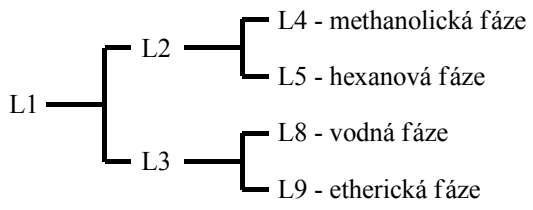



*Schéma 2*

### 4.2.1. Dělení methanolické fáze L4

V chloroformu rozpustná část methanolické fáze **L4** byla dělena sloupcovou chromatografií. Obsahově zajímavé frakce byly rechromatografovány. Ve frakcích byly přítomny triterpenoidní sloučeniny α-amyrin (**63**), oleanová kyselina (**21**) a ursolová kyselina (**22**).

### 4.2.2. Dělení hexanové fáze L5

Rozbor frakcí získaných gradientovou sloupcovou chromatografií a následnými rechromatografiemi ukázal na obsah triterpenoidních sloučenin α-amyrinu (**63**),

β-amyrinu (**59**), oleanové kyseliny (**21**), ursolové kyseliny (**22**), 3β,12β--dihydroxyolean-28→13-olidu (**62**) a glutinolu (**64**) a dále 3β-sitosterolu (**24**) ze skupiny steroidních sloučenin. Z jedné frakce se podařilo získat směs α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**), ve které převažoval α-amyrin (**63**) a z této směsi byla určena jeho struktura. Z jedné frakce byla získána téměř čistá ursolová kyselina (**22**) znečistěná malým obsahem oleanové kyseliny (**21**). Z této frakce byla určena struktura látky (**22**).

Z $^{1}$H NMR spekter frakcí obsahujících α-amyrin (**63**), β-amyrin (**59**), oleanovou kyselinu (**21**) a ursolovou kyselinu (**22**) byl proveden odhad množství těchto látek v methanolickém extraktu listu brusnice borůvky (viz tab. XXI).

Tabulka XXI. Procentuální zastoupení látek **21**, **22**, **59** a **63** vztažené na methanolický extrakt listu brusnice borůvky.

| | **63** | **59** | **21** | **22** |
|---|---|---|---|---|
| množství (mg) | 265 | 515 | 121 | 458 |
| zastoupení | 0.22 % | 0.43 % | 0.10 % | 0.38 % |

4.2.2.1. Určení struktury triterpenoidů

*4.2.2.1.1. Ursanové deriváty*

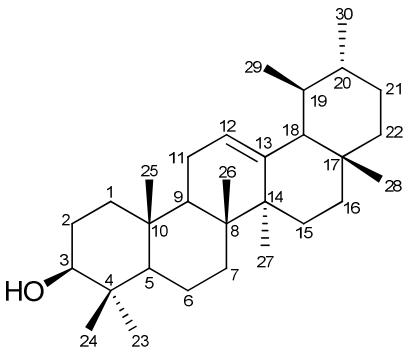
Ursanové deriváty se liší od oleananových derivátů pouze pozicí methylových skupin C-29 a C-30. V rozboru NOESY spekter následujících struktur se zaměřím pouze na interakce vodíkových atomů kruhu E. NOESY krospíky vodíkových atomů zbývající části struktury jsou u oleananových a ursanových derivátů totožné.

α-Amyrin (**63**)

Struktura α-amyrinu (**63**) je určena ze směsi s β-amyrinem (**59**). Analýzou 1D a 2D NMR spekter směsi těchto sloučenin není možné úplné přiřazení všech signálů vodíkových atomů, ale pouze signálů vodíkového atomu H-12 s chemickým posunem δ 5.13 ppm, vodíkového atomu H-3 s chemickým posunem δ 3.22 ppm. Osm singletů s integrální intenzitou tří vodíků a chemickými posuny δ 0.79, 0.80, 0.80, 0.91, 0.96, 1.00, 1.01 a 1.07 odpovídá osmi methylovým skupinám (viz tab. XXII). Porovnáním rozdílů v NMR spektrech oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**) s rozdíly spekter β-amyrinu (**59**) se spektry směsi β-amyrinu (**59**) s α-amyrinem (**63**) byla na základě podobných odlišností potvrzena struktura α-amyrinu (**63**).

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **63**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **63** má strukturu α-amyrinu. [77,85,86,89,101]

α-Amyrin (**63**) vykazuje řadu biologických aktivit: anti-HIV, protinádorovou, antivirovou a protizánětlivou aktivitu.[86]




**63**

Tabulka XXII. $^{1}$H a $^{13}$C NMR látky **63**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 38.75 | | |
| 2 | 27.23 | | |
| 3 | 79.00 | 3α | 3.22 (m, ∑*J*=16.0 Hz) |
| 4 | 38.75 | | |
| 5 | 55.12 | | |
| 6 | 18.34 | | |
| 7 | 32.89 | | |
| 8 | 39.96 | | |
| 9 | 47.66 | | |
| 10 | 36.86 | | |
| 11 | 23.33 | | |
| 12 | 124.37 | 12 | 5.13 (*t*, *J*=3.6 Hz) |
| 13 | 139.55 | | |
| 14 | 42.03 | | |
| 15 | 28.73 | | |
| 16 | 26.57 | | |
| 17 | 33.73 | | |
| 18 | 59.01 | | |
| 19 | 39.63 | | |
| 20 | 39.57 | | |
| 21 | 31.22 | | |
| 22 | 41.50 | | |
| 23 | 28.10 | 23α | 1.00 (s, 3H) |
| 24 | 15.67 | 24β | 0.80 (*s*, 3H) |
| 25 | 15.62 | 25 β | 0.96 (*s*, 3H) |
| 26 | 16.83 | 26 β | 1.01 (*s*, 3H) |
| 27 | 23.24 | 27 α | 1.07 (*s*, 3H) |
| 28 | 28.10 | 28 β | 0.80 (*s*, 3H) |
| 29 | 17.46 | 29 β | 0.79 (*s*, 3H) |
| 30 | 21.40 | 30 α | 0.91 (*s*, 3H) |

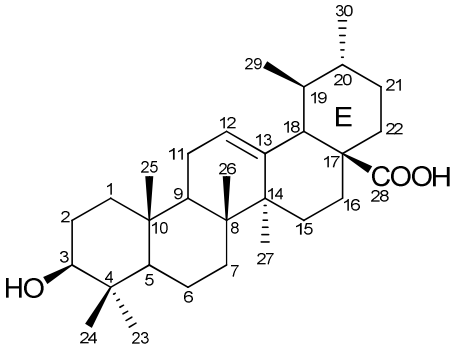
Ursolová kyselina (**22**)

Rozborem $^{1}H$, $^{13}C$ a DEPT spekter izolované látky **22** byla získána informace o počtu a typu uhlíkových atomů, sedmi $CH_3$, devíti $CH_2$ a sedmi CH skupinách a sedmi kvarterních uhlíkových atomech. Dále 1D NMR spektra ukazují na přítomnost hydroxylové skupiny na C-3 (δ 78.56 ppm), signál vodíkového atomu H-3 má chemický posun δ 3.20 ppm, dvojné vazby v pozici 12 (δ C-12 125.26 ppm a C-13 137.96 ppm), signál vodíkového atomu H-12 je triplet s chemickým posunem δ 5.24 ppm, karboxylové kyseliny C-28 (δ 180.33 ppm) a dvou methylových skupin sousedících s CH skupinami, dva dublety vodíkových atomů H-29 s chemickým posunem δ 0.87 ppm, C-29 (δ 16.70 ppm), a H-30 s chemickým posunem δ 0.95 ppm, C-30 (δ 20.82 ppm). Zbývající signály vodíkových atomů s integrální intenzitou tří vodíků jsou singlety s chemickými posuny δ 0.78, 0.83, 0.93, 0.98 a 1.09 ppm a odpovídají pěti methylovým skupinám. Dublet signálu vodíkového atomu H-18 s chemickým posunem δ 2.19 ppm ukazuje na přítomnost elektronakceptorové skupiny v blízkém okolí, v tomto případě karboxylové skupiny C-28. Získané informace ukazovaly na podobnost látky **22** s látkou **21** a odlišnost pouze na kruhu E. Úplné přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů látky **22** viz tab. XXIII.

Analýzou NOESY spektra je potvrzena konfigurace odpovídající ursolové kyselině (**22**). Vodíkové atomy methylové skupiny H-29β mají NOESY interakce s vodíkovými atomy H-12, H-18β, H-19α a H-20β. Vodíkové atomy methylové skupiny H-30α mají prostorové interakce s vodíkovými atomy H-19α, H-20β, H-21α a H-27α.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **22**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **22** má strukturu ursolové kyseliny. [77,82,113-117]

Ursolová kyselina (**22**) je velmi rozšířený triterpenoid v celé rostlinné říši často i ve formě glykosidů a vykazuje široké spektrum biologických aktivit: antimikrobiální, antiaterosklerotickou, protizánětlivou aktivitu a je inhibitorem tvorby zubního kazu.[115]




**22**

Tabulka XXIII. $^{1}$H a $^{13}$C NMR látky **22**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 38.44 | 1α | 1.00 |
| | | 1β | 1.64 |
| 2 | 26.51 | 2α | 1.60 |
| | | 2β | 1.60 |
| 3 | 78.56 | 3α | 3.20 (*m*, ∑*J*=15.7 Hz) |
| 4 | 38.44 | | |
| 5 | 55.02 | 5α | 0.73 |
| 6 | 18.06 | 6α | 1.50 |
| | | 6β | 1.34 |
| 7 | 32.80 | 7α | 1.34 |
| | | 7β | 1.52 |
| 8 | 39.22 | | |
| 9 | 47.32 | 9α | 1.51 |
| 10 | 36.68 | | |
| 11 | 23.01 | 11α | 1.92 |
| | | 11β | 1.92 |
| 12 | 125.26 | 12 | 5.24 (*t*, *J*=2.4 Hz) |
| 13 | 137.96 | | |
| 14 | 41.82 | | |
| 15 | 27.76 | 15α | 1.09 |
| | | 15β | 1.88 |
| 16 | 23.96 | 16α | 1.66 |
| | | 16β | 2.00 |
| 17 | 47.55 | | |
| 18 | 52.60 | 18β | 2.19 (*d*, *J*=11.9 Hz) |
| 19 | 38.85 | 19α | 1.34 |
| 20 | 38.67 | 20β | 0.96 |
| 21 | 30.42 | 21α | 1.33 |
| | | 21β | 1.49 |
| 22 | 36.58 | 22α | 1.70 |
| | | 22β | 1.64 |
| 23 | 27.73 | 23α | 0.98 (*s*, 3H) |
| 24 | 15.30 | 24β | 0.78 (*s*, 3H) |
| 25 | 15.10 | 25β | 0.93 (*s*, 3H) |
| 26 | 16.58 | 26β | 0.83 (*s*, 3H) |
| 27 | 23.22 | 27α | 1.09 (*s*, 3H) |
| 28 | 180.33 | | |
| 29 | 16.70 | 29β | 0.87 (*d*, *J*=6.0 Hz, 3H) |
| 30 | 20.82 | 30α | 0.95 (*d*, *J*=6.4 Hz, 3H) |

### 4.2.3. Dělení vodné fáze L8

Vodná fáze **L8** byla chromatograficky dělena a obsahem zajímavé frakce byly dále rechromatografovány. Rozbor vodné fáze ukázal na obsah sacharidů: methyl-β-D--fruktopyranosidu (**69**), methyl-α-D-fruktofuranosidu (**70**) a methyl-β-D--fruktofuranosidu (**71**).

Z této fáze byl izolován myo-inositol (**79**).

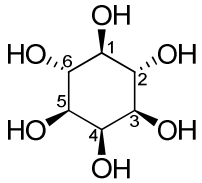
4.2.3.1. Určení struktury myo-inositolu (**79**)

Myo-inositol (**79**)

Signály vodíkových atomů jsou ve spektru v oblasti δ 3.20 – 4.10 ppm, jsou dobře rozlišené a jejich integrální intenzita odpovídá šesti vodíkovým atomům. Ve $^{13}C$ NMR spektru jsou čtyři signály uhlíkových atomů (δ 73.13 – 76.34 ppm), dva s dvojnásobnou intenzitou svědčící o symetrii molekuly. Chemické posuny signálů uhlíkových a vodíkových atomů svědčí o vazbách na hydroxylové skupiny. Sumární vzorec získaný z MS-ESI je $C_6H_{12}O_6$ ukazuje na přítomnost šesti hydroxylových skupin. Analýzou interakčních konstant signálů vodíkových atomů bylo provedeno úplné přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů izolované látky **79** (viz tab. XXIV). Hodnota interakční konstanty 10.0 Hz (resp. 9.2 Hz) odpovídá vzájemné axiálně-axiální poloze sousedních interagujících vodíkových atomů, zatímco interakční konstanta 2.4 Hz (resp. 2.8 Hz) odpovídá vzájemné axiálně-ekvatoriální resp. ekvatoriálně-ekvatoriální poloze vodíků.

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **79**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **79** má strukturu myo-inositolu.[107,118-121]

Myo-inositol (**79**) je hlavní složkou mnoha biochemických procesů. Metabolismus inositolu je základem pro vývoj rostlin, živočichů a některých mikroorganismů. Hlavní rolí myo-inositolu (**79**) v buněčných procesech je tvorba buněčných membrán, biogeneze buněčných stěn, reakce na stres a signál transdukce.[122]




**79**

Tabulka XXIV. $^{1}$H a $^{13}$C NMR látky **79**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 76.34 | 1 | 3.28 (*t*, *J*=9.2 Hz) |
| 2 | 73.13 | 2 | 3.62 (*t*, *J*=10.0 Hz) |
| 3 | 74.40 | 3 | 3.53 (*dd*, $J_1$=10.0, $J_2$=2.8 Hz) |
| 4 | 74.18 | 4 | 4.06 (*t*, *J*=2.4 Hz) |
| 5 | 74.40 | 5 | 3.53 (*dd*, $J_1$=10.0, $J_2$=2.8 Hz) |
| 6 | 73.13 | 6 | 3.62 (*t*, *J*=10.0 Hz) |

### 4.2.4. Dělení etherické fáze L9

Etherická fáze **L9** byla chromatograficky dělena a získané frakce byly následně rechromatografovány. V získaných frakcích byly obsaženy sacharid methyl-β-D--fruktofuranosid (**71**), iridoid monotropein (**58**), quercetin (**27**), deriváty (2*S*,*4R*)--pentandiolu: (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**), 4'*R*-(β-D--glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**), 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**) a glykosylovaný steroid: 3β-sitosterolglukosid (**80**). Tímto dělením byl získán čistý quercetin (**27**) a 3β-sitosterolglukosid (**80**).

4.2.4.1. Určení struktury flavonoidů

Quercetin (**27**)

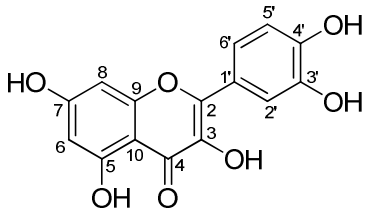
V protonovém spektru látky **27** jsou dobře rozlišené signály vodíkových atomů v aromatické oblasti s chemickým posunem δ 6.18, 6.40, 6.88, 7.54 a 7.67 ppm. Jedná se o systémy čtyř dubletů a jednoho dubletu dubletů. Hodnota interakční konstanty 8.4 Hz odpovídá ortho-pozici vzájemně interagujících vodíkových atomů. Hodnota interakční konstanty 2.0 Hz odpovídá meta-pozici vzájemně interagujících vodíkových atomů. Z $^{13}$C NMR a DEPT spektra je patrný celkový počet signálů uhlíkových atomů patnáct, a to pěti CH skupin a deseti kvarterních uhlíkových atomů. Z chemických posunů signálů uhlíkových atomů je patrný větší počet hydroxylových skupin a také karbonylová skupina v sousedství hydroxylové skupiny. Z MS-ESI je stanoven sumární

vzorec $C_{15}H_{10}O_7$, ze kterého lze usuzovat na přítomnost karbonylové skupiny a šesti hydroxylových skupin.

Z COSY spektra byly určeny spinové systémy vzájemně interagujících vodíkových atomů, vodíku H-6 s vodíkem H-8, vodíku H-2' s vodíky H-5' a H-6'. K uhlíkovým atomům byly přiřazeny přímo vázané vodíky pomocí HSQC spektra. Největší význam pro určení struktury izolované látky mělo HMBC spektrum. Na jeho základě bylo provedeno kompletní přiřazení signálů vodíkových a uhlíkových atomů **27** (viz tab. XXV).

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **79**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **79** má strukturu quercetinu.[123,124]

Quercetin (**27**) je látka s antialergenními, antiaterogenními, protizánětlivými, antimikrobiálními, antitrombotickými, kardioprotektivními, vazodilatačními a antioxidačními účinky.[14]




**27**

Tabulka XXV. $^1$H a $^{13}$C NMR látky **27**.

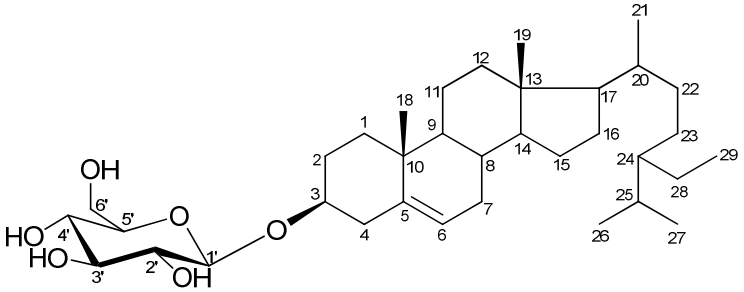
| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 2 | 146.78 | | |
| 3 | 135.72 | | |
| 4 | 175.82 | | |
| 5 | 160.71 | | |
| 6 | 98.18 | 6 | 6.18 (*d*, *J*=2.0 Hz) |
| 7 | 163.94 | | |
| 8 | 93.34 | 8 | 6.40 (*d*, *J*=2.0 Hz) |
| 9 | 156.13 | | |
| 10 | 102.98 | | |
| 1' | 121.94 | | |
| 2' | 115.05 | 2' | 7.67 (*d*, *J* =2.0 Hz) |
| 3' | 145.05 | | |
| 4' | 147.69 | | |
| 5' | 115.60 | 5' | 6.88 (*d*, *J* =8.4 Hz) |
| 6' | 119.96 | 6' | 7.54 (*dd*, $J_1$=8.4 Hz, $J_2$=2.0 Hz) |

4.2.4.2. Určení struktury steroidu

3β-Sitosterolglukosid (**80**)

Úplné přiřazení signálů uhlíkových atomů látky **80** je provedeno na základě analogie s látkou **24**. Z vodíkových signálů jsou přiřazeny pouze signály vysunuté mimo oblast překryvu a intenzivní signály methylových skupin. Vodíkové atomy glukopyranosidové části jsou přiřazeny na základě analýzy $^{1}$H NMR spektra a rozborem interakčních konstant jednotlivých signálů (viz tab. XXVI).

Všechny informace získané z NMR spekter jsou v souladu s navrženou strukturou látky **80**. Porovnáním s NMR daty uvedenými v literatuře bylo jednoznačně prokázáno, že látka **80** má strukturu ursolové kyseliny 3β-sitosterolglukosidu.[125-128]




**80**

Tabulka XXVI. $^{1}H$ a $^{13}C$ NMR látky **80**.

| **Uhlíky** | | **Protony** | |
|---|---|---|---|
| 1 | 37.83 | | |
| 2 | 30.60 | | |
| 3 | 78.49 | | |
| 4 | 39.68 | | |
| 5 | 141.27 | | |
| 6 | 122.26 | 6 | 5.36 (*t*, *J*=2.8 Hz) |
| 7 | 32.40 | | |
| 8 | 32.52 | | |
| 9 | 50.69 | | |
| 10 | 37.17 | | |
| 11 | 21.63 | | |
| 12 | 40.30 | | |
| 13 | 42.83 | | |
| 14 | 57.17 | | |
| 15 | 24.85 | | |
| 16 | 28.88 | | |
| 17 | 56.59 | | |
| 18 | 12.32 | 18 | 0.67 *s* |
| 19 | 19.76 | 19 | 0.95 *s* |
| 20 | 36.73 | | |
| 21 | 19.35 | 21 | 0.87 (*d*, *J*=6.8 Hz) |
| 22 | 34.55 | | |
| 23 | 26.74 | | |
| 24 | 46.39 | | |
| 25 | 29.81 | | |
| 26 | 19.55 | 26 | 0.89 (*d*, *J*=7.2 Hz) |
| 27 | 20.31 | 27 | 1.00 (*d*, *J*=6.8 Hz) |
| 28 | 23.73 | | |
| 29 | 12.50 | 29 | 0.90 (*t*, *J*=7.2 Hz) |
| 1’ | 102.91 | 1’ | 5.07 (*d*, *J*=8.0 Hz) |
| 2’ | 75.67 | 2’ | 3.98 (*m*, $\sum J$=34.4 Hz) |
| 3’ | 78.94 | 3’ | 4.08 (*dd*, $J_1$=8.8 Hz, $J_2$=7.6 Hz) |
| 4’ | 72.05 | 4’ | 4.31 *m* |
| 5’ | 78.80 | 5’ | 4.31 *m* |
| 6’ | 63.17 | 6’a | 4.43 (*dd*, $J_1$=11.6 Hz, $J_2$=5.2 Hz) |
| | | 6’b | 4.58 (*dd*, $J_1$=11.6 Hz, $J_2$=2.4 Hz) |

## 4.3. Přehled izolovaných látek ze stonku a listu brusnice borůvky

V následující tabulce (tab. XXVII) uvádím přehled látek izolovaných ze stonku a listu brusnice borůvky. ++ značí vyšší zastoupení látek v methanolickém extraktu oproti +.

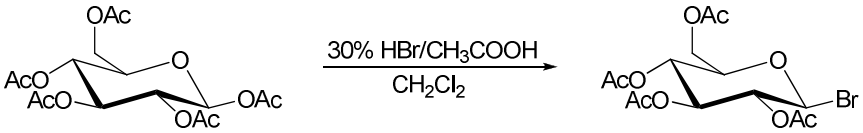
Tabulka XXVII. Zastoupení izolovaných látek ve stonku a listu brusnice borůvky

| **Sloučenina** | **Stonek** | **List** |
|---|---|---|
| α-amyrin (**63**) | + | + |
| β-amyrin (**59**) | ++ | ++ |
| ursolová kyselina (**22**) | + | + |
| oleanová kyselina (**21**) | ++ | ++ |
| 3β,12β-dihydroxyolean-28→13-olid (**62**) | + | + |
| glutinol (**64**) | + | + |
| 3β-sitosterol (**24**) | ++ | ++ |
| 3β-sitosterolglukosid (**80**) | – | + |
| monotropein (**58**) | + | + |
| quercetin (**27**) | ++ | ++ |
| myo-inositol (**79**) | – | + |
| vitamin E (**65**) | + | – |
| 2-deoxy-L-ribono-1,4-lakton (**73**) | + | – |
| sacharosa (**72**) | ++ | – |
| methyl-β-D-fruktopyranosid (**69**) | ++ | ++ |
| methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**) | ++ | ++ |
| methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**) | ++ | ++ |
| (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**) | + | + |
| 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**) | ++ | ++ |
| 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**) | + | + |

Z $^{1}$H NMR spekter frakcí obsahujících nové látky **75** a **76** byl učiněn odhad zastoupení těchto látek v methanolickém extraktu stonku brusnice borůvky. Množství látky **75** bylo odhadnuto na 1.97 g (1.45 %) methanolického extraktu stonku brusnice borůvky a množství látky **76** na 0.22 g (0.16 %) methanolického extraktu stonku brusnice borůvky. Odhad množství byl učiněn z frakcí získaných dělením frakce **S16**. Vzhledem k obsahu látky **75** také ve frakcích **S18** a **S20** bude celkové množství této látky ve stonku brusnice borůvky vyšší.

## 4.4. Příprava standardů: (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4--diolu (77) a (2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (78)

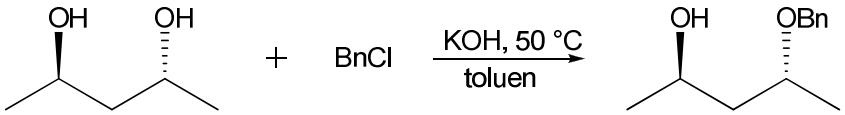
Pro určení absolutní konfigurace nových látek **75** a **76** bylo nutné připravit sloučeniny **77** a **78** s definovanou absolutní konfigurací pro porovnání NMR spekter se spektry izolovaných látek **74**, **75** a **76** a připraveného fragmentu **81**.




**83** **82**

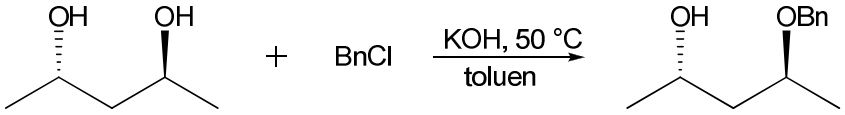
*Schéma 3*

V rámci toho byl syntetizován jako vhodný glykosyl donor 2,3,4,6-tetra-*O*--acetyl-β-D-glukopyranosylbromid (**82**) (viz schéma 3), který byl připraven reakcí peracetylované glukosy **83** s $HBr/CH_3COOH$ ve výtěžku 95 %.[129]




**86** **84**

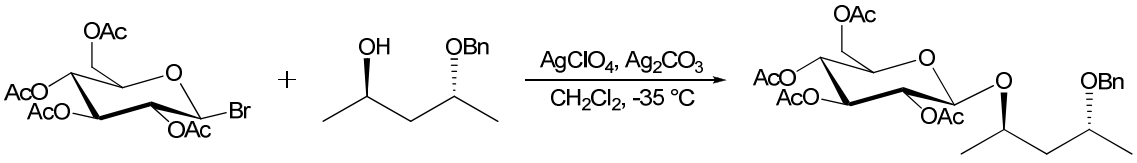
*Schéma 4*




**87** **85**

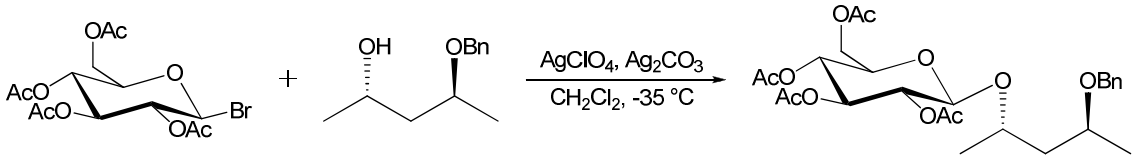
*Schéma 5*

Jako vhodné akceptory do glykosylačních reakcí byly použity monobenzylované dioly **84**/ **85**, které byly připraveny parciální benzylací 2,4-pentandiolu **86**/ **87** směsí benzylchlorid/ *n*-$Bu_4N^+Br^-$/ KOH/ voda/ toluen při 50° C ve výtěžku 62 %/ 46 % (viz schéma 4/ schéma 5).[130]




**82** **84** **88**

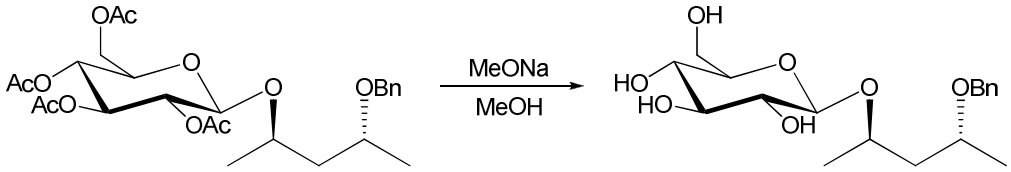
*Schéma 6*




**82** **85** **89**

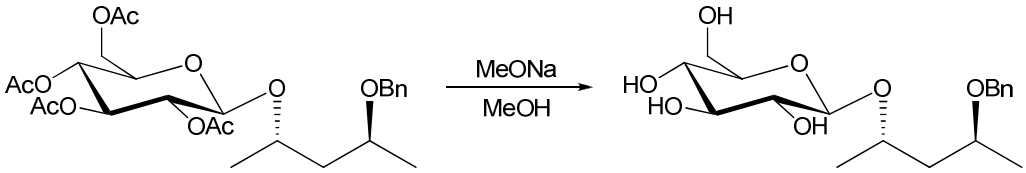
*Schéma 7*

Modifikovaná Koenigs-Knorrova metoda glykosylace monobezylovaných diolů **84/ 85** za použití směsi $AgClO_4$/ $Ag_2CO_3$ (1/5) v dichlormethanu poskytla chráněný glykosid **88**/ **89** ve výtěžku 22 %/ 21 % (viz schéma 6/ schéma 7).[131] (Nižší výtěžky byly zapříčiněny vynecháním optimalizace glykosylační metody, která nebyla předmětem této práce.)




**88** **90**

*Schéma 8*




**89** **91**

*Schéma 9*

Následně byly připravené chráněné dioly **88** a **89** deacetylovány dle Zempléna (MeONa/MeOH) (viz schéma 8/ schéma 9).[132] Výsledný benzylovaný glykosid **90/ 91** byl získán ve výtěžku 68 %/ 65 %.

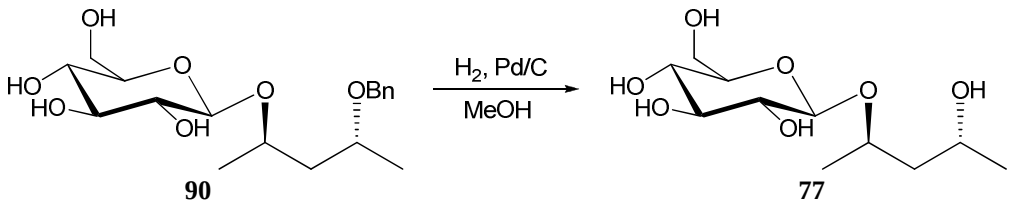



*Schéma 10*

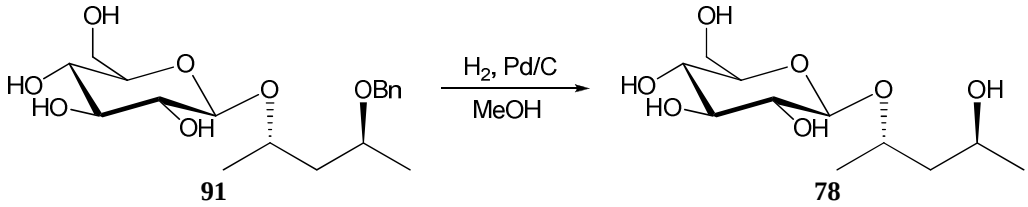



*Schéma 11*

Konečným krokem pro přípravu modelových 2,4-pentandiolových glykosidů **77** a **78** byla debenzylace sloučenin **90** a **91** pomocí $H_2$, která byla provedena za heterogenní katalýzy Pd/C (viz schéma 10/ schéma 11). Výsledné látky byly připraveny s výtěžkem 98 %/ 97 %.

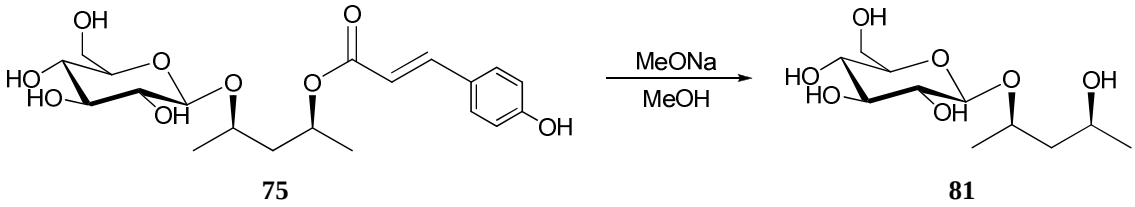
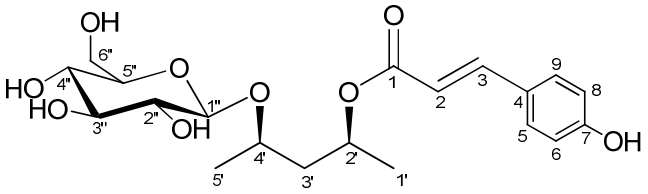



*Schéma 12*

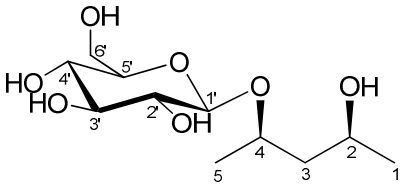
Pro porovnání NMR spekter se spektry výše syntetizovaných látek **77** a **78** byl použit fragment **81** získaný zásaditou alkoholýzou pomocí MeONa/ MeOH izolované látky **75** (viz schéma 12). $^{1}$H a $^{13}$C NMR spektra látky **81** získané ve výtěžku 72 % jsou totožná s $^{1}$H a $^{13}$C NMR spektry izolované látky **74**.

## 4.5. Určení absolutní konfigurace látek 75 a 76

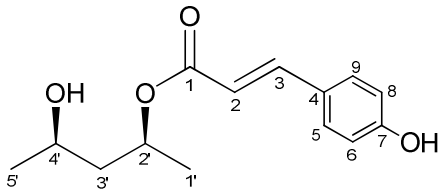
Pro srozumitelnost textu v této kapitole budu používat následující číslování řetězce látek **75**, **76** a **81**.



**75**



**81**



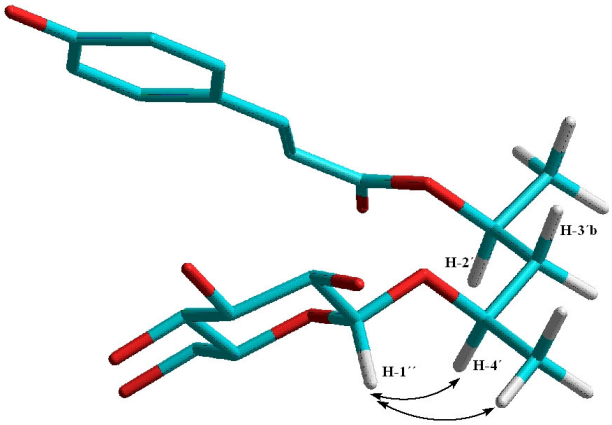
**76**

Konfigurace sloučeniny **75** byla určena kombinací syntézy standardů **77** a **78,** NMR měření a molekulového modelování. Nejprve byla vyloučena konfigurace 2*R*,4*R* a 2*S*,4*S* porovnáním $^{1}$H a $^{13}$C NMR spekter připravených standardů s $^{1}$H a $^{13}$C NMR spektry fragmentu **81** izolované látky **75**.

K rozlišení absolutní konfigurace mezi 2'*R*,4'*S* a 2'*S*,4'*R* bylo provedeno 100 simulovaných žíhání látek **75** a **76** na 1000 K a následné ochlazení na 200 K. Poté byly všechny struktury optimalizovány a geometrické uspořádání s nejnižší energií bylo porovnáno s 2D-ROESY spektrem sloučeniny **75**. Struktura 2´*S*,4´*R* konformeru s nejnižší energií je ve shodě s $^{1}$H NMR a 2D-ROESY spektry sloučeniny **75**. Nalezené kontakty v 2D-ROESY spektru mezi vodíkem H-1´´ a vodíkem H-4´ a mezi vodíkem H-1´´ a methylovými vodíky na C-5´ indikují, že konformace C1´´-O-C4´-C3´ je antiparalelní. V této konformaci jsou methylová skupina v pozici 5´ a vodíkový atom v pozici 4´ prostorově blízko vodíkovému atomu v pozici 1´´. Stejná konformace byla také pozorována ve struktuře s nejnižší energií, která byla získána simulovaným žíháním molekuly s konformací 2´*S*,4´*R* (viz obr. 4). Hodnoty interakční konstanty mezi vodíkem H-3´b a vodíkovými atomy v polohách 2´ a 4´ (7.9 Hz a 7.2 Hz) ukazují, že vodík H-3´b je orientován antiparalelně vzhledem k těmto dvěma vodíkovým atomům. V druhém možném prostorovém uspořádání sloučeniny s konfigurací 2´*R*,4´*S* je v konformeru s nejnižší energií methylová skupina na C-5´ vzdálená 4.5 Å od vodíků

H-1´´ a H-3´b a není v antiparalelním uspořádání s vodíkovými atomy v polohách 2´ a 4´. Z uvedené analýzy tedy vyplývá, že izolovaná sloučenina **75** má konfiguraci 2´*S*,4´*R*.

Na základě podobnosti $^{1}$H a $^{13}$C NMR spekter látky **76** se spektry látky **75** je patrné, že látka **76** je aglykonem látky **75**.




*Obr. 4. Prostorové uspořádání konformeru s nejnižší energií pro sloučeninu **75** s konfigurací 2´S,4´R. Vodíky, které nejsou významné pro určení absolutní konfigurace, jsou pro přehlednost vynechány. Znázorněny jsou významné 2D-ROESY korelace.*

# 5. Experimentální část

## 5.1. Obecné poznámky k experimentální části

NMR spektra byla měřena na přístrojích Bruker Avance II-600, Bruker Avance II-500, Varian $^{UNITY}$ *INOVA* 400, Varian VNMRs 300. $^{1}$H NMR spektra byla měřena při pracovní frekvenci 600.1, 500.0, 400.0 a 300.0 MHz, $^{13}$C spektra při pracovní frekvenci 150.9, 125.7, 100.6 a 75.0 MHz při teplotě 25 ˚C. Spektra byla měřena v $CDCl_3$, $CD_3OD$, $D_2O$, DMSO-$d_6$ a pyridinu-$d_5$. Jako vnitřní standard byl pro měření v $CDCl_3$ použit TMS ($\delta_H$ 0 ppm) a v $D_2O$ *t*-BuOH ($\delta_H$ 1.25 ppm). Spektra měřená v $CD_3OD$, DMSO-$d_6$ a pyridin-$d_5$ byla referencována na signál rozpouštědla ($\delta_H$ 3.31, 2.50 a 8.74 ppm). Chemické posuny v $^{13}$C NMR spektrech byly referencovány na signál rozpouštědla $CDCl_3$ ($\delta_C$ 77.00 ppm), $CD_3OD$ ($\delta_C$ 49.00 ppm), DMSO ($\delta_C$ 39.50 ppm) a pyridin-$d_5$ ($\delta_C$ 150.35 ppm), v $D_2O$ byly referencovány na signál *t*-BuOH ($\delta_C$ 31.60 ppm).

Standardní parametry NMR technik použitých v této práci:

**1D protonový experiment:**
akviziční čas: 2.5 s
relaxační prodleva: 2 s
spektrální šířka: od -1 do +11 ppm
počet přechodů: 64
celkový čas: 5 min

**1D uhlíkový experiment:**
akviziční čas s protonovým dekaplinkem: 0.8 s
relaxační prodleva: 2 s
spektrální šířka: od -10 do +240 ppm
počet přechodů: 1024
celkový čas: 48 min

**DEPT experiment:**
akviziční čas s protonovým dekaplinkem: 1.2 s
relaxační prodleva: 1.5 s
spektrální šířka: od -20 do +220 ppm
počet přechodů: 256 na 1 spektrum
celkový čas: 47 min

**2D COSY experiment:**
relaxační prodleva: 0.5 s
1536 komplexních bodů v t2 a 200 inkrementů v t1
8 přechodů na inkrement
celkový čas: 22 min

**2D TOCSY experiment:**
relaxační prodleva: 0.8 s
640 komplexních bodů v t2 a 250 inkrementů v t1
4 přechody na inkrement
celkový čas: 36 minut

**2D NOESY experiment:**
relaxační prodleva: 1.5 s
směšovací prodleva: 0.3 s
1504 komplexních bodů v t2 a 300 inkrementů v t1
32 přechodů na inkrement
celkový čas: 12 h

| **2D HSQC experiment:** | **2D HMBC experiment:** |
|---|---|
| relaxační prodleva: 1 s | relaxační prodleva: 0.9 s |
| 448 komplexních bodů v t2 a 256 inkrementů v t1 | 864 komplexních bodů v t2 a 256 inkrementů v t1 |
| 2 přechody na inkrement (s použitím gradientových pulsů) | 16 přechodů na inkrement (s použitím gradientových pulsů) |
| celkový čas: 19 min | celkový čas: 1h 20 min |

*Poznámka:* Jednotlivé časy experimentů byly upravovány podle množství měřeného vzorku.

Hmotnostní spektra ESI, APCI byla měřena na přístroji Bruker Equire 3000. Vzorek byl zaváděn přímou infuzí. HR-MS ESI spektra byla měřena na přístroji LCQ ORBITAL XL (Thermo) a GC-MS analýza byla provedena na přístroji FINNIGAN MAT GCQ$^{TM}$ na koloně SE-54. Optické otáčivosti byly měřeny v MeOH na automatickém polarimetru AUTOMATIC POLARIMETER, Autopol III (Rudolph research, Flanders, New Jersey) s přesností ±2˚.

Infračervená spektra byla měřena metodou difuzní reflektance (DRIFT) v KBr na přístroji Nicolet AVATAR 370 FT-IR. Vlnočty jsou uvedeny v cm$^{-1}$. UV spektra byla měřena na přístroji Thermo HELλOS.

Čistota vzorků byla sledována pomocí tenkovrstevné chromatografie na fóliích Kieselgel 60 F 254 (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna postřikem 10% kyselinou sírovou a zahřátím. Pro sloupcovou chromatografii byl používán silikagel Kieselgel 60 (63 – 200 μm, Merck), silikagel Fluka 60752 (0.04-0.063 mm), reverzní silikagel Kieselgel 60 silanizovaný (63 – 200 μm, Merck)

Opticky aktivní (2*R*,4*R*)-pentan-2,4-diol, (2*S*,4*S*)-pentan-2,4-diol a 10% Pd/C bylo od firmy Sigma Aldrich. Molekulární síto UOP 3Å bylo použito od Fluky. Veškerá rozpouštědla, která byla při experimentu používaná, byla předem předestilována. Silikagel použitý na sloupcové chromatografie byl před použitím vždy nejprve promyt mobilní fází.

Studie molekulového modelování byly provedeny s využitím programu Hyperchem 8 (Hypercube). Pro konvergenci (méně než 0.01 kJ mol$^{-1}$ RMS síly) byla použita Polak-Ribierova metoda pro minimalizování energie. Pro všechny výpočty bylo použito silové pole MM+. Protokol pro získání konformeru s nejnižší energií simulovaným žíháním: optimalizovaná výchozí struktura byla vystavena simulovanému žíhání – po dobu 0.2 ps zahřívání z 300 na 1000 K, 0.4 ps ekvilibrace a 0.7 ps chlazení na 200 K následované optimalizací geometrie. Každé další simulované

žíhání vycházelo z předchozí energeticky minimalizované struktury. Pro každou strukturu byla získána sada 100 geometrií, ze kterých byl pro další vyhodnocení vybrán konformer s nejnižší energií.

Nadzemní části brusnice borůvky byly nasbírány v lesích Českomoravské vrchoviny v srpnu roku 2000. Listy byly odděleny od stonků. Obě části byly sušeny na vzduchu při pokojové teplotě cca 25 ˚C po dobu jednoho měsíce.

Hmotnosti jednotlivých fází a frakcí jsou uvedeny po odpaření do sucha

## 5.2. Dělení methanolického extraktu stonku brusnice borůvky

Sušené stonky (2522 g) byly rozstříhány na malé kousky a dvakrát extrahovány methanolem (2×10 l) po dobu celkem tří měsíců. Byly získány dva methanolické extrakty, které byly smíchány a odpařeny do sucha. Byl získán methanolický extrakt stonku brusnice borůvky **S1** (257.8 g), který byl nejprve rozdělen na nepolární (**S2**) a polární frakci (**S3**) a dále zpracováván dle schématu 13.

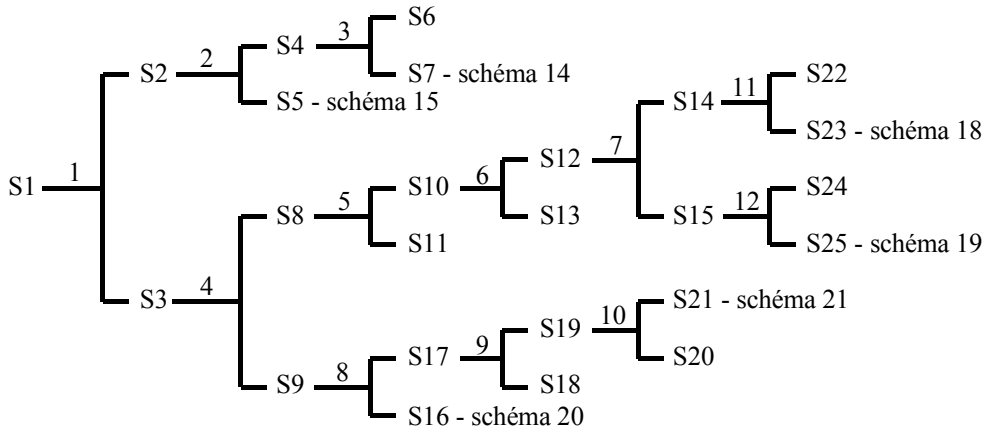



*Schéma 13*

1. Methanolický extrakt **S1** (135.60 g) byl rozpuštěn v MeOH (100 ml) a vysrážen destilovanou $H_2O$ (500 ml). Roztok byl ponechán stát po dobu 3 dnů. Vznikla nepolární sraženina **S2** (18.00 g) a vodná fáze **S3** (116.40 g).

2. Methanolická fáze **S2** (18.00 g) byla následně rozpuštěna v teplém MeOH (50 ml) a vysrážena teplým hexanem (500 ml). Na spojení fází byl přidán $CHCl_3$ (40 ml). Do druhého dne se vytvořila sraženina **S4** (9.13 g) a hexanová fáze **S5** (8.46 g). Hexanová fáze **S5** byla dále chromatograficky dělena (viz schéma 15).

3. Při rozpouštění methanolické fáze **S4** (9.13 g) v $CHCl_3$ (50 ml) byla získána nerozpuštěná složka **S6** (8.25 g) a chloroformová fáze **S7** (0.56 g), která byla dělena sloupcovou chromatografií (viz schéma 14).

4. Vodná fáze **S3** (116.4 g) byla rozpuštěna v MeOH (300 ml) a nechána zchladnout na laboratorní teplotu a vysrážena $Et_2O$ (300 ml). Stáním do druhého dne se usadila sraženina **S8** (64.75 g) a etherická fáze **S9** (51.36 g).

5. Vodná fáze **S8** (64.75 g) byla pod zpětným chladičem rozpuštěna v MeOH (80 ml) za varu a nechána zchladnout na laboratorní teplotu. Poté byl methanolický roztok vodné fáze vysrážen $Et_2O$ (80 ml). Vznikla sraženina **S10** (60.10 g) a etherická fáze **S11** (4.48 g). Etherická fáze **S11** obsahovala sacharosu (**72**) a monotropein (**58**).

6. Sraženina **S10** (60.10 g) byla rozpuštěna v MeOH (150 ml). Po zchladnutí na laboratorní teplotu byl roztok vysrážen $Et_2O$ (100 ml). Usadila se sraženina **S12** (47.26 g) a etherická fáze **S13** (12.55 g). Etherická fáze **S13** obsahovala sacharosu (**72**) a monotropein (**58**).

7. Vodná fáze **S12** (47.26 g) byla rozpuštěna za varu pod zpětným chladičem v MeOH (100 ml) a nechána zchladnout na laboratorní teplotu. Vzorek nebyl zcela rozpuštěn, proto byl přidán ještě MeOH (30 ml) a destilovaná $H_2O$ (15 ml). Až poté byl roztok vysrážen $Et_2O$ (75 ml). Vznikla sraženina **S14** (37.12 g) a etherická fáze **S15** (9.46 g).

8. Etherická fáze **S9** (51.36 g) byla za horka rozpuštěna v MeOH (40 ml). Po dosažení laboratorní teploty byl roztok vysrážen $Et_2O$ (40 ml). Usadila se sraženina **S16** (21.12 g) a etherická fáze **S17** (30.24 g). Sraženina **S16** byla dále chromatograficky dělena (viz schéma 20).

9. Etherická fáze **S17** (30.24 g) byla za horka rozpuštěna v MeOH (50 ml) a nechána zchladnout na laboratorní teplotu. Následně byl roztok vysrážen $Et_2O$ (75 ml). Vznikla sraženina **S18** (2.54 g) a etherická fáze **S19** (27.49 g). Sraženina **S18** obsahovala monotropein (**58**), 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**) a (2*R*,*4S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**).

10. Etherická fáze **S19** (27.49 g) byla rozpuštěna v MeOH (30 ml). Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl roztok vysrážen $Et_2O$ (60 ml). Do druhého dne vznikla sraženina **S20** (0.85 g) a etherická fáze **S21** (26.37 g), která byla dále chromatograficky dělena (viz schéma 21). Sraženina **S20** obsahovala monotropein (**58**),

4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**) a (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**).

11. Sraženina **S14** (37.12 g) byla za horka rozpuštěna v MeOH (150 ml), nechána zchladnout na laboratorní teplotu a vysrážena $Et_2O$ (50 ml). Do druhého dne se vytvořila sraženina **S22** (11.06 g) a etherická fáze **S23** (25.70 g), která byla dále chromatograficky dělena (viz schéma 18).

12. Etherická fáze **S15** (9.46 g) byla vytřepána mezi $CHCl_3$ (200 ml) a $H_2O$ (200 ml). Byla získána chloroformová fáze **S24** (24 mg) a vodná fáze **S25** (9.20 g). Vodná fáze **S25** byla dále chromatograficky dělena (viz schéma 19).

### 5.2.1. Dělení methanolické fáze

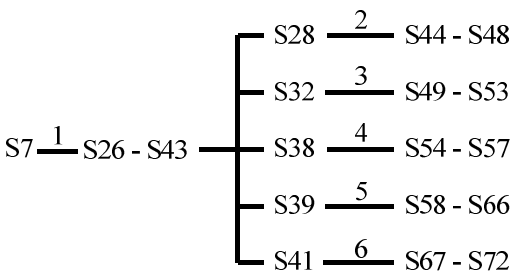
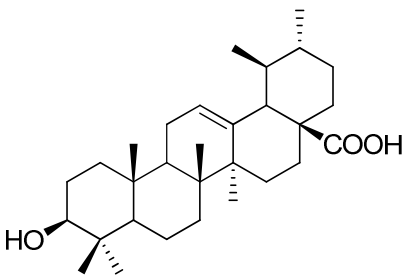



*Schéma 14*

1. Chloroformová fáze **S7** (256 mg) byla dělena gradientově na sloupci $SiO_2$ (50 g). Vzorek byl nanesen na sloupec rozpuštěný v $CHCl_3$ (5 ml). Byly odebírány 90 ml frakce, které byly podle TLC smíchány. Vzorek byl dělen následujícími mobilními fázemi: Hex (300 ml), Hex : $Et_2O$ 30:1 (310 ml), 20:1 (210 ml), 10:1 (330 ml), 9:1 (200 ml), 8:1 (270 ml), 7:1 (320 ml), 6:1 (280 ml), 5:1 (300 ml), 4:1 (250 ml), 3:1 (200 ml), 2.5:1 (350 ml), 2:1 (150 ml), 1.5:1 (250 ml), 1:1 (100 ml), 1:1.5 (250 ml), 1:2 (300 ml), 1:2.5 (175 ml), 1:3 (200 ml), 1:4 (250 ml), 1:5 (300 ml), 1:6 (175 ml), 1:7 (160 ml), 1:8 (90 ml), 1:9 (200 ml), 1:10 (110 ml), 1:20 (105 ml), 1:30 (155 ml), $Et_2O$ (200 ml), $Et_2O$ : MeOH 20:1 (525 ml), 10:1 (440 ml), 7:1 (320 ml), 5:1 (300 ml), 3:1 (400 ml), 1:1 (200 ml), MeOH (500 ml), 10% $CH_3COOH$ v MeOH (100 ml). Byly získány frakce **S26** až **S43**. Obsahem zajímavější frakce byly dále chromatografovány. Ve frakci **S33** (23 mg) byly obsaženy oleanová kyselina (**21**), ursolová kyselina (**22**) a 3β-sitosterol (**24**).




**22**

2. Frakce **S28** (8 mg) byla dělena na sloupečku $SiO_2$ (0.4 g). Vzorek byl nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.3 ml). Jako mobilní fáze byla použita směs $Et_2O$ : Hex 2:1 (130 ml). Byly získány frakce **S44** – **S48**.

3. Frakce **S32** (22 mg) byla dělena chromatograficky na sloupci $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml) s MeOH (1 kapka). Jako mobilní fáze byla použita $Et_2O$ : Hex 2:1 (140 ml) a na závěr byl sloupec silikagelu promyt MeOH (30 ml). Byly odebírány 10 ml frakce, které byly smíchány podle TLC a z této chromatografie byly získány frakce **S49** – **S53**. Z frakce **S52** (6 mg) byla krystalizací ze směsi $CHCl_3$ s MeOH získána oleanová kyselina (**21**) (3 mg). Zbylé frakce obsahovaly 3β,12β-dihydroxyoleanan-28→13β-olid (**62**) a 3β-sitosterol (**24**).

4. Frakce **S38** (37 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml) s MeOH (1 kapka). Jako mobilní fáze byla použita směs $Et_2O$ : Hex 3:1 (80 ml) a na závěr MeOH (30 ml). Byly odebírány 10 ml frakce. Jednotlivé frakce byly smíchány podle TLC. Chromatografie vedla k rozdělení na frakce **S54** až **S57**. Ve frakcích **S55** (3 mg) a **S56** (2 mg) byl obsažen 3β,12β--dihydroxyoleanan-28→13β-olid (**62**). Ve frakci **S57** (8 mg) byly obsaženy oleanová kyselina (**21**), ursolová kyselina (**22**) a 3β-sitosterol (**24**).

5. Frakce **S39** (43 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (3 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1 ml). Při gradientovém způsobu dělení byly použity tyto mobilní fáze: směs Hex : $Et_2O$ 5:1 (18 ml), 4:1 (5 ml), 3:1 (8 ml), 2:1 (6 ml), 1.5:1 (5 ml), 1:1 (8 ml), 1:1.5 (7.5 ml), 1:2 (18 ml), 1:3 (40 ml), 1:4 (20 ml), 1:5 (24 ml), 1:6 (7 ml), 1:7 (8 ml), 1:8 (9 ml), 1:10 (11 ml), $Et_2O$ (20 ml), $CHCl_3$ (20 ml), MeOH (20 ml). Po smíchání jednotlivých frakcí podle TLC byly získány frakce **S58** – **S66**. Ve frakci **S63** (5 mg) byly obsažena oleanová kyselina (**21**), stejně jako ve frakci **S64** (8 mg) a **S65** (20 mg).

6. Frakce **S41** (45 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (7 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (2 ml). Jednotlivé frakce byly eluovány dále uvedenými mobilními fázemi: $Et_2O$ : MeOH 20:1 (53 ml), 10:1 (165 ml), 5:1 (120 ml), 3:1 (80 ml), 1:1 (60 ml), MeOH (50 ml). Byly získány frakce **S67** – **S72**.

### 5.2.2. Dělení hexanové fáze

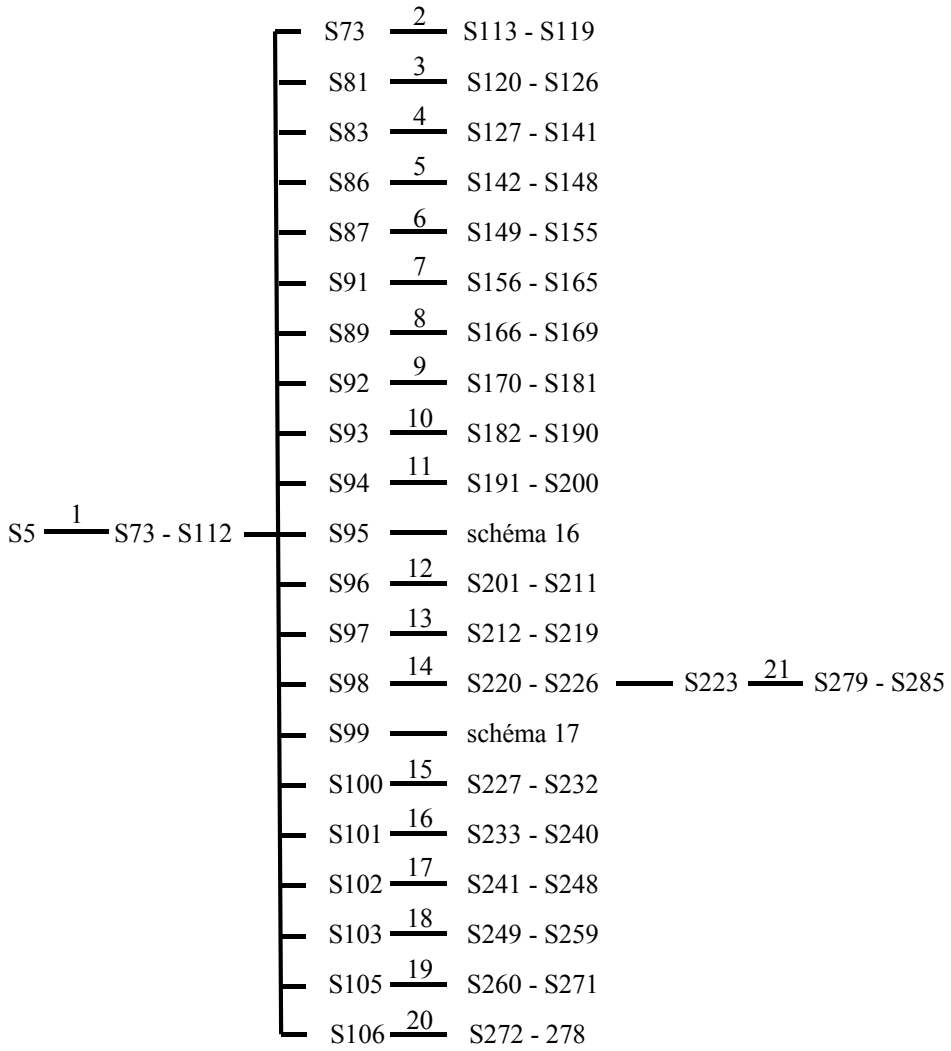
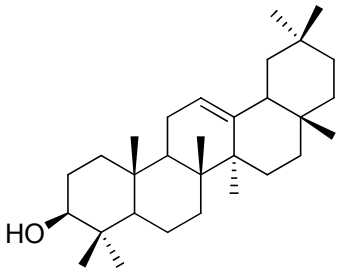



*Schéma 15*

1. Hexanová fáze **S5** (4.46 g) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (200 g). Vzorek byl nanesen na sloupec rozpuštěný v Hex (20 ml). Byly odebírány 90 ml frakce. Jednotlivé frakce byly smíchány podle TLC. Frakce byly při této gradientové chromatografii eluovány postupně těmito mobilními fázemi: Hex (500 ml), Hex : $Et_2O$ 30:1 (93 ml), 20:1 (420 ml), 15:1 (800 ml), 10:1 (660 ml), 9:1 (1500 ml), 8:1 (450 ml), 7:1 (1440 ml), 6:1 (1225 ml), 5:1 (960 ml) , 4:1 (500 ml), 3:1 (3200 ml), 2.5:1 (1330 ml), 2:1

(1800 ml), 1.5:1 (1500 ml), 1:1 (1500 ml), 1:1.5 (1000 ml), 1:2 (600 ml), 1:3 (400 ml), 1:4 (500 ml), 1:5 (600 ml), 1:6 (350 ml), 1:7 (350 ml), 1:8 (180 ml), 1:9 (200 ml), 1:10 (110 ml), 1:20 (210 ml), 1:30 (310 ml), $Et_2O$ (1000 ml), MeOH (1500 ml), horký MeOH (1500 ml), $CHCl_3$ (600 ml), 10% $CH_3COOH$ v MeOH (1000 ml). Byly získány frakce **S73** – **S112**. Jednotlivé frakce obsahující izoprenoidní sloučeniny byly dále děleny následnými sloupcovými chromatografiemi. Frakce **S95** byla dělena dle schématu 16 a frakce **S99** dle schématu 17. Z frakce **S90** (354 mg) byl krystalizací ze směsi $CHCl_3$ s MeOH získán a identifikován β-amyrin (**59**) (203 mg). APCI-MS ($C_{30}H_{50}O$), *m/z*: vypočteno 426.7, naměřeno 409.3 $[M+H–H_2O]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$) viz tab. IV. Ve frakci **S104** (33 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**). Oleanová kyselina (**21**) byla obsažena také ve frakcích **S107** (21 mg) a **S108** (48 mg).



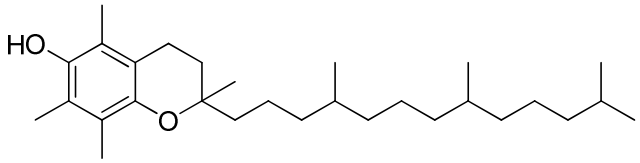

**59**

2. Frakce **S73** (944 mg) byla nanesena na sloupec $SiO_2$ (80 g) rozpuštěna ve směsi $CHCl_3$ (12 ml) a MeOH (1 ml). Byly odebírány 80 ml frakce po vymytí dále uvedenými mobilními fázemi: Hex (100 ml), Hex : $Et_2O$ 20:1 (210 ml), 10:1 (110 ml), 9:1 (100 ml), 8:1 (90 ml), 7:1 (80 ml), 6:1 (70 ml), 5:1 (60 ml), 4:1 (100 ml), 3:1 (40 ml) , 2:1 (60 ml), 1:1 (80 ml), 1:2 (90 ml), 1:3 (160 ml), 1:4 (100 ml), 1:5 (60 ml), 1:6 (70 ml), 1:7 (80 ml), 1:8 (45 ml), 1:9 (50 ml), 1:10 (55 ml), $Et_2O$ (100 ml), $Et_2O$ : MeOH 20:1 (105 ml), 10:1 (110 ml), 9:1 (50 ml), 7:1 (40 ml), 5:1 (60 ml), 4:1 (200 ml), 3:1 (120 ml), 2:1 (90 ml), 1.5:1 (100 ml), 1:1 (100 ml), 1.5:1 (100 ml), 1:2 (270 ml), 1:3 (80 ml), 1:4 (100 ml), 1:5 (60 ml), 1:6 (80 ml), 1:7 (80 ml), 1:8 (90 ml), 1:9 (100 ml), MeOH (150 ml), $CHCl_3$ (200 ml). Byly získány frakce **S113** – **S119**.

3. Frakce **S81** (28 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (6 g) mobilní fází $Et_2O$ : Hex 1:3 (40 ml). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1.5 ml). Byly odebírány 10 ml frakce, které byla následně smíchány dle TLC. Byly eluovány frakce

**S120** – **S126**. Vitamin E (**65**) byl obsažen ve frakci **S123** (5 mg), **S124** (2 mg), **S125** (3 mg) a **S126** (3 mg).

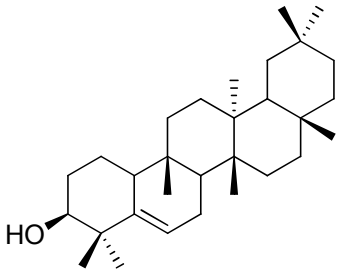
4. Frakce **S83** (51 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (8 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1.5 ml). Jednotlivé frakce byly eluovány těmito mobilními fázemi: Hex (20 ml), Hex : $Et_2O$ 30:1 (15.5 ml), 20:1 (21 ml), 15:1 (16 ml), 10:1 (44 ml), 8:1 (18 ml), 6:1 (14 ml), 4:1 (15 ml), 3:1 (20 ml), 2:1 (15 ml), 1:1 (20 ml), 1:2 (24 ml), 1:5 (24 ml), $Et_2O$ (30 ml), $CHCl_3$ (30 ml). Dle TLC byly jednotlivé frakce smíchány a získány byly frakce **S127** – **S141**. Frakce **S134** (9.3 mg) byla čistá látka, která byla identifikována jako vitamin E **65**. APCI-MS ($C_{29}H_{50}O_2$), *m/z*: vypočteno 430.7, naměřeno 431.3 $[M+H]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$) viz tab. IX. Vitamin E (**65**) byl obsažen i v dalších frakcích **S132** (1 mg), **S133** (7 mg), **S135** – **S141** celkem (28 mg).




**65**

5. Frakce **S86** (49 mg) byla rozdělena na sloupci $SiO_2$ (7 g). Vzorek byl na sloupec $SiO_2$ nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1 ml). Mobilní fáze: Hex (20 ml) a $CHCl_3$ (150 ml). Odebírány byly 10 ml frakce. Po smíchání jednotlivých frakcí podle TLC byly získány frakce **S142** – **S148**. Ve frakcích **S145** (1 mg) a **S146** (9 mg) byl obsažen glutinol (**64**), ve frakci **S147** (16 mg) byly obsaženy glutinol (**64**) a β-amyrin (**59**). Z frakce **S148** (9 mg) byl krystalizací získán čistý β-amyrin (**59**) (4 mg).

6. Frakce **S87** (50 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (8 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1.5 ml). Jednotlivé frakce **S149** – **S155** byly eluovány následujícími mobilními fázemi: Hex : $Et_2O$ 5:1 (60 ml), 4:1 (50 ml), 3:1 (40 ml), 2:1 (45 ml) a MeOH 20 ml. Ve frakcích **S153** (3 mg) a **S154** (14 mg) byl obsažen β-amyrin (**59**), který byl získán krystalizací ze směsi MeOH s $CHCl_3$ čistý (4 mg). Ve frakcích **S152** (3 mg) a **S153** (3 mg) byl obsažen glutinol (**64**). Z frakce **S151** (4 mg) byl glutinol (**64**) identifikován. APCI-MS ($C_{30}H_{50}O$), *m/z*: vypočteno 426.7, naměřeno 427.3 $[M+H]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$) viz tab. VIII.

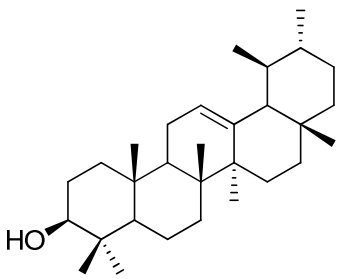



**64**

7. Frakce **S89** (183 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (2 ml). Byly odebírány 10 ml frakce, které byly podle TLC míchány. Jednotlivé frakce byly eluovány směsí $Et_2O$ : Hex 2:1 (100 ml), $CHCl_3$ (20 ml) a MeOH (30 ml). Byly získány frakce **S156** – **S165**. Ve frakcích **S158** (9 mg), **S159** (101 mg), **S160** (54 mg), **S161** (11 mg) byl obsažen β-amyrin (**59**). Krystalizací těchto frakcí ze směsi MeOH s $CHCl_3$ byl získán čistý β-amyrin (**59**) (celkem 108 mg).

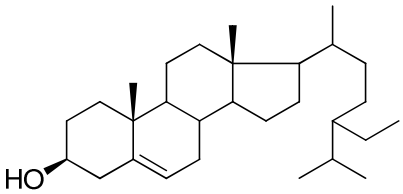
8. Frakce **S91** (253 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (25 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (3 ml), odebírány byly cca 40 ml frakce. Frakce byly eluovány mobilními fázemi Hex (50 ml), Hex : $Et_2O$ 30:1 (93 ml), 15:1 (80 ml), 10:1 (110 ml), 9:1 (700 ml), $CHCl_3$ (100 ml) a MeOH (200 ml). Byly získány frakce **S166** – **S169**. Z frakcí **S167** (224 mg), **S168** (50 mg) byl krystalizací ze směsi MeOH s $CHCl_3$ získán a identifikován čistý β-amyrin (**59**) (celkem 184 mg).

9. Frakce **S92** (177 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (8 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1.5 ml). Frakce byly eluovány mobilními fázemi: Hex : $Et_2O$ 10:1 (22 ml), 9:1 (20 ml), 8:1 (9 ml), 7:1 (48 ml), 6:1 (77 ml), 5:1 (18 ml), 4:1 (25 ml), 3:1 (20 ml), 2:1 (21 ml), $CHCl_3$ (30 ml). Byly eluovány frakce **S170** – **S181**. Ve frakci **S176** (9.3 mg) byly obsaženy 3β-sitosterol (**24**), oleanová kyselina (**21**), ursolová kyselina (**22**) a β-amyrin (**59**). Stejné látky byly obsaženy i ve frakci **S177** (16.9 mg). Ve frakci **S178** (39.9 mg) a ve frakci **S179** (36.4 mg) byly obsaženy 3β-sitosterol (**24**), β-amyrin (**59**) a α-amyrin (**63**). Ve frakci **S180** (7.2 mg) a ve frakci **S181** (10.1 mg) byl obsažen 3β-sitosterol (**24**).



**63**

10. Frakce **S93** (285 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl nanesen rozpuštěný na sloupec ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (3 ml). Byly odebírány cca 20 ml frakce. Frakce **S182** – **S190** byly eluovány mobilní fází $Et_2O$ : Hex 1:5 (300 ml), 1:4 (30 ml), 1:3 (80 ml), 1:2 (30 ml), 1:1.5 (25 ml), 1:1 (30 ml), $Et_2O$ (40 ml), MeOH (40 ml). Ve frakci **S183** (9 mg) byla obsažena směs izoprenoidů: 3β-sitosterolu (**24**), β-amyrinu (**59**) a α-amyrinu (**63**). Ursolová kyselina (**22**) byla obsažena ve frakci **S184** (3 mg). 3β-Sitosterol (**24**) byl obsažen ve frakcích **S185** (34 mg), **S186** (14 mg), **S187** (182 mg), ze kterých byl krystalizací ze směsi MeOH s $CHCl_3$ získán krystalický (celkem 95 mg). Z této frakce byl 3β-sitosterol (**24**) identifikován. APCI-MS ($C_{29}H_{50}O$), *m/z*: vypočteno 414.7, naměřeno 397.3 $[M+H–H_2O]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$ + $CD_3OD$) viz tab. XI.



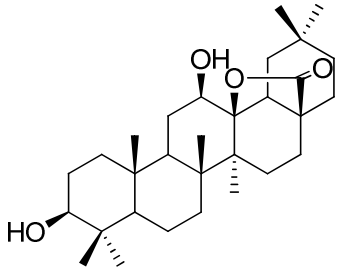
**24**

11. Frakce **S94** (73 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (7.5 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (2 ml). Byly odebírány frakce o objemu cca 10 ml, které byly dle TLC smíchávány. Frakce byly eluovány mobilní fází Hex (20 ml), Hex : $Et_2O$ 30:1 (15.5 ml), 15:1 (16 ml), 10:1 (11 ml), 9:1 (20 ml), 8:1 (27 ml), 7:1 (24 ml), 6:1 (28 ml), 5:1 (30 ml), 4:1 (125 ml), 3:1 (40 ml), 2:1 (30 ml), $CHCl_3$ (30 ml). Bylo získáno 10 frakcí, **S191** – **S200**. 3β-Sitosterol (**24**) byl obsažen ve frakcích **S194** (3 mg), **S195** (6 mg) a **S196** (11.5 mg).

12. Frakce **S96** (68 mg) byla dělena na sloupec $SiO_2$ (6 g). Vzorek byl na sloupce nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1 ml). Byly odebírány cca 10 ml frakce. Jednotlivé frakce byly vymývány mobilní fází Hex (20 ml), Hex : $Et_2O$ 20:1 (21 ml),

10:1 (22 ml), 9:1 (60 ml), 8:1 (54 ml), 7:1 (64 ml), 6:1 (105 ml), 5:1 (60 ml), 4:1 (50 ml), 3:1 (40 ml), 2:1 (30 ml), 1:1 (20 ml), $Et_2O$ (30 ml) a $CHCl_3$ (30 ml). Byly získány frakce **S201** – **S211**.

13. Frakce **S97** (69 mg) byla rozdělena na sloupci $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (2 ml). Byly odebírány 10 ml frakce, které byly smíchány dle TLC. Z této chromatografie byly získány frakce **S212** – **S219**. Frakce byly vymývány mobilní fází $Et_2O$ : Hex 1:5 (60 ml), 1:4 (75 ml), 1:3 (80 ml), 1:2 (90 ml), 1:1.5 (45 ml), 1:1 (50 ml), $Et_2O$ (50 ml), MeOH (30 ml). Oleanová kyselina **21** byla obsažena ve frakci **S213** (19.1 mg). Ve frakci **S214** (10.9 mg) byly obsaženy ve směsi triterpenoidů oleanová kyselina (**21**), ursolová kyselina (**22**), β-amyrin (**59**) a 3β,12β-dihydroxyoleanan-28→13β-olid (**62**). Frakce **S215** (3 mg) byl čistý 3β,12β-dihydroxyoleanan-28→13β-olid (**62**), který byl obsažen i ve frakci **S216**. APCI-MS ($C_{30}H_{48}O_4$), *m/z*: vypočteno 472.7, naměřeno 473.3 $[M+H]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$ + $CD_3OD$) viz tab. VI.




**62**

14. Frakce **S98** (284 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (50 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (3 ml). Odebírány byly cca 90 ml frakce. Jednotlivé frakce byly smíchány dle TLC a byly eluovány mobilní fází Hex (350 ml), Hex : $Et_2O$ 9:1 (500 ml), 8:1 (810 ml), 7:1 (160 ml), 6:1 (210 ml), 5:1 (180 ml), 4:1 (100 ml), 3:1 (160 ml), 2:1 (90 ml), 1:1 (150 ml), $Et_2O$ (100 ml), MeOH (300 ml). Byly získány frakce **S220** – **S226**. Ve frakcích **S220** (103 mg) a **S221** (12 mg) byla obsažena směs β-amyrinu (**59**) s oleanovou kyselinou (**21**). Frakce **S223** (34 mg) byla dále chromatograficky dělena. Z frakce **S224** (43 mg) byla krystalizací ze směsi MeOH s $CHCl_3$ získána oleanová kyselina (**21**) (17 mg). Dále byl v této frakci obsažen 3β,12β--dihydroxyoleanan-28→13β-olid (**62**).

15. Frakce **S100** (54 mg) byla rozdělena na sloupci 5 g $SiO_2$. Vzorek byl na sloupec silikagelu nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1.5 ml). Byly odebírány 10 ml frakce,

které byly eluovány mobilní fází $Et_2O$ : Hex 3:1 (150 ml) a MeOH (30 ml). Byl získáno 6 frakcí **S227** – **S232**.Ve frakcích **S228** (4 mg), **S229** (30 mg) a **S230** (7 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**) s ursolovou kyselinou (**22**).

16. Frakce **S101** (106 mg) byla rozpuštěna v $CHCl_3$ (2 ml) s MeOH (1 kapka) a nanesena na sloupec $SiO_2$ (10 g). Byly odebírány 15 ml frakce, které byly spojovány podle TLC. Byly získány frakce **S233** – **S240**. Ve frakci **S235** (5.4 mg) byla obsažena oleanová kyselina (**21**). Směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**) byla obsažena ve frakcích **S236** (52 mg), **S237** (3 mg) a **S238** (13 mg).

17. Frakce **S102** (61 mg) byla nanesena na sloupec $SiO_2$ (8 g) v $CHCl_3$ (2 ml). Byly odebírány 10 ml frakce eluované mobilní fází Hex : $Et_2O$ 5:1 (30 ml), 4:1 (25 ml), 3:1 (40 ml), 2:1 (30 ml), 1.5:1 (25 ml), 1:1 (70 ml), 1:1.5 (25 ml), 1:2 (30 ml), 1:3 (20 ml), $Et_2O$ (40 ml), MeOH (20 ml). Byly získány frakce **S241** – **S248**. Ve frakcích **S244** (18 mg) a **S245** (5 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**). Obě látky byly obsaženy také ve frakci **S246** (14 mg) a **S247** (5 mg).

18. Frakce **S103** (80 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (2 ml) s MeOH (1 kapka). Byly odebírány cca 20 ml frakce, jenž byly smíchávány dle TLC. Byly získány frakce **S249** – **S259**. Ve frakcích **S252** (2.3 mg), **S253** (24 mg), **S254** (3 mg), **S255** (11 mg) a **S256** (2 mg) byla obsažena oleanová kyselina (**21**), která byla získána čistá (12 mg) krystalizací z frakce **S253** (24 mg). Ve frakci **S253** byla obsažena také ursolová kyselina (**22**).

19. Frakce **S105** (220 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (20 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (2 ml). Ze sloupce byly eluovány 10 ml frakce, které byly následně smíchány dle TLC. Jako mobilní fáze byla použita směs $Et_2O$ : Hex 2:1 (240 ml), MeOH (50 ml). Tímto dělením byly získány frakce **S260** – **S271**. Ve frakcích **S263** (7 mg), **S264** (14 mg), **S265** (6 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**), ursolové kyseliny (**22**) a 3β,12β--dihydroxyoleanan-28→13β-olid (**62**). Směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**) byla obsažena ve frakcích **S266** (52 mg), **S267** (38 mg) a **S268** (26 mg). Z těchto frakcí byly krystalizací ze směsi MeOH s $CHCl_3$ získána opět směs těchto dvou kyselin (celkem 54 mg).

20. Frakce **S106** (119 mg) byla nanesena v $CHCl_3$ (2 ml) s MeOH (0.2 ml) na sloupec $SiO_2$ (10 g). Byly odebírány 10 ml frakce. Frakce byly eluovány mobilní fází Hex : $Et_2O$ 5:1 (30 ml), 4:1 (20 ml), 3:1 (20 ml), 2:1 (225 ml), 1.5:1 (50 ml), 1:1 (20 ml), 1:2 (30 ml), $Et_2O$ (20 ml), MeOH (20 ml) byly smíchány podle TLC a byly

získány frakce **S272** – **S278**. Ve frakcích **S273** (1 mg), **S274** (5 mg), **S275** (1 mg), **S276** (3 mg), **S277** (2 mg) a **S278** (102 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**).

21. Frakce **S223** (68 mg) byla chromatograficky dělena na sloupci $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl nanesen rozpuštěný na sloupec ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (2 ml). Odebírány byly cca 50 ml frakce, které byly eluovány mobilní fází $Et_2O$ : Hex 1:3 (240 ml), 1:2.5 (70 ml), 1:2 (90 ml), 1:1.5 (100 ml), 1:1 (60 ml), $Et_2O$ (50 ml), MeOH (50 ml). Smícháním podle TLC byly získány frakce **S279** – **S285**. Frakce **S280** (15 mg) obsahovala směs oleanové kyseliny (**21**) a β-amyrinu (**59**). Stejná směs byla obsažena ve frakci **S281** (18 mg). Oleanová kyselina (**21**) byla obsažena také ve frakcích **S282** (2 mg), **S283** (4 mg) a **S284** (2 mg).

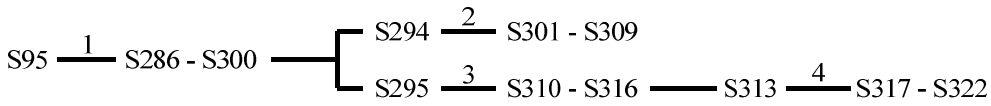



*Schéma 16*

1. Frakce **S95** (96 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na sloupci $SiO_2$ (7 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1.5 ml) s MeOH (1 kapka). Byly jímány cca 10 ml frakce, které následně byly dle TLC smíchány. Gradientovou chromatografií byly frakce eluovány mobilními fázemi Hex (20 ml), Hex : $Et_2O$ 20 : 1 (11 ml), 10:1 (22 ml), 9:1 (20 ml), 8:1 (18 ml), 7:1 (16 ml), 6:1 (21 ml), 5:1 (48 ml), 4:1 (75 ml), 3:1 (40 ml), 2:1 (30 ml), 1.5:1 (25 ml), 1:1 (30 ml), 1:1.5 (25 ml), 1:2 (30 ml), $CHCl_3$ (30 ml), MeOH (30 ml). Dělením **S95** byly získány frakce **S286** – **S300**.

2. Frakce **S294** (13 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl na desku nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (0.5 ml). Deska byla vyvíjena v mobilní fází $Et_2O$ : Hex 2:1. Byly získány frakce **S301** – **S309**.

3. Frakce **S295** (36 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl na desku nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (1 ml). Deska byla vyvíjena v mobilní fází $Et_2O$ : Hex 2 : 1. Byly získány frakce **S310** – **S316**.

4. Frakce **S313** (20 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl na desku nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (0.5 ml). Deska byla vyvíjena v mobilní fází $Et_2O$ : Hex 2 : 1. Byly získány frakce **S317** – **S322**.

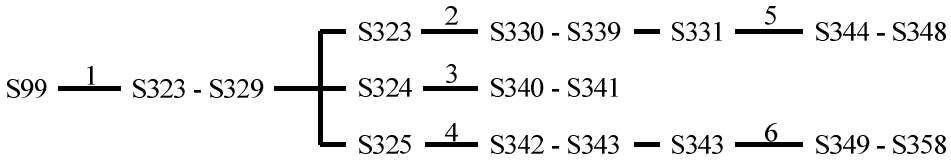


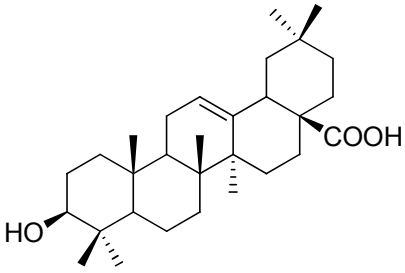

*Schéma 17*

1. Frakce **S99** (438 mg) byla nanesena na sloupec $SiO_2$ (50 g) rozpuštěna ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 2:1 (6 ml). Odebírány byly cca 80 ml frakce. Frakce eluovány mobilní fází: Hex : $Et_2O$ 3:1 (560 ml), 2:1 (450 ml), 1.5:1 (175 ml), 1:1 (180 ml), 1:1.5 (100 ml), 1:2 (150 ml), 1:3 (160 ml), 1:5 (120 ml), $Et_2O$ (100 ml), $CHCl_3$ (100 ml), MeOH (150 ml) byly smíchány dle TLC. Byly získány frakce **S323** – **S329**. Frakce **S323** až frakce **S325** byly dále děleny. Ve frakci **S326** (23 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**), ursolové kyseliny (**22**) a α-amyrinu (**63**).

2. Frakce **S323** (126 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (50 g). Vzorek byl na sloupec nanesen ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 2:1 (3 ml). Byly odebírány 80 ml frakce. Použité mobilní fáze této gradientové chromatografie: Hex (260 ml), Hex : $Et_2O$ 9:1 (550 ml), 8:1 (360 ml), 7:1 (160 ml), 6:1 (140 ml), 5:1 (120 ml), 4:1 (100 ml), 3:1 (120 ml), 2.5:1 (105 ml), $Et_2O$ (100 ml), MeOH (100 ml). Byly získány frakce **S330** – **S339**. Frakce **S330** (26 mg) byla směs izoprenoidních sloučenin, a to: oleanové kyseliny (**21**), β-amyrinu (**59**) a ursolové kyseliny (**22**). Frakce **S332** (12 mg), **S333** (4 mg) a **S334** (8 mg) obsahovaly směs oleanové kyseliny (**21**), ursolové kyseliny (**22**) a β-amyrinu (**59**). Frakce **S335** (4 mg) obsahovala 3β,12β-dihydroxyoleanan-28→13β--olid (**62**). Ve frakci **S336** (2 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**), ursolové kyseliny (**22**) a 3β,12β-dihydroxyoleanan-28→13β-olidu (**62**). Ve frakci **S337** (21 mg) byly obsaženy oleanová kyselina (**21**) a ursolová kyselina (**22**).

3. Z frakce **S324** (210 mg) byla krystalizací ze směsi MeOH s $CHCl_3$ získána oleanová kyselina (**21**) (64 mg). Frakce **S324** dále obsahovala ursolovou kyselinu (**22**), α-amyrin (**63**) a β-amyrin (**59**).

4. Krystalizací frakce **S325** (90 mg) ze směsi MeOH s $CHCl_3$ byla získána oleanová kyselina (**21**) **S342** (47 mg) a matečný louh **S343**. Z této frakce byla oleanová kyselina (**21**) identifikována. ESI-MS ($C_{30}H_{48}O_3$), *m/z*: vypočteno 456.7, naměřeno 455.4 $[M-H]^-$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$ + $CD_3OD$) viz tab. III.




**21**

5. Frakce **S331** (36mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (4 g). Vzorek byl nanesen na sloupec rozpuštěný v $CHCl_3$ (1 ml) s MeOH (1 kapka). Odebírány byly 40 ml frakce. Směs byla dělena mobilní fází Hex : $Et_2O$ 5:1 (120 ml), 4:1 (50 ml), 3:1 (80 ml), MeOH (50 ml). Byly získány frakce **S344** – **S348**. Ve frakci **S344** (4 mg) byla obsažena oleanová kyselina (**21**), která byla i ve frakci **S346** (7 mg) ve směsi s ursolovou kyselinou (**22**). Ve frakci **S345** (28 mg) byla oleanová kyselina (**21**) ve směsi s ursolovou kyselinou (**22**), β-amyrinem (**59**) a 3β-sitosterolem (**24**). Stejná směs izoprenodních látek byla obsažena i ve frakci **S348** (2 mg).

6. Matečný louh **S343** (42 mg) po krystalizaci oleanové kyseliny obsahoval směs izoprenoidních sloučenin a byl dále chromatograficky dělen na sloupci $SiO_2$ (5 g), kam byl nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (2 ml) s přídavkem MeOH. 30 ml frakce byly vymývány mobilní fází Hex (50 ml), Hex : $Et_2O$ 9:1 (30 ml), 8:1 (40 ml), 7:1 (80 ml), 6:1 (294 ml), 5:1 (210 ml), 4:1 (50 ml), 3:1 (80 ml), 2:1 (60 ml), 1:1 (200 ml), 1:2 (90 ml), 1:3 (60 ml), MeOH (60 ml). V získaných frakcích **S349** – **S358** byly obsaženy následující látky: oleanová kyselina (**21**), ursolová kyselina (**22**), β-amyrin (**59**), 3β,12β-dihydroxyoleanan-28→13β-olid (**62**).

### 5.2.3. Dělení vodné fáze

$$S23 \xrightarrow{1} S359 - S370 \xrightarrow{2} S367$$

*Schéma 18*

1. Frakce **S23** (13 g) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (410 g). Vzorek byl na sloupec nanesen v MeOH (25 ml) s $H_2O$ (10 kapek). Byly odebírány 200 ml frakce. Tato sloupcová chromatografie byla prováděna gradientovým způsobem. Jednotlivé frakce byly eluovány mobilní fází: $CHCl_3$ : MeOH 20:1 (7140 ml), 15:1 (2880 ml), 10:1 (3520 ml), 7.5:1 (2040 ml), 5:1 (4320 ml), 4:1 (1000 ml), 3:1 (3600 ml), 2:1 (5400 ml),

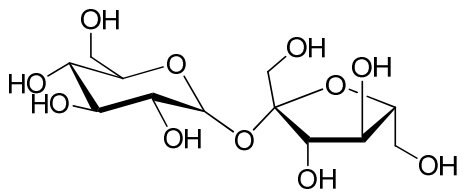
1:1 (1000 ml), MeOH (3300 ml), $H_2O$ (1500 ml). Dle TLC byly frakce smíchány a byly získány frakce **S359** – **S370**. Ve frakci **S359** (92 mg) převažoval 2-deoxy-L-ribono-1,4--lakton (**73**). Frakce **S360** (20 mg) a frakce **S361** (22 mg) obsahovala methyl-α-D--fruktofuranosid (**70**). Ve frakci **S362** (57 mg) byl obsažen (2*R*,*4S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**) společně s methyl-α-D-fruktofuranosidem (**70**). Methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**) byl obsažen také ve frakcích **S363** (22 mg), **S364** (19 mg). Ve frakci **S365** (824 mg) byly obsaženy methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**) a sacharosa (**72**). Ve frakcích **S366** (915 mg), **S368** (4.53 g) a **S369** (3.72 g) byla obsažena sacharosa (**72**).

2. Krystalizací **S367** (1.06 g) z MeOH byla získána a identifikována sacharosa (**72**) (458 mg).

$$\text{S25} \xrightarrow{1} \text{S371 - S388} \longrightarrow \text{S375} \xrightarrow{2} \text{S389 - S 391} \longrightarrow \text{S390}$$

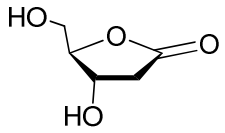
*Schéma 19*

1. Vodná fáze **S25** (9.20 g) byla nanesena ve směsi MeOH : $CHCl_3$ 15:4 (19 ml) na sloupec $SiO_2$ (450g). Byly odebírány 200 ml frakce, které byly následně podle TLC smíchávány. Směs byla dělena mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 20:1 (6720 ml), 15:1 (2400 ml), 10:1 (5720 ml), 7.5:1 (1360 ml), 5:1 (960 ml), 3:1 (1600 ml), 2:1 (4050 ml), 1.5:1 (1000 ml), 1:1 (4500 ml), 1:1.5 (500 ml), 1:2 (900 ml), MeOH (1500 ml). Byly získány frakce **S371** – **S388**. Ve frakci **S374** (11 mg) byl obsažen 2-deoxy-L-ribono--1,4-lakton (**73**). Frakce **S376** (53 mg) obsahovala methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**) a 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Ve frakci **S377** (161 mg) byl obsažen methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**). Ve frakci **S378** (115 mg) byla obsažena směs (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (**74**), methyl-α-D-fruktofuranosidu (**70**), methyl-β-D-fruktofuranosidu (**71**) a methyl-β-D--fruktopyranosidu (**69**). Krystalizací z MeOH byla z frakce **S383** (1.94 g) získána sacharosa (**72**)**,** která byla z této frakce identifikována. ESI-MS ($C_{12}H_{22}O_{11}$), *m/z*: vypočteno 342.3, naměřeno 365.1 $[M+Na]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($D_2O$) viz tab. XIII. Ve frakcích **S384** (2.17 g), **S385** (262 mg), **S386** (2.67 g) a **S387** (183 mg) byla obsažena sacharosa (**72**). Ve frakci **S384** byl vedle sacharosy (**72**) obsažen také monotropein (**58**).



**72**

2. Frakce **S375** (49 mg) byla dělena na sloupci jemného $SiO_2$ (5 g). Byly odebírány 10 ml frakce. Vzorek byl dělen mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (160 ml), MeOH (30 ml). Jednotlivé frakce byly smíchány dle TLC. Byly získány frakce **S389** – **S391**. Frakce **S390** (19 mg) byl čistý 2-deoxy-L-ribono-1,4-lakton (**73**), který byl z této frakce identifikován. ESI-MS ($C_5H_8O_4$), *m/z*: vypočteno 132.1, naměřeno 155.0 $[M+Na]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($D_2O$) viz tab. XII.



**73**

### 5.2.4. Dělení etherické fáze

S16 —1— S392 - S404 — S400 —2— S405 - S412 — S409 —
—3— S413 - S416 — S414 —4— S417 - S419

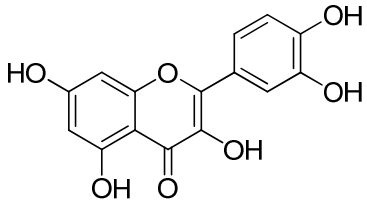
*Schéma 20*

1.Sraženina **S16** (10.20 g) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (250 g). Vzorek byl na sloupec nanesen ve směsi MeOH (26 ml) a $CHCl_3$ (21 ml). Byly odebírány 200 ml frakce. Použitou mobilní fází byla směs $CHCl_3$ : MeOH 15:1 (10080 ml), 10:1 (5280 ml), 5:1 (6480 ml), 3:1 (2000 ml), 2:1 (1800 ml), 1:1 (4000 ml), 1:2 (1800 ml), 1:5 (600 ml), MeOH (2000 ml). Byly získány frakce **S392** – **S404**. Ve frakcích **S392** (22 mg) a **S393** (75 mg) byl obsažen 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**). 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**) byl přítomen ve frakcích **S394** (79 mg) a **S395** (576 mg). Frakce **S395** (576 mg), **S396** (250 mg) a **S397** (520 mg) obsahovaly methyl--α-D-fruktofuranosid (**70**). Frakce **S396** (250 mg) obsahovala směs 4'*R*-(β-D--glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoátu (**75**) a methyl-

-α-D-fruktofuranosidu (**70**). Methyl-β–D-fruktopyranosid (**69**) byl obsažen ve frakci **S397** (520 mg). Frakce **S398** (1.07 g) byla směs (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosylpentan-2,4-diolu (**74**) a methyl-β-D-fruktofuranosidu (**71**). Methyl-β-D--fruktofuranosid (**71**) byl obsažen také ve frakci **S399** (2.66 g). Ve frakcích **S401** (332 mg) a **S402** (982 mg) byl obsažen monotropein (**58**).

2. Frakce **S400** (1.62 g) byla chromatograficky dělena na sloupci $SiO_2$ (110 g). Vzorek byl na sloupec nanesen ve směsi $CHCl_3$ (3 ml): MeOH (5 ml). Byly jímány 200 ml frakce, které byly dále smíchány dle TLC. Byly získány frakce **S405** – **S412**. Frakce **S405** (21 mg) obsahovala 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Frakce **S406** (20 mg) obsahovala ve směsi methyl--α-D-fruktofuranosid (**70**) a 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**) a methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**) byly obsaženy ve frakci **S407** (25 mg). Methyl--β-D-fruktofuranosid (**71**) byl obsažen ve frakci **S408** (54 mg). Frakce **S409** byla dále dělena. Z frakce **S410** (770 mg) byl krystalizací z MeOH získán a identifikován monotropein (**58**) (78 mg). Dále tato frakce obsahovala směs methyl-β-D--fruktofuranosidu (**71**). Monotropeinu (**58**) byl obsažen i ve frakci **411** (278 mg).

3. Frakce **S409** (365 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (30 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v MeOH (1.5 ml). Jako mobilní fáze byla použita směs $CHCl_3$ : MeOH 3:1 (900 ml), MeOH (250 ml). Po smíchání jednotlivých frakcí dle TLC byly získány frakce **S413** – **S416**. Frakce **S415** (78 mg) obsahovala monotropein (**58**) a quercetin (**27**).




**27**

4. Frakce **S414** (209 mg) byla chromatograficky dělena na sloupci $SiO_2$ (30 g). Mobilní fází byla směs $CHCl_3$ : MeOH : $NH_4OH$ 10:10:1 (840 ml). Po smíchání najímaných frakcí byly získány frakce **S417** – **S419**. Ve frakci **S417** (53 mg) byl obsažen monotropein (**58**). Frakce **S419** (94 mg) byla směs quercetinu (**27**) a monotropeinu (**58**).

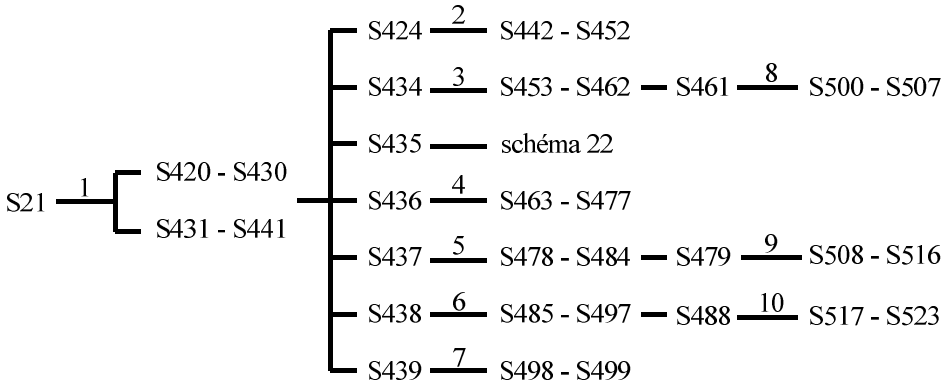



*Schéma 21*

1. Nejprve byla zkušebně dělena část etherické frakce **S21** (0.95 g) na sloupci reverzního $SiO_2$ (50 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi MeOH : $H_2O$ 1:1 (6 ml). Byly jímány frakce o objemu 25 ml. Vzorek byl ze sloupce silikagelu eluován mobilní fází MeOH : $H_2O$ 1:1 (500 ml), 1.5:1 (300 ml), 2:1 (180 ml), 3:1 (160 ml), 5:1 (60 ml), 10:1 (110 ml), MeOH (100 ml), $CHCl_3$ (200 ml), $H_2O$ (100 ml). Jednotlivé frakce byly smíchány podle TLC. Byly získány frakce **S420** – **S430**, z nichž frakce **S424** byla dále chromatograficky dělena. Chromatografie na reverzním silikagelu se jevila jako účinná a byla použita na dělení většího množství **S21**.

Etherická frakce **S21** (25 g) byla dělena na sloupci reverzního $SiO_2$ (250 g). Byly odebírány frakce o objemu 100 ml, které byly dle TLC smíchány. Jednotlivé frakce byly eluovány mobilní směsí $H_2O$ : MeOH 3:1 (2000 ml), 2:1 (600 ml), 1:1 (900 ml), 1:1.5 (250 ml), 1:2 (450 ml), 1:3 (400 ml), 1:5 (240 ml), MeOH (2300 ml), $CHCl_3$ (500 ml). Byly získány frakce **S431** – **S441**, které byly následně děleny dalšími sloupcovými chromatografiemi. Frakce **S435** byla dělena dle schématu 22.

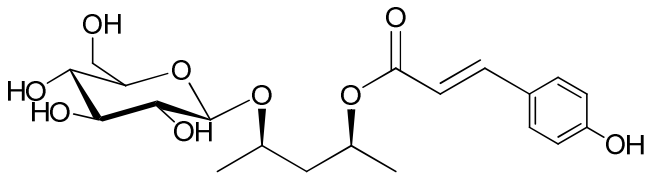
2. Frakce **S424** (132 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (20 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v MeOH (1.5 ml). Byly eluovány 25 ml frakce mobilní fází: $CHCl_3$ (50 ml), $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (460 ml), 3:1 (120 ml), 1:1 (60 ml), MeOH (100 ml), teplý MeOH (200 ml), $H_2O$ (200 ml). Po smíchání jednotlivých frakcí podle TLC byly získány vzorky **S442** – **S452**. Ve frakcích **S442** (11 mg), **S444** (12 mg), **S445** (43 mg) a **S446** (3 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Ve frakcích **S447** (2 mg), **S448** (5 mg) a **S449** (5 mg) byl obsažen quercetin (**27**).

3. Frakce **S434** (2.19 g) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (100 g). Vzorek byl na sloupec silikagelu nanesen ve směsi MeOH : $CHCl_3$ 5:2 (7 ml). Směs byla dělena mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 20:1 (6720 ml), 15:1 (480 ml), 10:1 (770 ml), 5:1 (960 ml), 2.5:1 (700 ml), 1:1 (500 ml), MeOH (500 ml). Po smíchání dle TLC byly získány frakce **S453** – **S462**. Ve frakcích **S455** (8 mg) a **S456** (62 mg) byl čistý methyl-α-D--fruktofuranosid (**70**), který byl z frakce **S456** identifikován. Ve frakci **S457** (246 mg) byla obsažena směs methyl-α-D-fruktofuranosidu (**70**) a (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosylpentan-2,4-diolu (**74**). Frakce **S458** (110 mg) byla směs methyl-β-D--fruktofuranosidu (**71**) a (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (**74**). Methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**) byl obsažen ve frakcích **S459** (11 mg) a **S460** (485 mg).

4. Frakce **S436** (3.50 g) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (400 g). Vzorek byl na sloupec silikagelu nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 12:5 (17 ml). Byly odebírány 200 ml frakce. Jednotlivé frakce, které byly smíchány podle TLC, byly eluovány mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 100:1 (4040 ml), 50:1 (2550 ml), 25:1 (4680 ml), 15:1 (2400 ml), 10:1 (4400 ml), 7:1 (960 ml), 5:1 (480 ml), 3:1 (400 ml) a MeOH (1500 ml). Byly získány frakce **S463** – **S477**. Frakce **S465** (20 mg), **S466** (24 mg) a **S467** (27 mg) obsahovaly 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2--enoát (**76**). Frakce **S470** (18 mg), **S471** (102 mg), **S472** (679 mg), **S473** (389 mg), **S474** (340 mg) a **S475** (255 mg) obsahovaly 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl--2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Ve frakci **S477** (787 mg) byl obsažen monotropein (**58**).

5. Frakce **S437** (1.70 g) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (250 g). Vzorek byl na sloupec nanesen ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (6 ml). Byly odebírány frakce o objemu 70 ml, které byly následně dle TLC smíchávány. Mobilní fází byla směs $CHCl_3$ : MeOH 20:1 (7140 ml), 15:1 (1280 ml), 10:1 (880 ml), 7.5:1 (680 ml), 5:1 (480 ml), 2.5:1 (350 ml), 1:1 (1000 ml), MeOH (500 ml). Byly získány frakce **S478** – **S484**. **V**e frakci **S480** (126 mg) byl obsažen 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2--enoát (**76**). Ve frakcích **S481** (52 mg), **S482** (83 mg) a **S483** (388 mg) byl obsažen 4'*R*--(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Z frakce **S482** byla tato látka identifikována a následně charakterizována. 4'*R*-(β-D--glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**): bezbarvý olej, $[\alpha]_D^{20}$ +2.3° (c 1.08, MeOH); UV $\lambda_{max}$ (MeOH, nm): 224, 312; IR (KBr) $\nu_{max}$, $cm^{-1}$:

3100–3600 (OH), 2972, 2930 (C-H), 1689 (C=O, ester), 1632 (C=C), 1514, 1587, 1604 (Ar), 1445, 1274, 1170, 1077 (C-O); ESI-MS ($C_{14}H_{18}O_4$), *m/z*: vypočteno 250.3, naměřeno 249.1 $[M-H]^-$, 163 $[M-H-248]^-$, 145 $[M-H-H_2O-248]^-$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CD_3OD$) viz tab. XX.




**75**

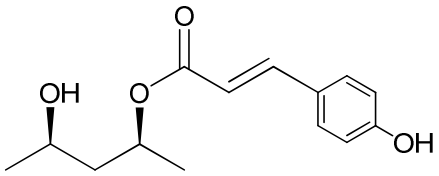
6. Frakce **S438** (377 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (50 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v MeOH (6 ml). Byly odebírány cca 20 ml frakce. Jako mobilní fáze byla použita směs $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (220 ml), 8:1 (90 ml), 7:1 (80 ml), 6:1 (35 ml), 5:1 (120 ml), 4:1 (100 ml), 3:1 (40 ml), 2:1 (60 ml), 1:1 (100 ml), 1:2 (210 ml), 1:3 (40 ml), 1:4 (50 ml), 1:5 (60 ml), 1:10 (110 ml), MeOH 250 ml), $H_2O$ (250 ml). Najímané frakce byly podle TLC smíchány a byly získány frakce **S485** – **S497**. Ve frakci **S487** (11 mg) byl obsažen 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**). Ve frakcích **S489** (40 mg), **S490** (18 mg) a **S491** (28 mg) byl obsažen quercetin (**27**), ve frakci **S489** byl obsažen také 4'*R*-hydroxypent--2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**).

7. Frakce **S439** (43 mg) byla extrahována $CHCl_3$.

8. Frakce **S461** (530 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (50 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v MeOH (2 ml). Mobilní fází byla směs $CHCl_3$ : MeOH : $NH_4OH$ 1:1:0.2 (3520 ml), 2:3:0.5 (550 ml), 1:2:0.3 (660 ml), 1:3:0.4 (440 ml), MeOH (500 ml). Byly odebírány cca 80 ml frakce, které byly následně smíchány dle TLC. Byly získány frakce **S500** – **S507**. Ve frakci **S501** (66 mg) byl obsažen (2*R*,4*S*)-2-*O*-β--D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**). Ve frakcích **S502** (72 mg) a **S503** (181 mg) byl obsažen monotropein (**58**), který byl z frakce **S503** získán čistý (35 mg) krystalizací z MeOH. Ve frakcích **S504** (44 mg) a **S505** (74 mg) byla obsažena sacharosa (**72**).

9. Frakce **S479** (97 mg) byla dělena na sloupci jemného $SiO_2$ (15 g). Vzorek byl na sloupec silikagelu nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1 ml). Byly odebírány cca 30 ml frakce. Mobilní fází byl $CHCl_3$ (600 ml) a směs $CHCl_3$ : MeOH 50:1 (200 ml). Byly získány frakce **S508** – **S516**. Ve frakcích **S512** (8 mg), **S513** (29 mg) a **S514** (23 mg)

byl obsažen 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**), který byl z frakce **S512** charakterizován. 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**)**:** bezbarvý olej, $[\alpha]_D^{20}$ +5.3° (c 0.19, MeOH); UV $\lambda_{max}$ (MeOH, nm): 225, 311.5; IR (KBr) $\nu_{max}$ , $cm^{-1}$: 3100–3600 (OH), 2963, 2927 (C-H), 1704 (C=O, ester), 1632 (C=C), 1514, 1587, 1604 (Ar), 1450, 1261, 1170, 1102 (C-O); ESI-MS ($C_{20}H_{28}O_9$), *m/z*: vypočteno 412.4, naměřeno 411.2 $[M-H]^-$, 163 $[M-H-86]^-$, 145 $[M-H-H_2O-86]^-$, 119 $[M-H-CO_2-86]^-$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CD_3OD$) viz tab. XIX.




**76**

10. Frakce **S488** (108 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (7 g). Vzorek byl rozpuštěn v MeOH (1 ml) a nanesen na sloupec. Vzorek byl vymýván mobilní fází $CHCl_3$ (250 ml), MeOH (250 ml), $H_2O$ (250 ml). Jednotlivé najímané 15 ml frakce byly smíchány dle TLC a byly získány frakce **S517** – **S523**. 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3--(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**) byl obsažen ve frakcích **S518** (72 mg), **S519** (11 mg) a **S520** (5 mg).

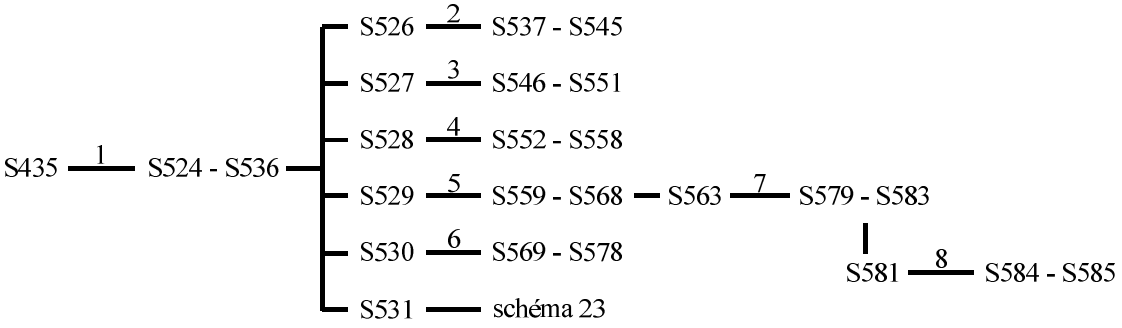
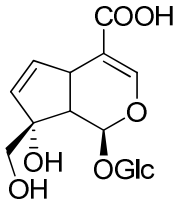



*Schéma 22*

1. Frakce **S435** (14.47 g) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (150 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v MeOH (20 ml). Jednotlivé 150 ml frakce byly eluovány mobilními fázemi: $CHCl_3$ (800 ml), $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (550 ml), 8:1 (360 ml), 5:1 (660 ml), 4:1 (250 ml), 3:1 (800 ml), 2:1 (300 ml), 1.5:1

(250 ml), 1:1 (500 ml), MeOH (1000 ml), $H_2O$ (500 ml). Po smíchání jednotlivých frakcí byly získány frakce **S524** – **S536**. Frakce **S531** byla dělena dle schématu 23. Ve frakcích **S532** (697 mg), **S533** (1.54 g) a **S534** (2.34 g) byl obsažen monotropein (**58**), který byl z frakce **S532** získán čistý krystalizací z MeOH a byl identifikován (65 mg). ESI-MS ($C_{16}H_{22}O_{11}$), *m/z*: vypočteno 390.3, naměřeno 389.1 $[M-H]^-$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($D_2O$) viz tab. XVII.




**58**

2. Frakce **S526** (298 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (30 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (2 ml). Jednotlivé 25 ml frakce, které byly následně smíchány dle TLC, byly eluovány následujícími mobilními fázemi: $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (220 ml), 8:1 (90 ml), 6:1 (70 ml), 4:1 (50 ml), MeOH (100 ml). Byly získány frakce **S537** – **S545**. Ve frakcích **S540** (8 mg), **S541** (28 mg), **S542** (39 mg) a **S543** (11 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D--glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**).

3. Frakce **S527** (195 mg) byla dělena gradientovou sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (20 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (2 ml). Vzorek byl eluován mobilními fázemi $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (240 ml), 4:1 (100 ml), 3:1 (80 ml), MeOH (100 ml). Tímto dělením byly získány frakce **S546** – **S551**. Ve frakcích **S547** (26 mg) a **S548** (17 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D--glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**).

4. Frakce **S528** (237 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (20 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (2 ml). Jednotlivé 20 ml frakce, které byly následně smíchány dle TLC, byly eluovány následujícími mobilními fázemi: $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (220 ml), 5:1 (60 ml), 3:1 (80 ml), MeOH (100 ml). Byly získány frakce **S552** – **S558**. Ve frakcích **S554** (37 mg), **S555** (58 mg) a **S556** (14 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl--2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**).

5. Frakce **S529** (602 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (70 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (3 ml). Jednotlivé 100 ml frakce, které byly následně smíchány dle TLC, byly eluovány následujícími mobilními fázemi: $CHCl_3$ : MeOH 30:1 (2170 ml), 10:1 (1100 ml), 1:1 (300 ml), MeOH (500 ml). Byly získány frakce **S559** – **S568**. Ve frakcích **S564** (16 mg) a **S565** (105 mg) byl obsažen methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**). Ve frakci **S566** (182 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**).

6. Frakce **S530** (1.61 g) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (200 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 1:1 (5 ml). Jednotlivé najímané frakce byly smíchány dle TLC. 150 ml frakce byly eluovány následujícími mobilními fázemi: $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (1200 ml), 4:1 (500 ml), 3:1 (200 ml), 2:1 (150 ml), 1:1 (200 ml), MeOH (1000 ml). Byly získány frakce **S569** – **S578**. Ve frakcích **S571** (13 mg), **S572** (56 mg), **S573** (329 mg) a **S574** (650 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Frakce **S575** (83 mg) obsahovala převážně methyl--α-D-fruktofuranosid (**70**). Ve frakcích **S576** (62 mg) a **S577** (179 mg) byl obsažen (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**).

7. Frakce **S563** (51 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (0.5 ml). Byly jímány 20 ml frakce. Vzorek byl dělen mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 15:1 (700 ml), MeOH (100 ml). Touto chromatografií byly získány frakce **S579** – **S583**. Frakce **S581** byla dále chromatograficky dělena.

8. Frakce **S581** (21 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na jemném $SiO_2$ (3.5 g). Vzorek byl na sloupci nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (0.5 ml). Byly eluovány 0.5 ml frakce mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 10:1, které byly následně smíchány dle TLC. Byly získány frakce **S584** (4 mg) a **S585** (16 mg). Ve frakci **S585** byl obsažen 2-deoxy-L-ribono-1,4-lakton (**73**).

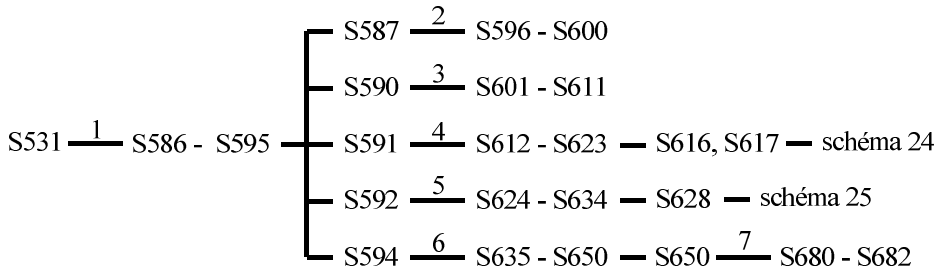


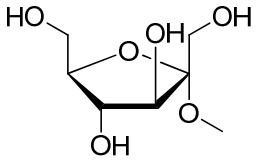

*Schéma 23*

1. Frakce **S531** (7.47 g) byla chromatograficky dělena na sloupci $SiO_2$ 500. Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (20 ml). Byly jímány 75 ml frakce. Najímané frakce byly následně smíchány dle TLC. Jednotlivé frakce byly eluovány mobilní fázi $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (3000 ml), 4:1 (1000 ml), 3:1 (1900 ml), MeOH (1000 ml). Tímto dělením byly získány frakce **S586** – **S595**, které byly dále děleny. Ve frakcích **S588** (124 mg) **a S589** (123 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D--glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Ve frakci **S593** (0.79 g) byl obsažen methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**), (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**), 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3--(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**) a monotropein (**58**). Ve frakci **S595** (1.79 g) byl obsažen monotropein (**58**).

2. Frakce **S587** (30 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (6 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (0.2 ml). Byly jímány 10 ml frakce. Podle TLC byly najímané frakce smíchány. Frakce **S596** – **S600** byly eluovány mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (210 ml), 3:1 (80 ml), 1:1 (50 ml), MeOH (50 ml). Ve frakcích **S597** (6 mg) a **S598** (9 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D--glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**).

3. Frakce **S590** (771 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (80 g). Vzorek byl rozpuštěn ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 20:1 (2 ml) a nanesen na sloupec silikagelu. Vzorek byl eluován následujícími mobilními fázemi: $CHCl_3$ : MeOH 20:1 (6400 ml), 1:1 (400 ml), MeOH (400 ml), $H_2O$ (200 ml). Najímané 100 ml frakce byly smíchány dle TLC a byly získány frakce **S601** – **S611**. Z frakce **S604** (65 mg), která byla čistý methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**), byla tato látka identifikována. ESI-MS ($C_7H_{14}O_6$), *m/z*: vypočteno 194.2, naměřeno 216.8 $[M+Na]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($D_2O$) viz tab. XIV. Methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**) byl také obsažen ve frakcích **S605** (73 mg) a **S606** (204 mg). Ve frakcích **S605** (73 mg), **S606** (204 mg) a **S607** (48 mg) byl obsažen

4’*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2’*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Ve frakci **S608** (104 mg) byl obsažen (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**).




**70**

4. Frakce **S591** (1.22 g) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (80 g). Vzorek rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 1:1 (4 ml) byl nanesen na sloupec silikagelu. Vzorek byl dělen mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 15:1 (6500 ml), 10:1 (880 ml), 5:1 (480 ml), 2.5:1 (350 ml), 1:1 (500 ml), MeOH (500 ml). Najímané frakce byly smíchány dle TLC. Byly získány frakce **S612** – **S623**. Frakce **S616** a **S617** byly dále chromatograficky děleny dle schématu 24. Ve frakcích **S613** (15 mg) a **S614** (9 mg) byl obsažen methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**). Ve frakci **S615** (114 mg) byl obsažen (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**). Frakce **S618** (81 mg) a **S619** (33 mg) byla směs methyl-β-D-fruktofuranosidu (**71**) a (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosylpentan-2,4-diolu (**74**). Ve frakci **S620** (20 mg) byly obsaženy methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**), 4’*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2’*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**) a (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**). Ve frakci **S621** (47 mg) byly obsaženy 4’*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2’*S*-yl--2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**) a (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan--2,4-diol (**74**).

5. Frakce **S592** (382 mg) byla rozdělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (30 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 2:1 (2 ml). Byly eluovány 50 ml frakce mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 20:1 (3250 ml), 15:1 (320 ml), 10:1 (660 ml), 5:1 (360 ml), 1:1 (600 ml), MeOH (400 ml). Dle TLC byly najímané frakce smíchány a byly získány frakce **S624** – **S634**. Frakce **S628** byla dělena dle schématu 25. Frakce **S627** (15 mg) byl čistý methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**), který byl z této frakce identifikován. Tato látka byla společně s (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosylpentan-2,4-diolem (**74**) obsažena i ve frakci **S629** (121 mg).

6. Frakce **S594** (842 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (80 g). Vzorek byl rozpuštěn ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 1:1 (10 ml). Jako mobilní fáze byla použita směs $CHCl_3$ : MeOH 20:1 (4200 ml), 15:1 (640 ml), 10:1 (990 ml), 5:1 (1200 ml), 2.5:1 (700 ml), 1:1 (500 ml), MeOH (1000 ml). Po smíchání jednotlivých najímaných 75 ml frakcí podle TLC byly získány frakce **S635** – **S650**. Frakce **S639** (15 mg), **S640** (14 mg), **S641** (17 mg) a **S642** (57 mg) obsahovaly methyl-α-D--fruktofuranosid (**70**). Ve frakci **S642** byl také obsažen methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**). Ve frakci **S643** (47 mg) byl obsažen methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**). Frakce **S644** (20 mg), **S645** (48 mg), **S646** (89 mg) a **S647** (42 mg) obsahovaly methyl-β-D--fruktofuranosid (**71**).

7. Frakce **S650** (32 mg) byla chromatograficky dělena na sloupci $SiO_2$ (3 g). Vzorek byl na sloupec $SiO_2$ (8 g) nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 20:1 (0.4 ml). Ze sloupce byly eluovány 10 ml frakce, které byly následně podle TLC smíchány. Byly získány frakce **S680** – **S682**. Ve frakci **S681** (6 mg) byl obsažen methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**).

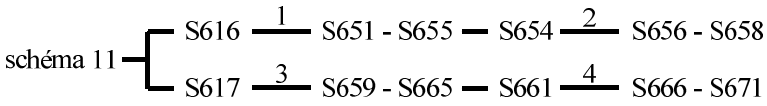
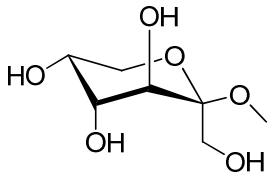


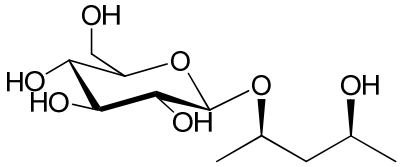

*Schéma 24*

1. Frakce **S616** (305 mg) byla rozdělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (20 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 2:1 (2 ml). Byly eluovány 30 ml frakce mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 15:1 (1690 ml), MeOH (200 ml), $H_2O$ (100 ml). Dle TLC byly najímané frakce smíchány a byly získány frakce **S651** – **S655**. Frakce **S652** (28 mg) byla čistý methyl-β-D-fruktopyranosid (**69**), který byl z této frakce identifikován. ESI-MS ($C_7H_{14}O_6$), *m/z*: vypočteno 194.2, naměřeno 216.8 $[M+Na]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($D_2O$) viz tab. XVI. Ve frakci **S653** (151 mg) převažoval (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**).




**69**

2. Frakce **S654** (98 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na jemném $SiO_2$ (15 g). Vzorek byl rozpuštěn ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (0.5 ml) a nanesen na sloupec silikagelu. Vzorek byl eluován mobilní fází: $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (440 ml), MeOH (100 ml). Najímané 20 ml frakce byly smíchány dle TLC a byly získány frakce **S656** – **S658**. Touto chromatografií bylo dosaženo vyčištění (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosylpentan-2,4-diolu (**74**), frakce **S656** (36 mg), který byl z této frakce identifikován. (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (**74**): $[\alpha]_D^{20}$ -39.6° (c 0.505, MeOH), lit. -33° (c 1.3, MeOH),[112] ESI-MS ($C_{14}H_{18}O_4$), *m/z*: vypočteno 266.3, naměřeno 289.1 $[M+Na]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CD_3OD$) viz tab. XVIII. (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**) byl obsažen i ve frakcích **S657** (46 mg) a **S658** (8 mg) společně s methyl-β-D-fruktofuranosidem (**71**).

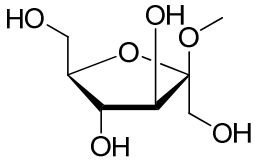



**74**

3. Frakce **S617** (335 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (20 g). Vzorek byl na sloupec nanesený rozpuštěn v MeOH (1 ml). Jako mobilní fáze byla použita směs $CHCl_3$ : MeOH 30:1 (4450 ml), 1:1 (300 ml), MeOH (100 ml). Jímány byly 50 ml frakce. Byly smíchány dle TLC a byly získány frakce **S659** – **S665**. Ve frakci **S662** (38 mg) byly obsaženy (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**) a methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**). Methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**) byl obsažen ve frakcích **S663** (62 mg), **S664** (39 mg) a **S665** (25 mg).

4. Frakce **S661** (162 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na jemném $SiO_2$ (15 g). Byly jímány 25 ml frakce, které byly smíchány dle TLC. Jednotlivé frakce byly eluovány mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (880 ml), MeOH (100 ml). Byly získány frakce **S666** – **S671**. Frakce **S667** (13 mg) byl čistý (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**). Ve frakcích **S668** (73 mg), **S669** (24 mg) a **S670** (14 mg) byla obsažena směs (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (**74**) a methyl-β-D-fruktofuranosidu (**71**). Frakce **S669** (12 mg) byl čistý methyl-β-D-

-fruktofuranosid (**71**), který byl z této frakce identifikován. ESI-MS ($C_7H_{14}O_6$), *m/z*: vypočteno 194.2, naměřeno 217.0 $[M+Na]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($D_2O$) viz tab. XV.




**71**

S628 —1— S672 - S675 — S674 —2— S676 - S677 — S676 —3— S678 - S679

*Schéma 25*

1. Frakce **S628** (125 mg) byla dělena na $SiO_2$ (13 g) sloupcovou chromatografií. Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (1 ml). Eluovány byly 30 ml frakce, které byly následně smíchány dle TLC, byly vymyty mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 20:1 (1260 ml), 5:1 (250 ml), MeOH (200 ml). Byly získány frakce **S672** – **S675**. Frakce **S674** byla dále chromatograficky dělena.

2. Frakce **S674** (132 mg) byla také dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (13 g). Vzorek byl na sloupec nanesen ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (1 ml). Byly odebírány 20 ml frakce, které byly posléze smíchány dle TLC. Jako mobilní fáze byla použita směs $CHCl_3$ : MeOH 5:1 (240 ml), MeOH (200 ml). Byly získány frakce **S676** a **S677**. Ve frakci **S677** (16 mg) byl obsažen methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**).

3. Frakce **S676** (110 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (9 g). Vzorek byl na sloupec nanesen ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 2:1 (1 ml). Byly odebírány 10 ml frakce. Následně byly smíchány dle TLC. Mobilní fází byla směs $CHCl_3$ : MeOH 2:1 (90 ml). Byly získány frakce **S678** a **S679**. Ve frakci **S678** (91 mg) byly obsaženy methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**) a (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (**74**) a ve frakci **S679** (15 mg) byl obsažen pouze methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**).

## 5.3. Dělení methanolického extraktu listu brusnice borůvky

Sušené listy (1644 g) byly rozstříhány na malé kousky a dvakrát extrahovány MeOH (2×10 l) po dobu celkem tří měsíců. Byly získány dva methanolické extrakty, které byly smíchány a odpařeny do sucha. Byl získán methanolický extrakt listů brusnice borůvky **L1** (133 g), který byl nejprve rozdělen na polární a nepolární frakci (viz schéma 26).

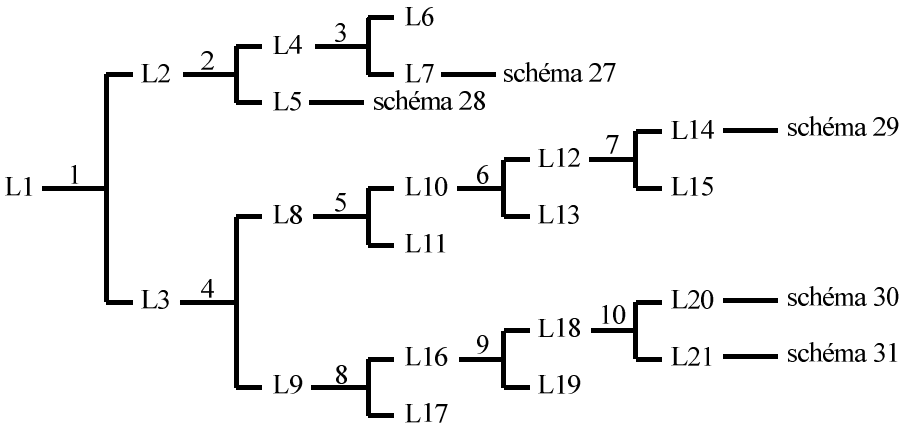



*Schéma 26*

1. Methanolický extrakt **L1** (119.30 g) byl rozpuštěn v teplém MeOH (320 ml) a vysrážen teplou $H_2O$ (t=80 ˚C, 1600 ml)). Vznikla nepolární sraženina **L2** (33.70 g), která byla dosušena v sušárně při 40 ˚C a vodný roztok **L3** (83.60 g).

2. Nepolární fáze **L2** (13.50 g) byla rozpuštěna v MeOH (40 ml) za varu, následně vysrážena horkým hexanem (200 ml) a na spojení fází byl přidán $CHCl_3$ (40 ml). Vznikla sraženina **L4** (7.49 g) a hexanový roztok **L5** (5.98 g). Hexanová fáze byla dále dělena dle schématu 28.

3. Methanolická fáze **L4** (7.49 g) byla rozpouštěna v $CHCl_3$. V $CHCl_3$ se rozpustila pouze část, vznikla sraženina **L6** (5.50 g) a chloroformový extrakt **L7** (1.96 g). Chloroformová fáze **L7** byla dále chromatograficky dělena (viz schéma 27).

4. Vodná fáze **L3** (46.50 g) byla rozpuštěna v MeOH (100 ml) za varu, nechána zchladnout na laboratorní teplotu a následně byla vysrážena $Et_2O$ (100 ml). Do druhého dne vznikla sraženina **L8** (22.10 g) a etherická fáze **L9** (24.51 g).

5. Sraženina **L8** (22.10 g) byla rozpuštěna v MeOH (25 ml) za varu. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byl roztok vysrážen $Et_2O$ (25 ml). Vznikla sraženina **L10** (20.22 g) a etherický roztok **L11** (1.46 g).

6. Vodná fáze **L10** (20.22 g) byla rozpuštěna v MeOH (50 ml) za varu. Roztok byl nechán zchladnout na laboratorní teplotu, vysrážen $Et_2O$ (50 ml) a nechán ustát do druhého dne. Vznikla sraženina **L12** (15.43 g) a etherický roztok **L13** (4.65 g).

7. Vodná fáze **L12** (15.43 g) byla rozpuštěna v MeOH (40 ml) za horka a po vychladnutí na laboratorní teplotu vysrážena $Et_2O$ (20 ml). Do druhého dne se usadila sraženina **L14** (11.31 g) a etherický roztok **L15** (3.90 g). Vodná fáze **L14** byla dále dělena (viz schéma 29).

8. Etherická fáze **L9** (24.51 g) byla rozpuštěna v MeOH (25 ml) za varu a nechána zchladnout na laboratorní teplotu. Poté byl tento roztok vysrážen $Et_2O$ (25 ml) a nechán odstát do druhého dne. Vznikl etherický roztok **L16** (21.46 g) a sraženina **L17** (2.98 g).

9. Etherická fáze **L16** (21.46 g) byla rozpuštěna v MeOH (50 ml) za varu, nechána zchladnout na laboratorní teplotu a vysrážena $Et_2O$ (50 ml). Do druhého dne vznikl etherický roztok **L18** (18.12 g) a sraženina **L19** (3.16 g).

10. Etherická fáze **L18** (18.12 g) byla rozpuštěna za horka v MeOH (50 ml) a po vychladnutí na laboratorní teplotu vysrážena $Et_2O$ (100 ml). Do druhého dne se usadila sraženina **L20** (1.87 g) a vodná fáze **L21** (16.10 g). Sraženina **L2**0 byla dále dělena dle schématu 30 a vodná fáze **L21** byla dělena dle schématu 31.

### 5.3.1. Dělení chloroformové fáze

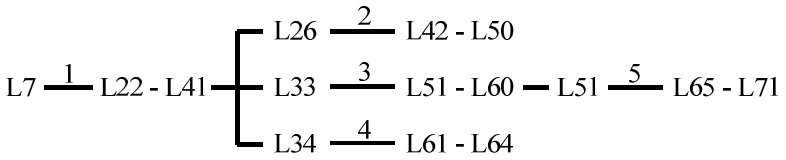
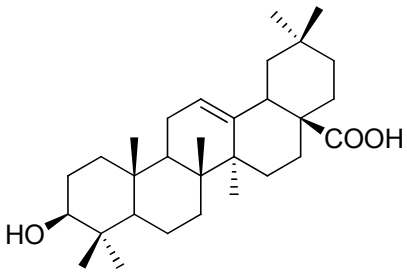


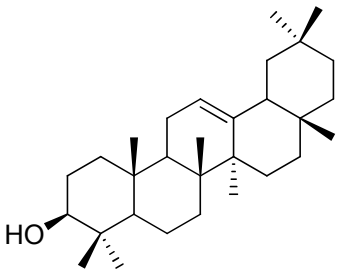

*Schéma 27*

1. Chloroformová fáze **L7** (1.94 g) byla rozpuštěna v $CHCl_3$ (10 ml) a nanesena na sloupec $SiO_2$ (300 g). Při této gradientové sloupcové chromatografii byly použity následující mobilní fáze: Hex (500 ml), Hex : $Et_2O$ 30:1 (270 ml), 15:1 (480 ml), 10:1 (220 ml), 9:1 (200 ml), 8:1 (360 ml), 7:1 (620 ml), 6:1 (280 ml), 5:1 (240 ml), 4:1 (250 ml), 3:1 (1200 ml), 2.5:1 (500 ml), 2:1 (240 ml), 1.5:1 (500 ml), 1:1 (850 ml), 1:1.5 (500 ml), 1:2 (2730 ml), 1:2.5 (700 ml), 1:3 (800 ml), 1:4 (1000 ml), 1:5 (600 ml), 1:6 (700 ml), 1:7 (800 ml), 1:8 (900 ml), 1:9 (1000 ml), 1:10 (600 ml), 1:15 (320 ml), 1:30 (20 ml), $Et_2O$ (200 ml), $Et_2O$ : MeOH 100:1 (202 ml), 20:1 (210 ml), 10:1

(220 ml), 20:3 (920 ml), 5:1 (1000 ml), 4:1 (2250 ml), 1:1 (750 ml), 1:1.5 (1250 ml), 1:2 (800 ml), MeOH (500 ml), MeOH : $CH_3COOH$ 9:1 (500 ml). Odebírány byly 90 ml frakce, které byly následně dle TLC smíchány. Byly získány frakce **L22** – **L41**. Frakce **L26** (49 mg), **L33** (146 mg), **L34** (57 mg) byly dále chromatograficky děleny. Ve frakci **L24** (14 mg) byly obsaženy α-amyrin (**63**) a β-amyrin (**59**), stejně jako ve frakci **L25** (43 mg). Ve frakcích **L27** (107 mg), **L28** (12 mg) byly obsaženy oleanová kyselina (**21**), ursolová kyselina (**22**), α-amyrin (**63**) a β-amyrin (**59**). Ve frakcích **L29** (26 mg), **L30** (14 mg) byly obsaženy oleanová kyselina (**21**) a ursolová kyselina (**22**). Ve frakcích **L36** (91 mg) a **L37** (220 mg) byla obsažena oleanová kyselina (**21**).




**21**




**59**

2. Krystalizací frakce **L26** (49 mg) ze směsi MeOH : $CHCl_3$ byla získána krystalická směs oleanové kyseliny **21** a ursolové kyseliny **22** (13 mg). Matečný louh po krystalizaci **L26** (34 mg) byl dělen na desce $SiO_2$ (1.5 g). Deska byla vyvíjena mobilní fází $Et_2O$: Hex 2:1. Bylo získáno 9 frakcí **L42** – **L50**. Ve frakcích **L46** (4 mg), **L47** (7 mg) byla obsažena směs 4 triterpenických sloučenin, oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**), α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**). Ve frakci **L48** (4 mg) převažuje oleanová kyselina (**21**). Směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**) byla obsažena ve frakcích **L49** (4 mg) a **L50** (5 mg).

3. Frakce **L33** (146 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na sloupci $SiO_2$ (100 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (4 ml). Byly odebírány 90 ml frakce, které byly smíchány dle TLC. Mobilní fází byla směs $Et_2O$ : Hex 10:1 (1800 ml), $Et_2O$ (700 ml), $Et_2O$ : MeOH 10:1 (600 ml), 5:1 (250 ml), 1:1 (100 ml), MeOH (450 ml). Byly získány frakce **L51** – **L60**. Ve frakcích **L52** (22 mg) a **L53** (12 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**). Frakce **L51** byla dále chromatograficky dělena.

4. Frakce **L34** (57 mg) byla dělena sloupcovou chromatografií na $SiO_2$ (8 g). Odebírány byly 10 ml frakce. Vzorek byl dělen mobilní fází $Et_2O$ : Hex 3:1 (100 ml), $Et_2O$ (30 ml), MeOH (30 ml). Po smíchání najímaných frakcí dle TLC byly získány frakce **L61** – **L64**. Ve frakci **L62** (20 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**). Ve frakci **L63** (24 mg) byla obsažena oleanová kyselina (**21**).

5. Frakce **L51** (66 mg) bylo chromatograficky dělena na sloupci $SiO_2$ (20 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ (1 ml) s MeOH (3 kapky). Vzorek byl dělen gradientově mobilními fázemi: Hex (200 ml), Hex : $Et_2O$ 30:1 (93 ml), 15:1 (80 ml), 10:1 (110 ml), 9:1 (100 ml), 8:1 (90 ml), 7:1 (80 ml), 6:1 (140 ml), 5:1 (120 ml), 4:1 (100 ml), 3:1 (200 ml), 2:1 (120 ml), 1.5:1 (125 ml), 1:1 (100 ml), 1:1.5 (125 ml), 1:2 (120 ml), 1:3 (360 ml), 1:4 (300 ml), 1:5 (120 ml), 1:6 (140 ml), 1:7 (160 ml), 1:8 (180 ml), 1:9 (100 ml), 1:10 (660 ml), 1:15 (160 ml), 1:30 (300 ml), $Et_2O$ : MeOH 10:1 (220 ml), 5:1 (240 ml), 1:1 (100 ml). Chromatografií byly eluovány 50 ml frakce, které byly dále dle TLC smíchány. Byly získány frakce **L65** – **L71**. Pouze ve frakcích **L70** (47 mg) a **L71** (16 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**). Krystalizací těchto dvou frakcí ze směsi $CHCl_3$ : MeOH byla získána opět směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**) (celkem 11 mg).

### 5.3.2. Dělení hexanové fáze

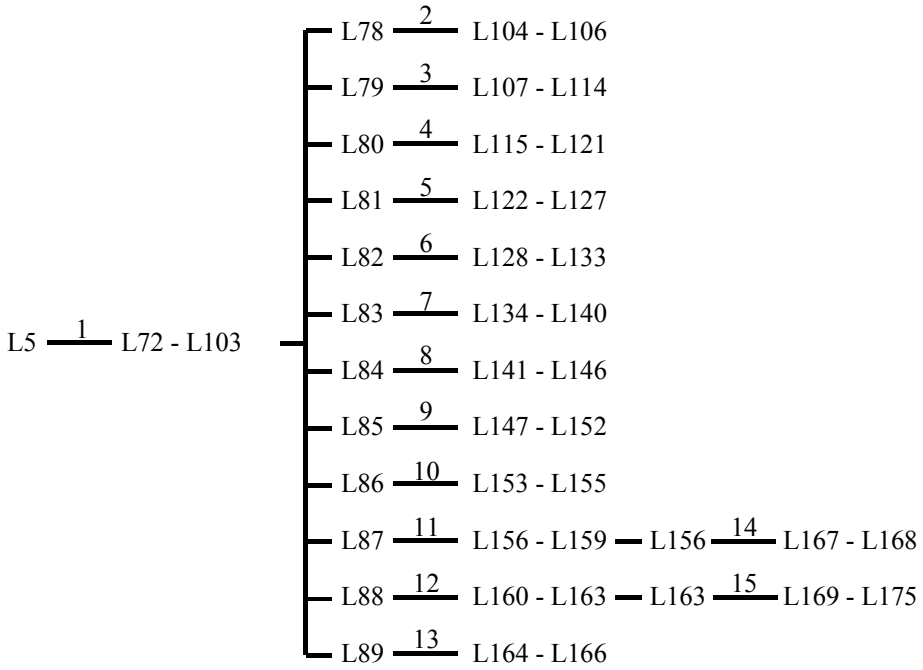



*Schéma 28 – 1.část*

1. Hexanová fáze **L5** (6.1 g) byla dělena gradientovou sloupcovou chromatografií na sloupci $SiO_2$ (200 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (10 ml). Chromatografií byly eluovány 100 ml frakce mobilními fázemi: Hex (1000 ml), Hex : $Et_2O$ 30:1 (100 ml), 10:1 (3450 ml), 9:1 (100 ml), 8:1 (3000 ml), 7:1 (100 ml), 6:1 (1500 ml), 5:1 (100 ml), 4:1 (2600 ml), 3:1 (100 ml), 2:1 (3600 ml), 1:1 (5700 ml), 2: 3 (2500 ml), 1:2 (3100 ml), 2:5 (525 ml), 1: 3 (1000 ml), 1:4 (1000 ml), 1:5 (100 ml), 1:6 (100 ml), 1:7 (1500 ml), 1:8 (100 ml), 1:9 (100 ml), 1:10 (500 ml), $Et_2O$ (1000 ml), MeOH (2500 ml), teplý MeOH (400 ml). Po smíchání najímaných frakcí dle TLC byly získány frakce **L72 – L103**. Ve frakci **L98** (595 mg) byla obsažena oleanová kyselina (**21**).

2. Frakce **L78** (35 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl nanesen na desku rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Deska byla vyvíjena ve směsi $Et_2O$ : Hex 1:10. Byly získány 3 frakce **L104 – L106**. Ve frakci **L105** (5 mg) byla obsažena směs α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**).

3. Frakce **L79** (28 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl nanesen na desku rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Deska byla vyvíjena ve směsi $Et_2O$ : Hex 1:8. Bylo získáno 8 frakcí **L107 – L114**. Pouze ve frakci **L110** (19 mg) byly obsaženy α-amyrin (**63**) a β-amyrin (**59**).

4. Frakce **L80** (25 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl nanesen na desku rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Deska byla vyvíjena ve směsi $Et_2O$ : Hex 1:8. Bylo získáno 7 frakcí **L115 – L121**.

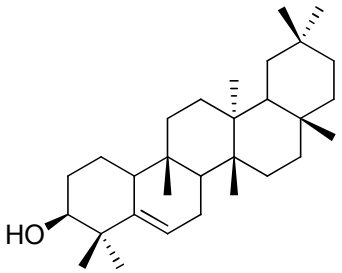
5. Frakce **L81** (48 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl nanesen na desku rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Deska byla vyvíjena ve směsi $Et_2O$ : Hex 1:10. Bylo získáno 6 frakcí **L122 – L127**.

6. Frakce **L82** (30 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl nanesen na desku rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Deska byla vyvíjena ve směsi $Et_2O$ : Hex 1:10. Bylo získáno 6 frakcí **L128 – L133**.

7. Frakce **L83** (23 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl nanesen na desku rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Deska byla vyvíjena ve směsi $Et_2O$ : Hex 1:9. Bylo získáno 7 frakcí **L134 – L140**.

8. Frakce **L84** (30 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl nanesen na desku rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Deska byla vyvíjena ve směsi $Et_2O$ : Hex 1:9. Bylo

získáno 6 frakcí **L141** – **L146**. Ve frakcích **L144** (8 mg) a **L146** (16 mg) byl obsažen glutinol (**64**).

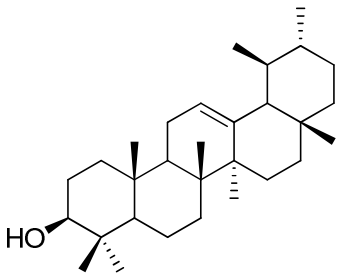



**64**

9. Frakce **L85** (20 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl nanesen na desku rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Deska byla vyvíjena dvakrát ve směsi $Et_2O$ : Hex 1:9. Bylo získáno 6 frakcí **L147** – **L152**. Ve frakcích **L151** (10 mg) a **L152** (9 mg) byl obsažen glutinol (**64**).

10. Krystalizací frakce **L86** (57 mg) ze směsi MeOH s $CHCl_3$ byla získána čistá směs α-ymyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**)**,** krystaly **L153** – **L155** (celkem 53 mg).

11. Krystalizací frakce **L87** (197 mg) ze směsi MeOH s $CHCl_3$ byla získána rovněž čistá směs α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**), krystaly **L156** – **L159** (celkem 80 mg). Z krystalů **L158** (24 mg) byl ze směsi α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**) (v poměru 1.0:1.1) identifikován α-amyrin (**63**). APCI-MS ($C_{30}H_{50}O$), *m/z*: vypočteno 426.7, naměřeno 409.3 $[M+H–H_2O]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$) viz tab. XXII.




**63**

12. Krystalizací frakce **L88** (297 mg) ze směsi MeOH s $CHCl_3$ byla získána směs α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**), krystaly **L160** – **L163** (celkem 116 mg).

13. Krystalizací frakce **L89** (196 mg) ze směsi MeOH s $CHCl_3$ byla získána směs α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**) (celkem 102 mg).

14. Frakce **L156** (16 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (10 g). Deska byla vyvíjena v mobilní fázi $Et_2O$ : Hex 1:2. Byly získány frakce **L167** – **L168**. Frakce **L168** (13 mg) byla čistá směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**).

15. Frakce **L163** (165 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (10 g) mobilní fází $Et_2O$: Hex 1:1 (80 ml), MeOH (30 ml). Najímané 5 ml frakce byly smíchány dle TLC. Byly získány frakce **L169** – **L175**. Směs α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**) byla obsažena ve frakcích **L170** (48 mg), **L171** (89 mg), **L172** (16 mg), **L173** (1 mg), **L174** (1 mg), **L175** (1 mg). Z frakce **L171** byla získána čistá směs α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**) (40 mg) krystalizací ze znečištěné směsi α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**).

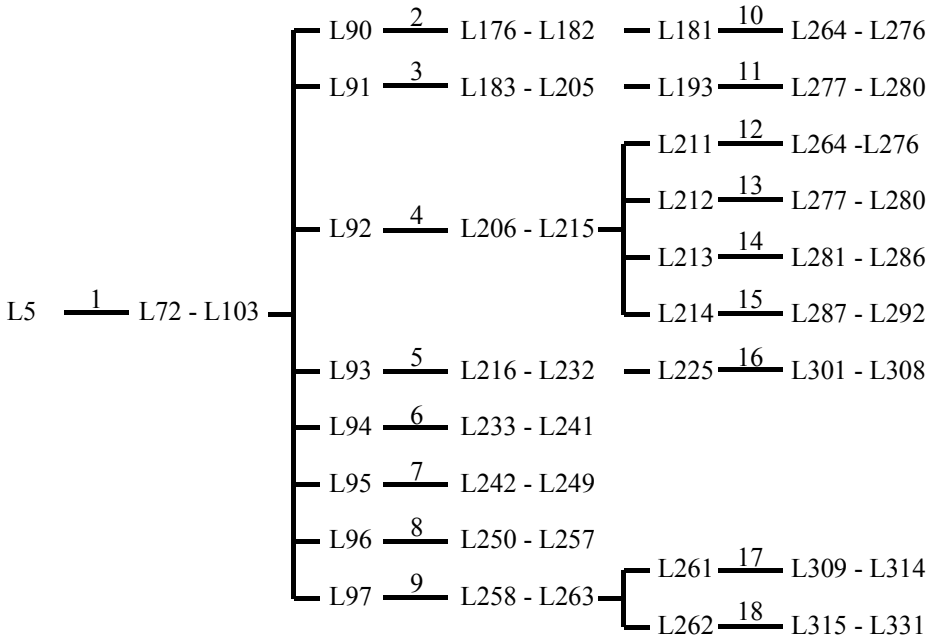
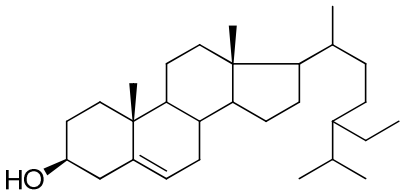



*Schéma 28 – 2.část*

1. viz schéma 28 – 1. část

2. Frakce **L90** (56 mg) byla nanesena v $CHCl_3$ (0.5 ml) na desku $SiO_2$ (5 g). Deska byla vyvíjena v mobilní fázi $Et_2O$ : Hex 1:5. Bylo získáno 7 frakcí **L176** – **L182**. Ve frakci **L178** (14 mg) byl obsažen 3β-sitosterol (**24**). Frakce **L181** (17 mg) byla dále chromatograficky dělena.



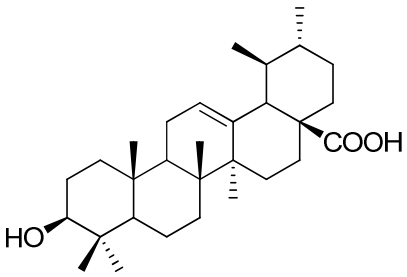

**24**

3. Frakce **L91** (245 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (25 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (5 ml). Byly jímány 50 ml frakce, které byly následně smíchány podle TLC. Jednotlivé frakce byly eluovány mobilní fází $Et_2O$ : Hex 1:10 (250 ml), 1:9 (100 ml), 1:8 (150 ml), 1:7 (80 ml), 1:5 (120 ml), 1:4 (75 ml), 1:3 (40 ml), 1:2 (200 ml), 1:1.5 (300 ml), 1:1 (80 ml), 1.5:1 (45 ml), 2:1 (60 ml), 3:1 (40 ml), 4:1 (50 ml), 5:1 (60 ml), 7:1 (80 ml), 10:1 (110 ml), $Et_2O$ (300 ml). Z této chromatografie byly získány frakce **L183** – **L205**. Ve frakcích **L191** (27 mg), **L192** (50 mg), **L193** (79 mg) a **L194** (5 mg), **L195** (8 mg) byl obsažen 3β-sitosterol (**24**), jako převažující látka vedle oleanové kyseliny (**21**) a β-amyrinu (**59**). Frakce **L196** (5 mg) a **L197** (4 mg) byla směs 3β-sitosterolu 399.94 MHz (**24**), oleanové kyseliny (**21**), ursolové kyseliny (**22**), α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**). Glutinol (**64**) byl obsažen ve frakci **L205** (6 mg).

4. Frakce **L52** (132 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (15 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (3 ml). Byly eluovány frakce o objemu 50 ml. Jako mobilní fáze byl použit Hex (100 ml), směs Hex : $Et_2O$ 10:1 (150 ml), 9:1 (150 ml), 7:1 (100 ml), 5:1 (150 ml), 3:1 (100 ml), 2:1 (100 ml), 1.5:1 (50 ml), 1:1 (100 ml), 1:2 (100 ml), 1:3 (100 ml), 1:5 (100 ml), 1:7 (100 ml), 1:10 (200 ml), $Et_2O$ (200 ml). Po smíchání jednotlivých frakcí dle TLC byly získány frakce **L206** – **L215**. Frakce **L211** – **L214** byly dále chromatograficky děleny.

5. Frakce **L93** (347 mg) byla rozpuštěna ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (2 ml) na sloupec $SiO_2$ (10 g). Ze sloupce byly eluovány 80 – 90 ml frakce. Frakce byly vymývány mobilní fází $Et_2O$: Hex 1:10 (660 ml), 1:9 (200 ml), 1:8 (180 ml), 1:7 (160 ml), 1:6 (180 ml), 1:5 (120 ml), 1:4 (300 ml), 1:3 (1710 ml), 1:2 (100 ml), 1:1.5 (500 ml), 1:1 (500 ml), 1.5:1 (500 ml), 2:1 (450 ml), 3:1 (400 ml), 4:1 (250 ml), 5:1 (300 ml), 7:1 (560 ml), 10:1 (440 ml), MeOH (300 ml). Najímané frakce byly dle TLC smíchány a byly získány frakce **L216** – **L232**. Ve frakci **L224** (17 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**), β-amyrinu (**59**) a 3β,12β-dihydroxyolean-28→13-olidu (**62**). Převažující látkou ve frakci **L226** (169 mg) byla oleanová kyselina (**21**) vedle ursolové kyseliny (**22**), α-amyrinu (**63**), β-amyrinu (**59**) a 3β,12β-dihydroxyolean--28→13-olidu (**62**). Krystalizací ze směsi $CHCl_3$ : MeOH frakce **L227** (88 mg) byla získána směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**) (7 mg), ve které výrazně převažovala ursolová kyselina (**22**) (ursolová kyselina (**22**) : oleanová kyselina (**21**)

3.4:1). Z této frakce byla ursolová kyselina (**22**) identifikována. ESI-MS ($C_{30}H_{48}O_3$), *m/z*: vypočteno 456.7, naměřeno 455.3 $[M-H]^-$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($CDCl_3$ + $CD_3OD$) viz tab. XXIII.




**22**

6. Frakce **L94** (1.43 g) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (25 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (3 ml). Byly odebírány 30 ml frakce, které byly eluovány mobilní fází $Et_2O$ : Hex 3:1 (400 ml), MeOH (100 ml) a které byly smíchány dle TLC. Byly získány frakce **L233** – **L241**. Ve frakcích **L234** (5 mg), **L235** (7 mg) a **L236** (5 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**).

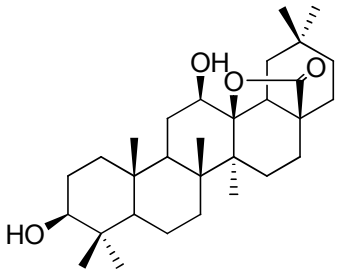
7. Frakce **L95** (100 mg) byla rozpuštěna ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (1.5 ml) a nanesena na sloupec $SiO_2$ (10 g). Ze sloupce byly eluovány frakce o objemu 5 – 10 ml mobilní fází Hex : $Et_2O$ 3:1 (80 ml), 2:1 (30 ml), 1.5:1 (150 ml), 1:1 (60 ml), 1:1.5 (50 ml), $Et_2O$ (50 ml), MeOH (50 ml). Byly získány frakce **L242** – **L249**. Frakce **L244** (21 mg) byla směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**). Obě tyto látky byly obsaženy ve frakcích **L245** (3 mg) a **L246** (11 mg).

8. Frakce **L96** (181 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl rozpuštěn ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (2 ml). Byly jímány cca 30 ml frakce, které byly eluovány mobilní fází Hex : $Et_2O$ 3:1 (64 ml), 2:1 (210 ml), 1.5:1 (50 ml), 1:1 (40 ml), 1:1.5 (25 ml), 1:2 (15 ml), $Et_2O$ (40 ml), MeOH (40 ml). Byly získány frakce **L250** – **L257**. Frakce **L253** (42 mg) byla směs oleanové kyseliny (**21**) s ursolovou kyselinou (**22**).

9. Frakce **L97** (595 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (50 g). Vzorek byl nanesen na sloupec rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (2 ml). Jednotlivé 60 ml frakce byly eluovány směsí $Et_2O$ : Hex 2:1 (400 ml), $Et_2O$ (300 ml), $Et_2O$ : MeOH 100:3 (206 ml), $Et_2O$ : MeOH 4:1 (100 ml), MeOH (100 ml). Najímané frakce byly smíchány dle TLC a byly získány frakce **L258** – **L263**. Frakce **L261** (153 mg) a **L262** (162 mg) byly dále

chromatograficky děleny. Ve frakci **L263** (113 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**).

10. Frakce **L181** 399.94 MHz (17 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (2 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Byly jímány frakce o objemu 10 ml. Vzorek byl dělen mobilní fází Hex : $Et_2O$ 2:1 (500 ml), MeOH (30 ml), $CHCl_3$ (20 ml). Byly získány frakce **L264** – **L276**. Ve frakcích **L266** (3 mg), **L267** (2 mg) a **L268** (1 mg) byl obsažen 3β,12β-dihydroxyolean-28→13-olid (**62**).




**62**

11. Frakce **L193** (78 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1 ml). 10 ml frakce byly eluovány mobilní fází $Et_2O$ : Hex 1:10 (300 ml). Byly získány frakce **L277** – **L280**. Ve frakcích **L277** (37 mg) a **L278** (26 mg) byl obsažen 3β-sitosterol (**24**), který by. získán čistý (13 mg) krystalizací **L278** ze směsi $CHCl_3$ : MeOH. Ve frakcích **L279** (4 mg) a **L280** (8 mg) byly obsaženy oleanová kyselina (**21**) a ursolová kyselina (**22**).

12. Frakce **L211** (38 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Vzorek byl na desku nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Deska byla vyvíjena ve směsi $Et_2O$ : Hex 1:3. Byly získány frakce **L281** – **L286**. Tímto dělením byl získán čistý 3β-sitosterol (**24**), frakce **L284** (9 mg).

13. Frakce **L212** (81 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl na desku nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1 ml). Deska byla vyvíjena ve směsi $Et_2O$ : Hex 1:1. Byly získány frakce **L287** – **L292**. Ve frakci **L289** (21 mg) byl převažující látkou 3β-sitosterol (**24**) a frakce **L290** (12 mg) byl čistý 3β-sitosterol (**24**).

14. Frakce **L213** (18 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g). Deska byla vyvíjena v mobilní fází $Et_2O$ : Hex 1:1. Byly získány frakce **L293** – **L296**.

15. Frakce **L214** (19 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (5 g) mobilní fází $Et_2O$ : Hex 3:1. Vzorek byl na desku nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (0.5 ml). Byly získány frakce **L297** – **L300**.

16. Krystalizací ze směsi MeOH s $CHCl_3$ **L225** (521 mg) byla získána směs oleanové kyseliny (**21**) a β-amyrinu (**59**) (111 mg). Matečný louh (398 mg) byl dělen na sloupci $SiO_2$ (50 g). Vzorek byl na sloupce nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ s MeOH 10:1 (3 ml). 65 ml odebírané frakce, které byly následně smíchány dle TLC, byly vymyty mobilní fází Hex : $Et_2O$ 1:3 (800 ml), $Et_2O$ (200 ml), MeOH (100 ml). Dělením byly získány frakce **L301** – **L308**. Frakce **L303** (157 mg) byla směs triterpenoidů: oleanové kyseliny (**21**), ursolové kyseliny (**22**), α-amyrinu (**63**), β-amyrinu (**59**) a 3β,12β-dihydroxyoleanan-28→13β-olidu (**62**). Frakce **L304** (48 mg) a **L305** (5 mg) obsahovaly směs oleanové kyseliny (**21**), ursolové kyseliny (**22**), α-amyrinu (**63**) a β-amyrinu (**59**). Frakce **L306** (11 mg) a **L307** (4 mg) obsahovala směs oleanové kyseliny (**21**) a ursolové kyseliny (**22**).

17. Frakce **L261** (153 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (8 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (2 ml). Byly jímány 15 ml frakce, které byly eluovány mobilní fází $Et_2O$ : Hex 1:1 (100 ml), 2:1 (150 ml), 3:1 (120 ml), 4:1 (50 ml), 5:1 (60 ml), $Et_2O$ (60 ml), MeOH (50 ml). Jednotlivé frakce byly smíchány dle TLC. Byly získány frakce **L309** – **L314**. Ve frakcích **L310** (32 mg), **L311** (20 mg), **L312** (24 mg), **L313** (38 mg), **L314** (16 mg) byla obsažena oleanová kyselina (**21**).

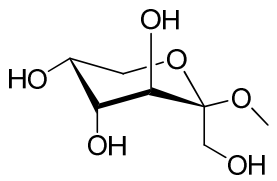
18. Frakce **L262** (182 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (8 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (3 ml). Byly jímány 15 ml frakce, které byly eluovány mobilní fází $Et_2O$ : Hex 1:1 (100 ml), 2:1 (60 ml), 3:1 (160 ml), 4:1 (100 ml), 5:1 (180 ml), $Et_2O$ (100 ml), MeOH (50 ml). Jednotlivé frakce byly smíchány dle TLC. Byly získány frakce **L315** – **L321**. Ve frakci **L317** (51 mg) byla obsažena oleanová kyselina (**21**), ve frakcích **L318** (25 mg) a **L319** (24 mg) byla obsažena směs oleanové kyseliny (**21**) a glutinolu (**64**).

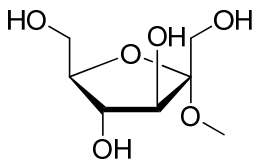
### 5.3.3. Dělení vodné fáze

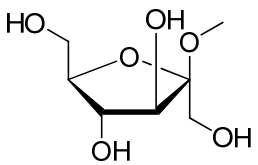
L14 —1— L332 - L343 — L338 —2— L344 - L347

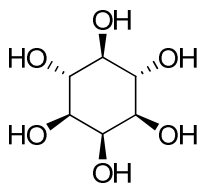
*Schéma 29*

1. Sraženina **L14** (11.3 g) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (270 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $H_2O$ : MeOH : $CHCl_3$ 7:10:1 (18 ml). Byly eluovány cca 150 ml frakce mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (3165 ml), 5:1 (4320 ml), 2.5 : 1 (1400 ml), 1.5:1 (500 ml), 1:1 (1500 ml), 1:2 (900 ml), 1:5 (600 ml), MeOH (1000 ml), $H_2O$ (1300 ml). Jednotlivé najímané frakce byly smíchány dle TLC a celkem byly získány frakce **L332** – **L343**. Ve frakcích **L335** (134 mg) a **L336** (109 mg) byl ze směsi sacharidů identifikován methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**). Ve frakci **L337** (963 mg) byly obsaženy methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**), methyl-α-D-fruktofuranosid (**70**), methyl-β-D-fruktopyranosid (**69**) **a** myo-inositol (**79**). Krystalizací **L339** (1.22 g) z MeOH byl získán a identifikován myo-inositol (**79**) (62 mg). ESI-MS ($C_6H_{12}O_6$), *m/z*: vypočteno 180.2, naměřeno 203.0 $[M+Na]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR ($D_2O$) viz tab. XXIV.


**69**


**70**


**71**


**79**

2. Frakce **L338** (440 mg) byla dělena na sloupci jemného $SiO_2$ (25 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH : $H_2O$ 10:1:1 kapek (2 ml). Byly odebírány cca 25 ml frakce. Jako mobilní fáze byla použita směs $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (700 ml), 5:1 ((400 ml), 3:1 (200 ml), MeOH (100 ml). Najímané frakce byly smíchány dle TLC a vznikly frakce **L344** – **L347**. Frakce **L344** (120 mg), **L345** (145 mg) a **L346** (165 mg) byly směsi sacharidů.

### 5.3.4. Dělení etherické fáze

$$L20 \xrightarrow{1} L348 - L350$$

*Schéma 30*

1. Sraženina **L20** (1.88 g) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (70 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi $CHCl_3$ : MeOH : $NH_4OH$ 2:1:0.03 (3 ml) + MeOH (2 ml) + $H_2O$ (0.5 ml). Vzorek byl dělen mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH : $NH_4OH$

2:1:0.03 (303 ml). Odebírány byly 25 ml frakce, které byly smíchány dle TLC. Byly získány frakce **L348 – L350**.

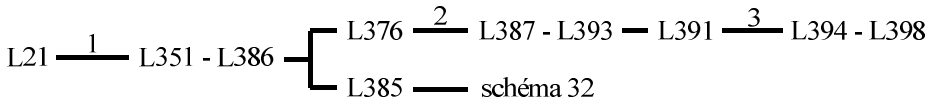
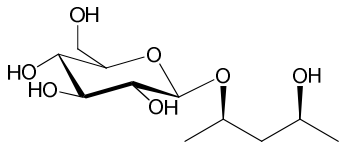
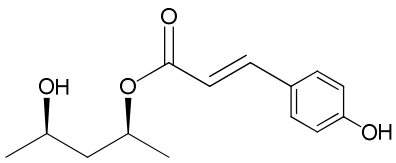



*Schéma 31*

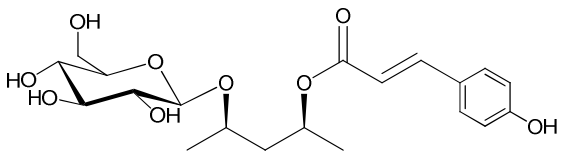
1. Nejprve bylo provedeno zkušební dělení s částí vodné fáze **L21** (2 g) na sloupci $SiO_2$ (200 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v MeOH (5 ml). Byly odebírány cca 80 - 90 ml frakce, které byly dle TLC smíchány. Frakce byly vymývány mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH : $NH_4OH$ 9:1:0.2 (918 ml), 7:1:0.2 (400 ml), 5:1:0.1 (605 ml), 4:1:0.1 (510 ml), 3:1:0.1 (508 ml), 2.5:1:0.1 (153 ml), 2:1:0.1 (1600 ml), 1.5:1:0.1 (900 ml), 1:1:0.05 (500 ml), 1:1.5:0.05 (500 ml), 1:2:0.05 (450 ml), 1:2.5:0.1 (400 ml), 1:3:0.1 (400 ml), 1:4:0.1 (500 ml), 1:5:0.2 (500 ml), 1:7:0.2 (500 ml), 1:9:0.2 (500 ml), MeOH : $NH_4OH$ (3400 ml), teplý MeOH (750 ml), MeOH : $CH_3COOH$ 9:1 (1000 ml). Byly získány frakce **L351 – L374**. Dále byla rozdělena pomocí stejné chromatografie další část vodné fáze **L21** (2 g). Touto chromatografií byly získány frakce **L375 – L386**. Ve frakci **L353** (292 mg) byl obsažen 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**). Také ve frakcích **L359** (81 mg), **L360** (53 mg), **L361** (39 mg), **L362** (56 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Ve frakcích **L363** ((39 mg) a **L364** (44 mg) byl ve směsi identifikován (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**). Ve frakci **L365** (239 mg) byl obsažen methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**). Frakce **L379** (187 mg) obsahovala 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Frakce **L386** (28 mg) obsahovala (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**). Frakce **L385** byla dále chromatograficky dělena (viz schéma 32).




**74**




**76**




**75**

2. Frakce **L376** (61 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl nanesen ve směsi MeOH s $NH_4OH$ 10:1 (0.5 ml). Deska byla vyvíjena v mobilní fázi $CHCl_3$ : MeOH : $NH_4OH$ 10:1:0.2. Bylo získáno 6 frakcí **L387** – **L393**. Ve frakci **L390** (10 mg) byl obsažen methyl-β-D-fruktofuranosid (**71**).

3. Frakce **L391** (26 mg) byla dělena na desce $SiO_2$ (10 g). Vzorek byl nanesen ve směsi MeOH s $NH_4OH$ 10:1 (0.3 ml). Deska byla vyvíjena ve směsi $CHCl_3$ : MeOH : $NH_4OH$ 8:1:0.1. Dělením bylo získáno 5 frakcí **L394** – **L398**.

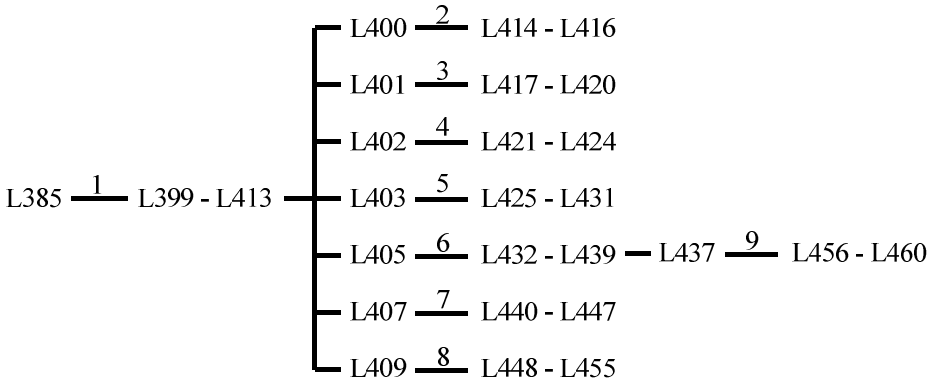
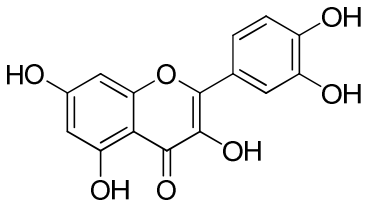


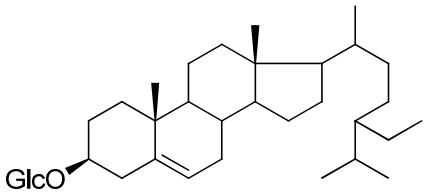

*Schéma 32*

1. Frakce **L385** (9.46 g) byla dělena na sloupcí $SiO_2$ (250 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný ve směsi MeOH : $CHCl_3$ 4:15 (19 ml). Byly odebírany 250 ml frakce, které byly dle TLC smíchány. Směs byla na sloupci dělena mobilní fází $CHCl_3$ (1400 ml), $CHCl_3$ : MeOH 50:1 (1020 ml), 40:1 (1230 ml), 30:1 (4340 ml), 25:1 (1560 ml), 20:1 (5040 ml), 15:1 (640 ml), 10:1 (4400 ml), 5:1 (600ml), 1:1 (1 l), MeOH (500 ml). Byly získány frakce **L399** – **L413**. Krystalizací z MeOH byl z frakce **L404** (371 mg) získán čistý quercetin (**27**) (45 mg), který byl z této frakce identifikován. ESI-MS ($C_{15}H_{10}O_7$), *m/z*: vypočteno 302.2, naměřeno 325.0 $[M+Na]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR (DMSO) viz tab. XXV. Další krystalizací z MeOH frakce **L404** byl získán 3β-sitosterolglukosid (**80**) (7 mg). ESI-MS ($C_{35}H_{60}O_6$), *m/z*: vypočteno 576.8, naměřeno 599.5 $[M+Na]^+$. $^1H$ a $^{13}C$ NMR (pyridin-$d_5$) viz tab. XXVI. Quercetin (**27**) byl obsažen

ve frakci **L406** (316 mg). Ve frakci **L408** (447 mg) byl obsažen methyl-β-D--fruktofuranosidu (**71**).




**27**




**80**

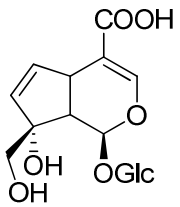
2. Frakce **L400** (486 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (45 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1.5 ml). Vzorek byl dělen mobilní fázi $CHCl_3$ (500 ml). Najímané 50 ml frakce byly smíchány dle TLC. Vznikly frakce **L414** – **L416**.

3. Frakce **L401** (288 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (40 g). Vzorek byl na sloupec nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1.5 ml). Vzorek byl dělen mobilní fází $CHCl_3$ (550 ml). Najímané frakce byly smíchány podle TLC a byly získány frakce **L417** – **L420**. Ve frakci **L420** (224 mg) byl obsažen 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**76**).

4. Frakce **L402** (378 mg) byla nanesena na sloupec jemného $SiO_2$ (30 g) rozpuštěna ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 30:1 (2 ml). Vzorek byl dělen mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 30:1 (310 ml), MeOH (100 ml). Byly eluovány 15 ml frakce, které byly smíchány dle TLC. Touto chromatografií byly získány frakce **L421** – **L424**.

5. Frakce **L403** (353 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (30 g). Vzorek byl na sloupec $SiO_2$ nanesen rozpuštěný v $CHCl_3$ (1.5 ml). Vzorek byl ze sloupce eluován mobilní fází $CHCl_3$ (700 ml), $CHCl_3$ : MeOH 100:1 (101 ml), 50:1 (408 ml), 25:1 (104 ml). Byly jímány 25 ml frakce, které byly smíchány podle TLC. Byly získány frakce **L425 - L431**.

6. Frakce **L405** (853 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (40 g). Vzorek byl nanesen na sloupec rozpuštěný v $CHCl_3$ (2.5 ml) s MeOH (10 kapek). 50 ml frakce byly eluovány mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 50:1 (2142 ml), MeOH (300 ml). Po smíchání najímaných frakcí dle TLC jsou získány frakce **L432** – **L439**. Ve frakcích **L435** (57 mg) a **L436** (191 mg) byl obsažen monotropein (**58**).




**58**

7. Frakce **L407** (838 mg) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (60g). Vzorek byl na sloupec nanesen ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (2 ml). Byly odebírány 50 ml frakce. Mobilní fází byla směs $CHCl_3$ : MeOH 10:1 (1080 ml), MeOH (250 ml). Najímané frakce byly smíchány dle TLC. Jsou získány frakce **L440** – **L447**. Ve frakcích **L442** (30 mg) a **L443** (91 mg) byl obsažen monotropein (**58**). Ve frakcích **L445** (152 mg) a **L446** (123 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**).

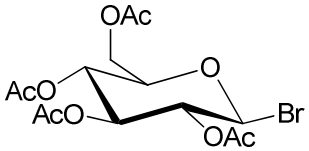
8. Frakce **L409** (1.03 g) byla dělena na sloupci $SiO_2$ (100 g). Vzorek byl rozpuštěn ve směsi $CHCl_3$ : MeOH 9:1 (3 ml) a nanesen na sloupec. Byly jímány 100 ml frakce, které byly eluovány mobilní fází $CHCl_3$ :MeOH 20:1 (7140 ml), 1:1 (400 ml). Po smíchání frakcí dle TLC byly získány frakce **L448** – **L455**. Ve frakci **L450** (27 mg) byl obsažen 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát (**75**). Ve frakci **L452** (252 mg) byl obsažen (2*R*,4*S*)-2-*O*--β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (**74**), který byl obsažen také ve frakci **L453** (397 mg).

9. Frakce **L437** (143 mg) byla dělena na jemném $SiO_2$ (20 g). Vzorek byl nanesen na sloupec rozpuštěný v $CHCl_3$ s MeOH (5 kapek). Odebírány byly 25 ml frakce. Vzorek byl dělen mobilní fází $CHCl_3$ : MeOH 30:1 (720 ml), 20:1 (210 ml), MeOH (200 ml). Najímané frakce byly smíchány dle TLC a jsou získány frakce **L456** – **L460**.

## 5.4. Příprava standardů: (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (77) a (2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (78)

### 5.4.1. Příprava standardu (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (77)

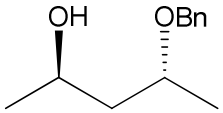
**2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glukopyranosylbromid (82)**




**82**

K 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-β-D-glukopyranose (2 g, 5.1 mmol) rozpuštěné v suchém dichlormethanu (15 ml) byl přidán při laboratorní teplotě roztok HBr v $CH_3COOH$ (30%, 5 ml) a reakční směs byla míchána 2 hodiny. Poté byla reakční směs nalita do studené destilované vody (50 ml) a vytřepána chloroformem (50 ml). Organická vrstva byla následně promyta nasyceným roztokem $NaHCO_3$ (2×50 ml), destilovanou vodou (2×50 ml), ~~a~~ vysušena bezvodým $MgSO_4$ a odpařena do sucha. Krystalizací odparku ze směsi $Et_2O$ - Hex bylo získáno 1.95 (95 %) 2,3,4,6-tetra-*O*--acetyl-β-D-glukopyranosylbromidu (**82**). $^1$H NMR (299.94 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ 1.99 (3H, *s*), 2.01 (3H, *s*), 2.06 (3H, *s*), 2.06 (3H, *s*), 4.09 (1H, *m*), 4.23 – 4.32 (2H, *m*), 4.80 (1H, *dd*, $J_1$=9.9 Hz, $J_2$=3.9 Hz), 5.12 (1H, *tt*, $J_1$=10.5 Hz, $J_2$=2.4 Hz), 5.52 (1H, *t*, *J*=9.6 Hz), 6.57 (1H, *d*, *J*=4.2 Hz). $^{13}$C NMR (75.43 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ 20.49, 20.56, 20.60, 20.60, 60.90, 67.12, 70.11, 70.54, 72.09, 86.53, 169.39, 169.72, 169.77, 170.43. NMR spektrální data jsou ve shodě s literaturou.[129]

**(2*R*,4*R*)-2-*O*-benzylpentan-2,4-diol (84).**

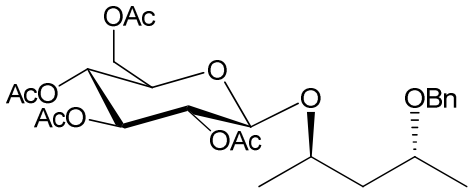



**84**

K (2*R*,4*R*)-pentan-2,4-diolu (500 mg, 4.80 mmol) rozpuštěnému v suchém toluenu (5 ml) byl za stálého míchání při teplotě 50 ˚C přidán KOH (1.35 g, 24 mmol)

rozpuštěný v destilované vodě (1.44 ml). Poté byl k reakční směsi přidán *n*-$Bu_4N^+Br^-$ (24 mg, 0.07 mmol) a benzylchlorid (0.55 ml, 607.6 mg, 4.80 mmol). Reakce probíhala za stálého míchání 16 hodin. Následně byl do reakční směsi přidán toluen (30 ml) a směs byla promyta destilovanou vodou (2×20 ml), vysušena bezvodým $MgSO_4$ a odpařena. Chromatografií odparku na sloupci silikagelu (15 g) ve směsi EtOAc/Hex=1/4 bylo získáno 581 mg (62 %) (2*R*,4*R*)-2-*O*-benzylpentan-2,4-diolu (**84**). ESI-MS ($C_{12}H_{18}O_2$), *m/z*: vypočteno 194.3, naměřeno 217.0 $[M+Na]^+$. $^1$H NMR (299.94 MHz, $CDCl_3$) : $\delta$ 1.17 (3H, *d*, *J*=6.3 Hz), 1.26 (3H, *d*, *J*=6.0 Hz), 1.62 – 1.68 (2H, *m*), 3.86 (1H, *m*), 4.12 (1H, *m*), 4.45 (1H, *d*, *J*=11.4 Hz), 4.62 (1H, *d*, *J*=11.7 Hz), 7.18 – 7.27 (5H, *m*). $^{13}$C NMR (75.43 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ 19.09, 23.42, 44.44, 64.45, 70.45, 72.61, 127.55, 127.62, 127.62, 128.34, 128.34, 138.34. NMR data jsou ve shodě s literaturou.[133,134]

**(2*R*,4*R*)-2-*O*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-β-D-glukopyranosyl)-4-*O*-benzylpentan-2,4-diol (88).**

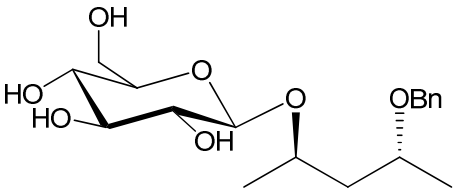



**88**

K roztoku (2*R*,4*R*)-2-*O*-benzylpentan-2,4-diolu (**84**) (300 mg, 1.54 mmol) v suchém dichlormethanu (5 ml) a bylo přidáno aktivované molekulární síto 3Å (0.5 g) a násleně $AgClO_4$ (319 mg, 1.54 mmol) a $Ag_2CO_3$ (1293 mg, 7.70 mmol). Reakční směs byla ochlazena na –35 ˚C. Za této teploty byl do reakční směsi přidán 2,3,4,6-tetra-*O*--acetyl-β-D-glukopyranosylbromid (950 mg, 2.31 mmol) rozpuštěný v suchém dichlormethanu (1 ml). Reakční směs byla míchána v atmosféře argonu bez přístupu světla po dobu 20 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl k reakční směsi přidán pyridin (400 μl) a vše bylo ponecháno 15 minut míchat. Následně byla reakční směs naředěna chloroformem (30 ml) a promyta 1M roztokem HCl (2×50 ml), nasyceným roztokem $NaHCO_3$ (2×50 ml) a destilovanou vodou (2×50 ml). Chloroformová frakce byla vysušena bezvodým $MgSO_4$ a odpařena. Chromatografií odparku na sloupci silikagelu ve směsi EtOAc/Hex=1/3 bylo získáno 181 mg (22 %) (2*R*, *4R*)-2-*O*-(2',3',4',6'-tetra--*O*-acetyl-β-D-glukopyranosyl)-4-*O*-benzylpentan-2,4-diolu (**88**). ESI-MS ($C_{26}H_{36}O_{11}$),

*m/z*: vypočteno 524.6, naměřeno 547.2 $[M+Na]^+$. IR (KBr) $\nu_{max}$, $cm^{-1}$: 2966, 2924, 2879 (C-H), 1751 (C=O), 1497, 1452, 1425 (C-H), 1376 ($CH_3$), 1223, 1171, 1110(C-O). 1066, 1038 (C-H), 748, 700 ($CH_2$). $^1$H NMR (299.94 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ 1.13 (3H, *d*, *J*=6.0 Hz), 1.17 (3H, *d*, *J*=6.3 Hz), 1.57 – 1.62 (2H, *m*), 1.94 (3H, *s*), 2.00 (3H, *s*), 2.01 (3H, *s*), 2.04 (3H, *s*), 3.61 (1H, *dq*, $J_1$=9.9 Hz, $J_2$=2.4 Hz), 3.81 (1H, *m*), 3.95 (1H, *dd*, $J_1$=12.3 Hz, $J_2$=2.4 Hz), 4.09 – 4.21 (2H, *m*), 4.49 (1H, *d*, *J*=11.4 Hz), 4.56 (1H, *d*, *J*=7.8 Hz), 4.59 (1H, *d*, *J*=11.4 Hz), 4.96 (1H, *dd*, $J_1$=9.6 Hz, $J_2$=8.1 Hz), 5.08 (1H, *t*, *J*=9.6 Hz), 5.20 (1H, *t*, *J*=9.6 Hz), 7.24 – 7.33 (5H, *m*). $^{13}$C NMR (75.43 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ 20.00, 20.31, 20.52, 20.55, 20.59, 20.63, 45.16, 60.34, 61.77, 68.28, 70.83, 71.52, 71.72, 71.80, 72.48, 72.92, 98.98, 127.29, 127.29, 128.27, 128.27, 139.30, 169.28, 169.38, 170.29, 170.54.

**(2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosyl)-4-*O*-benzylpentan-2,4-diol (90)**.

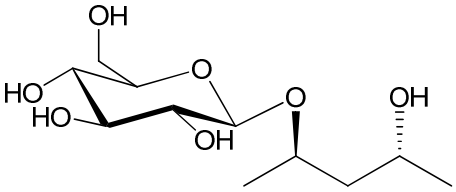



**90**

(2*R*,4*R*)-2-*O*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-β-D-glukopyranosyl)-4-*O*-benzylpentan--2,4-diol **88** (120 mg, 0.23 mmol) byl rozpuštěn v suchém MeOH (2.5 ml) v argonové atmosféře. Do reakční směsi byl následně přidán 0.56M roztok MeONa (0.57 ml, 0.46 mmol) a reakční směs byla míchána po dobu 15 hodin. Reakce byla zneutralizována ledovou $CH_3COOH$, odpařena a poté čištěna sloupcovou chromatografií na 20 g silikagelu v soustavě $CHCl_3$/MeOH =10/1. Bylo získáno 58 mg (68%) (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosyl-4-*O*-benzylpentan-2,4-diolu (**90**). ESI-MS ($C_{18}H_{28}O_7$), *m/z*: vypočteno 356.4, naměřeno 379.1 $[M+Na]^+$. IR (KBr) $\nu_{max}$, $cm^{-1}$: 3100-3600 (O-H), 2967, 2925, 2873 (C-H), 1455 (C-H), 1375 ($CH_3$), 1155 (C-O). 1073, 1031 (C-H), 737, 699 ($CH_2$). $^1$H NMR (299.95 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 1.18 (3H, *d*, *J*=3.0 Hz), 1.20 (3H, *d*, *J*=3.3 Hz), 1.61 – 1.66 (2H, *m*), 3.14 – 3.41 (4H, *m*), 3.67 (1H, *dd*, $J_1$=11.7 Hz, $J_2$=4.8 Hz), 3.77 (1H, *dd*, $J_1$=11.7 Hz, $J_2$=2.4 Hz), 3.92 (1H, *m*), 4.16 (1H, *m*), 4.35 (1H, *d*, *J*=7.5 Hz), 4.59 (2H, *bs*), 7.22 -7.40 (5H, *m*). $^{13}$C NMR

(75.43 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 20.47, 20.68, 46.33, 62.59, 71.57, 71.89, 72.68, 73.63, 75.10, 77.67, 78.09, 102.17, 128.48, 129.00, 129.00, 129.26, 129.26, 140.47.

**(2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (77).**

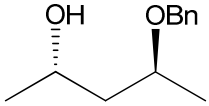



**77**

K roztoku (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosyl-4-*O*-benzylpentan-2,4-diolu **90** (50 mg, 0.13 mmol) v suchém MeOH (2 ml) bylo přidáno 10% Pd/C (5 mg). A následně byla reakční směs míchána pod mírným přetlakem vodíku (balonek) po dobu 6 hodin, promyta přes křemelinu MeOH (20 ml) a odpařena. Bylo získáno 37 mg (98 %) (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosyl-2,4-pentandiolu (**77**). ESI-MS ($C_{11}H_{22}O_7$), *m/z*: vypočteno 266.3, naměřeno 289.1 $[M+Na]^+$. IR (KBr) $\nu_{max}$, $cm^{-1}$: 3100-3600 (O-H), 2968, 2927, 2877 (C-H), 1450 (C-H), 1375 ($CH_3$), 1157 (C-O). 1079, 1043 (C-H), 827, 642 ($CH_2$). $^1$H NMR (499.95 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 1.15 (3H, *d*, $J_{5,4}$ = 6.4 Hz, H-5), 1.19 (3H, *d*, $J_{1,2}$ = 6.3 Hz, H-1), 1.45 (1H, *ddd*, $J_{gem}$ = 14.3 Hz, $J_{3a,4}$ = 9.9 Hz, $J_{3a,2}$ = 2.9 Hz, H-3a), 1.59 (1H, *ddd*, $J_{gem}$ = 14.3 Hz, $J_{3b,2}$ = 10.0 Hz, $J_{3b,4}$ = 2.7 Hz, H-3b), 3.16 (1H, *dd*, $J_{2',3'}$ = 9.3 Hz, $J_{2',1'}$ = 7.9 Hz, H-2´), 3.23 (1H, *dd*, $J_{4',5'}$ = 9.7 Hz, $J_{4',3'}$ = 8.8 Hz, H-4´), 3.30 (1H, *m*, H-5´), 3.37 (1H, *dd*, $J_{3',2'}$ = 9.2 Hz, $J_{3',4'}$ = 8.9 Hz, H-3´), 3.61 (1H, *dd*, $J_{gem}$ = 11.7 Hz, $J_{6'a,5'}$ = 6.8 Hz, H-6´a), 3.89 (1H, *dd*, $J_{gem}$ = 11.7 Hz, $J_{6'b,5'}$ = 2.3 Hz, H-6´b), 4.03 – 4.10 (2H, *m*, H-2 a H-4), 4.32 (1H, *d*, $J_{1',2'}$ = 7.9 Hz, H-1´). $^{13}$C NMR (125.73 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 20.8 (C-1), 23.7 (C-5), 47.7 (C-3), 63.0 (C-6´), 64.7 (C-4), 72.0 (C-4´), 72.6 (C-2), 74.9 (C-2´), 77.7 (C-5´), 78.0 (C-3´), 102.3 (C-1´).

### 5.4.2. Příprava standardu (2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (78)

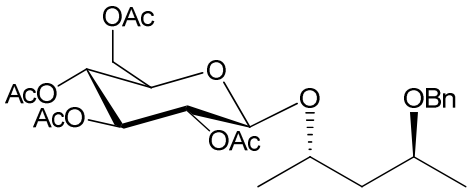
**(2*S*,4*S*)-2-*O*-benzylpentan-2,4-diol (85).**




**85**

Postup přípravy látky **85** byl analogický s postupem pro přípravu látky **84**. Výchozí množství reaktantů bylo totožné. Bylo získáno 432 mg (46 %) (2*S*,4*S*)-2-*O*--benzylpentan-2,4-diolu (**85**).[135] ESI-MS ($C_{12}H_{18}O_2$), *m/z*: vypočteno 194.3, naměřeno 217.0 $[M+Na]^+$. $^1$H NMR (299.94 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ 1.17 (3H, *d*, *J*=6.6 Hz), 1.25 (3H, *d*, *J*=6.3 Hz), 1.63 (1H, *bt*, *J*=4.2 Hz), 1.65 (1H, *bt*, *J*=4.5 Hz), 3.85 (1H, *m*), 4.11 (1H, *m*), 4.45 (1H, *d*, *J*=11.7 Hz), 4.61 (1H, *d*, *J*=11.7 Hz), 7.25 – 7.35 (5H, *m*). $^{13}$C NMR (75.43 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ 19.10, 23.43, 44.41, 64.49, 70.50, 72.63, 127.59, 127.65, 127.65, 128.36, 128.36, 138.34.

**(2*S*,4*S*)-2-*O*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-β-D-glukopyranosyl)-4-*O*-benzylpentan-2,4-diol (89).**

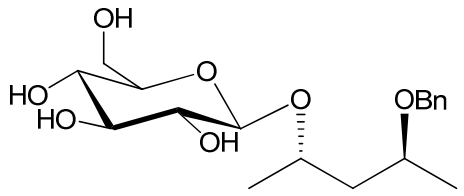



**89**

Postup přípravy látky **89** byl analogický s postupem pro přípravu látky **88**. Bylo získáno 170 mg (21 %) (2*S*,4*S*)-2-*O*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-β-D-glukopyranosyl)-4--*O*-benzylpentan-2,4-diolu (**89**). ESI-MS ($C_{26}H_{36}O_{11}$), *m/z*: vypočteno 524.6, naměřeno 547.2 $[M+Na]^+$. $]^+$. IR (KBr) $\nu_{max}$, $cm^{-1}$: 3476, 3029 (O-H), 2969, 2934 (C-H), 1751 (C=O), 1496, 1452 (C-H), 1373 ($CH_3$), 1250, 1229 (C-O), 1086, 1040, 907 (C-H), 737, 697 ($CH_2$). $^1$H NMR (299.94 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 1.18 (3H, *d*, *J*=6.9 Hz), 1.23 (3H, *d*, *J*=7.2 Hz), 1.50 – 1.54 (2H, *m*), 1.96 (3H, *s*), 1.99 (3H, *s*), 2.02 (3H, *s*), 2.04 (3H, *s*), 3.52 (1H, *ddd*, $J_1$=9.9 Hz, $J_2$=4.8 Hz, $J_3$=2.4 Hz), 3.67 (1H, *m*), 3.84 (1H, *m*), 4.05 – 4.24 (2H, *m*), 4.39 (1H, *d*, *J*=11.7 Hz), 4.68 (1H, *d*, J =11.7 Hz), 4.76 (1H, *dd*,

$J_1$=9.6 Hz, $J_2$=8.1 Hz), 4.82 (1H, *bs*), 4.91 (1H, *bt*, *J*=9.9 Hz), 5.09 (1H, *bt*, *J*=9.9 Hz), 7.32 – 7.42 (5H, *m*). $^{13}$C NMR (75.43 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 19.99, 20.54, 20.57, 20.63, 20.79, 23.08, 46.74, 63.16, 69.94, 71.04, 72.03, 72.58, 72.99, 74.21, 76.10, 102.31, 128.95, 129.53, 129.53, 129.70, 129.70, 140.28, 170.80, 171.18, 172.17, 172.89.

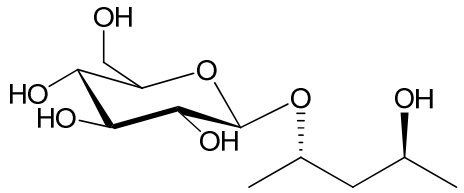
**(2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosyl)-4-*O*-benzylpentan-2,4-diol (91).**




**91**

Postup přípravy látky **91** byl analogický s postupem pro přípravu látky **90**. Výchozí množství látek bylo shodné. Bylo získáno 55mg (65 %) (2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosyl-4-*O*-benzylpentan-2,4-diolu (**91**). ESI-MS ($C_{18}H_{28}O_7$), *m/z*: vypočteno 356.4, naměřeno 379.1 $[M+Na]^+$. IR (KBr) $\nu_{max}$, $cm^{-1}$: 3100-3600 (O-H), 2968, 2925, 2873 (C-H), 1453 (C-H), 1373 ($CH_3$), 1155 (C-O). 1075, 1028 (C-H), 736, 698 ($CH_2$). $^1$H NMR (299.95 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 1.20 (3H, *d*, *J*=6.3 Hz), 1.25 (3H, *d*, *J*=6.3 Hz), 1.52 – 1.72 (2H, *m*), 3.12 – 3.18 (2H, *m*), 3.3.25 – 3.34 (2H, *m*), 3.65 (1H, *dd*, $J_1$=12.0 Hz, $J_2$=5.7 Hz,), 3.83 (1H, *dd*, $J_1$=12.0 Hz, $J_2$=2.4 Hz), 3.91 – 4.05 (2H, *m*), 4.22 (1H, *d*, *J*=7.8 Hz), 4.47 (1H, *d*, *J*=11.4 Hz), 4.62 (1H, *d*, *J*=11.7 Hz), 7.24 – 7.39 (5H, *m*). $^{13}$C NMR (75.43 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 20.16, 23.20, 46.33, 62.74, 71.52, 71.60, 73.26, 75.32, 75.41, 77.69, 78.04, 105.12, 128.59, 129.08, 129.08, 129.36, 129.36, 140.30.

**(2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol (78)**

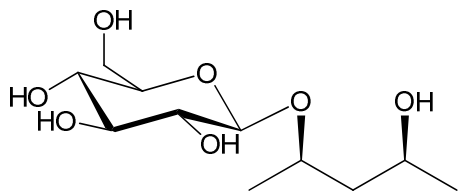



**78**

Postup přípravy látky **78** byl anologický s postupem pro přípravu látky **78**. Výchozí množství reaktantů bylo totožné. Bylo získáno 36 mg (97 %) (2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosyl-2,4-pentandiolu (**78**). ESI-MS ($C_{11}H_{22}O_7$), m/z: vypočteno 266.3, naměřeno 289.1 $[M+Na]^+$. IR (KBr) $\nu_{max}$, $cm^{-1}$: 3100-3600 (O-H), 2967, 2928, 2878 (C-H), 1451 (C-H), 1377 ($CH_3$), 1161 (C-O). 1077, 1039 (C-H), 827, 645 ($CH_2$). $^1H$ NMR (499.95 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 1.16 (3H, *d*, $J_{5,4}$ = 6.3 Hz, H-5), 1.27 (3H, *d*, $J_{1,2}$ = 6.3 Hz, H-1), 1.49 (1H, *ddd*, $J_{gem}$ = 14.4 Hz, $J_{3a,4}$ = 9.4 Hz, $J_{3a,2}$ = 3.6 Hz, H-3a), 1.64 (1H, *ddd*, $J_{gem}$ = 14.4 Hz, $J_{3b,2}$ = 8.9 Hz, $J_{3b,4}$ = 3.1 Hz, H-3b), 3.17 (1H, *dd*, $J_{2',3'}$ = 9.1 Hz, $J_{2',1'}$ = 7.9 Hz, H-2´), 3.25 – 3.32 (2H, *m*, H-4´ a H-5´), 3.37 (1H, *m*, H-3´), 3.68 (1H, *dd*, $J_{gem}$ = 11.9 Hz, $J_{6'a,5'}$ = 5.0, H-6´a), 3.85 (1H, *dd*, $J_{gem}$ = 11.9 Hz, $J_{6'b,5'}$ = 2.0 Hz, H-6´b), 4.02 (1H, *m*, H-2), 4.08 (1H, *m*, H-4), 4.40 (1H, *d*, $J_{1',2'}$ = 7.9 Hz, H-1´). $^{13}C$ NMR (125.73 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 22.9 (C-1), 24.1 (C-5), 47.2 (C-3), 62.6 (C-6´), 64.8 (C-4), 71.5 (C-4´), 75.3 (C-2´), 75.5 (C-2), 77.7 (C-5´), 78.0 (C-3´), 104.6 (C-1´).

### 5.4.3. Příprava (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (74)

**Alkalická hydrolýza látky 75**




**74**

K látce **75** (83 mg, 0.20 mmol) rozpuštěnému v suchém MeOH (2 ml) byl za stálého míchání v argonové atmosféře při laboratorní teplotě přidán 0.56M roztok MeONa (v suchém MeOH, 0.22 mmol, 0.40 ml). Reakční směs byla míchána 16 hodin a poté byla zneutralizována 1N HCl. Následně byla reakční směs naředěna EtOAc (20 ml), vysušena bezvodým $MgSO_4$ a odpařena. Chromatografií odparku na sloupci silikagelu (10 g) ve směsi $CHCl_3$/MeOH=10/1 bylo získáno 36 mg (72 %) (2*R*,4*S*)-2-O--β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diolu (**81**). ESI-MS ($C_{11}H_{22}O_7$), m/z: vypočteno 266.3, naměřeno 289.1 $[M+Na]^+$. $^1H$ NMR (499.95 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ 1.18 (3H, *d*, $J_{5,4}$ = 6.2 Hz, H-5), 1.21 (3H, *d*, $J_{1,2}$ = 6.2 Hz, H-1), 1.49 (1H, *ddd*, $J_{gem}$ = 13.9 Hz, $J_{3a,2}$ = 5.5 Hz, $J_{3a,4}$ = 4.9 Hz, H-3a), 1.82 (1H, *dt*, $J_{gem}$ = 13.9 Hz, $J_{3b,2}$ = $J_{3b,4}$ = 7.9 Hz,

H-3b), 3.13 (1H, *dd*, $J_{2',3'}$ = 9.2 Hz, $J_{2',1'}$ = 7.8 Hz, H-2´), 3.25 – 3.27 (2H, *m*, H-4´ a H-5´), 3.35 (1H, *t*, $J_{3',2'}$ = $J_{3',4'}$ = 9.1 Hz, H-3´), 3.65 (1H, *dm*, $J_{gem}$ = 11.8 Hz, H-6´a), 3.86 (1H, *dd*, $J_{gem}$ = 11.8 Hz, $J_{6'b,5'}$ = 1.8 Hz, H-6´b), 3.94 (1H, *dqd*, $J_{4,3b}$ = 8.1 Hz, $J_{4,5}$ = 6.3, $J_{4,3a}$ = 4.9 H-4), 4.05 (1H, *ddq*, $J_{2,3b}$ = 7.8 Hz, $J_{2,3a}$ = 5.6 Hz, $J_{2,1}$ = 6.1 Hz, H-2), 4.34 (1H, *d*, $J_{1',2'}$ = 7.8 Hz, H-1´). $^{13}$C NMR (125.73 MHz, $CD_3OD$): $\delta$20.2 (C-1), 23.6 (C-5), 47.2 (C-3), 62.9 (C-6´), 66.8 (C-4), 71.7 (C-4´), 74.2 (C-2), 75.1 (C-2´), 77.9 (C-5´), 78.0 (C-3´), 102.2 (C-1´).

# 6. Závěr

Bylo prostudováno složení methanolického extraktu stonku brusnice borůvky:

a) V nepolární frakci byly identifikovány: α-amyrin **63**, β-amyrin **59**, ursolová kyselina **22**, oleanová kyselina **21**, 3β,12β-dihydroxyolean-28→13-olid **62**, glutinol **64**, 3β-sitosterol **24**, vitamin E **65**
b) V polární frakci byly identifikovány: sacharosa **72**, 2-deoxy-L-ribono-1,4-lakton **73**, quercetin **27**, monotropein **58**, methyl-β-D-fruktopyranosid **69,** methyl-α-D--fruktofuranosid **70**, methyl-β-D-fruktofuranosid **71**, (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D--glukopyranosylpentan-2,4-diol **74**, 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát **76**, 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*--3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát **75**

Výskyt všech výše jmenovaných látek, s výjimkou 3β-sitosterolu **24**, ve stonku brusnice borůvky nebyl dosud v literatuře popsán.

Bylo prostudováno složení methanolického extraktu listu brusnice borůvky:

a) V nepolární frakci byly identifikovány: α-amyrin **63**, β-amyrin **59**, ursolová kyselina **22**, oleanová kyselina **21**, 3β,12β-dihydroxyolean-28→13-olid **62**, glutinol **64**, 3β-sitosterol **24**, 3β-sitosterolglukosid **80**
b) V polární frakci byly identifikovány: quercetin **27**, monotropein **58**, myo--inositol **79**, methyl-β-D-fruktopyranosid **69**, methyl-α-D-fruktofuranosid **70**, methyl-β-D-fruktofuranosid **71**, (2*R*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosylpentan-2,4-diol **74**, 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát **76**, 4'*R*-(β-D--glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoát **75**

Výskyt látek **62**, **63**, **64**, **74**, **76**, **75**, **79** a **80** byl v listech popsán poprvé.

Byly izolovány a plně charakterizovány nové látky: 4'*R*-hydroxypent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát **76**, 4'*R*-(β-D-glukopyranosyloxy)-pent-2'*S*-yl-2*E*-3-(4--hydroxyphenyl)prop-2-enoát **75** a 3β,12β-dihydroxyolean-28→13-olid **62**.

Byly připraveny standardy (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosyl-2,4-pentandiolu **77** a (2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosyl-2,4-pentandiolu **78**.

V rámci syntetické části dizertační práce byly připraveny nové látky: (2*R*,4*R*)-2-*O*-β-D--glukopyranosyl-2,4-pentandiol (**77**), (2*S*,4*S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosyl-2,4-pentandiolu (**78**), (2*R*,*4R*)-2-*O*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-β-D-glukopyranosyl)-4-*O*-benzylpentan--2,4-diol (**88**), (2*S*,*4S*)-2-*O*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-β-D-glukopyranosyl)-4-*O*--benzylpentan-2,4-diol (**89**) a (2*R*,*4R*)-2-*O*-β-D-glukopyranosyl)-4-*O*-benzylpentan-2,4--diol (**90**) a (2*S*,*4S*)-2-*O*-β-D-glukopyranosyl)-4-*O*-benzylpentan-2,4-diol (**91**).

# Poděkování

Závěrem bych ráda poděkovala svým školitelům, Doc. RNDr. Janu Sejbalovi, CSc.† a Ing. Bohumíru Koutkovi, za užitečné rady, připomínky a čas, který mi věnovali během vypracovávání této dizertační práce.

Za vyškolení a podnětné rady v oblasti NMR spektroskopie děkuji Doc. RNDr. Janu Sejbalovi, CSc. a RNDr. Ivě Rudovské, PhD., které také děkuji za cenné rady a připomínky během sepisování této práce. Za mnohé rady, podněty a diskuse se syntetickou částí této práce děkuji RNDr. Janu Veselému, PhD. Mgr. B. Šperlichové děkuji za měření specifických optických otáčivostí, Mgr. M. Štíchovi za měření MS spekter a RNDr. S. Hilgardovi za měření IČ spekter. Děkuji RNDr. M. Dračínskému, PhD. za výsledky molekulového modelování.

Děkuji všem svým spolupracovníkům za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Zvláštní poděkování patří mé rodině a mým blízkým za jejich podporu a pomoc.

# 7. Literatura


1. http://www.gymfry.cz/zmp0405/mlckovska/historie.htm (20.6.2008)
2. http://rostliny.prirodou.cz/?nazvy=cs&rostlina=vaccinium_myrtillus (30.5.2008)
3. http://botanika.wendys.cz/kytky/K361.php (30.5.2008)
4. Witzell J., Gref R., Näsholm T.: *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 115.
5. http://rostliny.prirodou.cz/?nazvy=cs&rostlina=vaccinium_myrtillus (30.5.2008)
6. Jaakola L., Määttä-Riihinen K., Kärenlampi S., Hohtola A.: *Planta* **2004**, *218*, 721.
7. http://cajeleci.blog.cz/0606/brusnice-boruvka (30.5.2008)
8. http://www.fiftyfifty.cz/spolecensky-magazin/9729699 (30.5.2008)
9. http://www.ordinace.cz/clanek/brusnice-boruvka/ (30.5.2008)
10. Dinelli G., Bonetti A., Minelli M., Marotti I., Catizone P., Mazzanti A.: *Food Chem.* **2006**, *99*, 105.
11. Elizabeth R.-G.N., Annete H., Francisco G.-L.R., Javier I.-P.F., Fraciela Z.-G., Alberto G.-I.J.: *Food Chem.* **2007**, *103*, 521.
12. Bialońska D., Zobel A.M., Kuraś M., Tykarska T., Sawicka-Kapusta K.: *Water Air Soil Poll.* **2007**,*181*, 123.
13. Chalker-Scott L.: *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 1.
14. Sultana F., Anwar F.: *Food Chem.* **2008**, *108*, 879.
15. Winkel-Shirley B.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **2002**, *5*, 218.
16. Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.-P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M.: *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3954.
17. Kanerva S., Kitunen V., Loponen J., Smolander A.: *Biol. Ferl. Soils* **2008**, *44*, 547.
18. Riihinen K., Jakola L, Kärenlampi S., Hohtola A.: Food Chem. **2008**, *110*, 156.
19. Heinonen M.: *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 684.
20. Quettier-Deleu Ch., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J.-C., Failleul F., Trotin F.: *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *72*, 35.
21. Rasmussen S.E., Frederiksen H., Krogholm K.S., Poulsen L.: *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 159.
22. Tapiero H., Tew K.D., Nguyen Ba G., Mathé G.: *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 200.
23. Valls J., Richard T., Trotin F., Monti J.-P., Mérillon J.-M., Vitrac X.: *Food Chem.* **2007**, *105*, 879.
24. Sokól-Letowska A., Oszmiański J., Wojdylo A.: *Food Chem.* **2007**, *103*, 853.

25. Ghidouche S., Es-Safi N.-E., Ducrot P.-H.: *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 619.
26. Boreckling C.D., Vivanco J.M.: *Soil. Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 1189.
27. Grisebach H.: *Lehrstuhl für biochemie der pflanen am biologischen institut II der universität Freiburg i. Br.*, Germany.
28. Santos-Buelga C., Scalbert A.: *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1094.
29. Milosavić N.B., Prodanović R.M., Jankov R.M.: *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7222.
30. Moon Y.H., Nam S.H., Kang J., Kim Y.-M., Lee J.-H., Kang H.-K., Braton V., Jun W.-J., Park K.-D., Kimura A., Kim D.: *Appl. Microbiol. Biot.* **2007**, *77*, 559.
31. Kostadinova E.Pl, Alipieva K.I., Kokubun T., Taskova R.M., Handjieva N.V.: *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1321.
32. Kováčová M., Malinová E.: *Czech J. Food. Sci.* **2007**, *25*, 325.
33. Sun T., Ho Ch.-T.: *Food Chem.* **2005**, *90*, 743.
34. Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D.: *J. Agric. Food. Chem.* **1998**, *46*, 4113.
35. Kim K.-H., Tsao R., Yang R., Cui S.W.: *Food Chem.* **2006**, *95*, 466.
36. Jin H., Cominelli E., Bailey P, Parr A., Mehrtens F., Jones J., Tonelli Ch., Weisshaar B., Martin C.: *EMBO J.* **2000**, *19*, 6150.
37. Li J., Ou-Lee T.-M., Raba R., Amundson R. G., Last R. L.: *Plant Cell* **1993**, *5*, 171.
38. Landry L. G., Chapple C. C. S., Last R. L.: *Platn Physiol*. **1995**, *109*, 1159.
39. McMurry J.: Organická chemie, VUT v Brně, nakladatelství Vutium, 2007.
40. Näsholm T., Edfast A.-B., Erisson A., Nordén L.-G.: *New Phytol.* **1994,** *126*, 137.
41. Crowell P.L.: *American Society for Nutritional Sciences* **1999**, 775s.
42. Dinda B., Debnath S., Harigaya Y: *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 159.
43. Choi J. Lee K.-T., Choi M.-Y., Nam J.-H., Jung H.-J., Park S.-K., Park H.-J.: *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1915.
44. Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R. E., Cosentino L.M., Ballas L.M., Jiang J.B, Janzen W.P., Chen I.-S., Lee K.-H.: *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 243.
45. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L.M., Chen Ch.-H., Garrett P.E., Lee K.-H.: *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1016.
46. Evers M., Poujade Ch., Soler F., Ribeill Y., James C., Leliévre Y., Gueguen J.-Ch., Reisdorf D., Morize I., Fauwels R., De Clercq E., Hénin Y., bousseau A., Mayaux J.-F., Le Pecq J.-B., Dereu N.: *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1068.
47. Xu H.-X., Zeng F.-Q., Wan M., Sim K.-Y.: *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 643.

48. Kashiwada Y., Wang H.-K., Nagao T., Kitanaka S., Yasuda I., Fujioka T., Yamagashi T., Cosentino L.M., Kozuka M., Okabe H., Ikeshiro Y., Hu Ch.-Q., Yeh E., Lee K.-H.: *J. Nat Prod.* **1998**, *61*, 1090.
49. Ito J., Chang F.-R., Wang H.-K., Park Y. K., Ikegaki M., Kilgore N., Lee K.-H.: *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1278.
50. Konoshima T., Takasaki M., Kozuka M.: *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 1167.
51. Ryu S.Y., Choi S.U., Lee S.H., Lee C.O., No Z., Ahn J.W.: *Arch. Pharm. Res.* **1994**, *17*, 375.
52. Yasukawa K., Yu S., Yamanouchi S., Takido M., Akihisa T., Tamura T.: *Phytomed.* **1995**, *4*, 309.
53. Kim D.S.H.L., Pezzuta J.M., Pisha E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1707.
54. Lee S.-S., Chen W.-Ch., Huang Ch.-F., Su Y.: *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1343.
55. Rice G.K., Yokoi T., Hayashi T., Suzuku H., Lee K.-H., McPhail A.T.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 1397.
56. Ye W.-C., Ji N.-N., Zhao S.-X., Liu J.-H., Ye T, McKervey M.A., Stevenson P.: *Phytochemistry* **1996**, *42*, 799.
57. Tan Q.L., Adnyana I.K., Tezuka Y., Nagaoka T., Tran Q.K., Kadota S.: *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 456.
58. Kahuno T., Yoshikawa K., Arihara S.: *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3535.
59. Kahuno T., Yoshikawa K., Arihara S., Takei M., Endo K.: *Tetrahedron* **1991**, *47*, 7219.
60. Sidiqui B.S., Afshan F., Faizi S., Naqvi S.N.-H., Tariq R.M.: *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1216.
61. Song T.-Y, Yen G.-Ch.: *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3322.
62. Kozai K., Miyake Y., Kohda H., Kametaka S., Yamasaki K., Suginaka H., Nagasaka N.: *Caries Res.* **1987**, *21*, 104.
63. Ryan E., Galvin K., O'Connor T.P.O., Maguire A.R., O'Brien N.M.: *Plant. Food. Hum. Nutr.* **2007**, *62*, 85.
64. Purpan E.I., Farkas E., Berger M., Labalette F., Centis S., Daydé, Calmon A.: *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* **2007**, *109*, 525.
65. Park Ch., Moon D.-O., Fhu Ch.-H., Choi B.T., Lee W.H., Kim G.-Y., Choi Y.-H.: *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 1317.
66. Zadernowski R., Naczk M., Nesterowicz J.: *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2118.

67. Wu X., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E., Prior R.L.: *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4069.
68. Mauri P., Pietta P.: *J. Pharmaceut. Biomed.* **2000**, *23*, 61.
69. Pyankov V.I., Ivanov L.A., Lambers H.: *Russ. J. Ecol.* **2001**, *32*, 221.
70. http://www.chromadex.com/Phytosearch/bilberry.htm (18.6.2003)
71. Hegnauer R.: *Chemotaxonomie der Pflatzen*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1966.
72. Ice C.H., Wender S.H.: *Contribution from the department of chemistry of the university of Oklahoma* **1952**, *75*, 50.
73. Witzel J, Shevtsova A.: *J. Chem. Ecol.* **2004,** *30*, 1937.
74. Gallet Ch., Lebreton P.: *Soil Biol. Biochem.* **1995,** *27*, 157.
75. Slosse P., Hootelé C.: *Tetrahedron Lett.* **1978**, *4*, 397.
76. Tišlerová I.: *Dizertační práce*, UK PřF, Praha **2003**.
77. Mahato S., Kundu A.P.: *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
78. Takahashi H., Iuchi M., Fujita Y., Minami H., Fukuyama Y.: *Phytochemistry* **1999,** *51*, 543.
79. Mendez J., Bilia A.R., Morelli I.: *Pharmaceutica Acta Helvetica* **1995**, *70*, 223.
80. Ramos M.P.P., Ferreira M.J.P., Lopes L., Emerenciano V.P.: *Internet Electronic Journal of Molecular Design* **2003**, *2*, 000.
81. Zhang Y., Jayaprakasam B., Seeram N.P., Olson L.K., DeWitt D., Nair M.G.,: *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 228.
82. Kim D., Han K, Chung I., Kim D., Kim S., Kwon B., Jeong T., Park M., Ahn E., Baek N.: *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *28*, 550.
83. Ovesná Z., Vachálková A., Horváthová K., Tóthová D.: *Neoplasma* **2004**, *51*, 327.
84. Sun H., Fang W.S., Wang W.Z., Hu Ch.: *Botanical studies* **2006**, *47*, 339.
85. da Paz Lima M, de Campos Braga P.A., Macedo M.L., da Silva M.F., Ferreira A.G., Fernandes J.B., Vieira P.C.: *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 385.
86. Morita M., Shibuya M., Kushiro T., Masuda K., Ebizuka Y.: E*ur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 3453.
87. Ercil D., Sakar M.K., Del Olmo E., San Feliciano A.: *Turk. J. Chem.* **2004**, *28*, 133.
88. Ding H., Wu Y., Lin H.: *J. Chin. Chem. Soc.* **2000**, *47*, 561.
89. De Sousa Menezes F., Borsatto A.S., Pereira N.A., de Abreu Matos F.J., Kaplan M.A.: *Phytochemistry* **1998**, *48*, 323.
90. Jenkins T., Bhattacharyya J., Majetich G., Teng Q., de Fatima A.M., Almeida R.: *Phytochemistry* **1999**, *52*, 723.

91. Morales G., Sierra P., Mancilla A., Paredes A., Loyola L.A., Gallardo O., Borquez J.: *J. Chil. Chem. Soc.* **2003**, *48*, 13.
92. García-Granados A., López P.E., Melguizo E., Parra A., Simeó Y.: *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1491.
93. Ali M.S., Jahangir M, Shazad ul Hussan S., Choudhary M.I.: *Phytochemistry* **2002**, *60*, 295.
94. Fu L., Zhang S., ., Sakai J., Hasegawa T., Mitsui T., Kataoka T., Oka S., Kiuchi M., Hirose K., Ando M.: *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 198.
95. Tanaka R., Ida T., Kita S., Kamisako W., Matsunaga S.: *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1163.
96. Parmar V.S., Bisht K.S., Malhotra A., Jha A., Errington W., Howarth O.W., Tyagi O.D., Stein P.C., Jensen S, Boll P.M., Olsen C.E.: *Phytochemistry* **1995**, *38*, 951.
97. Jiang Z.-H., Zhou R.-H., Masuda K., Ageta H.: *Phytochemistry* **1995**, *40*, 219.
98. Fraga B.M., Reina M., Luis J.G., Rodriguez M.L.: *Z. Naturforsch* **2003**, *58c*, 621.
99. Olea R.S.G., Torres L.M.B., Roque L.C., Roque N.F.: *Reference data* **1993**, 378.
100. Baker J.K., Myers Ch.W.: *Pharm.l res.* **1991**, *8*, 763.
101. Kolak U., Topcu G., Birteksoz S., Ötük G., Ulubelen A.: *Turk. J. Chem.* **2005**, *29*, 177.
102. Zhang X., Cambrai A., Miesch M., Roussi S., Raul F., Aoude-Werner D., Marchioni E.: *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1196.
103. De-Eknamkul W., Potduang B.: *Phytochemistry* **2003**, *62*, 389.
104. Kita Y., Tamura O., Itoh F., Yasuda H., Kishino H., Ke Y. Y., Tamura Y.: *J. Org. Chem.***1988**, *53*, 554.
105. Cho B. H., Kim J. H., Jeon H. B., Kim K. S.: *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4341.
106. Duker J. M., Serianni A. S.: *Carbohydr. Res.* **1993**, *249*, 281.
107. Spectral database for organic compounds http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
108. Buděšínský M., Pelnář J.: Fyzikálně-chemické metody (Nukleární magnetická rezonance), Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha 2000, svazek 25, III. Část k 26. kurzu.
109. Johnson L, Verraest D. L., van Haveren J., Hakala K., Peters J. A., van Dekkum H.: *Tetrahedron.Asymetry* **1994**, *5*, 2475.
110. Bergeron Ch., Marston A., ANtus S., Gauthier R., Hostettmann K.: *Phytochemistry* **1998**, *49*, 233.

111. Jensen H.D., Krogfelt K.A., Cornett C., Hansen S.H., Christensen S.B.: *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6871.
112. Kaneko T., Ohtani K., Kasal R., Yamasaki K., Duc N. M.: *Phytochemistry* **1998**, *47*, 259.
113. Taketa A.T.C., Breitmaier E., Schenkel E.P.: *J.Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 205.
114. Cai X.F., Lee I.S., Shen G., Dat N.T., Lee J.J., Kim Y.H.: *Arch. Pharm. Res.* **2004**, *27*, 825.
115. Tkachev A.V., Denisov A.Y., Gatilov Y.V., Bagryanskaya I.Y., shevisov S.A., Rybalova T.: *Tetrahedron* **1994,** *50*, 11459.
116. Durham D.G., Liu X, Richards R.M.E.: *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1469.
117. Deng J., Starck S.R., Hecht S.M.: *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1624.
118. Cerdan S., Hansen C.A., Johanson R., Inubushi T., Williamson J.R.: *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 14676.
119. Abraham R.J., Byrne J.J., Griffiths L., Perez M.: *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 491.
120. Takahashi H., Kittaka H., Ikegami S.: *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2705.
121. Abraham R.J., Byrne J.J., Griffiths, Koniotou R.: *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 611.
122. Chhetri D.R., Mukherjee A.K., Adhikari J.: *Braz. J. Plant Physiol.* **2006**, *18*, 291.
123. Wawer I., Zielinska A.: *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 374.
124. Lee J.H., Lee B.W., Kim J.H., Jeong T.-S., Kim M.J., Lee W.S., Park K.H.: *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2057.
125. Yayli N., Yildirim N., UstaA., Özkurt S., Akgün V.: *Turk. J. Chem.* **2003**, *27*, 749.
126. Sang S., Kikuzaki H., Lapsley K., Rosen R.T., Nakatani N., Ho Ch.-T.: *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4709.
127. Fujita T., Nakayama M.: *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1545.
128. Flamini G., Antognoli E., Morelli I.: *Phytochemistry* **2001**, *57*, 559.
129. Ruttens B., Blom P., van Hoof S., Hubrecht I., van der Eycken J., Sas B., van Hemel J., Vandenderckhove J.: *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5514.
130. De La Zerda J., Barak G. Sasson Y: *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1533.
131. Šaman D., Kratina, P., Moravcová, J., Wimmerová, M., Wimmer, Z.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2006**, *71*, 1470.
132. McAuliffe J.C., Hindsgaul O.: *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1234.
133. Denmark S.E., Almstead N.G.: *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8089.

134. Hoffmann R.W., Stenkamp D., Trieselmann T., Göttlich R.: *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2915.

135. Soai K., Hatanaka T., Yamashita T.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 927.

# Seznam zkratek

NMR – Nuclear Magnetic Resonance

HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

TLC – Thin Layer Chromatography

NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

COSY – Correlation Spectroscopy

TOCSY – Total Correlation Spectroscopy

ROESY – Rotation Frame NOESY

Hex – hexan

DMSO – dimethylsulfoxid

# Seznam obrázků

obr. 1. Šen-nung, zdroj: http://cina.yin.cz/historie/sen-nung/ (30.7.2008)

obr. 2. Fotografie brusnice borůvky, zdroj: Bohdal J.: www.naturfoto.cz (22.7.2008)

obr. 3. Příklad spinových systémů v triterpenoidní molekule.

obr. 4. Prostorové uspořádání konformeru s nejnižší energií pro sloučeninu **75** s konfigurací 2´S,4´R. Vodíky, které nejsou významné pro určení absolutní konfigurace, jsou pro přehlednost vynechány. Znázorněny jsou významné 2D-ROESY korelace. Zdroj: program Hyperchem 8 (Hypercube).