**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMAKOGNOZIE**

Monika Vostřelová

# Obsah alkaloidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica*

**(Diplomová práce)**

**Datum zadání: 28.11.2008**

**Datum odevzdání: 15.5.2010**

**Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jan Martin, Ph.D.**

**Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.**

**Oponent:**

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce. Použitá odborná literatura a další informační zdroje jsou citovány a uvedeny v seznamu literatury na konci této práce.

Děkuji svému školiteli PharmDr. Janu Martinovi, PhD. za odborné vedení, pomoc, vytvoření přátelské pracovní atmosféry a trpělivosti v průběhu celého vzniku mé diplomové práce. Děkuji také kolektivu katedry farmakognozie za ochotu pomoci a přístrojové zabezpečení experimentální části diplomové práce.

Monika Vostřelová

# OBSAH

1. ÚVOD ....6
2. CÍL PRÁCE ....8
3. TEORETICKÁ ČÁST ....9
3.1 *Fontinalis antipyretica* HEDW (pramenička obecná) ....10
3.1.1 Botanický popis rostliny ....10
3.1.2 Historie a použití ....11
3.1.3 Obsahové látky *Fontinalis antipyretica a Fontinalis squamosa* ....13
3.1.4 Biologické účinky β-karbolínových derivátů ....15
3.1.5 Biologické účinky flavonoidů ....18
3.1.6 Biosyntéza β-karbolínů ....19
3.1.7 Biosyntéza flavonoidů ....22
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ....24
4.1 Použité chemikálie a přístroje ....24
4.1.1 Chemikálie ....24
4.1.2 Přístroje a chromatografické doplňky ....24
4.2 Sběr a zpracování rostlinného materiálu ....25
4.2.1 Výběr lokalit sběru na území ČR ....25
4.2.2 Měření fyzikálních podmínek v daných lokalitách ....25
4.2.3 Vlastní sběr materiálu ....26
4.2.4 Ztráta sušením ....26
4.2.5 Zkoušky totožnosti provedené dle článku *Secale cornutum* ČsL 2 (důkaz přítomnosti alkaloidů) ....26
4.2.6 Stanovení celkového popela dle ČL 2002 ....27
4.3 Stanovení indolových alkaloidů dle ČsL 2 ....27
4.4 Stanovení alkaloidů pomocí HPLC ....28
4.4.1 Přípravy extraktu ....28
4.4.2 HPLC analýza ....31
4.5 Stanovení flavonoidů pomocí HPLC ....33
4.5.1 Příprava extraktu ....33
4.5.2 HPLC flavonoidů ....33
4.5.3 Validace HPLC analýzy ....35

4.6 Statistické zpracování dat ..... 36
5. VÝSLEDKY ..... 38
*5.1* Sběr vzorků *Fontinalis antipyretica* ..... 38
*5.2* Zkoušky totožnosti dle článku *Secale cornutum* ČsL 2 ..... 38
5.3 Výsledek chemické analýzy dle ČsL 2 ..... 38
5.4 Výsledky stanovení alkaloidů a flavonoidů pomocí HPLC ..... 39
6. DISKUZE ..... 41
7. ZÁVĚR ..... 44
8. LITERATURA ..... 45
9. OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA ..... 50

# 1. ÚVOD

Používání rostlin pro blaho člověka je prastaré. Mnohou léčivou rostlinu uchovává tradice od antiky přes středověk až do naší doby.(1) K léčebným metodám za pomoci nejrůznějších bylin se uchylovali lidé skutečně od nepaměti. Vyplývá to z dochovaných egyptských papyrů, pocházejících z dávnověku. Doklady existují i z oblasti Severní a Jižní Ameriky anebo Dálného východu, které lze datovat přibližně do doby 4000 let př. n. l. Asyřané a Babylóňané znali již v 17. století př. n. l. 65 druhů léčivých rostlin. Staří řečtí učenci se těmito poznatky hojně inspirovali, Hippokrates rozdělil byliny na horké, studené, suché a mokré, a Dioscoridův herbář již zahrnuje více než 600 bylinných druhů. Řím navázal na poznatky Řeků a ještě je prohloubil, Arabové rozšířili poznatky o nové byliny z exotických krajů, nemluvě o tradiční čínské medicíně a starých perských herbářích. Nejstarším českým herbářem je Knieha lekarska z roku 1517 litomyšlského lékaře J. Černého, který zde popisuje 380 bylin s léčivými účinky.(2)

Většina účinných látek se získává izolací, některé částečnou nebo úplnou syntézou, mikrobiologickými metodami nebo kombinací těchto postupů. Izolací se získávají zejména alkaloidy, polysacharidy, kardioglykosidy, antraglykosidy, flavonoidy, kumarinové deriváty, hormony, enzymy a některá antibiotika.(3)

Alkaloidy jsou v naprosté většině produkty zelených rostlin, jen velmi malý počet se vyskytuje v nižších houbách (námel) a v kožních sekretech obojživelníků. Název dostaly od alkalické povahy, ač někteří zástupci jsou neutrální látky. V rostlině jsou vázány na organické kyseliny (šťavelovou, jablečnou, vinnou, citronovou, mekonovou, chelidonovou). Často se vyznačují silným fyziologickým účinkem, a proto od pradávna sloužily (byť ve formě hrubých extraktů) jako léčiva, uspávací prostředky a jedy.

Přes velmi rozmanité účinky neznáme jejich přirozenou funkci a zdá se, že jsou pro rostliny postradatelné.

Alkaloidy obsahuje jen asi 10% všech rostlinných druhů a 20% rostlinných čeledí, většinou dvouděložných, a to v množství pod 0,5% sušiny, větší obsahy jsou výjimečné.(4) Většina alkaloidů je považována za dusíkaté odpadní látky rostlinného organismu. Úplné odstranění alkaloidů z rostlin, pokud je proveditelné experimentálně, obvykle nemá na rostlinu vliv. Biosynthesa alkaloidů však znamená pro rostlinu značnou spotřebu energie a předpokládá přítomnost vysoce specifických enzymů, což nasvědčuje určité úloze alkaloidů, která však zatím není zcela známa.

Alkaloidy se uplatňují jako analgetika, narkotika, kardiaka, prostředky ovlivňující krevní oběh a dýchání, chemoterapeutika, antiparasitika, uterotonika, lokální anestetika, mydriatika a amara.(5)

# 2. CÍL PRÁCE

Má diplomová práce s názvem „Stanovení alkaloidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica*“ se zabývá stanovením množství alkaloidů ve výše zmíněném vodním mechu a zjištěním přítomnosti dalších látek s možnou biologickou aktivitou.

Cílem práce bylo:

1. Zjistit výskyt vodního mechu *Fontinalis antipyretica* na území ČR a ve vybraných lokalitách získat vzorky.
2. Změřit fyzikální faktory prostředí, ve kterém se *Fontinalis antipyretica* vyskytuje.
3. Zvládnout stanovení alkaloidů ve *Fontinalis antipyretica* a porovnat množství alkaloidů u vzorků z různých lokalit ČR.
4. Identifikovat hlavní flavonoidy obsažené ve *Fontinalis antipyretica.*

# 3. TEORETICKÁ ČÁST

Mechorosty patří mezi nejstarší suchozemské rostliny, první fosílie pocházejí z devonu, tj. z období před 360 – 370 miliony let. Předchůdci mechorostů nejsou známí, ale předpokládá se, že se jedná o řasy z řádu *Charales.* Vývojově tvoří mechorosty tři samostatné vývojové skupiny s nejasnými vzájemnými vztahy – hlevíky (*Anthocerophyta),* játrovky *(Hepatophyta, Marchantiophyta)* a mechy *(Bryophyta).* V současné době je známo přibližně 20 tisíc druhů mechorostů. Jsou téměř kosmopolitně rozšířené, ale nikdy se nevyskytují ve vodách moří a oceánů. *Bryophyta* tvoří nejpočetnější skupinu mechorostů s přibližně 10 000 druhy v přibližně 700 rodech.

Mechorosty musí být schopny vyrovnat se s nepravidelnou dostupností vody. Vodu přijímají celým povrchem těla. U mechorostů s vyvinutou kutikulou, která je na některých místech slabší, případně zcela chybí, je tak umožněn cílený příjem vody do určitých oblastí. Přijatá voda je vedena vnitřkem stélky, a to jak mezibuněčnými prostory, tak i specializovanými buňkami, hydroidami. Omezen je i příjem živin ze substrátů, ale mechorosty dokáží lépe využívat látky obsažené ve srážkách. Tento příjem není omezen jen na látky minerální, ale i na různé polutanty, díky čemuž mohou mechorosty vystupovat jako citlivé bioindikátory znečištění.(5) Mechorosty nemají kořeny, nýbrž kořínkům podobná vlákna (rizoidy) s odlišným utvářením, s jejichž pomocí mohou být zakotveny v podkladu.(6)

## 3.1 *Fontinalis antipyretica* HEDW (pramenička obecná)

Říše: *Plantae*

Oddělení: *Bryophyta*

Třída: *Bryopsida*

Podtřída: *Bryidae*

Řád: *Hypnales*

Čeleď: *Fontinalaceae*

Rod: *Fontinalis* HEDW

Druh: *Fontinalis antipyretica* HEDW[74]

### 3.1.1 Botanický popis rostliny

Pramenička obecná – *Fontinalis antipyretica* je vodní mech, který se vyskytuje v tekoucích vodách, ve vodách mírně znečištěných, vzácně ve vodách stojatých jak v nížinách, tak i v horských oblastech. Neroste na vápenitých půdách a je velmi odolná proti vyschnutí.

Lodyžky vyrůstají v sytě tmavozelených 100 - 400 mm dlouhých a bohatě větvených svazcích s četnými výhonky. Lístky na lodyžkách i postranních větvičkách jsou výrazně sestaveny ve třech řadách. Jsou dlouhé 3 - 5 mm, bez žebra, člunkovité, vejčitě podlouhlé a celokrajné. Štět je dlouhý jen 1 – 5 mm a vyrůstá z postranních krátkých větviček, takže vejčité tobolky zdánlivě rostou mezi lístky. Výtrusy dozrávají v létě. Čepelné buňky jsou tečkované, obdélníkovité. Peritechiální lístky pohárkovitě obalují tobolku. Peristom je dvojitý, bradavičnatě papilnatý, tmavočervený. Jedná se o rostlinu dvoudomou.[26, 6] Rod *Fontinalis* je rozšířen po celé Evropě. V Čechách roste hlavně v oblasti Šumavy (horní řeky Křemelné[24]) a Krkonoš (Úpská jáma[25]). Je známo zhruba 14 druhů[29], přičemž u nás byly doposud objeveny tři druhy: *Fontinalis antipyretica, Fontinalis squamosa* a *Fontinalis hypnoides* HARTM.

Poslední zmíněný druh byl objeven až nedávno v nevelkém množství v jižních Čechách. Je velmi podobný *Fontinalis antipyretica*, od kterého je těžko rozeznatelný. Je řazen mezi nedostatečně známé druhy.[28]

### 3.1.2 Historie a použití

Mechorosty ve srovnání s vyššími rostlinami mají pouze omezený význam pro člověka; významnější roli hrají spíše v přírodních ekosystémech. Donedávna se hovořilo pouze o využití mechorostů jako obalového materiálu pro dekoraci; ekonomicky významné bylo jedině použití rašeliny. V Japonsku jsou ještě populární „mechové" zahrádky, využívající estetického vzhledu různých mechorostů. Časem se začaly používat mechorosty jako stanovištní indikátory. S rozvojem fytochemie přibylo využití sekundárních metabolitů; zvláště u játrovek byly nalezeny významné sloučeniny.

Člověk využíval některých vlastností mechorostů již od starověku. Již z neolitu je známo balení špiček šípů do mechorostů za účelem ochrany hrotů. Od pradávna byly také polštáře mechů používány jako výstelka lože, později jako náplň primitivních matrací, či polštářů. S touto skutečností je spojeno rodové jméno mechu *Hypnum* (= „spací" mech). Bylo použito již Lineém, který samozřejmě znal tuto souvislost z oblasti Laponska. Podobně mechorosty používají (hlavně v tropických deštných pralesech druhy rodů *Frullania, Floribundarie, Meteorium, Papillaria* aj.) ptáci ke stavbě hnízd a někteří savci pro výstelku svých pelechů. Jako výstelka hrobů byly mechorosty používány dlouhou dobu Japonci a Eskymáky.

Mnohem více byly mechorosty využívány člověkem jako vhodný těsnící materiál pro nejrůznější výplně. Mechem byly utěsňovány skuliny mezi kmeny v primitivních dřevěných staveních, mechy sloužily rovněž k utěsnění mezer v člunech. U severských národů byly skuliny mezi komínem a stavením vyplňovány vodním druhem *Fontinalis antipyretica* jako ochrana proti ohni. Rovněž tuto skutečnost převzal *Linné* do druhového jména mechu (*antipyretica* =

proti ohni). Dodnes jsou mechy lokálně používány jako výplň beden při transportu křehkého materiálu, ovoce, zeleniny, navlhčené při transportu zahradních rostlin apod. Na Filipínách jsou mechy (hlavně rašeliníky) používány jako obal vajíček krokodýlů v inkubátorech krokodýlích farem.

Jako izolační materiál kolem lahví (obdoba termosek) a jako obvazový materiál na odřeniny byly mechorosty používány ještě v 1. světové válce. V dřívějších dobách (u nás běžně v období renesance) a donedávna u primitivních národů se setkáváme s jejich použitím místo plenek, toaletního papíru, jako náplň dámských vložek či vložek do bot. Fungicidní a baktericidní účinky dodnes využívají severoameričtí Indiáni, kteří připravují z mechů masti na odřeniny. V orientálním lidovém léčitelství (zvláště v Číně) je využíváno asi 40 druhů mechorostů k léčení zánětů, ekzémů, bronchitidy, angíny apod. Použití mechorostů k dekoračním účelům je starého data. Zejména v květináčích se překrývá půda mechorosty dodnes, např. při pěstování bonsají, dále vánoční dekorace jesliček a použití do věnců.

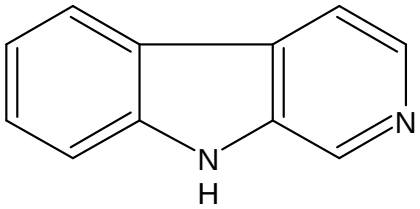
Mechorosty představují prostředí pro život řady roztočů, chvostoskoků, želvušek a vířníků. Pro vysoký obsah tříslovin nepatří k významným složkám potravy žádného druhu živočichů. Zvláštním případem jsou však lumíci, kteří nutně potřebují pozřít určité množství mechu; to jim slouží potom jako jakási výstelka v žaludku, umožňující správné trávení potravy. Jako poměrně jednoduché rostliny jsou mechorosty využívány jako modelové organizmy pro genetické, biochemické a další studie.[27]

### 3.1.3 Obsahové látky *Fontinalis antipyretica a Fontinalis squamosa*

Obsahové látky rodu *Fontinalis* byly zatím prozkoumány pouze u *Fontinalis squamosa*. Hlavními obsahovými látkami tohoto mechu jsou harmol, fontinalin a ester kyseliny harmolpropionové.[7] Harmol patří do skupiny β-karbolínových alkaloidů, konkrétně do podskupiny harmanových derivátů. Tyto látky získaly svůj název podle rostliny *Peganum harmala (Zygophillaceae)*, z níž byly poprvé izolovány. [41] β-karbolínové alkaloidy jsou rozšířenou skupinou látek, kterou lze nalézt v různých rostlinných čeledích, např. *Apocynaceae* (toješťovité), *Elaegnaceae* (hlošinovité), *Fabaceae* (bobovité), *Passifloraceae* (mučenkovité) a *Zygophyllaceae* (kacibovité).[8] Nachází se také v cigaretovém kouři, grilovaných potravinách a ve vínu.[9-12]

Obsahové látky mechu *Fontinalis squamosa* nebyly doposud podrobně zkoumány (práce Salma et al. byla zaměřena pouze na tři výše uvedené látky- harmol, fontinalin a ester kyseliny harmolpropionové - o jiných obsahových látkách se nezmiňuje). Vzhledem k tomu, že se v jiných rostlinách vyskytuje vždy více β-karbolínových alkaloidů (resp. látek harmanového typu) najednou, lze předpokládat, že se v mechu *Fontinalis squamosa* nacházejí kromě harmolu ještě další harmanové deriváty, tzn. harman, norharman, harmin, harmalin nebo harmalol. (Nelze vyloučit, že se zde nacházejí ještě další β-karbolínové deriváty odlišné struktury a pravděpodobně také látky úplně jiné stuktury, vzniklé primárním nebo sekundárním metabolismem).

Základní strukturou harmanových alkaloidů je tricyklická látka 9H-pyrido [3,4-b] indol. Podle nasycenosti pyridinového kruhu se rozdělují na deriváty β-karbolínů (harman, norharman, harmin a harmol), dihydro-β-karbolínů (harmalin a harmalol) a tetrahydrokarbolinů (např. tetrahydroharman).[30]

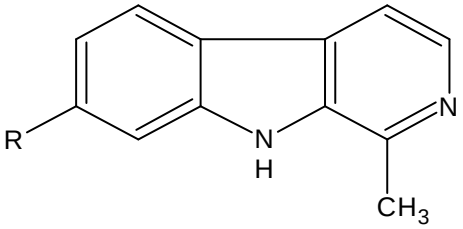



Struktura 9H-pyrido [3,4-b] indolu

harman: R = -H

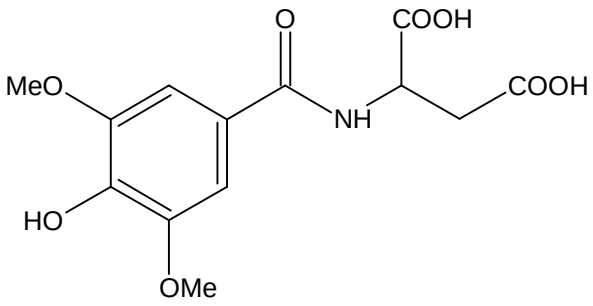
harmin : R = -$OCH_3$

harmalol : R = -OH




Jednotlivé alkaloidy se mezi sebou liší substituentem (hydroxylová nebo methoxylová skupina) v poloze 7. Některé z těchto alkaloidů, např. harman a norharman, jsou běžnou součástí lidských tkání a tělních tekutin (nalézají se v mozkové kůže a jiných mozkových tkáních, ale také v játrech a nadledvinách).[13,14] Jiné β-karbolínové alkaloidy, harmin a harmalin, jsou pravděpodobně spoluodpovědné za halucinogenní efekt nápoje „ayahuasca“, který se připravuje z pralesních lián *Banisteriopsis caapi* a *Psychotria viridis* a používá se při náboženských obřadech v Jižní Americe a v Africe.[15,16]

Struktura esteru kyseliny harmolpropionové a fontinalinu byla poprvé zjištěna a popsána v práci Salma et al.[7] Ester kyseliny harmolpropionové patří podle své struktury také mezi β-karbolínové deriváty, stejně jako jeho prekurzor kyselina harmolpropionová. Struktura fontinalinu je však odlišná. Je to N-(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoyl) asparagová kyselina. Obsahové látky *Fontinalis antipyretica* nebyly zatím blíže zkoumány. Lze však předpokládat, že budou podobné látkám ve *Fontinalis squamosa.*




Struktura fontinalinu

### 3.1.4 Biologické účinky β-karbolínových derivátů

U β-karbolínových alkaloidů můžeme nalézt široké spektrum účinků, především na muskulární, kardiovaskulární a centrální nervovou soustavu. Tyto účinky v sobě zahrnují inhibici enzymů, např. acetylcholinesteráza (ACHE) a butylcholinesteráza (BUCHE), monoaminooxidáza (MAO) A a B, vazbu na benzodiazepinové, serotoninové, dopaminové a imidazolinové receptory, dále konvulzivní a antikonvulzivní účinky a také účinky anxiolytické, tremorogenní a imunomodulační. Tyto alkaloidy mají také schopnost interkalace DNA a inhibice enzymů (např. DNA topoizomerázy), mají mutagenní efekt na různé organismy, antioxidační a neuroprotektivní účinky.[20]

#### Inhibice ACHE a BUCHE

Mezi nejznámější onemocnění, která souvisí s poruchami v cholinergním systému patří Alzheimerova choroba a myasthenia gravis. Součástí farmakoterapie Alzheimerovy choroby je substituce neurotransmiterů, kterých u Alzheimerovy choroby ubývá (acetylcholin, serotonin, dopamin).[77,78,79] Na přímé posílení funkce cholinergního systému působí inhibitory ACHE (ACHEI) a jednou ze skupin alkaloidů působících jako inhibitory ACHE jsou právě β-karbolínové alkaloidy. Jsou známy výsledky pokusů, které byly prováděny s deriváty harmanu a norharmanu. Jako nejúčinější inhibitory působily kvartérní soli, jejichž aktivita byla srovnatelná s referenčními drogami, kterými byly

galantamin a fysostigmin. Selektivněji na ACHE působily methyl deriváty v poloze N 9, bez této substituce byla aktivita smíšená. Také terciární alkaloidy však vykázaly významnou aktivitu. Terciární alkaloidy navíc oproti solím snadno přechází přes bariéru mezi mozkem a krví, mohly by se tak stát ideálními prekurzory pro kvartérní alkaloidy.[97]Jelikož β-karbolínové alkaloidy vykazují aktivitu na inhibici ACHE, některé z nich by se mohly stát předlohou pro nové ACHEI používané pro léčbu myasthenia gravis. Neinvazivním způsobem léčby tohoto nervosvalového onemocnění je symptomatická terapie, která využívá účinek ACHEI (samostatně nebo v kombinaci s imunosupresivy-kortikosteroidy).[80]

Inhibice MAO A a MAO B

Abnormální aktivita MAO B je zodpovědná za neurologická onemocnění jako Alzheimerova a Parkinsonova choroba, zatímco MAO A hraje důležitou roli např. při depresi.[81] Byly provedeny pokusy účinku β-karbolínových a dihydro-β-karbolínových alkaloidů na inhibici MAO a B a výsledky ukázaly, že všechny použité alkaloidy jsou reverzibilní kompetitivní inhibitory s vyšší afinitou k MAO A. Vyšší účinky měly látky s 1-methyl-7-methoxy substitucí, přičemž nejvyšší inhibiční aktivitu vykazoval harmalin a harmin společně s jeho deriváty s methylovou skupinou v poloze 2 a 9.[82]

Dále byl studován účinek výše zmíněných alkaloidů (harmalin a harmin) na léčbu Parkinsonovy choroby. Při pokusu na krysích játrech byly použity harmin, harmalin a extrakt z pralesní liány *Banisteriopsis caapi (Malpighiaceae)*, která tyto dvě látky obsahuje. Nejúčinnější byl extrakt a také harmalin vykazoval dobrou biologickou aktivitu. Harmin byl v použité koncentraci téměř neúčinný. Vzhledem k těmto výsledkům je pravděpodobné, že na účinku extraktu se podílejí ještě jiné obsahové látky *B. caapi* nebo zde může docházet k synergismu.[83] β-karbolínové alkaloidy se nacházejí také v kávě. V inhibici MAO A byl nejúčinnější norharman a harman, na MAO B norharman. Tyto dvě látky byly objeveny i v cigaretovém kouři, kde se rovněž účastní inhibice MAO.[81]

Vazba β-karbolínových derivátů na serotoninové, dopaminové, benzodiazepinové a imidazolové receptory

Bylo zkoušeno, jak se jednotlivé β-karbolíny váží na serotoninové a dopaminové receptory. Z výsledků vyplynulo, že se β-karbolínové alkaloidy váží s mírnou afinitou na receptory 5-HT2A, přičemž jejich afinita je závislá na substituentech a nasycenosti kruhů. Z plně aromatických alkaloidů vykazoval nejvyšší afinitu harman a harmin, u částečně nasycených pak harmalan a 5-methoxyharmalan a u tetrahydrodervátů 8 a 5-methoxytetrahydroharman. Afinita ke zbývajícím serotoninovým a dopaminovým receptorům byla zanedbatelná. I když s dopaminovými receptory β-karbolíny nereagují, dopaminergní systém je ovlivňován inhibicí MAO (viz. předcházející odstavec)[98]. Díky stimulaci 5-HT receptorů způsobují harmalové alkaloidy hypotermii.[84]

Dobrou afinitu k benzodiazepinovému receptoru vykazují β-karbolínové deriváty β-CCM (methyl-β-karbolín-3-karboxylát)[98] a DMCM (methyl-6,6-dimethoxy-4-ethyl-β-karbolín-3-karboxylát). Navázání na tento receptor způsobilo konvulzivní účinky.[85] Také norharman je známý svou reaktivitou v hippokampu, neokortexu, hypothalamu, thalamu, nucleu accumbens a amygdalae.[86]

Bylo potvrzeno, že β-karbolínové alkaloidy se váží na imidazolinové receptory I1, I2 (včetně pozitivního efektu)[87] a tato vazba na zmíněné receptory může mít za následek zvýšení sekrece insulinu z Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní. Tato skupina látek se tedy jeví jako potenciální insulinové sekretagogum.[88]

Antioxidační a antimutagenní aktivita

Některé z β-karbolínových alkaloidů (harman, harmalin a harmalol) vykazují antioxidační aktivitu tím, že inhibují peroxidaci lipidů v játrech[90] a zmírňují oxidativní poškození kyseliny hyaluronové, kolagenu v chrupavce nebo imunoglobulinu G. β-karbolíny také chrání neurony proti cytotoxickému efektu

dopaminu a glutamátu. Z výsledků práce Moura et al. vyplynulo, že β-karbolínové alkaloidy mají výrazný antioxidační efekt a jejich schopnost vychytávat volné OH-radikály přispívá k jejich antimutagennímu a antigenotoxickému účinku. Tyto účinky jsou závislé na koncentraci a chemické struktuře-dehydrogenace pyridinového kruhu a záměna hydroxylové skupiny za methoxylovou vede ke snížení antioxidačního účinku. Nejvyšší aktivitu vykazoval harmalol.[89]

Ostatní účinky

Harman lze považovat za potenciální hypotensivum. Bylo totiž zjištěno, že tato látka působí na endoteliální buňky, které produkují oxid dusný (vasorelaxans) a také že inhibuje napětí hladkého svalstva vazbou na napěťově řízené vápníkové kanály.[91] Vasodilatační efekt harminu a harmalinu je způsoben inhibicí fosfodiesterasy a indukcí relaxace přes prostacyklin. Obě látky navíc vychytávají volné radikály, což může také přispívat k jejich vasorelaxační aktivitě.[92] U norharmanu byla prokázána antibakteriální aktivita proti různým druhům cyanobakterií, G+ a G- bakteriím a proti kvasince *Candida albicans*.[89]

Přes všechny pozitivní účinky na léčbu různých onemocnění jsou některé karbolínové alkaloidy toxické substance.[93] Jako neurotoxické β-karbolíny s mutagenními účinky se ukázaly být harman a norharman.[94] Harmin a jeho deriváty dále prokázaly velkou schopnost interkalace do DNA a navíc inhibici topoizomerasy.[95]

### 3.1.5 Biologické účinky flavonoidů

Z biologických účinků flavonoidů je nejvýznamnější výrazná antioxidační aktivita, která se po dlouhodobějším užívání může projevit zvýšenou stabilitou oběhového systému (snížení destrukce cévního systému) a protizánětlivé účinky.[96] Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci peroxidového anion-radikálu (např. xanthinoxidasu, proteinkinasu C). Inhibují i další enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů (cyklooxygenasa, lipoxygenasa, mikrosomální monoxygenasy). Některé

z flavonoidů působí jako inhibitory topoisomerasy a induktory apoptosy. V této souvislosti je studován jejich antikancerogenní účinek. Na druhé straně nelze vyloučit ani roli některých flavonoidů při kancerogenezi. Tato role je diskutována zejména ve vztahu k bezpečnému příjmu flavonoidů.

Flavonoidy jsou nejčastěji se vyskytující polyfenoly ve výživě člověka. Mezi hlavní skupiny flavonoidů ve výživě člověka patří flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, proanthokyanidiny, kyanidiny a izoflavonoidy. Dominantní flavonoid ve výživě člověka je flavonol kvercetin, který se nachází ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách (cibule, jablka, kapusta, červené víno, zelený a černý čaj). Rutin (kvercetin-3-O-rhamnoglukosid-patrně jeden z nějčastějších flavonoidů v rostlinné říši vůbec) je součástí léků používaných jako venofarmaka, jelikož snižuje permeabilitu a fragilitu kapilár.

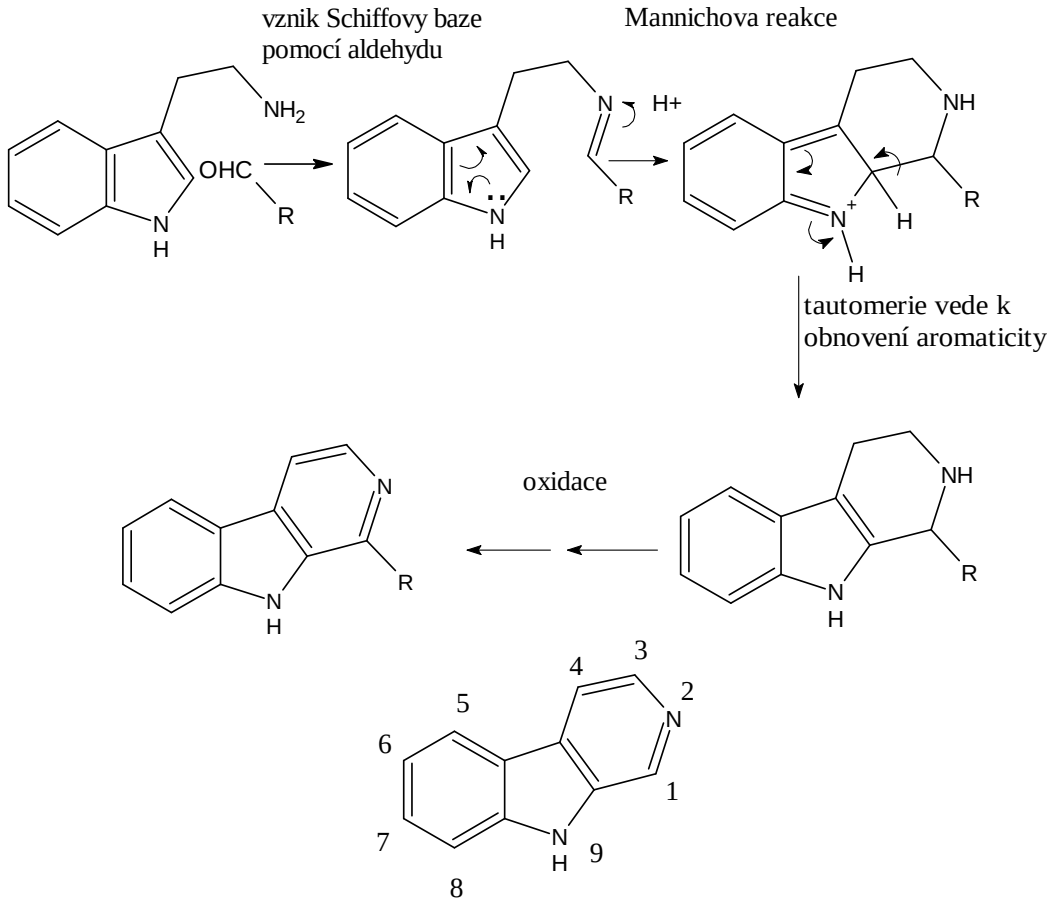
Skupina isoflavonoidů je strukturně podstatně užší než skupina flavonoidů, ale v lidské výživě hrají patrně významnější roli než flavonoidy. Od těchto se liší relativní strukturní drobností (aromatický boční kruh není na pyranový skelet navázán v poloze C-2, ale C-3). Kromě antioxidačního efektu disponují určitými estrogenními účinky (řadí se do skupiny tzv. fytoestrogenů), ale mohou tlumit také aktivitu některých enzymových systémů, které jsou zodpovědné za vývoj kancerogeneze.[96] Je sledována jejich možná role při prevenci vzniku nádorů prsu a osteoporosy.

### 3.1.6 Biosyntéza β-karbolínů

Tyto látky se v rostlinách syntetizují Mannichovou/Pictet-Spenglerovou reakcí. Jedná se o kondenzaci indolylethylaminu (tryptaminu) s aldehydem nebo α-ketokyselinou. Při reakci s aldehydem vznikne Shiffova báze (iminový kation), poté dojde ke ztrátě protonu na uhlíku číslo 2 a kruh se zacyklí. Následnou oxidací vznikají dihydro-β-karbolíny a dále plně nasycené β-karbolíny. Při reakci s kyselinou opět dojde ke kondenzaci (např. v případě syntézy harminu se jedná o kyselinu pyrohroznovou). Dalším krokem je oxidativní dekarboxylace, která dá

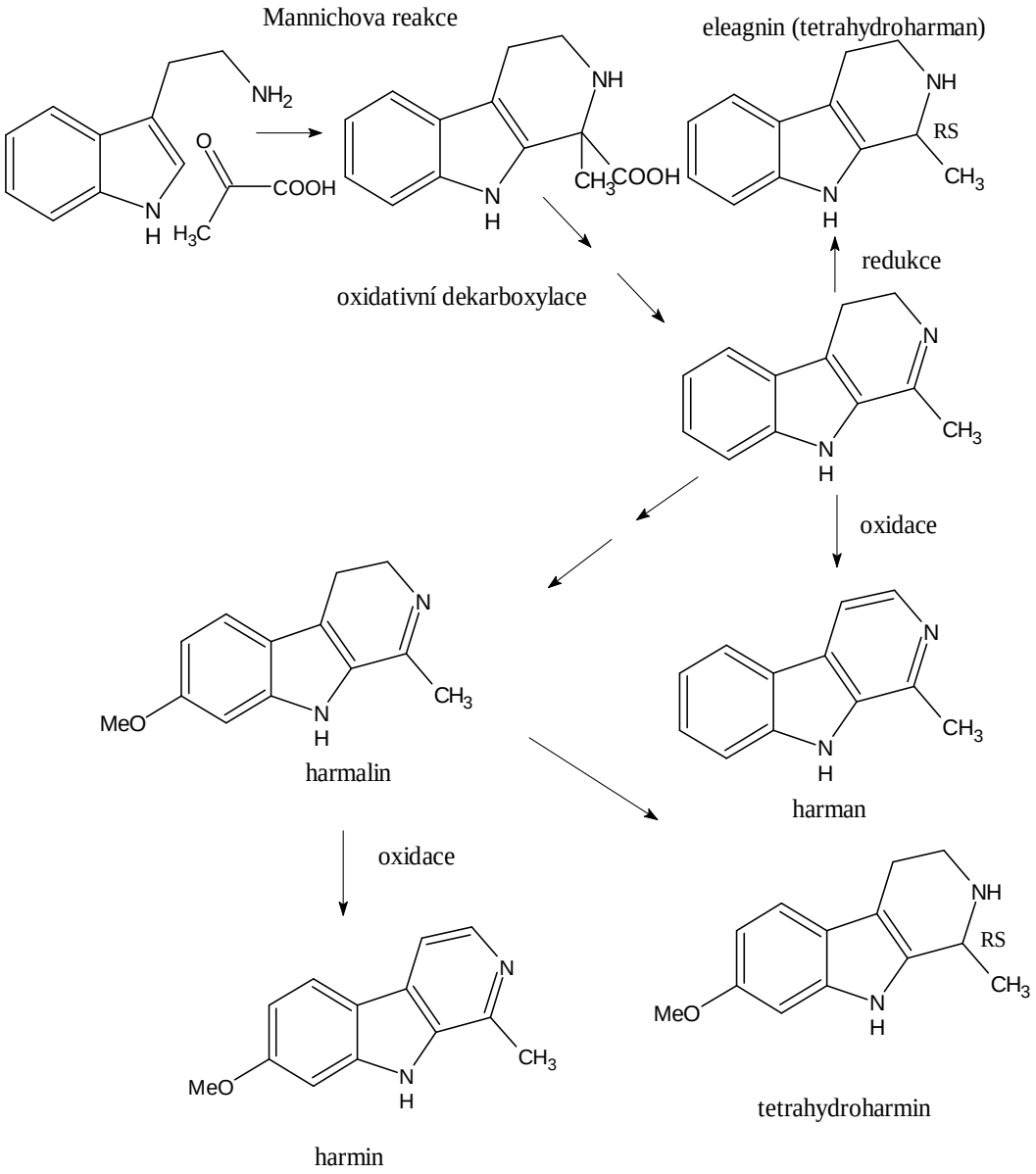
vzniknout dihydro-β-karbolínům. Ty se mohou dále redukovat na tetrahydro-β-karbolíny, nebo se oxidují na plně aromatické β-karbolínové struktury (např. harman). Methoxysubstitucí (pomocí hydroxylace a následné methylace) dihydroderivátů vzniká harmalin, který se může dále oxidovat na harmin, nebo redukovat na tetrahydroharmin[17]. Analogické reakce probíhají také v potravinách (např. v sojové omáčce nebo uzeném mase), kde jsou jako výchozí látky L-tryptofan a formaldehyd nebo acetaldehyd a jako nejčastější produkt vzniká kyselina tetrahydro-3-karbolín-3-karboxylová. Tyto reakce jsou závislé na pH[18]. V lidském těle jsou výchozími látkami biogenní aminy tryptofan, tryptamin a serotonin[19].

Schéma biosyntézy β-karbolínů: α-uhlík vystupuje jako nukleofil




struktura β-karbolínu

Schéma biosyntézy β-karbolínů: Mannichova reakce s pomocí keto-kyseliny

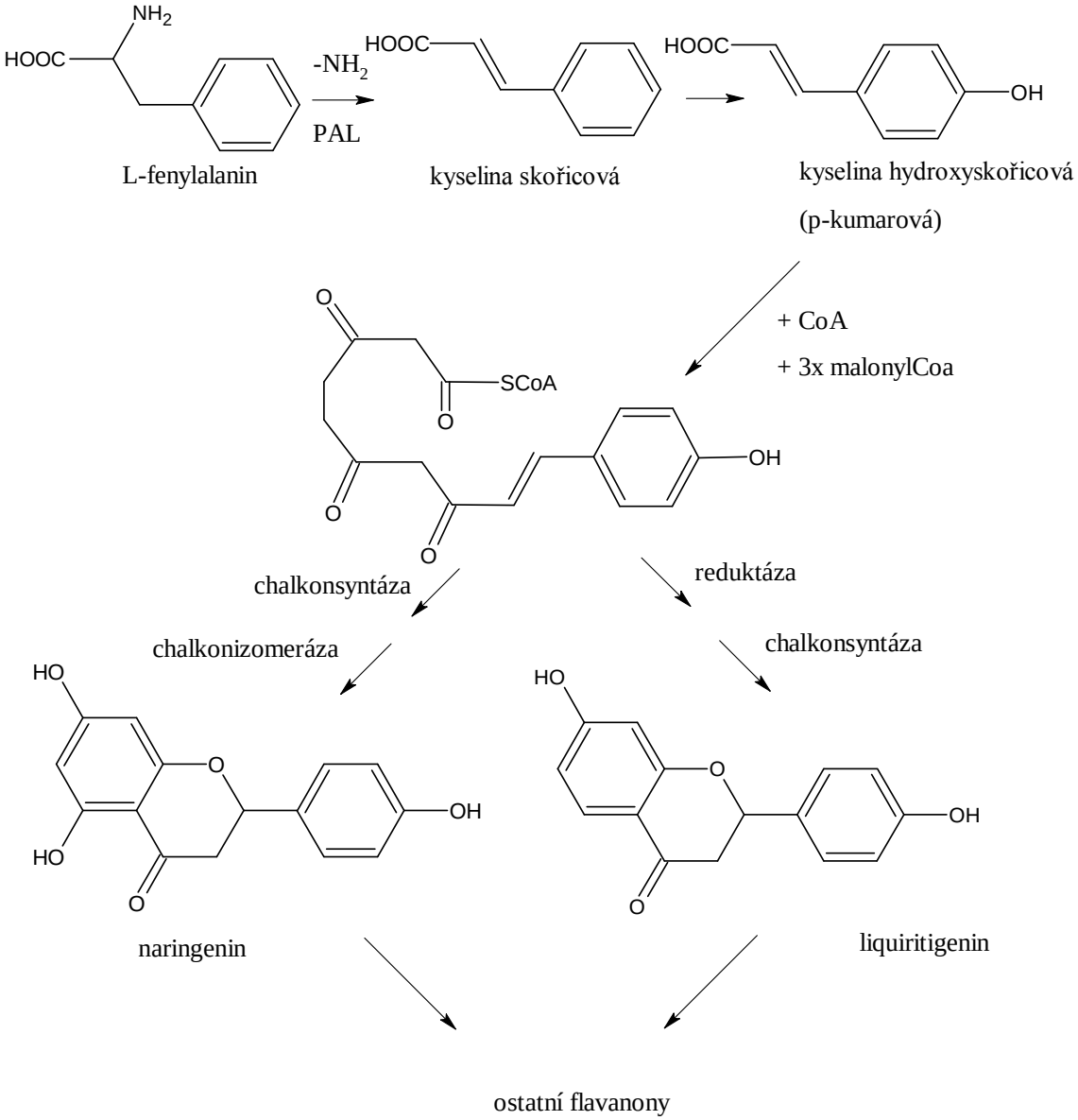



Biosyntéza fontinalinu nebyla zatím popsána. Pravděpodobně vzniká reakcí kyseliny gallové s kyselinou asparagovou. Kyselina gallová vzniká šikimátovou cestou, tedy stejně jako tryptofan, který je výchozí látkou pro syntézu β-karbolínů.

### 3.1.7 Biosyntéza flavonoidů

Biosyntéza flavonoidů vychází z metabolizmu kyseliny šikimové. Šikimátová cesta probíhá jen u mikroorganizmů a rostlin a jejími produkty jsou esenciální aminokyseliny, u živočichů přijímané jenom potravou. Biosyntéza začíná aldolovou kondenzací fosfoenolpyruvátu s D-erytroso-4-fosfátem přes meziprodukt na první cyklickou sloučeninu – kyselinu 3-dehydrochinovou. Ta dehydratací a několika redukčními reakcemi přes mezikrok kyselinu 3-dehydrošikimovou vytvoří kyselinu šikimovou. Od kyseliny šikimové se přímo odvozují kyselina gallová a pyrokatecholová jako základní sloučeniny mnoha přírodních produktů (např. tanniny). Fosforylací kyseliny šikimové vzniká kyselina chorismová a přes kyselinu prefenovou vzniká první esenciální aminokyselina – L-fenylalanin. Produkty paralelních reakcí jsou L-tyrosin, L-tryptofan a kyselina anthranilová, základní stavební kameny mnoha známých sloučenin jako kyselina salicylová, kyselina listová, dopamin a katecholaminy, kumariny a alkaloidy. Deaminací L-fenylalaninu enzymem PAL (phenylalanineammonia lyase) vzniká kyselina skořicová, která je přeměněna na kyselinu p-kumarovou (hydroxyskořicovou) a ta je po přijetí koenzymu A schopna reagovat se třemi molekulami malonyl-CoA vzniklých acetátovou biosyntetickou cestou. Tím vznikne polyketidická sloučenina, která se podle podmínek prostředí přemění enzymem chalkonsyntázou buď na naringenin nebo liquiritigenin, dvě sloučeniny určující strukturu flavonoidů. Z těchto dvou flavanonů vznikají flavony, dihydroflavonoly a z nich dále flavandiol, katechiny, anthokyanidiny, leukoanthokyanidiny a ostatní deriváty[3,68].

Schéma biosyntézy flavonoidů od L-fenylalaninu:



# 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1 Použité chemikálie a přístroje

### 4.1.1 Chemikálie

- methanol pro HPLC: Fluka, Buchs, acetonitril: Merck, Darmstadt, kyselina fosforečná: Lachema, Brno, standardy alkaloidů: harman, harmalol, harmin, harmalin, standardy flavonoidů: rutin, quercitrin, apigenin, vitexin, vitexin-rhamnosid, quercetin, myricetin, myricitrin Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, hyperosid Merck, Darmstadt, kyselina kávová, kyselina chlorogenová Fluka, Buchs;
- ether p.a., kyselina chlorovodíková p.a.: Penta a.s., Chrudim, Mayerovo činidlo (chlorid rtuťnatý p.a. a jodid draselný p.a.: Lachema, Brno), p-dimethylaminobenzaldehyd p. a., dihydrogenfosforečnan draselný p.a., hydrogenfosforečnan draselný p.a.;
- methanol p.a., petrolether p.a., chloroform p.a., hydroxid draselný p.a., aceton p.a., kyselina octová p.a., amoniak p.a.: Penta a.s., Chrudim, kyselina chlorovodíková p.a., kyselina vinná p.a.: Lachema, Brno;

### 4.1.2 Přístroje a chromatografické doplňky

- analytické váhy A 200S: Sartorius, Göttingen;
- vodní lázeň KL: Laboratorní přístroje, Praha;
- vakuová rotační odparka LABOROTA 4002, Heidolph, Schwabach;
- HPLC chromatograf JASCO (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055, detektor FP-2020): Jasco International, Tokyo;
- chromatografická kolona LiChrospher RP-18 250x4 (5µm) s předkolonkou: Merck, Darmstadt;
- Multimeter multi 340: WTW, Weilheim Germany;
- sušárna MEMMERT model 500;

- mlýnek Bosch KM13, Ljubljana, Slovinsko;
- mikrofiltr TESSEK, Praha;
- třepačka LT2, KAVALIER, Sázava.

## 4.2 Sběr a zpracování rostlinného materiálu

### 4.2.1 Výběr lokalit sběru na území ČR

Rostlinné vzorky byly nasbírány v předem vytipovaných lokalitách. Ke zjištění výskytu *Fontinalis antipyretica* na území ČR byly použity webové stránky Českého hydrometeorologického ústavu[76]. Zde byly vybrány lokality: řeka Labe - Horní Debrné a řeka Metuje – Rychnovek (z důvodu výskytu a přístupu k řece bylo zvoleno místo sběru o 2 km proti proudu). Zkoumána byla i řeka Orlice, ovšem výsledek výskytu *Fontinalis antipyretica* byl negativní. Lokality Ledce a Kunvald byly zvoleny na základě ústních sdělení a vlastního průzkumu.

### 4.2.2 Měření fyzikálních podmínek v daných lokalitách

Multimetr s příslušnou sondou byl zkalibrován na kalibrační roztoky. Sonda byla vložena do tekoucí vody na dané lokalitě a příslušná veličina změřena. Zjišťovanými fyzikálními veličinami byly: pH vody, teplota vody, vodivost a relativní množství rozpuštěného kyslíku ve vodě.

Konkrétní lokality sběru a jejich popis pomocí GPS souřadnic:

- řeka Dědina – Ledce: 50o13´ 48´´ s.š., 16o2´44´´ v.d.
- řeka Rokytenka – Kunvald: 50o6´40´´ s.š., 16o29´19´´ v.d.
- řeka Labe – Horní Debrné: 50o29´44´´ s.š., 15o44´7´´ v.d.
- řeka Metuje – Rychnovek: 50o20´51´´ s.š., 15o58´33´´ v.d.

### 4.2.3 Vlastní sběr materiálu

Sběr rostlinného materiálu probíhal ve všech lokalitách stejným způsobem. Rostlinky byly sbírány přímo ze dna řeky celé včetně kořenové části, následně byly opláchnuty vodou, zbaveny hrubých nečistot a lehce prosušeny pomocí filtračního papíru. Další zpracování materiálu probíhalo na katedře farmakognozie. Sušení celých rostlinek probíhalo na filtračním papíře při teplotě 50oC po dobu 24 hod. Usušený materiál byl rozdrobněn v mlýnku.

### 4.2.4 Ztráta sušením

Byla provedena ztráta sušením podle lékopisu ČL 2002[42]. Váženka s víčkem byla sušena v sušárně do konstantní hmotnosti při 100 oC, poté byla přemístěna do exsikátoru, kde vychladla a následně byla i s víčkem zvážena. Do váženky byl navážen 1,000 g rozdrobněného rostlinného materiálu a váženka s víčkem a materiálem byla vložena do sušárny. Sušení probíhalo ve třech váženkách při 100 oC do konstantní hmotnosti.

### 4.2.5 Zkoušky totožnosti provedené dle článku *Secale cornutum* ČsL 2 (důkaz přítomnosti alkaloidů)

Metoda byla převzata z ČsL2[69] a obměněna z důvodu předpokládané nízké koncentrace alkaloidů ve *Fontinalis antipyretica.*

Usušená a rozdrobněná droga v množství 0,5 g byla protřepávána ve zkumavce 5 min se 4 ml etheru a šesti kapkami amoniaku. Obsah zkumavky byl rychle zfiltrován přes malý kousek vaty a filtrát se dále protřepával 2 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové. Po ustálení a rozdělení vrstev byla spodní vrstva odebrána pipetou a rozdělena do dvou zkumavek.

a) K 1 ml získaného roztoku bylo přidáno 5 kapek Mayerova činidla, v přítomnosti alkaloidů vzniká sraženina.
b) K 1 ml získaného roztoku byly přidány 2 ml p-dimethylaminobenzaldehydu. V přítomnosti alkaloidů se na styku tekutin objeví modrý prstenec, po protřepání se celý roztok zbarví do modra.

### 4.2.6 Stanovení celkového popela dle ČL 2002

Keramický kelímek byl žíhán 30 min do červeného žáru, poté se nechal vychladnout v exsikátoru a zvážil se. Do kelímku byl navážen 1,000 g práškované rostlinné drogy, kelímek se sušil 1 hod při 100 °C až 105 °C a poté se žíhalo do konstantní hmotnosti v muflové peci při 600 ± 25 °C. Po každém žíhání se nechalo vychladnout v exsikátoru. Během zkoušky se nemá objevit plamen. Pokud ještě po opakovaném žíhání obsahuje popel černé částice, přidá se horká voda, přefiltruje se přes bezpopelný filtrační papír a papír se zbytkem se spálí a vyžíhá. K popelu se přidá filtrát, opatrně se odpaří do sucha a vyžíhá se do konstantní hmotnosti.

## 4.3 Stanovení indolových alkaloidů dle ČsL 2

Metoda byla převzata z ČsL 2 z článku *Secale cornutum*[69] a obměněna z důvodu předpokládané nízké koncentrace alkaloidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica*. Změny se týkaly navážky drogy a množství acetonu

použitého k extrakci. Změna byla též provedena v poslední fázi metody, kdy bylo vynecháno ředění.

Usušená a rozdrobněná droga v množství 5,000 g byla společně s 25 ml acetonu a 0,5 ml amoniaku vložena do Erlenmayerovy baňky. Baňka byla opatřena vatovou zátkou a hrdlo baňky bylo překryto a utěsněno alobalem. Takto uzavřená baňka byla třepána 25 min na třepačce. Obsah baňky byl poté zfiltrován přes filtrační papír a filtrát byl odpařen na zhruba 10 ml, což představovalo přibližně polovinu původního roztoku. Odpařování probíhalo za normální teploty v digestoři. Získaný roztok byl umístěn do dělící nálevky a extrahován trojnásobným množstvím etheru. Další extrahování probíhalo třikrát 10 ml 2% roztoku kyseliny vinné. Kyselé výtřepky, které představovaly vodnou fázi, byly umístěny do odměrné baňky na 50 ml, baňka byla zahřívána na vodní lázni po dobu přibližně 10 min, čímž byly odstraněny případné zbytky etheru. Po vychladnutí byl objem baňky doplněn 2% roztokem kyseliny vinné po značku a důkladně promísen. K 1 ml tohoto roztoku byly přidány 2 ml p-dimethylaminobenzaldehydu a po 30 min byla změřena absorbance tohoto roztoku při 590 nm proti vodě.

## 4.4 Stanovení alkaloidů pomocí HPLC

### 4.4.1 Přípravy extraktu

**Postup 1:**

Usušená a rozdrobněná droga v množství 3,000 g byla společně s 50 ml methanolu udržována ve varu pod zpětným chladičem po dobu 30 min. Extrakce proběhla celkem třikrát, po ukončení první a druhé extrakce byl roztok zfiltrován pomocí malého kousku vaty. Tento kousek vaty i s extrahovanou drogou byly vloženy zpět do baňky společně s 50 ml methanolu a proces se opakoval. Po ukončení třetí extrakce byl roztok zfiltrován skládaným filtrem. Získaný filtrát byl

vysušen do sucha na rotační odparce a zbytek byl rozpuštěn v 50 ml 2% kyseliny chlorovodíkové a zfiltrován. Filtrát byl dále dvakrát extrahován v děličce 20 ml petroletheru (pro odstranění chlorofylu). U získaných výtřepků bylo upraveno pH na hodnotu 10 přidáním 7,5 ml hydroxidu draselného (hydroxid draselný byl přidáván postupně po 0,5 ml do požadované hodnoty pH). Takto upravený roztok byl extrahován třikrát 30 ml chloroformu, získané výtřepky byly spojeny a odpařeny na rotační odparce. Zbytek po odpaření byl rozpuštěn v 10 ml methanolu (upravený na pH 7-8) a přefiltrován přes mikrofiltr.

**Postup 2:**

Usušená a rozdrobněná droga v množství 3,000 g byla společně s 20 ml směsi methanol-voda (140 ml methanolu a 60 ml vody) udržována ve varu pod zpětným chladičem po dobu 15 min. Extrakce byla provedena celkem třikrát s 20 ml směsi methanol-voda dle postupu 1. Po ukončení třetí extrakce byl roztok zfiltrován skládaným filtrem a získaný filtrát byl odpařen na rotační odparce. Zbytek po odpaření byl rozpuštěn v 5 ml směsi methanol-voda (viz. výše) a přidáním 2 ml kyseliny octové bylo upraveno pH extraktu na hodnotu 3-4. Takto upravený extrakt byl dvakrát třepán petroetherem (pro odstranění chlorofylu)v množství přibližně stejném s extraktem, přefiltrován přes mikrofiltr a doplněn směsí methanol-voda (viz výše) na objem 8 ml.

**Postup 3: dlouhodobá macerace za studena**

8,000 g usušené a rozdrobněné drogy bylo smícháno s 50 ml acetonu a takto získaná směs se nechala macerovat za pokojové teploty po dobu 60 hod (3 dny). Získaný extrakt byl zfiltrován přes vatu a droga s vatou byla ještě několikrát promyta acetonem, dokud nebyl vytékající filtrát čirý. Acetonový extrakt se vakuové odparce zahustil na zhruba 50 ml. Získaný extrakt byl přelit do dělící nálevky, k extraktu bylo přidáno 50 ml etheru a tento roztok byl třikrát třepán 15 ml 2% roztoku kyseliny octové. Kyselinové výtřepky byly spojeny a odpařeny na

vodní lázni do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve 4 ml destilované vody a přefiltrován mikrofilmem.

### 4.4.2 HPLC analýza

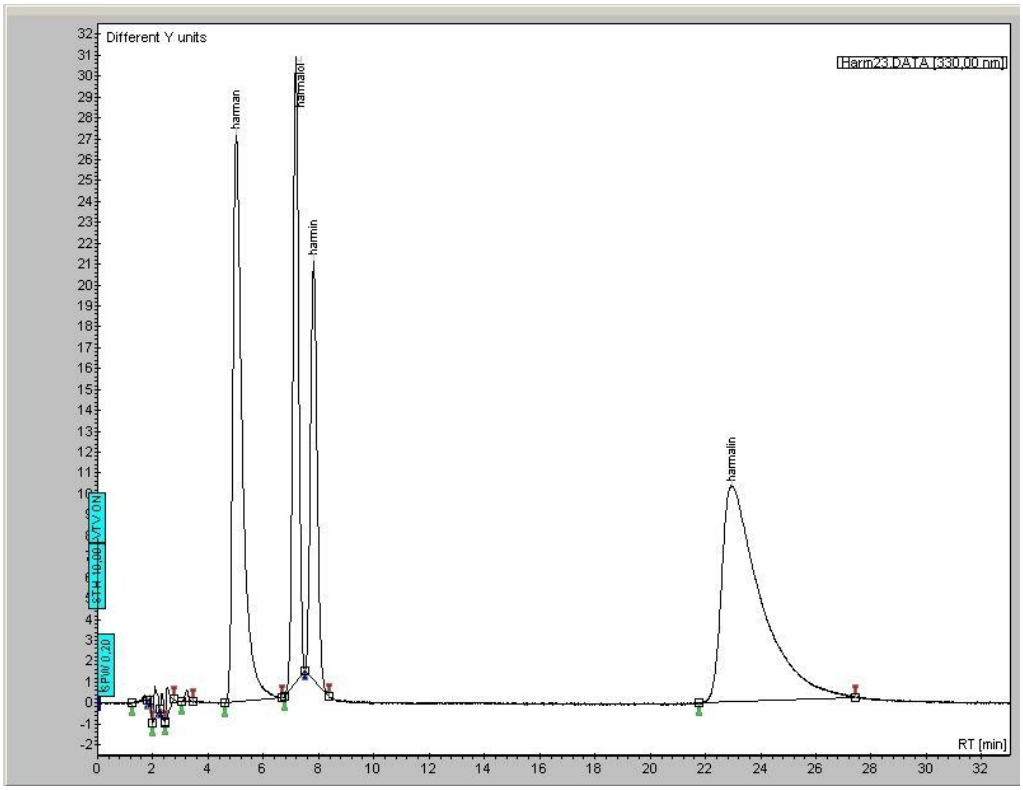
HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, fluorescenční detektor FP-2020, autosampler AS-2055, kolonový termostat Jetstream II plus). Sestava byla vybavena předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5μm) s ochrannou předkolonkou.

Metoda byla isokratická. Mobilní fáze se skládala ze 70% z methanolu a ze 30 % z fosfátového pufru pH 7,8 (fosfátový pufr o síle 50 mM, připravený z 0,3312 % (hm./obj.) $NaH_2PO_4$ a 0,8509 % hm./obj. $Na_2HPO_4$ . 12 H2O).

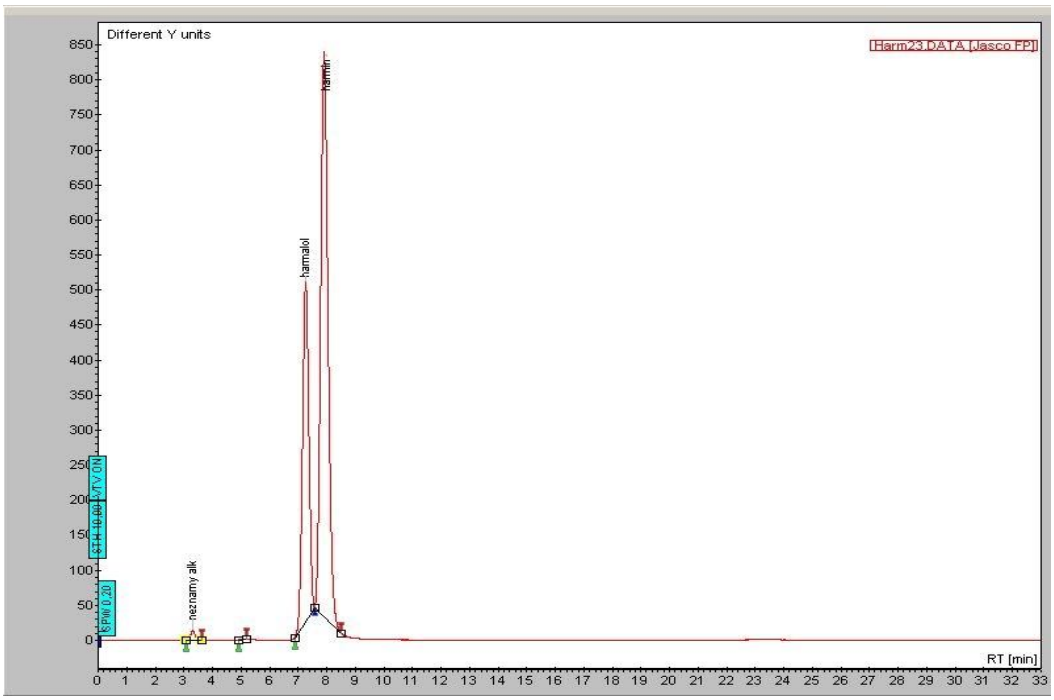
Délka analýzy byla 33 min. Průtok mobilní fáze v průběhu analýzy rostl z 1,1 ml/min v čase 0 do 1,5125 ml/min v čase 33 min. Nastřikovaný objem vzorku byl 100 μl.

Vzhledem k vyšší citlivosti fluorescenčního detektoru byly alkaloidy harmalol a harmin analyzovány a jejich obsah hodnocen podle tohoto přístroje. Použita byla extinkční vlnová délka 300 nm a emisní vlnová délka 435 nm.

Ukázka chromatogramu – standardy, detektor DAD




Ukázka chromatogramu – standardy, fluorescenční detektor



## 4.5 Stanovení flavonoidů pomocí HPLC

### 4.5.1 Příprava extraktu

Usušená a rozdrobněná droga v množství 1,000 g byla společně s 10 ml methanolu udržována ve varu po dobu 25 min. Extrakce proběhla celkem třikrát, po ukončení první a druhé extrakce byl roztok zfiltrován pomocí malého kousku vaty. Tento kousek vaty i s extrahovanou drogou byly vloženy zpět do baňky společně s 10 ml methanolu a proces se opakoval. Získané extrakty byly spojeny a objem byl upraven methanolem do 20 ml. V dalším kroku byl z extraktu odstraněn chlorofyl pomocí třepání s petroletherem, které proběhlo celkem třikrát s 30 ml petroletheru. Následně byl roztok zfiltrován přes mikrofilm (0,45 μm).

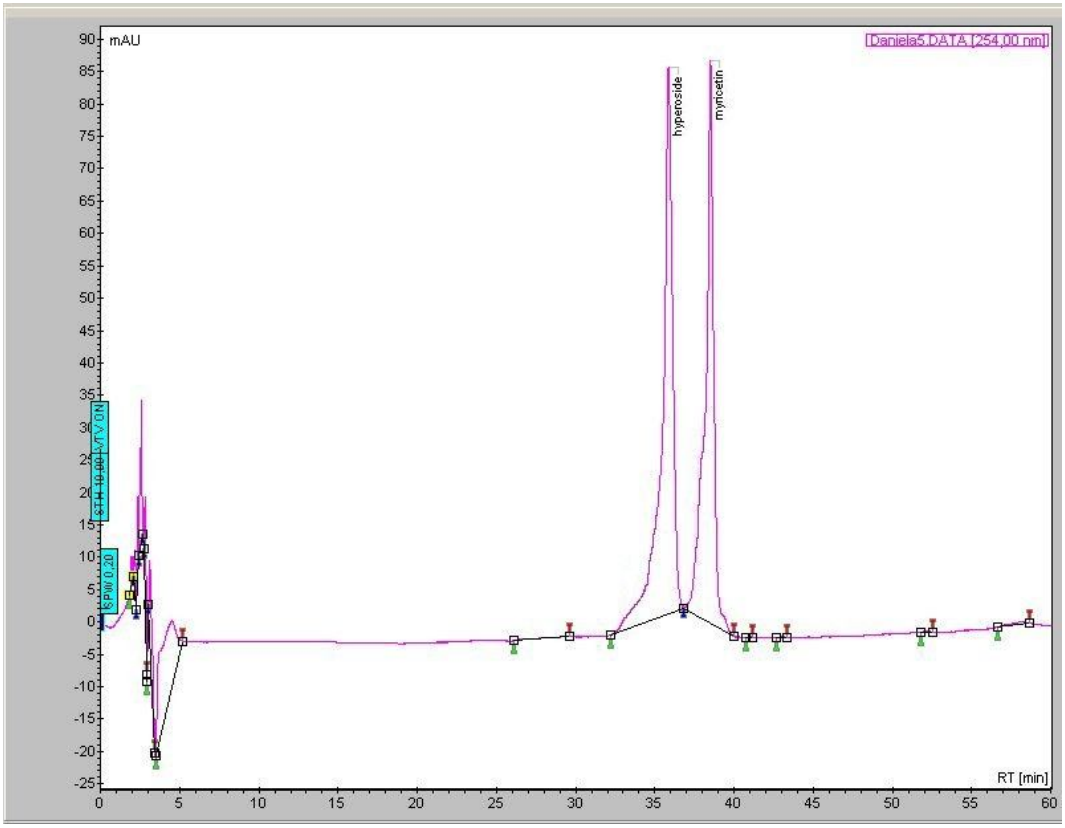
### 4.5.2 HPLC flavonoidů

HPLC analýza byla prováděna na chromatografické sestavě Jasco, vybavené předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5μm) s ochranou předkolonkou. Nastřikovaný objem byl 20 μl a použita byla gradientová metoda (viz tabulka). Voda i acetonitril obsahovaly 0,15% kyseliny fosforečné.

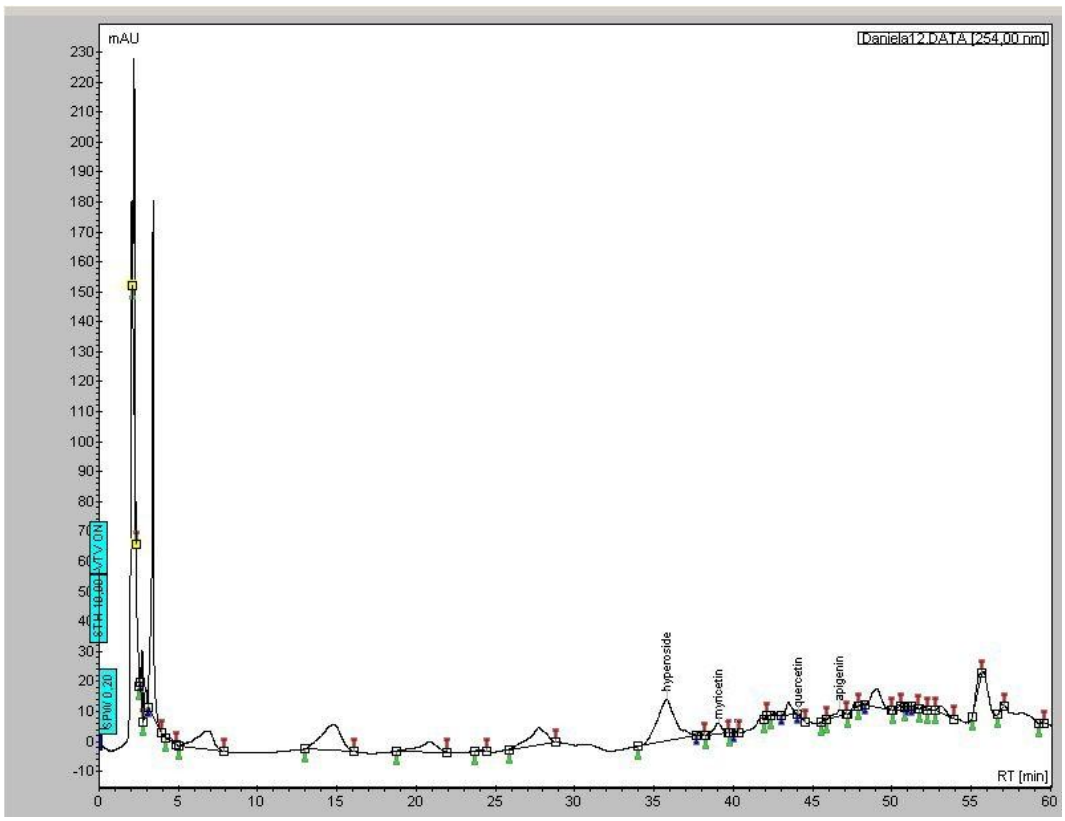
| Čas [min] | Acetonitril [%] | Voda [%] |
|---|---|---|
| 0 | 8 | 92 |
| 30 | 18 | 82 |
| 55 | 60 | 40 |

Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a detekce probíhala na DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200-600 nm.

Ukázka chromatogramu – flavonoidy standardy




Ukázka chromatogramu – flavonoidy vzorek



### 4.5.3 Validace HPLC analýzy

Validace znamená ověření platnosti zvoleného analytického postupu (metody).

Instrumentální validace je zajištěna výrobcem HPLC sestavy (Jasco) a to normou ISO 9001 (International Organization for Standardization).

Způsobilost chromatografických systémů byla navíc ověřena testem opakovaného nástřiku – tzv. test na přesnost (provedeno vždy šest nástřiků týmž vzorkem, vypočtená relativní směrodatná odchylka byla vždy menší než 1,5%) a testem linearity (na základě pěti různých koncentrací standardu se lineární regresní analýzou zjistí hodnota korelačního koeficientu r, která musí být větší než 0,9900). Pro hodnocení analytického měření byly dále převzaty metody z Evropského lékopisu, 3. vydání : Asymetrie píku a Počet teoretických pater.[71]

Pro hodnocení celé metody byly použity tyto validační parametry:

- správnost metody – jedná se o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotu (tedy porovnáním ověřovaných hodnot se standardem, porovnáním s jinou již osvědčenou metodou, nebo srovnáním s referenčním materiálem)[72,73]
- kvantitativní limit – jde o nejmenší hodnotu, která je měřitelná s přijatelnou přesností a správností (relativní směrodatná odchylka menší než 15%[72,73]

## 4.6 Statistické zpracování dat

Statistická významnost naměřených výsledků byla vypočítána pomocí t-testu rozdílu dvou průměrů podle následujících matematických vztahů:

**Aritmetický průměr:** $\bar{x} = \frac{\sum}{}$

**Směrodatná odchylka:** $= \sqrt{\frac{\sum \quad (\quad)}{}}$

$x_i$ = naměřené hodnoty,

x = aritmetický průměr,

$a$ = rozsah souboru

Pro výpočet testovacího kritéria platí následující vztah:

**Testovací kritérium:** $= \frac{|\quad|}{\cdot \quad \cdot} \cdot \sqrt{\frac{\quad (\quad)}{}}$

$x_1$ = aritmetický průměr kontrolního souboru,

$x_2$ = aritmetický průměr pokusného souboru,

$s_1$ = směrodatná odchylka kontrolního souboru,

$s_2$ = směrodatná odchylka pokusného souboru,

$a_1$ = počet členů kontrolního souboru,

$a_2$ = počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t-rozdělení se stupněm volnosti vypočteným podle vzorce: $= \quad + \quad - 2$

Vypočtená hodnota testovacího kritéria se porovná s příslušnou tabulkovou kritickou hodnotou $t(v)_p$ pro vypočtený stupeň volnosti v a zvolenou hladinou významnosti p ($p = 0,05$). Je-li hodnota t větší než hodnota $t(v)_p$, je rozdíl statisticky významný na hladině významnosti p.[70]

# 5. VÝSLEDKY

## *5.1* Sběr vzorků *Fontinalis antipyretica*

Vzorky vodního mechu *Fontinalis antipyretica* byly získány v srpnu 2009 a zároveň byly zaznamenány níže uvedené podmínky sběru.

| Lokalita (řeka-místo sběru) | Teplota vody[°C] | Vodivost [µS] | pH vody | Relativní obsah rozpuštěného kyslíku [%] |
|---|---|---|---|---|
| **Labe-Horní Debrné** | 16 | 278 | 7,91 | 82 |
| **Metuje-Rychnovek** | 14 | 122 | 7,69 | 85 |
| **Dědina-Ledce** | 17 | 305 | 7,58 | 77 |
| **Rokytenka-Kunvald** | 14 | 108 | 7,88 | 81 |

## *5.2* Zkoušky totožnosti dle článku *Secale cornutum* ČsL 2

Výsledky provedených zkoušek totožnosti byly negativní pravděpodobně v důsledku velmi nízké koncentrace alkaloidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica.*

## 5.3 Výsledek chemické analýzy dle ČsL 2

Provedená chemická analýza neprokázala přítomnost alkaloidů. Negativní výsledek byl pravděpodobně způsoben nízkou citlivostí metody a velmi nízkým množstvím alkaloidů, které jsou ve *Fontinalis antipyretica* přítomny. Přítomnost

alkaloidů nebyla prokázána ani po úpravě metody, která zahrnovala zvýšení množství drogy a zkoncentrování extraktu.

## 5.4 Výsledky stanovení alkaloidů a flavonoidů pomocí HPLC

Zjištěné hodnoty množství alkaloidů a flavonoidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica* pro jednotlivé lokality jsou shrnuty v tabulkách.

Tabulka č. 1: Výsledky pro rok 2008

| Lokalita (řeka-místo sběru) | Harmalol [%] | Harmin [%] | Celkové množství alkaloidů [%] | Směrodatná odchylka |
|---|---|---|---|---|
| **Metuje-Rychnovek** | 0,0002 | 0,0054 | 0,0056 | 0,0007 |
| **Labe-Horní Debrné** | 0,0000 (pod kvantitativním limitem) | 0,0000 (pod kvantitativním limitem) | 0,0000 (pod kvantitativním limitem) | 0 |

Tabulka č. 2: Zjištěné množství alkaloidů pro rok 2009

| Lokalita (řeka-místo sběru) | Harmalol [%] | Harmin [%] | Celkové množství alkaloidů [%] | Směrodatná odchylka |
|---|---|---|---|---|
| **Metuje-Rychnovek** | 0,0014 | 0,0059 | 0,0073 | 0,0011 |
| **Labe-Horní Debrné** | 0,0000 (pod kvantitativním limitem) | 0,0008 | 0,0008 | 0,0003 |
| **Dědina-Ledce** | 0,0000 (pod kvantitativním limitem) | 0,0007 | 0,0007 | 0,0003 |

Tabulka č. 3: Zjištěné množství flavonoidů pro rok 2009

| Lokalita (řeka-místo sběru) | Myricetin [%] | Hyperosid [%] | Celkové množství flavonoidů [%] | Standardní odchylka |
|---|---|---|---|---|
| **Metuje-Rychnovek** | 0,0005 | 0,0067 | 0,0072 | 0,005 |
| **Labe-Horní Debrné** | 0,0000 (pod kvantitativním limitem | 0,0028 | 0,0028 | 0,001 |
| **Dědina-Ledce** | 0,0000 (pod kvantitativním limitem | 0,0150 | 0,0150 | 0,001 |

# 6. DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývala zjištěním přítomnosti alkaloidů a flavonoidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica* a stanovením jejich obsahu na různých lokalitách v ČR. Zároveň byly měřeny i fyzikální faktory řek, ve kterých byla *Fontinalis antipyretica* sbírána.

Podle práce Salma et al jsou v příbuzném druhu *Fontinalis squamosa* přítomny alkaloidy odvozené od tryptofanu, konkrétně harmol, fontinalin a ester kyseliny harmolpropionové.[7] Z tohoto důvodu byly součástí této práce i zkoušky totožnosti a stanovení těchto alkaloidů.

Obecné zkoušky totožnosti na indolové alkaloidy byly provedeny pro orientační zjištění přítomnosti tohoto druhu alkaloidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica*. Konkrétně byly použity zkoušky s Mayerovým činidlem a para-dimethylaminobenzaldehydem. Výsledky metody převzaté z ČsL 2 byly negativní pravděpodobně z důvodu velmi nízké koncentrace tohoto typu alkaloidů. Rovněž metodu stanovení tohoto typu alkaloidů dle ČsL 2 nebylo možné použít pro standardní měření obsahu alkaloidů z důvodu nízké citlivosti metody a velmi nízkého obsahu alkaloidů.

Při stanovení alkaloidů pomocí HPLC byly pro detekci alkaloidů použity dva detektory: UV-VIS detektor a detektor fluorescenční. UV-VIS detektor nebyl pro detekci výše zmíněných alkaloidů nejvhodnější z důvodu jejich nízké koncentrace. Při HPLC stanovení pomocí fluorescenčního detektoru byly detekovány dva alkaloidy, a to harmalol a harmin. Kromě těchto dvou alkaloidů byly na chromatogramech patrné další píky neznámých alkaloidů s fluorescenčními vlastnostmi.

V případě stanovení alkaloidů pomocí HPLC byly testovány 3 extrakční metody se stejným rostlinným materiálem (řeka Labe-lokalita Horní Debrné),

přičemž nejvhodnější se ukázala být metoda č. 3: dlouhodobá macerace za studena. Tato metoda byla následně použita pro všechny analyzované vzorky.

Nejvyšší množství alkaloidů bylo dle zjištěných hodnot obsaženo v rostlinném materiálu získaném na lokalitě Rychnovek (řeka Metuje). V rámci zjištěných podmínek sběru nebyla v řece Metuje pozorována výrazně odlišná specifika. Zjištěné hodnoty pH se ve všech výše jmenovaných lokalitách pohybovaly v rozmezí od 7,58 do 7,91 (pH zjištěné v lokalitě Rychnovek bylo 7,69). Tyto hodnoty lze považovat za poměrně běžné, odpovídají hodnotám pH běžně uváděných i pro ostatních řeky. Jediná hodnota, kterou bychom u řeky Metuje mohli považovat za výrazněji odlišnou od ostatních sledovaných řek, je množství kyslíku rozpuštěného ve vodě. Jeho hodnota dosáhla v řece Metuje 85% (nejvyšší množství rozpuštěného kyslíku ve vodě ve sledovaných lokalitách). Tato hodnota je ovšem velmi závislá na přesném místě sběru (charakteristická pro konkrétní místo sběru, ne pro konkrétní řeku). Relativní množství kyslíku rozpuštěného ve vodě také zřejmě není směrodatné pro růst *Fontinalis antipyretica*, ale může být směrodatné pro produkci sekundárních metabolitů.

Zároveň s analýzou přítomných alkaloidů byla též provedena analýza obsahu flavonoidů. Z testovaných flavonoidů (standardy flavonoidů: rutin, hyperosid, quercitrin, apigenin, vitexin, vitexin-rhamnosid, quercetin, myricetin, myricitrin, kyselina kávová, kyselina chlorogenová) byl v některých vzorcích objeven myricetin a hyperosid. Celkový nejvyšší obsah flavonoidů byl zjištěn ve vzorcích *Fontinalis antipyretica* získaných v lokalitě Ledce (řeka Dědina), hodnota obsahu flavonoidů byla stanovena na 0,0150 %. V této lokalitě byla zároveň zjištěna nejvyšší teplota vody (17°C), nejvyšší vodivost (305 μS), nejkyselejší pH (7,58) a nejnižší obsah relativního kyslíku rozpuštěného ve vodě (77%). Nemůžeme s jistotou tvrdit, že obsah flavonoidů souvisí s fyzikálními faktory, které jsme naměřili. Teplota je totiž závislá na době sběru (nejen na ročním období, ale i na denní době sběru). Co se týče vodivosti, tak průměrné hodnoty pro české řeky se

uvádí v rozmezí od 50 µS do 500 µS. Námi získané hodnoty do tohoto rozmezí zapadají, takže se nijak výrazně neliší od průměru, který je běžně udáván.

Z uvedených hodnot tedy vyplývá, že obsah sekundárních metabolitů (alkaloidů a flavonoidů) byl nejvyšší v řekách Metuje a Dědina, zatímco v řece Labe byl obsah sledovaných skupin velmi nízký.

V dalších vědeckých pracích, které by na tuto mohly navazovat, by se dalo doporučit ověřit vliv zejména pH na obsah flavonoidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica*. Zároveň by bylo dobré zjistit obsah sekundárních metabolitů v různých vegetačních stádiích rostliny. Touto tematikou se v současné době zabývá disertační práce Zuzany Krškové.

# 7. ZÁVĚR

V průběhu této diplomové práce byl potvrzen výskyt vodního mechu *Fontinalis antipyretica* na území ČR, konkrétní vybrané lokality výskytu a sběru vzorků *F. antipyretica* byly následující: Rychnovek, Horní Debrné a Ledce. Zároveň byly změřeny a vzájemně porovnány podmínky sběru, ovšem žádná z měřených fyzikálních veličin (teplota, vodivost, pH a relativní obsah rozpuštěného kyslíku) se výrazně nelišila od průměrných hodnot běžně se vyskytujících na území ČR. Dále byla také zvládnuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), pomocí které byl stanoven obsah alkaloidů a také flavonoidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica.*

Nejvyšší obsah alkaloidů byl zjištěn na lokalitě Rychnovek (řeka Metuje) a zároveň byly detekovány alkaloidy harmalol a harmin. Při přípravě extraktů pro stanovení alkaloidů pomocí HPLC byly použity tři extrakční metody, přičemž nejvhodnější se ukázala být metoda č. 3: dlouhodobá macerace za studena.

Lokalitu Ledce (řeka Dědina) lze podle zjištěných výsledků označit za místo s nejvyšším obsahem flavonoidů, konkrétně byly v některých vzorcích detekovány flavonoidy myricetin a hyperosid.

# 8. LITERATURA


1. Schönfelder P., Schönfelder I.: Léčivé rostliny; poznávání, sběr, použití, Svoboda, Praha, 2001, s. 5
2. Hermann F.: 100 českých léčivých rostlin, Plot, Praha, 2007, s. 8
3. Hubík J., Dušek J., Spilková J.: Farmakognosie I., SPN, Praha, 1989, s.13, 33-34
4. Macholán L.: Sekundární metabolity, MU, Brno, 2003, s. 39
5. Babula P.: Mechorosty, výtrusné cévnaté rostliny, nahosemenné rostliny, Brno, 2008, s. 10, 16
6. Kremer B. P., Muhle H.: Lišejníky, mechorosty, kapraďorosty, Ikar, Praha, 1998, s. 76, 190, 191
7. Salm R. F., Zinsmeister H. D., Eicher T.: Phytochemistry, 1998, 49, 887-892
8. Allen J. R. F., Holmested B. R.: Phytochemistry, 1980, 19, 1573-1582
9. Adachi J. et al.: J. Chromatogr., 1991, 538, 331-339
10. Gross G.A. et al.: Carcinogenesis, 1993, 14, 2313-2318
11. Callaway J. C. et al.:J. Anal. Toxickol., 1996, 20, 492-497
12. Totsuka Y. H. et al.:Cancor Lett., 1999, 143, 139-143
13. Zheng W. et al.:Anal. Biochem., 2000, 279, 125-129
14. May T. et al.: Arch. Pharmacol., 1994, 349, 308
15. Freedland C. S., Mansbach R. S: Drug Alkohol Depend., 1999, 54, 183-194
16. Boeira j. M. et al.: Mutat. Res., 2002, 500, 39-48
17. Dewick P. M.: Medicinal Natural Products: A Biosyntetic Approach, J. Wiley and Sons Ltd., Chichester 1997, s. 323-324
18. Herraiz T.: J. Chromatogr. A, 2000, 881, 483-499
19. Schott Y. et al.: Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2006, 16, 5840-5843
20. Moura D. J. et al.: Mutagenesis, 2007, 22, 293-302

21. Kim H. et al.: 46rchive sof Biochemistry and Biophysics, 1997, 337, 137-142
22. Gordon R. K. et al.: Chem.-Biol. Interact. 157-158 (2005); 239-246
23. Zhao Q., Tang C. T.: Eur. J. Pharm., 2002, 455, 101-107
24. www.botanika.bf.jcu.cz/bryoweb/univ/files/BC_Eva_Hola.pdf 1.11.2007
25. www.muzeum-sumperk.cz/download/CasSlezMuz_E_Krkonose.pdf 1.11.2007
26. Rabsteinek o., Poruba M., Skuhrovec J.: Lišejníky, mechorosty a kapraďorosty, Praha, Státní zemědělské nakladatelství, 1987, s.172
27. Váňa J.: Obecná bryologie, Karolinum, Praha, 2006, s. 126, 127
28. www.botanika.bf.jcu.cz/bryoweb/klic/list.pdf 1.11.2007
29. http://www.biolib.cz/cz/taxon/id91102/ 1.11.2007
30. Glennon R. A. et al: Drug and Alcohol Depend., 2000, 60, 121-132
31. Tse S. et al.: Biochem. Pharmacol., 1991, 42, 459-464
32. Cho I. S. et al.: Korean J. Pharmacol., 1995, 31, 345-353
33. Kim H. et al.:J. Appl. Pharmacol., 1999, 7, 112-120
34. Maher P., Davis J. B.: J. Neurosci., 1996, 16, 6394-6401
35. Lee C. S. et al.: J. Neurochem., 2000, 75, 521-531
36. Kim D.H. et al.: Eur. J. Neurosci., 2001, 13, 1861-1872
37. Park T. H. et al.: Neurosci. Res., 2003, 46, 349-358
38. Wiseman H., Halliwell B.: Biochem. J., 1996, 313, 17-29
39. Stadtman E.R., Berlett B.S.: Cem. Res. Toxicol., 1997, 10, 485-494
40. Valko M. et al.: Mol. Cell. Biochem., 2004, 266, 37-56
41. Cao R. et al.: Eur. J. Med. Chem., 2005, 40, 991-1001
42. Český lékopis 2002, 1. Díl, kolektiv autorů, Grada Publishing a.s., Praha 2002, s. 154, 226
43. Schwarz M. J. et al.: Pharmacol. Biochem. Behav., 2003, 627-633
44. Pfau W., Skog K.: J. Chromat. B, 2004, 802, 115-126
45. Umezava A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 928-930
46. Lau P. P., Luh Y.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, 89, 188-194

47. Riebe M. et al.: Mutation Res., 1982, 104, 9-15
48. Sasaki Y. F. et al.: Mutation Res., 1992, 269, 79-95
49. Sasaki Y. F. et al.: Mutation Res., 1993, 302, 165-171
50. Madle E. et al.: Mutation Res., 1981, 90, 433-442
51. Hayashi K. et al.: Nucleic Acids Res., 1977, 4, 3679-3685
52. Aricioglu –Katal F. et al.: Life science, 2003, 73, 2363-2371
53. Song Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, 317, 128-132
54. Norbury C., Nurse P.: Annu. Rev. Biochem., 1992, 61, 441-470
55. Dhavan R., Tsai L. H.: Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2001, 2, 749-759
56. Moura D. J. et al.: Life Sciences, 2006, 79, 2099-2104
57. Herraiz T., Chaparro C.: Life Sciences, 206, 78, 795-802
58. Shi Ch.-Ch. et al.: Eur. J. Pharm., 2000, 390, 319-325
59. Berrougui H. et al.: Pharmacol. Res., 2006, 54, 150-157
60. Terry A. V., Buccafusco, J. J.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 2003, 306, 821.
61. Ghosal S. et al.: J. Pharm. Sci., 1972, 61, 808
62. Sarro G. et al.: Pharmacol. Biochem. Behav., 1997, 58, 281–289
63. Wei-Liang Zhu et al.: J. Mol. Struct. (Theochem), 1999, 488, 21–28
64. Szypula W. et al.: Plant Science, 2005, 168, 1443-1452
65. Hejný S., Slavík B.: Květena ČSR 1. díl, Academia, Praha 1988, s. 190 – 192
66. Čihař J., Kovanda M.: Horské rostliny ve fotografii, Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1983, s. 292
67. Ma X., Gang D. R.: Nat. Prod. Rep. , 2004, 21, 752-772
68. Dewick P. M.: Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach, J. Wiley & Sons Ltd., Chichester, s. 109, 135, 323, 324 (1997)
69. Československý lékopis vydání druhé (ČsL2), Státní zdravotnické nakladatelství, 1954, s. 675-677
70. Reisenauer R.: Metody matematické statistiky, SNTL, Praha 1970, s. 31
71. Kolektiv autorů: European Pharmacopoeia 4th Edition, EDQM, Strasburg 2002

72. Kolektiv autorů: ČSN ISO 3534-1, Statistika – slovník a značky, část 1.: Pravděpodobnosti a obecné statistické termíny, ČNI, Praha 1994, s. 4
73. Kolektiv autorů: Věstník SÚKL 1, 6 (1994)
74. http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=FOAN2 (20.6.2010)
75. Höschl C. et al: Symposium 1, Alzheimerova choroba, Galén 1999, Praha, Edice Symposium
76. http://www.biolib.cz/cz/taxon/id91103 (20.6.2010)
77. Sánchez del Campo L.F. et al.: Neurochemistry International 50 (2007) 531–539
78. Masson P. et al.: Biochimica et Biophysica Acta 1774 (2007) 16–34
79. Whyte K. A., Greenfield S. A. Experimental Neurology 184 (2003) 496–509
80. Schnutzner J., Šmat V. et al.: Myasthenia gravis, Komplexní pojetí a chirurgická léčba, Galén, 2005, Praha, str. 19, 22, 24-25, 79-82
81. Herraiz T., Chaparro C.: Life Sciences, 206, 78, 795-802
82. Kim H. et al.: Archives of Biochemistry and Biophysics, 1997, 337, 137-142
83. Schwarz M. J. et al.: Pharmacol. Biochem. Behav., 75, 2003, 627-633
84. Abdel-Fattah M. et al.: Pharmacology Biochemistry and Behavior, Vol. 52, No. 2, s. 421-426, 1995
85. Sarro G. et al.: Pharmacol. Biochem. Behav., 1997, 58, 281–289
86. Akshay Anand et al.: Behavioural Brain Research 182 (2007) 12–20
87. Husbands S. M. et al.: Drug and Alcohol Dependence 64 (2001) 203–208
88. Mukherjee P. K. et al.: Journal of Ethnopharmacology 106 (2006) 1–28
89. Moura D. J. et al.: Mutagenesis, 2007, 22, 293-302
90. Tse S. Y. H., Mak I.–T., Dickens B. F. et al.: Biochem. Pharmacol., 1991, 42, 459-464
91. Shi Ch.-Ch. et al.: Eur. J. Pharm., 2000, 390, 319-325
92. Berrougui H. et al.: Pharmacol. Res., 2006, 54, 150-157

93. Gerhard Bringmann: european journal of pharmaceutical sciences 28 (2006) 412–422
94. Pfau W., Skog K.: J. Chromat. B, 2004, 802, 115-126
95. Rihui Cao et al.: Biochemical and Biophysical Research Communications 338 (2005) 1557–1563
96. Uesugi, S.; Kobayashi, M. (2005) Flavonoids as additives for bird feeds. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 2005137217; Chem. Abstr. 2005, 469926
97. Schott Y. et al.: Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, 16, 5840-5843
98. Glennon R. A. et al: Drug and Alcohol Depend., 2000, 60, 121-132

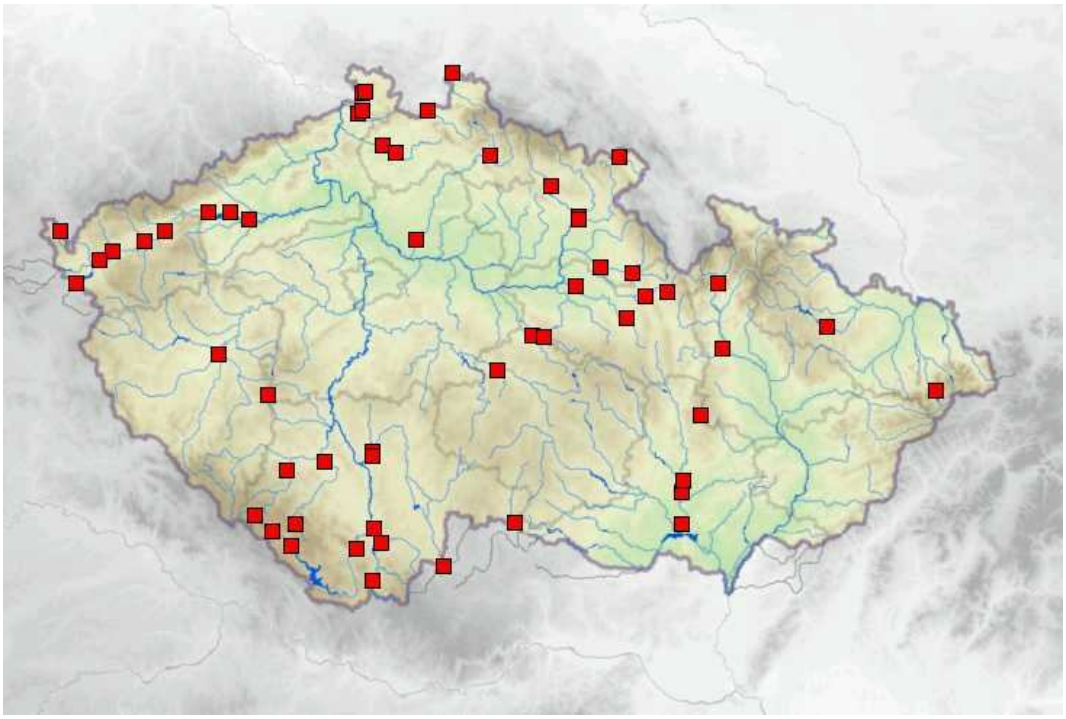
# 9. OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA

**Obr. č. 1: *Fontinalis antipyretica*[(75)]**

**Obr. č. 2: *Fontinalis antipyretica* detail[(75)]**

**Obr. č. 3: *Fontinalis antipyretica*[75]**

**Obr. č. 4: Výskyt *Fontinalis antipyretica* na našem území[76]**



# ABSTRAKT

Monika Vostřelová, Obsah alkaloidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica,* diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jan Martin, Ph.D., Hradec Králové, 2010, 53 stran

Diplomová práce s názvem „Obsah alkaloidů ve vodním mechu *Fontinalis antipyretica* se zabývá stanovením obsahu alkaloidů a flavonoidů ve výše zmíněném vodním mechu. Cílem této práce bylo získat vzorky *Fontinalis antipyretica* z různých lokalit ČR (Rychnovek, Debrné, a Ledce), zjistit přítomnost alkaloidů a flavonoidů, stanovit jejich obsah ve vzorcích z jednotlivých lokalit a zaznamenat podmínky sběru. Obsah alkaloidů i flavonoidů byl stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Z výsledků vyplývá, že nejvyšší obsah alkaloidů připadá na oblast Rychnovek (řeka Metuje) a zároveň byly detekovány alkaloidy harmalol a harmin. Za lokalitu s nejvyšším obsahem flavonoidů pak můžeme označit Ledce (řeka Dědina). V některých vzorcích byly konkrétně detekovány flavonoidy myricetin a hyperosid. V lokalitě Horní Debrné (řeka Labe) byl obsah sledovaných skupin velmi nízký.

Klíčová slova: alkaloidy – harmalol – harmin - *Fontinalis antipyretica* – flavonoidy -

# ABSTRACT

Monika Vostřelová, The volume of alkaloids in *Fontinalis antipyretica,* The diploma thesis, Charles University Prague, School of Pharmacy Hradec Králové, diploma thesis tutor: PharmDr. Jan Martin, Ph.D., Hradec Králové, 2010, 53 pages

This diploma thesis called "The volume of alkaloids in Fontinalis antipyretic aquatic moss" focuses on the setting of alkaloids and flavonoids volume in the above-mentioned aquatic moss. The aim of this thesis was to collect samples of Fontinalis antipyretica in different habitats of the Czech Republic (Rychnovek, Debrné, and Ledce), to determine alkaloids and flavonoids presence, to set their volume in the samples from different habitats and to describe the conditions of collection. The volume of alkaloids and flavonoids was determined by the method of high-performance liquid chromatography (HPLC). The results conclude that the highest volume of alkaloids can be found in the Rychnovek region (the Metuje river), also harmalol and harmine alkaloids were detected there. The habitat with the highest volume of flavonoids is Ledce (the Dědina river). In some samples myricetin and hyperosid flavonoids were found. The volume of the monitored groups in the habitat of Horní Debrné (the Labe river) was very low.

Key words: alkaloids – harmalol – harmine - *Fontinalis antipyretica* - flavonoids