

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

**Diplomová práce**

**FYTOCHEMICKÝ VÝZKUM EVOLVULUS ALSINOIDES IV.**

**PHYTOCHEMICAL STUDY OF EVOLVULUS ALSINOIDES IV.**

ŠKOLITEL: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Hradec Králové 2006

Jana Svačinová

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy 169/2004/B-Bio/FAF.

Ráda bych touto cestou poděkovala PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a pomoc při vypracování této diplomové práce a rovněž ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie UK za vytvoření příznivých pracovních podmínek, za poskytnuté rady a pomoc při práci. Poděkování patří také dalším pracovníkům: doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a doc. RNDr. Milanu Pourovi, Ph.D. z Katedry anorganické a organické chemie UK a MUDr. Radomíru Hyšplerovi, Ph.D. z Kliniky gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové, kteří se do výzkumu zapojili a přinesli této práci cenné výsledky.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Fytochemický výzkum *Evolvulus alsinoides* IV.“ vypracovala samostatně a použila jsem jen pramenů, které uvádím v příloženém seznamu literatury, případně v textu.

## OBSAH

<u>ÚVOD</u>	<u>9</u>
<u>CÍL PRÁCE</u>	<u>12</u>
<u>TEORETICKÁ ČÁST</u>	<u>13</u>
<u>Historie</u>	<u>13</u>
<u>Názvy rostliny</u>	<u>13</u>
<u>Historie</u>	<u>13</u>
<u>Botanický popis rostliny</u>	<u>14</u>
<u>Zařazení do taxonomického systému rostlin</u>	<u>14</u>
<u>Morfologický popis rostliny</u>	<u>15</u>
<u>Lokalita</u>	<u>15</u>
<u>Vliv některých faktorů na růst a produkci</u>	<u>16</u>
<u>Problematika záměn</u>	<u>17</u>
<u>Obsahové látky</u>	<u>18</u>
<u>Kalysteginy</u>	<u>18</u>
<u>Ostatní alkaloidy</u>	<u>19</u>
<u>Flavonoidní glykosidy</u>	<u>21</u>
<u>Kumariny</u>	<u>22</u>
<u>Barviva</u>	<u>23</u>
<u>Ostatní obsahové látky</u>	<u>24</u>
<u>Biologická aktivita obsahových látek</u>	<u>26</u>
<u>Účinky na vegetativní nervový systém</u>	<u>26</u>
<u>Účinky na centrální nervový systém</u>	<u>26</u>
<u>Adaptogenní aktivita</u>	<u>26</u>
<u>Imunomodulační působení</u>	<u>27</u>
<u>Antioxidační aktivita</u>	<u>27</u>
<u>Alelopatický potenciál</u>	<u>28</u>
<u>Antiulcerózní a antikatotonická aktivita</u>	<u>28</u>
<u>Antibakteriální a anthelmintická aktivita</u>	<u>28</u>
<u>Antisporulační aktivita</u>	<u>29</u>
<u>Ochranné a kosmetické využití</u>	<u>29</u>

<u>Využití rostliny</u>	<u>31</u>
<u>Využití rostliny v terapii</u>	<u>31</u>
<u>Hlavní indikace</u>	<u>31</u>
<u>Klinické použití</u>	<u>32</u>
<u>Používané části rostliny</u>	<u>33</u>
<u>Lékové formy a kombinace</u>	<u>33</u>
<u>Dávkování</u>	<u>33</u>
<u>Bezpečnost a interakce</u>	<u>34</u>
<u>Jiné použití rostliny</u>	<u>34</u>
<u>Vybrané přípravky obsahující <i>Evolvulus alsinoides</i></u>	<u>35</u>
<u>Všeobecné údaje o přípravcích</u>	<u>35</u>
<u>Některé dostupné přípravky</u>	<u>36</u>
<u>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>	<u>41</u>
<u>Všeobecné postupy</u>	<u>41</u>
<u>Destilace rozpouštědel</u>	<u>41</u>
<u>Sloupcová (kolonová) chromatografie (CC)</u>	<u>41</u>
<u>Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii</u>	<u>41</u>
<u>Plnění sloupce adsorbentem</u>	<u>41</u>
<u>Příprava roztěru pro nanesení na sloupec</u>	<u>41</u>
<u>Nanesení roztěru na sloupec</u>	<u>41</u>
<u>Tenkvrstvá chromatografie (TLC)</u>	<u>42</u>
<u>Zahušťování frakcí (roztoků látek)</u>	<u>42</u>
<u>Sušení</u>	<u>42</u>
<u>Potřeby a pomůcky</u>	<u>43</u>
<u>Rozpouštědla</u>	<u>43</u>
<u>Chemikálie</u>	<u>43</u>
<u>Detekční činidla</u>	<u>44</u>
<u>Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii</u>	<u>45</u>
<u>Chromatografické adsorbenty</u>	<u>45</u>
<u>Laboratorní sklo</u>	<u>46</u>
<u>Přístroje</u>	<u>46</u>
<u>Instrumentální metody a zkoušky biologické aktivity</u>	<u>47</u>
<u>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)</u>	<u>47</u>
<u>Infračervená spektrofotometrie (IČ)</u>	<u>47</u>

<u>Nukleární magnetická rezonance (NMR)</u>	<u>48</u>
<u>Plynová chromatografie/ hmotnostní spektrometrie (GC/MS)</u>	<u>49</u>
<u>Testy akutní toxicity</u>	<u>51</u>
<u>Antiagregační aktivita</u>	<u>53</u>
<u>Antioxidační aktivita</u>	<u>54</u>
<u>Izolace</u>	<u>57</u>
<u>Materiál</u>	<u>57</u>
<u>Extrakce drogy a zpracování extraktu</u>	<u>57</u>
<u>Předběžné zkoušky petroletherového extraktu (Pe extraktu)</u>	<u>59</u>
<u>Sloupcová chromatografie petroletherového extraktu (CC Pe extraktu)</u>	<u>59</u>
<u>Výběr vhodné eluční soustavy</u>	<u>59</u>
<u>Příprava vzorku</u>	<u>60</u>
<u>Příprava sloupce pro provedení CC</u>	<u>60</u>
<u>Chromatografické podmínky</u>	<u>60</u>
<u>Orientační TLC získaných frakcí</u>	<u>60</u>
<u>Výsledky sloupcové chromatografie</u>	<u>60</u>
<u>Orientační TLC spojených frakcí 1-52</u>	<u>60</u>
<u>Uchování a zpracování frakcí</u>	<u>65</u>
<u>Zpracování frakce 3-4</u>	<u>66</u>
<u>Úvodní charakteristika frakce 3-4</u>	<u>66</u>
<u>Orientační zkoušky</u>	<u>66</u>
<u>    Zkoušky rozpustnosti</u>	<u>66</u>
<u>    Orientační TLC frakcí 3-4 a 1-2</u>	<u>67</u>
<u>Zisk a přečišťování krystalů</u>	<u>67</u>
<u>Charakteristika krystalů</u>	<u>69</u>
<u>    Srovnávací TLC krystalů z frakce 3-4 se standardy</u>	<u>69</u>
<u>    Teplota tání získaných krystalů</u>	<u>71</u>
<u>    Vzhled krystalů</u>	<u>71</u>
<u>Instrumentální analýza frakce</u>	<u>72</u>
<u>    Infračervená spektrofotometrie</u>	<u>72</u>
<u>    Plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie</u>	<u>72</u>
<u>Zpracování frakce 5-7</u>	<u>72</u>
<u>    Úvodní charakteristika frakce 5-7</u>	<u>72</u>

<u>Orientační zkoušky</u>	<u>73</u>
<u>Zkoušky rozpustnosti</u>	<u>73</u>
<u>Orientační TLC frakcí 3-4 a 5-7</u>	<u>73</u>
<u>Zisk a přečišťování krystalů</u>	<u>73</u>
<u>Charakteristika krystalů</u>	<u>74</u>
<u>Orientační TLC čištěných krystalů z frakcí 3-4 a 5-7</u>	<u>74</u>
<u>Teplota tání získaných krystalů</u>	<u>75</u>
<u>Vzhled krystalů</u>	<u>75</u>
<u>Zpracování získaných krystalů</u>	<u>75</u>
<u>Zpracování frakce 15-16</u>	<u>75</u>
<u>Úvodní charakteristika frakce 15-16</u>	<u>75</u>
<u>Orientační zkoušky</u>	<u>75</u>
<u>Zkoušky rozpustnosti</u>	<u>75</u>
<u>Teplota tání vyloučených krystalů</u>	<u>75</u>
<u>Orientační TLC frakcí 15-16, 1-2 a 3-4</u>	<u>76</u>
<u>Vysokoučinná kapalinová chromatografie frakce 15-16</u>	<u>76</u>
<u>Chromatografické podmínky</u>	<u>76</u>
<u>Výsledky HPLC</u>	<u>76</u>
<u>Orientační TLC frakcí z HPLC dělení</u>	<u>77</u>
<u>Preparativní TLC frakce 15-16</u>	<u>78</u>
<u>Chromatografické podmínky</u>	<u>78</u>
<u>Výsledky preparativní TLC</u>	<u>79</u>
<u>Orientační zkoušky frakcí získaných preparativní TLC</u>	<u>79</u>
<u>Preparativní TLC druhé části frakce 15-16</u>	<u>81</u>
<u>Chromatografické podmínky</u>	<u>81</u>
<u>Výsledky preparativní TLC</u>	<u>81</u>
<u>Orientační zkoušky frakcí získaných preparativní TLC</u>	<u>82</u>
<u>Orientační TLC frakcí po TLC dělení frakce 15-16</u>	<u>83</u>
<u>Přečišťování krystalů z frakce 15-16/1X</u>	<u>83</u>
<u>Instrumentální analýza frakce</u>	<u>84</u>
<u>Nukleární magnetická rezonance</u>	<u>84</u>
<u>Zpracování frakce 17</u>	<u>85</u>
<u>Úvodní charakteristika frakce 17</u>	<u>85</u>
<u>Orientační TLC frakce 17</u>	<u>85</u>

<u>Preparativní TLC frakce 17</u>	<u>86</u>
<u>Chromatografické podmínky</u>	<u>86</u>
<u>Výsledky preparativní TLC</u>	<u>87</u>
<u>Orientační TLC frakcí získaných dělením frakce 17</u>	<u>88</u>
<u>Frakce 17/1</u>	<u>89</u>
<u>Orientační zkoušky</u>	<u>89</u>
<u>Vyhodnocení významu frakce 17</u>	<u>90</u>
<u>Zpracování frakce 36-40</u>	<u>90</u>
<u>Úvodní charakteristika frakce 36-40</u>	<u>90</u>
<u>Preparativní TLC frakce 36-40</u>	<u>90</u>
<u>Chromatografické podmínky</u>	<u>90</u>
<u>Výsledky preparativní TLC</u>	<u>91</u>
<u>Orientační zkoušky frakcí získaných preparativní TLC</u>	<u>92</u>
<u>Zpracování frakce 36-40/3</u>	<u>93</u>
<u>Srovnávací TLC frakce 36-40/3 se standardy</u>	<u>93</u>
<u>Orientační zkoušky</u>	<u>95</u>
<u>Instrumentální analýza frakce</u>	<u>95</u>
<u>Nukleární magnetická rezonance</u>	<u>95</u>
<u>Srovnávací TLC vybraných frakcí se standardy</u>	<u>96</u>
<u>Zkoušky biologické aktivity</u>	<u>98</u>
<u>Stanovení akutní toxicity</u>	<u>98</u>
<u>Stanovení antiagregační aktivity</u>	<u>100</u>
<u>Stanovení antioxidační aktivity</u>	<u>100</u>
<u>DISKUZE</u>	<u>103</u>
<u>SOUHRN</u>	<u>108</u>
<u>LITERATURA</u>	<u>110</u>

## I. ÚVOD

Udržení a znovuzískání ztraceného zdraví nutilo lidstvo odpradáva hledat a používat různé prostředky s předpokládaným léčivým účinkem. Jejich zdroje a charakter se postupně měnily v závislosti na pokroku lidského poznání přírody. Jedná se o vývoj vycházející z využití



prostředků lidové empirie k léčivům získaným cílevědomým racionálním výběrem struktur přesně definovaného složení a účinku.

Nejdelším vývojovým úsekem je období lidového léčitelství, které bylo založeno na empirii. Základní poznatky v této oblasti byly získávány především při obstarávání potravy člověkem. Člověk našel nejen přírodní vyžitelné jako potraviny, ale též rostlinné a později živočišné produkty se škodlivým působením, mnohdy však vyžitelné jako léčiva. Poznal tak, co ho léčí a co mu naopak škodí. Zkušeností založených na empirickém poznání se pak chopili bylinkáři, kteří dále rozvíjeli umění přírodní léčby. Období renesance se vyznačovalo rychlým rozvojem přírodních věd a počátkem použití chemických léčiv. Vycházelo se z předpokladu, že látky chemického charakteru jsou jako léčiva rovnocenné látkám přírodního původu. Nejprve byly používány anorganické sloučeniny, postupně pak organické sloučeniny získané jednoduchou izolací z přírodního materiálu nebo jednoduchou úpravou izolovaného produktu. Výrazný rozvoj organické chemie nastal ve druhé polovině 19. století. Jedním z východisek dalšího výzkumu bylo odmítnutí předpokladu, že izolovaný biologicky aktivní produkt je ideálně vytvořen pro použití jako léčivo. Dochází tak k modifikaci struktur léčiv přírodního původu. Později se začaly objevovat látky, které nemají návaznost na přírodní produkty, a začalo stále více přibývat léčiv získaných izolací komplexů sloučenin nebo chemických individuí a léčiv vzniklých obměnou předlohových struktur přírodního nebo syntetického původu. S rozvojem chemických léčiv tak došlo k ústupu od bylinkářských tradic.<sup>1</sup>

Léčení pomocí bylin a přírodnin však zůstalo zachováno v tradičních systémech léčení východní Asie. Jedním z takovýchto léčebných systémů je také ájurvéda. Ájurvéda, která doslova znamená „věda o životě“, je kombinací vědy a filozofie. Představuje tradiční systém léčebné praxe v Indii a na Srí Lance používaný po tisíce let. Stejně jako tradiční čínská medicína je ájurvéda uceleným systémem s celou řadou různých složek zaměřených na zlepšování emočního, fyzického a duševního zdraví. V západních zemích je všeobecně platné, že všichni lidé jsou v podstatě stejní a léčí se spíše obecné projevy chorob než konkrétní osoba, která jimi trpí. Ájurvéda chápe jedinečnost každého pacienta, bere v úvahu stav mysli a ducha i fyzické zdraví. Diagnóza je založena na osobité konstituci pacienta.<sup>2</sup>

Jednou z bylin, které se tradičně využívají v ájurvédském léčitelství, je *Evolvulus alsinoides*. Rostlina roste běžně jako plevel v tropických a subtropických oblastech prakticky po celém světě, lze ji tedy velmi snadno získat. Je používána především pro léčbu nejrůznějších onemocnění nervového systému, k posílení paměti a myšlení, jako nootropní činitel, při nervovém vyčerpání a neurodegenerativních onemocněních. Na trhu je dostupná řada preparátů obsahujících tuto rostlinu často v kombinaci s jinými blahodárně působícími bylinami.

V Evropě jsou tyto rostliny málo známé. Zájem o ně však stále narůstá. Právě neurodegenerativní onemocnění jsou v dnešní době jedním ze závažných problémů. Jedná se o progresivní onemocnění, která nelze zcela vyléčit, ale jejichž rozvoj lze různými léky zpomalit. Stále narůstá počet lidí, kteří těmito onemocněními trpí, a ne každý si může dovolit preparáty na našem trhu.

Jedním ze zdrojů nových léčiv může být objevování ztraceného. Pozornost je soustředěna na studium starších prací ve snaze po nalezení a využití takových poznatků, které v době publikování nebyly a nemohly být dostatečně oceněny. Do této oblasti lze zahrnout mnoho léčiv přírodního původu, která jsou objevována na základě poznatků lidového léčitelství a představují vlastně historicky nejstarší způsob objevu léčiv. Jsou tak hluboce studovány poznatky léčitelství Asie. Často se tyto izolované látky z přírodních materiálů staly předlohou pro pozdější syntézy modelových látek, které vytvářejí celé farmakoterapeutické skupiny léčiv.<sup>1</sup>

V současné době dochází ke stále většímu návratu k přírodě i v samotném léčení a samoléčení. Lidé považují to, co je přírodní, za čistší, šetrnější a účinnější. Obsahové látky rostlin působí ve svém komplexu, který je pro nás jen velmi obtížně poznatelný. Vzájemně se ovlivňují a potencují a často není jasné, která z látek je nositelem vlastního účinku. Samotnou izolací může látka předpokládaný účinek ztratit. Proto v případě rostlin je mnohdy výhodnější připravit lék ze samotné rostliny ve formě práškované drogy, extraktu, odvaru či tinktury, než izolace látek samotných. Přesto rostlinné látky mohou být předlohou úplně nových významných chemických látek. K tomu, aby se staly zdrojem nových účinných léčiv, je nutno, aby byly důkladně prozkoumány.

Ačkoliv je rostlina *Evolvulus alsinoides* používána odpradávná pro své blahodárné účinky především na nervový systém, jedná se o rostlinu neprozkoumanou z hlediska obsahových látek a jejich působení. Empirické zkušenosti s použitím této byliny jsou bohaté a prodělaly staletý vývoj. Existuje však jen málo prací, které se zabývají fytochemickým výzkumem *Evolvulus alsinoides* a určením biologické aktivity obsahových látek. I přesto, že se rostlina jeví jako velice perspektivní pro léčbu nejrůznějších poruch nervového systému, spektrum a obsah účinných látek rostliny není dostatečně probádán. Do praktického evropského použití by ovšem neměly být zařazeny přípravky obsahující rostliny dosud neprobádané, které obsahují velice účinné látky, zvláště pokud mají široké spektrum indikací a dávkování. Mohly by být příčinou nežádoucích vážných problémů.

Smysl mé práce je postaven na všech výše uvedených aspektech. Zapojila jsem se

do vědeckého výzkumu této tradiční byliny tak, aby bylo uceleným způsobem objasněno

spektrum obsahových látek a potvrzena či vyvrácena jejich biologická aktivita, popřípadě nalezena látka, která by se mohla stát novým potenciálním léčivem a předlohou pro další aktivní látky.

## II. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo pokračovat v systematickém fytochemickém výzkumu rostliny *Evolvulus alsinoides*, který zahájil doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. a na kterém se podílelo několik studentů, tak, aby výzkum této rostliny byl proveden v celém komplexu a byl ucelený.

Úkolem mé práce bylo zpracování petroletherového extraktu *Evolvulus alsinoides*, izolace látek obsažených v petroletherovém extraktu, charakterizace látek pomocí tenkovrstvé chromatografie a pomocí instrumentálních metod ve spolupráci s dalšími pracovišti a určení základní biologické aktivity látek obsažených v petroletherovém extraktu.

# III. TEORETICKÁ ČÁST

## 1. HISTORIE

### 1.1. Názvy rostliny<sup>3,4</sup>

Latinský název: *Evolvulus alsinoides* Linn.

Sanskrtský název: Vishnugrandi, Vishnukranta

Hindský název: Shyamakuranta, Shankhahuli, Shankhapushpi, Shankpushpi<sup>5</sup>

Anglický název: Slender dwarf morning-glory<sup>6</sup>

### 1.2. Historie<sup>3,4</sup>

Název této rostliny je ze sanskrtu překládaný jako Višnuova stopa. Višnu je jedna z podob boha v hinduismu. Jsou to různé formy jedné konečné vyšší moci, která nemá žádnou specifickou formu, jméno, obličej, rysy.<sup>7</sup> V nighantštině má název synonymum Nila-Pushpa, což znamená modře kvetoucí. Ve védské době byla rostlina známa k podpoře početí. Termíny Mangalyapushpi, Supushpi a Mangalyakusuma ukazují, že květina byla posvátná a byla používána při bohoslužbě. Listy, lodyhy a kořeny byly využívány v medicíně v jižní Indii jako posilující lék pro veškeré vnitřní orgány. Rostlina byla také lékem na průjem a byla používána ke zvýšení inteligence a zdokonalení paměti.<sup>4</sup> Právě specifické použití ke zvýšení inteligence a zlepšení paměti popsal Charaka, který je jedním ze zakladatelů ájurvédy. Podle Charaky zdraví a nemoc nejsou předurčené a život může být prodloužen lidskou snahou.<sup>3, 8</sup> Shankhapushpi je citována ve spisu Charaka jako jedinečná největší bylina pro zvýšení všech tří aspektů síly mysli - učení, paměť a vzpomínání. Díky tomu je nazývána největší Medhya Rasayana, neboli ten, který povznáší mysl.<sup>9</sup>

## 2. BOTANICKÝ POPIS ROSTLINY

### 2.1. Zařazení do taxonomického systému rostlin<sup>6</sup>

Říše:	Plantae	Plants
Podříše:	Tracheobionta	Vascular plants
Nadoddělení:	Spermatophyta	Seed plants
Oddělení:	Magnoliophyta	Flowering plants
Třída:	Magnoliopsida	Dicotyledons
Podtřída:	Asteridae	
Řád:	Solanales	
Čeleď:	Convolvulaceae	Morning-glory family
Rod:	<i>Evolvulus</i> L.	Dwarf morning-glory
Druh:	<i>Evolvulus alsinoides</i> L.	Slender dwarf morning-glory

Druh *Evolvulus alsinoides* L. má řadu variet, například:

*Evolvulus alsinoides* L. var. *angustifolius* Thorr

*Evolvulus alsinoides* L. var. *debilis* (Kunth) van Ooststroom<sup>6</sup>

*Evolvulus alsinoides* L. var. *alsinoides*

*Evolvulus alsinoides* L. var. *decumbens* (R. Brown) van Ooststr.

*Evolvulus alsinoides* L. var. *rotundifolius* Hayata ex van Ooststr.<sup>10</sup>

## 2.2. Morfologický popis rostliny <sup>3, 4, 10</sup>



Obrázek č. 1: *Evolvulus alsinoides* var. *alsinoides* <sup>11</sup>

*Evolvulus alsinoides* L. je vytrvalá bylina s malou dřevnatou a větvenou podnoží. Její lodyhy jsou početné, více než 30 cm dlouhé, často poléhavé, nebo vystoupavé, štíhlé a houževnaté s dlouhými trichomy.

Listy jsou malé, celistvé, eliptické až podlouhlé, tupé, kopinaté, na bázi s ostrým úhlem, zakončené hrotem, hustě ochlupené, velikost cca 0,7-2,5 cm x 5-10 mm. Řapík je nepatrný nebo téměř nepřítomný. Listeny jsou přímé, šídlovité až kopinaté, 1,5-4 mm dlouhé, perzistující.

Květy mají modrou až bílou barvu, kvetou od ledna do srpna.<sup>12</sup> Doba kvetení může být i v jiných měsících v závislosti na místě výskytu rostliny (např. od listopadu do dubna v Zimbabwe).<sup>11</sup> Květy jsou většinou osamocené v horních úžlabích, zřídka dva z listenu. Vyrůstají na dlouhých (2,5-3,5 cm), úžlabních, ochlupených květních stopkách. Kalich je laločnatý, kališní lístky (3-4 mm) kopinaté s ostrou špičkou. Koruna (7-10 mm) je okrouhlého, široce nálevkovitého tvaru.

Plodem jsou kulovité hladké tobolky se čtyřmi pouzdry, v nichž jsou uložena čtyři tmavá lysá semena.

### **2.3. Lokalita**

*Evolvulus alsinoides* L. je rostlina široce rozšířená v tropických a subtropických oblastech po celém světě.<sup>4</sup> Je jedním z převládajících plevelů v tropických oblastech jihovýchodní Asie.<sup>13</sup> Roste běžně jako plevel na otevřených travnatých rovinách, pustých, písčitých půdách, hlínách i jílech, mezi balvany, na suchých svazích, na obdělávané půdě, v přímořských oblastech. Můžeme ji nalézt na pastvinách, v houštinách, podél cest, podél vodních toků, poblíž řečišť a nádrží.<sup>8, 12, 14</sup>

Místa výskytu dosahují výšek 0-1800 m n.m., ze zemí jsou to Indie, Bangladěš, Kambodža, Indonésie, Japonsko (Ryukyu ostrovy), Laos, Malajsie, Nepál, Pákistán, Filipíny, Thajsko, Vietnam, Afrika, Austrálie, Severní a Jižní Amerika, ostrovy v Pacifiku.<sup>10</sup>

Ve vlhkých podmínkách je výskyt rostliny velmi vzácný.<sup>4</sup> Rostlina může být také pěstována.<sup>3</sup>

### **2.4. Vliv některých faktorů na růst a produkci**

Ekofyziologie *Evolvulus alsinoides* byla studována na listových pigmentech, indexu stability chlorofylu, hrubých proteinech, cukrech, prolinu a osmotickém potenciálu. Výsledky ukázaly, že maximální hodnoty výše uvedených měření s výjimkou osmotického potenciálu byly pozorovány během fáze kvetení následované vegetativní fází a minimální hodnoty u velmi mladých rostlin. Prolin byl v maximu během fáze kvetení s minimem osmotického potenciálu a naopak. Tento jev je způsobený osmoregulací během stresových podmínek.<sup>15</sup>

Výzkum provedený v dřívějších letech se zabýval kolísáním barev květů (tmavě modrá, světle růžová a bílá), morfologií semen a ekofyziologickými parametry *Evolvulus alsinoides*. Významné kolísání bylo pozorováno v barvě květu, morfologii stonku, květní stopky, kalichu a koruny, hmotnosti semen, životnosti a lokalitě. Na základě ekofyziologických studií bylo zjištěno, že rostliny s tmavě modrými květy jsou nejvíce adaptovány na skalnatá stanoviště, protože vykazovaly vysoký obsah prolinu s nízkým osmotickým potenciálem a indexem stability chlorofylu.<sup>16</sup>

V letech 2000-2001 byly provedeny pokusy, které studovaly vliv aplikace hnojiv na listové pigmenty, index stability chlorofylu, obsah proteinů a cukrů u *Evolvulus alsinoides*. Rostliny ošetřované hnojivy (AM, plná dávka NPK a plná dávka NPK + FYM + Hexameal) projevily významný vzrůst celkových pigmentů a obsahu cukrů a proteinů oproti kontrolním rostlinám.<sup>17</sup>



Výsledky sledování vlivu sponu a hladin hnojiv na růstové parametry a výnos biomasy u *Evolvulus alsinoides* v polních podmínkách odhalily, že růstové parametry se významně zvyšují po aplikaci hnojiv FYM, NPK + FYM a NPK u rostlin s roztečí 25 cm, index sklizně se oproti kontrole zvýšil po aplikaci Hexameal a FYM.<sup>18</sup>

Rostliny ošetřované NPK, FYM, Hexameal a jejich kombinací v polních podmínkách ukázaly lepší růstovou výkonnost oproti kontrolním. Mechanická skarifikace pomohla prorazit tvrdý plášť klidového stádia semene *Evolvulus alsinoides*.<sup>19</sup>

Při výzkumu vlivu cukrů na produkci námelových alkaloidů v suspenzních kulturách *Evolvulus alsinoides* byla odhalena nadřazenost sacharózy nad glukózou a fruktózou, jak pro růst buněk, tak pro produkci námelových alkaloidů. Sacharóza ve vysokých koncentracích (4 %) byla omezujícím faktorem pro produkci alkaloidů, zatímco při vyšších hladinách vzrostla hmotnost suché tkáně. Progresivní změny v aktivitě tryptofansyntázy, klíčového enzymu produkce tryptofanu, který je známým prekurzorem námelových alkaloidů, byly zkoumány při různých koncentracích sacharózy a jejich vztah k syntéze alkaloidů je stále diskutován.<sup>20</sup>

## **2.5. Problematika záměn**

I přesto, že byly popsány základní morfologické a ekologické rysy *Evolvulus alsinoides*, je tato rostlina často zaměňována, falšována a vyskytuje se zde i nejednotnost v použití názvů.

Pod programem poradenské služby Institutu pro identifikaci surových drog bylo pro identifikaci obdrženo třináct vzorků nezpracovaných drog z Shankhapushpi od různých farmaceutických společností a obchodníků s rostlinnými drogami. Při identifikaci založené na exomorfologických studiích a srovnávání s pravými vzorky nezpracované drogy Shankhapushpi, bylo pozorováno, že devět vzorků bylo *Convolvulus microphyllus* Sieb.ExSpreng, jeden *Evolvulus alsinoides* Linn., jeden směsí těchto dvou rostlin a další dva vzorky byly *Indigofera cordifolia* Heyne. Na základě těchto pozorování je doporučováno prokázat pravost vzorků nezpracované drogy zakoupené pod obchodním názvem Shankhapushpi před jejím použitím.<sup>21</sup>

Různé internetové stránky se liší v poskytovaných informacích a pod pojmem Shankhapushpi či Shankhapushpi uvádějí jako mateřskou rostlinu například *Convolvulus pluricaulis*<sup>22, 23, 24</sup> a *Convolvulus microphyllus*.<sup>25</sup> Většina stránek či odborné články ovšem uvádí jako mateřskou rostlinu *Evolvulus alsinoides* L.<sup>4, 5, 9, 17</sup> Základní charakteristika a použití těchto rostlin je téměř shodné. Všechny rostliny jsou určeny především k terapii nejrůznějších poruch nervového systému.<sup>4, 5, 22, 23, 24, 25</sup>



rostoucích v širokém pásmu tropických, subtropických a mírných lokalit všech kontinentů stejně tak jako z rostlin kultivovaných ve sklenících. Všechny rostlinné orgány se ukázaly být potenciálními místy výskytu těchto metabolitů, ačkoliv jsou kalysteginy často detekovatelné jen v určitém orgánu daných druhů. Tyto zjištěné skutečnosti jasně ukazují, že výskyt kalysteginů je v podstatě téměř pevným znakem u čeledi Convolvulaceae. Byla prověřena také přítomnost předpokládaných prekurzorů (základních lipofilních tropanů).<sup>28</sup>

Čisté kalysteginy, izolované poprvé z kořenových kultur druhu *Calystegia sepium*, byly testovány na inhibiční aktivitu vůči glykosidázám. Trihydroxyalkaloid kalystegin A je středně silný inhibitor  $\beta$ -glukosidázy a slabý inhibitor  $\alpha$ -galaktosidázy. Zvýšená hladina hydroxylace, jak je tomu u kalysteginu B, který obsahuje 27 % kalysteginu B1 a 73 % kalysteginu B2, měla za následek značně zvýšenou inhibiční aktivitu.<sup>30</sup>

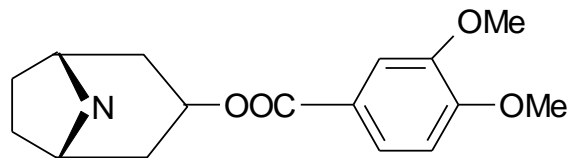
Kalysteginy tvoří novou strukturní třídu polyhydroxyalkaloidů - polyhydroxynortopany, které disponují silnými inhibičními vlastnostmi vůči glykosidázám.<sup>23, 30</sup> Mohou se proto využít nejen ve studiích těchto enzymů, ale i jako potenciální antivirotika a antikancerogenní látky. Proto jsou rostliny obsahující kalysteginy, které mohou být použitelné pro jejich výzkum, důležité.<sup>31</sup>

### **3.2. Ostatní alkaloidy**

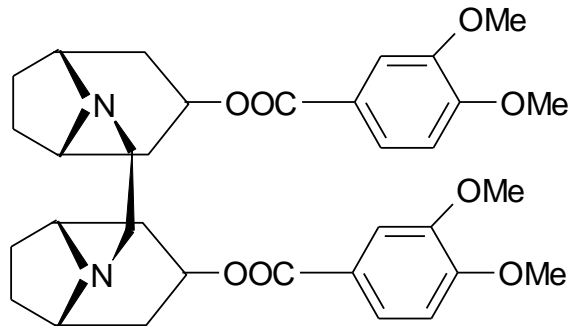
Varadan a kol. izoloval opticky aktivní alkaloidy a evolvin (shankhapushpin<sup>3</sup>). Baveja a kol. zahájil svou práci k izolaci a studiu zejména nezpracovaných alkaloidů. Izoloval ve vodě rozpustné baze s teplotou tání 60-61 °C. Jejich infračervené spektrum ukázalo na skupiny -OH, -NH<sub>2</sub> a aromatický kruh.<sup>32</sup>

Tropanové alkaloidy konvolvin, konvalidin a konvolamin byly objeveny a následně identifikovány v *Evolvulus sericeus* var. *holosericeus* a *Convolvulus subhirsutus*. Nepodařilo se je zatím prokázat u *Evolvulus alsinoides*.<sup>31</sup>

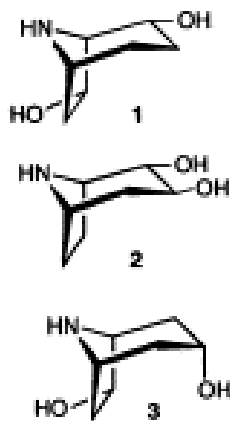
Dihydroxynortropanové alkaloidy (2 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxynortropan, 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihydroxynortropan a 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxynortropan) byly izolovány z rostlin produkujících kalysteginy z čeledi Convolvulaceae a Solanaceae.<sup>33</sup>



Obrázek č. 4: Konvolin

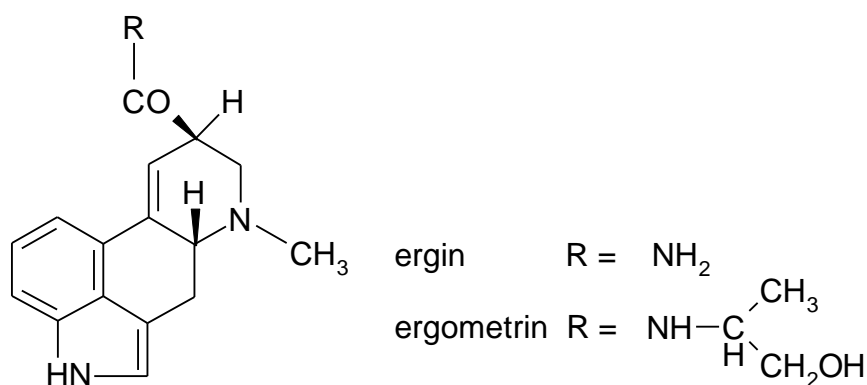


Obrázek č. 5: Konvalidin



Obrázek č. 6: Dihydroxynortropany izolované z rostlin z čeledi Convolvulaceae a Solanaceae produkujících kalysteginy<sup>33</sup>

Semena některých druhů čeledi Convolvulaceae (*Ipomoea* a *Convolvulus*) obsahují klavinové alkaloidy (deriváty 6,8-dimethylergolinu) a deriváty kyseliny lysergové, které se společně řadí mezi námelové alkaloidy. Obě skupiny mají stejný základní skelet odvozený od tryptofanu a kyseliny mevalonové.<sup>34, 35</sup> Pomocí tenkovrstvé a papírové chromatografie byly pokusně identifikovány ergin, isoergin, ergometrin, ergometrinin, elymoklavin, penniklavin a chanoklavin.. Ne všechny druhy testovaných semen obsahovaly tyto alkaloidy. Mateřské rostliny se semeny bohatými na alkaloidy obsahovaly alkaloid také v listech a stoncích.<sup>34</sup>

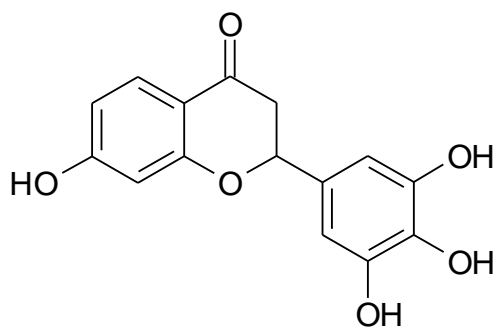


Obrázek č. 7: Struktura erginu a ergimetrinu

### 3.3. Flavonoidní glykosidy

Bylo provedeno předběžné fytochemické prověřování a separace flavonoidů pomocí papírové chromatografie. Z chromatografických studií bylo pozorováno, že dva flavonoidy kaempferol-3-glukosid a kaempferol-3-rutinosid jsou přítomné v rostlinách *Evolvulus alsinoides* a *Securinega leucopyrus*.<sup>36</sup>

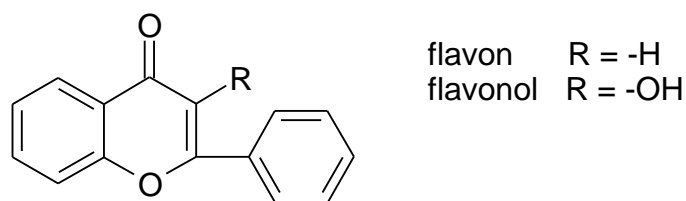
Z rostliny byly také izolovány flavonové glykosidy evolvulosid A a B, jejichž struktura je odvozena od robinitinu (3', 4', 5', 7-tetrahydroxyflavon). Evolvulosid A je chemicky 7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid, evolvulosid B je 7-O- $\beta$ -D-glukopyranosid.<sup>31</sup>



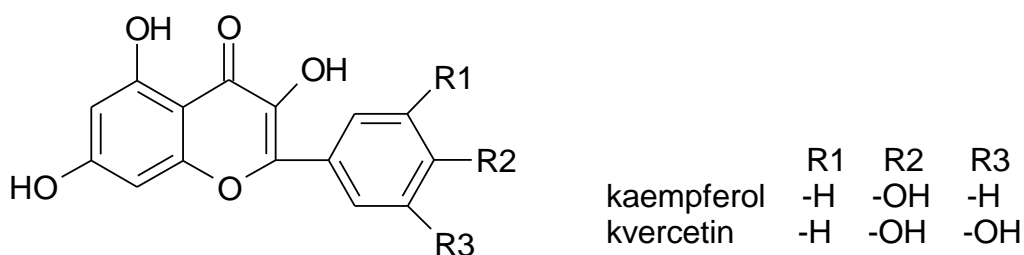
Obrázek č. 8: Robinitin

Z některých druhů čeledi Convolvulaceae byly získány sulfátované flavonoidy typu kvercetin-sulfát a kaempferol-sulfát.<sup>37</sup>

Flavonoidní glykosidy jsou deriváty fenylchromanu. Základem je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (isoflavany), 4 (neoflavany). Flavon a flavonol, které jsou základem uvedených flavonoidních glykosidů, se řadí do skupiny derivátů 4-oxoflavanu (flavonoidy).<sup>35</sup>



Obrázek č. 9: Struktura flavonu a flavonolu

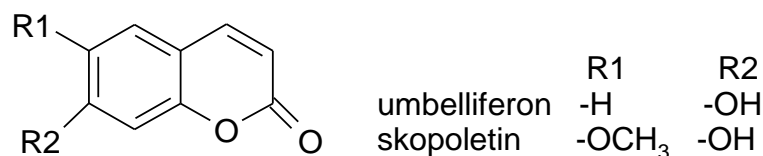


Obrázek č. 10: Kaempferol a kvercetin

Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, snižovat jejich lomivost, působit antihemorhagicky a antiedematózně. Inhibují také hyaluronidázu, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi a mohou tak být podpůrnými prostředky při léčení infekčních onemocnění. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak, s ionty vápníku tvoří komplexní soli, které brání srážení krve a zadržují vápník v těle. Potencují účinek vitamínu C, mají též vlastnosti choleretické, cholagogní, a spasmolytické. Účinné jsou jak glykosidy, tak aglykony.<sup>35</sup>

### 3.4. Kumariny

V rostlině byly také nalezeny zástupci jednoduchých kumarinů skopoletin a umbelliferon.<sup>31</sup> Kumariny se řadí mezi sloučeniny typu glykosidů, strukturou se jedná o deriváty  $\alpha$ -chromonu. Vznikají z cis-formy kyseliny o-hydroxyskořicové vytvořením laktonu. Prekurzory kumarinu v rostlinách jsou glykosidy kyseliny o-kumarové (trans-forma) a kumarinové (cis-forma), které jsou ve vzájemné rovnováze. Při sušení se glykosidy štěpí a tvoří se kumarin, lakton volné kumarinové kyseliny, který propůjčuje droze charakteristickou vůni. Skopoletin a umbelliferon patří mezi zástupce hydroxy- a methoxykumarinů. Na rozdíl od kumarinu umožňuje jejich volná -OH skupina vznik vlastních glykosidů.<sup>35</sup>



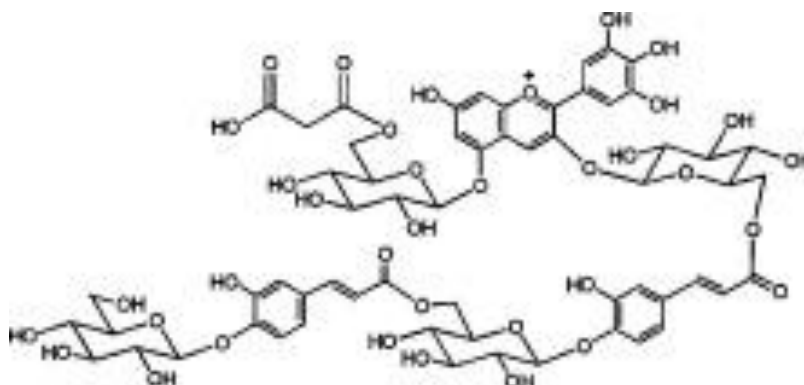
Obrázek č. 11: Umbelliferon a skopoletin

Nenasycený laktonový kruh kumarinů je nositelem účinku. Působí tlumivě na CNS, snižují teplotu, mají hypnotické účinky, některé působí spasmolyticky, velmi silně absorbují UV záření. Některé kumariny mohou senzibilizovat kůži na sluneční záření.<sup>35</sup>

### 3.5. Barviva

Z modrých květů *Evolvulus pilosus* byl izolován hlavní acylovaný antokyan. Chemickými a spektrálními metodami byla určena jeho struktura. V jeho molekule je přítomen acylovaný glykosid delfinidinu.<sup>38</sup>

Struktura izolovaného hlavního antokyanu z modrých korunních lístků *Evolvulus pilosus* byla potvrzená jako identická s phacelianinem. Antokyan phacelianin byl izolován z modrých korunních lístků *Phacelia campanularia*. Ve své struktuře má začleněný chromofor delfinidin. Phacelianin může zaujmout jak inter- tak intramolekulární klubkové uspořádání a projevit modrou barvu lístků molekulárními asociacemi a koexistencí s malým množstvím kovových iontů.<sup>39</sup>



Obrázek č. 12: Antokyan phacelianin

Z modrých květů *Evolvulus pilosus* a modrofialových květů *Eichhornia crassipes* byly extrahovány dvě řady strukturálně příbuzných antokyanů. Oba pigmenty mají stejný chromofor (delfinidin), ale odlišný způsob glykosilace a acylace. Pigmenty projevovaly nápadnou barevnou

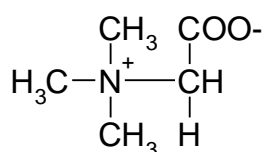
stabilitu ve vodném roztoku s mírně kyselými pH hodnotami. Jeden z těchto pigmentů má molekulu apigenin-7-glukosid (flavon) spojenou do glykosidického řetězce dvěma esterovými vazbami s kyselinou malonovou namísto aromatické kyseliny a je tak jediný známý antokyan s touto strukturou. Byla doložena existence hydrofóbních interakcí mezi skeletem chromoforu a acylovými nebo flavonoidními skupinami.<sup>40</sup>

### **3.6. Ostatní obsahové látky**<sup>3,4</sup>

Nejčasnější zpráva o extraktech od autora Nadkarni v knize Indian Materia Medica ukazovala přítomnost neutrálních tuků, alkaloidů, organických kyselin a jejich solí. Varadan a kol. izoloval kromě alkaloidů také  $\beta$ -sitosterol, kyselinu stearovou, olejovou, linolovou a fosforečnan hořečnatý.<sup>32</sup>

Při dalších fytochemických prověřováních byla odhalena přítomnost aminokyselin, cukrů, fenolických skupin, steroidů, flavonů, tříslovin a saponinů.<sup>36</sup> V rostlině jsou přítomny také nefenolické steroly, proteiny a uhlovodíky. Čerstvá rostlina obsahuje těkavé oleje a chlorid draselný.<sup>3,4</sup>

Ve výzkumu prováděném Bevajou a kol. byl z *Evolvulus alsinoides* L. izolován betain. Betain (trimethylglycin) je svými účinky na lidský organismus blízký cholinu, kyselině listové a vitamínu B12. Podílí se zejména na transmethylačních reakcích, kde působí jako donor methylové skupiny. Je důležitý pro správnou funkci jater a ledvin, uplatňuje se při syntéze L-karnitinu, při buněčném dělení a napomáhá detoxikaci tkání.<sup>31</sup>

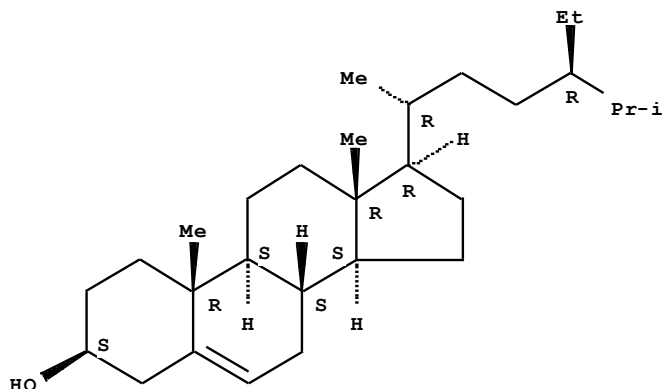


Obrázek č. 13: Betain

Při chemickém výzkumu *Evolvulus alsinoides* prováděném Mehtou a kol. byly z petroletherového extraktu získány tři látky  $\text{C}_{35}\text{H}_{72}$  (t.t. 75-76 °C),  $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$  (t.t. 65-66 °C),  $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{OH}$  (t.t. 135-136 °C), které byly identifikovány jako pentatriakontan, triakontan a  $\beta$ -sitosterol.<sup>41</sup>



Název dle chem. abstr.: Stigmast-5-en-3-ol, (3 $\beta$ )- (9CI)  
 Další názvy:  $\alpha$ -phytosterol,  $\beta$ -sitosterin,  $\beta$ -sitosterol  
 Vzorec: C<sub>29</sub> H<sub>50</sub> O



Obrázek č. 14:  $\beta$ -sitosterol

Název dle chem. abstr.: Pentatriacontane (6CI,7CI,8CI,9CI)  
 Další názvy: n-Pentatriacontane  
 Vzorec: C<sub>35</sub> H<sub>72</sub>  
 CH<sub>3</sub> – (CH<sub>2</sub>)<sub>33</sub> – CH<sub>3</sub>

Název dle chem. abstr.: Triacontane (6CI,8CI,9CI)  
 Další názvy: n-Triacontane  
 Vzorec: C<sub>30</sub> H<sub>62</sub>  
 CH<sub>3</sub> – (CH<sub>2</sub>)<sub>28</sub> – CH<sub>3</sub>

Byly také zkoumány oleje semen rostlin čeledi Convolvulaceae - *Convolvulus arvensis*, *Evolvulus alsinoides*, *Ipomoea biloba*, *Ipomoea hederacea*, *Ipomoea quamoclit* a *Ipomoea tuberosa*. Semena obsahují 6,7-16,5 % oleje. Mastné kyseliny zbavené nezmýdelnitelného podílu (bez dalšího ošetření, po hydrogenaci, po oxidaci) byly jednotlivě zkoumány na reverzních fázích sloupcové chromatografie (RPC). Zkoumání vzorků mastných kyselin pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) neodhalilo přítomnost žádné oxygenované kyseliny. Výsledky RPC dané v hmotnostních procentech u *Evolvulus alsinoides* byly následující: kyselina palmitová 8,4 %, stearová 14,8 %, olejová 4,4 %, linolová 4,3 %, linolenová 23,8 %, arachidonová 37,8 % a behemová 6,5 %. Žádné neobvyklé kyseliny nebyly v olejích detekovány. Nižší mastné kyseliny nebyly nalezeny v žádném z olejů ze semen.<sup>42</sup>

## 4. BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK

### 4.1. Účinky na vegetativní nervový systém

Předběžnou poznámku k farmakologii evolvinu poskytl Guruswami a kol. Evolvin, tekutý alkaloid, byl podán intravenózně psům za účelem detekce jeho účinku na krevní tlak a dýchání. Evolvin působil u psů silně stimulačně na dýchání a krevní tlak obdobně jako lobelin. Účinkoval pravděpodobně hlavně přes karotické chemoreceptory.<sup>43</sup>

Alkaloid evolvin má sympatomimetickou aktivitu.<sup>3</sup>

Ve vodě rozpustná frakce má účinek na žabí srdce a na izolovanou králičí střevní svalovinu.<sup>4</sup> Frakce „d“ (ve studii Baveja a kol.) v malých dávkách (0,02 mg) způsobila pokles frekvence a síly kontrakcí žabího srdce, zatímco ve vysokých dávkách (0,1 mg) vyvolala srdeční zástavu v diastole. Experimenty na králičí střevní svalovině ukázaly, že v dávkách od 1:500 000 do 1:250 000 způsobila frakce pokles amplitudy kontrakcí a zvýšila tonus střevní svaloviny.<sup>3, 4, 32</sup>

### 4.2. Účinky na centrální nervový systém

Rostlina *Evolvulus alsinoides* je dobře známá pro své paměť zlepšující, antiepileptické a imunomodulační vlastnosti v tradičním Indickém systému medicíny, ájurvédě.<sup>44</sup> Ve studii na krysách vykázal Shankhapushpi významnou antiepileptickou aktivitu v porovnání s placebem.<sup>45</sup>

### 4.3. Adaptogenní aktivita

S rostoucí pozorností směrem k rostlinám poskytujícím nespécifickou rezistenci proti stresu (adaptogeny), byly na hlodavcích hodnoceny nezpracované ethanolové extrakty *Evolvulus alsinoides* L. pro adaptogenní a paměť zlepšující vlastnosti. Adaptogenní aktivita byla zhodnocena na krysách vystavených akutnímu a chronickému neočekávanému stresu. Expozice stresu vyvolala u modelu akutního i chronického stresu žaludeční ulceraci se vzrůstem hmotnosti nadledvinek, plasma kreatinové kinázy (CK) a kortikosteroidní hladiny. Plazmatická hladina glukózy byla zvýšená jen u akutního stresu. Krysy byly léčeny odstupňovanými dávkami nezpracovaného ethanolového extraktu z *Evolvulus alsinoides* (100, 200 a 400 mg/kg perorálně) po tři dny a vystavené akutnímu stresu na tři dny za 45 minut po poslední dávce. Při chronickém

stresu byl extrakt podáván 45 minut před stresovým režimem po 7 dnů v dávce účinné perorálně v akutních studiích (200 mg/kg). *Evolvulus alsinoides* redukoval odchylky vyvolané stresem podobně jako *Panax quinquefolium* (100 mg/kg p.o.), dobře známý adaptogen.

*Evolvulus alsinoides* (100 mg/kg) byl podáván 3 dny orálně dospělému samci myši Swiss. Došlo ke zlepšení v periferních příznacích stresu a u demence indukované skopolaminem, což ukazuje adaptogenní a antiamnestické vlastnosti *Evolvulus alsinoides*.<sup>44</sup>

#### **4.4. Imunomodulační působení**

Imunomodulační vlastnosti rostlin *Evolvulus alsinoides* a *Emblica officinalis* byly prokazovány na modelu indukované artritidy u krysy. Injikování Freundova kompletního adjuvans do pravé zadní končetiny zvířat vyvolalo zánět. Sumární extrakty obou rostlin byly podány intraperitoneálně. Protizánětlivá odpověď obou extraktů byla dána proliferací lymfocytů a histopatologickou hloubkou synoviální hyperplazie. Oba extrakty výrazně redukovaly zánět a otok. Na buněčné úrovni nastala během časné fáze nemoci imunosuprese. U zvířat léčených těmito rostlinami zde došlo k mírné synoviální hyperplazii a infiltraci několika mononukleárními buňkami. Indukce syntázy oxidu dusnatého byla významně snížena u léčených zvířat v porovnání s kontrolami. Toto pozorování nasvědčuje tomu, že oba rostlinné extrakty způsobují imunosupresi, a ukazuje, že by mohly poskytnout alternativní přístup k léčbě artritidy v budoucnosti.<sup>46</sup>

#### **4.5. Antioxidační aktivita**

Rostliny používané v části ájurvédského léčitelství, která je známa jako Rasayana a poskytuje přístup k prevenci a léčbě degenerativních onemocnění, jsou klasifikovány jako omlazovače a mají silnou antioxidační aktivitu. Jen několik bylo prozkoumáno detailně. Tři takovéto rasayana rostliny byly poprvé testovány pro svou toxicitu a aktivitu ve vylučování volných radikálů jak in vitro tak ex vivo. Infúze ze tří rostlin (do 1 mg/ml) v MTT-testu nevykázaly toxické účinky na životnost PC12 buněčnou linii. Jak ethanolové extrakty tak vodné infúze rostlin byly testovány na jejich antioxidační aktivitu v dekolizační zkoušce radikálového kationu kyseliny 2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonové (ABTS). Inhibice lipidové peroxidace díky infúzím z rostlin byla provedena za použití spontánní lipidové peroxidace homogenátu z mozku krysy. Byly určeny hodnoty IC<sub>50</sub>. Výsledky ABTS zkoušky ukázaly, že etanolový extrakt ze *Sida cordifolia* byl nejvíce účinný (IC<sub>50</sub> 16,07 µg/ml), následuje

*Evolvulus alsinoides* (IC<sub>50</sub> 33,39 µg/ml) a *Cynodon dactylon* (IC<sub>50</sub> 78,62 µg/ml). Relativní antioxidační kapacita pro vodné infuze byla pozorována v následujícím pořadí: *E. alsinoides* (IC<sub>50</sub> 172,25 µg/ml) > *C. dactylon* (IC<sub>50</sub> 273,64 µg/ml) > *S. cordifolia* (IC<sub>50</sub> 342,82 µg/ml). Výsledky působení vodných infuzí rostlin na lipidovou peroxidaci byly následující: *E. alsinoides* (IC<sub>50</sub> 89,23 µg/ml) > *S. cordifolia* (IC<sub>50</sub> 126,78 µg/ml) > *C. dactylon* (IC<sub>50</sub> 608,31 µg/ml).<sup>47</sup>

Alkoholový extrakt *Evolvulus alsinoides* vykázal významnou aktivitu ve vychytávání volných radikálů in vitro. Fytochemické prověřování odhalilo přítomnost saponinů, steroidních sloučenin, triterpenoidů a glykosidů u *Evolvulus alsinoides*.<sup>48</sup>

#### **4.6. Alelopatický potenciál**

Alelopatický potenciál extraktů z *Evolvulus alsinoides* byl zkoumán v laboratorních podmínkách. Frakce rozpustné v n-hexanu, acetonu a vodě získané z acetonového extraktu nati *Evolvulus alsinoides* inhibovaly klíčení a růst kořenů a prýtlů šesti testovaných rostlinných druhů. Ve všech biologických zkouškách byla největší inhibiční aktivita u frakce rozpustné ve vodě, následovala frakce rozpustná v n-hexanu a acetonu. Se vzrůstem koncentrace extraktů byla pozorována významná redukce klíčení a růstu kořenů a hypokotylů. Odpovědi testovaných rostlin na působení jednotlivých frakcí závislé na koncentraci odhalily, že všechny tři frakce by mohly obsahovat alochemikálie (nečistoty chemického původu), největší potenciál byl však u frakce rozpustné ve vodě. Tyto výsledky ukazují, že *Evolvulus alsinoides* by mohl produkovat účinné alochemikálie.<sup>49</sup>

#### **4.7. Antiulcerózní a antikatatonická aktivita**

In vivo zhodnocení alkoholového extraktu *Evolvulus alsinoides* odhalilo jeho význačnou antiulcerózní a antikatatonickou aktivitu.<sup>50</sup> Katatonie je souhrn příznaků některých duševních poruch (např. schizofrenie), jako je ztuhlost s neschopností hýbat se a hovořit.<sup>51</sup>

#### **4.8. Antibakteriální a anthelmintická aktivita**

Antibakteriální aktivita extraktu z celé rostliny *Evolvulus alsinoides* byla zjišťována in vitro na *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. Methanolový extrakt projevil vysoký stupeň aktivity proti všem bakteriím. Acetonový

extrakt ukázal slabou aktivitu proti *Escherichia coli*. Inhibiční účinek extraktu byl srovnatelný s efektem použitých standardních antibiotik.<sup>52</sup>

Anthelmintická aktivita byla zkoušena na dospělci indického červa *Pheretima posthuma* pro jeho anatomickou a fyziologickou podobu s intestinálními parazity u člověka. Ethanolový extrakt způsobil paralýzu a následnou smrt červů na všech testovaných dávkových hladinách. Bylo pozorováno, že ethanolový extrakt *Evolvulus alsinoides* je účinnější než referenční kontrola piparezin citrátu. Účinnost extraktu byla nepřímo úměrná k času paralýzy/smrti červů. Aktivita potvrzuje povahu dávkové závislosti extraktu.

Antibakteriální aktivita nezpracovaného ethanolového extraktu byla ozkoušena metodou agarové misky. Výsledky antimikrobiální aktivity odhalily, že extrakt projevuje aktivitu proti *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*, ale je neúčinný na *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. Žádná z testovaných koncentrací nevykazovala srovnatelnou aktivitu s referenčním kontrolním trihydrátem ampicilinu. Tato studie ukazuje, že rostlina je také dotovaná potenciální anthelmintickou účinností vedle jejího populárního využití v tradičním systému medicíny.<sup>53</sup>

#### **4.9. Antisporulační aktivita**

Byly připraveny methanolové extrakty 40 rostlinných druhů běžně rostoucích po celé Indii a testovány na antisporulační aktivitu proti *Sclerospora graminicola* (Sacc.), Schroet., činiteli, který způsobuje ochmýřenou plíseň perlorodek. Sběrka představovala 38 rodů 30 čeledí. Aktivita extraktu *Evolvulus alsinoides* byla úměrná k prodáváním botanickým fungicidům. Antisporulační aktivita komercializovaného preparátu Azadirachta (Nutri-Neem) byla výraznější než u Reynutria a Sabadila. Tyto botanické preparáty odsunuly extrakty *Clematis gouriana* a *Evolvulus alsinoides* a syntetické fungicidy.<sup>54</sup>

#### **4.10. Ochranné a kosmetické využití**

K získání léčivého přípravku, který obsahuje akcelerátor produkce endoteliálního růstového faktoru, byl připraven extrakt bylin rodu *Evolvulus* (*Evolvulus alsinoides*, *Evolvulus boninensis*, *Evolvulus glomeratus* a další). Tento vyvinutý přípravek je bezpečný. Jeho účinek spočívá ve zlepšení hypooxidace při jaterní transplantaci, prevenci poranění endotelu jaterních dutin a ve zlepšení amyotrofické laterální sklerózy. Akcelerátor produkce endoteliálního růstového faktoru kapilár je složený z extraktu těchto rostlin.<sup>55</sup>

Extrakty bylin rodu *Evolvulus* (*Evolvulus alsinoides*) působí jako urychlovač vlasového stimulantu s vysokou bezpečností.<sup>56</sup>

Byl vyvinut přípravek na pleť obsahující peptidy proti stárnutí a další aktivní složky. Přípravek je složen z peptidového roztoku (glu-glu-met-gln-arg-arg) 10, glycerinu 5, methylparabenu 0,2, extraktu z *Evolvulus alsinoides* 2, doplněno vodou do 100 %.<sup>57</sup>

## 5. VYUŽITÍ ROSTLINY <sup>1,2</sup>

### 5.1. Využití rostliny v terapii

Řada indických léčivých rostlin byla používána po tisíce let v tradičním systému medicíny, ájurvédě. Mezi nimi jsou i rostliny používané ájurvédskými lékaři v péči u neurodegenerativních onemocnění jako je Parkinsonova nemoc, Alzheimerova choroba, ztráta paměti, degenerace nervů a další nervové poruchy. Ačkoliv etiologie neurodegenerativních onemocnění zůstává utajená, je zde důkaz, který naznačuje, že kritickými faktory mohou být defektní energetický metabolismus, excitotoxicita a oxidační poškození. Část ájurvédského systému, který poskytuje přístup k prevenci a léčbě degenerativních onemocnění je znám jako Rasayana a rostliny používané pro tento účel jsou klasifikovány jako omlazovače, léky proti stárnutí. Tato skupina rostlin všeobecně má silnou antioxidační aktivitu. Jen několik z nich bylo prozkoumáno detailně.<sup>41</sup>

Právě droga Shankpushpi byla široce používána v ájurvédské medicíně k ošetřování nervového systému. Není tomu dávno, co byla přivedena do amerických odchodů pro léčebné použití. Bylináři věří, že uklidňuje nervy regulací tělesné produkce stresových hormonů, adrenalinu a kortisolu. Pokud jsou tyto hormony v nerovnováze, člověk se pak snadno stane živým, úzkostným a vyplašeným. V ájurvédské medicíně se také věří, že je Shankpushpi lékem proti stárnutí nazývaným Rasayana

Přestože ájurvédští lékaři používali rostlinu po staletí, neexistuje žádný skutečný vědecký důkaz o příznivých účincích této byliny s výjimkou několika indických studií provedených v 70. a 80. letech 20. století. V těchto studiích byla bylina podávána po dobu šesti týdnů lidem trpícím úzkostí. Pacienti konstatovali, že mají více energie, lepší soustředění a kvalitnější spánek.<sup>58</sup>

#### **5.1.1. Hlavní indikace <sup>3</sup>**

1. nootropní činitel
2. chronická bronchitida
3. celková slabost

### 5.1.2. Klinické použití

#### **Celý organismus:** <sup>3, 4, 59</sup>

Rostlina *Evolvulus alsinoides* působí jako hořké tonikum (posilující lék) při celkové slabosti. Je používána jako Rasayana, prostředek zmlazující tělesné tkáně.

#### **Nervový systém:** <sup>3, 5, 9, 58, 59, 60</sup>

Rostlina má příznivé účinky na nervový systém, zvyšuje kvalitu nervové tkáně, proto se využívá jako mozkové tonikum a nootropní činitel, při nervovém vyčerpání, nervové ochablosti a ztrátě paměti, zlepšuje mozkové funkce jako je paměť a soustředění. Rostlina snižuje psychické napětí, je proto také používána jako psychostimulans a sedativum, k léčbě poruch spánku, stresu a úzkosti. Rostlina je dnes stále preferovanou metodou pro redukci symptomů spojených a úzkostí, projevy náhlé úzkosti, nervozitou a nespavostí. Pomáhá kvalitě spánku zlepšením koordinace mysli a těla. Potencuje barbiturátovou hypnózu. Je známa jako afrodisiakum.

#### **GIT systém:** <sup>5, 61</sup>

Rostlina je používána jako lék při střevních obtížích, obzvláště úplavici a jako prostředek podporující trávení a proti nadýmání.

#### **Dýchací systém:** <sup>3, 5</sup>

Cigarety vyrobené z listů jsou kouřeny u chronické bronchitidy a astmatu.

#### **Vegetativní systém:** <sup>3, 5</sup>

Bylina působí jako lék proti horečce (antipyretikum). Kořen je používán na intermitentní dětské horečky. Odvar z drogy s *Ocimum sanctum* je podáván při horečkách doprovázených zažívacími obtížemi anebo průjmem. Rostlina má antihypertenzní účinek.

#### **Antiinfekční vyžití:** <sup>3, 4, 5</sup>

Rostlina má antiseptické a antimalarické vlastnosti. Je používána jako anthelmintikum, hlístopudný lék při dysenterii (úplavici). Odvar byl podáván v případech malarické horečky. Je užívána při syfilis a krtici (tuberkulóza uzlin).



### **Metabolické využití:** <sup>5</sup>

Ethanolový extrakt rostliny redukuje celkovou hladinu cholesterolu, triglyceridů, fosfolipidů a neesterifikovaných mastných kyselin.

### **Další využití:** <sup>3, 5, 9</sup>

Rostlina je používána jako antiflogistikum, zvyšuje kvalitu kostní dřevě. Je prospěšná při vnitřních krváceních díky obsahu tříslovin. Odvar z bylin je podáván jako čistič krve. Olej z rostliny stimuluje růst vlasů.

### **5.1.3. Používané části rostliny**

K terapii se využívá celá rostlina v různých lékových formách.<sup>3, 61</sup>

### **5.1.4. Lékové formy a kombinace** <sup>3</sup>

#### **Lékové formy:**

sušená prášková bylina nebo její část  
tobolky s práškovou drogou nebo extraktem  
odvar (někdy s kmínem, bazalkou, mlékem)  
ethanolický extrakt  
cigarety vyrobené z listů  
olej z rostliny

#### **Kombinace:**

Výhodné jsou kombinace rostliny s ashwagandha (*Withania somnifera*), brahmi (*Bacopa monniera*) a *Ginkgo biloba*. Také je běžně kombinována s tulsi (*Ocimum sanctum*) jako tonizující čaj. Může být kouřena s vacha (*Acorus Calamus*) jako nervové tonikum.<sup>59</sup>

### **5.1.5. Dávkování**

Shankpushpi je dostupný v nejrůznějších formách a je přísadou mnoha produktů. Pro nejlepší výsledky léčby je důležité číst a následovat instrukce na obalu produktu.<sup>60</sup>

čerstvá šťáva (celá rostlina): 20-30 ml dvakrát denně <sup>3</sup>  
tinktura nebo extrakt 25%: 3-10 ml ve třech rozdělených dávkách <sup>31</sup>  
prášek z celé rostliny: 3-6 g dvakrát denně <sup>3</sup>  
sušená prášková droga: 2-10 g denně alespoň ve dvou rozdělených dávkách <sup>31</sup>

### 5.1.6. Bezpečnost a interakce

Shankhpushpi je všeobecně považován za bezpečný lék pokud je užíván v doporučených dávkách, avšak pokud jsou současně užívány jiné léky nebo potravní doplňky, je nejlepší promluvit si s lékařem nebo kvalifikovaným bylinářem před použitím této rostliny. Bezpečnost pro malé děti, těhotné a kojící ženy nebo pacienty s vážným onemocněním ledvin a jater není známa.<sup>61</sup>

V průběhu běžného sledování plazmatických hladin léčiv byla zaznamenána neočekávaná ztráta kontroly záchvatu nemoci a redukce v plazmatických hladinách fenytoinu u dvou pacientů, kteří užívali také Shankhpushpi (SRC). Následná studie zkoumající interakce mezi SRC a fenytoinem jak z farmakokinetického tak farmakodynamického hlediska byla provedena na krysách. Jednodávkové podání SRC a fenytoinu (p.o./i.p.) nemělo žádný efekt na plasmatické hladiny fenytoinu, ale způsobilo významný pokles antiepileptické aktivity fenytoinu. Při několikedávkovém podání SRC redukoval nejenom antiepileptickou aktivitu fenytoinu, ale také snížil jeho plazmatické hladiny. SRC samotný vykázal významnou antiepileptickou aktivitu v porovnání s placebem. Přesto klinická kombinace SRC s fenytoinem není doporučována.<sup>45</sup>

### 5.2. Jiné použití rostliny

Rostlina *Evolvulus alsinoides* se také kultivuje a je využívána v ozdobném zahradnictví v několika varietách. Pro pěstování v našich podmínkách vyžaduje rostlina málo vláhy, přímé slunce, půdu chudou na živiny a ochranu před zimní vlhkostí.<sup>31</sup>

Rostlina je schopna kumulovat ve vysokých koncentracích ve svých tkáních těžké kovy. Studie prováděné v Indii zjistily, že množství chrómu v některých exemplářích *Evolvulus alsinoides* přesahuje 60 mg/kg hmotnosti suché drogy.<sup>31</sup> Studie zabývající se zkoumáním půdy a vegetace na čtyřech z pěti známých ultramafických místech Srí Lanky zjistila, že hromadění různých prvků v tkáních je typické pro rostliny rostoucí na ultramafických substrátech, z nichž žádný taxon nebyl na ostrově endemický ani rostoucí jen na ultramafické půdy. *Evolvulus alsinoides* vykázal hyperakumulaci niklu (více než 1000 mg/g suché tkáně).<sup>62</sup>

Tato schopnost by se mohla v budoucnu využívat při detoxikaci zamořených oblastí, ale mohla by znamenat i závažnou překážku při léčebném využití.<sup>31</sup> Ozdravení míst kontaminovaných těžkými kovy s použitím rostlin předkládá slibnou alternativu ke stávajícím metodám.<sup>63</sup>

## 6. VYBRANÉ PŘÍPRAVKY OBSAHUJÍCÍ *Evolvulus alsinoides* L.

### 6.1. Všeobecné údaje o přípravcích

Přípravky obsahující *Evolvulus alsinoides*, ve většině případů v kombinaci s dalšími bylinami, představují přírodní rostlinnou alternativu pro zlepšení paměti a koncentrace, při poruchách pozornosti a neschopnosti učit se. Ájurvedské alternativní bylinné produkty mohou být přírodní náhradou ritalinu, imipraminu a dalších látek. Tyto byliny, koření, potraviny byly tradičně používány v ájurvédě a západním bylinkářství pro své blahodárné účinky na lidský organismus. Byly využívány pouze tradičně v bylinném lidovém léčení, nebyl proveden žádný klinický důkaz o účincích. Proto je před jejich použitím doporučováno poradit se s lékařem. Byliny mohou být využity samostatně nebo v kombinacích. Řada z nich může být zakoupena v místních obchodech zdravé výživy nebo asijských potravinách a použita také při vaření. Nejsou určeny k tomu, aby nahradily léčbu nebo lékaře. Je doporučováno, aby byly užity s vlastní vírou a porozuměním v ájurvédu.

Příklady využívaných drog: list *Evolvulus alsinoides* (Shankhapushpi), list *Hydrocotyle asiatica* (Gotu Kola), *Bacopa monieri* (Nir-Brahmi), kořen *Withania somnifera* (Ashwaganda), semeno *Cola acuminata* (Kola Nut), list *Turnera aphrodisiaca* (Damiana), nať *Scutellaria* sp. (Skullcap), semeno *Apium graveolens* (Ajwan), list *Ocinum Sanctum* (Tulasi), plod *Piper longum* (Pippali), *Ginkgo biloba*.

Rostliny se tradičně využívají při těchto symptomech: zapomnětlivost, pomoc k meditaci, zvýšení mentální bdělosti a bystrosti, podpora koncentrace, uvědomění a soustředění, zlepšení paměti, podpora procesu myšlení, při emocionální nerovnováze, k redukci mentálního vyčerpání, pro zlepšení uměleckých a tvůrčích schopností, zvýšení inteligence a představivosti.

Nebyla provedena žádná klinická zkouška, která by dokázala, že produkty jsou prospěšné v případě některého z výše uvedených symptomů.

Upozornění: Na internetových stránkách, kde jsou tyto přípravky reklamovány se objevují i další upozornění. Firmy vyrábějící takovéto produkty mají zakázáno tvrdit, že přípravky jsou určeny k předcházení, léčení, úpravě, odstraňování nebo diagnostice jakékoliv nemoci. Jsou povinny označit tyto produkty jako potravní doplňky. Všechny dostupné údaje

slouží pouze pro informativní účely. Žádné z těchto tvrzení ani produkty nebyly schváleny FDA (Food and Drug Administration). Před použitím těchto produktů je třeba vždy žádat o radu poskytovatele zdravotnické péče.<sup>60, 64, 65</sup>

## **6.2. Některé dostupné přípravky**

**EVOCEN<sup>®</sup>** - přípravek pro lepší paměť a koncentraci



Obrázek č. 15: Přípravek Evocen<sup>®</sup>

Tento produkt byl připraven ve spolupráci s Farmaceutickou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Přípravek disponuje silnými antioxidačními vlastnostmi a má pozitivní efekt na mozkové funkce.

Přípravek je složený ze dvou bylinných extraktů v kapslích, *Centella asiatica* (pupečník asijský) 155 mg a *Evolvulus alsinoides* 155 mg. *Centella asiatica* disponuje silnými antioxidačními vlastnostmi a je velice prospěšná pro nervový systém. *Evolvulus alsinoides* má adaptogenní, protistresové a uklidňující vlastnosti. Účinkuje jako paměťové tonikum.

Přípravek zlepšuje prokrvení tkání, příznivě ovlivňuje funkce mozku, stimuluje poznávací funkce a intelekt, zvyšuje schopnost koncentrace, snižuje riziko vzniku časně zapomnětlivosti. Saponiny obsažené v *Centella asiatica* také zvyšují syntézu kolagenu, což je prospěšné pro cévní systém. Tento účinek působí příznivě při stavech chronické cévní nedostatečnosti, zejména v souvislosti se stavy po prodělané mozkové příhodě. Přípravek vykazuje značné antioxidační účinky. Zmírňuje negativní působení stresu na organismus, potlačuje stavy úzkosti.

Přípravek je vhodný zejména pro osoby středního věku a seniory. Výrobek není určen pro děti, těhotné a kojící ženy.

Dávkování je 2-4 kapsle za den. Přípravek je dostupný v balení, které obsahuje 60 kapslí.<sup>66, 67</sup>

**SHANKAPUSHPI RASAYANA #20**

Přípravek zlepšuje soustředění a paměť. Je ve formě džemu složeného z bylin a koření v medovém základu, rýžovém sirupu a čištěném másle. Užívá se 1 čajová lžička na 25 kg tělesné hmotnosti přednostně ráno na prázdný žaludek. Pokud je přípravek užit příliš pozdě ve dne, může v noci způsobit nespavost.

Přípravek je složený z řady bylinných extraktů (list *Evolvulus Alsinoides*, list *Hydrocotyle asiatica*, *Bacopa monieri*, list *Ginkgo biloba*, kořen *Withania somnifera*, semeno *Cola acuminata* a další) a rostlinných prachů (list zeleného čaje, kořen *Zingiber officinale*, semeno *Myristica fragrans*, semeno *Elettaria cardamomum*, květ *Hibiscus rosa-sinensis*).<sup>64</sup>

### **SHANKHAPUSHPI (EVLVULUS ALSINOIDES) (nervové tonikum ve formě rostlinného prachu)**

Přípravek účinkuje a používá se v ájurvédě k podpoře paměti a soustředění, ke zlepšení krevní cirkulace do mozku, omlazení. Kvalita a použitá část rostliny jsou vysoce důležité ve výrobě a zpracování bylinných prachů, určité části jsou účinnější než ostatní, vlákna a další nechtěný materiál by měly být odstraněny, protože nemají žádné léčivé vlastnosti (kromě zvýšení váhy a množství). Vlastnosti samotné rostliny se mohou různit oblast od oblasti. Zrání a včasná sklizeň jsou dalším důležitým faktorem pro sílu každé jednotlivé byliny. Jsou zde směrnice pro sběr různých bylin v různých časech a časové rozpětí pro sběr jednotlivých bylin. Předpokládá se, že byliny rostoucí v přírodě jsou silnější a účinnější než kultivované, protože stanoviště hraje důležitou roli. Všechny faktory musí být zváženy velice opatrně a důsledně. Přípravek je laboratorně testován na kvalitu, čistotu a těžké kovy.<sup>68</sup>

### **MUKTA VATI**

Mukta Vati je ájurvedský lék na úzkost, nespavost, hypertenzi. Nemá žádné vedlejší účinky, je bezpečný. Je to jedinečný prostředek k léčbě vysokého krevního tlaku, který obsahuje ájurvédské časem ozkoušené byliny u nichž je známo, že pomáhají lidem s vysokým krevním tlakem, úzkostí a nespavostí. Podáván s individuální dietou, může účinkovat rychle, řada pacientů vidí výsledky během 2-4 dnů. Mukta Vati užitím vzácných bylin také ulehčuje od symptomů vysokého krevního tlaku jako je nespavost a úzkost.

Dávkování je 2 tablety dvakrát denně, užívá se hodinu před snídaní a hodinu před večeří. Může být použit i při užívání jiných léků, nezpůsobuje zkřížené reakce a nevyvolává žádné vedlejší účinky. Opět je nutno uvědomit lékaře, obzvláště při probíhající jiné léčbě.

Přípravek je složen z bylin *Bacopa monieri*, *Evolvulus alsinoides* L., *Inula racemosus*, *Acorus calamus*, *Celastrus paniculatus*, *Withania somnifera*, *Onasma bracteatum*, *Tinospora cordifolia*, prach z červených korálů a perel.

Přípravek je dostupný v balení po 120 tabletách.<sup>9, 66</sup>

## **PEDI TONE NATURAL HERBAL TONIC - 10 FL. OZ.**

Přípravek představuje přírodní rostlinnou úlevu od plynatosti a problémů s prořezáváním zubu u miminek. Ájurvédský systém medicíny klade důraz na správné funkce zažívacího traktu jako klíč ke zdraví a normálnímu růstu u dětí. Poškození zažívacího traktu je odpovědné za všechna onemocnění a poruchy, proto léčba všech poruch běžně se vyskytujících u kojenců a dětí zahrnuje jako výchozí krok úpravu abnormalit zažívacího traktu. Produkt obsahuje rostliny, které upravují abnormality spolu s rostlinami specificky účinkujícími na poruchy jako je zvracení, průjem, zácpa. *Evolvulus alsinoides* obsažený v tomto přípravku zlepšuje paměť a pomáhá v případech nervové slabosti. Takto Pedi Tone zlepšuje chuť a trávení, působí jako projímavé a celkové tonikum.

Přípravek je složen z vodných extraktů získaných z mnoha rostlin a koření (*Aconitum heterophyllum*, *Plumbago zeylanica*, *Berberis aristata*, *Piper longum*, *Zingiber officinale*, *Curcuma longa*, *Elettaria cardamomum*, *Asparagus racemosus*, *Foeniculum vulgare*, *Aloe barbadensis*, *Glycyrrhiza glabra*, *Acorus calamus*, *Carum copticum*, *Evolvulus alsinoides* a další v základu, který tvoří sirup z medu a cukru.<sup>69</sup>

## **BRAIN TONIC, 100% NATURAL, 375MG - 60 CAPS**

Ájurvédské složení přípravku je používáno jako pomoc pro zlepšení paměti, duševní bystrosti a předvídatosti tím, že pomáhá regenerovat porozumění a sebedůvěru. Revitalizuje mozkové funkce a také obnovuje normální metabolismus mozku. Přináší pocit uvědomění a redukuje běžné letargické cítění. Normalizací depresivního nebo hyperexcitovaného stavu mysli pomáhá tento přípravek redukovat emocionální napětí.

Přípravek je složen ze standardizovaného extraktu *Bacopa monnieri*, *Evolvulus alsinoides* a *Celastrus paniculatus*.<sup>70</sup>

## **CHYAWANPRASH**

Jedná se o dobře prozkoumaný 100 % přírodní bylinný džem, který je podáván dětem a starším lidem nebo těm, kteří se zotavují z vysilující nemoci. Pomáhá každému, kdo ho užívá, k podpoře imunity při nemoci a zlepšení přirozené schopnosti těla růst zdravou cestou. Je zde vědecký důkaz, který podporuje užití přípravku jako celkového tonika, které dává sílu a ráznost všeskeré fyziologii.

Velmi málo firem v Indii stále dodržuje originální složení v jeho úplnosti díky obtížnosti získávání některých potřebných bylin a značnému času přípravy. Nicméně je zajímavé, že všechny byliny skutečně stále existují. The National Institute Of Ayurvedic Medicine (NIAM)

jde za problémem získávání všech těchto medicínálních rostlinných materiálů a následuje podložené směrnice v přípravě tohoto tonika.<sup>59</sup>

### **MENTAT (péče o mysl)**

*Evolvulus alsinoides* tvoří jednu ze složek bylinného psychotropního preparátu BR-16A (Mentat) používaného v péči u nervových poruch. Přípravek je ve formě tablet a sirupu. Dlouhodobé podávání přípravku Mentat nemělo žádné nepříznivé účinky. Při studiích na myších bylo shledáno, že Mentat má nootropní vliv a usnadňuje učení a paměť. Je to cenný doplněk k běžně používaným antiepileptickým drogám. Mentat je bezpečná neanalgetická rostlinná náhrada, která může být použita v léčbě opiátové závislosti. Je také účinný pro zmírnění abstinčních příznaků po chronickém podávání alkoholu.

Mentat zlepšuje mentální funkce modulací (ztlumením) cholinergní a GABAergní neurotransmise. Mentat zdokonaluje mentální kvocient, rozsah paměti, schopnost koncentrace a stresový práh obnovením aktivit frontálních kortikálních muskarinových a cholinergních receptorů. Mentat pomáhá redukovat hladinu tribulinu, endogenního inhibitoru monoaminoxidázy, který je zvýšený na různých úrovních úzkosti. Mentat také zlepšuje kolísání pozornosti a poruchy chování, vykazuje významnou antiparkinsonickou aktivitu zvýšením aktivity dopaminového postsynaptického receptoru. Sedativní a utišující účinky Mentatu poskytují ochranu proti křečím a záchvatům a jsou také prospěšné při nespavosti. Mentat zlepšuje artikulaci a upravuje poruchy řeči. Není známo, že by měl vedlejší účinky při užívání v předepsaném dávkování.

Při dávkování je nutno domluvit se s lékařem, aby předepsal dávku, která nejlépe vyhovuje individuálním podmínkám.

Mentat tablety jsou prospěšné, pokud se objeví následující symptomy: porucha paměti (kolísání pozornosti, zhoršení koncentrace, jazyková a učební neschopnost, závislost na alkoholu, poruchy chování, hyperkinetické stavy, asociální chování, prudký výbuch hněvu (vztek, nálada), agresivní chování, pomočování (enureza), úzkostné poruchy související s úzkostí a stresem, mentální vyčerpanost, defekty řeči, podpůrná terapie ke zmírnění mentální retardace a jako pomocná látka u epilepsie, Alzheimerovy choroby a Parkinsonovy choroby.

Přípravek je složen z extraktů různých rostlin (*Bacopa monnieri* 136 mg, *Centella asiatica* 70 mg, *Withania somnifera* 52 mg, *Evolvulus alsinoides* 52 mg, *Nardostachys jatamansi* 52 mg, *Valeriana wallichii* 50 mg a další) a rostlinných prachů (*Bacopa monnieri* 80 mg, *Mucuna pruriens* 18 mg, *Elletaria cardamomum* 18 mg, *Terminaria arjuna* 18 mg).<sup>71</sup>



### **ANXOCARE (anxiolytikum, modifikátor chování, zlepšuje paměť)**

Jedná se o přípravek, který je určený pro psi a kočky. Působí jako anxiolytikum, modifikátor chování a zlepšuje paměť.

Přípravek je používán k vypořádání se s problémy s chováním jako je agrese, nervozita, neklid, hyperexcitabilita (modifikátor chování), k podpoře lepší vnímavosti a schopnosti učit se (zlepšení paměti), při nespecifické úzkosti a agresi, emocionálním stresu a stresu ze strachu k prostředí, hluku a cestování (anxiolytikum).

Dávkování může kolísat dle plemena nebo závažnosti stavu, nebo dle nařízení veterináře. Obvykle se podává u malých plemen psů 1-2 ml 2x denně, u velkých plemen psů 2-3ml 2x denně a u koček 1-2 ml 2x denně.

Každý ml přípravku obsahuje extrakty *Bacopa monnieri* 30 mg, *Centella asiatica* 16 mg, *Withania somnifera* 16 mg, Shankhapushpi 16 mg, *Celastrus paniculatus* 14 mg, *Prunus amygdalus* 12 mg (pod pojmem Shankhapushpi je zde uvedena rostlina *Convolvulus microphylus*).

Přípravek je balen v láhvi po 100 ml tekutiny.<sup>72</sup>

# IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 1. VŠEOBECNÉ POSTUPY

### 1.1. Destilace rozpouštědel

Při práci byla použita nová balení komerčně vyráběných rozpouštědel, nebylo třeba rozpouštědla destilovat.

### 1.2. Sloupcová (kolonová) chromatografie (CC)

#### **1.2.1. Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii**

Komerční silikagel byl tříděn síťováním, vybraná velikostní frakce byla vsypána do chromatografické kolony, promyta chloroformem, potom methanolem a na bezprašném místě ponechána do vyschnutí. Čistý silikagel byl aktivován 4 hodiny při 160 °C v sušárně ve vrstvě ne vyšší než 2 cm. Po zchladnutí byl deaktivován přidavkem 10 % destilované vody.

#### **1.2.2. Plnění sloupce adsorbentem**

Chromatografický sloupec daných rozměrů, jehož výpusť byla překryta malým kouskem buničité vaty, byl plněn naléváním řídké suspenze silikagelu v mobilní fázi při mírně otevřeném odtoku.

#### **1.2.3. Příprava roztěru pro nanesení na sloupec**

Vzorek byl rozpuštěn v přiměřeném množství vhodného rozpouštědla a smíchán se silikagelem v poměru 1:2. Takto připravený roztěr byl v odpařovací misce řádně vysušen při teplotě 40 °C na vodní lázni za stálého míchání. Dosušen byl ve vakuovém exikátoru nad oxidem fosforečným po dobu 24 hodin.

#### **1.2.4. Nanesení roztěru na sloupec**

Roztěr byl rovnoměrně nanesen pomocí nálevky na předem připravený sloupec přímo do rozpouštědla. Nanesený roztěr byl překryt filtračním papírem, buničitou vatou a zatížen vrstvou skleněných kuliček. Chromatografie byla prováděna způsobem stupňovité eluce.

### **1.3. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)**

Roztoky frakcí v rozpouštědle byly nanášeny na komerčně vyráběné chromatogramy různých rozměrů. Po vysušení byly chromatogramy vyvíjeny vzestupně v chromatografických komorách, které byly předem nasycené parami mobilní fáze. Komory byly syceny parami rozpouštědel 20 min resp. 2 hodiny dle velikosti a tvaru nádoby.

### **1.4. Zahušťování frakcí (roztoků látek)**

Zahušťování bylo prováděno na vakuové rotační odparce za sníženého tlaku (cca 1,33 kPa) při teplotě do 50 °C, nebo odpařením rozpouštědla proudem dusíku nebo vzduchu za normálního tlaku a mírně zvýšené teploty (do 40 °C) na vodní lázni.

### **1.5. Sušení**

Látky byly sušeny ve vakuovém exikátoru za normální teploty a sníženého tlaku (cca 1,33 kPa) nad oxidem fosforečným.<sup>73, 74</sup>

## 2. POTŘEBY A POMŮCKY

### 2.1. Rozpouštědla

voda destilovaná  
aceton p.a.  
chloroform p.a.  
chloroform č.  
methanol p.a.  
ethanol 96% č. (denaturovaný methanolem)  
toluen p.a.  
petrolether p.a.

### 2.2. Chemikálie

kyselina chloristá 70%  
kyselina sírová 96%  
vanilin  
berberin  
kyselina palmitová  
kyselina stearová  
kyselina fosfomolybdenová  
kyselina oleanolová  
ε-amyryn  
β-amyryn  
rutin  
β-sitosterol  
kyselina chlorogenová  
skopoletin  
umbelliferon  
4-hydroxykumarin

### **2.3. Detekční činidla**

D1: UV  $\lambda = 254$  nm

Chromatogram je pozorován pod UV lampou při vlnové délce 254 nm.

Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě tmavých skvrn, ve kterých je zhasen fluoreskující luminofor vrstvy chromatogramu.

D2: UV  $\lambda = 366$  nm

Chromatogram je pozorován pod UV lampou při vlnové délce 366 nm.

Pozitivní reakce se projevuje vznikem fluoreskujících skvrn různého zbarvení.

D3: vanilin-kyselina chloristá

1% roztok vanilinu v ethanolu se v čas potřeby smísí s 3% roztokem kyseliny chloristé v poměru 1:1. Po postřiku se chromatogram zahřívá na cca 100 °C.

Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě barevných skvrn.

**D4: vanilin-kyselina sírová** <sup>74</sup>

1% roztok vanilinu v ethanolu se v čas potřeby smísí s kyselinou sírovou v poměru 10:1. Chromatogram se ihned po postřiku zahřívá při 120 °C až do úplného rozvinutí barev.

Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě barevných skvrn.

**D5: berberin** <sup>75</sup>

10 mg berberin chloridu se rozpustí ve 100 ml ethanolu. Chromatogram se homogenně postříká, nechá se vysušit v proudu chladného vzduchu a pozoruje se pod UV  $\lambda = 254$  nm nebo UV  $\lambda = 366$  nm.

Pozitivní reakce se projevuje světle žlutě fluoreskujícími skvrnami na slabě žlutě fluoreskujícím pozadí. Je nutno použít Silufol bez fluorescenčního indikátoru.

Poznámka: pro nedostupnost berberin chloridu byl pro přípravu činidla použit berberin síran

**D6: kyselina fosfomolybdenová** <sup>75, 76, 77</sup>

Připraví se 10% roztok kyseliny fosfomolybdenové v ethanolu. Po vyvinutí se chromatogram vysuší v proudu teplého vzduchu a stříká se, až získá rovnoměrné žluté zabarvení. Chromatogram se po postřiku zahřívá na 120 °C do optimálního vybarvení skvn. Při detekci lipidů se chromatogram musí předem zahřát až na 160-180 °C a detekovat za horka. Pozitivní reakce se projevuje vznikem modrých skvrn na žlutém pozadí. Dlouhé zahřívání může mít za následek ztmavnutí pozadí.

#### **D7: páry jodu**<sup>76</sup>

Chromatogram se vloží do uzavřené komory, na jejíž dno bylo předem položeno několik krystalů jódu. Jódové páry se tvoří rychleji, pokud je komora mírně zahřívána. Řada organických sloučenin poskytuje v jódových parách hnědé skvrny.

### **2.4. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (mobilní fáze)**

- S1 - chloroform : toluen (90:10)
- S2 - petrolether : toluen (50:50)
- S3 - toluen
- S4 - n-hexan
- S5 - toluen : n-hexan (50:50)
- S6 - chloroform
- S7 - chloroform : toluen (95:5)
- S8 - chloroform : ethanol (95:5)
- S9 - chloroform : methanol (90:10)
- S10 - chloroform : methanol (75:25)
- S11 - chloroform : methanol (95:5)
- S12 - chloroform : toluen (70:30)

### **2.5. Chromatografické adsorbenty**

- A1 - Silikagel L 0,1-0,2 mm desaktivovaný 10 % vody
- A2 - TLC hliníková fólie Silikagel 60 F 254 Merck  
(tloušťka vrstvy 0,2 mm)
- A3 - TLC hliníková fólie Silikagel 60 Merck  
(bez fluorescenčního indikátoru, tloušťka vrstvy 0,2 mm)



## **2.6. Laboratorní sklo**

Zkumavky

Kádinky

Odměrné válce

Odpařovací baňky

Nálevky

Pipety

Pasteurova pipeta

Kapiláry

Erlenova baňka se zábrusem

Vialky s umělohmotným víčkem

## **2.7. Přístroje**

Váhy digitální KERN 440-53

Váhy digitální analytické AND HR-120

Vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114

Vodní lázeň Buchi Waterbath B-480

Horkovzdušná sušárna HS 31A

UV lampa Camag 254/366 nm

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10 P

Digitální stopky Eurochron



## **3. INSTRUMENTÁLNÍ METODY A ZKOUŠKY BIOLOGICKÉ AKTIVITY**

### **3.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

#### **Úvod**

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. Jejich přednosti vyniknou především při analýzách směsí látek, kdy ostatní analytické metody nelze principiálně použít. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, jejíž vývoj začal v 70. letech 20. stol., umožňuje analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek a polymerů a odstraňuje tak hlavní nedostatek plynové chromatografie. Při použití vhodného detektoru umožňuje provést identifikaci, kontrolu čistoty a stanovení obsahu v jednom kroku. Je vhodná i pro monitorování hladiny léků a metabolitů v tělních tekutinách.

#### **Princip**

U klasické kapalinové chromatografie mobilní fáze protéká kolonou samospádem. Čím menší a stejnoměrnější jsou jednotlivé částice stacionární fáze, tím větší je účinná plocha a separační účinnost, jak je tomu v případě HPLC. Pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze je však zapotřebí ji protlačit kolonou pomocí čerpadla pod vysokým tlakem. Dělení látek nastává mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku.

#### **Přístrojové vybavení**

Separace látek a jejich analýza metodou HPLC se provádí pomocí kapalinového chromatografu, jehož součástí jsou zásobníky mobilní fáze, vysokotlaká čerpadla, směšovač, manometr, předkolona, dávkovač, kolona, detektor, sběrač frakcí, zapisovač a integrátor.<sup>78</sup>

### **3.2. Infračervená spektrofotometrie (IČ)**

#### **Úvod**

Infračervená spektrofotometrie je dnes v praxi běžně používanou analytickou metodou zejména pro identifikaci sloučenin a řešení strukturního uspořádání v molekule. Hlavní využití

spočívá v kvalitativní analýze, tedy především při určování identity sloučenin, jejich čistoty a zejména pak při určování strukturního uspořádání v molekule.

### **Princip**

Metoda je založena na absorpci částic záření jednotlivými molekulami analyzovaného vzorku. Absorpci infračerveného záření, jehož energie je v porovnání s UV zářením malá, se nemění elektronový stav molekuly, ale dochází ke změnám ve vibračních a rotačních pohybech molekuly. Absorbovaná kvanta energie zvyšují vnitřní energii molekuly připadající na vibrace atomů v molekule a rotace jednotlivých částí molekuly. Jednotlivé vibrační vlnočty závisí na uspořádání atomů v molekule, na hmotnosti atomů a na pevnosti chemických vazeb mezi atomy. Přitom platí, že čím je vazba pevnější, tím více se absorpční pás posouvá k vyšším vlnočtům a naopak, čím jsou atomy těžší, dochází k absorpci při nižších vlnočtech.

### **Přístrojové vybavení**

IČ spektra se proměřují pomocí infračervených spektrofotometrů, které pracují na dvoupraprskovém principu a naměřené hodnoty registrují ve formě absorpčního spektra. V praxi se nejčastěji měří a udávají absorpční spektra jako závislost procenta propustnosti na vlnočtu v oblasti  $4000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ . IČ spektrofotometr se skládá ze zdroje záření, monochromátoru, kyvety pro měřený a slepý vzorek, detektoru záření a měrného zařízení.<sup>78</sup>

## **3.3. Nukleární magnetická rezonance (NMR)**

### **Princip**

Podle chování v magnetickém poli lze jádra všech prvků rozdělit do dvou skupin na jádra s magnetickým momentem a jádra bez magnetického momentu. Nukleární magnetickou rezonanci lze vyvolat jen u jader s magnetickým momentem. Mezi ně patří jádra, která mají lichý počet protonů nebo nukleonů. Z praktického hlediska se jeví jako nejvýznamnější NMR jader o kvantovém čísle  $\frac{1}{2}$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ). Hovoříme potom o  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -HNMR,  $^{15}\text{N}$ -NMR, ... spektroskopii. Jádra s větším kvantovým číslem ( $^2\text{H}$ ,  $^{10}\text{B}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ) dávají příliš složitá NMR spektra a jsou tedy méně vhodná pro praktickou aplikaci. Mezi jádra bez magnetického momentu patří například  $^{12}\text{C}$  a  $^{16}\text{O}$ , proto je nemůžeme měřit, i když se často vyskytují v organických molekulách.

## **Přístrojové vybavení**

Nejčastěji kapalný vzorek je při NMR spektroskopii umístěn mezi póly silného elektromagnetu. Působením tohoto magnetického pole dochází k energetickému odlišení mezi oběma spinovými stavy. Při měření je vzorek ozařován vysokofrekvenčními pulzy, dochází tak k předávání energie vzorku a jeho excitaci, důsledkem toho je přechod z jednoho spinového stavu do druhého. Při relaxaci do původního stavu dochází k uvolnění energie, která je registrována (závislost energie na čase) a Fourierovou transformací převedena na spektrum (závislost intenzity signálu na frekvenci).

## **Interpretace NMR spektra**

Na osu x NMR spektra nebývá vynášena frekvence, ale chemický posun  $\delta$ , což je bezrozměrná veličina uváděná obvykle v ppm, pro kterou platí definiční vztah  $\delta = (\nu - \nu_0) / \nu$ , kde  $\delta$  je chemický posun v ppm,  $\nu$  je naměřená frekvence,  $\nu_0$  frekvence odpovídající standardu a  $\nu$  je frekvence přístroje v MHz. Tento přepočítání zajišťuje, že i když měříme tu stejnou látku na přístrojích s různou frekvencí, vždy nalezneme signál měřené látky na stejném místě ve spektru. Na osu y je vynášena relativní intenzita signálu. Při NMR spektroskopii se pro jednotlivé signály získají následující údaje: chemický posun, intenzita, multiplicita.<sup>79</sup>

## **3.4. Plynová chromatografie/ hmotnostní spektrometrie (GC/MS)**

### **Úvod**

Plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS) je kombinovaná metoda využívající separačních vlastností plynové chromatografie s identifikační schopností hmotnostní spektrometrie. Tato kombinace produkuje 3D data, která poskytují kvantitativní a kvalitativní informace. GC/MS je schopná oddělit směs sloučenin a přesně je identifikovat, je tedy mocným prostředkem obzvláště při zacházení s neznámými sloučeninami.<sup>80</sup>

### **Princip**

Plynová chromatografie je separační technika založená na principu různé migrace separovaných složek mezi mobilní a stacionární fází v chromatografické koloně. Jako mobilní fáze se používá plyn, jako stacionární převážně polymer, kterým je pokryt chromatografický nosič nebo je umístěn na vnitřní straně křemenné kapilární kolony vhodného vnitřního průměru a délky.

Základním principem separace je různá rozpustnost jednotlivých složek vzorku ve stacionární fázi. Analyzovaná směs je do kolony vnášena ve formě par, které vznikají vypařením vzorku ve vyhřátém injektoru. Jednotlivé složky jsou unášeny kolonou vhodným nosným plynem. K detekci separovaných složek ve vzorku se používají různé typy detektorů.<sup>81</sup>

Hmotnostní spektrometrie je věda a technologie plynných iontů prvků, molekul nebo jejich fragmentů. Základním přínosem této techniky je určení hmotnosti těchto iontů, na jejímž základě může být provedena predikace jejich identity. Tato technika je univerzální pro atomy, anorganické i organické molekuly. Nejčastěji je připojena k některé ze separačních metod, např. plynové nebo kapalinové chromatografii.

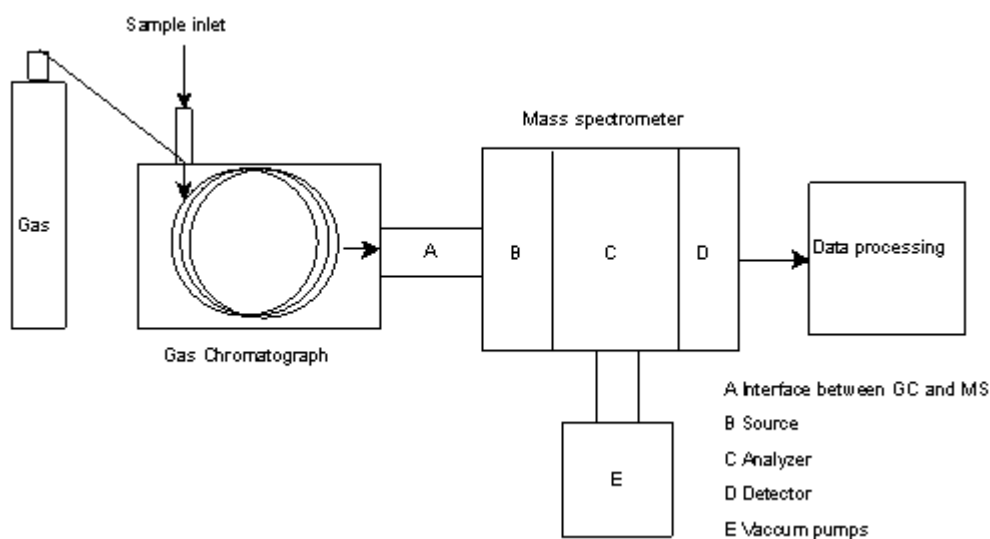
Hmotnostní spektrometrie je instrumentální metoda, při níž se z elektroneutrálních molekul nebo prvků vytváří ionty, které se při přebytku získané vnitřní energie mohou dále štěpit na fragmenty nesoucí náboj, radikály a neutrální částice. Nabité částice (molekulární a fragmentové ionty) jsou pak separovány podle poměru hmotností k náboji ( $m/z$ ). Prvním krokem hmotnostní analýzy je převedení molekul nebo atomů analytu na ionty v plynné fázi. Proces, při kterém z neutrálních částic vznikají ionty, se nazývá ionizace a probíhá v iontovém zdroji. Do současnosti byla vyvinuta celá řada ionizačních technik. Nejvíce používané jsou elektronová ionizace (EI), chemická ionizace (CI), ionizace elektrickým polem (FI). Druhým krokem je analýza iontů. Existuje několik typů hmotnostních analyzátorů. Většina z nich je založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem. Často používanými hmotnostními analyzátory jsou kvadrupólový hmotnostní filtr (Q), iontová past (IT), sektorové analyzátory, analyzátor doby letu (TOF) a iontová cyklotronová rezonance (ICR). Třetím krokem je detekce iontů (kladných nebo záporných). Základními typy detektorů jsou elektronový násobič a fotonový násobič.<sup>82</sup>

### **Přístrojové vybavení**

Plynový chromatograf se skládá z tlakové láhve s nosným plynem, regulátoru a měřiče průtoku, termostatu, mikrodávkače, nástřikové hlavy, chromatografické kolony, detektoru a zapisovače.<sup>78</sup>

Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, ve kterém dochází ke generování iontů, analyzátor iontů, kde jsou ionty separovány v závislosti na poměru  $m/z$ , a detektor iontů.<sup>82</sup>

Schéma č. 1: Blokové schéma GC/MS<sup>80</sup>



### 3.5. Testy akutní toxicity

#### Úvod

První poměrně rychle získatelný údaj o nebezpečnosti látky poskytuje její akutní toxicita. Její stanovení je časově a finančně velmi nákladné a je nutno utratit velké množství zvířat. Proto se hledají alternativní metody stanovení akutní toxicity, které by šetřily čas, peníze, zvířata. Tyto metody by měly poskytovat adekvátní informace jako pokusy prováděné na obratlovcích.

Pro vypracování rychlého a levného testování akutní toxicity látek rozpustných ve vodě bylo vybráno stanovení účinné koncentrace pro zástavu pohybu červů *Tubifex tubifex* (nitěnky) a letální koncentrace. Tato metoda byla vypracována za podpory Státního zdravotního ústavu. Jejími hlavními přednostmi jsou jednoduchost, reprodukovatelnost, rychlost a finanční nenáročnost. Vyhovuje i současnému trendu omezování použití obratlovců v pokusech. Nitěnky jsou zmíněny jako objekt pro test toxicity odpadních vod i pro stanovení akutní toxicity jednotlivých chemikálií a chemických přípravků.

Nitěnka náleží do kmenu kroužkoců (Annelida), třídy máloštětinatců (Oligochaeta). Mezi suchozemské zástupce máloštětinatců patří žížaly, mezi sladkovodní právě nitěnky.

Stanovení akutní toxicity bylo prováděno alternativní metodou stanovení akutní toxicity chemikálií - zástavou pohybu červů *Tubifex tubifex*.

## **Metodika**

### Testovaný objekt

Pokusný červ, nitěnka větší, se dá snadno získat zakoupením ve Zverimexu. Chov nitěnek probíhá za standardních podmínek v akváriu na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie UK.

### Laboratorní sklo a přístroje

Petriho misky různé velikosti, kádinka, automatická pipeta, pinzeta, stopky.

### Chemikálie

Destilovaná voda,  $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ , stanovovaná látka.

### Příprava roztoků zkoumané látky

Přesně známý objem látky se rozpustí ve 25 ml odměrné baňce. Tímto se získá základní roztok, který je ředěn do kádinek objemu 25 ml dle požadavků použité statistické metody a to 9 ml základního roztoku + 3 ml destilované vody (koncentrace 1), 9 ml koncentrace 1 + 3 ml destilované vody (koncentrace 2). Připravuje se vždy 4-6 ředění.

### Příprava roztoků referenční látky

Navážka dihydrátu chloridu manganatého (asi 1,8000 g přesně) se rozpustí ve 25 ml odměrné baňce. Takto získaný základní roztok se ředí následujícím způsobem: 8 ml základního roztoku + 2,1 ml destilované vody (koncentrace 1), 8 ml koncentrace 1 + 2,1 ml destilované vody (koncentrace 2) atd.

## **Pracovní postup**

Měření probíhá při laboratorní teplotě (20-25 °C). Do Petriho misky se napipetuje 1 ml pracovního roztoku o nejvyšší koncentraci. Z kolonie se rychle ale šetrně oddělí 6 stejně velkých nitěnek, osuší se na filtračním papíru a přenesou se do pracovního roztoku. Zde jsou exponovány přesně 3 minuty. Sleduje se zástava pohybu a stanoví se počet jedinců u nichž dojde k zástavě pohybu. Po 3 minutách se nitěnky rychle vyjmou, přenesou do Petriho misky s pitnou vodou a po 1 minutě se stanoví počet nehybných jedinců.

Použité nitěnky se vyřadí a pokus se opakuje celkem třikrát. Pak se pokračuje s nižšími koncentracemi až do dosažení koncentrace, která nezpůsobila žádnou zástavu pohybu nitěnek. Souběžně se stanovením akutní toxicity sledované látky se stanovuje i akutní toxicita referenční látky.

Výsledky pokusu se statisticky vyhodnotí podle metody Weilové.

### **Výpočet a vyhodnocení**

Výsledky jsou rovny počtům nehybných jedinců nitěnek po expozici přesně 3 minuty u každé koncentrace zkoumané látky. Z těchto hodnot je možné vypočítat  $EC_{50}$  dle vztahu  $\log EC_{50} = \log D_a + d (f + 1)$ , kde  $D_a$  je nejnižší koncentrace ze čtyř potřebných pro výpočet,  $f$  tabelovaná konstanta,  $d$  početní konstanta  $d = \log R$ , kde  $R$  je poměr mezi dvěma následujícími konstantami (vyšší koncentrace lomená nižší, je vždy větší než 1). Interval spolehlivosti pro 95% pravděpodobnost je dán vztahem  $L_{1,2} = \log EC_{50} \pm 2 \sigma_f d$ , kde  $\sigma_f$  je tabelovaná konstanta.

Konstanty  $f$  jsou tabelovány pro různé sestavy odečítaných výsledků (nehybných jedinců).

Obdobně lze získat hodnotu  $LC_{50}$ , kdy jsou k výpočtu použity počty nehybných jedinců odečtených přesně 1 minutu po přenesení červů z roztoku látky do čisté pitné vody.

Pro standardní provádění testu je doporučováno provádět testování referenční látky dihydrátu chloridu manganatého vždy souběžně s testováním každé látky. Pokud jsou hodnoty  $EC_{50}$  a  $LC_{50}$  včetně intervalů spolehlivosti statisticky shodné s výše uvedenými hodnotami, je to záruka, že test proběhl za standardních podmínek a jeho výsledek je použitelný pro jakákoliv další zpracování.<sup>83</sup>

## **3.6. Antiagregační aktivita**

### **Úvod**

Agregace destiček je v současné době nejužitečnější metodou pro kontrolu funkce destiček. Umožňuje najít vhodnou terapii pro pacienty s poškozenou funkcí srážení, poznání dědičných dysfunkcí apod.

### **Princip**

Destičky adherují za různých podmínek a v přítomnosti rozličných látek. Termín „agregace destiček“ vyjadřuje proces adherence jedné destičky ke druhé. Trombocyty mají panožky, jimi se zasouvají mezi sebe a tvoří agregáty (konglomeráty), někdy až 100 destiček v jednom agregátu. Jev může být indukován přidávkem agregaci vyvolávajících látek (ADP, epinefrin, kolagen, ristocetin, trombin, AA, hovězí faktor VIII, kalciový ionofor A23187,

serotonin) do plazmy obohacené destičkami nebo plné krve. Agregace destiček závisí na koncentraci kalcia, fibrinogenu, jednom či více plazmatických faktorech a přítomné agregační látce. Agregace proběhne různě dle typu látky vyvolávající agregaci a její koncentrace.

### **Metodika**

Metoda podle Borna je založena na měření zákalu s použitím agregometru Chrono-log 500Ca vybaveného softwarem pro vyhodnocení Aggro/Link. Antiagregační stanovení extraktů je měřeno v PRP (Platelet Rich Plasma, plasma bohatá na destičky) a je porovnáváno proti slepému vzorku PPP (Platelet Poor Plasma, plasma chudá na destičky) při použití standardní koncentrace 500 µg extraktu/1ml PRP a hlavních čtyř agregaci vyvolávajících látek (ADP, kolagen, arachidonová kyselina a trombin). Měření vyhodnocuje program Aggro/Link. Z grafu se odečítá inhibice nebo potenciace agregace destiček, která je způsobena agonistou, v procentech.<sup>84</sup>

## **3.7. Antioxidační aktivita**

### **Úvod**

Oxidační procesy vyskytující se v živých organismech mají za následek tvorbu vysoce reaktivních volných radikálů, o nichž je známo, že urychlují stárnutí živých buněk a zvyšují riziko zdravotního poškození včetně iniciace rakoviny.

Antioxidanty jsou chemické sloučeniny schopné ukončit radikálové řetězové reakce. Předpokládá se, že antioxidanty mají velkou důležitost v lidské stravě, obzvláště ve vztahu k prevenci rakoviny a kardiovaskulárních chorob. Proto přírodně se vyskytující sloučeniny s potenciálem antioxidační aktivity mají zvýšenou pozornost v biologickém výzkumu, medicíně, farmacii a potravinářské technologii. Rozsáhlé zkoumání rostlin (zaměřeno obzvláště na zeleninu a léčivé rostliny), jako zdroj účinných sloučenin vychytávajících radikály, probíhá v posledním desetiletí v řadě výzkumných skupin.<sup>85</sup>

### **Princip**

Schopnost různých antioxidantů ukončit radikálovou řetězovou reakci může být určena nepřímo různými metodami. Radikály reaktivních forem kyslíku jsou velmi reaktivní sloučeniny značně rozdílné životností a chemickými vlastnostmi. Proto je jejich přímá detekce nesnadná. Z tohoto důvodu jsou k určení celkové antioxidační aktivity často využívány stabilní radikálové sloučeniny.<sup>86</sup>



K ohodnocení aktivity vychytávání radikálů existuje řada detekčních metod založených na redoxních reakcích. Jeden z pokrokových systémů, které usnadňují rychlou a citlivou analýzu různých antioxidantů, je automatizovaná metoda DPPH (2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál) využívající techniku sekvenční injekční analýzy (SIA).

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) patří do skupiny průtokových analytických metod, které umožňují racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, a tak podstatně zvyšovat produktivitu, zejména rutinních stanovení. Je to relativně nová a velmi progresivně se rozvíjející technika.

Základním principem metody SIA je to, že analyt obsažený v roztoku vzorku je potřeba převést na detekovatelný produkt reakcí s činidlem a změřit vhodnou analytickou vlastnost tohoto produktu. V toku nosného proudu dochází ke vzájemnému mísení vzorku s činidlem a k chemické reakci. Reakční produkt je měřen v průtokovém detektoru, jehož signál je registrován ve formě píků. Technika SIA využívá princip, jehož charakteristickým rysem jsou oddělené měřicí cykly.

DPPH lze považovat za velmi stabilní radikál, který může být inaktivován jen antioxidantem, který je donorem atomu vodíku. Redukci DPPH doprovází pokles absorbance při charakteristické vlnové délce. Absorpční maximum pro DPPH je při  $\lambda = 525$  nm. Reakce může probíhat v organickém (methanol, ethanol, benzen, dioxan) nebo vodně-organickém (ethanol 50%) prostředí. Reakce probíhá nejlépe bez přídavku pufrů. Obvykle používaný postup je ten, že se roztok testovaného extraktu nebo standardu antioxidantu smísí s roztokem DPPH a nechá se stát při teplotě 30 °C ve vodní lázni. Zhášení barevného DPPH způsobené jeho interakcí s antioxidanty může být snadno sledováno spektrofotometricky. Antioxidační účinek lze vyjádřit v procentech poklesu absorbance oproti slepému vzorku.

Díky rychlosti, jednoduchosti, flexibilitě a citlivosti je metoda SIA vhodná pro provádění rutinního testování na přítomnost různých antioxidantů ve velkých sériích rostlinných extraktů. Množství vzorku potřebné pro analýzu je několik miligramů.<sup>85, 86</sup>

## **Metodika**

Počítačem řízený systém sekvenční injekční analýzy (SIA) vybavený diode-array spektrofotometrickým detektorem je používán pro rychlé monitorování a vyhodnocení antioxidační aktivity/vychytávání radikálů v biologických vzorcích.

Tato automatizovaná metoda je založena na známé reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálu (DPPH) s antioxidanty v organickém nebo

vodně-organickém médiu, což má za následek blednutí DPPH díky jeho zhášení interakcí s analytem. Pokles absorbance DPPH (porovnáváný se slepým vzorkem, který představuje směs voda:ethanol 1:1 namísto testovaného roztoku) měřený při 525 nm je závislý na koncentraci antioxidantu v testovaném roztoku. Vzorek (testovaná sloučenina) a činidlo (DPPH) jsou automaticky sekvenčně vstříknuty pomocí peristaltické pumpy a vícecestného ventilu do nosného proudu jednokanálového systému (ve smyčce) a po dokonalém promíchání je reakční produkt vedený do spektrofotometrického detektoru. Antioxidační aktivita testovaných vzorků je porovnávána se známými antioxidanty: kyselina askorbová ( $EC_{50} = 0,006$  mg/ml) a trolox ( $EC_{50} = 0,014$  mg/ml).

Díky optimalizaci metody SIA je možné detekovat až  $\mu$ M koncentrace modelových antioxidantů jako je kyselina askorbová, kyselina kávová, (+)-katechin, (-)-epikatechin a rutin a ohodnotit koncentrace těchto antioxidantů v rozmezí  $\mu$ M až mM.

### **Přístrojové vybavení**

FIALab 3000 analyzátor (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) řízený počítačem (FIALab pro Windows software), vybavený 2,5 ml injekční pumpou, šesticestným přepínacím ventilem, spektrofotometrem USB2000-UV/VIS se světelným zdrojem LS-1 (Ocean Optics, USA) a průtokovou kyvetou SMA-Z (délky 1 cm). Objem mísicí cívky je 0,6 ml a spojovací hadice PTFE (Watrex, Prague) má průměr 0,73 mm.<sup>85</sup>

## 4. IZOLACE

### 4.1. Materiál

Droga pochází z Indie a byla dodána do ČR mateřskou firmou včetně verifikace (verifikačním protokolem zaručujícím identitu drogy). Hlavním dovozcem a distributorem je Avicenna Company, spol. s r.o., Nad Vršovskou horou 88/4, 10101 Praha 10.

### 4.2. Extrakce drogy a zpracování extraktů

Předběžné pokusy, extrakce a následná sloupcová chromatografie byla provedena doc. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc.

#### **Předběžné pokusy:**

Prvním pokusem byla extrakce ethanolem 95%. 5 g řezané drogy bylo zalito 100 ml ethanolu (EtOH), zahřáto po dobu 30 minut při 70 °C, ponecháno přes noc, zfiltrováno a odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v 8 ml methanolu (MeOH), bylo přidáno 20 ml vody a roztok byl vytřepán 4x petroletherem (Pe) a odpařen. Odparek měl hmotnost 62,8 mg, byl velmi viskózní, tmavě zelené barvy. Zbytek po vytřepání byl odpařen dosucha, rozpuštěn v 1 ml EtOH 95% a za tepla byly přidány 4 ml vody. Po zchladnutí byl kalný roztok vytřepán 5 x 2 ml diethyletheru (Et<sub>2</sub>O) a odpařen. Hmotnost odparku činila 62,1 mg, odparek byl velmi viskózní a měl zelenou barvu. Zbytek po vytřepání Et<sub>2</sub>O byl odpařen dosucha. Tímto byl získán velmi viskózní, tmavě hnědý odparek bez chlorofylu o hmotnosti 133,6 mg.

#### **Vlastní extrakce drogy**

Řezaná nať o hmotnosti 8,80 kg byla provlhčena EtOH 95%, zalita v perkolátoru a po třech dnech perkolována EtOH 95% (v poměru 1:15). Celkové množství extraktu bylo 123 litrů.

Extrakt byl odpařen dosucha na velmi viskózní, tmavě zelený odparek, rozpuštěn ve 4800 ml MeOH a po přidání 1200 ml vody (celkový objem byl 6900 ml) byl vytřepán Pe (40-60 °C). 6900 ml bylo vytřepáno 4 x 1400 ml Pe (fáze se dobře dělily), organická fáze byla odpařena.

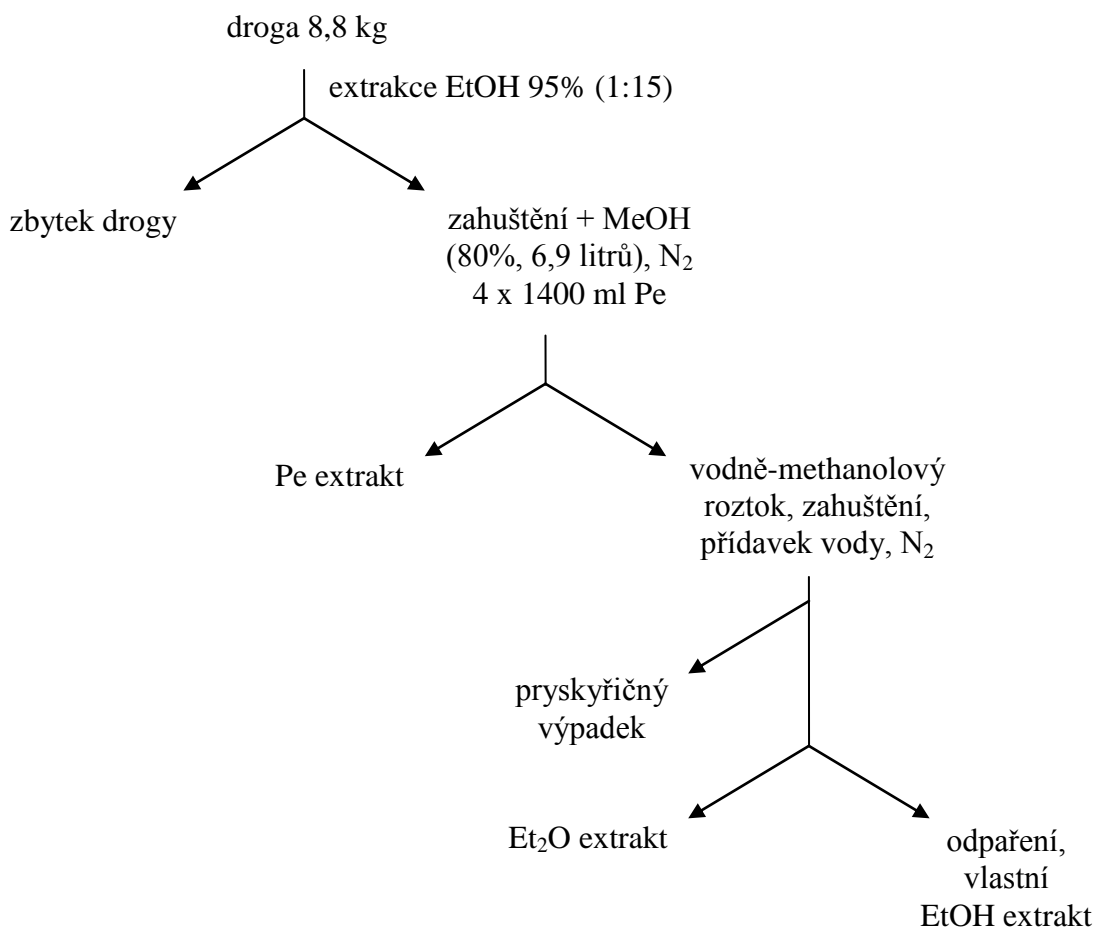
Extrakt v MeOH 80% byl odpařen dosucha (předtím probublán dusíkem, až byl odstraněn Pe). Odparek byl rozpuštěn v 1200 ml EtOH 96% a za tepla (40 °C) a za míchání bylo přidáno

4800 ml vody. Vyloučila se hnědozelená pryskyřičná hmota, která byla odfiltrována, promyta malým množstvím EtOH 20% a adjustována.

Methanolvý extrakt byl zbaven organického rozpouštědla (40 °C, vakuová odparka), doplněn vodou na 6900 ml a po zchladnutí byl vytřepán 5 x 1300 ml Et<sub>2</sub>O (fáze se dobře dělily), organická fáze byla odpařena.

Vodný zbytek byl při 30-40 °C probulán dusíkem, až unikl Et<sub>2</sub>O, a potom za snížené teploty a tlaku byl odpařen (velmi intenzivně pěnil).<sup>87</sup>

Schéma č. 2: Extrakce drogy<sup>87</sup>



Tabulka č. 1: Popis získaných extraktů <sup>87</sup>

<b>extrakt</b>	<b>hmotnost (g)</b>	<b>popis</b>
Pe	92,1	tmavě zelený, řídce olejovitý
Před Et <sub>2</sub> O	46,0	tmavě hnědý, pryskyřičnatý
Et <sub>2</sub> O	23,7	tmavě hnědý, olejovitý
EtOH	231,0	hnědý, řídce olejovitý

Extrakci a následnou sloupcovou chromatografií etherového odparku provedl doc. RNDr. L. Opletal, CSc. a byla popsána v diplomové práci Eleny Římanové *Fytochemický výzkum *Evolvulus alsinoides* I.* Diplomantka P. K. Matějková pro svůj výzkum zvolila frakce 51-62 (VII.), 63-69 (VIII.), 70-85 (IX.) a 86-92 (X), diplomantka Eva Balhárková na její práci navázala a prováděla výzkum frakcí 93-100 (XI.), 101-112 (XII.), 113-117 (XIII.), které se jeví jako perspektivní.

#### **4.3. Předběžné zkoušky petroletherového extraktu (Pe extraktu)**

##### **Zkoušky rozpustnosti**

Sumární Pe extrakt byl rozpouštěn ve vodě při 60-80 °C. Extrakt se nepodařilo rozpustit, organická fáze výtřepku zůstala oddělená.

##### **Pokusná sloupcová chromatografie Pe extraktu**

Bylo provedeno několik sloupcových chromatografií za použití různých vyvíjecích soustav ke zjištění neoptimálnějších soustavy pro chromatografické dělení Pe extraktu.

#### **4.4. Sloupcová chromatografie petroletherového extraktu (CC Pe extraktu)**

##### **4.4.1. Výběr vhodné eluční soustavy**

Vhodná eluční soustava pro sloupcovou chromatografií Pe extraktu byla zvolena na základě provedených předběžných zkoušek Pe extraktu. Eluce byla prováděna jako gradientová.

#### 4.4.2. Příprava vzorku

K provedení sloupcové chromatografie bylo použito 18,0 g Pe extraktu. Extrakt byl rozpuštěn v přiměřeném množství chloroformu ( $\text{CHCl}_3$ ) a roztok byl řádně přimíchán k 30,0 g A1. Veškeré rozpouštědlo bylo odpařeno na odpařovací misce na vodní lázni. Takto připravený roztěr byl nanesen do chromatografické kolony.

#### 4.4.3. Příprava sloupce pro provedení CC

Do sloupce bylo vpraveno 888,0 g silikagelu, který byl převrstven roztěrem vzorku. Nanesený roztěr byl překryt filtračním papírem, buničitou vatou a skleněnými kuličkami. Odběr jednotlivých frakcí následoval po vypuštění mrtvého objemu z kolony.

#### 4.4.4. Chromatografické podmínky

Parametry kolony:	průměr:	5,7 cm
	poloměr:	2,85 cm
	výška:	110,5 cm
	mrtvý objem:	1620,0 ml
Adsorbent:		A1 (837 g, aktivace, přidáno 83,0 g vody)
Celková výška sloupce kolony:		71,0 cm
Objem odebírané frakce:		100 ml
Doba toku jedné frakce:		15 min

#### 4.4.5. Orientační TLC získaných frakcí

V průběhu chromatografického dělení byla prováděna orientační TLC získaných frakcí. Na základě této TLC byly kvalitativně podobné frakce spojeny, částečně zahuštěny na vakuové rotační odparce, zředěny  $\text{CHCl}_3$  a uchovány v chladu v lednici.

#### 4.4.6. Výsledky sloupcové chromatografie

Tabulka č. 2: Průběh sloupcové chromatografie Pe extraktu

spojení	frakce	eluční soustava	vzhled frakce
1-2	1	$\text{CHCl}_3$ : toluen (75:25)	bezbarvá čirá
	2	$\text{CHCl}_3$ : toluen (75:25)	žlutá

3-4	3	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	oranžová
	4	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	oranžová
5-7	5	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	oranžová
	6	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	oranžová
	7	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	oranžová
8	8	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	oranžová
9	9	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	oranžová
10	10	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	oranžová
11-12	11	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	zelenooranžová
	12	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	zelenooranžová
13-14	13	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	zelenooranžová
	14	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	zelenooranžová
15-16	15	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	zelenooranžová
	16	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	zelenooranžová
17	17	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	zelenooranžová
18-19	18	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	zelenooranžová
	19	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	tmavě zelená
20-23	20	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	tmavě zelená
	21	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	tmavě zelená
	22	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	tmavě zelená
	23	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	tmavě zelená
24-26	24	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	tmavě zelená
	25	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	tmavě zelená
	26	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	středně zelená
27-31	27	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	středně zelená
	28	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená
	29	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená
	30	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená
	31	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená
32-35	32	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená
	33	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená
	34	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená

	35	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená
36-40	36	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená
	37	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená
	38	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	světle zelená
	39	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	středně zelená
	40	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	středně zelená
41-44	41	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	středně zelená
	42	CHCl <sub>3</sub> : toluen (75:25)	tmavě zelená, brčálová
	43	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
	44	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
45-48	45	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
	46	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
	47	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
	48	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
49-52	49	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
	50	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
	51	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
	52	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
53-60	53	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
	54	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, brčálová
	55	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená
	56	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená
	57	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, postupně se zesvětlující
	58	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, postupně se zesvětlující
	59	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, postupně se zesvětlující
	60	CHCl <sub>3</sub>	tmavě zelená, postupně se zesvětlující
61-113	61	CHCl <sub>3</sub>	stále se zesvětlující zelená
	62	CHCl <sub>3</sub>	stále se zesvětlující zelená



61-113	63	CHCl <sub>3</sub>	stále se zesvětlující zelená
	64	CHCl <sub>3</sub>	stále se zesvětlující zelená
	65	CHCl <sub>3</sub>	stále se zesvětlující zelená
	66	CHCl <sub>3</sub>	zesvětlení a přechod na žlutozelenou
	67	CHCl <sub>3</sub>	zesvětlení a přechod na žlutozelenou
	68	CHCl <sub>3</sub>	zesvětlení a přechod na žlutozelenou
	69	CHCl <sub>3</sub>	zesvětlení a přechod na žlutozelenou
	70	CHCl <sub>3</sub>	zesvětlení a přechod na žlutozelenou
	71	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutozelená
	72	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutozelená
	73	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	velmi tmavě zelená
	74	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	velmi tmavě zelená
	75	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	zesvětlující se tmavě zelená
	76	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	zesvětlující se zelená
	77	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	zesvětlující se zelená
	78	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	zesvětlující se zelená
	79	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutozelená
	80	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutozelená
	81	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutozelená
	82	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutozelená
	83	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutozelená
	84	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle zelenožlutá
	85	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle zelenožlutá
	86	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle zelenožlutá
	87	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle zelenožlutá
	88	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	stále světlejší a žlutější
	89	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	stále světlejší a žlutější

61-113	90	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	stále světlejší a žlutější
	91	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	stále světlejší a žlutější
	92	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	stále světlejší a žlutější
	93	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	stále světlejší a žlutější
	94	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	stále světlejší a žlutější
	95	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	stále světlejší a žlutější
	96	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	97	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	98	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	99	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	100	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	101	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	102	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	103	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	104	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	105	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	106	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	107	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (95:5)	světle žlutá
	108	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (90:10)	žlutá
	109	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (90:10)	zelenooranžová
	110	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (90:10)	oranžová s nádechem do zelena
	111	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (90:10)	žlutá
	112	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (90:10)	zelenooranžová, zakalená
113	CHCl <sub>3</sub> : EtOH (90:10) 800 ml CHCl <sub>3</sub> : EtOH (80:20)1000ml EtOH 1800ml	světle zelenohnědá	

#### 4.4.7. Orientační TLC spojených frakcí 1-52

##### Chromatografické podmínky:

Adsorbent:	A2
Vyvíjecí soustava:	S1
Dělicí dráha:	13,7 cm
Vyvíjení:	1x
Detekce:	D1 (černě ohraničené obdélníky) D2 (černě a červeně ohraničené skvrny) D3 (barevné skvrny)

##### Schéma chromatogramu:

Schéma je uvedeno v příloze č. 1.

##### Vysvětlivky ke schématu chromatogramu:

Odrážky na svislé ose označují vzdálenost od startu v cm.

Červeně ohraničení skvrny představují chlorofyl při detekci D2. Chlorofyl se při tomto UV záření projevuje červenou barvou.

Velká písmena označují barvu výrazných skvrn po detekci D2.

- A - modrozelená
- B - fialovomodrá
- C - zelenooranžová
- D - zelenožlutá
- E - fialovomodrá
- F - tyrkysová
- G - světle modrá

Frakce, které následují po frakci 18-19 obsahují velké množství chlorofylu. Chlorofyl se projevuje výrazně při detekci D2. Pro přehlednost byla zakreslena pouze detekce D1.

#### 4.4.8. Uchování a zpracování frakcí

Frakce získané sloupcovou chromatografií Pe extraktu byly ponechány v chladu v lednici a nadále sledovány tak, aby bylo možno podchytit případné změny. Jako významné se jevíly frakce 3-4, 5-7, 15-16, 17, 36-40. Tyto frakce byly dále zpracovávány.

Souhrnné schéma zpracování Pe extraktu *Evolvulus alsinoides* a následného zpracování významných frakcí je uvedeno v příloze č. 2.

## **4.5. Zpracování frakce 3-4**

### **4.5.1. Úvodní charakteristika frakce 3-4**

Frakce 3-4 měla po eluci z kolony vzhled oranžové tekutiny, její odparek byl velmi viskózní, oranžové barvy. Hmotnost odparku činila  $m(3-4) = 1,3244 \text{ g}$ .

Frakce se jevila jako zajímavá, jelikož jako jedna z mála neobsahovala chlorofyl a poměrně brzy po jejím získání se z ní vyloučily krystaly. Odebrané znečištěné krystaly byly detekovatelné D1, D2, po postřiku D3 se objevila intenzivně fialová skvrna. Ve vyvíjecí soustavě  $\text{CHCl}_3$  postupovala frakce souběžně s čelem mobilní fáze.

### **4.5.2. Orientační zkoušky**

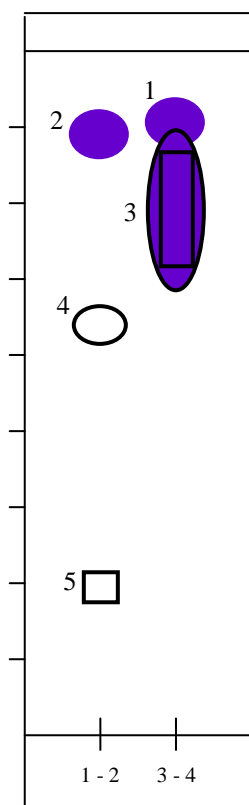
#### **4.5.2.1. Zkoušky rozpustnosti**

Ke vzorku z frakce 3-4 byl přidán MeOH. Frakce byla v MeOH nerozpustná a zůstaly odděleny dvě kapalně fáze. V prostředí MeOH vypadly z frakce krystaly, které se rozpustily v  $\text{CHCl}_3$ .

Ke vzorku z frakce 3-4 byl přidán aceton. Po přidání acetonu se za pokojové teploty vyloučila amorfni oranžová hmota (frakce tedy zůstala oddělena od acetonu), která se po zahřátí rozpustila. Frakce byla ponechána v chladu, kde se z ní vyloučilo malé množství krystalů a aceton se samovolně odpařil. Po ohřátí na pokojovou teplotu byl přidán další podíl acetonu, frakce byla zahřívána na vodní lázni, rozpuštěna za tepla ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a ponechána k pozvolnému chladnutí v lednici.

#### 4.5.2.2. Orientační TLC frakcí 3-4 a 1-2

##### Schéma chromatogramu č. 1



Adsorbent:	A2
Vyvíjecí soustava:	S1
Dělicí dráha:	9,0 cm
Vyvíjení:	1x
Detekce:	D1 (černě ohraničené obdélníky) D2 (černě ohraničené skvrny) D3 (barevné skvrny)

Poznámka: odrážky na svislé ose značí vzdálenost od startu v cm

<u>R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:</u>	1 - R <sub>f</sub> = 0,90
	2 - R <sub>f</sub> = 0,87
	3 - R <sub>f</sub> = 0,76
	4 - R <sub>f</sub> = 0,60
	5 - R <sub>f</sub> = 0,21

#### **4.5.3. Zisk a přečišťování krystalů**

V chladu v prostředí acetonu se z frakce vyloučily bílé krystaly. Ze zkumavky byl Pasteurovou pipetou odsát matečný louh do druhé čisté zkumavky. Ke krystalům, které v původní zkumavce zůstaly, byl přidán další podíl acetonu, obsah byl zahříván, rozpuštěn za tepla (40 °C) a ponechán v lednici. Následující den byl opět odebrán matečný louh a to i ze zkumavky s odebraným matečným louhem, ze kterého se vyloučily další krystaly, a přidán aceton. Z tohoto odebraného matečného louhu se také ještě uvolnilo menší množství krystalů. Matečný louh ze zkumavek, ve kterých se vyloučily krystaly, byl odsát a přemístěn do čtvrté zkumavky. Ve třetí zkumavce zůstalo pouze malé množství krystalů, proto byly dále přečišťovány jen krystaly z prvních dvou zkumavek. Přečišťovány byly ještě pětkrát výše uvedeným způsobem, tzn. byl odebrán matečný louh, přidán další podíl acetonu, krystaly byly rozpuštěny v acetonu za tepla a ponechány v chladu v lednici. Z takto čistých krystalů byl

matečný louh částečně odsát a jeho zbytek byl odpařen v proudu vzduchu. Krystaly ve zkumavkách byly uloženy do exikátoru k úplnému vysušení a po několika dnech byly vysušené krystaly přeneseny do malé vialky a zváženy. Hmotnost získaných krystalů z první zkumavky činila 3,5 mg, z druhé zkumavky 1,6 mg. Tímto způsobem byly získány krystaly pouze z části (cca  $\frac{1}{4}$ ) frakce 3-4.

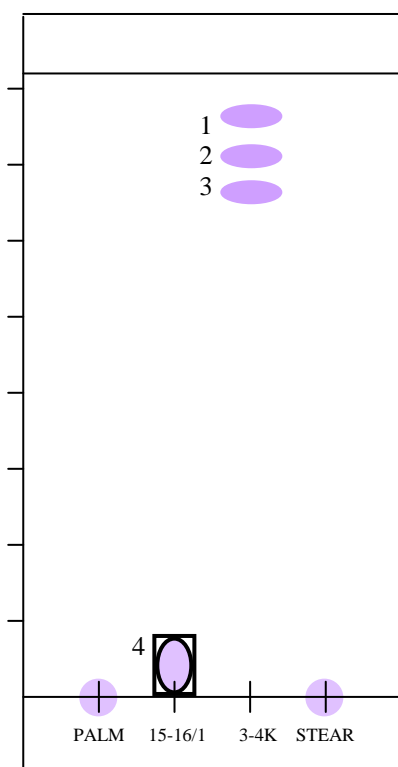
Následovalo čištění krystalů z další části frakce 3-4. Část původní frakce byla odebrána do čisté zkumavky, byl k ní přidán aceton, frakce byla rozpuštěna za tepla a ponechána v chladu. Tímto způsobem byla další část čištěna ještě třikrát. Hmotnosti získaných krystalů byla 1,5 mg.

Krystaly byly získávány stejným způsobem ještě potřetí. Všechny matečné louhy z předchozího čištění byly spojeny, byl k nim přidán další podíl celkové frakce 3-4 a byl zahájen proces zisku a čištění krystalů. Celkem byly provedeny čtyři oplachy krystalů uvolněných z acetonu v chladu. Při tomto čištění nebyly krystaly po odebrání matečného louhu a přidání čistého acetonu rozpouštěny za tepla, ale pouze umístěny do chladu. Po dosažení požadované čistoty krystalů byl zbytek čirého matečného louhu odpařen na vzduchu, krystaly byly umístěny do exikátoru a po úplném vysušení přemístěny do malé vialky a zváženy. Hmotnost takto získaných krystalů činila 13,4 mg.

#### 4.5.4. Charakteristika krystalů

##### 4.5.4.1. Srovnávací TLC krystalů z frakce 3-4 se standardy

##### Schéma chromatogramu č. 2



Adsorbent:	A2
Vyvíjecí soustava:	S2
Dělicí dráha:	8,2 cm
Vyvíjení:	2x
Detekce:	D1 (černě ohraničené obdélníky) D2 (černě ohraničené skvrny) D3 (barevné skvrny)

##### Vysvětlivky:

PALM (kyselina palmitová)

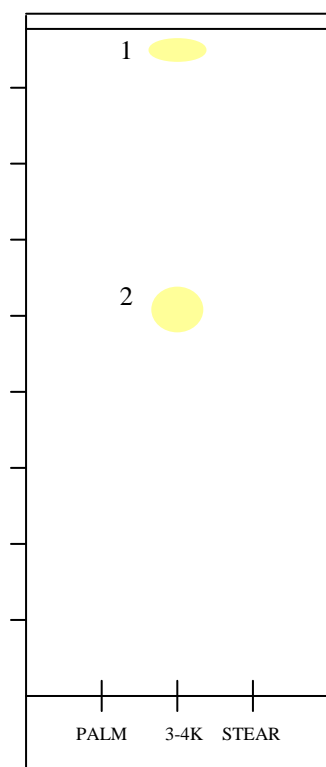
STEAR (kyselina stearová)

3-4K (přečištěné vysušené krystaly z frakce 3-4)

15-16/1 (jedna ze zón po TLC dělení frakce 15-16)

<u>R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:</u>	1 - R <sub>f</sub> = 0,94
	2 - R <sub>f</sub> = 0,87
	3 - R <sub>f</sub> = 0,82
	4 - R <sub>f</sub> = 0,05

### Schéma chromatogramu č. 3



Adsorbent: A2

Vyvíjecí soustava: S2

Dělicí dráha: 8,8 cm

Vyvíjení: 2x

Detekce: D7

#### Vysvětlivky:

PALM (kyselina palmitová)

STEAR (kyselina stearová)

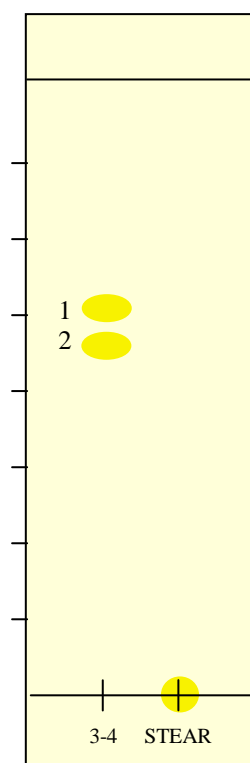
3-4K (přečištěné vysušené krystaly z frakce 3-4)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn: 1 - R<sub>f</sub> = 0,97

2 - R<sub>f</sub> = 0,60

Výsledky: ve dráze standardů se neobjevila žádná skvrna, ve dráze 3-4 K byly viditelné dvě světle žluté skvrny s retenčními faktory R<sub>f</sub> = 0,60 a R<sub>f</sub> = 0,97

### Schéma chromatogramu č. 4



Adsorbent: A3

Vyvíjecí soustava: S2

Dělicí dráha: 8,1 cm

Vyvíjení: 1x

Detekce: D5

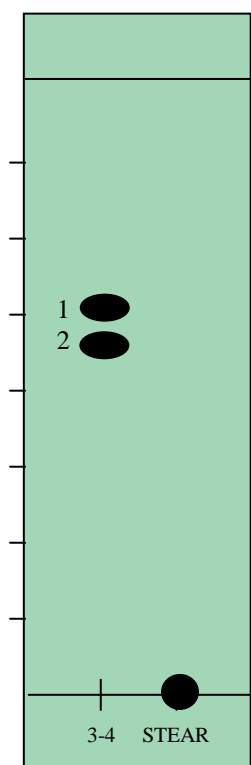
Vysvětlivky: STEAR (kyselina stearová)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn: 1 - R<sub>f</sub> = 0,63

2 - R<sub>f</sub> = 0,57



### Schéma chromatogramu č. 5



Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S2  
Dělicí dráha: 8,1 cm  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D6

Vysvětlivky: STEAR (kyselina stearová)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn: 1 - R<sub>f</sub> = 0,63  
2 - R<sub>f</sub> = 0,57

#### 4.5.4.2. Teplota tání získaných krystalů

Krystaly tály ve větším rozmezí teplot. Jednalo se zřejmě o směs nejméně tří kvalitativně odlišných krystalů. Malé kulovité krystaly měly teplotu tání t.t. = 58-59 °C, velký shluk křehlovitých krystalů t.t. = 74-75 °C a zbytkové krystaly kvádrotitého tvaru t.t. = 79-82 °C. Celková teplota tání směsi je t.t. = 58-82 °C.

#### 4.5.4.3. Vzhled krystalů

Získané krystaly měly bílou barvu a voskovitou konzistenci. Podle orientační TLC, teploty tání i mikroskopického vzhledu se pravděpodobně jednalo o směs nejméně tří kvalitativně odlišných krystalů. Makroskopicky bylo možno odlišit malé velmi drobné kulovité krystaly, krystaly se vzhledem jemných velmi krátkých vlákenek a velké křehlovité zaoblené krystaly.



#### **4.5.5. Instrumentální analýza frakce**

##### 4.5.5.1. Infračervená spektrofotometrie

Bylo proměřeno IČ spektrum krystalů z frakce 3-4 (1,6 mg) na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Měření bylo provedeno v tabletě z bromidu draselného. IČ spektrum bylo podobné IČ spektru kyseliny stearové.

Záznam IČ spektra krystalického podílu frakce 3-4 je uveden v příloze č. 3.

##### 4.5.5.2. GC/MS

Krystaly z frakce 3-4 byly analyzovány pomocí GC/MS ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Pro přípravu vzorku byla provedena tzv. studená transmethylace. Krystaly byly rozpuštěny v heptanu a třepány s roztokem hydroxidu draselného v methanolu (2 mol/l). Byla provedena analýza vzniklých methylesterů na přístroji GC/MS Turbo Mass firmy Perkin-Elmer. Touto metodou bylo zjištěno, že krystaly představují směs látek. Jedná se o kyselinu 8-methyldekanovou, kyselinu olejovou, alifatický uhlovodík a polynenasycené mastné kyseliny, které nebylo možno pro jejich malé množství blíže specifikovat.

Záznam GC/MS analýzy krystalického podílu frakce 3-4 je uveden v příloze č. 4.

#### **4.6. Zpracování frakce 5-7**

##### **4.6.1. Úvodní charakteristika frakce 5-7**

Frakce 5-7 měla po eluci z kolony ve zředěném stavu vzhled oranžové tekutiny, její odparek pak vzhled velmi viskózní hnědooranžové tekutiny. Hmotnost odparku byla  $m(5-7) = 2,7028$  g.

Frakce se jevila jako zajímavá, jelikož byla velmi podobná frakci 3-4, neobsahovala chlorofyl, při orientačních zkouškách se z frakce vyloučily krystaly a při dlouhodobějším stání došlo k samovolné krystalizaci značného množství krystalů.

## 4.6.2. Orientační zkoušky

### 4.6.2.1. Zkoušky rozpustnosti

Vzorek z frakce 5-7 byl rozpuštěn v  $\text{CHCl}_3$  a byl přidán MeOH. Z tekutiny se vyloučily bílé krystaly a sraženina. Vzorek byl ponechán v lednici, v chladu se vytvořil ještě mohutnější zákal.

Vzorek byl odpařen na dusíku, k oparku byl přidán MeOH a vzorek byl opět ponechán v chladu. Z tekutiny ve zkumavce vypadly krystaly. Pomocí Pasteurovy pipety byl odsát matečný loup do čisté zkumavky, ke krystalům byl přidán MeOH a obě zkumavky byly ponechány v chladu.

### 4.6.2.2. Orientační TLC frakcí 3-4 a 5-7

TLC byla nejprve prováděna několikrát orientačně s nepřečištěnými odebranými krystaly z frakce 5-7 za použití různých vyvíjecích soustav.

#### Chromatografické podmínky:

Adsorbent:	A2
Vyvíjecí soustava:	S3, S4, S5
Vzorky:	čisté krystaly z frakce 3-4 matečný loup z frakce 3-4 krystaly odebrané z frakce 5-7 matečný loup frakce 5-7

Soustava S5 byla vyhodnocena jako nejvýhodnější. Na základě výsledků TLC bylo zřejmé, že frakce 3-4, 5-7 a krystaly z obou těchto frakcí jsou kvalitativně shodné.

## 4.6.3. Zisk a přečišťování krystalů

Po dlouhodobém stání došlo ve frakci k vyloučení krystalů. Bylo zahájeno přečišťování těchto krystalů stejným způsobem jako u frakce 3-4. Byl tedy odebrán matečný loup, přidán aceton, krystaly rozpuštěny za tepla a ponechány v chladu v lednici. Jelikož frakce 5-7 obsahovala větší množství balastních látek (především oranžové barvivo) a jelikož pro získávání krystalů byla použita mnohem větší část frakce (cca  $\frac{1}{2}$ ) než u frakce 3-4, bylo nutné provádět

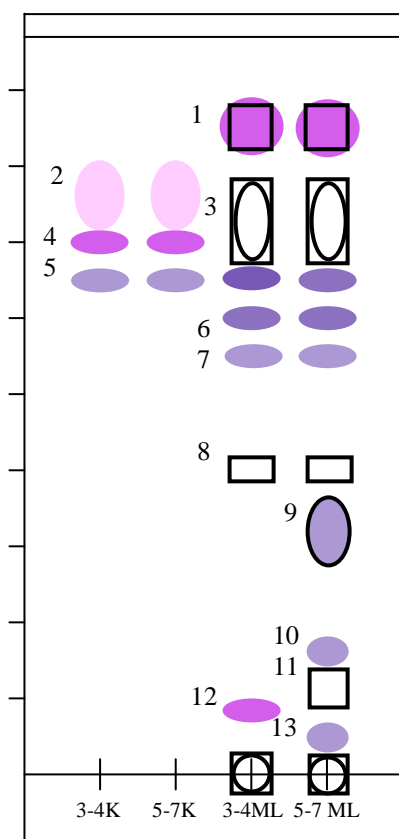
přečišťující proces vícekrát (cca 8x, vždy dvakrát v průběhu jednoho dne). Rozpouštění za tepla zde bylo využito pouze při prvních třech cyklech čištění, v ostatních byly krystaly po přidání acetonu pouze ponechány v chladu.

Jakmile byla dosažena požadovaná čistota krystalů, byl zbytek čirého matečného louhu odpařen na vzduchu, krystaly byly uloženy do exikátoru a po dokonalém vysušení zváženy. Hmotnost takto získaných krystalů činila  $m(5-7K) = 5,2 \text{ mg}$ .

#### 4.6.4. Charakteristika krystalů

##### 4.6.4.1. Orientační TLC čištěných krystalů z frakcí 3-4 a 5-7

##### Schéma chromatogramu č. 6



Adsorbent:	A2
Vyvíjecí soustava:	S5
Dělicí dráha:	9,7 cm
Vyvíjení:	1x
Detekce:	D1 (černě ohraničené obdélníky) D2 (černě ohraničené skvrny) D4 (barevné skvrny)

<u>Vysvětlivky:</u>	3-4K (čisté krystaly z frakce 3-4) 5-7K (čisté krystaly z frakce 5-7) 3-4ML (matečný louh frakce 3-4) 5-7ML (matečný louh frakce 5-7)
---------------------	--

<u>R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:</u>	
1 – R <sub>f</sub> = 0,88	8 – R <sub>f</sub> = 0,41
2 – R <sub>f</sub> = 0,78	9 – R <sub>f</sub> = 0,33
3 – R <sub>f</sub> = 0,75	10 – R <sub>f</sub> = 0,16
4 – R <sub>f</sub> = 0,72	11 – R <sub>f</sub> = 0,11
5 – R <sub>f</sub> = 0,67	12 – R <sub>f</sub> = 0,08
6 – R <sub>f</sub> = 0,61	13 – R <sub>f</sub> = 0,04
7 – R <sub>f</sub> = 0,57	

Na základě orientační TLC bylo zjištěno, že krystaly jsou kvalitativně stejné jako krystaly získané z frakce 3-4.

#### 4.6.4.2. Teplota tání získaných krystalů

Jelikož krystaly byly kvalitativně stejné jako krystaly získané z frakce 3-4, bylo zřejmé, že musí mít i stejné teplotní charakteristiky.

#### 4.6.4.3. Vzhled krystalů

Získané krystaly byly stejného vzhledu jako krystaly získané z frakce 3-4.

#### **4.6.5. Zpracování získaných krystalů**

Krystaly z frakce 5-7 nebyly dále analyzovány. Jsou k dispozici na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie UK k dalšímu zpracování a zkoušení.

### **4.7. Zpracování frakce 15-16**

#### **4.7.1. Úvodní charakteristika frakce 15-16**

Frakce měla v nezahuštěném stavu vzhled světle zelenooranžové tekutiny, její odparek byl tmavě zelený. Hmotnost odparku byla  $m(15-16) = 0,6411$  g.

Při předběžném zkoušení frakce vypadly v chladu z MeOH bílé krystaly. Frakce se tedy jevila jako zajímavá a bylo s ní dále pracováno.

Frakce obsahovala značné množství chlorofylu, proto bylo dalším cílem tuto frakci rozdělit. K dalšímu dělení byla odebrána vždy část z celkové frakce 15-16.

#### **4.7.2. Orientační zkoušky**

##### 4.7.2.1. Zkoušky rozpustnosti

Z frakce byl odebrán malý podíl a byl rozpouštěn v MeOH. Po rozpouštění byl uložen do chladu. V chladu vypadly z MeOH bílé krystaly. Takto vyloučené krystaly se jevily jako čisté, proto byly přemístěny do další zkumavky. Krystaly byly rozpustné v  $\text{CHCl}_3$ .

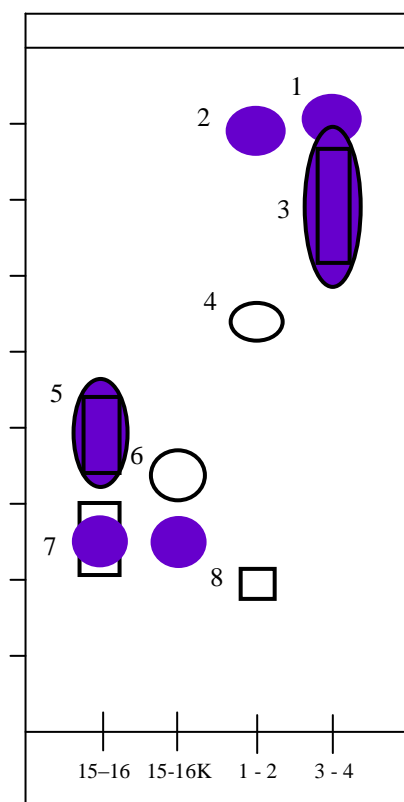
Po přidání MeOH k matečnému louhu se na dně zkumavky opět objevily malé krystaly.

#### 4.7.2.2. Teplota tání vyloučených krystalů

Byla změřena teplota tání vyloučených krystalů t.t. = 50-59°C

#### 4.7.2.3. Orientační TLC frakcí 15-16, 1-2 a 3-4

##### Schéma chromatogramu č. 7



Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S1  
Dělicí dráha: 9,0 cm  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1 (černě ohraničené obdélníky)  
D2 (černě ohraničené skvrny)  
D3 (barevné skvrny)

##### Vysvětlivky:

15-16K (krystaly získané z frakce 15-16)

##### R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:

1 - R <sub>f</sub> = 0,90	5 - R <sub>f</sub> = 0,43
2 - R <sub>f</sub> = 0,87	6 - R <sub>f</sub> = 0,37
3 - R <sub>f</sub> = 0,76	7 - R <sub>f</sub> = 0,28
4 - R <sub>f</sub> = 0,60	8 - R <sub>f</sub> = 0,21

#### **4.7.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie frakce 15 - 16**

##### 4.7.3.1. Chromatografické podmínky

Navážka: 0,1200 g frakce bylo rozpuštěno v MeOH  
Fáze: 100% MeOH  
Chromatograf: pumpa (Knauer, Preparative pump K-1800), detektor (Knauer, DAD K-2700, frakční elektor (Büchi B-684), kolona (Hibar, 2550 x 25 mm, Pre-Packed Column RT, Lichrosorb RP 18, 7 µm)  
Vlnová délka: 254 nm, 330 nm



Průtok: 1-18 min 15-20 ml/min, 18-40 min 20 ml/min

#### 4.7.3.2. Výsledky HPLC

Po provedení HPLC frakce 15-16 bylo získáno celkem šest nových frakcí. Frakce byly odpařeny dosucha, zváženy a částečně rozpuštěny v MeOH.

Hmotnost získaných frakcí byla:

1/15-16:  $m = 0,0065$  g

2/15-16:  $m = 0,0057$  g

3/15-16:  $m = 0,0065$  g,

4/15-16:  $m = 0,0285$  g

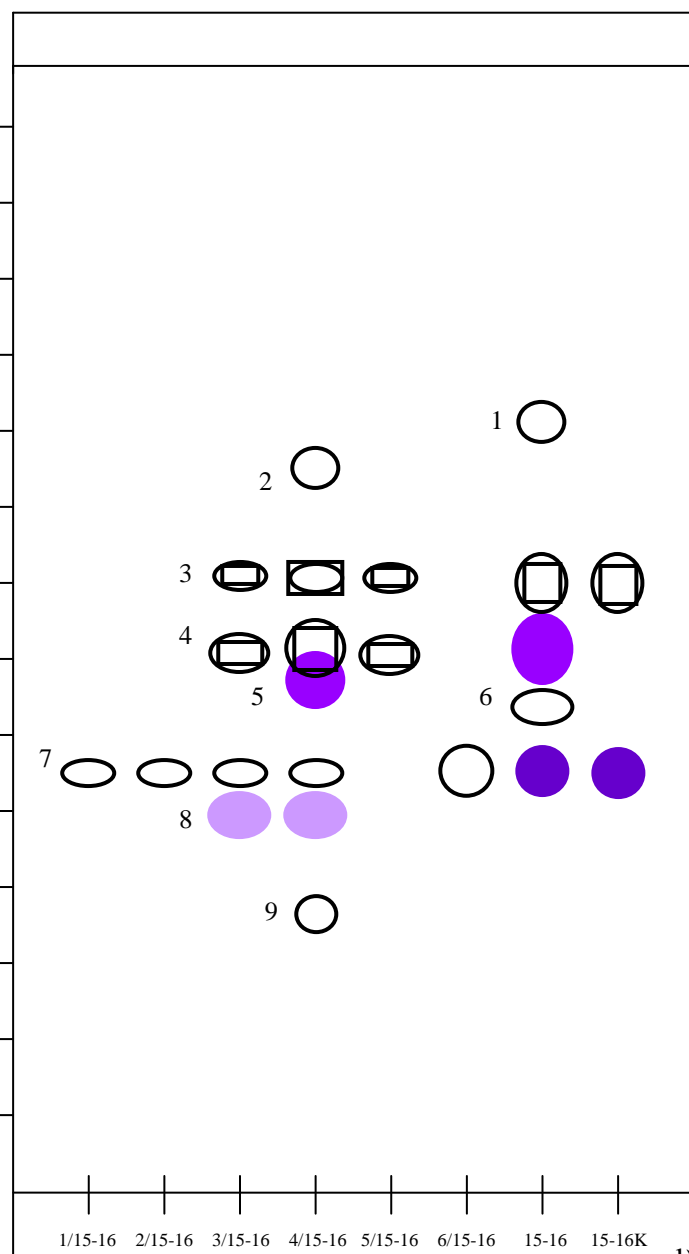
5/15-16:  $m = 0,0418$  g

6/15-16:  $m = 0,0239$  g

#### 4.7.3.3. Orientační TLC frakcí z HPLC dělení

Frakce byly při této orientační TLC porovnány se sumární frakcí 15-16 a s krystaly odebranými z frakce 15-16.

#### Schéma chromatogramu č. 8



Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S1  
Dělicí dráha: 14,8 cm  
Vyvíjení: 1x  
Detekce:

D1 (černě ohrazené obdélníky)

D2 (černě ohrazené skvrny)

D3 (barevné skvrny)

Vysvětlivky:

15-16 (sumární frakce)

15-16K (krystaly odebrané  
z frakce 15-16)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:

1 – R<sub>f</sub> = 0,69

2 – R<sub>f</sub> = 0,64

3 – R<sub>f</sub> = 0,55

4 – R<sub>f</sub> = 0,49

5 – R<sub>f</sub> = 0,45

6 – R<sub>f</sub> = 0,43

7 – R<sub>f</sub> = 0,37

8 – R<sub>f</sub> = 0,33

9 – R<sub>f</sub> = 0,25

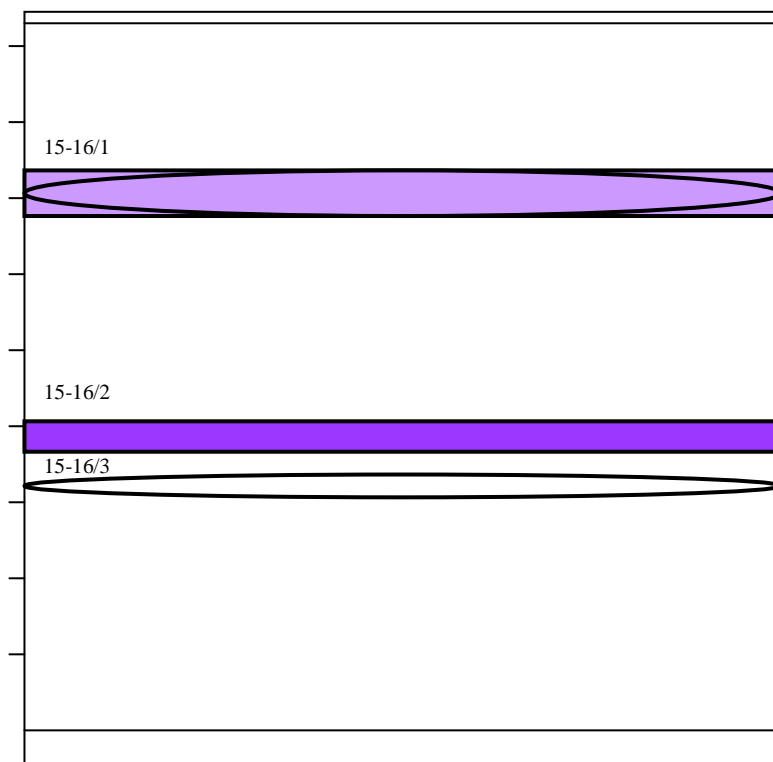
Ještěž množství frakcí získaných po HPLC dělení byla malá, frakce obsahovaly zbytky barviva a nevypadly z nich žádné krystaly, nebylo s nimi dále pracováno.

#### 4.7.4. Preparativní TLC frakce 15-16

#### 4.7.4.1. Chromatografické podmínky

Vzorek:	0,0800 g bylo rozpuštěno v $\text{CHCl}_3$ a naneseno na dvě desky
Adsorbent:	A2
Vyvíjecí soustava:	S6
Dělicí dráha:	18,8 cm
Vyvíjení:	1x
Desky:	20 x 20 cm
Detekce:	D1 (černě ohraničené obdélníky) D2 (černě ohraničené skvrny) D3 (barevné skvrny)

#### Schéma chromatogramu č. 9 (zmenšeno na 50%)



#### $R_f$ hodnoty zón:

$$15-16/1 - R_f = 0,74$$

$$15-16/2 - R_f = 0,41$$

$$15-16/3 - R_f = 0,34$$

#### 4.7.4.2. Výsledky preparativní TLC

Po rozdělení frakce pomocí preparativní TLC byly získány tři zóny, které byly označeny 15-16/1, 15-16/2, 15-16/3 a jejich charakteristika byla následující:

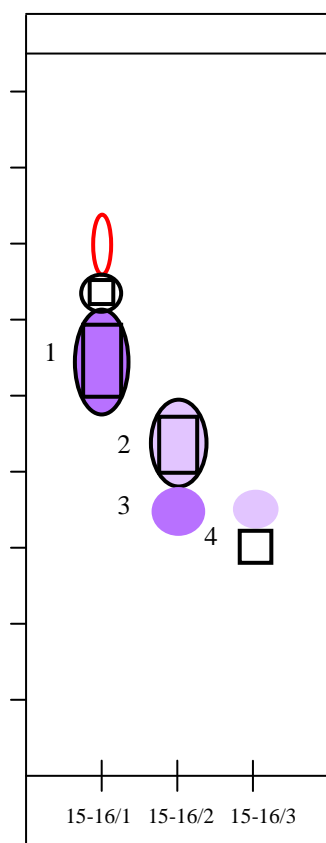
- 15-16/1: horní, nejširší zóna, detekovatelná D1, D2 (modrá), D3 (fialový pruh nad pruhem viditelným pod UV)
- 15-16/2: prostřední, užší zóna, detekovatelná D1, D3 (tmavě fialový pruh pod UV pruhem)
- 15-16/3: spodní, nejužší zóna, detekovatelná D2 (zelená)

Získané zóny byly z chromatogramu vystříhány, vyeluovány v  $\text{CHCl}_3$  a odpařeny. Hmotnost odparků byla  $m(15-16/1) = 0,0266 \text{ g}$ ,  $m(15-16/2) = 0,0120 \text{ g}$ ,  $m(15-16/3) = 0,0089 \text{ g}$ . Odparky byly rozpuštěny v  $\text{CHCl}_3$ , přeneseny do čistých zkumavek a uloženy do chladu.

#### 4.7.4.3. Orientační zkoušky frakcí získaných preparativní TLC

##### Orientační TLC frakcí

##### Schéma chromatogramu č. 10



Adsorbent:	A2
Vyvíjecí soustava:	S6
Dělicí dráha:	9,5 cm
Vyvíjení:	1x
Detekce:	D1 (černě ohraničené obdélníky) D2 (černě ohraničené skvrny) D3 (barevné skvrny)

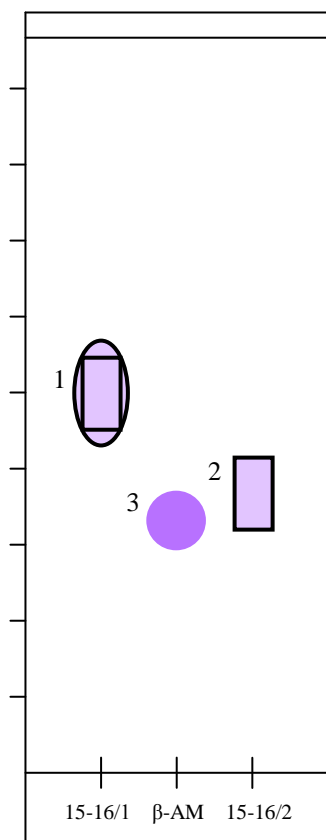
Vysvětlivky: červeně ohraničená skvrna označuje chlorofyl, který se při detekci D2 projevuje červenou barvou

<u>R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:</u>	1 - R <sub>f</sub> = 0,58 2 - R <sub>f</sub> = 0,45 3 - R <sub>f</sub> = 0,36
-------------------------------------	---

$$4 - R_f = 0,33$$

### Srovnávací TLC frakcí se standardy

#### Schéma chromatogramu č. 11



Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S6  
Dělicí dráha: 9,8 cm  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1 (černě ohraničené obdélníky)  
D2 (černě ohraničené skvrny)  
D3 (barevné skvrny)

Vysvětlivky: β-AM (β-amyrin)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn: 1 - R<sub>f</sub> = 0,51  
2 - R<sub>f</sub> = 0,38  
3 - R<sub>f</sub> = 0,35

### Zkoušky rozpustnosti

Frakce 15-16/1; 15-16/2; 15-16/3 byly odpařeny dosucha. K odpařeným frakcím byl přidán MeOH, frakce byly zahřáty a sledovány, zda se rozpouští za tepla.

Frakce 15-16/1 se snadno rozpustila. Z frakce 15-16/2 téměř ihned po přidání MeOH vypadly vločky, při rozpouštění se více rozptýlily v matečném louhu. Frakce 15-16/3 se za obyčejné teploty v MeOH nerozpustila a ani po zahřátí ji nebylo možno rozpustit. Ve zkumavce zůstala oddělená velmi viskózní fáze.

### Sledování změn frakcí

Z frakce 15-16/1 se za chladu v MeOH vyloučily krystaly. Byl odsát matečný louh, zkumavka s krystaly byla umístěna do exikátoru a po úplném vysušení byly krystaly přeneseny do malé vialky a zváženy. Hmotnost krystalů byla  $m = 1,7$  mg. Z matečného louhu frakce 15-16/1 se vyloučily další krystaly. Krystaly se rozpustily za tepla v MeOH a byly ponechány v prostředí MeOH v chladu, kde došlo opět k jejich krystalizaci. Čisté krystaly byly odděleny od matečného louhu. Celkem bylo získáno 7,3 mg bílých krystalů.

Ve frakci 15-16/2 byly v prostředí MeOH (za pět dnů) přítomny vyloučené krystaly. Rozpouštědlo bylo odpařeno, krystaly zůstaly neporušeny, dále byl přidán aceton, odsát matečný louh a přemístěn do další zkumavky.

### Teplota tání krystalů z frakce 15-16/1

Byla změřena teplota tání krystalů z frakce 15-16/1 t.t. = (52)55-58(61) °C

## **4.7.5. Preparativní TLC druhé části frakce 15-16**

### 4.7.5.1. Chromatografické podmínky

Vzorek:	0,1320 g bylo rozpuštěno v $\text{CHCl}_3$ a nanášeno na dvě desky
Adsorbent:	A2
Vyvíjecí soustava:	S6
Dělicí dráha:	18,8 cm
Vyvíjení:	1x
Detekce:	D1 (černě ohraničené obdélníky) D2 (černě ohraničené skvrny) D3 (barevné skvrny)

### 4.7.5.2. Výsledky preparativní TLC

Po provedení preparativní TLC druhé části frakce 15-16 byly získány opět tři zóny. Získané zóny byly z chromatogramu vystříhány, eluovány v  $\text{CHCl}_3$ , odpařeny a zváženy.

Hmotnost odparků činila:

15-16/1X:  $m = 0,0755 \text{ mg}$

15-16/2X:  $m = 0,0145 \text{ mg}$

15-16/3X:  $m = 0,0112 \text{ mg}$

Odparky byly rozpuštěny v  $\text{CHCl}_3$ , přeneseny do čistých zkumavek, částečně odpařeny a uloženy do chladu.

#### 4.7.5.3. Orientační zkoušky frakcí získaných preparativní TLC

##### Srovnávací TLC frakcí se standardy

##### Chromatografické podmínky:

Adsorbent:	A2
Vyvíjecí soustava:	S6
Dělicí dráha:	14,4 cm
Vyvíjení:	1x
Detekce:	D1, D2, D3

##### Vzorky a výsledky:

rutin - pozitivní detekce D3 (žlutý), zůstal na startu

kyselina chlorogenová - zůstala startu

4-hydroxykumarin -  $R_f = 0,07$

umbelliferon -  $R_f = 0,14$

frakce 15-16/1X -  $R_f = 0,45$

frakce 15-16/3X -  $R_f = 0,36$

##### Sledování změn frakcí

Do dalšího dne se z žádné získané frakce krystaly nevyloučily.

Frakce 15-16/1X byla odpařena dosucha, byl přidán MeOH a frakce byla ponechána v chladu. Z MeOH vypadly krystaly. Byla přidána další část MeOH. Část barviva obsaženého ve frakci se v přidaném MeOH rozpustila, krystaly zůstaly spleené oranžovou velmi viskózní tekutinou.

Frakce 15-16/2X se nezměnila. Byl přidán MeOH. Po zahřátí se frakce rozpustila, při pozvolném chladnutí se zakalila.

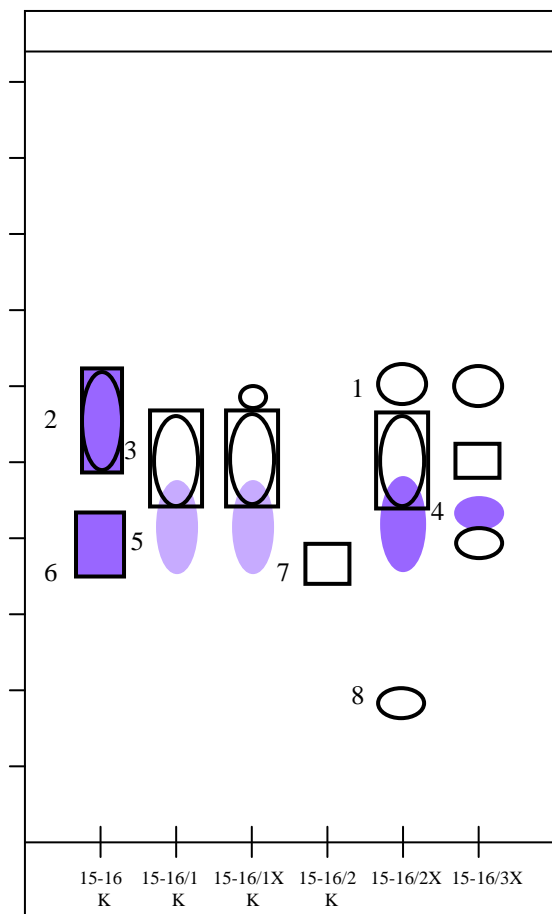
Frakce 15-16/3X se nezměnila. Byl přidán MeOH. Po zahřátí se frakce rozpustila a dále se nezměnila.





#### 4.7.6. Orientační TLC frakcí po TLC dělení frakce 15-16

Schéma chromatogramu č. 12



Adsorbent: A2

Vyvíjecí soustava: S6

Dělicí dráha: 10,4 cm

Vyvíjení: 1x

Detekce:

D1 (černě ohraničené obdélníky)

D2 (černě ohraničené skvrny)

D3 (barevné skvrny)

Vysvětlivky:

15-16K (krystaly odebrané z frakce 15-16)

15-16/1K (krystaly z frakce 15-16/1)

15-16/1XK (krystaly z frakce 15-16/1X)

15-16/2K (krystaly z frakce 15-16/2)

15-16/2X (frakce rozpuštěná v MeOH)

15-16/3X (frakce rozpuštěná v MeOH)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:

1 – R<sub>f</sub> = 0,59                      5 – R<sub>f</sub> = 0,39

2 – R<sub>f</sub> = 0,54                      6 – R<sub>f</sub> = 0,38

3 – R<sub>f</sub> = 0,48                      7 – R<sub>f</sub> = 0,36

4 – R<sub>f</sub> = 0,41                      8 – R<sub>f</sub> = 0,17

Výsledky:

Krystaly z frakce 15-16/1 a z frakce 15-16/1X jsou kvalitativně shodné.

#### 4.7.7. Přechištění krystalů z frakce 15 -16/1X

Krystaly z frakce 15-16/1X byly propláchnuty MeOH, zfiltróvány a s filtračním papírem umístěny do exikátoru. Vysušené krystaly byly z filtračního papíru přemístěny do malé vialky, zváženy a uloženy do exikátoru. Hmotnost krystalů byla  $m = 0,4$  mg. Filtrát byl částečně odpařen na vzduchu. V chladném proudícím vzduchu se filtrát zakalil a na stěnách se vyloučila oranžová sraženina.

Z filtrátu se opět vyloučily krystaly. Byla provedena stejná filtrace. Filtrační papír s krystaly byl uchován v exikátoru. Po vysušení byly krystaly z filtračního papíru přemístěny do malé vialky, zváženy a uloženy do exikátoru. Hmotnost krystalů byla  $m = 0,2$  mg. Filtrát byl částečně odpařen na vzduchu.

Z matečného louhu 15-16/1X se opět vyloučily krystaly. Byly odebrány ty krystaly, které se jevíly jako čisté.

Matečné louhy 15-16/1 a 15-16/1X byly spojeny, rozpuštěny v MeOH za studena a odpařovány na vzduchu. V chladném proudícím vzduchu vypadla poměrně brzy bílá sraženina. Obsah zkumavky byl uložen do mrazničky. Matečný luh byl odsát, byl přidán MeOH a zopakován stejný postup až k zisku čistých krystalů v prostředí MeOH. Krystaly byly dosušeny, zváženy  $m = 3,5$  mg a uloženy do exikátoru, matečný luh byl částečně odpařen a umístěn do chladu.

#### 4.7.8. Instrumentální analýza frakce

##### 4.7.8.1. Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Krystaly z frakce 15-16/1 o hmotnosti 5,3 mg byly předány k další analýze pomocí NMR na Katedru anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Pro potvrzení výsledků NMR byla provedena MS analýza v Praze. Pomocí NMR a MS spekter bylo zjištěno, že se jedná o podíl s obsahem esterů kyseliny 3-methoxy-4-hydroxyskořicové s dlouhými lineárními alkoholy ( $C_{14}$ - $C_{17}$ ).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 7.61 (d,  $J=15.9$  Hz, CH), 7.07 (dd,  $J=8.1$  Hz,  $J=1.9$  Hz, H6), 7.03 (d,  $J=1.9$  Hz, H2), 6.92 (d,  $J=8.1$  Hz, H5), 6.29 (d,  $J=15.9$  Hz, CH), 5.84 (bs, OH), 4.18 (t,  $J=6.7$  Hz, OCH<sub>2</sub>), 4.11 (t,  $J=6.7$  Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.93 (s, OCH<sub>3</sub>), 1.78-1.49 (m, CH<sub>2</sub>), 1.46-1.16 (m, CH<sub>2</sub>), 0.88 (t,  $J=6.7$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0.85 (t,  $J=6.7$  Hz, CH<sub>3</sub>)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 167.4, 147.8, 146.7, 144.6, 127.0, 123.0, 115.7, 114.7, 109.2, 64.6, 55.9, 39.0, 36.6, 34.4, 31.9, 30.0, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 28.8, 28.0, 27.4, 27.1, 26.0, 22.7, 19.2, 14.1, 11.4; (poloha substituentů skořicové kyseliny byla potvrzena experimenty: GHMQC, GHSQC, DPGNOE).<sup>88, 89</sup>



## 4.8. Zpracování frakce 17

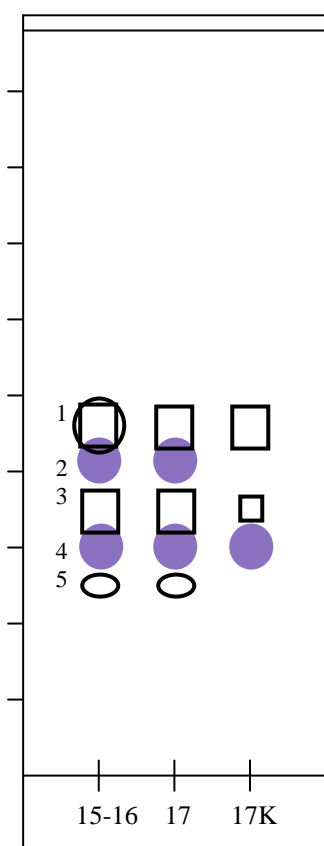
### 4.8.1. Úvodní charakteristika frakce 17

Frakce měla ve zředěném stavu vzhled světle zelenooranžové tekutiny, její odparek byl tmavě zelenooranžový. Hmotnost odparku byla  $m(17) = 0,1540$  g.

Frakce se jevila jako zajímavá, jelikož se zdála být velmi podobná frakci 15-16. Frakce obsahovala chlorofyl, proto bylo dalším cílem tuto frakci dále rozdělit. K dalšímu dělení byla odebrána část z celkové frakce.

### 4.8.2. Orientační TLC frakce 17

#### Schéma chromatogramu č. 13

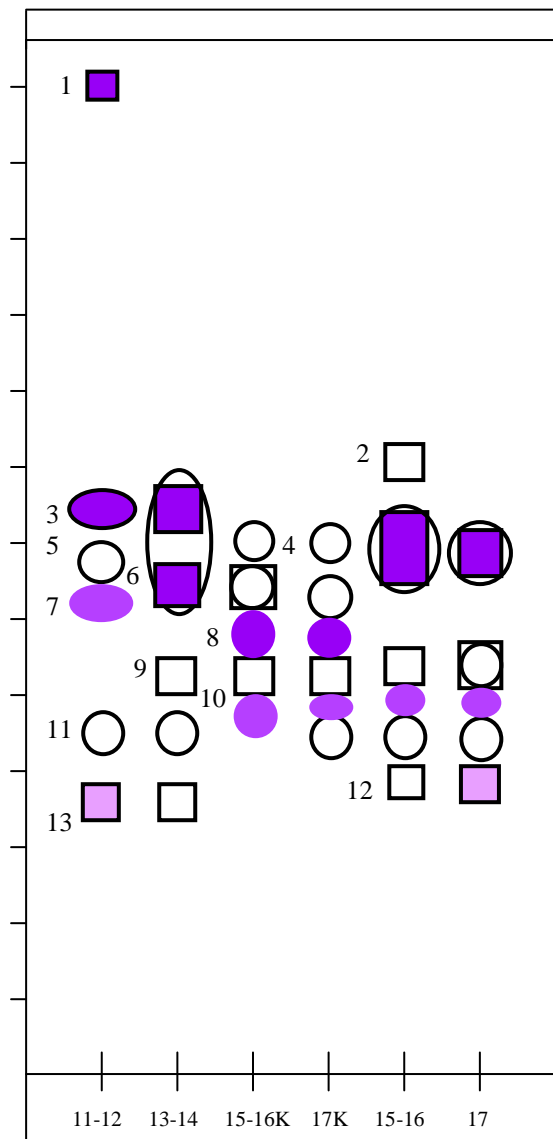


Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S1  
Dělicí dráha: 9,8 cm  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1 (černě ohraničené obdélníky)  
D2 (černě ohraničené skvrny)  
D3 (barevné skvrny)

Vysvětlivky: 17K (krystaly z frakce 17)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn: 1 – R<sub>f</sub> = 0,47  
2 – R<sub>f</sub> = 0,43  
3 – R<sub>f</sub> = 0,36  
4 – R<sub>f</sub> = 0,31  
5 – R<sub>f</sub> = 0,26

### Schéma chromatogramu č. 14



Adsorbent: A2

Vyvíjecí soustava: S1

Dělicí dráha: 13,6 cm

Vyvíjení: 1x

Detekce:

D1 (černě ohraničené obdélníky)

D2 (černě ohraničené skvrny)

D3 (barevné skvrny)

Vysvětlivky:

15-16K (krystaly z frakce 15-16)

17K (krystaly z frakce 17)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:

1 - R<sub>f</sub> = 0,95                      8 - R<sub>f</sub> = 0,43

2 - R<sub>f</sub> = 0,60                      9 - R<sub>f</sub> = 0,39

3 - R<sub>f</sub> = 0,54                      10 - R<sub>f</sub> = 0,36

4 - R<sub>f</sub> = 0,51                      11 - R<sub>f</sub> = 0,33

5 - R<sub>f</sub> = 0,49                      12 - R<sub>f</sub> = 0,29

6 - R<sub>f</sub> = 0,47                      13 - R<sub>f</sub> = 0,27

7 - R<sub>f</sub> = 0,46

### 4.8.3. Preparativní TLC frakce 17

#### 4.8.3.1. Chromatografické podmínky

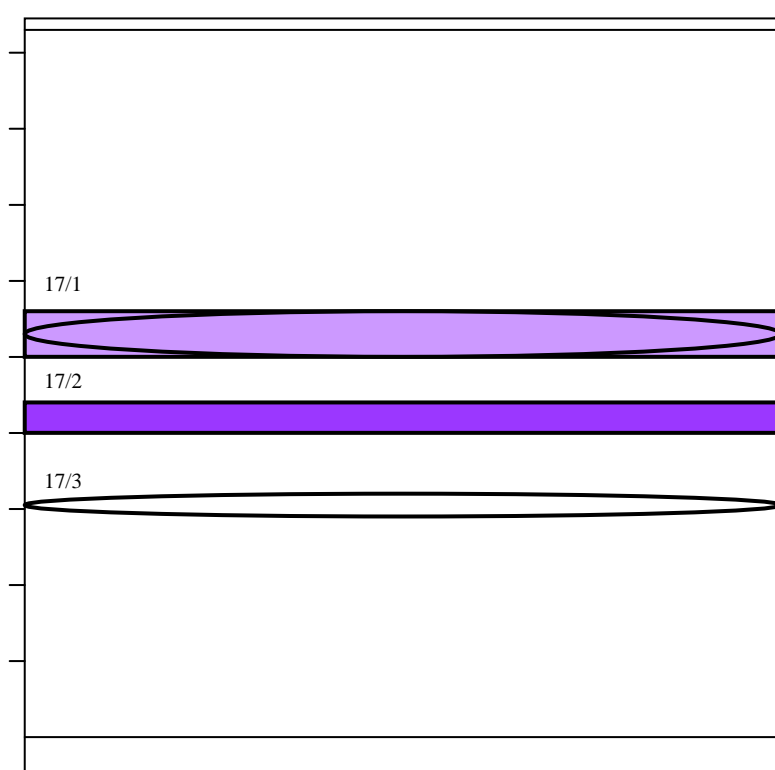
Vzorek: 0,0500 g bylo rozpuštěno v CHCl<sub>3</sub> a nanášeno na čtyři desky

Adsorbent: A2, předem nasycený mobilní fází

Vyvíjecí soustava: S7

Dělicí dráha: 18,8 cm  
Vyvíjení: 2x  
Desky: 20 x 20 cm  
Detekce: D1 (černě ohraničené obdélníky)  
D2 (černě ohraničené skvrny)  
D3 (barevné skvrny)

#### Schéma chromatogramu č. 15 (zmenšeno na 50%)



R<sub>f</sub> hodnoty zón:

17/1 – R<sub>f</sub> = 0,57

17/2 – R<sub>f</sub> = 0,45

17/3 – R<sub>f</sub> = 0,32

#### 4.8.3.2. Výsledky preparativní TLC

Po rozdělení frakce 17 pomocí preparativní TLC byly získány tři zóny, které byly označeny 17/1, 17/2, 17/3 a měly tyto znaky:

17/1: horní zóna, detekovatelná D1, D2 (světle modrá), D3 (světle fialová barva)

17/2: prostřední zóna, detekovatelná D1, D2 (tmavě modrá), D3 (tmavě fialová)

17/3: spodní zóna, detekovatelná D2 (zelená a červená)

Zóny byly vystříhány ze všech desek, eluovány v  $\text{CHCl}_3$ , odpařeny a zváženy. Hmotnost odparků činila:

17/1:  $m = 0,0201 \text{ g}$

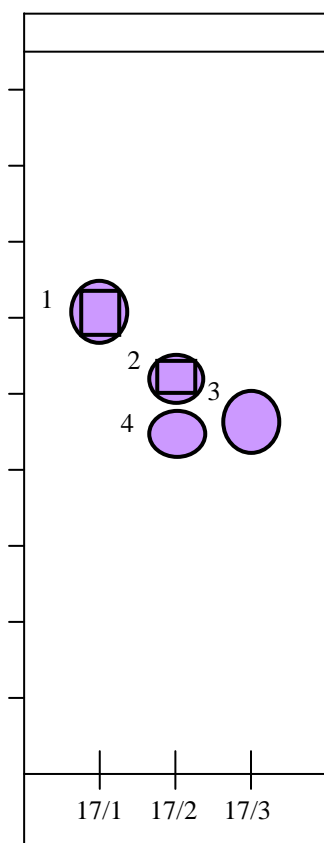
17/2:  $m = 0,0031 \text{ g}$

17/3:  $m = 0,0053 \text{ g}$

Odparky byly rozpuštěny v  $\text{CHCl}_3$ , přeneseny do čistých zkumavek, částečně odpařeny a uloženy do chladu.

#### 4.8.3.3. Orientační TLC frakcí získaných dělením frakce 17

#### Schéma chromatogramu č. 16

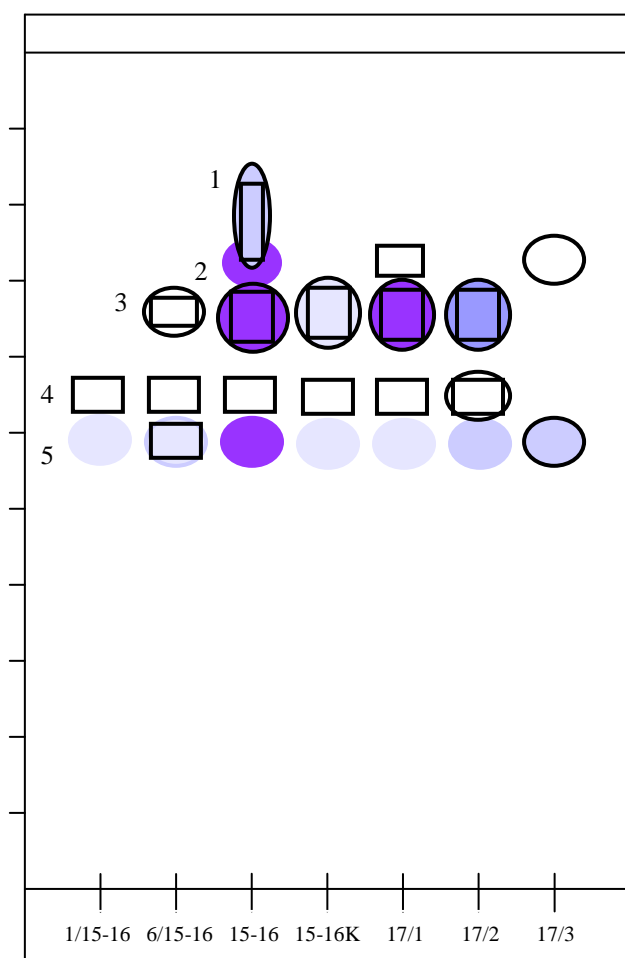


Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S7  
Dělicí dráha: 9,5 cm  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1 (černě ohraničené obdélníky)  
D2 (černě ohraničené skvrny)  
D3 (barevné skvrny)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:  
1 - R<sub>f</sub> = 0,64  
2 - R<sub>f</sub> = 0,55  
3 - R<sub>f</sub> = 0,48  
4 - R<sub>f</sub> = 0,46



## Schéma chromatogramu č. 17



Adsorbent: A1

Vyvíjecí soustava: S6

Dělicí dráha: 11 cm

Vyvíjení: 1x

Detekce:

D1 (černě ohraničené obdélníky)

D2 (černě ohraničené skvrny)

D3 (barevné skvrny)

Vysvětlivky:

1/15-16; 6/15-16 (frakce získané  
z HPLC dělení frakce 15-16)

15-16K (krystaly z frakce 15-16)

17/1; 17/2; 17/3 (frakce získané  
preparativní TLC frakce 17)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:

1 – R<sub>f</sub> = 0,83                      4 – R<sub>f</sub> = 0,59

2 – R<sub>f</sub> = 0,75                      5 – R<sub>f</sub> = 0,53

3 – R<sub>f</sub> = 0,69

Další pozornost ve zpracování byla zaměřena na frakci 17/1.

### 4.8.4. Frakce 17/1

#### 4.8.4.1. Orientační zkoušky

Frakce 17/1 byla rozpouštěna v MeOH za tepla. I přesto, že rozpouštění probíhalo velice pomalu, frakce se nakonec rozpustila. Po ochlazení v lednici byl MeOH odpařován v proudu vzduchu. V chladném proudícím vzduchu vypadly po stěně zkumavky voskovité krystaly, které ohřátím zkumavky v ruce roztály. K frakci byl následně přidán aceton. V acetonu se obsah rozpustil dobře i za studena. Pro velmi malé množství a značné znečištění vyloučených krystalů nebylo s touto frakcí dále pracováno.

#### **4.8.5. Vyhodnocení významu frakce 17**

Jelikož kromě frakce 17/1 nedošlo u frakcí 17/2 a 17/3 k vyloučení krystalů a množství jednotlivých frakcí získaných po TLC dělení bylo malé, frakce dále zpracovávána nebyla a pozornost byla soustředěna na jiné frakce.

### **4.9. Zpracování frakce 36-40**

#### **4.9.1. Úvodní charakteristika frakce 36-40**

Frakce 36-40 měla po eluci světle zelenou barvu, její odparek tmavě zelenou a byl velmi viskózní konzistence. Hmotnost odparku byla  $m(36-40) = 0,9579\text{g}$ .

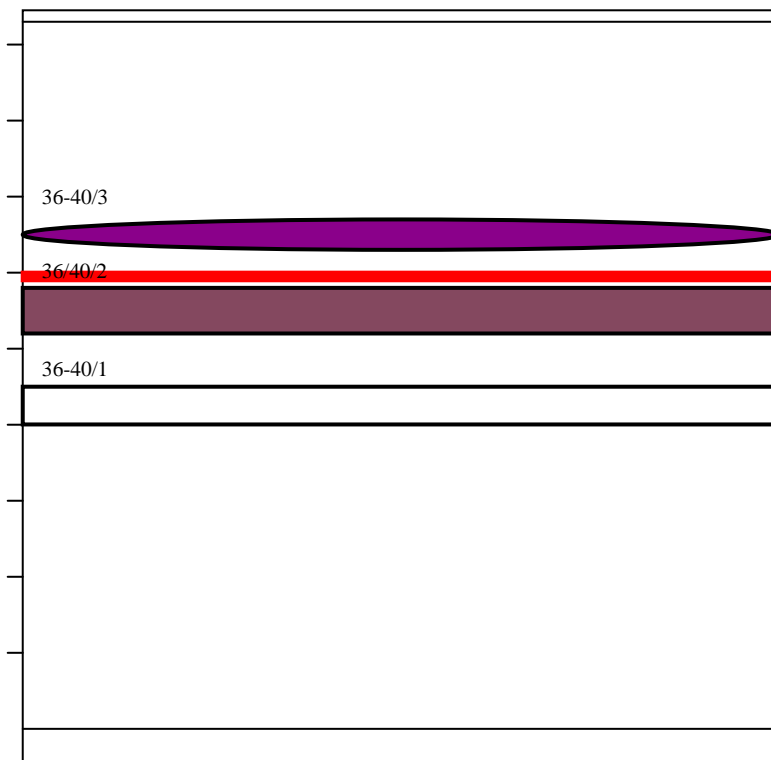
Frakce se jevila jako zajímavá, jelikož se z ní poměrně brzy po jejím získání vyloučily krystaly. Frakce ovšem obsahovala značné množství chlorofylu, proto bylo nutno ji dále rozdělit.

#### **4.9.2. Preparativní TLC frakce 36-40**

##### **4.9.2.1. Chromatografické podmínky**

Vzorek:	50 mg frakce 36-40 bylo rozpuštěno v 1 ml $\text{CHCl}_3$ , vzorek byl nanesen na dvě desky adsorbentu A2 vždy po 500 $\mu\text{l}$
Adsorbent:	A2
Vyvíjecí soustava:	S8
Vyvíjení:	1x
Dělicí dráha:	18,8 cm
Desky:	20 x 20 cm
Detekce:	D1 (černě ohraničené obdélníky) D2 (černě ohraničené skvrny) D3 (barevné skvrny)

### Schéma chromatogramu č. 18 (zmenšeno na 50%)



#### Poznámka:

červený pruh značí chlorofyl  
po detekci D2

#### R<sub>f</sub> hodnoty zón:

36-40/1 – R<sub>f</sub> = 0, 52

36-40/2 – R<sub>f</sub> = 0, 59

36-40/3 – R<sub>f</sub> = 0, 70

#### 4.9.2.2. Výsledky preparativní TLC

Po vyvinutí byly na chromatogramu jasně patrné tři oddělené zóny, které byly označeny 36-40/1, 36-40/2, 36-40/3 a měly následující znaky:

- 36-40/1: spodní zóna, detekovatelná D1
- 36-40/2: prostřední zóna, široký pruh, detekovatelná D1 (na její horní hraně tenký načervenalý proužek detekovatelný UV 366), D3 (hnědošedá barva)
- 36-40/3: horní zóna (proužek pod pruhem chlorofylu), detekovatelná D2 (modrá), D3 (tmavě fialová)

Zóny byly z chromatogramu vystříhány, eluovány v CHCl<sub>3</sub> a odpařeny. Hmotnost odparků z jednotlivých zón činila:

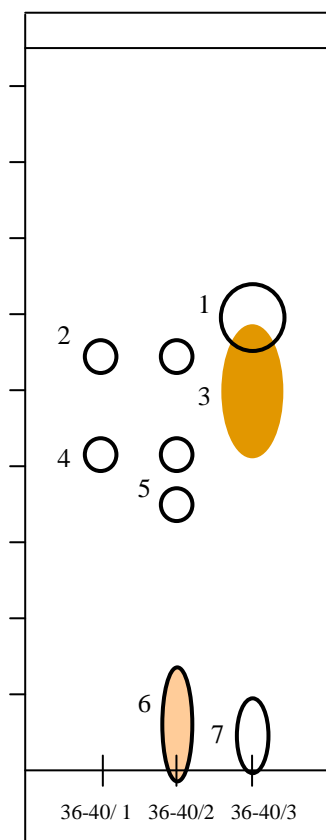
- 36-40/1: m = 0,0049 g
- 36-40/2: m = 0,0043 g
- 36-40/3: m = 0,0212 g

Odparky byly rozpuštěny v CHCl<sub>3</sub>, přeneseny do čistých zkumavek, částečně odpařeny a uloženy do chladu.

### 4.9.2.3. Orientační zkoušky frakcí získaných preparativní TLC

#### Orientační TLC získaných frakcí

#### Schéma chromatogramu č. 19



Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S9  
Dělicí dráha: 9,5 cm  
Vyvíjení: 3x  
Detekce: D1 negativní  
D2 (černě ohraničené skvrny)  
D3 (barevné skvrny)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:  
1 – R<sub>f</sub> = 0,63  
2 – R<sub>f</sub> = 0,57  
3 – R<sub>f</sub> = 0,56  
4 – R<sub>f</sub> = 0,44  
5 – R<sub>f</sub> = 0,37  
6 – R<sub>f</sub> = 0,08

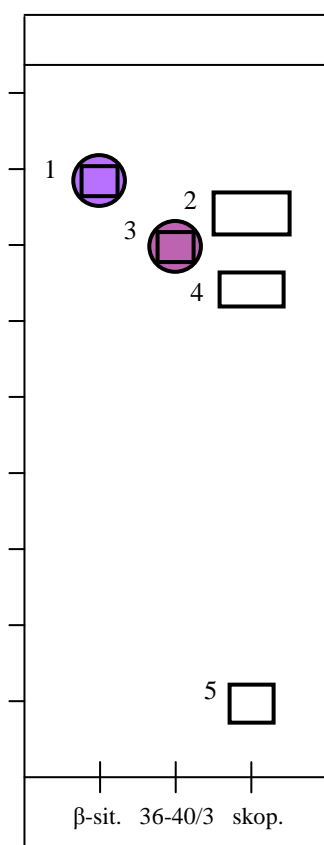
#### Sledování změn frakcí

Frakce byly stále sledovány. Pro další zpracování byla vybrána pouze frakce 36-40/3, jelikož se z ní po stěnách zkumavky vyloučily bílé krystaly. Ostatní frakce byly značně znečištěné a jejich malé množství nedovolilo s nimi dále pracovat.

### 4.9.3. Zpracování frakce 36-40/3

#### 4.9.3.1. Srovnávací TLC frakce 36-40/3 se standardy

##### Schéma chromatogramu č. 20



Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S10  
Dělicí dráha: 9,4 cm  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1 (černě ohraničené obdélníky)  
D2 (černě ohraničené skvrny)  
D3 (barevné skvrny)

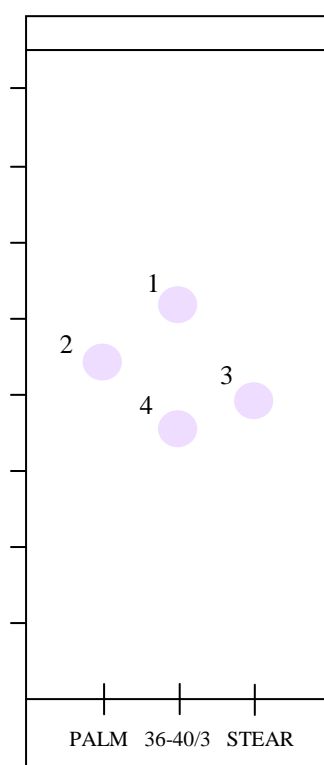
Vysvětlivky: skop. (skopoletin)  
 $\beta$ -sit. ( $\beta$ -sitosterol)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn: 1 - R<sub>f</sub> = 0,84  
2 - R<sub>f</sub> = 0,78  
3 - R<sub>f</sub> = 0,74  
4 - R<sub>f</sub> = 0,67  
5 - R<sub>f</sub> = 0,11

##### Výsledky:

Skopoletin svítí modře při detekci UV 254, nelze jej detekovat pod vanilinovým činidlem, detekovány byly jeho rozkladné produkty. R<sub>f</sub> hodnoty frakce 36-40/3 byly velice podobné skopoletinu, barva po detekci D3 byla hnědofialová.  $\beta$ -sitosterol je detekovatelný D1, D2, po detekci vanilinovým činidlem má fialovou barvu.

### Schéma chromatogramu č. 21

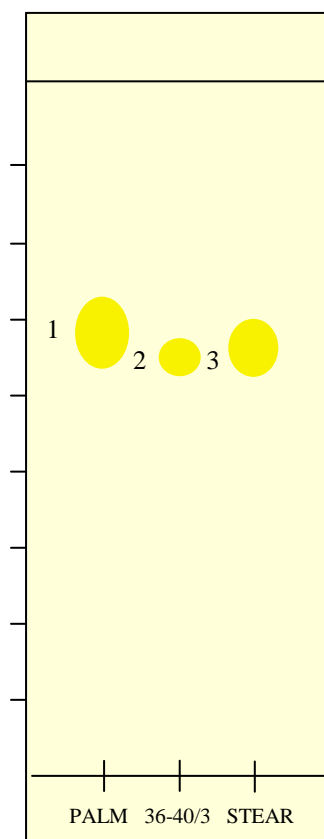


Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S11  
Dělicí dráha: 8,5 cm  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1 (negativní)  
D2 (negativní)  
D4 (barevné skvrny)

Vysvětlivky: PALM (kyselina palmitová)  
STEAR (kyselina stearová)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn: 1 - R<sub>f</sub> = 0,61  
2 - R<sub>f</sub> = 0,51  
3 - R<sub>f</sub> = 0,45  
4 - R<sub>f</sub> = 0,41

### Schéma chromatogramu č. 22



Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S11  
Dělicí dráha: 9,1 cm  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D6

Vysvětlivky: PALM (kyselina palmitová)  
STEAR (kyselina stearová)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn: 1 - R<sub>f</sub> = 0,64  
2 - R<sub>f</sub> = 0,60  
3 - R<sub>f</sub> = 0,62

### Výsledky:

Na podkladě této TLC vyplývá, že ve vzorku jsou přítomny kyseliny palmitová a stearová.

#### 4.9.3.2. Orientační zkoušky

##### Zkoušky rozpustnosti

Frakce byla odpařena a byl k ní přidán MeOH. V prostředí MeOH vykristalizovaly bílé krystaly, které byly rozpustné v  $\text{CHCl}_3$  a jevily se jako relativně čisté. Proto byly odebrány do nové zkumavky. Bylo takto získáno 7,0 mg krystalů.

##### Teplota tání krystalů

U vyloučených krystalů byla změřena teplota tání, která měla hodnotu  $t.t = 42-44\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **4.9.4. Instrumentální analýza frakce**

##### 4.9.4.1. Nukleární magnetická rezonance

5,3 mg krystalů z frakce 36-40/3 bylo odebráno k další analýze pomocí NMR na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Pro potvrzení výsledků z NMR byla provedena analýza pomocí MS v Praze. Na základě údajů získaných NMR a MS analýzou, včetně porovnání s TLC, byla potvrzena směs obsahující mastné kyseliny. Jednalo se o kyselinu palmitovou, heptadekanovou a stearovou.

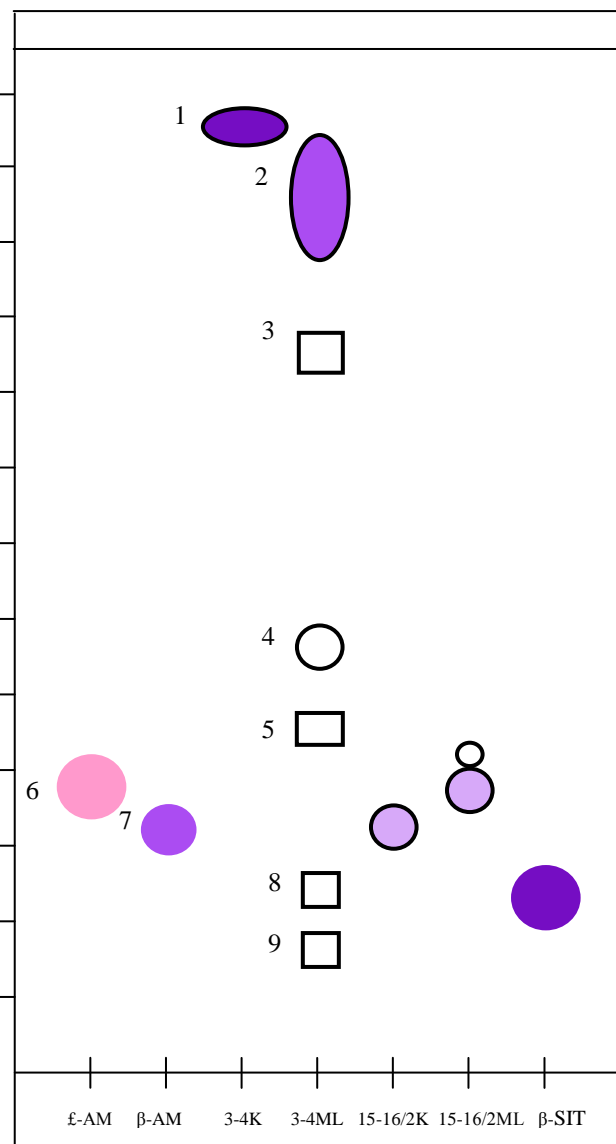
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 2.35 (t,  $J=7.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 1.71-1.55 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1.40-1.17 (m,  $\text{CH}_2$ ), 0.88 (t,  $J=6.7$  Hz,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 179.1, 179.1, 33.9, 31.9, 29.7, 29.7, 29.6, 29.4, 29.4, 29.2, 29.0, 28.8, 24.7, 24.5, 22.7, 14.1<sup>88, 89</sup>

Záznam analýzy krystalického podílu frakce 36-40/3 pomocí NMR je vyobrazen v příloze č. 5.

#### 4.10. Srovnávací TLC vybraných frakcí se standardy

Schéma chromatogramu č. 23



Adsorbent: A2  
Vyvíjecí soustava: S12  
Dělicí dráha: 13,5 cm  
Vyvíjení: 1x  
Detekce:  
D1 (černě ohraničené obdélníky)  
D2 (černě ohraničené skvrny)  
D3 (barevné skvrny)

Vysvětlivky:

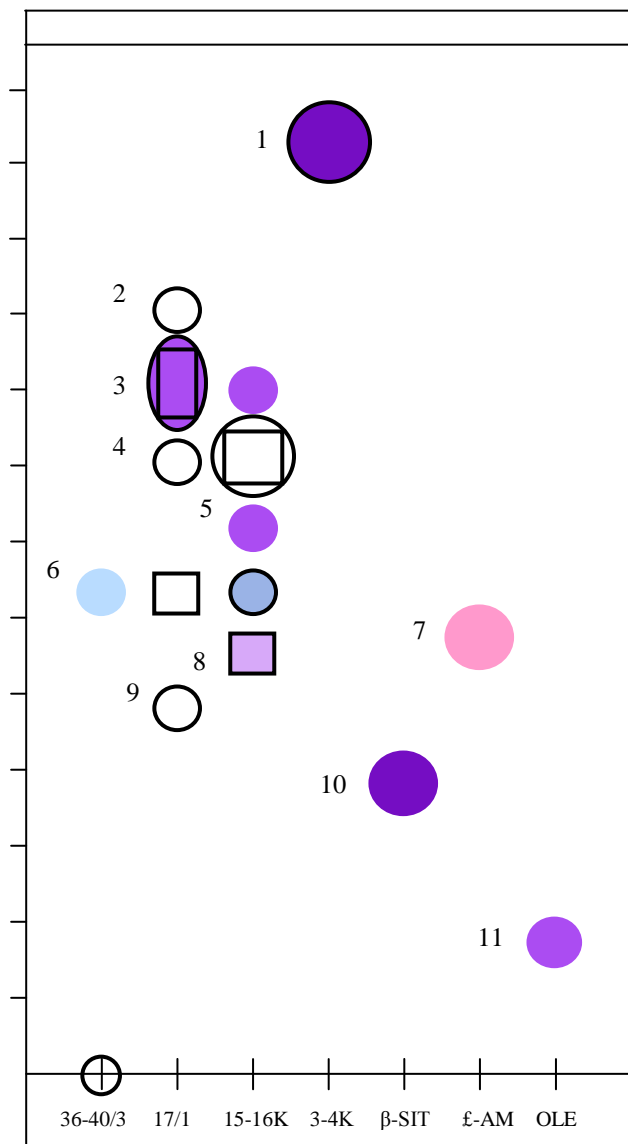
K (krystaly z frakce)  
ML (matečný louh frakce)  
£-AM (£-amyrin)  
β-AM (β-amyrin)  
β-SIT (β-sitosterol)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:

1 – R <sub>f</sub> = 0,92	6 – R <sub>f</sub> = 0,27
2 – R <sub>f</sub> = 0,85	7 – R <sub>f</sub> = 0,24
3 – R <sub>f</sub> = 0,70	8 – R <sub>f</sub> = 0,18
4 – R <sub>f</sub> = 0,41	9 – R <sub>f</sub> = 0,07
5 – R <sub>f</sub> = 0,33	



Schéma chromatogramu č. 24



Adsorbent: A2  
 Vyvíjecí soustava: CHCl<sub>3</sub>  
 Dělicí dráha: 13,6 cm  
 Vyvíjení: 1x

Detekce:  
 D1 (černě ohraničené obdélníky)  
 D2 (černě ohraničené skvrny)  
 D3 (barevné skvrny)

Vysvětlivky:

K (krystaly z frakce)

β-SIT (β-sitosterol)

£-AM (£-amyrin)

OLE (kyselina oleanová)

R<sub>f</sub> hodnoty skvrn:

1 – R <sub>f</sub> = 0,90	7 – R <sub>f</sub> = 0,43
2 – R <sub>f</sub> = 0,74	8 – R <sub>f</sub> = 0,41
3 – R <sub>f</sub> = 0,66	9 – R <sub>f</sub> = 0,36
4 – R <sub>f</sub> = 0,60	10 – R <sub>f</sub> = 0,29
5 – R <sub>f</sub> = 0,55	11 – R <sub>f</sub> = 0,14
6 – R <sub>f</sub> = 0,47	

## 4.11. Zkoušky biologické aktivity

### 4.11.1. Stanovení akutní toxicity

Stanovení akutní toxicity bylo prováděno rychlým laboratorním testem akutní toxicity - zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*.

#### Příprava roztoků referenční látky

Jako referenční látka byl použit  $\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  tak, jak je uvedeno v návodu podle Tichého. Bylo naváženo 2,2003 g  $\text{MnCl}_2$  a v odměrné baňce doplněno do 25 ml destilovanou vodou. Při ředěních tohoto základního roztoku byla nižší koncentrace získána odebráním 9 ml předchozí koncentrace a přidáním 3 ml vody.

#### Příprava roztoků zkoumaného extraktu

##### Základní roztok bez přídavku DMSO

Na akutní toxicitu byl zkoušen sumární petroletherový extrakt, který je nerozpustný ve vodě. Proto bylo možno připravit pouze emulzi. Pod pojmem roztok zde tedy budeme mít na mysli emulzi. Byl připraven 10% roztok Pe extraktu. 1 ml tohoto roztoku obsahoval 0,1 g extraktu a 0,9 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Výsledná původní koncentrace je tedy 0,1 g/1ml.

##### Základní roztok s přídavkem DMSO

Pro zvýšení rozpustnosti Pe extraktu ve vodě byl při přípravě dalších základních roztoků použit DMSO. Byly připraveny roztoky s přídavkem 1 % DMSO (roztok obsahoval 0,1 g Pe extraktu, 0,01 g DMSO a 0,89 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) a 5 % DMSO (0,1 g Pe extraktu, 0,05 g DMSO a 0,85 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

Extrakt byl po přidání vody homogenizován pomocí ultrazvuku. Voda se zakalila, ale zelený viskózní extrakt zůstal oddělený jako druhá fáze.

Základní roztok 0,1 g/ml byl připravován také ze sumární frakce 3-4. Po homogenizaci pomocí ultrazvuku se vytvořila emulze, zůstala oddělená lipofilní fáze. Se vzorkem nebylo dále pracováno.

#### Předpokládané ředění roztoků

Bylo dohodnuto, že nižší koncentrace budou připraveny ředěním původní koncentrace vodou v poměru 3:1, tedy  $\frac{3}{4}$  původní koncentrace. K 0,75 ml původního roztoku se přidá 0,25 ml

H<sub>2</sub>O. Číselně se tedy jedná o tyto koncentrace 0,1 g/ml; 0,075 g/ml; 0,0563 g/ml; 0,0422 g/ml; 0,0316 g/ml; 0,0237 g/ml.

#### Pracovní postup a průběh testu

Test byl prováděn dle návodu Tichého popsaného v části 3.5.

#### Porovnávací roztok

Výsledky testování porovnávacího roztoku uvádí následující tabulka.

Tabulka č. 3: Výsledky testování MnCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O

<b>koncentrace</b>	<b>roztoky (3min)</b>	<b>voda (1min)</b>
základní roztok	6, 6, 6	6, 6, 6
K1	6, 6, 6	6, 6, 6
K2	6, 6, 6	6, 6, 6
K3	6, 6, 6	6, 6, 6
K4	6, 6, 5	5, 6, 5

#### Zkoumaný roztok

Jako první koncentrace při testování na nitěnkách byla použita koncentrace základního roztoku 0,1 g/ml bez přídavku DMSO. Šest vybraných jedinců bylo vystaveno působení vzorku po dobu 3 minut. Žádný jedinec nezahynul a to ani poté, co byly nitěnky přeneseny do čisté vody na dobu 1 minuty. Z výsledků bylo zřejmé, že zkoušení slabších koncentrací nemá smysl.

Základní roztok s přídavkem 5 % DMSO viditelně poškozoval nitěnky. Nitěnky zčervenaly, docházelo k postupnému útlumu aktivity a hynutí. Toto poškozování bylo zapříčiněno velkou koncentrací DMSO.

#### Vyhodnocení

Podmínkou provedení testu je rozpustnost zkoušené látky ve vodě. Petroletherový extrakt je prakticky ve vodě nerozpustný, přesto mohlo dojít k rozdělení některých látek do vodné fáze. Emulze Pe extraktu ve vodě ani po přídavku DMSO nevykázala žádnou akutní toxicitu. Příčinou může být fakt, že aktivní látky nepřešly do vody a proto ani nemohly působit na testované červy.

#### 4.11.2. Stanovení antiagregační aktivity

Antiagregační aktivita byla stanovena u spojených krystalů vyloučených z frakce 15-16/1 a 15-16/1X. Stanovení antiagregační aktivity metodou agregometrie bylo provedeno dle popisu v části 3.6. na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie UK. 1 mg vzorku byl před vlastním stanovením rozpuštěn v DMSO a byla získána požadovaná koncentrace 500 µg/ml PRP. Jako agonista byl použit kolagen. Vlastní měření bylo vyhodnoceno programem Aggro/Link. Krystaly vykazovaly mírnou antiagregační aktivitu. Pro nedostatek látky nebylo možno provést měření jiných agonistů.

Výsledky měření antiagregační aktivity jsou uvedeny v příloze č. 6.

#### 4.11.3. Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla měřena na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie UK.

##### Podmínky měření

##### Přístrojové zařízení:

FIALab 3000 analyzátor (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) řízený počítačem (FIALab for Windows software), vybavený 2,5ml injekční pumpou, šesticestným selekčním ventilem, spektrofotometrem USB2000-UV/VIS se světelným zdrojem LS-1 (Ocean Optics, USA) a průtokovou celou SMA-Z (délky 1 cm), objem nosné cívky je 0,6 ml a spojující PTFE potrubí (Watrex, Prague) má v průměru 0,72 mm.

Reakční činidlo: DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl)  
koncentrace 0,03 mg/ml EtOH 50%

Měřeno při vlnové délce: 525 nm

Koncentrace vzorků: 1 mg/ml EtOH 50%  
0,5 mg/ml EtOH 50%  
0,25 mg/ml EtOH 50%  
0,1 mg/ml EtOH 50%

Použitá rozpouštědla: EtOH 96%  
EtOH 50%  
voda

## Postup

Potřebné koncentrace vzorků pro měření byly připraveny rozpuštěním v EtOH 50%. Rozpuštění bylo podpořeno ponecháním vzorku v ultrazvukové lázni. V některých případech byl vzorek nejprve rozpuštěn v EtOH 96% a následným přidáním vody byla získána požadovaná koncentrace. Do zkumavky s připraveným vzorkem byla vložena přírodní hadička a byl spuštěn program pro stanovení antioxidační aktivity. Analyzátor a počítač automaticky provedly měření hodnoty absorbance.

## Výpočet úbytku absorbance proti slepému vzorku v %

$$X = 100 - Aa/Ab \times 100$$

Vysvětlivky: X.....úbytek absorbance

Aa...hodnota absorbance vzorku

Ab...průměrná hodnota absorbance slepého vzorku

## Výsledky

Antioxidační aktivita byla měřena u roztoků připravených ze sumárního Pe extraktu a krystalických podílů frakcí 3-4, 15-16/1, 36-40/3 o různé koncentraci. Naměřené výsledky jednotlivých vzorků jsou uvedené v tabulce. Jako slepý vzorek bylo použito čisté rozpouštědlo EtOH 50%.

Tabulka č. 4: Výsledky stanovení antioxidační aktivity

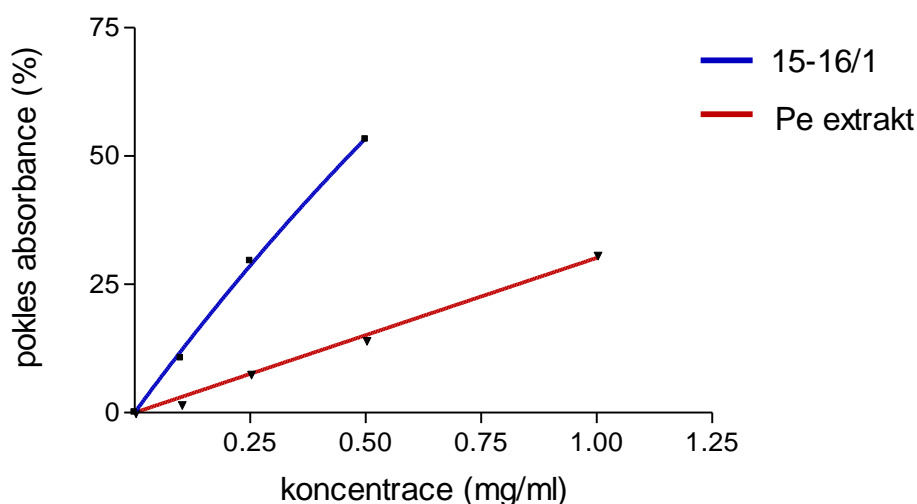
<b>vzorek</b>	<b>koncentrace [mg/ml]</b>	<b>měření (absorbance)</b>	<b>průměr</b>	<b>úbytek absorbance [%]</b>	<b>průměr</b>
slepý	0	0,4366; 0,4485; 0,4540	0,4464	0	0
36-40/3	1	0,4431; 0,4480; 0,4495	0,4469	0,74; 0; 0	0,74
3 - 4 <sup>1</sup>	1	0,4468; 0,4438; 0,4432	0,4446	0; 0,58; 0,72	0,65
slepý <sup>2</sup>	0	0,3989; 0,3967; 0,3963	0,3973	0	0
15-16/1 <sup>3</sup>	0,5	0,2007; 0,1738; 0,1828	0,1858	49,48; 56,25; 53,99	53,24
15-16/1	0,25	0,2816; 0,2789; 0,2793	0,2799	29,12; 29,80; 29,70	29,54
15-16/1	0,1	0,3596; 0,3510; 0,3547	0,3551	9,49; 11,65; 10,72	10,62
Pe extrakt <sup>4</sup>	1	0,2850; 0,2673; 0,2730	0,2751	28,27; 32,72; 31,29	30,76
Pe extrakt	0,5	0,3445; 0,3420; 0,3367	0,3411	13,29; 13,92; 15,25	14,15
Pe extrakt	0,25	0,3655; 0,3665; 0,3694	0,3671	8,00; 7,75; 7,02	7,59
Pe extrakt	0,1	0,3885; 0,3900; 0,3938	0,3908	2,21; 1,84; 0,88	1,64

### Poznámky k tabulce:

1. Frakci nebylo možno rozpustit v EtOH 50%. Vzniklá emulze byla následně zfiltrována. S filtrátem byla provedena zkouška na antioxidační aktivitu. Antioxidační aktivita prokázána nebyla.
2. Vzhledem k chemické nestálosti reakčního činidla bylo nutné proměřit slepý vzorek několikrát.
3. Pro zajištění lepší rozpustnosti vzorku byla jako počáteční koncentrace připravena koncentrace 0,5 mg/ml. Ze stejného důvodu byl vzorek nejprve rozpuštěn v EtOH 96% za pomoci ultrazvuku a následným přidáním vody byla získána požadovaná výchozí koncentrace 0,5 mg/ml EtOH 50%.
4. Extrakt byl nejprve rozpouštěn v EtOH 96% za pomoci ultrazvuku, následně byla přidána voda a tak získána požadovaná výchozí koncentrace 1 mg/ml EtOH 50%.

Z výsledků uvedených v tabulce je patrné, že nejsilnější antioxidační aktivitu projevil krystalický podíl frakce 15-16/1, následoval sumární Pe extrakt. Vypočítaná hodnota  $EC_{50}$  (15-16/1) je 0,46 mg/ml. Byla porovnávána se změřeným standardem kvercetinem  $EC_{50} = 0,026$  mg/ml.<sup>88, 89</sup>

Graf č.1: Závislost poklesu absorbance na koncentraci u Pe extraktu a krystalů 15-16/1



## V. DISKUZE

Léčivé rostliny používané v tradiční medicíně východní Asie jsou léty vyzkoušené, mají bohatou tradici a široké využití v lidovém léčitelství. Tyto rostliny se stále více dostávají do Evropy, lidé poznávají kulturu jiných zemí a přírodní léčba se stává novou alternativou. Rostliny mají své účinky a mohou být pro nás zdrojem nových účinných látek či přípravků. Jedná se však o rostliny dosud neprozkoumané, existuje jen velmi málo vědeckých důkazů o jejich účincích. Mohou se proto stát předmětem falšování a záměn, ale i původcem různých interakcí a nežádoucích účinků. Na trhu je dostupná řada přípravků, které obsahují tyto rostliny, ale není zde žádný vědecký podklad o tom, že skutečně působí léčivě. Přípravky jsou schváleny pouze jako potravní doplňky a je nutno k nim přistupovat s určitou rezervou.

Jednou z bylin tradičně využívaných v ájurvédském léčitelství je *Evolvulus alsinoides*. Bylina je tradičně používána k léčbě nejrůznějších poruch nervového systému. Proto její důkladné prozkoumání nám může dát nové možnosti právě k léčbě závažných neurodegenerativních onemocnění. Z těchto důvodů byl na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy zahájen fytochemický výzkum *Evolvulus alsinoides*.

Droga pocházela z Indie, kde ji lze velmi snadno získat, jelikož roste běžně jako plevel. Byla extrahována EtOH 95%, extrakt byl zahuštěn, rozpuštěn nejprve v methanolu, za přidání vody byla koncentrace methanolu upravena na 80 %. Tento roztok byl vytřepán petroletherem. Pokud by byla k rozpouštění použita voda, petrolether by vytvořil s touto vodnou fází výraznou emulzi, která by se obtížně dělila. Do petroletheru se extrahovaly především pigmenty (chlorofyl a jeho degradační produkty) a látky lipidového charakteru. Ve své podstatě byl tímto postupem ethanolový extrakt velmi účinně předčištěn, ale i tak mohly do petroletherového extraktu přejít látky, které by měly nezanedbatelnou biologickou aktivitu.<sup>87</sup>

Zpracovávala jsem tento petroletherový extrakt. Prvním krokem bylo rozdělení Pe extraktu pomocí sloupcové chromatografie. Tím se odstranilo velké množství chlorofylu a jeho degradačních produktů, které při kvalitativních reakcích působí rušivě, zvláště pokud je jejich obsah tak vysoký, jak tomu bylo v případě Pe extraktu. Dále jsem se pokusila izolovat látky z petroletherového extraktu a určit jejich biologickou aktivitu.

Provedením sloupcové chromatografie (adsorbent Silikagel L 0,1-0,2 mm deaktivovaný 10 % vody) bylo získáno celkem 113 frakcí. Na základě průběžného sledování chování frakcí byly pro další výzkum zvoleny sloučené frakce 3-4 , 5-7, 15-16 , 17 a 36-40 eluované soustavou  $\text{CHCl}_3$  : toluen (75:25).

Hmotnost odpařené frakce 3-4 byla 1,3244 g. Frakce neobsahovala chlorofyl, pouze oranžové barvivo, a po eluci při stání v chladu se z ní vyloučily krystaly. Frakce byla nerozpustná v methanolu, rozpustná v acetonu za tepla (do 40 °C). V obou případech vypadlo v prostředí těchto rozpouštědel v chladu malé množství krystalů a sraženina. Frakce byla detekovatelná pod UV světlem obou používaných vlnových délek, poskytovala také fialové skvrny po detekci činidlem vanilin-kyselina chloristá. Na základě provedených zkoušek bylo pro čištění krystalů jako nejvhodnější postup zvoleno rozpouštění krystalů za tepla v acetonu, jejich rekrystalizace v chladu a odebrání matečného louhu znečištěného oranžovým barvivem. Postup čištění bylo nutno opakovat až do úplného odstranění barviva a zisku čirého bezbarvého matečného louhu. Tímto způsobem bylo získáno celkem 0,02 g čistých krystalů.

Získané krystaly měly bílou barvu a voskovitou konzistenci, byly rozpustné v  $\text{CHCl}_3$ . Krystaly tály postupně ve větším rozmezí teplot a to při 58-82 °C. Při orientační TLC poskytly krystaly za použití toluenu jako mobilní fáze tři oddělené skvrny detekovatelné činidlem vanilin-kyselina chloristá s retenčními faktory 0,94, 0,87 a 0,82. Krystaly byly detekovatelné také berberinovým činidlem, kyselinou fosfomolybdenovou a parami jódu. Podle orientační TLC, teploty tání i mikroskopického vzhledu se pravděpodobně jednalo o směs nejméně tří kvalitativně odlišných krystalů. Pomocí srovnávací TLC se standardy bylo zjištěno, že se nejedná o kyselinu palmitovou a stearovou. Získané přečištěné krystaly byly podrobené instrumentální analýze, IČ spektrofotometrii a GC/MS analýze.

Pomocí GC/MS bylo zjištěno, že krystalický podíl frakce 3-4 představuje směs látek. Jedná se o kyselinu 8-methyldekanovou, kyselinu olejovou, alifatický uhlovodík a polynenasycené mastné kyseliny, které nebylo možno pro jejich malé množství blíže specifikovat.

Frakce 3-4 byla testována na antioxidační aktivitu.

Frakce 5-7 o hmotnosti 2,7028 g v odpařeném stavu stejně tak jako frakce 3-4 neobsahovala chlorofyl, ale pouze oranžové barvivo. Brzy po eluci při stání v chladu



se vyloučily bílé krystaly. Po přidání methanolu k frakci vypadla z matečného louhu sraženina a několik krystalů. Na základě TLC bylo zjištěno, že krystaly jsou kvalitativně shodné s krystaly z frakce 3-4. Krystaly byly přečišťovány stejným způsobem jako u frakce 3-4. Bylo nutno ovšem provést přečišťování vícekrát, jelikož frakce obsahovala větší množství balastních látek oproti frakci 3-4. Postup byl částečně zjednodušen tím, že frakce nebyla po přidání acetonu zahřívána a rozpouštěna, byla pouze ponechána v chladu. Hmotnost získaných krystalů činila 0,0052 g, krystaly měly stejný makroskopický vzhled jako krystaly získané z frakce 3-4. Krystaly nebyly dále analyzovány. Jsou k dispozici pro další případné měření na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie UK.

Frakce 15-16 obsahovala již značné množství chlorofylu, její odparek měl vzhled tmavě zelené hmoty a jeho hmotnost byla 0,6411 g. Při předběžném zkoušení vypadly v chladu v prostředí methanolu krystaly, které se jevily jako čisté. Proto byly odebrány do další zkumavky a byla změřena jejich teplota tání 50-59 °C. Krystaly byly rozpustné v  $\text{CHCl}_3$ . K odstranění chlorofylu bylo nutno frakci dále rozdělit. K separaci frakce byla nejprve použita metoda HPLC. Neposkytla však žádné zajímavé výsledky, frakce z tohoto dělení nebyly dostatečně čisté, jejich hmotnost byla velmi malá a nedošlo k vyloučení krystalů. Další dělení bylo provedeno pomocí TLC na komerčně vyráběných deskách. Dělení bylo provedeno celkem dvakrát, vždy s částí této frakce.

Při prvním dělení byly získány tři nové frakce. Jejich hmotnosti v odpařeném stavu byly  $m(15-16/1) = 0,0266$  g,  $m(15-16/2) = 0,0120$  g,  $m(15-16/3) = 0,0089$  g a retenční faktory výrazných skvrn těchto frakcí v soustavě  $\text{CHCl}_3$  měly hodnoty  $R_f(15-16/1) = 0,58$ ,  $R_f(15-16/2) = 0,45$  a  $0,36$ ,  $R_f(15-16/3) = 0,36$  a  $0,33$ . Pomocí srovnávací TLC bylo zjištěno, že frakce 15-16/1 a 15-16/2 neobsahují  $\beta$ -amyrin, i když svými retenčními charakteristikami jsou  $\beta$ -amyrinu blízké. Frakce 15-16/1 byla dobře rozpustná v MeOH, frakce 15-16/2 částečně a frakce 15-16/3 byla v MeOH prakticky nerozpustná. Z frakce 15-16/1 se vyloučily v prostředí MeOH krystaly. Byl odsát matečný loup a krystaly dokonale vysušeny. Bylo tak získáno 0,0073 g krystalů o teplotě tání (52)55-58(61) °C.

Krystalický podíl frakce 15-16/1 o hmotnosti 0,0053 mg byl analyzován metodou NMR na Katedře anorganické a organické chemie UK s potvrzením výsledků MS analýzou provedenou v Praze. Pomocí NMR a MS spekter bylo zjištěno, že se jedná o podíl s obsahem esterů kyseliny 3-methoxy-4-hydroxyskořicové s dlouhými lineárními alkoholy ( $\text{C}_{14}$ - $\text{C}_{17}$ ).

Pomocí druhé preparativní TLC byly získány opět tři frakce o hmotnostech  $m(15-16/1X) = 0,0755$  g,  $m(15-16/2X) = 0,0145$  g a  $m(15-16/3X) = 0,0112$  g. Z frakce 15-16/1X vypadly v chladu v prostředí MeOH krystaly. Frakce 15-16/2X a 15-16/3X se rozpustily v MeOH až po zahřátí, jinak se však nezměnily. Při srovnávací TLC bylo zjištěno, že frakce 15-16/1 a 15-16/1X i krystaly z těchto frakcí jsou kvalitativně shodné. Stejnou metodou bylo zjištěno, že frakce 15-16/1X a 15-16/3X neobsahují umbelliferon, 4-hydroxykumarin, rutin ani kyselinu chlorogenovou. Krystaly z frakce 15-16/1X byly přečišťovány tak, že byly nejprve propláchnuty MeOH, zfiltrány a s filtračním papírem přemístěny do exikátoru. Po úplném vysušení byly adjustovány a zváženy (0,4 mg). Z filtrátu se opět vyloučily krystaly, které byly čištěny stejným způsobem a po vysušení bylo získáno 0,2 mg krystalů.

Ve filtrátu došlo opět ke krystalizaci. Byly odebrány krystaly, které se jevily jako čisté. Matečné louhy 15-16/1 a 15-16/1X byly spojeny, rozpuštěny v MeOH a částečně odpařeny na vzduchu. V chladném proudícím vzduchu vypadla poměrně brzy bílá sraženina a krystaly. Po několikahodinovém stání v chladu byl matečný luh odsát, byl přidán další podíl MeOH a zopakován stejný postup až k získání čistých krystalů v prostředí MeOH, které byly dosušeny, zváženy (3,5 mg) a uloženy do exikátoru.

Spojené krystaly z frakcí 15-16/1 a 15-16/1X byly podrobeny testování na antiagregační aktivitu.

Frakce 17 byla podle provedené TLC kvalitativně téměř shodná s frakcí 15-16. V odpařeném stavu měla vzhled zelenooranžové hmoty a její hmotnost byla 0,1540 g. Hlavním cílem při jejím zpracování bylo oddělit přítomný chlorofyl a jeho degradační produkty. Byla provedena preparativní TLC, při níž byly získány tři frakce o hmotnostech  $m(17/1) = 0,0201$  g,  $m(17/2) = 0,0031$  g,  $m(17/3) = 0,0053$  g. Retenční faktory výrazných skvrn v soustavě  $\text{CHCl}_3$  : toluen (95:5) byly  $R_f(17/1) = 0,36$ ,  $R_f(17/2) = 0,55$  a  $0,46$ ,  $R_f(17/3) = 0,48$ . Další pozornost ve zpracování byla věnována frakci 17/1, která se rozpouštěla v MeOH za tepla, v chladu se pak vyloučily po stěnách zkumavky krystaly voskovité konzistence. V acetonu se frakce dobře rozpouštěla i při laboratorní teplotě. Vyloučené krystaly nebyly dále separovány pro jejich velmi malé množství a značné znečištění. V ostatních frakcích nedošlo k žádným změnám, frakce byly znečištěné barvivy a jejich malé množství neumožňovalo s nimi dále pracovat.

Frakce 36-40 o hmotnosti 0,9579 g v suchém stavu se i přes velký obsah chlorofylu zdála být významná, neboť se z ní brzy po eluci z kolony vyloučily krystaly. Pro velký obsah chlorofylu bylo nutno frakci dále rozdělit. K dělení byla použita opět preparativní TLC na komerčně vyráběných deskách. Po vyvinutí byly na chromatogramu jasně patrné tři oddělené zóny označené jako 36-40/1 (0,0049 g), 36-40/2 (0,0043 g), 36-40/3 (0,0212 g). Pro další zpracování byla vybrána pouze frakce 36-40/3, ostatní frakce byly značně znečištěné a jejich malé množství nedovolilo s nimi dále pracovat.

$R_f$  hodnota frakce 36-40/3 v soustavě  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (75:25) byla 0,74. Bylo zjištěno, že se nejedná o  $\beta$ -sitosterol a skopoletin. Frakce byla svými retenčními hodnotami velmi blízká kyselině palmitové a stearové. Po odpaření frakce 36-40/3 a přidání MeOH se vyloučily krystaly (7,0 mg), které se jevily jako čisté, měly teplotu tání 42-44 °C a byly rozpustné v  $\text{CHCl}_3$ . 5,3 mg krystalů bylo předáno k další analýze pomocí NMR na Katedru anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Na základě údajů získaných NMR analýzou, která byla potvrzena MS analýzou v Praze, a porovnáním s TLC, byla potvrzena směs obsahující mastné kyseliny. Jednalo se o kyselinu palmitovou, heptadekanovou a stearovou.

Krystaly z frakce 36-40/3 byly testovány na antioxidační aktivitu.

Byla testována také biologická aktivita Pe extraktu. Test akutní toxicity byl proveden pouze se sumárním Pe extraktem. Výsledek testování akutní toxicity alternativní metodou na červech *Tubifex tubifex* (nitěnky) byl negativní. Podmínkou provedení testu je rozpustnost testované látky ve vodě. Příčina negativního výsledku může spočívat v tom, že Pe extrakt je prakticky ve vodě nerozpustný, proto nemuselo dojít k přechodu aktivních látek do vody a tedy i jejich působení na testované červy.

U spojených krystalů vyloučených z frakcí 15-16/1 a 15-16/1X byla stanovena antiagregační aktivita. Krystalický podíl vykazoval slabou antiagregační aktivitu.

Antioxidační aktivita byla testována na sumárním Pe extraktu a krystalickém podílu frakcí 3-4, 15-16/1, 36-40/3. Antioxidační aktivita byla zjištěna u krystalického podílu z frakce 15-16/1 (jeho vypočítaná hodnota  $EC_{50}$  je 0,46 mg/ml) a sumárního Pe extraktu. Je však pravděpodobné, že výsledky měření antioxidační aktivity u Pe extraktu a krystalů z frakce 3-4 byly nepřesné. Důvodem možného zkreslení výsledků byla jejich špatná rozpustnost v použitém rozpouštědle. Při stanovování antioxidační aktivity byly analyzovány velmi jemné emulze.

## VI. SOUHRN

Provedla jsem výzkum petroletherového extraktu *Evolvulus alsinoides* L. Sloupcovou chromatografií jsem získala celkem 113 frakcí, z nichž pro další výzkum jsem zvolila frakce 3-4, 5-7, 15-16, 17, 36-40, které se jevily jako perspektivní.

Sumární petroletherový (Pe) extrakt byl podroben testování na akutní toxicitu. Test akutní toxicity nebylo možno s extraktem adekvátně provést, jelikož podmínkou jeho provedení je rozpustnost vzorku ve vodě. U emulze Pe extraktu s vodou byl výsledek negativní. Pe extrakt vykazoval slabou antioxidační aktivitu. Výsledky testování na antioxidační aktivitu mohly být zkresleny vzhledem k malé rozpustnosti extraktu v použitém rozpouštědle.

Z frakce 3-4 (1,3244 g) bylo získáno 0,02 g čistých krystalů bílé barvy a voskovité konzistence s teplotou tání 58-82 °C, které byly dle provedené TLC pravděpodobně směsí tří látek. Srovnávací TLC ukázala, že se nejednalo o kyselinu palmitovou a stearovou. Pomocí GC/MS bylo zjištěno, že krystalický podíl frakce 3-4 představuje směs látek. Jedná se o kyselinu 8-methyldekanovou, kyselinu olejovou, alifatický uhlovodík a polynenasycené mastné kyseliny, které nebylo možno pro jejich malé množství blíže specifikovat. Stanovení antioxidační aktivity u krystalického podílu frakce 3-4 bylo negativní.

Frakce 5-7 (2,7028 g) poskytla 0,0052 g krystalů kvalitativně shodných s krystaly z frakce 3-4. Krystaly nebyly dále analyzovány a jsou k dispozici pro další případné měření.

Frakce 15-16 (0,6411 g) byla podrobena dalšímu dělení pomocí preparativní TLC, jehož výsledkem byl získ nových frakcí a celkem 0,0114 g krystalů s teplotou tání (52)55-58(61) °C z frakce 15-16/1 (0,0266 g) a 15-16/1X (0,0755 g). Pomocí srovnávací TLC bylo zjištěno, že retenční charakteristiky frakce 15-16/1, která byla totožná s frakcí 15-16/1X, jsou podobné  $\beta$ -amyrinu, ale o  $\beta$ -amyrin se nejedná. Nejedná se také o umbelliferon, 4-hydroxykumarin, rutin ani kyselinu chlorogenovou. Pomocí NMR a MS spekter bylo zjištěno, že krystalický podíl frakce 15-16/1 představuje směs esterů kyseliny 3-methoxy-4-hydroxyškořicové s dlouhými lineárními alkoholy (C<sub>14</sub>-C<sub>17</sub>). Krystalický podíl frakce 15-16/1 vykazoval antiradikálovou

aktivitu. Jeho vypočítaná hodnota  $EC_{50}$  je 0,46 mg/ml. Krystaly z frakcí 15-16/1 a 15-16/1X byly podrobeny testování na antiagregační aktivitu. Byla zjištěna slabá antiagregační aktivita.

Orientační TLC ukázala, že frakce 17 (0,1540 g) je kvalitativně téměř shodná s frakcí 15-16. Byla provedena preparativní TLC, při níž byly získány tři frakce. Pouze frakce 17/1 (0,0201 g) poskytla krystaly, které však nebyly dále separovány pro jejich velmi malé množství a značné znečištění. Frakce nebyla dále zpracovávána.

Frakce 36-40 (0,9579 g) byla z důvodu odstranění chlorofylu dále dělena pomocí preparativní TLC, což vedlo k zisku tří frakcí. Pozornost byla soustředěna na frakci 36-40/3 (0,0212 g). Na základě srovnávací TLC bylo zjištěno, že se nejedná o  $\beta$ -sitosterol a skopoletin. Frakce byla svými retenčními hodnotami velmi blízká kyselině palmitové a stearové. Frakce poskytla krystaly (0,007 g) s teplotou tání 42-44 °C, rozpustné v  $CHCl_3$ . Na základě údajů získaných NMR a MS analýzou včetně porovnání s TLC byla u krystalického podílu frakce 36-40/3 potvrzena směs obsahující mastné kyseliny. Jednalo se o kyselinu palmitovou, heptadekanovou a stearovou. Frakce byla testována na antioxidační aktivitu. Výsledek testování byl negativní.

## VII. LITERATURA

1. HARTL, J., PALÁT, P. Farmaceutická chemie I. Praha: Karolinum, 2001, p. 6-10, 15, ISBN 80-7184-619-8
2. WARRIER, G., VERMA, H. et al. Tajemství ajurvédy. Praha: Svojtka & Co., 2003, p. 1-13, ISBN 80-7237-756-6
3. Bharatiya Vidya Bhavan's Swami Prakashananda Ayurveda Research Centre. Selected Medicinal Plants of India (A Monograph of Identity, Safety, and Clinical Usage). Bombay: Chemexcil, Tata Press Ltd., 1992, p.151-153
4. [http://www.himalayahealthcare.com/herbfinder/h\\_evolvulus.htm](http://www.himalayahealthcare.com/herbfinder/h_evolvulus.htm)
5. [http://www.allayurveda.com/herb\\_month\\_august2002.htm](http://www.allayurveda.com/herb_month_august2002.htm)
6. <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=EVAL&display=31>
7. <http://en.wikipedia.org/wiki/Vishnu>
8. <http://en.wikipedia.org/wiki/Charaka>
9. <http://www.herbscancure.com/muktavati.htm>
10. [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=2&taxon\\_id=200018836](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200018836)
11. [http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species\\_id=147190](http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species_id=147190)
12. <http://florabase.calm.wa.gov.au/browse/flora?f=307&level=s&id=6617>
13. KATO, N.H. Assessment of the allelopathic potential of extracts of *Evolvulus alsinoides*. Weed Research, 2000, vol. 40, no. 4, p. 343-350
14. BAVEJA, S.K., SINGLA, R.D. Investigation of *Evolvulus alsinoides* (Shankhpushpi). Indian Journal of Pharmacy, 1969, vol. 31, no. 4, p. 108-10
15. SAHARAN, P., KASERA, P.K., CHAWAN, D.D. Eco-physiology of *Evolvulus alsinoides* L. from Indian Thar desert. Bangladesh Journal of Botany, 2001, vol. 30, no. 1, p. 57-59
16. SAHARAN, P., KASERA, P.K., CHAWAN, D.D. A new report on variation in flower colours of *Evolvulus alsinoides* (Shankhpushpi) from the Indian Thar Desert. Journal of Economic and Taxonomic Botany, 2002, vol. 26, no. 1, p. 21-24
17. SAHARAN, P., KASERA, P.K. Effects of fertilizer on leaf pigments, chemical analyses and chlorophyll stability index in Shankhpushpi (*Evolvulus alsinoides*). Journal of Phytological Research, 2001, vol. 14, no. 1, p. 91-93

18. SAHARAN, P., KASERA, P.K., CHAWAN, D.D. Response of spacing and fertilizer levels on growth and biomass in Shankhpushpi (*Evolvulus alsinoides*) under dryland farming. *Journal of Economic and Taxonomic Botany*, 2001, vol. 25, no. 2, p. 309-316
19. SAHARAN, P., KASERA, P.K., CHAWAN, D.D. et al. Biology, conservation and mediculture of important medicinal plants from Indian thar desert. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 2000, vol. 22-23, no. 4A-1A, p. 432-443
20. NAMBIAR, G.R., MEHTA, A.R. Influence of sugars on ergot alkaloid production by cell suspension of *Evolvulus alsinoides*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1981, vol. 19, no. 6, p. 535-537
21. SINGH, H.B., VISWANATHAN, M.V. Need for authentication of market samples of crude drug shankhpushpi *Convolvulus microphyllus*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 2000, vol. 22-23, no. 4A-1A, p. 612-618
22. <http://www.raysahelian.com/shankhpushpi.html>
23. <http://www.naturesformulary.com/shankhpushpi.html>
24. <http://healthyherbs.about.com/od/monographs/p/Shankhpushpi.htm>
25. [http://business.vsnl.com/mitsan/shan\\_e.html](http://business.vsnl.com/mitsan/shan_e.html)
26. ZRŮST, J. Kalysteginy u bramboru. *Bramborářství*, 2005, vol. 13, no. 2, p. 14-15
27. GRIFFIN, W.J., LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, March 2000, vol. 53, no. 6, p. 623-637
28. SCHIMMING, T., MANN, P., MILSON, J. et al. Calystegines as chemotaxonomic markers in the *Convolvulaceae*. *Phytochemistry*, February 2005, vol. 66, no. 4, p. 469-480
29. SCHIMMING, T., MANN, P., RICHTER, A. et al. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the *Convolvulaceae*. *Phytochemistry*, 1998, vol. 49, no. 7, p. 1989-1995
30. MOLYNEUX, R.J., PAN, Y.T., GOLDMAN, A. et al. Calystegins, a Novel Class of Alkaloid Glycosidase Inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, July 1993, vol. 304, no. 1, p. 81-88
31. BALHÁRKOVÁ, E. Diplomová práce. 2005
32. BAVEJA, S.K., SINGLA, R.D. Investigation of *Evolvulus alsinoides* (shankhpushpi). *Indian Journal of Pharmacy*, 1969, vol. 31, no. 4, p. 108-110
33. ASANO, N., YOKOYAMA, K., SAKURAI, M. et al. Dihydroxynortropine alkaloids from calystegine-producing plants. *Phytochemistry*, July 2001, vol. 57, no. 5, p. 721-726

34. TABER, W.A., VINING, L.C. Clavine and lysergic acid alkaloids in varieties of morning glory. *Phytochemistry*, 1963, vol. 2, no. 1, p. 65-70
35. HUBÍK, J., DUŠEK, J., SPILKOVÁ J. et al. *Obecná farmakognozie II. Sekundární látky*. 2. vyd., Praha: SPN, 1986, p. 24-34, 141-146
36. SUNDARESAN, V., DE-BRITTO, A. J. Preliminary phytochemical studies on some medicinal plants of tirunelveli hills. *Journal of Economic and Taxonomic Botany*, 1999, vol. 23, no. 2, p. 377-380
37. MANN, P., TOFERN, B., KALOGA, M. et al. Flavonoid sulfates from the Convolvulaceae. *Phytochemistry*, January 1999, vol. 50, no. 2, p. 267-271
38. TOKI, K., SAITO, N., KAWANO, K. et al. An acylated delphinidin glycoside in the blue flowers of *Evolvulus pilosus*. *Phytochemistry*, June 1994, vol. 36, no. 3, p. 609-612
39. MORI, M., KONDO, T., TOKI, K. et al. Structure of anthocyanin from the blue petals of *Phacelia campanularia* and its blue flower color development. *Phytochemistry*, March 2006, vol. 67, no. 6, p. 622-629
40. FIGUEIREDO, P., ELHABIRI, M., TOKI, K. et al. New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry*, January 1996, vol. 41, no. 1, p. 301-308
41. MEHTA, C.R., SHAH, N.B. Chemical examination of *Evolvulus alsinoides*. *Science and Culture*, 1958, vol. 24, p. 180 – 181
42. BADAMI, R.C., THAKKAR, J. Minor seed oils. XIX: examination of Convolvulaceae seed oils. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1984, vol. 86, no. 5, p. 203-204
43. GURUSWAMI, M.N., KRISHNAMURTHY, T.R., VAIDYANATHAN, T.S. A preliminary note on the pharmacology of *evolvine*. *Current Science*, 1956, vol. 25, p. 119-120
44. SIRIPURAPU, K.B., GUPTA, P. BHATIA, G. et al. Adaptogenic and anti-amnesic properties of *Evolvulus alsinoides* in rodents. *Pharmacology*, July 2005, vol. 81, no. 3, p. 424-432
45. DANDEKAR, U.P., CHANDRA, R.S., DALVI, S.S. et al. Analysis of a clinically important interaction between phenytoin and Shankhapushpi, an Ayurvedic preparation. *Journal of Ethnopharmacology*, January 1992, vol. 35, no. 3, p. 285-288
46. GANJU, L., KARAN, D., CHANDA, S. et al. Immunomodulatory effects of agents of plant origin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, September 2003, vol. 57, no. 7, p. 296-300



47. AUDDY, B., FERREIRA, M., BLASINA, F. et al. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, February 2003, vol. 84, no. 2-3, p. 131-138
48. ACHLIYA, G., DESHPANDE, J., MISHRA, M. et al. Investigation of the free radical scavenging activity of some Indian medicinal plants. National Symposium on Emerging Trends in Indian Medicinal Plants, Lucknow. In. *Medicinal & Aromatic Plants Abstracts*, 2004, vol. 26, no.1, p. 71
49. KATO, N.H. Assessment of the allelopathic potential of extracts of *Evolvulus alsinoides*. *Weed Research*, 2000, vol. 40, no. 4, p. 343-350
50. PUROHIT, M.G., SHANTHAVEERAPPA, B.K., BADAMI, S. et al. Antiulcer and antitumor activity of alcoholic extract of *Evolvulus alsinoides* (Convolvulaceae). *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, vol. 58, no. 3, p. 110-112
51. <http://www.slovník-cizích-slov.cz/index.php?slovo=katatoni>
52. THARAN, N.T., VADIVU, R., PALANISAMY, M. et al. Antibacterial activity of *Evolvulus alsinoides*. *Indian Drugs*, 2003, vol. 40, no. 10, p. 585-586
53. DASH, G.K., SURESH, P., SAHU, S.K. et al. Evaluation of *Evolvulus alsinoides* L. for anthelmintic and antimicrobial activities. *Journal of Natural Remedies*, 2002, vol. 2, no. 2, p. 182 –185
54. DEEPAK, S.A., OROS, G., SATHYANARAYANA, S.G., et al. Antisporulant activity of leaf extracts of Indian plants against *Sclerospora graminicola* causing downy mildew disease of pearl millet. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2005, vol. 38, no. 1, p. 31-39
55. YAMAMOTO, T., SHISHIDO, M. The capillary endothelium growth factor production accelerator which consists of the extract of the being attached plant. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 2003, p. 6
56. MAEDA, T., YAMAMOTO, T., SHISHIDO, M. The growth hair charge which consists of the extract and the other herb medicine extracts of the being attached plant. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 2003, p. 10
57. ADACHI, K., TADA, T., ITO, S., ARAMAKI, K. et al. Skin compositions containing anti-aging peptides and other active components. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 2004, p. 24
58. <http://store.yahoo.com/herbal-remedies-usa/shankhpushpi-information.html>
59. <http://secure-shopping-cart.com/niam/cart/cart65.html>
60. <http://store.yahoo.com/herbal-remedies-usa/shankhpushpi.html>

61. <http://www.niam.com/corp-web/chywaninfo.html>
62. RAJAKURANA, N., BOHM, B.A. Serpentine and its vegetation: A preliminary study from Sri Lanka. *Journal of Applied Botany*, 2002, vol. 76, no. 1-2, p. 20-28
63. TORRESDEY-GARDEA, J.L., PERALTA-VIDEA, J.R., MONTES, M. et al. Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutrition elements. *Bioresource Technology*, May 2004, vol. 92, no. 3, p. 229-235
64. <http://www.ayurveda-herbs.com/20.htm>
65. <http://ayurvedicherbsforhealth.com/muktavati2.html>
66. <http://www.avicenna.cz/item/evocen>
67. <http://avicennacompany.co.uk/item/evocen-reg-memory-and-concentration>
68. <http://www.satveda.com/product.asp?pID=176&cID=5&OVRAW=evolvulus%20alsinoides&OVKEY=evolvulus%20alsinoides&OVMTc=standard&c=23512>
69. <http://store.yahoo.com/herbal-remedies-usa/pe-di-tone.html>
70. <http://store.yahoo.com/herbal-remedies-usa/brainton60ca.html>
71. <http://www.himalayahealthcare.com/products/mentat.htm>
72. <http://www.himalayahealthcare.com/products/anxocare.htm>
73. OPLETAL, L., DRAŠAR, P. *Fytochemické metody, izolace obsahových látek (laboratorní technika)*. Praha: Karolinum, 1994
74. KARLÍČKOVÁ, J. *Osobní sdělení*
75. JORK, H., FRENK, W., FISCHER, W. et al. *Thin-Layer Chromatography (Reagents and detection Methods)*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1990, vol. 1a, p. 143-441, ISBN 3-527-27834-6
76. STAHL, E. *Thin-Layer Chromatography*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1969, p. 855-904, ISBN 3-540-03761-6
77. ŠARŠŮNOVÁ, M., SCHWARZ, V. et al. *Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmacii a v klinickej biochémií*. 2. vyd., Martin: Osveta, 1977, p. 451-476
78. KARLÍČEK, R., POLÁŠEK, M., POSPÍŠILOVÁ, M. et al. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2001, p. 215-281
79. [http://ksicht.iglu.cz/serial.php?id\\_serie=4](http://ksicht.iglu.cz/serial.php?id_serie=4)
80. [http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2004/westengland\\_smith/ExempWeb/GC-MS.htm](http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2004/westengland_smith/ExempWeb/GC-MS.htm)
81. [http://www.fch.vutbr.cz/vyuka/ISA\\_Prakt\\_GC\\_04.pdf](http://www.fch.vutbr.cz/vyuka/ISA_Prakt_GC_04.pdf)
82. [http://www.fch.vutbr.cz/vyuka/pisa/uloha\\_3.pdf](http://www.fch.vutbr.cz/vyuka/pisa/uloha_3.pdf)

83. TICHÝ, M., MARIÁN, R. Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*. *Pracov. lék.*, 1996, vol. 48, no. 6, p. 225-230
84. BORN, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 1962, vol. 194, p. 927-929
85. POLÁŠEK, M., SKÁLA, P., OPLETAL, L. et al. Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, vol. 379, no. 5-6, p. 754-758
86. VŮJTĚCH, S. Rigorózní práce. 2004
87. ŘÍMANOVÁ, E. Diplomová práce. 2003
88. KARLÍČKOVÁ, J., ČERVENKA, F., JAHODÁŘ, L. et al. *Fytochemická studie extraktu *Evolvulus alsinoides* a jeho biologická aktivita. Sborník, 34. konference - Syntéza a analýza léčiv. Nové směry ve výzkumu léčiv. Brno, září 2005, p. 71*

**ČERVENKA, F., JAHODÁŘ, L., KARLÍČKOVÁ, J. et al. Chemická a biologická analýza taxonu *Evolvulus alsinoides*. Sborník, 34. konference - Syntéza a analýza léčiv. Nové směry ve výzkumu léčiv. Brno, září 2005, p. 47**

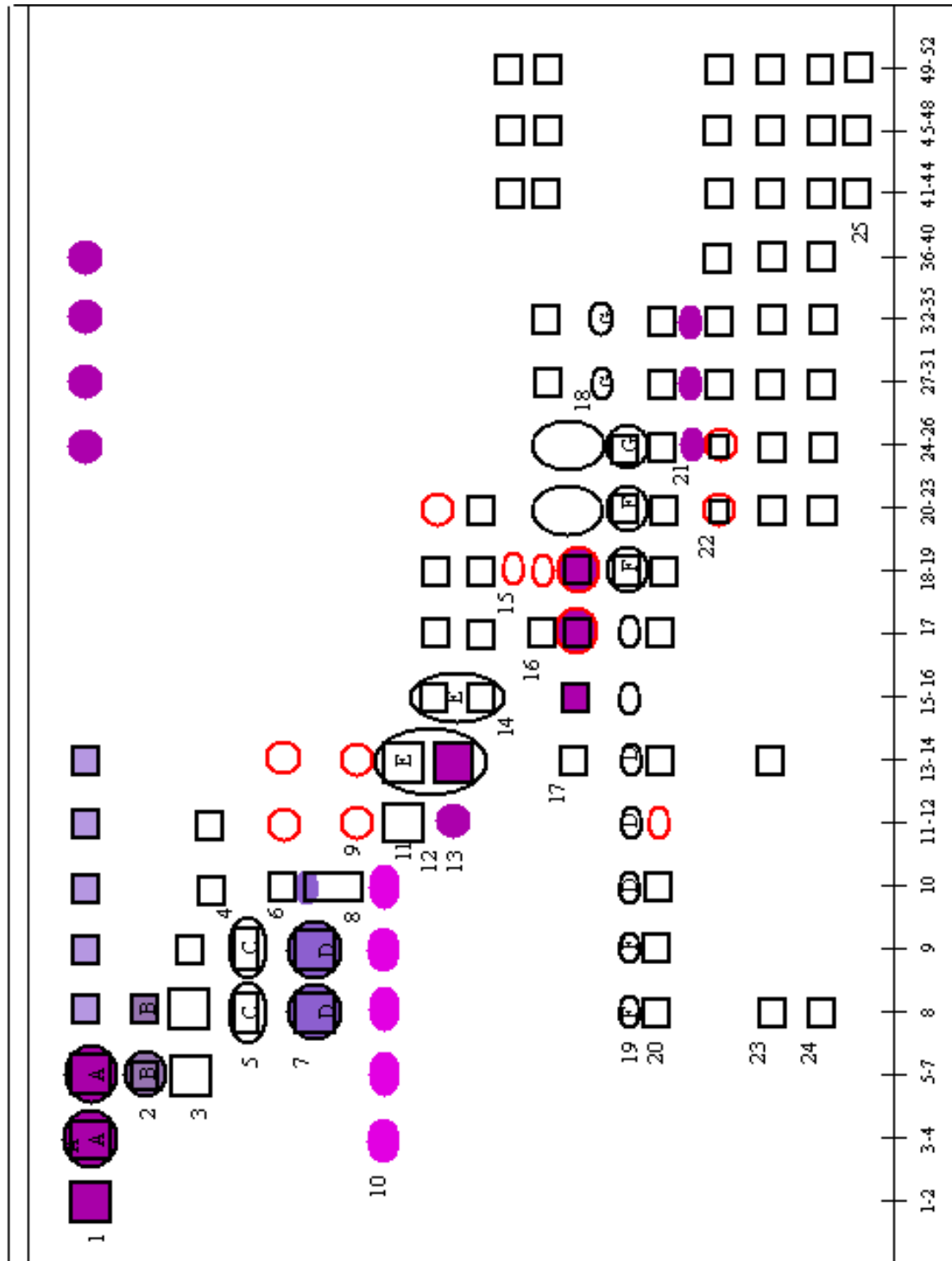
**PŘÍLOHY**

Příloha č. 1: Schéma chromatogramu orientační TLC spojených frakcí 1-52

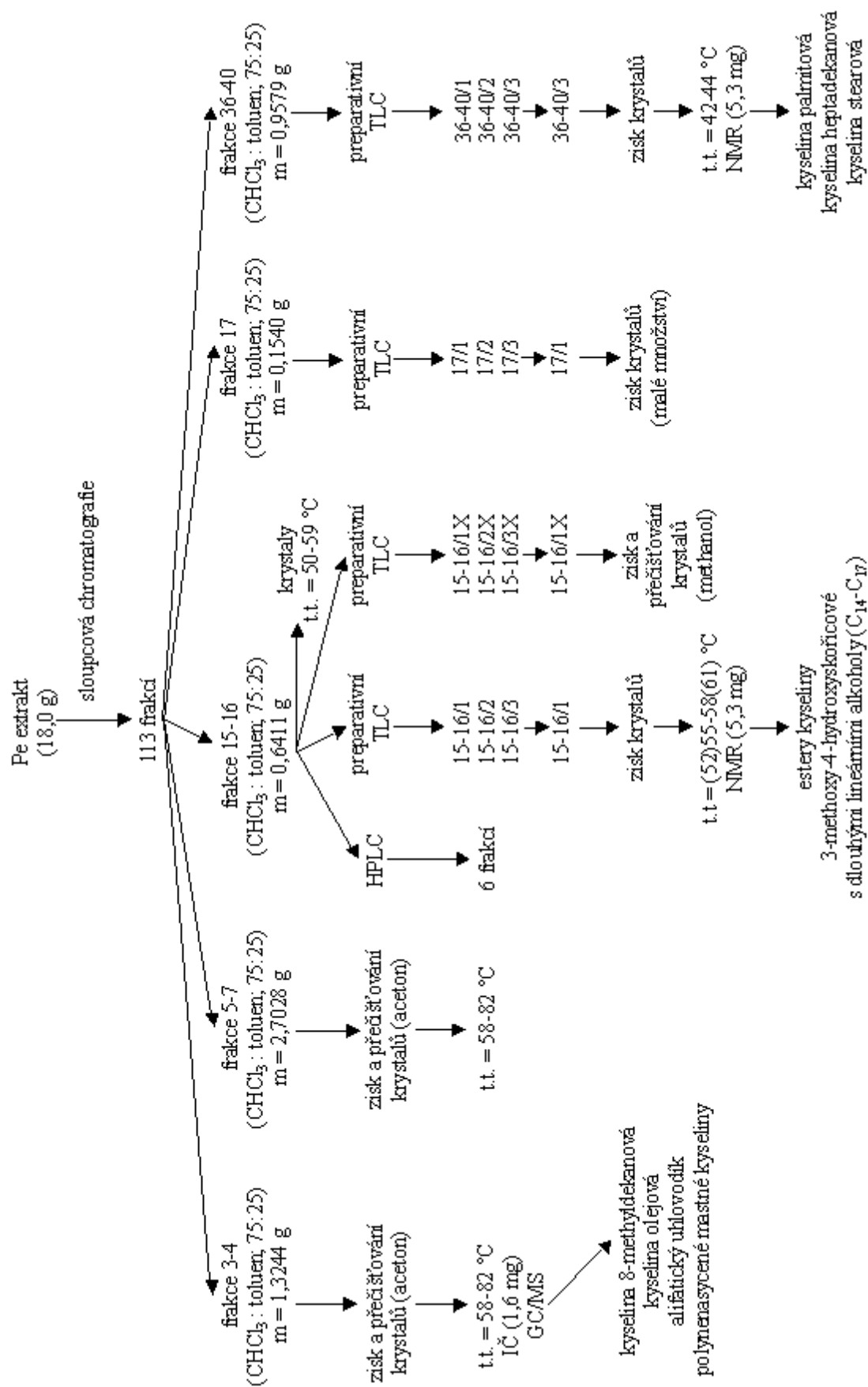
$R_f$  hodnoty

skvni.

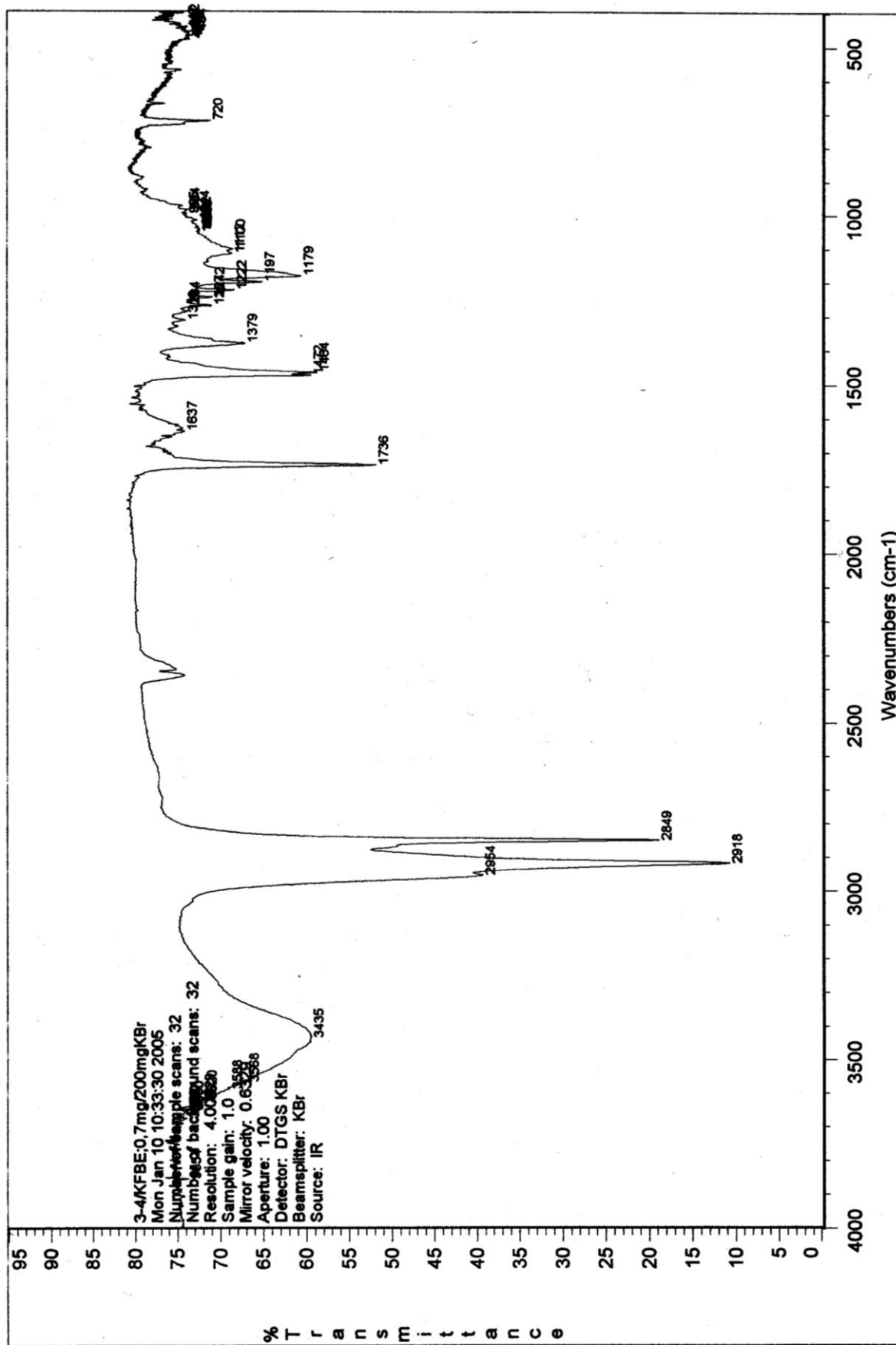
- 1 -  $R_f = 0,93$
- 2 -  $R_f = 0,86$
- 3 -  $R_f = 0,81$
- 4 -  $R_f = 0,79$
- 5 -  $R_f = 0,75$
- 6 -  $R_f = 0,71$
- 7 -  $R_f = 0,67$
- 8 -  $R_f = 0,65$
- 9 -  $R_f = 0,61$
- 10 -  $R_f = 0,59$
- 11 -  $R_f = 0,56$
- 12 -  $R_f = 0,53$
- 13 -  $R_f = 0,50$
- 14 -  $R_f = 0,47$
- 15 -  $R_f = 0,44$
- 16 -  $R_f = 0,40$
- 17 -  $R_f = 0,37$
- 18 -  $R_f = 0,34$
- 19 -  $R_f = 0,30$
- 20 -  $R_f = 0,28$
- 21 -  $R_f = 0,26$
- 22 -  $R_f = 0,20$
- 23 -  $R_f = 0,13$
- 24 -  $R_f = 0,09$
- 25 -  $R_f = 0,07$



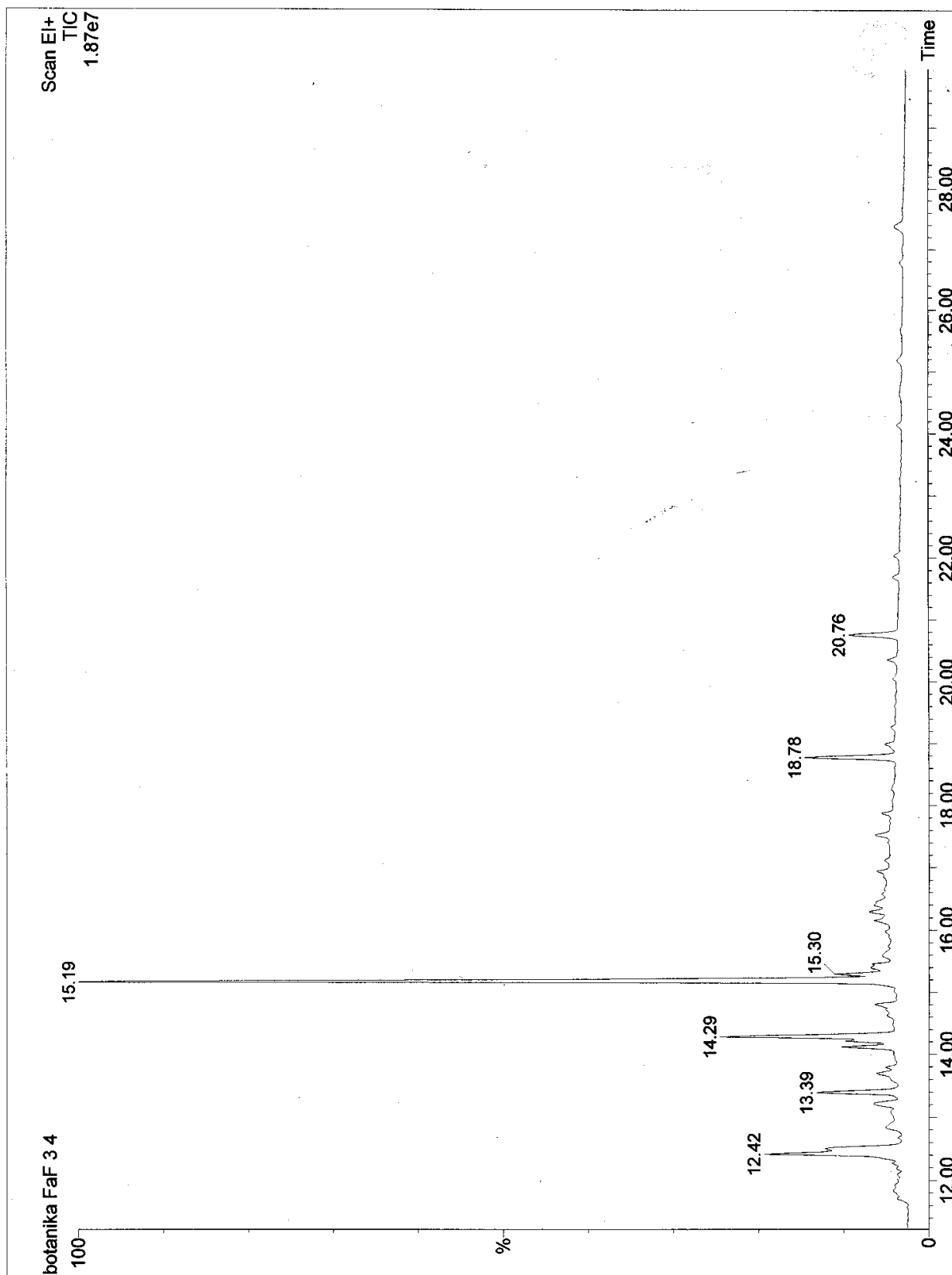
Příloha č. 2: Schéma zpracování petroletherového extraktu *Evolvulus alsinoides*



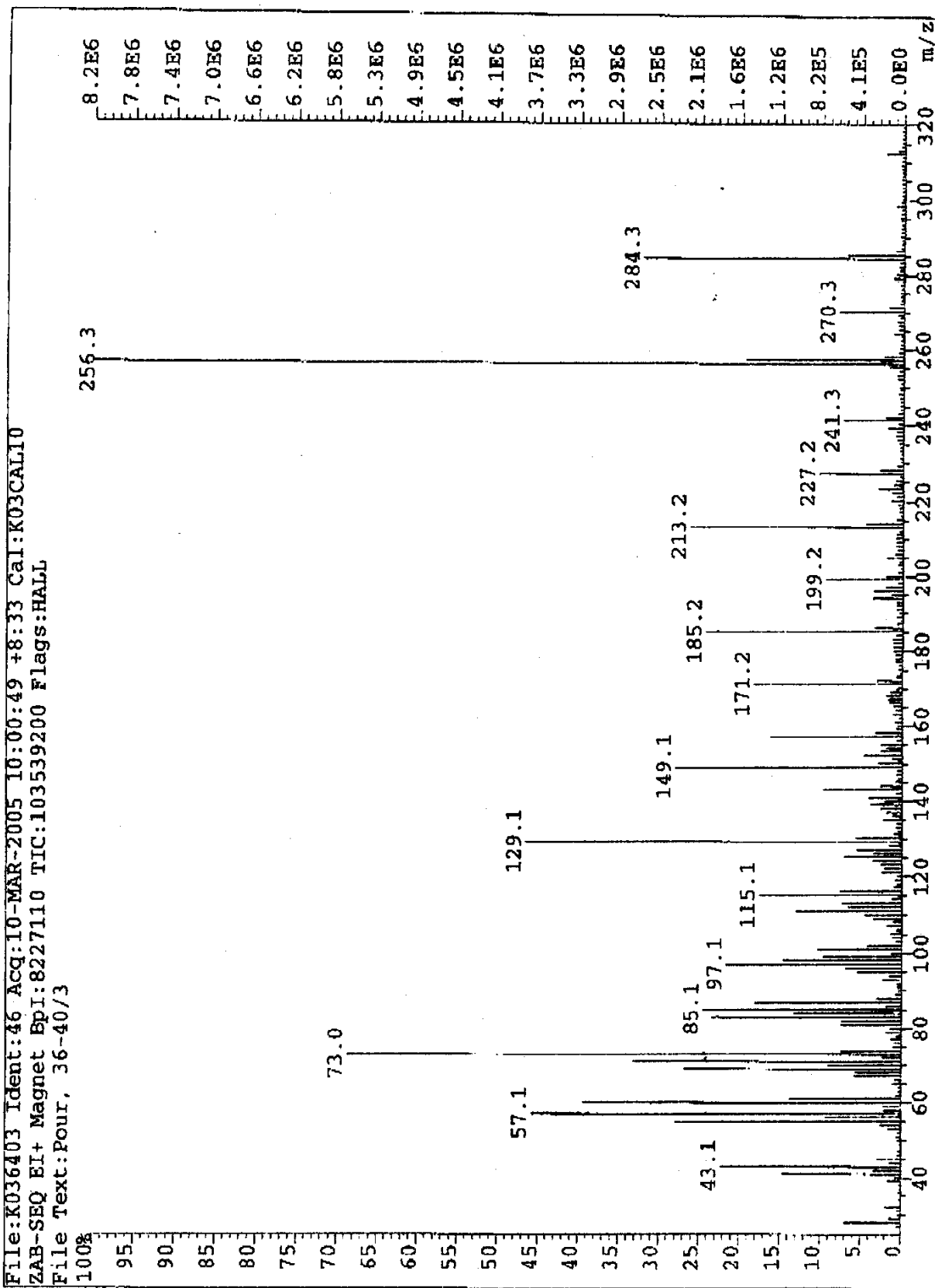
Příloha č. 3: Záznam IČ spektra krystalického podílu frakce 3-4



Příloha č. 4: Záznam GC/MS analýzy krystalického podílu frakce 3-4



Příloha č. 5: Záznam NMR analýzy krystalického podílu frakce 36-40/3





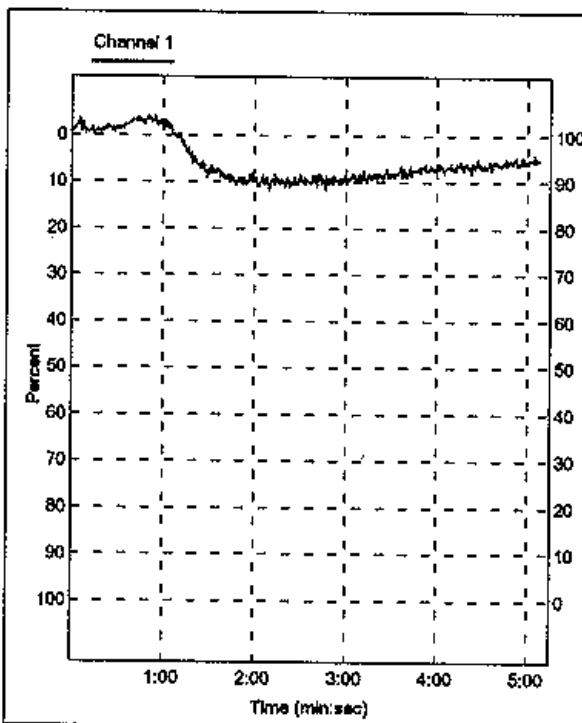
Příloha č. 6: Stanovení antiagregační aktivity spojených krystalů z frakcí 15-16/1 a 15-16/1X

Name EVOLV.Jana.250ug,ž2, Jana  
 ID Date 12/01/2005  
 Hosp.

Channel 1

Instrument	Opt
Reagent	COL, 1 ul
	2 ug/ml
Stirrer	1000
Gain	
Amplitude	12%
Slope	31

Comments

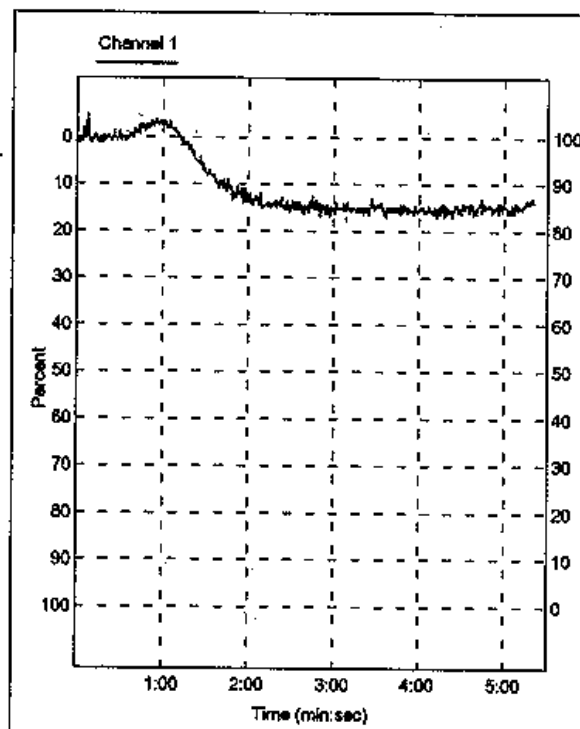


Name EVOLV.Jana.250ug,ž.1, Jana  
 ID Date 12/01/2005  
 Hosp.

Channel 1

Instrument	Opt
Reagent	COL, 1 ul
	2 ug/ml
Stirrer	1000
Gain	
Amplitude	16%
Slope	27

Comments



Name EVOLVJana.blank, Jana  
ID Date 12/01/2005  
Hosp.

Channel 1

Instrument	Opt
Reagent	COL, 1. ul 2 ug/ml
Stirrer	1000
Gain	
Amplitude	101%
Slope	139

Comments

