

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

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Fytochemický výzkum *Helianthus annuus*
Phytochemical study of *Helianthus annuus*

Školitel: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci vypracovala samostatně. Použitá literatura je uvedena.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (grant 118/2006/B BIO).

Děkuji PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a rady při tvorbě této práce a také kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření dobrých podmínek pro práci a přátelského prostředí. Také bych chtěla poděkovat Mudr. R. Hyšplerovi, Ph.D., laboratoř Kliniky gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové za provedení GC analýzy. Děkuji také Kateřině Kubíkové a Zuzaně Řehákové za pomoc při měření antioxidační aktivity.

OBSAH:

I. ÚVOD A CÍL PRÁCE	8
II. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1. BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA A VYUŽITÍ.....	11
2. HLAVNÍ OBSAHOVÉ LÁTKY	12
2.1 Terpeny.....	12
2.1.1 Seskviterpeny.....	12
2.1.1.1 <i>Heliannany, helibisabonoly</i>	13
2.1.1.2 <i>Germakranolidy</i>	14
2.1.1.3 <i>Guajanolidy</i>	15
2.1.1.4 <i>Seskviterpenové kyseliny</i>	15
2.1.1.5 <i>Annuionony (bisnorseskviterpenové laktony)</i>	15
2.1.1.6 <i>Heliespirony (spiroterpeny)</i>	16
2.1.2 Diterpeny	17
2.1.2.1 <i>Diterpenové kyseliny</i>	17
2.1.2.2 <i>Diterpenové alkoholy</i>	17
2.1.2.3 <i>Diterpenové aldehydy</i>	17
2.1.3 Triterpeny.....	18
2.1.3.1 <i>Triterpenové alkoholy</i>	18
2.1.3.2 <i>Estery mastných kyselin a triterpenových alkoholů</i>	18
2.1.4 Tokoferoly	18
2.2 Benzopyrany.....	18
2.3 Flavonoidy.....	19
2.3.1 Flavanony.....	20
2.3.2 Chalkony	20
2.3.3 Flavonoly	20
2.4 Estery mastných kyselin.....	21
2.4.1 Estolidy	21
2.5 Alkandioly	21
2.5.1 syn-alkan-4,6-dioly	21
2.5.2 syn-6,8-alkandioly	21

2.6 Alifatické ketony	21
2.7 Alkanové kyseliny	21
2.8 Saponiny	21
2.9 Gibbereliny	22
3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK	23
3.1 Antimykotická aktivita	23
3.2 Protizánětlivý účinek	23
3.3 Protinádorový účinek	23
3.4 Alelopatická aktivita	23
3.5 Antimikrobiální aktivita	24
3.6 Antiparazitická aktivita	24
3.7 Insekticidní aktivita	24
3.8 Antioxidační aktivita	25
3.8.1 Úvod.....	25
3.8.2 Metody stanovení.....	26
3.8.2.1 <i>Metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu</i>	27
3.8.2.2 <i>Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power)</i>	29
3.9 Alternativní metoda stanovení akutní toxicity extraktů: zástava pohybu červů <i>Tubifex tubifex</i>	30
3.9.1 Úvod.....	30
3.9.2 Popis testovaného organismu.....	31
3.9.3 Chemikálie používané při testu.....	32
3.9.4 Metodika testu.....	32
3.9.5 Příprava roztoků referenční látky	32
3.9.6 Příprava roztoků stanovované látky.....	33
3.9.7 Pracovní postup.....	33
3.9.8 Výpočet.....	33
3.10 Testování antimykotické aktivity	34
4. EXTRAKČNÍ, SEPARAČNÍ A STRUKTURNĚ ANALYTICKÉ POSTUPY	36
III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	39
1. VŠEOBECNÉ POSTUPY	40
1.1 Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii	40

1.2 Příprava roztěru	40
1.3 Sloupcová chromatografie	40
1.4 Orientační tenkovrstvá chromatografie (TLC)	40
1.5 Odpařování frakcí	40
2. POTŘEBY	41
2.1 Rozpouštědla	41
2.2 Chemikálie	41
2.3 Standardy	41
2.4 Detekční činidla	42
2.5 Vytvájecí soustavy pro chromatografii	43
2.6 Přístroje	43
3. IZOLACE FLAVONOIDŮ	45
3.1 Extrakce listů	45
3.1.1 Postup.....	45
3.2 Zpracování vodného extraktu – postup A	45
3.2.1 Schéma zpracování vodného extraktu	45
3.2.2 Schéma zpracování dichlormethanového podílu	46
3.3 Zpracování vodného extraktu – postup B	47
3.3.1 Schéma zpracování vodného extraktu	47
3.3.2 Zpracování chloroformové vrstvy	47
3.3.3 Sloupcová chromatografie chloroformového podílu na sloupci Sephadexu	48
3.3.4 Zpracování vodné, chloroformové horní vrstvy a dichlormethanové vrstvy.....	49
3.3.5 Sloupcová chromatografie butanolového podílu na sloupci Sephadexu	50
3.3.6 Orientační sloupcová chromatografie butanolového podílu na sloupci silikagelu	50
3.3.7 Sloupcová chromatografie butanolového podílu na sloupci silikagelu	52
3.3.8 Detekce na steroly, steroidy, triterpeny, cukry, terpeny a laktony	54
3.3.8.1 Postup a vyhodnocení detekce	54
4. BIOLOGICKÁ AKTIVITA	62
4.1 Stanovení antioxidační aktivity	62
4.1.1 Metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu	62
4.1.2 Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power)	66
4.2 Stanovení akutní toxicity	68
4.2.1 Referenční látka	68

4.2.2 Zkoumaná látka.....	70
4.2 Stanovení antimykotické aktivity.....	75
IV. DISKUSE, VÝSLEDKY	76
V. SOUHRN	81
VI. LITERATURA	83

I. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Tato rigorózní práce navazuje na diplomovou práci - Fytochemický výzkum listů *Helianthus annuus*.

V rámci diplomové práce jsem se snažila najít nejpřínosnější izolační postup pro získání látek z listů a pokusit se odstranit chlorofyl, kterého bylo v extraktu velké množství a mohl by komplikovat další postup. Náplní druhé části diplomové práce bylo provést biologické hodnocení získaných extraktů.¹

Cílem této rigorózní práce bylo pokusit se izolovat flavonoidy podle španělských autorů A.F. Maciase, A. Torrese, J.M.G. Molinilliho, popř. jiné látky z listů slunečnice roční. Ve druhé části práce jsem se zabývala hodnocením biologické aktivity získaných extraktů a frakcí.

II. TEORETICKÁ ČÁST

1. Botanická charakteristika a využití

Systematické zařazení:

Říše: Plantae (rostliny)

Podříše: Viridiplantae (zelené rostliny)

Oddělení: Magnoliophyta (rostliny krytosemenné)

Třída: Rosopsida (vyšší dvouděložné rostliny)

Podtřída: Asterideae

Řád: Asterales (hvězdnicotvaré)

Čeleď: Asteraceae (hvězdnicovité)

Podčeleď: Asteroideae

Rod: Helianthus (slunečnice)

Druh: *Helianthus annuus* L. (slunečnice roční)⁴



Helianthus annuus je jednoletá, vysoká bylina zakončená mohutným úborem. Úbor o průměru až několik dm má hnědé trubkovité květy terče a žluté, až 10 cm dlouhé jazykovité paprskové květy. Květy terče jsou hnědé, paprsku zlatožluté.³³ Slunečnice má střídavé, srdčité vejčité řapíkaté listy na přímé jednoduché lodyze.³⁴ Plody jsou černé nebo šedé, řidčeji bílé a šedě pruhované nažky, které mají olejnaté semeno. Slunečnice roční je domovem v Mexiku. V současné době se pěstuje také v Evropě jako důležitá užitková rostlina. Z jejích plodů (Fructus helianthi) se získává slunečnicový olej - Oleum helianthi, který je officinální.³³

Slunečnicový olej má protisklerotické účinky a je vynikající surovinou pro přípravu léčivých mastí. Užívá se zevně např. při zánětech, zapaření, a vnitřně: 2 - 4 čajové lžičky denně zlepšují ostrost vidění.²

V lékařství se slunečnicové tinktury užívá při malárii, tuberkulóze, při žilních chorobách.³

Slunečnicový olej se využívá jako součást do krémových přípravků, kde dodává ochranné a promašťující účinky.

Květy slunečnice jsou podstatným zdrojem medovice a nektaru pro výrobu medu.²

2.Hlavní obsahové látky

Rostliny čeledi Asteraceae se vyznačují tvorbou silic, balzámů a latexu. Dále obsahují deriváty fenypropanu, hlavně kyseliny kávové. V některých rodech byly nalezeny i alkaloidy. Silice v družících čeledi Asteraceae jsou značně rozšířeny. Uloženy jsou buď na povrchu orgánu v typických žláznatých chlupcích, nebo uvnitř orgánu v siličných buňkách nebo kanálcích. Chemické složení silic je různé, poněkud převládají terpeny a to monoterpeny jako pinen, limonen, thujon, cineol, kafr nebo seskviterpeny. Silice obsahující thujon jsou toxické. Rostliny čeledi Asteraceae obsahují další významnou skupinu látek jako např. seskviterpenové laktony. Jedná se o látky hořké, netěkavé nebo částečně těkavé, které nejsou glykosidicky vázané. Seskviterpenové laktony mohou vyvolat kontaktní alergické dermatitidy. V rostlinách této čeledi se taky vyskytují diterpeny, triterpeny, terpenoidní saponiny a polyterpeny. Z fenolických látek jsou v rostlinách hvězdnicovitých obsaženy hlavně deriváty kyseliny kávové a flavonoidy, ve kterých převládají charakteristické květní barviva chalkony a aurony.³³

V květech a stejně tak i v listech slunečnice je obsažen flavonoid quercimetrin, kumarinové glykosidy, triterpenové saponiny, karotenoidy, antokyany, třísloviny, cholin, xantofyly, betain, helianthin, minerální látky.³

Semena slunečnice obsahují kolem 45 % rostlinného oleje, bílkoviny, glyceridy, steroly, fosfolipidy, karotenoidy, organické kyseliny (citrónová, vinná, chlorogenová), lecitin a provitamin A.^{2,3}

2.1 Terpeny

Terpeny představují největší známou skupinu sekundárních metabolitů. Jsou typické především pro rostlinnou říši, ale jsou známy i u jiných forem života. Všechny terpeny a steroidy (biogenetické cesty jsou velmi podobné) je možno formálně odvodit ze základní stavební jednotky – pětiuhlíkatého 2-methylbutadienu (tzv. izoprénu). Podle počtu těchto jednotek se obvykle terpeny klasifikují jako: hemiterpeny C₅, monoterpeny C₁₀, seskviterpeny C₁₅, diterpeny C₂₀, sesterpeny C₂₅, triterpeny C₃₀, karoteny C₄₀.³⁸

2.1.1 Seskviterpeny

Seskviterpeny představují nejpočetnější skupinu terpenoidů. Jsou velmi často přítomny v silicích vyšších rostlin. Podle struktury se dělí na cyklické a acyklické.

Cyklické se dále dělí na monocyklické, bicyklické, tricyklické a laktony (α -methylen- γ -laktony). Laktony rozdělujeme podle uhlíkatého skeletu na germakranolidy, elemanolidy, guajanolidy, eudesmanolidy, pseudoguajanolidy, xanthanolidy a další.^{9,40}

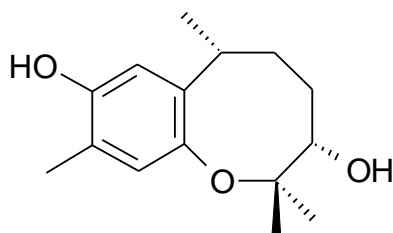
Seskviterpeny ve své hlavní biologicky aktivní formě – laktonu – mohou být prudkými křečovými jedy typu pikrotoxinu či koriamyrtinu, gastrointestinálními iritanty typu gossypolu, ale především kontaktními alergeny. Jejich základní patnáctiuhlíkatá struktura je formována do různých typů. Většina toxických a alergenních laktonů patří do skupiny guajanolidů, eudesmanolidů, germakranolidů, pseudoguajanolidů, sekoguajanolidů, sekoeudesmanolidů a sekopseudoguajanolidů. Seskviterpenové laktony se velmi hojně vyskytují v čeledi Asteraceae, často jsou hořkými a vonnými metabolity jejích druhů. Vedle řady pozitivních biologických efektů (jsou účinnými látkami významných léčivých rostlin) vykazují některé nežádoucí až toxické či alergenní účinky. V řadě odborných publikací byly popsány alergické kontaktní dermatitidy způsobené seskviterpenovými laktony. Přítomnost exocyklické α -methylenové skupiny je podmínkou vyvolání kontaktní hypersenzitivity (vazba laktonů na aminokyseliny). Toto zjištění přináší závěr o potenciální alergenní aktivitě u více než 400 seskviterpenových laktonů identifikovaných v čeledi Asteraceae. Nicméně i laktony bez methylenové skupiny, ale obsahující epoxyskupinu nebo cyklopentenový kruh mohou mít též senzibilizující vlastnosti. Seskviterpenové laktony jsou nízkomolekulární látky, jejich schopnost indukovat hypersenzitivitu pozdního typu je podmíněna přímým kontaktem s kůží. Jiná aplikace do organismu obvykle nevyvolá alergickou odezvu. Rozvoj kontaktní alergické dermatitidy závisí individuálně na koncentraci laktonů v rostlině, na jejich senzibilizující kapacitě, četnosti a intenzitě podání i individuální dispozici člověka. Pouze několik druhů Asteraceae obsahujících laktony může vedle pozdní hypersenzitivity způsobit také alergickou reakci časného typu, nicméně nebylo prokázáno, že se jedná o přímou aktivitu těchto látek. Senzibilizující schopnost seskviterpenových laktonů byla prokázána u řady druhů léčivých rostlin – i u *Helianthus annuus* (1,2-anhydrid 4,5-dehydroniveusin A apod.).³⁸

2.1.1.1 Heliannany, helibisabonoly

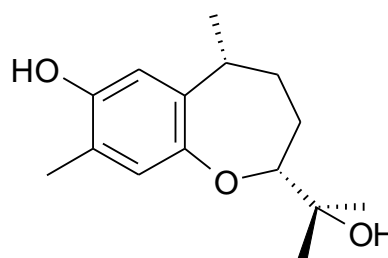
Heliannany byly izolovány z listů slunečnice. Heliannany jsou novým typem seskviterpenů izolovaných z pozemských (*Helianthus annuus*) a vodních (*Haliclona fascigera*) organismů. Sdílejí jako společný strukturální rys substituovaný aromatický kruh spojený s heterocyklem různé velikosti, který obsahuje kyslík.

Heliannany lze rozdělit na základě chemické struktury na 4 skupiny:

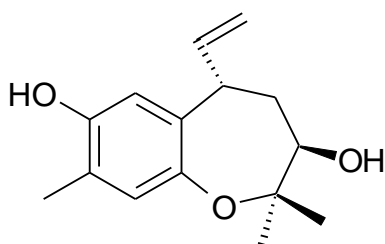
1. 7,11-heliannany: **heliannuol A** (obr.1), **heliannuol G** a jeho 8 epimer (**heliannuol H**) a **heliannuol K**
2. 7,10-heliannany: **heliannuol B** a jeho 8,9-hydrogenát **heliannuol D** (obr.2), **8-oxo heliannuol D** (**heliannuol F**), a 7,8 epimery **7,8-epoxy heliannuolu B** (**heliannuol I** a **heliannuol J**)
3. 8,11-heliannany: **heliannuol C** (obr.3)
4. 8,10-heliannany: **heliannuol E** (obr.4)^{1,11}



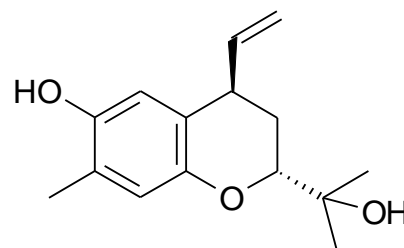
Obr.1: heliannuol A



Obr.2: heliannuol D

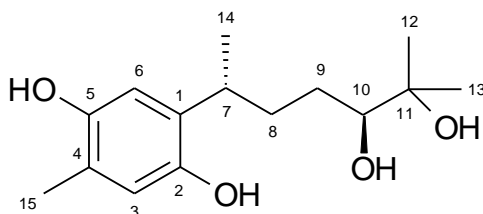


Obr.3: heliannuol C

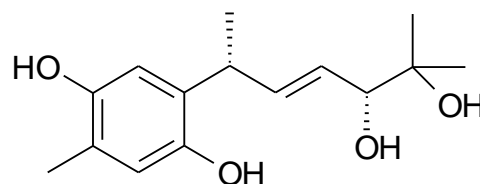


Obr.4: heliannuol E

Helibisabonoly jsou otevřené prekurzory heliannanů. Z listů slunečnice byly izolovány helibisabonoly A (obr.5) a B (obr.6).¹



Obr.5: helibisabonol A



Obr.6: helibisabonol B

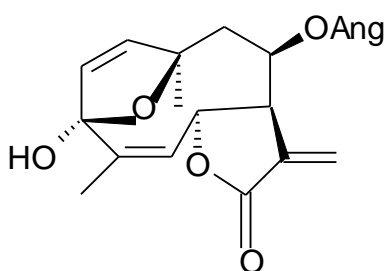
2.1.1.2 Germakranolidy

Germakranolidy jsou seskviterpenové laktony (α -metylen- γ -laktony).¹

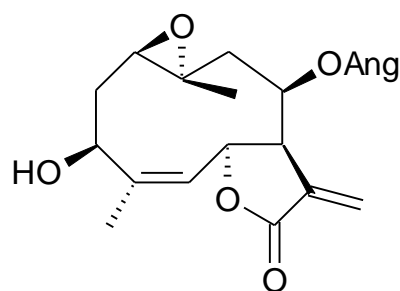
Z listů slunečnice byly vyizolovány tyto germakranolidy: helivypolidy D (obr.7), E, G, heliangolidy typu niveusinu - niveusin A, B, C a jejich deriváty, germakranolid tifruticinového typu, argophylliny A, B a leptokarpin (obr.8).¹

Dále byl izolován nový biologicky aktivní germakranolid annuithrin.⁶

Z květů slunečnice byly vyizolovány tyto germakranolidy: 3-O-methylniveusin A a 1,10-O-dimethyl-3-dehydroargophyllin B diol.⁷



Obr.7: helivypolid D



Obr.8: leptokarpin

2.1.1.3 Guajanolidy

Guajanolidy jsou také seskviterpenové laktony. Z listů slunečnice byly izolovány annuolidy A-E a 8β-angeloiloxicumambranolid.

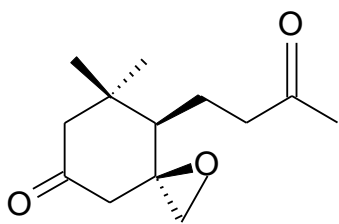
2.1.1.4 Seskviterpenové kyseliny

Z květů slunečnice byla vyizolována eudesma-1,3,11(13)-trien-12-ová kyselina.⁷

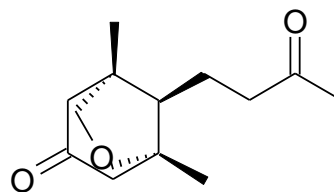
2.1.1.5 Annuionony (biseneskviterpenové laktony)

Z listů slunečnice byly vyizolovány annuionony A-H.¹

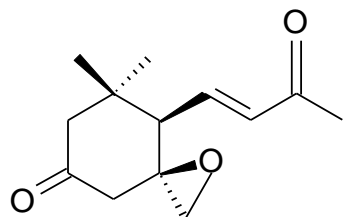
Polární biologicky aktivní frakce *Helianthus annuus* cv. Stella a SH-222 poskytla 8 apokarotenoidů, 2 z nich byly izolovány poprvé jako přírodní produkty (annuionony F a G). Izolace většího množství annuiononů A a E umožnila realizovat detailnější spektroskopickou studii. Byla navržena opravená struktura pro annuionony A, B a E, založená na pečlivé reanalýze nových spektroskopických dat.^{15,21}



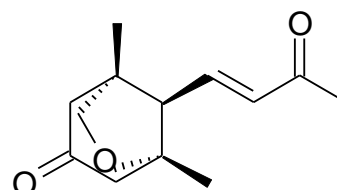
Obr.9: annuionon A (původní struktura)



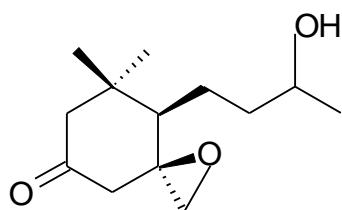
Obr.10: annuionon A (opravená struktura)



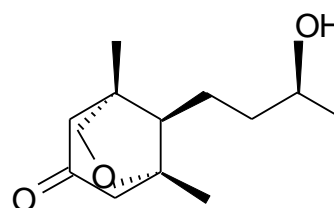
Obr.11: annuionon B (původní struktura)



Obr.12: annuionon B (opravená struktura)



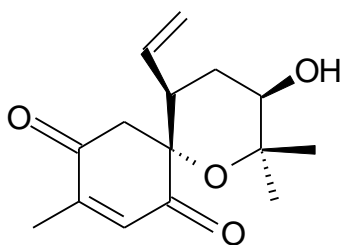
Obr.13: annuionon E (původní struktura)



Obr.14: annuionon E (opravená struktura)

2.1.1.6 Heliespiromy (spiroterpeny)

Ze středně polární frakce vodného extraktu listů *H. annuus* byly vyizolovány heliespiromy A-E.^{1,10}



Obr.15: heliespiron A

2.1.2 Diterpeny

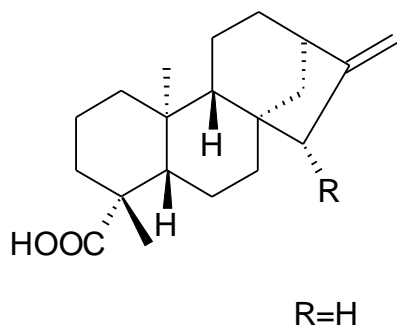
Diterpeny jsou látky obsahující 20 uhlíkových atomů. Diterpeny s tetracyklickou strukturou jsou kaurany. V přírodě se většina kauranových derivátů vyskytuje ve formě derivátů kaurenu ((-)-kaur-16-enu). Kaurany jsou v rostlinách široce rozšířené. Vykazují významnou biologickou aktivitu včetně toxicity.³⁸

2.1.2.1 Diterpenové kyseliny

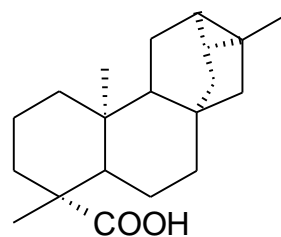
Z diethyletherového extraktu pylových zrn slunečnice byly izolovány 4 diterpenové kyseliny: 15-angelát grandiflorolikové kyseliny, *ent*-kaur-16-en-19-ová kyselina (obr.10), grandifloroliková kyselina a *ent*-trachyloban-19-ová kyselina.⁵

Z květů slunečnice byly izolovány trachyloban-19-ová kyselina spolu s biogeneticky příbuznou kaur-16-en-19-ovou kyselinou.⁸

Z jazykovitých květů byly izolovány také estery těchto dvou kyselin s thujanolem.¹²



Obr.16: kaur-16-en-19-ová kyselina



Obr.17: trachyloban-19-ová kyselina

2.1.2.2 Diterpenové alkoholy

Z květů byl izolován 7-oxo-trachyloban-15 α ,19-diol.⁷ Dále byly izolovány *ent*-kauran-16 β -ol¹², *ent*-kauran-16 α -ol^{12,23}, *ent*-kauran-16 β ,19-diol¹², *ent*-atisan-16 α -ol^{12,23} a *ent*-atisan-16 β -ol.¹²

2.1.2.3 Diterpenové aldehydy

Z květů slunečnice byly izolovány i *ent*-kaur-16-en-19-al a *ent*-trachyloban-19-al.¹²

2.1.3 Triterpeny

Triterpeny se vyskytují v metabolismu rostlin v různých strukturních formách, vykazují velmi rozličnou biologickou aktivitu, některé jsou také jedovaté.³⁸

2.1.3.1 Triterpenové alkoholy

Z diethyletherového extraktu pylových zrn byly izolovány 4 monooly: helianol, Δ^7 -tirucallol, α -amyrin a $4\alpha,5\alpha$ -epoxyhelianol.⁵

Z diethyletherového extraktu pylových zrn slunečnice bylo vyizolováno šest nových triterpenoidů 3,4-*seco*-tirucallanového typu: sunpollenol, (24S)-24,25-epoxysunpollenol, (24R)-24,25-epoxysunpollenol, (23E)-23-dehydro-25-hydroxy-sunpollenol, (24S)-24,25-dihydroxysunpollenol, (24R)-24,25-dihydroxy-sunpollenol.¹⁴

2.1.3.2 Estery mastných kyselin a triterpenových alkoholů

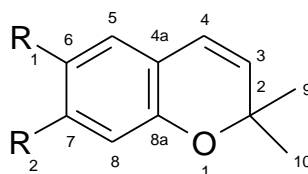
Z pylových zrn byly izolovány tyto estery: helianyloktanoát, (24S)-24,25-dihydroxyhelianyloktanoát, (24R)-24,25-dihydroxyhelianyloktanoát, $4\alpha,5\alpha$ -epoxyhelianyloktanoát, (24S)- $4\alpha,5\alpha:24,25$ -diepoxyhelianyloktanoát, (24R)- $4\alpha,5\alpha:24,25$ -diepoxyhelianyloktanoát, (24S)-24,25-dihydroxy- $4\alpha,5\alpha$ -epoxyhelianyloktanoát, (24R)-24,25-dihydroxy- $4\alpha,5\alpha$ -epoxyhelianyloktanoát. Alkalickou hydrolýzou byly získány volné alkoholy.⁵

2.1.4 Tokoferoly

Z pylových zrn byly izolovány tyto tokoferoly: (5S)- 3α -acetyl-2,3,5-trimethyl- 7α -hydroxy-5-(4,8,12-trimethyltridekanyl)-1,3 $\alpha,5,6,7,7\alpha$ -hexahydro-4-oxainden-1-on a dále 3α -acetyl-2,3,5-trimethyl- 7α -hydroxy-5-(4,8,12-trimethyltridekanyl)-1,3 $\alpha,5,6,7,7\alpha$ -hexahydro-4-oxainden-1-on.⁵

2.2 Benzopyrany

Z ethanolového extraktu úborových lůžek slunečnice byly izolovány tyto benzopyrany: demethoxyencecalin a demethylenencecalin (obr.18).¹³



Obr.18: demethoxyencecalin: R₁=CH₃CO, R₂=H

demethylenencecalin: R₁= CH₃CO, R₂=OH

2.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou deriváty benzopyranu, mezi něž patří jednak volné, jednak glykosidicky na cukry vázané katechiny, dihydrochalkony, chalkony, flavanony, isoflavanony, flavanoly, flavony, isoflavony, anthokyanidiny a flavonoly (pořadí podle rostoucího stupně oxidace).

Flavonoidy jsou v přírodě velmi rozšířené, vyskytují se však pouze v rostlinné říši. Pokud byly nalezeny v hmyzu nebo v jiných živočiších, dostaly se tam s potravou. Četné flavonoidy mají fyziologické účinky a používají se v medicíně.³⁵

V živém rostlinném organismu se flavonoidy patrně účastní oxidačně redukčních pochodů. Terapeutické využití flavonoidů je založeno na jejich schopnosti normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemoragicky a antiedematózně (P-vitaminový účinek). Jsou inhibitory hyaluronidasy, brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi, jsou proto podpůrnými prostředky při léčení infekčních nemocí. Některé působí diureticky, rozšiřují cévy, snižují krevní tlak. S ionty Ca²⁺ tvoří komplexní soli a brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Potencují účinek vitamínu C. Mají též účinky choleretické, cholagogní, spasmolytické.³⁷

Některé flavonoidy mají antialergickou, protizánětlivou, antivirovou a antioxidační aktivitu. Některé mají i protinádorové účinky. Určité flavonoidy vykazují potenciální aktivitu proti velkému množství enzymů. Významný je jejich inhibiční efekt na několik enzymových systémů, které souvisejí s procesy buněčné aktivace jako je proteinkinasa C, proteintyrosinkinasa a fosfolipasa A₂.³⁹

Z listů slunečnice byly vyizolovány tyto flavonoidy: tambulin, kukulkanin B, heliannon A-C.

2.3.1 Flavanony

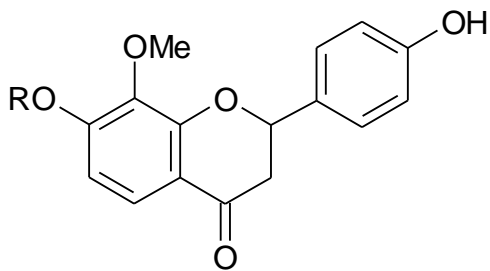
Mezi flavanony patří heliannon B a C

2.3.2 Chalkony

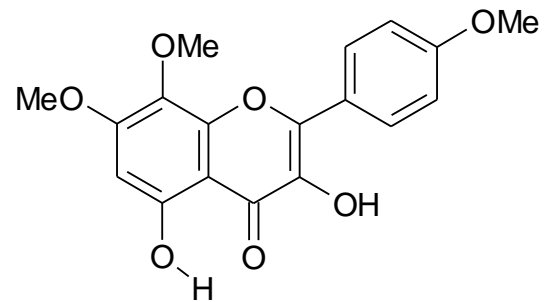
Kukulkanin B a heliannon A

2.3.3 Flavonoly

Tambulin³⁶



Obr.19: heliannon B R=CH₃
heliannon C R=H



tambulin

2.4 Estery mastných kyselin

2.4.1 Estolidy

Z pylových zrn slunečnice byly izolovány methylester 18-(hexadekanoyloxy)-oktadecenové kyseliny, ethylester 18-(hexadekanoyloxy)oktadecenové kyseliny, methylester 18-(oktadekanoyloxy)oktadecenové kyseliny a ethylester 18-(oktadekanoyloxy)oktadecenové kyseliny.⁵

2.5 Alkandioly

2.5.1 syn-alkan-4,6-dioly

Z pylových zrn byly izolovány: syn-nonadekan-4,6-diol, syn-hemikosan-4,6-diol, syn-dokosan-4,6-diol.⁵

2.5.2 syn-6,8-alkandioly

Z pylových zrn byly izolovány syn-6,8-alkandioly, jejichž základní skelet obsahoval 21 uhlíkových atomů, 23 uhlíkových atomů, 25 uhlíkových atomů a 27 až 35 uhlíkových atomů.

2.6 Alifatické ketony

Z pylu slunečnice byl izolován (3E)-trikos-3-en-5-on.

2.7 Alkanové kyseliny

Z pylu slunečnice byla izolována 14,16-dioxopentakosanová kyselina.

2.8 Saponiny

Z květů slunečnice byly izolovány 3 nové bisdesmosidické triterpenoidní saponiny-helianthosid 1, 2, 3.¹⁶

Helianthosid je základní saponin izolovaný ze slunečnice. Je charakterizován jako bisdesmosid echinocystové kyseliny.²²

2.9 Gibereliny

Giberelin je fytohormon, respektive skupina fytohormonů na bázi kyseliny giberelové (GA_3). Vzniká v mladých listech, vzrostných vrcholech, kořenech a klíčících semenech. Stimuluje mitózu, růst internodií a listů. Na rozdíl od dalších fytohormonů nestimuluje růst kořenů. Ovlivňuje aktivitu amylázy v klíčících obilkách, indukuje kvetení u dlouhodobých rostlin, omezuje tvorbu samčích květů, zkracuje juvenilní periodu, někdy mění fotoperiodickou adaptaci rostlin.¹⁷

Byla potvrzena struktura tří 13,15 β -dihydroxylovaných C-20 giberelinů, které byly izolovány ze semen slunečnice. Čtrnáct giberelinů bylo identifikováno v semenech slunečnice. Zahrnují dříve známé GA_1 , GA_4 , GA_{19} , GA_{20} a GA_{45} a devět nových 15 β -hydroxygiberelinů. Z nových giberelinů, 15 β -hydroxy GA_{20} a 15 β -hydroxy GA_1 byly dříve syntetizovány chemicky z GA_3 a jsou jim přidělena čísla GA_{67} a GA_{72} . Byla objasněna struktura 15 β -hydroxy GA_{15} , 15 β -hydroxy GA_{24} a 15 β -hydroxy GA_{25} . Těmto novým giberelinům byla přidělena čísla GA_{64} , GA_{65} a GA_{66} (tyto gibereliny byly identifikovány jako C-20 deriváty). Zbývajícím 4 giberelinům byla provizorně přidělena struktura: 15 β -hydroxy GA_{17} , 15 β -hydroxy GA_{19} , 15 β -hydroxy GA_{44} , 15 β -hydroxy GA_{53} . Dále byly detekovány tři ve vodě rozpustné sloučeniny: GA_{75} , GA_{76} a 3-epi- GA_{72} .
18,19,20

3. Biologická aktivita obsahových látek

3.1 Antimykotická aktivita

Pět terpenoidů, dva seskviterpeny a tři diterpenové kyseliny izolované ze slunečnice byly testovány pro jejich efekt na růst dvou ekonomicky důležitých patogenů slunečnice a dalších kulturních plodin. Minimální inhibiční koncentrace testovaných terpenoidů byla řádově 10-100 ppm pro *Verticillium dahliae* a 10-1000 ppm pro *Sclerotinium sclerotiorum*. Směs dvou diterpenových kyselin, kaurenové a angeloylgrandiflorikové, byla nejsilnějším inhibitorem růstu hyfových vláken.^{24,25}

3.2 Protizánětlivý účinek

Methanolový extrakt květů slunečnice a steroly, triterpenové alkoholy a syn-alkan-6,8-dioly izolované z extraktu vykazují významnou protizánětlivou aktivitu, působí proti 12-O-tetradekanoylphorbol-13-acetátu (TPA), který indukuje zánět u myši. Syn-alkan-6,8-dioly vykazovaly navíc inhibiční tumor-podněčující aktivity TPA ve dvou stádiích zhoubného bujení v kůži u myši.⁵

3.3 Protinádorový účinek

U 24 terpenoidů a lipidů a 6-ti volných triterpenových triolů byl testován jejich inhibiční efekt na indukci Epstein-Barr viru časného antigenu (EBV-EA), který je indukován tumorovými promotory, 12-O-tetradekanoylphorbol-13-acetát (TPA), v Raji buňkách (EBV genom nesoucí lidské lymfoblastoidní buňky, neproduktivní typ), který je znám jako primární screening test pro antitumorové promotory. Mezi 30-ti testovanými sloučeninami, 21 sloučenin mající di- nebo polycyklický systém v molekule, vykazovaly potenciální inhibiční efekt na EBV-EA indukci.⁵

Triterpenoidy 3,4-seco-tirucalanového typu inhibují EBV-EA aktivaci.¹⁴

3.4 Alelopatická aktivita

Seskviterpeny heliannol A, D, helibisabonol A a helivypolid G významně inhibují růst etiolizovaných pšeničných koleoptilů. Také leptokarpin inhibuje růst pšeničných koleoptilů. Annuolidy A-E vykazují potenciální alelopatickou aktivitu. Annuoinon H může být užít jako silný růstový inhibitor. Heliespiron C a flavonoidy izolované z listů slunečnice mají také silnou alelopatickou aktivitu.¹

3.5 Antimikrobiální aktivita

Kauren-19-ová kyselina má antimikrobiální aktivitu. Je aktivní proti *Bacillus subtilis* (0,313 μg ml⁻¹), *Staphylococcus aureus* (12,5 mg ml⁻¹), *Mycobacterium smegmatis* (6,25 mg ml⁻¹), ale ne proti *M. tuberculosis* a *M. avium*. Dále je účinná proti *Sachcaromyces cerevisiae*, *E. coli*, *Candida herbarum*, *Candida albicans*. Odpovídající methylester byl mnohem méně aktivní.²⁵

3.6 Antiparazitická aktivita

Kauren-19-ová kyselina je aktivní proti *Trypanosoma cruzi* (tento bičíkovec způsobuje Chagasovu nemoc). Ve srovnání s gentianovou violetí (IC₅₀ 31 μg ml⁻¹) byla kyselina asi dvacetkrát méně účinná (500 μg ml⁻¹). Sodná a amonná sůl kyseliny nebyla účinná, stejně tak grandifloriková kyselina (1000 μg ml⁻¹). Sloučeniny 16α-hydroxykauran (IC₅₀ 500 μg ml⁻¹) a kauren-19-ol (200 μg ml⁻¹) byly aktivní proti tomuto organismu.²⁵

3.7 Insekticidní aktivita

Kauren-19-ová kyselina omezuje růst larev *Homeosoma electellum*, *Homeosoma zea* a *Pectinophora gossypiella* a do 20 % růst *H. virescens*.²⁵

3.8 Antioxidační aktivita

3.8.1 Úvod

V moderní společnosti stoupá počet civilizačních onemocnění, která souvisí s působením volných radikálů. Vzdůstá snaha chránit organismus před těmito radikály. K eliminaci jejich vlivu může přispívat vyšší příjem exogenních antioxidantů, proto vzdůstá tendence hodnotit antioxidační vlastnosti čistých přírodních látek, rostlinných extraktů i potravinových doplňků.

Volným radikálům, které vznikají *in vivo* a mají řadu fyziologických funkcí (např. účast v protizánětlivých reakcích, v procesu fagocytózy), se v současnosti věnuje velká pozornost a sleduje se jejich negativní působení na organismus při řadě onemocnění. Jde především o reaktivní kyslíkové radikály (ROS-reactive oxygen species) a dusíkové radikály (RNS-reactive nitrogen species). Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Kaskáda reakcí iniciovaná radikály vede k následným změnám ve struktuře buněk, k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu. Reparativní procesy v organismu nemohou samy plně eliminovat poškození biologických molekul, významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence, tj. redukce příčin jejich vzniku.

Jednou možností jak organismus chránit před vlivem exogenních i endogenních volných radikálů, je působení antioxidantů. Podle již klasické definice jsou antioxidanty molekuly, které jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit, mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek. Kromě endogenních nízkomolekulárních antioxidantů, jako je glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další, se v poslední době do centra pozornosti řadí mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají společně s potravou. Některé potraviny rostlinného původu tak vedle nutriční a energetické hodnoty mají důležitou roli jako zdroj antioxidantů. K přírodním látkám s antioxidačními účinky, které jsou přijímané potravou, jsou v první řadě tradičně řazeny antioxidační vitaminy C, E a karotenoidy. V poslední době se však mnohem větší význam přikládá dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám. Mezi ně patří např. flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína a aromatické a léčivé rostliny. V řadě experimentálních studií bylo také

prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitaminů.

Klinické a epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch nebo procesů stárnutí. Z uvedených důvodů vzrůstá zájem stanovit antioxidační aktivitu různých látek rostlinného původu. Jeden z přístupů ve výzkumu přírodních antioxidantů je testování reaktivity individuálních izolovaných látek vůči jednotlivým volným radikálům. Slouží především k odvození vztahů mezi strukturou a reaktivitou příslušných sloučenin. Většinu přírodních antioxidantů však přijímáme jako součást složitých směsí, jejich složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy, mohou též na sebe vzájemně působit (synergicky i inhibičně). Proto je také snaha charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků i jako celku.²⁶

3.8.2 Metody stanovení

V literatuře lze nalézt velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy. Přesnější chemické vymezení mechanismu jejich účinku je však často problematické. Proto také postupy hodnotící míru antioxidačního působení jsou založeny na různých principech.

Obecně mohou být kategorizovány do dvou skupin: na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále na metody posuzující redoxní vlastnosti látek.

Přestože hodnocení antioxidačních vlastností přírodních látek je v oblasti výzkumu věnována široká pozornost, je třeba připomenout, že řada látek přijímaných v rostlinném materiálu podléhá metabolickým změnám již v trávicím traktu a jejich účinek v organismu je dále podstatně ovlivněn mírou resorpce a dalším metabolismem. Proto výrazná antioxidační aktivita zjištěná *in vitro* nemusí znamenat adekvátně významný účinek *in vivo*. O metabolických procesech v trávicím traktu, biologické dostupnosti a farmakokinetice přírodních látek nejrůznějšího charakteru je přitom dosud známo velmi málo.²⁶

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie se ke stanovení antioxidační aktivity látek používají dvě metody: metoda sekvenční injekční analýzy se

spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH (difenylpikrylhydrazyl) radikálu a metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power).

3.8.2.1 Metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu

Metoda používající DPPH patří mezi metody hodnotící schopnost eliminovat radikály. Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Pokles absorbance při určité vlnové délce se měří buď po uplynutí určitého konstantního času nebo se pracuje v kinetickém režimu.²⁶

Počítačem kontrolovaný systém sekvenční injekční analýzy vybavený spektrofotometrickým detektorem diodového pole je používán pro rychlé monitorování a vyhodnocení antioxidační aktivity biologických vzorků. Automatizovaná metoda je založena na známé reakci stabilního DPPH s antioxidanty v organických nebo vodně-organických médiích, kterou se odbarví roztok DPPH. Tento radikál je zhasen reakcí s antioxidační látkou, která je donorem vodíkového atomu. Pokles absorbance DPPH měřené při 525 nm souvisí s koncentrací antioxidantu v testovaném vzorku (v porovnání se slepým vzorkem provedeným s roztokem voda-ethanol 1 : 1 namísto s testovaným roztokem). Při použití vody jako nosného proudu byly píky DPPH ve vodno-ethanolovém roztoku nepravidelného tvaru. Výsledky byly nereprodukovatelné. Tento problém byl vyřešen nahrazením vody vodným roztokem 50% ethanolu jako nosného proudu.

Příprava roztoků

Pro přípravu vodných roztoků se používá vysoce čištěná deionizovaná voda. 50% ethanol se před použitím v SIA systému odplyní v ultrazvukové lázni po dobu pěti minut. Roztok slouží jako slepý vzorek a v systému SIA jako nosný proud. Roztok DPPH v 50% ethanolu o koncentraci 0,0001 M se připraví rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% ethanolu ve 100ml odměrné baňce (k úplnému rozpuštění je třeba použít pětiminutové sonikace) a doplněním vodou na 100 ml. Po dalším pětiminutovém odvzdušnění se odměrná baňka zatemní zabalením do alobalu a uchovává v chladu. Roztok DPPH se připravuje vždy čerstvý, tedy v den měření. Měřený vzorek se připraví rozpuštěním frakce v 50% ethanolu, aby vznikla koncentrace 1 mg/ml, roztok se sonikuje po dobu jedné minuty a důkladně protřepe. Dále se postupným ředěním

připraví koncentrace 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml tohoto vzorku. Nižší koncentrace jsou rovněž odplyněny v ultrazvukové lázni.

Přístroje

Měření probíhá na systému pro sekvenční injekční analýzu (SIA) FIALab 3000, vybaveným pístovým čerpadlem s objemem 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, mísící cívkou, průtokovou detekční celou, detektorem, halogenovou lampou, spojovacími hadičkami. Zařízení je propojeno s počítačem a prostřednictvím programu FIALab for Windows 5.0 se celý proces analýzy řídí. Před začátkem měření se zapne zdroj světla a lampa se nechá 5 minut žhavit, aby byl světelný paprsek konstantní intenzity.

Technika SIA používá princip, jehož charakteristickým rysem jsou oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně (jednorázově) aspirovány do jednobáňového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je dopraven do detektoru, tím je jeden cyklus ukončen. V tomto jednoduchém případě je získán výsledný analytický signál ve formě píku, v podstatě se jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem.

Rychlost, jednoduchost, flexibilita a plná automatizace předurčují techniku SIA jako velmi vhodný prostředek všude tam, kde je nutno analyzovat velké série vzorků, sledovat změny koncentrace důležitých analytů v průběhu různých procesů. Antioxidační účinek je vyjádřen v procentech poklesu absorbance oproti slepému vzorku:

$$\frac{C_{\text{prům. vzorku}}}{C_{\text{prům. DPPH}}} \cdot 100 = X$$
$$100 - X^{28}$$

3.8.2.2 Metoda FRAP (*ferric reducing antioxidant power*)

V rámci testování biologické aktivity byla zavedena nová metoda testování anti-ROS aktivity – FRAP metoda, která je jednoduchá a spolehlivá. Je to spektrofotometrická metoda modifikovaná na využití mikrodestiček, založená na schopnosti antioxidantů redukovat ionty Fe^{3+} na Fe^{2+} . Fe^{2+} ionty jsou měřeny spektrofotometricky (probíhá na přístroji Microplate reader (Anthos 2010)) měřením barevného (modrého) komplexu s 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazinem (TPTZ), jehož absorpční maximum je při 595 nm.⁴⁶

Všechny látky byly testovány nejméně 3x při 37 °C. Jako standardy jsou používány známé antioxidanty (Trolox, askorbová kyselina nebo (+)-katechin).

Statistická analýza byla vyhodnocena za užití software SigmaPlot 2002 pro Windows version 8.0.

Metoda má své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH 3,6, nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a trioly. Metoda FRAP tak odráží pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} a s celkovou antioxidační aktivitou vzorku nemusí pozitivně korelovat.²⁶

Příprava roztoku

K 10 ml acetátového pufru (300 mM) byla přidána kyselina octová tak, aby bylo udržováno pH 3,6. Tento pufr byl smíchán s 1 ml hexahydrátu chloridu železitého (20 mM), který byl rozpuštěn v destilované vodě a s 1 ml 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ) (10 mM), který byl rozpuštěn v kyselině chlorovodíkové (40 mM). 25 μl zkoumané látky rozpuštěné v různých koncentracích v rozmezí 10-200 μM . Všechny látky byly rozpuštěny v methanolu.²⁹

3.9 Alternativní metoda stanovení akutní toxicity extraktů: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*

3.9.1 Úvod

První, poměrně rychle získatelný údaj o nebezpečnosti látky poskytuje její akutní toxicita. Hledají se alternativní metody stanovení akutní toxicity, které by ušetřily čas, peníze, zvířata. Tyto metody by měly poskytovat adekvátní informace jako pokusy prováděné na obratlovcích.

Alternativní metody mají v toxikologii a xenobiochemii již dlouhou tradici, jsou využívány z etických důvodů, ale i informačních a ekonomických. Je vyžadováno nalezení takových metod a technik, které by poskytly hlavně rychle a s nižšími finančními náklady informace o nebezpečnosti nově produkováných a popisovaných látkách. I velmi hrubá, aproximativní informace je často důležitá.²⁶

Alternativní metody a testy tedy zahrnují nejen využití nižších organismů a rostlin nebo jejich částí, testy in vitro s izolovanými buňkami nebo tkáňovými kulturami, ale i počítačové modely, které nejčastěji využívají technik analýzy QSAR (Quantitative Structure –Activity Relationship, tj. kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou chemikálií a jejich biologickou účinností) nebo toxikokinetických pravidel.

Byly prováděny studie, které prokázaly u různých skupin látek korelaci mezi akutní toxicitou měřenou různými způsoby a rozdělovacím koeficientem oktanol/voda. Je možné předpokládat i korelaci dat stanovených na různých biologických objektech.

Bylo prokázáno, že existuje těsná korelace pro soubor alkoholů mezi LD₅₀ stanovenou na myších a EC₅₀ (zástava pohybu) stanovenou na nitěnkách, respektive IGC₅₀ (Inhibition Growth Concentration-koncentrace inhibující růst) stanovenou na prvocích. Hlavními přednostmi testu na červech *Tubifex tubifex* jsou jednoduchost, reprodukovatelnost, rychlost a finanční nenáročnost. Nitěnky jsou zmíněny jako objekt pro test toxicity odpadních vod i pro stanovení akutní toxicity jednotlivých chemikálií a chemických přípravků.

Byly použity na přelomu 50. a 60. let ke stanovení toxicity pro zásadní práce, které vedly k predikčním metodám typu analýzy QSAR.

3.9.2 Popis testovaného organismu

Říše: Animalia (živočichové)

Oddělení: Bilateria

Kmen: Annelida (kroužkovci)

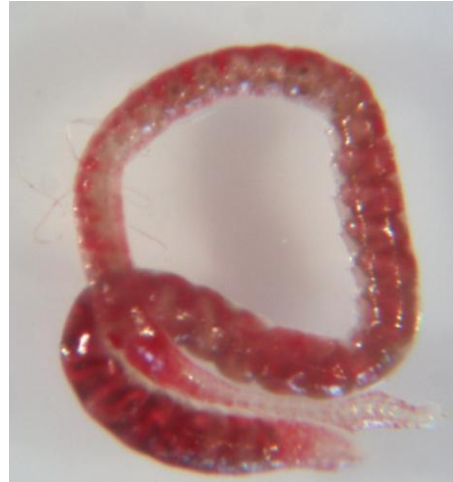
Třída: Oligochaeta (máloštětinatci)

Řád: Tubificida

Čeleď: Tubificidae (nitěnkovité)

Rod: nitěnka

Druh: nitěnka větší (*Tubifex tubifex*)²⁷



Obr.20: *Tubifex tubifex* (stereomikroskop 20:1)

Máloštětinatci mají tělo homononně segmentováno, až 600 článků s větším počtem štětin. Opasek je přítomen trvale. Přepážky (dissepimenta) jsou silně vyvinuty u forem suchozemských, u vodních jsou druhotně potlačeny.

Trávicí soustava může být diferencovaná na ústa, svalnatý hltan, jícen, u kterého jsou chylové žlázy (vápenaté žlázy vyrovnávající pH v trávicí trubici), dále je přítomen svalnatý a žláznatý žaludek a střevo s tyflosolis a řitní otvor.^{30,32}

Pro cévní soustavu je typická přítomnost tzv. pomocných (auxiliárních) srdcí vytvořených z obloukovitých postranních cév v přední části těla. Cévní soustava je uzavřená.^{30,32}

Máloštětinatci jsou hermafroditi. Vyskytují se hlavně v sladkých vodách a v půdě. Živí se organickým detritem (listí).³⁰

Všichni máloštětinatci dýchají celým povrchem těla. U některých druhů je vyvinuto dýchání stěnou střevní, přičemž výměnu vody obstarávají svaly a obrvený epitel na konci střeva. Některé druhy (*Tubifex tubifex*) vydrží dlouhou dobu v prostředí bez kyslíku, a to až desítky dnů (25 dnů při teplotě 10-12 °C, při teplotě 2-3 °C přežívá ještě 30 % jedinců anoxii 48 dnů). Jako zdroj energie je při anoxybióze ve zvýšené míře využíván glykogen (podíl glykolýzy na metabolismu se zvýší 3-4krát).³¹

3.9.3 Chemikálie používané při testu

destilovaná voda, tetrahydrát chloridu manganatého, stanovovaná látka

3.9.4 Metodika testu

Test se používá pro testování biologické aktivity látek rozpustných ve vodě a na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové jsme jej používali i na testování mikrosuspenzí. Testuje se roztok zkoumané látky a roztok referenční látky. Pro ověření správnosti testování byla stanovena akutní toxicita dihydrátu chloridu manganatého jeho průběžným testováním v letech 1992-1993. Kromě toho byla souběžně se stanovením akutní toxicity nasycených alkoholů tato sůl testována způsobem, který umožnil stanovit rozptyl výsledků jak při každém stanovení, tak mezi různými dny. Z celkového počtu 72 měření byla stanovena hodnota EC₅₀ pro zástavu pohybu červů a LC₅₀ pro letální koncentraci, včetně intervalů spolehlivosti pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$:

$$\log EC_{50} = -0,845 \pm 0,0326 \text{ (mol/l)}$$

$$\log LC_{50} = -0,726 \pm 0,0390 \text{ (mol/l)}$$

Tyto hodnoty slouží jako vnitřní kontrola správnosti testování akutní toxicity pomocí červů *Tubifex tubifex*.

3.9.5 Příprava roztoků referenční látky

Navážka dihydrátu chloridu manganatého (asi 1,8000 g přesně) měla být rozpuštěna ve 25ml odměrné baňce. V laboratoři byl k dispozici pouze tetrahydrát chloridu manganatého, tudíž navážka byla přepočtena na 2,2003 g přibližně přesně a rozpuštěna ve 25 ml destilované vody. Takto získaný základní roztok byl naředěn následujícím způsobem:

8 ml základního roztoku + 2,1 ml destilované vody ... koncentrace 1

8 ml koncentrace 1 + 2,1 ml destilované vody ... koncentrace 2

Bylo připraveno 6 ředění.

3.9.6 Příprava roztoků stanovované látky

Byly připraveny 2 ml 10% roztoku extraktu (základní roztok). Základní roztok byl ředěn následujícím způsobem:

0,9 ml základního roztoku + 0,3 ml destilované vody ... koncentrace 1

0,9 ml koncentrace 1 + 0,3 ml destilované vody ... koncentrace 2

Ředění bylo prováděno, dokud nitěnky reagovaly na roztok.

3.9.7 Pracovní postup

Měření probíhalo při laboratorní teplotě (20-25 °C). Do Petriho misky byl napipetován 1 ml pracovního roztoku o nejvyšší koncentraci. Z kolonie bylo rychle, ale šetrně odděleno 6 stejně velkých nitěnek, byly osušeny na filtračním papíře a přeneseny do pracovního roztoku. Zde byly exponovány přesně 3 minuty. Sledovala se zástava pohybu. Stanovil se počet jedinců, u nichž došlo k zástavě pohybu.

Po 3 minutách byly nitěnky rychle vyjmuty, přeneseny do Petriho misky s pitnou vodou a po 1 minutě se stanovil počet nehybných jedinců. Použité nitěnky byly vyřazeny a pokus byl opakován, a to celkem třikrát. Pak se pokračovalo s nižšími koncentracemi až po dosažení koncentrace, která nezpůsobila žádnou zástavu pohybu nitěnek. Souběžně se stanovením akutní toxicity sledované látky se stanovovala i akutní toxicita referenční látky.

Výsledky pokusů byly statisticky vyhodnoceny podle metody Weilové.

3.9.8 Výpočet

Výsledky jsou zatím počty nehybných jedinců nitěnek po expozici přesně tři minuty u každé koncentrace zkoumané látky. Z těchto hodnot je možné vypočítat EC_{50} podle následujícího vztahu:

$$\log EC_{50} = \log D_A + d (f + 1) \quad (1)$$

kde D_A je nejnižší koncentrace ze čtyř potřebných pro výpočet, f tabelovaná konstanta a d početní konstanta:

$$d = \log R \quad (2)$$

kde R je poměr mezi dvěma následujícími koncentracemi (vyšší koncentrace lomena nižší je vždy větší než jedna)

Interval spolehlivosti pro 95% pravděpodobnost je dán vztahem:

$$L_{1,2} = \log EC_{50} \pm 2 \sigma_f d \quad (3)$$

kde σ_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.³¹

3.10 Testování antimykotické aktivity

Metoda: mikrodiluční bujónová v destičkách – M27A-M1 (200+10)

Medium: RPMI 1640 s glutaminem

pH/pufr: 7,0/MOPS (0,165 M)

Teplota: 35 °C

Délka inkubace: 24-48 hod (u *Trichophyton mentagrophytes* 48-72hod)

Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra

Odečítání: vizuální/fotometrické (OD 540 nm), MIC=IC₈₀ (80 % inhibice kontroly)

Testované kmeny Kód, číslo:

CA1-*Candida albicans* ATCC 44859

CT-*Candida tropicalis* 156

CK2-*Candida krusei* E28

CG-*Candida glabrata* 20/I

TB-*Trichosporon beigeli* 1188

TM-*Trichophyton mentagrophztes* 445

AF-*Aspergillus fumigatus* 231

AC-*Absidia corymbifera* 272

Velikost inokula: ($\times 10^4$ cfu.ml⁻¹)

Testované extrakty: Sumární dichlormethanový (viz. diplomová práce)

Ethanolový (viz. diplomová práce)

Butanolový

Pozn.: Sumární dichlormethanový extrakt byl získán macerací sušených listů slunečnice roční dichlormethanem. Vysušené listy po předchozí extrakci dichlormethanem byly reextrahovány EtOH. Takto vznikl ethanolový extrakt.

4.Extrakční, separační a strukturně analytické postupy

Extrakce

Extrakce z kapaliny do kapaliny je separační metoda založená na přenosu látky z jedné kapalně fáze do druhé kapalně fáze. Obě kapalně fáze jsou přitom vzájemně nemísitelné a proto se tato jednoduchá extrakce označuje též jako „vytřepávání“. Nejjednodušší provedení extrakce je vytřepání v dělicí nálevce.

Chromatografie

Chromatografické metody jsou vysoce účinné separační metody, sloužící k oddělení složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní i kvantitativní analýze. Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna nepohyblivá, stacionární fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi, druhá pohyblivá, mobilní fáze pak vymývá (eluuje) jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich oddělení.

Stacionární fáze přitom může být tuhá (sorbent) nebo kapalná, mobilní fáze kapalná (=eluent, eluční činidlo) nebo plynná (nosný plyn). Hybnou silou v chromatografickém systému je tok mobilní fáze, která unáší ionty nebo molekuly. Vlastní dělení látek v systému však závisí na brzdící síle (retenci), která působí selektivně: některá látka je bržděna více, jiná méně. Při chromatografickém procesu se ustavuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí do mobilní fáze. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, tj. čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje.

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které se liší z hlediska povahy:

- separačního děje (chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, na molekulových sítích)
- použité techniky (chromatografie sloupcová, papírová, na tenké vrstvě)
- způsobu vyvíjení (chromatografie eluční, vytěšňovací, frontální analýza)

- skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze (chromatografie kapalina – tuhá látka, kapalina – kapalina, plyn – kapalina, plyn – tuhá látka)⁴¹

Chromatografie na tenké vrstvě

Jedná se vlastně o aplikaci sloupcové adsorpční a rozdělovací chromatografie v plošném uspořádání. Nepohyblivou fází tvoří tenká vrstva sorbetu naneseného na inertní podložce. Nejpoužívanějšími sorbety jsou silikagel, oxid hlinitý a prášková celulóza. Folie Silufol UV 254 nebo 366 (silikagel s pojídkem na hliníkové folii) obsahují ve vrstvě sorbetu zároveň fluorescenční indikátor umožňující detekci při uvedených vlnových délkách.

TLC spojuje vlastnosti sloupcové adsorpční a papírové chromatografie, má však proti nim mnoho výhod (jednoduché provedení, rychlost dělení látek, snadné vyhodnocování, možnost používání mikrogramových množství vzorků).⁴¹

Kolonová chromatografie

Při kolonové pracovní metodice se směs látek, určená k dělení, vnese vhodným způsobem na adsorbent v chromatografické trubici, na kolonu se vlévá eluent, který z kolony vytéká (a obsahuje komponenty dělené směsi), nazývá se eluát a jímá se po frakcích konstantního objemu.⁴²

Macerace

Macerace je představována jednostupňovou nebo několikanásobnou extrakcí drogy za protřepávání nebo míchání, které má být v průběhu předepsaného času dostatečně intenzivní. Provádí se v dobře uzavřených, před světlem chráněných nádobách. Směs se po uplynutí doby (několika dnech) kolíruje a droga vylisuje. Macerace patří mezi diskontinuální extrakce.

Filtrace

Filtrace je jednou z nejběžnějších operací, v jejím průběhu dochází k oddělování pevné fáze od fází ostatních pomocí propustného materiálu, který pevnou fází zachycuje a dovoluje prostup fázím ostatním. Filtrace má být kromě účinnosti dostatečně rychlá, nemá s ní být spojena zbytečná ztráta filtrovaného materiálu, a proto je třeba vždy uvážlivě přistupovat k volbě velikosti zařízení. Filtrační rychlost je přímo úměrná

hydrostatickému tlaku kapaliny, je tedy účelné udržovat na filtru hladinu v optimální výši.⁴²

III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

1. Všeobecné postupy

1.1 Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii

Silikagel L 0,1 – 0,2 mm (LACHEMA) byl 4 hod aktivován v sušárně při 160 °C ve vrstvě menší než 2 cm. Po vychladnutí byl deaktivován na 12 % obsahu vody.

1.2 Příprava roztěru

Extrakt, který měl být nanesen na kolonu, byl rozpuštěn v rozpouštědle, ve kterém se nejlépe rozpouští. Do odpařovací misky se navázilo potřebné množství silikagelu. Miska se umístila na vodní lázeň a na silikagel se nalilo malé množství rozpuštěného extraktu. Silikagel se míchal až do odpaření rozpouštědla z extraktu. Tímto způsobem se pokračovalo až do úplného odpaření rozpouštědla z extraktu. Tak byl získán silikagel nasycený extraktem a ten se nanášel na kolonu.

1.3 Sloupcová chromatografie

Chromatografická kolona byla připravena nalitím suspenze adsorbentu ve vhodném rozpouštědle do chromatografické kolony při současně mírně otevřeném odtoku. Po naplnění byl na hladinu nanesen suchý roztěr vzorku s adsorbentem. Sloupcová chromatografie byla prováděna způsobem stupňovité eluce.

1.4 Orientační tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Byla prováděna vzestupným způsobem v chromatografických komorách, které byly předem syceny parami eluční soustavy.

1.5 Odpařování frakcí

Roztoky byly odpařovány za sníženého tlaku (cca 1,6 kPa) a teploty kolem 50 °C na vakuové rotační odparce.

2. Potřeby

2.1 Rozpouštědla

Butanol (BuOH)

Diethylether

Dichlormethan

Ethanol (EtOH)

Chloroform (CHCl₃)

Methanol (MeOH)

Toluen

Voda destilovaná

2.2 Chemikálie

Acetanhydrid

Anisaldehyd

Dimethylsulfoxid

Ethyacetát

Hydroxid draselný (KOH)

Hydroxylamin chlorid

Chlorid manganatý-tetrahydrát

Chlorid železitý (FeCl₃)

Chlorid železitý-hexahydrát

Kyselina chlorovodíková

Kyselina chloristá

Kyselina mravenčí

Kyselina octová

Kyselina sírová

Mravenčan ethylnatý

Uhličitan draselný (K₂CO₃)

Vanilin

2.3 Standardy

Galangin

Hypericin

Kvercetin
Kyselina kávová
Naringenin
Rutin

2.4 Detekční činidla

D1: detekce na steroly, steroidy a triterpeny

Liebermann-Burchardovo činidlo: acetanhydrid a kyselina sírová. Před použitím bylo opatrně za chlazení smícháno 5 ml acetanhydridu s 5 ml koncentrované kyseliny sírové a získaná směs opatrně přidána do 50 ml ochlazeného absolutního ethanolu. Chromatogram byl zahříván při teplotě 100 °C asi 7 min. a vyhodnocen pod UV světlem při vlnové délce 365 nm. Při pozitivní reakci vznikají fluoreskující skvrny.

D2: detekce na cukry, steroidy, terpeny

Do roztoku 0,5 ml anisaldehydu v 50 ml kyseliny octové byl přidán 1 ml kyseliny sírové. Chromatogram byl zahříván na 100-105 °C než různě barevné skvrny dosáhly maximální intenzity.

D3: detekce na laktony

Roztok A: byl připraven rozpuštěním 20 g chloridu hydroxylaminu v 50 ml vody a doplněním do 200 ml ethanolu.

Roztok B: byl připraven rozpuštěním 50 g hydroxidu draselného v minimálním množství vody a zředěním na 500 ml ethanolu.

Postřikovací roztok I : byl získán smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 1 : 2 a odfiltrováním vyloučeného chloridu draselného.

Postřikovací roztok II : byl získán rozpuštěním 10 g chloridu železitého ve 20 ml 35% HCl a protřepáním s 200 ml diethyletheru do vzniku homogenního roztoku.

K detekci byl použit nejprve postřikovací roztok I, po usušení chromatogramu pak postřikovací roztok II. Vznikají různě zbarvené skvrny.³¹

Pozn. Všechna detekční činidla byla připravována v množství, které bylo potřebné k dané detekci.

D4: UV $\lambda=254$ nm

Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 254 nm. Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě tmavých skvrn, ve kterých je zhášen fluoreskující luminofor vrstvy chromatogramu.

D5: UV $\lambda=365$ nm

Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 365 nm. Pozitivní reakce se projevuje vznikem fluoreskujících skvrn různého zbarvení.

D6: Vanilinové činidlo

Činidlo bylo připraveno těsně před detekcí smísením roztoku 1% vanilinu v 95% EtOH s 3% kyselinou chloristou v poměru 1:1. Po postřiku činidlem byl chromatogram zahříván při teplotě 120 °C asi 7 minut. Pozitivní reakce se projeví vznikem různě barevných skvrn.⁴³

2.5 Vytvářecí soustavy pro chromatografii

S1: ethylacetát-kyselina mravenčí-kyselina octová-voda 100:11:11:27

S2: toluen-ethylacetát 93:7

S3: toluen-mravenčan ethylnatý-kyselina mravenčí 5:3,5:1,5

S4: chloroform-methanol 7:3

S5: chloroform-ethanol 98:2

S6: chloroform-ethanol 1:1

S7: chloroform-ethanol 9,5:0,5

S8: chloroform-ethanol 8,5:1,5

S9: chloroform-ethanol 8:2

S10: chloroform-ethanol 6:4

S11: chloroform-ethanol 1,5:8,5

2.6 Přístroje

Digitální stopky Eurochron

Digitální váhy KERN 572-33

Digitální váhy analytické ADA

UV lampa Camag 254/366 nm

Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER 10P

Vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114

Vodní lázeň

Laboratorní vařič Fisher Scientific

3. IZOLACE FLAVONOIDŮ

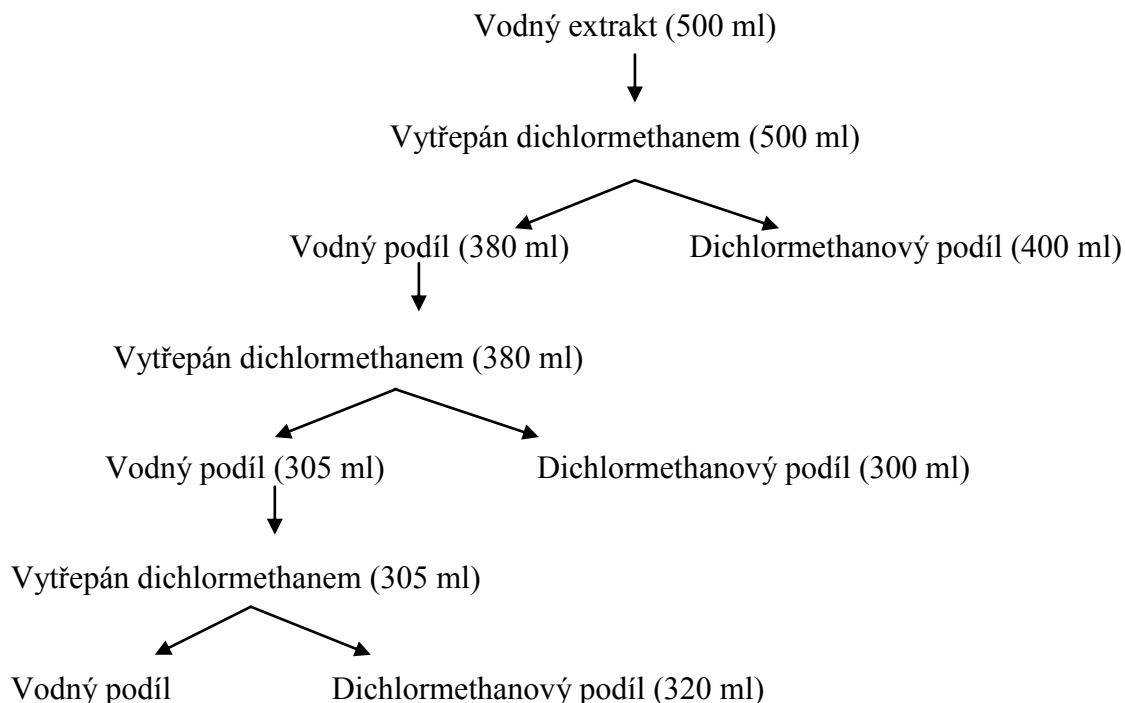
3.1 Extrakce listů

3.1.1 Postup

500 g usušených listů slunečnice bylo macerováno 3 dny 3 l vody (droga:voda 1:6). Listy byly umístěny do nádob a mírně stlačeny. Do nádob byla nalita voda tak, aby celý obsah byl ponořen. Nádoby byly uloženy do ledničky. Po třech dnech byl získán vodný extrakt. Listy byly ždímány přes gázu (sušené listy pohltily veškerou vodu). Pak byla provedena filtrace přes gázu a bylo získáno 2000 ml extraktu. Potom měla být provedena filtrace přes filtrační papír, ale póry se hned zanesly. Proto jsme vyzkoušeli filtraci přes Büchnerovu nálevku, ale také to nešlo. Proto byla filtrace provedena přes 6 vrstev buničité vaty. Tak bylo získáno 1650 ml extraktu.

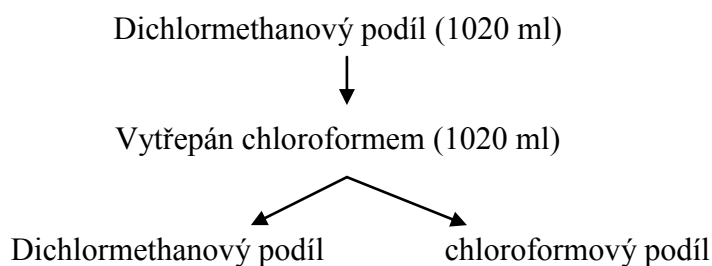
3.2 Zpracování vodného extraktu – postup A

3.2.1 Schéma zpracování vodného extraktu



Vodný podíl byl tmavě zelený až černý. Dichlormethanová vrstva byla žlutohnědá „gelovitá“ hmota. Trochu této hmoty jsme dali do zkumavky do lednice a nechali tam do druhého dne. Tato hmota se chladem nezměnila. 2 g dichlormethanové hmoty jsme dali do zkumavky a zahřáli (kolem 45 °C). Po zahřátí se „gelovitá“ hmota rozpustila. Po rozpuštění byla uskladněna do ledničky, aby se zjistilo, zda se opět změní v „gel“, ale zůstala i po 24 hod v lednici rozpuštěná. Byla snaha takto rozpustit celkové množství dichlormethanové vrstvy, ale to se nepodařilo. Při zahřívání tato hmota silně pěnila. Byla snaha tuto hmotu rozpustit přidáním rozpouštědel: nejprve byl přidán nadbytek dichlormethanu, ale hmota se nerozpustila. Pak byl přidán chloroform, hmota se částečně rozpustila. Po přidání vody vznikly dvě fáze.

3.2.2 Schéma zpracování dichlormethanového podílu

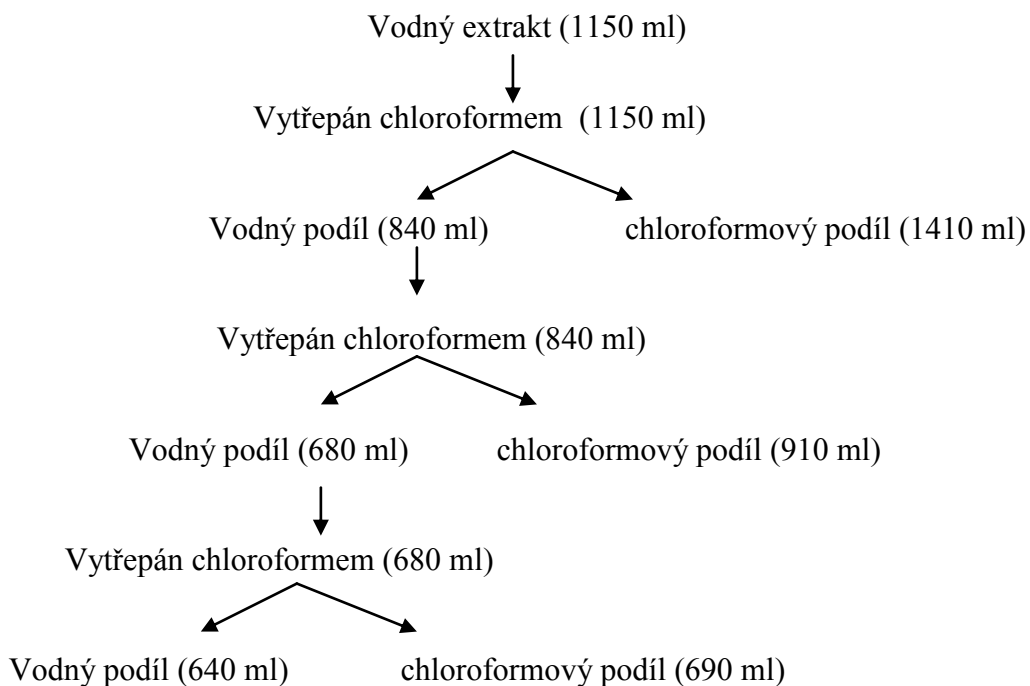


Dichlormethanový podíl byl vytřepán chloroformem 1:1. Většina „gelovitě“ hmoty se rozpustila v chloroformu. Dichlormethanové vrstvy zůstalo jen velmi málo. Chloroformový podíl byl přefiltrován přes uhličitan draselný. Bylo získáno 760 ml chloroformového podílu. Uhličitan draselný byl promyt 1000 ml chloroformu. Celkem tedy bylo získáno 1600 ml chloroformového podílu. Po odpaření chloroformu bylo získáno 0,1341 g suchého extraktu.

3.3 Zpracování vodného extraktu – postup B

3.3.1 Schéma zpracování vodného extraktu

Tento druhý postup byl zvolen, aby se zabránilo vzniku husté „gelovité“ hmoty, která vznikla v postupu A. Ovšem i po vytřepání vodného extraktu chloroformem tato hmota vznikla.



3.3.2 Zpracování chloroformové vrstvy

Chloroformová vrstva (3010 ml) byla vytřepána chloroformem 1:1. Bylo získáno 4820 ml spodní chloroformové vrstvy, horní vrstva vznikla jen v malém množství. Spodní vrstva byla filtrována přes K_2CO_3 . Po filtraci byl K_2CO_3 vymyt 2,5 l chloroformu. Po filtraci bylo získáno 6065 ml tohoto podílu. Po odpaření chloroformu bylo získáno 0,2919 g suchého extraktu. Tento extrakt byl spojen s 0,1341 g extraktu z postupu A. Celkem bylo získáno 0,426 g chloroformového podílu. Tento podíl byl rozpuštěn v ethanolu. Vznikly bílé krystalky, které se žiháním na měděné kopistce neměnily, ani se nerozpustily v chloroformu. Proto jsme usoudili, že je to uhličitán draselný, který byl použit na odstranění vody z tohoto extraktu. Uhličitán draselný byl odfiltrován. Po filtraci a odpaření bylo získáno 0,255 g chloroformového podílu.

Následovalo dělení tohoto podílu na sloupci Sephadexu.

3.3.3 Sloupcová chromatografie chloroformového podílu na sloupci Sephadexu

0,255 g extraktu bylo děleno na sloupci Sephadexu

Délka kolony: 40 cm

Průměr kolony: 2,5 cm

Sloupec Sephadexu: 33 cm

Kolona byla vymývána methanolem (250 ml). Extrakt byl rozdělen na tři frakce, extrakt se na tomto sloupci nedělil dostatečně.

Tab.1 Sloupcová chromatografie chloroformového podílu

Frakce	Eluční soustava	Popis frakce
1	methanol	oranžovo-hnědá (0,0291 g)
2	methanol	světle zelená (0,135 g)
3	methanol	světle zelená (0,0847 g)

Byla provedena TLC, kde byla nanesena frakce č.2 a standardy flavonoidů (galangin, kvercetin, rutin, naringenin, hypericin, kyselina kávová). Jako mobilní fázi jsme použili nejprve: ethylacetát-kyselina mravenčí-kyselina octová-voda 100:11:11:27, tato soustava však nebyla vhodná-některé flavonoidy zůstaly na startu. Dále jsme vyzkoušeli soustavu toluen-ethylacetát 93:7, avšak ani tato soustava nebyla vhodná. Jako nejvhodnější se jevila soustava: toluen-mravenčan ethylnatý-kyselina mravenčí 5:3,5:1,5. Frakce č.2 neobsahovala žádný z těchto flavonoidů, ale pod UV-366 byly vidět 2 intenzivně fluoreskující skvrny. Proto byla provedena preparativní TLC. 0,120 g frakce č.2 bylo naneseno na 10 silufolových desek. Mobilní fázi byla směs chloroform-methanol 7:3. Po vyvinutí chromatogramu byly desky shlédnuty pod UV-366. Desku jsme rozdělili na 4 zóny. 1. zóna obsahovala látky, které zůstaly na startu a v jeho okolí. 2. zóna obsahovala intenzivně fluoreskující látku, stejně tak 3. zóna, která byla těsně nad 2. zónou. 4. zóna obsahovala látky, které byly v čele chromatogramu.

Dále jsme se zabývali zónou č.2 a 3, které obsahovaly po jedné látce. Tyto zóny byly vystříhány a roztříhány na malé kousky a vymyty chloroformem. Stejný postup byl proveden i u 1. zóny, ale ta obsahovala více látek. Po vymytí silufolových desek chloroformem a následné filtraci, byl odpařen chloroform a bylo získáno:

Z 1. zóny: 0,0064 g

Z 2. zóny: 0,0025 g

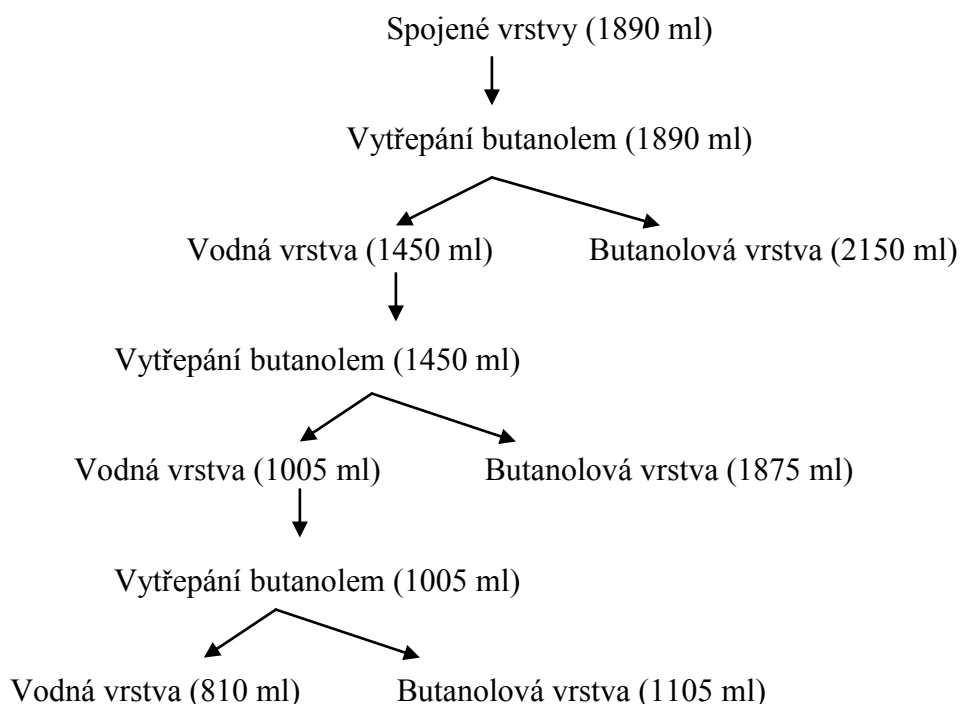
Z 3. zóny: 0,0022 g

Byla provedena TLC. Mobilní fází byla směs chloroform-ethanol 98:2. Zjistili jsme, že zóna 2 a 3, které byly těsně pod sebou obsahují stejnou látku. Proto byly spojeny a poslány na NMR analýzu. 1. zónou jsme se dále nezabývali, protože obsahovala více látek a další dělení nemohlo být provedeno, protože byla získána v malém množství.

3.3.4 Zpracování vodné, chloroformové horní vrstvy a dichlormethanové vrstvy

Byla spojena vodná vrstva po třepání dichlormethanem (380 ml), vodná vrstva po třepání chloroformem (1075 ml), dichlormethanová vrstva (155 ml) a horní chloroformová vrstva (280 ml). Celkem bylo získáno 1890 ml.

Tento podíl byl vytřepán butanolem 1:1.



Následovala filtrace butanolové vrstvy přes K_2CO_3 . Po filtraci byl K_2CO_3 promyt 4,5 l butanolu. Po odpaření butanolu bylo získáno 14,2601 g suchého extraktu.

3.3.5 Sloupcová chromatografie butanolového podílu na sloupci Sephadexu

0,25 g butanolového podílu bylo děleno na sloupci Sephadexu

Délka kolony: 40 cm

Průměr kolony: 2,5 cm

Sloupec Sephadexu: 33 cm

Kolona byla vymývána methanolem (200 ml). Extrakt se na této koloně nedělil.

3.3.6 Orientační sloupcová chromatografie butanolového podílu na sloupci silikagelu

1,12 g butanolového podílu bylo děleno na sloupci silikagelu. Na kolonu byl nanesen ve formě roztěru.

Délka kolony: 27 cm

Průměr kolony: 3 cm

Kolona byla vymývána nejprve chloroformem (50 ml), pak byl přidáván k chloroformu ethanol 5 % (150 ml), 10 % (50 ml), 15 % (50 ml), 20 % (350 ml), 25 % (100 ml), 30 % (75 ml), 40 % (50 ml), 50 % (50 ml). Pak byla kolona vymyta 400 ml 96 % ethanolu.

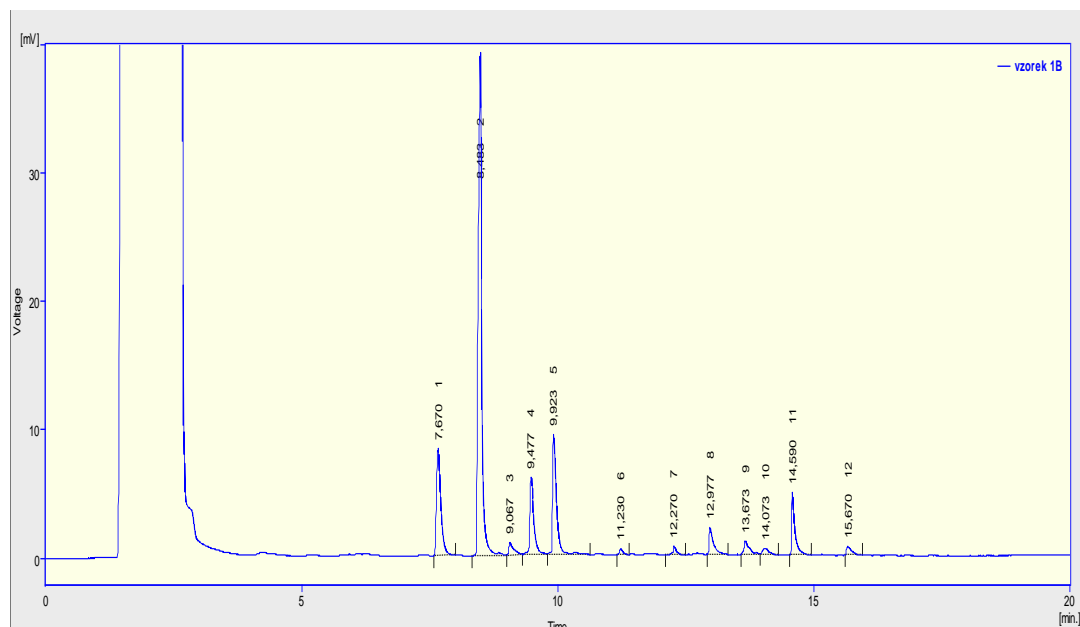
Tab.2 Orientační chromatografie butanolového podílu

Frakce	Eluční soustava	Popis frakce
1	5 % EtOH v CHCl_3	žlutooranžová
2	10 % EtOH v CHCl_3	světle žlutá
3	15 % EtOH v CHCl_3	světle žlutá-drobné krystalky
4	20 % EtOH v CHCl_3	světle žlutá-drobné krystalky
5	25 % EtOH v CHCl_3	světle žlutá
6	30 % EtOH v CHCl_3	oranžová
7	40 % EtOH v CHCl_3	oranžová
8	50 % EtOH v CHCl_3	oranžová
9	96 % EtOH v CHCl_3	oranžová

Byla provedena TLC těchto frakcí, mobilní fází byla směs CHCl_3 -EtOH 1:1. Frakce č.1 vznikla jímáním žlutozeleného proužku, který se vytvořil při dělení. Ve frakcích č.3 a 4 se vytvořily drobné krystalky. Z frakce č.4 bylo odpařeno rozpouštědlo a u extraktu byla hodnocena antioxidační aktivita. Krystalky ve frakci č.3 jsme se snažili přecistit promýváním chloroformem, avšak krystalky se rozptýlily a zmenšily.

Po přidání ethanolu téměř zmizely. Proto byla tato frakce opět zakoncentrována a uložena do lednice, aby se opět vytvořily krystaly. Po provedení TLC na chromatogramu frakce č.1 byla pouze jedna skvrna. Proto byla tato frakce zaslána na GC analýzu.

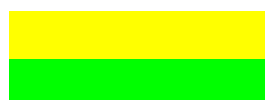
Obr.21 Chromatogram frakce č.1



Tab.3 Tabulka hodnocení chromatogramu frakce č.1

Retenční čas	Plocha	Podíl na celkové ploše (%)	Mastná kyselina
min	mV. s		
7,67	48,7 38	11,8	
8,483	210, 631	51	
9,067	7,47 4	1,9	
9,477	38,6 58	9,4	
9,923	51,5 79	12,5	
11,23	1,90 9	0,5	myristová

12,27	3,52 4	0,9	
12,977	11,8 96	2,9	palmitová
13,673	7,66 5	1,9	
14,073	4,38 7	1,1	
14,59	21,7 22	5,3	linolová
15,67	4,95 2	1,2	linolenová
Suma	413, 135	100	



frakce MK se středním řetězcem (86%)

frakce MK s dlouhým řetězcem (14%)

Frakce č.1 obsahovala směs mastných kyselin. Většina měřených mastných kyselin je se středním řetězcem a na jejich konkretizaci nebyly standardy (vypadají jako MCFA-middle chain fatty acids-nenasycené, jejich retenční čas neodpovídá nasyceným).

3.3.7 Sloupcová chromatografie butanolového podílu na sloupci silikagelu

5,0 g butanolového podílu bylo děleno na sloupci silikagelu. Na kolonu byl nanesen ve formě roztěru (5 g extraktu a 10 g silikagelu).

Délka kolony: 80 cm

Průměr kolony: 5 cm

Sloupec silikagelu: 70 cm

Kolona byla vymývána nejprve chloroformem (600 ml), pak byl přidán k chloroformu ethanol 5 % (3000 ml), 10 % (2500 ml), 15 % (1500 ml), 20 % (2000 ml), 25 % (1000 ml), 30 % (1000 ml), 35 % (1000 ml), 40 % (500 ml), 45 % (1000 ml), 50 % (2000 ml), 96 % (2000 ml).

Tab.4 Sloupcová chromatografie butanolového podílu

Frakce	Eluční soustava	Popis frakce
1	chloroform	žlutá

2	chloroform	žlutá
3	chloroform	světle žlutá
4	5 % EtOH	oranžová
5	5 % EtOH	oranžová
6	5 % EtOH	žlutooranžová
7	5 % EtOH	žlutooranžová
8	10 % EtOH	světle žlutá
9	10 % EtOH	světle žlutá
10	10 % EtOH	světle žlutá
11	10 % EtOH	žlutooranžová-bílé krystaly
12	10 % EtOH	žlutooranžová-bílé krystaly
13	15 % EtOH	žlutooranžová-bílé krystaly
14	15 % EtOH	žlutooranžová-bílé krystaly
15	15 % EtOH	žlutooranžová-bílé krystaly
16	20 % EtOH	žlutooranžová-bílé krystaly
17	20 % EtOH	žlutá-bílé krystaly
18	20 % EtOH	žlutá-bílé krystaly
19	20 % EtOH	žlutá-bílé krystaly
20	20 % EtOH	žlutá-bílé krystaly
21	25 % EtOH	žlutá-bílé krystaly
22	25 % EtOH	žlutooranžová-bílé krystaly
23	30 % EtOH	světle žlutá-bílé krystaly
24	30 % EtOH	světle žlutá-bílé krystaly
25	30 % EtOH	světle žlutá-bílé krystaly
26	35 % EtOH	světle žlutá-bílé krystaly
27	35 % EtOH	světle žlutá-bílé krystaly
28	35 % EtOH	světle žlutá-bílé krystaly
29	35 % EtOH	žlutá-bílé krystaly
30	40 % EtOH	žlutá-bílé krystaly
31	40 % EtOH	žlutá-bílé krystaly
32	40 % EtOH	žlutá-bílé krystaly
33	40 % EtOH	žlutá-bílé krystaly
34	45 % EtOH	žlutá
35	45 % EtOH	žlutá
36	45 % EtOH	žlutá
37	45 % EtOH	žlutá
38	50 % EtOH	oranžová
39	50 % EtOH	oranžová
40	50 % EtOH	oranžová
41	96 % EtOH	oranžová
42	96 % EtOH	žlutá
43	96 % EtOH	žlutá

3.3.8 Detekce na steroly, steroidy, triterpeny, cukry, terpeny a laktony

Detekce na tyto látky byla provedena v jednotlivých frakcích, které pocházely z dělení 5 g butanolového podílu na sloupci silikagelu.

3.3.8.1 Postup a vyhodnocení detekce:

Vyvíjecí soustavy pro chromatografii: pro frakci 1-7:	CHCl ₃ :EtOH	9,5:0,5
	pro frakci 8-14:	CHCl ₃ :EtOH 8,5:1,5
	pro frakci 15-21:	CHCl ₃ :EtOH 8:2
	pro frakci 22-28:	CHCl ₃ :EtOH 6:4
	pro frakci 29-35:	CHCl ₃ : EtOH 5:5
	pro frakci 36-41:	CHCl ₃ :EtOH 1,5:8,5

D1: detekce na steroly, steroidy, triterpeny

D2: detekce na cukry, steroidy, terpeny

D3: detekce na laktony

Obr.22 Chromatogram frakce 1-7

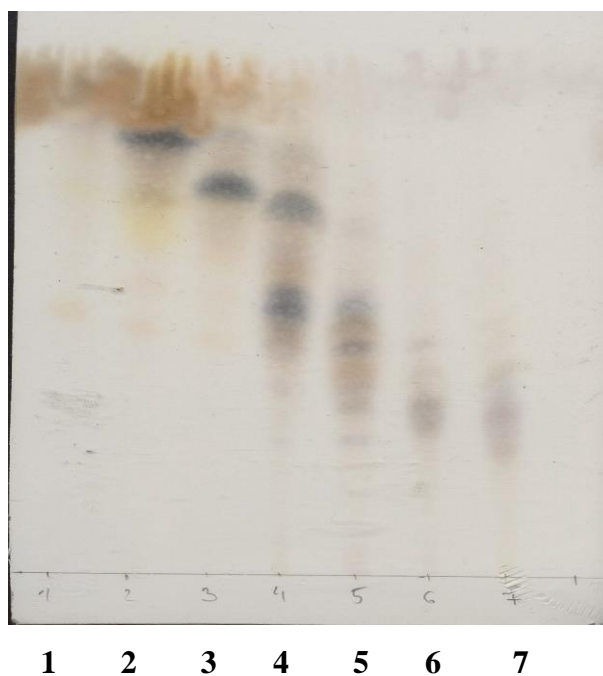
Frakce: 1-7

Soustava: S7

Detekce: D2

Komora: nasycená

Vyvíjení: jedenkrát



Obr.23 Chromatogram frakce 8-14

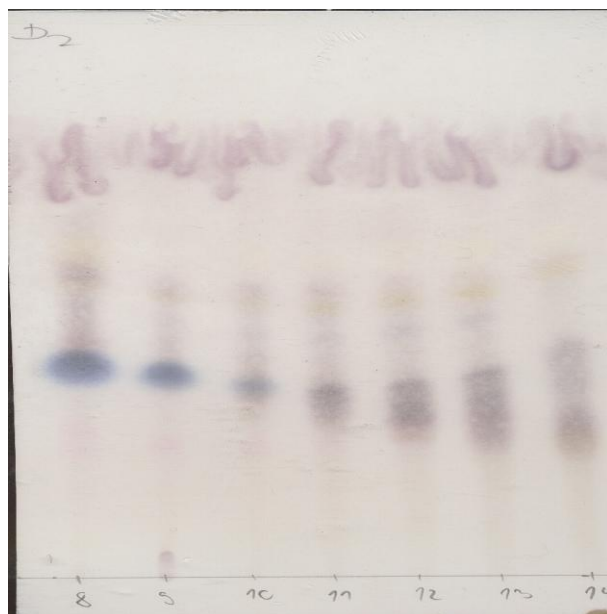
Frakce: 8-14

Soustava: S8

Detekce: D2

Komora: nasycená

Vyvíjení: jedenkrát



8 9 10 11 12 13 14

Obr.24 Chromatogram frakce 15-21

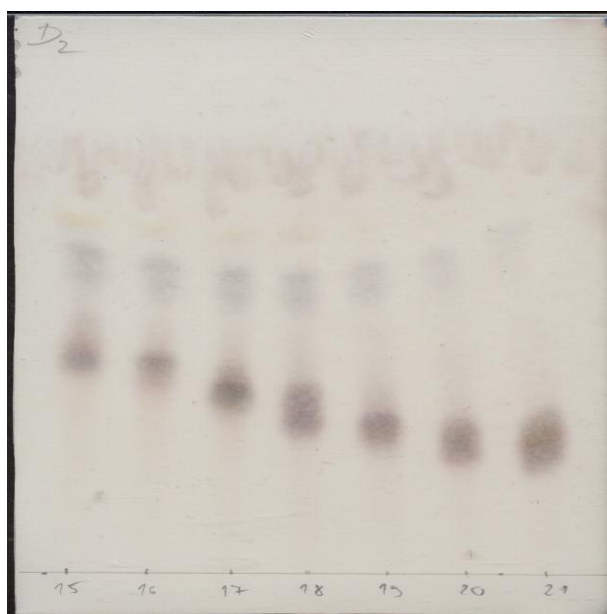
Frakce: 15-21

Soustava: S9

Detekce: D2

Komora: nasycená

Vyvíjení: jedenkrát



15 16 17 18 19 20 21

Obr.25 Chromatogram frakce 22-28

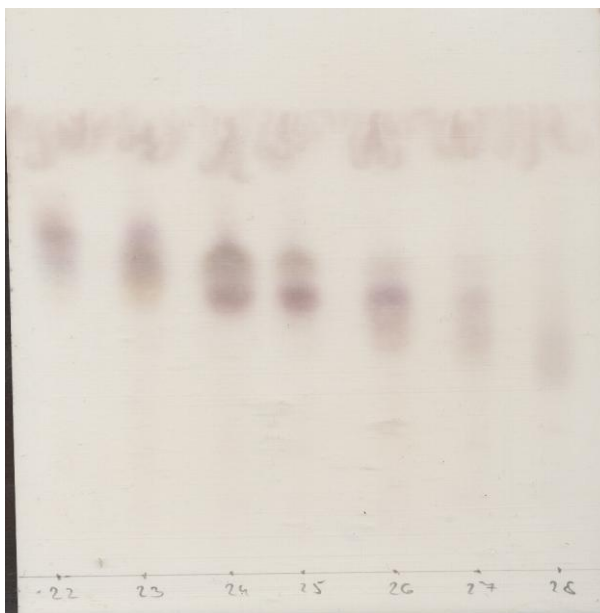
Frakce: 22-28

Soustava: S10

Detekce: D2

Komora: nasycená

Vyvíjení: jedenkrát



22 23 24 25 26 27 28

Obr.26 chromatogram frakce 29-35

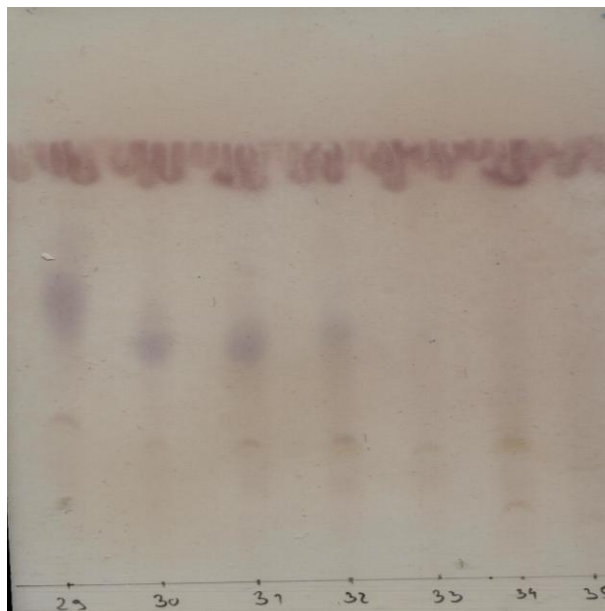
Frakce: 29-35

Soustava: S6

Detekce: D2

Komora: nasycená

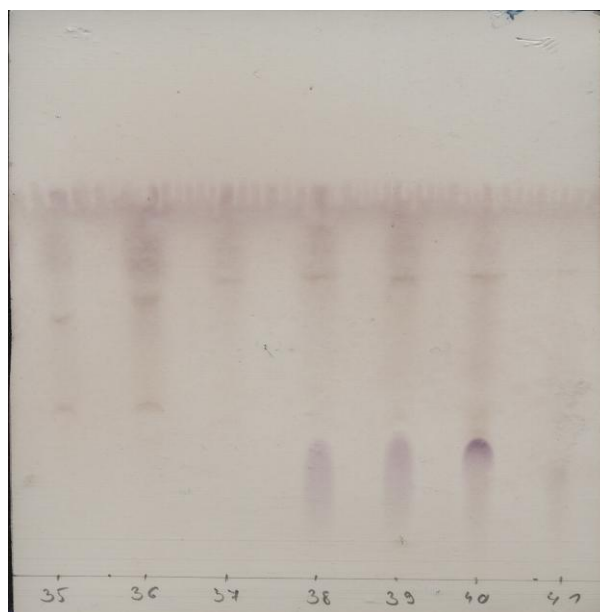
Vyvíjení: jedenkrát



29 30 31 32 33 34 35

Obr.27 Chromatogram frakce 36-41

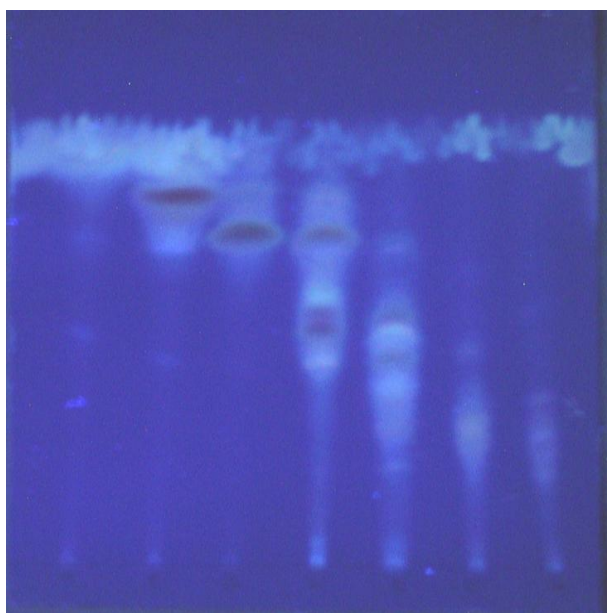
Frakce: 36-41
Soustava: S11
Detekce: D2
Komora: nasycená
Vyvíjení: jedenkrát



35 36 37 38 39 40 41

Obr.28 Chromatogram frakce 1-7

Frakce: 1-7
Soustava: S7
Detekce: D1
Komora: nasycená
Vyvíjení: jedenkrát



1 2 3 4 5 6 7

Obr.29 Chromatogram frakce 8-14

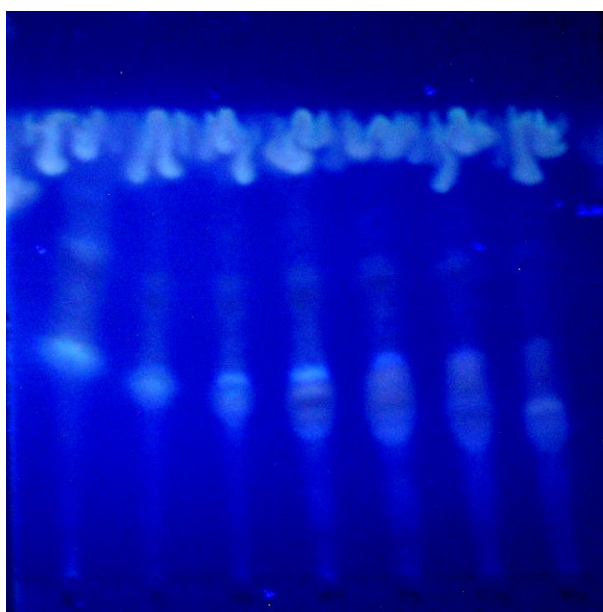
Frakce: 8-14

Soustava: S8

Detekce: D1

Komora: nasycená

Vyvíjení: jedenkrát



8 9 10 11 12 13 14

Obr.30 Chromatogram frakce 15-21

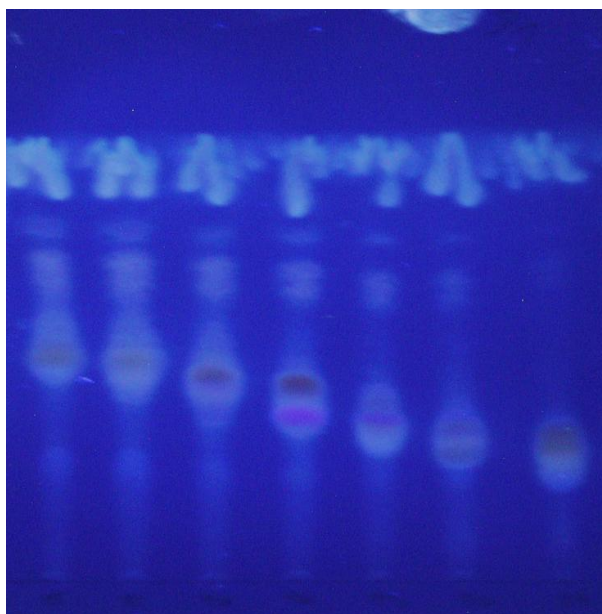
Frakce: 15-21

Soustava: S9

Detekce: D1

Komora: nasycená

Vyvíjení: jedenkrát



15 16 17 18 19 20 21

Obr.31 Chromatogram frakce 22-28

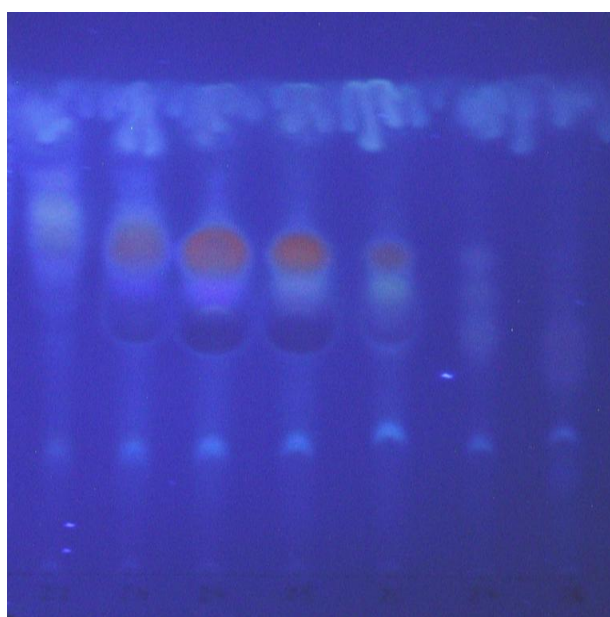
Frakce: 22-28

Soustava: S10

Detekce: D1

Komora: nasycená

Vyvíjení: jedenkrát



22 23 24 25 26 27 28

Obr.32 Chromatogram frakce 29-35

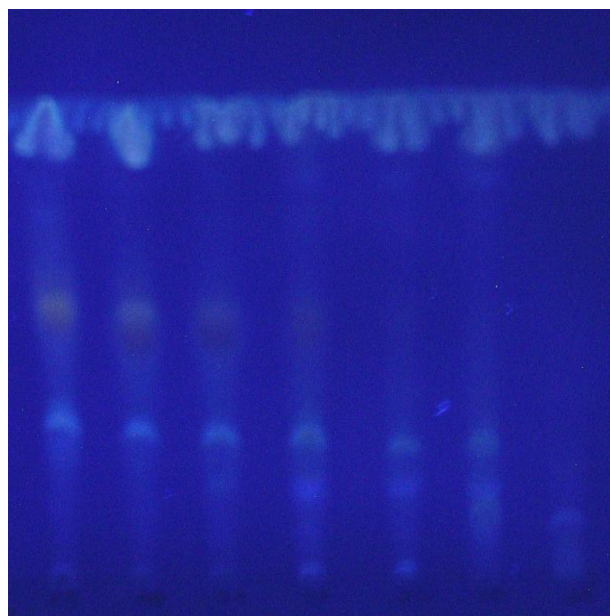
Frakce: 29-35

Soustava: S6

Detekce: D1

Komora: nasycená

Vyvíjení: jedenkrát



29 30 31 32 33 34 35

Obr.33 Chromatogram frakce 36-41

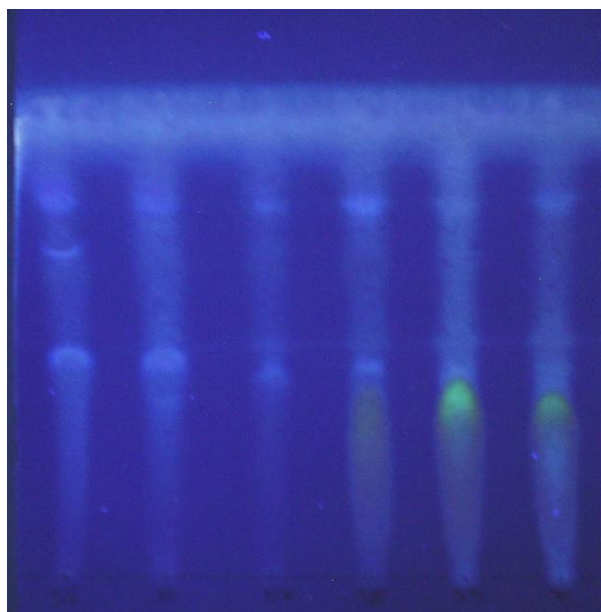
Frakce: 36-41

Soustava: S11

Detekce: D1

Komora: nasycená

Vyvíjení: jedenkrát



36 37 38 39 40 41

Tab.5 Detekce na steroly, steroidy, terpeny, cukry

FRAKCE	D1-počet skvrn	D2-počet skvrn
1	5	3
2	4	4
3	2	6
4	4	6
5	6	6
6	4	4
7	4	3
8	3	3
9	1	4
10	2	5
11	2	4
12	2	4
13	3	4
14	2	3
15	5	4
16	4	4
17	4	4

18	4	4
19	6	4
20	3	3
21	1	2
22	3	2
23	2	3
24	2	2
25	1	2
26	1	2
27	1	2
28	1	2
29	2	2
30	2	2
31	2	2
32	2	2
33	2	1
34	3	2
35	3	3
36	2	3
37	2	1
38	2	2
39	2	2
40	2	3
41	2	2

V jednotlivých frakcích butanolového podílu byly detekovány steroly, steroidy, triterpeny, cukry. Detekce na laktony se nezdařila.

4. Biologická aktivita

4.1 Stanovení antioxidační aktivity

4.1.1 Metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu

Tab.6 Chloroformový podíl frakce č.1

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,3963	0,3797	0,3873	0,3878		
vzorek 1mg/ml	0,7411	0,7624	0,7649	0,7561		
vzorek 0,5 mg/ml	0,434	0,4553	0,4665	0,4519		
vzorek 0,25 mg/ml	0,3525	0,3546	0,3596	0,3556	91,6968	8,3032
vzorek 0,1 mg/ml	0,3435	0,3536	0,3505	0,3492	90,0464	9,9536

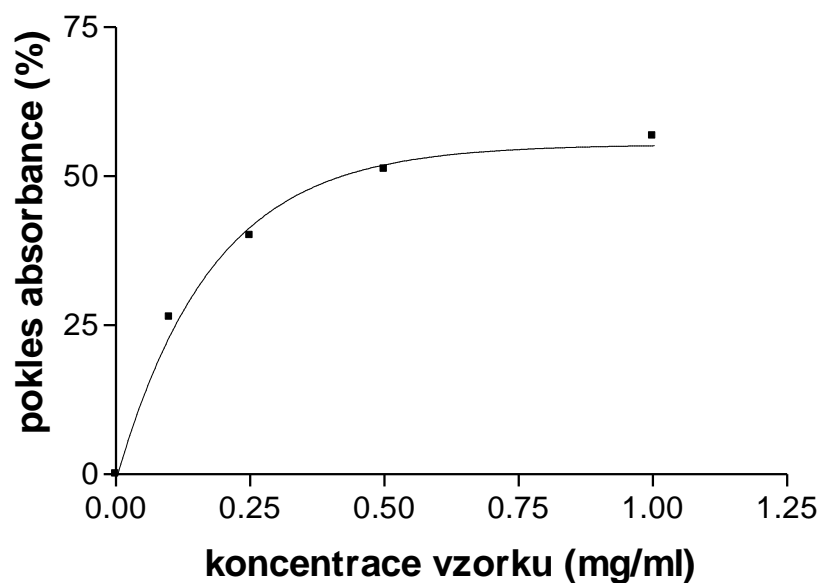
$EC_{50} > 1 \text{ mg/ml}$

Tab.7 Chloroformový podíl frakce č.2

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,3963	0,3797	0,3873	0,3878		
vzorek 1mg/ml	0,1755	0,16	0,1682	0,1679	43,2955	56,7045
vzorek 0,5 mg/ml	0,2033	0,1854	0,1796	0,1894	48,8396	51,1604
vzorek 0,25 mg/ml	0,2444	0,2279	0,2252	0,2325	59,9536	40,0464
vzorek 0,1 mg/ml	0,2902	0,2843	0,2825	0,2857	73,672	26,328

$EC_{50} = 0,41 \text{ mg/ml}$

Chloroformový podíl fr.2



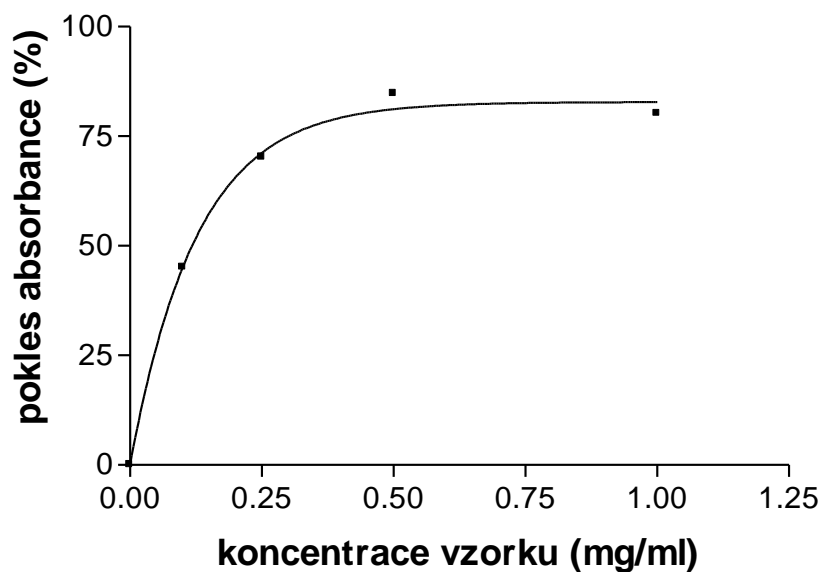
Graf.1

Tab.8 Chloroformový podíl frakce č.3

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,3963	0,3797	0,3873	0,3878		
vzorek 1mg/ml	0,0753	0,0792	0,0766	0,077	19,8556	80,1444
vzorek 0,5 mg/ml	0,0646	0,0541	0,0593	0,0593	15,2914	84,7086
vzorek 0,25 mg/ml	0,1354	0,1042	0,1068	0,1155	29,7834	70,2166
vzorek 0,1 mg/ml	0,2237	0,2069	0,2083	0,213	54,9252	45,0748

$EC_{50} = 0,118 \text{ mg/ml}$

Chloroformový podíl fr.3



Graf.2

Tab.9 Chloroformový podíl (celkový)

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,3963	0,3797	0,3873	0,3878		
vzorek 1mg/ml	0,5258	0,5713	0,5381	0,5451		
vzorek 0,5 mg/ml	0,3195	0,3107	0,3191	0,3164	81,5884	18,4116
vzorek 0,25 mg/ml	0,2907	0,2923	0,2897	0,2909	75,0129	24,9871
vzorek 0,1 mg/ml	0,3285	0,3224	0,3215	0,3241	83,574	16,426

EC₅₀ > 1 mg/ml

Tab.10 Butanolový podíl

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,3963	0,3797	0,3873	0,3878		

vzorek 1mg/ml	0,3184	0,314	0,3154	0,3159	81,4595	18,5405
vzorek 0,5 mg/ml	0,3321	0,3222	0,3245	0,3263	84,1413	15,8587
vzorek 0,25 mg/ml	0,3518	0,3401	0,3455	0,3458	89,1697	10,8303
vzorek 0,1 mg/ml	0,3535	0,3516	0,3529	0,3527	90,9489	9,0511

$EC_{50} > 1 \text{ mg/ml}$

Tab.11 Vodný podíl

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,3963	0,3797	0,3873	0,3878		
vzorek 1mg/ml	0,3449	0,344	0,3386	0,3425	88,3188	11,6812
vzorek 0,5 mg/ml	0,3501	0,3476	0,3146	0,3374	87,0036	12,9964
vzorek 0,25 mg/ml	0,3513	0,3514	0,3507	0,3511	90,5364	9,4636
vzorek 0,1 mg/ml	0,3509	0,3521	0,3553	0,3528	90,9747	9,0253

$EC_{50} > 1 \text{ mg/ml}$

Tab.12 Frakce č.4 (orientační sloup. chromatografie buthanolového podílu)

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	průměr	X	100-X
DPPH	0,3963	0,3797	0,3873	0,3878		
vzorek 1mg/ml	0,3396	0,3438	0,3357	0,3397	87,5967	12,4033
vzorek 0,5 mg/ml	0,3411	0,3383	0,3333	0,3376	87,0552	12,9448
vzorek 0,25 mg/ml	0,3385	0,343	0,3372	0,3396	87,5709	12,4291
vzorek 0,1 mg/ml	0,3389	0,3391	0,3399	0,3393	87,4936	12,5064

$EC_{50} > 1 \text{ mg/ml}$

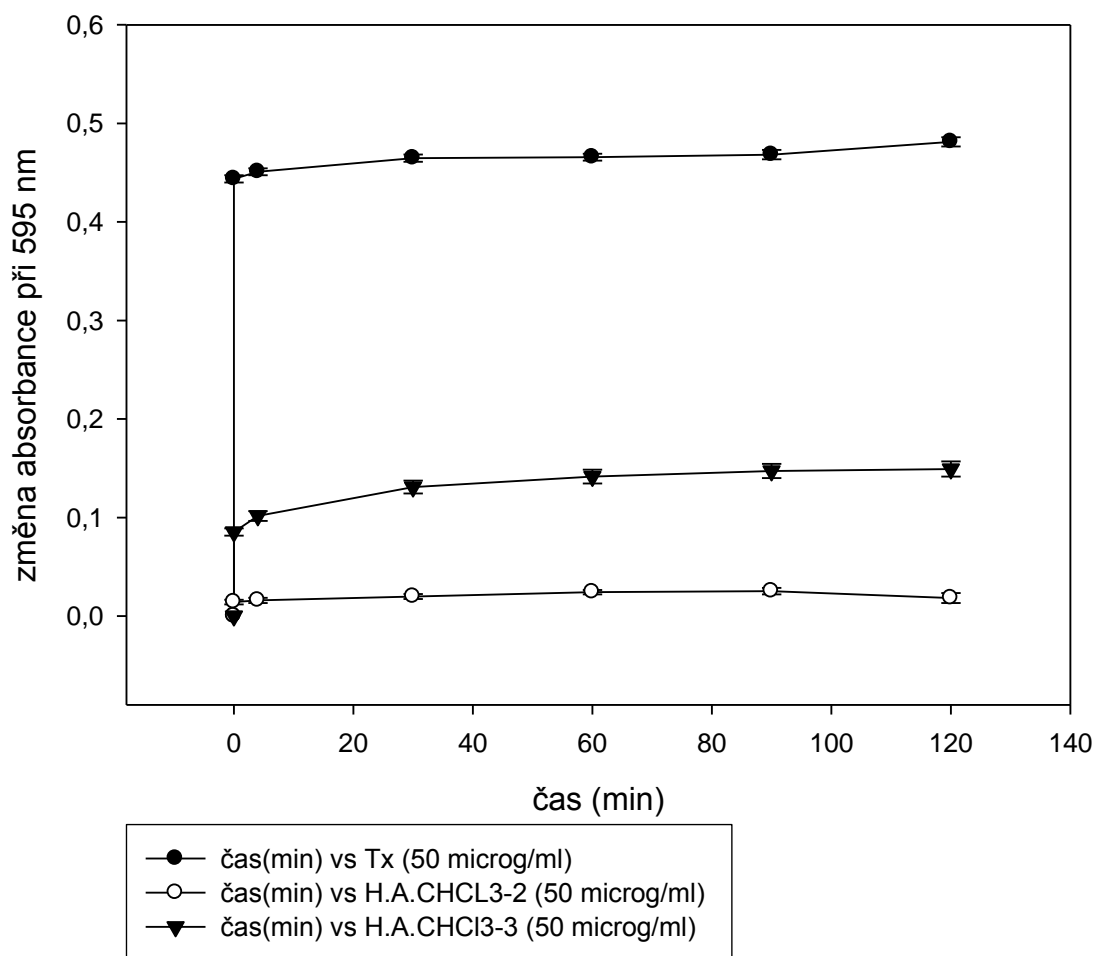
Významnou antioxidační aktivitu má frakce č.2 chloroformového podílu ($EC_{50} = 0,41 \text{ mg/ml}$) a frakce č.3 chloroformového podílu ($EC_{50} = 0,118 \text{ mg/ml}$).

4.1.2 Metoda FRAP (*ferric reducing antioxidant power*)

Testování antioxidační aktivity metodou FRAP bylo provedeno u frakce 2 a frakce 3 chloroformového podílu. U frakce 2 byla naměřena aktivita velmi nízká, u frakce 3 byla naměřena aktivita po 4 min 6x nižší než u Troloxu.

Tab.13 Změna absorbance za čas za přítomnosti frakce č.2 a č.3 chloroformového podílu.

Vzorek no.	FRAP value 4 min (μM)	FRAP value 60 min (μM)
Frakce č.2	0	2,7
Frakce č.3	2,5	3,8
Trolox	16,7	18,16



Graf.3

4.2 Stanovení akutní toxicity

4.2.1 Referenční látka

Navážka 2,2008 g tetrahydrátu chloridu manganatého byla přenesena do 25ml odměrné baňky, rozpuštěna v malém množství destilované vody a roztok byl doplněn po rysku. Tak byl získán základní roztok o koncentraci 0,445 mol/l.

Základní roztok byl pak zředěn způsobem uvedeným v teoretické části. Bylo připraveno šest pracovních roztoků, ve kterých byli červi exponováni.

Tab.14 Referenční látka

Ředění	Koncentrace (g/ml)	Počet nehybných červů po 3 min. expozice	Počet nehybných červů po 1min v pitné vodě
Základní roztok	0,088	6, 6, 6	6, 6, 6
1. ředění	0,0697	6, 6, 6	6, 6, 6
2. ředění	0,0552	6, 6, 6	6, 6, 6
3. ředění	0,0437	6, 6, 6	6, 6, 6
4. ředění	0,0346	6, 6, 5	4, 4, 3
5. ředění	0,0274	1, 2, 1	0, 1, 0
6. ředění	0,0217	0, 0, 0	0, 0, 0

Výpočet EC₅₀:

1. měření

$$\log EC_{50} = \log D_A + d (f + 1)$$

$$\log EC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,33333 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0296 \text{ g/ml}$$

2. měření

$$\log EC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,16667 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0285 \text{ g/ml}$$

3. měření

$$\log EC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,5 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0308 \text{ g/ml}$$

Průměrná hodnota EC_{50} :

$$EC_{50} = 0,0296 \text{ g/ml}$$

Interval spolehlivosti EC_{50} pro 95% pravděpodobnost:

$$L_{1,2} = \log EC_{50} \pm 2\sigma_f d$$

$$L_{1,2} = -1,5287 \pm 0,0414$$

$$EC_{50} = 0,0296 (0,0269 - 0,00326) \text{ g/ml}$$

Výpočet LC_{50} :

1. měření

$$\log LC_{50} = \log D_A + d (f + 1)$$

$$\log LC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,83333 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0333 \text{ g/ml}$$

2. měření

$$\log LC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (0,66667 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0320 \text{ g/ml}$$

3. měření

$$\log LC_{50} = \log 0,0217 + 0,1013 (1 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0346 \text{ g/ml}$$

Průměrná hodnota:

$$LC_{50} = 0,0333 \text{ g/ml}$$

Interval spolehlivosti LC_{50} pro 95% pravděpodobnost:

$$L_{1,2} = -1,4776 \pm 0,0475$$

$$LC_{50} = 0,0333 (0,0298 - 0,0371)$$

4.2.2 Zkoumaná látka

Byl připraven základní roztok zkoumané látky o koncentraci 0,1 g/ml. Základní roztok byl pak ředěn způsobem uvedeným v teoretické části. Ředění bylo prováděno dokud nitěnky reagovaly na roztok. Byl testován sumární dichlormethanový extrakt (viz. diplomová práce), který se však ani po přidání 2% dimethylsulfoxidu (DMSO) úplně nerozpustil ve vodě a vznikla suspenze, která byla testována. Dále byl testován vodný podíl a butanolový podíl.

Tab.15 Butanolový podíl

Ředění	Koncentrace g/ml	Počet nehybných nitěnek po 3 min. expozice	Počet nehybných nitěnek po 1 min. v pitné vodě
Základní roztok	0,1	6, 6, 6	6, 6, 6
1. ředění	0,075	6, 6, 6	6, 6, 6
2. ředění	0,0563	6, 6, 6	6, 6, 6
3. ředění	0,0422	6, 6, 6	6, 6, 6
4. ředění	0,0316	6, 6, 6	6, 6, 4
5. ředění	0,0237	4, 4, 5	4, 2, 3
6. ředění	0,0178	4, 4, 3	4, 3, 3
7. ředění	0,0134	3, 2, 1	1, 3, 3
8. ředění	0,0101	2, 0, 0	0, 0, 3
9. ředění	0,0076	0, 0, 0	0, 0, 0

Výpočet EC_{50} :

1. měření

$$\log EC_{50} = \log D_A + d (f + 1)$$

$$\log EC_{50} = \log 0,0076 + 0,1235 (1 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0134 \text{ g/ml}$$

2. měření

$$\log EC_{50} = \log 0,0076 + 0,1235 (0,75 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0125 \text{ g/ml}$$

3. měření

$$\log EC_{50} = \log 0,0076 + 0,1235 (1 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0134 \text{ g/ml}$$

Průměrná hodnota EC_{50} :

$$EC_{50} = 0,0131 \text{ g/ml}$$

Interval spolehlivosti EC_{50} pro 95% pravděpodobnost:

$$L_{1,2} = -1,8827 \pm 0,1103$$

$$EC_{50} = 0,0131 (0,0102 - 0,0169)$$

Výpočet LC_{50} :

1. měření

$$\log LC_{50} = \log 0,0076 + 0,1235 (1 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0134 \text{ g/ml}$$

2. měření

$$\log LC_{50} = \log 0,0076 + 0,1235 (1 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0134 \text{ g/ml}$$

3. měření

$$\log LC_{50} = \log 0,0076 + 0,1235 (1 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0134 \text{ g/ml}$$

Průměrná hodnota LC_{50} :

$$LC_{50} = 0,0134 \text{ g/ml}$$

Interval spolehlivosti LC_{50} pro 95% pravděpodobnost:

$$L_{1,2} = -1,8722 \pm 0,1632$$

Hodnota LC_{50} a v závorce intervaly spolehlivosti pro 95% pravděpodobnost u butanolového podílu:

$$LC_{50} = 0,0134 (0,0092 - 0,0195) \text{ g/ml}$$

Tab.16 Vodný podíl

Ředění	Koncentrace g/ml	Počet nehybných nitěnek po 3 min. expozice	Počet nehybných nitěnek po 1 min. v pitné vodě
Základní roztok	0,1	5, 4, 5	5, 4, 5
1. ředění	0,075	5, 5, 3	5, 4, 4
2. ředění	0,0563	1, 0, 1	1, 1, 0
3. ředění	0,0422	0, 0, 0	0, 0, 0

Výpočet EC_{50} :

1. měření

$$\log EC_{50} = \log D_A + d (f + 1)$$

$$\log EC_{50} = \log 0,0422 + 0,1252 (0,6 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0669 \text{ g/ml}$$

2. měření

$$\log EC_{50} = \log 0,0422 + 0,1252 (1 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0751 \text{ g/ml}$$

3. měření

$$\log EC_{50} = \log 0,0422 + 0,1252 (1 + 1)$$

$$EC_{50} = 0,0751 \text{ g/ml}$$

Průměrná hodnota EC_{50} :

$$EC_{50} = 0,0724 \text{ g/ml}$$

Interval spolehlivosti EC_{50} pro 95% pravděpodobnost:

$$L_{1,2} = -1,1403 \pm 0,0792$$

$$EC_{50} = 0,0724 (0,0603 - 0,0869)$$

Výpočet LC_{50} :

1. měření

$$\log LC_{50} = \log 0,0422 + 0,1252 (0,6 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0669 \text{ g/ml}$$

2. měření

$$\log LC_{50} = \log 0,0422 + 0,1252 (1 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0751 \text{ g/ml}$$

3. měření

$$\log LC_{50} = \log 0,0422 + 0,1252 (1 + 1)$$

$$LC_{50} = 0,0751 \text{ g/ml}$$

Průměrná hodnota LC_{50} :

$$LC_{50} = 0,0724 \text{ g/ml}$$

Interval spolehlivosti LC_{50} pro 95% pravděpodobnost:

$$L_{1,2} = -1,1403 \pm 0,0842$$

Hodnota LC_{50} a v závorce intervaly spolehlivosti pro 95% pravděpodobnost u vodného podílu:

$$LC_{50} = 0,0724 (0,0596 - 0,0879) \text{ g/ml}$$

Po provedeném výpočtu nám vyšla u butanolového podílu hodnota pro efektivní koncentraci 0,0131 g/ml a pro letální koncentraci 0,0134 g/ml. Sumární dichlormethanový extrakt nevykázal v tomto testu akutní toxicitu. U sumárního extraktu se objevil jen zpomalený pohyb červů *Tubifex tubifex*, je možné, že výsledek provedeného testu byl ovlivněn tím, že měřený roztok byl ve formě suspenze. Efektivní koncentrace u vodného podílu byla 0,0724 g/ml a letální koncentrace 0,0724 g/ml.

4.2 Stanovení antimykotické aktivity

Provedeno na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Tab.17

KMEN (kód)		Testovaná látka		
		CH ₂ Cl ₂	H	BuOH
CA	24h	>256	32	>256
	48h	>256	32	>256
CT	24h	>256	64	>256
	48h	>256	64	>256
CK	24h	>256	16	>256
	48h	>256	32	>256
CG	24h	>256	64	>256
	48h	>256	64	>256
TB	24h	>256	32	>256
	48h	>256	64	>256
AF	24h	>256	32	>256
	48h	>256	32	>256
AC	24h	>256	64	>256
	48h	>256	128	>256
TM	72h	64	32	32
	120h	64	32	64

Významnou antimykotickou aktivitu vykazoval ethanolový extrakt.

IV. DISKUSE, VÝSLEDKY

Cílem této rigorózní práce bylo pokusit se izolovat flavonoidy podle španělských autorů A.F. Maciase, A. Torrese, J.M.G. Molinilliho, popř. jiné látky z listů slunečnice roční.

Ve druhé části práce jsem se zabývala hodnocením biologické aktivity získaných extraktů a frakcí.

Pro izolaci flavonoidů použili španělští autoři tento postup: listy slunečnice (1,7 kg) byly máčeny ve vodě (rostlina : rozpouštědlo 1 : 3) po 24 hod, při teplotě 25 °C a ve tmě. Vodný extrakt byl reextrahován 8x1,0 l dichlormethanu pro každý 1,2 l vody. Kombinovaný extrakt byl sušen nad síranem sodným a odpařen ve vakuu. Takto bylo získáno 24 g surového extraktu, který byl dělen na sloupci silikagelu, mobilní fází byla směs n-hexan-ethylacetát stoupající polarity. Bylo získáno 192 frakcí po 50 ml, které byly redukovány na 30 frakcí po srovnání pomocí TLC. Středně polární frakce byla chromatograficky dělena na silikagelu a eluována hexan : aceton (7 : 3) a hexan : aceton (6 : 4) a pak znovu dělena pomocí HPLC, kde mobilní fází byla směs hexan : aceton (6 : 4). Takto byly získány: **tambulin** (4 mg), **kukulkanin B** (6 mg), **heliannon A** (5 mg), **heliannon B** (5 mg), **heliannon C** (3 mg).³⁶

Podle tohoto článku jsme i my připravili vodný extrakt z listů *H. annuus* zpracováním 500 g usušených listů slunečnice. Tak bylo získáno 1650 ml extraktu. Část vodného extraktu byla vytřepána dichlormethanem. Po vytřepání se vytvořily dvě vrstvy: vodná tmavě zelená až černá a žlutohnědá „gelovitá“ dichlormethanová vrstva. Dichlormethanová vrstva byla vytřepána chloroformem 1:1. Většina „gelovité“ hmoty se rozpustila v chloroformu. Po filtraci přes uhličitan draselný bylo získáno 1600 ml chloroformového podílu. Po odpaření chloroformu bylo získáno 0,1341 g suchého extraktu.

Byla snaha vyhnout se vzniku husté „gelovité“ hmoty, jejíž vznik v článku nebyl popsán, proto byl zvolen jiný postup, kde vodný extrakt byl místo dichlormethanem vytřepán chloroformem, ale i tak jsme nezabránili vzniku této husté hmoty. Chloroformová vrstva byla vytřepána chloroformem 1:1. Po filtraci bylo získáno 6065 ml. Po odpaření chloroformu bylo získáno 0,2919 g suchého extraktu.

Tento extrakt byl spojen s 0,1341 g extraktu z postupu A. Celkem bylo získáno 0,426 g chloroformového podílu. Tento podíl byl rozpuštěn v ethanolu. Vznikly bílé krystalky, které se žiháním na měděné kopistce neměnily, ani se nerozpustily v chloroformu. Proto jsme usoudili, že je to uhličitan draselný, který byl použit na

odstranění vody z tohoto extraktu. Uhličitan draselný byl odfiltrován. Po filtraci a odpaření ethanolu bylo získáno 0,255 g chloroformového podílu.

Následovalo dělení tohoto podílu na sloupci Sephadexu. Kolona byla vymývána methanolem (250 ml). Extrakt byl rozdělen na tři frakce, extrakt se na tomto sloupci nedělil dostatečně.

Byla provedena TLC, kde byla nanášena frakce č.2 a standardy flavonoidů (galangin, kvercetin, rutin, naringenin, hypericin, kyselina kávová). Jako mobilní fázi jsme použili nejprve: ethylacetát-kyselina mravenčí-kyselina octová-voda 100:11:11:27, tato soustava však nebyla vhodná, některé flavonoidy zůstaly na startu. Dále jsme vyzkoušeli soustavu toluen-ethylacetát 93:7, avšak ani tato soustava nebyla vhodná. Jako nejvhodnější se jevila soustava toluen-mravenčan ethylnatý-kyselina mravenčí 5:3,5:1,5. Frakce č.2 neobsahovala žádný z těchto flavonoidů, ale pod UV-366 byly vidět 2 intenzivně fluoreskující skvrny. Proto byla provedena preparativní TLC. 0,120 g frakce č.2 bylo nanášeno na 10 silufolových desek. Mobilní fázi byla směs chloroform-methanol 7:3. Po vyvinutí chromatogramu byly desky shlédnuty pod UV-366. Desku jsme rozdělili na 4 zóny. 1. zóna obsahovala látky, které zůstaly na startu a v jeho okolí. 2. zóna obsahovala intenzivně fluoreskující látku, stejně tak 3. zóna, která byla těsně nad 2. zónou. 4. zóna obsahovala látky, které byly v čele chromatogramu.

Dále jsme se zabývali zónou č.2 a 3, které obsahovaly po jedné látce. Tyto zóny byly vystříhány a roztříhány na malé kousky a vymyty chloroformem. Stejný postup byl proveden i u 1. zóny, ale ta obsahovala více látek. Po vymytí silufolových desek chloroformem a následné filtraci, byl odpařen chloroform a bylo získáno:

Z 1. zóny: 0,0064 g

Z 2. zóny: 0,0025 g

Z 3. zóny: 0,0022 g

Byla provedena TLC. Mobilní fázi byla směs chloroform-ethanol 98:2. Zjistili jsme, že zóna 2 a 3, které byly těsně pod sebou obsahují stejnou látku. Proto byly spojeny a poslány na NMR analýzu. 1. zónou jsme se dále nezabývali, protože obsahovala více látek a další dělení nemohlo být provedeno, protože bylo získáno malé množství.

Byla spojena vodná vrstva po třepání dichlormethanem (380 ml), vodná vrstva po třepání chloroformem (1075 ml), dichlormethanová vrstva (155 ml) a horní chloroformová vrstva (280 ml). Celkem bylo získáno 1890 ml.

Tento podíl byl vytřepán butanolem 1:1.

Po odpaření butanolu bylo získáno 14,2601 g suchého extraktu.

0,25 g butanolového podílu bylo děleno na sloupci Sephadexu. Kolona byla vymývána methanolem (200 ml). Extrakt se na této koloně nedělil.

Byla provedena orientační sloupcová chromatografie butanolového podílu na sloupci silikagelu. Kolona byla vymývána nejprve chloroformem, postupně byl přidáván ethanol. Bylo získáno devět frakcí.

Byla provedena TLC těchto frakcí, mobilní fází byla směs CHCl_3 -EtOH 1:1. Frakce č.1 vznikla jímáním žlutozeleného proužku, který se vytvořil při dělení. Ve frakcích č.3 a 4 se vytvořily drobné krystalky. Z frakce č.4 bylo odpařeno rozpouštědlo a u extraktu byla hodnocena antioxidační aktivita. Krystalky ve frakci č.3 jsme se snažili přecistit promýváním chloroformem, avšak krystalky se rozptýlily a zmenšily. Po přidání ethanolu téměř zmizely. Proto byla tato frakce opět zakoncentrována a uložena do lednice, aby se opět vytvořily krystaly. Po provedení TLC na chromatogramu frakce č.1 byla pouze jedna skvrna. Proto byla tato frakce zaslána na GC analýzu. Frakce č.1 obsahovala směs mastných kyselin. Většina měřených mastných kyselin je se středním řetězcem a na jejich konkretizaci nebyly standardy (vypadají jako MCFA-middle chain fatty acids-nenasycené, jejich retenční čas neodpovídá nasyceným).

Po zkušebním dělení bylo 5,0 g butanolového podílu bylo děleno na sloupci silikagelu. Bylo odebráno 43 frakcí.

V těchto frakcích byla provedena detekce na steroly, steroidy, triterpeny, cukry, terpeny a laktony. Ve všech frakcích byly tyto látky detekovány. Detekce na laktony se nezdařila.

Ve druhé části rigorózní práce bylo provedeno biologické hodnocení získaných extraktů. Byla hodnocena antioxidační aktivita metodou sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu u frakce č.1, 2, 3 chloroformového podílu, sumárního chloroformového podílu, butanolového podílu, vodného podílu a frakce č.4 butanolového podílu. Významnou antioxidační aktivitu má frakce č.2 chloroformového podílu ($\text{EC}_{50} = 0,41 \text{ mg/ml}$) a frakce č.3 chloroformového podílu ($\text{EC}_{50} = 0,118 \text{ mg/ml}$).

Test na antioxidační aktivitu (FRAP metoda) byl proveden u frakce 2 a frakce 3 chloroformového podílu, u frakce 2 byla naměřena aktivita velmi nízká, u frakce 3 byla naměřena aktivita po 4 min 6x nižší než u Troloxu.

Byla hodnocena akutní toxicita sumárního dichlormethanového extraktu (viz. diplomová práce), který se však ani po přidání dimethylsulfoxidu úplně nerozpustil ve vodě a vznikla suspenze, která byla testována. Dále byl testován vodný podíl a butanolový podíl.

Po provedeném výpočtu nám vyšla u butanolového podílu hodnota pro efektivní koncentraci 0,0131 g/ml a pro letální koncentraci 0,0134 g/ml. Sumární dichlormethanový extrakt nevykázal v tomto testu akutní toxicitu. U sumárního extraktu se objevil jen zpomalený pohyb červů *Tubifex tubifex*, je možné, že výsledek provedeného testu byl ovlivněn tím, že měřený roztok byl ve formě suspenze. Efektivní koncentrace u vodného podílu byla 0,0724 g/ml a letální koncentrace 0,0724 g/ml.

Byla testována antimykotická aktivita dichlormethanolového extraktu (viz. Diplomová práce), ethanolového extraktu (viz. Diplomová práce) a butanolového extraktu. Významnou antimykotickou aktivitu vykazoval ethanolový extrakt.

Ethanolový extrakt se z hlediska biologické aktivity projevil jako nejperspektivnější (pozitivní výsledky vykázal při testování antifungální aktivity na všech testovaných kmenech a při *in vitro* testech na antioxidační aktivitu v obou metodách). Bude proto dělen sloupcovou chromatografií pro získání obsahových látek polárního charakteru, které bude naší snahou identifikovat.

Extrakt i jeho frakce bude podroben dalšímu testování, včetně testu na fototoxicitu na nižších organismech (*Tubifex tubifex* a *Artemia salina*).

V. SOUHRN

První část naší práce směřovala k izolaci flavonoidů z listů *H. annuus*. Byl připraven vodný extrakt pomocí macerace listů, který byl dále zpracován – vytřepání pomocí dichlormethanu, dělení na silikagelu, izolace látek pomocí preparativní chromatografie. Podařilo se získat čistou látku, která je dána k identifikaci pomocí NMR analýzy. Získaný butanolový podíl bude dále zpracováván.

Druhá část práce byla zaměřena na hodnocení biologické aktivity extraktů a frakcí. Byly provedeny testy na akutní toxicitu, testy na antioxidační aktivitu (DPPH test, FRAP metoda) a test na antimykotickou aktivitu. Ethanolový extrakt vykázal pozitivní výsledky ve všech použitých testech a jeví se tedy jako nejperspektivnější.

First part of our work aimed to isolate flavonoids from leaves of *H. annuus*. The leaves were macerated and the resulting water extract was further processed – shaking using dichloromethane, separation on silica gel, isolation of substances using preparative chromatography. We managed to obtain pure substance which was submitted for identification using NMR analysis. Obtained butanol fraction will be further processed.

Second part of our work focused on the assessment of biological activity of extracts and fractions. Acute toxicity tests, antioxidant activity tests (DPPH test, FRAP method) and antimycotic activity test were carried out. The ethanol extract showed positive results in all applied tests and appears to be the most promising.

VI.LITERATURA

1. Novosadová, Z.: Diplomová práce-Fytochemický výzkum listů *Helianthus annuus*.2006,s.12
2. http://www.slunecnice.cz/text/slunecnice_rocni.html
3. <http://botanika.wendys.cz/kytky/K385.php>
4. <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id14871>
5. Ukiya, M., Akihisa, T., Tokuda, H. et al: Isolation, Structural Elucidation and Inhibitory Effects of Terpenoid and Lipid Constituents from Sunflower Pollen on Epstein-Barr Virus Early Antigen Induced by Tumor Promoter, TPA. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol.51, 2003, pp. 2949-2957
6. Spring, O., Albert,K., Gradmann, W.: Annuithrin, a new biologically aktive germacranolide from *Helianthus annuus*. Phytochemistry, Vol. 20, No. 8, 1981, pp. 1883-1885
7. Alfatafta, A.A., Mullin, A.CH.: Epicuticular Terpenoids and an Auroře from Flowers of *Helianthus annuus*. Phytochemistry, Vol. 31, No. 12, 1992, pp. 4109-4113
8. Pyrek, J.St.: New pentacyclic diterpene acid Trachyloban-19-oic acid from sunflower. Tetrahedron, Vol. 26, 1970, pp. 5029-5032
9. Jahodář, L., Klečáková, J.: Toxicita hvězdicovitých s přihlédnutím k farmaceuticky významným druhům. Chemické listy 93, 1999, s. 320-326
10. Macias, A.F., Varela, M.R., Torres, A., Molinillo, J.M.G.: Heliespirene A. The First Member of a Novel Family of Bioactive Sesquiterpenes. Tetrahedron Letters 39, 1998, pp. 427-430
11. Macias, A.F., Molinillo, J.M.G, Varela, R.M., Torres, A.: Structural Elucidation and Chemistry of a Novel Family of Bioactive Sesquiterpenes: Heliannuols. J.Org.Chem., Vol. 59, No. 26, 1994, pp. 8261-8266
12. Pyrek, J.St.: Neutral Diterpenoids of *Helianthus annuus*. Journal of Natural Products, Vol. 47, No. 5, 1984, pp. 822-827
13. Satoh, A., Utamura, H., Ishizuka, M. et al: Antimicrobial Benzopyrans from the Receptacle of Sunflower. Bioscience, Biotechnology, Biochemistry, Vol. 60, 1996, pp. 664-665
14. Ukiya, M., Akihisa, T., Tokuda, H. et al: Sunpollenol and Five Other Rearranged 3,4-*seco*-Tirucallane-Type Triterpenoids from Sunflower Pollen and Their Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation. Journal of Natural Products, Vol. 66, No. 11, 2003, pp.1476-1479

15. Macias, A.F., López, A., Varela, M.R. et al: Bioactive apocarotenoids annuionones F and G: structural revision of annuionones A, B and E. *Phytochemistry*, Vol. 65, No. 22, 2004, pp.3057-3063
16. Bader, G., Zieschang, M., Wagner, K. et al: New triterpenoids saponins from *Helianthus annuus*. *Planta Med.*, Vol. 57, 1991, pp.471-474
17. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Giberelin>
18. Owen, D.J., Mander, L.N., Gaskin, P., Macmillan, J.: Synthesis and Confirmation of Structure of Three 13,15 β -dihydroxy C-20 Gibberellins, GA₁₀₀, GA₁₀₁ and GA₁₀₂, Isolated from the Seeds of *Helianthus annuus* L. *Phytochemistry*, Vol. 42, No. 4, 1996, pp.921-925
19. Hutchison, M., Gaskin, P., MacMillan, J., Phinney, B.O.: Gibberellins in seeds of *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, Vol. 27, No. 8, 1988, pp.2695-2701
20. Castellaro, J.S., MacMillan, J., Singh, A.K., Willis, Ch.L.: Preparation and occurrence of gibberellins A₇₅ and A₇₆ and 3-epi-A₇₂. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, Vol. 1, 1990, pp.145-152
21. Takikawa, H., Isono, K., Sasaki, M. et al: Synthesis and structural revision of annuionon A. *Tetrahedron Letters*, Vol. 44, No. 37, 2003, pp.7023-7025
22. Bader, G., Plohmann, B., Hiller, K., Franz, G.: Cytotoxicity of triterpenoid saponins. *Pharmazie*, Vol. 51, 1996, pp.414-417
23. Morris, B.D., Foster, S.P., Grugel, S. et al: Isolation of the Diterpenoids, *Entkauran-16 α -ol*, from Sunflowers, as Oviposition Stimulants for the Banded Sunflower Moth, *Cochylis hospes*. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 31, No. 1, 2005, pp.89-100
24. Picman, A.K., Schneider, E.F., Gershenzon, J.: Antifungal activities of sunflower terpenoids. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 18, No. 5, 1990, pp.325-328
25. Ghisalberti, E.L.: The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia*, Vol. 68, No. 4, 1997, pp.303-320
26. Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy*, No. 98, 2004, s.174-179
27. <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id>
28. Skála, P.: Diplomová práce – Stanovení antioxidační aktivity látek metodou sekvenční injekční analýzy (SIA) se spektrofotometrickou detekcí. 2003, s.45-49

29. Firuzi, O., Lacanna, A., Petráčci, R. et al: Evaluation of the antioxydant aktivitty of flavonoids by „ferric reducing antioxydant power“ essay and vycliv voltammery. *Biochimica et Biophysica Acta* 1721, 2005, pp.174-184
30. http://www.kbi.zcu.cz/studium/invert/skri/w_anne.htm
31. Tichý, M., Rucki, M.: Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*. *Pracovní lékařství*, 48, 1996, No. 6, s. 225-230
32. Sedlák, E.: *Zoologie bezobratlých*. Masarykova univerzita Brno, 2003, s.71
33. Seifertová, I., Baloun, J.: *Farmaceutická botanika, systematika*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1990, s.140-143
34. Baloun, J., Beneš, J., Minařík, J.: *Farmaceutická botanika*, Avicenum 1978, s.257
35. Lábler, L., Schwarz, V.: *Chromatografie na tenké vrstvě*. Nakladatelství ČSAV Praha, 1965, s.283
36. Macias, A.F., Molinillo, J.M.G., Torres, A.: Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry*, Vol. 45, No. 4, 1997, pp.683-687
37. Hubík, J.: *Obecná farmakognosie II. Sekundární látky*. 3. vydání, Praha, SPN, 1989, s.31, 33
38. Hrdina, V., Hrdina, R., Jahodář, L.: *Přírodní toxiny a jedy*. Galén, 2004, s.21, 22
39. Middleton, E.: Biological Properties of Flavonoids: An Overview. *International Journal of Pharmacognosy*, Vol. 34, No. 5, 1996, pp.344-348
40. <http://faf.vfu.cz/html/txts/seskviterpeny.html>
41. Karlíček, R. a kol.: *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha, Nakladatelství Karolinum, 2001, ISBN 80-246-0348-9, s.266, 267
42. Opletal, L., Drašar, P.: *Fytochemické metody*. 1. Izolace obsahových látek (laboratorní technika). Karolinum, Praha, 1994, ISBN 382-110-94
43. Karlíčková, J.: Ústní sdělení
44. Řeháková, Z., Karlíčková, J., Jahodář, L., Kolečkar, V., Dresler, J., Novosadová, Z.: Pharmacognostic Study of *Helianthus annuus* L. in Abstract book (ISBN 3-89703-685-1), pp. 107, B017
45. Jahodář, L., Řeháková, Z., Pour, M., Opletal, L.: Phytochemical study of *Helianthus Annuus* L. Phytochemicals and their biological activity. *Pacificchem 2005, Int. Chem Congr., Honolulu, Hawaii, Dec. 15-20*. Abstr on CD, Agro 165

46. Dejian Huang, et. Al. Review, J. Agric. Food Chem.,Vol. 53, (2005), 1841-1856