

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

---

DIPLOMOVÁ PRÁCE

PODOFYLOTOXIN V JALOVCI VIRGINSKÉM  
(*JUNIPERUS VIRGINIANA*)



Vedoucí katedry: doc. Ing. Kateřina Macáková, Ph.D.

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Hradec Králové, květen 2020

Jiří Olšar

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Jiří Olšar

## Poděkování

Především bych chtěl poděkovat doc. PharmDr. Tomáši Siatkovi, CSc. za pomoc a odborné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za analýzu vzorků.

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Cíl práce .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Teoretická část.....</b>	<b>7</b>
3.1 ROD JALOVEC .....	7
3.2. JALOVEC VIRGINSKÝ .....	7
3.2.1. Botanický popis rostliny .....	7
3.2.2. Původ a výskyt.....	8
3.2.3. Obsahové látky.....	8
3.2.4. Využití.....	9
3.3. OSTATNÍ DRUHY JALOVCE .....	9
3.3.1. <i>Juniperus communis</i> L. – jalovec obecný .....	9
3.3.2. <i>Juniperus sabina</i> L. – jalovec chvojka.....	9
3.3.3. <i>Juniperus chinensis</i> L. – jalovec čínský .....	10
3.3.4. <i>Juniperus oxycedrus</i> L. – jalovec červený .....	10
3.4. LIGNANY .....	10
3.4.1. Charakteristika a rozdělení .....	10
3.4.2. Lignany v rostlinách.....	11
3.4.3. Lignany u živočichů.....	12
3.4.4. Podofylotoxin.....	13
3.4.4.1. Biosyntéza .....	13
3.4.4.2. Biologická aktivita .....	14
3.4.4.3. Mechanismus účinku.....	15
3.4.4.4. Vztah mezi strukturou a účinkem.....	16
3.4.4.5. Podofylotoxin v různých druzích jalovce.....	17
<b>4. Experimentální část.....</b>	<b>19</b>
4.1. Přístroje.....	19

4.2. Chemikálie.....	19
4.3. Rostlinný materiál.....	20
4.4. Extrakční postupy .....	20
4.5. Stanovení podofylotoxinu.....	21
4.6. Statistické zpracování .....	22
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>23</b>
<b>6. Diskuze .....</b>	<b>33</b>
<b>7. Závěr.....</b>	<b>37</b>
<b>8. Seznam použité literatury.....</b>	<b>38</b>
<b>Abstrakt.....</b>	<b>42</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>43</b>

# 1. Úvod

Již od dávnověku byly rostliny využívány k léčbě řady nemocí. Především v asijských zemích se o léčivé účinky rostlin i v současnosti opírá řada alternativních medicínských systémů, například tradiční čínská medicína a ájurvéda.

Přední příčky ve statistikách zabývajících se nejčastějšími příčinami úmrtí populace zauímají v současné době nádorová onemocnění. Farmaceutický výzkum po celém světě proto logicky investuje do vývoje účinných látek a hledá jejich dostupné zdroje.

Často v tomto směru skloňovanou účinnou látkou je právě podofylotoxin, lignan, který se vyskytuje v rostlinách *Podophyllum peltatum* a *Podophyllum hexandrum*, po nichž je také pojmenován. Tradičním jeho zdrojem je pryskyřice získaná z rodu *Podophyllum* [14]. Vzhledem k omezenému množství těchto rostlin a jejich pomalému růstu hledá farmaceutický výzkum co nejefektivnější metody extrakce podofylotoxinu i z jiných zdrojů. Jako vhodný materiál pro jeho extrakci ve větším množství v rámci farmaceutického průmyslu se jeví jalovec virginský, který je široce rozšířen zejména na severní polokouli. Zajímavé jsou také jeho silice, které obsahují mnoho látek jako například monoterpeny a seskviterpeny, jež jsou zodpovědné za protizánětlivé, antimikrobiální, antifungální a antiseptické účinky. Jedná se tedy dle mého názoru o vhodnou alternativu k rostlinám rodu *Podophyllum*, které jsou dnes již tak ohroženy nadměrným sběrem. [14, 25]

Z výše uvedených důvodů jsem se zaměřil ve své práci na extrakci podofylotoxinu z jehlic jalovce virginského. Je to součást vypracování analytického postupu pro stanovení podofylotoxinu v jehličí jalovce

## **2. Cíl práce**

Cílem této práce je pilotní studie optimalizace extrakčního postupu pro stanovení obsahu podofylotoxinu v jehličí jalovce virginského.

## 3. Teoretická část

### 3.1 ROD JALOVEC

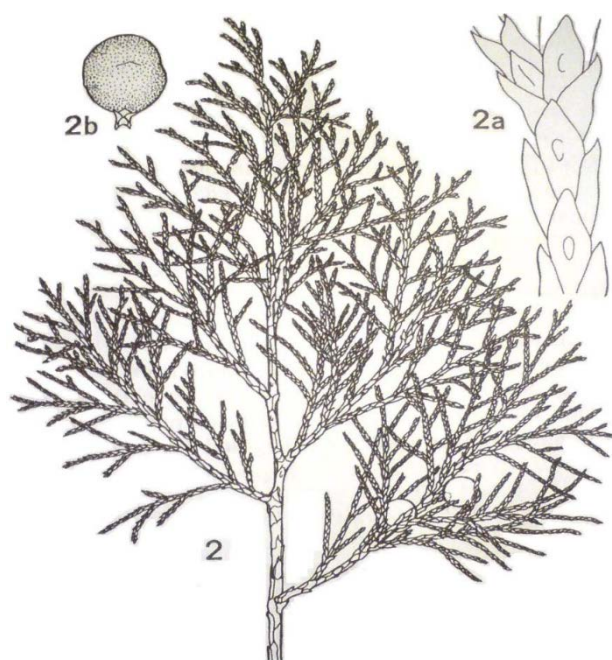
Zástupci rodu jalovec jsou keře nebo stromy, které jsou dvoudomé (řidčeji jednodomé), vždyzelené. Listy jsou jehlicovité s jedním pryskyřným kanálkem pod cévním svazkem, vstřícné nebo ve trojčetných přeslenech nebo šupinovité, křížmostojné. Samčí šištice dorůstá délky asi 5 mm a je tvořena několika přesleny šupinovitých tyčinek. Spodní tyčinky mají tři až čtyři prašná pouzdra, horní jedno až dvě. Samičí šištice dorůstají délky přibližně 2 mm, jsou tvořeny z několika přeslenů semenných šupin a pouze tři horní šupiny nesou po jednom vajíčku. Během dozrávání šupiny postupně dužnatí a srůstají v šišku, která se podobá bobuli. Jedná se však o nepravý plod, tzv. galbulus, který obsahuje jedno až šest semen. Ta jsou podlouhlá, trojhranná a bez křídel. Zpravidla obsahují dvě dělohy, zřídka čtyři až šest. Jalovec se nejčastěji vyskytuje na severní polokouli, kde lze nalézt až 60 různých druhů. Na jižní polokouli ho nalezneme pouze v horách východní Afriky. [1]

### 3.2. JALOVEC VIRGINSKÝ

#### 3.2.1. Botanický popis rostliny

*Juniperus virginiana* L. je dvoudomá dřevina z čeledi Cupressaceae (cypřišovitě). Dorůstá výšky kolem 15 metrů, koruna je kuželovitého či rozkladitého tvaru, větvičky velmi tenké, čtyřhranné. Listy jsou u mladších větví jehlicovité, zpravidla uskupené po dvou až třech. Špičatého tvaru, bělavé, na rubu zelené a 6 mm dlouhé. Listy starších větví jsou šupinovité, přibližně 2 mm dlouhé, přišpičatělé, na koncích od větvičky odstálé, s rýhovitou žlázkou. Oproti jiným druhům nemají listy po rozemnutí nepříjemný zápach. Tvoří galbuly vejcovitého až kulovitého tvaru, které dozrávají již prvním rokem. Tyto jsou temně modré a šedavě ojíněné, obsahují jen jedno až dvě semena. Borka je červenohnědé barvy a odlupuje se v úzkých podélných pruzích. [1-2]





Obrázek 1: Charakteristické znaky. 2 - větvička, 2a - detail větvičky, 2b – galbulus. [1]

### 3.2.2. Původ a výskyt

Jalovec virginský je původní rostlinou východní části Severní Ameriky, kde v oblasti mezi Hudsonovým zálivem, Floridou, Novým Mexikem a pásmem Skalnatých hor tvořil rozsáhlé porosty [1]. Kolem roku 1664 byl introdukován do Evropy a dnes roste téměř ve všech zahradách a parcích mírného pásma v mnoha kultivarech, které se liší výškou vzrůstu, tvarem koruny a barvou listů. [3-8]

### 3.2.3. Obsahové látky

Hlavní obsahovou látkou jalovce virginského je silice, která se získává ze dřeva. Její obsah se zvyšuje se stářím stromu. Starší stromy ji obsahují až 3,5 % [5]. Silice jalovce je směs až 200 látek. Je tvořená především monoterpeny a seskviterpeny a dále obsahuje: cedrol, cedren,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, thujopsen, elemol, safrol, felandren, limonen a terpinen-4-ol [7, 9]. V rostlině lze dále najít: flavonoidy, cukry, organické kyseliny, minerály a vitaminy, třísloviny, pryskyřice a lignany (především podofylotoxin,  $\alpha$ -peltatin,  $\beta$ -peltatin). [10-12, 15]

### 3.2.4. Využití

Pro jeho lososovitou barvu dřeva a charakteristickou vůni, křehkost a trvanlivost, porosty značně prořídly. Jalovcové dřevo se používalo především k výrobě tužek, nábytku, ale také k destilaci tzv. cedrového oleje (dříve se jalovci virginskému přezdívalo americký cedr) [3-5]. Na americkém území byl původními obyvateli jalovec využíván k léčbě nachlazení, bronchitidy, revmatismu, jako diaforetikum, antiparazitikum nebo k očištění organismu. Silice obsažená ve dřevě má mimo jiné antimikrobiální a repelentní účinky. Zajímavé jsou listy, které obsahují perspektivní látku podofylotoxin. [6-8]

## 3.3. OSTATNÍ DRUHY JALOVCE

### 3.3.1. *Juniperus communis* L. – jalovec obecný

Častěji se vyskytuje jako keř s válcovitou nebo pravidelně rozložitou korunou. Jehlice jsou ostře zašpičatělé, šedé až tmavozelené, uspořádané do trojčetných přeslenů. Na svrchní straně žlábkovité s bílým proužkem [1]. Je zdrojem lékopisné suroviny *Juniperi etheroleum* a *Juniperi fructus* [21]. Zralý nepravý plod obsahuje silice, pryskyřice, flavonoidy. Je široce rozšířen, vyskytuje se v jihozápadní Asii, Evropě a Severní Americe. Z farmakologické aktivity lze zmínit účinky hepatoprotektivní, protizánětlivé, antioxidační, antibakteriální, antimalarické, antihypercholesterolemické a neuroprotektivní. Má široké zastoupení v tradičním léčitelství. Jeho nepravé plody se využívají jako karminativum, diuretikum, amarum, také jako močové desinficiens. Jehlice pak jako podpůrná léčba při akutní cystitidě a zánětech močového měchýře. Kůra při edému ledvin, astmatu, při léčbě kapavky, artritidy, respiračních onemocnění, chronické pyelonefritidě, kašli a zánětech kůže. Dnes se jalovec obecný používá především jako diuretikum, avšak pro své dráždivé účinky je jeho podávání nevhodné po delší dobu a při zánětech ledvin. Dále se užívá jako stomachikum, karminativum nebo zevně při bolestech svalů a kloubů. [4, 13-14, 21]

### 3.3.2. *Juniperus sabina* L. – jalovec chvojka

Nazývaný též chvojka klášterská. Jedná se o široce rozložitý keř dorůstající do výšky 2 m. Větvičky jsou tenké, oblé a velmi husté. Starší listy jsou šupinovité, temně zelené barvy, o délce asi 1 mm, po rozemnutí nepříjemně zapáchají. Mladší jehlicovité listy pak dorůstají

přibližně 4 mm. Galbulus je modročerné barvy, šedě ojíněný. Dozrává zpravidla první rok na podzim nebo na jaře příštího roku. Celá rostlina je jedovatá díky silici, která obsahuje monoterpen sabinen [1]. Na toxickém účinku se podílí do jisté míry i podofylotoxin. [4]

### **3.3.3. *Juniperus chinensis* L. – jalovec čínský**

Tvoří menší stromy nebo keře, často pěstované v parcích a zahradách. Samčí rostliny jsou kuželovité až sloupovité, samičí naopak spíše široce rozkladité. Větve jsou oblé a na koncích převislé. Šupinovité listy dorůstají délky přibližně 1,5 mm, jehlicovité pak 8-10 mm, nejčastěji jsou uspořádány ve trojčetných přeslenech. Galbulus dozrává zpravidla druhým rokem a je ojíněn spíše do hněda. [1, 4]

### **3.3.4. *Juniperus oxycedrus* L. – jalovec červený**

Je dřevina vyskytující se v oblasti Středomoří. Jehlice jsou širší a na svrchní straně nesou dva bělavé pruhy. Galbulus je červenohnědé barvy. Využívá se jako antipruriginózum, zevně proti bolesti a jako protimikrobní látka. [4]

## **3.4. LIGNANY**

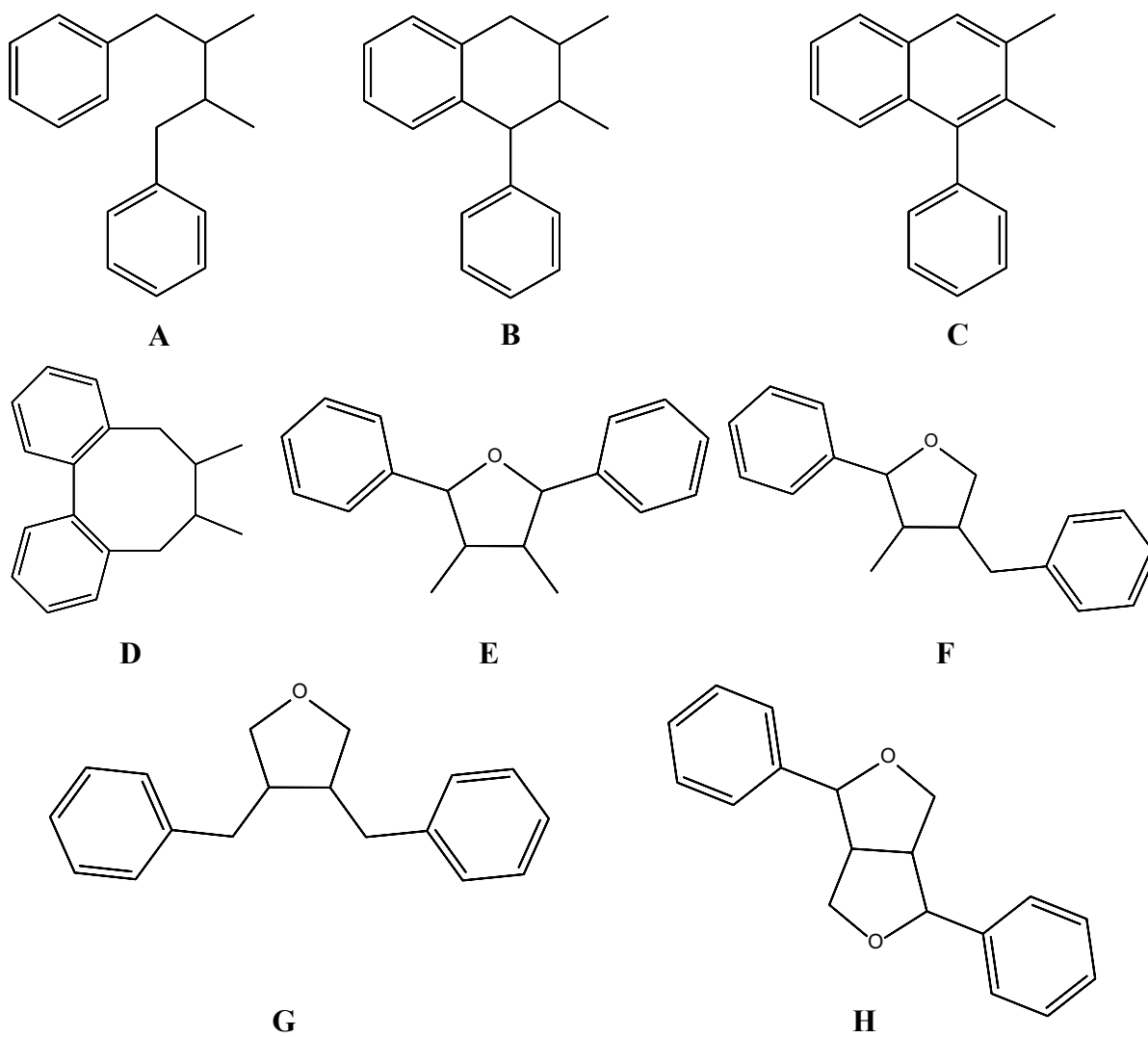
### **3.4.1. Charakteristika a rozdělení**

Jedná se o rozsáhlou skupinu sekundárních metabolitů cévnatých rostlin. Vznikají cestou kyseliny šikimové spojením dvou C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> látek, zpravidla fenylypropanových derivátů, přes β-uhlík postranního řetězce C<sub>3</sub> molekuly. Původně byly tyto sloučeniny považovány za meziprodukty při biosyntéze ligninu (polymer rovněž složený z fenylypropanových jednotek) a odtud vyplynul i jejich název. [18, 21, 35-36, 40]

Podle způsobu spojení fenylypropanových jednotek můžeme lignany rozdělit na několik typů:

- (A) dibenzylbutanový
- (B) aryltetralinový
- (C) arylnaftalenový
- (D) dibenzocyklooktanový

- (E) 2,5-diaryltetrahydrofuranový
- (F) 2-aryl-4-benzyltetrahydrofuranový
- (G) 3,4-dibenzyltetrahydrofuranový
- (H) 2,6-diarylfurofuranový



Obrázek 2: Základní strukturální vzorce lignanů. [40]

### 3.4.2. Lignany v rostlinách

Nachází se často u nahosemenných a u dvouděložných rostlin. Mohou se vyskytovat v rostlinách ve formě glykosidů, většinou je však najdeme ve formě aglykonů.

V současnosti je známo více než 200 lignanů, které byly nalezeny ve více než 70 čeledích a byly izolovány z různých částí rostlin: kořenů a oddenků, natí, listů, plodů a semen, ale také z pryskyřic. [18, 21]

Jejich význam v rostlinách spočívá v ochraně rostlin před býložravci a různými mikroorganismy. Rostliny obsahující lignany jsou v lidovém léčitelství v Číně, Japonsku a dalších východních zemích používány přibližně již 1000 let. Jedná se především o rostliny *Kadshura coccinea* (Schisandraceae), *Fraxinus sp.* a *Olea europea* (Oleaceae). Široké použití lignanů v tradiční medicíně z nich dělá potenciálně perspektivní skupinu nových látek založených na strukturní modifikaci molekul. Biologická aktivita lignanů je rozmanitá a zajímavá v mnoha oblastech výzkumu. Například se využívají jako inhibitory reverzní transkriptázy, mají imunomodulační vlastnosti a účinky na kardiovaskulární systém. Také ovlivňují hladinu lipidového spektra, inhibují lipooxygenázu-5, dále mají účinky antimykotické, antirevmatické, antipsoriatické, antimalarické a antiastmatické. [20, 36]

### 3.4.3. Lignany u živočichů

Lze je také v určitém množství nalézt v krvi a moči lidí a jiných savců. Jedná se především o enterolakton a enterodiol. Od rostlinných se odlišují pozicí hydroxylové skupiny, která je v poloze meta aromatických jader. Takováto substituce nebyla u lignanů rostlinného původu pozorována. Vznikají ve střevech působením mikroorganismů z rostlinných prekurzorů (matairesinol, secoisolariciresinol). Tyto prekurzory se nacházejí v rostlinných semenech, celozrnném pečivu, vláknině, některé zelenině a ovoci. Nejvyšší (až stonásobný) obsah byl nalezen ve lněném semínku.

V organismu účinkují jako fytoestrogeny. Podle hladiny estrogenů se váží nebo kompetují s estradiolem o vazebné místo na jaderném receptoru.

Působí také jako slabé inhibitory agregace trombocytů a inhibitory  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpy. Tuto pumpu inhibují slaběji než například ouabain a neváží se na vazebné místo pro digitalisové receptory.

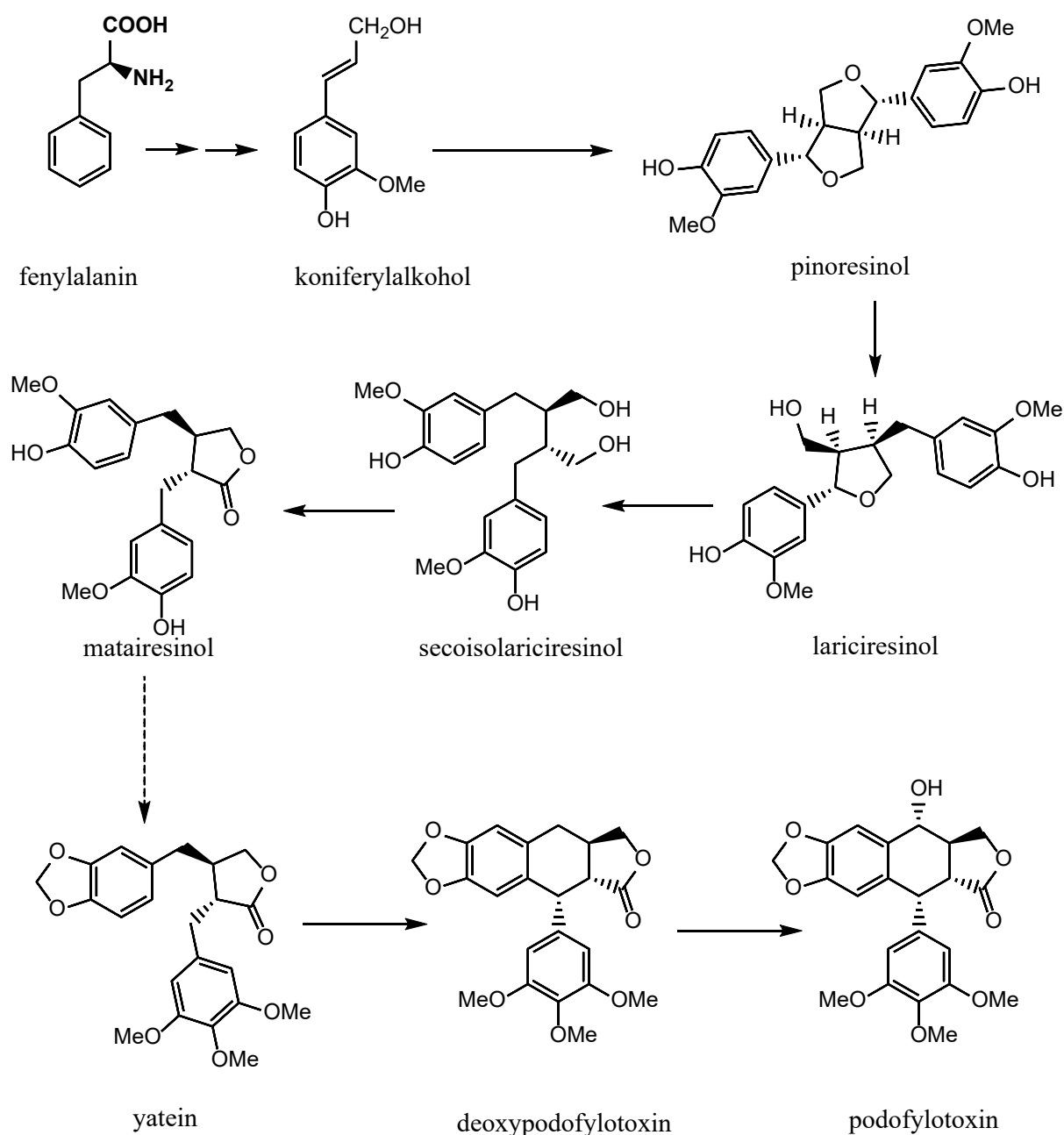
V neposlední řadě působí preventivně proti vzniku některých nádorových onemocnění. Vysoký obsah enterolaktonu v moči je spojen s nižším rizikem rakoviny prsu či kolorektálního karcinomu. Mimo svou antiestrogenní aktivitu působí také inhibičně na klíčové enzymy v biosyntéze steroidních hormonů ( $5\alpha$ -reduktáza a aromatáza). [25, 36]

### 3.4.4. Podofylotoxin

Podofylotoxin je aryltetralinový lakton spadající do skupiny lignanů. Tradičně se jako zdroj podofylotoxinu využívá pryskyřice získaná z rostlin rodu *Podophyllum*, především *Podophyllum peltatum* a *Podophyllum hexandrum* (syn. *Podophyllum emodi*). Zde se vyskytuje zejména v oddencích, ve kterých se jeho obsah pohybuje v rozmezí 0,3-1 %, u *Podophyllum hexandrum* až 4 % (hmotnosti suché drogy). Dalšími rostlinami obsahující podofylotoxin jsou: *Jeffersonia*, *Diphylleia*, *Dysosma* (Berberidaceae), *Cataranthus* (Apocynaceae), *Polygala* (Polygonaceae), *Anthriscus* (Apiaceae), *Linum* (Linaceae), *Hyptis* (Verbenaceae), *Teucrium*, *Nepeta*, *Thymus* (Lamiaceae), *Thuja*, *Juniperus*, *Thujopsis* (Cupressaceae), *Cassia* (Fabaceae), *Haplophyllum* (Rutaceae), *Commiphora* (Burseraceae). [16, 18-19]

#### 3.4.4.1. Biosyntéza

Biosyntéza podofylotoxinu není zcela do detailu známa. Základním kamenem je kyselina šikimová. Z té vzniká fenylalanin a kyselina skořicová. Velký význam mají dvě molekuly koniferylalkoholu, které jsou vzájemně spojené přes  $\beta$ -uhlík postranního řetězce. Z těchto dvou jednotek pak díky enzymu pinoresinol-syntáza vzniká furofuranový lignan pinoresinol, to je první lignan v této metabolické dráze. Otevřením jednoho z tetrahydrofuranových kruhů vzniká tetrahydrofuranový lignan lariciresinol. Tato reakce je zprostředkována enzymem pinoresinol/lariciresinol-reduktázou, která zajišťuje i přeměnu lariciresinolu na secoisolariciresinol (dibenzylbutanový lignan). Secoisolariciresinol-dehydrogenáza je enzym, pomocí kterého vzniká matairesinol (dibenzylbutyrolaktonový lignan). Uzavřením kruhu A vzniká yatein, z něj následně uzavřením kruhu C deoxypodofylotoxin. Poté už vzniká jako aryltetrahydro-naftalenový lignan samotný podofylotoxin. [18, 22, 34, 36]



Obrázek 3: Biosyntéza podofylotoxinu. [18]

### 3.4.4.2. Biologická aktivita

Podofylotoxin a jeho deriváty mají především vlastnosti protinádorové, antivirové, antirevmatické, laxativní a insekticidní. V praxi se využívá antivirového účinku při léčbě genitálních a perianálních bradavic (*Condyloma acuminata*), způsobených lidským papilomavirem (human papilloma virus, HPV). Při této léčbě se od použití podofylotoxinu postupně ustupuje a dává se přednost jiným strategiím, především látkám s nižším výskytem

nežádoucích účinků. Podofylotoxin a jeho deriváty jsou také účinné proti cytomegaloviru a mají uplatnění i v dermatologii při léčbě psoriázy. [17-18]

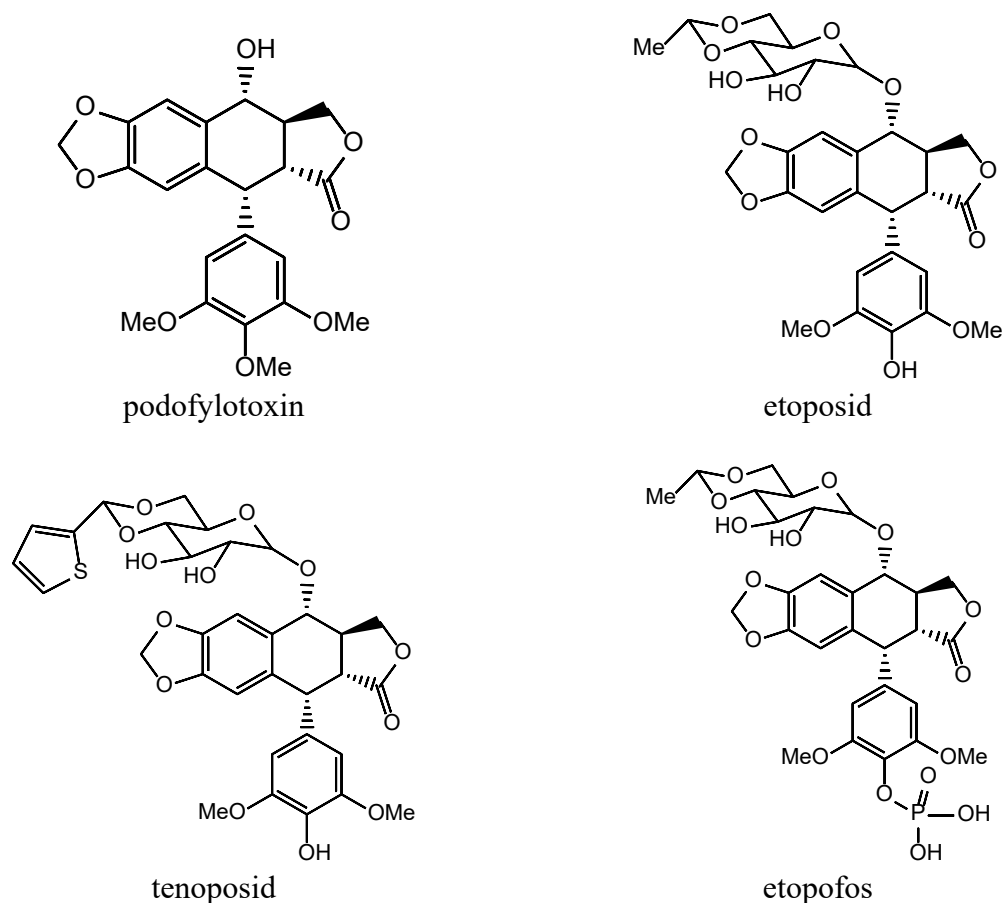
Širší uplatnění našly jeho glykosylované deriváty – etoposid, teniposid a etopofos. Etoposid je často základní a obtížně nahraditelné léčivo první volby. Vyrábí se semisynteticky z podofylotoxinu. Spolu s dalšími deriváty se používá pro své dobré klinické výsledky při léčbě nádorů varlat, plic, leukémie a Kaposiho sarkomu. Proto se velká pozornost obrací na nalezení nových analogů s vyšší protinádorovou aktivitou a nižší rezistencí buněk, vylepšenou farmakokinetikou a biologickou dostupností. Příkladem toho může být v roce 1996 schválený etopofos, což je ve vodě rozpustný fosfát etoposidu. Jedná se tedy o proléčivo, které se v organismu velmi rychle mění na etoposid. Samotný podofylotoxin vykazuje při léčbě nádorů mnoho nežádoucích účinků a nepoužívá se. [23, 27, 33-35]

### 3.4.4.3. Mechanismus účinku

Podofylotoxin patří mezi mitotické jedy. Disponuje vysokou afinitou k tubulinu (dvakrát vyšší oproti kolchicinu), váže se reverzibilně na tubulinový dimer, tím zabrání polymerizaci tubulinu a dojde k narušení poměru mezi polymery a dimery. Tvorba mikrotubulů, které vznikají polymerizací  $\alpha$  a  $\beta$  tubulinových jednotek, je zastavena. Dále pokračuje pouze depolymerizace, a to vše vede k zastavení buněčného dělení v metafázi. [12, 18]

Deriváty podofylotoxinu působí jako inhibitory topoisomerázy. Podmínkou účinku je však *trans*-konfigurace laktonového cyklu a *R*-konfigurace na C<sub>2</sub>. Pikropodofylotoxin, který se od podofylotoxinu liší pouze konfigurací na C<sub>2</sub>, se neváže na tubulin a jeho aktivita je do značné míry snížena. Deriváty 4'-demethylepipodofylotoxinu (etoposid, teniposid) mají nízkou afinitu k tubulinu a vykazují zcela odlišný mechanismus účinku, a to inhibicí topoisomerázy II, což je enzym štěpící obě vlákna DNA a je zodpovědný za kontrolu topologického stavu DNA. Tyto deriváty podofylotoxinu se nejprve vážou na DNA a pak k topoisomeráze II. Takto vzniklý komplex vytváří zlomy v DNA a zabraňuje opravě samotné DNA. To způsobuje zastavení buněčného cyklu a smrt buňky. [26, 29-31, 36]





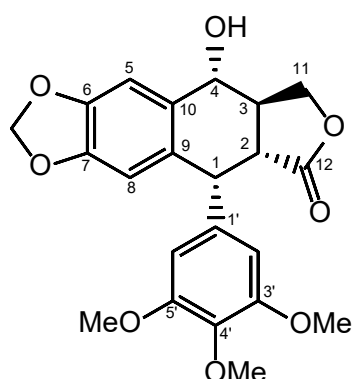
Obrázek 4: Struktura podofylotoxinu a jeho derivátů. [18]

#### 3.4.4.4. Vztah mezi strukturou a účinkem

Molekula podofylotoxinu je tvořena pěti kruhy (A-E) a obsahuje čtyři chirální uhlíky (na pozicích 1-4). Z hlediska prostorového uspořádání molekuly tvoří kruhy A-D téměř planární útvar. V molekule jsou obsaženy také atomy kyslíku a jiné funkční kyslíkaté skupiny. V kruhu A je to dioxol, v kruhu D lakton, na C<sub>4</sub> sekundární alkohol a v kruhu E na C<sub>3</sub> – C<sub>5</sub> skupiny methoxylové. Určitý stupeň volné otáčivosti vykazují kruhy E s  $\alpha$ -konfigurací. Důležitá je již zmíněná konfigurace na C<sub>4</sub>, která určuje míru afinity k tubulinu. [24, 28]

Kruh A není pro účinek nutný, ale jeho modifikací dochází ke snížení účinku. Modifikace na kruhu B vedou ke ztrátě účinku. Hlavním místem strukturálních změn je kruh C. Jeho aromatizací dochází ke ztrátě účinku, naopak *trans*-konfigurace (2 $\alpha$ , 3 $\beta$ ) mezi kruhy C a D má vyšší účinek. Epimerizace a současné zavedení objemného substituentu na C<sub>4</sub> vede ke zvýšení topoisomérázové aktivity. Vhodné je i ponechání laktonové skupiny na kruhu D, byť není nutná, ale její substituce působí snížení účinnosti. Kruh E musí disponovat volnou

otáčivostí a být v  $\alpha$ -konfiguraci. Demetylovaný derivát na C<sub>4'</sub> má vyšší protinádorovou aktivitu. Na tomto uhlíku lze také připravit deriváty ve formě prolečiv. [32-33, 37]



Obrázek 5: Chemický vzorec podofylotoxinu. [18]

#### 3.4.4.5. Podofylotoxin v různých druzích jalovce

Ve studii provedené v roce 2011 byl sledován obsah podofylotoxinu a deoxypodofylotoxinu ve 13 druzích rostlin rodu *Juniperus*. Deoxypodofylotoxin byl monitorován jako vhodná alternativa podofylotoxinu. Má totiž široký rozsah účinků na řadu linií nádorových buněk a podléhá selektivní hydroxylaci na epipodofyloroxin prostřednictvím rekombinantního cytochromu P450 3A4. Díky tomu je slibnou alternativou pro velkovýrobu tohoto farmaceuticky významného prekurzoru. [39]

Vzorky jehlic v této studii byly nejprve lyofilizovány a následně extrahovány methanolem mícháním na vodní lázni po dobu 5 hodin při teplotě 25 °C. Následně proběhla centrifugace při 3000 ot./min. po dobu 15 minut. Supernatant byl přefiltrován přes nylonovou membránu (0,45 $\mu$ m). Analýza vzorků proběhla pomocí HPLC. [39]

Tabulka č. 1: Obsah podofylotoxinu a deoxypodofylotoxinu. [39]

druh	obsah podofylotoxinu (mg/g)	obsah deoxypodofylotoxinu (mg/g)
<i>Juniperus bermudiana</i>	22,6 ± 0,5	4,7 ± 0,3
<i>Juniperus communis</i>	0,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1
<i>Juniperus conferta</i>	nedetekováno	nedetekováno
<i>Juniperus deppeana</i>	nedetekováno	nedetekováno
<i>Juniperus flaccida</i>	nedetekováno	nedetekováno
<i>Juniperus martinezii</i>	nedetekováno	nedetekováno
<i>Juniperus</i> × <i>media</i>	4,3 ± 0,2	3,9 ± 0,1
<i>Juniperus phoenicea</i>	1,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1
<i>Juniperus procumbens</i>	nedetekováno	5,8 ± 0,5
<i>Juniperus sabina</i>	2,3 ± 0,1	1,8 ± 0,2
<i>Juniperus scopulorum</i>	nedetekováno	nedetekováno
<i>Juniperus squamata</i>	stopy	4,8 ± 0,3
<i>Juniperus virginiana</i>	17,8 ± 1,3	3,6 ± 0,9

poznámka: hodnoty jsou uvedeny jako průměry vždy ze 3 vzorků

Vysoké hodnoty podofylotoxinu byly naměřeny v rostlině *J. bermudiana* a *J. virginiana*. Stopová množství byla nalezena v *J. squamata* a žádné nebo nedetekovatelné množství u 6 rostlin. Nejvyšší obsah deoxypodofylotoxinu byl nalezen ve vzorkách z rostlin *J. procumbens* a překvapivě *J. squamata*, ve kterém byla nalezena jen stopová množství podofylotoxinu. Jako velice vhodný materiál pro možnou extrakci ve větším množství v rámci farmaceutického průmyslu se jeví *Juniperus bermudiana* a *Juniperus virginiana* pro svůj vysoký obsah obou analyzovaných látek. Lze říci, že se jedná o potenciálně dobrou alternativu pro extrakci podofylotoxinu a deoxypodofylotoxinu k rostlinám rodu *Podophyllum*, které jsou ohroženy nadměrným sběrem.

Nicméně, i přes vysoký obsah podofylotoxinu a deoxypodofylotoxinu v *Juniperus bermudiana* není tento druh jalovce v současné době slibným zdrojem výše zmíněných látek, jelikož je ohrožen vyhynutím, které je zapříčiněno dvěma druhy patogenního hmyzu. Tento problém lze obejít použitím jalovce virginského nebo *in vitro* klonováním pozůstalých rezistentních jedinců. U jalovce virginského tento problém pozorován nebyl a je dokonce považován za druh do jisté míry invazivní. [39]

# 4. Experimentální část

## 4.1. Přístroje

Laboratorní analytické váhy, Sartorius, Göttingen

Sušárna FED 400, Binder, Tuttlingen

Kávomlýnek Moulinex 980, Groupe SEB, Ecully

Laboratorní odstředivka MPW 342, Med-Instruments, Varšava

Ultrazvuková lázeň Sonorex RK 255H, Bandelin Electronic, Berlín

Třepačka KS 501, IKA-Werke, Staufen

## 4.2. Chemikálie

dihydrogenfosforečnan sodný *p. a.*

hydrogenfosforečnan sodný *p. a.*

kyselina fosforečná 85 % *p. a.*

kyselina octová 99,8 % *p. a.*

dichlormethan *p. a.*

aceton *p. a.*

ethyl-acetát *p. a.*

methanol *p. a.*

acetonitril pro HPLC

tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 0,025 mol/l [42]

## 4.3. Rostlinný materiál

Pro extrakci podofylotoxinu bylo použito jehličí jalovce virginského (*Juniperus virginiana* L.), pěstovaného na Zahradě léčivých rostlin farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Sběr proběhl v únoru roku 2020. Jehličí bylo usušeno v sušárně při 40 °C a před stanovením upráškováno.

## 4.4. Extrakční postupy

Pro stanovení bylo navažováno asi 20 mg práškové drogy. Každá varianta příslušného extrakčního postupu byla prováděna se třemi paralelními vzorky. V rámci pilotní studie byly zkoušeny níže uvedené extrakční postupy.

Extrakce v ultrazvukové lázni za laboratorní teploty. Extrakční činidlo: methanol, aceton nebo ethyl-acetát; doba extrakce: 30, 60, 90, 120, 150 nebo 180 min. Extrakční činidlo: dichlormethan; doba extrakce 30 nebo 60 min.

Extrakce v ultrazvukové lázni při 50 °C. Extrakční činidlo: methanol nebo ethyl-acetát; doba extrakce: 30, 60, 90, 120, 150 nebo 180 min.

Extrakce v ultrazvukové lázni za laboratorní teploty. Extrakční činidlo: methanol nebo ethyl-acetát. Vícestupňová extrakce: 3x 10 min., 3x 20 min. nebo 3x 30 min.

Extrakce v ultrazvukové lázni při 50 °C. Extrakční činidlo: methanol nebo ethyl-acetát. Vícestupňová extrakce: 3x 10 min., 3x 20 min. nebo 3x 30 min.

Extrakce v ultrazvukové lázni za laboratorní teploty. Extrakční činidlo: tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 0,025 mol/l. Doba extrakce: 30 nebo 60 min. Poté přidán ethyl-acetát a extrahováno dalších 30 nebo 60 min. Pak ponecháno rozdělit, oddělena ethyl-acetátová vrstva, nebo po oddělení ethyl-acetátové vrstvy vodná fáze vytřepána ještě 2x ethyl-acetátem a ethyl-acetátové výtřepky spojeny.

Extrakce v ultrazvukové lázni při 50 °C. Extrakční činidlo: tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 0,025 mol/l. Doba extrakce: 30 nebo 60 min. Poté přidán ethyl-acetát a extrahováno dalších 30 nebo 60 min. Pak ponecháno rozdělit, oddělena ethyl-acetátová vrstva,

nebo po oddělení ethyl-acetátové vrstvy vodná fáze vytřepána ještě 2x ethyl-acetátem a ethyl-acetátové výtřepky spojeny.

Extrakce v ultrazvukové lázni při 50 °C. Extrakční činidlo: tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 0,025 mol/l nebo směs tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 0,025 mol/l + ethyl-acetát (1:1). Doba extrakce: 30 min. Při použití směsi ponecháno po extrakci rozdělit, oddělena ethyl-acetátová vrstva, nebo po oddělení ethyl-acetátové vrstvy vodná fáze vytřepána ještě 2x ethyl-acetátem a ethyl-acetátové výtřepky spojeny.

Extrakce na třepačce (150 ot./min.) za laboratorní teploty. Extrakční činidlo: methanol, aceton nebo ethyl-acetát; doba extrakce: 30, 60, 90, 120, 150 nebo 180 min.

Extrakce na třepačce (150 ot./min.) za laboratorní teploty. Extrakční činidlo: methanol nebo ethyl-acetát. Vícestupňová extrakce: 3x 10 min., 3x 20 min. nebo 3x 30 min.

Extrakce na třepačce (150 ot./min.) za laboratorní teploty. Extrakční činidlo: tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 0,025 mol/l. Doba extrakce: 30 nebo 60 min. Poté přidán ethyl-acetát a třepáno opět 30 nebo 60 min. pak necháno rozdělit, oddělena ethyl-acetátová vrstva, nebo po oddělení ethyl-acetátové vrstvy vodná fáze vytřepána ještě 2x ethyl-acetátem a ethyl-acetátové výtřepky spojeny.

Macerace za chladu (4 °C). Extrakční činidlo: methanol, ethyl-acetát nebo tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 0,025 mol/l. Doba extrakce: 12 nebo 24 hod. Extrakty v tlumivém roztoku vytřepány 1x, nebo 3x ethyl-acetátem.

## 4.5. Stanovení podofylotoxinu

Stanovení podofylotoxinu v extraktech jalovce virginského bylo prováděno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí. Podmínky stanovení byly následující: kolona Lichrospher RP18 (250 x 4 mm, velikost částic 5 µm) s předkolonou ze stejného materiálu; izokratická eluce s mobilní fází 0,1% kyselina octová a acetonitril v poměru 40:60; průtok 0,8 ml/min; teplota na koloně 30 °C; teplota v autosampleru 15 °C; dávkovaný objem vzorku 3 µl; excitační vlnová délka 240 nm, emisní vlnová délka 320 nm; doba separace byla 7,5 min. Analýza byla prováděna na přístroji LC-20 Prominence (Shimadzu).

## 4.6. Statistické zpracování

Statistické zpracování naměřených hodnot bylo provedeno na základě následujících vzorců [41].

aritmetický průměr:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

směrodatná odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

$n$  ..... rozsah souboru

$x_i$  ..... naměřené hodnoty

$\bar{x}$  ..... aritmetický průměr

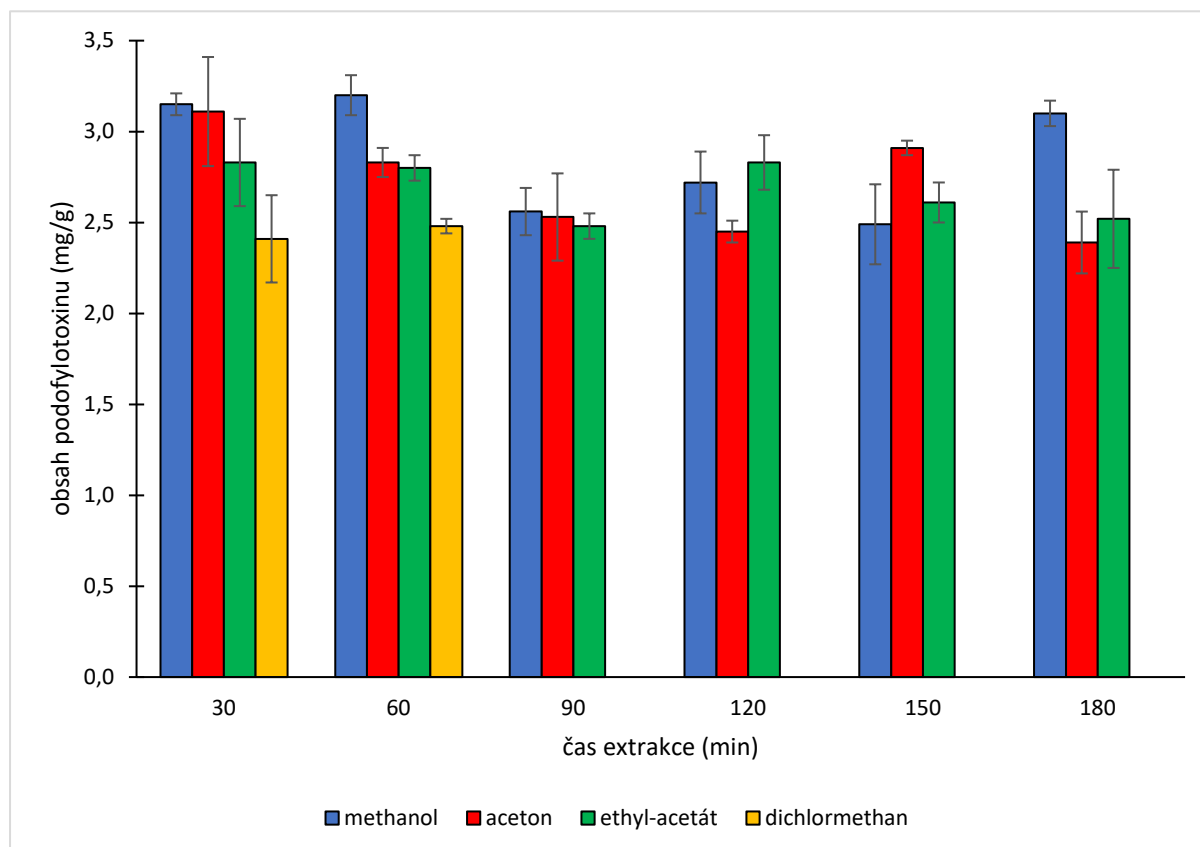
$s$  ..... směrodatná odchylka

## 5. Výsledky

Tabulka č. 2: Vliv doby a extrakčního činidla na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni za laboratorní teploty.

čas extrakce (min)	extrakční činidlo			
	methanol	aceton	ethyl-acetát	dichlormethan
	obsah podofylotoxinu (mg/g)			
30	3,15 ± 0,06	3,11 ± 0,30	2,83 ± 0,24	2,41 ± 0,24
60	3,20 ± 0,11	2,83 ± 0,08	2,80 ± 0,07	2,48 ± 0,04
90	2,56 ± 0,13	2,53 ± 0,24	2,48 ± 0,07	neměřeno
120	2,72 ± 0,17	2,45 ± 0,06	2,83 ± 0,15	neměřeno
150	2,49 ± 0,22	2,91 ± 0,04	2,61 ± 0,11	neměřeno
180	3,10 ± 0,07	2,39 ± 0,17	2,52 ± 0,27	neměřeno

Graf č. 1: Vliv doby a extrakčního činidla na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni za laboratorní teploty.

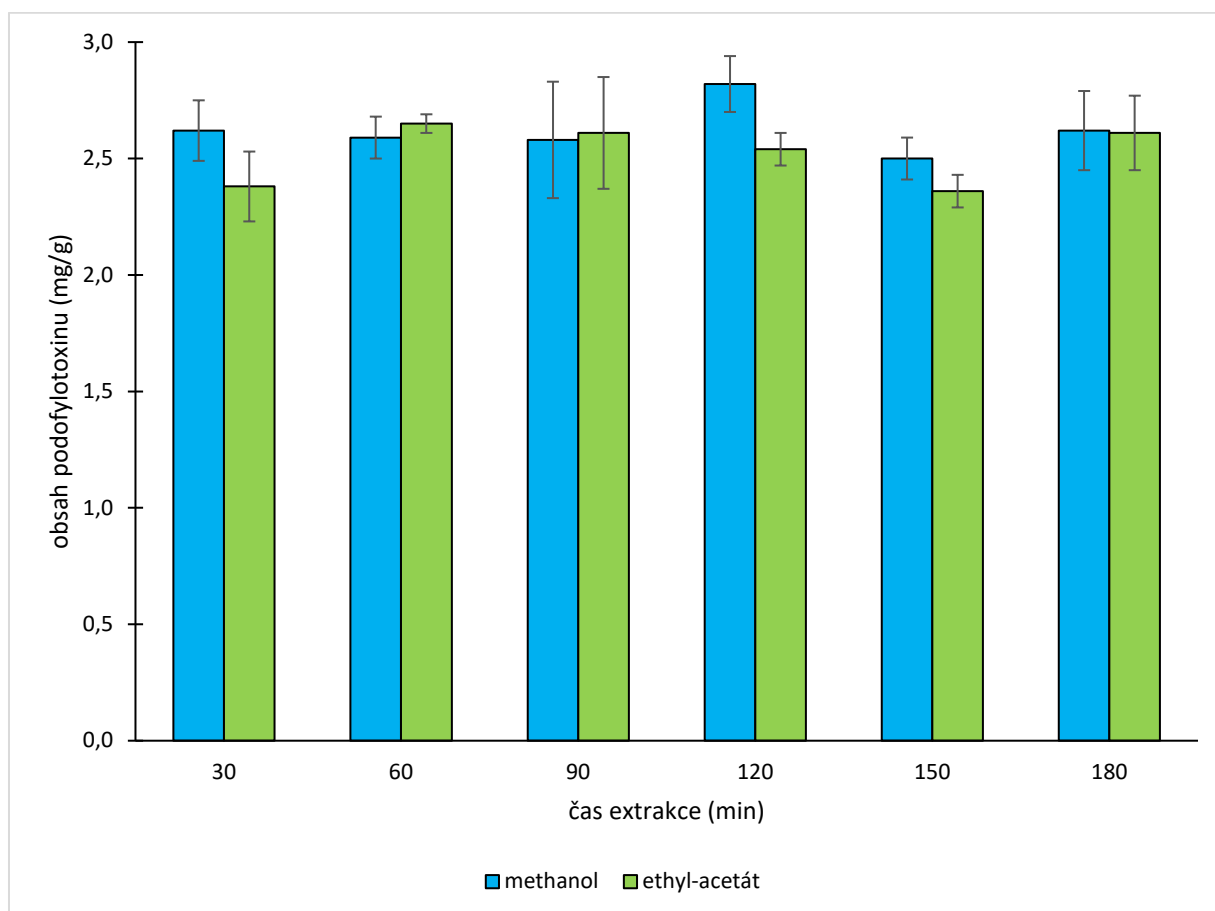




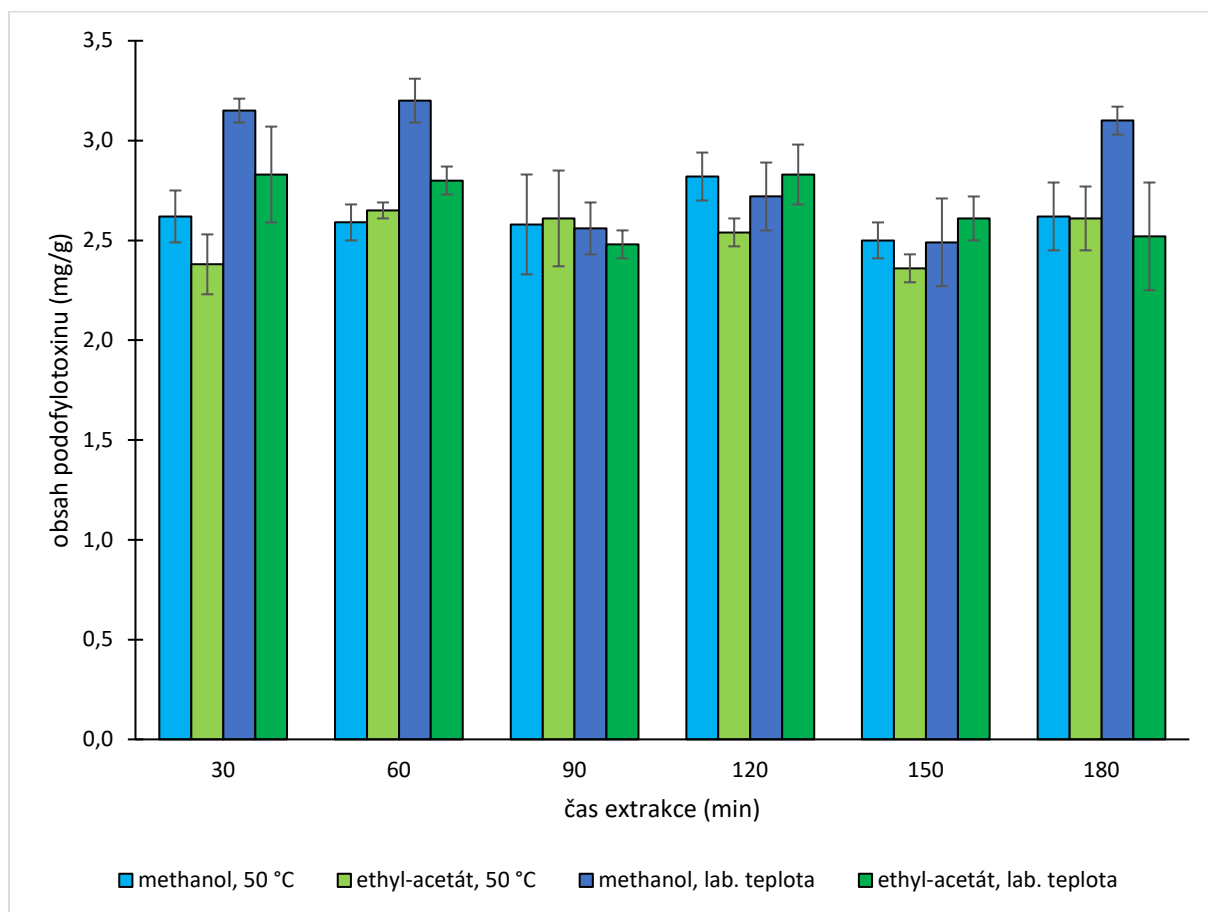
Tabulka č. 3: Vliv doby a extrakčního činidla na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni při teplotě 50 °C.

čas extrakce (min)	extrakční činidlo	
	methanol	ethyl-acetát
	obsah podofylotoxinu (mg/g)	
30	2,62 ± 0,13	2,38 ± 0,15
60	2,59 ± 0,09	2,65 ± 0,04
90	2,58 ± 0,25	2,61 ± 0,24
120	2,82 ± 0,12	2,54 ± 0,07
150	2,50 ± 0,09	2,36 ± 0,07
180	2,62 ± 0,17	2,61 ± 0,16

Graf č. 2: Vliv doby a extrakčního činidla na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni při teplotě 50 °C.



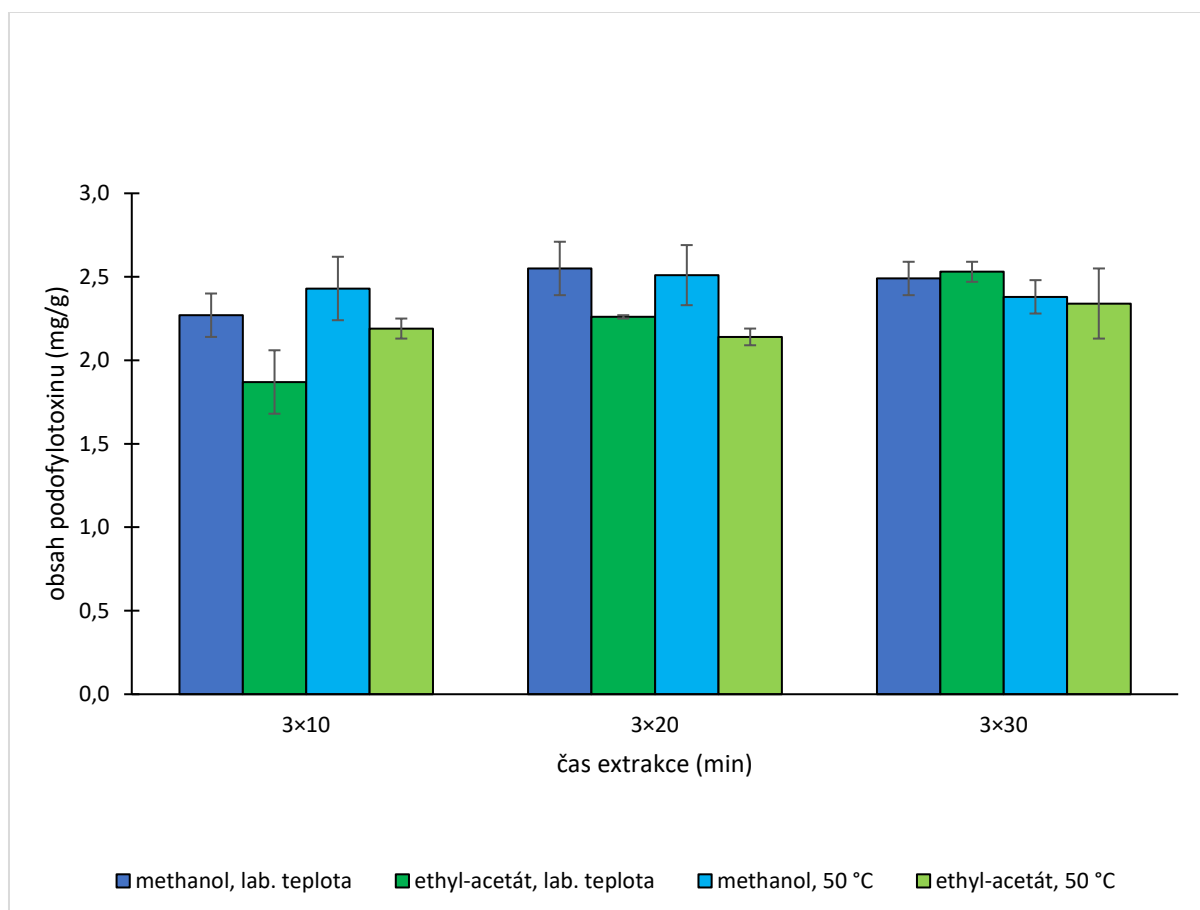
Graf č. 3: Porovnání vlivu doby, extrakčního činidla a teploty na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni.



Tabulka č. 4: Vliv extrakčního postupu, extrakčního činidla a teploty na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni.

čas extrakce (min)	extrakční činidlo			
	methanol		ethyl-acetát	
	laboratorní teplota	50 °C	laboratorní teplota	50 °C
	obsah podofylotoxinu (mg/g)			
3 × 10	2,27 ± 0,13	2,43 ± 0,19	1,87 ± 0,19	2,19 ± 0,06
3 × 20	2,55 ± 0,16	2,51 ± 0,18	2,26 ± 0,01	2,14 ± 0,05
3 × 30	2,49 ± 0,10	2,38 ± 0,10	2,53 ± 0,06	2,34 ± 0,21

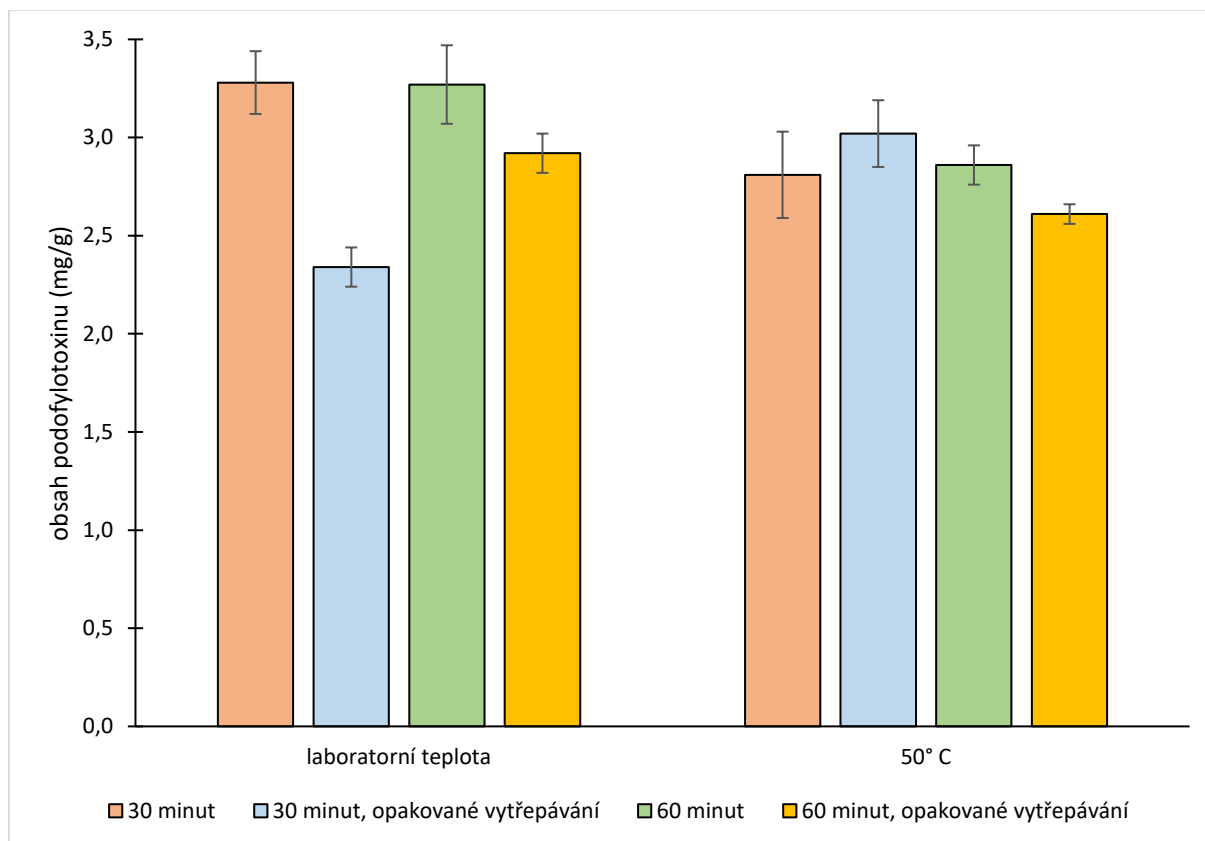
Graf č. 4: Vliv extrakčního postupu, extrakčního činidla a teploty na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni.



Tabulka č. 5: Vliv doby, teploty a extrakčního postupu na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni. Jako extrakční činidlo použit fosforečnanový tlumivý roztok s následným přidavkem ethyl-acetátu.

čas extrakce (min) a extrakční postup	teplota	
	laboratorní	50 °C
	obsah podofylotoxinu (mg/g)	
30 (fosforečnanový tlumivý roztok) + 30 (ethyl-acetát)	3,28 ± 0,16	2,81 ± 0,22
30 (fosforečnanový tlumivý roztok) + 30 (ethyl-acetát) následně vytřepáno ještě 2x ethyl-acetátem	2,34 ± 0,10	3,02 ± 0,17
60 (fosforečnanový tlumivý roztok) + 60 (ethyl-acetát)	3,27 ± 0,20	2,86 ± 0,10
60 (fosforečnanový tlumivý roztok) + 60 ethyl-acetát následně vytřepáno ještě 2x ethyl-acetátem	2,92 ± 0,10	2,61 ± 0,05

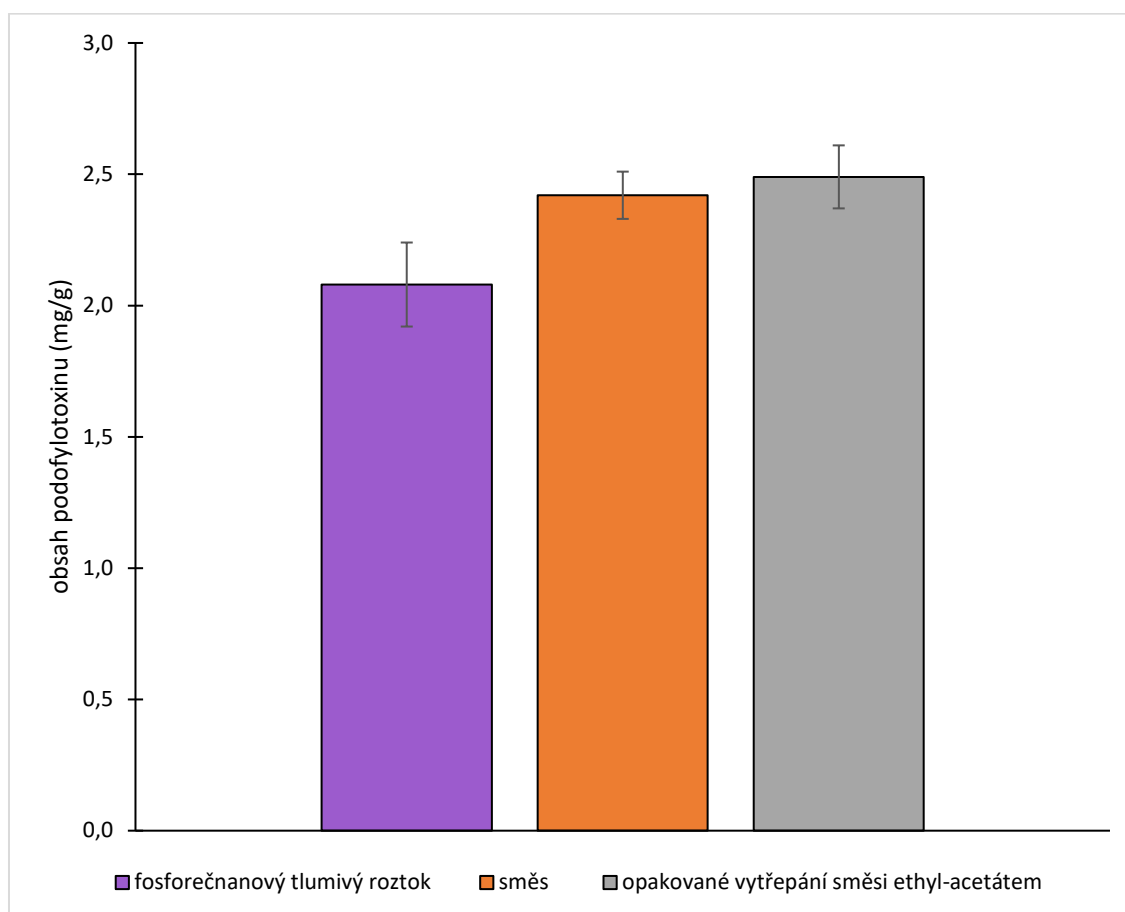
Graf. č. 5: Vliv doby, teploty a extrakčního postupu na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni.



Tabulka č. 6: Vliv extrakčního činidla na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni při teplotě 50 °C po dobu 30 min.

extrakční činidlo	obsah podofylotoxinu (mg/g)
fosforečnanový tlumivý roztok	2,08 ± 0,16
směs fosforečnanový tlumivý roztok + ethyl-acetát (1:1)	2,42 ± 0,09
směs fosforečnanový tlumivý roztok + ethyl-acetát (1:1), následně ještě 2x vytřepáno ethyl-acetátem	2,49 ± 0,12

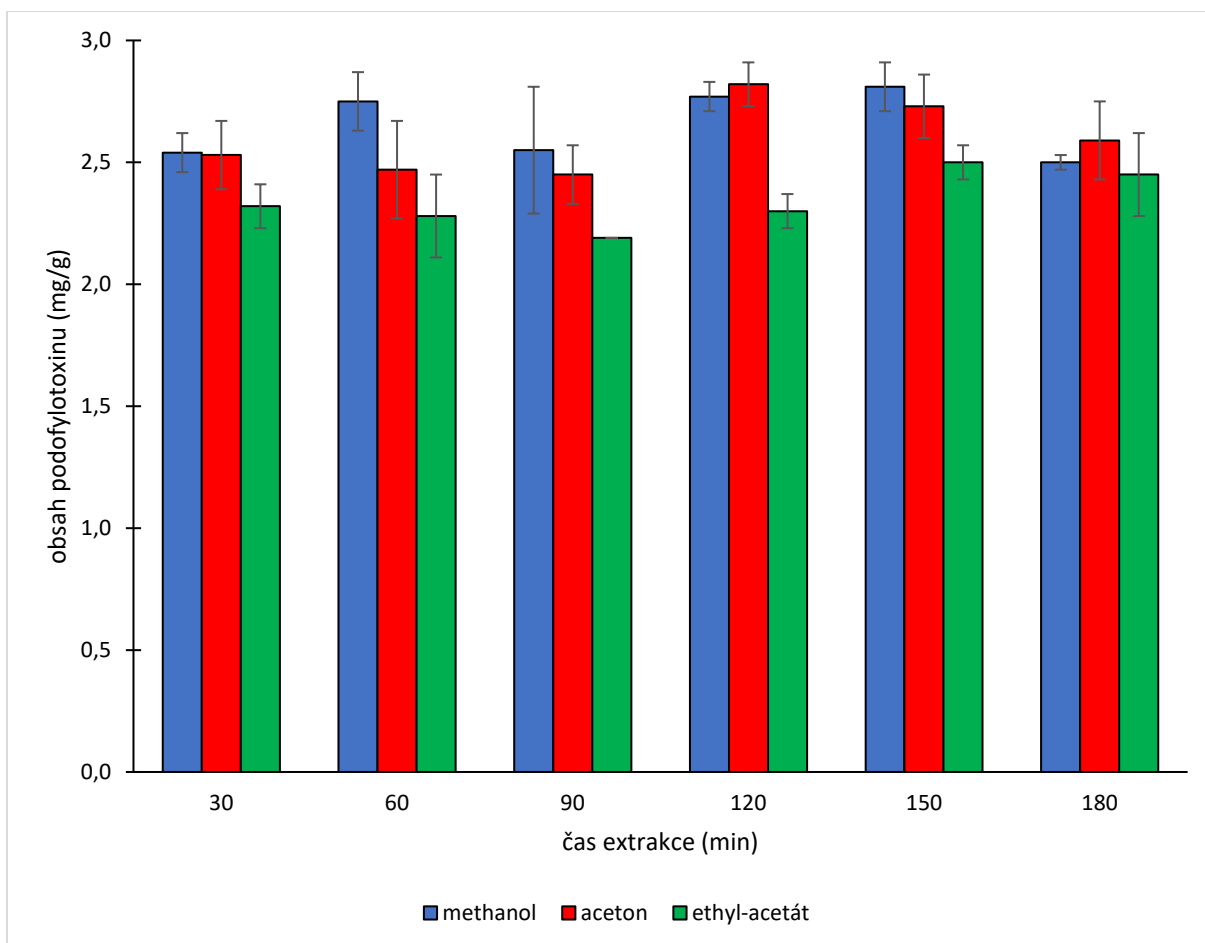
Graf č. 6: Vliv extrakčního činidla na extrakci podofylotoxinu v ultrazvukové lázni při teplotě 50 °C po dobu 30 min.



Tabulka č. 7: Vliv doby a extrakčního činidla na extrakci podofylotoxinu na třepačce za laboratorní teploty.

čas extrakce (min)	extrakční činidlo		
	methanol	aceton	ethyl-acetát
	obsah podofylotoxinu (mg/g)		
30	2,54 ± 0,08	2,53 ± 0,14	2,32 ± 0,09
60	2,75 ± 0,12	2,47 ± 0,20	2,28 ± 0,17
90	2,55 ± 0,26	2,45 ± 0,12	2,19 ± 0,00
120	2,77 ± 0,06	2,82 ± 0,09	2,30 ± 0,07
150	2,81 ± 0,10	2,73 ± 0,13	2,50 ± 0,07
180	2,50 ± 0,03	2,59 ± 0,16	2,45 ± 0,17

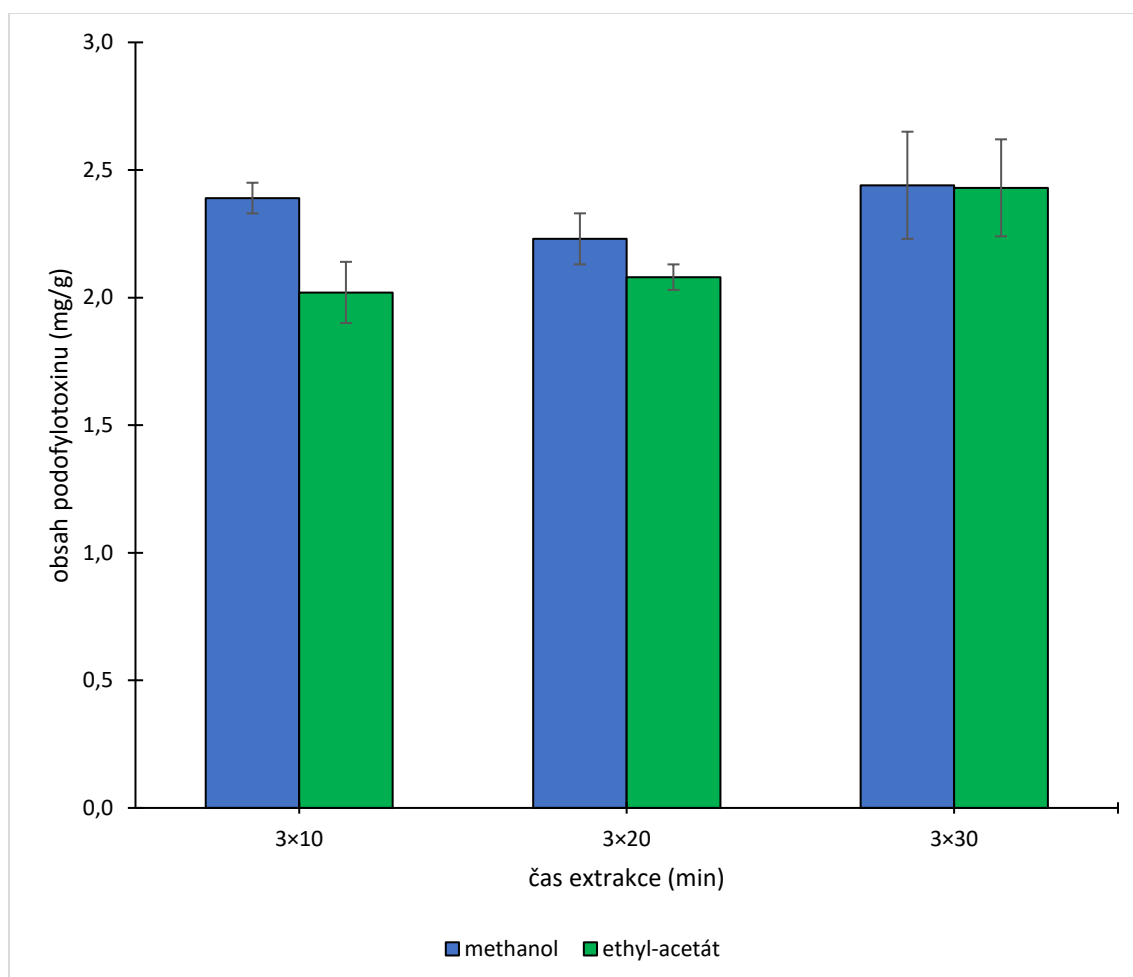
Graf č. 7: Vliv doby a extrakčního činidla na extrakci podofylotoxinu na třepačce za laboratorní teploty.



Tabulka č. 8: Vliv extrakčního činidla a extrakčního postupu na extrakci podofylotoxinu na třepače za laboratorní teploty.

čas extrakce (min)	extrakční činidlo	
	methanol	ethyl-acetát
	obsah podofylotoxinu (mg/g)	
3 × 10	2,39 ± 0,06	2,02 ± 0,12
3 × 20	2,23 ± 0,10	2,08 ± 0,05
3 × 30	2,44 ± 0,21	2,43 ± 0,19

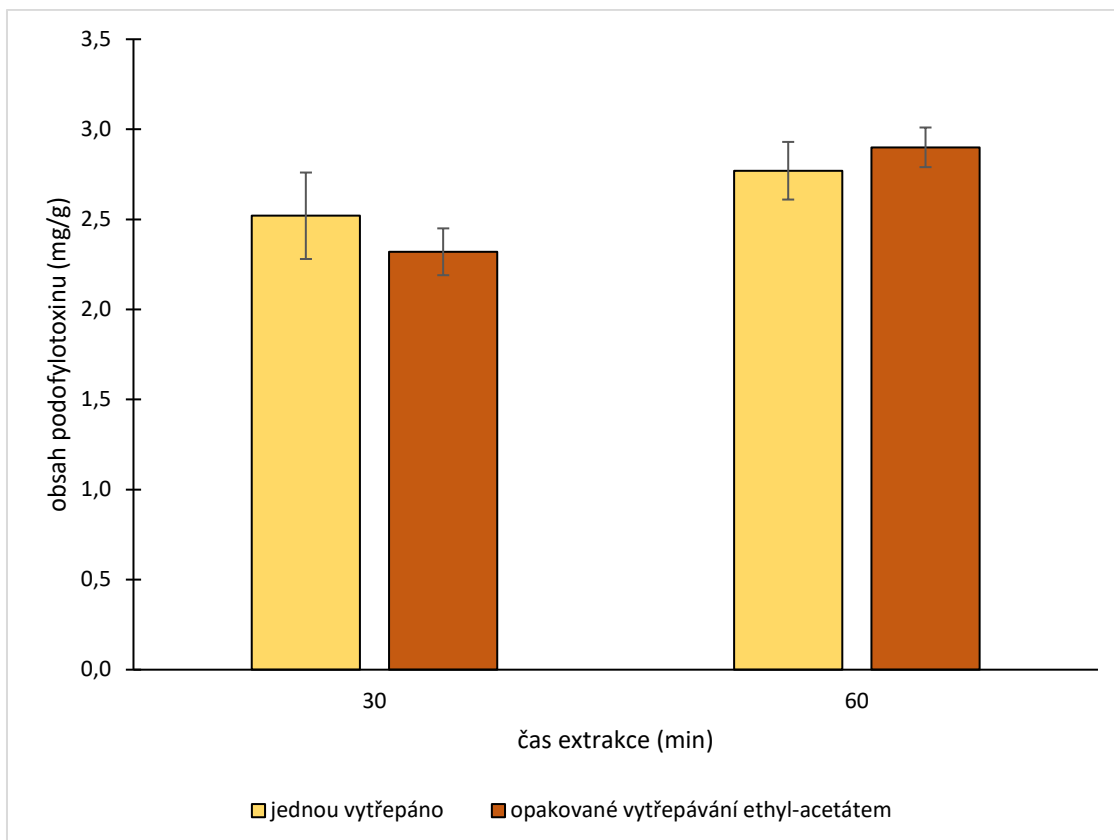
Graf č. 8: Vliv extrakčního činidla a extrakčního postupu na extrakci podofylotoxinu na třepače za laboratorní teploty.



Tabulka č. 9: Vliv doby a extrakčního postupu na extrakci podofylotoxinu na třepačce za laboratorní teploty. Jako extrakční činidlo použit fosforečnanový tlumivý roztok s následným přidavkem ethyl-acetátu.

čas extrakce (min) a extrakční postup	obsah podofylotoxinu (mg/g)
30 (fosforečnanový tlumivý roztok) + 30 (ethyl-acetát)	2,52 ± 0,24
30 (fosforečnanový tlumivý roztok) + 30 (ethyl-acetát) následně vytřepáno ještě 2x ethyl-acetátem	2,32 ± 0,13
60 (fosforečnanový tlumivý roztok) + 60 (ethyl-acetát)	2,77 ± 0,16
60 (fosforečnanový tlumivý roztok) + 30 (ethyl-acetát) následně vytřepáno ještě 2x ethyl-acetátem	2,90 ± 0,11

Graf č. 9: Vliv doby a extrakčního postupu na extrakci podofylotoxinu na třepačce za laboratorní teploty. Jako extrakční činidlo použit fosforečnanový tlumivý roztok s následným přidavkem ethyl-acetátu.

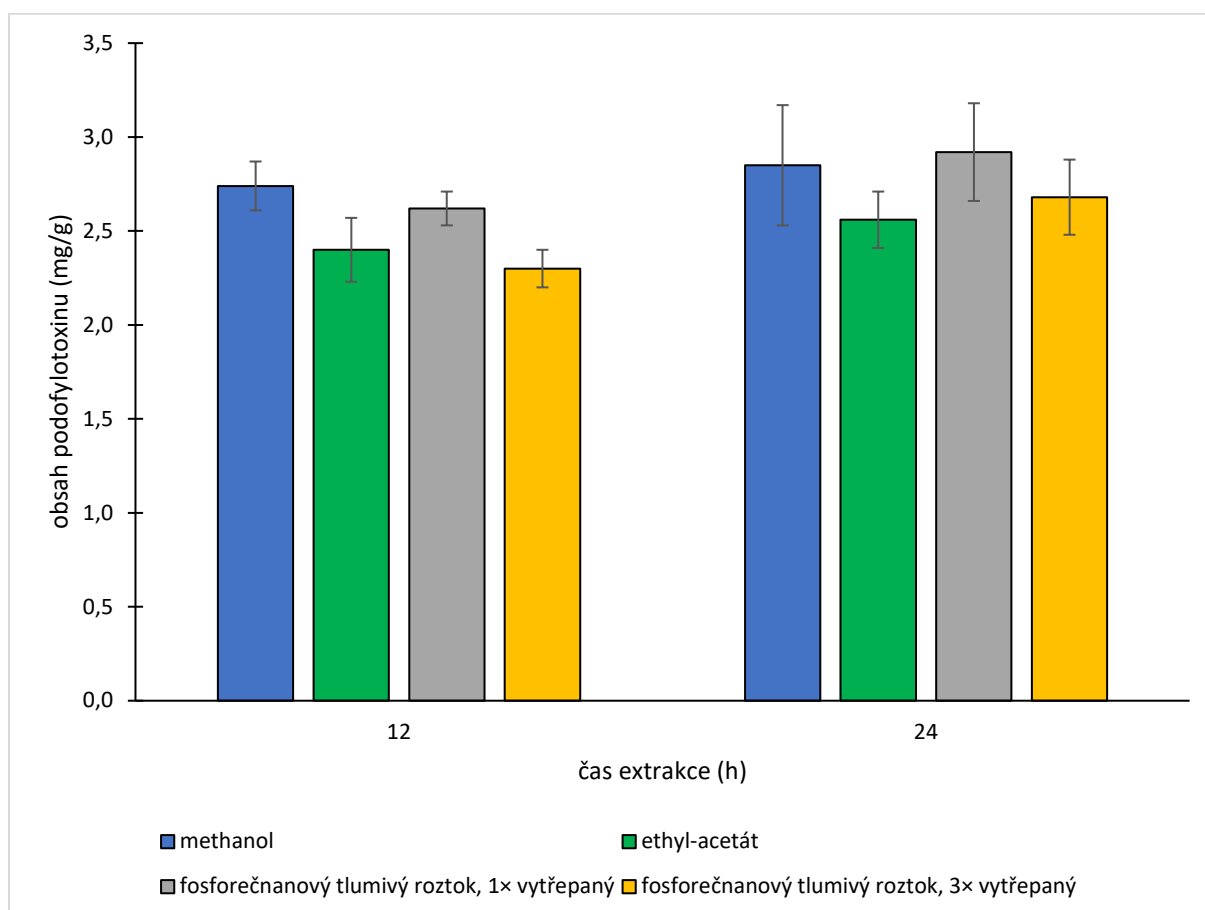




Tabulka č. 10: Vliv doby a extrakčního činidla na extrakci podofylotoxinu při maceraci za chladu (4 °C).

čas extrakce (h)	extrakční činidlo			
	methanol	ethanol	fosforečnanový tlumivý roztok	
			extrakty vytřepány 1× ethyl-acetátem	extrakty vytřepány 3× ethyl-acetátem
	obsah podofylotoxinu (mg/g)			
12	2,74 ± 0,13	2,40 ± 0,17	2,62 ± 0,09	2,30 ± 0,10
24	2,85 ± 0,32	2,56 ± 0,15	2,92 ± 0,26	2,68 ± 0,20

Graf č. 10: Vliv doby a extrakčního činidla na extrakci podofylotoxinu při maceraci za chladu (4 °C).



## 6. Diskuze

Podofylotoxin je sekundární metabolit spadající do skupiny přírodních lignanů, který se v současné době využívá jako prekurzor pro semisyntézu protirakovinných léčiv, především se jedná o etoposid, teniposid a etopofos. Podofylotoxin jako takový není v léčbě tolik využíván, zejména pro své toxické účinky na organismus. Jeho deriváty našly uplatnění v léčbě nádorů plic a varlat a některých typů leukémie. Podofylotoxin se používá v dermatologii při léčbě genitálních bradavic způsobených lidským papilloma virem. Obecně má tedy především účinky antikancerózní a antivirové.

Totální syntéza podofylotoxinu je příliš nákladná, a proto má velký význam hledání ekonomicky přijatelnějších a dostupnějších zdrojů. Zpočátku se naděje upínaly k oddenkům a kořenům rostlin *Podophyllum hexandrum* a *Podophyllum peltatum*. *Podophyllum hendarum* je však ohrožený druh pocházející z oblasti Himálaje, Afghánistánu a Číny. *Podophyllum peltatum* je více rozšířen a fakt, že lignany jsou skladovány v listech, činí sběr snazší a k rostlině šetrnější. Při použití speciální extrakční metody lze dokonce dospět k podobnému množství podofylotoxinu (40 mg/g) jako při použití oddenků *Podophyllum hexandrum*. Jako další možné zdroje se uvádí rostliny rodů *Linum*, *Juniperus*, *Hyptis*, *Teucrium*, *Nepeta*, *Dysosma*, *Jeffersonia*, *Thymus* a *Thuja*. [43]

Z výše uvedených se jako velice perspektivní jeví rod *Juniperus*, konkrétně druhy *J. virginiana*, *J. chinensis*, *J. bermudiana*. Na základě několika studií zejména druh *Juniperus virginiana*. [9][39]

Na jalovci virginském byly dokonce provedeny studie, které sledovaly vliv doby sklizně a stáří rostliny na obsah podofylotoxinu. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší obsah byl zaznamenán v lednu a dubnu (1,56 mg/g a 1,45 mg/g). Nejnižší obsah podofylotoxinu byl zaznamenán v únoru a červnu, konkrétně 1,06 mg/g a 1,08 mg/g. Bylo také popsáno, že nejnižší obsah podofylotoxinu je v nejmladších jedincích. Množství postupně se stářím rostliny narůstá, avšak poté pozvolna klesá a dospělí jedinci mají už opět nižší obsah. Z těchto dat vyplývá mimo jiné také fakt, že obsah podofylotoxinu v této rostlině během roku kolísá, a to až o 50 %. Ani maximální hodnoty nejsou ovšem stále tak uspokojivé jako v případě extrakce podofylotoxinu z *Podophyllum peltatum* (56 mg/g). Výhodou je, že listy jalovce virginského obsahují mnohem

méně  $\alpha$ - a  $\beta$ -peltatinu. To jsou lignany společně se vyskytující v listech rostliny *Podophyllum peltatum*, které následně komplikují extrakci a čištění extrakční směsi. [15]

Již provedené studie na jalovci virginském za účelem stanovení obsahu podofylotoxinu uvádí do jisté míry rozličné výsledky – 1 mg/g [44], 1,56 mg/g [45], 3,6 mg/g [46], 4,8 mg/g [43] a dokonce 17,8 mg/g [39].

Tato práce se zabývá optimalizací extrakčního postupu pro stanovení obsahu podofylotoxinu v jalovci virginském. Byly použity tři základní metody: extrakce v ultrazvukové lázni, extrakce na třepače a macerace za chladu. Metody byly upravovány změnou různých parametrů – extrakční činidlo, teplota a délka extrakce.

První metodou byla extrakce v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě. Extrakce probíhala původně se čtyřmi různými extrakčními činidly. Některá se však ukázala pro další postup nevhodná. Zejména dichlormethan kvůli své hustotě, která je ve srovnání s ostatními výrazně vyšší (dichlormethan 1,325 g/cm<sup>3</sup>, methanol 0,791 g/cm<sup>3</sup>, aceton 0,790 g/cm<sup>3</sup>, ethyl-acetát 0,897 g/cm<sup>3</sup>). Vzorky drogy v něm plavaly u hladiny a nebylo možné zajistit plnohodnotnou extrakci. Z tohoto důvodu byl obsah změřen pouze po 30 a 60 minutách extrakce. Jako efektivní extrakční činidlo se jeví methanol, který poskytoval velice zajímavé výsledky zejména během první hodiny extrakce a to 3,15 mg/g a 3,20 mg/g (viz Graf č. 1). Během extrakce při 50 °C bylo potřeba vzít v úvahu teploty varu použitých činidel. V průběhu extrakce se lázeň samotným chodem postupně zahřívala a teplota uvnitř dosahovala hodnot teploty varu acetonu (teploty varu použitých činidel: aceton 56,5 °C; methanol 64,7 °C, ethyl-acetát 77,1 °C, dichlormethan 39,8 °C). Z tohoto důvodu se při dalších experimentech od použití acetonu a dichlormethanu jako extrakčních činidel upustilo. Zde se jako nejvýhodnější extrakční činidlo opět jeví methanol, především v prvních 30 minutách extrakce a také ve 120. minutě extrakce (viz Graf č. 2). Při porovnání výsledků extrakce při laboratorní teplotě a při 50 °C bylo dosaženo vyšších hodnot při laboratorní teplotě, a to jak při použití methanolu, tak při použití ethyl-acetátu (viz Graf č. 3). Vysokou extrakční schopnost methanolu potvrzuje již provedená studie [36], zde bylo nejlepších výsledků dosaženo použitím methanolu (4,10 mg/g). Extrakce byla provedena i prostřednictvím dalších extrakčních činidel, a to acetonu (3,20 mg/g), chloroformu (1,90 mg/g), ethanolu (1,60 mg/g) a petroletheru (0,50 mg/g).

Při vícestupňové extrakci v ultrazvukové lázni, kdy byla droga extrahována třikrát 10, 20, nebo 30 minut opakovaným přidavkem příslušného rozpouštědla, provedené jak za laboratorní teploty, tak při 50 °C. Jako lepší extrakční činidlo vychází opět methanol, a to bez ohledu na použitou teplotu. Nejlepších výsledků bylo při extrakci 3x 10 minut dosaženo použitím methanolu při 50 °C, při extrakci 3x 20 minut pak při použití methanolu za laboratorní

teploty a při extrakci 3x 30 minut použitím ethyl-acetátu při laboratorní teplotě (viz Graf č. 4). Z grafu je také patrné, že methanol poskytuje stabilnější výsledky. Jednotlivé hodnoty se mezi sebou liší pouze v řádech několika jednotek desetin mg.

V ultrazvukové lázni byla zkoušena také extrakce za použití fosforečnanového tlumivého roztoku o pH 7,0 a koncentraci 0,025 mol/l, jehož koncentrace a pH byly zvoleny na základě literatury [43]. Největší obsah podofylotoxinu (3,28 mg/g) byl stanoven ve vzorku extrahovaném 30 minut. Při laboratorní teplotě nebylo dalším vytřepáváním ethyl-acetátem dosaženo lepších výsledků (viz Graf č. 5). Studie provedené za podobných podmínek vykazují obdobné výsledky (3,40 a 4,70 mg/g) a obsah podofylotoxinu při extrakci tlumivým roztokem hodnotí z hlediska výtěžnosti nejlépe [43]. Další studie potvrzuje výsledky předešlé a uvádí hodnoty 3,40 mg/g [9].

Při porovnání obsahu podofylotoxinu extrakcí fosforečnanovým tlumivým roztokem o pH 7,0 a koncentraci 0,025 mol/l a směsí tohoto tlumivého roztoku s ethyl-acetátem v poměru 1:1 je patrné, že lepších hodnot bylo dosaženo použitím směsi. Ještě vyšší obsah byl extrahován při použití směsi, následném oddělení vodné vrstvy a jejím dvojnásobným vytřepáním ethyl-acetátem (viz Graf č. 6). Porovnáme-li hodnotu získanou použitím směsi extrakčních činidel (2,42 mg/g) s hodnotou z předchozího stanovení, kde byl použit jako extrakční činidlo fosforečnanový tlumivý roztok o pH 7,0 a koncentraci 0,025 mol/l s následným přidavkem ethyl-acetátu (2,81 mg/g), jeví se použití směsi jako méně výhodné.

Vedle extrakce v ultrazvukové lázni byla zkoušena také extrakce na třepačce, která byla provedena za laboratorní teploty. V prvním měření obsahu podofylotoxinu byla porovnávána tři extrakční činidla: methanol, aceton a ethyl-acetát. Nejnižších hodnot bylo dosaženo při použití ethylacetátu, nejvyšších pak methanolu a acetonu (viz Graf č. 7). Zajímavý je vývoj hodnot, u kterých je patrný nárůst až k přibližně 120.-150. minutě a poté následný pokles s narůstající délkou extrakce. Nelze zde tedy říci, že se zvyšující se délkou extrakce na třepačce narůstá i množství extrahovaného podofylotoxinu. Zajímavé je srovnání vlivu doby extrakce na obsah podofylotoxinu s již provedenou studií [36]. Zde obsah podofylotoxinu v extrakci trávající 72 hodin postupně narůstal k maximu, kterého dosáhl po 5 hodinách extrakce a dále pozvolna klesal.

Dále byla provedena vícestupňová extrakce na třepačce. Extrakčním činidlem byl methanol a ethyl-acetát. Opět bylo lepších výsledků dosaženo při použití methanolu. Avšak při extrakci 3x 30 minut se výsledky téměř shodují (viz. Graf č. 8).

Poté byla provedena extrakce pomocí fosforečnanového tlumivého roztoku o pH 7,0 a koncentraci 0,025 mol/l na třepačce ve dvou časových intervalech. Z hodnot je patrné, že

vyššího obsahu podofylotoxinu bylo dosaženo při extrakci po dobu 60 minut fosforečnanovým tlumivým roztokem následovaných dalšími 60 minutami s přidavkem ethyl-acetátu a ještě následném dvojnásobném vytřepání vodné fáze ethyl-acetátem (viz. Graf č. 9). Konkrétně se jednalo o 2,90 mg/g. Z tohoto grafu je také patrné, že doba extrakce má pozitivní vliv na množství obsaženého podofylotoxinu.

Poslední testovanou extrakční metodou byla macerace za chladu (4 °C) po dobu 12 a 24 hodin. Jako extrakční činidlo byl použit methanol, ethyl-acetát a tlumivý fosforečnanový roztok o pH 7,0 a koncentraci 0,025 mol/l, jenž byl následně vytřepáván ethyl-acetátem. S prodlužující s dobou extrakce došlo u všech vzorků k nárůstu množství podofylotoxinu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím methanolu (2,85 mg/g) a fosforečnanového tlumivého roztoku, jehož extrakty byly jednou vytřepány ethyl-acetátem (2,92 mg/g).

## 7. Závěr

Z výše uvedených výsledků práce vyplývá:

- 1) Metodou extrakce v ultrazvukové lázni se nejlepších výsledků dosáhlo použitím methanolu jako extrakčního činidla, a to v první hodině extrakce (3,20 mg/g). Této hodnoty nebylo dosaženo ani při následném navýšení teploty. Dalším vhodným extrakčním činidlem se jeví i fosforečnanový tlumivý roztok o pH 7,0 a koncentraci 0,025 mol/l s následným přidavkem ethyl-acetátu (3,28 mg/g). Nevhodná pro tuto metodu jsou extrakční činidla aceton a dichlormethan.
- 2) Metoda extrakce na třepačce poskytla nejlepší výsledek při použití fosforečnanového tlumivého roztoku o pH 7,0 a koncentraci 0,025 mol/l (2,90 mg/g), při extrakci trvající 60 minut a následném vytřepávání roztokem ethyl-acetátu.
- 3) Macerací za chladu (4 °C) se dosáhlo nejvyšších hodnot podofylotoxinu při použití methanolu (2,85 mg/g) nebo tlumivého fosforečnanového roztoku o pH 7,0 a koncentraci 0,025 mol/l po 24 hodinách (2,92 mg/g).
- 4) Při porovnání všech tří typů extrakcí se jako nejvýhodnější jeví extrakce v ultrazvukové lázni za použití methanolu nebo kombinace fosforečnanového tlumivého roztoku a ethyl-acetátu jako extrakčních činidel.

## 8. Seznam použité literatury

- [1] **Hejný, S., Slavík, B.:** *Květena ČSR I.* Academia, Praha, 1988, s. 336-338.
- [2] **Štursa, J.:** *Dřeviny opadavé i stálezelené v ilustracích Věry Ničové.* Aventinum, Praha, 2016, s. 114.
- [3] **Větvička, V.:** *Stromy a keře.* Aventinum, Praha, 2001, s. 94.
- [4] **Jahodář, L.:** *Farmakobotanika.* Karolinum, Praha, 2011, s. 34-35.
- [5] **Dunford, N. T., Hirziroglu, S., Holcomb, R.:** *Effect of age on the distribution of oil in Eastern redcedar tree segments.* Bioresource Technology, 2007, 98: 2636-2640.
- [6] **Foster, S., Duke, J. A.:** *A Field Guide to Medicinal Plants and Herbs of Eastern and Central North America.* Houghton Mifflin Harcourt, Boston, 2000, s. 293.
- [7] **Gawde, A. J., Cantrell, C. L., Zheljazkov, V. D.:** *Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from Juniperus virginiana.* Industrial Crops and Products, 2009, 30: 276-280.
- [8] **Kindscher, K.:** *Medicinal wild plants of the prerie.* University Press of Kansas, Lawrence, 1992, s. 130-135.
- [9] **Cantrell, C. L., Zheljazkov, V. D., Osbrink, W. L. A. et al.:** *Podophyllotoxin and Essential oil profile of Juniperus and related species.* Industrial Crops and Products, 2013, 43: 27-35.
- [10] **Hădărugă, N. G., Branic, A. G., Hădărugă, D. I. et al.:** *Comparative study of Juniperus communis and Juniperus virginiana Essential oils: TLC and GC analysis.* Journal of Planar Chromatography, 2011, 24: 130-135
- [11] **Trifunči, S., Ardelean, D.:** *Studies on the optimal extraction of flavonoids from the fruit of Juniperus virginiana L.* Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, 2010, 119: 127-133.
- [12] **Předota, V.:** Diplomová práce. *Explantátová kultura Juniperus virginiana.* Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie, 2014.
- [13] **Tavares, W. R., Seca, A. M. L.:** *The current Status of the Pharmaceutical Potential of Juniperus L. Metabolites.* Medicines, 2018, 5, 81.

- [14] **Bais, S., Gill, N. S., Rana, N. et al.:** *A Phytopharmacological Review on a Medicinal Plant: Juniperus communis*. International Scholarly Research Notices, 2014, article ID 634723.
- [15] **Maqbool, M., Cushman, K. E.:** *Podophyllotoxin Content in Leaves of Eastern Red Cedar (Juniperus virginiana)*. Acta Horticulturae, 2004, 629: 87-92.
- [16] **Li, F., Liu, D., Liao, X. et al.:** *Acid-controlled release complexes of podophyllotoxin and etoposide with acyclic cucurbit[n]urils for low cytotoxicity*. Bioorganic and Medical Chemistry, 2019, 27: 525-532.
- [17] **Kašparová, M., Martin, J., Tůmová L. et al.:** *Production of Podophyllotoxin by Plant Cultures of Juniperus virginiana*. Natural Product Communications, 2017, 12(1): 101-103.
- [18] **Gordaliza, M., García, P. A., del Corral, J. M. M. et al.:** *Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives*. Toxicon, 2004, 44: 441-459.
- [19] **Farkya, S., Bisaria, V. S., Srivastava, A. K.:** *Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65: 504-519.
- [20] **Fang, X., Hu, X.:** *Advances in the Synthesis of Lignan Natural Products*. Molecules, 2018, 23, 3385.
- [21] **Spilková, J., Martin, J., Siatka, T. et al.:** *Farmakognozie*. Karolinum, Praha, 2016, s. 81-82.
- [22] **Kamal, A.:** *Synthesis and biological evaluation of podophyllotoxin congeners as tubulin polymerization inhibitors*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2014, 22: 5466-5475.
- [23] **Guerrero, E., Abad, A., Montenegro, G. et al.:** *Analgesic and anti-inflammatory activity of podophyllotoxin derivatives*. Pharmaceutical Biology, 2013, 51(5): 566-572.
- [24] **Ardalani, H., Avan, A., Ghayour-Mobarhan, M.:** *Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent*. Avicenna Journal of Phytomedicine, 2017, 7(4): 285-294.
- [25] **Zheljazkov, V. D., Semerdjieva, I. B., Dincheva, I. et al.:** *Antimicrobial and antioxidant activity of Juniper galbuli essential oil constituents eluted at different times*. Industrial Crops and Products, 2017, 109: 529-537.
- [26] **Antúnez-Mojica, M., Rodríguez-Salarichs, J., Redondo-Horcajo, M. et al.:** *Structural and Biochemical Characterization of the Interaction of Tubulin with Potent Natural Analogues of Podophyllotoxin*. Journal of Natural Products, 2016, 79: 2113-2121.



- [27] **Och, M., Och, A., Cieřla, Ľ. et al.:** *Study of cytotoxic activity, podophyllotoxin, and deoxypodophyllotoxin content in selected Juniperus species cultivated in Poland.* *Pharmaceutical Biology*, 2015, 53(6): 831-837.
- [28] **Liu, Y., Wei, D., Zhao, Y. et al.:** *Synthesis and biological evaluation of a series of podophyllotoxins derivatives as a class of potent antitubulin agents.* *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2012, 20: 6285-6295.
- [29] **Hu, S., Zhou, Q., Wu, W. et al.:** *Anticancer effect of deoxypodophyllotoxin induces apoptosis of human prostate cancer cells.* *Oncology letters*, 2016, 12: 2918-2923.
- [30] **Ma, Y., Fang, S., Li, H. et al.:** *Biological Evaluation and Molecular Modelling Study of Podophyllotoxin Derivatives as Potent Inhibitors of Tubulin Polymerization.* *Chemical Biology and Drug Design*, 2013, 82: 12-21
- [31] **Magedov, I. V., Frolova, L., Manpadi, M. et al.:** *Anticancer Properties of an Important Drug Lead Podophyllotoxin Can Be Efficiently Mimicked By Diverse Heterocyclic Scaffolds Accessible via One-Step Synthesis.* *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54(12): 4234-4246.
- [32] **Yu, X., Che, Z., Xu, H.:** *Recent Advances in the Chemistry and Biology of Podophyllotoxins.* *Chemistry, A European Journal*, 2017, 23: 4467-4526.
- [33] **Guerram, M., Jiang, Z., Zhang, L.:** *Podophyllotoxin, a medical agent of plant origin: past, present and future.* *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2012, 10: 161-169.
- [34] **Petersen, M., Alfermann, A. W.:** *The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55: 135-142.
- [35] **Harmatha, J.:** *Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů.* *Chemické listy*, 2005, 99: 622-632.
- [36] **Slanina, J.:** *Biologická a farmakologická aktivita lignanů.* *Chemické listy*, 2004, 94: 111-116.
- [37] **Damayanthi, Y., Lown, J. W.:** *Podophyllotoxin: Current status and Recent Developments.* *Current Medicinal Chemistry*, 1998, 5: 205-252.
- [38] **Zhang, L., Zeng, X., Ren, X. et al.:** *Design, synthesis, and biological evaluation of indole carboxylic acid esters of podophyllotoxin as antiproliferative agents.* *Medical Chemistry Research*, 2019, 28: 81-94.
- [39] **Renouard, S., Lopez, T., Hendrawati, O. et al.:** *Podophyllotoxin and Deoxypodophyllotoxin in Juniperus bermudiana and 12 Other Juniperus Species: Optimization of Extraction, Method, Validation, and Quantification.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59: 8101-8107.

- [40] **Nagy, M., Grančai, D., Mučaji, P. et al.:** *Farmakognózia. Biogenéza prírodných látok.* Osveta, Martin, 2011, s. 116-119.
- [41] **Klemerová, V.:** *Základy aplikované statistiky.* SPN, Praha, 1993, s. 30, 31.
- [42] *Český lékopis 2017.* Grada, Praha, 2017, s. 690.
- [43] **Bedir, E., Khan, I., Moraes, R. M.:** *Trends in newcrops and new uses; bioprospecting for podophyllotoxin,* ASHS Press, Alexandria, 2002, s. 545-549.
- [44] **Hartwell, J. L., Johnson, J. M., Fitzgerald, D. B. et al.:** *Podophyllotoxin from Juniperus Species.* Journal of the American Chemical Society, 1953, 75(1): 235-236.
- [45] **Cushman, K. E., Maqbool, M., Gerard, P. D. et al.:** *Variation of podophyllotoxin in leaves of Eastern red cedar (Juniperus virginiana).* Planta Medica, 2003, 69: 477-478.
- [46] **Gawde, A. J., Zheljzkov, V. D., Maddox. et al.:** *Bioprospection of Eastern red cedar from nine physiographic regions in Mississippi.* Industrial Crops and Products, 2009, 30: 59-64.
- [47] **Zheljzkov, V. D., Cantrell, C. L., Donega, M. A. et al.:** *Bioprospecting for podophyllotoxin in the Big Horn Mountains, Wyoming.* Industrial Crops and Products, 2013, 43: 787-790.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Student: Jiří Olšar

Školitel: doc. PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Název diplomové práce: Podofylotoxin v jalovci virginském (*Juniperus virginiana*)

Tato se práce se zabývá optimalizací extrakčního postupu pro stanovení obsahu podofylotoxinu v jehličí jalovce virginského. Byly použity tři metody: extrakce v ultrazvukové lázni, extrakce na třepačce a macerace za chladu. U metod byly sledovány i parametry, které mohou mít vliv na vlastní extrakci podofylotoxinu jako například délka extrakce, teplota a extrakční činidlo.

Jako nejvýhodnější se jeví extrakce v ultrazvukové lázni za použití methanolu nebo kombinace fosforečnanového tlumivého roztoku a ethyl-acetátu jako extrakčních činidel.

# Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy

Student: Jiří Olšar

Supervisor: doc. PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Title of diploma thesis: Podophyllotoxin in *Juniperus virginiana*

This thesis describes the optimisation of the extraction process for quantity determination of podophyllotoxin in the leaves of *Juniperus virginiana* L. This determination was conducted through three different methods: the extraction in ultrasound bath, the extraction in the orbital shaker and the maceration in cold environment of 4 °C. Extractions were affected by various factors which were monitored, for instance time of extraction, temperature, and extraction solvents.

The most efficient method appears to be the extraction in ultrasound bath with the use of methanol or a combination of phosphate buffer with ethyl-acetate.