

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE**

**OBSAHOVÉ LÁTKY *HELIANTHUS ANNUUS L.***

**Rigorózní práce**

**Hradec Králové 2007**

**Mgr. Soňa Niedobová**

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci vypracovala samostatně a použila jen citace z uvedené literatury.

Ráda bych touto cestou poděkovala PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za odborné vedení, obětavost a za všestrannou pomoc při vypracovávání této rigorózní práce. Děkuji Ing. Kateřině Kubíkové, Mgr. Jitce Vytlačilové za pomoc při testování frakcí. RNDr. Aleně Tiché, Ph.D. a MUDr. Radomíru Hyšplerovi, Ph.D. z Geronto-metabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové děkuji za analýzu frakce pomocí plynové chromatografie.

# OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>1. ÚVOD A CÍL PRÁCE</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>2. CHAREKTERISTIKA ČELEDI ASTERACEAE</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>3. CHARAKTERISTIKA DRUHU</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>4. OBSAHOVÉ LÁTKY ROSTLINY</b> .....	<b>- 7 -</b>
4.1. TERPENY .....	- 7 -
4.1.1. <i>Monoterpeny</i> .....	- 8 -
4.1.2. <i>Seskviterpeny</i> .....	- 8 -
4.1.3. <i>Norseskviterpeny</i> .....	- 12 -
4.1.4. <i>Spiroseskviterpeny</i> .....	- 13 -
4.1.5. <i>Seskviterpenické laktony</i> .....	- 14 -
4.1.6. <i>Diterpeny</i> .....	- 19 -
4.2. SAPONINY .....	- 19 -
4.2.1. <i>Steroidní saponiny</i> .....	- 20 -
4.2.2. <i>Triterpenoidní saponiny</i> .....	- 20 -
4.3. FLAVONOIDY .....	- 21 -
<b>5. BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK</b> .....	<b>- 23 -</b>
5.1. ALELOPATICKÁ AKTIVITA .....	- 23 -
5.2. CYTOTOXICKÁ A HEMOLYTICKÁ AKTIVITA .....	- 24 -
5.3. ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITA .....	- 25 -
5.4. ALERGENNÍ AKTIVITA .....	- 25 -
5.5. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA .....	- 26 -
5.5.1. <i>Metody založené na eliminaci radikálů</i> .....	- 27 -
5.5.2. <i>Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek</i> .....	- 29 -
5.6. FOTOTOXICKÁ AKTIVITA .....	- 30 -
<b>6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>- 33 -</b>
6.1. CHEMIKÁLIE, CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL A.....	- 33 -
6.1.1. <i>Rozpouštědla</i> .....	- 33 -
6.1.2. <i>Chemikálie</i> .....	- 33 -
6.1.3. <i>Chromatografický materiál</i> .....	- 33 -
6.1.4. <i>Přístroje</i> .....	- 33 -
6.1.5. <i>Vyvíjecí soustavy</i> .....	- 34 -
6.1.6. <i>Detekční činidla</i> .....	- 34 -
6.2. POSTUP PŘÍPRAVY EXTRAKTU .....	- 34 -
6.3. ZPRACOVÁVÁNÍ FRAKČÍ .....	- 35 -
<b>7. VÝSLEKY MĚŘENÍ</b> .....	<b>- 41 -</b>

7.1.	VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY .....	- 41 -
7.1.1.	<i>Metoda SIA</i> .....	- 41 -
7.2.	VÝSLEDKY MĚŘENÍ FOTOTOXICKÉ AKTIVITY .....	- 43 -
7.3.	VÝSLEDKY ANALÝZY FRAKCE V 39-40/1 POMOCÍ NMR .....	- 46 -
7.4.	VÝSLEDKY ANALÝZY FRAKCE V 38 POMOCÍ GC.....	- 46 -
<b>8.</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>- 47 -</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>- 49 -</b>
<b>10.</b>	<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>- 51 -</b>
<b>11.</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>- 52 -</b>

## 1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Zaměření Rigorózní práce je obdobné jako u mé Diplomové práce (2007). Náplní bylo navázat na výzkum prováděný v průběhu Rigorózní práce Mgr. Zuzany Novosadové (2006). Zvolené frakce, získané z předchozího dělení, bylo třeba dále zpracovat, přečistit pomocí preparativní chromatografie, provést analýzu získaných látek (GC-MS, NMR) a testy na biologickou aktivitu u vybraných frakcí (antioxidační aktivita, fototoxicita) s následným hodnocením na základě získaných výsledků.

Zároveň bylo cílem práce vyhledat a doplnit nové dostupné informace k obsahovým látkám slunečnice roční a jejich biologickým účinkům.

## 2. CHAREKTERISTIKA ČELEDI ASTERACEAE

Čeď Asteraceae představují především vytrvalé nebo jednoleté byliny a polokeře, často s různým typem žláznatých nebo jiných trichomů. Často se systémem článkovaných (především Cichorioideae) mléčnic v lýku, které obsahují latex bohatý na triterpeny nebo s více či méně vyvinutým systémem schizogenních pryskyřičných kanálků, které jsou často vystlány epitelem. Oba sekreční systémy se obvykle společně v jednom druhu nevyskytují. Listy jsou střídavé, méně často protistojné, jednoduché nebo složené, někdy redukované v šupiny. Květy jsou obojité nebo jednopohlavní i jalové, drobné, s obaly rozlišenými, pokud kalich nechýbí (kalich bývá často přeměněn v chmýr nebo žláznatý val). Koruna srostlolupenná, obvykle pětičetná, aktinomorfní nebo zygomorfní. Květy tvoří husté racemózní květenství – úbor se zákrovem z listenů. Květenství je tvořeno buď jedním typem květů jazykovitých (Cichorioideae), nebo jazykovitými květy tvořícími paprsek úboru a trubkovitými květy vytvářejícími terč úboru (Asteroideae). Tyčinek je pět, jejich prašníky se slepují v trubičku; nitkami přirůstají ke koruně. Gyneceum je tvořeno dvěma plodolisty, je zakončené dvouramennou bliznou. Semeník je spodní, jednopouzdrý, s jedním vajíčkem. Plodem je nažka s vytrvávajícím chmýrem kalichového původu. Významným chemotaxonomickým znakem jsou výskyt inulinu jako zásobního polysacharidu, biosyntéza polyynů (polyacetylenů) a seskviterpenických laktonů, výskyt pentacyklických triterpenů v latexu, silice, kávové kyseliny a jejích derivátů, lokalizovaně se vyskytující alkaloidy. Význačným znakem je absence iridoidů. Čeď se dělí na dvě podčeďi:

- **Cichorioideae – čekankovité**

Tato podčeď je charakterizována úbory pouze z jazykovitých oboupohlavních květů. Velmi časté jsou mléčnice.<sup>3</sup> Patří zde rostliny léčivé a dieteticky významné, např. *Taraxacum officinale* Web., *Cichorium intybus* L.; ale také rostliny jedovaté a mechanicky škodlivé, např. *Lactuca virosa* L., *Sonchus arvensis* L.<sup>6</sup>

- **Asteroideae – hvězdnicové**

Podčeď je typická tvorbou jazykovitých i trubkovitých květů obojitéch i jednopohlavních i jalových, uspořádaných na úborovém lůžku jako paprsek a terč. Mléčnice se obvykle nevyskytují.<sup>3</sup> I zde najdeme mnoho rostlin léčivých a dieteticky významných, např. *Achillea millefolium* L., *Chamomilla recutita* (L.), *Tussilago farfara* L., *Artemisia vulgare* L., *Silybum marianum* (L.); rostliny jako krmiva, např. *Helianthus annuus* L., *Helianthus tuberosum* L., *Cynara scolymus* L.; rostliny mechanicky škodlivé a poškozující kvalitu živočišných produktů, např. *Bidens tripartita* L.; a rostliny jedovaté, např. *Senecio vulgare* L., *Tanacetum vulgare* L.<sup>6</sup>



### 3. CHARAKTERISTIKA DRUHU

**HELIANTHUS ANNUUS**



**Obr. 1**



**Obr.2**

### 3. Charakteristika druhu

---

Nadříše:	EUKARYOTA
Říše:	PLANTAE
Oddělení:	MAGNOLIOPHYTA
Třída:	MAGNOLIOPSIDA
Podtřída:	ASTERIDAE
Řád:	ASTERALES
Čeleď:	ASTERACEAE
<b>Rostlina:</b>	<b><i>Helianthus annuus L.</i></b> <sup>5</sup>

Slunečnice roční je jednoletá bylina původem ze Severní Ameriky, která je nyní pěstována po celém světě. Hlavní kořen je tlustý, hluboce kořenící, s četnými tenkými postranními kořeny. Lodyha přímá, jednoduchá nebo velmi řídko v horní části větvená, 1,0 – 2,5 m dlouhá, světle zelená, zvláště v horní části odstále drsně bíle chlupatá. Listy střídavé, 2 dolní obvykle vstřícné, dlouze řapíkaté, řapík nejčastěji 10 – 20 cm dlouhý, čepel srdčité vejčité až široce trojúhelníkovitá, 15 – 35 cm dlouhá, 10 – 30 cm široká, na vrcholu špičatá až zašpičatělá, na okrajích nepravidelně pilovitá, se širokou, mělce až hluboce srdčitou bází, s výraznými 3 hlavními žilkami. Úbory jednotlivé, koncové, obvykle mohutné, 15 – 30 cm v průměru, otáčející se za sluncem a během zrání semen se sklánějící. Lůžko úboru ploché nebo mírně vyklenuté. Jazykovité květy žluté, v počtu 20 – 70, květy terče četné, s korunou trubkovitou, zprvu téměř černou, v plném květu žlutou s červenajícími cípy nebo celou hnědopurpurovou. Prašníky téměř černé nebo hnědopurpurové. Nažky zčásti obalené plevkami, zploštělé, v obrysu obvejčité nebo úzce obvejčité s klínovitou bází, šedavé až téměř černé. Slunečnice roční je světlomilná, obvykle krátkodenní rostlina s kultivačním optimem v teplých oblastech, existují však odrůdy snášející chladnější podmínky. Nejlepší výnosy poskytuje na bazických, dusíkem bohatých půdách.<sup>4</sup>

Sbírá se zejména semeno (Semen helianthi), někdy i květ (Flos helianthi). Semena obsahují až 45 % oleje, dále bílkoviny, fosfolipidy, karotenoidy, glyceridy, steroly, organické kyseliny (citrónová, vinná, chlorogenová), lecitin a provitamin A. V lékařství se slunečnicové tinktury užívají při žilních chorobách, malárii, tuberkulóze. Slunečnicová semena v množství 2 – 4 čajové lžičky za den zlepšují ostrost vidění. Ze semen se vyrábí slunečnicový olej, který obsahuje vysoký podíl nenasycených mastných kyselin (zejména kyselinu linolovou a olejovou). V květech a listech je obsažen cholin, xantofyly, solantová kyselina, betain, helianthin, flavonoid quercimeritrin, kumarinové glykosidy, triterpenové saponiny, karotenoidy, antokyany, trísloviny a minerální látky. Slunečnicový květ snižuje pocení, horečku, vylepšuje trávení, stimuluje činnost jater, zevně léčí hnisavé kožní afekce a záněty.<sup>7</sup>

## 4. OBSAHOVÉ LÁTKY ROSTLINY

### 4.1. TERPENY

Terpeny patří mezi největší a strukturně nejrozmanitější skupinu přírodních látek. Nižší, prchavé složky silic byly známy už ve starověku a používaly se především pro svoji vůni. Získávaly se destilací, a proto se označovaly i jako éterické oleje. Mnohem později se zjistilo, že éterické oleje jsou mnohasložkové směsi, ve kterých se kromě terpenů, vyskytují i fenylypropanové deriváty a mnohé jiné látky. Ze složení a struktury terpenů  $C_{10}$ ,  $C_{15}$ ,  $C_{20}$ ,  $C_{30}$  atd. vyplývá, že jsou násobkem „pětiuhlíkové jednotky“. Pyrolytickým rozkladem terpenů vzniká uhlovodík izopren (2-methyl-buta-1,3-dien).<sup>1</sup> Existují tři základní řetězce reakcí, které objasňují původ všech terpenů a steroidů:

- vytváření reaktivních  $C_5$  jednotek z acetátu, cestou přes mevalonát
- spojování izoprenových jednotek systémem „hlava – pata“ (mono-, seskvi-, di-, sester- and polyterpeny)
- spojování  $C_{15}$  a  $C_{20}$  jednotek systémem „pata – pata“ (vede k prekurzorům triterpenů a karotenů)<sup>2</sup>

Terpeny dělíme do několika základních skupin:<sup>1</sup>

Označení	Počet $C_5$ jednotek	Výskyt - příklady
Hemiterpeny	1	některé $C_5$ kyseliny, $C_5$ alkylderiváty – humulon, lupulon
Monoterpeny	2	složky silic – geraniol, mentol, iridoidy – loganin
Seskviterpeny	3	složky silic – farnesol, azulény, některé hořčiny – artabsin
Diterpeny	4	složky pryskyřic, balzámů, gibereliny
Triterpeny	6	některé hořčiny
Tetraterpeny	8	karotenoidy, xantofyly
Polyterpeny	n	kaučuk

Prekurzory jednotlivých skupin terpenů:

- geranyl-difosfát (GPP) – prekurzor  $C_{10}$  monoterpenů
- farnesyl-difosfát (FPP) – prekurzor  $C_{15}$  seskviterpenů
- geranylgeranyl-difosfát (GGPP) – prekurzor  $C_{20}$  diterpenů
- geranylfarnesyl-difosfát (GFPP) – prekurzor  $C_{25}$  sesterterpenů
- skvalen (2x FPP) a fytoen (2x GGPP) – prekurzory  $C_{30}$  triterpenů a  $C_{40}$  karotenů<sup>2</sup>

#### 4.1.1. MONOTERPENY

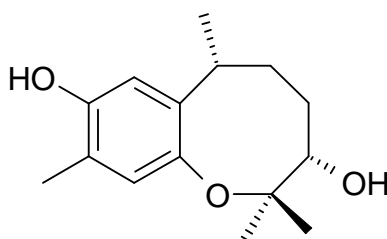
Monoterpeny patří mezi nejjednodušší sloučeniny mezi terpeny.<sup>2</sup> Reakcí dvou C<sub>5</sub>-jednotek systémem „hlava – pata“ (kondenzací dimetylalyl-difosfátu DMAPP a izopentenyl-difosfátu IPP) vzniká geranyl-difosfát.<sup>1</sup> Je známo více jak tisíc monoterpenů: „pravidelné“ struktury jsou běžnými složkami olejů, „nepravidelné“ struktury (odvozeny od chrysanthemyl-difosfátu, který nejspíše vzniká spojením dvou molekul DMAPP) jsou součástí pyretrinů a ve složení některých olejů v čeledi Asteraceae.<sup>2</sup> Od klasických terpenů se odlišují iridoidy, velmi rozšířena skupina látek, která se v rostlinách vyskytuje ve formě glykosidů. Jsou většinou deriváty cyklopentanu.<sup>1</sup>

#### 4.1.2. SESKVITERPENY

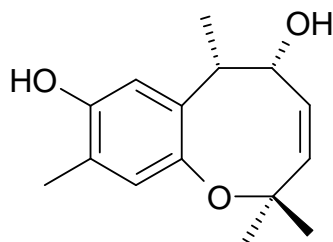
Základní skelet seskviterpenů obsahuje zpravidla 15 uhlíkových atomů. Často tvoří jednu z hlavních složek silic. Z terapeutického hlediska jsou nejvýznamnější azuleny, resp. azulenogenní seskviterpeny (např. matricin, matrikarin), které při destilaci drogy s vodou po okyselení poskytují chamazulén. Podle uhlíkových skeletů rozlišujeme několik typů seskviterpenů, a to acyklické, mono-, bi- a tricyklické. Podle substituentů je dělíme na alkoholy, ketony a seskviterpenické laktony, kterých známe okolo 3 000.<sup>1</sup>

#### HELIANNANY

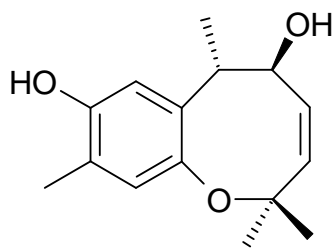
- 7, 11 – HELIANNANY<sup>10</sup>



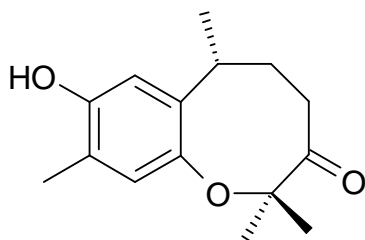
Heliannuol A



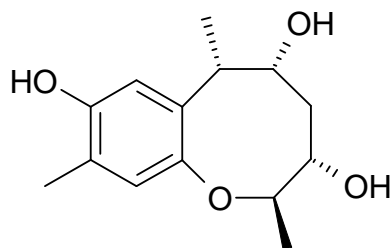
Heliannuol G



Heliannuol H

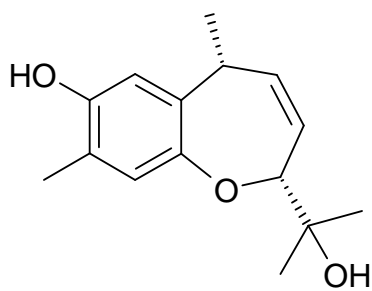


Heliannuol K

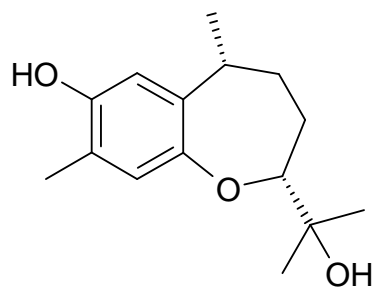


Heliannuol L

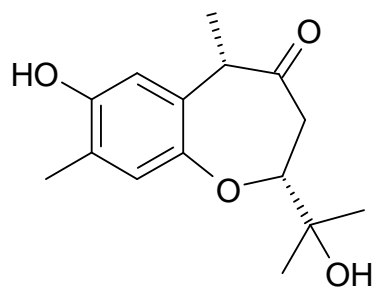
- 7, 10 – HELIANNANY



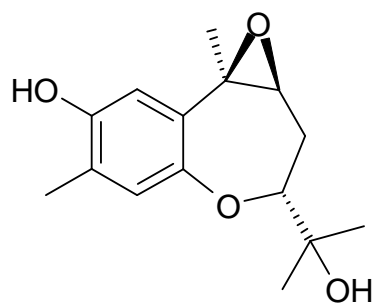
Heliannuol B



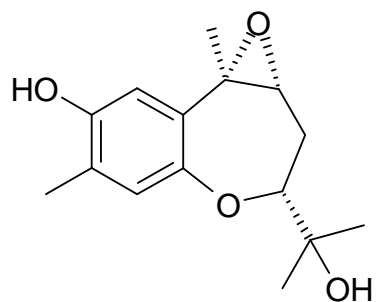
Heliannuol D



Heliannuol F

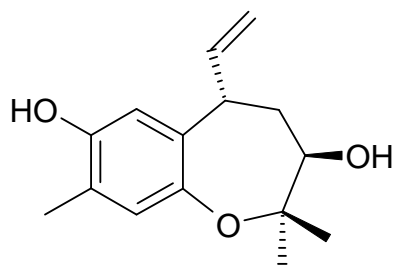


Heliannuol I



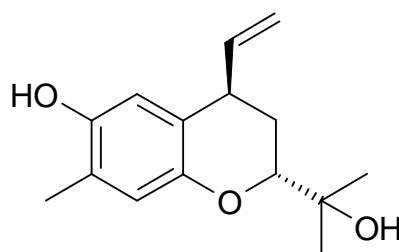
Heliannuol J

- 8, 11 – HELIANNANY



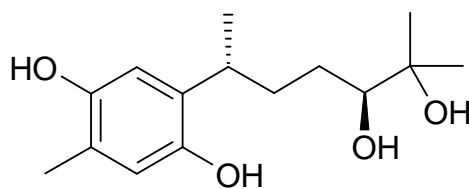
Heliannuol C

- 8, 10 – HELIANNANY

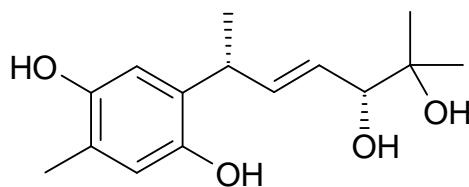


Heliannuol E

#### HELIBISABONOLY<sup>11</sup>



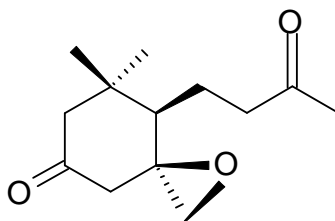
Helibisabonol A



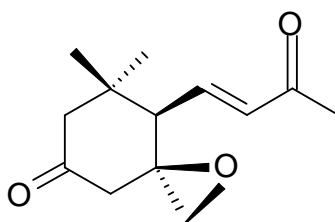
Helibisabonol B

### 4.1.3. NORSESKVITERPENY

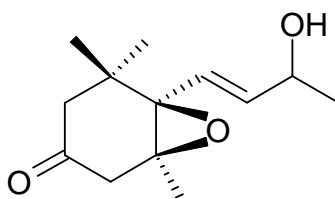
ANNUIONY<sup>11, 12, 13, 14</sup>



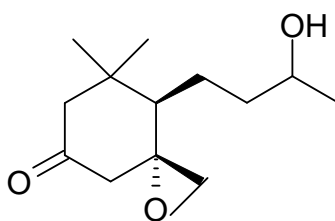
Annuion A



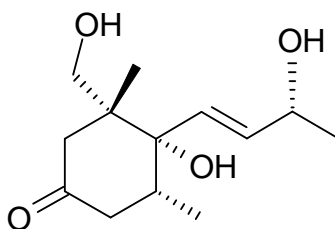
Annuion B



Annuion C

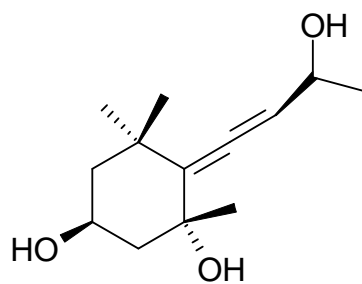


Annuion E

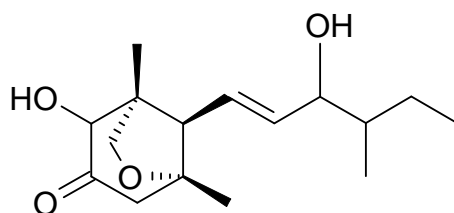


Annuion F



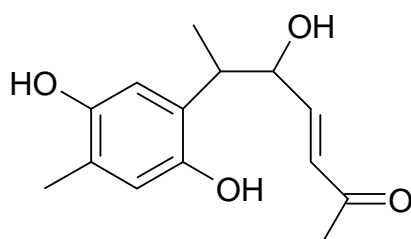


Annuion G



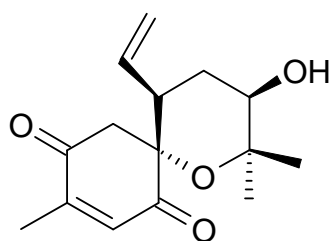
Annuion H

#### NORBISABOLEN

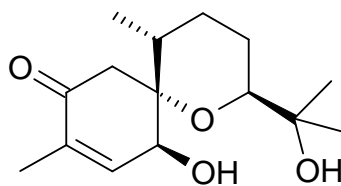


Helinorbisabon

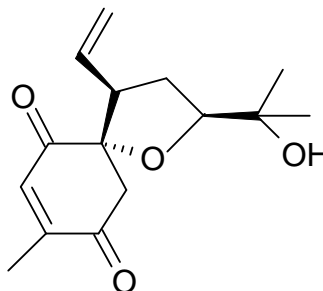
#### 4.1.4. SPIROSESKVITERPENY



Heliespiron A<sup>8</sup>



Heliespiron B

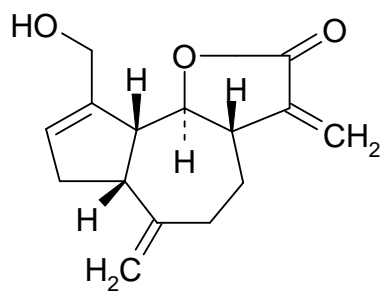
Heliespiron C<sup>9</sup>

#### 4.1.5. SESKVITERPENICKÉ LAKTONY

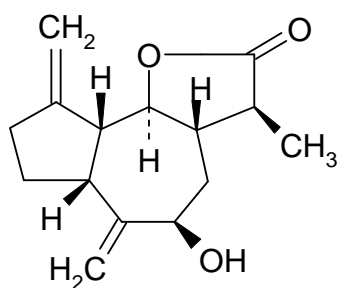
Seskviterpenické laktony jsou velkou skupinou látek, vyskytující se v čeledích a Apiaceae, Lauraceae, Menispermaceae a hlavně v čeledi Asteraceae. Jejich struktura se může měnit, ale všechny mají společný cyklodekadienový typ skeletu, který vzniká cyklizací farnesyl-difosfátu. Struktura cyklizačního produktu závisí na původní konformaci a na pozici dvojně vazby, které umožní různé intramolekulární elektrofilní cyklizace. Enzym, zahrnutý v reakci, funguje jako „základ“ pro prekurzor a určuje stereospecifitu reakce. Existuje mnoho druhotných strukturních variací, které mají vliv na:

- laktonový kruh, který může být *cis*-6,7, *cis*-7,8, *trans*-6,7 nebo v mnoha případech *trans*-7,8; je to hlavně  $\alpha$ -methyl- $\gamma$ -lakton a ve všech případech je vodík v poloze 7 v postavení  $\alpha$
- methylové skupiny (často ve formě alkoholu, karboxylových kyselin)
- nenasyčenost vazeb, které mohou být redukovány nebo oxidovány; pokud je přítomna hydroxylová skupina, je často esterifikována<sup>2</sup>

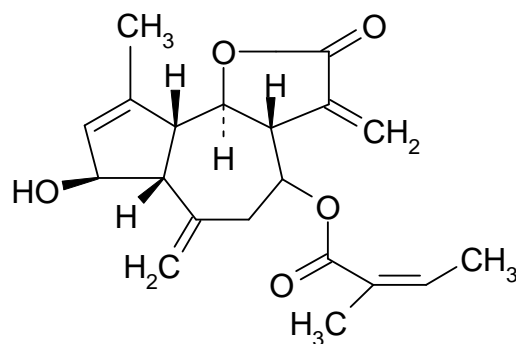
ANNUOLIDY<sup>15</sup>



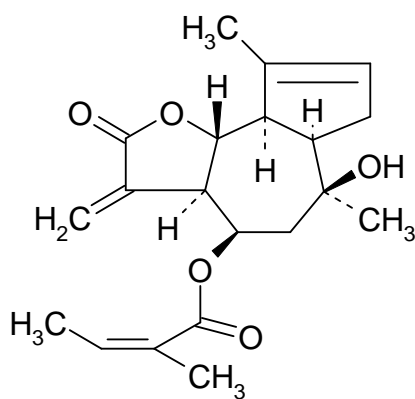
Annuolid A



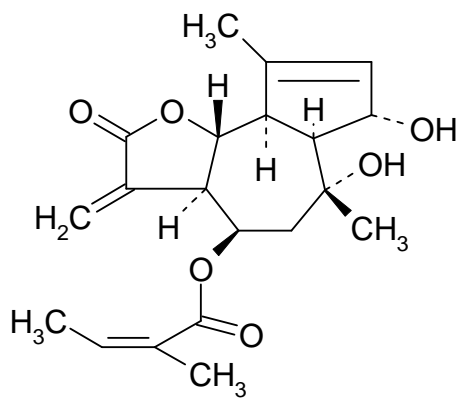
Annuolid D



Annuolid F

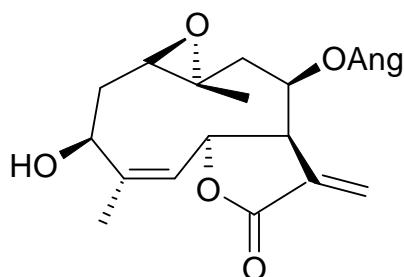


Annuolid G

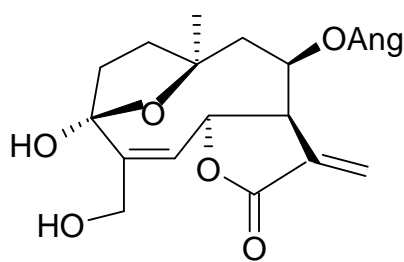


Annuolid H

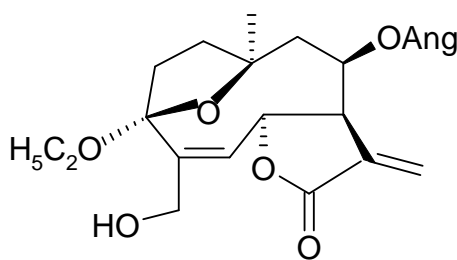
LEPTOKARPIN<sup>11</sup>



GERMAKRANOLIDY<sup>16</sup>

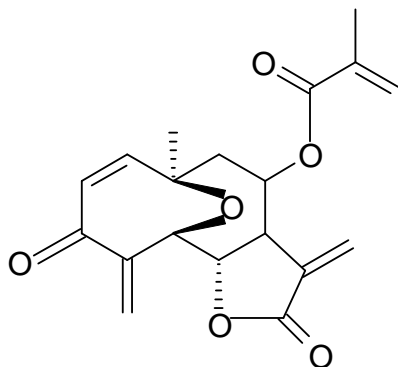


Niveusin B

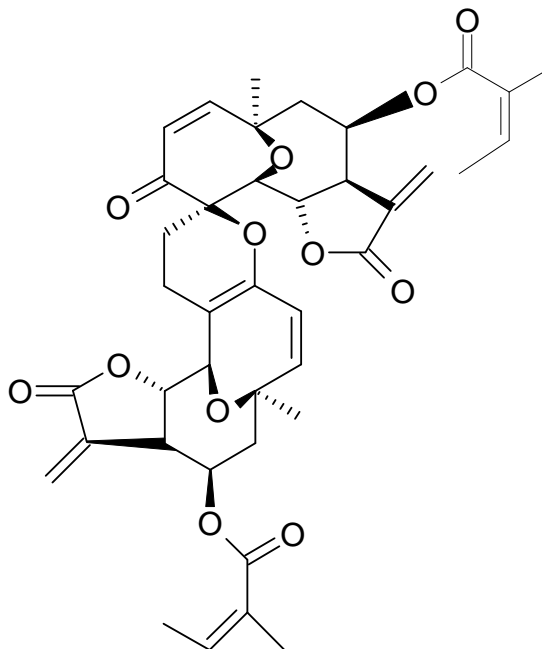


3-Ethoxyniveusin B

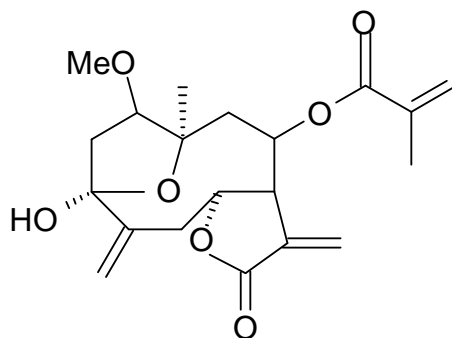
HELIVYPOLID F<sup>15</sup>



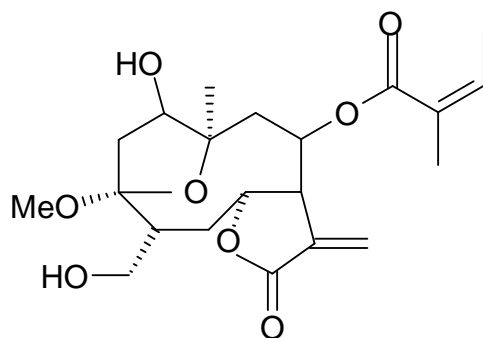
HELIVYPOLID G<sup>17</sup>



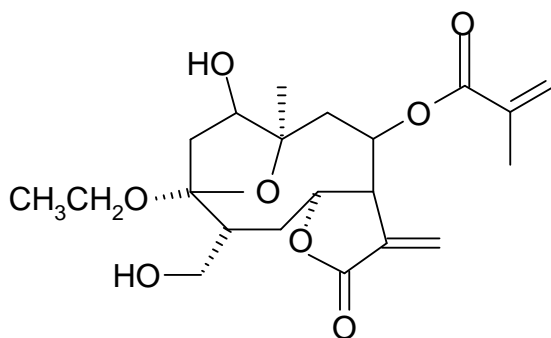
HELIVYPOLID H<sup>15</sup>



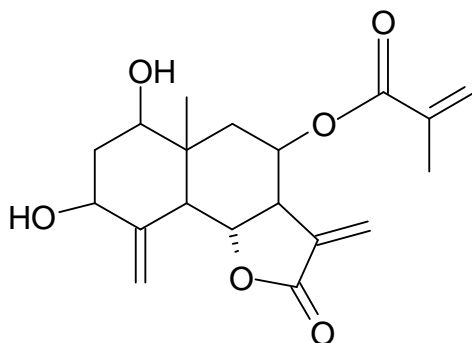
HELIVYPOLID I



HELIVYPOLID J



HELIEUDESMANOLID A<sup>15</sup>



### 4.1.6. DITERPENY

Diterpeny představují velkou skupinu 20-ti uhlíkových sloučenin, vznikající z geranylgeranyl-difosfátu. Přítomné v některém druhu hmyzu a v různých zvířecích organismech, jsou především rozšířeny v rostlinách. Některé jsou ubikviterní (gibereliny), zatímco jiné mají více omezený výskyt. Zvláště bohaté jsou na ně řády Lamiales a Asterales – přes 1 200 sloučenin reprezentuje kolem stovky struktur, a to pouze v čeledi Asteraceae. Dále jsou ještě rozptýlené v řádu Gentianales, Geraniales a Fabales. Struktura diterpenů je vysoce variabilní a přísně závisí na jejich biogenezi. Dělíme je na acyklické a cyklické sloučeniny.

- Acyklické – nejsou běžně se vyskytující sloučeniny
- Cyklické – cyklizace způsobená odstupující difosfátovou skupinou a vznikající karbokation alkyluje dvojnou vazbu. Nejčastěji to je koncový isopropyliden a tento mechanismus vede ke vzniku makrocyclu. Takový makrocyclický polynenasycený kation je velmi reaktivní. Může být stabilizován (př. eliminací protonu) nebo, a to je častější, vzniká polycyklická struktura pomocí intramolekulární nukleofilní substituce. (př. taxan). Nebo je cyklizace katalyzována kyselinou, stejně jako u triterpenů, ale bez úvodní epoxidace. Výsledkem je substituovaný dekahydronaftalen. Tento typ cyklizace vede ke dvěma řadám enantiomerů, které se liší konfigurací na uhlíku C5, C9 a C10.<sup>2</sup>

2 $\beta$ ,16 $\beta$ -*ent*-kaurandiol

15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -epoxy-17 $\beta$ -*al-ent*-kauran-19-ová kyselina<sup>18</sup>

## 4.2. SAPONINY

Saponiny jsou glykosidy izoprenoidního původu, jejichž vodné roztoky protřepáváním silně pění. Pěnivost je podmíněná jejich schopností snižovat povrchové napětí v heterogenních systémech - mezi plynem a tekutou fází. Mezi dvěma tekutými fázemi působí jako emulgátory a mezi tuhou a tekutou fází jsou dispergujícím činidlem. Kromě toho mají hemolyzující účinky. Jako všechny glykosidy se skládají z lipofilního aglykonu – sapogeninu a hydrofilní sacharidové složky. Podle struktury aglykonu sapogeninu se dělí na steroidní a triterpenoidní. Podle funkčních skupin a reakce se rozlišují saponiny neutrální, kyselé a bazické. Kyselé charakter podmiňuje karboxylová skupina aglykonu nebo sacharidové složky. Kyselé saponiny jsou většinou triterpenoidní a bazické saponiny jsou některé steroidní – obsahují v molekule dusík a patří k steroidním alkaloidům. Na sapogenin se glykosidicky nebo ve formě esteru naváže až do 12 monosacharidů nebo urónových kyselin. Oligosacharidová

složky saponinů skoro vždy tvoří běžné cukry a ty jsou vždy navázané na hydroxyl v poloze C3, někdy i na jiném uhlíku. U steroidních saponinů to bývá C26, u triterpenoidních karboxylová skupina na C28. Saponiny s dvěma cukernými řetězci se označují jako bidesmozidy, s jedním jsou monodesmozidy. Řetězce mohou být rozvětvené, přičemž pentózy se připojují na konci řetězce. Tím se steroidní saponiny odlišují od jiných steroidních glykosidů – kardioglykosidů. Některé saponiny obsahují esterově vázané kyseliny – např. octovou, jantarovou.<sup>1</sup>

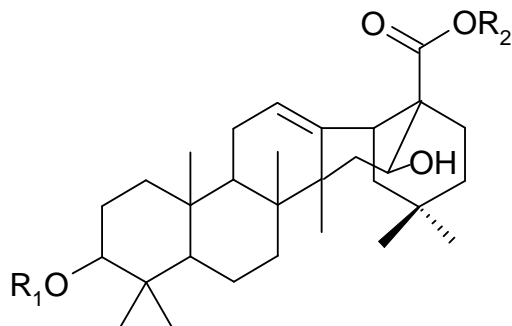
#### 4.2.1. STEROIDNÍ SAPONINY

Základní skelet tvoří cyklopentanperhydrofenantren. Tím je určena jejich příbuznost s kardioaktivními glykosidy, žlučovými kyselinami, fyto- a zoosteroly a s pohlavními a nadledvinkovými hormony. Podle bočního řetězce se rozlišují typy furostanový a spirostanový. Spirostanových saponinů je většina. Sacharidovou složku mají vázanou na C3 a na C17 je spiroacetalové seskupení. Furostanové saponiny mají alifatický boční řetězec a na C26 glykosidicky vázaný sacharid (sacharidy) – jsou teda bidesmozidy. Hydroxylová skupina na C3 může být v poloze  $\alpha$  nebo  $\beta$ , kruhy A a B mohou být *trans* nebo *cis* anelované.<sup>1</sup>

#### 4.2.2. TRITERPENOIDNÍ SAPONINY

Aglykony jsou pentacyklické triterpenoidy a dělí se na  $\beta$ -amyrinový,  $\alpha$ -amyrinový a lupeolový typ. Cukernou složku glykosidů tvoří zpravidla větší počet molekul sacharidů, které se nejčastěji váží na hydroxyl v poloze C3. Pokud má aglykon na C17 karboxylovou skupinu, může se na ni navázat ve formě esteru další molekuly cukrů.<sup>1</sup>

HELIANTHOSID<sup>19</sup>



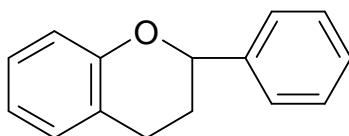
R<sub>1</sub>: ←glc(3←1rha)4←1xyl

R<sub>2</sub>: ←ara(2←1rha)4←1glc



### 4.3. FLAVONOIDY

Flavonoidy jsou v širokém slova smyslu vlastně univerzální rostlinná barviva. Téměř vždy jsou rozpustná ve vodě, jsou zodpovědná za barvu květů, ovoce a někdy i listů. Například žluté flavonoidy (chalkony, aurony a žluté flavonoly) a červené, modré nebo purpurové antokyany. Pokud nejsou přímo viditelné, přispívají k barvě jako tzv. kopigmenty. Např. bezbarvé flavony a flavonoly jako kopigmenty chrání antokyany. Někdy molekula absorbuje UV záření. Tato „barva“ je vnímána pouze hmyzem, ten je přitahován a nutně tedy dochází k přenosu pylu a je tedy splněna důležitá podmínka pro přežití rostlinných druhů. Flavonoidy jsou také běžně přítomné v kutikule listů a epidermálních buňkách, kde zajišťují ochranu tkání proti škodlivým účinkům UV záření. Všechny flavonoidy jsou deriváty 2-fenylchromanu.

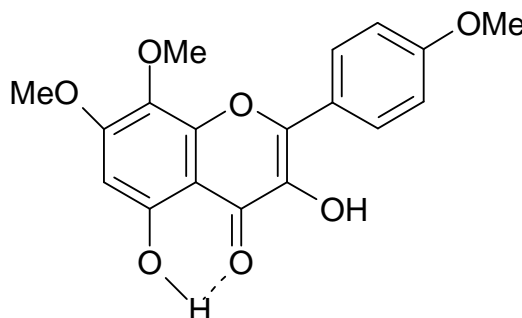


Dělení do skupin závisí na stupni oxidace centrálního pyranového kruhu:

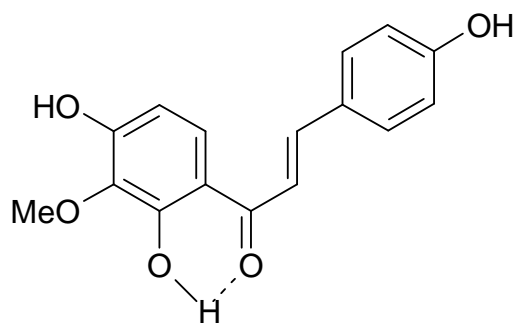
- 2-fenylchromony: flavony, flavonoly a jejich dimery; flavanony a dihydroflavonoly, (2,3-dihydrogenované deriváty); isoflavony, isoflavanony
- 2-fenylchromany: flavany; flavan-3-oly, flavan-3,4-dioly
- chalkony a dihydrochalkony (pyranový kruh je otevřený)
- 2-benzylidenkumaranony (= aurony)
- 2-fenylbenzopyrilium (= antokyany)<sup>2</sup>

Kolem třiceti typů flavonoidů je zatím identifikováno v čeledi Asteraceae.<sup>2</sup> V *H. annuus* L. bylo identifikováno pět bioaktivních flavonoidů. Flavonol tambulin, chalkony kukulkanin B a heliannon A a flavanony heliannon B a heliannon C.

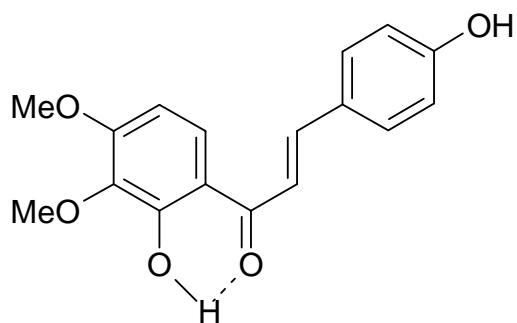
TAMBULIN<sup>20</sup>



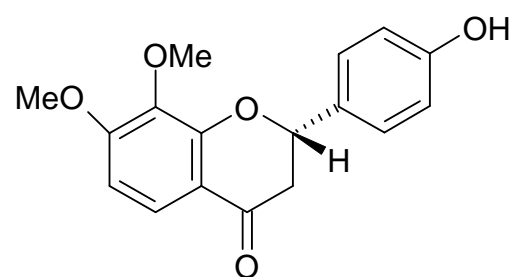
KUKULKANIN B



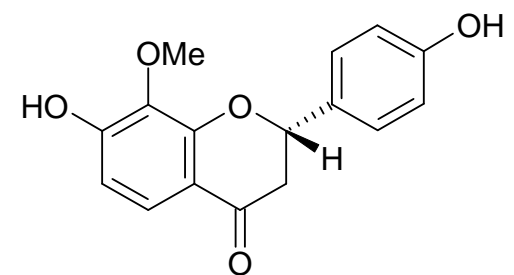
HELIANNON A



HELIANNON B



HELIANNON C



## 5. BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK

### 5.1. ALELOPATICKÁ AKTIVITA

Alelopatii obecně je označován specifický vliv jednoho druhu rostlin (donora) na klíčení, růst a vývoj druhého rostlinného druhu (recipienta). Ve většině případů se alelopatické působení projevuje inhibičně. Pouze v některých případech byl zaznamenán stimulační účinek. Inhibiční účinek je zprostředkován produkcí chemických látek rostlinami s alelopatickými vlastnostmi. Na alelopatii se vždy podílí celý komplex chemických látek nejrůznějšího složení (steroidy, silice, terpeny, kumariny, fenoly, alkaloidy, barviva atd.). Tyto látky jsou nejčastěji vylučovány kořeny rostlin nebo se dostávají do prostředí jako výluhy z nadzemních částí rostlin. Mohou se rovněž uvolňovat z rozkládajících se zbytků odumřelých nadzemních částí rostlin a kořenů. Vliv alelopatie se projevuje jednak zpomalením až inhibicí klíčení semen ostatních druhů plevelů nebo zpomalením až zastavením růstu a vývoje již vyklíčených rostlin. U některých druhů rostlin byl zjištěn autoinhibiční účinek, prostřednictvím kterého dochází k zabránění vyklíčení vlastních semen v dosahu matečné rostliny.<sup>23</sup>

Nepřiměřené užívání agrochemikálií může vést k nárůstu nežádoucích vedlejších efektů. Je tedy nutné rozvíjet nové systémy, založené na ekologickém zpracování, aby došlo k redukování závislosti na chemických herbicidech a insekticidech. Ačkoliv výzkum je v tomto směru pomalý, už máme některé nadějně výsledky. Je známo velké množství rostlin, které prokazují supresivní účinky na ostatní rostliny ve svém okolí, ale pouze některé vykazují efekt i proti plevelu. Několik studií prokázalo, že *H. annuus* L. obsahuje látky s alelopatickými vlastnostmi. Výtažek z této rostliny může být používán jako přírodní herbicid k redukování závislosti na syntetických herbicidech. Protože aktivní látky jsou v rostlinách obvykle přítomny v nízkých koncentracích, je velmi důležité rozvinout více efektivní a selektivní extrakční metodu, abychom získali požadovanou látku ze „surového“ materiálu. Superkritická kapalná extrakce (SFE) je alternativou k doplnění nebo nahrazení konvenčních separačních metod (destilace nebo extrakce rozpouštědlem), protože výsledky a separační účinnost jsou velmi dobré. Mnohdy jsou výsledky lepší než při použití konvenčních separačních metod. SFE minimalizuje zacházení s vzorkem, jeho přípravu, výtažky jsou čisté a také snižuje používání a následné čištění agresivních rozpouštědel. Metoda je momentálně velmi důkladně studována nejen pro separaci látek z rostlin, ale také pro využití v potravinářském průmyslu. Jako rozpouštědlo se většinou používá CO<sub>2</sub>, je nehořlavý, netoxický, má dobré rozpouštěcí vlastnosti, lehce odstranitelný z produktu a je levný. Byl testován efekt kosolventu (methanol, voda a DMSO – dimethylsulfoxid) na výtěžek extrakce. Také byla hodnocena aktivita extraktu získaného za různých podmínek. Jako byly počáteční

úprava - mražený vzorek nebo sušený při pokojové teplotě, tlak 500 nebo 100 barů a teplota 50 nebo 100 °C. Biologická aktivita vzorků, a to jejich stimulační či inhibiční účinek, byla testována na semenech pšenice *Triticum aestivum* L. Studie přinesla tyto výsledky. Nejlepší výtěžky byly získány při použití 5 % vody jako kosolventu, při tlaku 500 barů a teplotě 50 °C. Při tlaku 100 barů to pak byla teplota 35 °C. Všechny získané vzorky jsou bioaktivní, ale nejlepší výsledky inhibice růstu semen vykázal vzorek, zmražený při přípravě na -25 °C a při podmínkách extrakce 500 barů a 50 °C.<sup>24</sup>

Bylo prokázáno, že seskviterpenické laktony jsou schopny inhibovat růst rostlin v koncentraci přibližně  $10^{-3}$  M. U helieudesmanolidu A jako jediné sloučeniny byl prokázán stimulační efekt a to v koncentraci nižší než  $10^{-3}$  M. Toto je v přírodě velice zřídka se vyskytující jev. Obdobně se v přírodě jako rostlinné růstové promotory chovají gibereliny, cytokíny, IAA (indol-3-octová kyselina), brasinosteroidy. Účinky helieudesmanolidu A jsou podobné IAA, který inhibuje růst rostlin v koncentraci  $10^{-3}$  M, ale při nižší koncentraci růst naopak podporuje.<sup>15</sup>

### 5.2. CYTOTOXICKÁ A HEMOLYTICKÁ AKTIVITA

Triterpenoidní saponiny mají řadu zajímavých biologických účinků jako jsou protizánětlivý, protinádorový, antivirový, imunomodulační, antitusický, kardiovaskulární, cytotoxický a jiné. *In vitro*, na myších nádorových buňkách, byl testován vliv velikosti hydrofilní sacharidové části saponinu na jeho cytotoxicitu. Struktura helianthosidu obsahuje 2 navázané cukerné řetězce - trisacharidy a to v poloze C3 a C17. Studie prokázala, že odštěpením jednoho nebo dvou molekul cukrů z navázaného trisacharidu se získají saponiny s daleko menší cytotoxickou aktivitou.<sup>19</sup>

Saponiny také vykazují hemolytické vlastnosti, kdy při interakci saponinu se steroly erytrocytární membrány, dojde ke zvýšení permeability a ke ztrátám hemoglobinu. Monodesmosidy mají větší hemolytické účinky než bidesmosidy a aktivita se snižuje se vzrůstající délkou cukerného řetězce. Na stejném principu interakce s membránou se vysvětluje také potenciální spermicidní efekt triterpenoidních saponinů.<sup>2</sup>

### 5.3. ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITA

Dlouho neexistovala univerzální metoda pro testování antifungální aktivity *in vitro*. Až v roce 1992 byla vytvořena standardní metoda M27-P. Ta byla využita i v Diplomové práci H. Jahodářové (2001). Několik vzorků druhů čeledi Asteraceae byly testovány ve třech řádově odlišných koncentracích 0,01; 0,1; 1%.<sup>25</sup> Nejúčinnějším rostlinným druhem byla *Leuzea carthamoides*. *In vitro* antifungální aktivitu projevila vůči všem druhům použitých hub. Proti *Candida tropicalis* a *C. glabrata* byl účinná i koncentrace 0,01 %. Signifikantní aktivita byla patrná i u druhů *Bellis perennis*, *Helianthus annuus*, *Tanacetum vulgare*, *Cnicus benedictus*, *Eupatoriumm cannabinum* a *Xanthium spinosum*.<sup>26</sup> Všechny testované extrakty působily *in vitro* v různých koncentracích proti dermatofytům (*Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*). Byl proveden druh stupeň testování s větším rozsahem koncentrací vzorků *Bellis perennis*, *Cnicus benedictus*, *Tanacetum vulgare*, *Helianthus annuus*, *Leuzea carthamoides*. Současně byli i zařazen další kmen dermatofytů *Microsporum gypseum*. Výsledkem bylo upřesnění nejnižší účinné koncentrace vzorku *Leuzea carthamoides* – 0,007 % proti *Candida glabrata*. *Microsporum gypsem* bylo méně citlivé vůči testovaným látkám než *Trichophyton mentagrophytes*. Rešerše o obsahových látkách produkovaných v rámci jednotlivých skupin neumožňují jednoznačně přisoudit odpovědnost za antifungální aktivitu některé chemické struktury, která je specifická pro aktivní taxony.<sup>25</sup>

### 5.4. ALERGENNÍ AKTIVITA

Mnoho rostlin z čeledi Asteraceae se využívá pro lékařské účely. Bohužel je ale také známo kolem 180 druhů, které způsobují alergickou kontaktní dermatitidu. Ta se projevuje jako zčervenání a podráždění části pokožky, která přišla do kontaktu s dráždivou látkou. Velmi často jsou látkami vyvolávajícími kontaktní dermatitidu seskviterpenické laktony. Vyskytují se v listech, stoncích i květech, běžně ve velkém množství. Zpravidla nejsou toxické, ale mají intenzivní hořkou chuť, pravděpodobně k odrazení býložravců. Několik seskviterpenických laktonů je vysoce toxických (př. repin a helenalin), ale mnoho z nich má zase protizánětlivé účinky a vykazují *in vitro* relaxaci hladkých svalů.<sup>30</sup>

Většina toxických a alergenních laktonů patří do skupiny guajanolidů, eudesmanolidů, germakranolidů, pseudoguajanolidů, sekoguajanolidů, sekoedesmanolidů a sekopseudoguajanolidů. Přítomnost exocyklidké  $\alpha$ -methylenové skupiny je podmínkou vyvolání kontaktní hypersenzitivity (vazba laktonů na aminokyseliny). Toto zjištění přináší závěr o potenciální alergenní aktivitě u více než 400 seskviterpenických laktonů identifikovaných v čeledi Asteraceae. Nicméně i laktony bez methylenové skupiny, ale obsahující epoxyskupinu nebo cyklopentenový kruh mohou mít též senzibilizující vlastnosti.

Klinické zkušenosti ukazují, že jednotlivci senzitivní k těmto laktonům mají tendenci vytvářet zkříženou reaktivitu, tj. prokazují hypersenzitivitu i při kontaktu s jiným rostlinným druhem obsahujícím seskviterpenické laktony. Tato přecitlivělost byla prokázána experimentálně. Jednou prokázaná zvýšená citlivost na rostliny obsahující tyto látky znamená pro pacienta nutnost vyvarovat se všech kontaktů s těmito látkami, včetně kosmetických a léčivých přípravků, které je obsahují. Seskviterpenické laktony jsou nízkomolekulární látky, jejich schopnost indukovat hypersenzitivitu pozdního typu je podmíněn 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. Alergickou kontaktní dermatitidu způsobuje u druhu *H. annuus* 1,2-anhydrid-4,5-dehydroniveusin A.<sup>31</sup>

### 5.5. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

V posledních desetiletích se zvyšuje množství poznatků a úroveň znalostí o úloze volných radikálů při oxidačním stresu u živých organismů. Volným radikálům, které vznikají *in vivo* a mají řadu fyziologických funkcí (např. účast v protizánětlivých reakcích, v procesu fagocytosy), 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 biomolekul, významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence, tj. redukce příčin jejich vzniku.

Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem exogenních i endogenních volných radikálů, je působení antioxidantů. Antioxidanty jsou 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 své 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. Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší než příjem antioxidantních vitaminů. V řadě experimentálních studií bylo také prokázáno, že antioxidantní aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidantních vitaminů. Klinické a epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidantní aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch nebo procesů stárnutí.

Z uvedených důvodů vzrůstá zájem stanovit antioxidantní 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 antioxidantní aktivitu směsných vzorků i jako celku. Přestože hodnocení antioxidantních 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 antioxidantní aktivita zjištěná *in vitro* nemusí znamenat adekvátně významný účinek *in vivo*. O metabolických procesech v trávicím traktu, biodostupnosti a farmakokinetice přírodních látek nejrůznějšího charakteru je přitom dosud známo velmi málo.

V literatuře lze nalézt velký počet metod používaných ke stanovení antioxidantní aktivity. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Obecně mohou být kategorizovány do dvou skupin.<sup>27</sup>

### 5.5.1. METODY ZALOŽENÉ NA ELIMINACI RADIKÁLŮ

Metody spočívají v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné radikály. Radikály mohou být v reakční směsi generovány nebo jsou do reakční směsi přidávány. Z hlediska chemického jde o radikály kyslíkové (hydroxyl, peroxy) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH).<sup>27</sup>

### **Princip**

Stanovení antioxidační aktivity látek metodou sekvenční injekční analýzy (SIA) se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu.

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 2,2'-difeny-1-pikrylhydrazyl radikálu (DPPH) a 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. Ethanol 50% 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 100 ml 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 lyofilizátu (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) FIA Lab<sup>®</sup> 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 FIA Lab 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 jednobanálního systému s využitím selektivního 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.<sup>28</sup>

Antioxidační účinek je vyjádřen v procentech poklesu absorbance oproti slepému vzorku:

$$C_{\text{prům. vzorku}}/C_{\text{prům. DPPH}} \cdot 100 = X$$

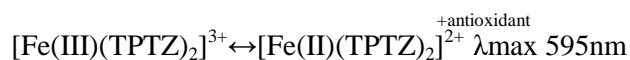
$$100 - X$$

### 5.5.2. METODY ZALOŽENÉ NA HODNOCENÍ REDOXNÍCH VLASTNOSTÍ LÁTEK

Neenzymové antioxidyanty mohou být charakterizovány jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukuje je a tím je inaktivují. Z tohoto pohledu lze antioxidační aktivitu posuzovat na základě redukční schopnosti látky.<sup>27</sup>

#### Princip

FRAP metoda je jednoduchá, spolehlivá, spektrofotometrická metoda, založená na schopnosti antioxidyantů redukovat  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{Fe}^{2+}$  jsou měřeny spektrofotometricky měřením barevného (modrého) komplexu s 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazinem (TPTZ), jehož absorpční maximum je při 595nm.



### Postup

Všechny experimenty byly dělány dle článku (O. Firuzi, 2005).<sup>29</sup> Na mikrodestičku typu P (Brand 400 $\mu$ l, Fisher) se nanese do 4 jamek 25 $\mu$ l látky v různé koncentraci 10-200 $\mu$ M. Všechny látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu nebo methanolu (3mg/3ml). Nižší koncentrace 200-10  $\mu$ M byly připraveny ředěním v acetátovém pufru pH 3,6. Reakční FRAP roztok 175 $\mu$ l, vždy čerstvě připraven a zahřát na 37  $^{\circ}$ C, byl přidán k látkám do třech jamek, do čtvrté pak bylo přidáno 175 $\mu$ l acetátového pufru (slepý vzorek). Absorbance 595nm byla měřena na přístroji Microplate reader (Anthos 2010) v různých časových intervalech až po dobu 120 min. Změna absorbance  $\Delta A_{595nm}$  byla počítána jako rozdíl absorbance slepého vzorku (substance + acetátový pufr) a směsí (175 $\mu$ l FRAP roztoku +25 $\mu$ l acetátového pufru) a absorbance antioxidantů pro každý časový interval. Všechny látky byly testovány nejméně třikrát při 37  $^{\circ}$ C. Hodnota FRAP v čase t byla počítána dle vzorce:

$$\text{FRAP}_t (\text{M}) = (\Delta a_t \text{ FI} / \Delta a_t \text{ Fe}^{2+}) \times 10^{-5}$$

Kde  $\Delta a_t \text{ FI}$  je změna v časovém intervalu t (4 a 60 minut) vztažená k testované látce při koncentraci  $1 \times 10^{-5}$  M a  $\Delta a_t \text{ Fe}^{2+}$  je změna absorbance ve stejném časovém intervalu vztažená na železnaté ionty při stejné koncentraci. Jako standardy byly využity známé antioxidanty, jako je trolox, askorbová kyselina nebo (+)-katechin.

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

### Přístroje

Jedná se o FRAP metodu modifikovanou za využití mikrodestiček. Destičky typu P 400 $\mu$ l, byly získány od firmy Fisher. Všechna měření proběhla na přístroji Microplate reader (Anthos 2010).

## 5.6. FOTOTOXICKÁ AKTIVITA

Pro ověřování fotosenzibilizačních vlastností testovaných látek se na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie provádí test, využívající experimentální metodiku screeningového testování pomocí *Tubifex tubifex* Müll. U každé testované látky jsou nejprve provedeny předběžné testy, které slouží k odhadu citlivosti testovaného organismu k danému toxinu. Při předběžných testech se zkoumá širší rozsah koncentrací. Podle jejich výsledků se zvolí oblast koncentrací k vlastnímu testování tak, aby při nejvyšší koncentraci reagovaly všechny organismy a při nejnižší koncentraci nebyl zasažen žádný organismus.

### Popis testu

Vlastní test probíhá ve 24jamkových mikrotitračních destičkách, což plně odpovídá nejnovějším trendům v ekotoxikologii a screeningové toxikologii vůbec, tj. miniaturizace uspořádání, úspora experimentálních organismů a zároveň daleko menší spotřeba než je při klasickém uspořádání v Petriho miskách.

Při každém pokusu je zároveň s fotosenzibilizujícími látkami testován  $MnCl_2$  jako standardní toxin, který ověřuje standardnost experimentálních organismů.<sup>32</sup>

### Testovaný organismus

Říše: Animalia (živočichové)

Kmen: Annelida (kroužkovci)

Třída: Oligochaeta (máloštětinatci)

Řád: Tubificida

Čeleď: Tubificidae (nítěnkovití)

Druh: *Tubifex tubifex*<sup>33</sup>



Obr. 3 (stereomikroskop, měřítko 20 : 1)<sup>34</sup>

*Tubifex tubifex* je chován v akváriu s 6 cm vrstvou písku a 8 cm vody. Světelný režim den:noc je 10:14 hodin. Akvárium je 24 hodin denně provzdušňováno, koncentrace kyslíku je 8 mg/l, teplota  $20 \pm 2^\circ C$ , pH  $7,5 \pm 0,1$ .

### **Příprava testované látky**

Množství toxinu odpovídající nejvyšší koncentraci bylo naváženo a rozpuštěno v zábrusové zkumavce v 2% roztoku dimethylsulfoxidu. K rozpuštění byla využita ultrazvuková lázeň. Z toho vzorku byly připraveny roztoky o nižší koncentraci tzv. půlovým ředěním.

### **Vlastní test**

Na počátku každého testování byl proveden test se standardním toxinem -  $MnCl_2$ . 24jamková destička je vystavena působení toxinu po dobu jedné hodiny celkem v šesti koncentracích a třech paralelních stanoveních. Po uplynutí stanovené doby je vyhodnocena mortalita. Na základě získání standardních výsledků je přistoupeno k vlastnímu testování. Připravíme koncentrační řadu alespoň 12 ředění, které je dosaženo postupným ředěním výchozího koncentrátu testované látky. Do každé jamky mikrotitrační destičky umístíme 6 jedinců. Pod stereomikroskopem ověříme jejich nezávadnost a vitalitu. Posléze přidáme testovaný toxin. Při každém experimentu jsou zachovány kontroly jedinců bez fotosenzibilizačních látek a zároveň i temnostní kontrolu, tj. vliv fototoxinů bez UV záření. Po zvolené době ozařování dochází ihned k vyhodnocení pod stereomikroskopem.

Existuje více hodnotících parametrů. V našem případě byly zvoleny dva endpointy – mortalita a poškození.

Po vyhodnocení mortality standardního toxinu ( $MnCl_2$  – chlorid manganatý, jehož indexy akutní toxicity byly stanoveny dlouhodobým sledováním.  $EC_{50}$   $MnCl_2$  byla stanovena 68, 04 mmol/l) bylo přistoupeno k vlastnímu testování. Do dvou 24jamkových mikrotitračních destiček byl přidán naředěný fototoxin tak, že byla vytvořena řada 12 koncentrací ve třech paralelních stanoveních. Mikrotitrační destičky byly umístěny pod UV lampu (366 nm; 0,3 W.cm<sup>2</sup>) za standardní teploty  $20 \pm 0,5^\circ C$ . Na konci zvolené doby ozařování byl pokus vyhodnocen a výsledky zapsány do tabulky v počtech mrtvých či poškozených jedinců.<sup>32</sup>

## **6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **6.1. CHEMIKÁLIE, CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL A PŘÍSTROJE**

#### **6.1.1. ROZPOUŠTĚDLA**

Aqua destillata

Chloroform p.a. (CHCl<sub>3</sub>)

Ethanol 96% (Et-OH)

#### **6.1.2. CHEMIKÁLIE**

2,2-difeny-1-pikryl hydrazyl radikál (DPPH)

2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ)

Vanilin

Kyselina chloristá

#### **6.1.3. CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL**

TLC hliníková fólie silikagel 60 F254 20x20 cm, tloušťka vrstvy 0,2 mm (Merk)

Silufol UV 254/366 – 150x150 mm (Kavalier Sázava)

#### **6.1.4. PŘÍSTROJE**

Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114

Přístroj na měření antioxidantní aktivity FIA Lab<sup>®</sup>

Přístroj na měření antioxidantní aktivity Microplate reader (Athos 2010)

UV lampa CAMAG

Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER 10P (Bandelin)

Analytické váhy HR-120

### 6.1.5. VYVÍJECÍ SOUSTAVY

**S1:** Et-OH : CHCl<sub>3</sub> 8,5 : 1,5

**S2:** CHCl<sub>3</sub> : Et-OH 8,5 : 1,5

**S3:** CHCl<sub>3</sub> : Et-OH 8 : 2

**S4:** CHCl<sub>3</sub> : Et-OH 5 : 5

### 6.1.6. DETEKČNÍ ČINIDLA

**D1:** 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. Na chromatogramech jsou tmavé skvrny obtaženy tužkou □.

**D2:** UV  $\lambda = 365$  nm

Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 365 nm. Pozitivní reakce se projevuje vznikem fluoreskujících skvrn různého zabarvení. Na chromatogramech jsou skvrny obtaženy tužkou ○.

**D3:** Vanilinové činidlo

Činidlo bylo připraveno těsně před detekcí smísením 1% roztoku vanilinu v 95% Et-OH s 3% kyselinou chloristou v poměru 1 : 1. Po postřiku byl chromatogram zahříván při teplotě 120 °C asi 7 minut. Pozitivní reakce se projeví vznikem různě barevných skvrn.<sup>21</sup>

## 6.2. POSTUP PŘÍPRAVY EXTRAKTU

Ve své rigorózní práci jsem navazovala na práci Mgr. Zuzany Novosadové a dále zpracovávala butanolové frakce, které nebyly ještě testovány. Bylo postupováno následujícím způsobem. 500 g usušených listů slunečnice bylo macerováno 3 dny 3 litry vody. Poté byly listy ždímány přes gázu i buničitou vatu a bylo získáno 1 650 ml extraktu. Ten byl dále vytřepáván nejdříve dichlormethanem (postup A) a pak také chloroformem (postup B). Spojením vodných vrstev po třepání dichlormethanem a chloroformem byl získán podíl, který byl dále vytřepáván butanolem v poměru 1 : 1. Takto získany butanolový podíl byl odpařen na vakuové odparce a bylo získáno 14,2601 g suchého odparku. Ten byl ve formě roztěru nanesen na kolonu (délka kolony 80 cm; průměr 5 cm; sloupec silikagelu 70 cm) a kolona byla vymývána CHCl<sub>3</sub> se zvyšujícím se procentem Et-OH. Takto bylo získáno 43 frakcí a také

byla provedena orientační TLC. Podrobnější popis přípravy extraktu a chromatogramy jsou uvedeny v Rigorózní práci Mgr. Z. Novosadové.<sup>22</sup>

Frakce, které byly na základě TLC vhodné, byly dále zpracovány a výsledky jsou obsahem této rigorózní práce.

### 6.3. ZPRACOVÁVÁNÍ FRAKCIÍ

Protože butanolové frakce nebyly zpracovány okamžitě, došlo k odpaření rozpouštědla a na stěnách zkumavek zůstaly látky ve formě krystalků nebo prášku světle žluté, oranžové barvy; popř. jako mastné kapky žluto-oranžové barvy. Po zhodnocení TLC byly dále zpracovány následující frakce.

Frakce **8, 9, 10** byly rozpuštěny v  $\text{CHCl}_3$ , nanесeny na chromatogram a vyvíjeny v soustavě S2. Podle výsledků orientační TLC byly tyto frakce spojeny a odpařeny na vakuové odparce do sucha ( $m = 55,5 \text{ mg}$ ). Vzorek pod označením **V 8–10** byl testován na fototoxickou aktivitu.

Frakce **15 a 21** byly rozpuštěny v 20% Et-OH, nanесeny na chromatogram a vyvíjeny v soustavě S3. Bylo zjišťováno, zda půjde spojit frakce 15 až 21 a dělit je následně preparativní chromatografií.



Soustava:	S1
Dráha:	10 cm
Komora:	nasyčená (30 min po nalití)
Vyvíjení:	1x
Detekce:	D1, D2, D3

**Obr. 3**

Tento chromatogram ukázal, že frakce obsahují různé látky a spojení není vhodné. Proto byly na chromatogram nanесeny k frakci **15** ještě frakce **16, 17** (obě rozpuštěny v 20% Et-OH) spolu s kyselinou kávovou.



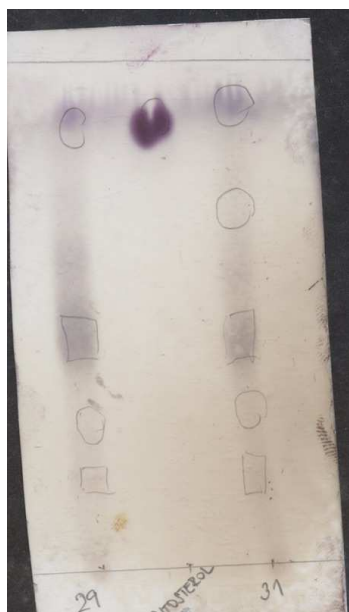
Soustava: S3  
Dráha: 10 cm  
Komora: nasycená (30 min po nalití)  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1, D2, D3

**Obr. 4**

Po zhodnocení tohoto chromatogramu bylo rozhodnuto, že dělení preparativní chromatografií by nebylo efektivní. Ve frakcích je mnoho látek a získaný výtěžek by byl velmi malý. Proto byly frakce spojeny a odpařeny na vakuové odparce do sucha ( $m = 61,1$  mg). Vzorek pod označením **V 15-17** byl testován na antioxidační aktivitu metodou SIA, dle výsledků pak i metodou FRAP, rovněž byl vzorek testován na fototoxickou aktivitu.



Frakce **29** a **31** byly rozpuštěny v Et-OH, naneseny na chromatogram a vyvíjeny v soustavě S4. Spolu s nimi byl nanesen pro srovnání i sitosterol.



Soustava: S3  
Dráha: 10 cm  
Komora: nasycená (30 min po nalití)  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1, D2, D3

**Obr. 5**

K těmto frakcím byla přidána i frakce **30**, také rozpuštěna v Et-OH a všechny frakce byly spojeny, odpařeny na vakuové odparce ( $m = 49,9$  mg) a takto získaný vzorek byl pod označením **V 29-31** testován na antioxidační aktivitu metodou SIA a dle výsledků pak i metodou FRAP.

Frakce **38**, **39**, **40** byly rozpuštěny v  $\text{CHCl}_3$  a Et-OH v poměru 1 : 1 a naneseny na chromatogram.



Soustava: S1  
Dráha: 10 cm  
Komora: nasycená (30 min po nalití)  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1, D2, D3

**Obr. 6**

Také frakce **37** byla rozpuštěna v  $\text{CHCl}_3$  a Et-OH v poměru 1 : 1 a s frakcí **38** byla nanesena na chromatogram pro srovnání spolu s kyselinou oleanolovou, palmitovou, kávovou,  $\alpha$ -amyrinem, sitosterolem a glukózou (rozpuštěna v 85% Et-OH).



Soustava: S2  
Dráha: 10 cm  
Komora: nasycená (30 min po nalití)  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1, D2, D3

**Obr. 7**

Frakce **38** byla ve formě světle žlutého prášku, a protože se jevila jako látka "relativně čistá" (Obr. 6), byla část pod označením **V 38** odeslána na rozbor pomocí plynové chromatografie. Druhá část byla testována na antioxidační aktivitu metodou SIA.

Po zhodnocení chromatogramu (Obr. 6) byly frakce **39** a **40** spojeny, rozpuštěny v 2 ml Et-OH (sonikace 1 min) a další dělení probíhalo pomocí preparativní chromatografie. Celkem bylo naneseno 18 chromatogramů, které byly vyvíjeny v soustavě S1. Po vyjmutí a vysušení chromatogramu byly pod UV lampou označeny jednotlivé rozdělené látky (zóny).

- Pod UV 254 nm zakresleny 2 zóny
  1. zóna (blíže startu) – tmavá, zháší fluorescenci
  2. zóna – světle fialová, slaběji zháší fluorescenci
- Pod UV 365 nm zakresleny 2 zóny
  1. zóna – světle fialová
  2. zóna – světle fialová

Chromatogramy byly pak rozstříhány na jednotlivé zóny, které byly rozděleny do kádinek s Et-OH a CHCl<sub>3</sub> v poměru 8,5 : 1,5 a 10 minut protřepávány, aby došlo k uvolnění vyizolované látky z fólie. Pak byla tekutina zfiltrována do vytárovaných a označených baněk a odpařena do sucha na vakuové odparce.

- Po rozstříhání
  - kádinka **1**: 1. zóna + 60 ml Et-OH : CHCl<sub>3</sub> v poměru 8,5 : 1,5
  - kádinka **2**: 2. zóna + 50 ml Et-OH : CHCl<sub>3</sub> v poměru 8,5 : 1,5
- Po odpaření váha látek
  - 1**:  $m_1 = 0,0033$  g
  - 2**:  $m_2 = 0,0034$  g

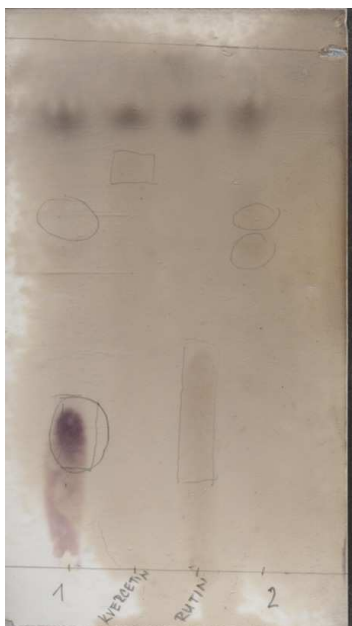
Tyto dvě vyizolované látky byly rozpuštěny v Et-OH : CHCl<sub>3</sub> v poměru 8,5 : 1,5 a naneseny na chromatogramy. Na Obr. 5 spolu s kyselinou kávovou a sitosterolem.



**Obr. 8**

Soustava:	S1
Dráha:	10 cm
Komora:	nasycená (30 min po nalití)
Vyvíjení:	1x
Detekce:	D1, D2, D3

Na Obr. 9 spolu s flavonoidy kvercetinem a rutinem.



Soustava: S1  
Dráha: 10 cm  
Komora: nasycená (30 min po nalití)  
Vyvíjení: 1x  
Detekce: D1, D2, D3

**Obr. 9**

Po opětovném odpaření do sucha na vakuové odparce byla látka 1 pod označením **V 39-40/1** odeslána na rozbor pomocí NMR. Látka 2 byla pod označením **V 39-40/2** testována na antioxidační aktivitu metodou SIA.

Pro přehlednost jsou dále uvedeny názvy frakcí a jakým způsobem byly dále testovány:

- **V 8-10** (m = 55,5 mg) fototoxicita
- **V 15-17** (m = 5,9 mg) antioxidační aktivita metodou SIA; dle získaných výsledků i alternativní metodou FRAP
- (m = 49 mg) fototoxicita
- **V 29-31** (m = 49,9 mg) antioxidační aktivita metodou SIA; dle získaných výsledků i alternativní metodou FRAP
- **V 38** (m = 3,1 mg) analýza pomocí plynové chromatografie (GC)
- (m = 4,1 mg) antioxidační aktivita metodou SIA
- **V 39-40/1** (m = 3,3 mg) analýza pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR)
- **V 39-40/2** (m = 3,4 mg) antioxidační aktivita metodou SIA

## 7. VÝSLEKY MĚŘENÍ

### 7.1. VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Měření antioxidační aktivity probíhalo na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, při laboratorní teplotě 21 °C.

#### 7.1.1. METODA SIA

Měření probíhalo na systému pro sekvenční injekční analýzu (SIA) FIA Lab<sup>®</sup> 3000. Zařízení je propojeno s počítačem a prostřednictvím programu FIA Lab for Windows 5.0 se celý proces analýzy řídí. V následující tabulce jsou uvedeny naměřené hodnoty.

**Tab. 1**

Název frakce	Naměřené hodnoty	Průměr
Slepý vzorek	0,4086	0,4012
	0,3957	
	0,3994	

**Tab. 2.1**

Název frakce	Koncentrace (mg/ml)	Naměřené hodnoty	Průměr	Pokles absorbance v %
Bu-OH V 15-17	1	0,3751	0,3764	6,19
		0,3755		
		0,3785		
	0,5	0,3815	0,3815	4,92
		0,3826		
		0,3803		
	0,25	0,3928	0,3953	1,64
		0,4031		
		0,3899		
	0,1			

Tab. 2.2

Název frakce	Koncentrace (mg/ml)	Naměřené hodnoty	Průměr	Pokles absorbance v %
Bu-OH V 29-31	1	0,4546	0,4469	0,0
		0,4403		
		0,4459		
	0,5			
	0,25			
	0,1			

Tab. 2.3

Název frakce	Koncentrace (mg/ml)	Naměřené hodnoty	Průměr	Pokles absorbance v %
Bu-OH V 38	1	0,3727	0,3761	6,26
		0,3718		
		0,3837		
	0,5	0,385	0,3869	3,56
		0,3934		
		0,3823		
	0,25	0,3939	0,3934	1,94
		0,3915		
		0,3949		
	0,1	0,4473	0,4131	0,94
		0,4021		
		0,3899		

Tab. 2.4

Název frakce	Koncentrace (mg/ml)	Naměřené hodnoty	Průměr	Pokles absorbance v %
Bu-OH V 39-40/2	1	0,3853	0,3813	4,97
		0,3853		
		0,3732		
	0,5	0,3765	0,3793	5,45
		0,3875		
		0,374		
	0,25	0,3821	0,3851	3,44
		0,3789		
		0,3943		
	0,1			

U žádného z testovaných vzorků nebyl zaznamenán významný pokles absorbance. U všech je tedy  $EC_{50} > 1$  mg/ml. Na základě těchto získaných výsledků, nebyly dále vzorky testovány na antioxidační aktivitu alternativní metodou FRAP.

## 7.2. VÝSLEDKY MĚŘENÍ FOTOTOXICKÉ AKTIVITY

Testování fototoxické aktivity probíhalo na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie při teplotě 21 °C.

Den před pokusem bylo z chovu odděleno dostatečné množství máloštětinatců potřebných pro experiment. Nítěnky byly 24 hodin před pokusem nekrmeny a udržovány při konstantní teplotě 20 °C. Pro pokus byli vybráni dospělí jedinci v rozmezí 0,0140 – 0,020 g. Výsledky byly odečteny bezprostředně po pokusech okulometricky pod mikroskopem. Byla hodnocena mortalita a poškození organismů. Zároveň byly vyhodnocovány i temnostní kontroly, tj. destičky, v nichž se nacházela fotosenzibilizující látka, ale nebyly vystaveny UV záření. Hodnoty uvedené v následujících tabulkách jsou průměrem ze 3 měření.

Tab. 3 Frakce V 8-10

H o d	Koncentrace vzorku (mg/ml)									
		7,5		3,75		1,875				
0,5	Oz	100%	100%	0%	100%	0%	17%			
		M	P	M	P	M	P			
	K	0%	33%							
		M	P							
1	Oz	100%	100%	50%	100%	17%	50%			
		M	P	M	P	M	P			
	K	0%	66%							
		M	P							
2	Oz	100%	100%	66%	100%	50%	100%			
		M	P	M	P	M	P			
	K	0%	100%	0%	17%					
		M	P	M	P					
3	Oz	100%	100%	66%	100%	50%	100%			
		M	P	M	P	M	P			
	K	0%	100%	0%	17%					
		M	P	M	P					

Pozn.: Oz – ozáření pod UV lampou (366 nm)

K – kontrola (destičky, které nebyly vystaveny UV záření)

P – poškození *Tubifex tubifex*

M – mortalita *Tubifex tubifex*

U frakce V 8-10 byly zjištěny tyto hodnoty. Při koncentraci 7,5 mg/ml byla mortalita i poškození i po 3 hodinách 100%. U koncentrace 3,75 mg/ml bylo po 0,5 hod poškození 100%, ale mortalita nulová. Po 1 hod už byla mortalita 50% a poškození stále 100%. Po 2 hod mortalita vzrostla na 66%, poškození bylo opět 100%. Stejně hodnoty byly získány i po 3 hod. U koncentrace 1,875 mg/ml bylo po 0,5 hod poškození pouze 17% s nulovou mortalitou nítěnek. Po 1 hod však už bylo poškození 50% a mortalita 17%. Po 2 a 3 hodinách byly výsledky stejné – poškození 100% a mortalita 50%. Nižší koncentrace 0,9375 mg/ml, 0,4688 mg/ml a 0,2344 mg/ml nevykázaly fototoxicitu (viz. Tab. 3 přeškrknuté buňky).

Z výsledků testu vyplývá, že frakce Bu-OH V 8-10 je fototoxická i toxická pro jedince *Tubifex tubifex*.



Tab. 4 Frakce V 15-17

H o d	Koncentrace vzorku (mg/ml)													
		7,5		3,75		1,875		0,9375	0,4688	0,2344				
0,5	Oz	100%	100%	0%	100%	0%	17%	/	/	/				
		M	P	M	P	M	P							
	K	0%	100%	0%	17%	/	/				/	/		
		M	P	M	P									
1	Oz	100%	100%	83%	100%			50%	100%	/			/	/
		M	P	M	P			M	P					
	K	66%	100%	0%	83%	/	/	/	/					
		M	P	M	P									
2	Oz	100%	100%	83%	100%					50%	100%	/	/	/
		M	P	M	P					M	P			
	K	100%	100%	0%	83%	/	/	/	/					
		M	P	M	P									
3	Oz	100%	100%	83%	100%					50%	100%	/	/	/
		M	P	M	P					M	P			
	K	100%	100%	0%	83%	/	/	/	/					
		M	P	M	P									

Pozn.: Oz – ozáření pod UV lampou (366 nm)

K – kontrola (destičky, které nebyly vystaveny UV záření)

P – poškození *Tubifex tubifex*

M – mortalita *Tubifex tubifex*

Frakce V 15-17 vykázala tyto hodnoty. Při koncentraci 7,5 mg/ml byla mortalita i poškození i po 3 hodinách 100%. U koncentrace 3,75 mg/ml bylo po 0,5 hod poškození 100%, ale mortalita nulová. Po 1 hod už byla mortalita 83% a poškození stále 100%. Stejně výsledky – tedy 100% poškození s 83% mortalitou, byly naměřeny i po 2 a 3 hodinách. U koncentrace 1,875 mg/ml bylo po 0,5 hod poškození pouze 17% s nulovou mortalitou *Tubifex tubifex*. Po 1 hod však mortalita vzrostla na 50% a poškození bylo 100%. Stejně výsledky byly opět i po 2 a 3 hodinách. Nižší koncentrace 0,9375 mg/ml, 0,4688 mg/ml a 0,2344 mg/ml nevykázaly fototoxicitu (viz. Tab. 4 přeškrnuté buňky).

Z výsledků testu vyplývá, že frakce Bu-OH V 15-17 je také fototoxická i toxická pro jedince *Tubifex tubifex*.

### **7.3. VÝSLEDKY ANALÝZY FRAKCE V 39-40/1 POMOCÍ NMR**

Analýza frakce **V 39-40/1** bude provedena ve spolupráci s Katedrou anorganické a organické chemie a to pomocí nukleární magnetické rezonance. V době sepsování této práce však nebyla analýza frakce ještě provedena, a proto zde nebudou výsledky uvedeny.

### **7.4. VÝSLEDKY ANALÝZY FRAKCE V 38 POMOCÍ GC**

Analýza frakce **V 38** byla provedena na Geronto-metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Rozbor pomocí plynové chromatografie s plamenoionizační detekcí však neprokázal žádné zastoupení mastných kyselin.

## 8. DISKUSE

Cílem této rigorózní práce bylo navázat na výzkum prováděný v průběhu Rigorózní práce Mgr. Zuzany Novosadové (2006) na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie v Hradci Králové. Zvolené frakce byly dále zpracovány a také byly testovány jejich biologické účinky. Testovaný butanolový podíl byl získán z 500 g usušených listů slunečnice pomocí macerace a vytřepávání do různě polárních rozpouštědel. Na závěr byl butanolový podíl podroben chromatografickému dělení na koloně, které dalo vzniknout 43 frakcím. Ty, které byly na základě orientační TLC vhodné, byly dále zpracovány.

Pomocí preparativní chromatografie byly na základě zhodnocení chromatogramu (viz Obr. 6) zpracovány a přečištěny spojené frakce **39, 40**. Tímto způsobem byly získány dvě látky. První pod označením **V 39-40/1** byla zaslána na analýzu pomocí NMR na Katedru anorganické a organické chemie. V době sepisování této práce však nebyla analýza ještě provedena a tak zde výsledky rozboru chybí. Druhá látka pod označením **V 39-40/2** byla testována na antioxidační aktivitu (viz dále).

Také frakce **15, 16, 17** měly být děleny pomocí preparativní chromatografie. Orientační TLC (viz Obr. 4) však ukázala, že takto postupovat by nebylo efektivní. Frakce obsahují mnoho látek a získaný výtěžek by byl velmi malý. Proto byly frakce spojeny a pod označením **V 15-17** byly testovány na antioxidační i fototoxickou aktivitu.

Frakce **38** byla ve formě světle žlutého prášku, a protože se jevila jako látka "relativně čistá" (Obr. 6), byla část pod označením **V 38** odeslána na rozbor pomocí plynové chromatografie na Geronto-metabolickou kliniku Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Provedená analýza však nepotvrdila žádnou přítomnost mastných kyselin.

Měření antioxidační aktivity a fototoxicity bylo provedeno na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Pro měření antioxidační aktivity metodou SIA, byl pro následný výpočet  $EC_{50}$  důležitý, zejména pokles absorbance u jednotlivých testovaných vzorků (viz Tab. 2.1, 2.2, 2.3 a 2.4). Z výsledků ale vyplývá, že žádný z testovaných vzorků **V 15-17, V 29-31, V 38** a **V 39-40/2** nevykázal významný pokles absorbance a tudíž nemají antioxidační aktivitu ( $EC_{50} > 1$  mg/ml u všech testovaných vzorků). Na základě těchto výsledků nebyly dále vzorky testovány na antioxidační aktivitu alternativní metodou FRAP.

K ověření fotosenzibilizační vlastností frakcí **V 8-10** a **V 15-17** byla použita experimentální metodika screeningového testování pomocí *Tubifex tubifex*. Do mikrotitračních destiček byl k 6 jedincům *Tubifex tubifex* přidán testovaný toxin a následovalo ozáření pod UV lampou (366 nm). Na konci zvolené doby ozařování byla hodnocena mortalita a poškození organismů. Test prokázal, že obě frakce **V 8-10** a **V 15-17** jsou fototoxické i

toxické pro jedince *Tubifex tubifex* a dá se tedy předpokládat, že mohou obsahovat seskviterpenické laktony a být fototoxické i toxické i pro další druhy organismů.

## 9. LITERATURA

1. Tomko, J. a kol.: Farmakognózia, Vyd. Osveta 1999, s. 69-83, 181-183, 217-223, ISBN 80-8063-014-3
2. Bruneton, J.: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, Technique&Documentation-Lavoisier 1995, pp. 266-280, 387-403, 499-516,538-545, ISBN 2-7430-0028-7
3. Jahodář, L.: Farmakobotanika, Nak. Karolinum, Praha 2006, s. 165-166, ISBN 80-246-1225-9
4. Slavík, B., Štěpánková, J.: Květena České republiky 7, Vyd. Academia, Praha 2004, s. 325
5. Jahodář, L.: Přednášky farmaceutická botanika, Hradec Králové 2003
6. [http://www.netusil.net/files\\_public/aplikovana\\_botanika/dvoudelozne.doc](http://www.netusil.net/files_public/aplikovana_botanika/dvoudelozne.doc) (10. 7. 2007)
7. <http://www.mineralfit.cz/clanek/1099--slunecnice-symbol-em-leta.html> (10. 7. 2007)
8. Macias, F. A. et al.: Heliespirone A. The First member of a Novel Family of Bioactive Sesquiterpenes, Tetrahedron Letters 39, 1998, pp. 427 - 430
9. Macias, F. et al.: Heliespirones B and C: Two New Plant Heliespiranes with a Novel Spiro Heterocyclic Sesquiterpene Skeleton, Organic Letters, 8, August 2006, pp. 4513 - 4516
10. Macias, F. A. et al.: Heliannanes – a Structure-Activity relationship (SAR) Study, Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals, pp. 103 – 124
11. Macias, F. A. et al.: Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick<sup>®</sup>, Phytochemistry 61, 2002, pp. 687 – 692
12. Macias, F. A. et al.: Bioactive norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity, Phytochemistry, Vol. 48, No. 4, pp. 631 – 636
13. Macias, F. A. 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
14. Tehmina, A., Rukhsana, B.: A bioactive annuionone from sunflower leaves, Phytochemistry, Vol. 66, Issue 16, 2005, pp. 1919 – 1921
15. Macias, F. A. et al.: Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals, Journal of Natural Products, Vol. 69, No. 5, 2006, pp. 795 – 800
16. Spring, O., Albert, K. and Hager, A.: Three Biologically Active Heliangolides from *Helianthus annuus*, Phytochemistry, Vol. 21, No. 10, 1982, pp. 2551 – 2553

17. Macias, F. A. et al.: Helivypolide G. A novel dimeric bioactive sesquiterpene lactone, *Tetrahedron Letters*, Vol. 45, No. 35, 2004, pp. 6567 – 6570
18. Suo, M. R. et al.: Two New Diterpenes from *Helianthus annuus* L., *Chinese Chemical Letters*, Vol. 17, No. 1, 2006, pp. 45 – 48
19. Bader, G., Plohmman, B., Hiller, K. and Franz, G.: Cytotoxicity of triterpenoid saponins, *Pharmazie* 51, 1996, pp. 414 – 417
20. Macias, F. A. et al.: Biactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars, *Phytochemistry*, Vol. 45, No. 4, 1997, pp. 683 – 687
21. Karlíčková, J.: Ústní sdělení
22. Novosadová, Z.: Rigorózní práce 2006, s. 45 – 53
23. <http://www.vurv.cz/weeds/cz/druhy/03.html> - 10k (16. 7. 2007)
24. Casas, L. et al.: Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *H. annuus* L., *Journal of Supercritical Fluids* 41, 2007, pp 43 – 49
25. Jahodářová, H.: Diplomová práce (2001)
26. Jahodář, L. a kol.: The screening of *in vitro* antifungal activity of *Asteraceae* of Czech provenience, 3rd International Symposium on Natural Drugs, Naples, October 2-4, 2003
27. Paulová, H., Bochařová, H., Táborská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*, *Chemické listy* 98, 2004, s. 174 – 179
28. Skála, P.: Diplomová práce (2003)
29. Firuzi, O. et al.: Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by „ferric reducing antioxidant power“ assay and cyclic voltammetry, *Biochimica et Biophysica Acta* 1721, 2005, pp. 174 – 184
30. Avalos, J., Maibach, H. I.: *Dermatologic Botany*, CRC Press LLC, 2002, pp 152, 153, ISBN 0-8493-7361-1
31. Hrdina, R., Jahodář, L. a kol.: *Přírodní toxiny a jedy*, Nak. Galén, 2004, s. 21, 22, ISBN 80-7262-256-0
32. Vytlačilová, J.: Ústní sdělení
33. Tichý, M., Rucki, M.: Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*, *Pracovní lékařství*, 48, č. 6, 1996, s. 225 – 230
34. Foto pořízeno na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie (Jahodář, L.)

## 10. **ABSTRAKT**

Má rigorózní práce se týkala zpracování butanolových frakcí listů taxonu *Helianthus annuus* L. za doprovodu biologických testů – jednalo se o testy na antioxidační aktivitu (DPPH test) a test na fototoxickou aktivitu.

Frakce V 8-10 a V 15-17 jsou fototoxické i toxické pro jedince *Tubifex tubifex* a dá se předpokládat, že může obsahovat seskviterpenické laktony a být fototoxické i toxické i pro další druhy organismů. Antioxidační aktivita nebyla u žádné z frakcí potvrzena.

## 11. **ABSTRACT**

My rigorous thesis was intend on elaboration of butanol fractions of *Helianthus annuus* L. leaves and simultaneously biological tests were done – antioxidant activity (DPPH test) and fototoxic activity.

The Fractions V 8-10 a V 15-17 are fototoxic and they are toxic for *Tubifex tubifex* organism too. We suppose the presence of seskviterpenoid lactones and therefore it can be fotoxic and toxic for next species of organisms. Antioxidant activity wasn't proved.