

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Fytochemická studie *Helianthus annuus L.*

(diplomová práce)

2006

Jiří Dresler

Chtěl bych touto cestou poděkovat prof. RNDr. Lud'ku Jahodářovi, CSc. za pomoc při vypracování této diplomové práce. Stejně tak bych rád poděkoval celému kolektivu katedry, který mi byl v nápomocen jak v činnosti experimentální, tak při zpracování vlastní diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	3
2. CÍL PRÁCE.....	5
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	7
3.1. BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA.....	8
3.1.1. Botanické zařazení.....	8
3.1.2. Charakteristika druhu.....	8
3.2. CHARAKTERISTIKA OBSAHOVÝCH LÁTEK RODU A DRUHU.....	10
3.2.1. Seskviterpeny.....	10
3.2.2. Diterpeny.....	16
3.2.3. Triterpeny a steroidy.....	19
3.2.4. Kumariny.....	22
3.2.5. Flavonoidy.....	23
3.2.6. Benzopyrany.....	25
3.2.7. Lipidové sloučeniny.....	26
3.2.8. Tokoferoly.....	28
3.2.9. Alkany.....	29
3.3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK.....	30
3.3.1. Alelopatická aktivita.....	30
3.3.2. Antimikrobiální, antifungální a antiprotozoální aktivita.....	31
3.3.3. Další biologické účinky.....	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
4.1. CHARAKTERISTIKA ZPRACOVÁVANÉHO MATERIÁL.....	34
4.2. CHEMIKÁLIE, CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL A PŘÍSTROJE.....	34
4.2.1. Chemikálie.....	34
4.2.2. Chromatografický materiál.....	35
4.2.3. Přístroje.....	35

4.2.4.	Přehled mobilních fází.....	35
4.3.	PŘEDBĚŽNÉ DĚLENÍ.....	37
4.3.1.	Schéma předběžného dělení.....	37
4.4.	ZPRACOVÁNÍ JAZYKOVITÝCH KVĚTŮ.....	37
4.4.1.	Výchozí materiál.....	39
4.4.2.	Perkolace a zpracování perkolátu.....	39
4.4.3.	Zpracování vodné fáze.....	39
4.4.4.	Zpracování chloroformové fáze.....	40
4.4.5.	Zpracování butanolové fáze.....	42
4.5.	ZPRACOVÁNÍ ÚBOROVÝCH LŮŽEK.....	48
4.5.1.	Předběžná extrakce.....	48
4.5.2.	Hlavní extrakce	50
4.5.3.	Zpracování butanolové fáze.....	52
5.	HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE.....	56
6.	SOUHRN.....	60
7.	LITERATURA.....	62

1. ÚVOD

Rostlinná říše je cenným zdrojem celé řady biologicky aktivních sloučenin. Mnoho léčivých látek i vlastních léčiv jsou rostlinného původu. Analgetika typu morfinu, atropin nebo kardiotonické glykosidy jsou významnými léčivy používanými v terapii již několik desetiletí. I dnes však lze výzkumem rostlinných metabolitů dospět k látkám, které jsou ve farmakoterapii některých onemocnění zcela zásadní jako například taxol, vinkristin či kamptotekany. Rostliny hrají rovněž důležitou roli v samoléčení, kde je naopak nutná jejich fytochemická studie z důvodu zhodnocení jejich skutečného terapeuticko-toxikologického potenciálu.

Slunečnice roční je tradiční hospodářskou plodinou. Je předmětem studia nejen kvůli svým obsahovým látkám a jejich medicínskému využití, ale též z důvodu hledání vztahů těchto látek ke škůdcům a jejich možného užití v zemědělství.

Testováním antifungálních aktivit extraktů vybraných zástupců čeledi *Asteraceae* byla právě slunečnice roční vybrána jako potenciálně vhodná rostlina pro studium jejich obsahových látek a následné hodnocení jejich biologických aktivit. Tomuto tématu je věnována tato diplomová práce.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je fytochemické hodnocení jazykovitých květů a úborových lůžek *Helianthus annuus* L.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA

3.1.1. Botanické zařazení¹

druh *Helianthus annuus L.*

rod *Helianthus*

tribus *Heliantheae*

podčeleď *Asteroideae*

čeleď *Asteraceae*

řád *Asterales*

nadřád *Asteranae*

podtřída *Asteridae*

třída *Magnoliopsida*

oddělení *Magnoliophyta*

3.1.2. Charakteristika druhu^{2,3,5}

***Helianthus annuus L.* - slunečnice roční**

Je to jednoletá, 6 – 200 (i 400) cm vysoká bylina se silnou (dole 2 až 10 cm tlustou) a vzpřímenou, olistěnou a většinou jednoduchou nebo i více úbory zakončenou, odstálou a drsně chlupatou lodyhou, která je na povrchu zelená a uvnitř vyplněna bělavou dřevinou. Listy jsou střídavé, řapíkaté, trojhranně srdčité a krátce a ztuha štětinkatě chlupaté. Latinské jméno *Helianthus annuus L.* se skládá z řeckých slov *helois*, *anthos* (slunce, květ) a *annus* (rok).

Charakteristika úborových lůžek a jazykovitých květů

Lůžko úborů je skoro ploché, plevkami porostlé a tyto plevky v době zralosti obklopují nažky. Nažky jsou obvejčité, kuželovité, 7,5 – 17 mm dlouhé, 3,5 až 9 mm široké a 2 – 5,5 mm tlusté, jemně podélně žebnaté, celé hustě a kratičce chlupaté, bílé, slámově žluté až černé, s oplodím vláknitě dřevnatým, uvnitř s olejnatým a chutným semenem. Kvete od srpna do října. Veliké úbory měří v průměru 10 až 50 cm, skládají se v terči až ze 2000 oboupohlavných, hnědých, pětičetných kvítků a na okraji je jazykovitá, zlatožlutá, 6 - 10 cm dlouhá a až 2 cm široká koruna.

Rozšíření *Helianthus annuus L.* v České republice: Semena obsahují olej dobré jakosti, který se hodí jak k jídlu, tak k průmyslovým účelům. Ze 100 kg semen se vytlačí 25 – 30 (i 50) kg oleje. Za studena lisovaného oleje se používá k jídlu, olej za horka lisovaný slouží k výrobě jemnějších mýdel, barev, margarínů aj. V zemědělství je slunečnice je využívána také jako pícnina pro krmení dobytka. Jako kulturní rostlina je hojně rozšířena.

Celkové rozšíření: Je to velmi často pěstovaná rostlina, a to jak na polích, tak i v zahradách. Pochází pravděpodobně z Mexika, odkud se dostala do Evropy v 16. století. Je pěstována v řadě zemí, především v teplých oblastech mírného pásu a v subtropech.

3.2. CHARAKTERISTIKA OBSAHOVÝCH LÁTEK DRUHU

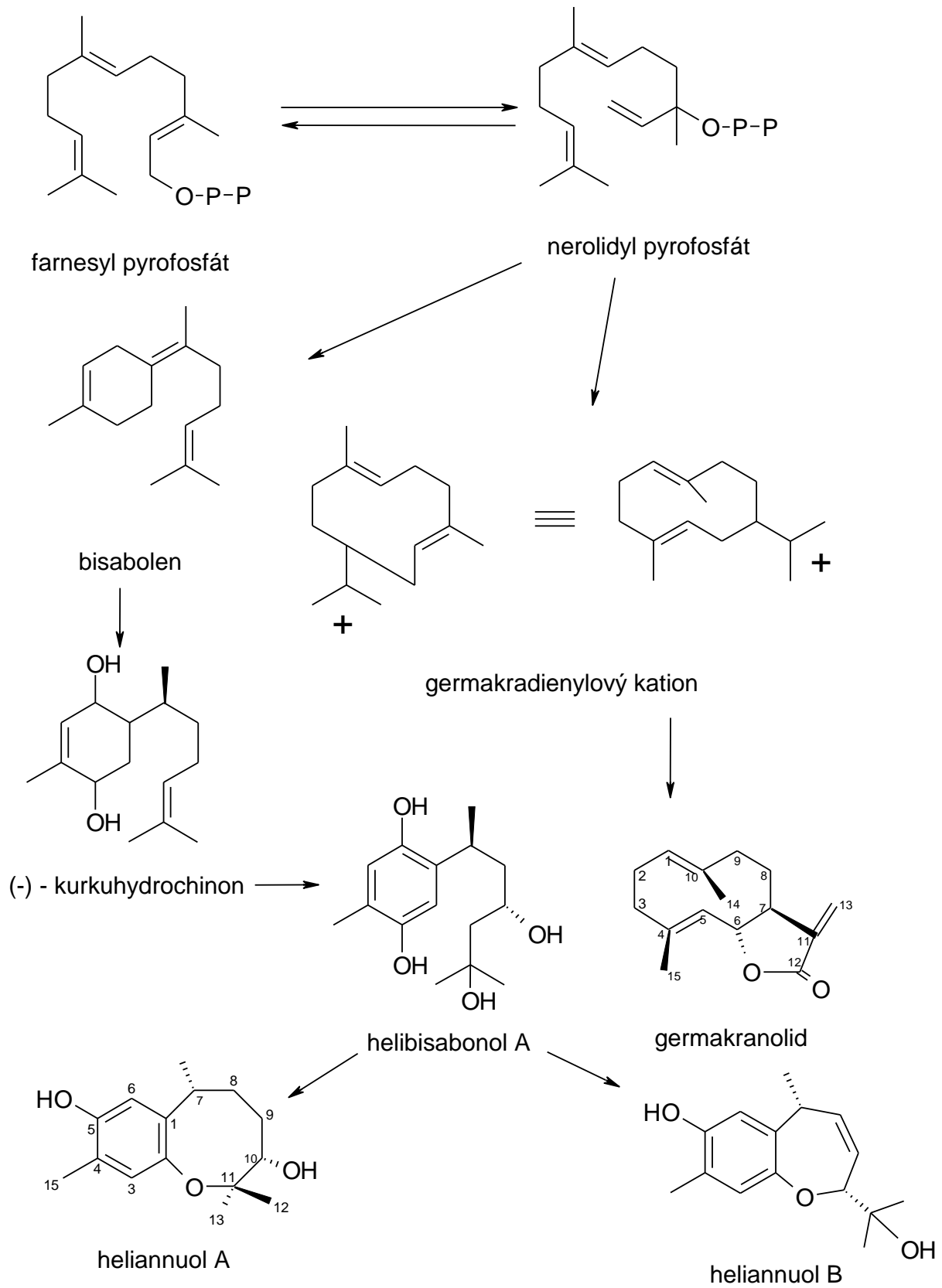
Podle základní chemické struktury

Slunečnice roční je bohatým zdrojem seskviterpenů, zejména seskviterpenických laktonů. Vzhledem k její ekonomické důležitosti, je slunečnice rozsáhle studována. Byly izolovány a chemicky charakterizovány fenolické sloučeniny (kumariny, flavonoidy, diterpeny a triterpeny)².

3.2.1. Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou 15 uhlíkaté terpenické sloučeniny. Jejich společným prekurzorem je farnesylpyrofosfát, popřípadě jeho izomer nerolidyl pyrofosfát. Z této struktury je odvozen germakradienový kation a seskviterpenický lakton germakranolid. Z nerolidyl pyrofosfátu ale také vychází biogeneze látek s šestičlenným cyklem typu bisabolanů a také sloučenin guajanolidů typu karotanu a jeho derivátů, u rodu *Helianthus* označovaných jako heliannanů⁴¹. Prekurzorem heliannanů je γ -bisabolen. Tvorba se pak ubírá cestou přes (-)-kurkuchinon a helibisabonol A³.

Biosyntéza seskviterpenů *Helianthus annuus L.*



Guajany

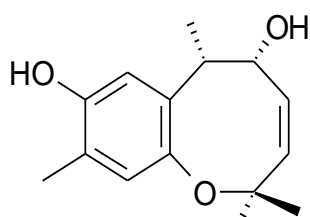
Guajany jsou bicyklické seskviterpeny skládající se z pěti a sedmiuhlíkatého přiléhajícího kruhu. Mezi guajany jsou řazeny i heliannany. Heliannany (též heliannuoly) představují typ seskviterpenů izolovaných z nadzemních částí slunečnice roční (*Helianthus annuus L.*). Je pro ně typický substituovaný aromatický kruh spojený s heterocyklem různé velikosti obsahující kyslík³.

Je zajímavé, že základní skelet heliannanu byl izolován později z mořské houby *Haliclona fascigera*³.

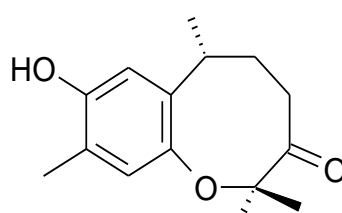
Tyto látky lze rozdělit na základě chem. struktury na 4 skupiny.

1. **7,11-heliannany**: heliannuol A^{23,8}, heliannuol G²⁵ a jeho 8 epimer (heliannuol H²⁵) a heliannuol K²⁵
2. **7,10-heliannany**: heliannuol B⁸ a jeho 8,9-hydrogenát heliannuol D⁸, 8-oxo heliannuol D (heliannuol F²⁵), a 7,8 epimery 7,8-epoxy heliannuolu B (heliannuol I²⁵ a heliannuol J^{25,26})
3. **8,11-heliannany**: heliannuol C⁸
4. **8,10-heliannany**: heliannuol E²⁴

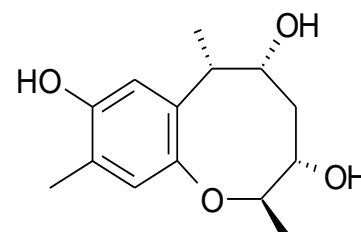
7,11-heliannany



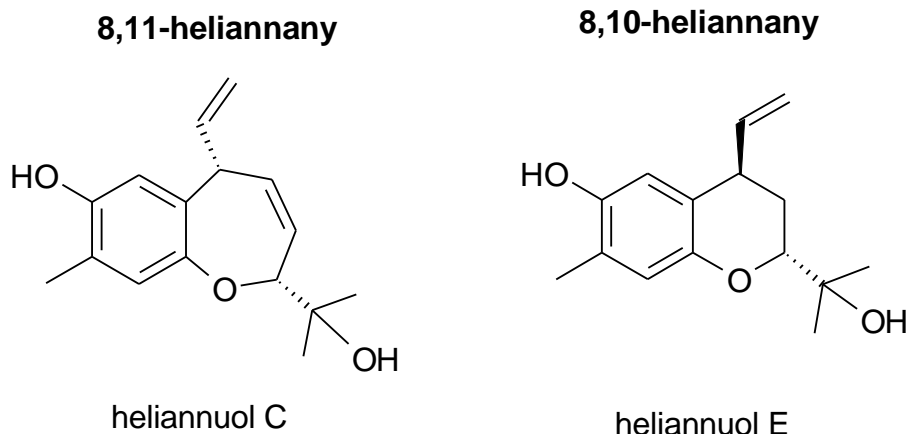
heliannuol G



heliannuol K



heliannuol L

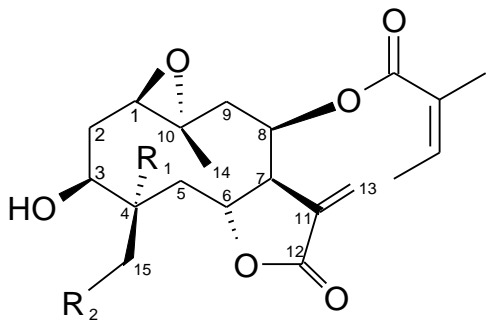


Seskviterpenické laktony

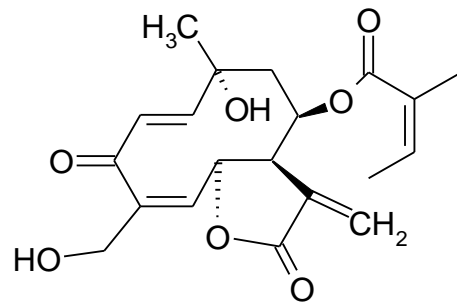
Jednou z nejbohatších skupin sekundárních metabolitů v *Helianthus annuus L.* jsou seskviterpenické laktony. Jejich přítomností u zástupců cévnatých rostlin je charakterizována především čeleď *Asteraceae*. U rostlin této čeledi se vyskytují často v žláznatých trichomech listů, stonků a květenství. Tyto sloučeniny jsou charakterizovány hořkou chutí. V *Helianthus annuus L.* se nacházejí seskviterpenické laktony typu germakranolidů. Germakrany jsou sloučeniny s 10 uhlíkatým cyklem. Přípona -olid pak značí přítomnost laktonu⁴¹.

MELEK¹⁰ identifikoval z listů agrophyllin A jako hlavní germakrolid a agrophyllin B a 4,5-dihydroniveusin A jako minoritní. SPRING^{11,12} identifikoval z listů 15-hydroxy-3-dehydrodesoxytifruticin (autorem zvaný též annuithrin) a jeho 3-hemiketal jako majoritní a agrophyllin B, niveusin C (byl nalezen i v *Helianthus niveus a v Helianthus maximiliani*), 1-methoxy-4,5-dihydroniveusin A, jeho 3-oxoformu a jeho 4,5-dihydroderivát pak jako minoritní složky, dále izoloval niveusin B, 3-O-ethylniveusin B. ALFATAFTA⁹ izoloval z celých rostlin 3-O-methyl niveusin A a 1,10-dimethoxy-3-oxo derivát agrophyllinu B. MACÍAS²² izoloval z listů seskviterpenický lakton leptokarpin, což je 4,5-dehydroagrophyllin B. MACÍAS²⁸ izoloval z listů dimerický seskviterpenický lakton helivypolid G, který má spojeny dva monomery seskviterpenového laktonu pomocí spirocyklického dihydropyranového kruhu.

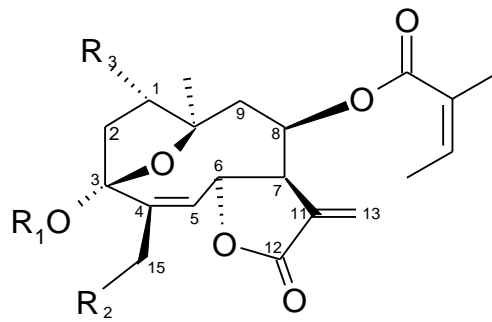
Seskviterpenické laktony *Helianthus annuus L.*



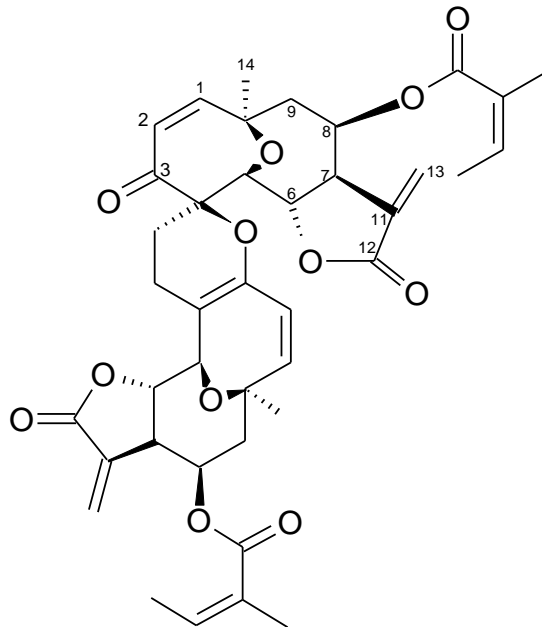
agrophyllin A $R_1=OH$ $R_2=H$
 agrophyllin B $R_1=H$ $R_2=OH$



15-hydroxy-3-dehydrodesoxyfruticin



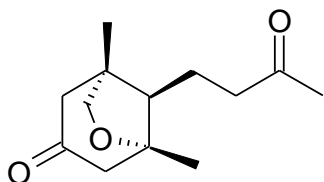
niveusin A $R_1=OH$ $R_2=OH$ $R_3=OH$
 niveusin B $R_1=H$ $R_2=OH$ $R_3=H$
 niveusin C $R_1=H$ $R_2=H$ $R_3=OH$



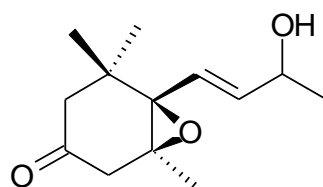
helivypolid G

Norseskviterpeny

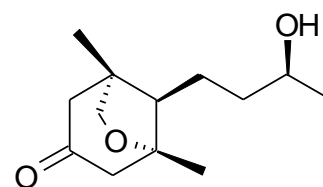
MACÍAS^{4,8,34,37} izoloval z listů bisnorseskviterpeny - annuolidy: annuionon A, jeho 7,8-dehydrogenát annuionon B, annuionon C, annuionon E, annuionon F, annuionon G (annuoiny jsou také řazeny mezi apokarotenoidy) a tři seskviterpeny bisabolenového typu: helibisabonol A, helibisabonol B a norbisabolen helinorbisabon.



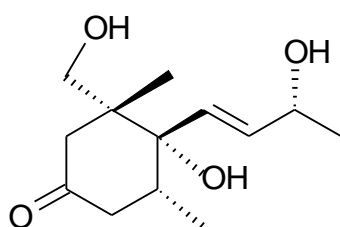
annuionon A



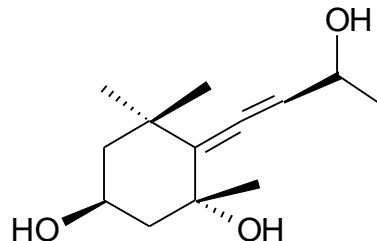
annuionon C



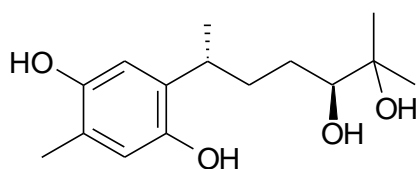
annuionon E



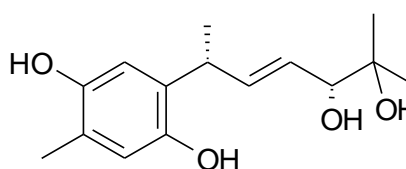
annuionon F



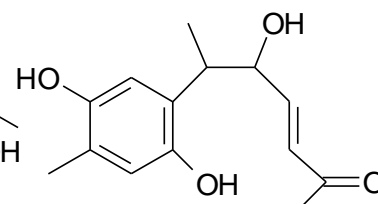
annuionon G



helibisabonol A



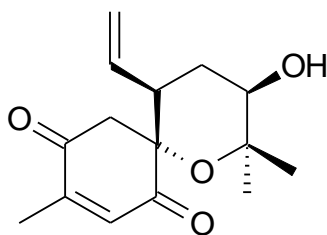
helibisabonol B



helinorbisabon

Heliespirany

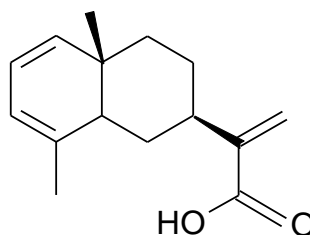
MACÍAS³⁵ izoloval z listů spirosekviterpen heliespiron A.



heliespiron A

Jiné seskviterpeny

ALFATAFTA⁹ izoloval z celých rostlin kyselinu eudesma-1,3,11(13)-trien-12-ovou.

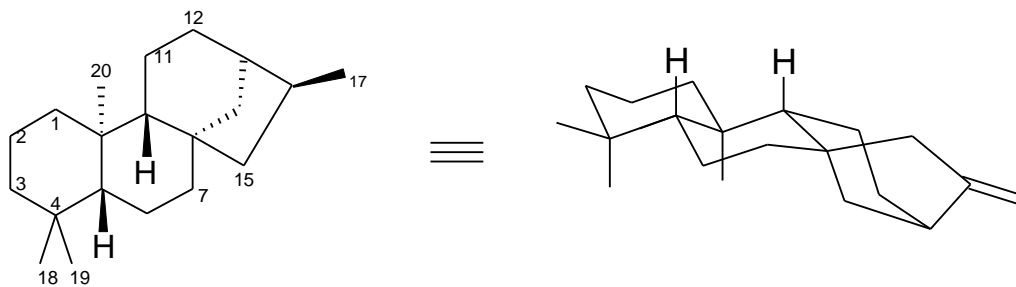


kyselina eudesma-1,3,11(13)-trien-12-ová

3.2.2. Diterpeny

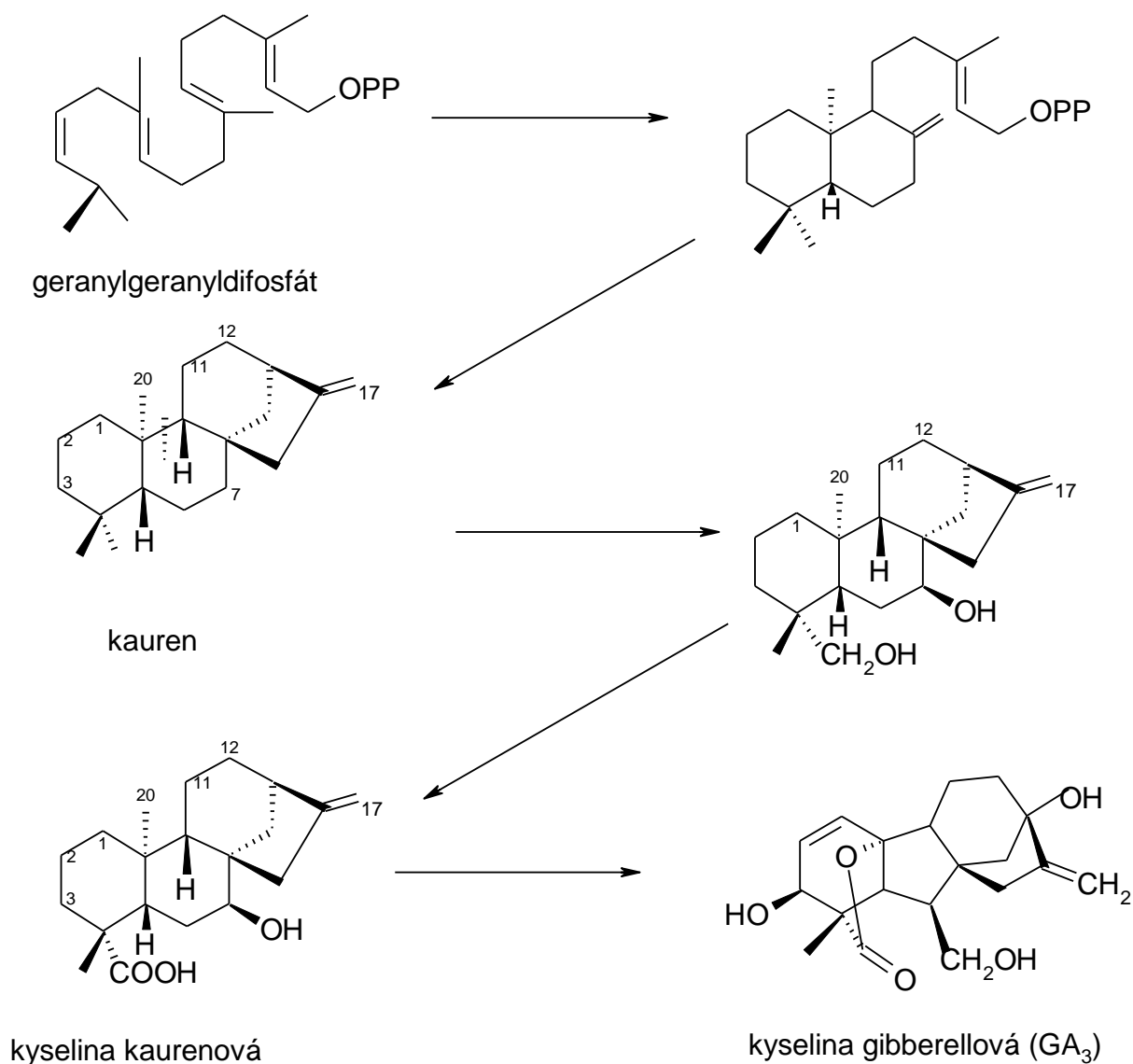
Kaureny^{5,14}

Kaurany jsou tetracyklické diterpeny. Vyskytují se jako hydrogenované kaurany nebo jako kaureny. Jsou intermediárními metabolity v syntéze gibberellinů, důležitých růstových faktorů, a některých diterpenických alkaloidů. Kaurany jsou poměrně rozšířené sloučeniny a jako prekurzory gibberellinů se objevují v celé rostlinné říši. Koncentrace endogenních gibberellinů v zelených pletivech je ale asi 10^{-9} g na gram živé váhy.



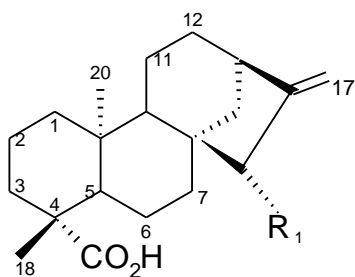
kauran

Kaureny jakožto terpeny vycházejí z mevalonátu. Jsou tvořeny kauren syntetasovou reakcí z geranylgeranyl difosfátu, který se nejprve cyklizuje a následně oxiduje.



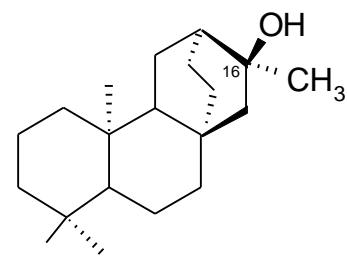
ALFATAFTA⁹ prokázal v květenstvích tyto látky: kyselina *ent*-kaur-16-en-19-ová, angelyester kyseliny grandiflorové, kyselina grandiflorová. PYREK^{6, 13} izoloval z jazykovitých květů *ent*-trachyloban-19-ovou kyselinu spolu s *ent*-kaur-16-en-19-ovou kyselinou. Později izoloval z jazykovitých květů i estery těchto dvou kyselin s thujanolem, *ent*-kaur-16-en-19-al, *ent*-trachyloban-19-al, *ent*-kauran-16 β -ol, *ent*-kauran-16 α -ol, *ent*-kauran-16 β ,19-diol, *ent*-atisan-16 α -ol a *ent*-atisan-16 β -ol. Za majoritní diterpen považuje kyselinu trachyloban-19-ovou kyselinu, ostatní její deriváty jsou pak minoritním doprovodem těchto látek. ALFATAFTA⁹ izoloval 17-oxo-trachyloban-15 α ,19-diol a kyselinu 15 α -hydroxytrachyloban-19-ovou.

Kauranové deriváty *Helianthus annuus L.*

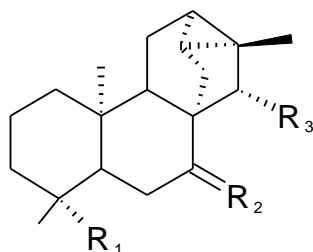


kyselina *ent*-kaur-16-en-19-ová
 kyselina grandiflorová
 angelát kys. grandiflorové
 (ester s kyselinou angelikovou)

R₁=H
 R₁=OH
 R₁=OAng



ent-atisan-16 alfa-ol



kyselina trachyloban-19-ová

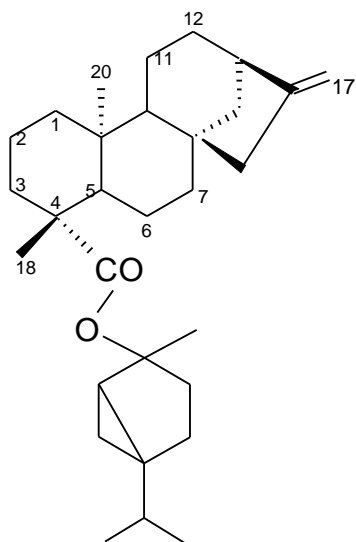
R₁=COOH R₂=H R₃=H

kyselina 15 α -hydroxytrachyloban-19-ová

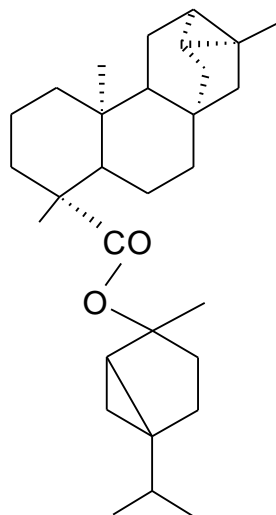
R₁=COOH R₂=H R₃=OH

7-oxo-trachyloban-15 α ,19-diol

R₁=CH₂OH R₂=O R₃=OH



ester thujanolu a kyseliny
ent-kaur-16-en-19-ové

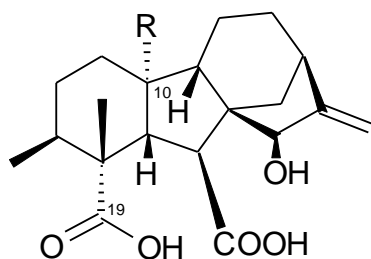


ester thujanolu a kyseliny
ent-trachaloban-19-ové

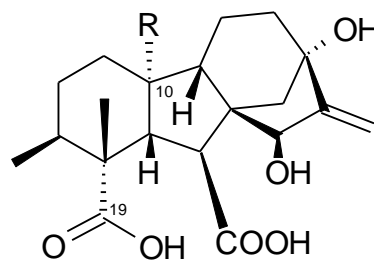
Gibberelliny

Gibberelliny jsou růstové faktory izolované z askomycety *Gibberella fujikuroi*. Chemicky jde o diterpenické kyseliny; dnes je známých 70 typů, z toho 20 u vyšších rostlin. Jsou syntetizovány u vyšších rostlin ve vrcholech prýtu a také v mladých listech a embryích. V rostlině je obvykle 2 a více gibberellinů, včetně glykosidicky vázaných⁴².

HUTCHINSON³⁸ izoloval ze semen gibberelliny GA₁, GA₄, GA₁₉, GA₂₀, GA₄₅, GA₆₄, GA₆₅, GA₆₆, GA₆₇, GA₇₂ a dále pak sloučeniny, které OWEN³⁹ identifikoval jako GA₁₀₀, GA₁₀₁ a GA₁₀₂. CASTELLARO⁴⁰ izoloval ze zralých semen gibberelliny GA₇₅, GA₇₆ a 3-*epi*-GA₇₂.



GA₆₄ R=CH₂OH (19,10 - lakton)
GA₆₅ R=CHO
GA₆₆ R=COOH



GA₁₀₀ R=CH₃
GA₁₀₁ R=CH₂OH (19,10 - lakton)
GA₁₀₂ R=COOH

3.2.3. Triterpeny a steroidy

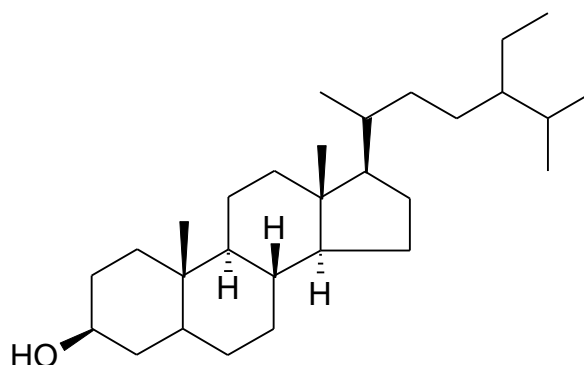
Triterpeny jsou sloučeniny obsahující 30 atomů uhlíku. Jejich základní uhlíkatý skelet lze formálně rozložit na 6 jednotek isoprenu. Jedná se o struktury alifatické, tricyklické, tetracyklické a pentacyklické. Biodegradací tetracyklických triterpenů vznikají steroidy, které se spolu s terpeny řadí do skupiny látek označovaných jako terpenoidy²⁸.

Triterpenické alkoholy

1.) Fytosteroly

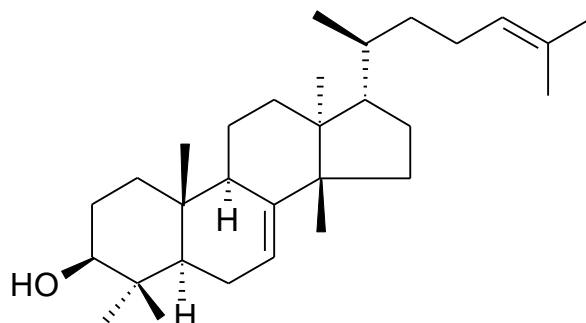
Rostlinné steroly-phytosteroly jsou sekundární alkoholy, při normální teplotě jsou to pevné látky. Jejich jméno pochází z řeckého steros (pevný) a koncovky pro alkohol-ol. Fytosteroly mají perhydro-1,2-cyklopentanofenantrenový skelet, kruhy A-B a C-D jsou spojeny trans, v poloze 3 β je vázána sekundární alkoholická skupina. Fytosteroly se pravděpodobně vyskytují ve všech krytosemenných a nahosemenných rostlinách i v houbách, řasách, lišejnících a bakteriích. Nejčastěji se vyskytuje β -sitosterol, stigmasterol, campesterol a ergosterol. Při biosyntéze fytosterolu se nejprve známým způsobem z acetyl-CoA, přes acetylacetát, kyselinu hydroxymethylglutarovou, mevalonovou a geranylpyrofosfát syntetizuje skvalen. Dále následuje syntéza vlastních steroidů. Fytosteroly mají v organismu nejméně 2 funkce - jsou prekurzory pro syntézu ostatních steroidních látek a jsou důležitou složkou buněčných membrán – stabilizují je a účastní se řízení jejich rozpustnosti, k tomu je důležitá volnost C₃- β hydroxylové skupiny pro interakci s fosfolipidy³⁰.

SCHULZ²⁸ izoloval z pylových zrn β -sitosterol, stigmasterol (3,4,22,23-dehydrogen- β -sitosterol), isofukosterol (5,6,24,25-dehydrogen β -sitosterol) a neophytadien.



β -sitosterol

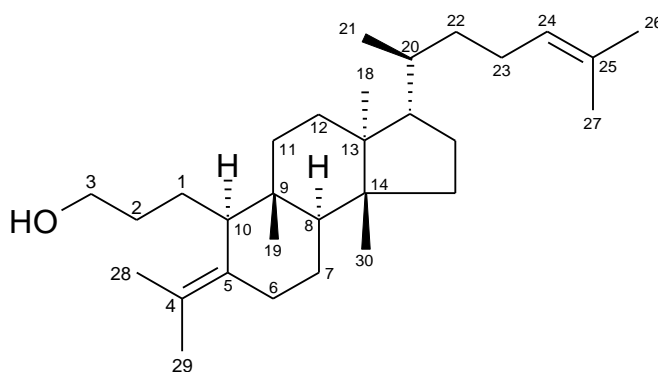
UKIYA²⁰ izoloval z pylových zrn Δ^7 -tirucallol.



Δ^7 -tirucallol

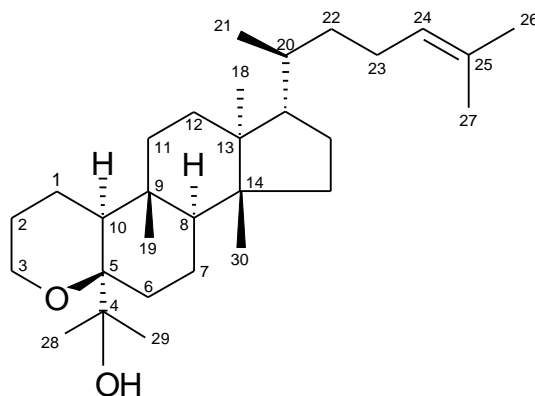
2.) Sekotirucallany

UKIYA²⁰ izoloval z pylových zrn tyto sloučeniny: triterpenický alkohol helianol (3,4-*seko*-19(10→9)-*abeo*-8 α ,9 β ,10 α -tirucalla-2,24-dien-3 β -ol) a jeho 3-oktanoát jako majoritní triterpenovou složku, která popřípadě může být doprovázena malým množstvím hexanoátu, dekanoátu a dodekanoátu²⁸, (24S)-24,25-dihydroxyhelianyl-3-oktanoát a jeho 24R epimer, 4 α ,5 α -epoxyhelianol a jeho 3-oktanoát, (24S)-4 α ,5 α :24,25-diepoxyhelianyl-3-oktanoát a jeho 24R epimer, (24S)-24,25-dihydroxy-4 α ,5 α -epoxyhelianyl-3-oktanoát a jeho 24R epimer²⁰.



helianol

UKIYA²¹ později izoloval z pylových zrn sloučeniny odvozené od 3,4-*seko*-tirucallanu: sunpollenol (4-hydroxy-3,4-*seko*-glutinan-3,5 β -oxid), (24R)-24,25-epoxysunpollenol a jeho (24S) epimer, (23E)-dehydro-25-hydroxysunpollenol a (24R)-24,25-dihydroxysunpollenol a jeho (24S) epimer.

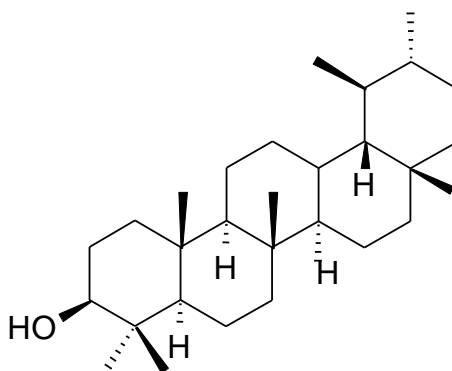


sunpollenol

Pentacyklické triterpeny

1) skupina ursanu (α -amyrinu)

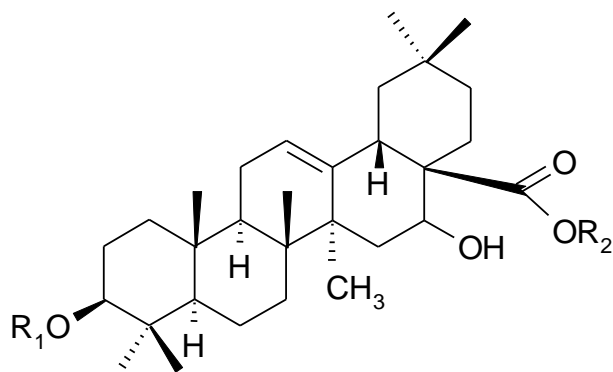
UKIYA²⁰ izoloval z pylových zrn α -amyrin.



α -amyrin

2) skupina oleananová (β -amyrinu)

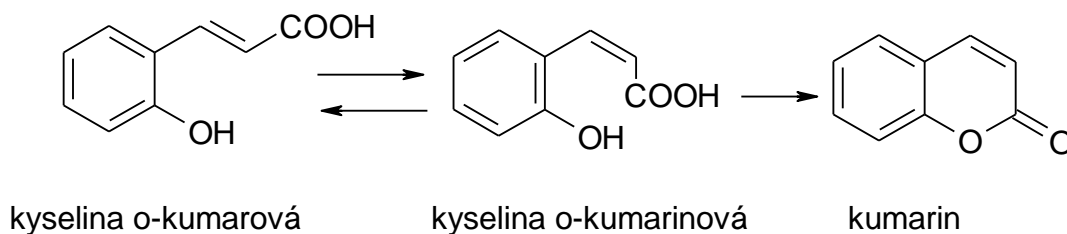
BADER³¹ izoloval z celých rostlin bidesmosidy helianthosid 1, 2 a 3.



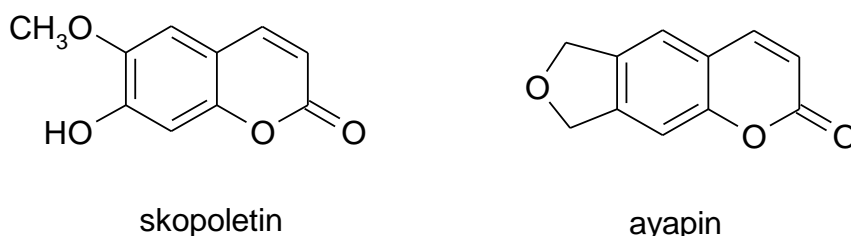
helianthosid 2 $R_1 = -1,6 \text{ glc}-1,4 \text{ glc}-1 \text{ rha}$ $R_2 = -1,2 \text{ ara}-1,4 \text{ rha}-1 \text{ glc}$

3.2.4. Kumariny

Svou strukturou jsou kumariny deriváty α -chromonu. Vznikají z cis-formy kyseliny o-hydroxyskořicové vytvořením laktonu. Prekursory kumarinu v rostlinách jsou glykosidy kyseliny o-kumarové (trans-forma) a kyseliny kumarinové (cis-forma), které jsou enzymem izomerasou udržovány ve vzájemné rovnováze. Při sušení se glykosid štěpí a tvoří se kumarin, lakton volné kumarinové kyseliny, která se stále vytváří z kyseliny o-kumarové v důsledku posunu rovnováhy³³.

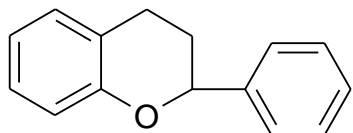


MURRAY³² uvádí přítomnost skopoletinu, jeho O-glukosidu a ayapinu.

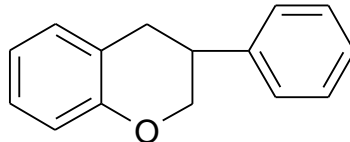


3.2.5. Flavonoidy

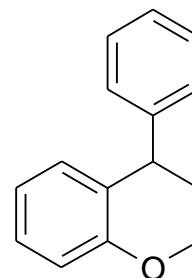
Flavonoidy tvoří početnou skupinu žlutých nebo oranžových rostlinných látek. Jedná se o deriváty fenylochromanu. Základem jejich struktury je chroman arylovaný v poloze 2 (flavany), 3 (izoflavany) nebo 4 (neoflavany).



flavan



isoflavan

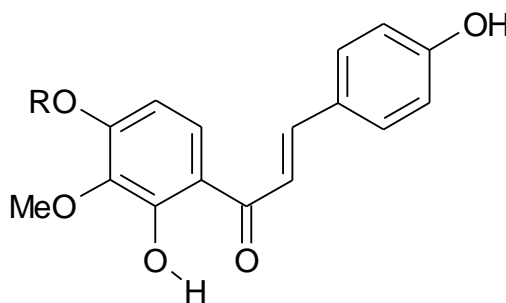


neoflavan

Flavonoidy jsou látky vyskytující se pouze v rostlinné říši a to nejčastěji ve formě flavanů. Jednotlivé flavonoidy se od sebe dále liší počtem a polohou hydroxylových skupin na aromatických kruzích, přítomností dvojných vazeb a napojením cukrů nebo organických kyselin. V rostlinném organismu se vyskytují v podobě glykosidu nebo volného geninu²⁹.

Chalkony

MACÍAS³⁶ izoloval z listů kukulkamin B a heliannon A.

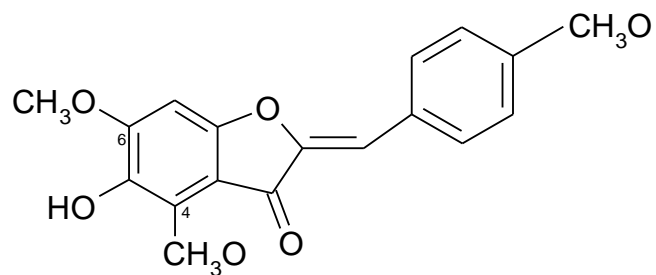


kukulkamin B
heliannon A

R=CH₃
R=H

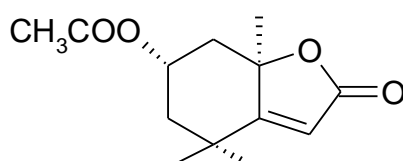
Aurony

ALFATAFTA⁹ prokázal v květenstvích 5-hydroxy-4,6,4'-trimethoxyauron.



5-hydroxy-4,6,4'-trimethoxyauron

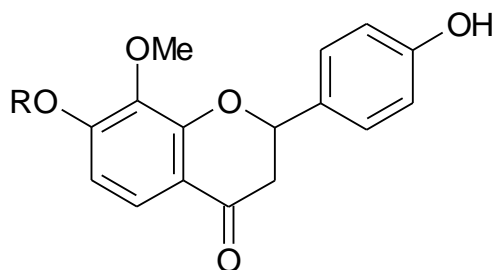
PYREK¹³ izoloval z jazykovitých květů loliolid acetát.



loliolid acetát

Flavanony

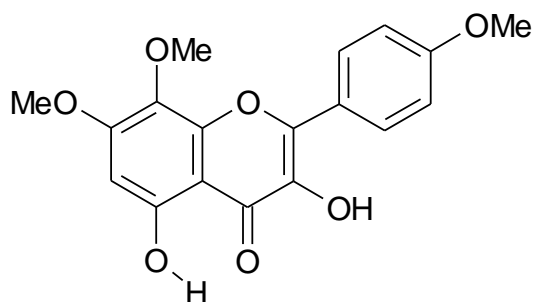
MACÍAS³⁶ izoloval z listů heliannon B a heliannon C.



heliannon B	R=CH ₃
heliannon C	R=H

Flavony

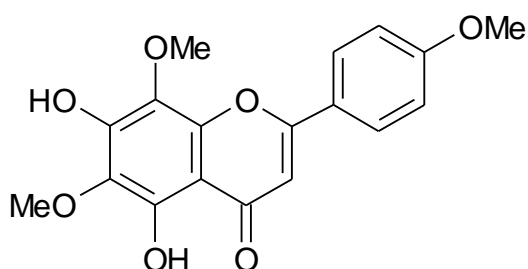
MACÍAS³⁶ izoloval z listů tambulin.



tambulin

Flavonoly

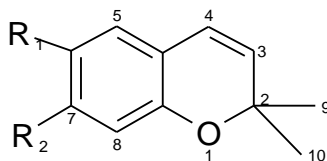
ALFATAFTA⁹ potvrdil izolací z květenství přítomnost nevadensinu.



nevadensin

3.2.6. Benzopyrany

SATOH⁷ izoloval z úborových lůžek sloučeniny typu benzopyranů. Byly identifikovány jako demethoxyencecalin (6-acetyl-2,2-dimethyl-1,2-benzopyran) a demethylenecalinin (6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethyl-1,2-benzopyran).



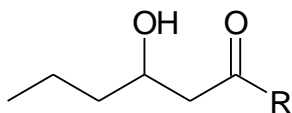
demethoxyencecalin	$R_1 = \text{CH}_3\text{CO}$	$R_2 = \text{H}$
demethylenecalinin	$R_1 = \text{CH}_3\text{CO}$	$R_2 = \text{OH}$

3.2.7. Lipidové sloučeniny

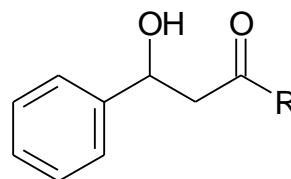
Dioly

UKIYA²⁰ izoloval z pylových zrn *syn*-nonadecan-4,6-diol, *syn*-hencosan-4,6-diol a *syn*-docosan-4,6-diol. SCHULZ²⁸ stanovil výše uvedené sloučeniny jako hlavní

dioly pylu a izoloval z pylu další sloučeniny typu β -diolů. Majoritními sloučeninami jsou 4,6-dioly doprovázené malými množstvími 5,7-, 6,8-, 10,12- a 1-fenyl-1,3-dioly. Délka řetězce se pohybuje od 19 do 25 uhlíků.



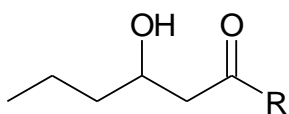
β -diol $R=C_{13}H_{27} - C_{19}H_{39}$



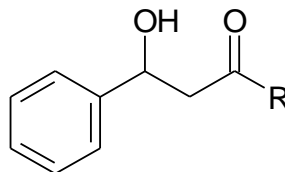
1-fenylalkan-1,3-ol $R=C_{19}H_{39} - C_{24}H_{49}$

Hydroxyketony

SCHULZ²⁸ izoloval z pylu sloučeniny typu β -ketolů. Mezi izolovanými látkami byly alkanony typu 4-ol,6-on a jejich polohové izomery 6-ol-4-on, 5-ol-7-on a 6-ol-8-on a jejich polohové izomery 6-on-8-ol. Délka řetězce se pohybovala mezi 17 až 27 uhlíky. Izoloval také 3-hydroxy-1-fenylalkanony a jejich polohové izomery 1-ol-3-on s délkou postranního řetězce od 22 do 27 uhlíků. Majoritním β -ketolem byl 4-hydroxy-6-nonadekanon.



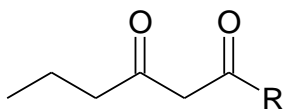
β -ketol $R=C_{13}H_{27} - C_{21}H_{43}$



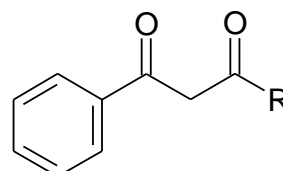
1-hydroxy-1-fenyl-3-alkanon $R=C_{19}H_{39} - C_{24}H_{49}$

Alifické ketony

SCHULZ²⁸ izoloval z pylových zrn celou řadu β -diketonů, hlavní skupinu lipidů pylu. Jako majoritní sloučeniny stanovil 4,6-diony a 6,8-diony a 10,12-diony pak jako minoritní. Délka řetězce jednotlivých sloučenin se pohybovala od 18 do 33 uhlíků. Izoloval rovněž do té doby neznámé 1-fenylalkan-1,3-diony.

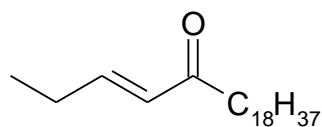


β -diketon $R=C_{13}H_{27} - C_{27}H_{55}$



1-fenylalkan-1,3-dion $R=C_{14}H_{29} - C_{24}H_{49}$

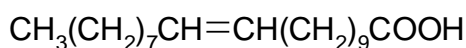
UKIYA²⁰ izoloval z pylových zrn (3E)-trikos-3-en-5-on.



(3E)-trikos-3-en-5-on

Mastné kyseliny

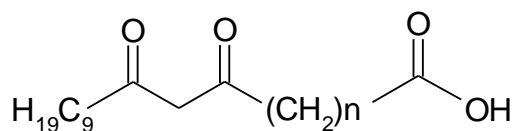
SCHULZ²⁸ izoloval z pylových zrn řadu nasycených mastných kyselin od hexanové po nonakosanovou s výjimkou C₇ a C₂₇ kyselin. Nenasycené mastné kyseliny jsou reprezentovány kyselinou hexadec-9-enovou (9-16:1), 9-18,1, 11-18:1, 9,12-18:2, 18:3, 11-20:1, 11,14-20:2 a 13-22:1. Hlavní látkou je kyselina 11-eikosenová.



kyselina 11-eikosenová

β-dioxoalkanové kyseliny

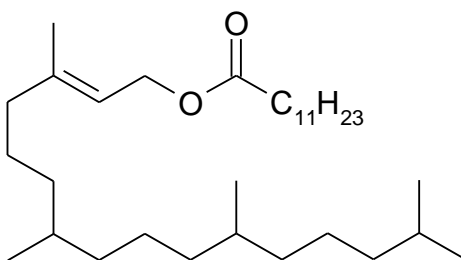
UKIYA²⁰ izoloval z pylových zrn kyselinu 14,16-dioxopentakosanovou. SCHULZ²⁸ její přítomnost potvrdil a izoloval z pylových zrn řadu dalších ω-6,8, ω-10,12 a ω-12,14-β-dioxoalkanových kyselin. Délka jejich uhlíkatého řetězce se pohybovala od 24 do 29 uhlíků.



β-diketoalkanové kyseliny n=11-15

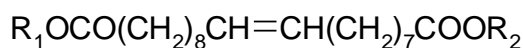
Estery mastných kyselin

SCHULZ²⁸ izoloval z pylových zrn ftylyldekanoát, menší množství dodecylalpmítátu, oktyleikosanoátu a oktyleikosadienoátu a menší množství methylesterů výše zmiňovaných mastných kyselin.



ftylyldodekanoát

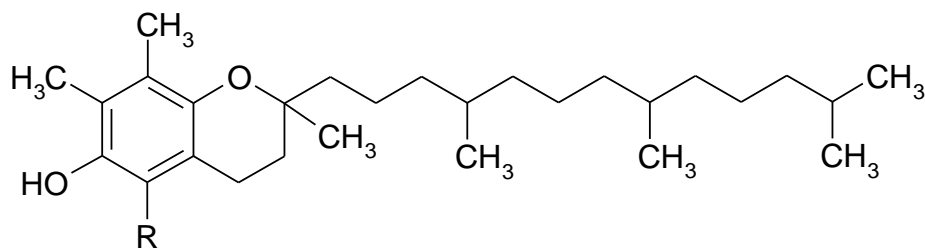
UKIYA²⁰ a SCHULZ²⁸ izolovali z pylových zrn estery hydroxylovaných mastných kyselin estolidového typu: kyselinu 18-(hexadecanoyloxy)oktadecenovou, její methyl a ethyl ester a kyselinu 18-(oktadecanoyloxy)oktadecenovou a její methyl a ethyl ester.



methylester kyseliny 18-(hexadecanoyloxy)oktadecenové	$R_1=C_{15}H_{31}$	$R_2=CH_3$
ethylester kyseliny 18-(hexadecanoyloxy)oktadecenové	$R_1=C_{15}H_{31}$	$R_2=C_2H_5$
methylester kyseliny 18-(oktadecanoyloxy)oktadecenové	$R_1=C_{17}H_{35}$	$R_2=CH_3$
ethylester kyseliny 18-(oktadecanoyloxy)oktadecenové	$R_1=C_{17}H_{35}$	$R_2=C_2H_5$

3.2.8. Tokoferoly

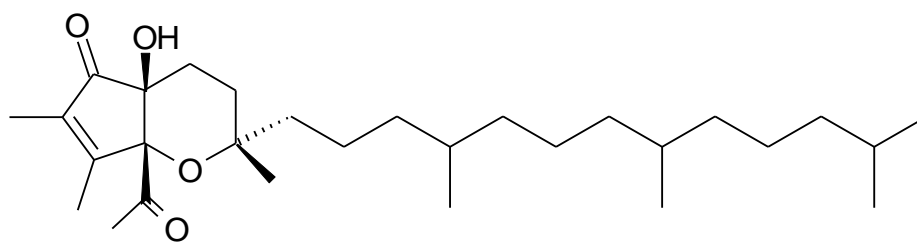
SCHULZ²⁸ izoloval z pylových zrn α - a γ -tokoferol.



α -tokoferol $R=CH_3$

γ -tokoferol $R=H$

UKIYA²⁰ izoloval (5S)-3 α -acetyl-2,3,5-trimethyl-7 α -hydroxy-5-(4,8,12-trimethyltridecanyl)-1,3 α ,5,6,7,7 α -hexahydro-4-oxainden-1-on a jeho 5R epimer.



(5S)-3 α -acetyl-2,3,5-trimethyl-7 α -hydroxy-5-(4,8,12-trimethyltridecalin)-

1,3 α ,5,6,7,7 α -hexahydro-4-oxainden-1-on

3.2.9. Alkany

SCHULZ²⁸ izoloval z pylových zrn menší množství lineárních C₂₅, C₂₇, C₂₉, C₃₁ a C₃₃ alkanů.

3.3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA OBSAHOVÝCH LÁTEK

V lidovém léčitelství se využívá zejména semeno a jazykovité květy. Ze semen vyráběný slunečnicový olej má protisklerotické účinky a je vynikající surovinou pro přípravu léčivých mastí. Užívá se zevně např. při zánětech, zapaření, a vnitřně 2 až 4 čajové lžičky denně zlepšují ostrost vidění. Jazykovité květy se používají do čajových směsí pro snížení horečky a míry pocení, podporu trávení a stimulaci činnosti jater.

3.3.1. Alelopatická aktivita

U látek typu heliannanů byla hodnocena klíčivost semen, délka kořenů a výhonků. Bioanalýza byla prováděna na semenech hlávkového salátu (*Lactuca sativa*), řeřichy (*Lepidium sativum*) a cibuli (*Allium cepa*), pšenice (*Triticum aestivum*) a ječmene (*Hordeum vulgare*). Heliannuol A a C byly aktivní, zatímco helibisabonoly A a B byly neaktivní. Obecně studie zjistila, že heliannuoly, které mají hydroxylovou skupinu lokalizovanou na heterocyklu (7,11-heliannuoly a 8,11-heliannuoly) jsou aktivnější než ty, které mají hydroxylovou skupinu na vedlejším iso-propylovém řetězci (7,10-heliannuoly). Klíčovou roli zde hraje i stereochemie každého chirálního centra³.

Bisnorseskviterpeny annuionony A, B a C a helinorbisabon vykazovaly potencionální alelopatický účinek na jednoděložné rostlinné druhy. Vykazovaly 45% inhibici klíčivosti semen *Allium cepa* a 50% stimulaci růstu kořene *Allium cepa* a *Hordeum vulgare* řádově v koncentraci 10^5 - 10^9 M. Jejich potencionální alelopatická aktivita je předurčuje k využití jako nové generace přírodních agrochemikálií⁴.

Germakranolidy 15-hydroxy-3-dehydrodesoxytifruticin, 3-O-ethoxyniveusin B a niveusin B inhibovaly lineární růst v *Avena* koleoptilovém testu¹². Helivypolid G vykazoval inhibiční efekt v pšeničném koleoptilovém testu²⁷.

3.3.2. Antimikrobiální, antifungální a antiprotozoální aktivita

U benzopyranových derivátů 6-acetyl-2,2-dimethyl-1,2-benzopyranu a 6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethyl-1,2-benzopyranu z extraktu úborových lůžek byla prokázána antimykotická aktivita. Testovanou houbou byla *Pyricularia oryzae*. Stejně výsledky vykazovaly také extrakty získané z celých květenství. Extrakty dalších rostlinných orgánů nevykazovaly takovou toxicitu na testovaný mikroorganismus⁷. Extrakty plodových lůžek vykazovaly antimykotickou aktivitu také proti *Cladosporium herbarum*⁴³.

SPRING^{11, 12} prokázal antimikrobiální aktivitu u 3-O-ethylheliangolidu, který vykazoval silnou aktivitu proti *Proteus vulgaris*, *Eremothecium ashbyi* a *Bacillus brevis*. Dále uvádí silnou antifungální aktivitu α -methylen- γ -laktonového germakrolidu (později identifikovaném jako 15-hydroxy-3-dehydrodesoxyfruticin, autorem nazývaný též annuithrin) testovanou na *Eremothecium ashbyi*.

U kyseliny kauren-19-ové byla zaznamenána antimikrobiální aktivita¹⁵. Je aktivní proti *Bacillus subtilis* (0,313 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)^{16,17}, *Staphylococcus aureus* (12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)^{15,16,18}, *Mycobacterium smegmatis* (6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)^{15,16} (ale ne proti *M. tuberculosis* a *M. avium*)¹⁷, *Saccharomyces cerevisiae*¹⁶, *E. coli*¹⁹ a *Candida albicans*²⁰ (ačkoliv zdroj 16 uvádí, že je daná kyselina je k tomuto organismu neaktivní). Naproti tomu methylester kyseliny kauren-19-ové je mnohem méně antimikrobiálně účinný (například proti *Mycobacterium smegmatis* (25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, ale proti *S. aureus* není účinný vůbec). Pro srovnání streptomycin inhiboval růst těchto organismů v koncentracích 0,78 a 3,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ¹⁵.

Kyselina kauren-19-ová vykazovala aktivitu proti protozoálnímu bičíkovci *Trypanosoma cruzi*, původci Chagasovy nemoci. Tato látka vykazovala i aktivitu proti měkkýši *Biomphalaria gabata*, mezihostitelem schistozomózy. Kaurenová kyselina se ukázala jako účinná proti larvám *Homeosa electellum*, *H. zea*, *H. virescens* a *Pectinophora gossypiella*¹⁴.

Směs dvou diterpenových kyselin, kaurenové a angeloylgrandiflorové, se ukázala jako silný inhibitor růstu vláknitých stélek hub *Verticillium dahliae*, *Sclerotinium sclerotiorum*¹⁴.

3.3.3. Další biologické účinky

Z extraktu květů byly získány steroly, triterpenické alkoholy a *syn*-alkan-6,8-dioly, které vykazovaly značnou protizánětlivou aktivitu indukovanou 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetátem, který způsobuje zánět u myši²⁰. Kaurenová kyselina také vykazovala protizánětlivou aktivitu¹⁴.

Látky typu *syn*-alkan-6,8-diolu vykazovaly inhibiční účinek na nádorovou aktivitu 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetátu ve dvou stádiích zhoubného nádorového bujení na kůži myši²⁰.

3,4-*seko*-tirucallany izolované z pylu *Helianthus annuus L.* vykazovaly inhibiční efekt na indukci EBV-EA (virus Epstein-Barrové - časný antigen) vyvolaný pomocí 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetátu v Raji buňkách. Jako referenční látka byl zvolen β -karoten. Inhibiční efekt těchto sloučenin byl stejný nebo silnější než β -karotenu. Tyto struktury byly proto navrženy jako potencionální chemopreventivní činidla²¹.

Kaurenová kyselina vykazovala též antifertilní aktivitu u primátů¹⁴.

Testování cytotoxicity kaurenové kyseliny bylo provedeno na garnátech (IC₅₀ 2,03 μ g/ml, 16 μ g/ml) a různých buněčných liniích (myši lymfatické leukémie, karcinomu prsu, plic, střeva, ovarií, prostaty a kůže)¹⁴.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. CHARAKTERISTIKA ZPRACOVÁVANÉHO MATERIÁLU

Ke zpracování byly použity sušené jazykovité květy, sušená úborová lůžka zbavená jazykovitých květů a následně i listy *Helianthus annuus L.*, získané legálním sběrem na poli soukromého zemědělce v obci Rohozec u Kutné Hory v červenci 2004. Rostliny dle čestného prohlášení pěstitele nebyly chemicky ošetřeny. Rostlinný materiál byl sušen na Katedře Farmaceutické botaniky a ekologie a byl drcen na kladivovém mlýnu. Hmotnost výchozího usušeného a pomletého materiálu činila 190 g jazykovitých květů, 2650 g úborových lůžek zbavených jazykovitých květů a 5 kg listů.

4.2. CHEMIKÁLIE, CHROMATOGRAFICKÝ MATERIÁL A PŘÍSTROJE

4.2.1. Chemikálie

Rozpouštědla

AQUA DESTILLATA

KYSELINA OCTOVÁ p.a.

ETHANOL 96%

METHANOL p.a.

n-BUTYLALKOHOL p.a.

TOLUEN p.a.

ETHYLESTER KYSELINY OCTOVÉ p.a.

CHLOROFORM p.a.

ACETON p.a.

XYLEN p.a.

PETROLETHER p.a.

Detekční činidla

vanilinové činidlo (směs 1% ethanolického roztoku vanilinu a 3% kys. chloristé v poměru 1:1; obě složky se smísí před použitím; po postřiku se chromatogram zahřívá při 105 °C do doby, než se vybarví skvrny)

4.2.2. Chromatografický materiál

SILIKAGEL

SEPHADEX LH-20

TLC aluminium sheets 20x20 cm silica gel F₂₅₄ MERCK

4.2.3. Přístroje

1. **UV spektrofotometr** SHIMADZU UV-1601
2. **FIA lab 3000 analyser** FIA lab instruments Inc., Bellevue WA, USA (zařízení na měření antioxidační aktivity)
3. **UV lampa** CAMAG 254 a 366 nm

4.2.4. Přehled mobilních fází

Chromatografické soustavy

S1- CHCl ₃ : MeOH	65:35
S2- CHCl ₃ : MeOH	80:20
S3- EtAc: CH ₃ COCH ₃ : HCOOH: H ₂ O	100:11:11:27
S4- CH ₂ Cl ₂ : EtAc	4:1
S5- CH ₂ Cl ₂ : EtAc	1:1
S6- EtAc	čistý
S7- BuOH: H ₂ O: CH ₃ COOH	40:20:10
S8- CHCl ₃ : MeOH	85:15

S9- CHCl ₃ : MeOH	75: 25
S10- CHCl ₃ : MeOH	95:5
S11- CHCl ₃	čistý
S12- CHCl ₃ : MeOH	90:10
S13- CHCl ₃ : MeOH	87:13
S14- CHCl ₃ : MeOH	70:30
S15- CHCl ₃ : MeOH	60:40

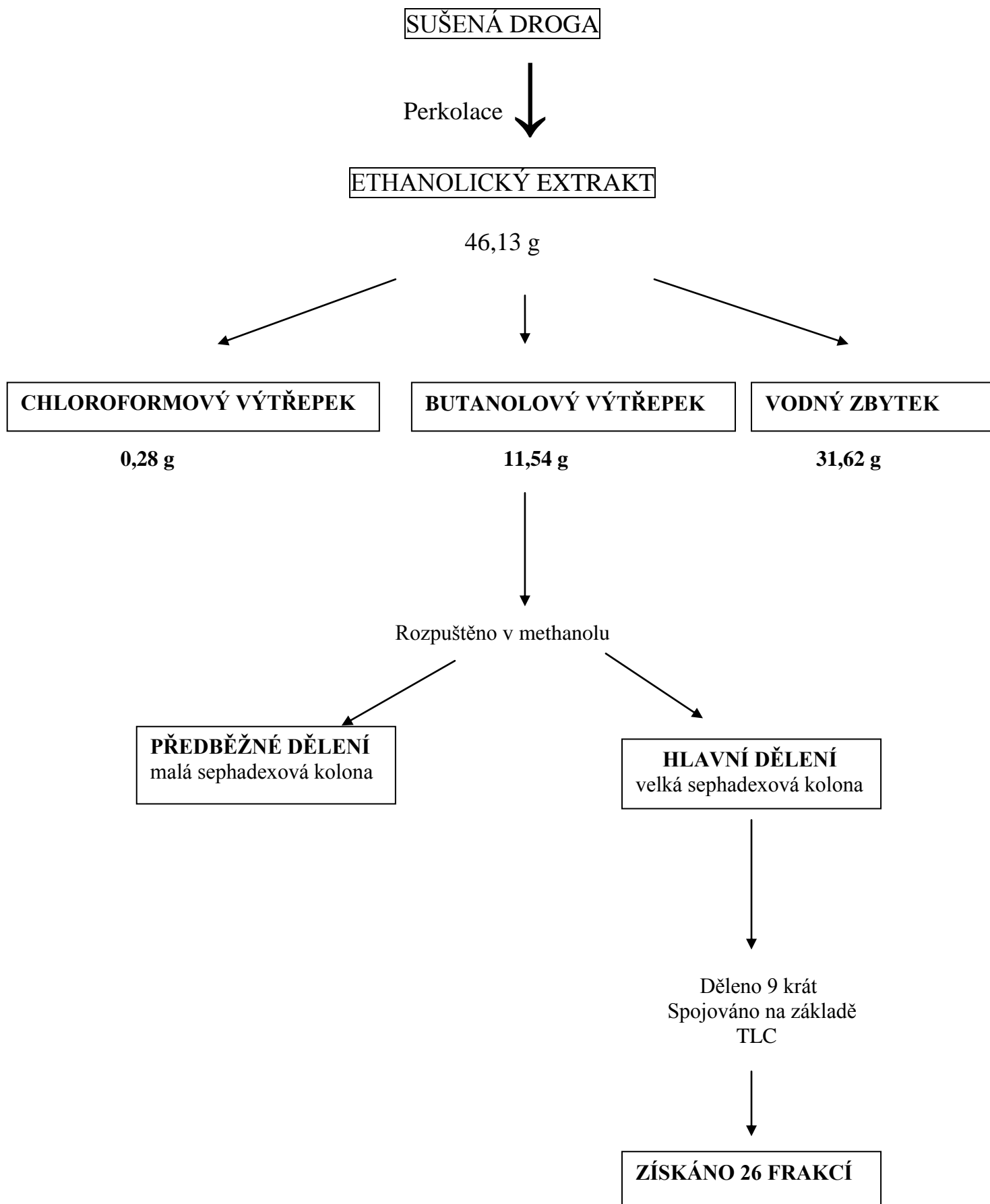
4.3. PŘEDBĚŽNÉ DĚLENÍ

4.3.1. Schéma předběžného dělení

Bylo zpracováno 3,07 g úborových lůžek, 3,09 g jazykovitých květů a 3,03 g listů. Jednotlivé drogy byly protřepávány na třepače v 60% ethanolu po dobu 1 hodiny. Odpařením do sucha bylo získáno 0,139 g extraktu z úborových lůžek, 0,8514 g extraktu z jazykovitých květů a 0,5567 g extraktu z listů. Výtěžnost tedy byla 14,83 % z úborových lůžek, 27,55 % z jazykovitých květů a 18,37 % z listů. U těchto extraktů byla provedena TLC (tenkovrstvá chromatografie) v soustavách S₁ a S₂, detekce vanilinovým činidlem. Dále byla provedena TLC všech tří extraktů spolu se standardy hesperitinu a kvercetinu v soustavě S₃ (soustava pro detekci flavonoidů), detekce vanilinovým činidlem, což vzhledem k přítomnosti několika skvrn na chromatogramu v drahách extraktů poukázalo na možný výskyt látek obdobné polariry ve všech zkoumaných částech rostliny, ale přítomnost hesperitinu ani kvercetinu potvrzena nebyla. Pro další zpracování byly vybrány jazykovité květy a úborová lůžka.

4.4. ZPRACOVÁNÍ JAZYKOVITÝCH KVĚTŮ

SCHÉMA ZPRACOVÁNÍ JAZYKOVITÝCH KVĚTŮ



4.4.1. Výchozí materiál

K dělení byly použity sušené jazykovité květy z *Helianthus annuus L.*, viz. 4.1. charakteristika zpracovávaného materiálu. Hmotnost výchozího pomletého materiálu činila 190 g.

4.4.2. Perkolace a zpracování perkolátu

Suchý rostlinný materiál byl jednočlennou perkolací extrahován 60% ethanolem v perkolátoru. Extrakce probíhala tak dlouho, dokud perkolát vykazoval vážitelný zbytek. Perkolát byl průběžně zahušťován, konečná hmotnost zahuštěného perkolátu činila 46,13 g.

K rozdělování byl použit celý zahuštěný perkolát. K perkolátu bylo přidáno 80 ml vody a následně byl protřepáván třikrát 150 ml chloroformu. Výtěžek chloroformového podílu po odpaření činil 0,28 g. Vodný zbytek byl dále na rotační vakuové odparce zbaven stop chloroformu a extrahován 5 krát 150 ml butanolu. Získaný extrakt byl přefiltrován přes bezvodý Na_2SO_4 , aby se odstranila zbytková voda a byl průběžně zahušťován. Nakonec byly všechny frakce spojeny a odpařeny do sucha. Bylo získáno 11,54 g butanolové fáze. Ve vodné fázi zůstalo rozpuštěno 31,6 g. Byla provedena TLC v soustavách S1 a S2, detekce vanilinovým činidlem, všech těchto fází a TLC butanolové a vodné fáze v soustavě S1.

4.4.3. Zpracování vodné fáze

Předběžné dělení

Vodná fáze byla předběžně dělena na koloně. Kolona byla připravena nabobtnáním molekulového síta Sephadexu LH 20 v 80% ethanolu. Jako eluční činidlo byl použit 80% ethanol. Objem jednotlivých nanášek činil cca 5 ml vodné fáze (sedimentu této fáze rozpuštěné v methanolu). Vzorčky byly odebírány po přibližně

stejných objemech (15 ml) dle vizuální indikace barevných zón. Eluce probíhala rychlostí 5 ml/min. Bylo získáno 14 frakcí a provedena TLC v S1 a S4, detekce vanilinovým činidlem. Na základě těchto chromatogramů bylo rozhodnuto o dalším zpracování této vodné fáze.

Vodná fáze byla následně rozpuštěna v 30 ml vody a poté vytřepána s 3 krát 30ml BuOH předem nasyceného vodou (10 ml BuOH a 20 ml H₂O). BuOH výtřepok byl přefiltrován přes potaš (K₂CO₃). Tato fáze byla dále zahuštěna do sucha. Hmotnost suchého extraktu činil 1,619 g.

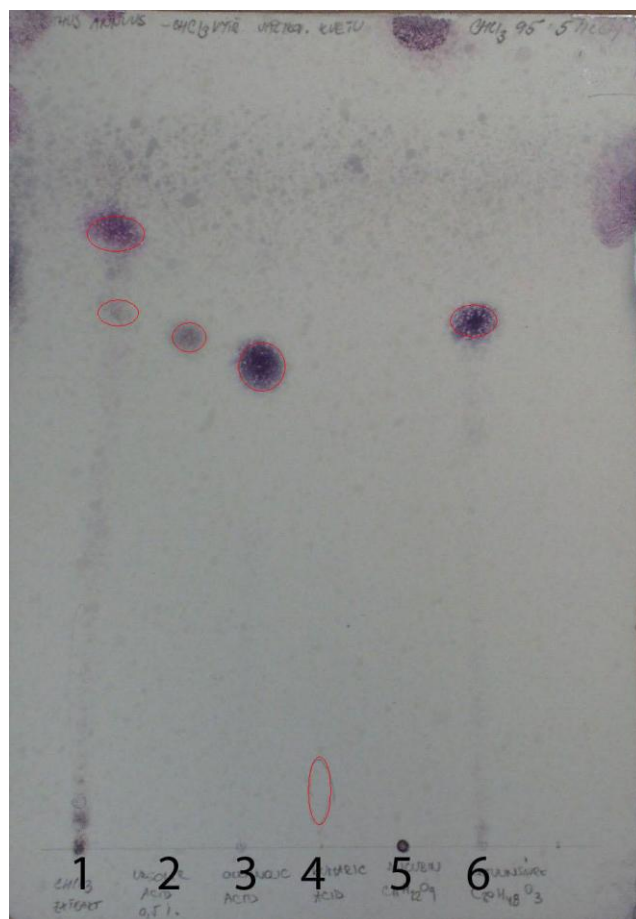
Hlavní dělení

Extrakt byl dále dělen na silikagelové sloupcové koloně. Bylo zpracovááno 1,6 g suchého extraktu. Silikagel byl zbaven vody zahříváním 4 h při 160°C a následně upraven na obsah vody 12 %. Množství aktivovaného silikagelu na koloně činilo 200 g. Dále byl připraven roztěr na kolonu. Suchý extrakt byl rozpuštěn v minimálním množství MeOH, poté bylo přidáno 10 g silikagelu a směs se byla odpařena do sucha na porcelánové misce, za občasné homogenizace.

Jako eluční činidlo pro silikagelovou kolonu byla použita směs chloroformu a xylenu v poměru 75:25. Dále se postupovalo s čistým chloroformem, s chloroformem a 1% MeOH a 3% MeOH. Bylo získáno 6 frakcí a provedena TLC v S12 a S10, detekce vanilinovým činidlem, která ukázala několik separovaných skvrn. Jednotlivé frakce byly předány k dalšímu zpracování.

4.4.4. Zpracování chloroformové fáze

Byla provedena TLC s referenčním látkami: kyselina ursolová; kyselina oleanolová; kyselina kumarová; aukubin a kyselina betulinová, v mobilní fázi S10, detekce vanilinovým činidlem (viz chromatogram č.1). Chloroformová frakce na základě tohoto chromatogramu pravděpodobně neobsahovala žádnou z výše uvedených referenčních látek. Z důvodu malého množství této fáze nebyla tato fáze dále zpracovávána.



Chromatogram č.1

1-chloroformová fáze jazykovitých květů

2-standard kys. ursolové

3-standard kys. oleanolové

4-standard kys. kumarové

5-standard aukubinu

6-standard kys. betulínové

4.4.5. Zpracování butanolové fáze

Předběžné dělení butanolové fáze

Butanolová fáze byla po odpaření do sucha rozpuštěna v methanolu a předběžně dělena na malé koloně. Kolona byla připravena nabobtnáním 85 g molekulového síta Sephadexu LH 20 v 80% ethanolu. Jako eluční činidlo byl použit 80% ethanol. Objem nanášky činil cca 5 ml methanolového výtřepku butanolové fáze.

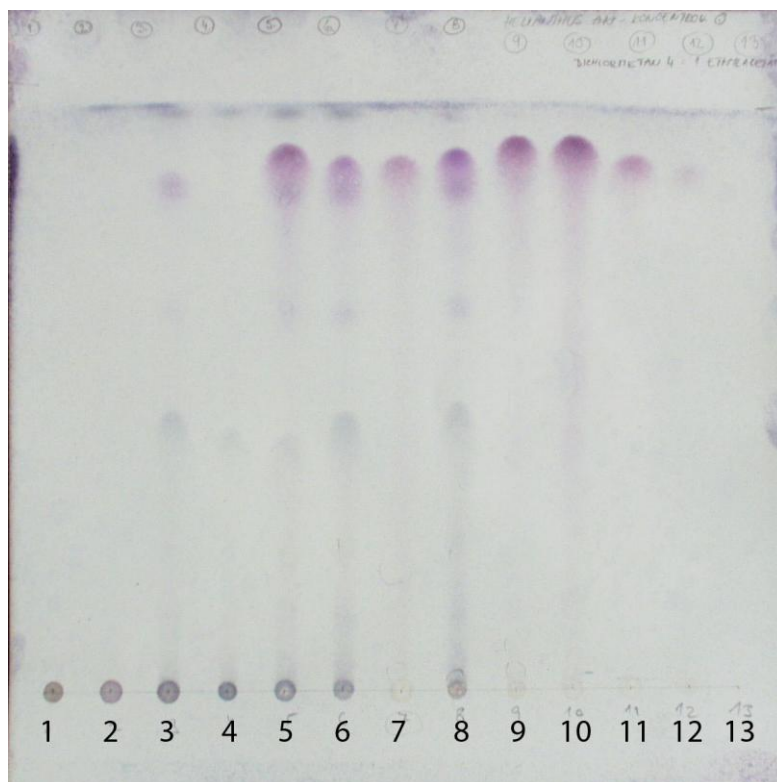
Vzorky byly odebírány po přibližně stejných objemech (15 ml) dle vizuální indikace barevných zón. Eluce probíhala rychlostí 5 ml/min. Bylo získáno 13 frakcí a provedena TLC v S1, detekce vanilinovým činidlem, která vzhledem k dobře odděleným skrvnám na chromatogramu rozhodla o dalším zpracování této fáze příslušným způsobem.

Hlavní dělení butanolového extraktu

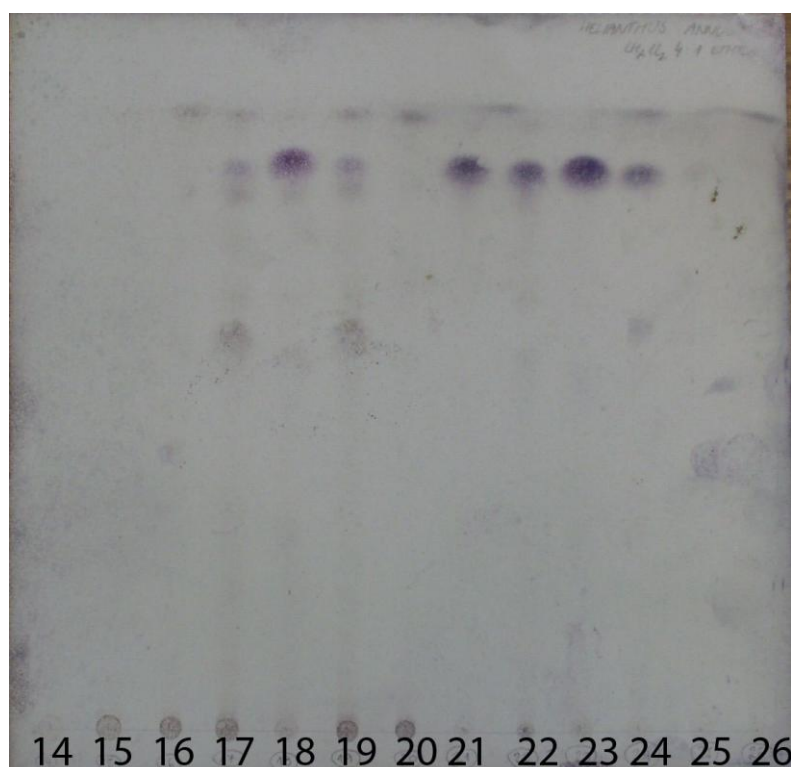
K dělení bylo použita velká kolona připravena nabobtnáním molekulového síta Sephadexu LH 20 v 80% ethanolu. Jako eluční činidlo byl použit 80% ethanol. Objem nanášky na jednotlivá dělení činil asi 10 ml methanolového výtřepku butanolového extraktu. Toto dělení bylo provedeno celkem 9 krát, jednotlivé frakce byly pospojovány na základě TLC. Celkem bylo získáno 26 frakcí. Byla provedena TLC všech 26 frakcí v soustavě S4, detekce vanilinovým činidlem (viz chromatogramy č.2 a 3). Na základě TLC byly některé frakce spojeny (viz tabulka č.1). S frakcí 6 byla provedena TLC s β -karotenem v soustavě S4. Přítomnost β -karotenu ve frakci 6 nebyla prokázána. U všech 26 frakcí jsme měřili UV-VIS spektrum.

frakce první podíl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
frakce druhý podíl	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26

Tabulka č.1.: Spojování frakcí butanolové fáze jazykovitých květů.



Chromatogram č.2: Hlavní dělení butanolové fáze jazykovitých květů, frakce 1-13



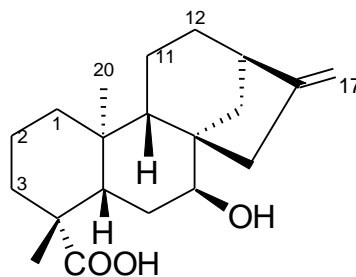
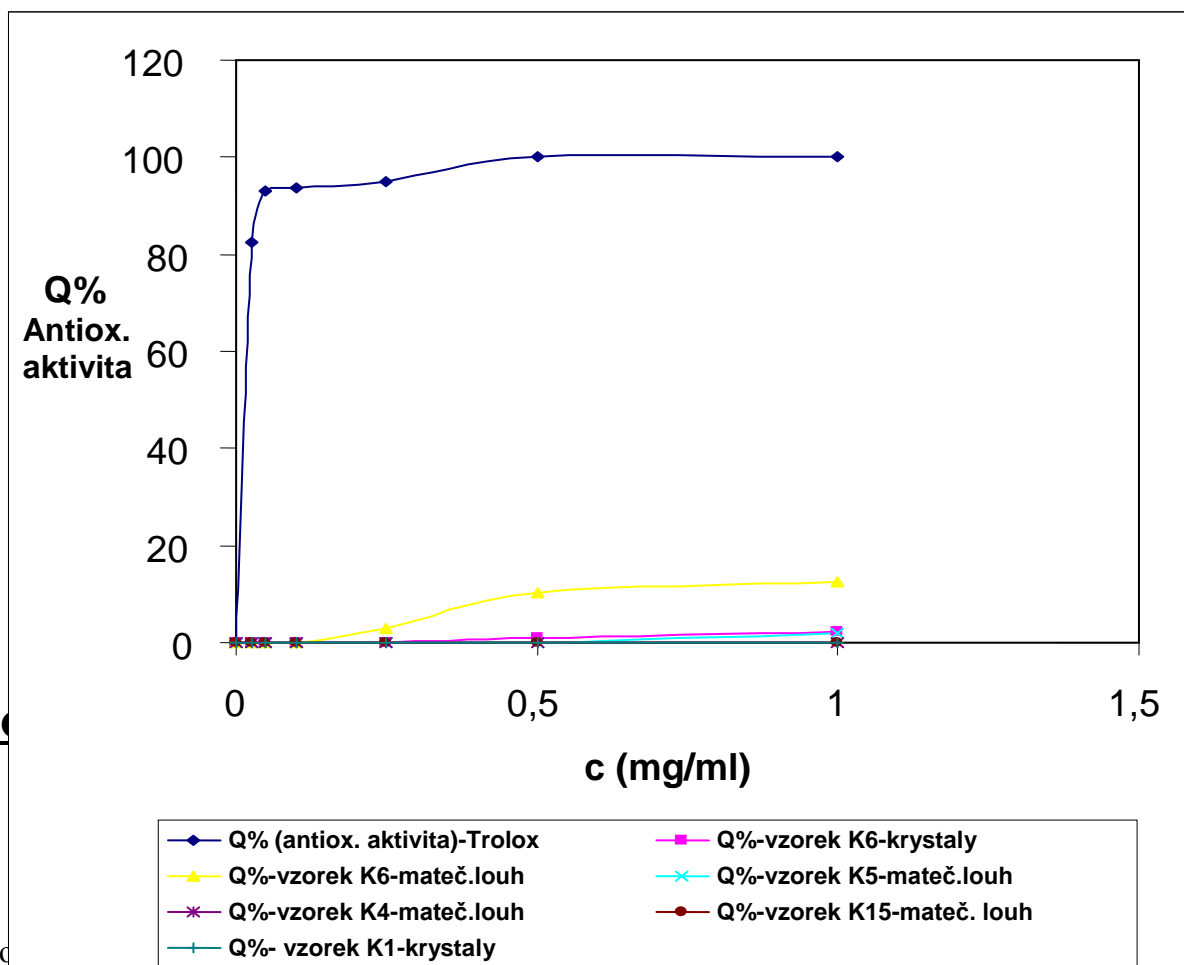
Chromatogram č.3: Hlavní dělení butanolové fáze jazykovitých květů, frakce 14-

Po určité době, za uchovávání v chladu, vypadly krystaly ve frakcích č.9 (K3), 11+24 (K1), 23 (K2), 5, 6, 7 a 8 (K4). Jednotlivé krystaly byly přejmenovány (viz tabulka č.2).

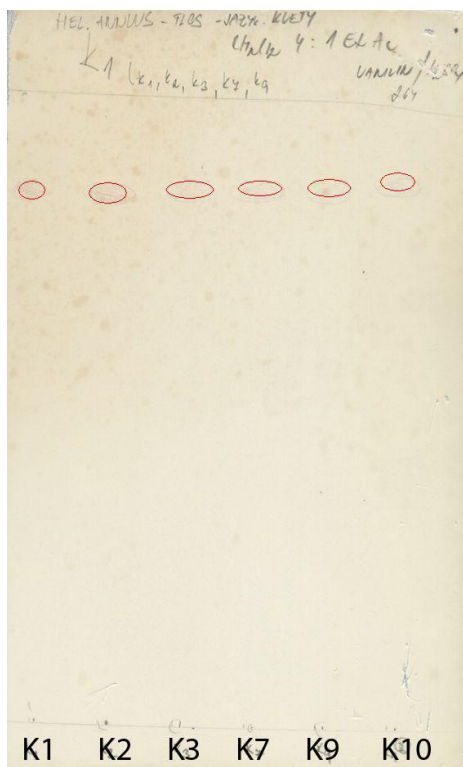
Vzorek: 11+24	K1
Vzorek: 23	K2
Vzorek: 9	K3
Vzorek: 5,6,7 a 8	K4
Vzorek: 2	K5
Vzorek: 17	K6
Vzorek: 10	K7
Vzorek: 4	K8
Vzorek: 21	K9
Vzorek: 13+26	K10
Vzorek: 22	K11
Vzorek: 14	K12
Vzorek: 20	K13
Vzorek: 16	K14
Vzorek: 19	K15
Vzorek: 15	K16
Vzorek: 3	K17
Vzorek: 18	K18
Vzorek: 25	K19

Tabulka č. 2: Přejmenování jednotlivých frakcí butanolové fáze jazykovitých květů.

U matečných louhů K4, K5, K6 a K15 a krystalů K1 byla měřena antioxidační aktivita pomocí DPPH testu, jak je standardně prováděno na katedře. Jako referenční látka byl použit Trolox. Žádný z testovaných vzorků však nevykázal signifikantní antioxidační efekt (viz graf č. 1).



Byla provedena TLC krystalů K1, K3, K9, K7, K2 a K10 v soustavě S4, detekce vanilinovým činidlem (viz chromatogram č.4). Z chromatogramu vyplývá, že K1, K3, K9, K7, K2 a K10 jsou látky shodné s kyselinou kaurenovou. Na základě tohoto chromatogramu byly pak příslušné frakce spojeny.



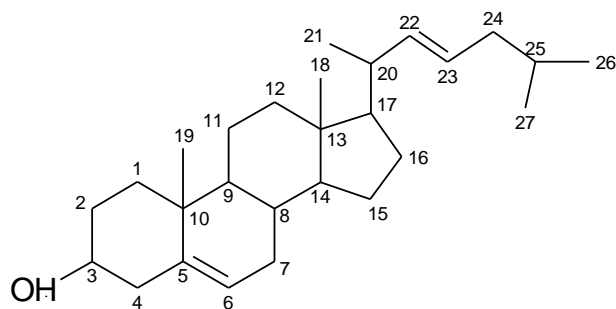
Chromatogram č.4: Krystaly K1, K2, K3, K7, K9 a K10 z butanolové fáze
jazykovitých květů

Byla provedena TLC krystalů K1 a K4 (frakce č. 5 a 6) rozpuštěných v methanolu v soustavě S4 (viz chromatogram č.5), detekce vanilinovým činidlem. Z chromatogramu vyplývá, že v případě K4 se nejedná o identickou látku s K1 (kyselinu kaurenovou).



Chromatogram č.5: Krystaly K1 a K4 z butanolové fáze jazykovitých květů

Krystaly K4 byly podrobeny NMR analýze C13 a H1 na Katedře anorganické a organické chemie. Jedná se pravděpodobně o cholestan-5,22-dien-2-ol ($3\beta,22E$).



cholestan-5,22-dien-2-ol ($3\beta,22E$)

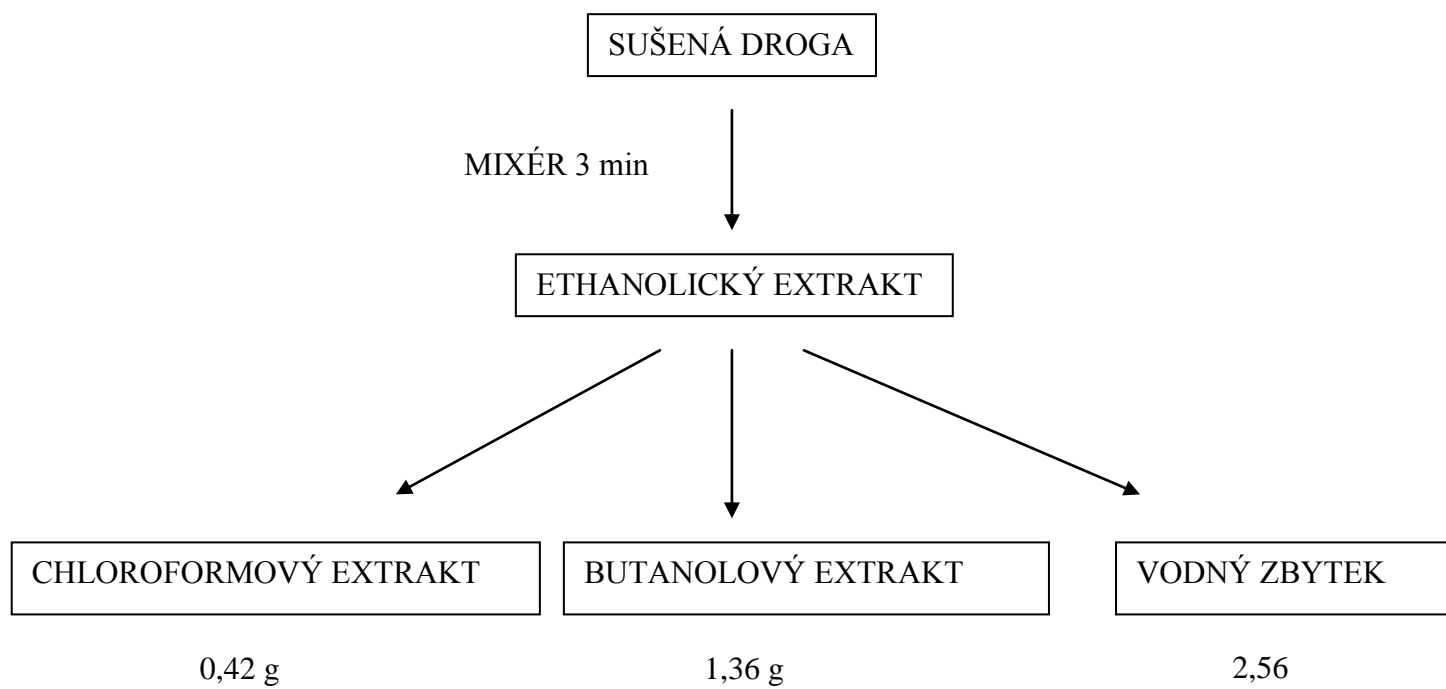
4.5. ZPRACOVÁNÍ ÚBOROVÝCH LŮŽEK

4.5.1. Předběžná extrakce

K dělení byla použita sušená úborová lůžka *Helianthus annuus L.*, viz. 4.1. charakteristika zpracovávaného materiálu. Hmotnost výchozího pomletého materiálu činila 50 g.

Lůžka byla extrahována 250 ml 60% ethanolu. Extrakce byla prováděna v mixéru po dobu 3 min. Výsledná suspenze byla filtrována přes filtrační papír. Byla provedena TLC filtrátu spolu s frakcí 10 hlavního dělení butanolové fáze jazykovitých květů v mobilních fázích S4, S5, S6 a S7, detekce vanilinovým činidlem. Byly zaznamenány skvrny s podobnými R_F v dráze předběžného extraktu a frakcí 10 hlavního dělení butanolové fáze jazykovitých květů. Ethanolový extrakt byl dále protřepán 3 krát 150 ml chloroformu. Chloroformový výtřepok byl zbaven vody přefiltrováním přes K_2CO_3 . Po odpaření chloroformu činil výtěžek této fáze 0,42 g. Zbytek byl protřepáván 3 krát celkem 500 ml butanolu, a výtřepky byly opět vysušeny přes K_2CO_3 . Výtěžek po odpaření rozpouštědla byl 1,36 g. Zbytek suché vodné fáze byl po vysušení 2,56 g. Procentuální množství jednotlivých vysušených fází vztažené k celkovému množství navážky suché drogy byly: 0,84 % chloroformové fáze, 2,72 % butanolové fáze a 5,12 % vodné fáze. Byla provedena TLC s jednotlivými fázemi v mobilních soustavách S8 a S9. Jednotlivé fáze byly vždy samostatně podrobeny TLC a to: butanolová fáze v soustavě S8, chloroformová fáze v soustavě S10 a vodná fáze v soustavě S25. Jako obsahově nejbohatší se jevila butanolová fáze.

SCHÉMA PŘEDBĚŽNÉHO DĚLENÍ ÚBOROVÝCH LŮŽEK



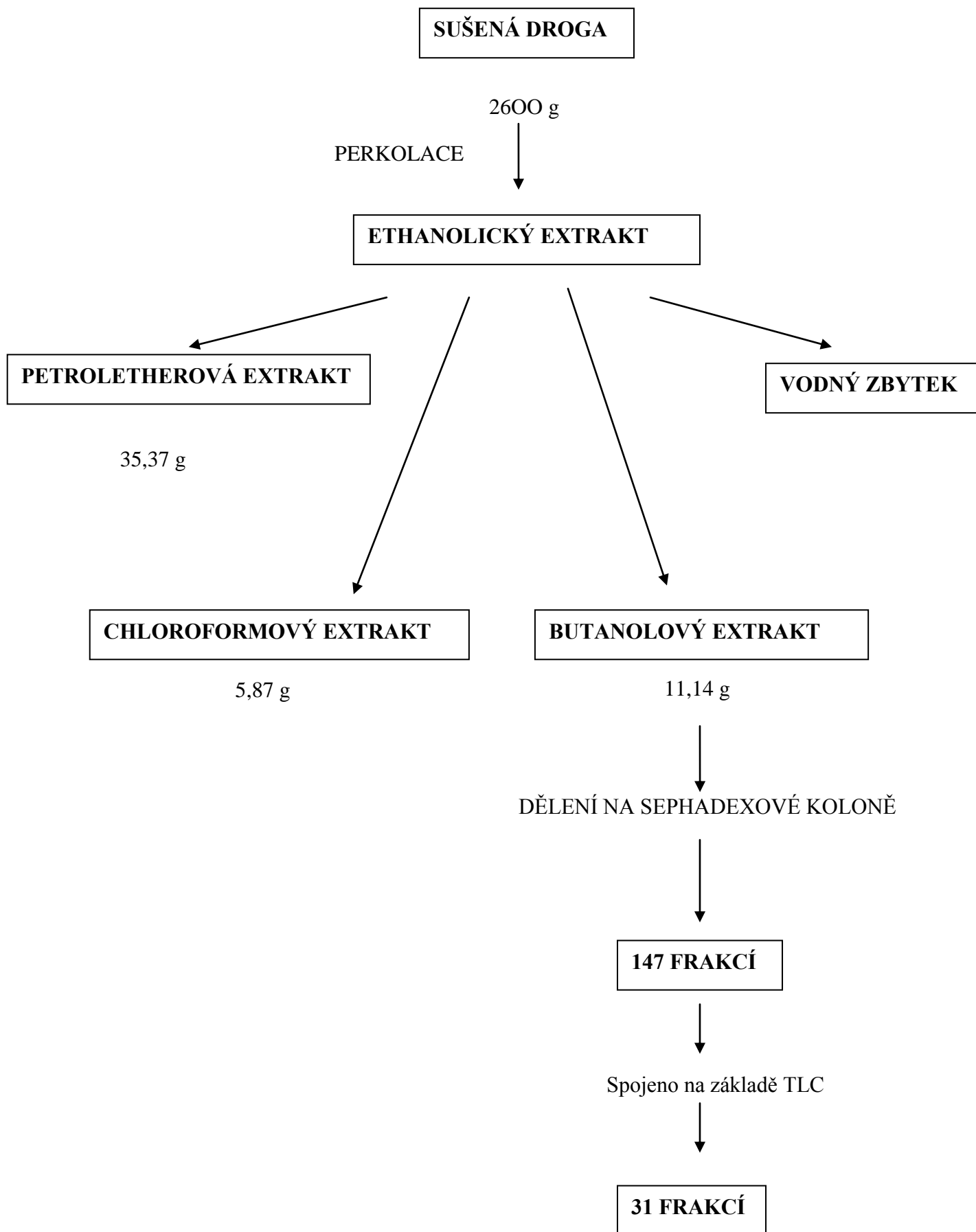
4.5.3. Hlavní extrakce

Perkolace

Suchý rostlinný materiál o hmotnosti 2600 g byl jednočlennou perkolací extrahován 60% ethanolem v perkolátoru. Extrakce probíhala tak dlouho, dokud perkolát vykazoval važitelný zbytek. Byla provedena TLC perkolátu a sedimentu, jenž se v něm stáním v lednici vytvořil a byl následně rozpuštěn v methanolu. Byla provedena TLC v soustavách S11, S12 a S10.

Perkolát byl postupně extrahován 2000 ml petroletheru, jednak z důvodu odstranění chlorofylu z přítomných zákrovních lístků a také kvůli již relativní zralosti plodových lůžek a možnosti přítomnosti většího množství olejů v již založených nažkách. Výtřepky byly vysušeny přes K_2CO_3 a spojeny, výtěžek po odpaření byl 35,37 g. Zbytek perkolátu byl postupně protřepáván 2500 ml chloroformu. Jednotlivé výtěžky byly opět přesušeny přes K_2CO_3 a spojeny, výtěžek po odpaření byl 5,87 g. Zbytek byl zbaven stop chloroformu na rotační vakuové odparce a extrahován postupně celkem 2000 ml butanolu. Jednotlivé výtěžky byly opět přesušeny přes K_2CO_3 a spojeny, výtěžek po odpaření byl 11,14 g. Celkem tedy bylo získáno 52,38 g suchých extraktů. Vztaženo k této hodnotě činila výtěžnost jednotlivých extrakcí 67,53 % petroletherové fáze, 11,21 % chloroformové fáze a 21,27 % butanolové fáze. Byla provedena TLC vodné a butanolové fáze v soustavě S9, vodné butanolové a chloroformové fáze v soustavě S2 a chloroformové a petroletherové fáze v soustavě S10. Na základě těchto chromatogramů byla k dalšímu zpracování použita butanolová fáze.

SCHÉMA ZPRACOVÁNÍ ÚBOROVÝCH LŮŽEK



4.5.3. Zpracování butanolové fáze

K dělení bylo použito 1100 g silikagelu přesítovaného 90 µm sítím. Silikagel byl zbaven vody zahříváním 4 h při 160 °C a následně upraven na obsah vody 12 %. Byl připraven roztěr z butanolového extraktu rozpuštěného v 95% ethanolu se 70 g silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit chloroform se stoupající koncentrací methanolu a ethanol (viz tabulka č.3). Rychlost průtoku činila 5 ml/min. Vzorby byly jímány na základě viditelných zón, s výjimkou prvních 7 frakcí, po 50 ml.

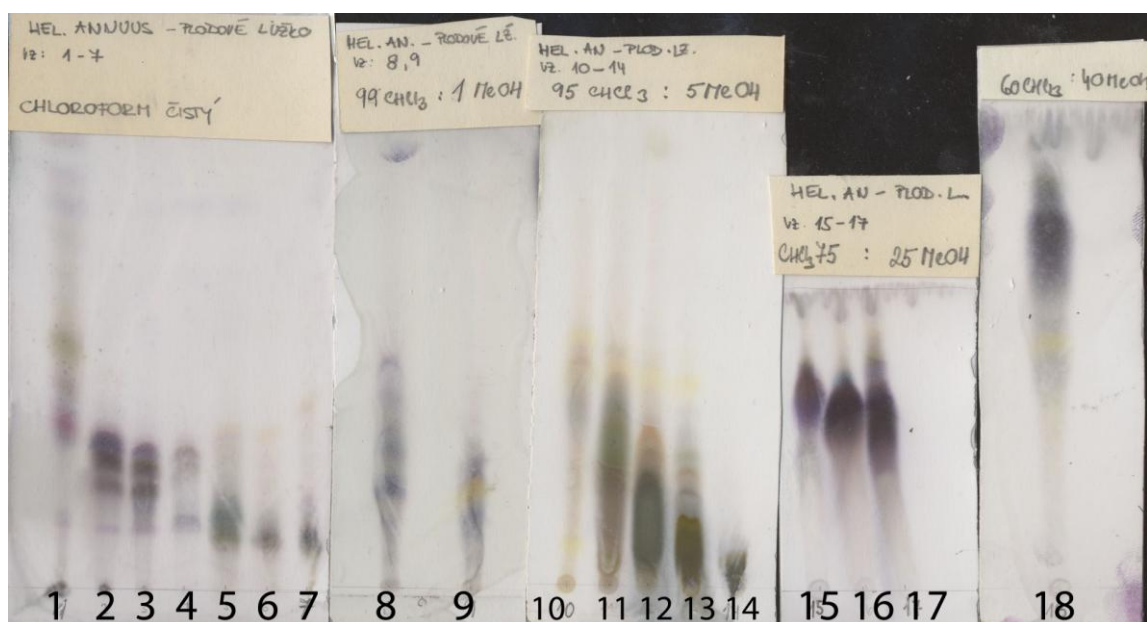
mobilní fáze	poměr složek	objem rozpouštědla
CHCl ₃	p.a.	3000 ml
CHCl ₃ : MeOH	98:2	2500 ml
CHCl ₃ : MeOH	92:8	3200 ml
CHCl ₃ : MeOH	84:16	1000 ml
EtOH	denat. 5% MeOH	2700 ml

Tabulka č.3: přehled mobilních fází a jejich množství použitých pro hlavní dělení butanolové fáze úborových lůžek.

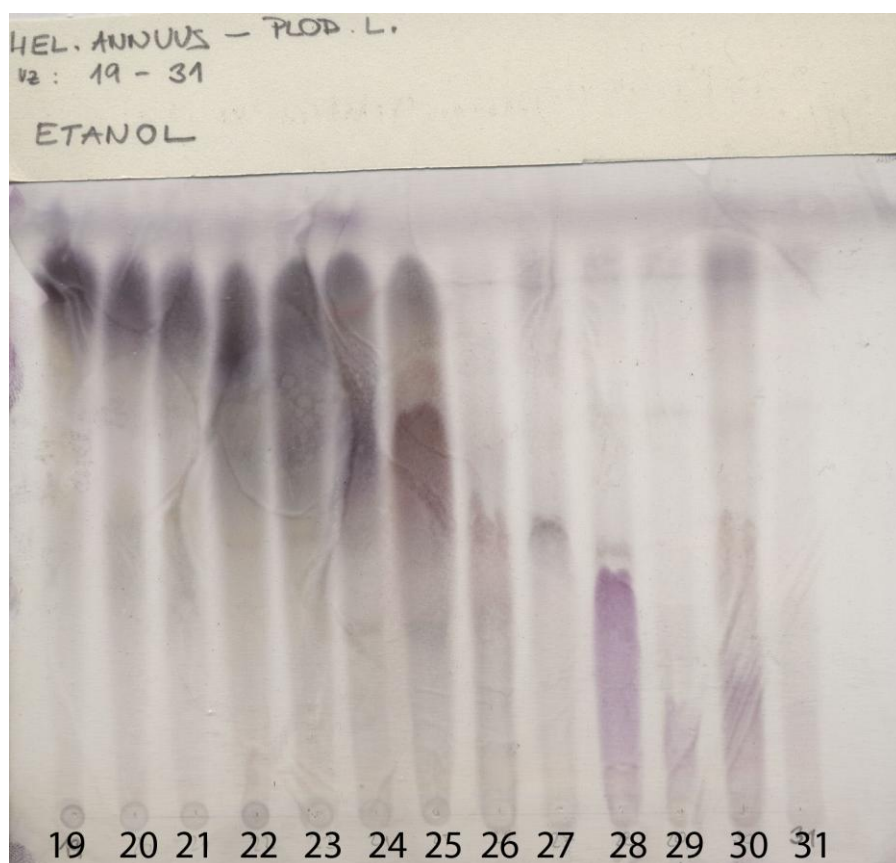
Dělením bylo získáno 147 frakcí, s nimiž byla provedena TLC v příslušných mobilních fázích (viz tabulka č.4) s detekcí vanilinovým činidlem (viz chromatogramy č.6 a 7), na jejíž základě byly jednotlivé fáze pospojovány (viz tabulka č.4) na 31 kvalitativně odlišných frakcí.

Mobilní fáze na koloně	TLC	Mobilní fáze pro TLC	spojené frakce	číslo spojené frakce
CHCl ₃		CHCl ₃		1
				2
				3
				4
				5
CHCl ₃ :MeOH (8%)			17-18	6
			19-29	7
		CHCl ₃ :MeOH (1%)	30-34	8
			35-37	9
		CHCl ₃ :MeOH (5%)	38-41	10
CHCl ₃ :MeOH (1%)			42-45	11
			46-63	12
			64-69	13
			70-77	14
			78-82	15
		CHCl ₃ :MeOH (25%)	83-84	16
			85-89	17
		CHCl ₃ :MeOH (40%)	90-94	18
		EtOH	95-106	19
			107-109	20
			110-114	21
			115-121	22
			122-126	23
			127-129	24
			130-131	25
			132-133	26
			134-137	27
			138-141	28
			142-145	29
			146-147	30
			zbytek	31

Tabulka č.4: Spojování frakcí hlavního dělení butanové fáze úborových lůžek.

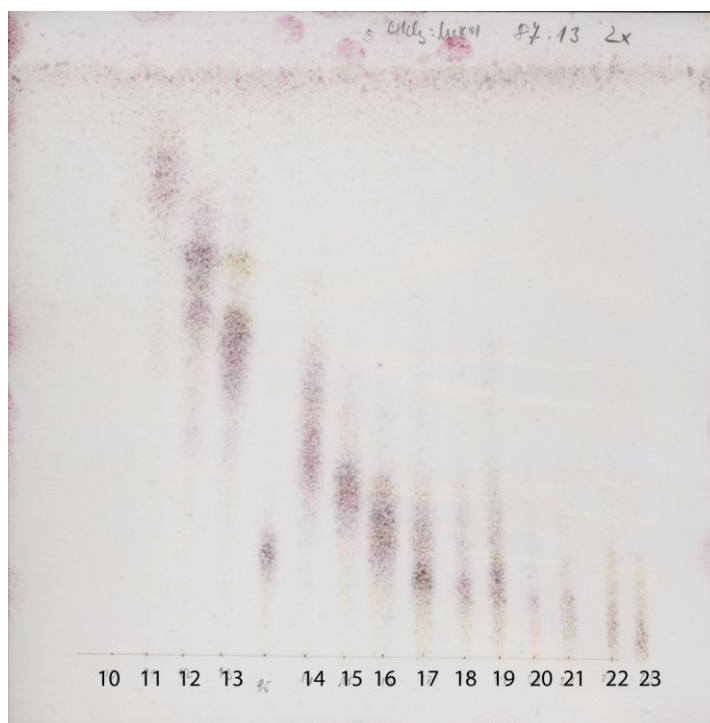


Chromatogram č.6: Frakce č. 1-18 hlavního dělení butanolové fáze úborových lůžek.



Chromatogram č.7: Frakce č. 19-31 hlavního dělení butanolové fáze úborových lůžek.

Frakce 10-23 byly dále podstoupeny TLC v soustavě S13, detekce vanilinovým činidlem (viz chromatogram č.8).



Chromatogram č.8: Frakce č. 10-23 hlavního dělení butanolové fáze úborových lůžek.

5. HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

Slunečnice roční je bezpochyby jedna z nejvýznamnějších hospodářských rostlin a proto nepřekvapí, že přitahuje pozornost vědců již od nepaměti. Tato rostlina je zkoumána jednak z hlediska ekologicko–zemědělského s cílem zvýšení produkce a ochrany před škůdci, ale také kvůli potenciálnímu využití jejích obsahových látek v oblasti medicíny.

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy vybrala tuto rostlinu na základě screeningových antifungálních testů extraktů jednotlivých rostlinných druhů z čeledi *Asteraceae*. Tyto testy poukázaly na poměrně dobré antimykotické vlastnosti některých zástupců této čeledi, z nichž extrakt z *Helianthus annuus L.* se jevil jako velice perspektivní pro další výzkum. Ačkoliv byl *Helianthus annuus L.* podroben za posledních 30 let intenzivnímu fytochemickému zkoumání, není příliš mnoho prací týkající se antifungálních účinků jak extraktů, tak jednotlivých látek z ní izolovaných. Pro zkoumání byly vybrány jazykovité květy a úborová lůžka. Materiál použitý v této práci pocházel od soukromého zemědělce, dle jeho informace nebyl chemicky ošetřen.

Jazykovité květy poměrně detailně zkoumal PYREK^{6, 13} a byl popsán výskyt kaurenových diterpenů a auronu loliolidu acetátu. Za hlavní sekundární metabolit ze skupiny kaurenů se považuje kyselina trachyloban-19-ová. Dále byla popsána přítomnost řady dalších kaurenů jako minoritní doprovod výše uvedené sloučeniny. Žádné jiné práce na téma obsahových látek jazykovitých květů *Helianthus annuus L.* nebyly publikovány. U kyseliny *ent-kaur-16-en-19-ové*, ale izolované z jiného zdroje, byla zaznamenána antifungální aktivita proti *Saccharomyces cerevisiae*¹⁶ a *Candida albicans*²⁰ (ačkoliv zdroj 16 uvádí, že je daná kyselina je k tomuto organismu neaktivní). Z těchto důvodů se fytochemická studie jazykovitých květů s následným hodnocením mykotoxicity jevila jako velice perspektivní.

Vzhledem k literární rešerši a obecným znalostem o obsahových látkách byla pro zpracování jazykovitých květů navržena jednočlenná perkolace 60% ethanolem. Bylo získáno 46,13 g extraktu. Ten byl dále vytřepáván chloroformem (získáno 0,28 g) a butanolem (získáno 11,54 g). Sediment vodné fáze byl rozpuštěn v methanolu a předběžně dělen sloupcovou chromatografií na molekulovém síti Sephadexu LH 20. Jako eluční činidlo byl použit 80% ethanol. Vizuálně a pomocí TLC bylo indikováno větší množství sloučenin, které však nebyly v jednotlivých frakcích dostatečně odděleny. Pro další zpracování této fáze byla proto zvolena chromatografie na

silikagelové sloupcové koloně. Jako elučňi činidlo byla použita směs xylynu a chloroformu a následně směsi chloroformu s methanolem. Na TLC bylo několik dobře separovaných skvrn. Jednotlivé frakce byly předány k dalšímu zpracování na HPLC. TLC chloroformové fáze provedená se standardy kyseliny oleanolové, kumarové, betulinové a aukubinu neprokázala přítomnost těchto látek v extraktu. Chloroformová fáze nebyla dále zpracovávána z důvodů jejího malého množství.

Středem našeho zájmu byla butanolová fáze, kde bylo možno očekávat výskyt kaurenových derivátů. Ta byla nejprve předběžně dělena sloupcovou chromatografií na molekulovém síti Sephadex LH 20, jako mobilní fází byl použit 80% ethanol, která prokázala dobrou dělicí schopnost této soustavy. Poté bylo provedeno hlavní dělení butanolové fáze. Bylo získáno 15 frakcí. Byla provedena UV –VIS spektroskopie těchto frakcí. Z některých frakcí se po určité době stání za chladu objevily krystaly. Byla měřena antioxidační aktivita jak těchto krystalů, tak jejich příslušných mateřských louhů. U žádného vzorku nebyly prokázány významné antioxidační vlastnosti. Krystaly frakce K1 byly podrobeny NMR analýze C13 a H1 na Katedře anorganické a organické chemie. Bylo zjištěno, že se jedná o čistou látku *ent*-kaur-16-en-19-ovou kyselinu (kyselinu kaurenovou). Tato sloučenina již byla dříve v jazykovitých květech *Helianthus annuus L.* dokázána. Na základě TLC byla zjištěna shodnost složení krystalů K1, K3, K9, K7, K2 a K10 se závěrem, že ve všech případech se jedná o kyselinu kaurenovou. Odlišnost na TLC ukazovaly krystaly frakce K4, které byly podrobeny NMR analýze C13 a H1 na Katedře anorganické a organické chemie. Jedná se pravděpodobně o cholestan-5,22-dien-2-ol (3 β ,22E). Přítomnost této sloučeniny nebyla doposud nikdy v jazykovitých květech *Helianthus annuus L.* publikována. V současné době probíhá konfirmační analýza této sloučeniny.

V jazykovitých květech byla tedy potvrzena pouze přítomnost kyseliny kaurenové, ačkoliv kvantitativně nejvýznamnějším kauranem je kyselina trachyloban-19-ová^{6,13}. Lze tedy vážně uvažovat o tom, že hlavním metabolitem v jazykovitých květech je možná právě námi dokázaná kyselina kaurenová. Nebyl prokázán žádný minoritní kauran, což lze vysvětlit nízkým obsahem těchto sloučenin v jazykovitých květech. Množství krystalů námi získané bylo příliš malé na to, aby byly tyto sloučeniny zachyceny v identifikovatelném množství. Přítomnost v literatuře uváděného loliolid acetátu rovněž nebyla potvrzena. Další dokázanou sloučeninou byl cholestan-5,22-dien-2-ol (3 β ,22E), je však nezbytně nutné počkat na výsledky konfirmační analýzy.

Úborová lůžka byla rovněž podrobena rozsáhlému fytochemickému výzkumu, jehož výsledkem byla izolace řady sekundárních metabolitů typu kauranů a flavonoidů⁹. Ze semen byly izolovány gibberelliny^{38,39,40}. Byla provedena rovněž detailní analýza obsahových látek pylových zrn^{20,21,28}. Z úborových lůžek byly izolovány benzopyranové deriváty 6-acetyl-2,2-dimethyl-1,2-benzopyran a 6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethyl-1,2-benzopyran⁷. Existuje také celá řada studií zabývajících se izolací látek z nadzemních částí nebo celých rostlin.

Prací zabývajících se samotnými úborovými lůžky není mnoho a navíc dokázané látky typu benzopyranů vykazovaly vyjimečný antifungální efekt proti *Pyricularia oryzae*, který v obdobné síle nebyl zaznamenán u žádného z extraktu z jiných částí rostliny⁷. Antifungální vlastnosti byly zaznamenány i u extraktu z celých úborových lůžek⁴³. Z těchto důvodů byla úborová lůžka vybrána jako vhodný materiál pro fytochemickou studii s cílem analyzovat obsahové látky, nalézt již publikované zástupce benzopyranů a otestovat tyto látky na humánních patogenních houbách.

Vzhledem k literární rešerši a obecným znalostem o obsahových látkách a výsledkům předběžné extrakce byla pro zpracování úborových lůžek navržena opět jednočlenná perkolace 60% ethanolem.

Ethanolový extrakt byl postupně vytřepáván petroletherem (získáno 35,37 g), chloroformem (získáno 5,87 g) a butanolem (získáno 11,54 g). Na základě TLC, množství izolovaných fází a polaritě očekávaných sloučenin byla k následujícímu dělení použita pouze butanolová fáze. Ta byla dělena sloupcovou chromatografií na silikagelu. Jako mobilní fáze byla nejprve použita směs chloroformu a methanolu se stoupající koncentrací methanolu a poté ethanol. Výsledkem bylo získání 31 kvalitativně odlišných frakcí, které čekají na další zpracování.

6. SOUHRN

Cílem této práce bylo fytochemické hodnocení jazykovitých květů *Helianthus annuus L.* a zpracování úborových lůžek pro následnou analýzu téže rostliny.

Výsledky lze shrnout takto:

1. Vodná fáze jazykovitých květů byla rozdělena na 6 frakcí, které čekají na další zpracování.
2. V jazykovitých květech nebyla prokázána přítomnost kyseliny ursolové, oleanolové, kumarové, betulinové a aukubinu.
3. Žádná ze zkoumaných frakcí dělení butanolové fáze nevykazovala významné antioxidační vlastnosti.
4. V jazykovitých květech byla pomocí NMR analýzy C13 a H1 prokázána *ent*-kaur-16-en-19-ovou kyselina.
5. V jazykovitých květech byla pomocí NMR analýzy C13 a H1 pravděpodobně prokázána přítomnost cholestan-5,22-dien-2-olu (3 β ,22E). Jeho přítomnost je však třeba ještě dodatečně potvrdit.
6. Byla zpracována úborová lůžka. Na další zpracování čekají petroletherová, chloroformová a vodná fáze a 31 kvalitativně odlišných frakcí dělení butanové fáze.

7. LITERATURA

1. Takhtajan A.L.. *Diversity and Classification of Flowering Plants*. Columbia University press, New York, 642 pp (1997)
2. Valíček P. a kolektiv, *Užitkové rostliny tropů a subtropů* Academia Praha, str. 127 (2002)
3. Hrouda L., Skalický V., *Květena České republiky* Academia Praha, díl 7 (1990)
4. Macías F. A., Varela R. M., Torres A., et al, *Phytochemistry* 48, 631-636 (1998)
5. Leifertová I., Baloun J., *Farmaceutická botanika* Státní pedagogické nakladatelství Praha, str. 146 (1990)
6. Pyrek J. St., *Tetrahedron* 26, 5029-5032 (1970)
7. Satoh A., Utanuta H., Ishizuka M., Endo N., Tsuji M., Nishimura H., *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(4), 664-665 (1996)
8. Macías F. A., Varela R. M., Torres A. and Molinillo J. M. G., *Phytochemistry* 34, 669-674 (1993)
9. Ali A. Alfatafta, et al., *Phytochemistry* 31, 4109-41137 (1992)
10. Melek F. R., Gage D. A. Gershenzon J. and Marby T. J., *Phytochemistry* 24, 1537 (1985)
11. Spring O., Benz T. and Ilg M., , *Phytochemistry* 28, 745-7491(1989)
12. Spring O., Albert K. and Hager A., *Phytochemistry* 21, 2551-2553 (1982)
13. Pyrek J. St., *J.of Nat. Products* 47, 822-827 (1984) *J.Nat. Prod.*
14. Ghisalberti E. L., *Fitoterapia* 68, 303-325 (1997)
15. Mitscher L. A. Rao G. S., Veysoglu T., Drake S., Haas T., *J. Nat. Prod.*46, 745 (1983)
16. Oguntimein B. O., *Fitoterapia* 58, 411 (1987)
17. Slimetad R., Marston A., Mavi S., Hostettmann K., *Planta Med.* 61, 562 (1995)
18. Mathur S. B., Garcia Tello P., Fermin C. M., Mora-Arellano V., *Latinoamer. Quim.* 6, 275 (1975)
19. Nakano M., Fukushima M., Azuma H., *J.Food Hyg. Soc. Jap.* 36, 22 (1995)
20. Ukiya M., Akihisa T., Tokuda H., et al, , *J. Agric. Food Chem.* 51, 2949-2957 (2003)
21. Ukiya M., Akihisa T., Tokuda H. et al., *J. Nat. Produkt* 66, 1476-1479 (2003)
22. Macías F.A, Torres A. et al., , *Phytochemistry* 61, 687-692 (2002)
23. Macías F. A. et al., , *J. Org. Chem.* 59, 8261-8266 (1994)
24. Macías F. A., Varela R. M., Torres A., , *Tetrahedron Lett.* 40, 4725-4728 (1999)

25. Macías F. A., Varela R. M., Torres A. and Molinillo J. M. G., *J. Nat. Prod.* **62**, 1636-1639 (1999)
26. Macías F. A., Oliva R. M., Varela R. M., Torres A. and Molinillo J. M. G., *Phytochemistry* **52**, 613-621 (1999)
27. Macías F. A., López A., Varela M. R., et al, *Tetrahedron Lett.***45**, 6567-6570 (2004)
28. Schulz S., Arsene C., Tauber M. et al, *Phytochemistry* **54**, 325-336 (2000)
29. Němč P., Diplomová práce. Karlova univerzita, Hradec Králové (1998)
30. Bell. E.A., Cherlwood B. V., *Secondary Plant Products* Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1980)
31. Bader G., Zieschang M., Wagner K., Grundemann E., Hiller K., *Planta Med.* **57**(5), 471-4 (1991)
32. Murray R. D. H., Méndez J. a Brown S. A., *The natural coumarins: occurrence chemistry and biochemistry*, ed. J. Wiley and Sons, Chichester U. K. (1982)
33. Hubík J., Dušek J., Řezáčová A. a Štarhová H., *Obecná farmakognosie Díl II Sekundární látky* SPN Praha, str. 24 (1978)
34. Macías F. A., López A., Varela R. M., Torres A. and Molinillo J. M.G., *Phytochemistry* **65** (22), 3057-3063 (2004)
35. Macías F. A., López A., Varela R. M., Torres A. and Molinillo J. M.G., *Tetrahedron Lett.***39**, 427-430 (1998)
36. Macías F. A., López A., Varela R. M., Torres A., Molinillo J. M.G a Castellano D., *Phytochemistry* **45**, 683-687 (1997)
37. Macías F. A., López A., Varela R. M., Torres A., Molinillo J. M.G., *Tetrahedron Letters* **37**, 7023-7025 (2003)
38. Michael Hutchison M., Paul Gaskin P., Jake MacMillan J. and Bernard O. P., *Phytochemistry* **27**(8), 2695-2701 (1988)
39. Owen J., Mander L. N., Gaskin P. and Macmillan J., *Phytochemistry* **42**(4), 921-925 (1996)
40. Castellano J. S., MacMillan J., Singh A. K. and Willis C. L., *J. Chem. Soc.* **1**, 145 – 152 (1990)
41. Bruneton J., *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medical Plants*, Intercept Ltd Andover England, (1995)
42. Jahodář L., *Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty*, Karolinum Praha, str. 40 (1995)

43. Homans A. L. and Fuchs A., J. Chromatogr. 51, 327-329 (1970)