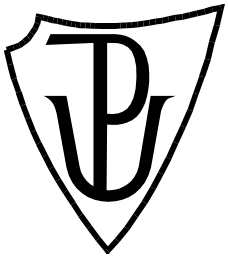
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Profilování farmakologicky významných fytoekdysteroidů ve vybraných rostlinných druzích

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracovala:	**Jana Demlová**
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.**
Termín odevzdání práce:	21. 7. 2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Demlová
Název práce	Profilování farmakologicky významných fytoekdysteroidů ve vybraných rostlinných druzích
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	Předložená bakalářská práce je zaměřena na izolaci a stanovení fytoekdysteroidů v rostlinných pletivech. Cílem této bakalářské práce bylo provést screening přítomnosti a obsahu vybraných fytoekdysteroidů v některých rostlinných druzích. Teoretická část je věnována především samotným ekdysteroidům, fytoekdysteroidům (PECs), jejich vlastnostem, izolaci a stanovení. Experimentální část je zaměřena na porovnání separačních metod pro stanovení PECs a popisu rostlin a čeledí, ve kterých bylo jejich zastoupení PECs nalezeno největší. Kapitola výsledky a diskuze je zaměřena na souhrn a zhodnocení získaných poznatků.
Klíčová slova	ekdysteroidy, extrakce na pevné fázi, kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	45
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author´s first name and surname	Jana Demlová
Title of thesis	Profiling of pharmacologically important phytoecdysteroids in selected plant species
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	M.Sc. Danuše Tarkowská, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	This bachelor thesis is focused on the isolation and the determination of phytoecdysteroids (PECs) in plant tissue. The aim of this study was to screen the presence and the content of selected PECs in some plant species. The theoretical part of the thesis is devoted mainly to ecdysteroids, ECs, their physico-chemical properties, isolation and determination. The experimental part is focused to the comparison of separation methods for PECs determination and description of plants and families, in which the highest levels of PECs were found. The chapters Results and Discussion are focused on the summary and description of the findings obtained.

Keywords	ecdysteroids, solid-phase extraction, liquid chromatography, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, mass spectrometry
Number of pages	45
Number of appendices	none
Language	Czech

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že jsem svou předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Danuše Tarkowské, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 21. 7. 2015 ……..

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat především své vedoucí bakalářské práce Mgr. Danuši Tarkowské, Ph.D. za ochotu, trpělivost, odborné vedení, podávání cenných rad a informací při zpracování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Tiboru Béresovi, Ph.D. z Laboratoře růstových regulátorů za vedení v oblasti kapilární elektroforézy a své rodině za podporu.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ECs	ekdysteroidy
PECs	fytoekdysteroidy
20E	20-hydroxyekdyson
polB	polypodin B
ajuC	ajugasteron C
ponA	ponasteron A
stachC	stachysteron C
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC	ultra-účinná kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
CE	kapilární elektroforéza
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
UV	ultrafialová spektrometrie
SPE	extrakce na pevné fázi

Obsah

1. Cíle práce ..... - 9 -
2. Teoretická část ..... - 10 -

2.1. Úvod ..... - 10 -
2.2. Teoretická část a rešeršní část ..... - 10 -
2.2.1. Ekdysteroidy – historie a současnost ..... - 10 -
2.2.2. Živočišné ekdysteroidy (zooekdysteroidy) ..... - 13 -
2.2.3. Rostlinné ekdysteroidy (fytoekdysteroidy) ..... - 14 -
2.2.3.1. Parcha saflorová (*Leuzea carthamoides*) ..... - 15 -
2.2.4. Chemické a fyzikální vlastnosti fytoekdysteroidů ..... - 16 -
2.2.5. Extrakce a izolace ekdysteroidů ..... - 16 -
2.2.6. Instrumentální metody analýzy ekdysteroidů ..... - 20 -

3. Experimentální část ..... - 24 -

3. 1. Chemikálie ..... - 24 -
3. 2. Rostlinný materiál ..... - 24 -
3. 3. Přístroje a pomůcky ..... - 24 -
3. 4. Postup práce ..... - 24 -
3. 5. Vyhodnocení experimentálních dat ..... - 24 -

4. Výsledky a diskuze ..... - 24 -

5. Závěr ..... - 24 -

6. Použitá literatura ..... - 25 -

1. Cíle práce

Cíle této bakalářské práce byly stanoveny takto:

- vypracovat literární rešerši na téma ekdysteroidy, fytoekdysteroidy a zooekdysteroidy

- provést screening přítomnosti a obsahu zvolených fytoekdysteroidů ve vybraných rostlinných druzích pomocí dvou nezávislých instrumentálních metod

- na základě získaných výsledků porovnat obě metody pro stanovení fytoekdysteroidů v rostlinných pletivech

2. Teoretická část

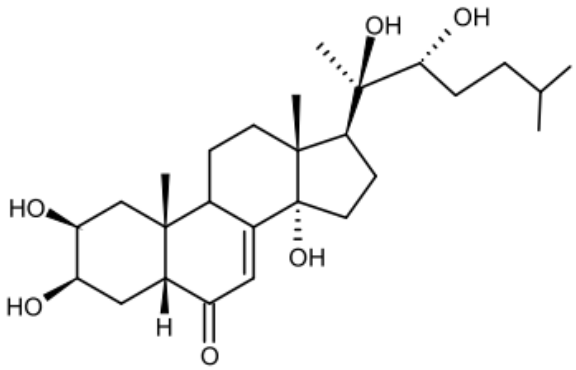
2.1. Úvod

Ekdysteroidy (ECs) byly objeveny prvotně jako svlékací hormony u hmyzu (Dinan, 2001). V pozdějších výzkumech se ukázalo, že se ECs vyskytují i u rostlin, a to ve větším množství než u hmyzu. Ekdysteroidy tedy byly na základě tohoto poznatku rozděleny na rostlinné ECs (fytoekdysteroidy) a ECs živočišné (zooekdysteroidy). Nejvýznamnějším a nejčastěji izolovaným ekdysteroidem je přitom 20-hydroxyekdyson (20E), který má, co se týče rostlin, největší zastoupení v parše saflorové (*Leuzea carthamoides*, viz kapitola 2.2.3.1.).

2.2.Teoretická část a rešeršní část

2.2.1. Ekdysteroidy – historie a současnost

Ekdysteroidy (ECs) tvoří v současnosti skupinu asi 476 polyhydroxylovaných triterpenoidů, které jsou strukturně příbuzné hlavnímu steroidnímu hormonu bezobratlých α-ekdysonu (**Obr. 1**).

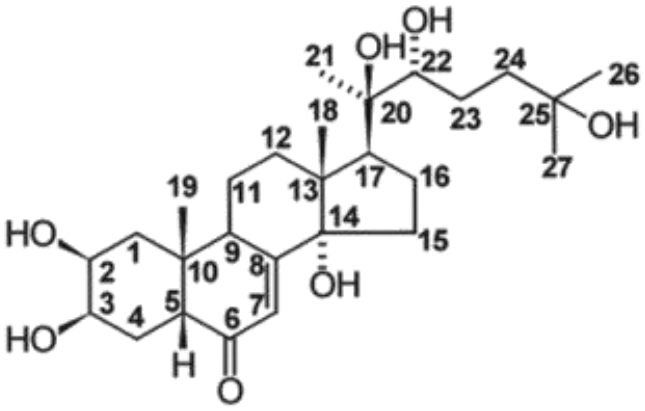


Obr. 1. Chemická struktura α-ekdysonu.

Ten byl prvně izolován v roce 1954 Butenandtem a Karlsonem z kukly bource morušového (Butenandt a Karlson, 1954), ale jeho struktura byla objasněna až v roce 1965 pomocí prostředků OFX-ray krystalografie (Huber a Hoppe, 1965). ECs jsou steroidní hormony

všech tříd členovců a pravděpodobně i dalších bezobratlých a byly uznány jako první steroidní hormony řídící svlékání a metamorfózu u hmyzu (*lat.* ecdysis = svlékání; Dinan, 2001). V současné době jsou tyto steroidní látky přítomny ve všech stádiích vývoje hmyzu, přičemž regulují mnoho důležitých biochemických a fyziologických procesů jako např. embryonální a postembryonální vývoj dospělců, již zmíněnou metamorfózu, rozmnožování a v neposlední řadě diapauzu (Koolman, 1989). Ačkoli je vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou ekdysteroidů znám jen částečně, bylo nalezeno několik strukturních požadavků na tyto molekuly jakožto biologicky aktivních molekul. S ohledem na chemickou strukturu ECs (**Obr. 2**) jde tedy především o:

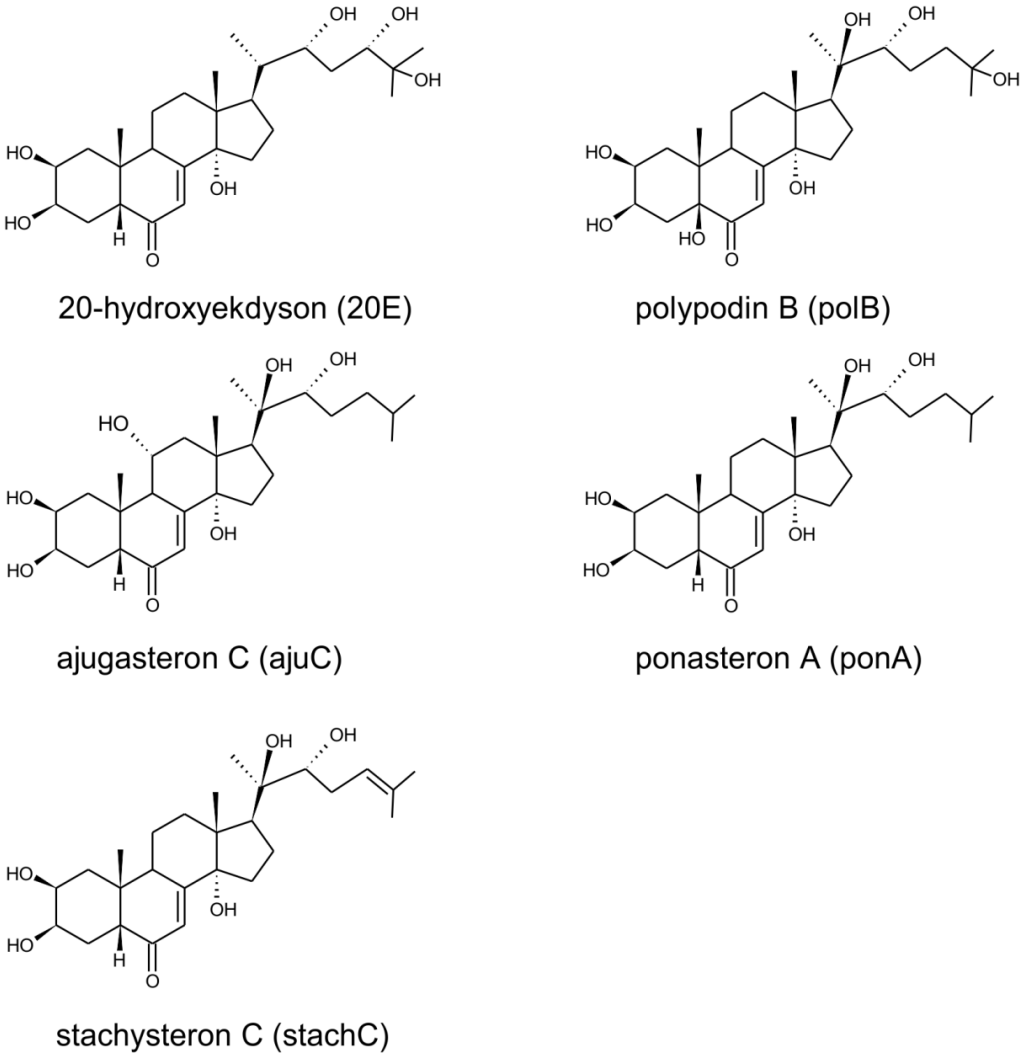
a) *cis* konfiguraci spojení kruhu A/B
b) přítomnost 7-en-6-on skupiny
c) kompletní sterolový vedlejší řetězec obsahující kyslík v poloze *22R* a v některých případech další alkylové skupiny v poloze 24α
d) kyslík obecně ve formě 3β-OH
e) další OH skupiny na C-14 a C-2β, a v mnoha případech také na C-20 and C-25



Obr. 2. Struktura typického ekdysteroidu (20-hydroxyekdyson) znázorňující číslování uhlíkových atomů (Dinan, 2001).

Přestože byly ECs původně objeveny v živočišných zdrojích, bylo zjištěno, že jsou přítomny rovněž ve více než 100 druzích suchozemských rostlin (kapradiny, nahosemenné i krytosemenné rostliny - Fukuzawa a kol., 1986). Zajímavostí je, že první izolace ECs z rostlinných zdrojů probíhaly téměř současně. Například při zkoumání chemického složení

listů nahosemenného jehličnanu *Podocarpus nakaii* ve vztahu k protinádorovým látkám, byly izolovány tři polyhydroxylované steroidy - ponasteron A, B a C (Nakanishi a kol., 1966). Ve stejném období skupina vědce Takemota izolovala 20-hydroxyekdyson (20E, **Obr. 3**) a inokosteron (struktura viz http://ecdybase.org) z kořenů *Achyranthes fauriei*, krytosemenné rostliny z čeledi laskavcovitých (Takemoto a kol., 1967). Tyto časné zprávy o výskytu ECs v rostlinách podporovaly další výzkum v této oblasti a brzy se ukázalo, že ekdysteroidy byly při evoluci spíše rozšířeny v rostlinách než v živočiších (přehledný referát viz Hikino a Hikino, 1970; Horn, 1971; Lafont a Wilson, 1996).



Obr. 3. Fytoekdysteroidy vybrané pro účely této bakalářské práce. Chemická struktura 20-hydroxyekdysonu (20E), polypodinu B (polB), ajugasteronu C (ajuC), stachysteronu C (stachC) a ponasteronu A (ponA).

Od objevu analogů ECs v rostlinách bylo navrženo označit tuto skupinu jako fytoekdysteroidy (PECs) a odlišit je tak od těch, které byly izolovány z hmyzu, korýšů a jiných živočišných zdrojů (tzv. zooekdysteroidy, viz kapitola 2.2.2.). Nicméně tento návrh nemusí být považován za úplně směrodatný, protože mnoho ekdysteroidů (např. 20E, makisteron A - http://ecdybase.org nebo ajugasteron) je přítomno jak v živočišných, tak i v rostlinných zdrojích (Fukuzawa a kol., 1986).

2.2.2. Živočišné ekdysteroidy (zooekdysteroidy)

Zooekdysteroidy (ECs) jsou skupinou asi 200 polyhydroxylovaných látek odvozených od α-ekdysonu (**Obr. 1**) a 20E (**Obr. 3**), přičemž výskyt 20E byl prokázán asi u 2/3 druhů z celkového množství živočišných druhů, v nichž byl ECs detekovány (Baltaev a Shangaraeva, 2000). Je uváděno, že poměr ekdysonu a 20E závisí na druhu hmyzu, jeho pohlaví a vývojovém stádiu. Zatímco u mladých housenek jsou koncentrace ECs vysoké, u dospělých larev pak klesají. 20E lze tedy považovat za hlavní aktivní ekdysteroidní hormon, který reguluje svlékací proces u hmyzu *(Insecta* nebo také *Hexapoda*) a korýšů (*Crustaceae*) – Dinan, 2001. Bývá také nazýván „hmyzí svlékací hormon“, popř. *β*-ekdyson, ekdysteron, kommisteron A, isoinokosteron nebo polypodin A. Vzniká aktivací ekdysonu jako prohormonu (Pavlík a kol., 2010). K zooekdysteroidům se ale řadí i velká skupina látek, které ekdysonovou aktivitu nevykazují, ačkoli splňují strukturní kritéria (chromofor konjugovaného ketonu 7-en-6-on cholestanového typu cytoskeletu C_{27} a 5β-vodík, tj. *cis* konfigurace spojení kruhů A/ B).

Mezi ECs patří i produkty hmyzích detoxifikačních (katabolických) drah, které vedou k tvorbě jejich hormonálně neaktivních analog, většinou konjugátů. Jde především o konjugáty s kyselinou fosforečnou (např. 20E-22-fosfát, Williams a kol., 1997), se sacharidy (např. 22-glukosidy, Rharrabe a kol., 2007) nebo s mastnými kyselinami (C22-acylestery, Rharrabe a kol., 2007). Dalšími dvěma způsoby deaktivace bioaktivních ECs u živočichů je hydroxylace a další oxidace až na příslušnou kyselinu na uhlíku C26, a tvorba 3-dehydroekdysteroidů za katalýzy ekdysonoxidasy (Sommé-Martin a kol., 1988).

2.2.3. Rostlinné ekdysteroidy (fytoekdysteroidy)

Fytoekdysteroidy (PECs) jsou rostlinnými analogy živočišných steroidních hormonů ekdysteroidů a některé spadají, díky svému výskytu, jak do skupiny zooekdysteroidů, tak do skupiny fytoekdysteroidů. Typickým příkladem je nejběžnější PEC 20E, který, jak už víme, je zároveň i biologicky aktivním zooekdysteroidem (Dinan, 2001). Za posledních 40 let bylo více než 300 jeho strukturních analogů izolováno z různých rostlinných zdrojů (strukturální, spektrální a biologické údaje a literatura jsou shrnuty na webové databázi Ecdybase (http://ecdybase.org; Lafont a kol., 2002). Další analoga jsou izolována rychlostí 10-20 látek za rok (pro nedávné příklady identifikace nových typů PECs viz Liktor-Busa a kol., 2008; Ho a kol., 2008). Počet důkazů naznačuje, že většina, ne-li všechny druhy rostlin, mají genetickou schopnost generovat PECs (Dinan, 2001). Na základě vyhodnocení vzorků semen vyplývá, že by se mohlo zdát, že 5 - 6% suchozemských druhů rostlin hromadí detekovatelné hladiny ekdysteroidů (Dinan, 1995), ale na základě vzorků listů by to mohlo být až 40% druhů (Dinan a kol., 2001). Rostlinné druhy obvykle obsahují 0,01 - 0,1% PECs z hmotnosti sušiny (*angl.* dry weight, DW, Dinan, 2001). Nicméně u hrstky rostlinných druhů bylo zjištěno, že obsahují i více než 1% DW jako je tomu např. u parchy saflorové (*Leuzea carthamoides*, 2 % v semeni; Koudela a kol., 1995) nebo třeba u *Diploclisia glaucescens* (3,2% ve stonku; Bandara a kol., 1989). Není bez zajímavosti, že koncentrace ekdysteroidů nalezených v rostlinách jsou alespoň 1000krát vyšší než ty, které se nacházejí téměř u všech členovců. Jak již bylo řečeno v úvodu této práce, fytoekdysteroidy se vyskytují ve více než 100 pozemských rostlinách zahrnující především kapradiny, nahosemenné a krytosemenné rostliny. Nacházejí se jak v jednoletkách, tak i v trvalkách. Jak ukazují dřívější studie japonských rostlin (Imai a kol., 1969), 5-6% testovaných rostlin bylo aktivních na ekdysteroidy. Ve výskytu fytoekdysteroidů v rostlinách se nezdá byt na první pohled úplně přesný evoluční trend, ale spíše trend náhodný. Nicméně, nedávné studie zaměřené na větší počet druhů ve specifických skupinách ukazují, že výskyt ekdysteroidů může být spojen s fylogenetickou pozicí (Dinan a kol., 1998; Savchenko a kol., 1998; Zibareva, 2000). Například zatímco jsou ECs přítomny téměř ve všech rostlinách v rámci rodu *Chenopodium* (merlík), pak na druhou stranu naopak chybí ve všech členech podrodu *Ambrosia* (ambrózie, Dinan a kol., 1998).

Dráhy biosyntézy a metabolismu fytoekdysteroidů i vzájemná přeměna jejich analog jsou pochopeny pouze částečně (Lafont, 1998; Dinan, 2001). Navíc není prakticky nic známo o regulaci těchto drah v rostlinách (Dinan a kol., 2009). Jediná skutečně životaschopná hypotéza, která byla předložena pro funkci fytoekdysteroidů v rostlinách je, že slouží k zastrašení fytofágních bezobratlých predátorů, a to buď tím, že je ekdysteroid toxický při požití a/nebo tím, že má antifidantní účinek (přitažlivost potravy snižující - Descoins and Marion-Poll, 1999; Marion-Poll and Descoins, 2002; Calas a kol., 2006, 2007).

Co se týká testování biologické aktivity ekdysteroidů, nejvíce biotestů je prováděno právě na hmyzu. Zatímco entomologové vycházejí z biologické funkce PECs, a uvádějí, že funkce PECs spočívá v obraně rostliny proti herbivornímu hmyzu (Adler a kol., 1999; Soriano a kol., 2004), lékaři a farmaceuti se naopak přiklánějí k názoru, že biologická funkce PECs je spojena se steroidními účinky na býložravce nebo všežravce. Přese všechny tyto poznatky však stále není úloha PECs v rostlině plně zřejmá (Pavlík a kol., 2010). Při studiu fytohormonální aktivity pomocí standardních rostlinných biotestů bylo zjištěno, že aktivita buď chybí, nebo je velmi nízká. Zdá se momentálně nepravděpodobné, že PECs by mohly mít hormonální roli v rostlinách, neboť jejich výskyt není univerzální. Pokud se vyskytují, jejich hladiny mohou být často velmi vysoké, což nepřísluší molekulám hormonálního charakteru. Nicméně bylo prokázáno, že PECs mají například značný vliv na růst, buněčnou velikost a biochemické vlastnosti v sinici *Nostoc* (Maršálek a kol., 1992) a v *Chlorella vulgaris* (Bajguz a Dinan, 2004).

Kromě vyšších rostlin byla přítomnost ekdysteroidů prokázána také v některých houbách (Fungi, dříve Mycophyta, odtud "mykoekdysteroidy"; Kovganko, 1999, Sun a Yasukawa, 2008). Zatím ale není jasné, zda houby generují tyto látky *de novo* nebo přebírají a upravují PECs ze substrátu, na kterém rostou. Ekdysteroidům podobné sloučeniny se vyskytují také v řasách, tj. nižších rostlinách (např. v červené mořské řase *Laurencia pinnata* - Fukuzawa a kol., 1981, 1986).

2.2.3.1. Parcha saflorová (*Leuzea carthamoides*)

Parcha saflorová se řadí mezi vytrvalé byliny, je také známa jako maralí kořen či ruská leuzea. Obvykle dorůstá výšky až 150 cm. Její endemický výskyt je v sajano-altajské oblasti jižní Sibiře, kde se přirozeně vyskytuje v nadmořské výšce 1200-2300 m n.m. (Selivanova, 1979; Lotocka a Geszprych, 2004).

V průběhu posledních desetiletí byla rostlina rozšířena do různých regionů střední a východní Evropy, kde se nyní široce pěstuje pro své význačné léčivé vlastnosti (Opletal a kol., 1997).

V současné době se extrakty nebo některé látky z jejích kořenů a oddenků používají pro své adaptogenní (Brekhman a Dardymov, 1969) a budivé účinky v různých potravinových doplňcích nebo nutričních přípravcích na podporu růstu svalové hmoty. Přípravky z parchy dále léčí impotenci, eliminují fyzickou slabost a duševní únavu (Winston a Maimes, 2007) a doporučují se také pro zotavení po operaci, léčbu infekční onemocnění nebo chemickou detoxikaci. Nově jsou součástí různých nealkoholických nápojů, kosmetických a koupelnových produktů (Opletal a Opletalova, 1990; Opletal a kol., 1997).

Kořen parchy slouží pro mnoho biologických a chemických účelů. Používá se často v laboratořích jako vhodný zdroj základních fytoekdysteroidů jako jsou 20E, polB, ajuC, makisteron A a některé z jejich mono- či diacetonidů (Píš a Harmatha, 1992; Píš a kol., 1992; Píš a kol., 1994).

2.2.4. Chemické a fyzikální vlastnosti fytoekdysteroidů

Fytoekdysteroidy (PECs) jsou různorodá třída rostlinných triterpenoidů, které obsahují steroidní kostru a liší se v počtu, poloze a orientaci hydroxysubstituentů i konjugovaných částí. PECs jsou především molekuly obsahující 27 až 29 atomů uhlíku a jsou odvozené od fytosterolů, které byly různě modifikovány. Většina ECs (**Obr. 2**) obsahuje hydroxy skupinu v poloze 14α a methylová skupina na uhlíku C-10 a C-13 má konfiguraci beta. Spojení kruhu B/C a C/D je vždy orientováno do polohy *trans*, zatímco spojení kruhu A/B naopak *cis* (5β-H). Konfigurace 5α-H se vyskytuje jen zřídka. Na rozdíl od jiných rostlinných látek steroidní povahy, brassinosteroidů, obsahuje molekula ECs chromofor (14α-hydroxy-7-en-6-on), což umožňuje těmto sloučeninám absorpci světla v UV oblasti elektromagnetického spektra při vlnové délce 242 nm (v alkoholu) představující maximum jejich absorpčního pásu (Dinan a kol., 2001).

2.2.5. Extrakce a izolace ekdysteroidů

Homogenizace a příprava biologického vzorku je rozhodující fází jak při jeho purifikaci (odstraňování nežádoucí biologické matrice), tak při izolaci vybraných analytů

(cílené obohacování) z biologického materiálu. Celý postup zahrnuje zpravidla tři základní kroky:

1. Drcení, mletí, extrakce vzorku rostlin a úprava hrubého extraktu
2. Koncentrace extraktu nebo podílu při extrakci kapalina-kapalina
3. Izolace nebo čištění extraktu vzorku chromatografickými technikami – např. extrakce na pevné fázi (SPE), iontově-výměnná nebo imunoafinitní chromatografie

Krok 1 slouží k homogenizaci rostlinného vzorku a odstranění pevného podílu rostlinného pletiva z hrubého extraktu ať už filtrací nebo centrifugací. Primárním úkolem homogenizace je pak rozbití buněčných stěn pletiv, aby byla následně umožněna extrakce látek obsažených uvnitř buněk, neboť mnoho látek vzniká a je přeměňováno pouze uvnitř buněk a nikoliv v mezibuněčných prostorech pletiv. Pokud k rozbití stěn rostlinných buněk vzorků pletiv nedojde, v mnoha případech pak není co izolovat ani purifikovat. K homogenizaci se používají nejčastěji kulové mlýnky, které v posledních letech téměř zcela nahradily homogenizaci pomocí tekutého dusíku v třecí misce s tloučkem (Tarkowská a kol., 2014). V extrakčním kroku, který obvykle následuje po homogenizaci vzorku, je pak doporučeno použít nejméně desetinásobek vhodného organického rozpouštědla (obvykle methanol, aceton, etylacetát apod.), aby došlo ke kvantitativní extrakci vybraných přírodních látek z rostlinného vzorku. Extrakty látek, které podléhají rozkladu ať už vlivem vyšších (laboratorních) teplot nebo vlivem oxidace, je zapotřebí navíc zpracovávat s ohledem na tyto skutečnosti (zajistit chlazení vzorku, ošetřit extrakt přídavkem antioxidantu apod.). Další kroky přípravy vzorku se pak řídí selektivně s ohledem na chemickou povahu a vlastnosti analytů, resp. povahu matrice a obsah primárních a sekundárních metabolitů, popř. jiných látek, které mohou následně nežádoucně interferovat s koncovou analýzou (např. proteiny, lipidy, rostlinná barviva).
Příprava vzorku pro účely analýzy ekdysteroidů byla v minulosti založena zejména na jejich rozpustnosti, resp. jejich schopnosti rozdělovat se mezi rozpouštědla různé povahy (extrakce kapalina-kapalina). Obecně platilo, že organickým rozpouštědlem první volby byl aceton, kterým byly odstraněny sloučeniny polárnější, než jsou ECs. V dalším kroku byl pro vytřepání z acetonového extraktu použit vodný roztok methanolu a hexanu (nebo jiného rozpouštědla, která jsou mísitelná s nepolárními uhlovodíky), přičemž hexan měl za úkol odstranit většinu látek s charakterem méně polárním, než byly ECs. Tento krok se obvykle i nadále v současnosti provádí s cílem ekdysteroidového obohacení při výrobě produktů pro zdraví (potravinové doplňky prodávané jako adaptogeny).

V laboratorním analytickém měřítku je extrakce kapalina-kapalina nyní často nahrazována extrakcí na pevné fázi (angl. solid-phase extraction, SPE). Tato metoda slouží také k obohacování ECs z rostlinných extraktů na principu odstraňování některých látek majících podobnou polaritu jako ECs, ale lišících se substituenty na aromatickém kruhu. SPE se používá především při izolaci čistých ECs, tj. hlavním cílem SPE je zde efektivní snížení množství nečistot. Často používaným sorbentem pro SPE je polyamid, jehož podstatnou výhodou je to, že ECs jsou z něj eluovány dříve než znečišťující látky (např. fenoly), čímž je sníženo riziko další kontaminace na minimum (Báthori, 2002). SPE na bázi polyamidu zde předchází homogenizace rostlinného pletiva (drcení a mletí) a extrakce rostlinných steroidů do vodných roztoků metanolu o koncentraci 30-50% (viz Schéma 1 nebo Bathori a kol., 1986, 1988).

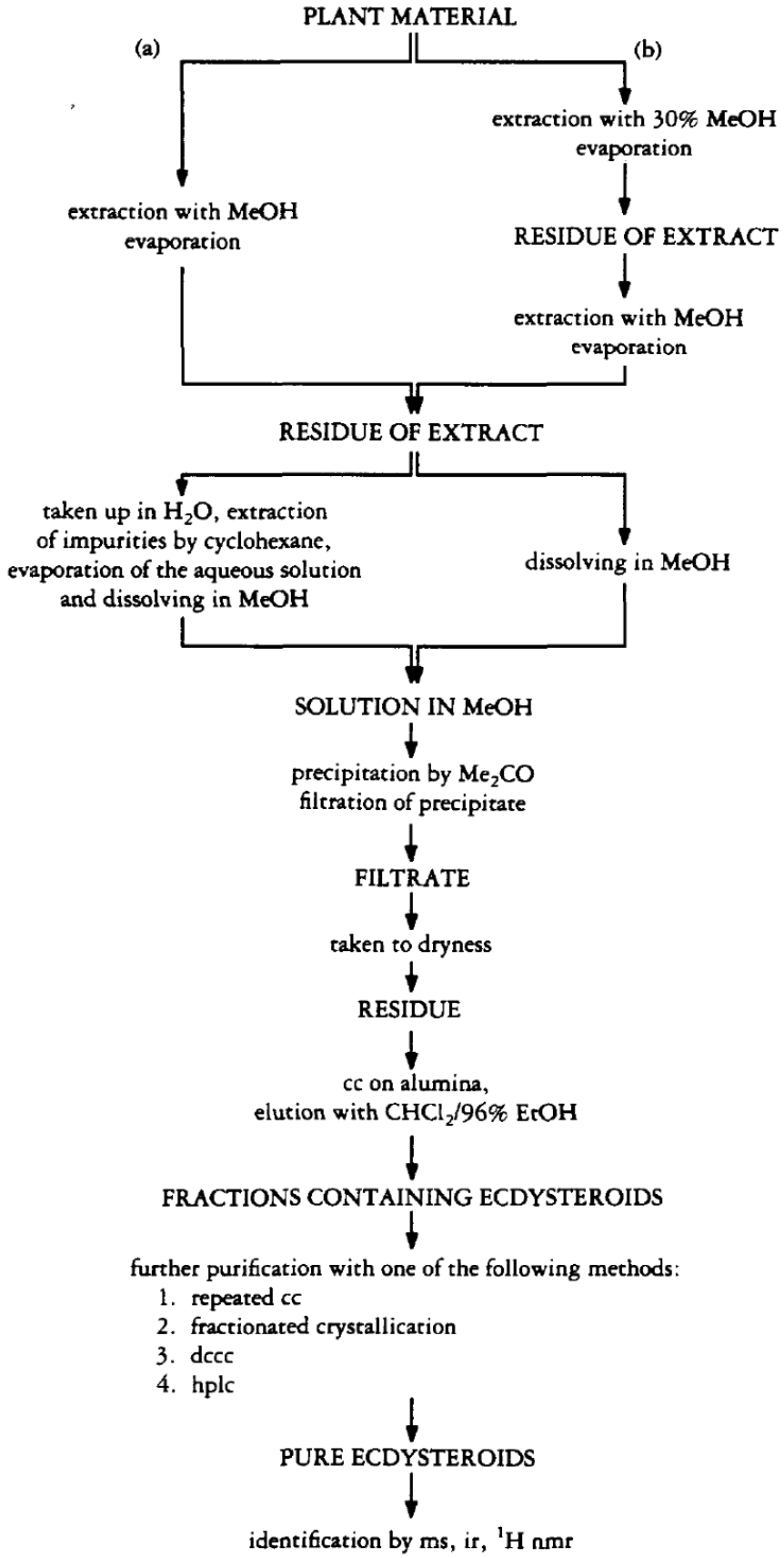


Schéma 1. Schéma izolace rostlinných ekdysteroidů. Přejato z Girault a kol., 1990.

Princip SPE

Analyty jsou zakoncentrovány díky sorpci ze vzorku na pevném sorbentu (viz Schéma 2), k němuž mají větší afinitu než k rozpouštědlu, ve kterém jsou na SPE kolonku nanášeny (krok B). Rozpouštědlem stejného složení je kolonka před nanesením vzorku kondicionována (krok A). Ostatní komponenty vzorku jsou zachycovány co nejméně. Analyty jsou po promytí sorbentu (eluce interferentů, krok C) uvolněny ze sorbentu elucí vhodným rozpouštědlem (krok D), které má výrazné solvatační schopnosti pro sledované analyty.

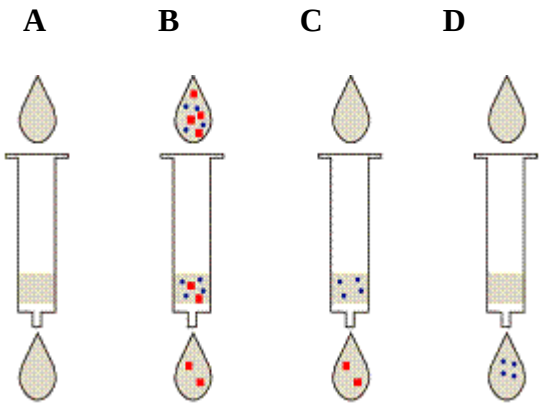


Schéma 2. Proces zakoncentrování za použití SPE techniky. ● Analyty, ■ Nečistoty **A**-kondicionace, **B**-dávkování vzorku, **C**-promývání, **D**-eluce. Přejato z http://www.labicom.cz/spe-kolonky-81/

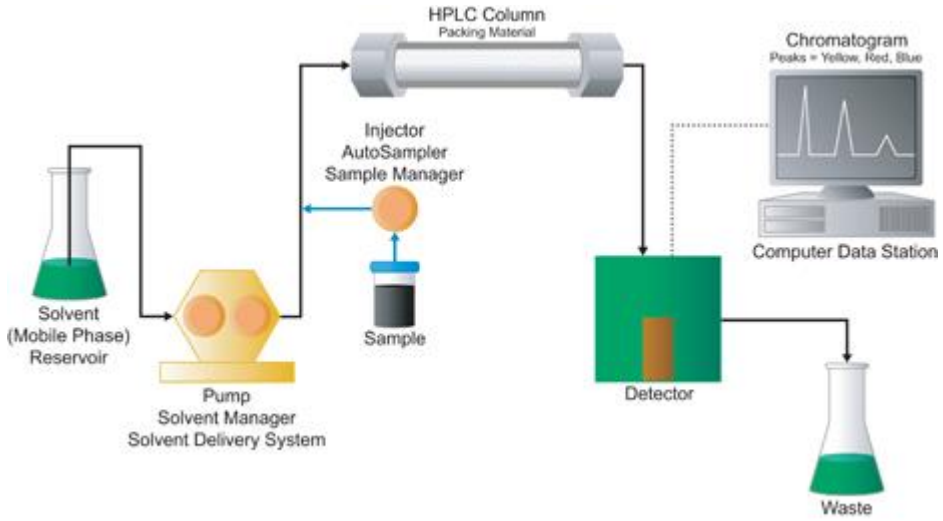
2.2.6. Instrumentální metody analýzy ekdysteroidů

Kapalinová chromatografie

Metody založené na použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) byly v minulosti nejčastěji používanými metodami pro separaci ekdysteroidů izolovaných z různých biologických zdrojů ať už v měřítku analytickém nebo preparativním (Lafont a Wilson, 1991). Pro tyto účely bylo využíváno zejména chromatografie na normálních fázích (NP; Lafont a kol., 1994a) za použití polárně i nepolárně vázaných „silica“ kolon,

ale i chromatografických kolon pro práci v systému reverzních fází (RP). Pro detekci bylo nejčastěji využito diode array detektorů (UV), radiodetektorů a v neposlední řadě i hmotnostních spektrometrů (MS). Metoda HPLC/UV je v současné době méně používána vzhledem k tomu, že často dochází ke koeluci ECs, které nelze při téže vlnové délce (jeden chromofor u většiny analytů) rozlišit. Bývá tedy stále častěji nahrazována metodou HPLC/MS (Lafont a kol., 1994b; Wainwright a kol., 1997). HPLC/MS dosahuje proti metodě HPLC-UV vyšší citlivosti a zároveň poskytuje velmi spolehlivé stanovení ekdysteroidů, a to i v případě pouze stopového množství ECs (Dinan, 1995).

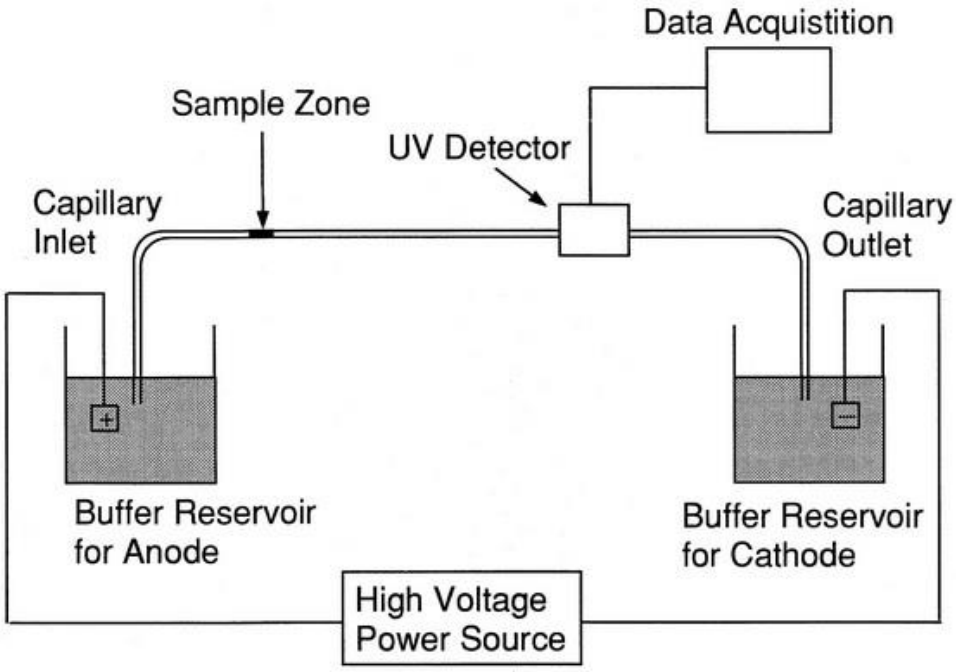
Novým separačním formátem kapalinové chromatografie využívaným v poslední době je ultraúčinná kapalinová chromatografie, tj. UHPLC (angl. Ultra-High Performance Liquid Chromatography - **Obr. 4**). Pro separaci látek se zde využívá sorbentů o velikosti částic menších než 2 μm. Tím je dosaženo zpětných tlaků až 15 000 psi (1034,2 bar; 103,4 MPa), při kterých dosahují separace vysokých účinností díky zvýšenému počtu teoretických pater kolony. Krom výše zmíněných výhod, přináší UHPLC i řadu dalších předností oproti klasické HPLC technice, a to konkrétně kratší dobu analýzy, tj. vyšší průchodnost vzorků (vyšší produktivita), snížení nákladů (menší spotřeba HPLC rozpouštědel), snížení meze detekce a zvýšení citlivosti. K dnešnímu dni ovšem nebyla žádná metoda využívající UHPLC pro separaci ECs publikována.



Obr. 4. Schéma přístroje pro ultra-účinnou kapalinovou chromatografii. Přejato z http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055.

Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je elektromigrační metoda, která se provádí nejčastěji v křemenné kapiláře naplněné nosným elektrolytem a ponořené oběma konci do elektrodových nádobek (viz **Obr. 5**). Při separaci látek se zde vedle elektroforetického principu (pohyb nabitých molekul v elektrickém poli) uplatňuje též tzv. elektroosmotický tok (angl. **e**lectro**o**smotic **f**low, EOF), což je spontánní tok kapaliny v kapiláře v důsledku vzniku záporného náboje na vnitřní stěně kapiláry při pH vyšších než 7 (disociace silanolových skupin křemenné kapiláry). Následně dochází k tomu, že kationty se shromažďují u povrchu kapiláry a vytvářejí tak dvojvrstvu (tzv. Sternova vrstva), která se po umístění kapiláry do stejnosměrného elektrického pole začne pohybovat ke katodě a strhává s sebou veškerou kapalinu v kapiláře včetně neutrálních molekul, které by jinak v elektrickém poli nemigrovaly. Výsledný pohyb nabitých molekul je pak součtem (kationty) či rozdílem (anionty) elektroforetického pohybu a EOF.



Obr. 5. Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu. Přejato z http://aem.asm.org/content/64/7/2572/F1.expansion.html.

CE byla použita pro separaci mnoha biologicky významných látek. Vzhledem k tomu, že valná většina ECs (pokud ne všechny) nejsou nabitými molekulami, jednoduchá CE umožňující separovat pouze látky s ionizovatelnými skupinami, nemůže být v tomto

případě použita. Z tohoto důvodu je tedy nutné využít micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC), při níž je do základního elektrolytu přidán detergent v kritické micelární koncentraci (nejčastěji dodecyl síran sodný, SDS) tvořící s molekulami ECs nabité micely schopné migrace v elektrickém poli. Za těchto podmínek byla pak tato elektromigrační technika úspěšně použita pro separaci PECs (Large a kol., 1992; Davis a kol., 1993).

5. Závěr

Tato práce byla zaměřena na analýzu 49 druhů rostlin metodou UHPLC-MS/MS s využitím purifikace rostlinného extraktu pomocí extrakce na pevné fázi. U některých rostlin z vybraného souboru byly analyzovány zvlášť jednotlivé části rostliny (květ, stonek, list, kořen, semeno), takže celkový počet rostlinných vzorků nakonec činil 83. V těchto vzorcích byl sledován obsah pěti vybraných fytoekdysteroidů (20E, polB, stachC, ajuC, ponA). 20E byl detekován u zhruba 75% z celkového souboru rostlinných vzorků. Jeho největší koncentrace byla nalezena v parše saflorové, dále u špenátu setého a v hluchavce nachové, což je v souladu s literaturou. Významně vysoké koncentrace 20E byly nalezeny rovněž v šalvěji lékařské, koriandru setém, kustovnici čínské, kokošce pastuší tobolce, mateřídoušce vejčité, brusnici borůvce a hluchavce bílé. Nejvíce zástupců rostlinných druhů měly ve vybraném souboru analyzovaných rostlin rostliny z čeledi hluchavkovitých (*Laminaceae*), u níž bylo detekováno nejvíce 20E v hluchavce nachové, poté v hluchavce bílé, mateřídoušce vejčité, šalvěji lékařské a majoránce zahradní.

Pro orientační screening potencionálně vysokoobsahových rostlinných pletiv bez předchozí purifikace pomocí extrakce na pevné fázi lze s výhodou použít micelární elektrokinetickou chromatografii, která představuje levnější a rychlejší metodu kvantitativní analýzy fytoekdysteroidů.

1. Použitá literatura

Adler JH, Grebenok RJ. 1999. Occurrence, biosynthesis, and putative role of ecdysteroids in plants. *In*: Parish EJ, Nes WD (Eds), Biochemistry and Function of Sterols, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 181–192.

Bajguz A, Dinan L. 2004. Effects of ecdysteroids on *Chlorella vulgaris*. Physiol. Plantarum 121:349–357.

Baltaev UA, Shagaraeva GS. 2000. Zooecdysteroids: Distribution and role in arthropod life cycle. Chem. Nat. Compd. 36:543–559.

Bandara BMR, Jayasinghe L, Karunaratne V, Wanningama GP, Bokel M, Kraus W. 1989. Ecdysterone from stem of *Diploclisia glaucescens*. Phytochemistry 28:1073–1075.

Bathori M, Szendrei K, Miklos P, Pelczer I, Solyrnosi P. 1986. *In*: Chromatography ’85. Kakz H, Enre LS (Ed), Akadtmiai Kiadb, Budapest, pp. 241.

Bathori M, Szendrei K, Orcsik I, Kalhz H, Lafont R, Girault J-P. 1988. *In*: Advances in Steroid Analysis ’87. Gariig S (Ed), Akadtmiai Kiadb, Budapest, pp. 567.

Báthori M, Máthé I, Guttman A. 1998. Determination of 20-hydroxyecdysone content by thin-layer chromatography and micellar electrokinetic chromatography. Chromatografia 48:145–148.

Báthori M. 2002. Phytoecdysteroids effects on mammalians, isolation and analysis. Mini Rev. Med. Chem. 2:285–293.

Brekhman II, Dardymov IV. 1969. New substances of plantorigin which increase nonspecific resistance. Annu. Rev. Pharmacol. 9:419–430.

Butenandt A, Karlson P. 1954. Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormone der Insekten in kristallisierter Form. Z. Naturforsch. 96:389–391.

Calas D, Berthier A, Marion-Poll F. 2007. Do European corn borer femalesdetect and avoid laying eggs in the presence of 20-hydroxyecdysone? J. Chem. Ecol. 33:1393–1404.

Calas D, Thiéry D, Marion-Poll F. 2006. 20-Hydroxyecdysone deters oviposition and larval feeding in the European Graapevine Moth *Labesia botrana*. J. Chem. Ecol. 32:2443–2454.

Davis P, Lafont R, Large T, Morgan ED, Wilson ID. 1993. Micellar capillary electrophoresis of the ecdysteroids. Chromatographia 37: 37–42.

Descoins C, Marion-Poll F. 1999. Electrophysiological responses of gustatory sensilla of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera, Noctuidae) larvae to three ecdysteroids: ecdysone, 20-hydroxyecdysone and ponasterone A. J. Insect Physiol. 45:871–876.

Dinan L, Harmatha J, Volodin V, Lafont R. 2009. Phytoecdysteroids: diversity, biosynthesis and distribution. *In*: Smagghe G (Ed), Ecdysone: structures and functions. New York: Springer Science, pp. 3–45.

Dinan L, Whiting P, Scott AJ. 1998. Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of the Chenopodiaceae. Biochem. Syst. Ecol. 26:553–576.

Dinan L. 1995. Distribution and levels of phytoecdysteroids within individual plants of species of the Chenopodiaceae. Eur. J. Entomol. 92:295–300.

Dinan L. 2001. Phytoecdysteroids: biological aspects. Phytochemistry 57:325–339.

Dinan L, Savchenko T, Whiting P. 2001. On the distribution of phytoecdysteroids in plants. Cell Mol. Life Sci. 58:1121–1132.

Fukuzawa A, Kumagai Y, Masamune T, Furusaki A, Katayama C, Matsumoto T. 1981. Acetylpinnasterol and pinnasterol, ecdysone-like metabolites from the marine red alga *Laurencia pinnata* Yamada. Tetrahedron Lett. 22:4085–4086.

Fukuzawa A, Miyamoto M, Kumagai Y, Masamune T. 1986. Ecdysone-like metabolites, 14α-hydroxypinnasterols from the red alga *Laurencia pinnata*. Phytochemistry 25:1305–1307.

Girault J-P, Bathori M, Varga E, Szendrei K, Lafont R. 1990. Isolation and identification of new ecdysteroids from Caryophyllaceae. J. Nat. Prod. 53:279–293.

Hikino H, Hikino Y. 1970. Anthropod molting hormones. *In*: Herz W, Grisebach H, Scott AI (Eds), Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 28. Springer-Verlag, Vienna, pp. 256–312.

Ho R, Girault J-P, Cousteau P-Y, Bianchini J-P, Raharivelomanana P, Lafont R. 2008. Isolation of a new class of ecdysteroid conjugates (glucosyl-ferulates) using a combination of liquid chromatographic methods. J. Chromatogr. Sci. 46:102–110.

Horn DHS. 1971. The ecdysones. *In*: Jacobsen M, Crosby DG (Eds), Naturally occurring insecticides. Marcel Dekker. New York, pp. 333–459.

Huber R, Hoppe W. 1965. Die Kristall- und Molekul struktur analyse des Insekt enverpuppungs hormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekulmethode. Chem. Ber. 98:2403–2404.

Imai S, Toyosata T, Sakai M, Sato Y, Fujioka S, Murata E, Goto M. 1969. Screening results of plants for phytoecdysones. Chem. Pharm. Bull. 17:335–339.

Koolman J. (Ed). 1989. Ecdysone: From Chemistry to Mode of Action. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Koudela K, Tenora J, Bajer J, Mathova A, Slama K. 1995. Stimulation of growth and development in Japanese quails after oral administration of ecdysteroid-containing diet. Eur. J. Entomol. 92:349–354.

Kovganko NV. 1999. Ecdysteroids and related compounds in fungi. Chem. Nat. Comp. 35:597–611.

Lafont R, Wilson ID. 1991. Advances in Ecdysteroid High Performance Liquid Chromatography. Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones Chromatographic Society Symposium Series, pp 79–94.

Lafont R, Kaouadji N, Morgan ED, Wilson ID. 1994a. Selectivity in the high-performance liquid chromatography of ecdysteroids. J. Chromatogr. A 658:55–67.

Lafont R, Morgan ED, Wilson ID. 1994b. Chromatographic procedures for phytoecdysteroids. J. Chromatogr. A 658:31–53.

Lafont R, Wilson ID. 1996. The Ecdysone Handbook, 2nd Edition, The Chromatographic Society, Nottingham, UK.

Lafont R. 1998. Phytoecdysteroids in the world flora: diversity, distribution, biosynthesis and evolution. Russ. J. Plant Physiol. 45:276–295.

Lafont R, Harmatha J, Marion-Poll F, Dinan L, Wilson ID. 2002. Ecdybase, an ecdysteroid database. http://ecdybase.org

Large T, Lafont R, Morgan ED, Wilson ID. 1992.Advances in capillary electrophoresis. Micellar capillary electrophoresis of ecdysteroids. Anal. Proc. 29:386–388.

Liktor-Busa E, Simon A, Toth G, Bathori M. 2008. The first two ecdysteroids containing a furan ring from *Serratula wolfii*. Tetrahedron Lett. 49:1738–1740.

Lotocka B, Geszprych A. 2004. Anatomy of the vegetative organs and secretory structures of *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae). Bot. J. Linnean Soc. 144:207–233.

Marion-Poll F, Descoins C. 2002. Taste detection of phytoecdysteroids in larvae of *Bombyx mori, Spodoptera littoralis* and *Ostrinia nubilalis*. J. Insect Physiol. 48:467–476.

Maršálek B, Šimek M, Smith RJ. 1992. The effect of ecdysterone on the Cyanobacterium *Nostoc* 6720. Z. Naturforsch. 47c:726–730.

Nakanishi K, Koreeda M, Sasaki L, Chang ML, Hsu HY. 1966. Insect hormones I. the structure ofponasterone A, an insect molting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii* Hay. Chem. Commun. 915–917.

Opletal L, Opletalova V. 1990. Pokroky ve Farmacii 10. Adaptogeny rostlinného původu. Avicenum, Praha.

Opletal L, Sovova M, Dittrich M, Solich P, Dvorak J, Kratky F, Cerovsky J, Hofbauer J. 1997. Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system. 6. *Leuzea carthamoides* (WILLD.) DC: the present state of research and possible use of the taxon. Ceska Slov. Farm. 46: 247–255.

Pavlík M, Ryšavá H, Wimmer Z. 2010. Metabolismus ekdysteroidů u hmyzu (*Insecta*) a význam hmyzí střevní mikroflóry. Chem. Listy 104:831–837.

Píš J, Harmatha J. 1992. Phenylboronic acid as a versatile derivatization agent for chromatography of ecdysteroids. J. Chromatogr. 596:271–275.

Píš J, Hykl J, Buděšínský M, Harmatha J. 1992. Cyclic phenylboronates of ecdysteroids as products of regiospecific reaction with phenylboronic acid. Collect. Czech. Chem. Commun. 58:612–618.

Píš J, Hykl J, Buděšínský M, Harmatha J. 1994. Regioselective synthesis of 20-hydroxyecdysone glycosides. Tetrahedron 50:9679–9690.

Rharrabe K., Alla S., Maria A., Sayah F., Lafont R. 2007. Diversity of Detoxification Pathways of Ingested Ecdysteroids Among Phytophagous Insects. Arch. Insect Biochem. Physiol. 65:65–73.

Santagati NA, Tropea S, Ronsisvalle G. 2005. Analysis of ecdysteroids by micellar electrokinetic chromatography with on-line preconcentration. J. Chromatogr. A 1081:77–86.

Savchenko T, Whiting P, Šik V, Underwood E, Sarker SD, Dinan L. 1998. Distribution and identities of phytoecdysteroids in the genus *Briza* (Gramineae). Biochem. Syst. Ecol. 26:781–791.

Selivanova OK. 1979. Biologicheskie osobennosti i izmenchivost morfologicheskikh priznakov *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin,vyrashivaemogo v Karelii. Rastit. Resur. 15:177–183.

Sommé-Martin G, Colardeau J, Lafont R. 1988**.** Metabolism and biosynthesis of ecdysteroids in the *Drosophila* development mutant ecd1. Insect Biochem. 18:735–742.

Soriano IR, Riley IT, Potter MJ, Bowers WS. 2004. Phytoecdysteroids: a novel defense against plant parasitic nematodes. J. Chem. Ecol. 30:1885–1899.

Sun Y, Yasukawa K. 2008. New anti-inflammatory ergostane-type ecdysteroids from the sclerotium of *Polyporus umbellatus*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18:3417–3420.

Takemoto T, Ogawa S, Nishimoto N. 1967. Studies on the constituents of Achyranthis radix. I. Yakugaku Zasshi 87:1463–1468.

Tarkowská D, Novák O, Floková K, Tarkowski P, Turečková V, Grúz J, Rolčík J, Strnad M. 2014. Quo vadis plant hormone analysis? Planta 240:55–76.

Wainwright G, Prescott MC, Lomas LO, Webster SG, Rees HH .1997. Development of a new high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method for the

analysis of ecdysteroids in biological extracts. Arch. Insect Biochem. Physiol. 35:21–37.

Williams DR, Chen JH, Fisher MJ, Rees HH.1997. Induction of enzymes involved in molting hormone (ecdysteroid) inactivation by ecdysteroids and an agonist, 1,2-dibenzoyl-1-tert-butylhydrazine (RH-5849). J. Biol. Chem. 272:8427–8432.

Winston D, Maimes S. 2007. Adaptogens: Herbs for Strength, Stamina, and Stress Relief. Healing Arts Press, Rochester.

Zibareva L. 2000. Distribution and levels of phytoecdysteroids in plants of the genus *Silene* during development. Arch. Insect Biochem. Physiol. 43:1–8.