

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**ANALÝZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH SLOŽEK
V ROSTLINNÉM MATERIÁLU PLYNOVOU
CHROMATOGRÁFIÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:
Studijní program:
Studijní obor:
Forma studia:

Bc. Jana Nádvoříková
Chemie
Analytická chemie
Prezenční

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2019

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Podpis

Mé poděkování patří především panu doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za jeho trpělivost, čas, ochotu, podnětné rady a věcné připomínky, které mi poskytoval po celou dobu vypracovávání této práce a v neposlední řadě za nápady při řešení problémů. Také bych ráda poděkovala panu Ing. Petru Šňupárkovi, Ph.D. za jeho rady a pomoc týkající se grafických úprav v této práci.

Ráda bych také poděkovala své rodině za jejich pochopení, podporu a za vytvoření ideálních podmínek pro mé studium.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2018_027 a IGA_PrF_2019_028).

Bibliografická identifikace:

| | |
|--------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora: | Bc. Jana Nádvorníková |
| Název práce: | Analýza biologicky aktivních složek v rostlinném materiálu plynovou chromatografií |
| Typ práce: | Diplomová |
| Pracoviště: | Katedra analytické chemie |
| Vedoucí práce: | doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce: | 2019 |
| Abstrakt: | <p>V teoretické části diplomové práce jsou popsány dvě nejznámější rostliny Jižní Ameriky – lapacho a vilcacora. Tato část práce se zabývá jejich popisem jak z botanického, tak především z chemického hlediska. Důraz je kladen zejména na popis a účinek majoritních biologicky aktivních látek. Nechybí zde ani nejpoužívanější metody pro extrakci daných látek. Experimentální část je zaměřena na popis použitých extrakčních technik, kterými byly macerace, akcelerovaná extrakce a superkritická fluidní extrakce. V diskuzní části je srovnávána účinnost těchto tří extrakčních technik z pohledu výtěžnosti hledaných analytů. U každé metody je rovněž vyhodnocován vliv mletí vzorků a derivatizace. Na základě dosažených výsledků pak byla podrobně zkoumána derivatizace činidlem HMDS, při které byly obdrženy neočekávané produkty.</p> |
| Klíčová slova: | alkaloidy, HMDS, lapacho, plynová chromatografie, superkritická fluidní extrakce, vilcacora |
| Počet stran: | 69 |
| Jazyk: | Český |

Bibliographic identification:

Author's first name and surname: Bc. Jana Nádvorníková

Title: Analysis of active substances in plant material by gas chromatography

Type of thesis: Master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

The year of submission: 2019

Abstract: In the theoretical part of the Master's thesis there are described the two most famous plants of South America - lapacho and vilcacora. This part of the thesis deals with their description from both botanical and chemical point of view. Emphasis is placed on the description and effect of major biologically active substances. There are also characterised the most common methods used for extracting the substances. The experimental part is focused on the description of used extraction techniques, which were maceration, accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction. In the discussion part, the efficiency of these three extraction techniques is compared from the point of view of the yield of the searched analytes. The influence of sample grinding and derivatization procedure is also evaluated for each method. Based on the results obtained, the derivatization with HMDS reagent at which unexpected products were obtained was examined in detail.

Keywords: alkaloids, gas chromatography, HMDS, lapacho, supercritical fluid extraction, vilcacora

Number of pages: 69

Language: Czech

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1 Úvod | 1 |
| 2 Teoretická část | 2 |
| 2.1 Řemdihák plstnatý | 2 |
| 2.1.2 Historie | 2 |
| 2.1.3 Léčebné použití | 3 |
| 2.1.4 Taxonomie | 3 |
| 2.1.5 Fytochemie | 4 |
| 2.2 Lapacho – taxonomie | 7 |
| 2.2.3 Chemicky aktivní látky | 11 |
| 2.2.4 Léčivé účinky | 16 |
| 2.3 Metody extrakce účinných látek | 17 |
| 2.3.1 Řemdihák plstnatý | 17 |
| 2.3.2 <i>Handroanthus impetiginosus</i> | 19 |
| 2.4 Analýza bioaktivních látek | 19 |
| 2.4.1 Řemdihák plstnatý | 19 |
| 2.4.2 <i>Handroanthus impetiginosus</i> | 20 |
| 3 Experimentální část | 22 |
| 3.1 Použité chemikálie | 22 |
| 3.2 Přístrojové vybavení | 22 |
| 3.3 Vzorok rostlinného materiálu | 23 |
| 3.4 Příprava extraktů | 23 |
| 3.4.1 Macerace | 23 |
| 3.4.2 Extrakce pomletého rostlinného materiálu | 23 |
| 3.4.3 Extrakce sadou rozpouštědel | 24 |
| 3.4.4 Extrakce pěti vybranými rozpouštědly | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.4.5 | Vysokotlaká extrakce – nepomleté vzorky | 25 |
| 3.4.6 | Vysokotlaká extrakce – pomleté vzorky | 25 |
| 3.4.7 | Superkritická fluidní extrakce | 25 |
| 3.5 | Příprava standardních roztoků | 28 |
| 3.6 | Příprava diazomethanu | 29 |
| 3.7 | Úprava vzorků – derivatizace | 30 |
| 4 | Výsledky a diskuze | 32 |
| 4.1 | Macerace | 32 |
| 4.2 | Extrakce sadou rozpouštědel | 36 |
| 4.3 | Vysokotlaká extrakce | 42 |
| 4.4 | Superkritická fluidní extrakce | 44 |
| 4.4.1 | Kvantifikace | 53 |
| 4.5 | Derivatizace standardů | 53 |
| 5 | Závěr | 60 |
| 7 | Seznam použité literatury | 62 |
| 8 | Seznam použitých zkratk a symbolů | 69 |

1 Úvod

Jižní Amerika je čtvrtým největším světadílem na Zemi a svou rozlohou se řadí k největším územím, rozkládajícím se na jižní polokouli. Je domovem biomů s obrovskou diverzitou rostlinných druhů, kterých je zhruba okolo osmdesáti tisíc. Odhaduje se, že až polovina světové rostlinné populace se vyskytuje v povodí Amazonie, které se rozprostírá na 6,9 milionu kilometrů čtverečních a zasahuje do devíti států. Biodiverzita této oblasti však nesouvisí pouze s rozmanitostí živých organismů, ale je úzce spjata se sociálními a kulturními činnostmi, spojenými se znalostmi a využíváním přírodních zdrojů. Tyto znalosti se pojí již s domorodými obyvateli – Inky, jakožto první civilizací na kontinentu, žijící převážně v Andách. S příjezdem evropských kolonizátorů v 16. století došlo k devastaci velké části území, včetně degradaci mnoha biomů a rozsáhlému odlesňování. I přes to však v dnešní době žije mnoho etnických skupin původního obyvatelstva v tropických lesích, rozprostírajících se přes Kolumbii, Peru, Bolívii, Venezuelu, Ekvádor a Paraguay. Tento fakt může úzce souviset s tím, že až 80 % obyvatel Jižní Ameriky využívá léčivé rostliny. Těch může být odhadem na tisíce a nejvíce rozšířeny jsou v Brazílii. Jedná se například o *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, *Oxalis adenophylla*, *Phyllanthus niruri* L. a také o *Handroanthus impetiginosus* (známý také jako *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb. nebo lapacho) a *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC známou jako vilcacroa. Brazílie je rovněž jednou z mála zemí, ve které vláda poskytuje veřejnou podporu na platby za léčivé přípravky vyráběné z rostlin.¹

I když je domovinou pro lapacho a vilcacoru téměř výhradně Jižní Amerika, díky vyspělosti a celosvětovému obchodu je používání produktů z nich vyráběných rozšířeno po celém světě. Jsou známy především pro svůj imunomodulační a protizánětlivý účinek stejně jako pro možné protinádorové působení, který zatím nebylo klinickými testy plně prokázáno. Hlavními skupinami látek, podílejícími se na léčivém účinku jsou v případě vilcacory alkaloidy, konkrétně oxindolový typ. U lapacha se jedná o chinony, nejznámějším a nejvíce prozkoumaným je naftochinon lapachol.

Extrakce sušeného rostlinného materiálu probíhá nejčastěji pomocí Soxhletovy extrakce, která má však řadu nevýhod, a proto je snaha o nalezení metod, které by tento způsob extrakce mohly nahradit, a které by zároveň svým účinkem byly ve srovnání s původními metodami lepší, nebo alespoň srovnatelné.

2 Teoretická část

2.1 Řemdihák plstnatý

Řemdihák plstnatý. Český název rostliny, který je pro většinu lidí neznámý. Přitom se však jedná o velice užitečnou léčivou rostlinu pocházející z Jižní Ameriky. Tamní obyvatelé jí znají pod jménem „uña de gato“, což v překladu ze španělštiny znamená kočičí dráp. Tento lidový název si vysloužila díky trnům, kterými je pokrytá, a které svým tvarem připomínají právě kočičí dráp. Proto se můžeme v zahraničních publikacích setkat s názvy jako: Cat's claw, Katzenkralle, Samento, Hawk's claw, nebo také vilcacora, či *Uncaria tomentosa*. Poslední uvedené je latinské pojmenování pro tuto rostlinu.²

2.1.2 Historie

O léčivých vlastnostech vilcacory věděli původní obyvatelé Jižní Ameriky již před mnoha staletími. V dnešní době tvoří nejpočetnější skupinu domorodých obyvatel indiánský kmen Asháninka, jenž obývá území Brazílie a Peru. Pokud chce Evropan znát pouze západní medicíny pochopit, jak vlastně funguje a na čem je založeno léčitelství této skupiny lidí, musí začít již u pojmu lidského bytí, který je poněkud odlišný od toho, který je nám běžně předkládán. V jejich pojetí se člověk sestává z fyzického a duchovního bytí, které vzniká v době narození. Obě složky spolu navzájem komunikují a jsou regulovány tzv. regulačním prvkem. Zdravotní poruchy mohou nastat u každé z těchto složek a jedná se poté o fyzické nemoci, psychologické obtíže, či zhoršení regulace dvou přechozích složek. Na čem je tedy založeno léčitelství Asháninků? Vyplývá to z výše uvedených informací. Jestliže je na člověka nahlíženo jako na bytost sestávající z fyzického a duchovního bytí a nemoci mohou postihnout obě tyto složky bytí, pak je nezbytné, aby existovala léčba pro obě tyto složky. Tím se zabývají léčitelé, které můžeme rozdělit do tří úrovní. První z nich se nazývají „anteaviari“ a mají na starost konzultovat jednoduchá onemocnění. Další úrovní jsou intelektuální vůdci a léčitelé zvaní „saripeari“, kteří se zabývají společensko-náboženskými, stejně tak jako sociálně-lékařskými záležitostmi. Poslední, tou nejvyšší úrovní jsou kněží, neboli takzvaní „sancoshi“. Na tuto úroveň jsou vybráni pouze někteří muži, kteří celý svůj život musí strávit v ústraní v džungli, pod dohledem starších mentorů, kteří jim předávají svá moudra a zkušenosti. Úlohou sancoshi je rozpoznání rostlin, které lze využít k odstranění poruch mezi tělem a duchem a tím tak obnovit zdraví člověka. Mezi tyto tzv. „mocné rostliny“, neboli saventaro lze řadit právě vilcacoru. Na základě čeho dokáží sancoshi rozpoznat, kterou rostlinu využít? Uvádí se, že dokáží v rostlinách vidět dobré a zlé duchy.

Racionálně uvažujícímu člověku to může připadat těžko uvěřitelné, nicméně vědci skutečně potvrdili, že existují dva různé chemotypy uncarií. Přičemž ten první obsahuje pentacyklické oxindolové alkaloidy, které mají zdraví prospěšné účinky a druhý typ obsahuje tetracyklické oxindolové alkaloidy, které se naopak chovají jako jejich antagonisté.³

2.1.3 Léčebné použití

Extrakt z kořene a kůry používal kmen Asháninků k léčbě mnoha onemocnění. Jednalo se zejména o nemoci virového a bakteriálního původu, zánětlivé nemoci, astma, záněty močových cest, nemoci trávicího ústrojí aj. Uvádí se, že běžně používali odvary připravené zhruba z 20 g sušené kůry kořene, které se vařily po dobu 45 minut v litru vody. Poté byl nálev přeceděn a takto hotový nápoj byl podáván.⁴ V dnešní době se vilcacora užívá spíše jako alternativní způsob léčby. Uvádí se, že extrakty vyráběné z vilcacory mají antivirové, antimutagenní a cytostatické vlastnosti. Rovněž mohou stimulovat fagocytózu a regulovat aktivitu centrální nervové soustavy. Jedním z nejznámějších komerčně dostupných vodných extraktů je produkt C-MED-100TM (cit.²). In vitro experimenty prokázaly, že podpora fagocytózy se děje díky aktivním látkám – oxindolovým alkaloidům. Vilcacora má také imunostimulační vlastnosti. Dále má cytoprotektivní neboli ochranný vliv na buňky před silnými oxidanty. Rovněž je účinným antioxidantem proti volným radikálům, ale hlavně je pozoruhodným inhibitorem TNF-alfa (jedná se o faktor nádorové nekrózy, zablokování jeho funkce vede k poklesu produkce zánětlivých látek buňkami).⁵

2.1.4 Taxonomie

Jak již bylo zmíněno výše, rostlina je původem z Jižní Ameriky. Domovinou jí jsou tedy státy převážně Jižní Ameriky, jako např. Peru, Kolumbie, Ekvádor, Guyana, ale také státy střední Ameriky jako jsou Panama, Trinidad, Kostarika aj.² Rozšířena je ovšem i na jiných kontinentech, příkladem mohou být deštné pralesy a džungle jihovýchodní Asie, či Afriky.⁶ Vilcacora spadá do čeledi mořenovitých, latinsky *Rubiaceae*. Tato početná čeleď zahrnuje například i kávovník, chinovník, svízel, či gardénii. Společným znakem pro většinu druhů je výskyt v subtropickém až tropickém pásu a nápadné zbarvení květů.⁷ Z botanického hlediska lze vilcacoru popsat jako dřevnatou liánu, s charakteristickými trny a žlutavými květy, jak dokazují obrázky 1 a 2. Díky svým trnům, kterými se zachytává ve svém blízkém okolí, může vyrůst až do třiceti metrů. Květy zbarvené do žlutobíla odlišují *U. tomentosu* od *U. guianensis*, která kvete oranžovočervenými květy, a která je rovněž využívána pro své léčivé vlastnosti.⁴ K výrobě léčivých prostředků je používána kůra vilcacory, která se dále

dělí na vnitřní a vnější, přičemž vnitřní kůra je vláknitá na rozdíl od kůry vnější, která má povrchové podélné trhliny. Aby mohla být kůra použita, musí dosáhnout rostlina stáří minimálně osmi let.⁸ Rod *Uncaria* čítá na několik desítek druhů (uvádí se okolo 35). Za zmínku stojí například *Uncaria africana*, *Uncaria elliptica*, *Uncaria guianensis*, *Uncaria lanosa*, *Uncaria rhynchophylla* atd. Prvním popsáním druhem byla v roce 1775 *U. guianensis*, dříve známá jako *Ouroouparia guianensis*. Rod *Uncaria* dříve spadl pod rod *Nauclea*, proto je možné v literatuře narazit na názvy jako *Nauclea aculeata*, *Nauclea tomentosa*, *Nauclea polycephala* aj. Všechny jsou to nicméně synonyma pro dnes asi nejznámější a rovněž nejvíce prozkoumanou rostlinu rodu *Uncaria* - *Uncaria tomentosa*.⁶



Obr. 1 Květy *U. tomentosa*⁹



Obr. 2 Trny *U. tomentosa*¹⁰

2.1.5 Fytochemie

Chemické složení celého rodu *Uncaria* je intenzivně zkoumáno již od počátku minulého století. Za jednu z prvních prací týkající se fytochemie lze považovat publikaci z roku 1928, ve které se panu Kondu a jeho týmu podařilo izolovat alkaloid rhynchofylin z *U. rhynchophylla*. Od té doby bylo objeveno na více než 200 chemických látek, jako jsou například alkaloidy, triterpeny, flavonoidy, fenylypropanoidy, glykosidy atd. napříč celým rodem *Uncaria*.⁵ Výše bylo zmíněno, že *U. tomentosa* je považována za nejvíce prozkoumanou rostlinu z rodu *Uncaria*. Jejímu chemickému složení je věnována pozornost od doby, kdy byla objevena rakouským vědcem K. Keplingerem. Ještě na konci 20. století bylo známo okolo třiceti chemických látek, jejichž počet díky vývoji nových metod během let narůstá a dnes můžeme izolovat kolem padesáti látek. Za biologicky aktivní, tedy ty, které se podílejí na léčivém účinku, lze považovat tři skupiny látek. Jsou to alkaloidy, glykosidy kyseliny chinové a polyhydroxylované triterpeny. Dále to mohou také být látky fenolické povahy (procyanidiny, katechiny, taniny), či steroly (beta-sitosterol).^{4,11}

Alkaloidy

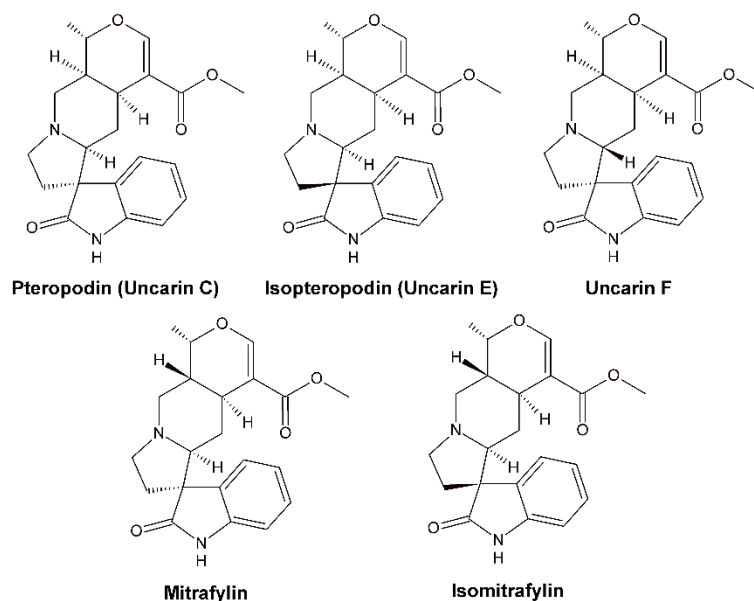
Nejpočetnější skupinou látek, které vilcacora obsahuje, a kterým jsou přičítány léčivé vlastnosti, jsou bezesporu alkaloidy.² Definovat zcela jasně alkaloidy není tak úplně možné. Z biologického hlediska se jedná o čistě přírodní, biologicky aktivní sloučeniny, jejichž struktura je heterocyklická a obsahuje dusíkový atom. Z pohledu chemického můžeme alkaloidy definovat jako komplexní skupinu N-heterocyklických sloučenin, obsahujících dusíkový atom, které mohou být často toxické. Samozřejmě existují výjimky, které se od této definice mohou odlišovat. Díky dusíkovému atomu, přítomnému v molekule, mají alkaloidy bazický charakter. Na základě toho byl odvozen jejich název, který byl poprvé zmíněn v roce 1819 farmaceutem W. Meißnerem, jenž označil alkaloidy za „podobné alkáliím“, v anglickém jazyce „like alkali“ a odtud vzešel název alkaloidy. Dusíkový atom se zde nachází v důsledku transformace některé z aminokyselin, které slouží jako prekurzory pro stovky alkaloidů.¹²

Rozdělení alkaloidů

Alkaloidy je možné klasifikovat na základě jejich biologických a fyzikálních vlastností. Rozdělit je můžeme dle jejich biologické aktivity, na základě vztahu k chemickým a technologickým inovacím, podle biosyntetické dráhy, kterou vznikají, nebo dle chemické struktury, respektive na základě podobnosti uhlíkové kostry.¹²

V *U. tomentosa* jsou zastoupeny zejména dvě skupiny alkaloidů. Jedná se o indolové a oxindolové alkaloidy, které lze dále rozdělit na základě počtu kruhů, které je tvoří, na pentacyklické a tetracyklické. Příklady jednotlivých alkaloidů jsou uvedeny v Tabulce I, ukázka struktury pentacyklických oxindolových alkaloidů je uvedena na obr. 3. Prekurzorem pro vznik indolových alkaloidů je aminokyselina L-tryptofan. Z biochemického hlediska se jedná o tzv. „pravé alkaloidy“. Charakteristickými znaky této skupiny alkaloidů je vznik z příslušných aminokyselin, heterocyklický kruh s dusíkovým atomem, vysoká reaktivita a biologická aktivita již při malých dávkách. Všechny „pravé alkaloidy“ mají hořkou chuť a vyskytují se převážně jako pevné, bílé látky s výjimkou nikotinu.¹² Analýzy mnoha vzorků ukázaly, že *U. tomentosa* se v přírodě vyskytuje ve dvou různých chemotypech. První typ obsahuje pentacyklické oxindolové alkaloidy (známé pod zkratkou POA), které působí pozitivně na imunitní systém člověka. Zvyšují rychlost fagocytózy granulocytů, podporují proliferaci normálních, nebo slabě aktivovaných B a T lymfocytů u člověka. Druhý typ naopak obsahuje oxindolové tetracyklické alkaloidy, označovány zkratkou TOA. Jedná se

o “špatné“ alkaloidy, které působí jako antagonisté proti pentacyklickým.^{3,13} Typickým znakem oxindolových alkaloidů je jejich izomerace ve vodných roztocích v závislosti na daném pH. Tento nežádoucí proces lze zpomalit protonací nebo snížením polarity rozpouštědla. Izomerace může bránit při studiu vlastností jednotlivých izomerů, a proto je doporučováno při identifikaci používat standardy směsi izomerů oxindolových alkaloidů namísto čistých sloučenin.^{3,4}



Obr. 3 Struktura vybraných pentacyklických oxindolových alkaloidů izolovaných z *U. tomentosy* (převzato z¹⁴)

Důležité je také poznamenat, jak se liší obsah alkaloidů v jednotlivých částech rostliny. Práce B. Falkiewiczze uvádí, že nejvíce alkaloidů se nachází v kořenech a kůře, o něco méně pak v dalších nadzemních částech uncarie.² Oproti tomu, v práci D. Lause a K. Keplingera je uvedeno, že největší koncentrace alkaloidů je v mladých listech.¹⁵ Další práce K. Reinharda taktéž dokládá, že listy *U. tomentosa* obsahují větší množství alkaloidů než kůra a kořeny.¹⁶ Obsah alkaloidů však nezávisí pouze na tom, z které části rostliny byly izolovány, ale může se měnit v závislosti na okolních podmínkách, jakými mohou být geografické umístění, roční období, ale také stáří rostliny.² Uvádí se, že během životního cyklu rostliny, se obsah alkaloidů několikrát změní a může také docházet k přecházení z jednoho chemotypu na druhý.⁴ Různorodé roz distribuování alkaloidů v rostlině je rovněž zapříčiněno výše zmiňovanou izomerací. Příkladem může být alkaloid akuammigin, který je tvořen v mladých listech *U. tomentosy* pentacyklického chemotypu, ze kterého je vytvořen alkaloid unkarin F, jehož izomerací vznikají alkaloidy speciofyllin, pteropodin a isopteropodin. Tyto alkaloidy jsou transportovány do kořene a během tohoto transportu se

objevuje další alkaloid - mitrafylin. Jeho izomer - isomitrafylin lze poté nalézt pouze v kořeni rostliny.¹⁶

Tab. I Příklady indolových a oxindolových alkaloidů v U. tomentosa (převzato z 2,4)

| | Indolové alkaloidy | Oxindolové alkaloidy |
|--------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Tetracycklé | Dihydrokoryanthein | Isokorynoxein |
| | Hirsutin | Isorotundofolin |
| | Hirsutein | Isorhynchofylin |
| | Korynathein | Korynoxein |
| | | Rhynchofylin |
| | | Rotundifolin |
| Pentacycklé | Angustin | Isomitrafylin |
| | Angustolin | Isopteropodin (Uncarin E) |
| | Isoajmalicin | Mitrafylin |
| | Tetrahydroalstonin | Pteropodin (Uncarin C) |
| | | Speciofylin (Uncarin D) |
| | | Uncarin F |

2.2 Lapacho – taxonomie

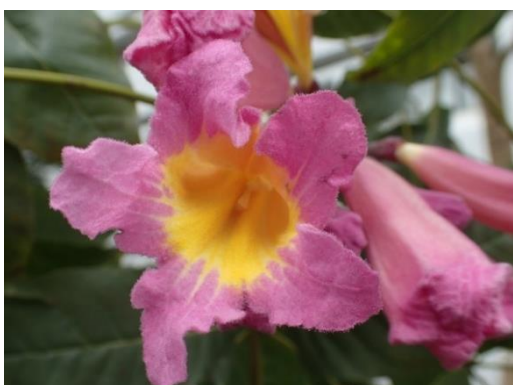
Z hlediska taxonomie spadá lapacho do čeledi trubačovitých (*Bignoniaceae*), zařazení do rodu už je poněkud složitější. Na začátku 19. století spadalo lapacho do rodu tabebuja (*Tabebuia*). Švýcarský botanik Augustin Pyramus de Candolle začal takto nazývat rostliny mající jednoduché listy. O více než sto let později rozdělil rod *Tabebuia* brazilský botanik João Rodrigues de Mattos, jenž vytvořil rod nový, zvaný *Handroanthus*, který vyděloval některé druhy na základě palmového tvaru listů. Tento koncept však nebyl mnohými botaniky uznáván, a proto byly ke konci 20. století rostliny rodu *Handroanthus* vřazeny zpět do rodu *Tabebuia*. Stalo se tak zejména díky americkému botanikovi Alwynu Howardu Gentrymu, který roku 1992 ve své monografii v časopise *Flora Neotropica* rozdělil rod *Tabebuia* do deseti neformálních skupin, do kterých byly jednotlivé druhy zařazeny. Gentry však nebral v úvahu, že by *Tabebuia* mohla být polyfyletickým rodem, neboť takové rody se sestávají z různých vývojových linií.¹⁷ Výše zmíněný fakt byl opomíjen až do roku 2007, kdy byla provedena rozsáhlá fylogenetická studie rodu *Tabebuia*, která prokázala, že se rod skládá ze tří větví. První z nich zahrnuje rostliny s měkkým dřevem, dřevním jádrem nerozlišitelným od bělového dřeva (dřevo mezi jádrem a kambiem) a malým, nebo žádným obsahem účinné látky lapacholu. Typickou barvou květů je bílá až červená, kalich je zbarven žlutě. Druhá větev se vyznačuje listy a kalichem pokrytými jemnými chloupky, jedním z nejtěžších a zároveň nejtvrdějších dřev s vysokým obsahem lapacholu a žlutými květy.

Výjimku tvoří 4 druhy – *T. selachidentata*, *T. barbata*, *T. heptaphylla* a *T. impetiginosa*, jejichž květy jsou růžovo až fialově zbarveny, a které mají opět žlutý kalich. Třetí větev se od dvou předchozích odlišuje kalichem, který je toulcovitý a má stejnou barvu jako koruna. Rozdělení rodu *Tabebuia* do tří větví úzce souvisí s Gentryho rozdělením do deseti tzv. druhových skupin. Do první větve, která je v dnešní době tvořena samostatným rodem *Tabebuia* spadají skupiny 2 a 6-10, druhá větev – rod *Handroanthus*, který Mattos vydělil, odpovídá skupinám 3-5 podle Gentryho. Poslední, třetí větev tvořená pouze dvěma druhy – *T. donnell-smithii* a *T. chrysea* odpovídá Gentryho neformální skupině s číslem 1 a dnes je tvořena samostatným rodem *Roseodendron*.¹⁸

Z výše uvedeného vyplývá, že lapacho by mělo spadat do rodu *Handroanthus*, přesněji řečeno se jedná o druh *Handroanthus impetiginosus* (syn. *H. avellanadae*), nicméně řada autorů toto pojmenování nerespektuje a můžeme se tak i nadále setkávat v literatuře s názvem *Tabebuia impetiginosus* (syn. *T. avellanadae*). Druhové jméno „*impetiginosus*“ dostalo lapacho na základě používání k léčbě nemoci zvané impetigo ke konci 19. století.¹⁹

Handroanthus impetiginosus

H. impetiginosus je stále zelený strom dorůstající až do výšky třiceti metrů, kvetoucí od července do září sytě růžovými až nachovými květy - obr. 4 a 5. Vyskytuje se od Mexika, přes Střední až po Jižní Ameriku. S různým místem výskytu jsou spojeny i různé hovorové názvy. V Brazílii se lze setkat například s těmito: Ipê, Ipê roxo, Cavatan, Guiraiba, Lapacho nebo Pau d'Arco. Pro Argentinu a Paraguay je typickým jménem Lapacho, případně Lapacho negro. Etnické skupiny indiánů pak používají názvy jako Tayihu nebo Taheebo.²⁰ V některých případech je ovšem možné vidět i použití názvů lapacho, Pau d'Arco nebo Ipê roxo pro různé druhy rostlin z rodu *Tabebuia*, používaných k léčebným účelům.²¹ Původní obyvatelé Brazílie, Peru, severní Argentiny, Paraguaye a Bolívie používali odvary připravené z kůry k léčbě nejrůznějších onemocnění, mezi které patřily například syfilis, malárie, horečka, bakteriální a plísňové onemocnění nebo žaludeční poruchy. Rozsáhlé používání lapacha domorodým obyvatelstvem bylo podrobně popsáno španělskými a portugalskými dobyvateli Jižní Ameriky okolo 15. století. Léčivé vlastnosti lapacha byly sice podrobně popsány doktorem J. A. Pintem v roce 1873, nicméně do popředí zájmu klinických výzkumů se lapacho dostalo až po roce 1967, kdy se začaly objevovat zprávy o zázračném uzdravení pacientů s rakovinou z nemocnice v Sao Paulo.²²



Obr. 4 Květ stromu *H. impetiginosus*²³



Obr. 5 Rozkvetlý strom *H. impetiginosus*²⁴

Z lapacha je nejčastěji připravován odvar, který je získáván vařením lýka nebo jádra dřeva ve vodě ideálně po dobu 8-10 min. Delší čas je nutný k uvolnění neaktivnějších látek - lapacholu a β -lapachonu, které přechází do vody velice neochotně. Připravený odvar nemusí být podáván pouze orálně, ale může sloužit i k omývání postižených částí těla, ať už v případě kvasinkových infekcí nebo ekzémů a dalších onemocnění kůže. Vedle odvarů jsou v dnešní době oblíbeny také tinktury.²² Jak už bylo řečeno výše, pro přípravu je využíváno dřevo stromu lapacho. Listy a květy jsou používány pouze ojedinelé. Původní obyvatelé používali k přípravě odvarů vnitřní vrstvu, která se nazývá floém (lýko), neboť věřili, že nejvíce aktivních látek je koncentrováno právě zde.¹⁹ Některé studie to ovšem vyvracejí a naopak uvádějí, že nejvíce aktivních látek je ve střední části dřeva, nazývané také jako jádrové dřevo. Jednou z prvních prací, věnující se obsahu naftochinonů v různých částech dřeva stromů *T. rosea*, *T. chrysantha* a *H. impetiginosus* byla práce z roku 1988. Výsledkem bylo zjištění, že hlavní účinné látky - lapachol a dehydro- α -lapachon se nacházejí v jádrovém dřevě, ale většina ostatních naftochinonů je soustředěna v lýku.²⁵

Další otázkou je také to, zda byly komerčně dostupné produkty označené jako Lapacho, Pau d'Arco, Ipê roxo aj. vyrobeny opravdu ze dřeva stromu lapacho (*H. impetiginosus*). Případně zda bylo k výrobě použito lýko nebo jádrové dřevo a ne jiná část stromu. Stromy lapacho jsou díky své velké hustotě a neobvyklé barvě nejvíce těženým dřevem v Brazílii a jedná se také o druhé nejdražší dřevo, často označované jako „nový mahagon“.²⁶ Z těchto důvodů dochází často k nelegální těžbě a nezákonnému obchodování s tímto dřevem. Studie zaměřená na těžbu v centrální a jihozápadní Amazonii prokázala drastické úbytky populace stromů *H. impetiginosus* a *T. serratofolia*. Byl učiněn závěr, že tyto druhy jsou ohrožené a jejich záchrana by vyžadovala ochranu dle právních předpisů.²⁷ Prodávané produkty jsou tak mnohdy pouze vedlejším produktem z dřevozpracujícího

průmyslu.²⁸ Dokonce i zbytky po zpracování mahagonového dřeva jsou prodávány po celém světě pod názvem lapacho, Pau d'Arco apod., a to díky podobné barvě a vůni dřeva jakou má pravé lapacho.²¹ Nízkou kvalitu dokládá i analýza dvanácti komerčně dostupných produktů údajně vyráběných z jádrového dřeva lapacha z roku 1987, při které bylo zjištěno, že pouze jeden produkt obsahoval účinnou látku lapachol a to navíc ve velmi malém množství. Ostatní produkty neobsahovaly dřevo ze stromu lapacho, nebo došlo při zpracování a transportu k výrazným změnám chemického složení.²¹ Další studie prokázala skutečný rozdíl mezi obsahem lapacholu a dalších aktivních naftochinonů v lýkové části a jádrovém dřevě. V případě lapacholu byl obsah v lýkové části pod limitem detekce, v jádrovém dřevě se jednalo o tisíce procent navážky materiálu. Tato studie byla rovněž zaměřena na množství naftochinonů v sedmnácti produktech zakoupených v Kanadě. Výsledkem bylo zjištění, že v patnácti produktech byly sice přítomny naftochinony, nicméně lapachol byl detegován pouze ve třech z nich a to opět v jádrovém dřevě.²⁹ O něco podrobnějšímu výzkumu se věnovala práce z roku 1996, ve které se znovu potvrdilo, že lapachol je majoritně přítomen v jádrovém dřevě a navíc se podařilo objasnit, že ostatní naftochinony nejsou pouze v lýkové části, ale i v jádru. Jádrové dřevo obsahovalo pouze antrachinony, zatímco lýková část furanonaftochinony. Rozdíl může být způsoben vyšší polaritou, s kterou souvisí větší počet atomů kyslíku v molekulách furanonaftochinonů, neboť je známo, že dochází k oxidaci chinoidních struktur vzduchem difundujícím skrze kůru stromu. Sloučeniny blíže kůře pak budou více náchylnější k této oxidaci.³⁰

Z výše uvedeného a mnoha dalších studií by se mohlo zdát, že nejlepší částí stromu k přípravě léčivých prostředků je jádrové dřevo, ve kterém byla prokázána existence mnoha aktivních sloučenin a navíc ve větším množství, než se nachází v lýku. Důvody pro používání lýka pramení z procesů probíhajících uvnitř stromu. Pod svrchní vrstvou kůry (borky) se nachází tenká vrstva zvaná kambium. Cílem kambia je vytváření nových buněčných tkání, jako je floém. Postupným vytvářením dalších a dalších nových vrstev dochází k tomu, že starší buňky floému jsou vtlačeny do kůry a buňky nové přechází do vrstvy kambia a tvoří xylém. Nový xylém je nazýván také jako běl, nebo bělové dřevo. Starší xylém je postupem času rozdrčován a prostupuje do jádra stromu, kde se stává součástí jádrového dřeva. Jádrové dřevo společně s kůrou slouží pouze ke stabilitě stromu a nevedou v nich aktivní vodivé tkáně. Tyto tkáně vedou ve vrstvách xylému a floému z každé strany kambia a to je onen důvod pro používání lýkové části neboli floému.³¹

Navíc, pokud je používáno jádrové dřevo, znamená to nutnost strom pokácet. Při získávání lýkové části dochází v některých případech k tomu, že je ze stromu pouze oloupána kůra a následně lýková část. Tento proces se děje jednou, maximálně dvakrát za rok a strom tak nemusí být pokácen.¹ Na druhou stranu pokud dojde k odstranění kůry, která slouží jako ochrana před vnějšími vlivy a lýka, které slouží pro distribuci živin do jednotlivých částí stromů, je vysoce pravděpodobné, že strom odumře a pokácení se nevyhne.

Ačkoliv se lapacho hojně využívalo po mnoho staletí a dodnes i využívá, objevují se nové studie poukazující na vedlejší účinky naftochinonů, které mohou být toxické.³² Tento fakt spojený s nízkou úrovní kontrol může vést až k zákazu prodeje čaje lapacho.

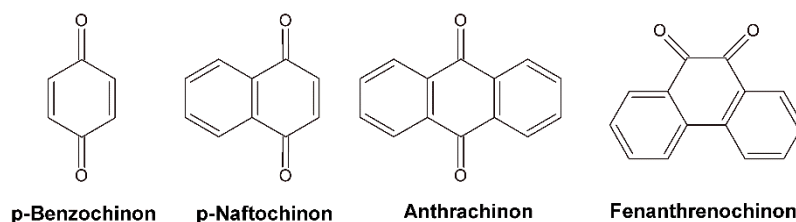
2.2.3 Chemicky aktivní látky

Vzhledem k dlouhodobému používání tohoto druhu a velkému komerčnímu zájmu, zejména jeho použití jako doplňku výživy, je velký počet studií zaměřen na objasnění aktivních látek *H. impetiginosus* a dalších druhů. Jak z lýka, tak jádrového dřeva byly izolovány desítky přirozeně se vyskytujících sloučenin, mezi které patří flavonoidy, cyklopentenové dialdehydy, kyselina benzoová společně s jejími hydroxy a methoxy deriváty, kumariny, deriváty benzaldehydu, ale hlavně chinony, furanonaftochinony a anthrachinony.^{1,22,33}

Chinony představují rozmanitou skupinu sekundárních metabolitů vyskytujících se v mnoha živých organismech. Jsou přítomny v rostlinách, lišejnících, houbách, ale i v bakteriích a hmyzu. V posledních letech vzrostl zájem o tyto látky a to nejen z důvodu důležitosti v biochemických procesech, ale také z důvodu důležitosti pro farmakologii. Pokud jde o biochemické procesy, jsou chinony významnou součástí fotosyntézy a dýchacího řetězce. Příkladem mohou být benzochinony plastochinon a ubichinon, které hrají klíčovou roli v přenosu elektronů ve výše zmíněných procesech. Pro člověka mají význam například naftochinony sloužící jako prekurzory pro vitamíny skupiny K, které jsou nezbytné k syntéze proteinů regulujících srážlivost krve.³⁴ Pro farmakologii jsou cenné zejména deriváty naftochinonů mající antimikrobiální, antivirové, protizánětlivé a cytotoxické účinky. Používány jsou také k výrobě antipyretik a insekticidů.³⁵

Vznik chinonů je důsledkem oxidace příslušných fenolů. Můžeme je rozdělit do několika skupin, přičemž kritériem rozdělení je typ aromatického systému. Benzochinony vycházejí z kruhu benzenového, naftochinony z naftalenového, anthrachinony

z anthracenového kruhu a základ pro fenanthrenchinony tvoří fenathren.³⁶ Obecné struktury těchto látek jsou vyobrazeny na obrázku 6.

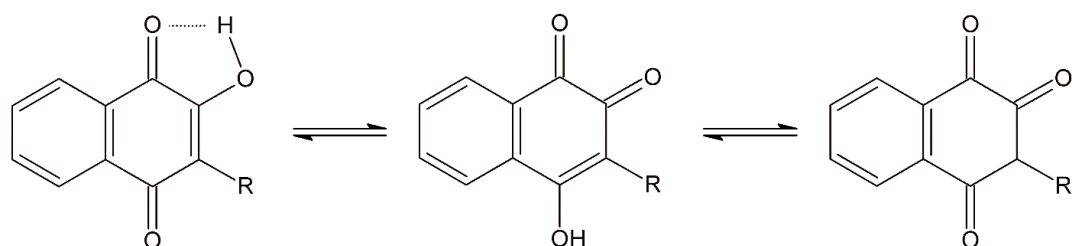


Obr. 6 Chemické struktury vybraných chinonů (převzato z³⁷)

Naftochinony jsou nejrozšířenější skupinou látek v rostlinách rodu *Handroanthus* (*Tabebuia*). Zastoupeny jsou zejména v těchto třech druzích: *T. impetiginosa*, *T. serratofloa*, *T. rosea*. To je také důvodem, proč jsou právě tyto druhy nejvíce využívány k výrobě léčivých prostředků.¹⁹ V popředí zájmu jsou cytotoxické účinky naftochinonů, které mohou být výhodné při léčbě rakoviny nebo Chagasově nemoci způsobené parazitickými prvky rodu trypanozoma. S těmito účinky jsou spojeny dva mechanismy, jedním z nich je oxidační stres a druhým nukleofilní alkylace. Bioredukci chinonů (přijmutím elektronů) specifickými enzymy dochází ke vzniku reaktivních kyslíkových radikálů (hydrogenperoxidový $\text{HOO}\cdot$, hydroxylový $\cdot\text{OH}$, superoxidový anion-radikál $\cdot\text{O}_2^-$). Tyto reaktivní formy kyslíku (ROS) interagují s enzymy topoizomerázami v rakovinných buňkách. Bohužel může docházet i k poškození buněčných složek normálních buněk a nejen těch maligních.³⁸ Charakteristickými naftochinony jsou lapachol a jeho cyklické deriváty – lapachony. Z biologického hlediska se jedná o nejvíce aktivní sloučeniny, nicméně z hlediska obsahu se jedná o látky minoritní. Obsah lapacholu se v rostlinách rodu *Handroanthus* (*Tabebuia*) pohybuje od 2 do 7 %, většinou okolo 2 - 3 % (cit.³⁹). Toto rozmezí bylo potvrzeno i F. Linardim, který obdržel výtěžek 3,2 % lapacholu z celkové navážky 500 g (cit.⁴⁰). Výjimkou jsou jiné druhy tohoto rodu rostlin, ve kterých je lapachol obsažen v množství přesahujícím 7 % (cit.^{19,41}).

Hydroxylové deriváty naftochinonů jako je lawson nebo lapachol se mohou vyskytovat ve třech tautomerních formách, které se od sebe liší polohou vodíkového atomu, a které jsou v roztoku v chemické rovnováze, ačkoliv nejvíce stabilní formou je 1,4-naftochinon. Tato stabilita je dána změnou dipólového momentu karbonylové skupiny a tvorbou intramolekulární vodíkové vazby.⁴²⁻⁴⁴ Tautomerní formy jsou uvedeny na obr. 7. Charakteristickým typem reakce chinonů je nukleofilní adice na některou z karbonylových skupin chinoidního jádra. Nukleofilními činidly bývají zpravidla aminy. Dalo by se

očekávat, že vzniklým produktem této adiční reakce bude Schiffova báze, ale častěji dochází k Streckerově degradaci vzniklých produktů. Tento jev bude pravděpodobně důsledkem imin-enaminové tautomerie.^{44,45}



Lawson, R = H

Lapachol, R = CH₂CH=C(CH₃)₂

Obr. 7 Tautomerní formy lawsonu a lapacholu (převzato z⁴³)

2.2.3.1 Lapachol

Lapachol (2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naftochinon) je přirozeně se vyskytující 1,4-naftochinon známý od roku 1858. Jedná se o první sloučeninu izolovanou ze stromu *H. impetig.*, která je navíc nejvíce rozšířeným chinonem ve dřevě dalších druhů, spadajících do čeledi trubačovitých (*Bignoniaceae*).^{22,46} Výskyt lapacholu není však omezen pouze na jednu čeleď, ale nachází se v mnoha dalších, jakými jsou například: sporýšovité (*Verbenaceae*), proteovité (*Proteaceae*), bobovité (*Leguminosae*), krtičníkové (*Scrophulariaceae*) a další.⁴⁷

Historie

Jak již bylo zmíněno výše, lapachol byl poprvé objeven v roce 1858, kdy jej Arnaudon extrahoval jako žlutou krystalickou látku z povrchu dřeva taigu z Paraguaye. Podle dřeva, ve kterém jej objevil, pojmenoval lapachol jako „taiguic acid“. O devět let později popsal Stein podobnou látku jako Arnaudon, kterou vyextrahoval ze dřeva stromu *Chlorocardium rodiei* (též známé jako greenheart) v Surinamu a nazval ji jako „greenhartin“. Roku 1879 prokázal italský fytochemik E. Paternó shodu těchto látek s látkou nazvanou jako kyselina lapachová (lapachic acid), získanou ze stromu lapacho v Jižní Americe.⁴⁸ V jeho rozsáhlém výzkumu, publikovaném v časopise *Gazzetta Chimica Italiana* v roce 1882, byla navržena struktura látky nazývané jako acido lapacico (sumární vzorec C₁₅H₁₄O₃, struktura je vyobrazena na obrázku 8).⁴⁹ Lapachol byl tehdy nesprávně nazván kyselinou kvůli jeho poměrně kyselým vlastnostem, nicméně přítomnost karboxylové skupiny nebyla nikdy prokázána.⁴⁸ Paternó se rovněž zabýval reakcemi lapacholu s nejrůznějšími anorganickými látkami. Při reakci lapacholu (kyseliny lapachové) s koncentrovanou kyselinou sírovou

Fyzikálně chemické vlastnosti

Různé fyzikálně chemické vlastnosti ovlivňují metabolický osud biologicky aktivních sloučenin a jejich studium je klíčové k pochopení způsobu účinku. Důležitými parametry jsou například lipofilita, rozpustnost, permeabilita nebo disociační konstanta.⁵³ V pevném skupenství je lapachol světle žlutá krystalická látka málo rozpustná ve vodě. Rozpustnost je silně ovlivněna pH, v kyselé oblasti (pH 4) byla naměřena hodnota 1,5 µg/ml, v oblasti alkalické (pH 10) je rozpustnost daleko vyšší a to až 5 mg/ml. Z toho plyne, že lapachol bude dobře rozpustný ve vodných roztocích zásad, dále je dobře rozpustný v diethyletheru, acetonu a petroletheru. O něco menší je jeho rozpustnost v rozpouštědlech, jakými jsou methanol, ethanol, chloroform nebo benzen.⁵⁴ Vzhledem k přítomnosti hydroxylové skupiny se lapachol chová jako slabá kyselina, čemuž odpovídá i jeho disociační konstanta, respektive její záporný dekadický logaritmus (pKa), který nabývá hodnoty 6,15 (cit.⁵³). S disociací jsou úzce spjaty i barevné přechody molekuly. V kyselém prostředí barví lapachol roztok žlutě, naopak v prostředí bazickém, v důsledku deprotonace hydroxylové skupiny, dojde k barevné přeměně a roztok bude zbarven do červena.⁵⁴

2.2.3.2 Ostatní účinné látky

Vznik většiny pyrano a furano derivátů lapacholu začíná cyklizací postranního řetězce. V kyselém prostředí dochází k protonaci dvojnás vazby v postranním řetězci za vzniku terciárního karbokationtu. Terciární karbokation pak může být přitahován hydroxylovou skupinou na uhlíku C₂ nebo kyslíkem chinoidního jádra v pozici C₄.⁴⁶ Tímto mechanismem vznikají dvě důležité isomerní sloučeniny lapacholu - α-lapachon a β-lapachon. Struktury jsou uvedeny na obrázku 9. Jak už bylo zmíněno na straně 13, tyto deriváty byly připraveny již roku 1882 E. Paternem a o několik let později definovány jako isomery lapacholu společně s podmínkami nezbytnými k jejich vytvoření S. C. Hookerem.^{49,50} Ačkoliv byly tyto deriváty připraveny uměle, byl potvrzen i jejich přirozený výskyt ve dřevě stromů rodu *Handroanthus (Tabebuia)*.⁴¹ Za zmínku stojí uvést několik vlastností typických pro tyto isomery. α-lapachon vzniká reakcí lapacholu s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou, stejně jako α-naftochinony je žlutě zbarvený, destilovatelný s vodní parou. Oproti tomu β-lapachon má červené zbarvení, vzniká reakcí lapacholu s koncentrovanou kyselinou sírovou a není možné jej oddělit při destilaci s vodní parou.⁵⁰ Na první pohled malé rozdíly ve fyzikálně-chemických vlastnostech vedou ovšem ke zcela rozdílné biologické aktivitě těchto dvou izomerů. Jedná se především o významnou aktivitu proti celé řadě nádorových buněčných linií, která byla prokázána u β-lapachonu.^{22,55} V počátcích studia β-lapachonu,

kdy ještě nebyla prokázána jeho protinádorová aktivita, byl v zájmu výzkumu především pro svoji antitrypanosomální aktivitu.⁴⁷ β -lapachon má velký potenciál vzhledem k jeho farmakologickým vlastnostem, pro představu se jedná například o antiparazitní, antihypertenzní, antiangiogenní a zejména cytostatickou aktivitu. Navzdory tomu je však jeho použití v klinické praxi značně omezeno z důvodu nízké rozpustnosti ve vodě a gastrointestinálních tekutinách.⁵⁶

S ohledem na množství pozitivních účinků bývají zkoumány především naftochinony a ostatní látky bývají upozadovány, ačkoliv i ony vykazují mnohé biologické aktivity. Jednou takovou skupinou látek jsou například methoxy deriváty benzaldehydu a kyseliny benzoové. Mezi ně patří například vanilin, kyselina vanilová, veratraldehyd, kyselina p-anisová, nebo kyselina veratrová. Tyto látky jsou známé především pro své antioxidační schopnosti, zejména pak poslední zmiňovaná látka - kyselina veratrová, která je nejvíce zastoupeným derivátem kyseliny benzoové v rostlinné říši. Díky svým antibakteriálním, protizánětlivým, antihypertenzním vlastnostem a zároveň neprokázané toxicitě je spojována s účinností lapacha.^{33,57}

Poslední důležitou skupinou látek, která nebývá takřka vůbec zmiňována, jsou lignany. Jedná se o rostlinné fenoly, které mohou být přítomny volně, nebo vázané glykosidickou vazbou na různé druhy sacharidů. Jejich hlavními funkcemi jsou ochrana rostlin proti patogenům a regulace růstu rostlin. Nejvíce jich bývá obsaženo ve stromech, neboť právě ty potřebují být během celého života chráněny. Spolu s dalšími polyfenolickými látkami se lignany koncentrují zejména v jádrovém dřevě stromů.⁵⁸ V práci byl při mnohých experimentech detegován lignan sesamin, ale spojitost s jeho výskytem v lapachu nebyla v literatuře dosud popsána.

2.2.4 Léčivé účinky

Mnoho let byl v popředí zájmu klinických výzkumů zejména lapachol, jehož cytotoxických účinků mělo být využito k léčbě rakoviny. Nicméně u něj nebyl zcela jasně prokázán vliv na nádorová onemocnění a zároveň vykazoval extrémně toxické vedlejší účinky. Tyto důvody vedly k jeho vyřazení z NCI (National Cancer Institute) roku 1974 (cit.²¹). Naopak se do popředí zájmu dostal β -lapachon, který vykazoval schopnost inhibovat topoizomerázu I a také opětovně aktivovat apoptotické dráhy, které se podílí na odstraňování rakovinotvorných buněk z těla.⁵⁹ Vzhledem ke své aktivitě je lapachol ideálním kandidátem pro strukturní

modifikace s cílem vytvořit analogy, které by měly lepší aktivitu a zároveň menší nežádoucí toxicitu.^{32, 60}

Mezi hlavní léčivé vlastnosti lapacholu patří jeho antibakteriální a antifungicidní aktivita. Těchto vlastností je využíváno zejména při léčbě kvasinkových infekcí a onemocněních kůže způsobené bakterií *Staphylococcus aureus*.¹⁹ Dalšími důležitými vlastnostmi je účinné působení proti virovým kmenům (například herpetické viry skupin I a II) či inhibiční aktivita vůči buňkám uvolňujícím histamin, což vede k protizánětlivým účinkům.⁴⁷ Významnou je také antiparazitní aktivita, kterou lapachol disponuje, zejména proti parazitickým prvokům rodu trypanozoma a plasmodium, kteří způsobují Chagasovu nemoc v případě *Trypanosomy cruzi* a malárii způsobenou parazitem *Plasmodium falciparum*. Tato onemocnění jsou vážným problémem zejména obyvatelstva Latinské Ameriky, rozšířeny jsou ale po celém světě.⁴⁶

2.3 Metody extrakce účinných látek

Mezi nejčastější metody extrakce bioaktivních látek z rostlinného materiálu patří Soxhletova extrakce, macerace, či vaření rostlinných částí v různých rozpouštědlech. Postupem času dochází, jako v každém vědním oboru, k objevům a vynálezům nových metod a technik, které by zefektivnily extrakční postup a zároveň poskytovaly srovnatelné, nebo lepší výsledky než metody dříve používané. Jedním příkladem za všechny může být Soxhletova extrakce, která je součástí normovaných postupů a bývá často standardem pro srovnání s novými technikami.⁶¹ Nevýhody jako dlouhá extrakční doba (např. 48 hodin) a nadměrná spotřeba rozpouštědel, se kterou jsou spojeny další faktory (cena, čistota, toxicita, použití směsných rozpouštědel atd.), vedou k hledání alternativ pro extrakci sušeného materiálu nejčastěji přírodního původu. Těmi mohou být techniky, jako jsou extrakce za zvýšeného tlaku a teploty, extrakce za použití superkritických kapalin, nebo také mikrovlnně asistované extrakce. Poslední dvě zmiňované techniky jsou poměrně nové a jejich předností je kratší doba extrakce, menší spotřeba rozpouštědel a tím pádem menší zátěž pro životní prostředí.^{62,63}

2.3.1 Řemdihák plstnatý

Téměř všechny alkaloidy jsou bazického charakteru, tomu odpovídají hodnoty záporného dekadického logaritmu disociačních konstant, pohybující se v rozmezí od 6 do 12. Drtivá většina alkaloidů se pohybuje v rozmezí 7 - 9. Izolace alkaloidů je založena na skutečnosti, že mohou být extrahovány při neutrálních, či bazických podmínkách (např. alkalizace

rostlinného materiálu amoniakem, uhličitánem sodným, případně hydrogenuhličitánem sodným), nebo za kyselých podmínek v případě, že pro volné báze je použito organické rozpouštědlo (např. chloroform, ethylacetát, alkoholy, dichlormetan atd.) a pro protonované báze rozpouštědlo polární (voda, alkoholy).⁶⁴

Běžně používanými rozpouštědly pro extrakci alkaloidů a dalších biologicky aktivních látek z *U. tomentosy* bývá voda, ethanol, nebo methanol, případně předchozí dvě rozpouštědla v určitém poměru s vodou.⁶⁵ Nejen poměr pro mísení rozpouštědel je důležitý, ale také poměr rostlinného materiálu a použitého rozpouštědla je klíčem k úspěšné izolaci aktivních látek. Uvádí se, že dobrých výsledků lze dosáhnout při dodržení poměru rostlina : rozpouštědlo 1:10 (w/v).⁶⁵

Při výběru extrakční metody je nutné respektovat některé klíčové chemické vlastnosti oxindolových alkaloidů. Jde především o podléhání izomeraci, obzvláště za horka a za přítomnosti kyselých nebo bazických látek.¹⁵ Bylo zjištěno, že izomerace probíhá rychle v neutrálních a zásaditých roztocích, nezávisle na teplotě. Naopak v kyselých roztocích byla izomerace pomalejší a při pokojové teplotě k ní takřka nedocházelo. Z toho vyplývá, že klasická kontinuální extrakční Soxhletova technika, kde je materiál v kontaktu s vroucím rozpouštědlem, navíc po delší dobu, je zcela nevhodná, stejně jako superkritická extrakce oxidem uhličitým, při které rovněž dochází k izomeraci. Extrakty získané těmito metodami nevypovídají o aktuálním zastoupení alkaloidů v rostlinném materiálu.¹⁵ Na druhou stranu, v práci V. Lopez-Avilley je srovnávána extrakce methanolem a superkritickým oxidem uhličitým. Výsledky ukazují na mnohem čistější extrakty získané superkritickou extrakcí a větší množství balastních látek v methanolových extraktech.⁶⁶ Potlačit vliv izomerace jde také za použití akcelerované extrakce s následným přečištěním za pomoci iontoměníčů.⁶⁷

Pro extrakci sušeného rostlinného materiálu se velice hojně využívá macerace, při které se v určitém poměru mísí methanol, voda a koncentrovaná kyselina chlorovodíková. Macerace se provádí za pokojové teploty a může být několikrát opakována. Následuje neutralizace získaného extraktu hydroxidem sodným a fosfátovým pufrem o pH 7.^{68,69} Alternativou může být extrakce methanolem za zvýšeného tlaku. Získané extrakty jsou okyseleny kyselinou chlorovodíkovou s následným přečištěním na kolonkách pro extrakci tuhou fází.⁶⁷ Další možností je okyselení suchých, rostlinných částí kyselinou sírovou, centrifugace a následně několikrát se opakující extrakce ethylacetátem. Odebírá se vodná fáze, jejíž pH je upraveno hydroxidem amonným a opět se provádí extrakce ethylacetátem.⁷⁰ Extrakce může být samozřejmě prováděna i bez přídavku kyselin.⁷¹

2.3.2 *Handroanthus impetiginosus*

Naftochinony obsahující hydroxylovou skupinu ve své molekule, díky které se chovají jako slabě kyselá látka, budou obecně dobře extrahovatelné látkami bazické povahy.⁴⁶ Jak už bylo řečeno, dobře rozpustný je lapachol v etherických rozpouštědlech (diethylether, petrolether) a také v acetonu. Této vlastnosti je využíváno při extrakci lapacholu a jeho derivátů z rostlinného materiálu. K extrakci naftochinonů z lapacha je nejčastěji využíváno Soxhletovy extrakce. Postupy vycházející z tohoto typu extrakční metody pochází převážně z přelomu dvacátého a dvacátého prvního století. Použitým rozpouštědlem bývá ve většině případů petrolether, případně směs petrolether + diethylether + aceton.^{25,72} Petrolether je často používán i při maceraci pomletého materiálu prováděné za laboratorní teploty.^{40,54} Dále jsou k extrakcím, jako je macerace nebo var pod refluxem, používána rozpouštědla methanol a ethanol. Při tomto typu extrakcí dochází často k následné reextrakci případně frakcionaci pomocí chloroformu nebo ethylacetátu.^{20,73,74}

Zmiňovanou alternativou k Soxhletově extrakci by mohla být superkritická fluidní extrakce. Vzhledem k použití extraktů v medicíně, je nadkritický oxid uhličitý, jako netoxická extrakční kapalina, více než vhodným kandidátem. Limitem může být ovšem rozpustnost naftochinonů, které mají být nadkritickým oxidem uhličitým extrahovány.⁷⁵ Nicméně publikací, ve kterých by byl uveden postup pro extrakci lapacholu a od něho odvozených derivátů nadkritickým uhličitým, je minimum, konkrétně k dnešnímu datu je známa pouze jediná publikace. V ní se autoři také zabývají přímým srovnáním této extrakce s extrakcí podle Soxhleta. Výsledky, které obdržely superkritickou extrakcí, prováděné za teploty 40 °C a tlaku 20 MPa byly srovnatelné s extrakcí podle Soxhleta a čistota extraktů byla shodná s těmi, kde bylo využito n-hexanu jako rozpouštědla. Rovněž prokázali vliv extrakčních podmínek, konkrétně tlaku na výtěžnost lapacholu. Účinnost extrakce byla s rostoucím tlakem zvyšována a největší obsah lapacholu ve vzorku byl zaznamenán při tlaku 21 MPa.⁷⁶ Tento tlak byl ovšem nejvyšším použitým v dané práci a není tak možné říci, zda by jeho další zvyšování vedlo k nárůstu výtěžnosti. Nicméně výsledky z výše uvedené práce tomu nasvědčují.

2.4 Analýza bioaktivních látek

2.4.1 Řemdihák plstnatý

Alkaloidy rostlin z rodu *Uncaria* lze separovat mnoha nejrůznějšími metodami. Za nejvíce používané lze označit chromatografii na tenké vrstvě, vysokoúčinnou kapalinovou

chromatografii nebo kapilární elektroforézu. Tyto techniky jsou rovněž využívány při kontrole kvality produktů vyráběných z vilcacory.² Při podrobnějším procházení literatury je ovšem jasně vidět dominantní postavení HPLC nad ostatními technikami. Ať už s UV detekcí, nebo o něco méně v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí.

Postupy pro separace výše uvedených alkaloidů za pomoci plynové chromatografie nejsou v literatuře takřka vůbec uváděny, neboť její použití má značná omezení v důsledku malé těkavosti a termální nestability mnoha alkaloidů.⁷⁷ Tato omezení nemusí být nutně překážkou a důvodem, proč se vzdát tohoto způsobu separace. Naopak mohou být motivací pro optimalizaci jak extrakčních, tak separačních podmínek a plynová chromatografie se tak může stát vhodnou srovnávací technikou při izolaci alkaloidů z rodu *Uncaria*. Lze to vidět v práci J. D. Phillipsona, ve které se povedlo identifikovat jedenáct alkaloidů pomocí plynové chromatografie.⁷⁸ Separaci látek pomocí plynové chromatografie bude výrazně ovlivněna změnou chemické struktury látek pomocí derivatizace s cílem vylepšit chromatografické vlastnosti látek a mnohdy vůbec umožnit jejich detekci. Derivatizace indolových alkaloidů je prováděna trimethylsilylačními činidly – hexametyldisilazan, N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid (BSTFA), N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA), nebo N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA).⁷⁹ Jako příklad lze uvést extrakci rostlinného vzorku směsí rozpouštědel methanol - voda, kdy byla po úpravě extraktu provedena derivatizace BSTFA v prostředí pyridinu pro lepší detekovatelnost sledovaných látek.⁶²

2.4.2 Handroanthus impetiginosus

V současné době jsou metody analýzy naftochinů založeny zejména na vysokoúčinné kapalinové chromatografii a plynové chromatografii. Tyto metody nahradily dříve používanou tenkovrstvou chromatografii.^{35,54} Se separačními technikami jsou úzce spojeny možnosti detekce. Lapachol spolu se svými deriváty tvoří barevné roztoky, a proto je jejich detekce ve většině případů spektrofotometrická (spojení HPLC-UV/VIS). Spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí poskytuje vysoce citlivou detekci chinonů a může být použito i jako srovnávací identifikační metoda k HPLC-UV/VIS.²⁹ Počátky studia fragmentace naftochinonů lze datovat rokem 1970, kdy byla uveřejněna publikace obsahující hmotnostní spektra naftochinonů příbuzných lapacholu včetně popsání fragmentačních cest.⁸⁰ Následovalo ověřování identity těchto naftochinonů, značně usnadněné vývojem nukleární magnetické rezonance.⁸¹ Znalost fragmentačních cest a relativních intenzit

fragmentů, které jsou specifické a reprodukovatelné, je v dnešní době činí snadno použitelnými pro identifikaci lapacholu a jeho analogů.²⁹

Limitujícím faktorem pro využití plynové chromatografie je nedostatečná těkavost chinoidních sloučenin. Proto je vhodné chinony derivatizovat vhodným činidlem, jakým může být například PFHBA (O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)hydroxylamin), nebo DNPH (4-dinitrofenylhydrazon) a nebo směs silylačních činidel - N,O-bis-trimethylsilyl-acetamid + trimethylchlorsilan + trimethylsilyl jodid (BSA+TMCS+TMI).⁸²

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

- Aceton p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Acetonitril p.a., Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
- Diethylether p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika
- Dusitan sodný p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika
- Ethylacetát p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika
- Hexan p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika
- Hydroxid sodný p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Chloroform p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Kyselina sírová 96% p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika
- Methylalkohol p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Methylisobutylketon p.a., LOBA Feinchemie GmbH, Fischamend, Rakousko
- N-Methylmočovina p.a., Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
- Propan-2-ol p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika
- Pyridin p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Silylační činidlo N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
- Silylační činidlo Hexamethyldisilazán (HMDS), Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
- Terc-butyl methyl ether p.a., Acros Organics, Geel, Belgie
- Toluén p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Standardy:
 - Lapachol p.a., Merck, Praha, Česká republika
 - Lawson p.a., Merck, Praha, Česká republika
 - 4-Ethylfenol p.a., Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

3.2 Přístrojové vybavení

- Centrifuga 5702, Eppendorf, Hamburk, Německo
- Centrifuga MIKRO 20, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo

- Mlýnek mini PULVERISETTE 23, Fritsch GmbH - Milling and Sizing, Idar-Oberstein, Německo
- Plynový chromatograf Agilent 7890A s hmotnostním detektorem 5975 C, Palo Alto, Kalifornie, USA. Nosný plyn – Helium (čistota 99,9995 %, rychlost průtoku 0,9 ml/min, SIAD, Bergamo, Itálie). Kolona – ZB-5HT (parametry 30 m × 0,25 mm × 0,10 μm, Phenomenex, Torrance, Kalifornie, USA). Podmínky GC separace (50 °C (2 min) – 10 °C/min – 300 °C (15 min); nástřik 1 μl (280 °C), dávkovací puls 138 kPa, 12 s. Hmotnostní spektra byla snímána v režimu TIC v intervalu 29 - 800 m/z.
- Superkritický fluidní extraktor Lizard 2001 (Seko-K), Brno, Česká republika
- Termostat blokový SBH 130, Stuart, Staffordshire, Velká Británie
- Třepačka Reax Top, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Německo
- Ultrazvuková čistička Elmasonic S40H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Německo
- Vysokotlaký extraktor *one* PSE, Applied separations Inc., Allentown, PA, USA

3.3 Vzorky rostlinného materiálu

- *Uncaria tomentosa* (vilcacora), Baba zioła, Polsko, země původu Paraguay
- *Handroanthus impetiginosus* (lapacho)
 - Lapacho, OXALIS, spol. s. r. o., Česká republika, země původu Brazílie
 - Lapacho, MILOTA s. r. o., Česká republika, země původu - neuváděna
 - Lapacho, SONNENTOR Kräuterhandels GmbH, Rakousko, země původu Brazílie
 - Lapacho, BaBa zioła, Polsko, země původu Peru

3.4 Příprava extraktů

3.4.1 Macerace

Do dvou plastových zkumavek bylo naváženo přesně 1000 mg sušené kůry vilcacory a lapacha. Bylo přidáno 10 ml methanolu a uzavřené zkumavky byly ponechány v temnu při laboratorní teplotě po dobu jednoho týdne. Před odebráním 1 ml supernatantu do připravených vialek byla provedena centrifugace (4400 ot/min, 5 min).

3.4.2 Extrakce pomletého rostlinného materiálu

Vzorky rostlinného materiálu byly pomlety kuličkovým mlýnkem do výsledné jemně práškové konzistence. Takto namleté vzorky byly naváženy do plastových zkumavek typu

ependorf (dvě zkumavky po 200 mg) a bylo k nim přidáno po 2 ml methanolu. Obsah zkumavek byl řádně protřepáván, jak ručně, tak pomocí třepačky a následně centrifugován (14000 ot/min, 3 min). Po centrifugaci byl odebrán 1 ml supernatantu, který byl analyzován na plynovém chromatografu.

3.4.3 Extrakce sadou rozpouštědel

Vzorky rostlinného materiálu byly opět namlety kuličkovým mlýnkem a poté zhomogenizovány. Do zkumavek eppendorf o objemu 1,5 ml bylo naváženo 80 mg namletého materiálu a bylo přidáno 800 µl rozpouštědla. K extrakci byla použita sada dvanácti rozpouštědel s různou polaritou – viz tabulka II. Zkumavky byly protřepávány jak ručně, tak jednu minutu přístrojově s využitím třepačky a poté sonifikovány v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Před samotnou analýzou byla provedena centrifugace (12000 ot/min, 3 min) a následně bylo odebráno 480 µl supernatantu do připravených vialek. Extrakty ve vialkách získané z vilcacory byly po analýze odpařeny proudem dusíku při 70 °C a derivatizovány činidlem HMDS – postup uveden v kapitole 3.7.

Tab. II Použitá rozpouštědla pro extrakci vilcacory a lapacha seřazená sestupně dle polarity

| Použitá rozpouštědla | |
|----------------------|-------------------------|
| Destilovaná voda | Ethylacetát |
| Acetonitril | Chloroform |
| Methanol | Terc-butyl methyl ether |
| Aceton | Diethylether |
| Propan-2-ol | Toluen |
| Methylisobutylketon | Hexan |

3.4.4 Extrakce pěti vybranými rozpouštědly

Do pěti zkumavek typu eppendorf bylo naváženo 150 mg pomletého rostlinného materiálu, ke kterému bylo přidáno 1,5 ml rozpouštědla. Pro extrakci bylo vybráno pět rozpouštědel z předchozí sady, která se na základě dosažených výsledků jevila jako nejvíce vhodná. Jednalo se o polárnější rozpouštědla a to: methanol, aceton, acetonitril, ethylacetát a methylisobutylketon. Vzorky ve zkumavkách byly intenzivně protřepávány (ručně i na třepačce), sonifikovány v ultrazvukové lázni (10 min), poté znovu protřepávány na třepačce a na závěr centrifugovány (14000 ot/min, 3 min). Do vialek bylo odebráno po 1 ml supernatantu z každé zkumavky. Odebraný supernatant byl dále rozdělen na dvě poloviny

do nových vialek, přičemž větší část (600 µl) sloužila přímo k analýze a ta menší byla derivatizována – viz kapitola 3.7 Úprava vzorků.

Po skončení analýzy byly nederivatizované vzorky dále zpracovávány. Konkrétně se jednalo o jejich zakoncentrování, které probíhalo tak, že vzorky byly napipetovány do jedné vialky a obsah ve vialkách byl odpařen na výsledný objem 200 µl pomocí proudu dusíku a současného zahřívání na 60 °C. Obsah z vialek byl převeden do insertu o objemu 200 µl, aby bylo umožněno přímé nadávkování tak malého množství vzorku. Jakmile byla ukončena analýza na plynovém chromatografu, vzorky byly derivatizovány – postup v kapitole 3.7.

3.4.5 Vysokotlaká extrakce – nepomleté vzorky

Vysokotlaká extrakce byla prováděna na přístroji *one* PSE. Pro všechny extrakce na tomto přístroji byly použity patrony z nerezové oceli o objemu 10 ml, na jejichž dno byla umístěna fritra a tenká vrstva křemeliny. Podmínky provedení extrakce byly následující: teplota 150 °C, tlak 15 MPa, 2 pracovní cykly (každý v délce trvání 10 minut), použité rozpouštědlo - methanol. Na dno patrony byl kvantitativně převeden vzorek nepomletého rostlinného materiálu (navážka 1,5 g) a extrahován za výše uvedených podmínek. Získaný extrakt byl zakoncentrován na objem 5 ml pomocí proudu dusíku a současného zahřívání na 80 °C. Poté byl do zkumavky eppendorf odebrán 1 ml extraktu a centrifugován (14000 ot/min, 5 min). Supernatant byl odebrán do připravených vialek a následovala analýza na plynovém chromatografu. Vzorky byly po ukončení analýzy odpařeny do sucha a podrobeny derivatizaci, jejíž parametry jsou uvedeny v kapitole 3.7.

3.4.6 Vysokotlaká extrakce – pomleté vzorky

Pomletý a zhomogenizovaný rostlinný materiál byl navážen (300 mg obou rostlin) a kvantitativně převeden do patrony pro vysokotlakou extrakci, která probíhala za stejných podmínek jako v předchozím případě. Výsledný extrakt byl proudem dusíku odpařen na 1 ml, který byl převeden do vialky a připraven k analýze. Po skončení analýzy byly vzorky odpařeny do sucha a derivatizovány – viz kapitola 3.7.

3.4.7 Superkritická fluidní extrakce

K superkritické fluidní extrakci byl použit přístroj Lizard 2001 od firmy Seko-K, Brno (obr. 10 na straně 28). U přístroje tohoto typu není umožněno kontinuální dávkování modifikátoru společně s oxidem uhličitým a tak byl modifikátor, kterým byl pro všechny extrakce methanol, dávkován do patrony se vzorkem vždy před zahájením extrakčního cyklu. Pro extrakce nepomletého materiálu byla použita patrona z nerezové oceli o rozměrech 62 mm

x 5,1 mm (vnitřní objem 1,267 cm³) a v případě pomletého rostlinného materiálu byla použita patrona o rozměrech 62 mm x 4,0 mm (vnitřní objem 0,779 cm³). Dále byly všechny extrakce prováděny za těchto podmínek: vyhřívání extrakční cely na 60 °C, teplota restriktoru 100 °C a tlak 25 MPa. Záchyt analytů probíhal do tmavých vialek naplněných 3 ml methanolu. Tyto podmínky byly tedy pro všechny extrakce konstantní a proměnnými se tak staly doba trvání jednoho extrakčního cyklu, celkový počet těchto cyklů, množství vzorku a objem přidávaného modifikátoru.

Pilotní pokus byl realizován s nepomletými vzorky, u vilcacory se jednalo o navážku 623,5 mg, u lapacha bylo naváženo 1274,1 mg. Extrakce probíhala za podmínek uvedených výše, v prvním kroku bez modifikátoru po dobu 30 minut. Obsah v záchytové vialce byl odfován proudem dusíku při současném zahřívání (70 °C) na výsledný objem 1 ml, který byl stejnoměrně rozdělen do dvou nových vialek. Jedna sada vialek s 500 µl vzorku byla připravena přímo k analýze, ve druhé sadě byl objem odfován do sucha pomocí proudu dusíku a následně silanizován. Druhý krok spočíval v nadávkování modifikátoru do patrony naplněné vzorkem z předchozí extrakce. Dávkový objem byl 200 µl, jeden extrakční cyklus trval 15 minut. Po uplynutí této doby bylo do patrony opět nadávkováno 200 µl modifikátoru a znovu probíhala extrakce 15 minut. Získaný extrakt byl zpracován totožným způsobem jako v prvním kroku.

Sada pomletých vzorků označená indexem 1 (V₁, L₁) byla extrahována obdobně jako nepomleté vzorky s přidavkem modifikátoru. Pouze s tím rozdílem, že bylo 200 µl methanolu nadávkováno před zahájením extrakce. Sada označená indexem 2 (V₂, L₂) byla extrahována jednou bez modifikátoru a poté následovaly 3 cykly s přidavky 300 µl a 2x 200 µl. Jelikož docházelo k opakovanému ucpávání restriktoru, musel být vzorek vilcacory z druhé sady opakován a pro vzorek lapacha byla použita zkušební fritu z polyethylenu. Všechny parametry extrakcí včetně navážek pomletých vzorků jsou přehledně uvedeny v tabulce III. Následné zpracování extraktů zahrnovalo jejich zakoncentrování proudem dusíku na 1 ml, rozdělení na 2 symetrické poloviny, kdy jedna polovina byla připravena přímo k analýze a druhá polovina byla derivatizována silylačním činidlem. U lapacha (L₂) došlo po ukončení extrakce navíc k oplachu spodní části patrony s fritou, následovaného dvacetiminutovou sonifikací v methanolu, centrifugací (4400 ot/min, 5 min) a odběrem 500 µl, které byly poté derivatizovány.

Tab. III Parametry provedení superkritické fluidní extrakce pomletého rostlinného materiálu

| | Označení vzorku | Navážka (mg) | Celkový objem modifikátoru (μl) | Doba extrakce (min) | Počet extrakčních cyklů |
|------------------|---------------------------|--------------|---------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Vilcacora | V ₁ | 275,8 | 400 | 15 | 2 |
| | V ₂ | 281,7 | 600 | 10 | 3 |
| | V ₂ (opak) | 197,4 | 700 | 10 | 4 |
| Lapacho | L ₁ | 195,1 | 400 | 15 | 2 |
| | L ₂ (s fritou) | 199,5 | 700 | 10 | 4 |

Další sada experimentů probíhala opět s namletými vzorky. U vzorku vilcacory V₁ se jednalo celkem o 3 extrakční cykly s přidavkem modifikátoru 600 μl (3x 200 μl), pro vzorek V₂ bylo navýšeno dávkování modifikátoru z 200 μl na 300 μl. Obsah v záchyťových vialkách byl odふうován na 2 ml a rozdělen po 1 ml do nových vialek (V₁ →VD₁, VD₂ a V₂ →VD₃, VD₄). Všechny vzorky kromě VD₁ byly derivatizovány. Vzorek lapacha L byl v prvním cyklu extrahován s 300 μl methanolu, následoval cyklus bez modifikátou, potom opět s 300 μl, bez modifikátoru a poslední cyklus se 100 μl modifikátoru. Došlo k zakoncentrování objemu v záchyťové vialce z 3 ml na 2 ml, které byly následně rozděleny jako u vilcacory. Jedna část extraktu nebyla derivatizována (LD₁), druhá (LD₂) za pomoci činidla BSTFA. Shrnutí navážek spolu s parametry extrakcí jsou shrnuty v tabulce IV.

Tab. IV Parametry provedení superkritické fluidní extrakce pro vzorky vilcacory a lapacha

| | Označení vzorku | Navážka (mg) | Celkový objem modifikátoru (μl) | Doba extrakce (min) | Počet extrakčních cyklů |
|------------------|-----------------|--------------|---------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Vilcacora | V ₁ | 110,4 | 600 | 10 | 3 |
| | V ₂ | 111,9 | 900 | 10 | 3 |
| Lapacho | L | 110,5 | 700 | 10 | 5 |

Vzorky čaje lapacho od tří různých výrobců byly pomlety na mlýnku a zhomogenizovány. Ke každému vzorku bylo před zahájením extrakce, která trvala 15 minut, přidáno 100 μl modifikátoru. Po ukončení jednoho cyklu bylo znovu nadávkováno 100 μl a extrakce byla opakována. Obsah v záchyťových vialkách byl odふうován na 1 ml a přímo analyzován plynovým chromatografem. Navážky společně s parametry extrakce jsou uvedeny v tabulce V.

Tab. V Shrnutí podmínek superkritické fluidní extrakce pro tři různé vzorky čaje lapacho

| | Výrobce | Navážka (mg) | Celkový objem modifikátoru (μl) | Doba extrakce (min) | Počet extrakčních cyklů |
|----------------|-----------|--------------|---------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Lapacho | Milota | 118,8 | 200 | 15 | 2 |
| | Oxalis | 116,9 | | | |
| | Sonnentor | 116,8 | | | |



Obr. 10 Přístroj pro superkritickou fluidní extrakci značky Lizard 2001 firmy Seko-K, Brno

3.5 Příprava standardních roztoků

Standardní roztoky lapacholu, lawsonu a 4-ethylfenolu o výsledné koncentraci 1 mg/ml byly připraveny rozpuštěním příslušné navážky v methanolu. K analýze, prováděné souběžně se třemi vzorky čaje lapacho, bylo odebráno 50 μl standardního roztoku lapacholu a doplněno hexanem na výsledný objem 500 μl – viz obrázek 40 v kapitole 4.5. Ostatní analýzy byly provedeny odebráním 50 μl standardů, které byly doplněny methanolem na výsledný objem 500 μl.

3.6 Příprava diazomethanu

Prekurzorem pro výrobu diazomethanu byla N-methylmočovina, jejíž nitrosací vznikl produkt N-nitroso-N-methylmočovina, který byl rozpouštěn v hydroxidu sodném za vzniku diazomethanu. Navážka 2,5 g N-methylmočoviny a 2,45 g dusitanu sodného byla rozpuštěna v 25 ml vody a ochlazena v lázni s ledem. Ke vzniklému roztoku bylo za stálého míchání a chlazení postupně přidáváno 1 ml koncentrované kyseliny sírové, která byla zředěna 10 ml vody. Vylučování sraženiny probíhalo po dobu dvou hodin, během kterých byl obsah několikrát promíchán. Vzniklá sraženina N-nitroso-N-methylmočovina byla odsáta na Büchnerově nálevce a promyta destilovanou vodou. Prosáváním byla sraženina zbavena přebytečné vody. Rozklad N-nitroso-N-methylmočoviny na diazomethan probíhal v aparátu vyobrazeném na obrázku 11. Do první vialky naplněné diethyletherem byl přes septum zaveden přívod dusíku. Dusík nasycený etherem byl pomocí hadičky zaváděn do druhé vialky, ve které byla N-nitroso-N-methylmočovina spolu s 5 ml destilované vody a 1 ml diethyletheru. Do této vialky bylo přes septum nadávkováno pomocí injekční stříkačky 5 ml hydroxidu sodného o koncentraci $4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vznikající diazomethan byl jímán do poslední vialky naplněné diethyletherem. Vzniklý produkt byl uschován v mrazicím boxu při teplotě $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do doby, než byl použit k analýze.



Obr. 11 Aparát pro přípravu diazomethanu

3.7 Úprava vzorků – derivatizace

Derivatizace extraktů, získaných po sonifikaci s pěti vybranými rozpouštědly, byla prováděna silylačním činidlem hexamethyldisilazánem (dále už jen HMDS) v prostředí pyridinu. Odparky byly rozpuštěny v 200 μl pyridinu a silanizovány 200 μl HMDS. U zakoncentrovaných vzorků probíhala silanizace s 100 μl pyridinu a 100 μl HMDS. V případě extraktů z vysokotlaké a superkritické fluidní extrakce bylo použito 250 μl pyridinu a 250 μl činidla HMDS. Směs v uzavřených vialkách byla v obou případech zahřívána po dobu 30 minut při 70 °C. Po inkubaci byly vzorky ze sonifikace připravené k analýze na plynovém chromatografu. Vzorky z vysokotlaké extrakce byly po inkubaci zcentrifugovány (4400 ot/min, 5 min) a pro analýzu bylo odebráno 400 μl supernatantu a doplněno hexanem na výsledný objem 500 μl . Většinu vzorků ze superkritické fluidní extrakce bylo možné ihned po inkubaci analyzovat, pouze vzorek vilcacory (V_2) musel být centrifugován (4400 ot/min, 5 min) a poté z něj bylo odebráno 400 μl supernatantu, který byly doplněn hexanem na objem 500 μl .

Derivatizace druhé sady extraktů, získaných superkritickou extrakcí namletých rostlinných vzorků, probíhala opět po dobu 30 minut při 70 °C za podmínek, jež jsou uvedeny v tabulce VI.

Tab. VI Derivatizační podmínky druhé sady vzorků ze superkritické fluidní extrakce

| | Označení vzorku | Derivatizační směs | Objem (μl) |
|------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|
| Vilcacora | VD ₂ | HMDS + pyridin | 250 + 250 |
| | VD ₃ | HMDS + pyridin + TFA | 250 + 250 + 10 |
| | VD ₄ | BSTFA + pyridin | 50 + 50 |
| Lapacho | LD ₂ | BSTFA + pyridin | 50 + 50 |

Standardní roztok lapacholu, který byl analyzován souběžně se třemi vzorky čajů byl derivatizován následovně: 50 μl standardu odpařeno dusíkem, k prvnímu vzorku přidáno 100 μl pyridinu a 100 μl činidla HMDS. Druhý vzorek byl silanizován činidlem BSTFA (50 μl) v prostředí pyridinu (50 μl). Po ukončení silanizace trvající 30 minut při 70 °C byly vzorky doplněny hexanem na výsledný objem 500 μl .

Standardní roztoky lapacholu, lawsonu a 4-ethylfenolu byly derivatizovány činidly BSTFA, HMDS a diazomethanem za podmínek, jež jsou uvedeny v tabulce VII. Doba trvání silanizace a methylace byla 30 minut. Silanizace probíhala při zvýšené teplotě 70 °C a methylace za laboratorní teploty. Vzorky silanizované pomocí BSTFA byly po ukončení inkubace a vychladnutí doplněny hexanem na výsledný objem 500 μl . Methylované vzorky

byly odpařeny do sucha a doplněny na výše uvedený objem methanolem. K další sadě tří standardních vzorků derivatizovaných diazomethanem byla po ukončení methylace a odpaření do sucha přidána činidla HMDS a BSTFA ve stejných objemech, které byly používány v předchozí analýze – viz tabulka VI. Vzorky, ke kterým bylo přidáváno BSTFA, byly po ukončení inkubace a vychladnutí doplněny hexanem na výsledný objem 500 μl . Celá tato sada vzorků byla připravena tak, aby výsledná koncentrace byla 0,2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Tab. VII Podmínky derivatizace standardních roztoků

| Standard | Označení vzorku | Množství vzorku (μl) | Derivatizační směs | Objem (μl) |
|---------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Lapachol | Lap ₁ | 50 | HMDS + pyridin | 250 + 250 |
| | Lap ₂ | | BSTFA + pyridin | 50 + 50 |
| | Lap _{DM} | | Diazomethan | 500 |
| Lawson | Law ₁ | 50 | HMDS + pyridin | 250 + 250 |
| | Law ₂ | | BSTFA + pyridin | 50 + 50 |
| | Law _{DM} | | Diazomethan | 500 |
| 4-ethylfenol | 4-EP ₁ | 50 | HMDS + pyridin | 250 + 250 |
| | 4-EP ₂ | | BSTFA + pyridin | 50 + 50 |
| | 4-EP _{DM} | | Diazomethan | 500 |

Derivatizována byla rovněž směs standardních roztoků lapacholu a lawsonu, při které bylo do vialky odebráno po 50 μl od každého standardu. Tento objem by odpařen dusíkem do sucha a k derivatizaci byla použita opět činidla BSTFA a HMDS o známých objemech (např. tabulka VII). Ke směsi derivatizované pomocí BSTFA bylo po ukončení inkubace přidáno 400 μl hexanu.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Macerace

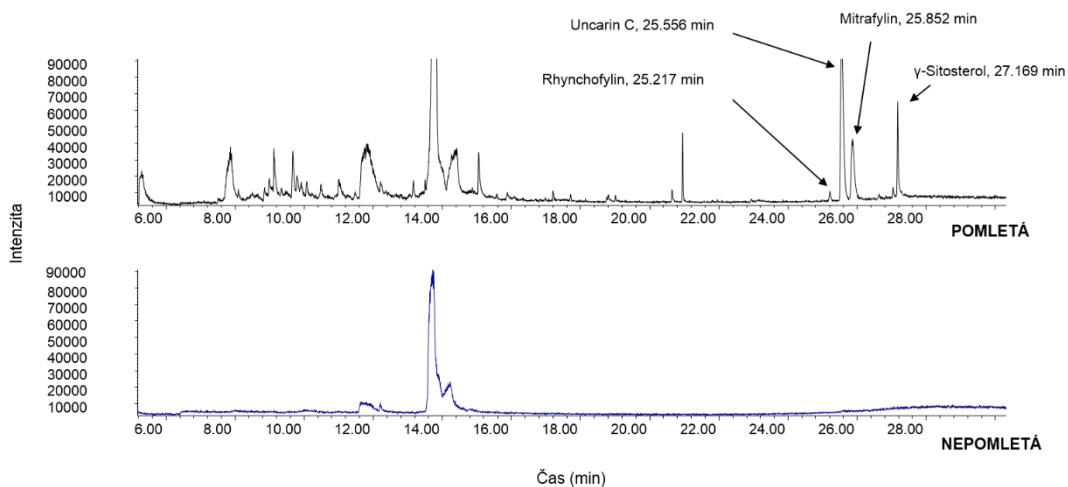
U prvně zvolené extrakční metody, kterou byla macerace usušeného, nepomletého rostlinného materiálu, nebyly v případě vilcacory detegovány žádné píky. O něco lepší situace byla u lapacha, kde se podařilo identifikovat celkem osm látek, včetně té biologicky neaktivnější – lapacholu. Konkrétně se jednalo o 4 fenolické kyseliny (k. p-anisová, eudesmová, vanilová, veratrová), isokumarin, veratryl alkohol, dehydro- α -lapachon a již zmiňovaný lapachol. Identifikace všech látek probíhala na základě srovnání retenčních časů a hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST, 2008 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, USA). Molekulové hmotnosti společně s retenčními časy a vybranými ionty k detekci jsou uvedeny v tabulkách VIII a IX na stranách 34 a 35. V těchto tabulkách jsou rovněž vypsány i další látky, které byly identifikovány v ostatních experimentech.

Vzhledem k nízké koncentraci látek v extraktu z vilcacory byla hledána cesta, jak zvýšit efektivitu extrakce, a proto byly rostlinné vzorky namlety kuličkovým mlýnkem, dokud nenabývaly práškové konzistence. Také způsob provedení macerace byl pozměněn. Namísto pouhého naložení vzorků v rozpouštědle - methanolu, byly vzorky intenzivně protřepávány a poté centrifugovány, aby došlo k účinnému narušení matrice a uvolnění analytů do rozpouštědla.

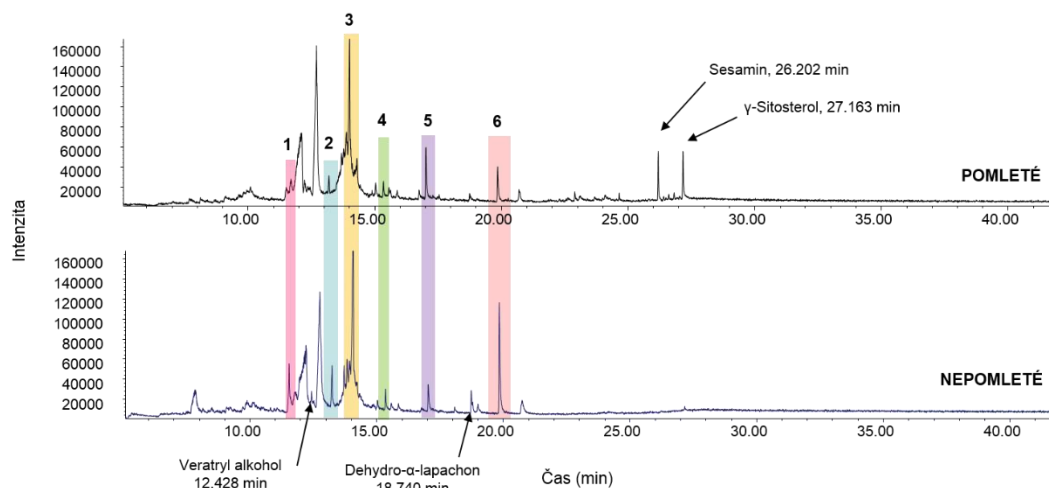
Jak účinný byl tento postup, lze vidět na obrázcích 12 a 13. Ve vilcacoře byly identifikovány tři alkaloidy a jedna steroidní sloučenina. K selektivní detekci byly použity ionty 368 m/z pro uncarin C a mitrafylin, ion 384 m/z pro rhynchofylin a ion 414 m/z pro γ -sitosterol. Jednalo o molekulární ionty daných látek. U lapacha nemělo mletí velký význam, v extraktu byly kromě látek uvedených výše při maceraci nepomletého materiálu identifikovány navíc dvě látky - γ -sitosterol a lignan sesamin (354 m/z). Naopak vlivem mletí došlo ke zmenšení výtěžku a ztrátě dehydro- α -lapachonu a veratryl alkoholu - viz obrázek 15.

Vzorky pomletého materiálu byly po analýze na plynovém chromatografu podrobeny ještě derivatizaci silylačním činidlem HMDS. U vilcacory došlo sice ke ztrátě rhynchofylinu, ale derivatizace naopak pomohla k identifikaci polyfenolické sloučeniny katechinu a kyseliny chinové, která byla rovněž nejvíce zastoupenou látkou, jak dokazuje obrázek 14. V derivatizovaném vzorku lapacha nebyly identifikovány tytéž látky jako v pomletých

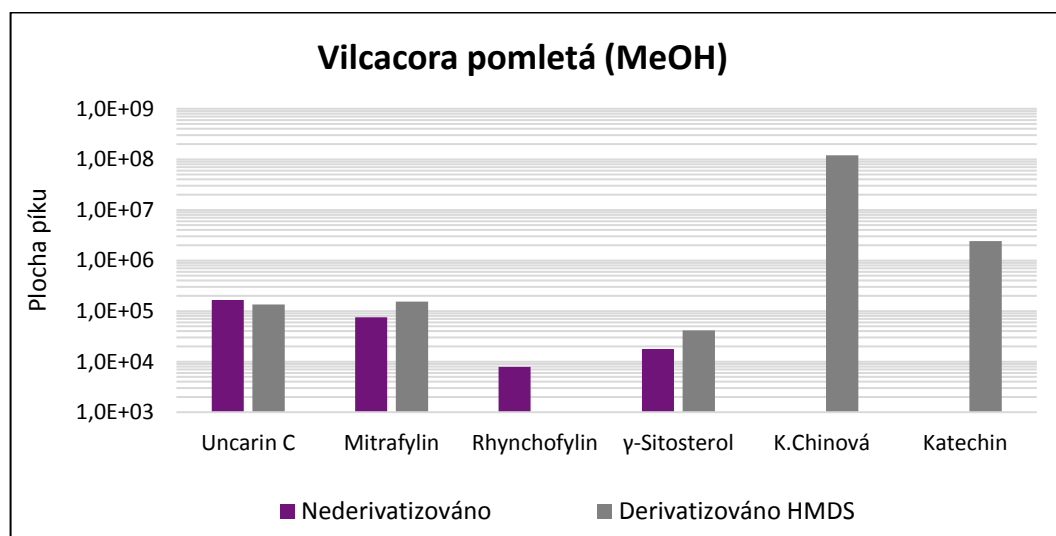
vzorcích, tedy dehydro- α -lapachon a veratryl alkohol. Došlo také ke ztrátě isokumarinu, namísto něj však byla identifikována další fenolická kyselina – kyselina isoferulová.



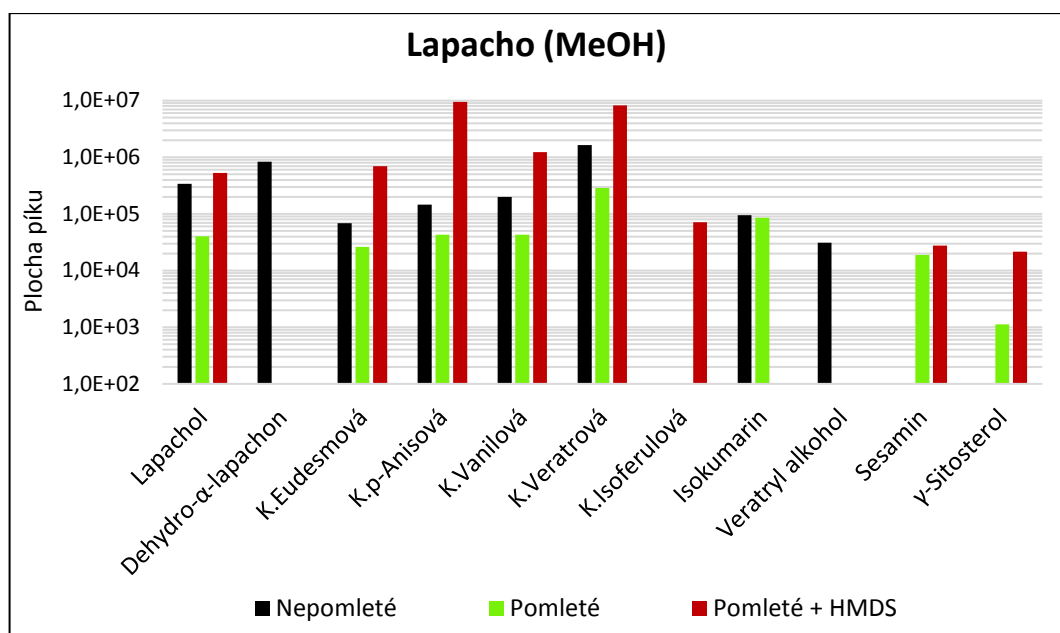
Obr. 12 Chromatogram účinných látek při maceraci vilcacory - pomletá vs. nepomletá



Obr. 13 Chromatogram účinných látek při maceraci lapacha - pomleté vs. nepomleté. 1 - K.p-anisová 2 - K.vanilová 3 - K.veratrová 4 - K.eudesmová 5 - Isokumarin 6 - Lapachol



Obr. 14 Srovnání množství účinných látek v nederivatizovaném a derivatizovaném vzorku pomleté vilcacory



Obr. 15 Srovnání množství účinných látek v jednotlivých vzorcích lapacha

Tab. VIII Retenční časy, molekulové hmotnosti a fragmenty použité k identifikaci účinných látek vilcacory

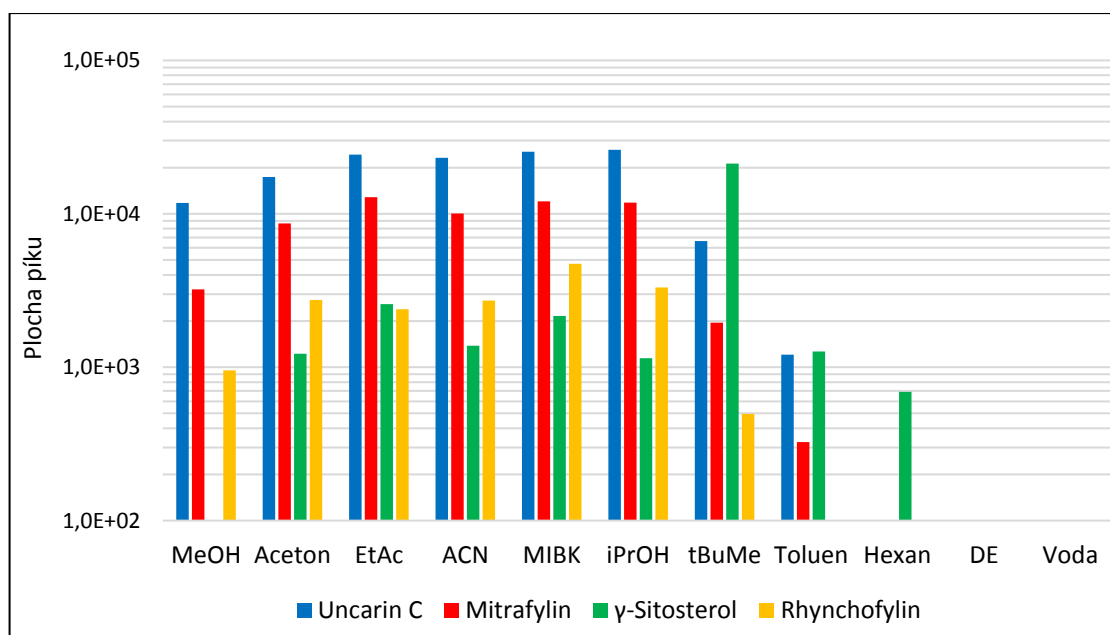
| Látka | Retenční čas (min) | Molekulová hmotnost (g·mol ⁻¹) | Molekulová hmotnost po silanizaci (g·mol ⁻¹) | Ion k detekci (m/z) |
|------------------------|--------------------|--|--|---------------------|
| K. Chinová | 16.618 | 192,167 | 552,077 | 345 |
| K. Chlorogenová | 26.486 | 354,311 | 787,445 | 345 |
| Katechin | 24.561 | 290,271 | 650,271 | 368 |
| Mitrafylin | 25.867 | 368,433 | 368,433 | 368 |
| Rhynchofylin | 25.217 | 384,476 | 384,476 | 384 |
| Uncarin C | 25.559 | 368,433 | 368,433 | 368 |
| γ-Sitosterol | 27.366 | 414,718 | 486,718 | 414 (486) |

Tab. IX Retenční časy, molekulové hmotnosti a fragmenty použité k identifikaci účinných látek lapacha

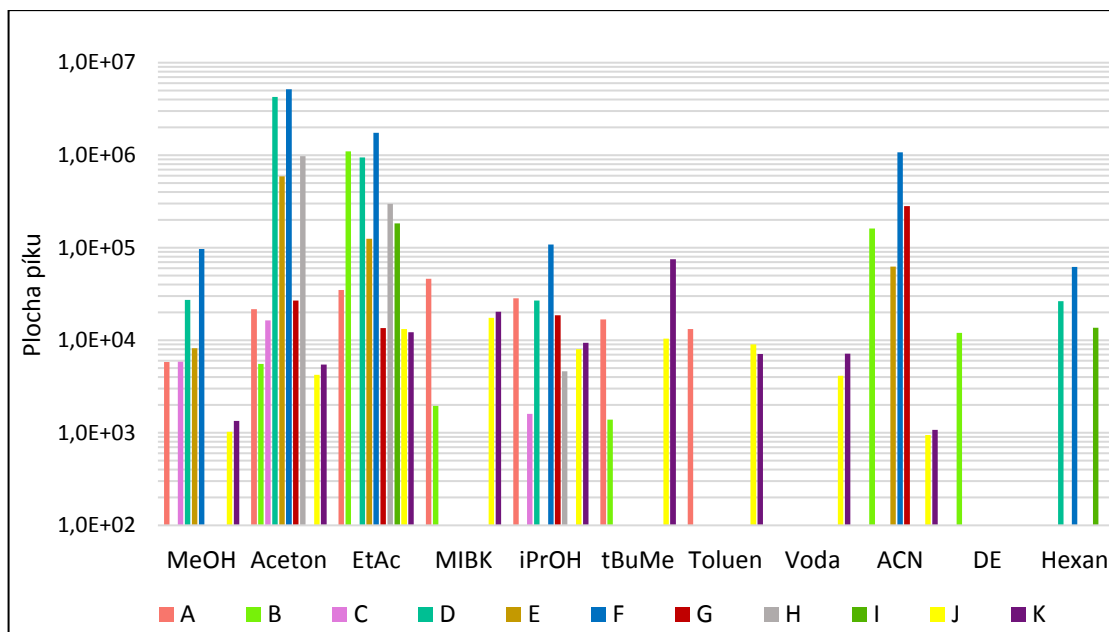
| Látka | Retenční čas (min) | Molekulová hmotnost (g·mol ⁻¹) | Molekulová hmotnost po silanizaci (g·mol ⁻¹) | Ion k detekci (m/z) |
|---|--------------------|--|--|----------------------|
| Dehydro-α-lapachon | 18.740 | 240,258 | 240,258 | 240 |
| Isokumarin | 17.040 | 194,186 | 338,186 | 194 |
| K. p-Anisová | 11.859 | 152,149 | 224,149 | 152 |
| K. Eudesmová | 15.362 | 212,201 | 284,201 | 212 |
| K. Chinová | 16.978 | 192,167 | 552,077 | 345 |
| K. Isoferulová | 18.489 | 194,186 | 338,186 | 338 |
| Lapachol | 19.847 | 242,274 | 314,274 | 242,227 (299,314) |
| Veratraldehyd | 12.494 | 166,176 | 166,176 | 166 |
| Veratryl alkohol | 12.428 | 168,192 | 240,192 | 168 (240) |
| K. Vanilová | 13.200 | 168,148 | 312,148 | 168 |
| K. Veratrová | 14.411 | 182,175 | 254,175 | 182 |
| Vanilin | 11.668 | 152,149 | 224,179 | 152 (224) |
| Sesamin | 26.202 | 354,358 | 354,378 | 354 |
| β-Sitosterol | 27.850 | 414,718 | 485,718 | 414 (486) |
| γ-Sitosterol | 27.163 | 414,718 | 485,718 | 414 (486) |
| Stigmasterol | 26.959 | 412,702 | 483,702 | 412 (484) |

4.2 Extrakce sadou rozpouštědel

Prvotní experimenty zahrnující extrakci macerací byly prováděny pouze v prostředí methanolu, který je pro extrakci středně polárních látek často používán. K zjištění vhodného rozpouštědla pro cílové analyty obou rostlin byly pomleté vzorky rostlinného materiálu extrahovány sadou dvanácti rozpouštědel o různé polaritě - viz tabulka II v kapitole 3.4.3. Extrakce vzorků proběhla sice s využitím dvanácti rozpouštědel, nicméně látky byly detegovány pouze v jedenácti z nich. U vzorků extrahovaných chloroformem docházelo k obtížnému oddělování jemných částeczek pomletého materiálu z důvodu poměrně vysoké hustoty chloroformu ($1,492 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, cit.⁸³) a hledaných analytů. Tyto faktory spolu s malým objemem rozpouštědla (800 μl) znemožnily odebrání supernatantu k analýze. Řešením by mohl být větší objem použitého rozpouštědla a filtrace získaného extraktu. Z obrázků 16 a 17 lze vidět, že jak pro vilcacoru, tak pro lapacho nejsou vhodná nepolární rozpouštědla, jakými jsou diethylether, hexan a toluen. U vilcacory se navíc nepodařilo extrahovat účinné látky ani nejvíce polárním rozpouštědlem - destilovanou vodou. Na základě srovnání ploch pík se jako optimální rozpouštědla jevila tato: propan-2-ol, methylisobutylketon, ethylacetát, acetonitril, aceton a methanol, u kterého byly zaznamenány zhruba dvakrát menší plochy pík než u ostatních výše zmíněných rozpouštědel. V případě lapacha byla situace podobná. Nejlepších výsledků bylo dosahováno pro rozpouštědla aceton a ethylacetát, ve kterých se podařilo identifikovat celkem deset látek z jedenácti. Za těmito rozpouštědly následoval propan-2-ol, aceton a methanol.

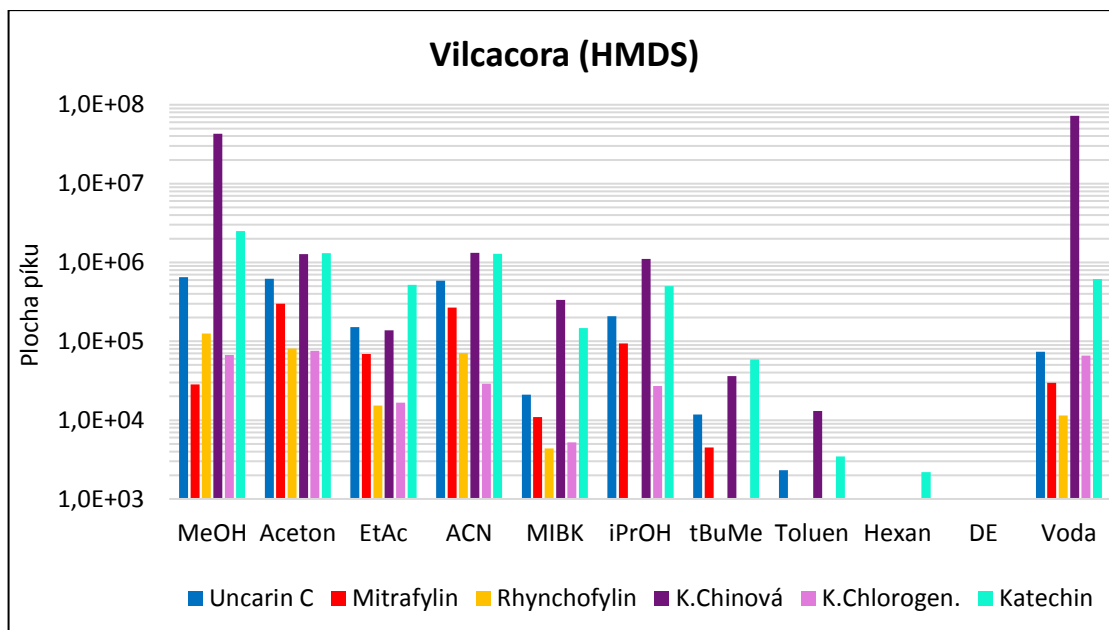


Obr. 16 Srovnání rozpouštědel použitých k extrakci účinných látek vilcacory



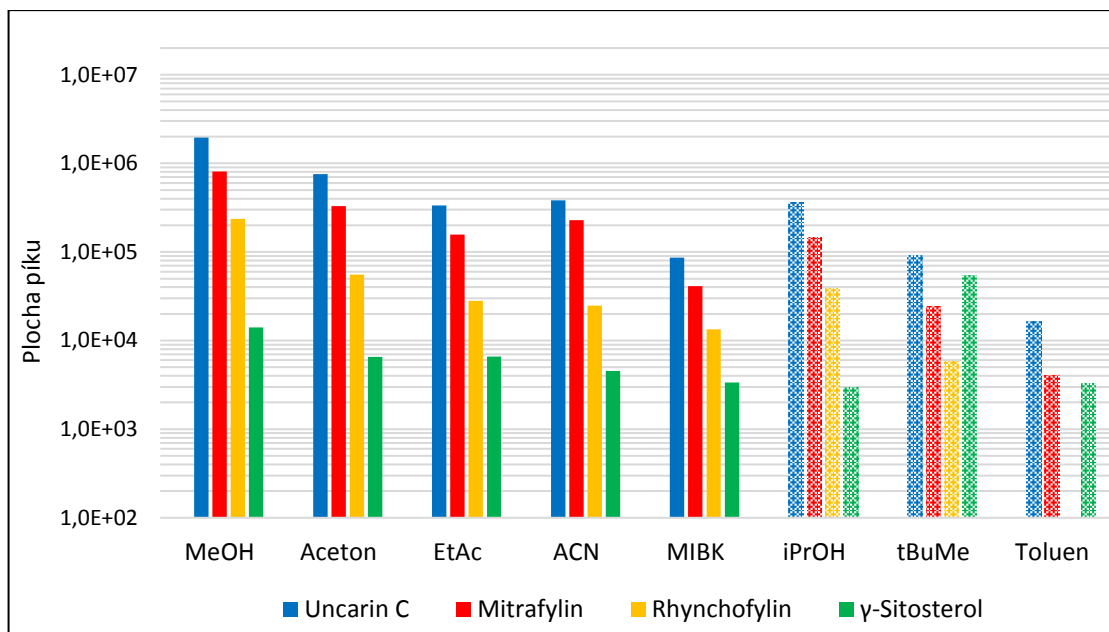
Obr. 17 Srovnání rozpouštědel použitých k extrakci účinných látek lapacha. A – Lapachol, B – Dehydro- α -lapachon, C – *K.eudesmová*, D – *K.p-anisová*, E – *K. vanilová*, F – *K.veratrová*, G – *Isokumarin*, H – *Veratryl alkohol*, I – *Veratraldehyd*, J – *Sesamin*, K – γ -sitosterol

Vzorky vilcacory byly po ukončení analýzy derivatizovány činidlem HMDS. Jak dokazuje obrázek 18, tento krok vedl k nárůstu ploch všech integrovaných látek až o jeden řád. Rovněž byl identifikován katechin a kyselina chinová jako tomu bylo u předchozí macerace s následnou derivatizací. Navíc se podařilo identifikovat významnou fenolickou kyselinu a to kyselinu chlorogenovou. Na tomto obrázku lze také vidět, jak se změnila identifikace látek. V nederivatizovaných vzorcích nepřecházely do vody žádné analyty, po derivatizaci byla situace ovšem zcela opačná. Podařilo se identifikovat všech šest látek, navíc v poměrně dobrém výtěžku ve srovnání se ostatními rozpouštědly. Naopak pro rozpouštědla nepolární nedošlo k žádným významným změnám, hledané analyty do nich téměř vůbec nepřecházely, což pouze potvrdilo myšlenku o použití středně až více polárních rozpouštědel.

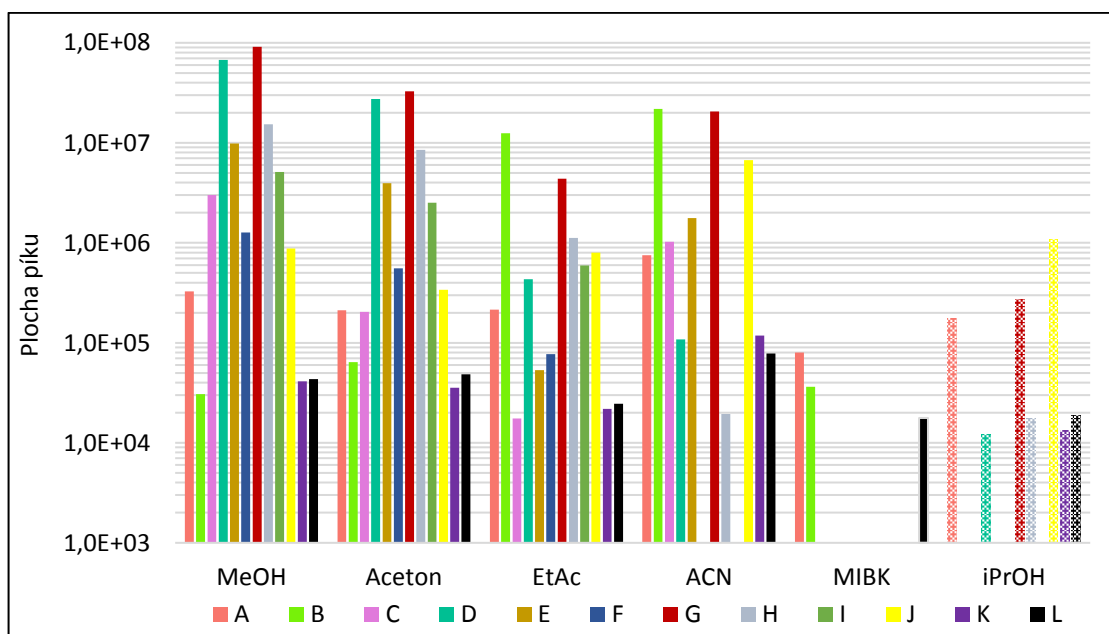


Obr. 18 Srovnání ploch píků pro jednotlivá rozpouštědla po derivatizaci vzorků vilcacory

Pro další experiment byla proto vyselektována pětice polárnějších rozpouštědel – methanol, aceton, acetonitril, methylisobutylketon a ethylacetát. Extrakční podmínky byly takřka totožné, pouze doba sonifikace byla prodloužena a protřepávání bylo zintenzivněno a několikrát opakováno. Touto malou modifikací extrakčního postupu bylo docíleno nárůstu ploch všech identifikovaných látek, jak dokazují obrázky 19 - 20. Na obr. 19 jsou vidět i plochy látek pro rozpouštědla, která ovšem v daném experimentu použita nebyla (vyznačeno v pravé části grafu). Tyto plochy byly doplněny z předchozí sady experimentů po normalizaci podle poměrů ploch jednotlivých analytů detegovaných při extrakci ethylacetátem, který byl použit v obou sadách experimentů. Pro lapacho byl proveden dopočet pouze pro propan-2-ol, neboť pro ostatní rozpouštědla neměl tento dopočet smysl z důvodu malého počtu vyextrahovaných látek – viz obrázek 17.



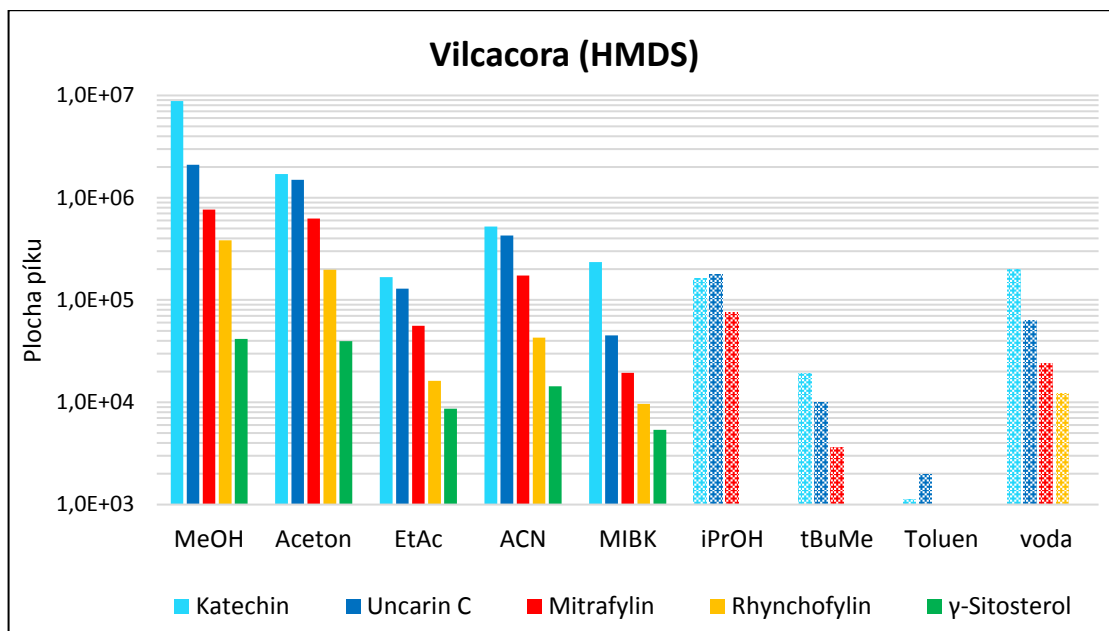
Obr. 19 Srovnání rozpouštědel použitých při extrakci vilcacory + dopočet ploch pro rozpouštědla použita v předchozí analýze



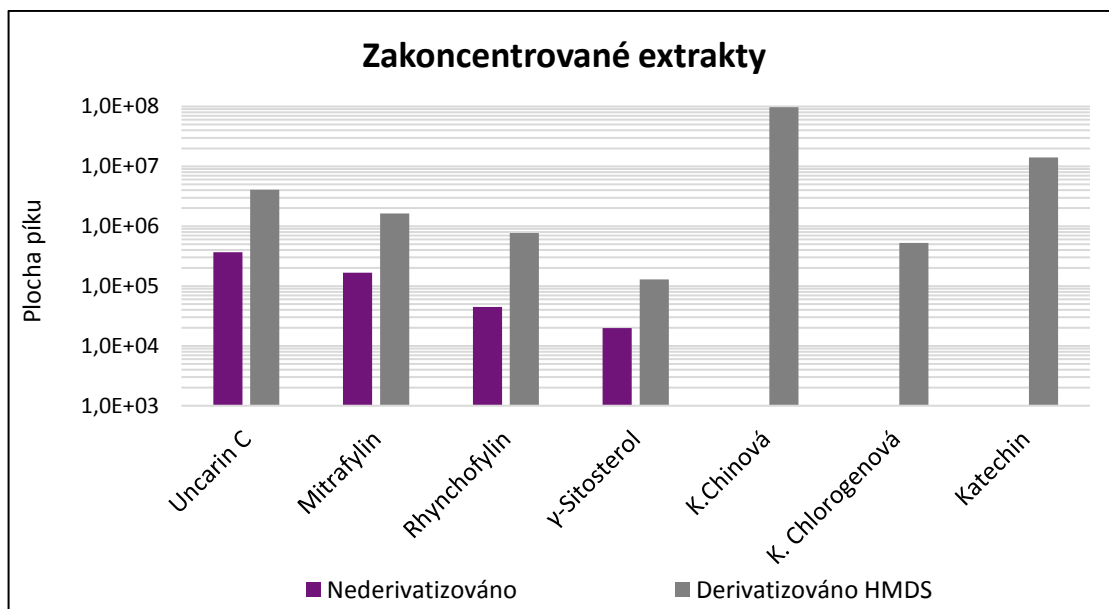
Obr. 20 Srovnání rozpouštědel použitých při extrakci lapacha + dopočet ploch pro rozpouštědla použita v předchozí analýze. A – Lapachol, B – Dehydro- α -lapachon, C – K.eudesmová, D – K.p-anisová, E – K. vanilová, F – Vanilin, G – K.veratrová, H – Veratryl alkohol, I – Veratraldehyd, J – Isokumarin, K – Sesamin, L - γ -Sitosterol

Derivatizace prováděná opět po ukončení analýzy poskytla podobné výsledky jako v předchozím experimentu. Dominantní látkou ve všech použitých rozpouštědlech byl opět katechin. Z alkaloidů poskytoval největší plochy uncarin C – obr 21. Z obrázků 18 a 21 vyplývá, že nejvíce látek přecházelo do methanolu, ačkoliv se při pilotním pokusu jevil jako méně vhodný a že derivatizace přispívá ke značnému zvýšení citlivosti detekce. Vliv

derivatizace je nejlépe vidět na obrázku 22. Vzorky získané extrakcí pomocí pěti rozpouštědel byly zakoncentrovány na objem 200 μ l, analyzovány a následně derivatizovány. Nejenom že derivatizace pomohla k citlivější detekci a můžeme tak vidět větší plochy píků daných látek, ale v tomto případě navíc pomohla i k identifikaci dalších fenolických sloučenin, konkrétně kyseliny chinové a chlorogenové.



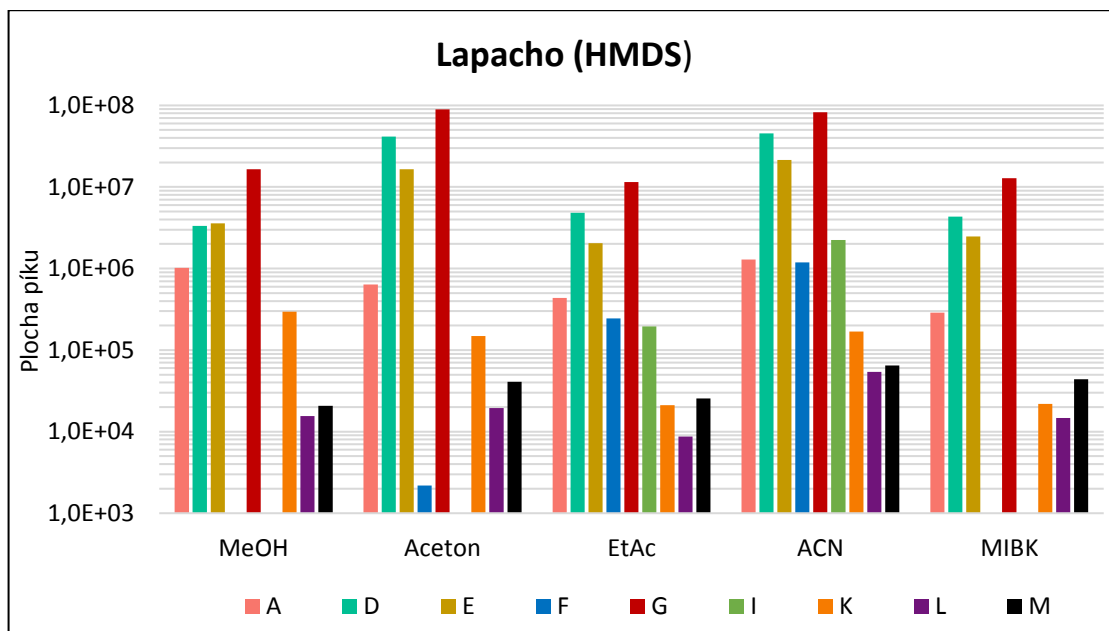
Obr. 21 Srovnání rozpouštědel použitých při extrakci vilcacory s následnou derivatizací + dopočet ploch pro rozpouštědla použitá v předchozí analýze



Obr. 22 Rozdíly ploch účinných látek v nederivatizovaných a derivatizovaných zakoncentrovaných extraktech vilcacory

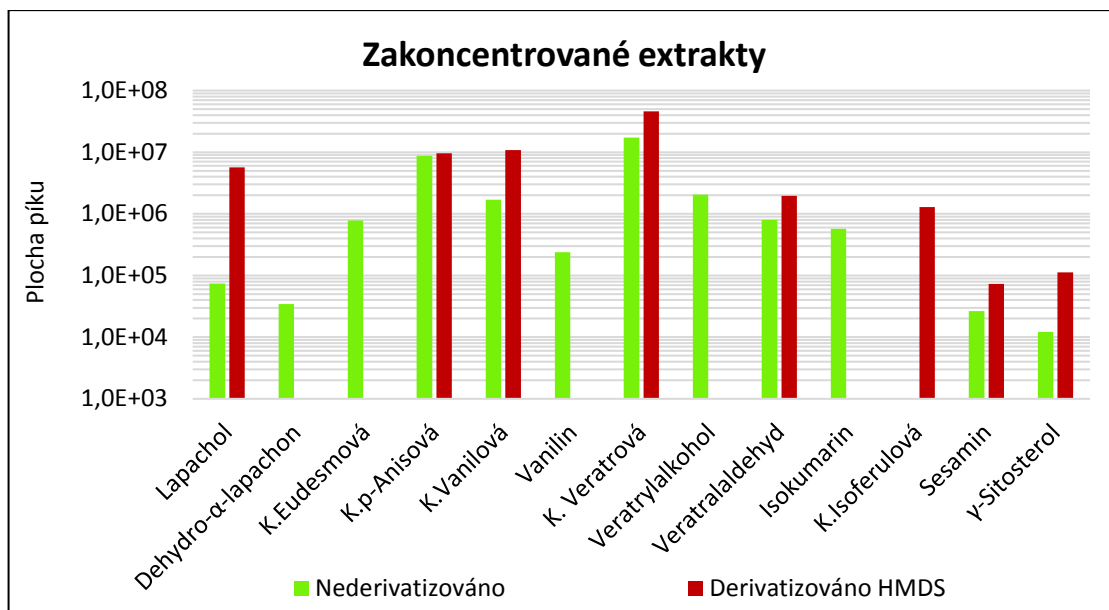
U lapacha nebyl vliv derivatizace tak markantní jako v případě vilcacory. Ve srovnání s nederivatizovanými vzorky došlo ke ztrátě čtyř látek – dehydro- α -lapachonu, kyseliny

eudesmové, veratryl alkoholu a isokumarinu. Naopak byla identifikována kyselina isoferulová, která se objevila již v derivatizovaných vzorcích po maceraci. Dominantní ve všech použitých rozpouštědlech se stala kyselina veratrová, následovaná kyselinami p-anisovou a vanilovou. Nejvíce látek (co se jejich počtu týče) přecházelo do acetonitrilu a ethylacetátu – viz obr. 23.



Obr. 23 Srovnání ploch účinných látek lapacha pro jednotlivá rozpouštědla za použití derivatizace. A – Lapachol, D – K.p-anisová, E – K. vanilová, F – Vanilin, G – K.veratrová, I – Veratraldehyd, K – Sesamin, L – γ -Sitosterol, M – K.isoferulová

V zakoncentrovaných vzorcích lze vidět vliv derivatizace nejlépe na hlavní účinné látce – lapacholu, jehož plocha vzrostla o dva řády – obr. 24. U ostatních látek, které byly detegovány jak v nederivatizovaných, tak v derivatizovaných vzorcích lze pozorovat jen nepatrný nárůst jejich ploch. Po derivatizaci nebyl opět detegován dehydro- α -lapachon, kyselina eudesmová, isokumarin, vanilin a veratryl alkohol, ale naopak přibyla již zmiňovaná kyselina isoferulová.



Obr. 24 Porovnání nederivatizovaných a derivatizovaných vzorků lapacha

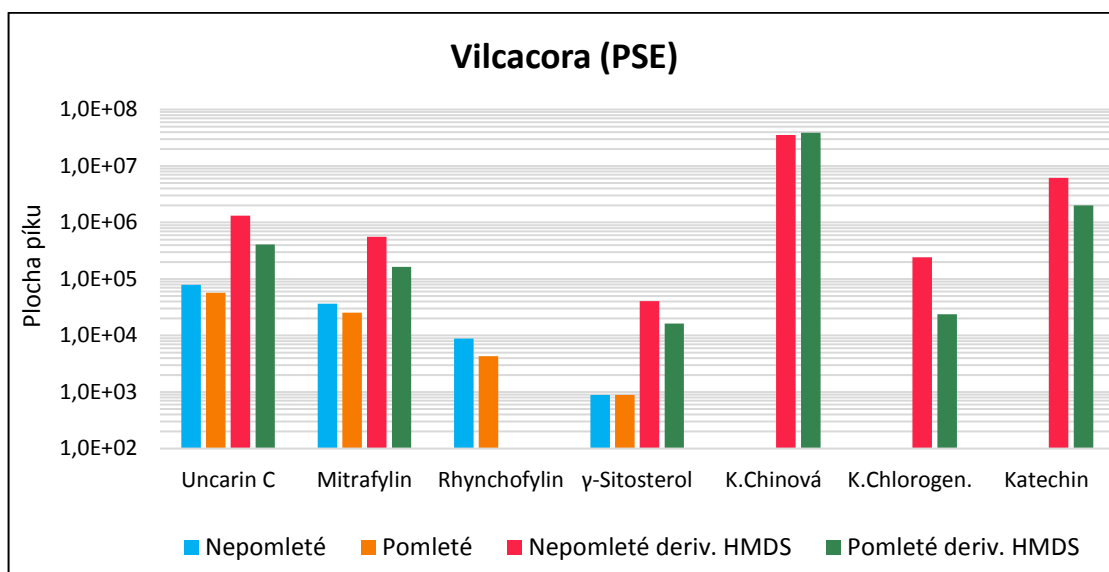
4.3 Vysokotlaká extrakce

Extrakce prováděná za vysokých teplot a tlaků dovoluje rozpouštědlo lépe proniknout do matrice vzorku a tím zvyšuje účinnost extrakce analytů. Na základě dosažených výsledků z předchozích experimentů byl pro vysokotlakou extrakci jako rozpouštědlo použit methanol. Samotná extrakce probíhala za teploty 150 °C a tlaku 15 MPa ve dvou desetiminutových cyklech. Získané extrakty byly zakoncentrovány na 5 a 1 ml (nepomletý a pomletý rostlinný materiál). Po skončení analýz proběhla navíc derivatizace činidlem HMDS.

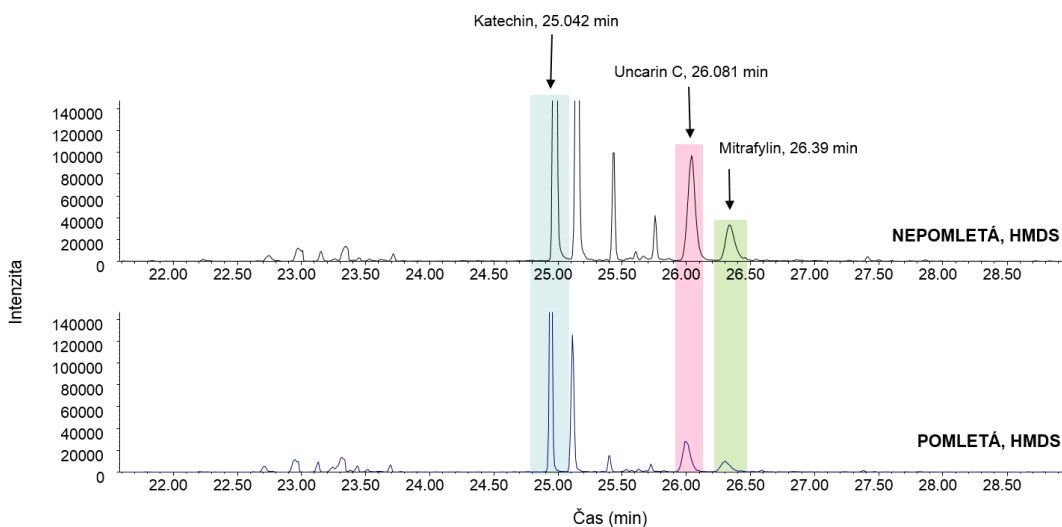
K selektivní detekci byly použity ionty jako u předešlých analýz a to – ion 368 m/z pro alkaloidy uncarin C, mitrafylin a katechin, ion 384 m/z pro rhynchofylin, ion 414 m/z respektive 486 m/z pro γ -sitosterol a ion 345 m/z pro kyselinu chinovou a chlorogenovou. Ionty vybraných látek u lapacha jsou přehledně uvedeny v Tabulce IX v kapitole 4.1. Identifikace výše uvedených látek spolu s látkami lapacha proběhla na základě srovnání retenčních časů a hmotnostních spekter s knihovnou spekter.

Vliv mletí a derivatizace vzorků je ukázán na obrázcích 25 a 26. Mletí vzorků za účelem zvětšení jejich plochy a tím pádem usnadnění styku rozpouštědla s matricí nemá v případě vysokotlaké extrakce význam. K uvolnění analytů z matrice postačuje již vysoká teplota a tlak a mletí vzorku tak nemá na účinnost extrakce vliv. Naopak můžeme vidět i malý rozdíl mezi plochami nepomletých a pomletých vzorků ve prospěch vzorků nepomletých. Tento jev je o něco více patrný u derivatizovaných vzorků, jak lze také vidět

na obrázku 26. Tyto malé rozdíly mohou být způsobeny částečným ucpáváním frity malými částicemi pomletého materiálu, ačkoliv byla mezi fritou a analyzovaným materiálem vždy vrstva křemeliny.



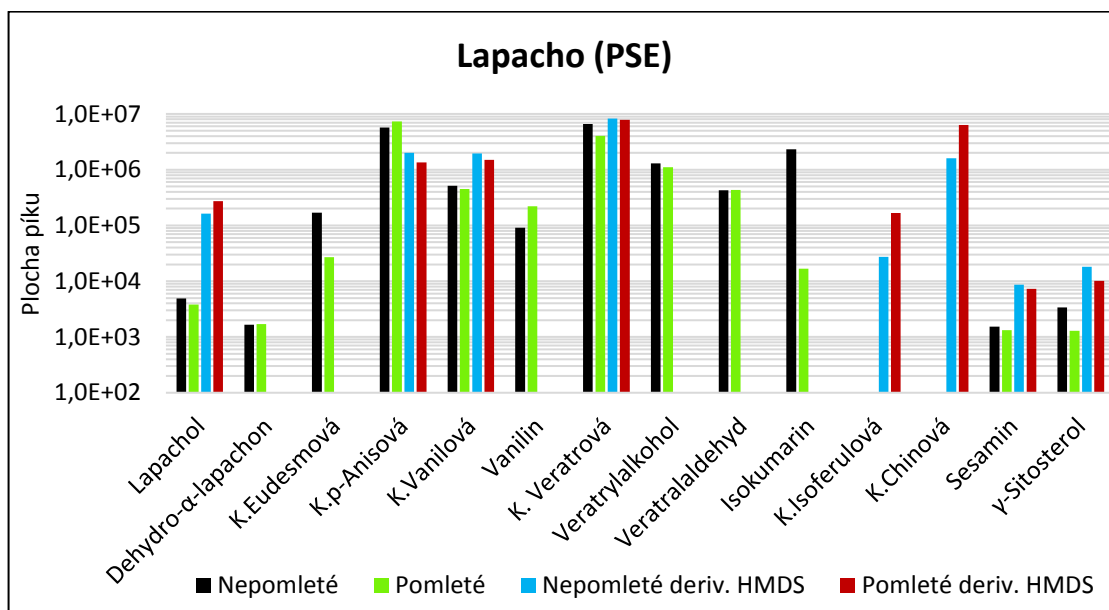
Obr. 25 Vzorky vilcacory extrahované vysokotlakou extrakcí



Obr. 26 Výřez z chromatogramu účinných látek vilcacory – ion 368 m/z

U látek identifikovaných v lapachu nebyla situace tak zcela jednoznačná, jako tomu bylo u vilcacory – viz obr. 27. Plochy látek v pomletých a nepomletých vzorcích byly téměř totožné s výjimkou tří látek – kyseliny eudesmové, isokumarinu a γ -sitosterolu, u kterých jsou na první pohled patrné větší plochy u nepomletých vzorků. Ani u derivatizovaných vzorků nedošlo ke skokovému nárůstu ploch, kromě hlavní účinné látky lapacholu. K mírnému poklesu došlo u kyseliny p-anisové, jejíž plocha byla větší v nederivatizovaných vzorcích pomletého i nepomletého materiálu. Polovina z identifikovaných látek měla po

derivatizaci větší plochy v případě nepomletých vzorků, na druhou stranu vlivem mletí a derivatizace došlo k identifikaci další významné kyseliny a to kyseliny chinové.



Obr. 27 Vzorky lapacha extrahované vysokotlakou extrakcí

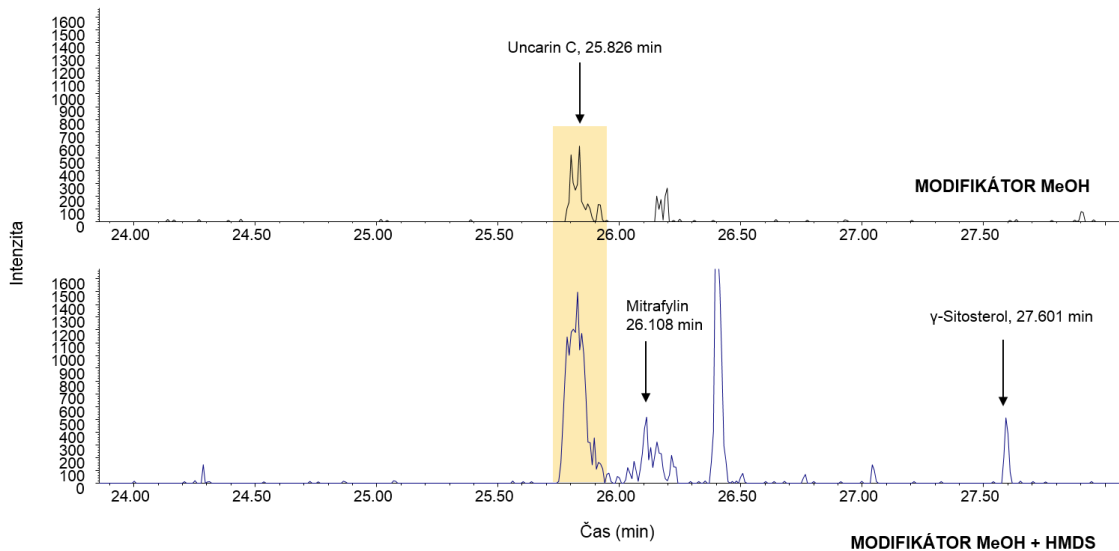
4.4 Superkritická fluidní extrakce

Ačkoliv metoda vysokotlaké extrakce přinesla oproti maceraci zlepšení, týkající se výtěžku a počtu daných látek, společně s požadovanými analyty docházelo bohužel k extrakci i dalších, balastních látek. Jednalo se zejména o látky sacharidové povahy. Motivací pro další experimenty se tak stalo nalezení metody, která by dávala srovnatelné výsledky jako vysokotlaká extrakce, ovšem poskytující čistější extrakty. Jednou z několika variant byla právě superkritická fluidní extrakce.

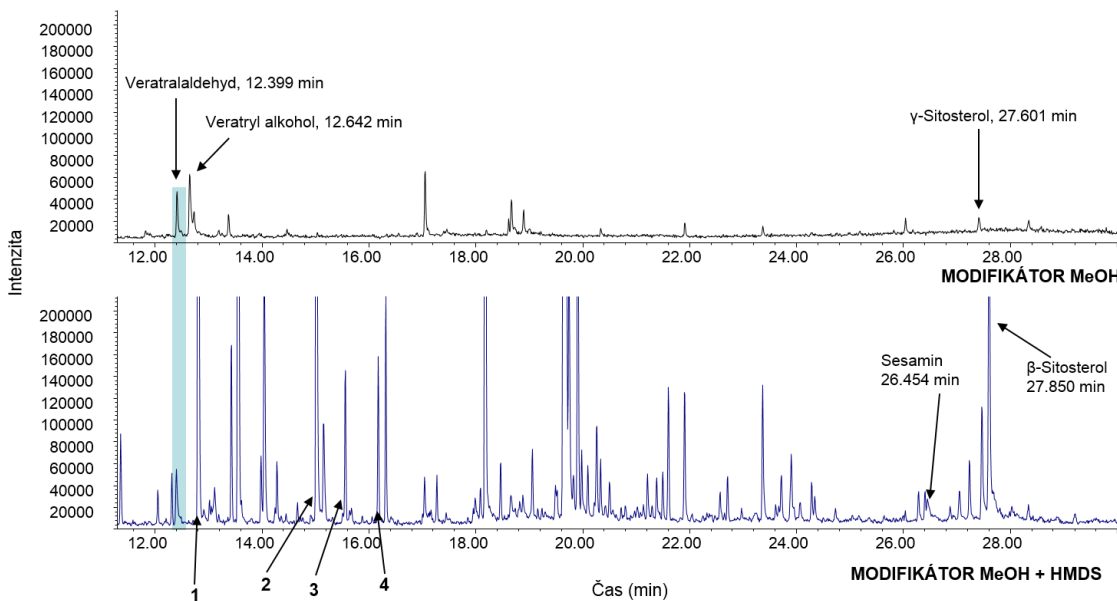
Tento typ extrakce se v literatuře ve spojitosti s alkaloidy vilcacory a účinnými látkami lapacha téměř nevyskytoval a bylo tak obtížné najít vhodné podmínky k provedení extrakce. Nakonec byl vybrán článek, ve kterém byla vůbec poprvé použita SFE k extrakci aktivních složek z vilcacory a experiment byl prováděn za velice podobných parametrů.

Nepomletý rostlinný materiál byl nejprve extrahován bez přídavku modifikátoru a následně s přídavkem 2x 200 µl. Tyto dvě frakce byly poté rozděleny na další dvě, kdy jedna část byla derivatizována a druhá byla připravena přímo k analýze. Ve vzorcích bez přídavku modifikátoru (bez i s derivatizací) byly identifikovány pouze sitosteroly – u vilcacory i lapacha γ-sitosterol. O něco lepší byla situace v případě vzorků s modifikátorem. U vilcacory se podařilo identifikovat uncarin C a v lapachu γ-sitosterol, veratryl alkohol a veratraldehyd. Nejlepších výsledků bylo dosaženo za použití modifikátoru s následnou

derivatizací vzorků, jak lze vidět na obrázcích 28 a 29. Ve vilcacoře se podařilo identifikovat dva alkaloidy – uncarin C spolu s mitrafylinem a γ -sitosterol. V lapachu bylo identifikováno 5 kyselin (k. eudesmová, p-anisová, isoferulová, vanilová a veratrová), veratraldehyd a β -sitosterol.



Obr. 28 Výřez z chromatogramu - superkritická fluidní extrakce vilcacyry - ion 368 m/z



Obr. 29 Chromatogram ze superkritické fluidní extrakce lapacha. 1 – K.p-anisová, 2 – K.veratrová, 3 – K.vanilová, 4 – K.eudesmová

Aby mohlo dojít k přímému srovnání s vysokotlakou extrakcí, bylo zapotřebí provést tyto dvě metody velice podobným způsobem. Obě extrakce byly prováděny s pomletým rostlinným materiálem o stejné navázce. Vysokotlaká extrakce probíhala opět při 150 °C a tlaku 15 MPa ve dvou desetiminutových cyklech. Použitým rozpouštědlem byl methanol. Superkritická fluidní extrakce probíhala při teplotě 60 °C a tlaku 25 MPa. Předchozí analýza ukázala na výhodnost použití modifikátoru spolu s následnou derivatizací, a proto byl tento

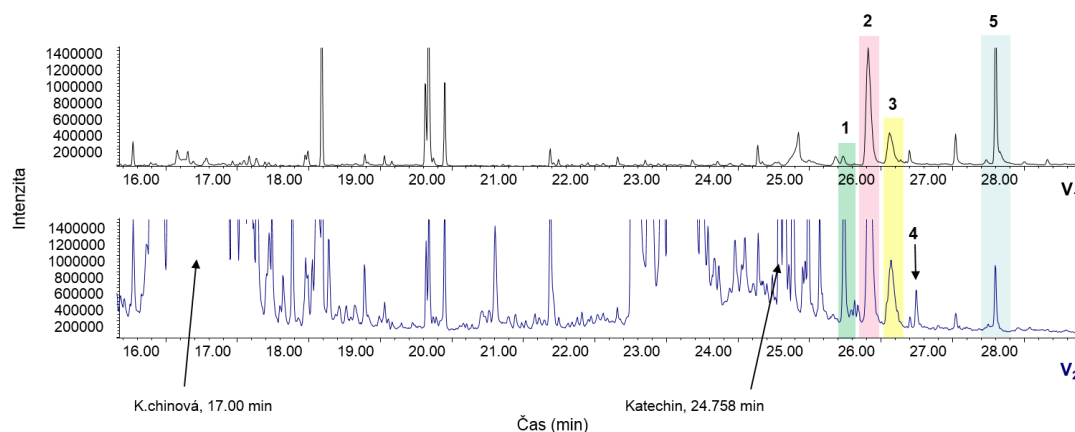
postup opakován. Derivatizovány byly rovněž vzorky získané vysokotlakou extrakcí. Nejprve probíhaly dva patnáctiminutové cykly s přídatkem 2x 200 μ l MeOH, poté následovala modifikace v podobě zkrácení doby jednoho cyklu na deset minut, navýšení počtu opakování na čtyři a dávkovaného objemu MeOH na 300 μ l. Ve druhém cyklu však došlo k ucpání restriktoru a extrakce musela být opakována. Opakování bylo provedeno v prvním cyklu bez modifikátoru a následně s přídatkem 1x 300 μ l a 2x 200 μ l. Z důvodu opětovného ucpávání restriktoru byla navržena úprava extrakční cely pomocí polyethylenové frity. Z plastové frity vyjmuté z běžné kolonky pro extrakci tuhou fází (SPE) byl vykrojen kruhový útvar o průměru 4 mm, který byl zatlačen do dolní části extrakční cely. K ověření složení použitého materiálu bylo využito zkoušky v plameni, při které byl sledován zápach plamene. Referenčním materiálem byla polypropylenová zkumavka s polyethylenovým víčkem. Tato úprava významně omezila ucpávání restriktoru a umožnila tak nepřerušovanou extrakci i jemně mletého rostlinného materiálu. Vzorky lapacha tak byly extrahovány již s využitím této pomůcky. Po skončení extrakce byla spodní část patrony s fritou omyta malým množstvím methanolu, 15 minut sonifikována a následně byl objem zakoncentrován na 1 ml a analyzován na plynovém chromatografu. Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda fritu slouží jako filtr balastních látek, nebo v ní dochází k záchytu hledaných analytů. Použitá patrona s fritou jsou pro ilustraci znázorněny na obrázku 30.



Obr. 30 Patrona pro superkritickou extrakci společně s filtrem v podobě polyethylenové frity

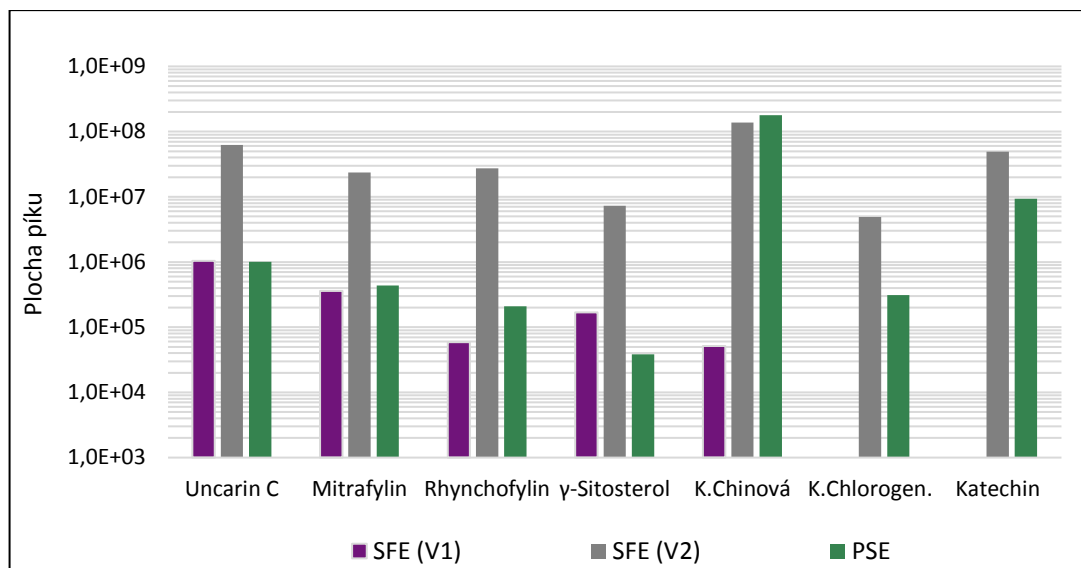
Na obrázku 31 můžeme nejprve vidět srovnání vzorků ze SFE. V horní části obrázku je výřez z chromatogramu extraktu (označení V_1), který byl získán extrakcí 2x 15 min, přídatkem MeOH 2x 200 μ l s následnou derivatizací. Tento výřez můžeme porovnat s obrázkem 28 na straně 45, kde byla extrakce prováděná za naprosto totožných podmínek,

pouze s tím rozdílem, že se jednalo o nepomleté vzorky. Pomletí vzorků umožnilo identifikaci tří alkaloidů – uncarinu C, mitrafylinu a rhynchofylinu, γ -sitosterolu, a kyseliny chinové. Navíc při pohledu na osu y (intenzita) je rovněž vidět obrovský rozdíl ve výtěžku daných látek. Pokud jde o srovnání chromatogramů na tomto obrázku, dolní výřez (označen jako V_2) znázorňuje malou modifikaci – extrakce 4x 10 min, jeden cyklus bez přídavku MeOH, poté tři cykly s přídavkem 300 μ l a 2x 200 μ l. Tento krok vedl k identifikaci dalších dvou látek, zmiňovaných již v předchozích kapitolách – katechinu a kyseliny chlorogenové, což je velký úspěch vzhledem k vysoké polaritě těchto látek. Zároveň došlo k poměrně velkému nárůstu ploch všech identifikovaných látek oproti experimentu V_1 s výjimkou γ -sitosterolu.



Obr. 31 Chromatogram získaný superkritickou fluidní extrakcí pomleté vilcacory - srovnání experimentů V_1 vs. V_2

Jedním z cílů tohoto experimentu bylo srovnání superkritické extrakce s vysokotlakou. Toto srovnání je vyjádřeno grafickým znázorněním ploch všech sledovaných analytů – obr. 32. Na tomto obrázku můžeme vidět, že co se počtu identifikovaných látek týče, jsou výsledky z PSE srovnatelné s těmi z modifikovaného postupu u SFE (značení V_2). Z pohledu výtěžků se však PSE blíží více prvnímu postupu SFE (V_1). Výjimkou je kyselina chinová, jejíž plocha byla dokonce větší než u vzorku V_2 ze SFE. Co z tohoto srovnání vyplývá? Mletí vzorků má u superkritické extrakce daleko větší význam než při extrakci vysokotlaké. Opakované přídavky modifikátoru methanolu spolu s kratšími cykly umožňují extrakci hledaných analytů s výtěžkem převyšujícím vysokotlakou extrakci mnohdy až o dva řády. Zároveň jsou extrakty čisté, bez většího množství rušivých balastních látek. Poslední zmíněný fakt je také možné pozorovat na obrázku 33, na kterém jsou vialky s jednotlivými extrakty. Stupeň zbarvení odpovídá množství extrahovaných látek, v případě extraktu z PSE k němu však hojně přispívají balastní látky.



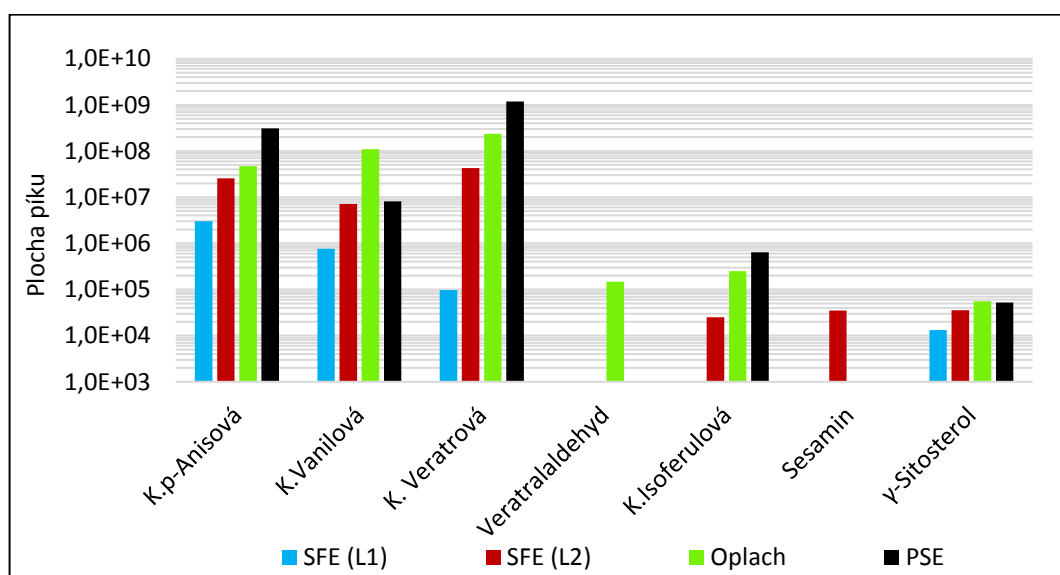
Obr. 32 Grafické vyjádření srovnání superkritické a vysokotlaké extrakce



Obr. 33 Srovnání extraktů vilcacory při superkritické a vysokotlaké extrakci

Na obrázku 34 je grafické srovnání ploch identifikovaných látek v lapachu získaných superkritickou a vysokotlakou extrakcí. Nejprve však bude vyhodnocen účinek mletí, neboť tyto experimenty probíhaly již s pomletým materiálem a navíc také za použití polyethylenové frity v patroně SFE. Vzorek L₁ je tedy srovnatelný s předchozí analýzou – viz obr. 29 na straně 45, spodní výřez chromatogramu. Identifikovány byly pouze čtyři látky – kyseliny p-anisová, vanilová, veratrová a γ -sitosterol. Jak lze vidět na obrázku 34, jedná se přesně o polovinu identifikovaných látek, než bylo v nepomletých vzorcích. Přibližné kvantitativní srovnání prováděné na základě porovnávání ploch píků je možné po přepočtu na stejné navážky, neboť navážka nepomletého materiálu byla šestkrát větší. Po tomto přepočtu byly plochy látek řádově stejné kromě kyseliny veratrové, jejíž plocha byla řádově dvakrát větší v případě nepomletého vzorku. V modifikovaném vzorku L₂ byly identifikovány stejné látky jako v L₁ spolu s dvěma látkami navíc – k. isoferulová a sesamin.

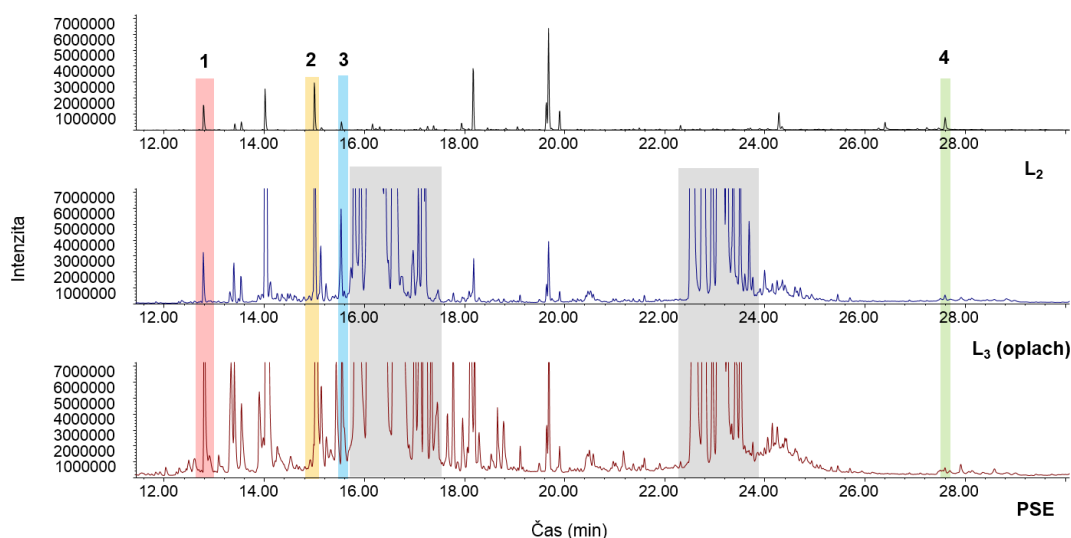
Modifikace rovněž přinesla nárůst ploch u všech látek. Bylo identifikováno celkem pět látek v extraktech z vysokotlaké extrakce. Nebyl mezi nimi sesamin, který se ovšem v předchozích experimentech vyskytoval – viz obr. 27 na straně 44 a veratraldehyd, který v předešlých analýzách pomocí PSE nebyl identifikován. Výtěžnost byla větší na rozdíl od superkritické extrakce, na druhou stranu extrakty nebyly tak čisté, což také dokazují obrázky 35 a 36. Podobně jako u vilcacory i zde je vidět, jak koresponduje zbarvení extraktů s množstvím vyextrahovaných látek, nicméně k barvě extraktů z PSE a oplachu spodní části patrony u SFE přispívají hojně balastní látky. Zmíněný extrakt získaný oplachem patrony s fritou přinesl překvapivé výsledky. Původním záměrem pro použití polyethylenové frity nebylo jen zamezit ucpávání restriktoru, ale také oddělit hledané analyty od balastních látek. Tento záměr se podařilo naplnit jen z části, jak je ukázáno na obrázku 34. V „oplachu“, jak byl tento extrakt označen, sice nebyly identifikovány hlavní účinné látky lapachol a dehydro- α -lapachon, nicméně další významné látky ano a to dokonce ve větším množství než v extraktu L₂. Frita tak posloužila k zadržení balastních látek, spolu s nimi byly ovšem zadrženy i vedlejší účinné látky. Použití frity v dalších experimentech by tak vyžadovalo optimalizaci extrakčního postupu.



Obr. 34 Grafické srovnání vyextrahovaných látek z lapacha pomocí superkritické a vysokotlaké extrakce



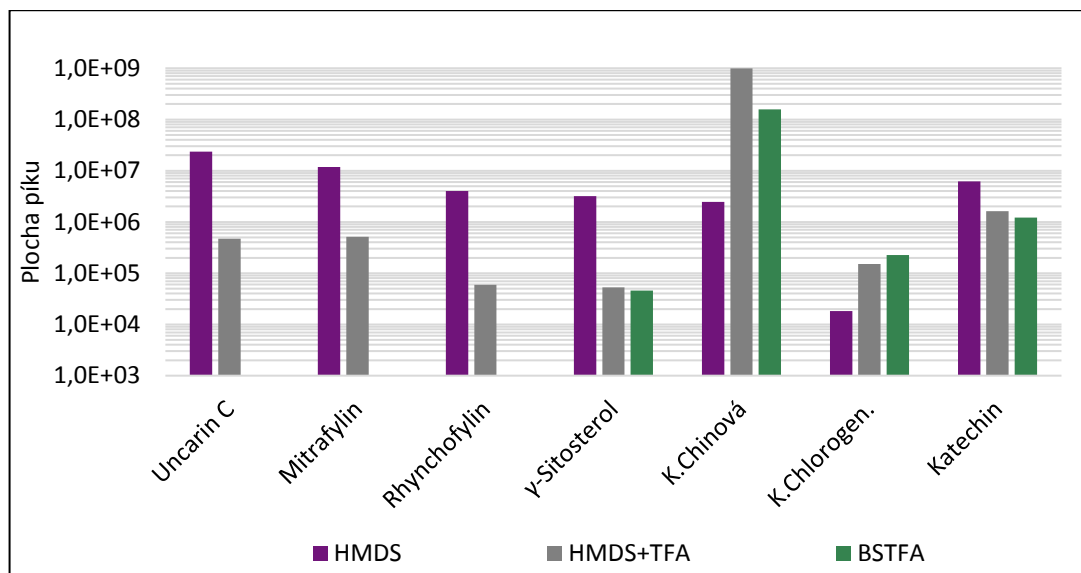
Obr. 35 Srovnání extraktů lapacha získaných superkritickou a vysokotlakou extrakcí společně se standardem lapacholu. L3 - oplach patроны



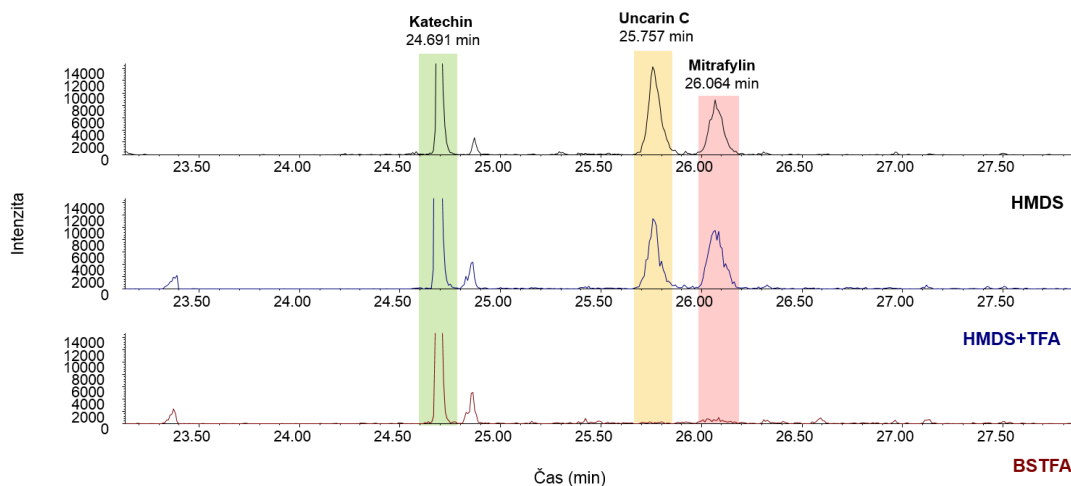
Obr. 36 Výřez z chromatogramu znázorňující srovnání účinných látek lapacha v jednotlivých extraktech. 1 - K. p-anisová, 2 - K. veratrová, 3 - K. vanilová, 4 - γ -sitosterol. Balastní látky jsou vyznačeny šedě

Dosažené výsledky ukazovaly na výhodnost úpravy vzorků před samotnou analýzou pomocí derivatizace, nicméně po celou dobu bylo používáno pouze silylační činidlo HMDS v prostředí pyridinu. Nabízelo se tak vyzkoušení dalších silylačních činidel, případně modifikace stávajícího postupu. Pomletá vilcacora byla dvakrát extrahována SFE. Získané extrakty byly spojeny a poté následně rozděleny na čtyři části. Jedná část extraktu derivatizována nebyla, zbylé tři ano. K derivatizaci bylo použito opět činidlo HMDS v prostředí pyridinu, dále pak HMDS v pyridinu s přidavkem katalyzátoru v podobě kyseliny trifluoroctové a poslední část extraktu byla silylována čindlem BSTFA opět v prostředí pyridinu. Jak dokazují obrázky 37 a 38, používání samotného HMDS po celou dobu práce bylo více než vhodné. Pomocí tohoto činidla dochází k identifikaci všech hledaných analytů navíc ve velkém množství. Při použití katalyzátoru (kyselina TFA) dochází sice rovněž k identifikaci všech analytů, ale už s menším výtěžkem než je tomu v případě samotného HMDS. Výjimku tvoří dvě kyseliny – chinová a chlorogenová, u

kterých okyselení přispívá k dokonalejší derivatizaci a tím pádem k lepší výtěžnosti. Podobně jsou na tom vzorky po derivatizaci BSTFA, plochy dvou výše uvedených kyselin jsou větší než je tomu u derivatizace samotným HMDS, nicméně nedošlo k detekci žádného alkaloidu. Lze tedy konstatovat, že k derivatizaci extraktů z vilcacory je nejvhodnější použít činidlo HMDS v prostředí pyridinu.



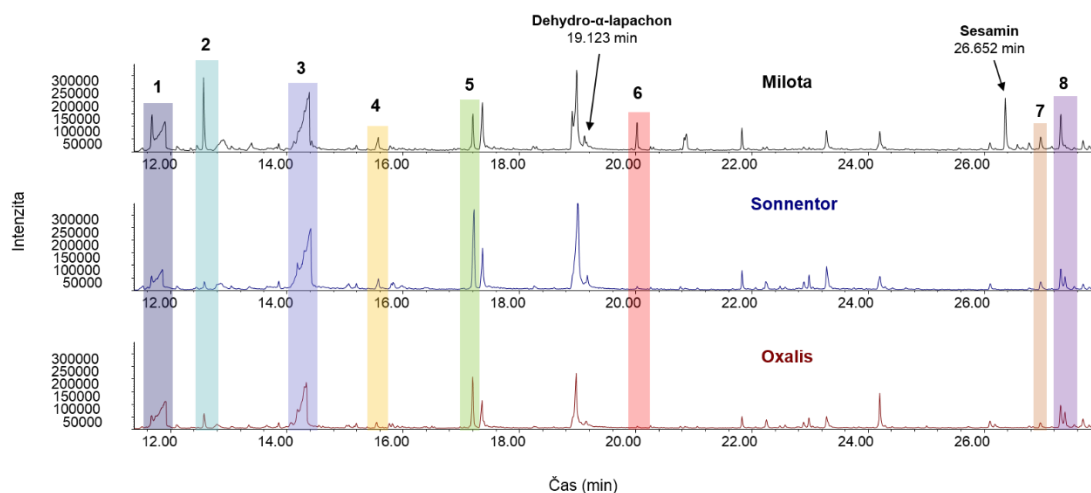
Obr. 37 Grafické srovnání tří derivatizačních postupů u vzorků vilcacory získaných SFE



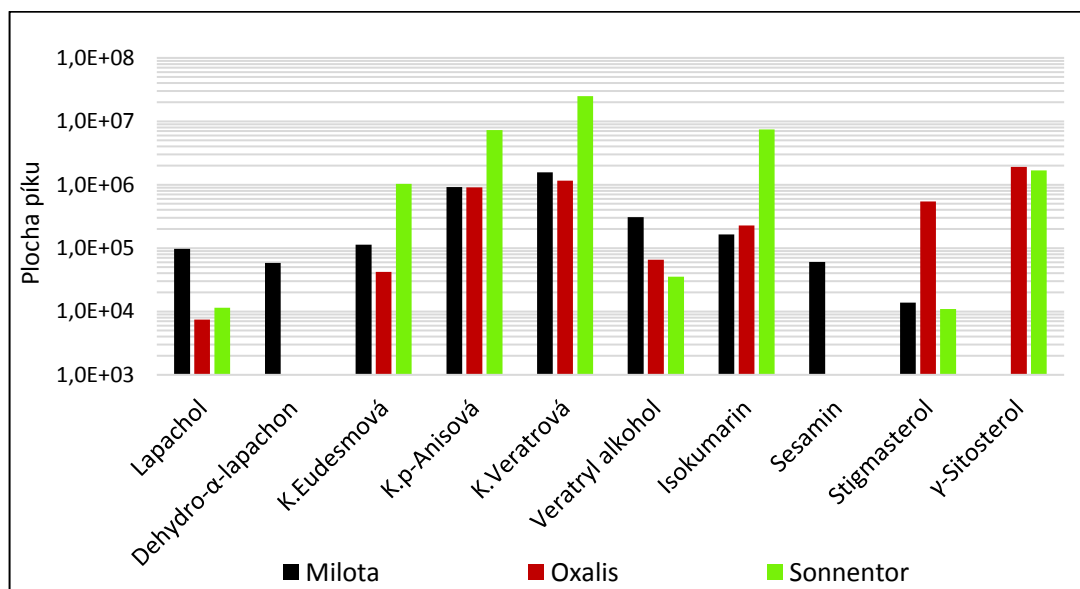
Obr. 38 Výřez z chromatogramu srovnávající tři druhy derivatizace extraktů vilcacory získaných SFE - ion 368 m/z

Vzorky lapacha byly derivatizovány pouze činidlem BSTFA, neboť v předešlých experimentech při superkritické fluidní extrakci nedošlo u derivatizovaných vzorků k detekci hlavních účinných látek. Celkově bylo identifikováno osm látek – kyseliny: chinová, isoferulová, p-anisová, vanilová a veratrová, vanilin, veratralaldehyd a γ -sitosterol. Absence lapacholu a dehydro- α -lapachonu ve vzorcích čaje od firmy BaBa vedla k úvaze o možné ztrátě účinných látek vlivem špatného skladování a manipulace. Z tohoto důvodu

byly proto zakoupeny další tři čaje od různých výrobců. Po namletí byly vzorky extrahovány pomocí superkritické fluidní extrakce a nederivatizované extrakty byly analyzovány. Lapachol se vyskytoval ve všech třech vzorcích, ale ve velice nízké koncentraci – viz tabulka X na následující straně. Nejvíce ho bylo v čaji značky Milota. V tomto čaji byl rovněž jako v jediném identifikován dehydro- α -lapachon. Všechny identifikované látky je možné vidět na obrázku 39 a srovnání množství těchto látek je znázorněno na obrázku 40. Ukázka použitých čajů lapacho spolu s extrakty získanými SFE pomletého materiálu je na obr. 41.



Obr. 39 Výřez z chromatogramu se srovnáním účinných látek v extraktech čaje lapacho od tří výrobců. 1 – K.p-anisová, 2 – Veratryl alkohol, 3 – K.veratrová, 4 – K.eudesmová, 5 – Isokumarin, 6 – Lapachol, 7 – Stigmasterol, 8 – γ -sitosterol



Obr. 40 Grafické srovnání množství účinných látek získaných SFE čaje lapacho tří různých výrobců



Obr. 41 Čaje lapacho s vialky extraktů získaných SFE

4.4.1 Kvantifikace

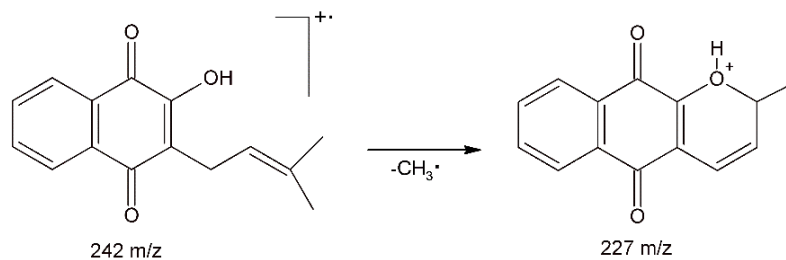
Kvantifikace byla provedena metodou vnějšího standardu, při které bylo využito přímého srovnání ploch lapacholu ve třech vzorcích čaje lapacho s plochou standardu této látky. Hmotnostní koncentrace lapacholu v uvedených čajích spolu s koncentrací přepočtenou na jeden gram navážky je uvedena v tabulce X.

Tab. X Koncentrace lapacholu v různých vzorcích čaje lapacho

| | | Plocha píku | Koncentrace ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$) | Navážka (g) | Koncentrace v 1 g ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) |
|------------------------|-----------|-------------|--|----------------|--|
| Vzorky čaje lapacho | Milota | 96718 | $4,190 \cdot 10^{-4}$ | 0,119 | 3,527 |
| | Oxalis | 7454 | $3,229 \cdot 10^{-5}$ | 0,117 | 2,762 |
| | Sonnentor | 11418 | $4,946 \cdot 10^{-5}$ | 0,117 | 4,235 |
| Standard | Lapachol | 23084525 | 0,100 | - | - |

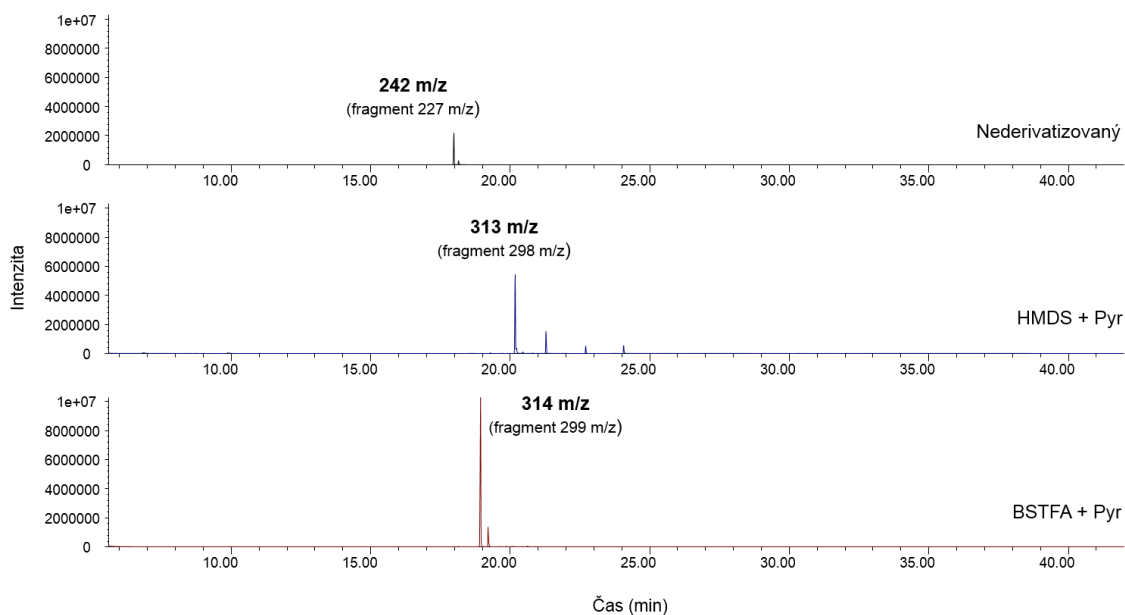
4.5 Derivatizace standardů

Derivatizací původních vzorků, ve kterých byl identifikován lapachol, bylo zjištěno, že dochází ke vzniku rozdílných produktů při použití činidel BSTFA a HMDS. Za účelem objasnění této anomálie byl proto zakoupen standard lapacholu. Nejdříve byla provedena analýza nederivatizovaného standardu, při které byl detegován lapachol s molekulárním iontem 242 m/z. Fragmentací molekulárního iontu, která začíná odštěpením methylové skupiny ($-\text{CH}_3$), respektive methylového radikálu $\cdot\text{CH}_3$ z postranního řetězce s následným zacyklením do struktury vyobrazené na obrázku 42, vzniká dominantní ion ze spektra - 227 m/z.



Obr. 42 Začátek fragmentace lapacholu – molekulární a dominantní ion (převzato z ⁸⁰)

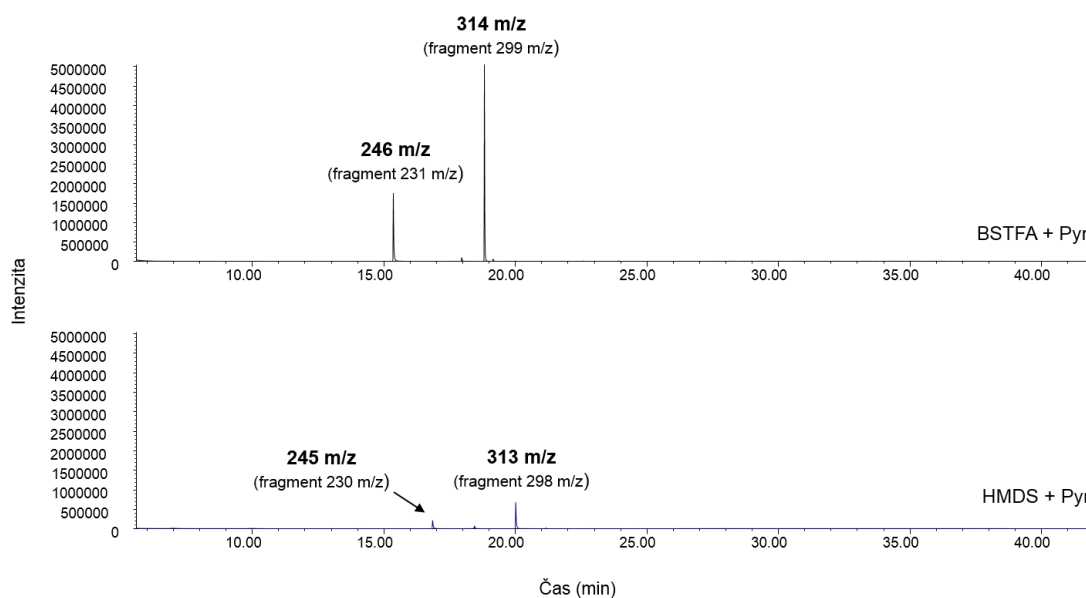
K derivatizaci hydroxylové skupiny nacházející se v molekule lapacholu byla vybrána silanizace a stejně jako v reálných vzorcích s obsahem lapacholu docházelo ke vzniku dvou různých produktů. V případě derivatizace činidlem BSTFA v prostředí pyridinu vznikal očekávaný produkt, kterým byl TMS derivát s molekulárním iontem 314 m/z a dominantním iontem na hmotě 299 m/z. Chromatogram tohoto derivátu lze vidět na obrázku 43, strukturu vzniklého produktu pak na obrázku 48. Derivatizací činidlem HMDS opět v prostředí pyridinu dochází ke vzniku jiného produktu, který se liší jak svým retenčním časem, tak pravděpodobným molekulárním iontem s hodnotou m/z menší o jedničku, tedy 313 m/z – viz obr. 43. Tomu, že se jedná o molekulární ion, napovídají sudé fragmenty, které byly obdrženy a které převládají při fragmentaci lichých molekulárních iontů. Lichý molekulární ion pak dle dusíkového pravidla poukazuje na přítomnost lichého počtu atomů dusíku v molekule. Podíváme-li se na hmotnostní spektrum, můžeme vidět první a rovněž nejintenzivnější fragment se sudou hmotou 298 m/z. Mezi hmotou tohoto fragmentu a předpokládaným molekulárním iontem je diference 15, což indikuje, že by se opravdu mohlo jednat o molekulární ion, neboť u nich dochází na začátku fragmentace nejčastěji ke ztrátě právě methylové skupiny.



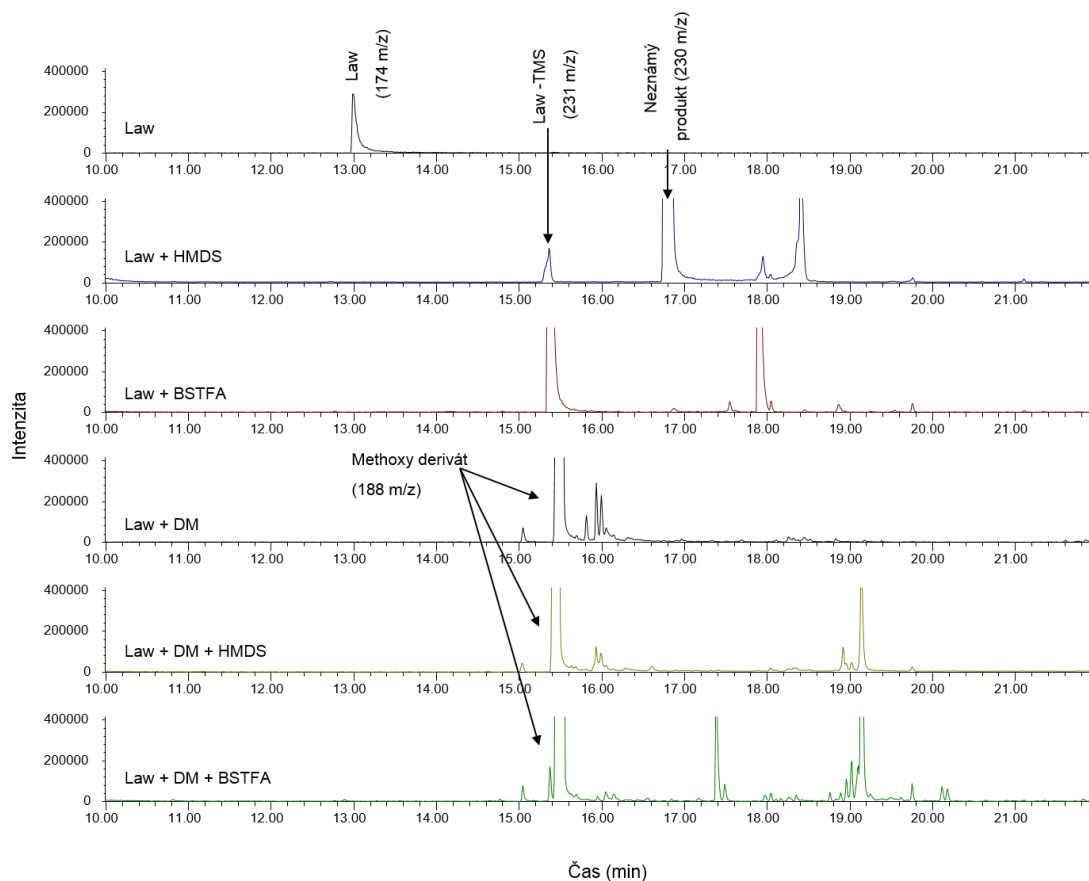
Obr. 43 Srovnání nederivatizovaného a derivatizovaného vzorku standardu lapacholu

Za předpokladu, že ion 313 m/z je skutečně molekulární a v jeho molekule se nachází liché počet atomů dusíku, vyvstává otázka, jak a proč k navázání dusíku došlo. Odpověď na tuto otázku lze hledat v rozdílné elektronové struktuře obou činidel. Volný elektronový pár dusíkového atomu v činidle HMDS se chová jako nukleofil, který se může adovat na elektrofilní atomy, zatímco u činidla BSTFA takovou reaktivitu nelze očekávat, neboť amidový dusík je deaktivován okolními skupinami, které působí zápornými indukčními a mezomerními efekty. Důsledkem těchto efektů je pak snížení elektronové hustoty. Nukleofilní adice je nejběžnějším typem reakce aldehydů a ketonů. Činidlo HMDS, které je vlastně substituovaný amin, tak bude velice ochotně reagovat s některým z kyslíků karbonylových skupin za vzniku příslušného iminu. Mezomerním posunem elektronů v chinoidním systému pak bude patrně docházet k tomu, že adici bude moci podlehnout kterýkoliv z kyslíků. Hypotetické návrhy produktů jsou uvedeny na obrázku 48. Jinou možností by mohla být reakce HMDS s aktivním vodíkem hydroxylové skupiny lapacholu, nebo s jinou skupinou obsahující aktivní vodíkový atom za vzniku očekávaného produktu - TMS derivátu. Takovou reakcí by došlo k rozpadu činidla HMDS a částice $\text{NH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ by mohla reagovat s nesilanizovanou molekulou lapacholu obdobným způsobem jako v prvním případě, jen s tím rozdílem, že uvolněný amoniak z činidla by se navázal na některý z kyslíků karbonylových skupin za vzniku iminu. Vznik takovýchto derivátů je navíc podpořen myšlenkou opírající se o tvorbu silnějších vazeb kyslíkatých sloučenin s TMS skupinou než je tomu v případě dusíku. Návrh možných struktur je znázorněn na obrázku 49.

K ověření tvorby iminových derivátů, vznikajících po derivatizaci činidlem HMDS u strukturně podobných látek jako je lapachol, byl za tímto účelem pořízen standard 2-hydroxy-1,4-naftochinonu jinak také známého jako lawson. Analýzou tohoto standardu derivatizovaného oběma činidly docházelo ke stejnému jevu jako u lapacholu. Derivatizací pomocí BSTFA vznikal očekávaný produkt (molekulární ion 246 m/z, fragment 231 m/z), u HMDS docházelo opět ke tvorbě jiného produktu s molekulárním iontem 245 m/z a dominantním fragmentem 230 m/z. Chromatogram produktů získaných derivatizací směsi obou standardů pomocí BSTFA a HMDS je uveden na obrázku 44. Společně se standardy naftochinonů byl analyzován i 4-ethylfenol pro kontrolu, že činidlo HMDS reaguje tak, jak se u něj očekává a není například nějak znečištěno. Výsledky ukázaly, že s tímto jednoduchým alkyl substituovaným fenolem probíhá silylace normálně a oběma činidly dochází ke vzniku stejného produktu – trimethylsilyletheru. Standardy byly analyzovány opakovaně a při derivatizaci samotného standardu lawsonu činidlem HMDS došlo ke vzniku jak očekávaného produktu (TMS derivátu), tak také ke vzniku neznámého produktu s odlišným molekulárním iontem o 1 m/z. Je tedy pravděpodobné, že vazbou činidla na jednu molekulu výchozí látky dochází ke vzniku TMS derivátu, který je ovšem doprovázen rozpadem činidla HMDS, které se pak váže na druhou molekulu analytu. Výsledky ze souhrnné analýzy standardu lawsonu jsou uvedeny na obrázku 45

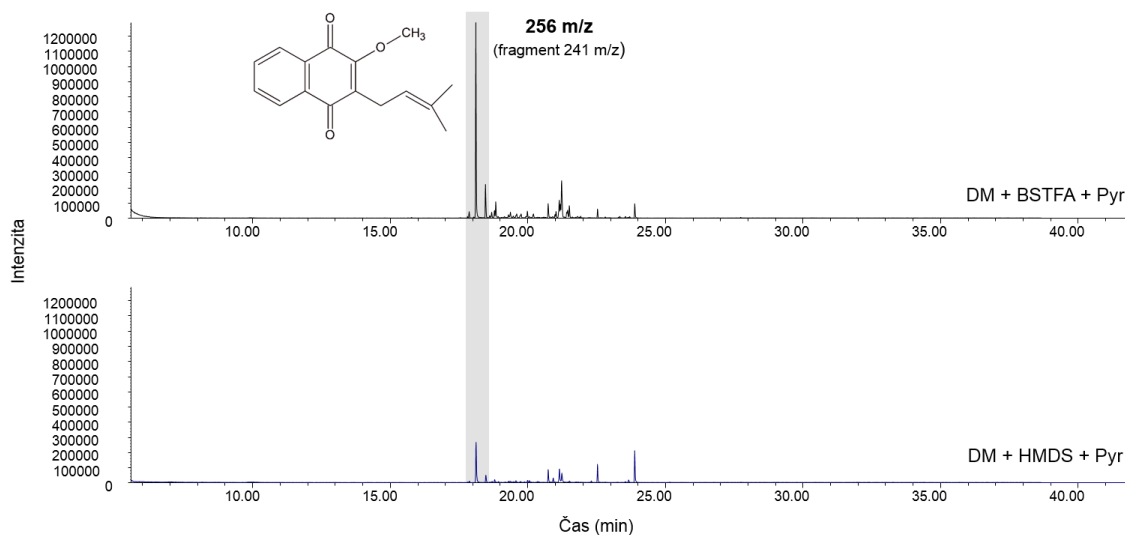


Obr. 44 Molekulární a fragmentové ionty standardů lapacholu a lawsonu při derivatizaci dvěma činidly

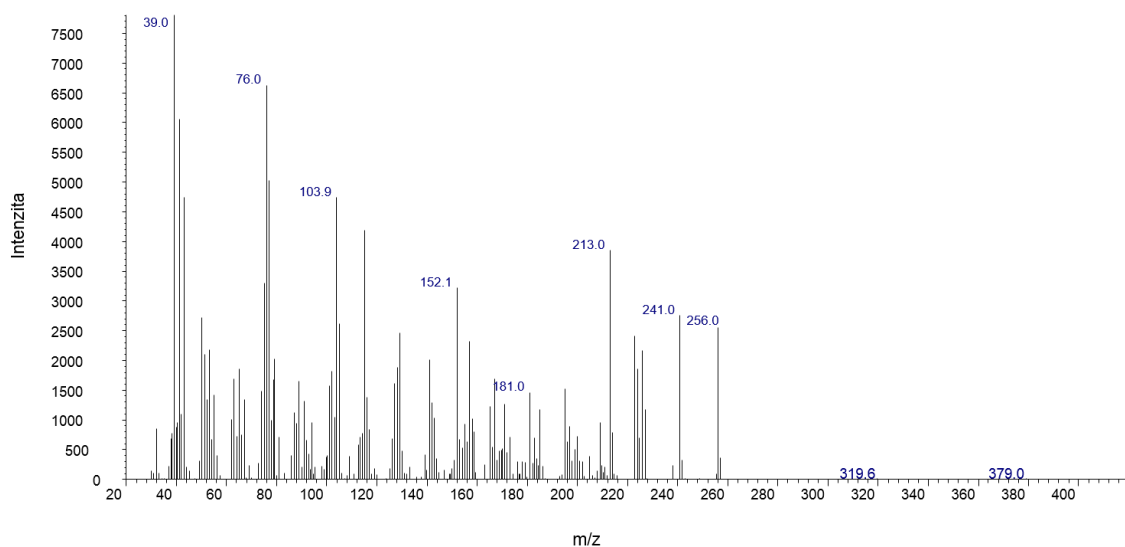


Obr. 45 Produkty vzniklé reakcí standardu lawsonu s příslušnými činidly

Další experimenty zahrnovaly jednoduchou derivatizaci - metylaci pomocí čerstvě připraveného diazomethanu. Jedna sada standardních vzorků reagovala pouze se samotným diazomethanem, další dvě sady byly metylovány diazomethanem a následně podrobeny reakci s činidly BSTFA a HMDS. Motivací těchto experimentů byly snaha ověřit, zda metylací dojde k blokaci vodíku hydroxylové skupiny, která již pak bude neaktivní vůči dalšímu působení derivatizačních činidel a zda bude docházet ke vzniku jednotného produktu methylace, tedy že nebudou vznikat izomery příslušející jednotlivým tautomerním formám. Analýzou bylo dokázáno, že skutečně vznikají stejné produkty methylace, jak bylo předpokládáno. Identifikace methoxy derivátu lawsonu proběhla na základě srovnání retenčních časů a hmotnostních spekter s knihovnou spekter. Methoxy derivát lapacholu nebyl uveden v knihovně spekter, nicméně na základě retenčního času a hmotnostního spektra byla jeho identifikace potvrzena. Chromatogram společně s hmotnostním spektrem vzniklého methoxy derivátu lapacholu je uveden na obrázcích 46 a 47.

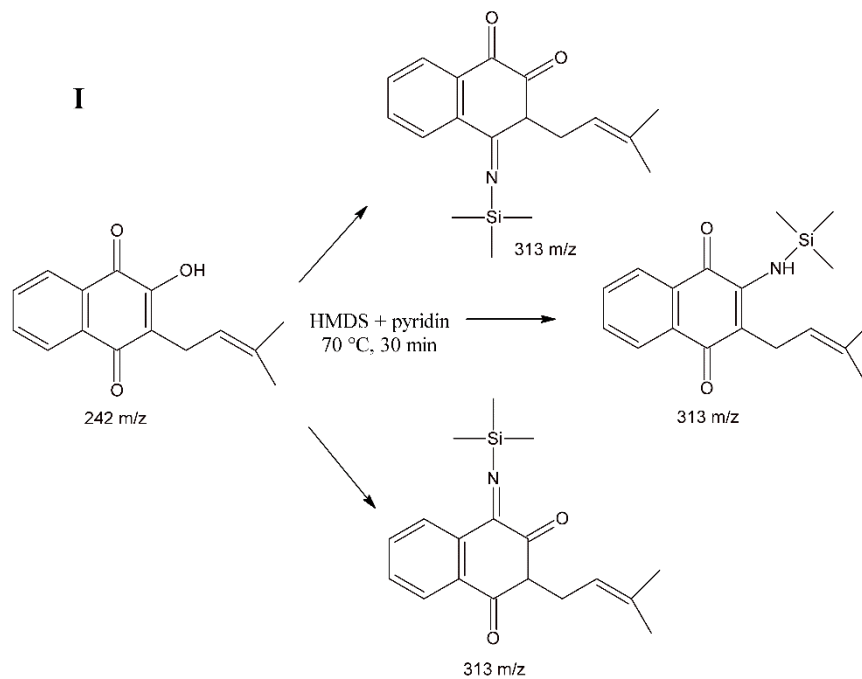
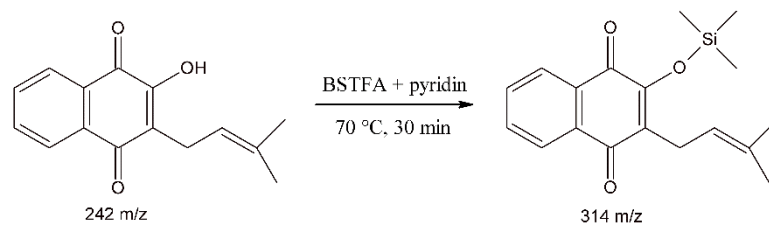


Obr. 46 Molekulární a fragmentový ion methoxy derivátu lapacholu po reakci s činidly BSTFA a HMDS

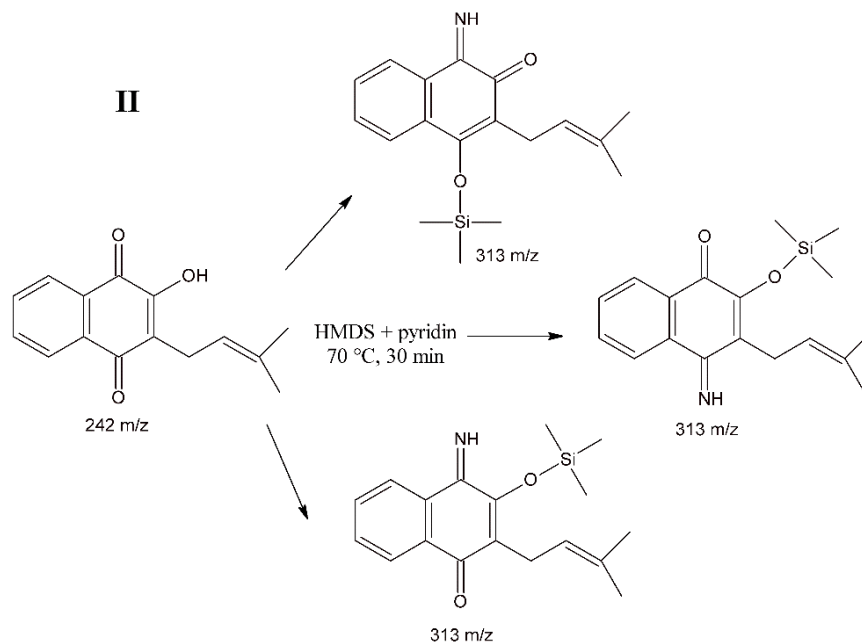


Obr. 47 Hmotnostní spektrum methoxy derivátu lapacholu

Výsledky z methylace standardů vedou k úvaze, že derivatizace činidlem HMDS nebude patrně zahájena přes dusík vazbou na karbonylový kyslík v chinoidním jádře, ale že reakce bude začínat nukleofilní substitucí aktivního vodíku skupinou TMS a až poté dojde vlivem rozpadu činidla k navázání aminu, respektive amoniaku na některý z kyslíků karbonylových skupin. Této hypotéze by více odpovídaly návrhy struktur na obrázku 49. S ohledem na experimentální data však nelze tento mechanismus s jistotou potvrdit. Znovu také uvádím, že níže uvedené produkty reakce s činidlem HMDS jsou pouze hypotetické varianty. Určení jejich struktury je předmětem dalšího výzkumu. Jednou z možností by mohla být bazicky katalyzovaná hydrolyza. Za předpokladu, že při reakci vzniká imin, by hydrolyza vedla ke vzniku původní karbonylové skupiny. V případě úspěšné izolace vzniklého produktu by se nabízela samozřejmě nukleární magnetické rezonance, kterou by došlo k určení přesné struktury.



Obr. 48 Schéma produktu vzniklého derivatizací činidlem BSTFA a hypotetické návrhy struktur produktů po reakci s HMDS



Obr. 49 Schéma II s možnými produkty silanizace činidlem HMDS

5 Závěr

Tato práce se zabývala stanovením účinných látek ve dvou rostlinách a to konkrétně ve vilcacoře a lapachu. Pro jejich extrakci byla vybrána na začátku macerace. Po týdenní maceraci nepomletého materiálu v methanolu nebyly u vilcacory detegovány žádné píky alkaloidů, u lapacha byly detegovány jak majoritní účinné látky (lapachol, dehydro- α -lapachon), tak i ty minoritní v podobě fenolických kyselin. Efektivita macerace byla u vilcacory zvýšena pomletím rostlinného materiálu a použitím intenzivnějších extrakčních kroků, které vedly k detekci tří alkaloidů. Následnou derivatizací došlo rovněž k identifikaci polyfenolických látek katechinu a kyseliny chinové. U lapacha nepřineslo mletí oproti předchozí extrakci žádné zlepšení. Při použití sady dvanácti rozpouštědel se jako optimální k dalším experimentům jevila rozpouštědla polárnější a to aceton, acetonitril, ethylacetát, methanol a methylisobutylketon.

Dalším krokem bylo použití vysokotlaké extrakce, která zvyšuje účinnost extrakce analytů díky použití vysokých teplot a tlaků. I zde byl sledován vliv mletí vzorků, který ukázal, že v případě vysokotlaké extrakce nemá mletí význam. To také potvrdila následná derivatizace, kde byly rozdíly více patrné a nemletí vzorků se jevílo jako lepší varianta. Na vině však může být částečné ucpávání frity, které je častým problémem u tohoto typu extrakce.

Za účelem získání čistějších extraktů bez doprovodu balastních látek byla provedena extrakce oxidem uhličitým v nadkritickém stavu, jak bez použití modifikátoru, tak s jeho využitím. V nepomletém materiálu bylo detegováno minimum sloučenin, rapidní zlepšení situace nastalo při jeho pomletí a opakováním několika extrakčních cyklů s přidávkou modifikátoru, kterým byl po celou dobu práce methanol. U vilcacory došlo k detekci i vysoce polárních látek jakými jsou kyseliny chinová, chlorogenová a katechin. Při těchto experimentech nicméně docházelo k ucpávání restriktoru jemnými částicemi pomletého materiálu a z toho důvodu bylo navrženo použití frity pro jejich záchyt, u které bylo rovněž předpokládáno, že by mohla sloužit také pro záchyt balastních látek. Běžně je tato polyethylenová frita používána v kolonkách pro extrakci tuhou fází, v této práci byla upravena její velikost pro použití v patroně pro superkritickou extrakci. Analýzou extraktu získaného oplachem spodní části patrony s fritou bylo zjištěno, že na jednu stranu dochází sice k zadržování balastních látek sacharidové povahy, na druhou stranu se zde nacházely i

vedlejší účinné látky v poměrně velkém zastoupení. Další používání frity by tak vyžadovalo optimalizaci extrakčního postupu.

U vzorků lapacha, které byly v průběhu práce derivatizovány činidly BSTFA a HMDS bylo zjištěno, že dochází ke vzniku rozdílných produktů a na základě této anomálie byly zakoupeny standardy jak lapacholu, tak strukturně nejjednoduššího hydroxynaftochinonu - lawsonu. Jejich derivatizace skutečně potvrdila vznik rozdílných produktů. V případě BSTFA vznikal očekávaný TMS derivát, derivatizací HMDS docházelo ke vzniku jiného produktu s hodnotou m/z menší o jedničku, který ve své molekule obsahoval atom dusíku. Methyloací obou standardů diazomethanem vznikaly methoxyderiváty. Připravené methoxyderiváty nepodléhaly dalším reakcím se silanizačními činidly a vznikaly jednotné methoxyderiváty. Hypotetickým návrhem pro vznik odlišných produktů byla myšlenka opírající se o rozpad činidla HMDS při derivatizační reakci. V práci jsou rovněž uvedeny teoretické produkty vznikající reakcí hydroxynaftochinonů s tímto činidlem. Jejich skutečná struktura nebyla nicméně ověřena a tyto návrhy jsou tak předmětem dalšího výzkumu.

7 Seznam použité literatury

1. Albuquerque, U. P.: *Medicinal and aromatic plants of South America: Brazil*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2018.
2. Falkiewicz, B.; Lukasiak, J.: Vilcacora [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmel.] - A review of published scientific literature. *Case Rep. Clin. Pract. Rev.* **2**, 305–316 (2001).
3. Keplinger, K.; Gerhard, L.; Wurm, M.; Dierich, M. P.; Teppner, H.: *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. - Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J Ethnopharmacol* **64**(1), 23-34 (1998).
4. Valerio, L. G.; Gonzales, G. F.: Toxicological Aspects of the South American Herbs Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*). *Crit. Rev. Toxicol.* **24**(1), 11-35 (2005).
5. Sandoval, M.; Okuhama, N. N.; Zhang, X. J.; et al.: Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* **9**(4), 325-337 (2002).
6. Zhang, Q.; Zhao, J. J.; Xu, J.; Feng, F.; Qu, W.: Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. *J. Ethnopharmacol* **173**, 48-80 (2015).
7. Bridson, D. M.; Robbrecht, E.: Tropical Woody Rubiaceae. Characteristic Features and Progressions. Contributions to a New Subfamilial Classification. *Kew Bull.* **45**(3), (1990).
8. Luna-Palencia, G. R.; Cedra-García-Rojas, C. M.; Rodríguez-Monroy, M.; Ramos-Valdivia, A. C.: Influence of Auxins and Sucrose in Monoterpenoid Oxindole Alkaloid Production by *Uncaria tomentosa* Cell Suspension Cultures. *Biotechnol. Prog.* **21**(1), 198-204 (2005).
9. <http://www.oshims.com/herb-directory/c/cats-claw/>, staženo 15. dubna 2019.
10. <http://www.herbs.org/herbnews/product/cats-claw-info-packet/>, staženo 15. dubna 2019.
11. Heitzman, M. E.; et al.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of (Rubiaceae). *Phytochemistry* **66**(1), 5-29 (2005).
12. Aniszewski, T.: *Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications*. 2nd edition. Waltham, MA: Elsevier, 2015.
13. Thomas, A. E.: *DNA damage repair, repair mechanisms, and aging*. Hauppauge, N. Y.: Nova Science Publisher's, 2010.

14. Yu, B.; Yu, Q.; Liu, H. M.: Spirooxindoles: Promising scaffolds for anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 673-698 (2015).
15. Laus, G.; Keplinger, D.: Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **662**(2), 243-249 (1994).
16. Reinhard, K.: *Uncaria tomentosa* (Willd.) D. C.: cat's claw, uña de gato, or savéntaro. *J. Altern. Complement. Med* **5**(2), 143-51 (1999).
17. Gentry, A. H.: Bignoniaceae: Part II (Tribe Tecomeae). *Flora Neotropica*. New York Botanical Garden Press, **25** (part 2), 1992, s. 1-370.
18. Grose, S. O.; Olmstead, R. G.: Taxonomic Revisions in the Polyphyletic Genus *Tabebuia* s. I. (Bignoniaceae). *Syst Bot.* **32**(3), 660-670 (2007).
19. Lewis, W. H.: Pau d'Arco or Lapacho (*Tabebuia*) v knize: Coates, P. M.: *Encyclopedia of dietary supplements*. New York: Marcel Dekker, 2005, s. 527-535.
20. Ueda, S.: *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb. (Taheebo): In Vitro Culture and the Production of Naphtoquinones, v knize: Bajaj, Y. P. S. (ed.), *Medicinal and Aromatic Plants VII*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1994, s. 445-456 .
21. Nepomuceno, J. C.: Lapachol and its derivatives as potential drugs for cancer treatment, v knize: *Plants and Crop The Biology and Biotechnology Research*, Edition: 1^a, iConcept Press Ltd. 2014, s. 19.
22. Castellanos, G.; Rubén, J.; Prieto, J. M.; Heinrich, M.: Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) - A global ethnopharmacological commodity? *J Ethnopharmacol* **121**(1), 1-13 (2009).
23. http://syhuherbarium.sls.cuhk.edu.hk/collections/course_quiz/handroanthus-impetiginosus/, staženo 15. dubna 2019.
24. <https://www.flickr.com/photos/flaviocb/7451600780/in/photostream/>, staženo 15. dubna 2019.
25. Girard, M.; Kindack, D.; Dawson, B. A.; Ethier, JC; Awang, D. V. C.; Gentry, A. H.: Naphthoquinone Constituents of *Tabebuia* spp. *J. Nat. Prod.* **51**(5), 1023-1024 (1988).
26. Silva-junior, O. B.; Grattapaglia, D.; Novaes, E.; Collevatti, R. G.: Genome assembly of the Pink Ipê (*Handroanthus impetiginosus*, Bignoniaceae), a highly valued, ecologically keystone Neotropical timber forest tree. *GigaScience* **7**(1) (2018).

27. Schulze, M.; Grogan, J.; Uhl, Ch.; Lentini, M.; Vidal, E.: Evaluating ipê (Tabebuia, Bignoniaceae) logging in Amazonia: Sustainable management or catalyst for forest degradation? *Biological Conservation* **141**(8), 2071-2085 (2008).
28. Dvorkin, C.; Whelan, L.; Whelan, J. S.: Tropical American Plants in the Treatment of Infectious Diseases. *J. Diet. Suppl.* **5**(4), 349-372 (2009).
29. Awang, D. V. C.; Dawson, B. A.; Ethier, JC; Gentry, A. H.; Girard, M.; Kindack, D.: Naphthoquinone Constituents of Commercial Lapacho/Pau d'arco/Tabebuia Products. *J Herbs Spices Med Plants* **2**(4), 27-43 (1995).
30. Steinert, J.; Khalaf, H.; Rimpler, M.: High-performance liquid chromatographic separation of some naturally occurring naphthoquinones and anthraquinones. *J. Chromatogr. A* **723**(1), 206-209 (1996).
31. Mowrey, D. B.: *Ancient Herb, Modern Miracle: Pau D'Arco (Tabebuia Tea, Lapacho)*. Mountain West Institute of Herbal Sciences, Salt Lake City 2001.
32. Niehues, M.; Barros, V. P.; Emery, F. S.; Dias-baruffi, M.; Assis, M. D.; Lopes, P. N.: Biomimetic in vitro oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the in vivo phase I metabolism of bioactive compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **54**, 804-812 (2012).
33. Park, B. S.; Lee, K. G.; Shibamoto, T.; Lee, S. E.; Takeoka, G. R.: Antioxidant Activity and Characterization of Volatile Constituents of Tabebuia (Tabebuia impetiginosa Martius ex DC). *J. Agric. Food Chem.* **51**(1), 295-300 (2003).
34. Silva, M. N. da; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V.: Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. *Química Nova* **26**(3), 407-416 (2003).
35. Epifano, F.; Genovese, S.; Fiorito, S.; Mathieu, V.; Kiss, R.: Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review. *Phytochem. Rev.* **13**(1), 37-49 (2014).
36. Lu, J. J.; Bao, J. L.; Wu, G. S.; Xu, W. S.; Huang, M. O.; Chen, X. P.; Wang, Y. T.: Quinones Derived from Plant Secondary Metabolites as Anti-cancer Agents. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **13**(3), 456-463 (2013).
37. El-Najjar, N.; Gali-Muhtasib, H.; Ketola, R. A.; Vuorela, P.; Urtti, A.; Vuorela, H.: The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. *Phytochem. Rev.* **10**(3), 353-370 (2011).
38. Silva, F. C. de; Ferreira, V. F.: Natural Naphthoquinones with Great Importance in Medicinal Chemistry. *Curr. Org. Synth.* **13**(3), 334-371 (2016).
39. Rao, K. V.; Mc Bride, T. J.; Oleson, J. J.: Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor agent. *Cancer Res.* **28**, 1952-1954 (1968).

40. Linardi, M. da C. F.; Oliveira, M. M. de; Sampaio, M. R. P.: Lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. *J. Med. Chem.* **18**(11), 1159-1161 (1975).
41. Thomson, R. H.: *Naturally occurring quinones*. 2d ed. New York: Academic Press, 1971.
42. Fieser, L. F.: The tautomerism of hydroxy quinones. *J. Am. Chem. Soc.* **50**(2), 439-465 (1928).
43. López López, L. I.; Nery Flores, Q. F. B.; Belmares Silva, S. Y.; Galindo, A. S.: Naphthoquinones: biological properties and synthesis of lawsone and derivatives - a structured review. *Vitae Columbia* **21**(3), 248-258 (2014).
44. Jelly, R.; Lewis, S. W.; Lennard, Ch.; Lim, K. F.; Almog, J.: Lawsone: a novel reagent for the detection of latent fingerprints on paper surfaces. *Chem. Commun.* **30**, (2008).
45. Santos, M. D. F.; Litivack-junior, J. T.; Antunes, R. V.; Silva, T. M. S; Camara, C. A.: New Adducts of Lapachol with Primary Amines. *J. Braz. Chem. Soc.* **22**(4), 796-800 (2011).
46. Ravelo, Á.; Estévez-Braun, A.; Pérez-sacau, E.: The chemistry and biology of lapachol and related natural products α and β -lapachones. Bioactive Natural Products (Part J). Elsevier, Studies in Natural Products Chemistry 719-760 (2003).
47. Hussain, H., Krohn, K.; Ahmad VU et al.: Lapachol: an overview. *Arkivoc Part II*, 145-171 (2007).
48. Hooker, S. C.; Greene, W. H.: On the constitution of lapachic acid and its derivatives. *J Franklin Inst* **128**(2), 142-147 (1889).
49. Paternó, E.: Ricerche sull'acido lapachico. *Gazz Chim Ital* **12**, 337-392 (1882).
50. Hooker, S. C.: LVII. - The constitution of "lapachic acid"(lapachol) and its derivatives. *J. Chem. Soc., Trans* **61**, 611-650 (1892).
51. Hooker, S. C.: LXXXVII. - The constitution of lapachol and its derivatives. Part III. The structure of the amylene chain. *J. Chem. Soc., Trans* **69**, 1355-1381 (1896).
52. Fieser, L. F.: The alkylation of hydroxynaphthoquinone. III. A synthesis of lapachol. *J. Am. Chem. Soc* **49**(3), 857-864 (1927).
53. Ossowski, T.; Goulart, M. O. F.; Abreu, F. C.; et al.: Determination of the pKa values of some biologically active and inactive hydroxyquinones. *J. Braz. Chem. Soc.* **19**(1), 175-183 (2008).
54. Segoloni, E.; Di Maria, F.: UV-VIS spectral and GC-MS characterization of *Handroanthus serratifolius* (Vahl.) Grose (a.k.a. *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nichols/Lapacho) heartwood main extractives: a comparison of protocols aimed at a

- practical evaluation of Lapachol and Dehydro- α -Lapachone content *Eur J Wood Wood Prod* **76**(5), 1547-1561 (2018).
55. Pardee, A.; Li, Y.; Li, Ch.: Cancer Therapy with β -Lapachone. *Curr. Drug Targets* **2**(3), 227-242 (2002).
 56. Bermejo, M.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-alvarez, I.; Gonzalez-alvarez, M.: Enhancing Oral Absorption of β -Lapachone: Progress Till Date. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **42**(1), 1-10 (2017).
 57. Jin, Y.; Jeong, K. M.; Lee, J.; Zhao, J.; Cho, S. Y.; Baek, K. S.: Development and Validation of an Analytical Method Readily Applicable for Quality Control of *Tabebuia impetiginosa* (Taheebo) Ethanolic Extract. *J. AOAC Int.* **101**(3), 695-700 (2018).
 58. Willför, S. M.; Smeds, A. I.; Holmbom, B. R.: Chromatographic analysis of lignans. *J. Chromatogr. A* **1112**(1-2), 64-77 (2006).
 59. Mehndiratta, S.; et al.: A Review on Plants a useful source of anti-cancer drugs. *J. Pharm. Res* **4**, 264-71 (2011).
 60. Almeida, E. R. de.: Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. *The Open Natural Products Journal* **2**(1), 42-47 (2009).
 61. Mendelova univerzita v Brně,
https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968, staženo 15. dubna 2019.
 62. Tan, S. G.; Yong, J. W. H.; Teo, Ch. Ch.; Ge, L.; Chan, Y. W.; Hew, Ch. S.: Determination of metabolites in *Uncaria sinensis* by HPLC and GC - MS after green solvent microwave-assisted extraction. *Talanta* **83**(3), 891-898 (2011).
 63. Calvo, A.; Dévényi, D.; Kószó, B.; et al.: Controlling concentration of bioactive components in cat's claw based products with a hybrid separation process. *J. Supercrit. Fluids* **125**, 50-55 (2017).
 64. Linskens, H. F.; Jackson, J. F.; ed.: Alkaloids, v knize: Linskens, H. F.; Jackson, J. F.: *Modern Methods of Plant Analysis*, Springer Berlin Heidelberg, **15** (1994).
 65. Kaiser, S.; Verza, S. G.; Moraes, R. C.; Pittol, V.; Peñaloza, E. M. C.; Pavei, C.; Ortega, G. G.: Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides from cat's claw bark by Box - Behnken design. *Ind. Crop. Prod.* **48**, 153-161 (2013).
 66. Lopez-Avila, V.; Benedicto, J.; Robaugh, D.: Supercritical fluid extraction of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *J High Resolut Chromatogr.* **20**(4), 231-236 (1997).

67. Montoro, P.; Carbone, V.; Zuniga Quiroz, J. D. de; Simone, F. de; Pizza, C.: Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. *Phytochem. Anal.* **15**(1), 55-64 (2004).
68. Laus, G.; Teppner, H.: The alkaloids of an *Uncaria rhynchophylla* (Rubiaceae-Coptosapelteae)[JJ]. *Phyton; Annales rei botanicae* **36**(2):185-196 (1996).
69. Laus, G.; Brössner, D.; Kepplinger, K.: Alkaloids of peruvian *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* **45**(4), 855-860 (1997).
70. Pilarski, R.; Zieliński, H.; Ciesiołka, D.; Gulewicz, K.: Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J Ethnopharmacol.* **104**(1-2), 18-23 (2006).
71. Pilarski, R.; Filip, B.; Wietrzyk, J.; Kuraś, M.; Gulewicz, K.: Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine* **17**(14), 1133-1139 (2010).
72. Burnett, A. R.; Thomson, R. H.: Naturally occurring quinones. Part X. The quinonoid constituents of *Tabebuia avellaneda*(Bignoniaceae). *J. Chem. Soc. C* (1967).
73. Solomon, S.; Muruganantham, N.; Senthamilselvi, M. M.: Anti-cancer activity of *tabebuia rosea* (flowers) against human liver cancer. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **5**(4), 171-174 (2015).
74. Warashina, T.; Nagatani, Y.; Noro, T.: Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry* **65**(13), 2003-2011 (2004).
75. Rodrigues, S. V.; Viana, L. M.; Baumann, W.: UV/Vis spectra and solubility of some naphthoquinones, and the extraction behavior of plumbagin from *Plumbago scandens* roots in supercritical CO₂. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**(5), 895-900 (2006).
76. Viana, L. M.; Freitas, M. R.; Rodrigues, S. V.; Baumann, W.: Extraction of lapachol from *Tabebuia avellaneda* wood with supercritical CO₂: an alternative to Soxhlet extraction? *Braz. J. Chem. Eng.* **20**(3), 317-325 (2003).
77. Verpoorte, R.: ALKALOIDS | Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Separation Science*. Elsevier, s. 1949-1956 (2000).
78. Phillipson, J. D.; Hemingway, S. R.: Chromatographic and spectroscopic methods for the identification of alkaloids from herbarium samples of the genus *uncaria*. *J. Chromatogr. A* **105**(1), 163-178 (1975).
79. Baerheim-Svendsen, A.; Verpoorte, R.: *Chromatography of alkaloids*. New York: Distributors for the U. S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1984.

80. Elwood, T. A.; Dudley, K. H.; Tesarek, J. M.; Rogerson, P. F.; Bursey, M. M.: The mass spectra of some naphthoquinones. Lapachol, isolapachol and related compounds. *Organic Mass Spectrometry* **3**(7), 841-861 (1970).
81. Girard, M.; Ethier, J. C.; Kindack, D.; Dawson, B. A.; Awang, D. V. C.: Mass Spectral Characterization of Naphthoquinones Related to Lapachol. *J. Nat. Prod.* **50**(6), 1149-1151 (1987).
82. Pei, J.; Wang, Y.; Yu, K.: Sensitive Determination of Quinones by High - Performance Liquid Chromatography - Electrospray Ionization - Tandem Mass Spectrometry with Methanol Derivatization. *Anal. Sci.* **34**(3), 335-340 (2018).
83. Sigma-Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com/chemistry/solvents/chloroform-center.html>, staženo 16. dubna 2019.

8 Seznam použitých zkratek a symbolů

| | |
|-------|--|
| ACN | acetonitril |
| BSTFA | N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid |
| DE | diethylether |
| EtAc | ethylacetát |
| HMDS | hexamethyldisilazán |
| iPrOH | propan-2-ol |
| MIBK | methylisobutylketon |
| MeOH | methanol |
| NMU | N-nitroso-N-methylmočovina |
| PSE | vysokotlaká extrakce rozpouštědlem |
| SFE | superkritická fluidní extrakce |
| tBuMe | terc-butyl methyl ether |
| TMS | trimethylsilyl |