

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Vědní obor: Toxikologie přírodních látek



Biologická aktivita obsahových látek *Cichorium intybus*

Biological activity of *Cichorium intybus* compounds

Rigorózní práce

Vypracovala: Mgr. Marta Málková

Konzultant práce: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

2010

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Marta Málková

Za cenné rady, všestrannou pomoc a odborné vedení při vypracování této práce děkuji Prof. RNDr. Lud'ku Jahodářovi, Csc.

OBSAH

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Systematické zařazení <i>Cichorium intybus</i> L. – čekanka obecná	9
2.2. Fytochemická charakteristika rostliny	10
2.2.1. Inulin	10
2.2.2. Seskviterpenické laktony	11
2.2.3. Fytosteroly	15
2.2.4. Fenolické kyseliny	18
2.2.5. Obsahové látky semen a charakteristika oleje	20
2.3. Biologická aktivita obsahových látek <i>Cichorium intybus</i>	22
2.3.1. Inhibiční efekt na acetylcholinesterázu	22
2.3.2. Antihepatotoxická aktivita	22
2.3.3. Inhibiční efekt na α -glukosidázu	23
2.3.4. Anti- a pro-oxidační aktivita	24
2.3.5. Antifugální aktivita	25
2.3.6. Antibakteriální aktivita	25
2.3.7. Antidiabetická aktivita	26
2.3.8. Antimalarická aktivita	26
2.3.9. Analgetická a sedativní aktivita	27
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1. Charakteristika zpracovávaného materiálu	29
3.2. Chemikálie, chromatografický materiál a přístroje	29
3.2.1. Chemikálie	29
3.2.2. Chromatografický materiál	29

3.2.3. Pístroje	30
3.3. Standardy, detekční činidla	31
3.3.1. Standardy	31
3.3.2. Detekční činidla	31
3.4. Příprava extraktů	32
3.4.1. Příprava ethanolového extraktu	32
3.4.2. Příprava vodného extraktu	32
3.4.3. Příprava dichlormethanového extraktu	32
3.4.4. Příprava frakce obsahující fenolické kyseliny	32
3.5. Chromatografické hodnocení zkoušených extraktů	34
3.5.1. Hodnocení extraktů pomocí TLC	34
3.5.2. HPLC analýza dichlormethanového extraktu	38
3.6. Stanovení biologické aktivity a celkového množství fenolů	42
3.6.1. Stanovení celkového množství fenolů	42
3.6.2. Stanovení účinku na AChE a BuChE (IC ₅₀)	42
3.6.3. Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu, vyhodnocení metodou SIA	43
3.6.4. Tabulka naměřených hodnot	45
4. HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE	47
5. ZÁVĚR	51
6. LITERATURA	53
7. ABSTRAKT	56
8. ABSTRACT	57

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Práce navazuje na výsledky získané v mojí diplomové práci, která byla zaměřena na identifikaci látek obsažených v plodech *Cichorium intybus*. Tato práce přidává další výsledky, které se zabývají nejen látkami obsaženými v plodech, ale i látkami obsaženými v kořenech této rostliny. Pro testování byly použity částečně purifikované extrakty, u kterých byla stanovována biologická aktivita.

Cílem této práce bylo zjistit antioxidační účinky, vliv na inhibici enzymů acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy a stanovit celkové množství fenolických látek v extraktech z obou částí rostlin.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Systematické zařazení *Cichorium intybus* L. – čekanka obecná¹

ODDĚLENÍ : *Magnoliophyta*

TŘÍDA : *Magnoliopsida*

ŘÁD : *Asterales*

ČELEĎ : *Asteraceae* - hvězdnicovité

PODČELEĎ : *Cichorioideae* - čekankové

ROD : *Cichorium* - čekanka

DRUH : *Cichorium intybus* L. - čekanka obecná

2.2. Fytochemická charakteristika rostliny

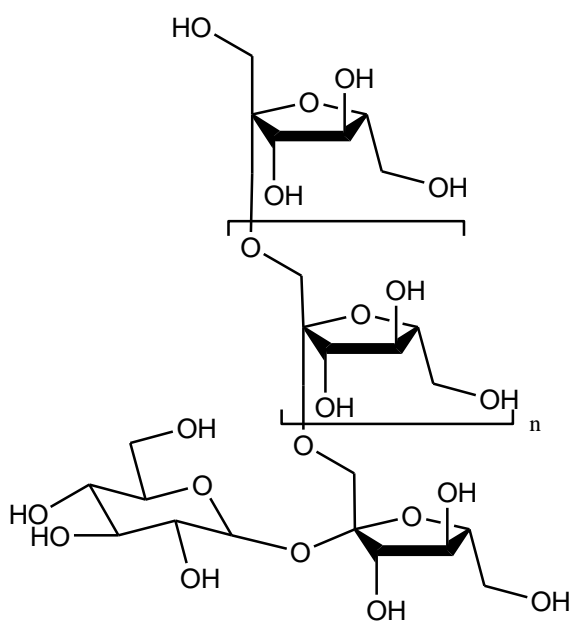
2.2.1. Inulin

Pro čeleď *Asteraceae* je charakteristická přítomnost inulinu (viz. Obr.1.).

Inulin je polysacharid tvořený 35 zbytky fruktózy spojenými β -2,1 vazbami s koncovou a středovou jednou molekulou glukózy. Je rozpustný ve vodě.²

Je používán jako náhrada tuků a cukrů, snižuje kalorickou hodnotu potravin, a proto je vhodný především pro diabetiky. Také je používán při testu renální clearance.³

Obr. 1.



inulin

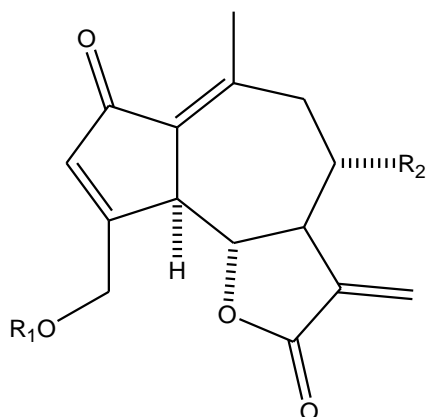
2.2.2. Seskviterpenické laktony

V listech a především v kořenech čekanky obecné je obsažen vysoký podíl seskviterpenických laktonů. Jedná se především o laktucin a jeho deriváty. Tyto látky způsobují charakteristickou nahořklou chuť, a proto jsou používány k podpoře trávení a chuti k jídlu.⁴

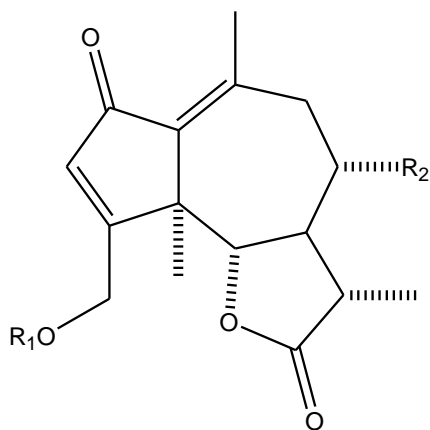
Seskviterpenické laktony často obsahují jako vedoucí strukturu α,β -nenasycený- γ -lakton, který je v současnosti spojován s protinádorovou, cytotoxickou, antimikrobiální a fytotoxickou aktivitou.⁵

Kromě derivátů laktucinu (A), kam patří především 8-deoxylaktucin (B) a laktukopikrin (C), byla zjištěna také přítomnost germakranolidů, eudesmanolidů a guajanolidů, které jsou přítomny především ve formě glykosidů v kořenech čekanky. Byly zpracovávány ethanolové extrakty z listů a kořenů *Cichorium intybus*. V listech byla zjištěna přítomnost 11 β ,13-dihydrolaktucinu (D), jacquinelinu (E), směs laktucinu a 11 β ,13-dihydrolaktucinu, směs 8-deoxylaktucinu a jacquinelinu, směs laktukopikrinu a jeho derivátů (F, I), crepidiasid B (G), loliolid a sloučenina (J), která byla analyzována pomocí chromatografických a spektrálních metod, neboť se jednalo o novou přírodní látku a následně byla označena jako 3,4 β -dihydro-15-dehydrolaktukopikrin. Kořeny obsahují vedle směsi methyl a ethyl esterů kyseliny p-hydroxyfenyloctové kyseliny, 8-deoxylaktucinu, crepidiasidu B, směsi laktukopikrinu s jeho deriváty, cichoriosidu B (H) a sonchusidu A (L) také 3,4 β -dihydro-15-dehydrolaktukopikrin, ixerisosid D (K) a magnoliolid (M), který byl poprvé izolován z *Magnolia grandiflora*. Derivát laktukopikrinu (I) a ixerisosid D byl poprvé získán z *Cichorium intybus* a *Ixeris repens*. Dále byla zjištěna přítomnost eudesmanolidu cichoriolidu (O), přítomného v *C. intybus* a *C. endivia*, guajanolidu cichopumilidu (R), který byl nalezen v *C. pumilum*. K určení struktury byla využita také porovnávací NMR spektra blízce příbuzné látky, eudesmanolidu artesinu (N). Pro zjištění identity magnoliolidu a cichopumilidu byla použita známá spektrální a fyzikální data jejich 11 β ,13-dihydroderivátů (N,P,S), na základě kterých byly porovnávány. Dále byl identifikován sonchusid C (Q), získaný z *Cichorium intybus*.⁴

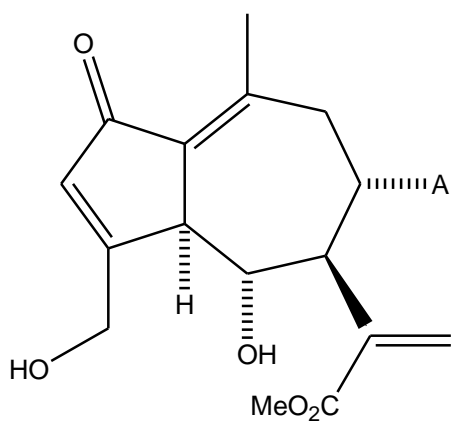
Obr. 2.



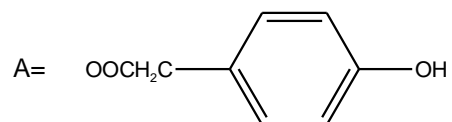
- A** R₁ = H, R₂ = OH
- B** R₁ = H, R₂ = H
- C** R₁ = H, R₂ = A

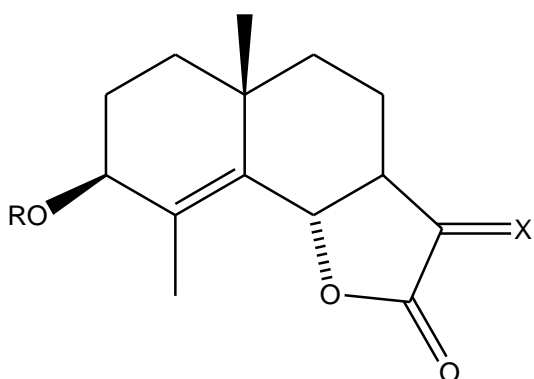
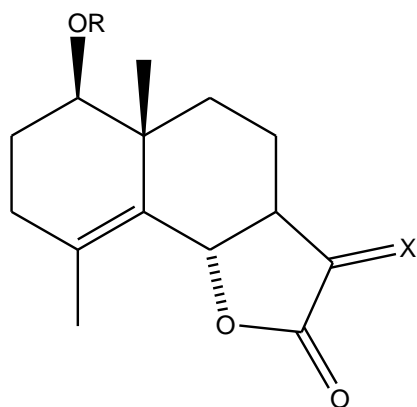
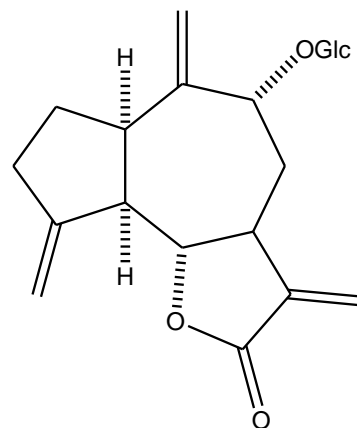
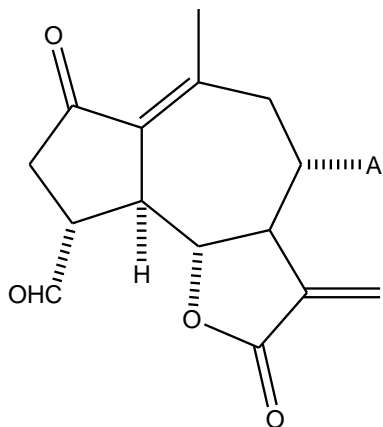


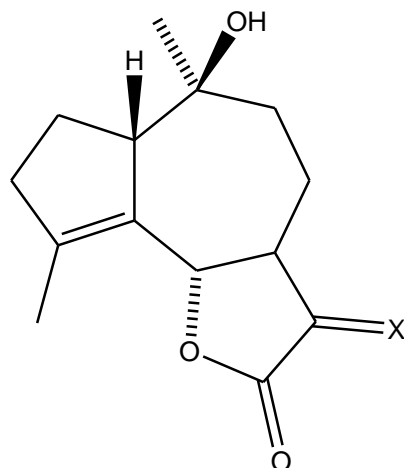
- D** R₁ = H, R₂ = OH
- E** R₁ = H, R₂ = H
- F** R₁ = H, R₂ = A
- G** R₁ = Glc, R₂ = H
- H** R₁ = Glc, R₂ = OH



I



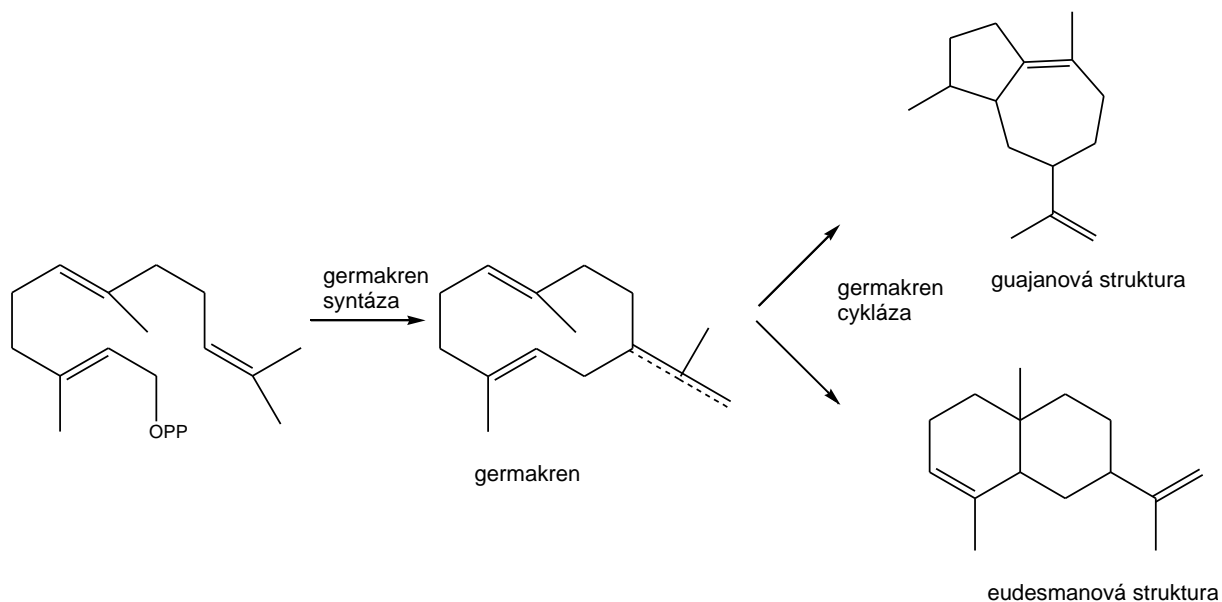




R X = CH₂
S X = H, alfa-Me

Syntéza eudesmanolidů a germakranolidů je katalyzována germakren A syntázou izolovanou z kořenů čekanky a probíhá přes mevalonát-farnesyldifosfát-germakradien. Pomocí této seskviterpenické cyklázy vzniká germakren A. Jeho následná oxidace a/nebo glykosylace za účasti germakren cyklázy dává vznik guajanových nebo eudesmanových typů seskviterpenických laktonů (viz. Obr. 3).⁶

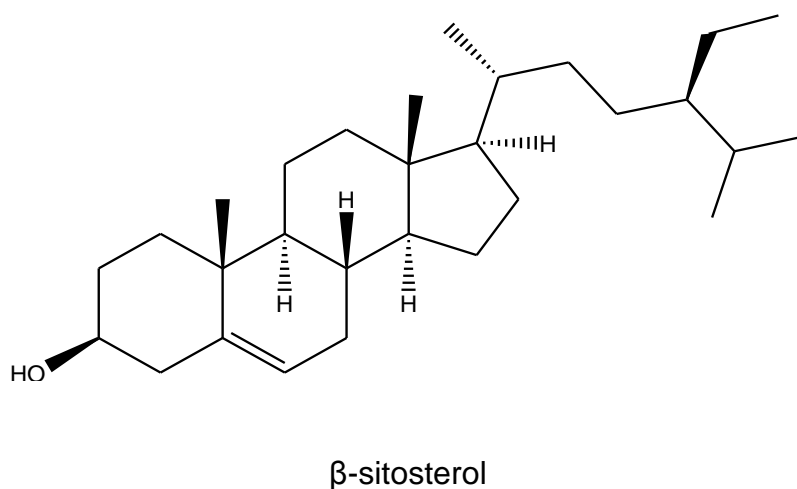
Obr. 3.



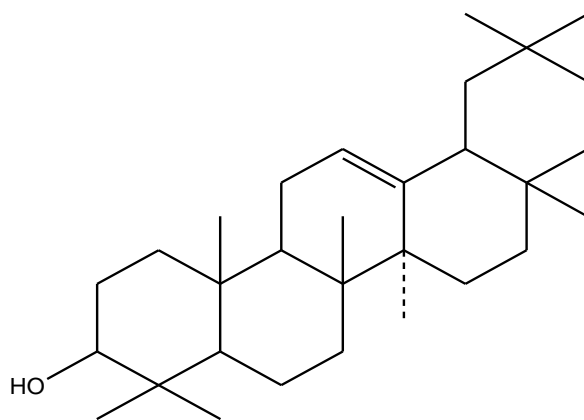
2.2.3. Fytosteroly

Důkaz přítomnosti fytosterolů ve vodném extraktu z plodů *Cichorium intybus* byl založen na výsledcích tenkovrstvé chromatografie. Z původního vodného extraktu byl nejprve získán chloroformový extrakt, který byl dále zpracováván. Při hodnocení byl tento extrakt nanesen na TLC desku spolu se standardy β -amyrinu (viz. Obr. 5.) a β -sitosterolu (viz. Obr. 4.), vzorky obsahujícími chloroformový extrakt v kombinaci s oběma standardy a vzorkem obsahujícím kombinaci obou standardů. Jako mobilní fáze byl použit čistý chloroform, chromatogram byl vyvíjen 3x po sobě. Detekce byla provedena 1% lihovým roztokem vanilinu s 96% kys. sírovou (10 : 1) a následným zahřátím na 100°C. Skvrny byly detekovány pomocí R_f a barvy a byla prokázána přítomnost β -sitosterolu a β -amyrinu (viz. chromatogram 1).⁷

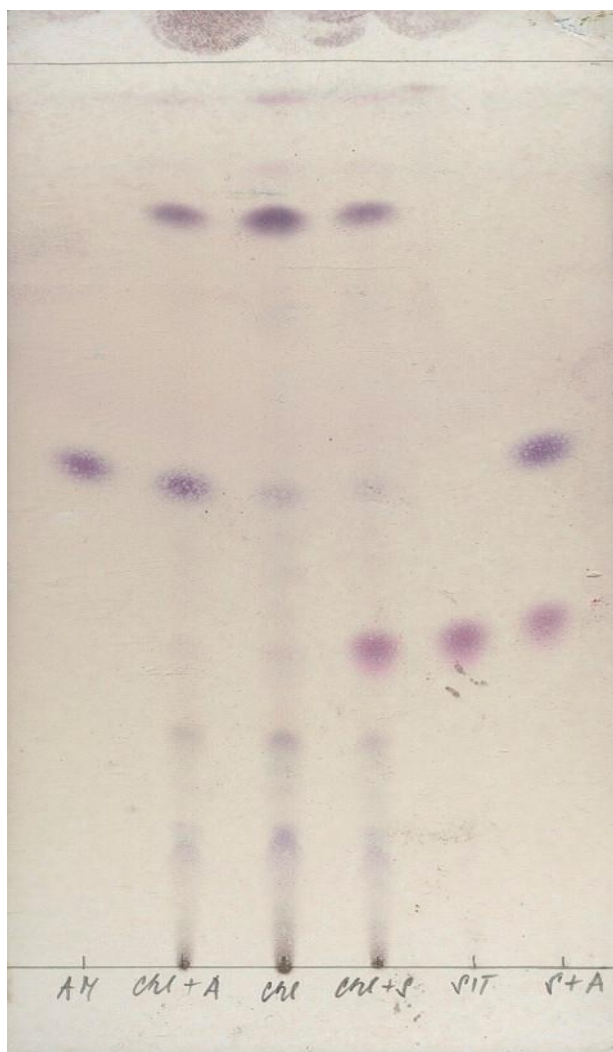
Obr. 4.



Obr. 5.



β -amyrin



CHROMATOGRAM 1

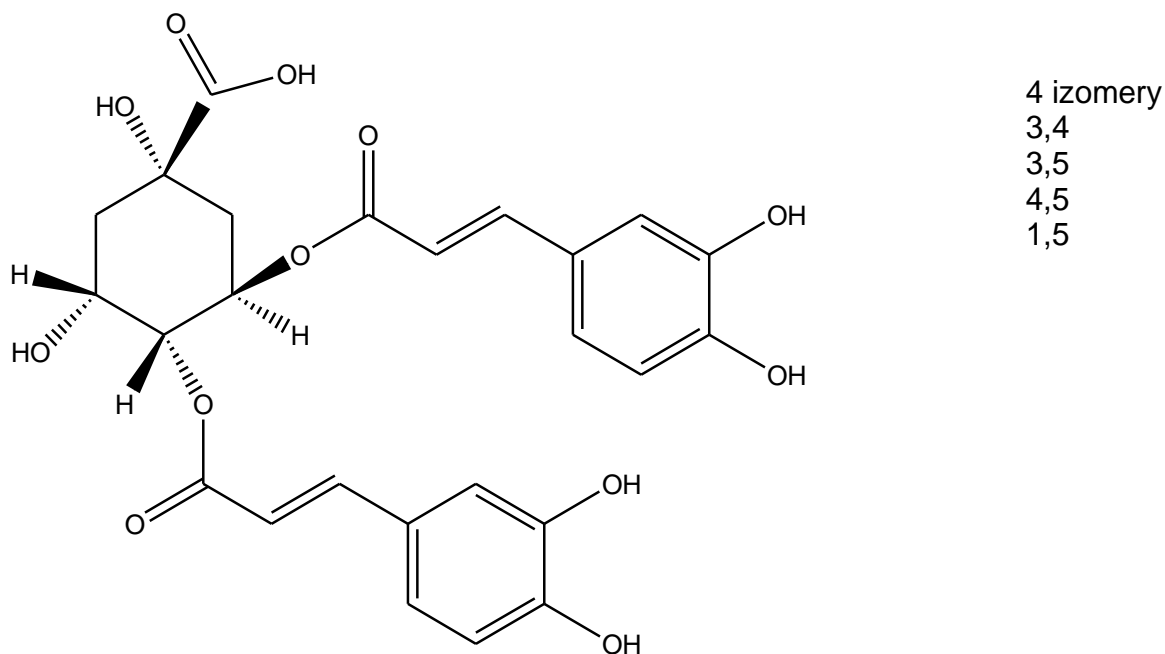
Důkaz fytoosterolů a pentacyklických triterpenů

Mobilní fáze: CHCl_3 (vyvíjeno 3x)
 Stacionární fáze: silikagel Merck bez fluorescenčního indikátoru
 Detekce: vanilin + H_2SO_4 (10 : 1)
 Nanáška: Chl = chloroformový extrakt
 SIT = standard sitosterolu
 AM = standard amyriu
 Chl + A = chloroformový extrakt + standard amyriu
 Chl + S = chloroformový extrakt + standard sitosterolu
 S + A = standard sitosterolu + standard amyriu

2.2.4. Fenolické kyseliny

Ethanolový extrakt získaný extrakcí původního suchého vodného extraktu z plodů *Cichorium intybus* 80% ethanolem byl nejprve rozdělen sloupcovou chromatografií. Jako adsorbent byl použit sephadex LH-20 a elučním činidlem byl 80% ethanol. Získáno bylo 13 frakcí, které byly hodnoceny pomocí tenkovrstvé chromatografie a na základě jejího výsledku byly dále zpracovány. Na základě předpokladu výskytu kyseliny kávové a jejích derivátů byly frakce porovnávány se standardy kyseliny kávové, skořicové, chlorogenové a ferulové. Frakce, která dle výsledků tenkovrstvé chromatografie (viz. chromatogram 2) vykazovala pravděpodobnou přítomnost kyseliny chlorogenové byla dále hodnocena UPLC MS/MS analýzou a byla zjištěna přítomnost 4 izomerů kyseliny isochlorogenové (viz. Obr. 6.).⁷

Obr. 6.





CHROMATOGRAM 2

Důkaz kyseliny chlorogenové

Mobilní fáze: BuOH : CH₃COOH : H₂O (5 : 1 : 4)
Stacionární fáze: silikagel Merck bez fluorescenčního indikátoru
Detekce: K₃[Fe(CN)₆] + FeCl₃ (1 : 1)
Nanáška: K.CHL = standard kyseliny chlorogenové
12 = frakce č.12 ze sephadexové kolony

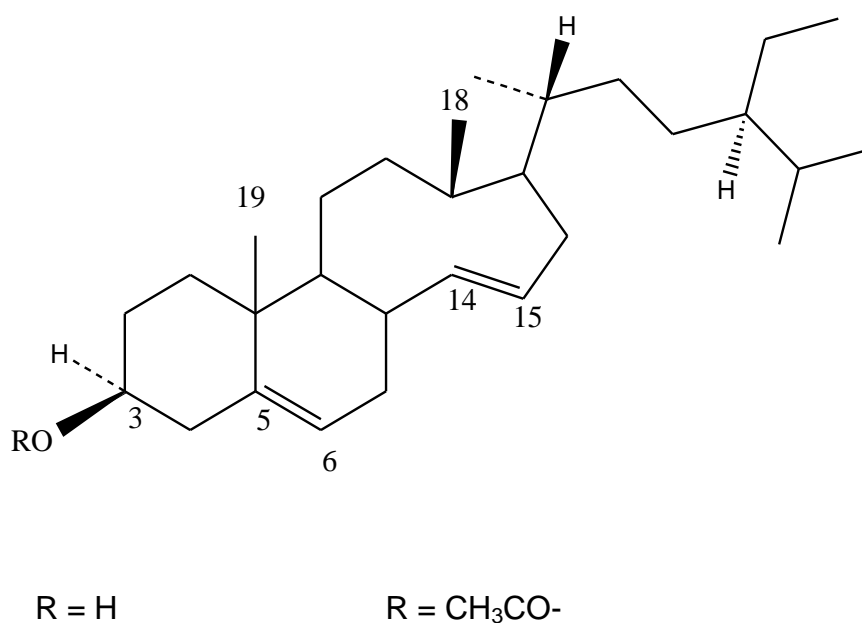
2.2.5. Obsahové látky semen a charakteristika oleje

Ze semen čekanky byl získán surový olej, u kterého byly stanovovány jeho fyzikálně chemické vlastnosti. Index lomu 1,4576 (při 25°C); jodové číslo 124,3; číslo zmýdelnění 191,4; nezmýdelnitelný podíl 5,3% a přítomnost volných mastných kyselin 6,0 (mg KOH/g). Analýzou oleje plynovou chromatografií byla zjištěna přítomnost vysokého podílu linoleové kyseliny (59,8%) a okolo 21% nasycených kyselin. Zbytek hmoty získané ze semen obsahoval 16,9% proteinů s nízkou hodnotou využitelného lysinu (1,37g/16 g N).⁸

Seco-sterol, jehož přítomnost byla prokázána v semenech čekanky obecné, byl pojmenován jako cichosterol. Chemicky se jedná o 13,14-seco-stigma-5(6), 14(15)-dien-3- β -ol. Dále byla zjištěna přítomnost steroidního glykosidu stigma-5(6)-en-3- α -O-(β -D-glukopyranosidu). Obě sloučeniny byly získány z ethyl-acetátové frakce pomocí sloupcové chromatografie. Jejich struktury byly objasněny na základě spektrálních a chemických studií.⁹

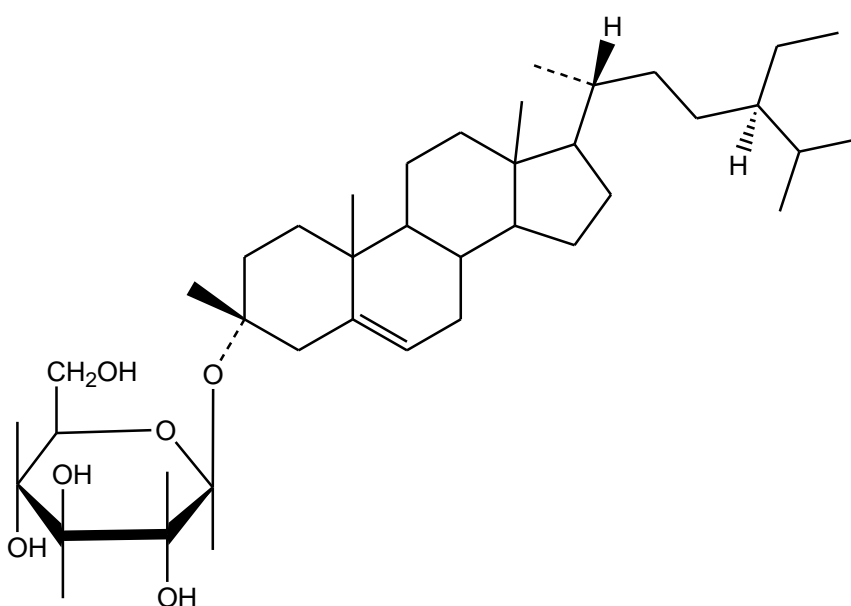
Cichosterol vykazoval pozitivní Liebermann–Burchardův test potvrzující, že se jedná o sterol. Možný je i jeho acetylovaný derivát (viz. Obr. 7.).

Obr. 7.



Druhá sloučenina byla získána v podobě bezbarvých krystalů s teplotou tání 232°C. Vykazuje pozitivní Libermann–Burchardův test na steroidy a Molischův test na přítomnost glykosidů. Neredukuje Fehlingův roztok a tím je potvrzeno, že se jedná o steroidní glykosid. Hydrolyzou 10% HCl byl získán aglykon. Poměr získaného aglykonu ke glykosidu byl stanoven okolo 60%, což prokazuje pouze jeden cukr v molekule. Tento cukr byl stanoven papírovou chromatografií jako glukóza (viz. Obr. 8.).⁹

Obr. 8.



Ze semen čekanky obecné byl izolován nový seskviterpenický glykosid cichotybosid. Jde o 2- α -6- β -7- β -15-tetrahydroxy-1(10),4(5)-dien-guajan-9- α -12-olid-7-O- β -caffoyl-15-O- β -D-glukosid. Vykazuje značnou antihepatotoxickou aktivitu při působení chloroformu na hepatocyty.¹⁰

2.3. Biologická aktivita obsahových látek *Cichorium intybus*

2.3.1. Inhibiční efekt na acetylcholinesterázu

Inhibitory acetylcholinesterázy jsou používány k udržení hladiny acetylcholinu při cholinergním deficitu, příznacích demence a Alzheimerově chorobě. Byla provedena studie zaměřená na nealkaloidní inhibitory acetylcholinesterázy získané z přírodních zdrojů za účelem objevení nových aktivních struktur.¹¹ V této studii byly *in vitro* testovány i dichlormethanový a methanolový extrakt z kořenů *Cichorium intybus*. Pro stanovení inhibiční aktivity byl použit enzymový test s Ellmanovým činidlem. Kořeny byly sbírány na různých územích a byl použit rostlinný materiál sušený na vzduchu. Následně byly kořeny rozdrčeny a za laboratorní teploty extrahovány s 10 ml dichlormethanu v ultrazvukové lázni po dobu 20ti minut. Dichlormethanový extrakt byl zahuštěn na vakuové odparce a zbylý rostlinný materiál byl extrahován methanolem za stejných podmínek. Dichlormethanový extrakt z kořenů čekanky vykázal signifikantní inhibiční efekt na acetylcholinesterázu. Při koncentraci 1 mg extraktu/ml byla naměřena 70% inhibice. Podkladem pro stanovení inhibiční aktivity byl počítačem vytvořený model, který využíval znalostí struktury sekundárních metabolitů *Cichorium intybus* získaných z literatury. Byly zjišťovány virtuální interakce s tímto modelem a zjištěna byla možná interakce s některými nízkomolekulárními seskviterpenoidy. Pro ověření této počítačové hypotézy byly použity frakce z extraktu kořene *Cichorium intybus* a došlo k izolaci dvou seskviterpenických laktonů, 8-deoxylaktucinu a laktukopikrinu, které jsou zodpovědné za inhibici acetylcholinesterázy.¹¹

2.3.2. Antihepatotoxická aktivita

Při testování antihepatotoxické aktivity byla použita semena *Cichorium intybus*,¹² která byla předem rozdrčena a upráškována a následně z nich byly připraveny čtyři extrakty, petroletherový, ethyl-acetátový, methanolový a ethanolový. Tyto extrakty byly dále podrobeny analýze. Petroletherový extrakt byl nevyhovující

kvůli svému chemickému složení. Z ethyl-acetátového extraktu byl získán nový steroid pojmenovaný cichosterol. Z methanolového extraktu byla pomocí sloupcové chromatografie získána sloučenina AB-IV, která vykazovala pozitivní test na fenoly. Všechny získané extrakty i izolované sloučeniny byly filtrovány a jejich čistota byla stanovena pomocí TLC a HPLC. Testování antihepatotoxické aktivity probíhalo na bílých krysách, které byly rozděleny do 8 skupin. V každé skupině bylo 6 krys. První skupina byla kontrolní, nebyla intoxikována. Druhá skupina byla kontrolní, intoxikována CCl₄. Třetí skupině byl podáván silymarin v dávce 70 mg/kg hmotnosti a zbylým skupinám byly podány jednotlivé extrakty a zároveň byly intoxikovány CCl₄. Po 24 hodinách byla myším odebrána krev a játra byla podrobena histopatologické studii. Stupeň ochrany jater byl měřen s využitím biochemických parametrů jako vliv na aspartát transaminázu, alanin transaminázu, alkalin fosfatázu a celkový protein. Po intoxikaci CCl₄ došlo k otoku a nekróze hepatocytů. Různé extrakty ze semen *Cichorium intybus* vykazovaly různě velký stupeň antihepatotoxické aktivity. Nejlepší stupeň ochrany vykazovala methanolový extrakt a sloučenina AB-IV, jejichž účinek byl srovnatelný s účinkem silymarinu. Histopatologická studie prokázala, že došlo ke kompletní normalizaci tkáně a nebyly pozorovány žádné nekrózy.¹²

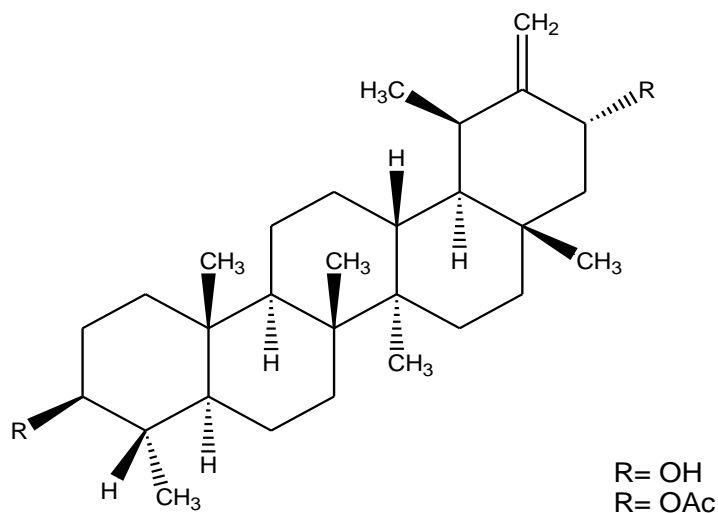
2.3.3. Inhibiční efekt na α -glukosidázu

Z methanolového extraktu semen *Cichorium intybus* byly získány dva nové triterpenoidy 18 α ,19 β -20(30)-taraxasten-3 β ,21 α -diol (cichoridiol) a 17-epi-metyl-6-hydroxyangolensat (intybusoloid). Kromě toho byly získány také další obsahové látky jako lupeol, friedelin, β -sitosterol, stigmasterol, betulinová kyselina, betulin, betulinaldehyd, syringová kyselina, vanilová kyselina, 6,7-dihydroxykumarin a metyl- α -D-galaktopyranosid, které byly popsány již dříve. U všech jmenovaných látek byla testována inhibiční aktivita na α -glukosidázu. Jedná se o enzym, který štěpí disacharidy a polysacharidy obsahující glukosu. Inhibitory tohoto enzymu snižují hladinu postprandiální glykémie. Glukosidázy ovlivňují i další biologické procesy, například biosyntézu glykoproteinů a katabolismus glykokonjugátů probíhající v lyzozómech.¹³

Inhibiční efekt na α -glukosidázu byl zjištěn u cichoridiolu (IC = 59 μ M) a kyseliny vanilové (IC = 69 \pm 0,008 μ M). Největší inhibiční efekt ale vykazoval derivát

cichoridiolu obsahující dvě acetylové skupiny (viz. Obr. 9.). Možné je využití inhibitorů glukosidáz také jako antivirotik nebo imunomodulačních látek.¹³

Obr. 9.



2.3.4. Anti- a pro-oxidační aktivita

Byla zjišťována anti- a pro-oxidační aktivita ve vodě rozpustných komponent čekanky obecné var. silvestre.¹⁴ Rostlinná šťáva byla získána centrifugací z rostlin a upravena při 2°C a 102°C. Dále byla zkoušena také šťáva, která byla získaná stejným způsobem a dále byla skladovaná při 25°C po dobu tří hodin. Antioxidační aktivita byla testována in vitro s využitím modelového systému β -karoten-linoleová kyselina a ex vivo na lipidy v membránách hepatocytů, které byly poškozeny CCl₄. Během reakce došlo ke vzrůstu antioxidační aktivity tak, že na konci sledované doby byl poměr degradace β -karotenu snížen o více než 80% u neuvařené šťávy a o 94% u uvařené. Po zhodnocení výsledků nebyl výrazný rozdíl mezi antioxidační aktivitou naměřenou u šťávy získané při 2 a 25°C, zatímco byl výrazný rozdíl mezi uvařenou a neuvařenou šťávou, kdy uvařená vykazovala vyšší antioxidační aktivitu. Protektivní aktivita byla zjištěna u šťávy filtrované při 2°C, ale získané hodnoty byly velmi odlišné. Vyšší protektivní aktivitu s menšími odchylkami vykazovala šťáva skladovaná při 25°C. Nejmenší protektivní aktivitu vykazovala uvařená šťáva.

Prooxidační komponenty, kterými mohou být také enzymy, vykazují teplotní nestabilitu, a proto byl jejich největší obsah zjištěn u neuvařené šťávy. *Cichorium intybus* tedy obsahuje komponenty s antioxidační i prooxidační aktivitou, které mohou hrát významnou roli v řadě chemických a biologických systémů. Prooxidační sloučeniny, které byly zkoušeny v biologických systémech, mají nízkou molekulovou hmotnost (<3000) a jsou rozpustné v kyselých rozpouštědlech. Sloučeniny vykazující antioxidační aktivitu mají molekulovou hmotnost vyšší než 25000 a jsou v kyselých rozpouštědlech nerozpustné. Nejvíce antioxidačně aktivní jsou sloučeniny s molekulovou hmotností větší než 300000.¹⁴

2.3.5. Antifugální aktivita

Testován byl extrakt získaný z kořenů *Cichorium intybus* a byla zjišťována jeho potenciální biologická aktivita na některé druhy hub parazitujících na rostlinách (fytopatogeny), na zvířatech, na lidech (zoofilní nebo antropofilní dermatophyty), nebo žijících v půdě. Extrakt neprokázal vliv na geofilní druhy a fytopatogeny, kromě *Pythium ultimum*, ale inhibice byla prokázána na růst zoofilních a antropofilních dermatofytů, zejména *Trichophyton tonsurans* var. *sulfureum*. Předpokladem pro inhibiční aktivitu je přítomnost seskviterpenických laktonů 8-deoxylaktucinu a 11 β , 13-dihydrolaktucinu.¹⁵

2.3.6. Antibakteriální aktivita

Z kořenů čekanky byly připraveny jak polární, tak nepolární extrakty, u kterých byla hodnocena jejich antibakteriální aktivita proti gram pozitivním (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus*) a gram negativním (*Escherichia coli* a *Salmonella typhi*) patogenním bakteriím.³ Jako rozpouštědlo byl použit petrolether, chloroform, hexan, ethyl-acetát a voda. Pro testování byly použity jednotlivé extrakty, kdy každý obsahoval dané rozpouštědlo a rozsah inhibice byl měřen velikostí nárůstu inhibiční zóny při použití 50 a 100 μ l extraktů. Výsledkem byla zjištěná inhibiční aktivita všech pěti extraktů na gram pozitivní (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus*) a gram negativní (*Escherichia coli* a *Salmonella typhi*) bakterie. Hexanový extrakt prokázal inhibiční vliv již při použití 50 μ l extraktu na

všechny testované organismy. Největší inhibiční efekt měl na *S. aureus*, *B. subtilis* a *E. coli*. Menší inhibiční vliv vykazoval tento extrakt na růst *M. luteus* a *S. typhi*. Při koncentraci v 50 μ l extraktu byla prokázána také inhibice ethyl-acetátového extraktu na *B. subtilis*. Ostatní extrakty vykazovaly inhibiční aktivitu na nárůst bakterií až při koncentraci obsažené ve 100 μ l extraktu. Nejvyšší inhibiční efekt byl zjištěn u hexanového extraktu na *B. subtilis*, kde velikost inhibiční zóny byla $18,2 \pm 0,47$, což je více, než inhibiční zóna chloramfenikolu, který byl použit jako standard. Rovněž byl zjištěn větší inhibiční vliv toho extraktu na růst *S. aureus* v porovnání s chloramfenikolem. Ostatní extrakty vykazovaly nižší aktivitu než chloramfenikol.³

Dále byla testována antibakteriální aktivita vodného, ethanolového a ethyl-acetátového extraktu *Cichorium intybus* na *Agrobacterium radiobacter*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas aeruginosa*, přičemž nejvýraznější antimikrobiální aktivitu vykazoval ethyl-acetátový extrakt.¹⁶

2.3.7. Antidiabetická aktivita

U krys starých 9 týdnů byl vyvolán diabetes použitím streptozotocinu. Byl sledován hypoglykemický efekt ethanolického extraktu čekanky obecné při perorálním glukózotolerančním testu. Každodenní podávání tohoto extraktu krysám s diabetem po dobu 14 dní snížilo hodnotu glukózy o 20%, hodnotu triglyceridů o 91% a celkový cholesterol o 16%. Koncentrace inzulínu v séru nebyly změněny, což vylučuje možnost, že extrakt z čekanky indukuje inzulínovou sekreci z pankreatických B-buněk. Aktivita jaterní glukóza-6-fosfatázy byla snížena po podání extraktu z čekanky v porovnání s kontrolní skupinou. Snížená aktivita glukóza-6-fosfatázy může snížit produkci glukózy játry.¹⁷

2.3.8. Antimalarická aktivita

Obsahové látky čekanky obecné byly testovány i na antimalarickou aktivitu. *In vitro* byla zjištěna antimalarická aktivita proti kmenu *Plazmodium falciparum*, který byl chlorochin senzitivní a pyrimetamin rezistentní. Za tuto aktivitu jsou zodpovědné seskviterpenické laktony laktucin a laktukopikrin, získané z vodného extraktu kořenů čekanky.¹⁸

2.3.9. Analgetická a sedativní aktivita

Laktucin a jeho deriváty laktukopikrin a 11 β -13-dehydrolaktucin získané z *Lactuca virosa* a *Cichorium intybus* byly testovány na myších na analgetickou a sedativní aktivitu. Jako standard byl použit ibuprofen. Analgetická aktivita sloučenin v dávce 30 mg/kg byla srovnatelná s ibuprofenem 60 mg/kg. Laktukopikrin vykazoval nejvyšší analgetickou aktivitu. U laktucinu a laktukopikrinu byl pozorován také sedativní efekt. Použit byl ethanolický extrakt z listů a kořenů *Cichorium intybus*.¹⁹

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Charakteristika zpracovávaného materiálu

Pro testování byly použity tři různé vzorky. Zpracováván byl suchý vodný extrakt plodů *Cichorium intybus*, který pochází z Indie a je připraven v poměru 10:1 (droga : extrakt). Dále byly použity sušené kořeny *Cichorium intybus* sbírané v říjnu 2008 na Zahradě léčivých rostlin Faf UK v Hradci Králové a frakce obsahující fenolické kyseliny, která byla získána při sloupcové chromatografii ethanolového extraktu, připraveného z původního vodného extraktu plodů *Cichorium intybus* a analyzována a identifikována v mé diplomové práci.⁷

3.2. Chemikálie, chromatografický materiál, přístroje

3.2.1. Chemikálie

chloroform p.a., Penta

ethanol 96%

dichlormethan p.a., Penta

methylalkohol p.a., Penta

n-butylalkohol p.a., Lach-Ner s.r.o.

kys. octová 99,8%, Lach-Ner s.r.o.

kys. sírová 96%, Lachema a.s.

vanilin, Fluka Chemika

chlorid železitý bezvodý č., Lachema a.s.

hexakynoželezitan draselný č., Lachema s.p.

benzen, Lachema a.s.

3.2.2. Chromatografický materiál

stacionární fáze :

silikagel 60F₂₅₄, Merck

mobilní fáze :

chloroform p.a.

chloroform : methanol (různé poměry)

butanol : kys. octová : voda (5 : 1 : 4)

chloroform : methanol : benzen (8 : 1,5 : 0,5)

3.2.3. Přístroje

rotační vakuová odparka Büchi R114

UV lampa pro vlnové délky 254 a 366 nm Camag

elektrický mixér

spektrofotometr Shimadzu UV-1601, UV Probe software

přístroj SIA (systém PC kontrolované sekvenční injekční analýzy)

HPLC - Philips PU4100

detektor : Philips PU4100 UV/VIS

3.3. Standardy, detekční činidla

3.3.1. Standardy

sitosterol*

eupatoriopikrin*

trilobolid*

laserolid*

arnikolid*

onopordopikrin*

grosheimin*

kys. chlorogenová, Fluka AG

*látky izolované a identifikované na katedře botaniky z rostlin z čeledi *Asteraceae*

3.3.2. Detekční činidla

1% ethanolický roztok vanilinu + kys. sírová 96% (10 : 1)

1% roztok chloridu železitého v 50% ethanolu + 3% roztok hexakynoželezitanu draselného v 96% ethanolu (1 : 1)

3.4. Příprava extraktů

3.4.1. Příprava ethanolového extraktu

Bylo použito 41g sušeného kořene *Cichorium intybus*. Usušené kořeny byly nejprve mechanicky rozdrceny a následně smíseny se 400 ml 95% ethanolu a 10 minut míchány na elektrickém mixéru. Nerozpuštěná část byla zfiltrována a extrakt byl následně odpařen do sucha na vakuové odparce.

3.4.2. Příprava vodného extraktu

Vodný extrakt byl připraven stejným způsobem a pro přípravu bylo použito stejné množství drogy, jako při přípravě ethanolového extraktu. Před odpařením na vakuové odparce byl vodný extrakt zředěn 95% ethanolem v poměru 1 : 1.

3.4.3. Příprava dichlormethanového extraktu

Byla odebrána část ethanolového extraktu po odpaření rozpouštědla, která byla následně smísená s dichlormethanem přibližně v poměru 1:10. Extrakt byl také odpařen do sucha na vakuové odparce.

3.4.4. Příprava frakce obsahující fenolické kyseliny

Frakce byla připravena z původního suchého extraktu ze semen *Cichorium intybus*.⁷ 100g tohoto extraktu bylo nejprve smíseno s 500 ml chloroformu a poté mícháno 1 hodinu na elektrickém rolleru. Nerozpuštěná část extraktu byla zfiltrována a vysušena a po usušení byla smíchána s 500 ml 80% ethanolu a opět hodinu míchána na elektrickém rolleru. Takto byl získán ethanolový extrakt, který byl dále zpracováván. Byl podroben sloupcové chromatografii, kde byl jako adsorbent použit sephadex LH-20 a elučním činidlem byl 80% ethanol. Byla připravena kolona o výšce cca 30 cm, na kterou bylo použito 30g sephadexu LH-20 a dostatečné množství ethanolu. Na dělicí vrstvu byl nanesen ethanolový extrakt a byly jímány frakce.

Celkem bylo získáno 13 frakcí po 10 ml. Ty byly na základě provedené tenkovrstvé chromatografie spojeny do sedmi frakcí. Tyto frakce byly i dále hodnoceny pomocí tenkovrstvé chromatografie. Frakce 11 a 12 byly hodnoceny na přítomnost fenolických kyselin. Byla použita soustava BuOH : CH₃COOH : H₂O (5 : 1 : 4) a jako standard byla použita kys. kávová, skořicová, chlorogenová a ferulová. K detekci byl použit K₃[Fe(CN)₆] a FeCl₃ (1 : 1). Na základě zbarvení skvrn byla zjištěna pravděpodobná přítomnost kyseliny chlorogenové ve frakci 12. Byl proveden ještě kontrolní chromatogram s nanáškami frakce č. 12 a standardem kyseliny chlorogenové. Použita byla tatáž soustava a detekce byla provedena stejným způsobem. Na základě výsledku z tenkovrstvé chromatografie byl vzorek odeslán na UPLC MS/MS analýzu na katedru analytické chemie. Ve vzorku byla prokázána přítomnost 4 izomerů kyseliny isochlorogenové.⁷

Posledním vzorkem, který byl podroben testům na biologickou aktivitu byl původní suchý extrakt z plodů *Cichorium intybus*.

3.5. Chromatografické hodnocení zkoušených extraktů

3.5.1. Hodnocení extraktů pomocí TLC

Pro hodnocení připravených extraktů byla použita chromatografie na tenké vrstvě. Byl použit silikagel s fluorescenčním indikátorem. Nejprve bylo nutné najít vhodnou vyvíjecí soustavu. Jako první byla použita mobilní soustava chloroform : methanol (8 : 2). Na desku byl nanesen standard sitosterolu, který byl připraven jako 1% roztok v chloroformu, dále 1% roztok standardu kyseliny chlorogenové v 50% ethanolu, ethanolový a vodný extrakt z kořene čekanky, chloroformový extrakt připravený ze suchého extraktu semen *Cichorium intybus* v poměru 1 : 10 a ethanolový extrakt ze semen *Cichorium intybus* připravený stejným způsobem, kde jako rozpoštědlo byl použit 50% ethanol. Detekce byla provedena nejprve pod UV lampou při vlnových délkách 254 a 366 nm a následně postřikem 1% lihovým roztokem vanilinu s kyselinou sírovou 96% (10 : 1) a zahřátím na 100°C. Tato soustava neposkytla vhodné výsledky, a proto bylo provedeno další hodnocení, které probíhalo stejným způsobem, ale použita byla soustava BuOH : CH₃COOH : H₂O (5 : 1 : 4). Detekce probíhala také stejným způsobem, ale ani v této soustavě nebyly získány vhodné výsledky.

Dále byl hodnocen pomocí tenkovrstvé chromatografie dichlormethanový extrakt, který byl získán z ethanolového extraktu z kořenů *Cichorium intybus*. Naneseny byly tři různé koncentrace dichlormethanového extraktu. Vyvíjecí soustavou byl v tomto případě čistý chloroform a detekce byla provedena nejprve pod UV a pak postřikem 1% lihovým roztokem vanilinu s kyselinou sírovou 96% (10 : 1) a následným zahřátím na 100°C. Po zahřátí byly patrné fialové skvrny, ale ani tento chromatogram neposkytl požadované výsledky.

Při dalším chromatografickém hodnocení byl použit standard laktonu grosheiminu, standard sitosterolu, dichlormethanový extrakt z kořenů *Cichorium intybus* a ethanolový extrakt z kořenů *Cichorium intybus*. Jako vyvíjecí soustava byl použit čistý chloroform a vyvíjení probíhalo 3x po sobě. Detekce probíhala pod UV a následně postřikem 1% lihovým roztokem vanilinu s roztokem 6 molární kyseliny sírové v poměru 1 : 1 v 50% ethanolu (1 : 5) a zahřátím v peci na 100°C. Vzniklé

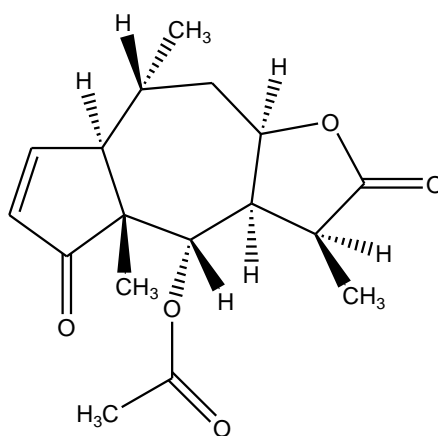
skvrny byly charakterizovány retenčním faktorem R_f a barvou a byly vzájemně porovnány (viz. chromatogram 3).

Tato chromatografie byla provedena ještě jednou stejným způsobem, ale jako vyvíjecí soustava byl použit chloroform : methanol (97 : 3). Hodnocení probíhalo identicky, jako v předchozím případě.

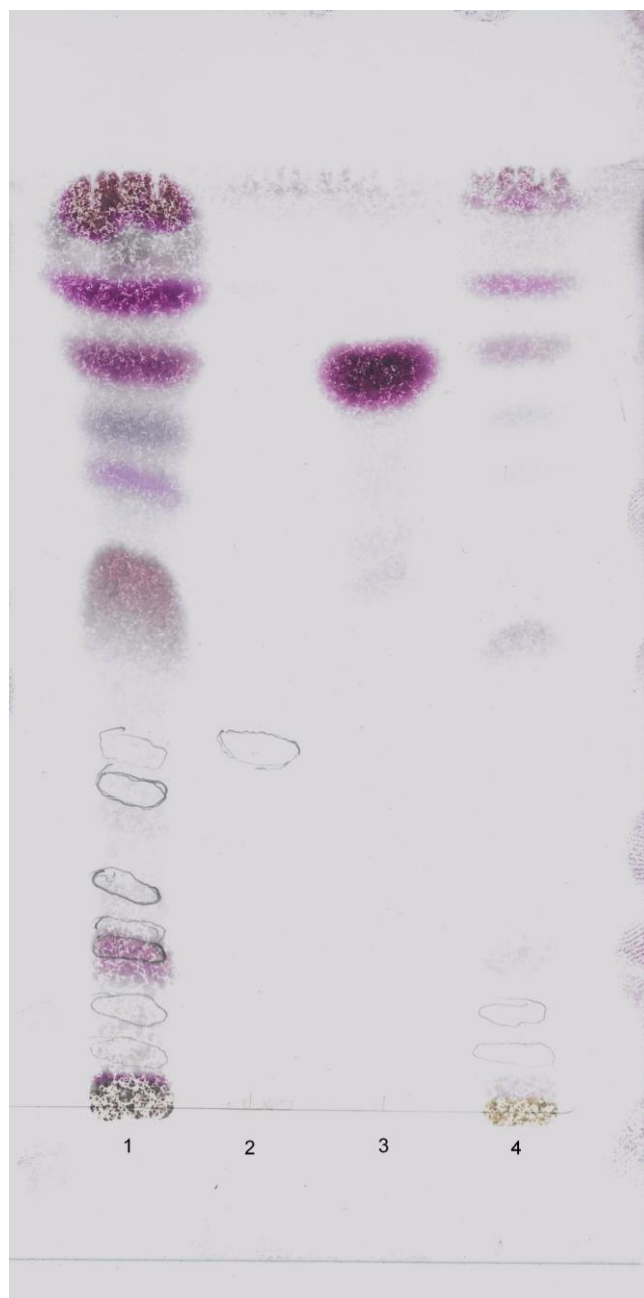
Při dalším hodnocení byly použity standardy laktonů trilobolidu a arnikolidu, ethanolový extrakt a dichlormethanový extrakt z kořenů. Použita byla soustava BuOH : CH₃COOH : H₂O (95 : 5 : 8) a detekce byla provedena nejprve pod UV a poté postříkem 1% lihovým roztokem vanilinu s kyselinou sírovou 96% (10 : 1) a zahřátím na 100°C. Na základě výsledků získaných při této chromatografii byl dichlormethanový extrakt dále testován na přítomnost arnikolidu (viz. Obr.12.) pomocí HPLC (viz. chromatogram 4)

Dále byla provedena chromatografie, při které byly použity standardy laktonů eupatoriopikrinu, trilobolidu, laserolidu, arnikolidu, onopordopikrinu a grosheiminu. Dále byl nanesen dichlormethanový extrakt, vodný extrakt a ethanolový extrakt z kořenů *Cichorium intybus* a ethanolový extrakt připravený z plodů *Cichorium intybus*. Použita byla soustava chloroform : methanol : benzen (8 : 1,5 : 0,5). Detekce probíhala stejně jako v předchozím případě. Skvrny byly porovnány pomocí R_f a barvy, ale nebyla prokázána přítomnost těchto laktonů.

Obr. 10.



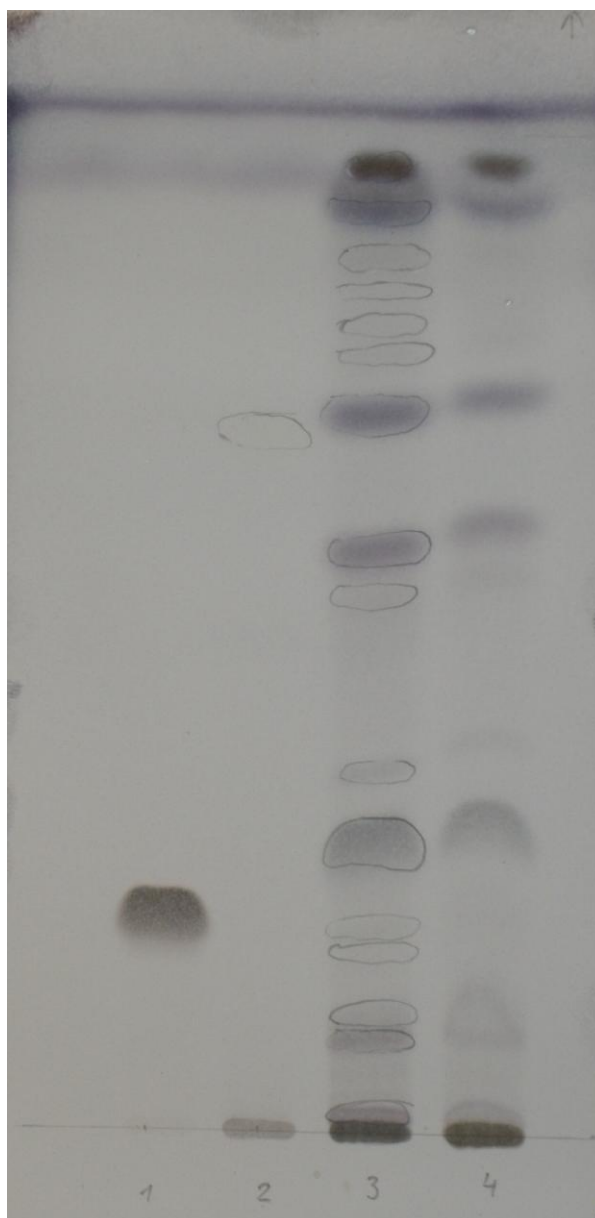
arnikolid



CHROMATOGRAM 3

Důkaz sitosterolu

- Mobilní fáze : CHCl_3 (vyvíjeno 3x)
Stacionární fáze : silikagel 60F₂₅₄, Merck
Detekce : vanilin + H_2SO_4 (10 : 1)
Nanáška :
1. dichlormethanový extrakt
2. standard grosheiminu
3. standard sitosterolu
4. ethanolový extrakt



CHROMATOGRAM 4

Důkaz trilobolidu a arnikolidu

Mobilní fáze : BuOH : CH₃COOH : H₂O (95 : 5 : 8)

Stacionární fáze : silikagel 60F₂₅₄, Merck

Detekce : UV, vanilin + H₂SO₄ (10 : 1)

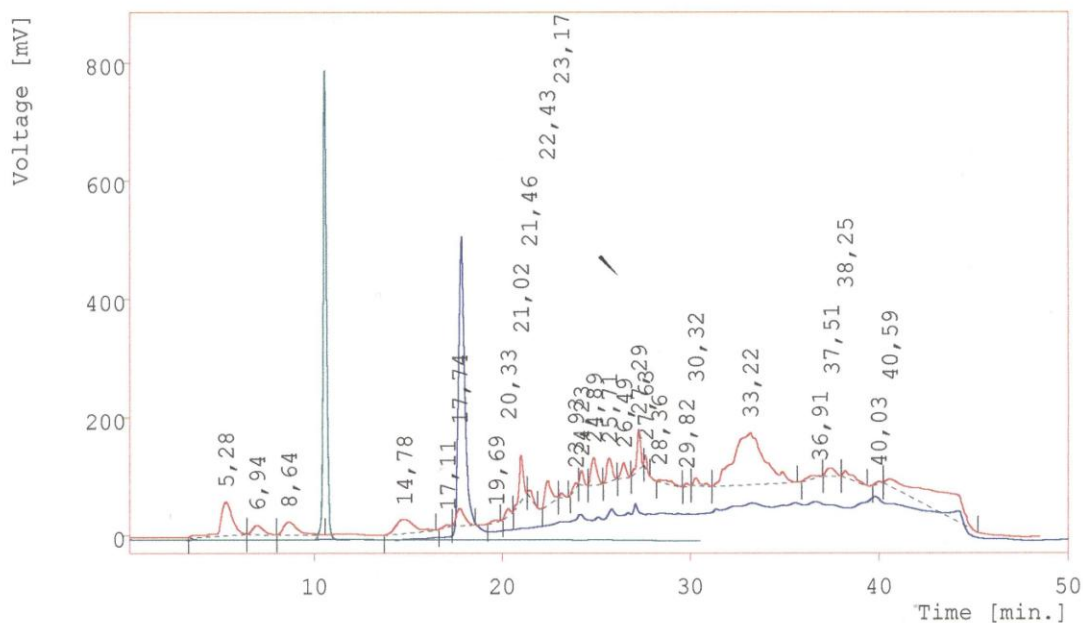
Nanášky :
1. trilobolid
2. arnikolid
3. dichlormethanový extrakt
4. ethanolový extrakt

3.5.2. HPLC analýza dichlormethanového extraktu

Přístroj: Philips PU4100
Detektor: Philips PU4100 UV/VIS
Kolona: Merck, Purospher Star, RP18e, 5 μ m, 250x4mm
Vlnová délka: 237nm
Průtok: 1,0ml/min
Fáze: 0-15 min 65% MeOH isokraticky
15-20 min 65% MeOH - 100%MeOH
20-50 min 100% MeOH isokraticky
Nástřik: 20 μ l

Popis chromatogramů Obr. 13 : červená křivka = dichlormethanová frakce
modrá křivka = standard trilobolidu a arnikolidu
Obr. 14 : modrá křivka = standard arnikolidu

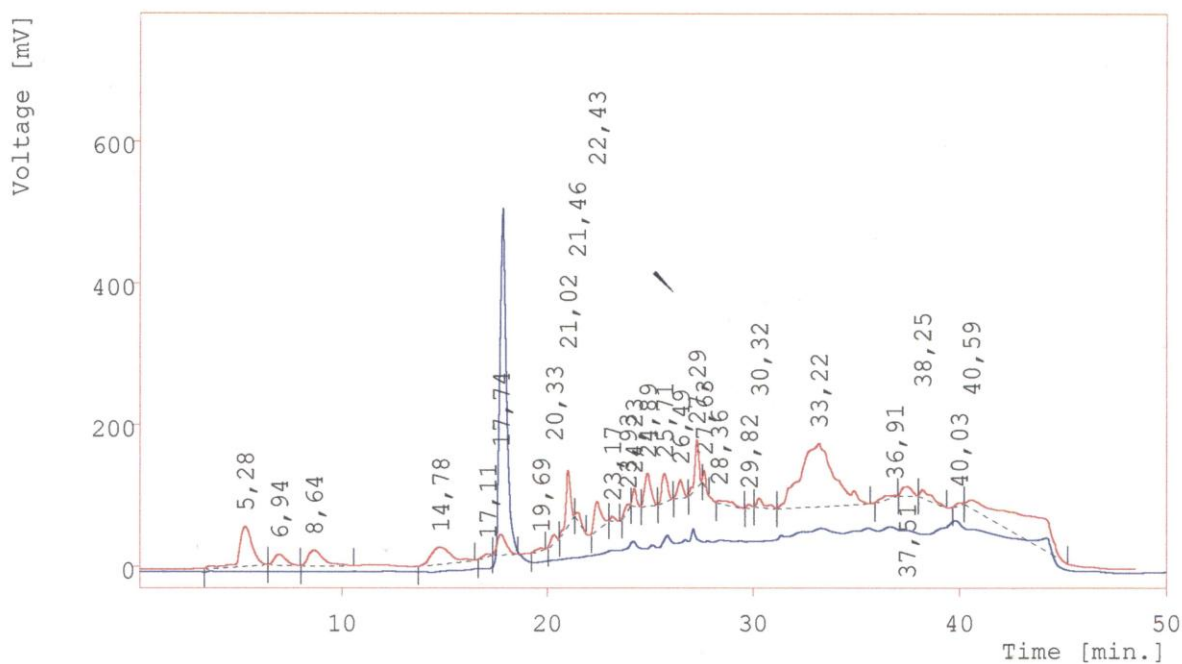
Obr. 11. HPLC chromatogram



Result Table - Calculation Method Uncal

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Height [mV]	W05 [min.]	Area [%]	Height [%]
1	5,280	2426,9581	56,508	0,627	7,744	8,397
2	6,940	573,4288	14,738	0,620	1,830	2,190
3	8,640	1091,3889	21,624	0,747	3,483	3,214
4	14,780	1541,6118	23,299	1,047	4,919	3,462
5	17,113	67,3045	2,692	0,333	0,215	0,400
6	17,740	858,5255	28,359	0,487	2,740	4,214
7	19,693	72,8981	2,778	0,340	0,233	0,413
8	20,333	186,4053	10,808	0,320	0,595	1,606
9	21,020	1091,3401	76,389	0,240	3,482	11,352
10	21,460	250,7381	11,588	0,320	0,800	1,722
11	22,427	852,9775	39,677	0,393	2,722	5,896
12	23,167	97,0001	6,380	0,247	0,310	0,948
13	23,933	111,5856	7,064	0,193	0,356	1,050
14	24,233	312,5143	23,900	0,220	0,997	3,552
15	24,887	959,8770	45,866	0,347	3,063	6,816
16	25,713	765,8297	39,858	0,333	2,444	5,923
17	26,493	458,0779	25,106	0,293	1,462	3,731
18	27,293	830,0259	65,983	0,193	2,649	9,805
19	27,633	220,2425	22,067	0,160	0,703	3,279
20	28,360	243,9184	3,564	0,540	0,778	0,530
21	29,820	53,0177	4,193	0,233	0,169	0,623
22	30,320	298,9255	12,292	0,267	0,954	1,827
23	33,220	10022,5774	88,241	1,533	31,982	13,113
24	36,907	188,3171	1,625	0,227	0,601	0,242
25	37,513	435,0265	12,663	0,580	1,388	1,882
26	38,247	430,0293	11,462	0,333	1,372	1,703
27	40,027	50,2061	2,703	0,313	0,160	0,402
28	40,593	6847,8602	11,491	0,807	21,849	1,708
-	Total	31338,6080	672,921			

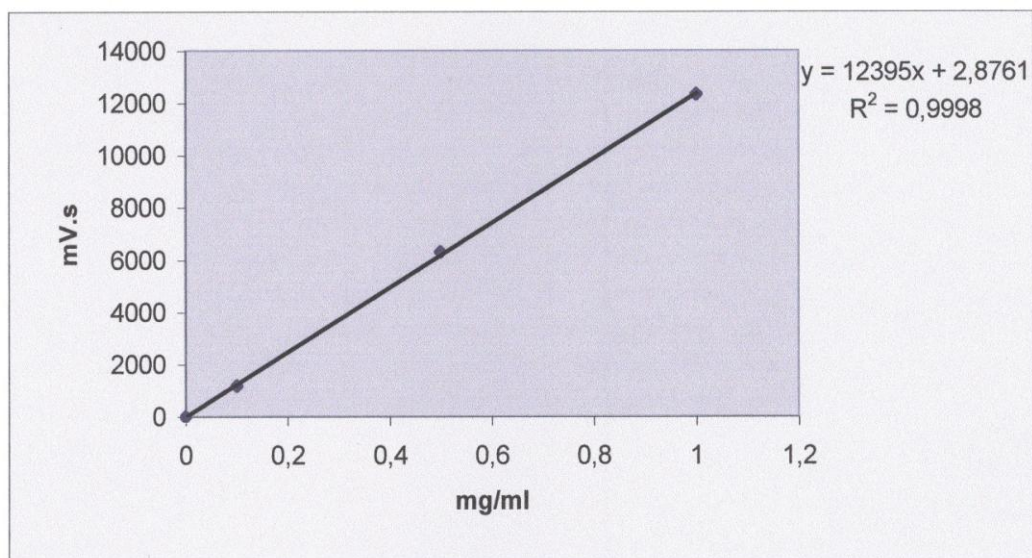
Obr. 12.



Result Table - Calculation Method Uncal

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Height [mV]	W05 [min.]	Area [%]	Height [%]
1	5,280	2426,9581	56,508	0,627	7,744	8,397
2	6,940	573,4288	14,738	0,620	1,830	2,190
3	8,640	1091,3889	21,624	0,747	3,483	3,214
4	14,780	1541,6118	23,299	1,047	4,919	3,462
5	17,113	67,3045	2,692	0,333	0,215	0,400
6	17,740	858,5255	28,359	0,487	2,740	4,214
7	19,693	72,8981	2,778	0,340	0,233	0,413
8	20,333	186,4053	10,808	0,320	0,595	1,606
9	21,020	1091,3401	76,389	0,240	3,482	11,352
10	21,460	250,7381	11,588	0,320	0,800	1,722
11	22,427	852,9775	39,677	0,393	2,722	5,896
12	23,167	97,0001	6,380	0,247	0,310	0,948
13	23,933	111,5856	7,064	0,193	0,356	1,050
14	24,233	312,5143	23,900	0,220	0,997	3,552
15	24,887	959,8770	45,866	0,347	3,063	6,816
16	25,713	765,8297	39,858	0,333	2,444	5,923
17	26,493	458,0779	25,106	0,293	1,462	3,731
18	27,293	830,0259	65,983	0,193	2,649	9,805
19	27,633	220,2425	22,067	0,160	0,703	3,279
20	28,360	243,9184	3,564	0,540	0,778	0,530
21	29,820	53,0177	4,193	0,233	0,169	0,623
22	30,320	298,9255	12,292	0,267	0,954	1,827
23	33,220	10022,5774	88,241	1,533	31,982	13,113
24	36,907	188,3171	1,625	0,227	0,601	0,242
25	37,513	435,0265	12,663	0,580	1,388	1,882
26	38,247	430,0293	11,462	0,333	1,372	1,703
27	40,027	50,2061	2,703	0,313	0,160	0,402
28	40,593	6847,8602	11,491	0,807	21,849	1,708
-	Total	31338,6080	672,921			

Obr. 13. Kalibrační křivka arnikolidu



3.6. Stanovení biologické aktivity a celkového množství fenolů

3.6.1. Stanovení celkového množství fenolů

Stanovení celkového množství fenolických sloučenin v získaných extraktech bylo měřeno modifikovanou Folin-Ciocalteuovou metodou²⁰ a výsledky byly zaznamenány jako podíl kyseliny gallové. Pro přípravu kalibrační křivky bylo třeba smísit 0,25 ml ethanolového roztoku gallové kyseliny o obsahu 0,025 - 0,25 mg/ml s 1,25 ml Folin-Ciocalteuova činidla a s 1 ml 7,5% uhličitanu sodného. Absorbance byla odečítána po 30ti minutách při pokojové teplotě a vlnové délce 765 nm. Při vlastním testu byl připraven z částečně purifikovaných extraktů roztok o koncentraci 1 mg/ml. 0,25 ml tohoto roztoku bylo smíšeno se stejnými činidly a po 30ti minutách byla měřena absorbance za stejných podmínek, jako při přípravě slepého vzorku. Měření bylo provedeno třikrát. Celkové množství fenolů bylo odečteno z kalibrační křivky s využitím UV Probe softwaru a vyjádřeno jako podíl gallové kyseliny v mg extraktu (GAE/mg).

3.6.2. Stanovení účinku na AChE a BuChE (IC₅₀)

Stanovení bylo provedeno modifikovanou metodou dle Ellmana.²¹ Experimenty byly prováděny spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm při teplotě 25°C, pH 7,4 a použity byly jednorázové plastové kyvety o tloušťce 1 cm. Při přípravě slepého vzorku bylo do kyvety postupně přidáváno 10-25 µl hemolyzátu nebo plazmy, 200 µl DTNB, 25 µl rozpouštědla použitého k rozpuštění vzorků (DMSO) a dále byl vzorek doplněn na objem 900 µl pufrem. Následně bylo přidáno 100 µl substrátu (acetylcholin jodid nebo butyrylcholin jodid). Byl měřen nárůst absorbance při vlnové délce 436 nm. Měření bylo třikrát opakováno a pro výpočet poklesu nárůstu absorbance byla použita průměrná hodnota.

Při měření vzorku bylo do kyvety postupně přidáváno 10-25 µl hemolyzátu nebo plazmy, 200 µl DTNB, 25 µl měřeného vzorku v různých koncentracích a poté byl měřený vzorek doplněn pufrem na objem 900 µl. Měření bylo opakováno třikrát a nárůst absorbance byl měřen při vlnové délce 436 nm.

Matematické zpracování experimentálních dat

Výpočet poklesu ΔA

$$\% \text{ poklesu } \Delta A = 100 - (\Delta A_{SA} / \Delta A_{BL} \times 100)$$

ΔA_{SA} - nárůst absorbance za 1 minutu u měřeného vzorku

ΔA_{BL} - nárůst absorbance za 1 minutu u slepého vzorku

Stanovení hodnoty IC_{50}

Z vypočítaných hodnot byla pomocí statistického programu GraphPad sestrojena křivka, ze které byla odečtena hodnota IC_{50} .

3.6.3. Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu, vyhodnocení metodou SIA²²

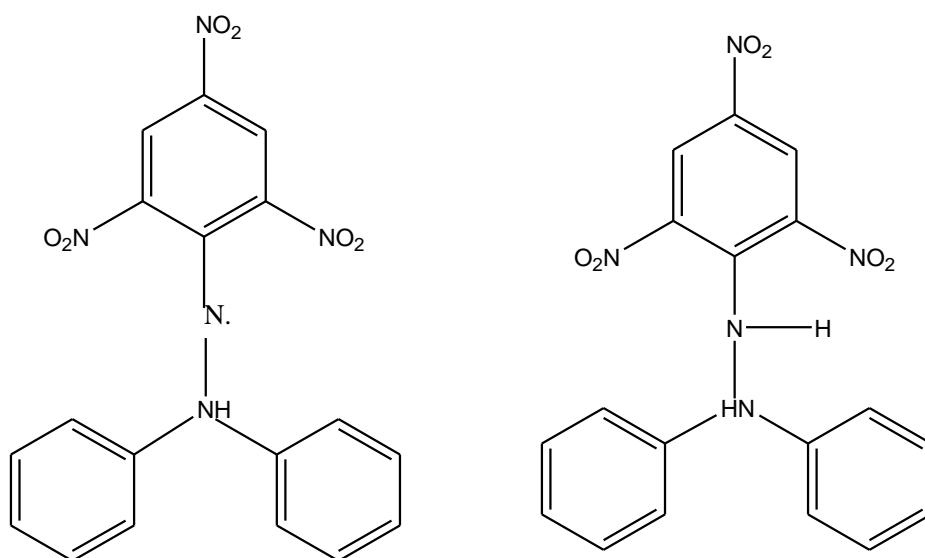
Metoda je založena na barevné reakci 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) s antioxidanty v organickém nebo vodně-organickém prostředí, při které dochází k interakci radikálu s analytem a v důsledku toho dojde k odbarvení DPPH radikálu. Při redukci DPPH dojde k poklesu absorbance při charakteristické vlnové délce. DPPH má absorpční maximum při 525 nm. Snížení absorbance DPPH souvisí s koncentrací antioxidantu v testovaném vzorku. Měření jednoho vzorku trvá 4 minuty. S pomocí SIA je možné detekovat mikromolární koncentrace antioxidantu. Optimální pH pro měření je 5.

Byl připraven $1 \cdot 10^{-4}$ M roztok DPPH radikálu. Roztok byl připraven rozpouštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% ethanolu ve 100 ml hnědé odměrné baňce a následně doplněn superčistou vodou do 100 ml. Následně byl roztok po dobu 5 minut odvzdušněn v ultrazvukové lázni a chráněn před světlem. Jako rozpouštědlo pro přípravu vzorků byl použit 50% ethanol, který byl 5 minut odvzdušněn a zároveň byl použit i jako nosný proud v systému a slepý vzorek. Měřený vzorek byl připraven rozpuštěním cca 4 mg extraktu v 50% ethanolu tak, aby vznikla koncentrace 1mg/ml. Dalším ředěním byly připraveny koncentrace 0,5, 0,25, 0,1 mg/ml. Všechny

připravené koncentrace byly odvzdušněny v ultrazvukové lázni. Před vlastním měřením byla nejprve změřena absorbance slepého vzorku. Vzorek byl měřen ve 3 následných měřeních a tím byly získány 3 hodnoty. Po nasátí roztoku DPPH přístojem SIA mezi dvě zóny měřeného vzorku, resp. slepého vzorku, došlo k reakci. Byla změřena absorbance při $\lambda=525$ nm.

Antioxidační účinek byl vyjádřen v % poklesu absorbance proti slepému vzorku dle vzorce $Q\% = (1 - A_x/A_0) \cdot 100$, kde A_x je výška píku měřeného vzorku a A_0 je výška píku slepého vzorku.

Obr. 14.



DPPH• (volný radikál) a DPPH (redukováná forma)

3.6.4. Tabulka naměřených hodnot

vzorek	GAE (mgGA/mgEXT)	DPPH EC ₅₀ (mg/ml)	AChE		BuChE	
			IC ₅₀ (mg/ml)	% inhibice c=0,5 mg/ml	IC ₅₀ (mg/ml)	% inhibice c=0,5 mg/ml
extrakt ze semen	0,0427	0,39	>0,5	0	>0,5	5,09
ethanolový extr.	0,0337	0,332	>0,5	0	>0,5	9,22
vodný extr.	0,0050	> 1	>0,5	0	>0,5	1,03
frakce obsahující fenolické kys.	0,3400	0,01	>0,5	0	>0,5	17,76
dichlormetanový extr.			>0,5	4,15	>0,5	9,02

4. HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

Cílem této práce bylo stanovit biologickou aktivitu extraktů získaných z *Cichorium intybus*. Byla zjišťována antioxidační aktivita, vliv extraktů na inhibici enzymů acetylcholinesterázy, která hraje významnou roli při léčbě Alzheimerovy choroby, a butyrylcholinesterázy. Dále bylo stanovováno celkové množství fenolických látek v extraktech.

Vliv dichlormethanového extraktu připraveného ze sušených kořenů *Cichorium intybus* na inhibici acetylcholinesterázy byl již dříve testován pomocí enzymového testu s Ellmanovým činidlem. Prokázána byla 70% inhibice při použité koncentraci 1mg extraktu/ml.¹¹ Extrakty připravené z *Cichorium intybus* se používají také jako hepatoprotektiva,¹² ovlivňují také aktivitu enzymů α -glukosidázy, která štěpí disacharidy a polysacharidy obsahující glukosu,¹³ a glukóza-6-fosfatázy, jejíž aktivitu snižují a tím snižují i hodnotu glykémie.¹⁷ Obsahové látky z řady seskviterpenických laktonů, především laktucin, laktukopikrin a jejich deriváty, mají inhibiční vliv na řadu gram pozitivních a gram negativních bakterií,¹⁶ na původce malarie *Plazmodium falciparum*¹⁸ a také na některé zoofilní a antropofilní dermatofyty.¹⁵ Jsou zodpovědné také za analgetickou a sedativní aktivitu.¹⁹

Extrakty použité v této práci byly získány jednak z původního suchého extraktu z plodů *Cichorium intybus* a dále z extraktů připravených ze sušených kořenů této rostliny. Kořeny byly nejprve mechanicky zpracovány a následně z nich byl připraven vodný a ethanolový extrakt. Z ethanolového extraktu byla po odpaření na vakuové odparce odebrána suchá část, která byla dále rozpuštěna v dichlormethanu, a tím vznikl další extrakt. Dále byl pro testování použit suchý vodný extrakt plodů *Cichorium intybus* a frakce obsahující fenolické kyseliny, která byla získána z ethanolového extraktu připraveného ze suchého extraktu plodů *Cichorium intybus*. Extrakt byl chromatograficky rozdělen na sephadexové koloně a frakce obsahující pravděpodobně kyselinu chlorogenovou byla analyzována pomocí UPLC MS/MS, kde byla potvrzena přítomnost 4 izomerů kyseliny izochlorogenové.⁷

Všechny extrakty byly odpařeny do sucha a pro vlastní testování byla použita část, která zbyla po odpaření. Navážky vzorků byly v rozmezí 10-20 μ g, kromě extraktu obsahujícího fenolické kyseliny, kde bylo použito menší množství. Vodný extrakt z plodů *Cichorium intybus* byl použit v původním stavu.

Stanovení celkového množství fenolických látek bylo provedeno modifikovanou Folin-Ciocalteuovou metodou,²⁰ výsledky byly odečteny z kalibrační křivky a vyjádřeny jako podíl kyseliny gallové v mg extraktu. Nejvyšší naměřená

hodnota 0,34 byla zjištěna u extraktu obsahujícího fenolické kyseliny. Naměřená hodnota u extraktu ze semen *Cichorium intybus* byla 0,0427, u ethanolového extraktu z kořenů 0,0337 a u vodného extraktu 0,0050. Dichlormethanový extrakt testován nebyl.

Antioxidační aktivita byla stanovena DPPH testem, který vychází z barevné reakce 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu s antioxidanty v organickém nebo vodně-organickém prostředí, kdy dochází k odbarvení DPPH radikálu při reakci s analytem. Naměřené hodnoty byly zaznamenány jako koncentrace zhášející 50% DPPH v mg/ml. Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u extraktu obsahujícího fenolické kyseliny a měla hodnotu 0,01 mg/ml. Další naměřené hodnoty byly 0,39 mg/ml u extraktu z plodů, 0,332 mg/ml u ethanolového extraktu z kořenů a u vodného extraktu byla zjištěna hodnota větší než 1 mg/ml. Dichlormethanový extrakt nebyl testován.

Pro zjištění inhibičního vlivu na acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu je nutné zjistit hodnotu IC_{50} a získaná data dále matematicky zpracovat. Použita byla modifikovaná metoda dle Ellmana.²¹ U všech testovaných extraktů byla zjištěna hodnota větší než 0,5 mg/ml, která již neumožňuje vypočítat IC_{50} . U všech extraktů kromě dichlormethanového nebyla při koncentraci 0,5 mg/ml zaznamenána žádná inhibiční aktivita na acetylcholinesterázu. U dichlormethanového extraktu při koncentraci 0,5 mg/ml byla zaznamenána inhibiční aktivita na acetylcholinesterázu 4,15%. Inhibiční aktivita na butyrylcholinesterázu měřená při koncentraci 0,5 mg/ml byla 5,09% u suchého extraktu z plodů *Cichorium intybus*, 9,22% u ethanolového extraktu z kořenů, 1,03% u vodného extraktu z kořenů, 17,76% u frakce obsahující fenolické kyseliny a 9,02% u dichlormethanového extraktu z kořenů.

Všechny extrakty byly také hodnoceny pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Použity byly mobilní fáze chloroform : methanol, butanol : kyselina octová : voda, čistý chloroform a soustava vhodná pro identifikaci laktonů chloroform : methanol : benzen . Jako standardy laktonů byl použit eupatoriopikrin, trilobolid, laserolid, arnikolid, onopordopikrin a grosheimin. Byla provedena chromatografie se standardy laktonů trilobolidu a arnikolidu a dichlormethanovým a ethanolovým extraktem z kořenů *Cichorium intybus*. Použita byla soustava butanol : kyselina octová : voda. Na základě výsledků této chromatografie bylo provedeno stanovení arnikolidu v dichlormethanovém extraktu pomocí HPLC. Výchozí koncentrace byla 3,4 mg/ml. Jako rozpouštědlo byl použit methanol. Pík č. 6 (viz. Obr. 13., 14.) podle

kalibrační křivky (viz. Obr. 15.) a plochy vykazuje 12350 mV.s při koncentraci 1mg/ml. Plocha pod křivkou odpovídá 1,09 % arnikolidu ve směsi.

Dále byla zjišťována přítomnost sitosterolu a kyseliny chlorogenové v chloroformovém a ethanolovém extraktu, který byl připraven ze suchého extraktu semen *Cichorium intybus* a ve vodném a ethanolovém extraktu z kořenů. Přítomnost sitosterolu i kyseliny chlorogenové v extraktu ze semen byla potvrzena již dříve.⁷ Použity byly dvě různé soustavy. Nejprve chloroform : methanol (95 : 5) a pak butanol : kys.octová : voda (5 : 1 : 4), ale po vyhodnocení ani jedna z nich neposkytla požadované výsledky. Přítomnost sitosterolu pak byla dále zjišťována ještě v dichlormethanovém extraktu z kořenů a použita soustava chloroform : methanol (97 : 3). Kromě toho byly naneseny standardy laktonu grosheiminu a ethanolového extraktu z kořenů. Po vyhodnocení na základě R_f a zbarvení skvrn byla prokázána přítomnost sitosterolu v dichlormethanovém extraktu z kořenů *Cichorium intybus*.

5. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit biologickou aktivitu extraktů připravených z plodů a kořenů *Cichorium intybus*.

Byla zjišťována inhibiční aktivita na enzymy acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu, antioxidační aktivita a stanovení celkového množství fenolických látek ve vzorku.

Hodnocen byl vodný a ethanolový extrakt získaný ze sušených kořenů *Cichorium intybus* a dichlormethanový extrakt, připravený z ethanolového extraktu po odpaření do sucha, dále původní suchý vodný extrakt získaný z plodů *Cichorium intybus* a frakce obsahující fenolické kyseliny, získaná po rozdělení na sephadexové koloně z ethanolového extraktu z plodů.

Inhibiční vliv na acetylcholinesterázu nebyl prokázán u žádného extraktu, stopová aktivita byla zjištěna pouze u dichlormethanového extraktu. Inhibiční vliv na butyrylcholinesterázu byl zaznamenán u extraktů také pouze jako stopová aktivita. Získané hodnoty neumožnily vypočítat IC_{50} . Stanovení celkového množství fenolů bylo provedeno Folin-Ciocalteuovou metodou a nejvyšší hodnota byla naměřena u extraktu obsahujícího fenolické kyseliny. Antioxidační aktivita byla stanovena DPPH testem a nejvýraznější byla u frakce obsahující fenolické kyseliny.

Dále byly provedeny porovnávací TLC chromatografie v různých soustavách a s využitím standardů různých látek. Potvrzena byla přítomnost sitosterolu v dichlormethanovém extraktu získaném z kořenů *Cichorium intybus*. Na základě výsledků tenkovrstvé chromatografie byla pomocí HPLC zjištěna přítomnost laktonu arnikolidu v dichlormethanovém extraktu.

6. LITERATURA

1. JAHODÁŘ, L.: Farmakobotanika semenné rostliny. Karolinum 2006. (s.164)
2. JAHODÁŘ, L.: Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin pro farmaceuty. Karolinum Praha 1998. (s. 8)
3. NANDAGOPAL, S., RANJITHA KUMARI, B. D.: Phytochemical and bacterial studies of cichory (*Cichorium intybus* L.)- A multipurpose medicinal plant. Advan. Biol. Res. 1(1-2), 17-21 (2007).
4. KISIEL, W., ZIELIŃSKA, K.: Guajanolides from *Cichorium intybus* and structure revision of *Cichorium* sesquiterpene lactones. Phytochemistry. 57, 523-527 (2001).
5. RODRIQUEZ, E., TOWERS, G. H. N., MITCHELL, J. C.: Biological activities of sesquiterpene lactones. Phytochemistry. 15(11), 1573-1580 (1976).
6. DE KRAKER, J. W., FRANSSEM, M. C. R., DE GROOT, A., KÖNIG, W. A., BOUWMEESTER, H. J.: (+)- Germacrene A biosynthesis. The committed step in biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in cichory. Plant physiol. 117, 1381-1392 (1998).
7. Málková, M.: Obsahové látky extraktu *Cichorium intybus* [Diplomová práce]. Hradec Králové 2008. 56 s., Univerzita Karlova., Farmaceutická fakulta.
8. NOLASCO, S. M., QUIRITA, O., WIESE, B., VIGO, M. S.: Estudio de la composición química de la semilla y aceite seminal de *Cichorium intybus* L.(Achicoria). Grasas y Aceites. 47, 377-380 (1996).
9. AHMAD, B., BAWA, S., SIDDIQUI, A. B., ALAM, T., KHAN, S. A.: Components from seeds of *Cichorium intybus* Linn. In. J. Chem. 41B, 2701-2705 (2002).

10. AHMED, B., KHAN, S., MASOOD, M. H., SIDDIQUE, A. H.: Anti-hepatotoxic activity of cichotyboside, a sesquiterpene glykoside from the seeds of *Cichorium intybus*. J. Ass. Nat. Prod. Res. 10(3), 218-223 (2008).
11. ROLLINGER, J. M., MOCKA, P., ZIDORN, C., ELLMERER, E. P., LANGER, T., STUPPNER, H.: Application of the in combo screening approach for the discovery of non-alkaloid acetylcholinesterase inhibitors from *Cichorium intybus*. Curr. Drug Discov. Tech. 2(3), 185-193 (2005).
12. AHMED, B., AL-HOWIRINY, T. A., TAWFEG, A., SIDDIQUI, A. B.: Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*. J. Ethnopharmacol. 87(2-3), 237-240 (2003).
13. RAHMAN, A., ZAREEN, S., CHOUDHARY, M. I., AKHTAR, M. N., KHAN, S. N.: α - glucosidase inhibitory activity of triterpenoids from *Cichorium intybus*. J. Nat. Prod. 71, 910-913 (2008).
14. GAZZANI, G., DAGLIA, M., PAPETTI, A., GREGOTTI, C.: In vitro and ex vivo anti- and prooxidant components of *Cichorium intybus*. J. Pharm. Biomed. Anal. 23(223), 127-133 (1999).
15. MARES, D., ROMAGNOLI, C., TOSI, B., ANDREOTTI, E., CHILLEMI, G., POLI, F.: Chicory extract from *Cichorium intybus* L. as potential antifugals. Mycopathologia. 160, 85-92 (2005).
16. PETROVIC, J., STANOJKOVIC, A., COMIC, L. J., CURCIC, S.: Antibacterial activity of *Cichorium intybus*. Fitoterapia. 75(7-8), 737-739 (2004).
17. PUSHPARAJ, P. N., LOW, H. K., MANIKANDAN, J., TAN, B. K., TAN, C. H.: Anti-diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozocin-induced diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 111(2), 430-434 (2007).

18. BISCHOFF, T. A., KELLEY, C. J., KARCHESY, Y., LAURANTOS, M., NGUYEN-DYNH, P., AREFI, A. G.: Antimalarial activity of lactucin and lactucopicrin: sesquiterpene lactones isolated from *Cichorium intybus* L. J. Ethnopharmacol. 95(2-3), 455-457 (2004).
19. WESOLOWSKA, A., NIKIFORUK, A., MICHALSKA, K., KISIEL, W., CHOJNACKA-WÓJCIK, E.: Analgesic and sedative activities of lactucin- like guaianolides in mice. J. Ethnopharmacol. 107(2), 254-258 (2006).
20. SINGLETON, V. L., ROSSI, J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticult. 16, 144-158 (1965).
21. CAHLÍKOVÁ, L., KULHÁNKOVÁ, A., URBANOVÁ, K. et al: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyrantes robusta* by GC-MS and its cholinesterase activity. Nat. Prod. Comm. v tisku
22. POLÁŠEK, M., SKALA, P., OPLETAL, L., JAHODÁŘ, L.: Rapid automated assay of anti-oxidant/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. Anal. Bioanal. Chem. 379, 754-758 (2004).

ABSTRAKT

Marta Málková: Biologická aktivita obsahových látek *Cichorium intybus*. Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2010, s.57.

Klíčová slova : *Cichorium intybus*, čekanka obecná, arnikolid

Biologická aktivita byla stanovována u extraktů získaných z plodů a kořenů *Cichorium intybus*. Použit byl ethanolový, vodný a dichlormetanový extrakt ze sušených kořenů a suchý vodný extrakt z plodů a z něj získaná frakce obsahující fenolické kyseliny. Významný inhibiční efekt na acetylcholinesterázu a butylcholinesterázu nebyl zaznamenán u žádného z extraktů. Nejvyšší obsah fenolických látek a zároveň nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u frakce obsahující fenolické kyseliny. Dále byly všechny extrakty hodnoceny pomocí tenkovrstvé chromatografie, která prokázala přítomnost sitosterolu v dichlormethanovém extraktu z kořenů *Cichorium intybus*. Na základě výsledků TLC byla pomocí HPLC v tomto extraktu zjištěna přítomnost laktону arnikolidu.

ABSTRACT

Marta Málková: Biological activity of *Cichorium intybus* compounds. Rigorous thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology. Hradec Králové, 2010, s.57.

Keywords : *Cichorium intybus*, arnicolide

This study deals with biological activity of the extracts from seeds and roots of *Cichorium intybus*. Aqueous, ethanolic and dichloromethane extract from dried roots of *Cichorium intybus*, dry aqueous extract from seeds of *Cichorium intybus* and fraction containing phenolic acids acquired from this aqueous extract were used.

These extracts did not show any significant inhibition of acetylcholinesterase or butyrylcholinesterase. The highest amount of phenolic compounds along with the highest antioxidant activity was found in the fraction containing phenolic acids.

Furthermore, all extracts was analyzed by TLC chromatography. Sitosterol was detected in dichloromethane extract from *Cichorium intybus* roots. Based on TLC chromatography, lactone arnicolide was also detected by HPLC in this extract.