

**6P-01****SYNTHESIS OF SILYBIN SULFATES****DAVID BIEDERMANN<sup>a</sup>, RADEK GAŽÁK<sup>a</sup>, CHARLES LAMBERT<sup>b</sup>, and VLADIMÍR KŘEN<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Center for Biocatalysis and Biotransformation, Institute of Microbiology AS CR, Videňská 1083, Praha 4, <sup>b</sup> Laboratory of Connective Tissues Biology, University of Liege, Tour de Pathologie B23/3, CHU Sart Tilman, 4000 Sart Tilman [biedermann@biomed.cas.cz](mailto:biedermann@biomed.cas.cz)

Silymarin is a standardized extract of the seeds of milk thistle (*Silybum marianum*). Major compound of this complex mixture of flavonolignans and flavonoids is silybin, which is valued for its hepatoprotective and antioxidative activity and virtually no toxicity<sup>1</sup>. Recently, new applications of silybin in prostate cancer treatment (II stage clin. trials), skin tumor treatment and skin protection were described<sup>2</sup>. Orally administered silybin is partly excreted by the urine, but majority is transformed in the liver to the corresponding glucuronide and sulfate conjugates<sup>3</sup>. Different diastereoisomerically pure glucuronides of silybin were prepared using chemoenzymatic glucuronization with nucleoside in situ regeneration<sup>4</sup>.

The aim of this work is to prepare other major metabolites, e.g. silybin sulfates. Silybin sulfatation has been accomplished with amine – sulfuric oxide complex. Several silybin sulfates have been prepared. Diastereomerically pure silybin disulfates were obtained using preparative HPLC. It was shown, that some of prepared derivatives inhibit expression of VEGF 111.

*This work was supported by the grants LC06010, P207/10/0288 and ME10027.*

## REFERENCES

1. Saller R., Meier R., Brignoli R.: *Drugs* 61, 2035 (2001).
2. Gažák R., Walterová D., Křen V.: *Curr. Med. Chem.* 14, 315 (2007).
3. Hoh C., Boocock D., Marczylo T., Singh R., Berry D. P., Dennison A., R., Hemingway D., Miller A., West K., Euden S., Garcea G., Farmer P. B., Steward W. P., Gescher A. J.: *Clin. Cancer. Res.* 12, 2944 (2006).
4. Křen V., Ulrichová J., Kosina P., Stevenson D., Sedmera P., Přikrylová V., Halada P., Šimánek V.: *Drug Met. Disp.* 28, 1513 (2000).

**6P-02****ANTIBACTERIAL EFFECTS OF CARVACROL AND THYMOL ON STRAINS *Klebsiella pneumoniae* AND *Staphylococcus aureus* RESISTANT TO ANTIBIOTICS****ALEXANDRA JANTOVSKÁ, KAREL VENTURA, PETRA LYSKOVÁ, JAROSLAVA MAZUROVÁ, and KAREL MENCL**

Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice [alexandra.jantovska@student.upce.cz](mailto:alexandra.jantovska@student.upce.cz)

One of the important problems in the treatment of infectious diseases is increasing resistance of microorganisms to antibiotics. Therefore, attention focuses on research of the effects of natural origin compounds. Natural compounds are also less toxic and degrade in the organism more easily. The aim of this work is verification of microbial effects including determination the lowest effective concentration of thymol and carvacrol, monoterpenes contain in particular in plants of the genus *Thymus* and *Origanum*. Strains of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* were tested and the resistance to certain antibiotik was detected. These strains were cultivated from clinical material by laboratory workers microbiological department of Regional Hospital Pardubice. Informations about resistance of these strains was evaluated in our lab by microdilution method, sets for these determination were obtained by TRIOS, spol. s r.o., CZ. Minimum inhibitory concentrations of carvacrol and thymol were determined by tube dilution method and microdilution method in the Mueller-Hinton broth. Both tested substances were dissolved in Mueller-Hinton broth. The growth was characterised by turbidity content of the tube in dilution method and in microdilution method by sediment. Results were analyzed after 24, 48 and 72 hours incubation at 37 °C visually. The broth culture was cultivated on blood agar and incubate at 37 °C to confirm the growth. For *Klebsiella pneumoniae* strains was determined by tube dilution method and microdilution method minimum inhibitory concentration (MIC) of carvacrol in the range 150–200 µg ml<sup>-1</sup>. Thymol inhibited growth of these strains by using tube dilution method in quantity 75–1200 µg ml<sup>-1</sup>. MIC on 75–600 µg ml<sup>-1</sup> was determined by microdilution method. MIC of carvacrol to the strains of *Staphylococcus aureus* determined by tube dilution method was 300 µg ml<sup>-1</sup>. The effective quantity obtained by testing microdilution method was in the range 150–600 µg ml<sup>-1</sup>. Thymol tested by tube dilution method showed MIC 75–600 µg ml<sup>-1</sup>, by microdilution method was concentration determined on 37,5–300 µg ml<sup>-1</sup>. The results were affected by the solubility of both tested substances in broth.

*This work was supported by MSM 0021627502.*

## 6P-03

PREPARATIVNÍ DĚLENÍ DIASTEREOMERŮ  
SILYBINU A JEHO SULFÁTŮ

PETRA KOLÁŘOVÁ<sup>a,b</sup>, DAVID BIEDERMANN<sup>a</sup>,  
EVA TESAŘOVÁ<sup>b</sup> a VLADIMÍR KŘEN<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centrum biokatalýzy a biotransformací, Mikrobiologický ústav, AV ČR, Vítězná 1083, 142 20 Praha 4,

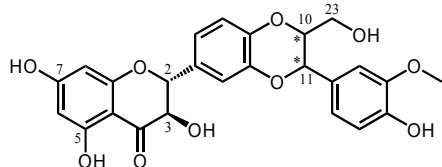
<sup>b</sup> Přírodovědecká fakulta UK v Praze  
B.B.Petra@seznam.cz

Z plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) se získává standardizovaný extrakt silymarin, jehož hlavní komponentou je silybin<sup>1</sup>. Tento flavonolignan je převážně odpovědný za léčivé účinky plodů ostropestřce: antioxidační, hepatoprotektivní, chemoprotektivní a protinádorové účinky.

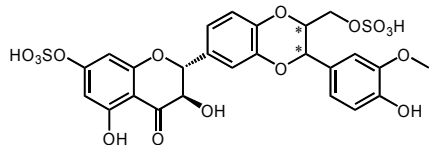
Přírodní silybin existuje jako preparativně neseperovatelná ekvimolární směs stereomerů A a B (**1** a **2**)<sup>2</sup>. Bylo prokázáno, že biologická aktivita silybinu A a B je odlišná, a že se v organismu konjuguje převážně na sulfáty, jejichž struktura ani biologická aktivita není dosud známa.

Cílem této práce je vývoj prakticky použitelné metody pro preparativní separaci stereomerů silybinu A a B a jeho sulfátů, které jsou považovány za hlavní metabolity.

Byla vyvinuta původní preparativní metoda na dělení silybinu A a B v mobilní fázi tvořené 60% MeOH na chromatografické koloně Labio C18 50 × 500 mm s použitím preparativního čerpadla Shimadzu – LC-8A a detektoru SPD-20A. Čistota diastereomerů (d.e.) po prvním separaci byla 70 %, a po druhé následně 97 %. Za jeden den je takto možno získat až 0,5 g silybinu A a 0,5 g silybinu B. Připravené opticky čisté stereomery silybinu byly využity jako výchozí materiál pro sulfataci silybinu a byly získány opticky čisté silybin-7,23-disulfáty (**3**). Tyto látky budou sloužit jako standardy pro studium metabolického profilu silybinu *in vivo*.



**1**: Silybin A (2*R*, 3*R*, 10*R*, 11*R*); **2**: silybin B (2*R*, 3*R*, 10*S*, 11*S*)



**3**: Silybin-7,23-disulfát

Tato práce vznikla za podpory grantů LC06010, 303/08/0658, MŠMT OC08049 a ME10027.

## LITERATURA

1. Gažák R., Walterová D., Křen V.: *Curr. Med. Chem.* 14, 315 (2007).

## 6P-04

SUPERKRITICKÁ EXTRAKCE  $\beta$ -SITOSTEROLU  
Z KOŘENE KOPŘIVY

KRISTINA ROCHOVÁ, MARIE SAJFRTOVÁ,  
HELENA SOVOVÁ a MILENA BÁRTLOVÁ

Ústav chemických procesů AVČR, v.v.i., Rozvojová 135,  
165 02 Praha 6 – Suchbátka

rochova@icpf.cas.cz

Díky vysokému obsahu léčivých látek se kopřiva (*Urtica dioica* L.) uplatňuje v oblasti farmacie, kosmetiky a potravinových doplňků. Její listy obsahují nadprůměrné množství chlorofylů a karotenoidy, jež mají anioxidační a antimikrobiální účinky. V kořenech jsou obsaženy mimo jiné steroly, mastné kyseliny, skopoletin, polysacharidy a isolektiny. Rostlinné steroly, minoritní složky rostlinných olejů, jsou cennými látkami díky své schopnosti snižovat hladinu cholesterolu a tím riziko srdečních onemocnění<sup>1</sup>. Byla u nich prokázána protizánětlivá a protibakteriální aktivita a protirakovinné účinky<sup>2</sup>.

Superkritický oxid uhličitý (sc-CO<sub>2</sub>) jakožto nepolární rozpouštědlo přednostně rozpouští nepolární a slabě polární látky jako jsou rostlinné oleje, vosky, silice a karotenoidy spolu s dalšími minoritními složkami obsaženými v rostlinném materiálu. Minoritní složky jsou v extraktech zastoupeny jen v jednotkách procent či méně, ale právě tyto látky jsou často vysoce ceněny pro svou biologickou aktivitu. Superkritickou extrakcí lze s výhodou tyto složky izolovat, neboť umožňuje regulaci rozpouštěcí schopnosti sc-CO<sub>2</sub> změnou tlaku a teploty (případně přidáním polárního unašeče), čímž je možno dosáhnout selektivní extrakce vůči vybrané látce či skupině látek. Rozdělení celkového extraktu na několik frakcí o různém složení lze provést frakcionací v čase nebo frakcionací v několika separátorech udržovaných při rozdílných hodnotách tlaku a teploty.

Cílem této práce je studium průběhu extrakce a výtěžku  $\beta$ -sitosterolu izolovaného z kořene kopřivy metodou superkritické extrakce sc-CO<sub>2</sub>. Na základě získaných dat je pak možná optimalizace podmínek extrakčního procesu spojeného s frakcionací do dvou separátorů za účelem zakoncentrování  $\beta$ -sitosterolu ve vzorku. Extrakční tlak se u jednotlivých pokusů pohyboval v intervalu 15–50 MPa a teplota 40–80 °C. Vedle sc-CO<sub>2</sub> extraktů byla provedena Soxhletova extrakce hexanem. Obsah  $\beta$ -sitosterolu ve vzorcích byl stanoven kapalinovou chromatografií.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 2B06024.

## LITERATURA

1. Jones P. J. H., MacDougall D. E., Ntanios F., Vanstone C. A.: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 217 (1997).
2. Beveridge T. H. J., Li T. S. C., Drover J. C. G.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 744 (2002).

**6P-05****SUPERKRITICKÁ EXTRAKCE A INSEKTICIDNÍ AKTIVITA HLUCHAVKOVITÝCH ROSTLIN****MARIE SAJFRTOVÁ<sup>a\*</sup>, ROMAN PAVELA<sup>b</sup>, JIN-DRÍCH KARBAN<sup>a</sup> a HELENA SOVOVÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Ústav chemických procesů AV ČR, v.v.i., Rozvojová 135, 165 02 Praha 6-Suchbát, <sup>b</sup> Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně  
sajfrtova@icpf.cas.cz

Časté používání syntetických insekticidů v zemědělství vede k vytváření resistantních populací hmyzu a znamená environmentální nebezpečí pro necílové organismy; navíc zbytky některých pesticidů v potravním řetězci mohou být nebezpečné lidskému zdraví<sup>1</sup>. Nový trend v ochraně rostlin představují přípravky na bázi rostlinných výtažků, tzv. botanické insekticidy, které redukuje zmíněné problémy na minimum a navíc se v přírodě snadno rozkládají. Látky s insekticidními účinky se většinou nacházejí v rostlinných silicích, které jsou složeny především z terpenů<sup>2</sup>.

Již při výběru metody pro izolaci rostlinných insekticidů je nutno brát ohled na životní prostředí a zpřísnující se normy pro používání organických rozpouštědel. Z tohoto hlediska je vysoce perspektivní extrakce superkritickým oxidem uhličitým, která nepoužívá toxická rozpouštědla, nedochází při ní k degradaci labilních složek extraktu a poskytuje extrakty s vysokou biologickou aktivitou<sup>3</sup>.

Tato práce se zabývá porovnáním insekticidní aktivity výtažků získaných SFE a tradičními extrakčními metodami z rostlin čeledi Hluchavkovité (*Lamiaceae*). Díky snadné regulaci rozpouštěcí síly superkritického CO<sub>2</sub> pomocí tlaku, teploty a složení rozpouštědla byly připraveny tři typy extraktů. Extrakty bohaté na silici (při tlaku 12 MPa) nebo na olejoprskyřici (při 28 MPa) byly získány při teplotě 50 °C čistým CO<sub>2</sub>, zatímco extrakty s obsahem polárních látek (při 28 MPa) s přídavkem 4,3 hm.% acetonu k CO<sub>2</sub>. Samotná silice byla z rostlin získána hydrodestilací a olejoprskyřice Soxhletovou extrakcí etanolem a hexanem.

U získaných výtažků byl plynovou chromatografií (GC-MS a GC-FID) stanoven obsah těkavých látek a otestována jejich biologická aktivita proti hmyzím škůdcům (larvám a dospělcům mandelinky bramborové a mouchy domácí, housenkám blýskavky a komářím larvám). Pomocí hodnot akutní kontaktní toxicity (LD<sub>50</sub>) a protipožerové aktivity výtažků byla porovnána jejich účinnost v závislosti na rostlinném druhu, způsobu izolace a druhu škůdce.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 2B06049.*

**LITERATURA**

1. Prakash A., Rao J.: *Botanical insecticides in agriculture*, s. 461. CRC Press, London 1997.
2. Klein Gebbinck E. A., Jansen B. J. M., de Groot A.: *Phytochemistry* 61, 737 (2002).
3. Reverchon E.: *J. Supercrit. Fluids* 10, 1 (1997).

**6P-06****SROVNÁNÍ OBSAHU ISOCHINOLINOVÝCH ALKALOIDŮ V JEDNOLETÉ A VÍCELETÉ KULTUŘE *Macleaya microcarpa*****KRISTÝNA PĚNČÍKOVÁ, JANA URBANOVÁ, JANA GREGOROVÁ a EVA TÁBORSKÁ\***

Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 638 00 Brno  
taborska@med.muni.cz

*Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde (*Papaveraceae*) je víceletá bylina pocházející z Dálného východu. Obsahuje protopinové alkaloidy allokryptopin a protopin a je jedním z významných zdrojů kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů (KBA). Mezi tyto alkaloidy patří sanguinarin (SA) a chelerythrin (CHE), které jsou doprovázeny minoritními benzofenanthridiny – sanguirubinem (SR), chelirubinem (CR), sanguilutinem (SL), chelilutinem (CL) a makarpinem (MAK). Biologické efekty sanguinarinu a chelerythrinu jsou již detailně popsány v řadě prací. Přestože informace o minoritních alkaloidech jsou dosud sporé, vykazují řadu neobvyklých vlastností. Zejména makarpin je v posledních letech intenzivně zkoumán pro možnost jeho využití při studiu buněčných struktur pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie<sup>1</sup>. Další studie jsou však limitovány malou dostupností tohoto alkaloidu.

V naší práci jsme se zaměřili na srovnání obsahu alkaloidů v nadzemní i podzemní části u jednoleté a víceleté kultury zejména s přihlédnutím k obsahu KBA.

Rostlinný materiál byl extrahován v Soxhletově extraktoru a vzorky byly vyhodnoceny metodou HPLC s UV detekcí.

Hlavním alkaloidem všech částí rostlin je allokryptopin a ve významném množství je obsažen i protopin. V nadzemní části jednoleté kultury nebyly prokázány významné rozdíly v porovnání s kulturou víceletou. Minoritní KBA byly obsaženy v nadzemních částech obou kultur pouze ve stopových množstvích.

Obsah alkaloidů v kořenech je obecně vyšší než v nadzemní části. Z benzofenanthridinových alkaloidů je v jednoleté kultuře nejvíce zastoupen CHE (0,303 %), dále SA (0,216 %) a ve významném množství též CR (0,133 %). Zastoupení CL (0,033 %) a MAK (0,007 %) jsou podstatně menší. V kořenech víceleté kultury se obsah SA (0,260 %) a CHE (0,367 %) téměř nemění, ale jsou vydatnějším zdrojem minoritních KBA, např. obsah makarpinu je 0,127 %.

Pro izolaci minoritních KBA, zejména makarpinu se jako nejvíce perspektivní jeví kořeny víceleté kultury, kde zároveň klesá obsah protopinových alkaloidů. To odpovídá biosyntetické cestě isochinolinových alkaloidů, kdy makarpin je na konci této dráhy.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR č. 525/08/0819.*

**LITERATURA**

1. Slaninová I., Slanina J., Táborská E.: *Cytometry, Part A* 71A, 9 (2007).