

M U N I

Rostliny ve zdraví a nemoci

**Farmaceutická fakulta MU
Ústav přírodních léčiv**

prof. PharmDr. Karel Šmejkal, Ph.D.

1

M U N I

Metody zkoumání

2

METODOLOGIE FARMAKOGNOSIE

1. Správné botanické určení (v každé expedici musí být zkušený systematický botanik)

Všechny rostliny určené k experimentům musí být uloženy ve formě herbářových položek

2. Makroskopická analýza drogy

Znalost morfologických znaků (tvar a stavba rostlinných orgánů typických pro čeledě, rody)

listy – tvar a délka řapíku, tvar a tloušťka čepele, množství a tvar trichomů aj., stomata (průduchy) a stomatální index

kořeny – barva povrchu, vnitřku nebo lomu

charakteristický zápach, chuť – pro hořčiny kvantitativní hodnocení

květy – velikost, tvar, barva, stavba



3 Ústav přírodních léčiv

MUNI

3

METODOLOGIE FARMAKOGNOSIE

3. Mikroskopická analýza drogy

pozoruje se anatomická stavba rostlinných orgánů, tvar jejich pletiv typické znaky na povrchu – tvar pokožkových buněk, odění

řez drogou – jednoděložné, dvojděložné, Pteridophyta

drogy práškovité – *Amyla*, *Lupulin*, *Faex medicinalis*

drogy práškované – listy Solanaceae podle formy CaOx, pevné elementy stavební (cévy, libriform, vyztužovací lišta, souvislý mechanický pás)

→ identifikace drogy a určení její matečné rostliny a čeledě



4. Chemická kontrola drogy

- důkaz obsahových látek

(metody fyzikální – fluorescence, mikrosublimate, chromatografie)

(m. biologické – hemolytická aktivita, aglutinační účinek, hořkost)

(m. chemické – barevné a srážecí reakce po předchozí extrakci dokazovaných látek, histochemie)

- kvantitativní stanovení obsahových látek

metody určeny povahou stanovované látky

5. Studium tvorby účinných látek

- pomocí inkorporace radioaktivně značených látek – domnělých prekursorů

4 Ústav přírodních léčiv

MUNI

4

METODOLOGIE FARMAKOGNOSIE

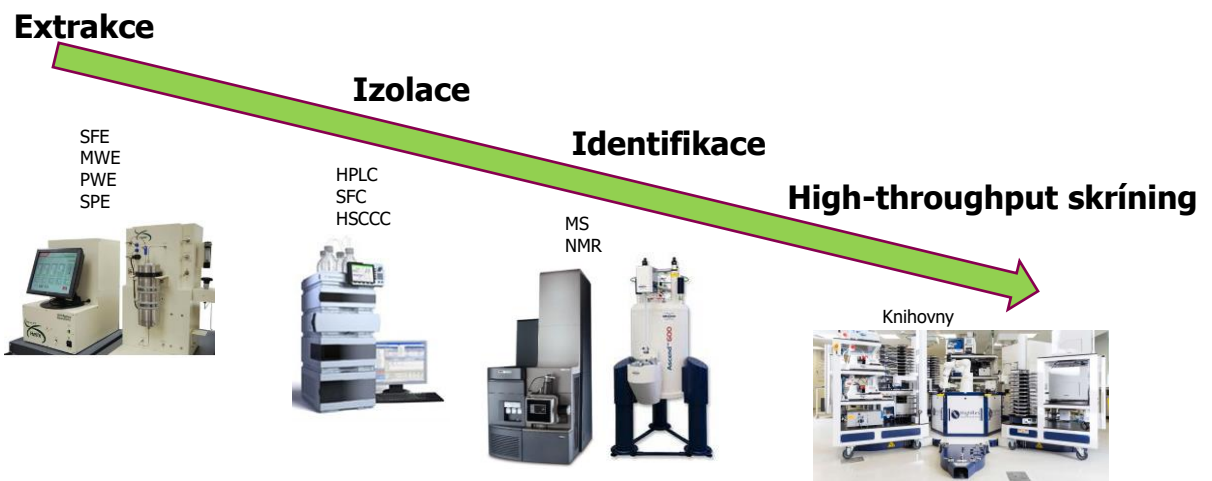
- 6. Předběžné zkoušky biologické aktivity** (výběr surovin pro další studium)
 - účinek antibakteriální, antimykotický, antivirový, cytotoxický, antihypertenzní, antiflogistický, spasmolytický, antioxidační, antidiabetický
 - výběr na základě příbuznosti druhů a rodů, na základě lidového léčitelství, náhodnou volbou – intuice
- 7. Separace a izolace obsahových látek z pokusného materiálu**
 - destilace, krystalizace, vytřepávání, chromatografie preparační
- 8. Detekce izolátů a zkouška jejich čistoty**
 - fyzikální: teplota tání, index lomu, optická otáčivost, CD, GC, HPLC
 - chemická: tvorba barevných produktů se specifickými činidly, degradace
 - biologická: hemolýza, aglutinace erytrocytů, stanovení hořkosti
- 9. Charakteristika a identifikace izolátů**
 - identifikace struktury důležitá pro testování biologické aktivity

5 Ústav přírodních léčiv

MUNI

5

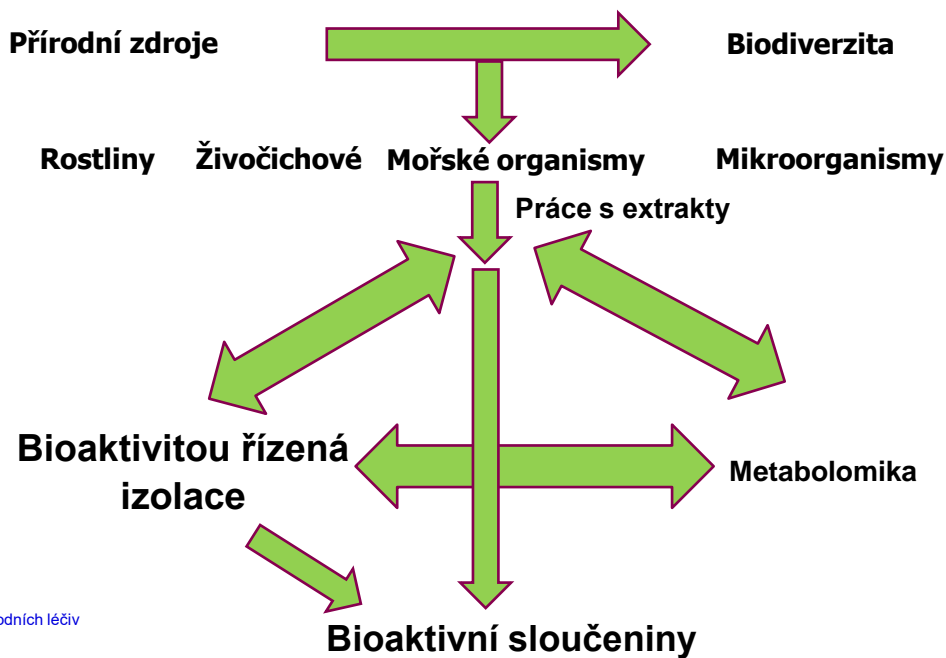
Technologický pokrok



6 Ústav přírodních léčiv

MUNI

6



7 Ústav přírodních léčiv

MUNI

7

IZOLACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK

Izolace má vliv na

- množství získaných látek,
- jejich čistotu,
- biologickou aktivitu,
- možnou kontaminaci balastními látkami,
- ztrátu biologické aktivity degradací nativních látek,
- pro každý typ je vhodná jiná izolační technika.

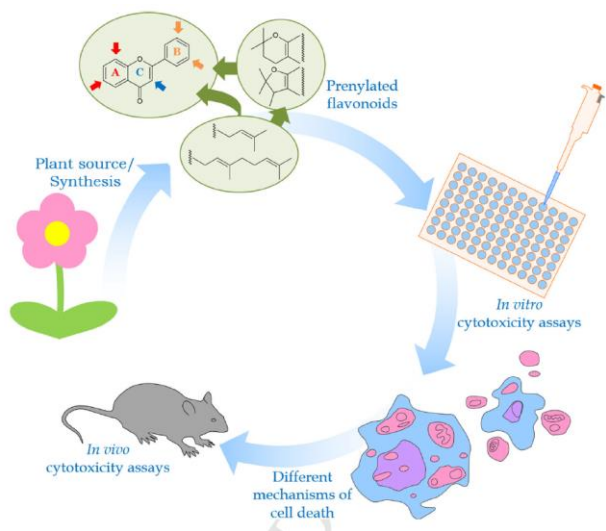
8 Ústav přírodních léčiv

MUNI

8

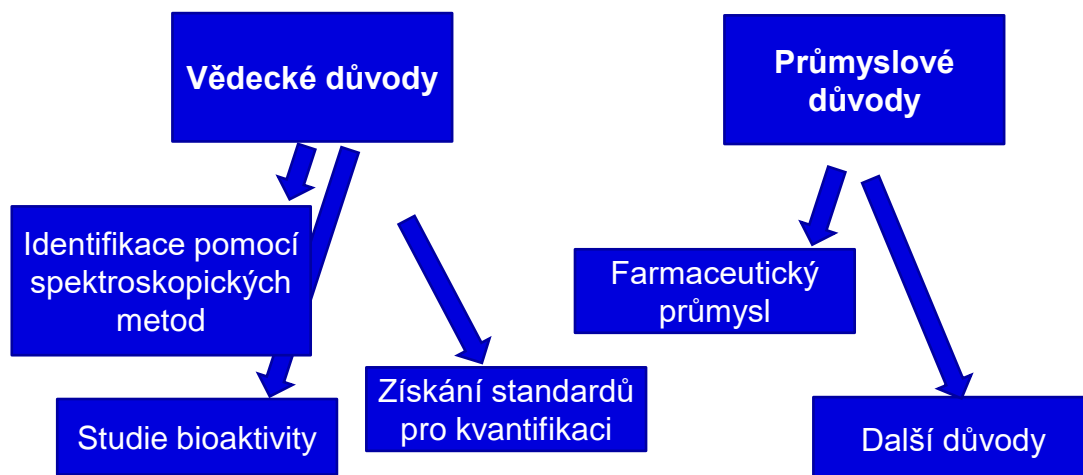
C-prenylated flavonoids with potential cytotoxic activity against solid tumor cell lines

Lenka Molčanová · Dominika Jarošíková · Stefano Dall'Acqua · Karel Šmejkal



Preparativní techniky

– Proč využívat různé preparativní techniky?



1. **EXTRAKCE:** (série rozpouštědel různé polaritý – eluotropní řada) „*similia similibus solventur*“

Fickovy zákony

pevné látky kapalinou

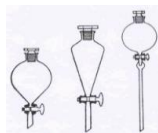
jednorázová (macerace, digesce)

opakovaná

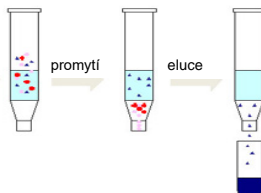
kontinuální (perkolace, Soxhlet)

kapaliny kapalinou (perforace)

vytřepávání v dělicí nálevce



SPE – extrakce tuhou fází na kolonce



SFE – superkritická fluidní extrakce – superkritická kapalina (120 atm - scCO_2)

11 Ústav přírodních léčiv

11

Eluotropní řada

Volba vhodného rozpouštědla

Eluotropic Series of Solvents

Solvent	$E^0(\text{Al}_2\text{O}_3)$	Viscosity, $\text{mN.s.m}^{-2}(20^\circ\text{C})$		
		Boiling pt., $^\circ\text{C}$		UV Cutoff, nm
Pentane	0	36	0.24	210
Cyclohexane	0.04	69	0.98	210
CCl_4	0.18	77	0.97	265
Toluene	0.29	111	0.59	286
Diethyl ether	0.38	35	0.25	218
Chloroform	0.40	62	0.57	245
Dichloromethane	0.42	40	0.44	235
Tetrahydrofuran	0.45	66	0.55	220
2-Butanone	0.51	80	0.32	330
Acetone	0.56	56	0.32	330
1,4-Dioxane	0.56	107	1.44	215
Ethyl acetate	0.58	77	0.45	255
Diethylamine	0.63	115	0.33	275
Acetonitrile	0.65	82	0.37	190
2-Propanol	0.82	82	2.50	210
Ethanol	0.88	78	1.20	210
Methanol	0.95	64	0.59	210
Water	1.00	100	1.0	–

Na co nezapomenout

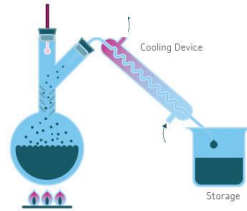
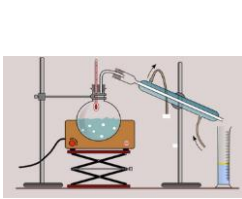
12 Ústav přírodních léčiv

MUNI

12

2. DESTILACE

- za normálního tlaku, sníženého tlaku (s varnými kaménky)



- Hickmanova baňka (límčovka - lobelin)
- s kolonou (rektifikace)
- s vodní parou
- s vodou

13 Ústav přírodních léčiv

MUNI

13

SEPARACE A IZOLACE PŘÍRODNÍCH LÁTEK

3. SUBLIMACE (puriny, chinony)

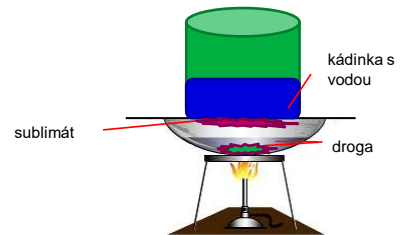
4. KRYSTALIZACE – umění vyžadující zkušenost a zručnost

(Příklad: máme-li ze směsi vykristalizovat látku lipofilní, je vhodné použít pro krystalizaci polární rozpouštědlo, protože z něj bude pro malou rozpustnost krystalizovat nejméně polární látka, ostatní zůstanou v matečném louhu)

5. SRÁŽENÍ

změna polaritý rozpouštědla, změna pH (čištění alkaloidů)
vysolování např. solemi těžkých kovů (Pb a třísloviny)

6. FILTRACE, DIALÝZA



14 Ústav přírodních léčiv

14

Preparativní techniky

- Rychlost
- Čistota
- Výtěžek
- Ekonomika procesu

Čistý materiál v dostatečném množství

Úplná extrakce

Získat co největší množství

Čistota dostatečná pro další zpracování
Eliminace neaktivních látek

Extrakce kapalinou kapalinou



Chromatografie

Efektivní chromatografická separace
Dobrý výtěžek

15 Ústav přírodních léčiv

MUNI

15

Extrakce kapalinou kapalinou – typické schéma



- **Výhody**
- kapacita (low/large scale)
 - Žádné ireversibilní jevy
 - Jednoduchost
 - Levné

- **Nevýhody**
- Tvorba emulzí
 - Omezený počet rozpouštědel
 - Nelze zjednodušeně automatizovat

Úplná extrakce voda/ethanol

Odstranění rozpouštědla pomocí vakua/lyophilizace

Surový extrakt

Rozpuštěný v methanolu → dělicí nálevka → 10 % vody

Hexan/petroletherový podíl

Methanol/vodný podíl

Odstranění methanolu methanol → dělicí nálevka → voda a CHCl_3

Chloroformový podíl

Vodný podíl

Ethylacetát

Ethylacetátový podíl

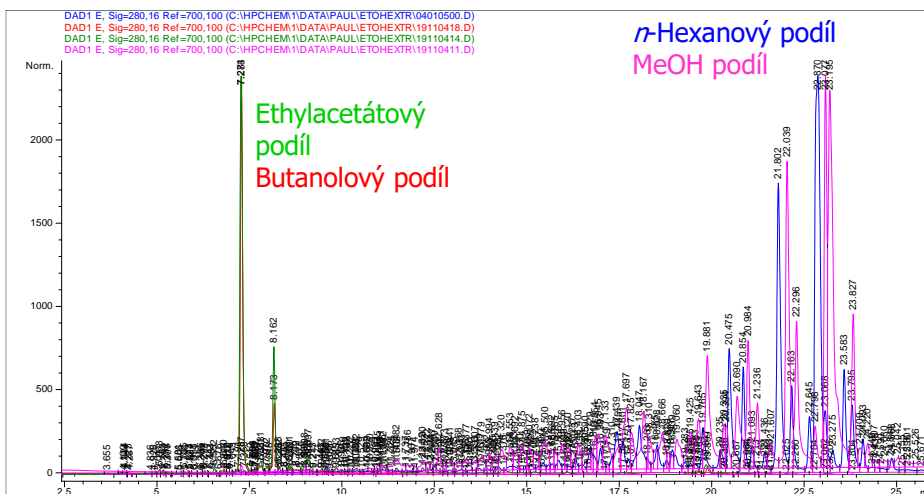
Vodný podíl

16 Ústav přírodních léčiv

MUNI

16

Typický příklad srovnání různých frakcí s rozdílnou polaritou

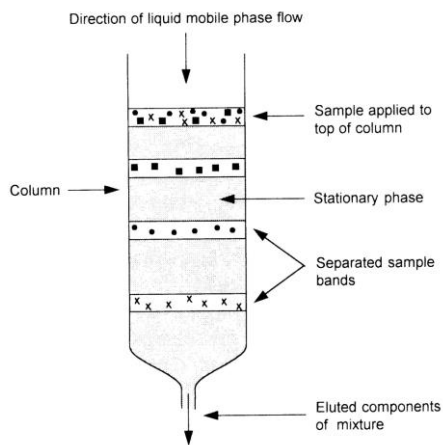


17 Ústav přírodních léčiv

MUNI

17

Sloupcová chromatografie



18 Ústav přírodních léčiv



MUNI

18

Stálý průtok, pokud možno bez přerušení



Vsádka vzorku:

1. kapalný
2. pevný

Důležitá síla vrstvy a množství vzorku

Stacionární fáze:

- Silika gel
- Alumina
- Polyamid

– **Výhody**

- Kapacita (low/large scale)
- Jednoduchost
- Levné
- Jednoduchý setup
- Získání jednoduchých směsí

– **Nevýhody**

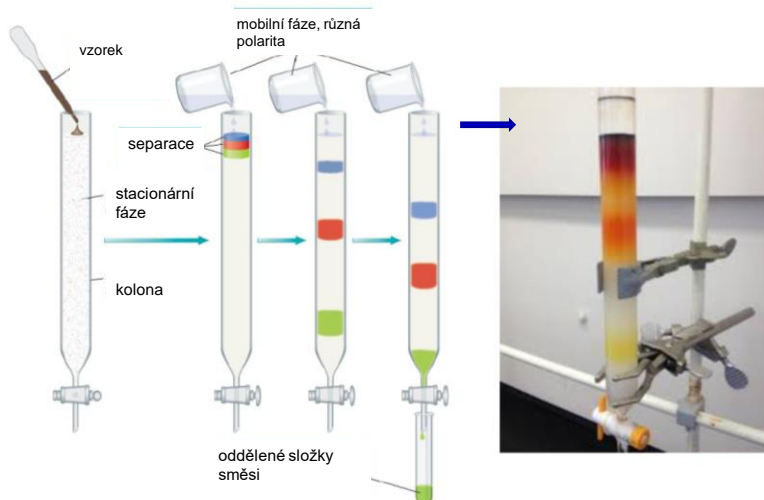
- Není možno jednoduše automatizovat
- Omezený počet vhodných rozpouštědel
- Ireversibilní adsorpce
- Omezené rozlišení

Frakcionace podle objemu, času, detekční metody

19 Ústav přírodních léčiv

MUNI

19



MUNI

20

Sloupcová chromatografie

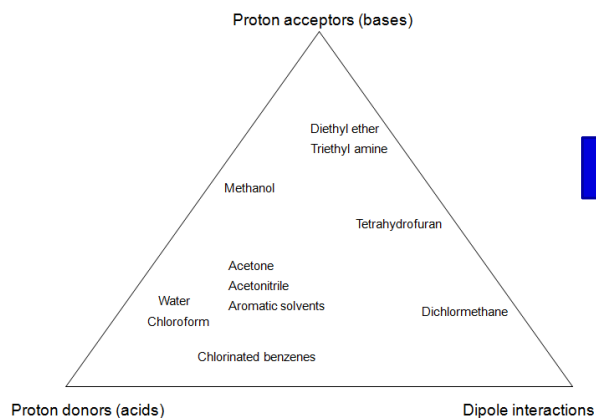
Volba vhodných rozpouštědel

Založeno na TLC

Kombinace 2-3 rozpouštědel

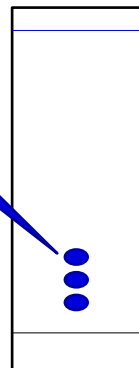
Modifikace acido-bazických poměrů

Vhodný R_f



Dostatečné rozlišení

1/3 výšky desky



MUNI

21 Ústav přírodních léčiv

21



140 cm
60 g of sample
200 fractions
150 ml/fraction



3 × 100 cm
3 × 35 g of sample
300 fractions
120 ml/fraction



2 × 100 cm, 1 × 140 cm
2 × 40 g, 1 × 50 g of sample
300 fractions
120 ml/fraction

22 Ústav přírodních léčiv

MUNI

22

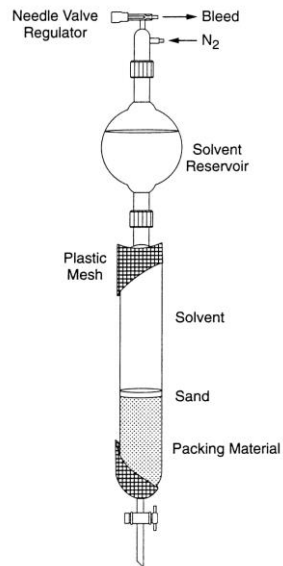


23 Ústav přírodních léčiv

MUNI

23

Flash chromatography



- Advantages
 - Capacity (low/large scale)
 - Simplicity
 - Cheap
 - Simple set up
 - Obtaining simple mixtures or pure compounds

24 Ústav přírodních léčiv

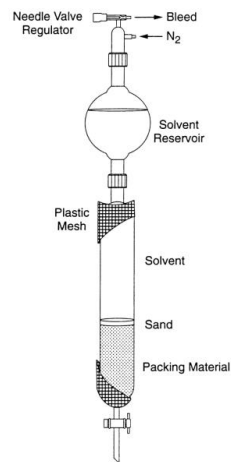
MUNI

24

Flash chromatografie



25 Ústav přírodních léčiv



MUNI

25

Preparativní HPLC

- High **performance liquid** chromatography
- High **pressure liquid** chromatography
- Highly **problematic leaking** chromatography
- Relativně velké operační tlaky v systému
- Relativně velké průtoky mobilní fáze
- Relativně malá velikost částic stacionární fáze

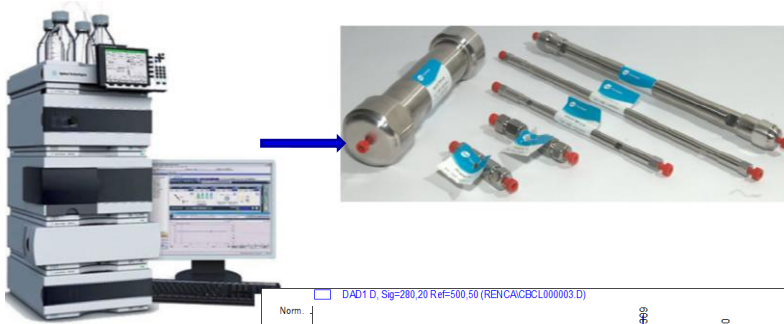


- Extrémně vysoké rozlišení
- Velmi rychlý proces
- Mnoho způsobů kontroly separace – detekce látek
- Možnost up-scale procesu

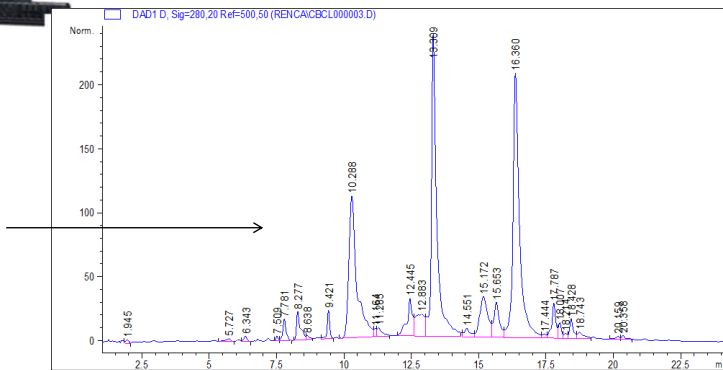
26 Ústav přírodních léčiv

MUNI

26



27 Ústav přírodních léčiv

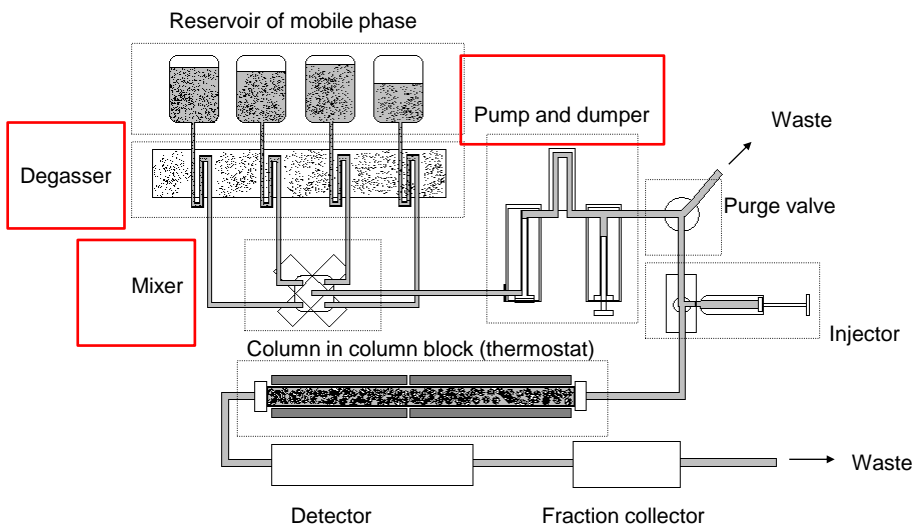


MUNI

27

MUNI

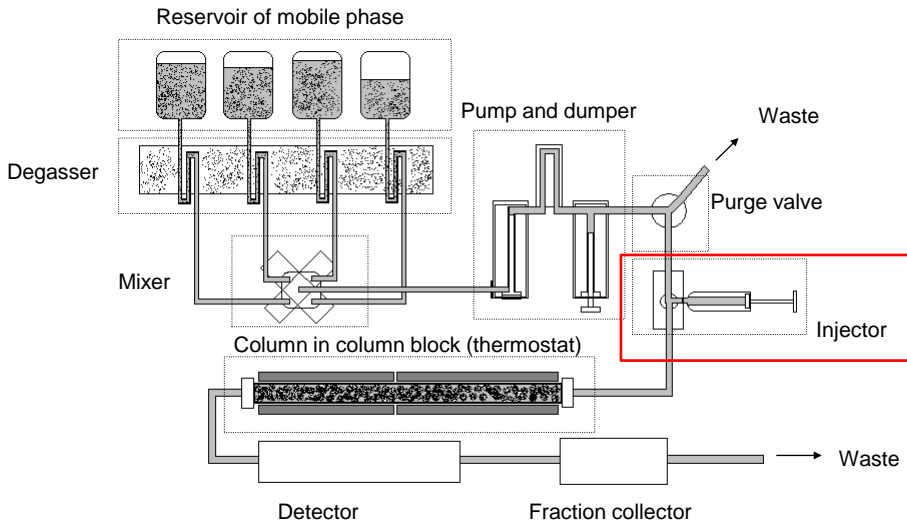
Schéma HPLC



28 Ústav přírodních léčiv

28

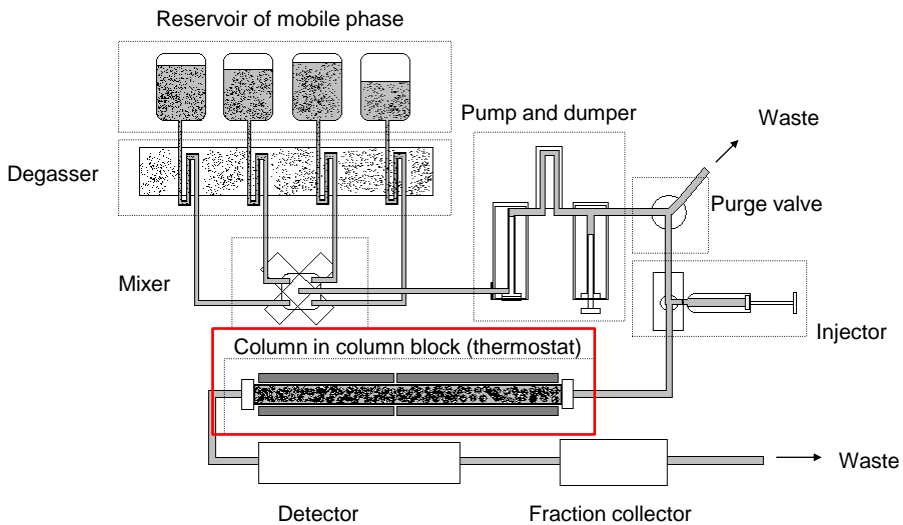
Scheme of HPLC



29 Ústav přírodních léčiv

29

Scheme of HPLC



30 Ústav přírodních léčiv

30



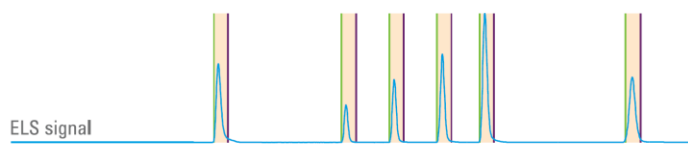
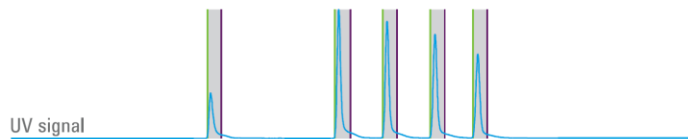
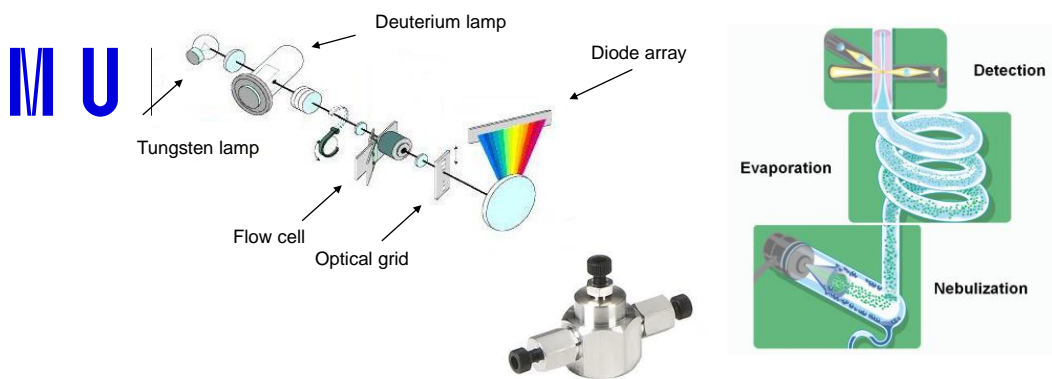
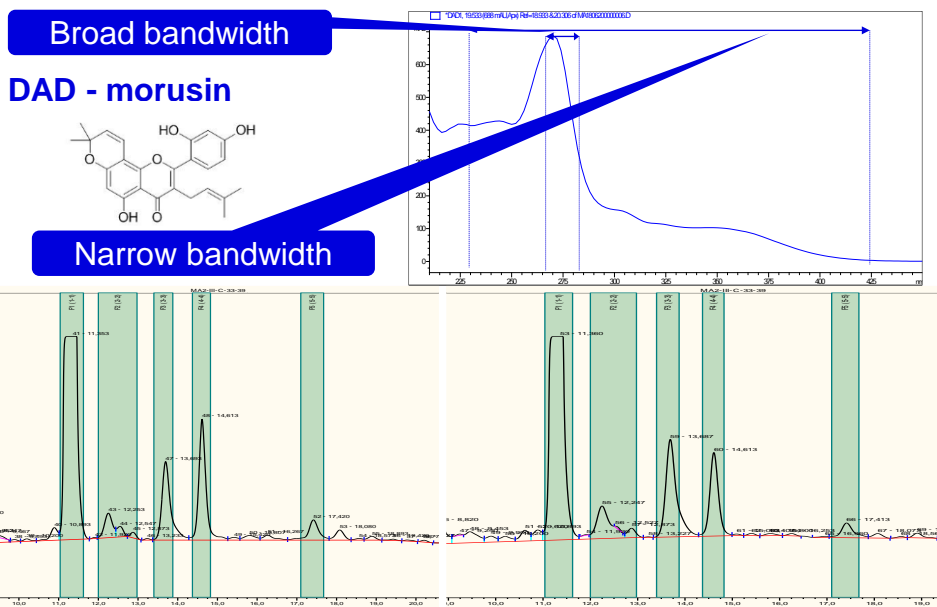
<https://www.scas.co.jp/en/insrtuments-products-synthesis/hplc-column/>

Typické průtoky, rozměry kolon a separovaná množství

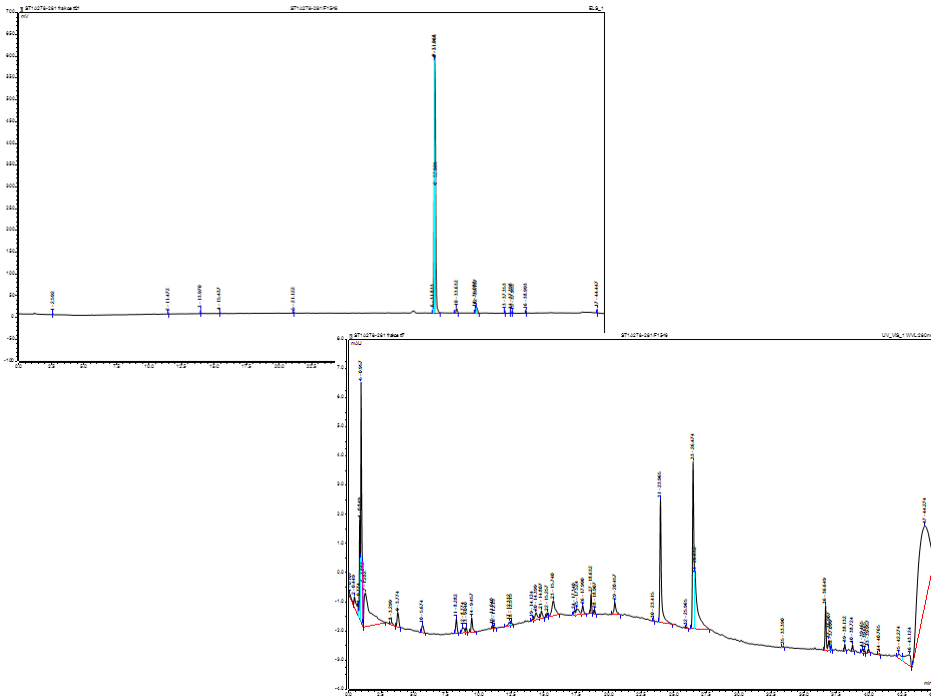
	Analytical Scale		Semipreparative Scale		Preparative Scale		Pilot Separation		
Rozsah množství [mg]	1-15	7-70	30-300	64-640	180-1800	400-4000	700-7000	600-16000	2800-28000
Vnitřní průměr kolony [mm]	4.6	0,8-2.0							
	9.4	4-10							
	21.2		18-42						
	30			34-85					
	50				94-236				
	75					212-931			
	100						378-945		
	150							800-2100	
	200								1100-3375

Množství je selektováno na základě množství stacionární fáze: typicky 0,1-1 %.

Adapted from: Principals and practical aspects of preparative liquid chromatography. H. Schulenberg-Schell, Andreas Tei.



Adapted from: *Principals and practical aspects of preparative liquid chromatography*. H. Schulenberg-Schell, Andreas Tei.

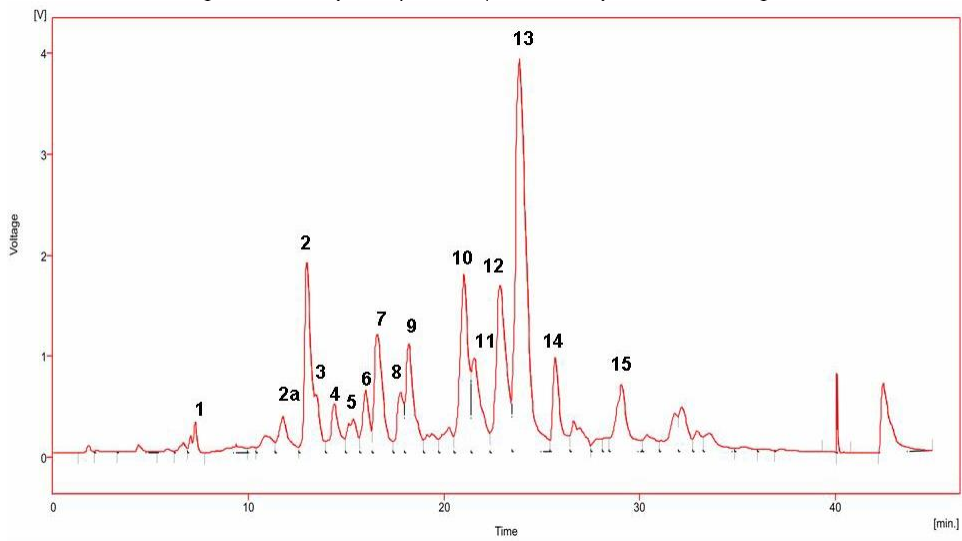


MUNI

35

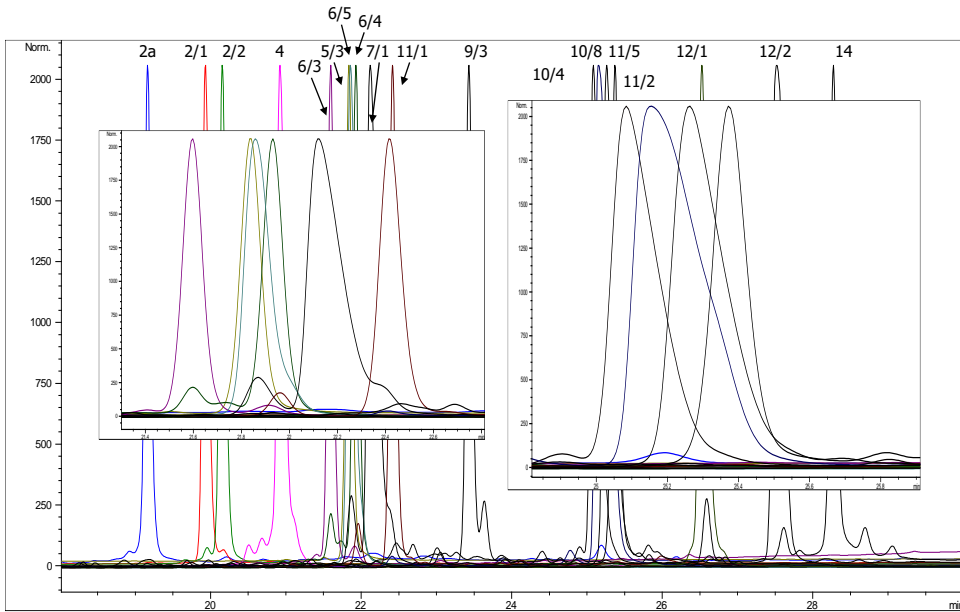
MUNI

MeOH part of *M. alba* extract
 Preparative chromatography on reversed phase
 Supelcosil ABZ+Plus, gradient of 0.2% HCOOH and ACN



36

Detailed depiction of preparative HPLC

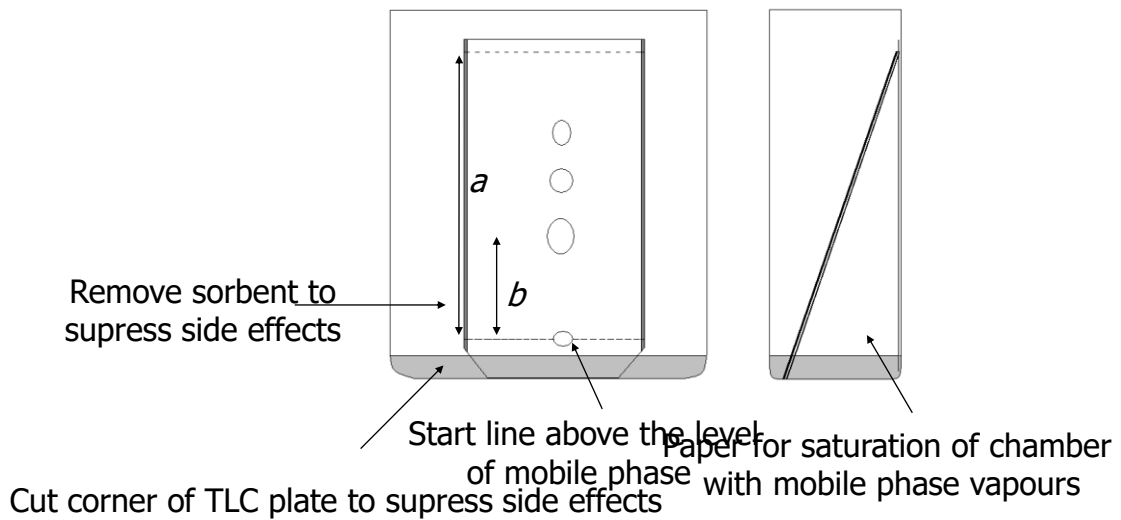


MUNI

37

MUNI

Thin layer chromatography



38

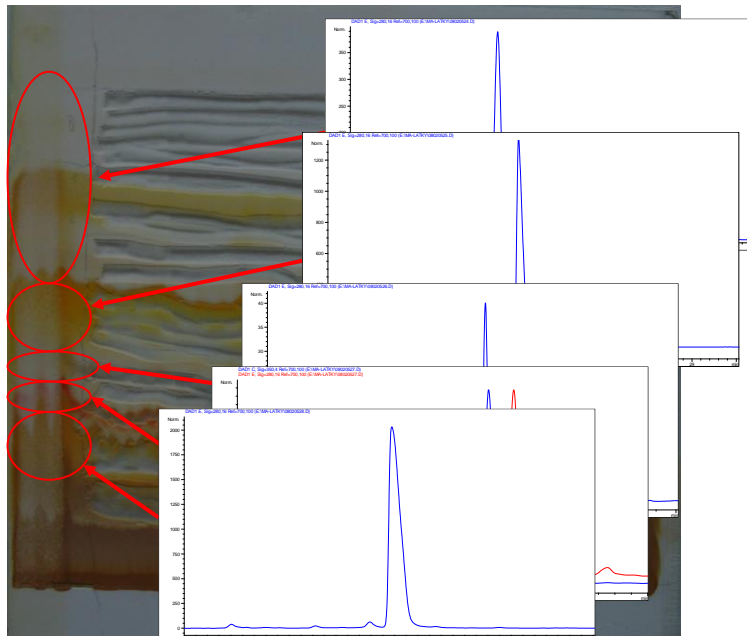
Preparative TLC



MUNI

39

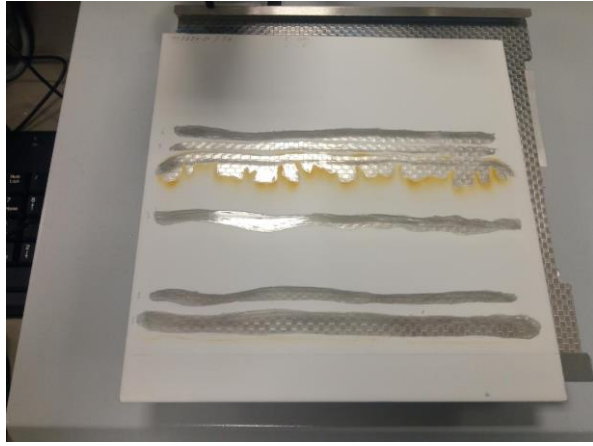
Preparative Thin layer chromatography contra preparative HPLC



MUNI

40

Preparativní TLC



- **Výhody**
 - Kapacita (low/large scale)
 - Jednoduchost
 - Jednoduché nastavení separace
 - Získání velmi jednoduchých směsí nebo čistých látek

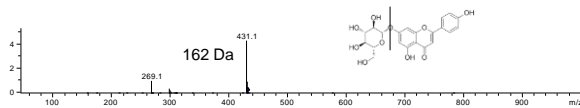
MUNI

41

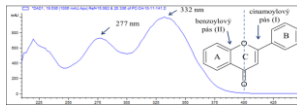
CHARAKTERISTIKA A IDENTIFIKACE

Metody identifikace chemické struktury

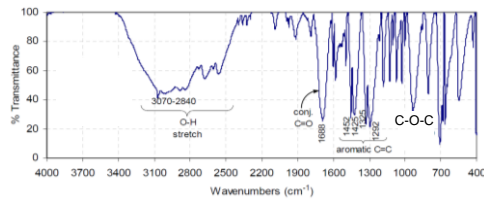
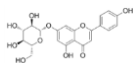
- Hmotnostní spektrometrie
metoda pro určování hmotností molekul a jejich částí, jež je třeba k tomu účelu převést na kladné nebo záporné ionty.



- Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (sleduje změny které vznikají interakcí s elektromagnetickým monochromatickým zářením); UV 180-400 nm; VIS 400-750 nm;



- Absorpční spektrofotometrie v infračervené oblasti
Záznam spekter v oblasti od 4000 cm⁻¹ do 650 cm⁻¹ (2,5 μm až 15 μm)

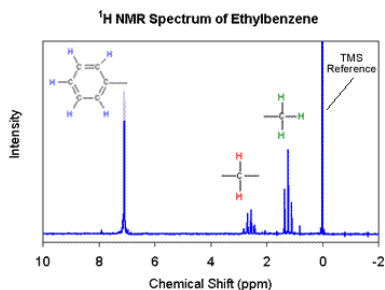


MUNI

42

Metody identifikace chemické struktury

- Ramanova spektrometrie – sledují se změny ve vibračních stavech molekuly, vyvolané interakcí látky s fotony (laser), záznam spekter v oblasti od 4000 cm^{-1} do 13 000 cm^{-1}
- Nukleární magnetická rezonanční spektrometrie ^1H , ^{13}C NMR – zkoumá interakce atomových jader s nenulovým spinem s magnetickým polem, sleduje rozdělení energií jaderného spinu v magnetickém poli a přechody mezi jednotlivými spinovými stavy vyvolané zářením



- ORD – optická rotační disperze – závislost optické otáčivosti na vlnové délce
 - CD – cirkulární dichroismus – rozdíl absorpance vlevo a vpravo cirkulárně polarizovaného světla
 - RTG – rentgen strukturní analýza
- metoda studující interakce krystalických vzorků s rentgenovým zářením

MUNI

43

Parametry

% jistoty	Potřebná množství látky		
	μg	mg	g
90		NOESY, COESY	RTG TOTÁLNÍ SYNTÉZA DEGRADACE PŘÍPRAVA DERIVÁTŮ
70		HRMS	ORD
50	^1H NMR Raman	^{13}C NMR	CD
30	MS HPLC GC	UV	IR
10	TLC		

MUNI

44