

MASARYKOVA
UNIVERZITA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

**Fytochemická analýza
vybraných částí *Ficus*
species III**

Diplomová práce

DENISA WITTEKOVÁ

Vedoucí práce: PharmDr. Milan Malaník, Ph.D.

Ústav přírodních léčiv
Program Farmacie

Brno 2024

MUNI
PHARM

Bibliografický záznam

Autor: Denisa Witteková
Farmaceutická fakulta
Masarykova univerzita
Ústav přírodních léčiv

Název práce: Fytochemická analýza vybraných částí *Ficus species III*

Studijní program: Farmacie

Vedoucí práce: PharmDr. Milan Malaník, Ph.D.

Rok: 2024

Počet stran: 73

Klíčová slova: *Ficus elastica*, *Ficus microcarpa*, *Ficus binnendijkii*, HPLC-ELSD, flash chromatografie

Bibliographic record

Author: Denisa Witteková
Faculty of Pharmacy
Masaryk University
Department of Natural Drugs

Title of Thesis: Phytochemical analysis of selected parts of *Ficus* species III

Degree Programme: Pharmacy

Supervisor: PharmDr. Milan Malaník, Ph.D.

Year: 2024

Number of Pages: 73

Keywords: *Ficus elastica*, *Ficus microcarpa*, *Ficus binnendijkii*, HPLC-ELSD, flash chromatografie

Anotace

Diplomová práce se zaměřuje na izolaci a identifikaci látek, které neabsorbují UV záření, z vybraných částí rostlin rodu *Ficus* (*F. binnendijkii* 'Alii', *F. binnendijkii* 'Amstel Gold', *F. microcarpa*, *F. elastica* 'Decora'). Teoretická část popisuje botanickou charakteristiku, rozšíření, fytochemický profil a biologickou aktivitu vybraných druhů. Experimentální část se zabývá analýzou celkových extraktů, na základě které byl k dalšímu zpracování vybrán extrakt z listů *F. elastica* 'Decora'. Pracovalo se s hexanovým podílem, z kterého byly pomocí flash chromatografie a semipreparativní HPLC získány čtyři látky neabsorbující UV záření. Předběžná identifikace proběhla pomocí IČ spektroskopie. Konečnou strukturu se nám podařilo určit metodou NMR pouze u jedné látky, která byla identifikována jako kyselina palmitová. Dvě látky byly určeny jako triterpeny lupanového typu a jednu se nám kvůli nízkému výtěžku identifikovat nepodařilo.

Abstract

The diploma thesis focuses on the isolation and identification of substances that do not absorb UV radiation from selected parts of *Ficus* species (*F. binnendijkii* 'Alii', *F. binnendijkii* 'Amstel Gold', *F. microcarpa*, *F. elastica* 'Decora'). The theoretical part describes the botanical characteristics, distribution, phytochemical profile and biological activity of the selected species. The experimental part deals with the analysis of crude extracts, on the basis of which the extract of the leaves of *F. elastica* 'Decora' was selected for further processing. We worked with the hexane fraction, from which four compounds not absorbing UV were obtained by flash chromatography and semi-preparative HPLC. Preliminary identification was made by infrared spectroscopy. We were able to determine the final structure by NMR for only one substance, which was identified as palmitic acid. Two substances were identified as lupane-type triterpenes and one we were unable to identify due to low yield.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Fytochemická analýza vybraných částí *Ficus species III*** zpracovala sama. Veškeré prameny a zdroje informací, které jsem použila k sepsání této práce, byly citovány v textu a jsou uvedeny v seznamu použitých pramenů a literatury.

V Brně 15. dubna 2024

.....
Denisa Witteková

Poděkování

Poděkovat bych chtěla zejména mému školiteli PharmDr. Milanu Malaníkovi, Ph.D. za jeho neochvějnou trpělivost, cenné rady, milý přístup a také za jeho podporu při psaní této diplomové práce. Díky patří i mé rodině, která při mně po celou dobu stála.

Obsah

Seznam obrázků	13
Seznam tabulek	15
Seznam pojmů a zkratk	16
1 Úvod a cíl práce	17
2 Teoretická část	18
2.1 Botanická charakteristika čeledi Moraceae.....	18
2.2 Charakteristika rodu <i>Ficus</i>	18
2.3 <i>Ficus elastica</i> Roxb. ex Hornem.....	19
2.4 <i>Ficus microcarpa</i> L. f.....	27
2.5 <i>Ficus binnendijkii</i> Miq.	36
3 Experimentální část	40
3.1 Použitý materiál a přístroje	40
3.2 Výsledky a diskuse.....	42
4 Závěr	62
Použité zdroje	64

Seznam obrázků

Obr. 1: <i>Ficus elastica</i> 'Variegata'	19
Obr. 2: Plod <i>F. elastica</i>	20
Obr. 3: Výskyt <i>F. elastica</i>	21
Obr. 4: Kaempferin	24
Obr. 5: Kvercitrin.....	24
Obr. 6: Feroxidín.....	25
Obr. 7: Kyselina ficuselastiková.....	25
Obr. 8: Corchoionosid C.....	25
Obr. 9: Kyselina chlorogenová	26
Obr. 10: Elastichinon	26
Obr. 11: Biochanin A.....	26
Obr. 12: <i>F. microcarpa</i>	27
Obr. 13: Výskyt <i>F. microcarpa</i>	29
Obr. 14: Prokyanidin B3.....	31
Obr. 15: <i>p</i> -Vinylguaiacol.....	31
Obr. 16: Rutin	32
Obr. 17: Luteolin.....	32
Obr. 18: Kyselina kávová.....	32
Obr. 19: Ficuflavosid.....	33
Obr. 20: Ficuseskvilignan.....	33
Obr. 21: Ficusal	34
Obr. 22: Bridelionosid B.....	34
Obr. 23: Ficumegasosid	34
Obr. 24: $20\alpha,20\alpha$ -epoxytaraxastan- 3β -ol	35
Obr. 25: 3β -acetoxy- $11\alpha,12\alpha$ -epoxy-16-oxo-14-taraxeren.....	35
Obr. 26: 3β -acetoxy- 11α -ethoxy-12-oleanen.....	36
Obr. 27: <i>Ficus binnendijkii</i>	36
Obr. 28: Plod <i>F. binnendijkii</i>	37
Obr. 29: Výskyt <i>F. binnendijkii</i>	38
Obr. 30: β -Amyrin	39
Obr. 31: Moretenol	39
Obr. 32: HPLC-ELSD chromatogramy <i>F. binnendijkii</i> 'Alii'	44
Obr. 33: HPLC-ELSD chromatogramy <i>F. binnendijkii</i> 'Amstel Gold'	44
Obr. 34: HPLC-ELSD chromatogramy <i>F. microcarpa</i>	45
Obr. 35: HPLC-ELSD chromatogramy <i>F. elastica</i> 'Decora'	46
Obr. 36: Liquid-liquid extrakce.....	47
Obr. 37: HPLC-ELSD chromatogramy jednotlivých podílů.....	48
Obr. 38: Flash chromatograf puriFlash® 5.250	49
Obr. 39: TLC hexanového podílu.....	50
Obr. 40: TLC frakcí získaných flash chromatografií	51
Obr. 41: Chromatogram frakce FE-12-50.....	51

Obr. 42: Chromatogram frakce FE-7-11.....	53
Obr. 43: TLC subfrakcí získaných z FE-7-11.....	54
Obr. 44: Chromatogram subfrakce FE-(7-11)-12-18.....	55
Obr. 45: HPLC-ELSD chromatogram látky FE-12-50-A.....	56
Obr. 46: IČ spektrum látky FE-12-50-A.....	57
Obr. 47: Kyselina palmitová.....	57
Obr. 48: HPLC-ELSD chromatogram látky FE-(7-11)-12-18-A.....	58
Obr. 49: HPLC-ELSD chromatogram látky FE-(7-11)-12-18-B.....	59
Obr. 50: IČ spektrum látky FE-(7-11)-12-18-B.....	60
Obr. 51: HPLC-ELSD chromatogram látky FE-(7-11)-12-18-C.....	60
Obr. 52: Struktura derivátu lupeolu.....	61

Seznam tabulek

Tab. 1: Výtěžky extraktů <i>F. binnendijkii</i> 'Alii'	42
Tab. 2: Výtěžky extraktů <i>F. binnendijkii</i> 'Amstel Gold'	42
Tab. 3: Výtěžky extraktů <i>F. microcarpa</i>	42
Tab. 4: Výtěžky extraktů <i>F. elastica</i> 'Decora'	42
Tab. 5: Parametry metody použité při analýze HPLC-ELSD.....	43
Tab. 6: Hmotnosti jednotlivých podílů	48
Tab. 7: Zkoušené kombinace rozpouštědel pro mobilní fázi	49
Tab. 8: Hmotnosti frakcí získaných flash chromatografií.....	50
Tab. 9: Parametry metody použité při separaci frakce FE-12-50.....	52
Tab. 10: Zkoušené kombinace rozpouštědel pro mobilní fázi.....	53
Tab. 11: Hmotnosti subfrakcí získaných separací frakce FE-7-11.....	54
Tab. 12: Parametry metody použité při separaci subfrakce FE-(7-11)-12-18	55
Tab. 13: Hmotnosti látek získaných ze subfrakce FE-(7-11)-12-18	56

Seznam pojmů a zkratk

IC ₅₀	- koncentrace způsobující 50% inhibici
CHCl ₃	- chloroform
MIC	- minimální inhibiční koncentrace
ORAC	- oxygen radical absorbance capacity
MeOH	- methanol
HPLC	- vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DAD	- detektor s diodovým polem
B16F10	- buněčná linie myšího melanomu
DPPH	- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS	- 2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonová kyselina)
PMS	- 5-metylfenaziniummethylsulfát
NADH	- nikotinamidadenindinukleotid
EtOAc	- ethylacetát
PtE	- petrolether
TLC	- tenkovrstvá chromatografie
DMSO	- dimethylsulfoxid
UV	- ultrafialové záření
IČ	- infračervené záření
NMR	- nukleární magnetická rezonance
ELSD	- evaporative light scattering detector
THF	- tetrahydrofuran
HCOOH	- kyselina mravenčí
FE	- <i>F. elastica</i>
t _R	- retenční čas

1 Úvod a cíl práce

Rod *Ficus* (česky fíkovník) se řadí mezi jeden z nejpočetnějších rodů v rostlinné říši a jeho zástupce můžeme najít v tropech a subtropích celého světa, zejména pak v Asii a Africe. Jednotlivé druhy se od sebe liší nejen vzhledem, ale také obsahovými látkami, proto jejich účinky nelze generalizovat. Pro přesnou představu o účincích by bylo potřeba každý jednotlivý druh řádně prozkoumat. To se v současnosti děje pouze u malého zlomku druhů, přestože jsou fíkovníky již odedávna využívány v tradičním lidovém léčení na řadu zdravotních problémů.

Dalším důvodem pěstování fíkovníků je bezesporu jejich atraktivní vzhled. Díky tomu můžeme mnoho druhů najít v domácnostech, parcích či zahradách, kde jsou pěstovány jako okrasné rostliny. V potravinářství pak nachází využití např. *Ficus carica*, jehož plody jsou s oblibou konzumovány čerstvé, sušené i jako přísada do různých pokrmů. Tato diplomová práce pojednává o druhu *Ficus elastica*, který byl dříve hojně využíván k získávání kaučuku, tuto funkci dnes však již plně převzal druh *Hevea brasiliensis*.

Rod *Ficus* patří do čeledi Moraceae, se kterou dlouhodobě pracují výzkumníci Ústavu přírodních léčiv Farmaceutické fakulty Masarykovy univerzity. Tato čeleď je typická prenylovanými flavonoidy, které disponují např. protizánětlivými a cytotoxickými účinky. Jelikož v předchozích diplomových pracích byly popsány i látky, které neabsorbují UV záření, rozhodli jsme se jimi zabývat v této diplomové práci.

Teoretická část čtenáře seznámí s botanickou charakteristikou, rozšířením, obsahovými látkami a bioaktivitou každého druhu, experimentální část pak bude zaměřena na samotné zpracování rostlin a analýzu celkových extraktů. Na základě toho bude vybrán druh, který je nejvíce bohatý na látky, které neabsorbují UV záření, což je také cílem této diplomové práce. Látky budou následně izolovány a identifikovány pomocí různých chromatografických metod.

2 Teoretická část

2.1 Botanická charakteristika čeledi Moraceae

Jedná se o velice početnou čeleď sestávající z asi 40 rodů a více než 1100 druhů rostlin. Čeleď je dosti rozmanitá, jejími zástupci jsou opadavé nebo stálezelené stromy, keře, byliny i liány. V rostlinách můžeme často najít mléčně bílou mizu, tzv. latex. Listy jsou povětšinou střídavé, vzácně mohou růst protistojně nebo v přeslenu, přítomny jsou také palisty. Okraje listů jsou celokrajné, zubaté nebo laločnaté, žilnatina je zpeřená nebo dlanitá. Květenstvím je hlávka, hrozen nebo vrcholík, květy jsou jednopohlavné, jednodomé nebo dvoudomé, drobné, často uzavřené do útvaru zvaného syconium. Plodenství bývají velká a nápadná. Zástupci čeledi Moraceae jsou nejvíce rozšířené v tropech a subtropích, méně pak v oblastech mírného pásma. Dobře se jim daří zejména v Asii [1].

2.2 Charakteristika rodu *Ficus*

Ficus je rod vyšších dvouděložných rostlin sestávající z více než 850 druhů, což z něj činí nejpočetnější rod čeledi Moraceae. Jedná se o stromy, keře nebo liány ronící bíle zbarvenou tekutinu (latex), často s přítomnými adventivními (přídavnými) kořeny. Listy jsou většinou střídavé, výjimečně protistojné. Květenství s mnoha nenápadnými květy je uzavřeno ve specializovaném dužnatém útvaru nazývaném syconium (zjednodušeně fík) [2–4]. Tyto květy jsou opylovány tzv. fíkovníkovými vosičkami z čeledi *Agaonidae*, přičemž jeden druh fíkovníku je obvykle opylován jen jedním druhem vosičky [5]. Tomuto typu mezidruhového vztahu se říká obligátní mutualismus. Opylovačem je zde vždy samička, která se do fíku dostane skrz malý otvor zvaný ostiola. Poté hledá vhodné květy, do kterých by nakladla vajíčka. Touto činností uvnitř syconia roznáší pyl, který si přinesla z fíku, ve kterém se narodila, čímž opyluje další květy [6]. Po několika týdnech se začne líhnout potomstvo. Samci žijí jen pár hodin a jejich jedinou úlohou je oplodnit nově narozené samičky. Ty následně obalené pylem opouští syconium a vydávají se hledat další fík, do něhož by nakladly svá vajíčka [6, 7].

Rod *Ficus* se dále dělí na šest podrodů: *Pharmacosycea*, *Ficus*, *Synoecia*, *Sycidium*, *Sycomorus* a *Urostigma* [8].

2.3 *Ficus elastica* Roxb. ex Hornem



Obr. 1: *Ficus elastica* 'Variegata'

2.3.1 Botanická charakteristika

Ficus elastica, česky nazývaný fíkovník pryžodárný, je až 30 m vysoký strom vyznačující se velkým počtem vzdušných kořenů. Produkuje množství mléčně bílého latexu, na jehož základě si získal název „Indian rubber tree“ [3, 6, 9, 10]. Olistěné větvičky jsou 3–5 mm silné, lysé, případně mírně chlupaté, s listy spirálovitě uspořádanými. Velké lesklé kožovité listy mohou být až 40 cm dlouhé a 22 cm široké, čepel je oválná až vejčitá, s krátkou, ale jasně zřetelnou špičkou. Střední žíla je zabarvena do červena, zatímco laterální žíly jsou jen málo zřetelné. Plody o velikosti 1,2 × 0,8 cm vyrůstají z paždí listů nebo těsně pod listy, a to v párech, vzácně jednotlivě. Zrají do žluté až khaki barvy s tmavě hnědými skvrnami na povrchu [3, 6, 9].

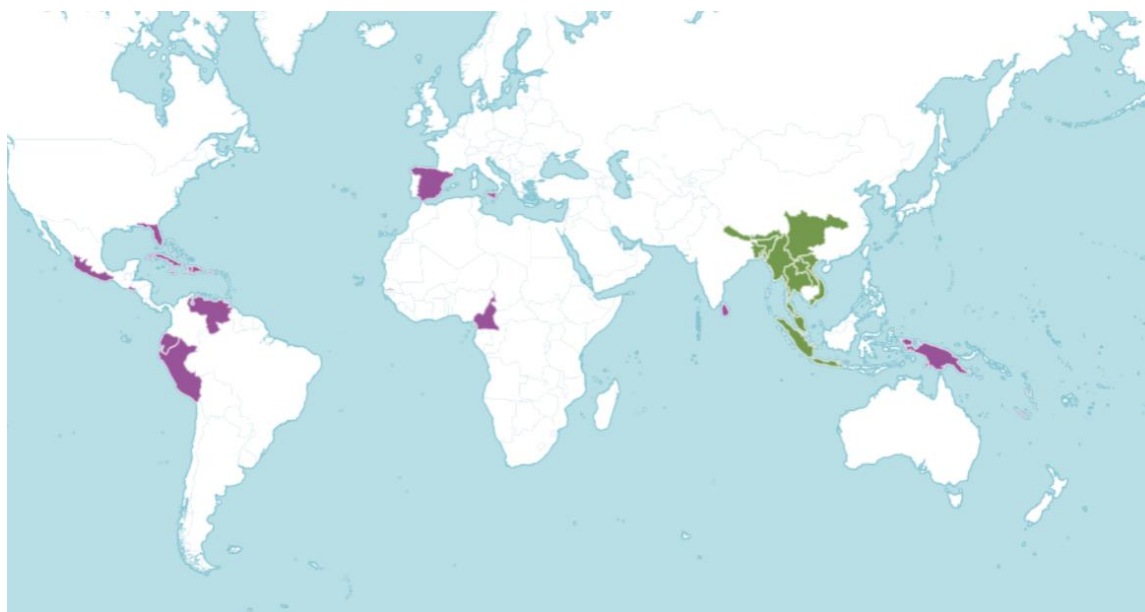


Obr. 2: Plod *F. elastica* [11]

2.3.2 Rozšíření

Druh je původní v zemích a oblastech jižní a jihovýchodní Asie, jako je například Assam, Bangladéš, podhůří východních Himalájí, Laos, Malajsie, Myanmar, Jáva, Sumatra, Thajsko nebo Vietnam. Do dalších níže vyobrazených oblastí (Obr. 3) byl zavlečený. Jako příklad si můžeme uvést Srí Lanku, Novou Guineu, Španělsko, Sicílii, Mexiko, Floridu nebo Venezuelu [12]. *F. elastica* upřednostňuje vyšší nadmořské výšky od 800 do 1150 m n. m. Je schopný přežít i za extrémně náročných podmínek, problém mu nedělají vysoké teploty ani nedostatek vláhy [13].

Je s podivem, že po mnoho let nebyl tento druh v Thajsku považován za původní. K zajímavému zjištění dospěl tým vědců z Národního přírodovědného muzea a Přírodní rezervace Thung Yai v Thajsku. Společně prozkoumali ty nejhlubší části pralesa v regionu Umphang, až objevili rostliny, které vykazovaly značnou podobnost s *F. elastica*. Později bylo potvrzeno, že tyto exempláře opravdu patří k druhu *F. elastica*. Díky tomu je dnes tento fíkovník považován v Thajsku za domácí [14].

Obr. 3: Výskyt *F. elastica* [12]

2.3.3 Využití

Fíkovník pryžodárný má nesmírně široké využití v lidovém léčení. Bylinkáři v západní Africe jej např. používají k úlevě od bolesti kloubů a svalů [15], v Indonésii zase proti žaludečním vředům a revmatismu [13].

Podle dostupných zdrojů, různé části rostliny vykazují rozličné účinky na zdraví, kupříkladu listy tohoto fíkovníku se osvědčily v léčbě různých infekcí, iritací a alergií kůže [16]. Kůra a vzdušné kořeny naproti tomu nachází uplatnění jako hemostyptikum, jelikož tyto rostlinné části obsahují látky s adstringentním působením. Dobře tak zastavují krvácení a napomáhají lepšímu hojení drobných ran a škrábaců. Nesmíme opomenout ani latex, který by měl pomáhat při tuberkulóze, bolestech zad a problémech s hemoroidy nebo otoky [17].

Latex z *F. elastica* se dříve hojně využíval jako surovina k výrobě kaučuku (gumy). Z důvodu nepříliš vysoké výtěžnosti a složitosti celého procesu však tuto úlohu plně převzala konkurenční rostlina pocházející z čeledi Euphorbiaceae, *Hevea brasiliensis* (neboli kaučukovník brazilský) [18, 19]. V minulosti však byla tato mléčná šťáva blíže zkoumána a ukázalo se, že by její využití mohlo spočívat ve výrobě bezpečného paliva, které by neznečišťovalo životní prostředí [20].

F. elastica můžeme také najít v mnoha domácnostech, kde si ho lidé pěstují pro jeho velké dekorativní listy jako pokojovou rostlinu. V dnešní době již existuje řada kultivarů s různě skvrnitými a barevnými listy. V teplejších oblastech může být vysazován i ve venkovních prostorech, kde za vhodných podmínek poměrně rychle roste a vytváří také větší množství vzdušných kořenů [21].

2.3.4 Biologická aktivita extraktů

Rostliny rodu *Ficus* jsou již odedávna využívány v lidovém léčitelství pro své široké spektrum účinků. Mimo jiné našly své uplatnění i jako anthelmintika a výjimkou není ani *F. elastica* [22]. Existuje několik studií, které se zaměřují právě na jeho anthelmintickou a antiparazitickou aktivitu. Zkoumány byly také účinky proti bakteriím a schopnost vychytávat kyslíkové radikály.

Antiplasmodiální aktivita

Methanolický extrakt vzdušných kořenů (25 µg/ml) snižoval viabilitu *Plasmodium falciparum* a dosahoval hodnoty IC₅₀ 9,5 µg/ml. Jako srovnávací léčivo byl použit chlorochin, jehož hodnota IC₅₀ byla 7,9 nM [23]. V druhé studii byl zkoumán extrakt kůry v koncentracích 100, 200 a 400 mg/kg na myších. Nutno podotknout, že z dostupné literatury není zcela jasné, zda se jednalo o extrakt vodný nebo methanolický. Referenční látkou byl opět chlorochin v koncentraci 10 mg/kg. Z testování vyplynulo, že extrakty o koncentraci 100 a 200 mg/kg dosahovaly srovnatelné aktivity jako chlorochin, kdežto u koncentrace 400 mg/kg nebyl zaznamenán výraznější účinek [17]. Z výsledků lze říci, že *F. elastica* vykazoval uspokojivou antiplasmodiální aktivitu a má tak potenciál v léčbě malárie.

Antitrypanosomální aktivita

Studie se zaměřuje na testování aktivity methanolického extraktu vzdušných kořenů (25 µg/ml) vůči *Trypanosoma brucei brucei*. Extrakt významně snižoval viabilitu *T. brucei brucei* (IC₅₀ 0,9 µg/ml), zatímco referenční léčivo pentamidin vykazovalo hodnotu IC₅₀ 0,17 nM [23]. Přesto lze konstatovat, že *F. elastica* má slibnou antitrypanosomální aktivitu. Vzhledem k nedostatku dostupných informací je však vhodný další výzkum.

Antischistosomální aktivita

V další studii byl zkoumán latex *F. elastica*. Nejdříve byl extrakcí větviček získán vodný extrakt s obsahem latexu, který byl následně přefiltrován a vysušen. Poté bylo třeba zbavit extrakt toxických látek pocházejících z latexu, které znemožňovaly perorální (p.o.) podání. Toho bylo docíleno promytím 85% methanolem [15].

Dalším krokem bylo p.o. podání extraktu myším infikovaným parazitem *Schistosoma mansoni* v dávce 1500 mg/kg rozdělené do tří po sobě jdoucích dnů. Zjistilo se, že tato léčba neměla žádný efekt na počet helmintů v těle. To bylo s největší pravděpodobností způsobeno inhibicí cysteinových proteáz (které se z velké části podílí na farmakologickém účinku latexu [24]) žaludečními kyselinami. Na základě tohoto zjištění byly infikované myši premedikovány ranitidinem (30 mg/kg), a to hodinu před podáním samotného extraktu. U těchto myší bylo následně pozorováno

snížení počtu parazitů o 16,71 %, čímž byl prokázán antischistosomální účinek *F. elastica* [15].

Antibakteriální aktivita

V tomto případě byl zkoumán celkový extrakt kůry vzdušných kořenů *F. elastica*. Jako extrakční činidlo posloužil CHCl_3 a methanol v poměru 1:1. Testována byla účinnost extraktu proti různým mikrobům mikrodiluční metodou, což je standardní metoda pro testování účinnosti antibiotik. Referenční sloučeninou byl v tomto případě gentamicin. Experiment prokázal uspokojivou baktericidní a bakteriostatickou aktivitu. Lepší účinnost než referenční léčivo vykazoval extrakt proti bakteriím *Staphylococcus saprophyticus* a *Klebsiella pneumoniae*, naopak nejnižší aktivita byla sledována proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Z extraktu byly navíc izolovány látky, které taktéž vykazovaly různě velkou míru antimikrobiální aktivity. Látka ficusamid velice efektivně působila proti *S. saprophyticus* s MIC 3 $\mu\text{g/ml}$ oproti gentamicinu (980 $\mu\text{g/ml}$) a látka elastikosid významně inhibovala aktivitu bakterie *Enterococcus faecalis* s MIC o hodnotě 30 $\mu\text{g/ml}$ ve srovnání s gentamicinem (980 $\mu\text{g/ml}$) [25].

Antioxidační aktivita

Testování byl podroben methanolický, ethylacetátový, *n*-hexanový a vodný extrakt listů *F. elastica*. Pro zjištění schopnosti vzorků vychytávat kyslíkové radikály byla použita metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Jako referenční látka sloužil tzv. Trolox, což je syntetický analog vitamínu E, u něhož je známa antioxidační aktivita [16].

Nejpotentnější antioxidační aktivitu vykazoval vodný (5 $\mu\text{g/ml}$) a ethylacetátový extrakt (5 $\mu\text{g/ml}$). Na základě tohoto zjištění byly tyto podíly vybrány pro izolaci bioaktivních látek. Cílem této studie tedy bylo nejen prozkoumání antioxidačních účinků *F. elastica*, ale také fytochemický screening vybraných podílů a následná izolace sloučenin [16], které jsou blíže popsány v podkapitole 2.3.5.

2.3.5 Fytochemický profil

Ačkoliv patří *F. elastica* k velmi oblíbeným okrasným rostlinám, prozatím neexistuje příliš mnoho kvalitních studií, které by se zabývaly jeho obsahovými látkami. Většina sloučenin byla navíc nalezena v listech, vzdušných kořenech nebo v latexu. Plody a kořeny *F. elastica* na své prozkoumání stále čekají a je tak možné, že pravý potenciál této rostliny dosud nebyl odhalen. Nicméně v současnosti byla izolována a identifikována řada látek, z nichž některé byly testovány i na biologickou aktivitu. Jedná se o sloučeniny velmi různorodé, nelze tedy říci, které z nich v této rostlině převažují.

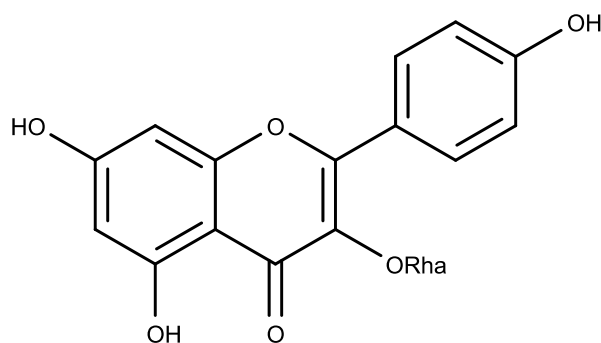
Ceramidy a cerebrosidy

Z $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) extraktu vzdušných kořenů byly izolována látky ficusamid a ficusosid, u nichž byl zkoumán účinek proti bakteriím. Jak již bylo zmíněno, nově izolovaná látka ficusamid vykazovala silnou antibakteriální aktivitu [25].

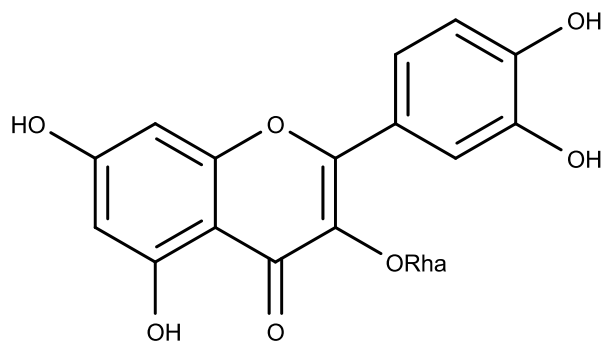
Z methanového extraktu vzdušných kořenů byl izolován ještě další cerebrosid ficusosid B. Zde se testovala možná cytotoxická aktivita, nicméně u sloučeniny byly pozorovány jen velmi slabé účinky [26].

Flavonoidní glykosidy

V extraktu listů bylo nalezeno několik flavonoidních glykosidů, jejichž antioxidační aktivita se zdála být ve srovnání s Troloxem velmi uspokojivá. Izolovány byly známé látky, konkrétně kaempferin, kvercitrin a myricitrin [16].



Obr. 4: Kaempferin



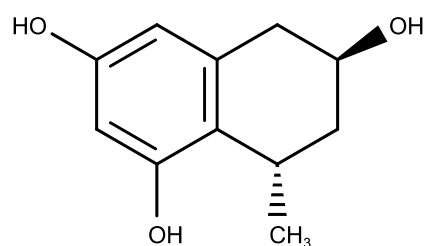
Obr. 5: Kvercitrin

Ostatní látky

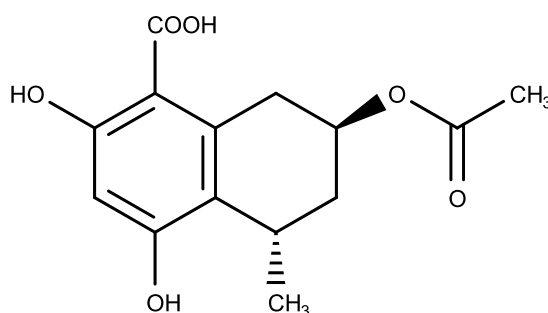
Na základě různých identifikačních metod bylo v listech *F. elastica* nalezeno několik polyprenolů, jmenovitě ficaprenol-10, -11 a -12 a v minoritním zastoupení také ficaprenol-9 a -13 [27]. Vědci však dospěli k závěru, že izolovali látky, které již byly nalezeny v jiné rostlině *Aesculus hippocastanum* (Sapindaceae), kde dostaly

pojmenování castaprenol-9, -10, -11, -12 a -13 [28]. Vzhledem k této skutečnosti je doporučeno, aby objevené sloučeniny nesly společný název castaprenol [27].

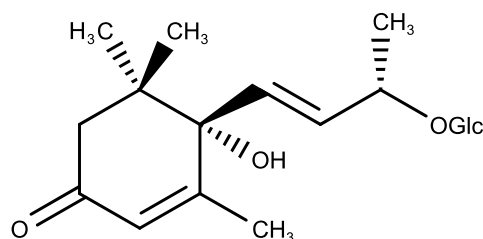
V listech byla nalezena také nová látka kyselina ficuselastiková. Došlo též k izolaci sloučeniny feroxidin [16], což je známá látka, která byla poprvé objevena v roce 1990 v rostlině *Aloe ferox* (Asphodelaceae) [29]. Obě látky jsou si strukturně podobné, jedná se o hydroxylované deriváty naftalenu, v případě kyseliny ficuselastikové navíc s připojenou karboxylovou a acetylovou skupinou. V rámci stejné studie bylo izolováno i několik megastigmanů (citrosid B, corchoionosid C a (6*S*,9*R*)-roseosid) a triterpenů (kyselina oleanolová, kyselina ursolová) [16].



Obr. 6: Feroxidin



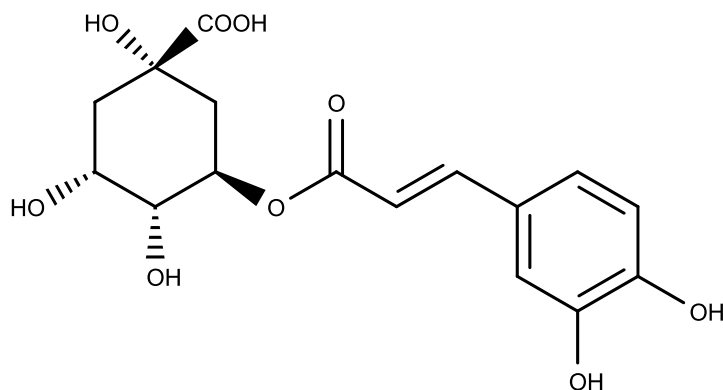
Obr. 7: Kyselina ficuselastiková



Obr. 8: Corchoionosid C

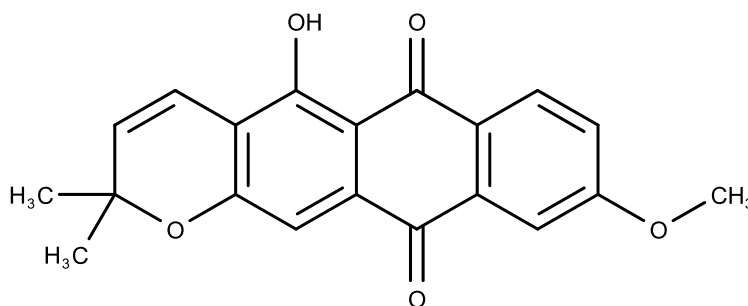
Pomocí HPLC-DAD metody se v extraktu listů *F. elastica* podařilo identifikovat kyselinu chlorogenovou. Na antioxidační aktivitu se testoval jen samotný extrakt, u něhož nebyla pozorována výraznější schopnost vychytávání kyslíkových radikálů [30]. Samotná kyselina chlorogenová testování podrobena nebyla, jedná se však o známý

antioxidant vyskytující se např. v zelené kávě nebo čaji. Mezi další účinky kyseliny chlorogenové patří např. antimikrobiální, antipyretické, hepatoprotektivní nebo neuroprotektivní působení [31].

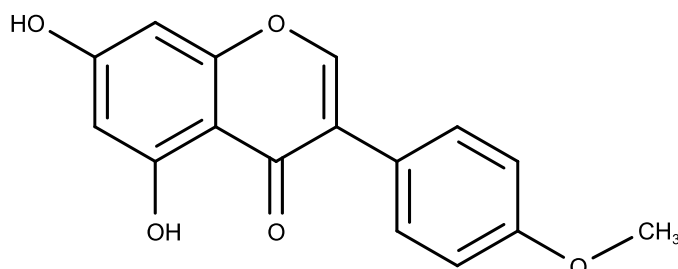


Obr. 9: Kyselina chlorogenová

Methanolický extrakt vzdušných kořenů byl zdrojem další nové látky, která byla pojmenována elastichinon. Sloučenina měla velmi příznivé výsledky, co se týče antiproliferativní aktivity, konkrétně působila proti melanomovým buňkám B16F10 s hodnotou IC_{50} 14 μ M. Spolu s touto látkou byla izolována ještě jedna známá sloučenina biochanin A, která vykazovala středně silné antiproliferativní účinky proti šesti liniím rakovinných buněk s IC_{50} v rozmezí 47–69 μ M [26].



Obr. 10: Elastichinon



Obr. 11: Biochanin A

Z latexu *F. elastica* byla izolována proteáza ficin E. Slovo „ficin“ slouží k popisu endoproteolytické enzymatické aktivity latexu rostlin rodu *Ficus*. Podobné proteázy byly již dříve nalezeny i v jiných druzích fíkovníků jako je např. *Ficus glabrata* nebo *Ficus carica*, jednalo se ale o enzymy s jiným složením aminokyselin. Ficin E má v reakčním centru situován serin, jde tedy o serinovou proteázu [32, 33].

2.4 *Ficus microcarpa* L. f.



Obr. 12: *F. microcarpa* [34]

2.4.1 Botanická charakteristika

Ficus microcarpa, jinak také zvaný „Chinese banyan“ nebo „Malayan banyan“, je mohutný, asi 30 m vysoký stálezelený strom, který disponuje rozsáhlým systémem vzdušných kořenů sloužících k nasávání vzdušné vlhkosti. Listy tohoto fíkovníku jsou jednoduché, celokrajné, oválného tvaru, zakončené neostrou špičkou. Na pohled jsou lesklé, kožovité a mají svěží tmavě zelenou barvu. Na větvích vyrůstají střídavě a časem mění své zbarvení na tmavě hnědé. Drobné květy tvoří květenství uzavřené do

syconia [35]. Plody mají v průměru 0,6–1 cm a vyrůstají zpravidla v párech v paždí listů. Ve zralém stavu jsou narůžovělé až tmavě fialové, někdy téměř černé [6].

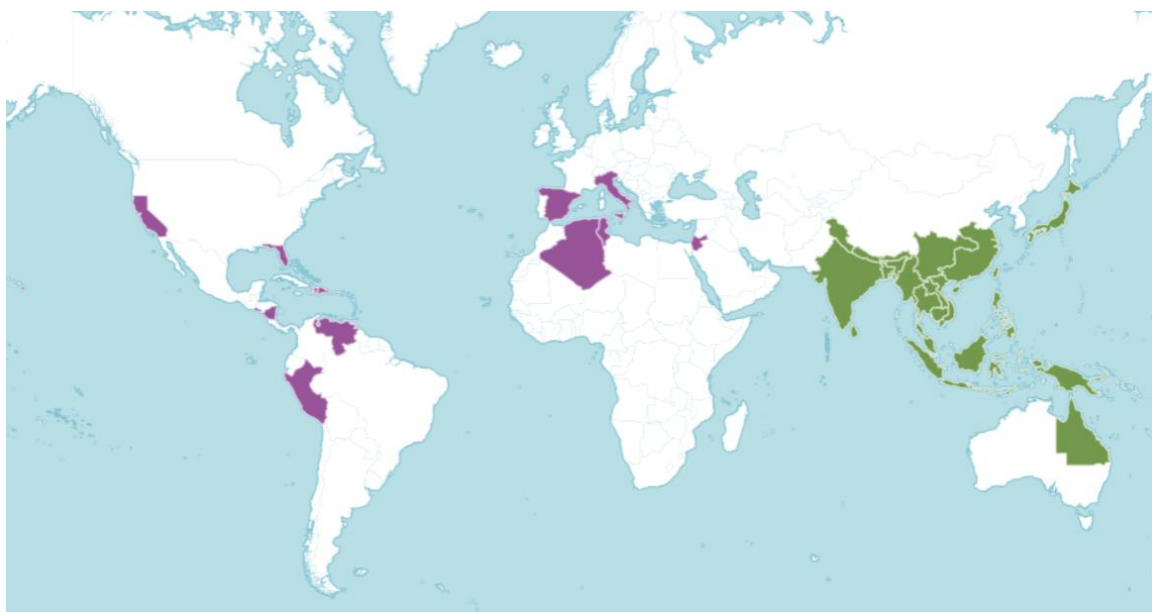
Slovo „banyan“ pochází z hindštiny. Volně ho můžeme přeložit jako „jihoasijský ovocný strom z rodu *Ficus* produkující kořeny, které rostou směrem k zemi a tvoří tak další kmeny“. Původně však tento výraz vznikl jako jiný název pro *Ficus benghalensis* (nebo také *Ficus indica*), který je typický pro indický subkontinent [36].

2.4.2 Rozšíření

Domovinou tohoto druhu jsou, stejně jako u řady dalších fíkovníků, tropické a subtropické oblasti jižní a jihovýchodní Asie. *F. microcarpa* je ale původní také v Austrálii, konkrétně ve státu Queensland, kde rovněž panuje tropické podnebí. Z asijských států se druh vyskytuje například v Indii, Bangladéši, Myanmaru, Thajsku, Laosu, Vietnamu, Malajsii nebo Indonésii, ale jeho výskyt je zaznamenán také v Japonsku [37].

Můžeme ho ale najít i v dalších koutech světa, neboť se velice snadno rozmnožuje. Řadu zemí tedy začala trápit jeho vysoká invazivita. Klíčovou roli v jeho rychlém šíření hraje fakt, že je tento strom s oblibou vysazován v městských parcích a zahradách pro svou atraktivitu a jako zdroj tolik potřebného stínu. Dalším faktorem je i skutečnost, že se jeho symbiotická vosička *Eupristina* (*Parapristina*) *verticillata* Waterston (Agaonidae) vyskytuje všude, kam byl *F. microcarpa* zavlečen. Svůj podíl na rozšiřování druhu mají i ptáci a netopýři, kteří mohou rozptylovat semena zralých fíků prakticky kdekoliv. Na Havaji byla tato rostlina na počátku 20. století hojně vysazována, ale rychle rostoucí populace jejích opylovačů způsobila dramatický nárůst počtu těchto fíkovníků. Důsledkem bylo a je nekontrolovatelné šíření tohoto druhu na Havaji, ale i jinde ve světě. Podobný trend je možné pozorovat např. na Floridě, Bermudách nebo v Mexiku [5, 38, 39].

Tento strom můžeme najít ve vlhkých, podmáčených, až téměř mokřadních oblastech, typicky blízko vodních toků, např. v okolí řek nebo pláží. Jeho oblíbeným stanovištěm jsou také skalní útesy a pukliny, kde velmi dobře prosperuje. Nejběžnější je přitom v listnatých nebo smíšených lesích. Poměrně hojný je ve vyšších nadmořských výškách kolem 1100–1200 m n. m. Objevuje se i na vápencovém podloží, nicméně se nejedná o jeho typický biotop [2, 3, 6, 9].

Obr. 13: Výskyt *F. microcarpa* [37]

2.4.3 Využití

F. microcarpa je jedním z několika druhů stromů, které se využívaly (a občas stále využívají) při přípravě tradičních japonských nudlí z oblasti Okinawa v Japonsku. Říká se jim Okinawa Soba. Dokonalé struktury těchto nudlí se dosáhne pouze tehdy, když jsou vyráběny z vody o vysoce alkalickém pH (tzv. louh). V dnešní době se takového pH docílí smícháním vody s oxidem uhličitým, čímž nám vznikne voda karbonizovaná. Původní receptura je však poněkud odlišná. Dříve se využívalo popela vzniklého pálením dřeva určitých stromů, např. *F. microcarpa* (Moraceae), *Quercus miyagii* (Fagaceae) nebo *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). Tento popel se přidal do vody a vzniklá směs se nechala přes noc usadit. Voda se na druhý den slila a smíchala s pšeničnou moukou. Takto vzniklo těsto, z kterého se poté vytvářely Soba nudle. Běžně se tímto způsobem vyráběly v době před a po 2. světové válce, časem se ale začalo přistupovat k jednodušším řešením. Mimo Japonska můžeme tento způsob výroby spatřit také v Číně nebo v Thajsku [40].

V tradiční lidové medicíně se listy, kůra a vzdušné kořeny *F. microcarpa* používaly jako analgetikum nebo antipyretikum. V Číně byl běžně užíván k léčbě malárie, chřipky, bronchitidy nebo revmatismu a v jihovýchodní Asii našel uplatnění jako antidiabetikum [35].

Druh je také oblíbenou okrasnou rostlinou napříč celým světem, často se pěstuje jako obrovský strom v parcích nebo jako bonsai v květináčích [35]. Vysoká oblíbenost jde však ruku v ruce s jeho již zmíněnou rostoucí invazivitou [5].

2.4.4 Biologická aktivita extraktů

Antitusická, antiastmatická a expektorační aktivita

Sledována byla antitusická, antiastmatická a expektorační aktivita různých extraktů (vodný, *n*-butanolový, ethylacetátový a methanolový) z listů *F. microcarpa*. Prováděl se i experiment s vodným extraktem přečištěným pomocí keramické membrány (membránová frakce) za účelem zjištění možného rozdílu v účincích při odlišné přípravě extraktu [41].

Nejprve byly testovány antitusické účinky extraktů na myších. Jako pozitivní kontrola posloužil pentoxyverin citrát (50 mg/kg). Extrakty (100 a 200 mg/kg) byly myším podávány po tři dny, přičemž hodinu po podání poslední dávky extraktu/léčiva byly myši umístěny do komory, kde byly vystaveny inhalaci 20% amoniaku. Pozorována byla frekvence a latence kašle. Z výsledků vyplývá, že frekvenci kašle nejvíce snižovala *n*-butanolová frakce v dávce 100 mg/kg. Ukázalo se však, že i membránová frakce uspokojivě snižovala frekvenci a zároveň signifikantně prodlužovala latenci kašle [41].

Pro testování antiastmatické aktivity bylo jako pokusný subjekt zvoleno morče a jako referenční léčivo dexamethason (5 mg/kg). Hodinu po podání poslední dávky extraktu/léčiva byla morčata vystavena směsi 2% acetylcholinu a 0,1% histaminofosfátu (1:1) a měřila se doba latence astmatu. Je patrné, že nejlépe účinkovala vodná a methanolová frakce. Druhá jmenovaná dokonce prodlužovala dobu latence více než pozitivní kontrola, nicméně je nutné zohlednit zcela odlišné použité koncentrace [41].

Liu et al. testovali expektorační aktivitu na myších za použití roztoku chloridu amonného (1 mg/kg) jako standardu. Po uplynutí jedné hodiny po aplikaci poslední dávky extraktu/léčiva byl myším injektován 5% roztok fenolové červeně (500 mg/kg). Ze všech pěti extraktů pouze membránová frakce významně zvyšovala exkreci fenolové červeně [41].

Antioxidační aktivita

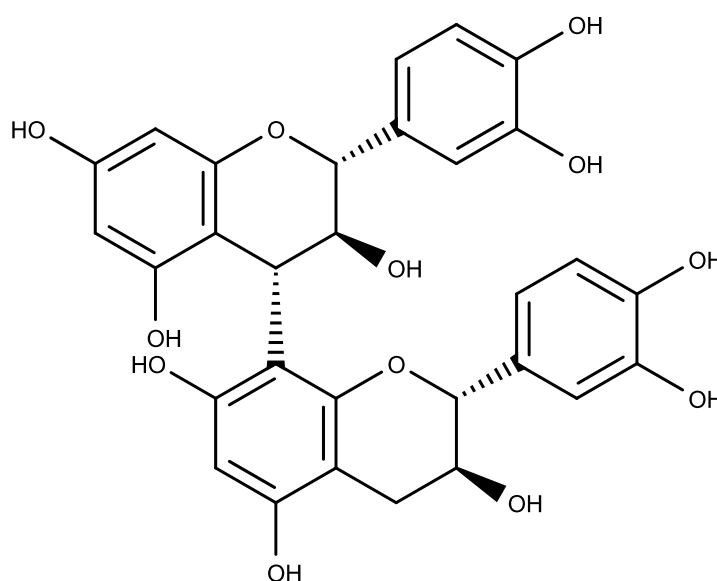
Z různých rostlinných částí *F. microcarpa* byly připraveny methanolové extrakty a následně získáno několik podílů (hexanový, ethylacetátový, *n*-butanolový a vodný). Aktivita byla testována pomocí metod DPPH, ABTS a PMS-NADH, což jsou metody založené na eliminaci radikálů. Dle výsledků vykazovaly jednoznačně nejlepší antioxidační účinky ethylacetátové (EtOAc) frakce vzdušných kořenů a kůry, což bylo s největší pravděpodobností způsobeno vysokým podílem fenolických sloučenin [43, 44]. V reakci na to bylo z EtOAc frakce izolováno a identifikováno několik látek, které jsou podrobněji rozepsány v kapitole 2.4.5. Kůrou se vědci zabývali i v rámci jiného experimentu, kde výsledky opět potvrzují, že EtOAc frakce vykazuje nejsilnější antioxidační aktivitu, která je dokonce srovnatelná s účinky silymarinu jako standardu. Výsledky jsou však závislé na koncentraci extraktu/léčiva [44].

2.4.5 Fytochemický profil

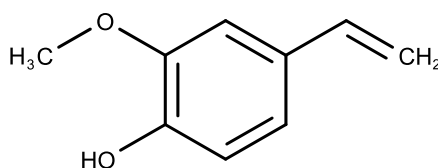
Na základě několika relevantních studií, které se zabývaly sloučeninami izolovanými z *F. microcarpa* lze říci, že je rostlina bohatá hlavně na fenolické látky a triterpeny. Dále tato rostlina v menší míře obsahuje další látky jako jsou megastigmany, sterolové deriváty a karboxylové kyseliny.

Fenolické látky

Z ethylacetátového podílu methanolového extraktu vzdušných kořenů a kůry byly získány především fenolické sloučeniny, jmenovitě např. *p*-vinylguaiacol, syringol, pyrokatechol, vanilin, kyselina isovanilová, syringaldehyd, kyselina protokatechová, kyselina chlorogenová nebo prokyanidin B3 [42, 43, 45].

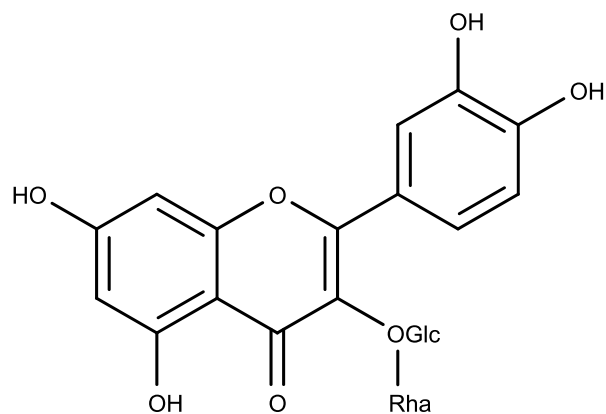
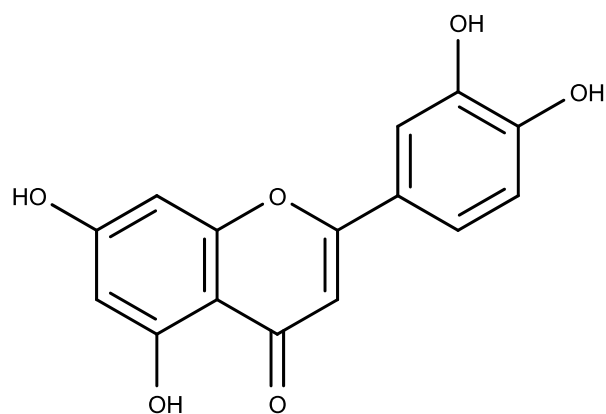
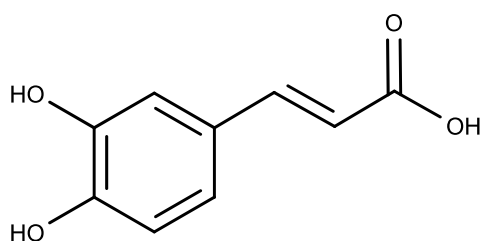


Obr. 14: Prokyanidin B3

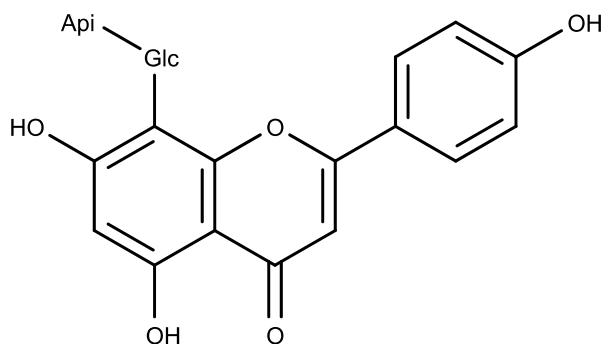


Obr. 15: *p*-Vinylguaiacol

V methanolovém extraktu vzdušných kořenů byly nalezeny i další látky odvozené od fenolu. Největší zastoupení měla kyselina kávová, kyselina salicylová a rutin. Kromě rutinu zde byly přítomny i další flavonoidy, kupříkladu kvercetin, luteolin nebo apigenin [46].

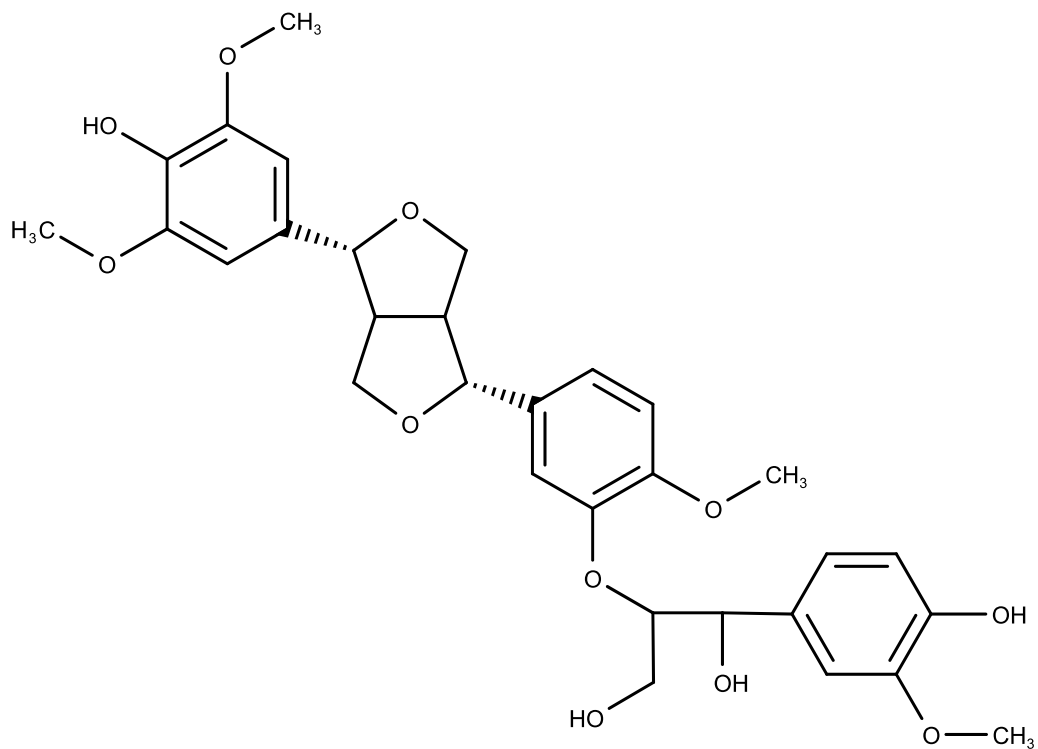
**Obr. 16: Rutin****Obr. 17: Luteolin****Obr. 18: Kyselina kávová**

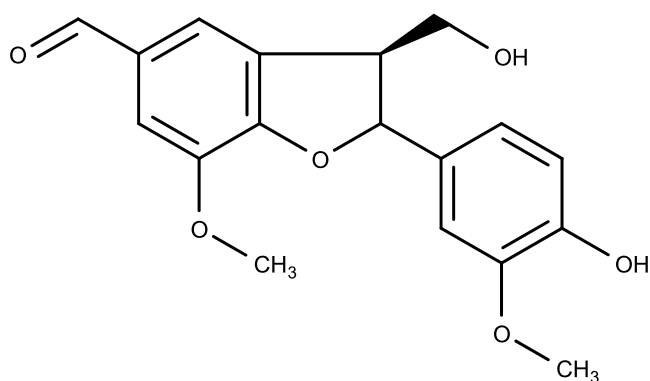
Nová látka ficuflavosid, která patří mezi *C*-glykosylflavony, byla izolována z methanolového extraktu listů. Spolu s touto látkou došlo k izolaci i několika známých molekul (isovitexin, isosaponarin, syringin). U všech jmenovaných kromě syringinu byla pozorována velmi dobrá antioxidační aktivita [47].

**Obr. 19: Ficuflavosid**

Lignany

Tři nové sloučeniny ficusal, ficuseskvilignan A a ficuseskvilignan B byly izolovány z methanového extraktu dřeva *F. microcarpa* [48].

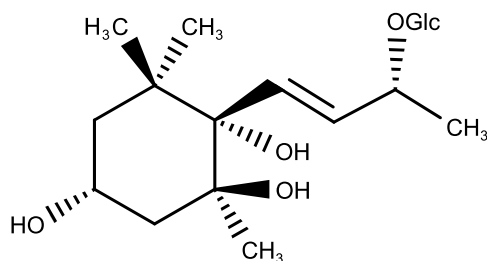
**Obr. 20: Ficuseskvilignan**



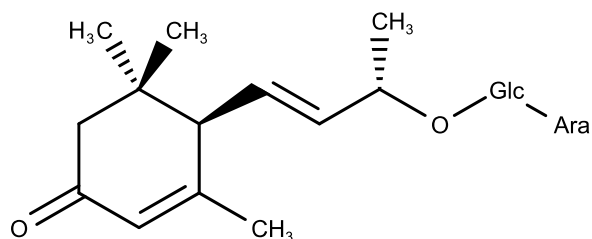
Obr. 21: Ficusal

Megastigmany

Z listů byly získány tři megastigmany. Konkrétně se jednalo o dvě známé látky (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-en-3,5,6,9-tetraol a bridelionosid B a jednu novou, která dostala triviální název ficumegasosid [47].



Obr. 22: Bridelionosid B

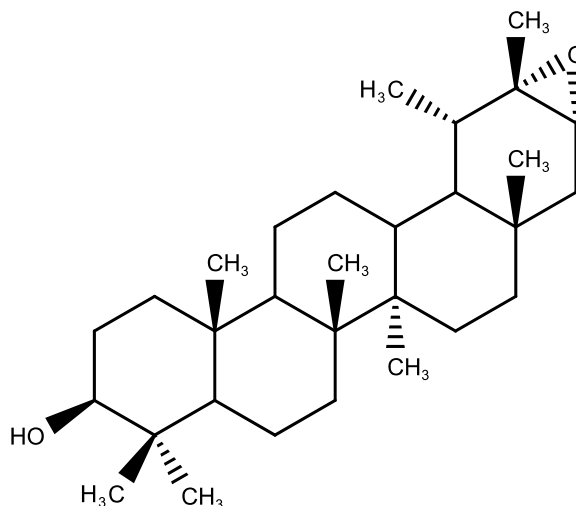


Obr. 23: Ficumegasosid

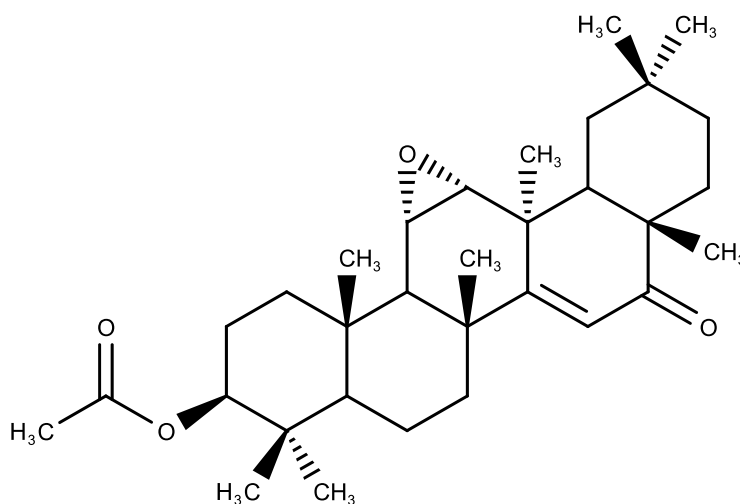
Triterpeny

Pět nových triterpenů taraxastanového typu bylo nalezeno ve vzdušných kořenech *F. microcarpa*. Těmito sloučeninami jsou 22-oxo-21-taraxasten-3β-ol, 20(30)-taraxasten-3β,21α-diol, 20α,20α-epoxytaraxasten-3β-ol, 20-taraxasten-3β,22β-diol a 3β-acetoxy-20-taraxasten-22-on. Identifikovány byly i dvě již objevené látky

20-taraxasten-3 β -ol a ptiloepoxid [49]. V rámci jiné studie se vědcům podařilo identifikovat dalších šest nových triterpenů zejména taraxastanového typu, např. 3 β -acetoxy-19(29)-taraxasten-20 α -ol nebo 3 β -acetoxy-11 α ,12 α -epoxy-16-oxo-14-taraxeren. Spolu s nimi byly v extraktu přítomny i známé pentacyklické triterpeny jako kyselina oleanolová, kyselina betulinová a kyselina ursolová [50].

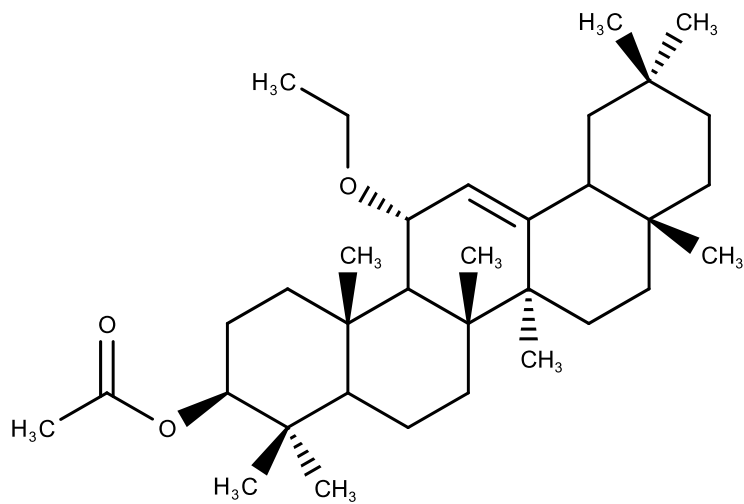


Obr. 24: 20 α ,20 α -epoxytaraxastan-3 β -ol



Obr. 25: 3 β -acetoxy-11 α ,12 α -epoxy-16-oxo-14-taraxeren

Z listů bylo získáno také šest nových triterpenů ursanového a oleananového typu, a to 3 β -acetoxy-11 α -methoxy-12-ursen, 3 β -acetoxy-11 α -ethoxy-12-ursen, 3 β -acetoxy-11 α -hydroperoxy-12-ursen, 3 β -hydroxy-11 α -hydroperoxy-12-ursen, 3 β -acetoxy-11 α -ethoxy-12-oleanen a 3 β -acetoxy-11 α -hydroperoxy-12-oleanen [51].



Obr. 26: 3β-acetoxy-11α-ethoxy-12-oleanen

2.5 *Ficus binnendijkii* Miq.



Obr. 27: *Ficus binnendijkii*

2.5.1 Botanická charakteristika

Jedná se o tropický stálezelený strom dorůstající výšky až 10 m (výjimečně i více) s větvemi hnědými až našedlými. Listy jsou celokrajné, kopinaté, 3–24 cm dlouhé, sbíhající se do ostré špičky, na povrchu lesklé, s výraznou žilnatinou. Plody jsou drobné, téměř kulovité, o průměru 4–8 mm přecházející ze zelenožluté barvy do oranžovočervené. Vyrůstají samostatně nebo v párech většinou z paždí listů. Ostiola má průměr 1–2 mm [9, 52].

V roce 1998 byla popsána nová varieta pojmenovaná jako *Ficus binnendijkii* var. *pallescens* (Weiblen) C.C. Berg. *F. binnendijkii* vykazuje značnou podobnost s touto varietou, liší se však větším množstvím laterálních žilek, kratšími bazálními laterálními žilkami a menšími žilkami na čepeli listu. V roce 2004 bylo toto rozřazení přepracováno a *F. binnendijkii* var. *pallescens* byl vyčleněn jako samostatný druh *Ficus pallescens* (Weiblen) C.C. Berg [9, 53].

Mezi kultivary běžně pěstované jako pokojové rostliny patří např. kultivar 'Alii' nebo 'Amstel King', přičemž druhý jmenovaný se vyznačuje většími a širšími listy [54].



Obr. 28: Plod *F. binnendijkii* [55]

2.5.2 Rozšíření

Druh je rozšířen především v zemích jihovýchodní Asie, kde nachází vhodné podmínky pro svůj růst. Těmito zeměmi jsou například Thajsko, Malajsie a Indonésie. Z indonéských ostrovů lze konkrétněji jmenovat ostrov Jáva, Borneo a Sumatra. Roste v deštných lesích s podmáčeným podložím do nadmořské výšky 1000 m n. m. Typický habitat pro tento druh jsou tedy nížiny a podhorské oblasti [9, 52].



Obr. 29: Výskyt *F. binnendijkii* [56]

2.5.3 Obsahové látky a biologická aktivita

Navzdory oblíbenosti *F. binnendijkii* jako okrasné rostliny dosud existuje pouze jedna dostupná studie zabývající se obsahovými látkami a bioaktivitou [57]. Jedná se tedy o značně přehlížený druh, který stále čeká na detailní prozkoumání.

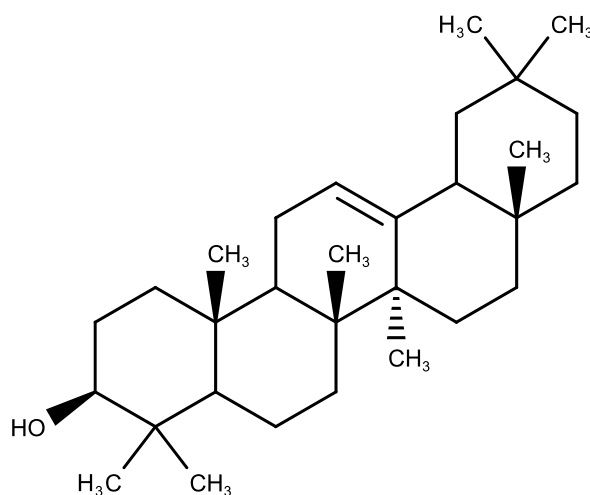
Cílem této studie bylo provést fytochemickou profilaci a zjistit potenciální analgetickou, antipyretickou a protizánětlivou aktivitu petroletherového (PtE) extraktu listů *F. binnendijkii*. Připraven byl také chloroformový a ethylacetátový extrakt, nicméně právě petroletherový vykazoval nejvyšší procento vyextrahovaných látek, proto byl při výzkumu použit [57].

PtE frakce byla rozdělena na frakci nezmýdelnitelnou a frakci methylesterů mastných kyselin. V první frakci bylo pomocí GC/MS analýzy detekováno 46 sloučenin, z toho majoritní většinu tvořily triterpeny (např. β -amyrin, moretenol), diterpenické alifatické alkoholy (např. fytol) a nenasycené uhlovodíky. V druhé frakci byla tímto způsobem zjištěna přítomnost 13 látek, z toho největší zastoupení měl methylhexadekanoát [57].

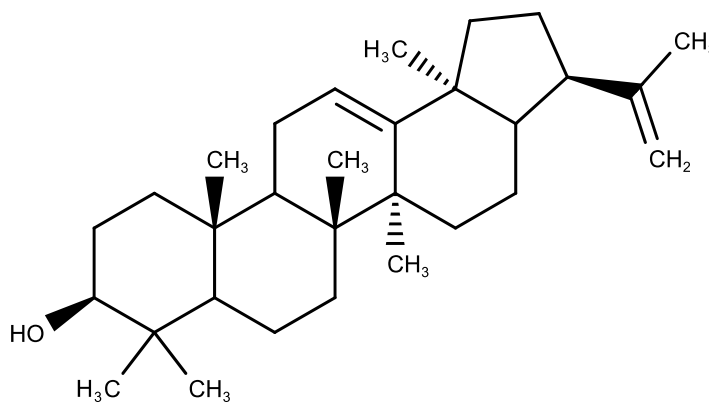
Analgetická aktivita se zjišťovala na myších prostřednictvím testu peritoneálního dráždění. Pro testování byla zvolena koncentrace PtE extraktu 50 a 100 mg/kg, přičemž výsledky ukázaly, že extrakt o vyšší koncentraci vykazoval srovnatelné účinky s indomethacinem (20 mg/kg) [57].

Antipyretická aktivita se hodnotila tak, že byla potkanům uměle vyvolána pyrexie, a to pomocí 44% suspenze pivovarských kvasinek. Po 18 hodinách proběhla aplikace PtE extraktu (100 mg/kg) a výsledky přinesly zjištění, že extrakt sice snižuje teplotu, ale ne v takové míře jako indomethacin (20 mg/kg) [57].

Posledním provedeným experimentem bylo vyvolání zánětu tlapek potkana karagenanem. Sledovalo se, nakolik je PtE extrakt (50 a 100 mg/kg) schopný inhibovat vzniklý zánět a z výsledků paradoxně vyplývá, že extrakt s nižší koncentrací má vyšší účinnost než extrakt s koncentrací vyšší. Jako pozitivní kontrola byl opět použit indomethacin, který vykazoval o něco nižší účinnost než extrakt, ale v mnohem nižší koncentraci (20 mg/kg) [57].



Obr. 30: β -Amyrin



Obr. 31: Moretenol

3 Experimentální část

3.1 Použitý materiál a přístroje

3.1.1 Rostlinný materiál

Jednotlivé druhy použité v této diplomové práci pochází ze Zahrady léčivých rostlin Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a byly identifikovány Ing. Anežkou Chlebkovou. Byly použity listy a větvičky *F. binnendijkii* 'Alii' a listy, větvičky a kořeny druhů *F. binnendijkii* 'Amstel Gold', *F. microcarpa* a *F. elastica* 'Decora'.

3.1.2 Chemikálie

Rozpouštědla použitá při extrakci, TLC a flash chromatografii

- Ethanol 96% (Lihovar Kojetín)
- Ethylacetát p.a. (Lach-Ner)
- Tetrahydrofuran HPLC Grade (Fisher Chemical)
- Methanol p.a. (Lach-Ner)
- Chloroform p.a. (Lach-Ner)
- *n*-Hexan p.a. (Penta)
- Toluén p.a. (Lach-Ner)
- Roztok kyseliny sírové v diethyletheru
- DMSO (Sigma-Aldrich)

Rozpouštědla použitá při HPLC

- Acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich)
- Methanol pro HPLC (Sigma-Aldrich)
- Kyselina mravenčí 98% (Sigma-Aldrich)
- Voda pro HPLC (připravená v systému na úpravu vody)

Rozpouštědla použitá pro NMR

- Deuterovaný chloroform (CDCl_3-d , Sigma-Aldrich)
- Deuterovaný pyridin ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}-d_5$, Sigma-Aldrich)

3.1.3 Laboratorní přístroje, zařízení a pomůcky

- Analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
- Ultrazvuková vodní lázeň Bandelin Sonorex Digitec (Bandelin, Německo)
- Rotační vakuová odparka BÜCHI Rotavapor R-114, Waterbath B-480 (Büchi, Švýcarsko)
- Lyofilizátor CHRIST ALPHA 1-2 LD (Christ, Německo)
- UV lampa se stativem ($\lambda = 253$ a 366 nm)
- Laboratorní centrifuga MINI-10K+ Miulab (Miu Instruments, Čína)
- Laboratorní sklo a další pomůcky

3.1.4 NMR

TLC

- Hliníková fólie TLC Silikagel 60 F254, rozměr 20×20 cm, tloušťka vrstvy $0,2$ mm (Merck)

Flash chromatografie

- Flash chromatograf puriFlash® 5.250 (Interchim, Francie)
- Flash kolona PF-50SIHC-F0040 o délce 135 mm a vnitřním průměru 27 mm, předplněná silikagelem puriFlash® SI-HC o velikosti částic $50 \mu\text{m}$ (Interchim, Francie)

HPLC-ELSD

- HPLC Dionex Ultimate 3 000 s UV detektorem a ELSD (Thermo Scientific, USA)
- Analytická kolona Ascentis® Express C18, 10 cm \times $2,1$ mm, velikost částic $2,7 \mu\text{m}$ (Supelco, USA)
- Semipreparativní kolona Ascentis® C18, 25 cm \times 10 mm, velikost částic $5 \mu\text{m}$ (Supelco, USA)

IČ

- Bruker Alpha FT-IR spektrometr (Bruker Daltonik, Německo)

NMR

- NMR spektrometr JEOL ECZR 400 MHz (Jeol, Japonsko)

3.2 Výsledky a diskuse

3.2.1 Příprava extraktů

Všechny rostlinné části byly extrahovány stejným způsobem. Přibližně 10 g drogy bylo náležitě rozdrobněno a macerováno v ethanolu tak, aby byl zachován poměr droga ku rozpouštědlu 1:20 (m/V). Macerace probíhala za studena po dobu 24 hodin a byla provedena ve třech opakováních. Pro zahuštění extraktů byla použita rotační vakuová odparka. Získané extrakty byly poté přeneseny do vialek, ve kterých byly uchovávány pro další použití. Výtěžky získané z jednotlivých rostlinných částí jsou uvedeny v tabulkách (Tab.1–4).

Tab. 1: Výtěžky extraktů *F. binnendijkii* 'Alii'

Rostlinná část	Výtěžek [g]
Kůra větvíček	0,324
List	0,467

Tab. 2: Výtěžky extraktů *F. binnendijkii* 'Amstel Gold'

Rostlinná část	Výtěžek [g]
Kůra větvíček	0,357
List	0,712
Kořen	0,492
Kůra kořene	0,721

Tab. 3: Výtěžky extraktů *F. microcarpa*

Rostlinná část	Výtěžek [g]
Kůra větvíček	0,698
List	0,451
Kořen	0,626
Kůra kořene	0,863
Dřevo	0,771

Tab. 4: Výtěžky extraktů *F. elastica* 'Decora'

Rostlinná část	Výtěžek [g]
Kůra větvíček	0,622
List	0,987
Kořen	0,479

3.2.2 HPLC-ELSD analýza celkových extraktů

Vzhledem k zadanému tématu jsme pro analýzu celkových extraktů zvolili metodu HPLC-ELSD, pomocí níž je možné detekovat i látky, které neabsorbují UV záření. Parametry použité metody jsou uvedeny v Tab. 5.

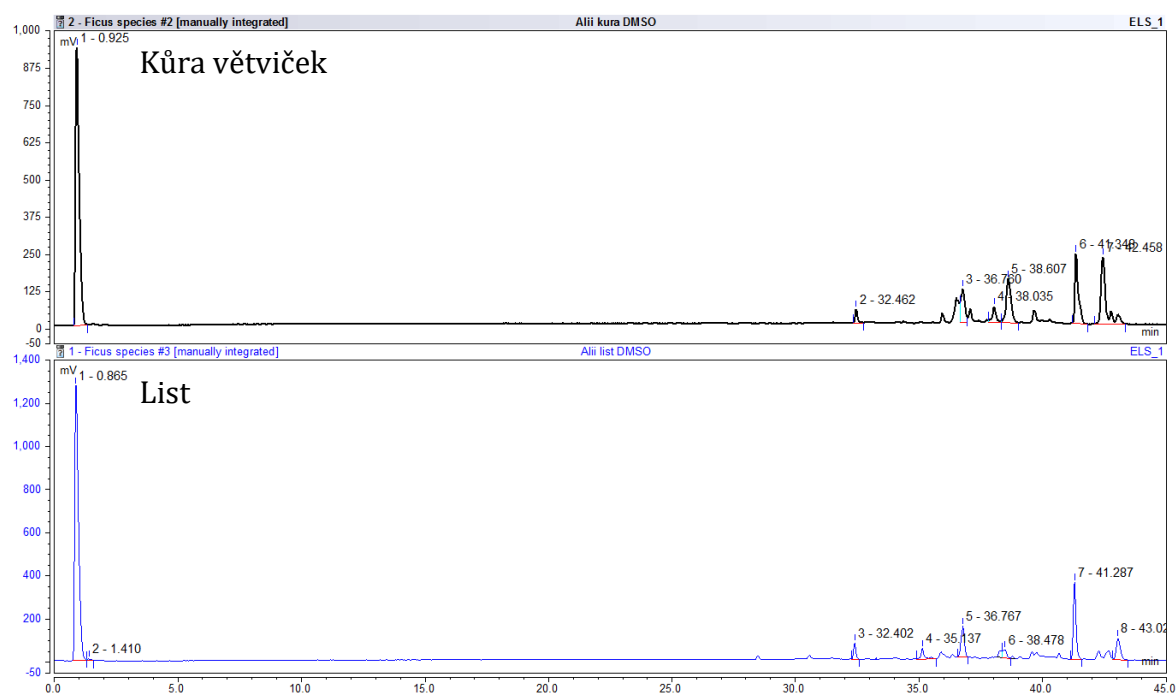
Před samotnou analýzou bylo potřeba připravit vzorky o náležité koncentraci. Extrakty *F. microcarpa* a obou kultivarů *F. binnendijkii* jsme rozpustili v DMSO (5 mg/ml), jelikož se špatně rozpouštěly v dalších zkoušených rozpouštědlech. Extrakty z kořenů a kůry větvíček *F. elastica* se rozpustily v methanolu (5 mg/ml), zatímco extrakt z listů byl špatně rozpustný ve všech rozpouštědlech. Částečně se nám ho podařilo rozpustit v tetrahydrofuranu (THF), přesto však bylo nutné extrakt odstředit. Kvůli problematické rozpustnosti byl připraven vzorek o koncentraci 1 mg/ml.

Tab. 5: Parametry metody použité při analýze HPLC-ELSD

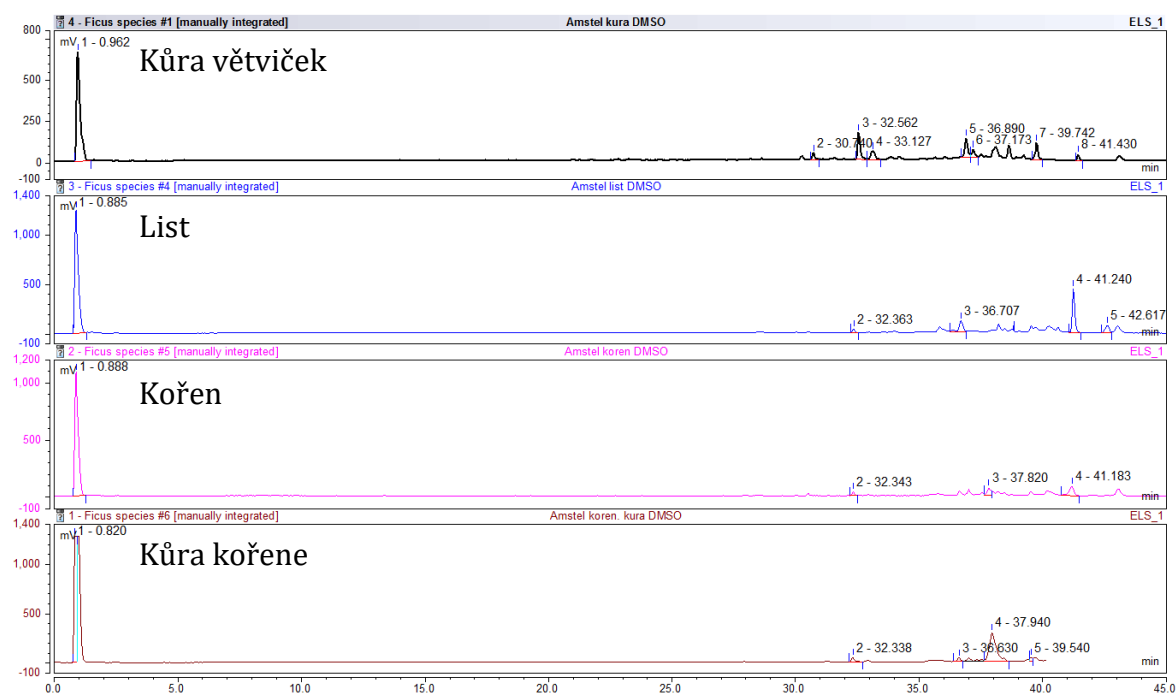
Mobilní fáze	Acetonitril (A) a 0,2% HCOOH (B)
Gradientová eluce	0. min = 10 % (A) + 90 % (B) 36. minuta = 100 % (A)
Průtok	0,3 ml/min
Nástřik	1 μ l
Teplota	40 °C
Detekce	ELSD

F. binnendijkii 'Alii' a *F. binnendijkii* 'Amstel Gold'

Analýzou bylo zjištěno, že všechny rostlinné části obou kultivarů *F. binnendijkii* obsahovaly především lipofilní látky, protože se v chromatogramech (Obr. 32, Obr. 33) objevují zejména kolem 36.–41. minuty, což je vzhledem k použité metodě oblast, kde se zobrazují silně lipofilní sloučeniny. Při porovnání chromatogramů je patrné, že se jednotlivé kultivary ve složení látek prakticky neliší a ani žádná rostlinná část není na obsahové látky výrazně bohatší než jiné části rostliny.



Obr. 32: HPLC-ELSD chromatogramy *F. binnendijkii* 'Alii'



Obr. 33: HPLC-ELSD chromatogramy *F. binnendijkii* 'Amstel Gold'

Dle dostupné literatury by se v listech *F. binnendijkii* měly vyskytovat triterpeny, nicméně analýza extraktů jednotlivých částí nám to nepotvrdila. Nejpolárnější látky mají dle chromatogramů retenční čas kolem 32. minuty, pro běžné triterpeny je však

charakteristická oblast okolo 28.–29. minuty [58]. Zároveň by tento druh měl obsahovat velké množství esterů mastných kyselin [57], což by mohlo odpovídat píkům kolem 40. minuty, kde se typicky nachází silně lipofilní sloučeniny.

Podobné chromatogramy byly pozorovány i u druhu *F. benjamina*, kterým se ve své diplomové práci zabývala Tereza Stiskálková. I zde lze vidět silně lipofilní sloučeniny s retenčním časem kolem 40. minuty [59].

Na základě provedené analýzy jsme dospěli k závěru, že pro nás tyto druhy nejsou perspektivní a nebudeme s nimi dále pracovat.

F. microcarpa

Chromatogramy jednotlivých rostlinných částí *F. microcarpa* (Obr. 34) mezi sebou vykazovaly značnou podobnost, dá se tedy říci, že všechny drogy obsahovaly velmi podobné obsahové látky. Opět se však většina píků objevuje v části, kde se zobrazují silně lipofilní sloučeniny, pouze okolo 28. minuty je na chromatogramech vidět polárnější látka, která by mohla být např. triterpen, jelikož se běžné triterpeny zobrazují právě v této oblasti [58]. U látek detekovaných kolem 32. a 36. minuty se může jednat o triterpeny s navázaným lipofilním substituentem. To by mohlo korespondovat s údaji uvedenými ve vědecké literatuře, podle nichž je *F. microcarpa* bohatým zdrojem triterpenů [50, 51]. Zároveň by tento druh měl obsahovat významné množství fenolických látek [42, 43, 45, 46] a megastigmanů [47].



Obr. 34: HPLC-ELSD chromatogramy *F. microcarpa*

Po analýze extraktů pomocí HPLC-DAD a HPLC-ELSD se nám však toto tvrzení nepodařilo potvrdit. Je možné, že byly zmíněné látky maskovány balastními, lipofilnějšími látkami, proto nebyly na chromatogramech patrné.

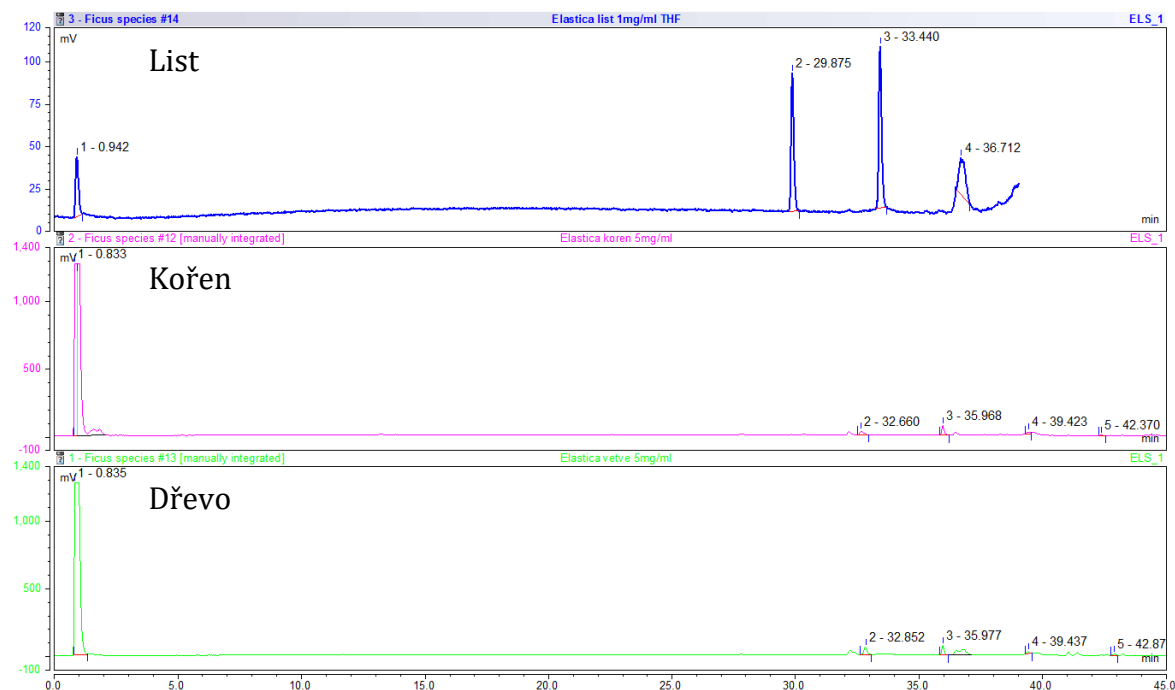
Na základě uvedených skutečností se nám rostlina nejevila jako atraktivní, proto jsme se rozhodli s ní dále nepracovat.

F. elastica 'Decora'

Zatímco na chromatogramech kořenů a dřeva se objevily píky s retenčním časem (t_R) 32,660 min a více, analýza listů odhalila dvě hlavní látky, z nichž jedna měla t_R 29,875 min a druhá 33,440 min (Obr. 35). Analýza nebyla doměřena z důvodu nedostatku času, a protože se v této oblasti vyskytují pro nás neatraktivní sloučeniny.

Po prohledání vědecké literatury bylo zjištěno, že by druh *F. elastica* měl být bohatým zdrojem např. fenolických látek [16, 26, 31]. Po provedení analýzy metodou HPLC-DAD však nebyly detekovány téměř žádné látky, které absorbují UV záření, tudíž významnou přítomnost fenolických látek nelze potvrdit. Některé z těchto sloučenin však byly nalezeny v jiných rostlinných druzích, které ve své diplomové práci zpracovávala Terézia Jedináková. Konkrétně v listech *F. triangularis* byla detekována kyselina chlorogenová a její deriváty a v kořenu *F. cyathistipula* byla nalezena látka strukturně podobná biochaninu A [60].

Po HPLC-ELSD analýze všech rostlinných částí se nám extrakt z listů *F. elastica* jevil jako nejperspektivnější, proto jsme se mu rozhodli dále věnovat.



Obr. 35: HPLC-ELSD chromatogramy *F. elastica* 'Decora'

3.2.3 Extrakce nemísitelnými kapalinami (liquid-liquid extrakce)



Obr. 36: Liquid-liquid extrakce

Dalším krokem bylo zpracování veškerého materiálu, v našem případě listů *F. elastica*, který jsme měli k dispozici. Na 434,23 g listů bylo použito 3,3 L ethanolu, přičemž následná extrakce probíhala naprosto identickým způsobem jako při přípravě celkových extraktů. Takto bylo získáno celkem 36,321 g suchého extraktu. Ten byl následně použit k tzv. liquid-liquid extrakci, což je separační metoda, pomocí níž je možné rozdělit látky obsažené v extraktu do jednotlivých frakcí na základě polarity. Toho se docílí vytřepáváním extraktu mezi dvěma nemísitelnými kapalinami.

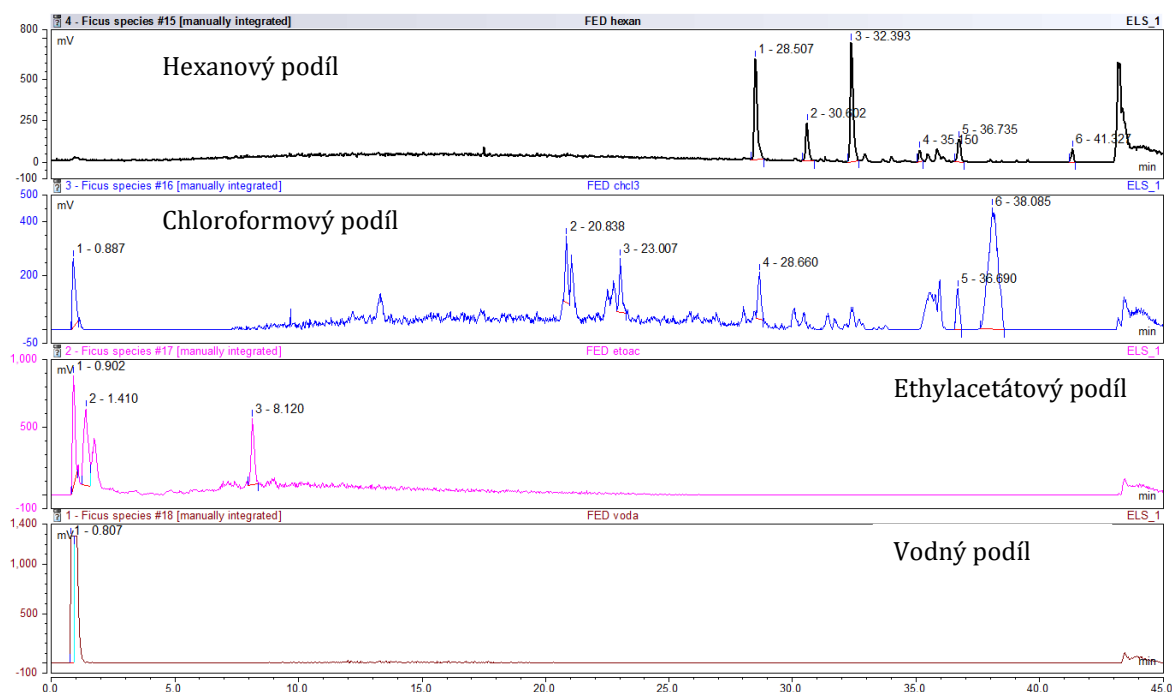
Celkový extrakt byl rozdělen na dvě části a přenesen do dvou dělicích nálevek. Nejdříve proběhlo vytřepávání ve směsi methanol:voda (8:2) + hexan, k čemuž bylo použito 300 ml směsi methanol:voda a 200 ml hexanu pro každou dělicí nálevku. Vytřepáním do hexanu se podařilo oddělit většinu chlorofylu a nejlipofilnějších látek od ostatních složek extraktu, na rozhraní fází se však objevila poměrně výrazná mezifáze, kterou jsme prozatím ponechali v methanolové fázi. Z methanolového podílu byla odpařena podstatná část methanolu tak, aby vznikla směs methanol:voda o poměru přibližně 2:8. Poté jsme 200 ml této směsi třikrát vytřepali s 300 ml chloroformu. Vodno-methanolový podíl jsme odpařením zbavili methanolu a zbytek vytřepali do ethylacetátu (200 ml). Tímto jsme získali čtyři podíly (hexanový, chloroformový, ethylacetátový a vodný). Z prvních tří jsme na rotační vakuové odparce odpařili organická rozpouštědla a vody jsme se zbavili lyofilizací. Výtěžky jednotlivých podílů jsou uvedeny v Tab. 6. Nižší výtěžnost je způsobena ztrátami vzniklými při vytřepávání, např. vznikem nerozpustné sraženiny.

Tab. 6: Hmotnosti jednotlivých podílů

Podíl	Hmotnost [g]
Hexanový	11,427
Chloroformový	2,777
Ethylacetátový	0,525
Vodný	15,396

3.2.4 HPLC-ELSD analýza podílů po liquid-liquid extrakci

Získané podíly byly následně analyzovány pomocí HPLC-ELSD, jelikož bylo potřeba vybrat jeden podíl, který bude dále zpracováván. Parametry metody zůstaly stejné jako u předchozího měření a jsou uvedeny v Tab. 5.

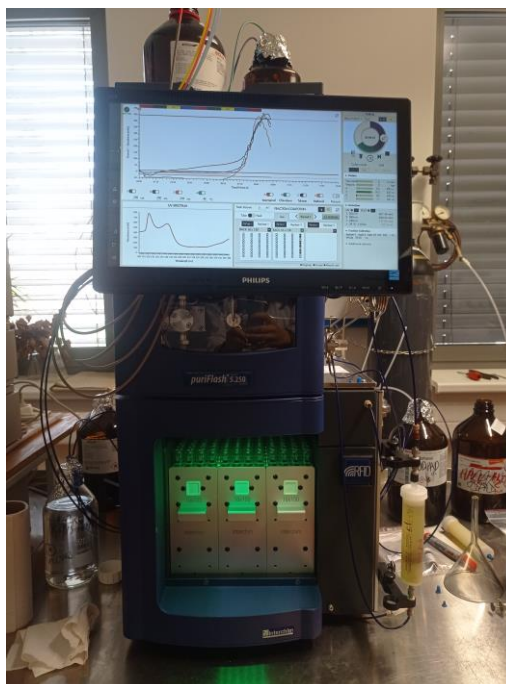


Obr. 37: HPLC-ELSD chromatogramy jednotlivých podílů

Při pohledu na chromatogramy (Obr. 37) je patrné, že vodný podíl neobsahuje prakticky žádné látky, které by neabsorbovaly UV záření, není tedy vhodný k dalšímu zkoumání. U ethylacetátového podílu se vyskytuje pouze jeden výrazný pík s t_R 8,120 min. Naše pozornost byla zaměřena na dva zbývající podíly – hexanový a chloroformový. Na chromatogramu chloroformového podílu je vidět několik výrazných píků s t_R 20,838 min, 23,007 min, 28,660 min a 38,085 min, z HPLC-UV záznamu však bylo zjištěno, že se z většiny jedná o látky, které absorbují UV záření, tudíž nezapadají do zadaného tématu diplomové práce. U hexanového podílu byly pomocí HPLC-ELSD detekovány tři hlavní látky s t_R 28,507 min, 30,602 min a

32,393 min, které neabsorbovaly UV záření. Vzhledem k hodnotám retenčních časů jsme se domnívali, že by se mohlo jednat o triterpeny, proto byl tento podíl vybrán k dalšímu zpracování.

3.2.5 Flash chromatografie hexanového podílu



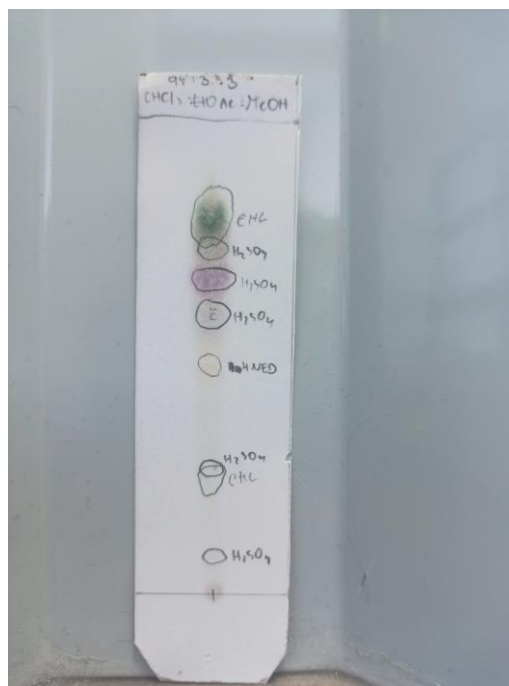
Obr. 38: Flash chromatograf puriFlash® 5.250

Pro hrubou separaci hexanového podílu jsme si vybrali flash chromatografii. Nejdříve bylo třeba připravit mobilní fázi s vhodným složením rozpouštědel, aby byla separace co nejefektivnější. Pro tento účel byla kombinována různá rozpouštědla o různých poměrech a takto připravené mobilní fáze byly analyzovány pomocí metody tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako nejvhodnější byla zvolena mobilní fáze chloroform:ethylacetát:methanol v poměru 96:2:2. Zkoušené mobilní fáze jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7: Zkoušené kombinace rozpouštědel pro mobilní fázi

Rozpouštědla	Poměry
Chloroform:methanol	95:5
Chloroform:toluen:methanol	85:10:5
Chloroform:toluen:methanol	90:5:5
Chloroform:ethylacetát:methanol	90:5:5
Chloroform:methanol	97:3
Chloroform:ethylacetát	90:10

Rozpouštědla	Poměry
Chloroform:ethylacetát:methanol	94:3:3
Chloroform:ethylacetát:methanol	96:2:2

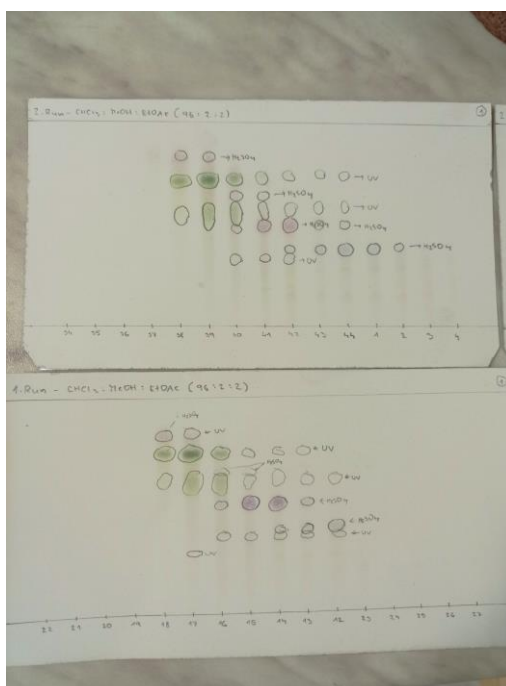


Obr. 39: TLC hexanového podílu

Separaci pomocí flash chromatografie jsme provedli ve dvou runech, přičemž pro každý run bylo použito 500 mg hexanového podílu. Takto bylo z prvního runu získáno 30 frakcí a z druhého 31 frakcí, které byly analyzovány pomocí TLC a na základě podobnosti spojeny. Hmotnosti těchto frakcí jsou uvedeny v Tab. 8.

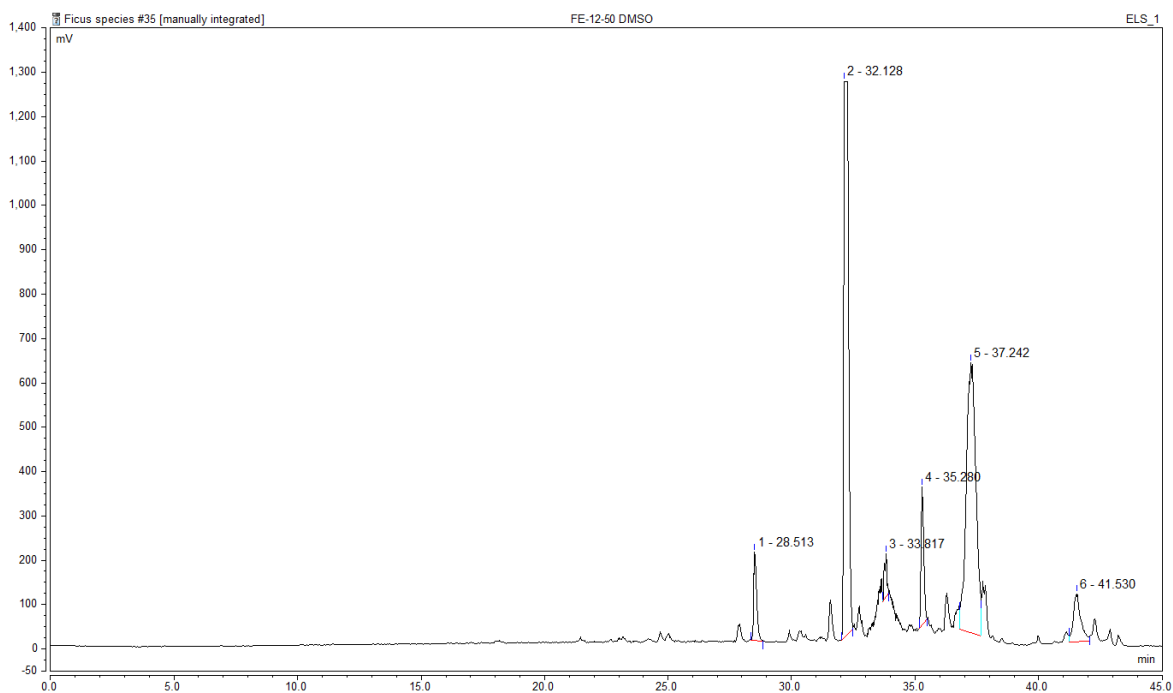
Tab. 8: Hmotnosti frakcí získaných flash chromatografií

Frakce	Hmotnost [g]
FE-1-4	0,000
FE-5-6	0,243
FE-7-11	0,336
FE-12-50	0,187
FE-51-61	0,212



Obr. 40: TLC frakcí získaných flash chromatografií

Frakce byly ještě podrobeny analýze pomocí HPLC-ELSD. Použili jsme vzorky o koncentraci 5 mg/ml. Na základě získaných chromatogramů jsme se rozhodli k další separaci použít frakci FE-12-50, protože obsahovala jednu dominantní látku, jejíž retenční čas byl 32,128 min.



Obr. 41: Chromatogram frakce FE-12-50

3.2.6 Izolace látek z frakce FE-12-50

Pro separaci frakce FE-12-50 a následnou izolaci hlavní látky jsme použili metodu semipreparativní HPLC. Veškerá frakce byla rozpuštěna v 1 ml THF. Podle ELSD jsme si nastavili metodu pro co nejúčinnější separaci látek, samotná separace již však probíhala s vypnutým ELSD, jelikož se jedná o destruktivní metodu, která by náš vzorek nevratně poškodila. Vzhledem k vysokému nástřiku vzorek částečně absorboval UV záření a na UV chromatogramu se objevily alespoň slabé odezvy píků, proto jsme nechali UV detektor zapnutý, abychom mohli látku efektivně izolovat. Použité parametry metody jsou specifikovány v Tab. 9.

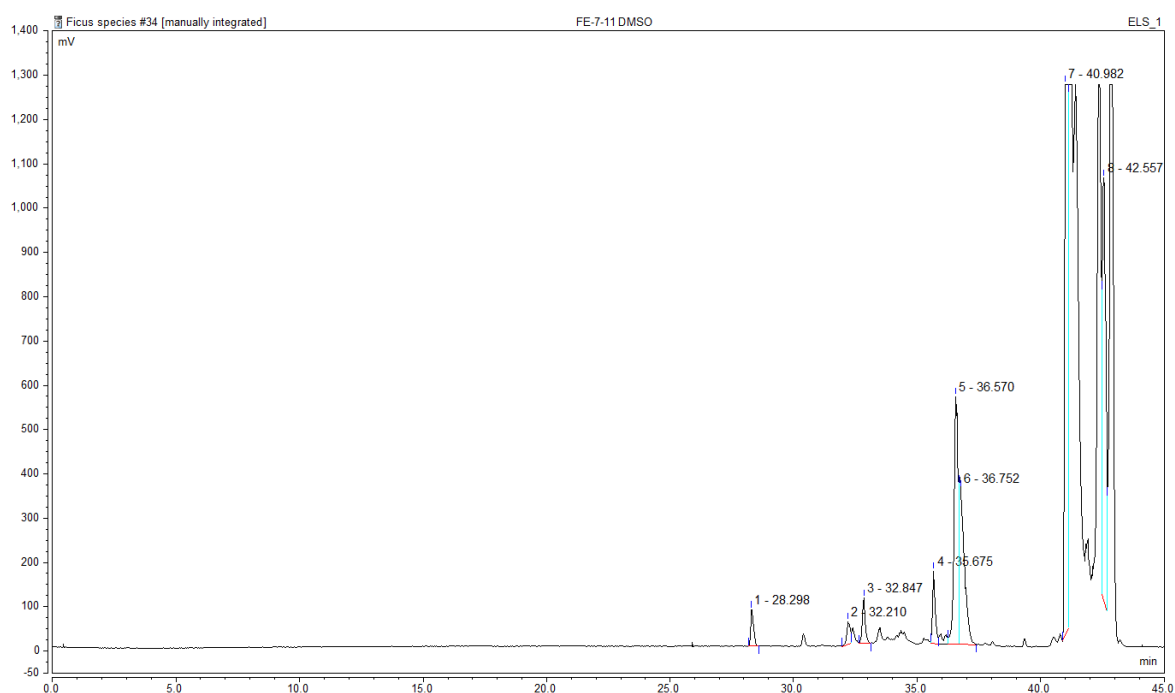
Tab. 9: Parametry metody použité při separaci frakce FE-12-50

Mobilní fáze	Acetonitril (A) a 0,2% HCOOH (B)
Gradientová eluce	0. min = 80 % (A) + 20 % (B) 20. minuta = 100 % (A) 25. minuta = 80 % (A) + 20 % (B)
Průtok	5 ml/min
Nástřik	30 μ l
Teplota kolonového bloku	40 °C
Detekce	UV při λ 210, 280 a 350 nm

Izolace probíhala způsobem, kdy byla látka sbírána do kádinky v předem určeném časovém rozmezí, které jsme určili na základě UV detekce. Takto byla zpracována celá frakce FE-12-50. Z látky, rozpuštěné ve směsi acetonitrilu a vody, byl následně pomocí rotační vakuové odpařky odpařen veškerý acetonitril a pomocí lyofilizátoru i zbytek vody. Těmito úkony byla získána látka FE-12-50-A, jejíž hmotnost byla rovných 11 mg. Retenční čas této látky byl 32,213 min.

3.2.7 Flash chromatografie frakce FE-7-11

Rozhodli jsme se flash chromatografii podrobit i frakci FE-7-11, jelikož bylo z TLC provedeného po separaci hexanového podílu (Obr. 39) patrné, že právě frakce FE-7-11 obsahuje několik dominantních látek, které byly vidět i na HPLC-ELSD chromatogramu této frakce (Obr. 42).



Obr. 42: Chromatogram frakce FE-7-11

Pro separaci bylo opět nutné vyvinout vhodnou mobilní fázi s vyhovujícím poměrem rozpouštědel. Testováno bylo několik mobilních fází, přičemž jako nejlepší byla vybrána kombinace chloroform:toluen:methanol o poměru 90:5:5. Všechny zkušební kombinace jsou uvedeny v Tab. 10.

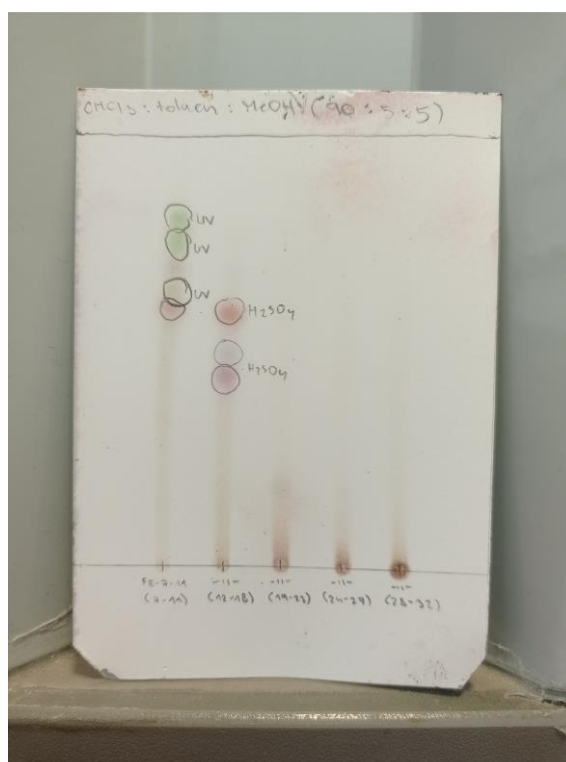
Tab. 10: Zkoušené kombinace rozpouštědel pro mobilní fázi

Rozpouštědla	Poměry
Chloroform:toluen:methanol	85:10:5
Chloroform:toluen	85:15
Chloroform:toluen:methanol	88:10:2
Chloroform:toluen:methanol	80:15:5
Chloroform:toluen:methanol	90:5:5

Flash chromatografie frakce FE-7-11 byla provedena v jednom runu a bylo získáno celkem 32 subfrakcí, které byly na základě podobnosti spojeny. Poté bylo ze subfrakcí pomocí rotační vakuové odparky odpařeno všechno rozpouštědlo a vzorky subfrakcí nanoseny na TLC destičku (Obr. 43). Pro tento účel byla použita stejná mobilní fáze jako u flash chromatografie. Na destičce se objevily dvě až tři skvrny u subfrakce FE-(7-11)-12-18, proto byla použita k izolaci dalších látek. Hmotnosti jednotlivých subfrakcí popisuje Tab. 11.

Tab. 11: Hmotnosti subfrakcí získaných separací frakce FE-7-11

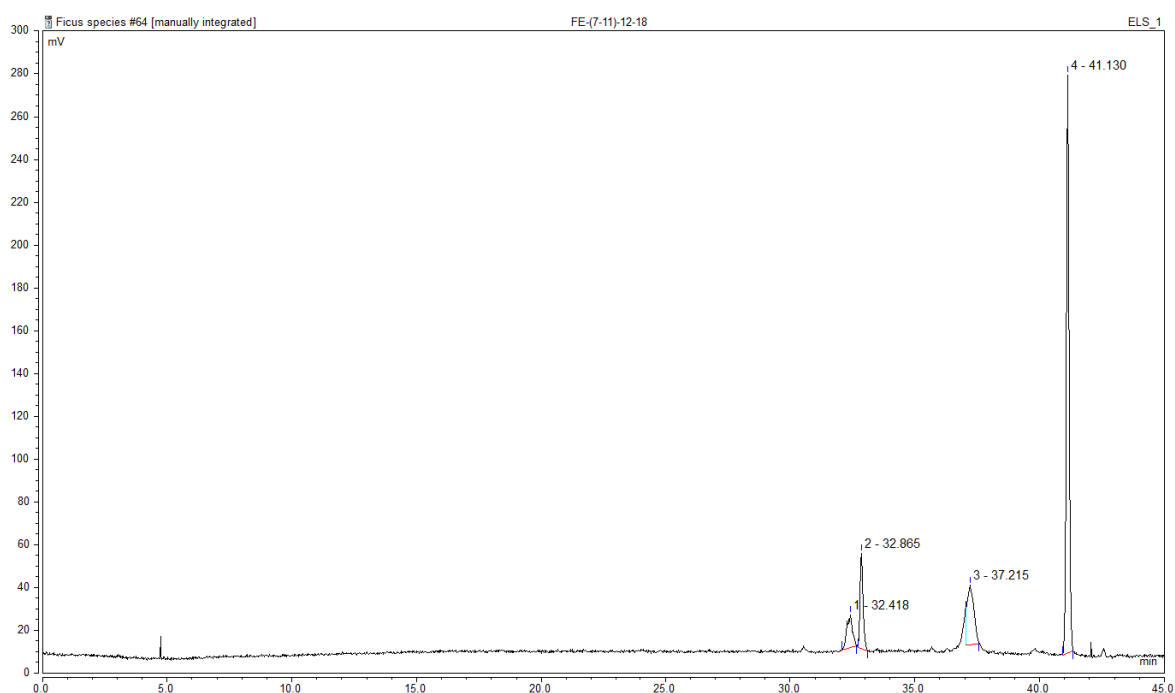
Subfrakce	Hmotnost [g]
FE-(7-11)-7-11	0,1280
FE-(7-11)-12-18	0,1378
FE-(7-11)-19-23	0,0065
FE-(7-11)-24-27	0,0051
FE-(7-11)-28-32	0,0132



Obr. 43: TLC subfrakcí získaných z FE-7-11

Subfrakce byly rovněž podrobeny analýze pomocí HPLC-ELSD. Všechny se rozpustily v THF, přičemž subfrakce FE-(7-11)-7-11 a FE-(7-11)-12-18 byly připraveny v koncentraci 5 mg/ml a subfrakce FE-(7-11)-19-23 a FE-(7-11)-24-27 v celém množství. Pouze subfrakce FE-(7-11)-28-32 se rozpustila v 1 ml methanolu. Touto metodou jsme potvrdili, že největší potenciál k izolaci dalších látek má subfrakce FE-(7-11)-12-18 (Obr. 44).

Dospěli jsme ke zjištění, že subfrakce FE-(7-11)-19-23 a FE-(7-11)-24-27 obsahují dvě látky, které absorbují UV záření, s ohledem na zadané téma se jimi však nebudeme v rámci diplomové práce zabývat. Vzhledem k tomu, že chromatogramy těchto subfrakcí vypadaly velmi podobně, rozhodli jsme se je spojit, čímž vznikla subfrakce FE-(7-11)-19-27 o hmotnosti 0,0116 g.



Obr. 44: Chromatogram subfrakce FE-(7-11)-12-18

3.2.8 Izolace látek ze subfrakce FE-(7-11)-12-18

Pro separaci subfrakce FE-(7-11)-12-18 jsme použili stejnou metodu jako při separaci frakce FE-12-50, tedy metodu semipreparativní HPLC. Pro začátek byla celá subfrakce rozpuštěna v 1 ml THF. Následná separace probíhala stejným způsobem jako při separaci frakce FE-12-50, tedy s vypnutým ELSD detektorem a zapnutým UV detektorem. Detailní parametry metody jsou zobrazeny v Tab. 12.

Tab. 12: Parametry metody použité při separaci subfrakce FE-(7-11)-12-18

Mobilní fáze	Acetonitril (A) a 0,2% HCOOH (B)
Gradientová eluce	0. min = 85 % (A) + 15 % (B) 20. minuta = 100 % (A) 25. minuta = 85 % (A) + 15 % (B)
Průtok	5 ml/min
Nástřik	20 μ l
Teplota kolonového bloku	40 °C
Detekce	UV při λ 210, 280 a 350 nm

Látky byly sbírány v předurčených časech, dokud nebyl spotřebován veškerý vzorek. Výsledkem byl získání tří látek FE-(7-11)-12-18-A, FE-(7-11)-12-18-B a

FE-(7-11)-12-18-C, které jsme pomocí rotační vakuové odparky zbavili rozpouštědla a poté zvážili. Hmotnosti získaných látek zobrazuje Tab. 13.

Tab. 13: Hmotnosti látek získaných ze subfrakce FE-(7-11)-12-18

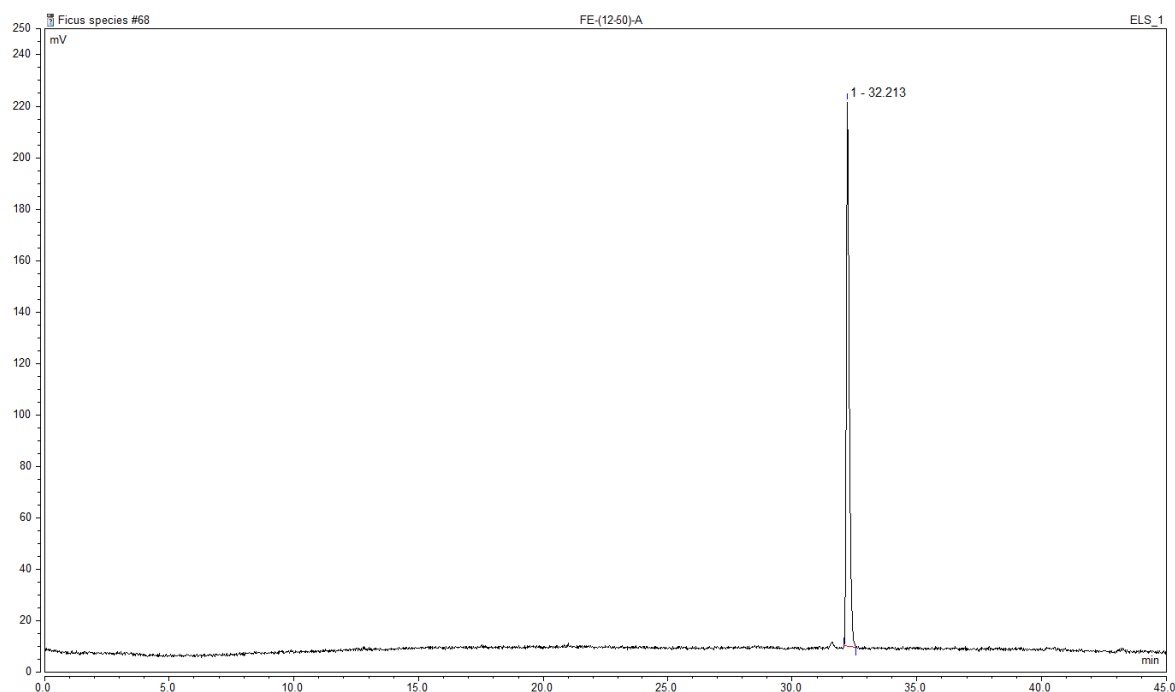
Látka	Hmotnost [mg]
FE-(7-11)-12-18-A	1,0
FE-(7-11)-12-18-B	1,9
FE-(7-11)-12-18-C	2,2

3.2.9 Identifikace získaných látek

Metodou semipreparativní HPLC se nám podařilo izolovat celkem čtyři látky: FE-12-50-A, FE-(7-11)-12-18-A, FE-(7-11)-12-18-B a FE-(7-11)-12-18-C. Ty byly analyzovány pomocí HPLC-ELSD za účelem zjištění jejich čistoty, následně byly některé z nich podrobeny infračervené spektroskopii, díky níž jsme zjistili přítomnost charakteristických funkčních skupin. Použita byla také metoda NMR, která nám přiblížila finální strukturu látek.

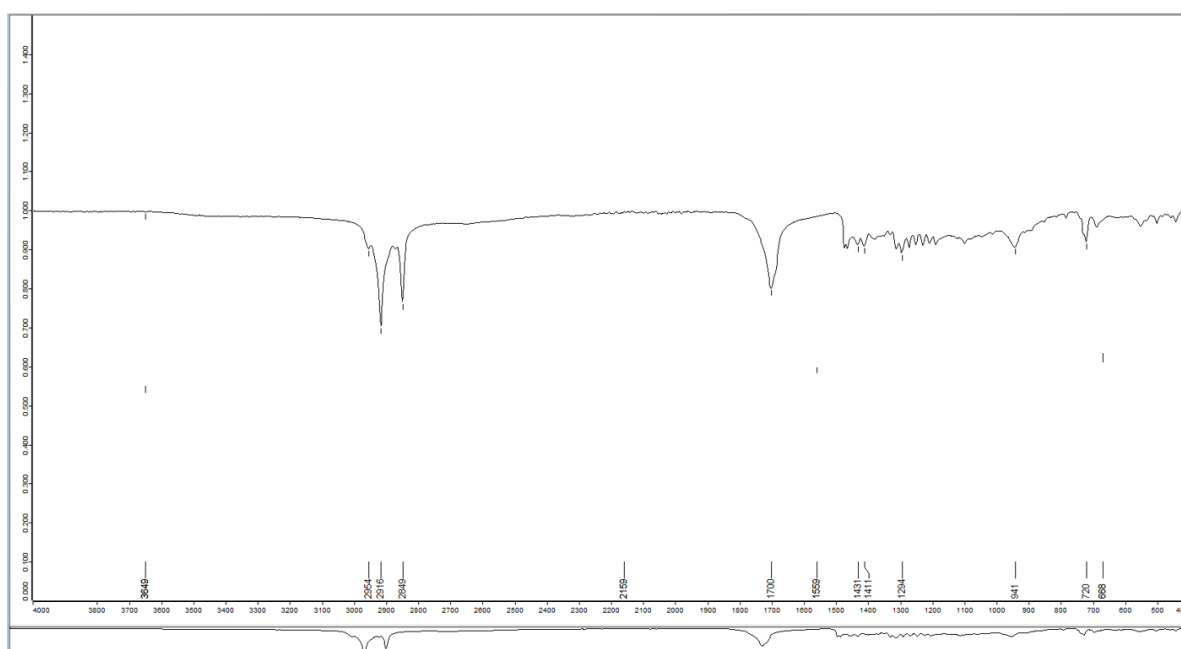
Látka FE-12-50-A

Chromatogram (Obr. 45) zobrazuje látku FE-12-50-A s t_R 32,213 min. Jedná se o čistou látku, která je relativně nepolární a taktéž víme, že látka neabsorbuje UV záření.



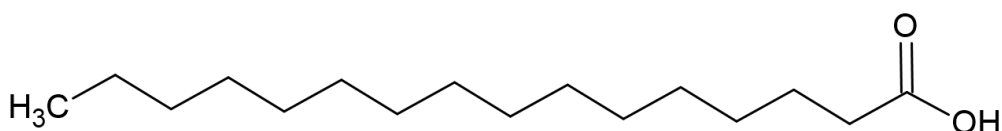
Obr. 45: HPLC-ELSD chromatogram látky FE-12-50-A

Pro identifikaci látky byla použita metoda infračervené spektroskopie. Na získaném spektru (Obr. 46) je možné vidět několik absorpčních pásů o různých vlnových délkách, které charakterizují konkrétní funkční skupiny přítomné ve struktuře látky. Signály o vlnočtu 2954–2849 cm^{-1} vypovídají o přítomnosti $-\text{CH}_2-$ nebo $-\text{CH}_3$ skupiny (C-H), pro které je charakteristická oblast v rozmezí 2970–2845 cm^{-1} . Absorpční pás o hodnotě 1700 cm^{-1} pravděpodobně odpovídá karbonylové nebo karboxylové skupině (C=O). V oblasti mezi 1500–1200 cm^{-1} se vyskytuje množství nevýrazných signálů, které mohou představovat např. karboxylovou skupinu (C-O, O-H), hydroxylovou skupinu (O-H) nebo alkanovou skupinu ($-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3-$) [61].



Obr. 46: IČ spektrum látky FE-12-50-A

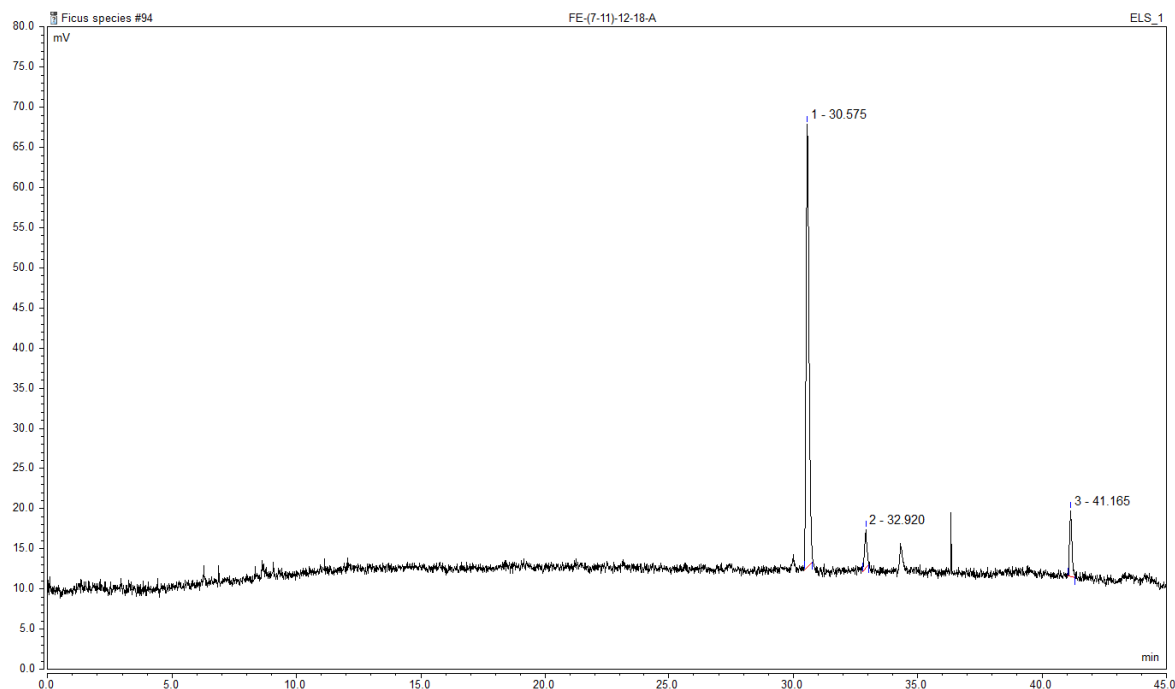
Konečná identifikace proběhla pomocí metody NMR a získané spektrum bylo následně vyhodnoceno PharmDr. Milanem Malaníkem, Ph.D. Látka byla identifikována jako kyselina palmitová, což je relativně běžná mastná kyselina, která již byla popsána v jiných druzích fíkovníků, např. ve *F. carica* [62] nebo *F. benjamina* [63].



Obr. 47: Kyselina palmitová

Látka FE-(7-11)-12-18-A

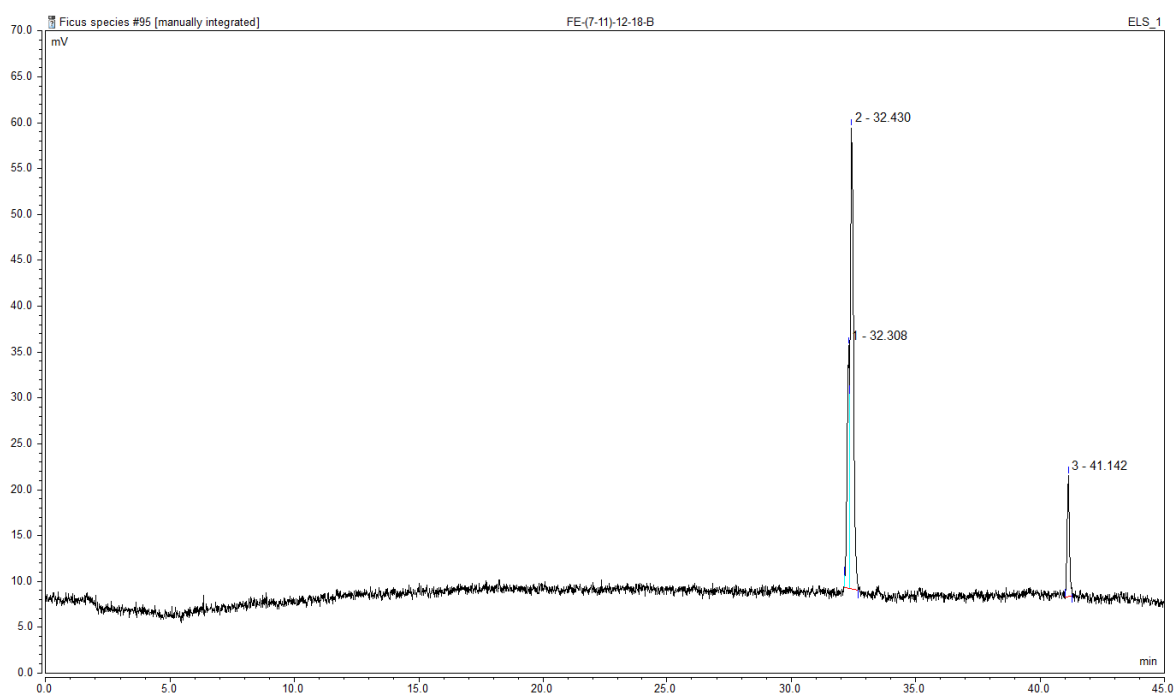
Jako další jsme izolovali látku FE-(7-11)-12-18-A, která nebyla zcela čistá, z chromatogramu (Obr. 48) je však patrný jeden dominantní pík s retenčním časem 30,575 min. Jedná se o látku nepolární, která neabsorbuje UV záření. Tato látka bohužel nemohla být analyzována metodou IČ spektroskopie z důvodu nízkého výtěžku.



Obr. 48: HPLC-ELSD chromatogram látky FE-(7-11)-12-18-A

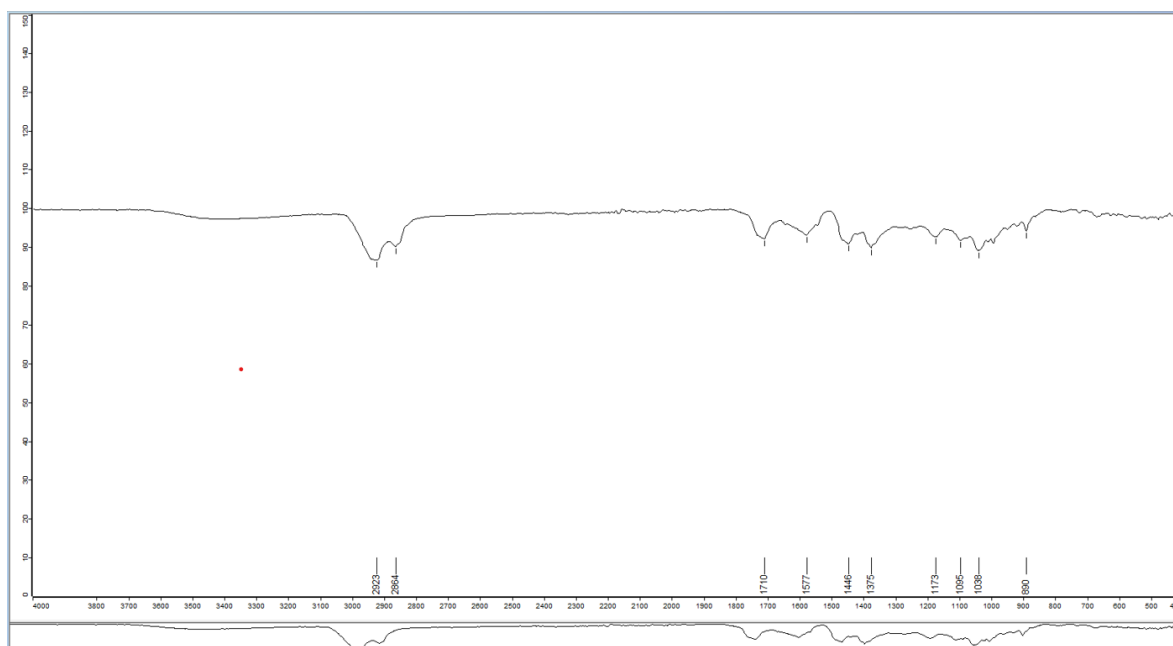
Látka FE-(7-11)-12-18-B

Na chromatogramu (Obr. 49) je na první pohled vidět jeden hlavní pík. Po bližším prozkoumání bylo zjištěno, že se jedná o dvojpík, což napovídá, že se jedná o dvě látky, které jsou si strukturně velmi podobné. Lze uvažovat, že se jedná o izomery. Retenční čas je opět podobný jako u předchozích látek, jedná se tedy o látku nepolární.



Obr. 49: HPLC-ELSD chromatogram látky FE-(7-11)-12-18-B

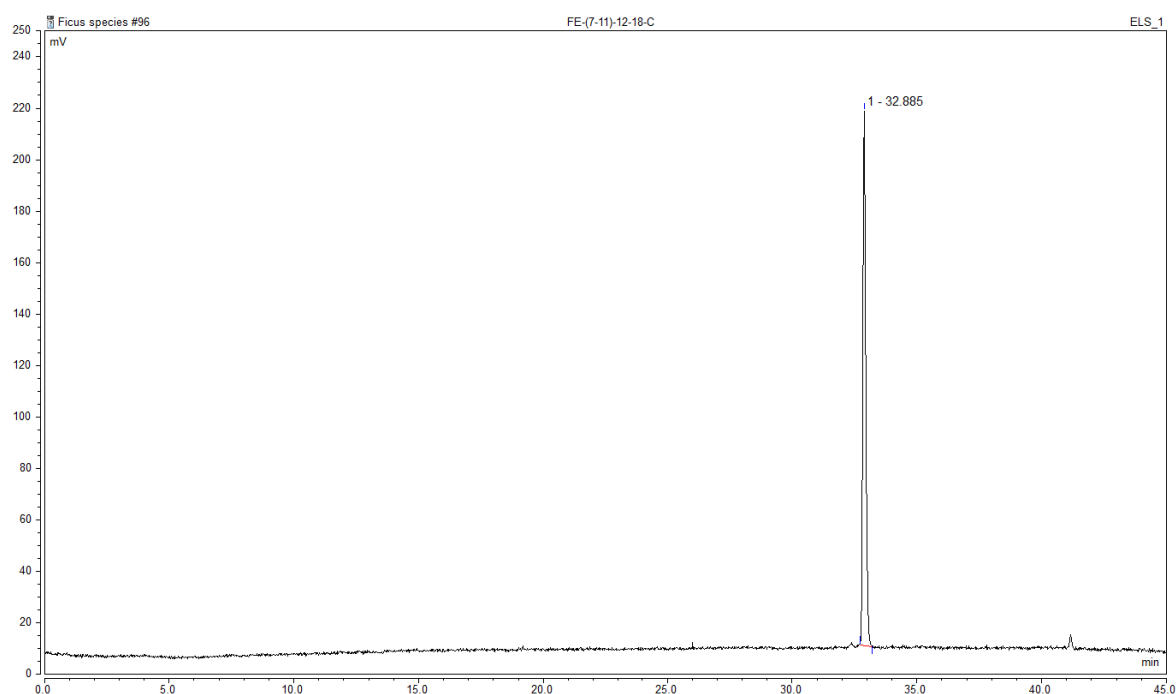
U této látky byla provedena analýza metodou IČ spektroskopie (Obr. 50). Absorpční pás v oblasti $2923\text{--}2864\text{ cm}^{-1}$ charakterizuje alkanovou skupinu (C-H), tedy $-\text{CH}_2-$ a/nebo $-\text{CH}_3$. Signál o vlnočtu 1710 cm^{-1} není příliš výrazný, s největší pravděpodobností se však bude jednat o karbonylovou nebo karboxylovou skupinu (C=O). Absorpční pás s vlnočtem 1577 cm^{-1} by mohl poukazovat na aminoskupinu (N-H). U zbývajících signálů není možné přesně určit, o jakou skupinu jde, mohlo by se jednat např. o aminoskupinu (C-N), alkanovou skupinu ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$), případně o primární, sekundární nebo terciární alkohol (C-O).



Obr. 50: IČ spektrum látky FE-(7-11)-12-18-B

Látka FE-(7-11)-12-18-C

Z chromatogramu (Obr. 51) lze vyčíst, že se jedná o látku čistou, s minimálním množstvím nečistot a vzhledem k retenčnímu času (t_R 32,885 min) také o látku nepolární. Stejně jako předchozí izolované sloučeniny, ani tato neabsorbuje UV záření.

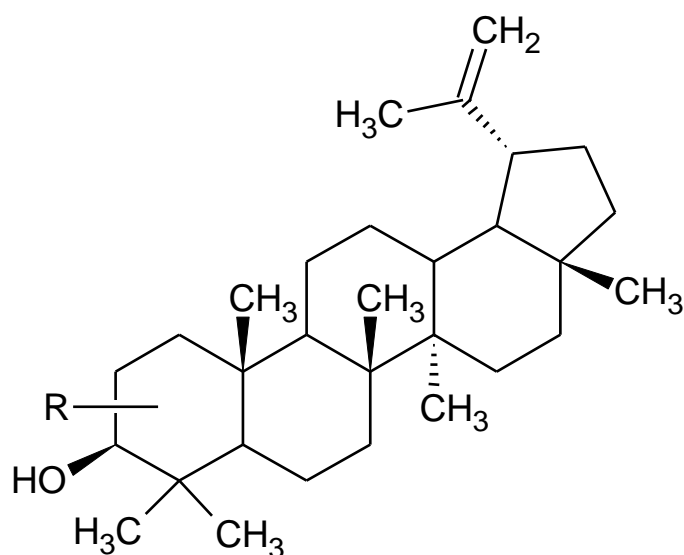


Obr. 51: HPLC-ELSD chromatogram látky FE-(7-11)-12-18-C

Izolovaná látka nebyla identifikována metodou IČ spektroskopie z důvodu nízkého výtěžku a olejovitého charakteru látky.

Pro zjištění finální struktury látek FE-(7-11)-12-18-B a FE-(7-11)-12-18-C byla provedena analýza metodou NMR, kterou vyhodnocoval PharmDr. Milan Malaník, Ph.D. Dle specifických charakteristik, jako je počet uhlíků, počet methylových skupin a přítomnost isopropenylové skupiny, lze předpokládat, že se jedná o triterpeny lupanového typu, konkrétně o deriváty lupeolu. Kvůli nízkému výtěžku však nebyly v 2D NMR spektrech vidět všechny korelace a nepodařilo se tak určit přesnou strukturu látek. Identifikace bude předmětem dalšího výzkumu.

Ačkoli v samotném *F. elastica* zatím nebyly triterpeny lupanového typu popsány, v jiných druzích se nachází relativně běžně. Jako příklad je možné uvést *F. benjamina*, *F. religiosa* nebo *F. racemosa*, které dle nalezené literatury obsahují pentacyklický triterpen lupeol [64–66], u něhož byly dokázány pozitivní účinky při hojení ran [67] a také protizánětlivé [68], antidiabetické [69] a hypolipidemické účinky [70]. Vzhledem k přítomnosti tohoto triterpenu v jiných fíkovnících je možné předpokládat, že se deriváty lupeolu nachází i ve *F. elastica*.



Obr. 52: Struktura derivátu lupeolu

4 Závěr

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na obecnou charakteristiku vybraných druhů fíkovníků (*F. binnendijkii* 'Alii', *F. binnendijkii* 'Amstel Gold', *F. microcarpa*, *F. elastica* 'Decora'). Zmiňována je botanická charakteristika, rozšíření, fytochemický profil a biologická aktivita jednotlivých druhů.

Experimentální část se věnuje zpracování rostlinných částí zmíněných druhů za účelem získání celkových extraktů a následně jejich analýze především pomocí metody HPLC-ELSD. Na základě toho byl k izolaci látek neabsorbujících UV záření vybrán druh bohatý na látky, které neabsorbují UV záření a zároveň nejsou příliš lipofilní.

Navzdory údajům ve vědecké literatuře, podle níž by měl být *F. microcarpa* bohatým zdrojem triterpenů, se nám tuto skutečnost nepodařilo prokázat, což mohlo být způsobeno přítomností velkého množství vysoce lipofilních látek, které maskovaly látky polárnější. Je pravděpodobné, že bychom přítomnost látek neabsorbujících UV záření objevili po provedení liquid-liquid extrakce, pomocí níž bychom se zbavili balastních sloučenin.

Ani jeden z kultivarů *F. binnendijkii* se neukázal jako zdroj perspektivních látek, podobně jako *F. microcarpa*. Ze všech zpracovávaných druhů existuje k tomuto fíkovníku nejméně vědeckých studií, což je poměrně překvapivé, vzhledem k tomu, že se nejedná o druh neznámý, ale naopak velmi hojně pěstovaný v domácnostech.

Na základě HPLC-ELSD analýzy celkových extraktů byl k dalšímu zpracování vybrán list *F. elastica*. Oproti ostatním druhům obsahoval méně lipofilní látky, což poukazovalo na možnou přítomnost triterpenů, které zapadají do tématu diplomové práce. Ve srovnání s ostatními rostlinnými částmi tohoto fíkovníku se nám právě list jevil jako nejbohatší na látky neabsorbující UV záření.

K izolaci látek jsme zvolili hexanový podíl, jelikož jeho HPLC-ELSD analýza prokázala přítomnost několika látek s retenčním časem okolo 28.–32. minuty, což je oblast chromatogramu charakteristická pro triterpeny. Chromatogram chloroformového podílu byl také velmi zajímavý, nicméně po provedení HPLC-DAD analýzy bylo zjištěno, že se jedná o látky absorbující UV záření, což neodpovídá tématu diplomové práce. Chloroformový podíl se však jeví jako perspektivní a bude předmětem dalšího zkoumání.

Následovala flash chromatografie, díky které byly získány jednotlivé frakce. K izolaci látek byla vybrána frakce FE-12-50 a subfrakce FE-(7-11)-12-18, z kterých byly metodou semipreparativní HPLC izolovány čtyři látky.

Dle HPLC-ELSD analýzy se dá konstatovat, že látky FE-12-50-A a FE-(7-11)-12-18-C jsou relativně čisté, naopak látka FE-(7-11)-12-18-A obsahuje malé množství nečistot. U látky FE-(7-11)-12-18-B bylo zjištěno, že se jedná o dvojpík, což by mohlo signalizovat existenci dvou izomerů.

Finální struktura byla zjištěna pouze u látky FE-12-50-A, která byla identifikována jako kyselina palmitová. U látek FE-(7-11)-12-18-B a FE-(7-11)-12-18-C se nám podařilo zjistit, že se pravděpodobně jedná o deriváty lupeolu. Látka FE-(7-11)-12-18-A nemohla být identifikována z důvodu nízkého výtěžku.

Závěrem lze říci, že všechny druhy, o kterých pojednává tato diplomová práce, obsahovaly hlavně látky nepolární a vysoce lipofilní. V předchozích diplomových pracích byly zpracovány fíkovníky, u kterých byl zjištěn významný obsah látek absorbujících UV záření (s výjimkou *F. benjamina*), jako jsou kumariny nebo fenolické látky (prenylované isoflavony, fenolické kyseliny) [59, 60]. Tato zjištění jsou nesporným důkazem toho, jak jsou jednotlivé druhy fíkovníků odlišné a jedinečné. Je tudíž potřeba jim věnovat náležitou pozornost.

Použité zdroje

- [1] WUNDERLIN, Richard P. Moraceae. In: *Flora of North America, Vol. 3*. 1993 [vid. 2024-01-26], s. 1753–1831. Dostupné z: http://efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=10583
- [2] DUBEY, Praveen, Shaikh MUJAFFAR a Arjun Prasad TIWARI. *Ficus Species of Madhya Pradesh*. 2019.
- [3] SANTISUK, Thawatchai a Kai LARSEN, ed. *Flora of Thailand. Vol. 10, Pt. 4: Cecropiaceae & Moraceae*. Bangkok: The Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, 2011. ISBN 978-974-286-874-1.
- [4] WU, Zheng-yi, Zhe-Kun ZHOU a Michael G. GILBERT. *Ficus*. In: *Flora of China, Vol. 5*. 2003 [vid. 2024-03-04], s. 37. Dostupné z: http://efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=112770
- [5] WANG, Rong, Robert AYLWIN, James COBB, Lamara CRAINE, Salah GHANA, J. Alfredo REYES-BETANCORT, Rupert J. QUINNELL a Stephen G. COMPTON. The impact of fig wasps (Chalcidoidea), new to the Mediterranean, on reproduction of an invasive fig tree *Ficus microcarpa* (Moraceae) and their potential for its biological control. *Biological Control*. 2015, **81**, 21–30. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biocontrol.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.004)
- [6] GARDNER, Simon, Pindar SIDISUNTHORN a Kongkanda CHAYAMARIT. *Forest trees of Southern Thailand. Vol. 3: Monimiaceae to Ximeniaceae & Gymnosperms*. Bangkok: Amarin Printing and Publishing Plc, 2018. ISBN 978-616-468-571-0.
- [7] EATON, Deren C. Coevolutionary Research. In: *Encyclopedia of Ecology*. B.m.: Elsevier, 2008 [vid. 2024-03-04], s. 659–663. ISBN 978-0-08-045405-4. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-008045405-4.00777-1](https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00777-1)
- [8] BERG, Cornelis C. Flora Malesiana Precursor for the Treatment of Moraceae 1: The Main Subdivision of *Ficus*: The Subgenera. *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*. 2003, **48**(1), 166–177. Dostupné z: [doi:10.3767/000651903X686132](https://doi.org/10.3767/000651903X686132)
- [9] BERG, Cornelis C. a Edred John Henry CORNER, ed. *Flora Malesiana. 17,2: Series I, Spermatophyta Moraceae (Ficus)*. Groningen: Noordhoff, 2005. ISBN 978-90-71236-61-7.
- [10] AUGUSTUS, David Paul Singh George a Gerald J. SEILER. *Ficus elastica* – The Indian rubber tree – An underutilized promising multi-use species. *Biomass and*

- Bioenergy*. 2011, **35**(7), 3247–3250. Dostupné z: doi:10.1016/j.biombioe.2011.03.015
- [11] YERCAUD, Elango. *Moraceae-indian rubber tree, fruit yellow, edible*. 2016 [vid. 2023-11-19]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ficus_elastica-2-fruit-yercaud-salem-India.jpg
- [12] POWO. *Ficus elastica* Roxb. ex Hornem. | Plants of the World Online | Kew Science. *Plants of the World Online*. 2024 [vid. 2023-11-18]. Dostupné z: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60458499-2>
- [13] ARSYAD, Anggun Selvy, Arief NURROCHMAD a Nanang FAKHRUDIN. Phytochemistry, traditional uses, and pharmacological activities of *Ficus elastica* Roxb. ex Hornem: A review. *Journal of Herbmed Pharmacology*. 2022, **12**(1), 41–53. Dostupné z: doi:10.34172/jhp.2023.04
- [14] CHANTARASUWAN, Bhanumas, Sompong THONGSRIKEM, Piya PINYO, Permsak KANITHAJATA a Finn KJELLBERG. A Natural Population of *Ficus elastica* Roxb. ex Hornem., in Thailand. 2016, 7–14.
- [15] SEIF EL-DIN, Sayed H., Naglaa M. EL-LAKKANY, Mona A. MOHAMED, Manal M. HAMED, Olov STERNER a Sanaa S. BOTROS. Potential effect of the medicinal plants *Calotropis procera*, *Ficus elastica* and *Zingiber officinale* against *Schistosoma mansoni* in mice. *Pharmaceutical Biology*. 2014, **52**(2), 144–150. Dostupné z: doi:10.3109/13880209.2013.818041
- [16] KIM, Seung Hyun, Jin-Kyoung KIM a Young Ho KIM. Chemical Constituents of the *Ficus elastica* Leaves and Their Antioxidant Activities. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2012, **33**(10), 3461–3464. Dostupné z: doi:10.5012/BKCS.2012.33.10.3461
- [17] IFIJEN, Ikhazuagbe H., Ifeanyi J. ODIACHI, Muniratu MALIKI, Oscar N. AGHEDO a Casmir O. OKEREKE. Investigation of the Anti-malaria Potency and Chemical Constituents of the Bark Extracts of *Ficus elastica* in *Plasmodium berghei* Infected Mice. *Chemistry Africa*. 2020, **3**(4), 1045–1051. Dostupné z: doi:10.1007/s42250-020-00163-2
- [18] *Ficus elastica*: Cultivating the Rubber Plant. *The Figs of Borneo*. 2019 [vid. 2024-02-08]. Dostupné z: <https://borneoficus.info/2019/06/19/ficus-elastica-cultivating-the-rubber-tree/>
- [19] STEVENS, Henry P. *Ficus Elastica* and *Castilloa Latices*. *Rubber Chemistry and Technology*. 1939, **12**(4), 688–694. Dostupné z: doi:10.5254/1.3546479

- [20] LANSKY, Ephraim P. a Helena M. PAAVILAINEN. *Figs: The Genus Ficus*. Boca Raton: CRC Press, 2011. Traditional herbal medicines for modern times, 9. ISBN 978-1-4200-8966-0.
- [21] STARR, Forest, Kim STARR a Lloyd LOOPE. *Ficus elastica*, India rubber tree, Moraceae. *United States Geological Survey, Biological Resources Division, Haleakala Field Station, Maui, Hawai'i*. 2003, 1–5.
- [22] HARI, B.N. Vedha, P. Saravana KUMAR a D. Ramya DEVI. Comparative in-vitro anthelmintic activity of the latex of *Ficus religiosa*, *Ficus elastica* and *Ficus bengalensis*. *Journal of Phytology*. 2011, **3**(3), 26–30.
- [23] MBOSSO TEINKELA, Jean Emmanuel, Xavier SIWE NOUNDOU, Edwige Laure NGUEMFO, Franck MEYER, Rene WINTJENS, Michelle ISAACS, Albert Emmanuel MPONDO MPONDO, Heinrich C. HOPPE, Rui Werner Maçedo KRAUSE a Anatole Guy Blaise AZEBAZE. Biological activities of plant extracts from *Ficus elastica* and *Selaginella vogelli*: An antimalarial, antitrypanosomal and cytotoxicity evaluation. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018, **25**(1), 117–122. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2017.07.002
- [24] FREITAS, Cleverson Diniz T., Jefferson Soares OLIVEIRA, Maria Raquel A. MIRANDA, Nívea Maria R. MACEDO, Maurício Pereira SALES, Laurival A. VILLAS-BOAS a Márcio Viana RAMOS. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2007, **45**(10), 781–789. Dostupné z: doi:10.1016/j.plaphy.2007.07.020
- [25] MBOSSO TEINKELA, Jean Emmanuel, Jules Clément Assob NGUEDIA, Franck MEYER, Bruno Ndjakou LENTA, Silvère NGOUELA, Benjamin LALLEMAND, Véronique MATHIEU, Pierre Van ANTWERPEN, Anna Longdoh NJUNDA, Dieudonné ADIOGO, Etienne TSAMO, Yvan LOOZE, Robert KISS a René WINTJENS. Ceramide, cerebroside and triterpenoid saponin from the bark of aerial roots of *Ficus elastica* (Moraceae). *Phytochemistry*. 2012, **83**, 95–103. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2012.07.010
- [26] MBOSSO TEINKELA, Jean Emmanuel, Xavier SIWE NOUNDOU, Edwige Laure NGUEMFO, Franck MEYER, Alfred DJOUKOUÉ, Pierre VAN ANTWERPEN, Silvère NGOUELA, Etienne TSAMO, Emmanuel Albert MPONDO MPONDO, Juliette Cathérine VARDAMIDES, Guy Anathole Blaise AZEBAZE a René WINTJENS. Identification of compounds with anti-proliferative activity from the wood of *Ficus elastica* Roxb. ex Hornem. aerial roots. *Fitoterapia*. 2016, **112**, 65–73. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2016.05.002
- [27] STONE, K. J., Alan R. WELLBURN, Frank W. HEMMING a J.F. PENNOCK. The characterization of ficaprenol-10, -11 and -12 from the leaves of *Ficus elastica* (decorative rubber plant). *Biochemical Journal*. 1967, **102**(1), 325–330.

- [28] WELLBURN, Alan R., J. STEVENSON, Frank W. HEMMING a Richard Alan MORTON. The characterization and properties of castaprenol-11, -12 and -13 from the leaves of *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut). *Biochemical Journal*. 1967, **102**(1), 313–324.
- [29] SPERANZA, Giovanna, Paolo MANITTO, Diego MONTI a Francesca LIANZA. Feroxidin, a novel 1-methyltetralin derivative isolated from cape aloe. *Tetrahedron Letters*. 1990, **31**(21), 3077–3080. Dostupné z: doi:10.1016/S0040-4039(00)89030-9
- [30] TEIXEIRA, Dora Martins, Vera Calção CANELAS, Manuel Martins DO CANTO, Jorge Ginja TEIXEIRA a Cristina Barrocas DIAS. HPLC-DAD Quantification of Phenolic Compounds Contributing to the Antioxidant Activity of *Maclura pomifera*, *Ficus carica* and *Ficus elastica* Extracts. *Analytical Letters*. 2009, **42**(18), 2986–3003. Dostupné z: doi:10.1080/00032710903276646
- [31] NAVEED, Muhammad, Veghar HEJAZI, Muhammad ABBAS, Asghar Ali KAMBOH, Ghulam Jilany KHAN, Muhammad SHUMZAI, Fawwad AHMAD, Daryoush BABAZADEH, Xia FANGFANG, Faezeh MODARRESI-GHAZANI, Li WENHUA a Zhou XIAOHUI. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018, **97**, 67–74. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2017.10.064
- [32] LYNN, Kenneth R. a Nancy A. CLEVETTE-RADFORD. Ficin E, a serine-centred protease from *Ficus elastica*. *Phytochemistry*. 1986, **25**(7), 1559–1561. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-9422(00)81208-X
- [33] DEVARAJ, Basavarajappa K., Lalitha R. GOWDA a Vishweshwaraiah PRAKASH. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry*. 2008, **69**(3), 647–655. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2007.09.003
- [34] CSIRO. *Ficus microcarpa*. *Australian Tropical Rainforest Plants*. 2020 [vid. 2023-11-18]. Dostupné z: https://apps.lucidcentral.org/rainforest/text/entities/ficus_microcarpa.htm
- [35] CHIANG CHAN, Eric Wei, Joseph TANGAH, Tomomi INOUE, Mami KAINUMA, Karin BABA, Nozomi OSHIRO, Mio KEZUKA a Norimi KIMURA. Botany, Uses, Chemistry and Pharmacology of *Ficus microcarpa*: A Short Review. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2017, **8**(1), 103–111. Dostupné z: doi:10.5530/srp.2017.1.18
- [36] YULE, Henry, Arthur Coke BURNELL a William CROOKE. *Hobson-Jobson; a glossary of colloquial Anglo-Indian words and phrases, and of kindred terms, etymological, historical, geographical and discursive*. B.m.: London, J. Murray,

- 1903 [vid. 2024-01-27]. Dostupné
z: <http://archive.org/details/hobsonjobsonagl02croogoo>
- [37] POWO. *Ficus microcarpa* L.f. | Plants of the World Online | Kew Science. *Plants of the World Online*. 2024 [vid. 2023-11-18]. Dostupné
z: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:853217-1>
- [38] STARR, Forest, Kim STARR a Lloyd LOOPE. *Ficus microcarpa*, Chinese banyan, Moraceae. *United States Geological Survey, Biological Resources Division, Haleakala Field Station, Maui, Hawai'i*. 2003, 1–8.
- [39] SIMBERLOFF, Daniel. Introduced Species, Impacts and Distribution of. In: *Encyclopedia of Biodiversity*. B.m.: Elsevier, 2013, s. 357–368. ISBN 978-0-12-384720-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384719-5.00251-3
- [40] NAKAMA, Yuei. Research on the History and Production of Lye-kneaded Wheat Noodle as Part of Okinawan Traditional Food Culture. *Science Bulletin of the College of Agriculture - University of the Ryukyus (Japan)*. 2003, **50**, 85–92.
- [41] LIU, Li-Heng, Li-Sheng WANG a Xiong-Min LIU. Comparison of antitussive, expectorant and antiasthmatic activities of different extracts from *Ficus microcarpa*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009, **3**(8), 596–599.
- [42] AO, Changwei, Farah DEBA, Masakuni TAKO a Shinkichi TAWATA. Biological activity and composition of extract from aerial root of *Ficus microcarpa* L. fil. *International Journal of Food Science & Technology*. 2009, **44**(2), 349–358. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01732.x
- [43] AO, Changwei, Anping LI, Abdelnaser A. ELZAAWELY, Tran D. XUAN a Shinkichi TAWATA. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. extract. *Food Control*. 2008, **19**(10), 940–948. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2007.09.007
- [44] KALASKAR, Mohan G. a Sanjay J. SURANA. Free radical scavenging and hepatoprotective potential of *Ficus microcarpa* L. fil. bark extracts. *Journal of Natural Medicines*. 2011, **65**(3), 633–640. Dostupné z: doi:10.1007/s11418-011-0532-z
- [45] AO, Changwei, Tatsunori HIGA, Hui MING, Yu-ting DING a Shinkichi TAWATA. Isolation and identification of antioxidant and hyaluronidase inhibitory compounds from *Ficus microcarpa* L. fil. bark. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2010, **25**(3), 406–413. Dostupné z: doi:10.3109/14756360903213473

- [46] RJEIBI, Ilhem, Sana NCIB, Hichem ALIMI, Anouar BEN SAAD, Imen SAÏD a Sami SOUID. Comparison of phytochemicals, antimicrobial, and antioxidant capacities in different anatomical parts of *Ficus microcarpa* (Moraceae). *Journal of Food Biochemistry*. 2017, **41**(3), 1–9. Dostupné z: doi:10.1111/jfbc.12354
- [47] KIEM, Phan Van, Nguyen Xuan CUONG, Nguyen Xuan NHIEM, Vu Kim THU, Ninh Khac BAN, Chau Van MINH, Bui Huu TAI, Truong Nam HAI, Sang Hyun LEE, Hae Dong JANG a Young Ho KIM. Antioxidant activity of a new C-glycosylflavone from the leaves of *Ficus microcarpa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011, **21**(2), 633–637. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2010.12.025
- [48] LI, Yen-Cheng a Yueh-Hsiung KUO. Four New Compounds, Ficusal, Ficulesquignan A, B, and Ficusolide Diacetate from the Heartwood of *Ficus microcarpa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2000, **48**(12), 1862–1865. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.48.1862
- [49] KUO, Yueh-Hsiung a Yi-Ming CHAIANG. Five New Taraxastane-Type Triterpenes from the Aerial Roots of *Ficus microcarpa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1999, **47**(4), 498–500. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.47.498
- [50] CHIANG, Yi-Ming, Jang-Yang CHANG, Ching-Chuan KUO, Chi-Yen CHANG a Yueh-Hsiung KUO. Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry*. 2005, **66**(4), 495–501. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2004.12.026
- [51] KUO, Yueh-Hsiung a Yi-Ming CHIANG. Six New Ursane- and Oleanane-Type Triterpenes from the Aerial Roots of *Ficus microcarpa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2000, **48**(5), 593–596. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.48.593
- [52] LAMAN, Timothy G. a George D. WEIBLEN. Figs of Gunung Palung National Park (West Kalimantan, Indonesia). *Tropical Biodiversity*. 1998, **5**(3), 245–297.
- [53] BERG, Cornelis C. Flora Malesiana Precursor for the Treatment of Moraceae 7: *Ficus* Subgenus *Urostigma*. *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*. 2004, **49**(2), 463–480. Dostupné z: doi:10.3767/000651904X484423
- [54] UNWIN, Lianne. Plant of the Month - *Ficus binnendijkii* „Alii” (Alii Ficus). *Moore Park Plantscapes: Tropical Office Plants*. 2015 [vid. 2023-11-19]. Dostupné z: <http://mooreparkplantscapes.ca/plant-of-the-month-ficus-binnendijkii-alii-alii-ficus/>

- [55] FOONG, Ang Wee. NParks | *Ficus binnendijkii*. *National Parks*. 2012 [vid. 2023-11-19]. Dostupné z: <https://www.nparks.gov.sg/florafaunaweb/flora/5/5/5592>
- [56] POWO. *Ficus binnendykii* (Miq.) Miq. | Plants of the World Online | Kew Science. *Plants of the World Online*. 2024 [vid. 2023-11-18]. Dostupné z: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:852499-1>
- [57] EL-RAFIE, Hanaa Mohamed a Amany Ameen SLEEM. Phytochemical Studies of *Ficus Binnendijkii* Leaf Extracts: Fractionation and Bioactivities of Its Petroleum Ether Extract. 2016, **8**(10), 1742–1750.
- [58] KRČ-KONEČNÁ, Michaela. *Separace obsahových látek plodů Sorbus domestica s potenciální antidiabetickou aktivitou*. Brno, 2022. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta. Vedoucí práce PharmDr. Milan Malaník, Ph.D.
- [59] STISKÁLKOVÁ, Tereza. *Fytochemická analýza vybraných částí Ficus species II*. Brno, 2023. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta. Vedoucí práce PharmDr. Milan Malaník, Ph.D.
- [60] JEDINÁKOVÁ, Terézia. *Fytochemická analýza vybraných částí Ficus species I*. Brno, 2023. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta. Vedoucí práce PharmDr. Milan Malaník, Ph.D.
- [61] COATES, John. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: Robert A. MEYERS, ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 1. vyd. B.m.: Wiley, 2000 [vid. 2024-04-08], s. 10815–10837. ISBN 978-0-471-97670-7. Dostupné z: doi:10.1002/9780470027318.a5606
- [62] JEONG, Woo-Sik a Pierre LA CHANCE. Phytosterols and Fatty Acids in Fig (*Ficus carica*, var. Mission) Fruit and Tree Components. *Journal of Food Science*. 2001, **66**(2), 278–281. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb11332.x
- [63] IMRAN, Muhammad, Nasir RASOOL, Komal RIZWAN, Muhammad ZUBAIR, Muhammad RIAZ, Muhammad ZIA-UL-HAQ, Usman Ali RANA, Ayman NAFADY a Hawa ZE JAAFAR. Chemical composition and Biological studies of *Ficus benjamina*. *Chemistry Central Journal*. 2014, **8**(1), 1–10. Dostupné z: doi:10.1186/1752-153X-8-12
- [64] SINGH, Amandeep, Hayat Mohammad MUKHTAR, Hardeep KAUR a Lakhvir KAUR. Investigation of antiplasmodial efficacy of lupeol and ursolic acid isolated from *Ficus benjamina* leaves extract. *Natural Product Research*. 2020, **34**(17), 2514–2517. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2018.1540476

- [65] SINGH, Damanpreet, Bikram SINGH a Rajesh Kumar GOEL. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus religiosa*: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, **134**(3), 565–583. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2011.01.046
- [66] BOPAGE, Nisansala Swarnamali, G. M. KAMAL BANDARA GUNATHERATH, Kithsiri Hector JAYAWARDENA, Sushila Chandrani WIJEYARATNE, Ajita Mahendra ABEYSEKERA a Seneviratne SOMARATNE. Dual function of active constituents from bark of *Ficus racemosa* L in wound healing. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018, **18**(29), 1–13. Dostupné z: doi:10.1186/s12906-018-2089-9
- [67] PEREIRA BESERRA, Fernando, Lucas Fernando SÉRGIO GUSHIKEN, Ana Júlia VIEIRA, Danilo AUGUSTO BÉRGAMO, Patrícia LUÍSA BÉRGAMO, Mariana OLIVEIRA DE SOUZA, Carlos ALBERTO HUSSNI, Regina KIOMI TAKAHIRA, Rafael HENRIQUE NÓBREGA, Emanuel Ricardo MONTEIRO MARTINEZ, Christopher JOHN JACKSON, Gabriela LEMOS DE AZEVEDO MAIA, Ariane LEITE ROZZA a Cláudia HELENA PELLIZZON. From Inflammation to Cutaneous Repair: Topical Application of Lupeol Improves Skin Wound Healing in Rats by Modulating the Cytokine Levels, NF- κ B, Ki-67, Growth Factor Expression, and Distribution of Collagen Fibers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**(4952), 1–21. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21144952
- [68] BADSHAH, Haroon, Tahir ALI, Shafiq-ur REHMAN, Faiz-ul AMIN, Faheem ULLAH, Tae Hyun KIM a Myeong Ok KIM. Protective Effect of Lupeol Against Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation via the p38/c-Jun N-Terminal Kinase Pathway in the Adult Mouse Brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2016, **11**(1), 48–60. Dostupné z: doi:10.1007/s11481-015-9623-z
- [69] ALQAHTANI, Ali, Kaiser HAMID, Antony KAM, Ka Ho WONG, Zohra ABDELHAK, Valentina RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, Kelvin CHAN, Kong M. LI, Paul W. GROUNDWATER a Geroge Q. LI. The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications. *Current Medicinal Chemistry*. 2013, **20**(7), 908–931. Dostupné z: doi:10.2174/092986713805219082
- [70] SUDHAHAR, Varatharajan, Sekar Ashok KUMAR a Palaninathan VARALAKSHMI. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic–oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. *Life Sciences*. 2006, **78**(12), 1329–1335. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2005.07.011