MASARYKOVA UNIVERZITA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

Izolace a identifikace prenylovaných sloučenin *Broussonetia papyrifera*

Diplomová práce

MICHAELA OBROVSKÁ

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

Ústav přírodních léčiv
Program Farmacie

Brno 2021

MUNI
PHARM

Bibliografický záznam

Autor: Michaela Obrovská
Farmaceutická fakulta
Masarykova univerzita
Ústav přírodních léčiv

Název práce: Izolace a identifikace prenylovaných sloučenin *Broussonetia papyrifera*

Studijní program: Farmacie

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

Rok: 2021

Počet stran: 89

Klíčová slova: *Broussonetia papyrifera*, prenylované flavonoidy, chromatografické metody, kazinol J, kazinol C, kazinol E, broussoflavonol A

Bibliographic record

Author: Michaela Obrovská
Faculty of Pharmacy
Masaryk University
Department of Natural Drugs

Title of Thesis: Isolation and identification of prenylated compounds from *Broussonetia papyrifera*

Degree Programme: Pharmacy

Supervisor: PharmDr. Milan Malaník, Ph.D.

Year: 2021

Number of Pages: 89

Keywords: *Broussonetia papyrifera*, prenylated flavonoids, chromatographic methods, kazinol J, kazinol C, kazinol E, broussoflavonol A

Anotace

Práce v první části poskytuje informace o botanické charakteristice, rozšíření a využití rostliny *Broussonetia papyrifera* (Moraceae) a přehled obsahových látek ze skupiny prenylovaných flavonoidů, jejich biosyntézu, strukturu a biologickou aktivitu. Cílem experimentální části je izolace flavonoidů s prenylovými substituenty z extraktu dřevních částí rostliny pomocí sloupcové chromatografie a semipreparativní HPLC a následná identifikace získaných látek metodami UV a IČ spektroskopie a NMR. Izolované sloučeniny byly identifikovány jako kazinol J, směs kazinolu C a kazinolu E a broussoflavonol A.

Abstract

This thesis provides information regarding botanical characteristics, geographical distribution and use of the plant *Broussonetia papyrifera* (Moraceae). It gives an overview of its prenylated flavonoids in terms of biosynthesis, structure and biological activity. The aim of the experimental part is to isolate prenylated flavonoids from the extract of woody parts of the plant using column chromatography and semipreparative HPLC and subsequently to identify the constituents with UV and IR spectroscopy and NMR. Isolated constituents were identified as kazinol J, mixture of kazinol C and kazinol E and broussoflavonol A.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Izolace a identifikace prenylovaných sloučenin *Broussonetia papyrifera*** 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 13. dubna 2021

.....

Michaela Obrovská

Poděkování

Děkuji vedoucímu této práce PharmDr. Milanu Malaníkovi, Ph.D. za jeho nekonečnou trpělivost, ochotu a vstřícnost, za veškerý čas, který mi během celé práce věnoval a v neposlední řadě za cenné rady a podnětné připomínky při vypracování.

Obsah

Seznam obrázků 12

Seznam tabulek 13

1 Úvod a cíle práce 15

2 Teoretická část 16

2.1 Botanická klasifikace ... 16
2.2 Botanický název ... 16
2.3 Botanická charakteristika a morfologie ... 17
2.4 Geografické rozšíření ... 19
2.5 Využití ... 20
2.6 Obsahové látky a jejich biologická aktivita ... 21
2.7 Přehled flavonoidů *B. papyrifera* ... 26

3 Experimentální část 51

3.1 Použitý materiál a přístroje ... 51
3.2 Použité separační a identifikační metody ... 53
3.3 Výsledky a diskuse ... 55

4 Závěr 74

Použité zdroje 77

Seznam obrázků

Obr. 1: Morfologie rostliny ... 18
Obr. 2: Geografické rozšíření *B. papyrifera* ... 19
Obr. 3: Základní skelet flavonoidů ... 22
Obr. 4: Nejčastější formy prenylových substituentů ... 25
Obr. 5: Nejčastější formy geranylových substituentů ... 25
Obr. 6: Chromatogram frakce BP/$CHCl_3$/23–24 při 280 nm ... 55
Obr. 7: Chromatogram frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5 při 280 nm ... 57
Obr. 8: Pásma absorpčních maxim flavonoidů ... 58
Obr. 9: Vykrystalizovaná frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5 ... 58
Obr. 10: Chromatogram BP/$CHCl_3$/23–24/5 ze semipreparativní HPLC při 290 nm ... 59
Obr. 11: Chromatogram frakce BP/23–24/5/A při 280 nm ... 60
Obr. 12: Chromatogram frakce BP/23–24/5/B při 280 nm ... 61
Obr. 13: Chromatogram BP/23–24/5/A+B ze semipreparativní HPLC při 280 nm ... 62
Obr. 14: Chromatogramy tří frakcí získaných z BP/23–24/5/A+B při 280 nm ... 63
Obr. 15: Chromatogram látky BP/23–24/5/C při 280 nm a UV spektrum ... 64
Obr. 16: UV spektrum látky BP/23–24/5/C a kazinolu Q ... 64
Obr. 17: IČ spektrum látky BP/23–24/5/C ... 65
Obr. 18: Struktura kazinolu J ... 65
Obr. 19: Chromatogram látky BP/23–24/5/D při 280 nm a UV spektrum ... 66
Obr. 20: UV spektrum látky BP/23–24/5/D a kazinolu Q ... 66
Obr. 21: IČ spektrum látky BP/23–24/5/D ... 67
Obr. 22: Struktura kazinolu C ... 68
Obr. 23: Struktura kazinolu E ... 68
Obr. 24: Chromatogram látky BP/23–24/5/E při 280 nm a UV spektrum ... 69
Obr. 25: UV spektrum látky BP/23–24/5/E a broussoflavonolu A ... 69
Obr. 26: Chromatogram látky BP/23–24/5/E a broussoflavonolu A při 280 nm ... 70
Obr. 27: Struktura broussoflavonolu A ... 70
Obr. 28: Chromatogram látky BP/23–24/5/F při 280 nm a UV spektrum ... 71
Obr. 29: IČ spektrum látky BP/23–24/5/F ... 72
Obr. 30: Chromatogram látky BP/23–24/5/F po rozpadu při 254, 280 a 350 nm ... 73

Seznam tabulek

Tab. 1: Taxonomická klasifikace *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent. 16
Tab. 2: Klasifikace flavonoidních sloučenin podle základního skeletu.. 22
Tab. 3: Přehled vybraných 1,3–difenylpropanů *B. papyrifera* a jejich struktura 28
Tab. 4: Přehled vybraných chalkonů *B. papyrifera* a jejich struktura 31
Tab. 5: Přehled vybraných flavanonů *B. papyrifera* a jejich struktura... 34
Tab. 6: Přehled vybraných flavanů *B. papyrifera* a jejich struktura..... 37
Tab. 7: Přehled vybraných flavonů *B. papyrifera* a jejich struktura..... 41
Tab. 8: Přehled vybraných flavonolů *B. papyrifera* a jejich struktura.... 45
Tab. 9: Parametry metody použité při analytické HPLC 54
Tab. 10: Frakce získané sloupcovou chromatografií BP/$CHCl_3$/23–24 56
Tab. 11: Metoda separace BP/$CHCl_3$/23–24/5 pomocí semipreparativní HPLC 59
Tab. 12: Frakce izolované pomocí semipreparativní HPLC z BP/$CHCl_3$/23–24/5 60
Tab. 13: Metoda separace BP/23–24/5/A+B pomocí semipreparativní HPLC 62

1 Úvod a cíle práce

Broussonetia papyrifera (L.) L'Hér. ex Vent z čeledi Moraceae je dvoudomá dřevina pocházející z jihovýchodní Asie, kde je po staletí využívána v tradičním lidovém léčitelství, k výrobě tapa vlákna a zejména pak k výrobě papíru, čemuž napovídá i český název rostliny – papírovník čínský [1]. Rostlina je v tradiční východní medicíně používána k léčbě edémů, očních potíží, impotence, krvácivých stavů a k obkladům při různých kožních problémech. Mezi obsahové látky izolované z *B. papyrifera* patří zejména flavonoidy, kumariny, alkaloidy a lignany, u kterých byly popsány antioxidační, protizánětlivé, antiagregační či antimikrobiální účinky [2].

Ačkoliv nejsou prenylované látky v přírodě příliš rozšířeny a jejich přítomnost byla popsána pouze u několika málo čeledí, čeleď Moraceae je považována za nejbohatší zdroj těchto sloučenin a z *B. papyrifera* bylo izolováno a popsáno značné množství především prenylovaných flavonoidů. Prenylová substituce zvyšující lipofilitu těchto látek usnadňuje průnik buněčnou membránou a prodlužuje setrvání látek v buňce, čímž potencuje jejich účinky [3].

Systematický přehled prenylovaných flavonoidů *B. papyrifera* a popis jejich biosyntézy, struktury a biologické aktivity je cílem první části této práce. Praktická část pak popisuje jednotlivé kroky práce s rostlinným extraktem a výběr vhodných separačních metod, vedoucí k izolaci a následně identifikaci izolovaných látek, se zaměřením na prenylované sloučeniny, které budou dále zkoumány ve spolupráci s Ústavem molekulární farmacie.

2 Teoretická část

2.1 Botanická klasifikace

Rod *Broussonetia* náleží již od svého objevení do čeledi Moraceae. V rámci kladistického (fylogenetického) systému APG IV je *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent. řazena do následujících taxonů [4; 5].

Tab. 1: Taxonomická klasifikace *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent.

Říše	**Plantae** (rostliny)
Klady	**Angiosperms** (krytosemenné rostliny)
	Eudicots (pravé dvouděložné)
	Core Eudicots (jaderné trikolpátní)
	Rosids (rosidová větev)
	Eurosids I (pravé rosidy I)
Řád	**Rosales** Bercht. & J. Presl (růžotvaré)
Čeleď	**Moraceae** Gaudich. (morušovníkovité)
Rod	***Broussonetia*** (L.) L'Hér. ex Vent. (papírovník)
Druh	***Broussonetia papyrifera*** (L.) L'Hér. ex Vent. (papírovník čínský)

2.2 Botanický název

Svůj název dostal rod *Broussonetia* po francouzském přírodovědci Pierru Broussonetovi, působícím v 18. století v botanické zahradě v Montpellier. Broussonet přivezl ze Skotska samičí jedince a přiřadil je k samčím, čímž umožnil produkci plodů, které do té doby ve Francii neznali, kvůli rozšíření pouze samčích jedinců. Papírovník byl následně vyřazen z rodu *Morus*, kam ho roku 1753 zařadil Carl Linné. Autorem názvu rodu *Broussonetia* je Charles Louis L'Héritier de Brutelle, francouzský botanik, a jeho student a spolupracovník, Étienne Ventenat [6]. Druhové jméno *papyrifera* pak vychází z egyptského *papyrus* – papír a latinského *ferre* – nosit a odkazuje tak na hlavní využití této rostliny [7]. V literatuře se lze také setkat se synonymními vědeckými názvy *Morus papyrifera* L. nebo *Papyrius papyrifera* (L.) Kuntze, v angličtině je papírovník běžně označován jako paper mullbery nebo tapa cloth tree [8].

2.3 Botanická charakteristika a morfologie

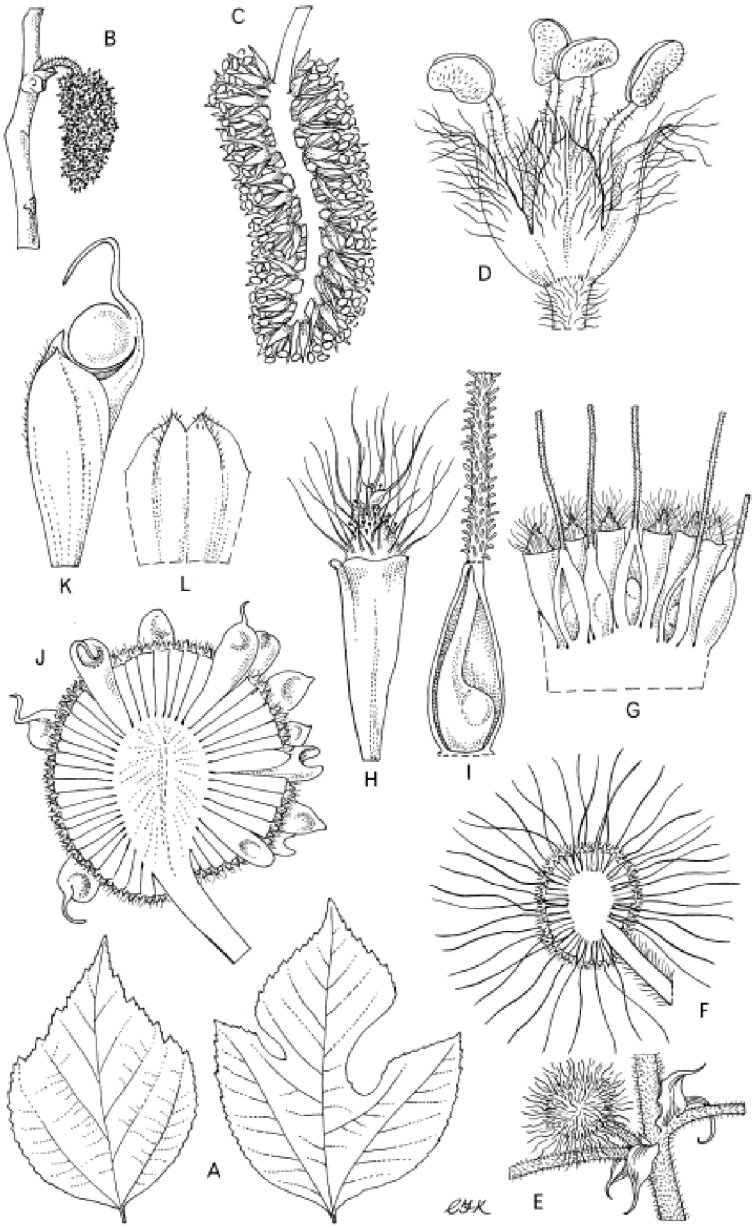
Papírovník čínský je dvoudomý opadavý keř nebo strom, vysoký 10 až 20 m [9]. Produkuje latex, pro čeleď Moraceae typický [10]. Listy vykazují heterofylii. Mohou dosahovat délky 8–25 cm, malé listy jsou jednoduché, větší listy jsou vykrojené s třemi až pěti laloky. Báze čepele je srdčitá a asymetrická s pilovitým okrajem, vrchol krátce zašpičatělý. Čepel může být široká až 20 cm. Adaxiální strana listu je hrubá, olivově zelené barvy, spodní strana je hustě ochlupená, zabarvena je šedozeleně. Uspořádání listů je střídavé, dvouřadé, tzv. distichiální, silné řapíky jsou hustě posety trichomy a dosahují délky až 30 cm. Palisty jsou opadavé, vejčitého tvaru. Mladá kůra je šedozelená a hladká, časem vytváří brázdy a zbarvení se mění na šedohnědou. Vedlejší větve jsou hustě ochlupené trichomy [6; 9].

Samčí květenství je 4–8 cm dlouhá, samostatně rostoucí jehněda s kopinatými ochlupenými listeny. Samčí květy jsou přisedlé, periant je složený ze čtyř přiléhajících, proximálně spojených segmentů a je také ochlupený [6; 9]. Typickým znakem čeledi Moraceae je absence koruny a květní obal, ačkoliv rozlišený, je tvořený pouze kališními lístky [10]. Jeden květ nese čtyři tyčinky a malé pistillodium [6], rudimentární sterilní zbytek pestíku, nacházející se v některých jednopohlavných samčích květech [11], který můžeme nalézt i u některých dalších rodů této čeledi [10]. V rámci čeledi pak nacházíme vždy jednopohlavné květy na jednodomých nebo dvoudomých rostlinách [6; 10].

Samičím květenstvím je hlávka, kulovitý útvar široký v průměru 1 až 2 cm, s mnoha listeny, přisedlými žláznatými trichomy, hojně posetý výrazným dlouhým ochlupením. Zelené samičí květy mají periant nerovnoměrně rozdělený na 2–4 segmenty, v době květu je pak květní obal srostlý s čnělkou, dlouhou 3–4 mm, semeník je volný, blizny výrazně vyčnívají. Rostlina kvete v průběhu dubna a května a od června do července tvoří plody. Plody jsou úzké podlouhlé peckovice tvořící kulaté oranžovočervené plodenství, široké v průměru 2–3 cm, které je jedlé [6; 9]. Peckovice spolu s nažkami jsou pro čeleď Moraceae charakteristické, stejně jako srůst plodů do plodenství, které můžeme nalézt např. u rodu *Morus* či *Ficus* [10; 12].

Rod *Broussonetia* čítá několik druhů, mezi nejprostudovanější pak kromě *B. papyrifera* patří i *B. kazinoki.* Na rozdíl od papírovníku čínského je papírovník Kazinockého jednodomý keř dosahující výšky 2–4 m. Mezi méně prostudované druhy pak patří *B. zeylanica* a *B. kaempferi*, které

jsou dvoudomé, ale liší se tvarem listů, které jsou zde spíše podlouhlé a úzké, výškou a geografickým rozšířením, kdy tyto druhy nejsou rozšířeny tak, jako *B. papyrifera* [13].

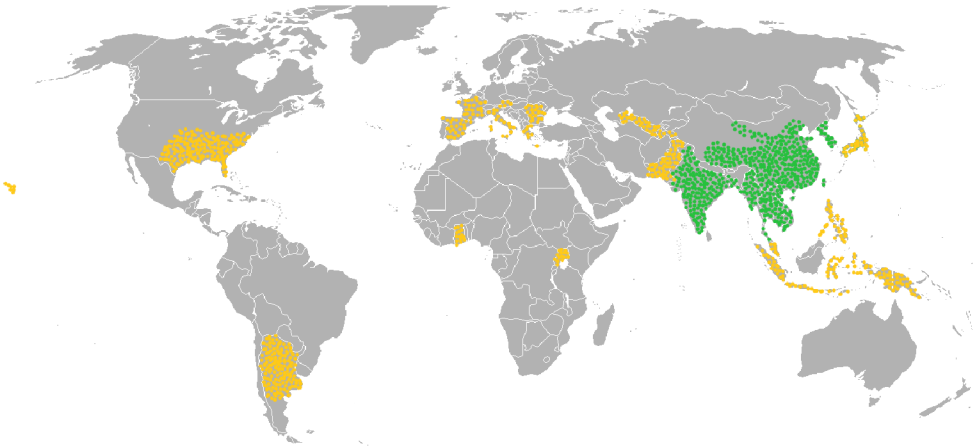


Broussonetia papyrifera. A, leaf outlines, × $\frac{1}{4}$; B, staminate inflorescence, × $\frac{2}{3}$; C, l.s. staminate inflorescence, × 2; D, staminate flower, × 12; E, pistillate inflorescence, × $\frac{2}{3}$; F, l.s. pistillate inflorescence, × 2; G, l.s. of part of pistillate inflorescence, × 8; H, interfloral bract of pistillate flower, × 20; I, pistillate flower with part of perianth removed to show pistil, × 20; J, infructescence, × $1\frac{1}{2}$; K, dehiscing fruit, × 4; L, fruiting perianth, × 4. Drawn by Christabel King.

Obr. 1: Morfologie rostliny [6]

2.4 Geografické rozšíření

Původní je v Číně, Koreji, Myanmaru (Barmě), Laosu, Kambodži, Thajsku a v některých částech Indie, ale rozšířena je i jinde v Asii, na ostrovech Tichého oceánu (Havaj), v jižní Evropě, v Argentině a v některých státech USA a Afriky [1]. Její invazivní potenciál je problematický zejména v jižních státech USA, ale i v Pákistánu, Argentině a Ghaně. Svou odolností, rychlým růstem a nízkými nároky na okolní podmínky tak v zemích, kde není původní, vytlačuje přirozeně se vyskytující druhy. Například v Pákistánu a Argentině je řazena mezi nejvíce invazivní druhy. V africké Ghaně, kam byla v 60. letech zavlečena kvůli výrobě papíru, je považována spolu s druhem *Chromolaena odorata* za vůbec nejhorší [14]. *B. papyrifera* je považována za pionýrský druh, je tedy schopna osídlit nepříznivé lokality, což napomáhá jejímu invazivnímu šíření. Dalším důvodem je pak přítomnost samčích i samičích jedinců ve výše zmíněných zemích. V Tichomoří, kde nedochází k invazivnímu šíření, převažují samčí jedinci a rozmnožování tak probíhá vegetativně [14; 15].



Obr. 2: Geografické rozšíření *B. papyrifera* [1]

Zeleně je vyznačen přirozený výskyt druhu; žlutě jsou vyznačeny oblasti introdukce.

2.5 Využití

2.5.1 Výroba papíru a plátna

Papírovník čínský byl v jihovýchodní Číně po staletí využíván k výrobě papíru, první doložená výroba je datována do začátku 2. století n. l., ale zmínky o papírovníku se v pramenech nacházejí již mnohem dříve. Z Číny se výroba papíru rozšířila do Japonska a Tichomoří až zhruba o 500 let později a do Evropy se dostala až ve 12. století [6]. Papírovník byl v minulosti považován za velice významnou dřevinu. Při výrobě papíru se využívá borka, která je ve velkých kusech oddělována od kmene a rozdělována na lýko, ze kterého se dále vyrábí papír, a vnější části. Lýko se roztlouká tvrdými dřevěnými palicemi, míchá se s vodou, nechává se macerovat a následně se rozprostírá a suší. Dlouhá lýková vlákna jsou od zbytku kůry snadno oddělitelná, což je pro výrobu papíru klíčový předpoklad [6; 15]. Papír vyrobený z *B. papyrifera* je silný a zároveň jemný [6]. Pokud je lýko roztlučeno a následně vrstveno na sebe, vzniká surovina pro výrobu plátna, tzv. tapa cloth [15], které se dále využívá na výrobu různých druhů oděvu, například sarongů (specifický druh oděvu jihovýchodní Asie [16]), šátků, pokrývek hlavy nebo například i lůžkovin [1]. Ačkoliv už tapa plátno není využíváno v takové míře jako dříve, dodnes jsou tradiční oděvy z tohoto plátna součástí tamních ceremoniálů a svátků [1; 15]. Historicky je výroba tapa vlákna v jihovýchodní Asii starší než výroba papíru a předpokládá se, že se výrobě papíru z lýkových vláken papírovníku stala inspirací [6].

2.5.2 Medicínské využití

V tradiční východní medicíně papírovník byl a je využíván pro širokou škálu účinků, například při léčbě dermatofytóz, edémů nebo hernie [2]. Lékopisným je podle Čínského lékopisu zralý usušený plod *Broussonetiae fructus,* kterému se v Číně tradičně říká Chushizi [17], ale uplatnění nachází i ostatní části rostliny. Plod je využíván k léčení onemocnění očí a erektilní dysfunkce a tyto účinky byly potvrzeny farmakologickými experimenty [18], dále jako diuretikum, stomachikum a tonikum [2]. Listy jsou pak využívány v léčbě chronické prostatitidy [18], pro diaforetické a laxativní vlastnosti, dále při nadměrném menstruačním krvácení či příměsi krve ve sputu a při emezi, ve formě obkladů k léčení kožních chorob, krvácejících ran a hmyzího bodnutí. Účinky kůry jsou popisovány

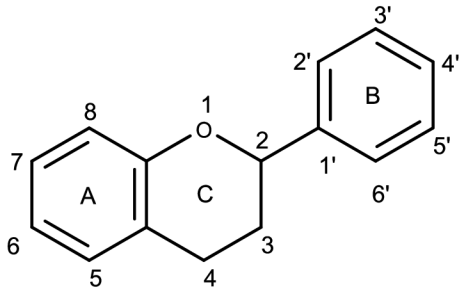
jako hemostatické a odvar z kůry je pak využíván při redukci ascitu a otoků nebo břišní distenze. Odvar z kořene se využívá jako laktagogum [2; 19]. V neposlední řadě je využíván i latex, a to k zevnímu léčení dermatitidy, ekzémů, kožních infekcí a dalších kožních onemocnění [19].

2.6 Obsahové látky a jejich biologická aktivita

Všechny známé obsahové látky rostliny *B. papyrifera* včetně jejich biologické aktivity jsou podrobně popsány v diplomové práci Mgr. Terezy Pospíšilové [20] a disertační práci PharmDr. Milana Malaníka, Ph.D. [21]. Tato práce se proto bude zabývat výhradně popisem a biologickou aktivitou prenylovaných flavonoidů, látek relevantních pro zadané téma.

2.6.1 Flavonoidy

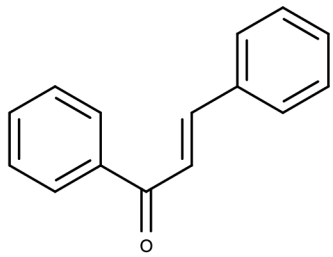
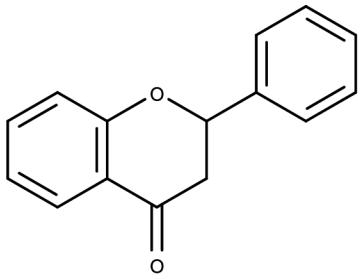
Flavonoidy jsou fenolické látky vznikající částečně z kyseliny šikimové a částečně z kyseliny octové. V rostlinách je nejčastěji nacházíme ve formě glykosidů. Skelet se skládá ze dvou fenolických jader, která jsou spojena tříuhlíkatou jednotkou. Výchozí sloučeniny syntézy jsou malonyl-koenzym A, vznikající z aktivní formy kyseliny octové (acetyl-CoA), který je připojen k molekule cinnamoyl-koenzymu A, sloučenině, která má původ v kyselině skořicové. Při syntéze dochází k reakci jedné molekuly cinnamoyl-koenzymu A a tří molekul malonyl-koenzymu A. Reakce typu Claisenovy kondenzace je katalyzována enzymem chalkon-syntázou, výsledkem je chalkon, přímý prekurzor flavonoidů. Kruh A vznikající cyklizací výše zmíněných poly-β-ketokyselin pak nese substituované hydroxylové skupiny typicky v polohách 5 a 7. Kruh B, šikimátového původu, pak nese hydroxylové skupiny nejčastěji v poloze 4', v polohách 3', 4' nebo 3', 4', 5' [22; 23]. Flavonoidy jsou relativně hydrofilní látky, propůjčující květům a plodům svoji barvu, odtud také pochází jejich název, z latinského *flavus* – žlutý [22]. Mezi hlavní účinky těchto látek patří zejména účinky antioxidační, protizánětlivé a antikarcinogenní [24].

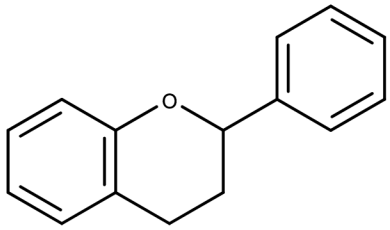
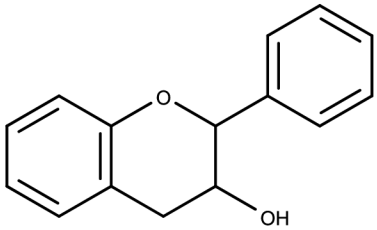
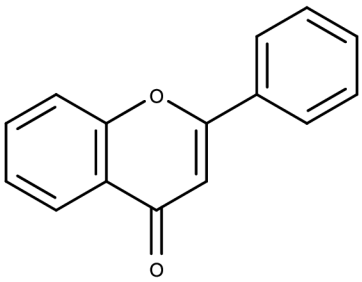
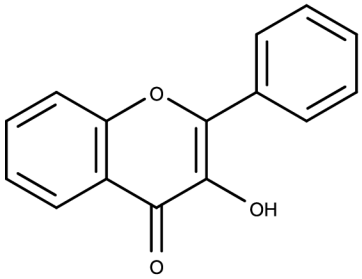
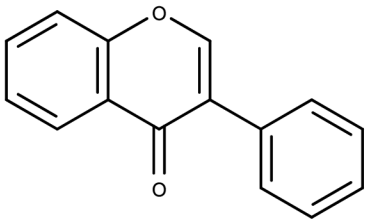


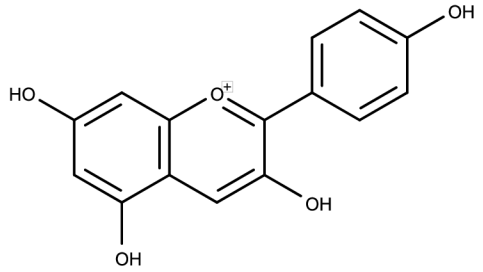
Obr. 3: Základní skelet flavonoidů [24]

Flavonoidy mohou být dále rozděleny podle pozice připojení kruhu B ke kruhu C a stupně nasycení a oxidace kruhu C. Výchozí sloučeninou je chalkon, jehož hydroxylová skupina kruhu A reaguje s α,β-nenasycenou karbonylovou částí postranního řetězce a dochází k cyklizaci na flavanon. Flavanony pak různými následnými reakcemi dávají vzniknout dalším skupinám flavonoidů, které uvádí tabulka 2 [22].

Tab. 2: Klasifikace flavonoidních sloučenin podle základního skeletu [22; 23; 24]

Chalkony	
Flavanony	

Flavany	
Flavanoly, flavan-3-oly, katechiny	
Flavony	
Flavonoly	
Isoflavonoidy	

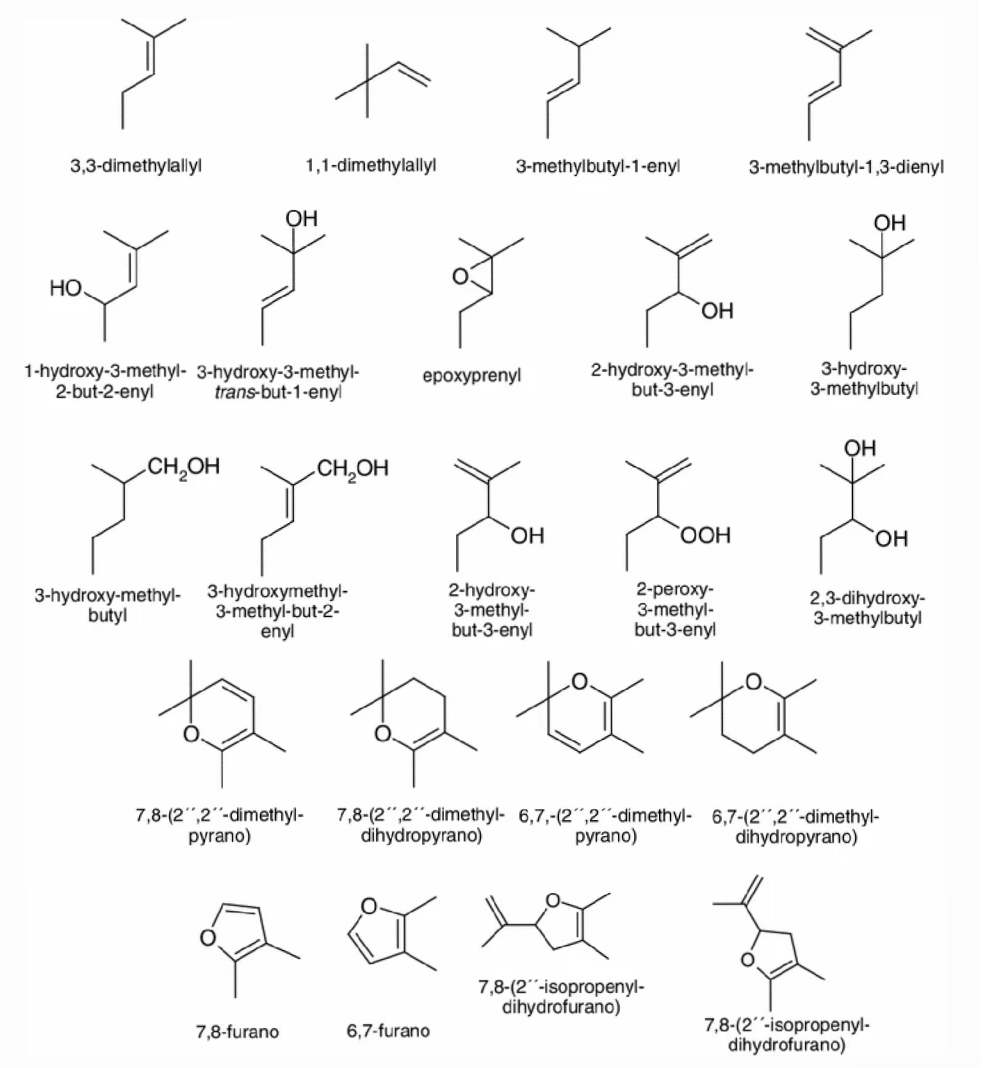
Anthokyany	

2.6.2 Prenylová substituce

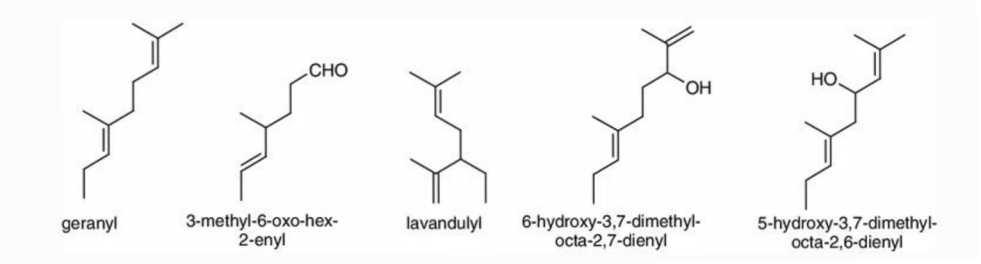
Prenylová skupina je tvořena pětiuhlíkovými stavebními bloky nazývanými isopreny. V rostlinách vznikají buď v cytosolu z kyseliny mevalonové, nebo v plastidech tzv. methylerythritolovou cestou. První způsob, kdy isoprenová jednotka vzniká z kyseliny mevalonové, začíná kondenzací tří molekul acetylkoenzymu A, produktem této reakce je pak β–hydroxy–β–methylglutarylkoenzym A, který je dále redukován na kyselinu mevalonovou. Primární alkoholická skupina mevalonové kyseliny je fosforylována a vzniklý 3–methyl–3–butenyl–difosfát (IPP) již představuje biogenetickou isoprenovou jednotku. Aby mohlo docházet k polymerizaci několika isoprenových jednotek, je nutná enzymově katalyzovaná isomerizace IPP na 3–methyl–2–butenyl–difosfát (DMAPP), který umožní zahájit reakci. Při druhém způsobu, kdy sledem reakcí začínajícím adicí pyruvátu na glyceraldehyd–3–fosfát vzniká 2–*C*–methyl–D–erythritol–4–fosfát, vzniká jak IPP, tak DMAPP, a to v poměru 85:15 [23].

K připojení terpenoidní jednotky k fenolickému skeletu dochází pomocí enzymatického prenyltransferázového systému, který využívá aktivní difosfátovou formu prenylové jednotky a to dimethylallyldifosfát (DMAPP), geranyldifosfát nebo farnesyldifosfát. Po odštěpení fosfátových skupin pak může dojít k připojení prenylové/dimethylallylové (C5), geranylové (C10) nebo farnesylové (C15) jednotky. Nově připojené řetězce mohou být dále modifikovány oxidací, methylací, cyklizací, substitucí, adicí hydroxylové skupiny nebo vytvořením karbonylové skupiny. Nejčastěji má postranní řetězec strukturu 3–methyl–2–butenylu, 3–methyl–3–butenylu nebo 3–methyl–1–butenylu. Pokud je přítomná hydroxylová skupina, může docházet k cyklizaci na 2,2–dimethylpyran nebo furan. Není zcela jasné, zda se veškeré známé modifikace prenylových řetězců nachází v přírodě nebo vznikají až při izolaci látek. Nevhodné podmínky skladování, kyselé prostředí, vysoké teploty nebo působení

kyslíku a slunečního záření mohou ovlivnit výslednou strukturu zkoumané látky [3].



Obr. 4: Nejčastější formy prenylových substituentů [3]



Obr. 5: Nejčastější formy geranylových substituentů [3]

2.6.3 Prenylované flavonoidy

Prenylované flavonoidy jsou sloučeniny, u kterých na flavonoidním skeletu nacházíme lipofilní prenylový substituent. Tato kombinace dává výsledné struktuře významný potenciál pro biologickou aktivitu. Ta je ovlivněna nejenom typem flavonoidního skeletu, ale také pozicí prenylace, počtem, typem prenylového substituentu a jeho modifikacemi [3]. Lipofilní prenylový substituent vede k vyšší afinitě molekuly k buněčné membráně, výsledkem jsou pak flavonoidy vykazující silnější cytotoxický, antibakteriální, protizánětlivý, antioxidační a estrogenní účinek. Nicméně je udáváno, že prenylový substituent snižuje biologickou dostupnost a absorpci flavonoidů z krevní plazmy [25].

Prenylované flavonoidy jako produkty sekundárního metabolismu rostlin mají pravděpodobně význam při sebeobraně rostliny. Jsou rostlinou využívány při ochraně proti mikroorganismům a drobným škůdcům, ke zmírnění vlivu negativních abiotických faktorů prostředí, jako je například oxidativní stres, nebo ve stavu extrémní suchosti. Zatímco flavonoidní sloučeniny jsou rostlinou produkovány nezávisle na vnějších stimulech, látky s isoflavonoidním skeletem se tvoří v reakci na poškození nebo patogenní útok, jedná se tedy o fytoalexiny [3].

Kromě čeledi Moraceae, která je na prenylované flavonoidy zřejmě nejbohatší, nacházíme tyto sloučeniny i v čeledích Paulowniaceae, Fabaceae, Clusiaceae, Rutaceae a Cannabaceae. Nejčastěji jsou tyto látky obsaženy v kořenech a kůře, ale v některých případech je nacházíme i v pupenech, semenech či plodech [3].

2.7 Přehled flavonoidů *B. papyrifera*

2.7.1 1,3–difenylpropany

Tyto látky, vznikající redukcí chalkonu, se v přírodě nachází spíše ojediněle. Tabulka 3 popisuje některé zástupce této skupiny, tučně jsou vyznačeny látky s prenylovým řetězcem ve struktuře, neprenylované látky jsou uvedeny pro komplexnost přehledu.

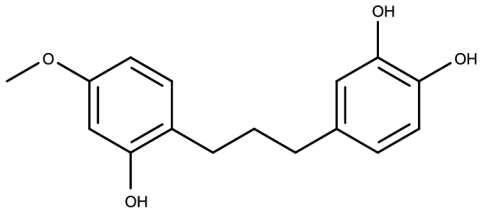
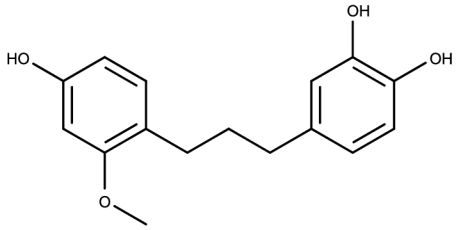
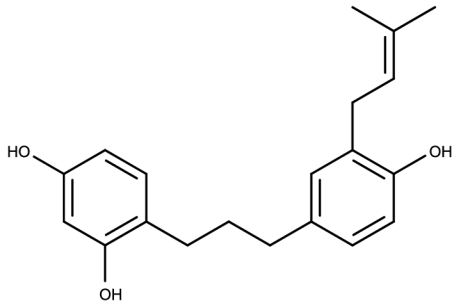
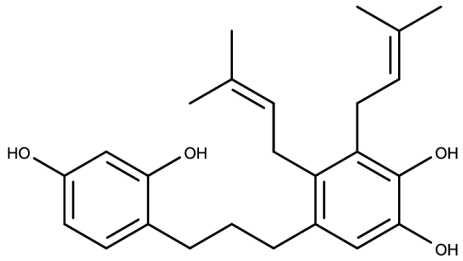
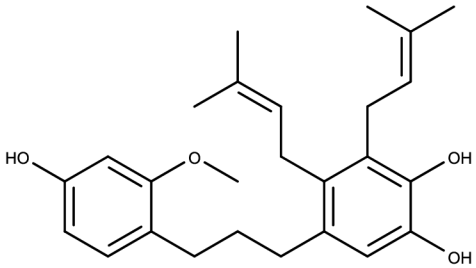
Broussoniny A–F se v rostlině nachází pouze v případě poškození, jsou tedy charakterizovány jako fytoalexiny [26]. Broussonin A pak v experimentech inhiboval aromatázu, enzym katalyzující aromatizaci androgenů na estrogeny a působil také antimykoticky [27, 28].

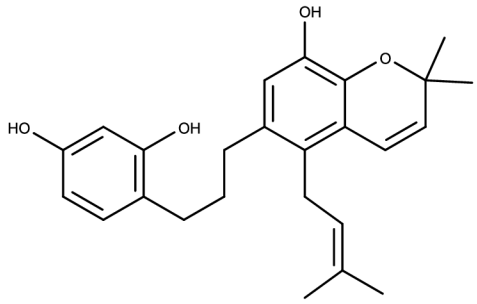
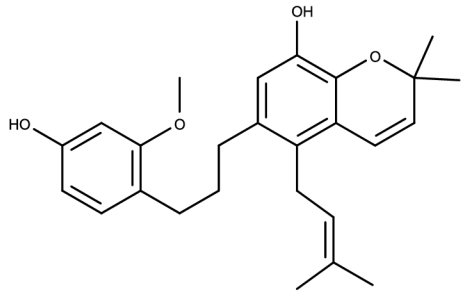
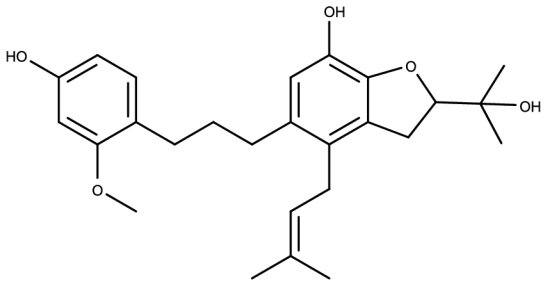
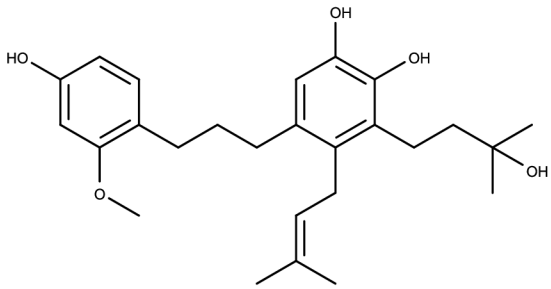
Ve výzkumné práci, která se zabývala využitím fenolických látek z *B. papyrifera* k inhibici koronavirových proteáz viru SARS–CoV $3CL^{pro}$ (3–chymotripsin–like proteáza) a PL^{pro} (papain–like proteáza), bylo zjištěno, že kazinol F i kazinol J inhibují zmíněné proteázy, avšak kazinol J s methoxy skupinou ve struktuře vykazoval dvojnásobně silnější účinky, přestože jsou struktury těchto látek jinak analogické [29]. V práci zkoumající účinky extraktu *B. papyrifera* na zánětlivé procesy v tukové tkáni a inzulinovou senzitivitu bylo zjištěno, že kazinol J nejenom že je schopen inhibovat zánět v adipocytech redukcí NF–κB transkripční aktivity a prozánětlivé genové exprese, ale je také schopen zmírnit glukózovou rezistenci a aktivovat AMP–aktivovanou proteinovou kinázu, která je odpovědná za řízení energetického metabolismu a také za redukci NF–κB transkripční aktivity v tukové tkáni, díky čemuž by mohl být využíván v léčbě obezity nebo diabetes mellitus 2. typu [30].

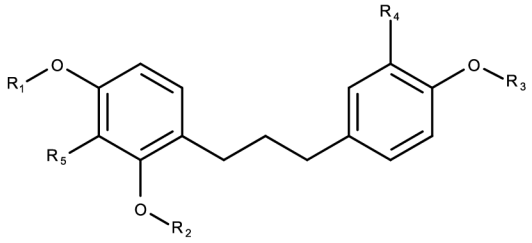
V práci zkoumající protizánětlivé a antioxidační účinky vykazoval kazinol M, v porovnání s kazinolem N, výraznější protizánětlivý účinek v inhibici transkripčních faktorů NF–κB a AP–1, ačkoliv je jejich struktura opět odlišná pouze o jedinou methylovou skupinu. Podle autorů tato skutečnost naznačuje, že *O*-methylace 1,3–dihydroxybenzenového kruhu může snižovat schopnost látky inhibovat prozánětlivé faktory NF-κB a AP–1. U kazinolu M byl dále prokázán inhibiční účinek na prozánětlivé cytokiny IL–1β a TNF–α, a to vyšší než u prednisonu. Kazinol M také vykazoval výrazný antioxidační účinek [31]. Další protizánětlivě působící difenylpropany kazinol V a kazinol W byly poprvé izolovány v roce 2019 a vykazovaly protizánětlivé účinky inhibicí prozánětlivých cytokinů TNF–α a IL–6 [32].

Broussosidy A, B, C a D měly v rámci jednoho extraktu různé účinky, kdy broussosid A podporoval a broussosidy B–D inhibovaly biosyntézu estrogenu. Ukázalo se, že jsou spolu s dalšími fenolickými látkami v extraktu odpovědné za regulaci biosyntézy estrogenu, což by mohlo mít pozitivní vliv na dobytek krmený listy papírovníku a po dalším výzkumu na toto téma vést ke snížení užívání syntetických regulátorů hormonů u hospodářských zvířat v oblastech, kde je rostlina pro krmné účely využívána [33].

Tab. 3: Přehled vybraných 1,3–difenylpropanů *B. papyrifera* a jejich struktura

Broussonin A	
Broussonin B	
Broussonin C	
Kazinol F	
Kazinol J	

Kazinol M	
Kazinol N	
Kazinol V	
Kazinol W	

Broussosid A, B, C, D	 A: $R_1 = R_3 = Glc$, $R_2 = R_4 = H$, $R_5 = CH_2\text{-}CH{=}C\text{-}(CH_3)_2$ B: $R_1 = R_4 = H$, $R_2 = R_3 = Glc$, $R_5 = CH_2\text{-}CH{=}C\text{-}(CH_3)_2$ C: $R_1 = R_3 = Glc$, $R_2 = CH_3$, $R_5 = H$, $R_4 = CH_2\text{-}CH{=}C\text{-}(CH_3)_2$ D: $R_1 = Glc$, $R_2 = R_3 = R_4 = H$, $R_5 = CH_2\text{-}CH(OH)\text{-}C(CH_2)\text{-}CH_3$

2.7.2 Chalkony

Chalkony jsou v rostlinné říši rozšířenější a jejich účinky byly hojně zkoumány. Známé jsou chalkony s antidiabetickými, protizánětlivými, protinádorovými a imunomodulačními účinky. Spolu s aurony jsou také odpovědné za velmi intenzivní žluté zbarvení rostlin, ve kterých se nacházejí [34].

Broussochalkon A byl poprvé izolován v roce 1985 a od té doby byl předmětem několika experimentálních prací, ve kterých inhiboval respirační vzplanutí v neutrofilech [35], inhiboval agregaci trombocytů částečnou inhibicí cyklooxygenázy [36], vykazoval silný antioxidační účinek při zhášení kyslíkových radikálů a inhiboval makrofágové enzymy NO-syntázy produkující oxid dusnatý, čehož se dá využít při nadměrném tvoření peroxynitritu při probíhajícím zánětu poškozujícím okolní zdravou tkáň u pacientů se zánětlivými a autoimunitními nemocemi [37]. Dále vykazoval cytotoxický účinek jednak inhibicí CYP2J2, enzymu exprimovaného lidskými nádorovými buňkami [38], a za druhé napomáhal degradaci intracelulárního β–kateninu, klíčového komponentu Wnt/β–kateninové signalizační dráhy [39].

V práci zabývající se využitím fenolických látek z *B. papyrifera* k inhibici koronavirových proteáz viru SARS–CoV ([$3CL^{pro}$], [PL^{pro}]) byla pozorována klesající aktivita u látek s uzavřeným postranním prenylovým řetězcem. V rámci sloučenin s chalkonovým skeletem vykazoval nejvyšší aktivitu proti virovým proteázám broussochalkon A, menší účinek vykazoval broussochalkon B a nejnižší účinek byl pozorován u 4–hydroxyisolonchocarpinu [29].

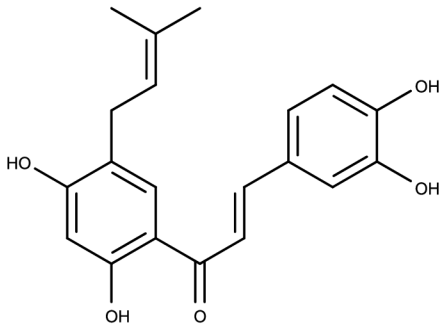
Broussochalkon A i B, 4–hydroxyisolonchocarpin a 3,4–dihydroxyisolonchocarpin byly testovány na inhibici enzymu α–glukosidázy a všechny zmíněné látky vykazovaly inhibiční efekt, ačkoliv s různou intenzitou. Nejsilnější efekt vykazoval broussochalkon A a autoři práce tento výsledek připisují rozložení hydroxylových skupin katecholového typu (ortho) na kruhu B a resorcinolového typu (meta) na kruhu A. Dále popisují výrazně vyšší inhibiční aktivitu u látek s volnou prenylovou a hydroxylovou skupinou na kruhu A oproti cyklizaci postranního řetězce u látek 4–hydroxyisolonchocarpin a 3,4–dihydroxyisolonchocarpin [40].

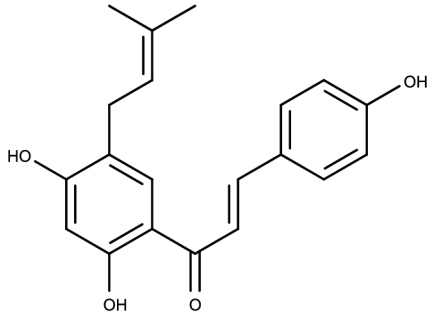
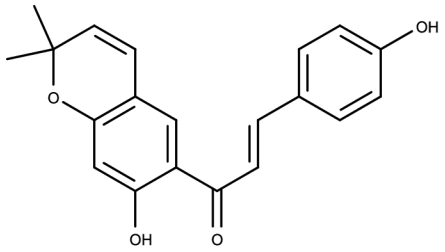
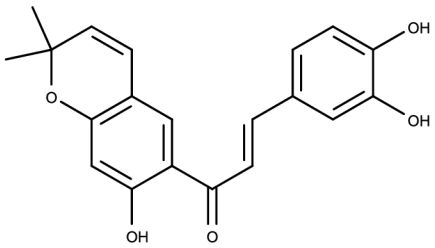
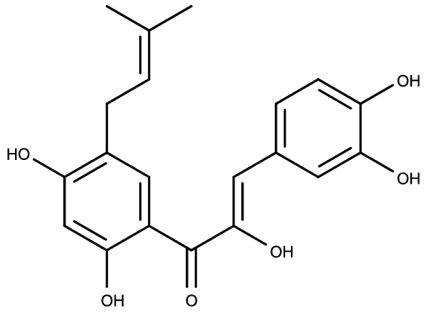
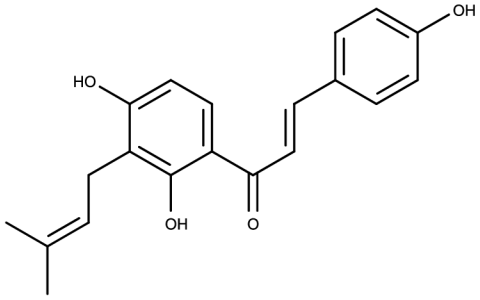
Novou látkou, izolovanou v roce 2019, je broussochalkon C, který vykazuje protizánětlivé účinky inhibicí prozánětlivých cytokinů TNF–α, IL–6 a oxidu dusnatého, a to ve vyšší míře než dexametazon použitý v experimentu jako pozitivní kontrola [32].

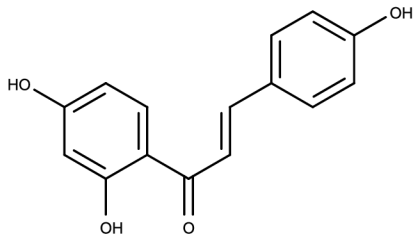
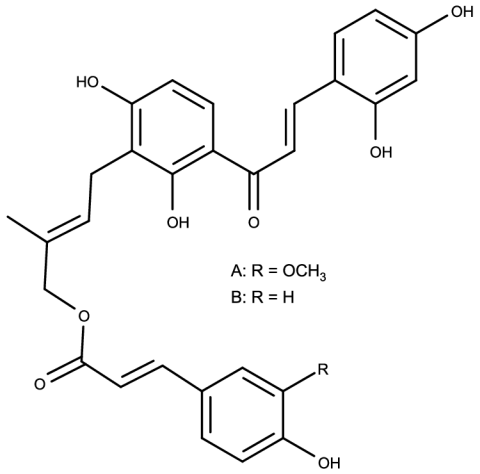
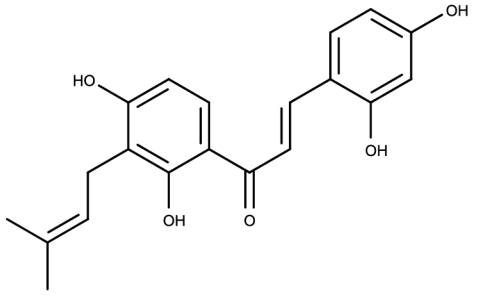
Isobavachalkon je látka poprvé izolovaná z rostliny *Psoralea coryfolia* v roce 1968 a kromě čeledi Fabaceae jej obsahuje i četné množství druhů čeledi Moraceae. Jsou popisovány jeho antibakteriální, antimykotické, cytotoxické, antioxidační a antituberkulotické účinky a schopnost inhibovat virovou reverzní transkriptázu [41]. Z extraktu *B. papyrifera* byl kromě výše zmíněných látek izolován také chalkon isoliquiritigenin, látka typicky přítomná v rostlinách rodu *Glycyrrhiza* [42].

U látek isogemichalkon C, 3'–[γ–hydroxymethyl–(E)–γ–methylallyl]-2,4,2',4'–tetrahydroxychalkon 11'–*O*–kumarát a 2,4,2',4'–tetrahydroxy–3'–prenylchalkon byla popsána významná aktivita v inhibici aromatázy [43].

Tab. 4: Přehled vybraných chalkonů *B. papyrifera* a jejich struktura

Broussochalkon A	

Broussochalkon B	
4–hydroxyisolon-chocarpin	
3,4–dihydroxyisolon-chocarpin	
Broussochalkon C	
Isobavachalkon	

Isoliquiritigenin	
Isogemichalkon C (A) **3'–[γ–hydroxymethyl–(E)–γ–methylallyl]-2,4,2',4'–tetrahydroxy-chalkon 11'–*O*–kumarát** (B)	
2,4,2',4'–tetrahydroxy–3'–prenylchalkon	

2.7.3 Flavanony

Flavanony jako klíčové meziprodukty syntézy ostatních flavonoidů jsou v přírodě široce rozšířeny. Přítomností pouze jednoduché vazby mezi uhlíky C–2 a C–3 vzniká v pozici C–2 chirální centrum, které určuje natočení kruhu B vůči kruhům A a C, což může mít zásadní vliv na výslednou biologickou aktivitu. Významným zdrojem flavanonů jsou pak citrusové plody [44].

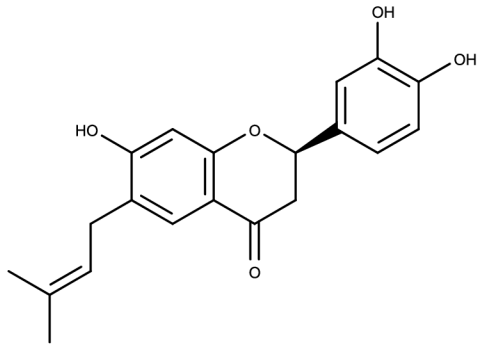
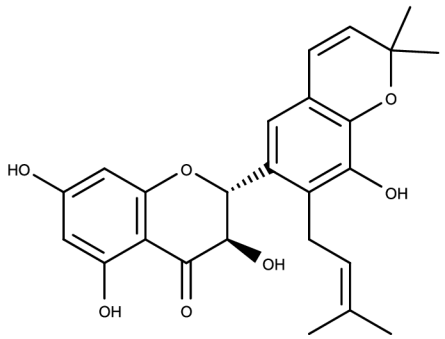
(2*R*)–7,3',4'–trihydroxy–6–prenylflavanon a nově izolovaný broussoflavanonol A vykazovaly protizánětlivé účinky inhibicí indukovatelné NO-syntázy (iNOS) a cyklooxygenázy–2 (COX–2) u lipopolysacharidem

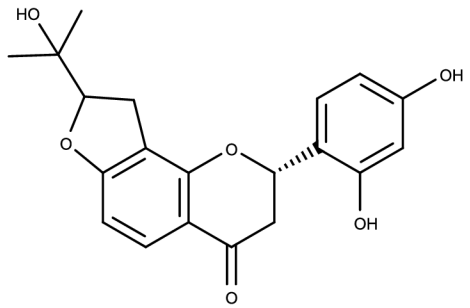
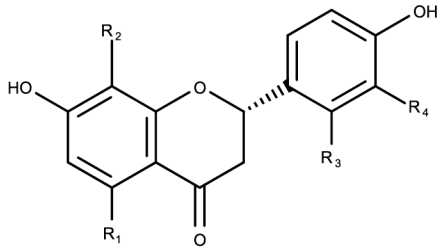
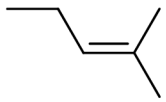
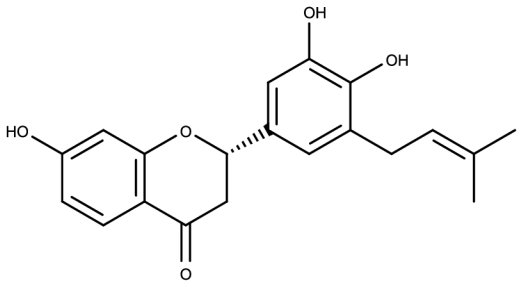
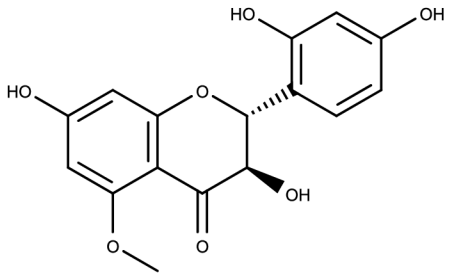
aktivovaných makrofágů, což ve výsledku vedlo k inhibici prozánětlivých cytokinů TNF–α a IL–6. Obě látky vykazovaly silnější efekt než dexametazon použitý jako pozitivní kontrola [32].

Několik flavanonů bylo popsáno v práci zabývající se inhibicí aromatázy, a to vysoce aktivní (2*S*)–2',4'–dihydroxy–2''–(1-hydroxy–1–methylethyl)dihydrofuro[2,3–*h*]flavanon a dále abyssinon II, (2*S*)–5,7,2',4'–tetrahydroxyflavanon, euchrenon a7 a naringenin [43]. Mírné antimikrobiální účinky vykazoval abyssinon VII [45].

Velmi účinnou se ukázala být látka objevená teprve nedávno, broussoflavonol J, který vykazoval velmi silný účinek v inhibici tyrozinázy, silnější než kyselina kojová použitá jako pozitivní kontrola. V rámci této práce vykazoval neprenylovaný broussoflavonol J silnější účinek než ostatní prenylované flavonoidy a výsledky ukazují, že v tomto případě má prenylace negativní vliv na schopnost inhibovat tyrozinázu. Naopak při testování cytotoxického účinku vykazovaly prenylované sloučeniny inhibiční účinky na nádorové buňky, zatímco broussoflavonol J byl neaktivní [46].

Tab. 5: Přehled vybraných flavanonů *B. papyrifera* a jejich struktura

(2*R*)–7,3',4'–trihydroxy–6–prenylflavanon	
Broussoflavanonol A	

(2*S*)–2',4'–dihydroxy–2''–(1-hydroxy–1–methylethyl)dihydrofuro[2,3–*h*]flavanon	
Abyssinon II (A) (2*S*)–5,7,2',4'–tetrahydroxyflavanon (B) **Euchrenon a7** (C) Naringenin (D)	 A: R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = prenyl B: R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = H C: R_1 = H, R_2 = prenyl, R_3 = OH, R_4 = H D: R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = H prenyl: 
Abyssinon VII	
Broussoflavonol J	

2.7.4 Flavany

Flavany nejsou v přírodě tak široce rozšířeny jako ostatní flavonoidy. Jsou to produkty dvojité redukce flavanonů a mnoho z nich je lipofilních. Nezralé plody obsahují vyšší koncentrace flavanů než plody zralé, mnoho z těchto látek také patří mezi fytoalexiny [47], například broussin a demethylbroussin [28].

Di– a triprenylované látky kazinol A a kazinol E vykazovaly v práci zaměřené na inhibici α–glukosidázy silnější účinky než zkoušený monoprenylovaný 3'–(3–methylbut–2–enyl)–3',4',7–trihydroxyflavan a kazinol B s jedním volným a jedním zacykleným prenylovým řetězcem, podle autorů tak s rostoucím počtem prenylových skupin roste i inhibiční účinek, což bylo pozorováno i u zkoušených flavanolů [40]. V oblasti látek potenciálně využitelných při léčbě diabetu je dobře prozkoumán kazinol B. Ve studii, kde byl izolován z příbuzné *B. kazinoki*, zlepšoval uptake glukózy a inzulinovou senzitivitu aktivací AMP–aktivované proteinové kinázy, odpovědné za řízení energetického metabolismu, a inzulinové signalizace [48]. Kromě toho je u něj také popisována inhibiční aktivita na produkci NO u lipopolysacharidem aktivovaných makrofágů [49].

Broussoflavan A, poprvé izolovaný v roce 1994 [50], vykazoval antiproliferativní účinek na myší vaskulární buňky hladké svaloviny a antioxidační účinky inhibicí Fe^{2+} indukované oxidace lipidů [51]. Dále byl testován jeho možný antiagregační účinek, který se ale neprokázal, na rozdíl od kazinolu A a B, u kterých byl popsán inhibiční účinek na agregaci trombocytů indukovanou kyselinou arachidonovou mechanismem inhibice cyklooxygenázy [36].

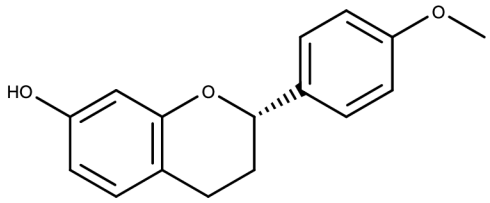
V již zmiňované práci zabývající se inhibicí koronavirových proteáz viru SARS–CoV ([$3CL^{pro}$], [PL^{pro}]) byly testovány také flavany a to 3'–(3–methylbut–2–enyl)–3',4',7–trihydroxyflavan, kazinoly A a B a broussoflavan A. Obecně byly látky v této studii účinnější proti PL^{pro} než proti $3CL^{pro}$, avšak 3'–(3–methylbut–2–enyl)–3',4',7–trihydroxyflavan vykazoval nejsilnější účinek při inhibici právě $3CL^{pro}$ ze všech testovaných látek. Všechny flavany inhibovaly v různé míře PL^{pro}, nejslabší účinek vykazoval kazinol A, avšak nebylo možné u těchto látek pozorovat závislost prenylové substituce na daný účinek, tak jako například u flavonů [29].

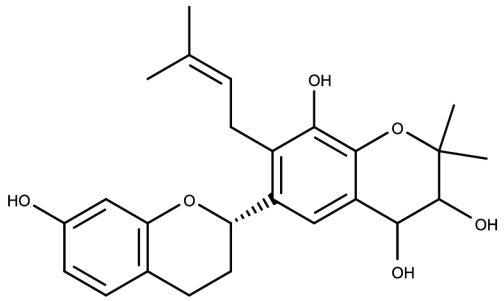
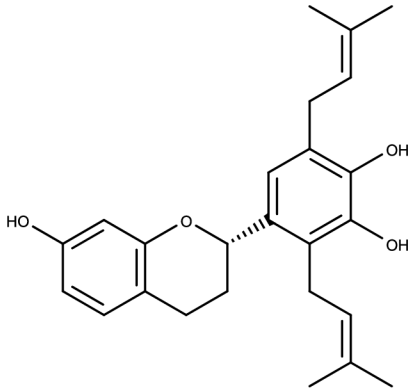
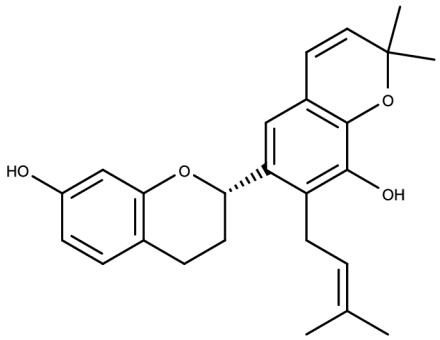
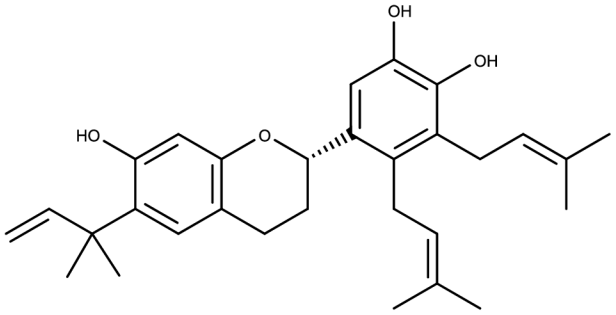
Kazinol A vykazoval cytotoxické účinky proti lidským urocystickým nádorovým buňkám, a to inhibicí Akt kinázy a aktivací AMP kinázy, vedoucí k apoptóze a autofagii těchto buněk [52]. Také kazinol E vykazoval cytotoxický účinek, a to inhibicí kinázy ERK (extracellular signal–regulated kinase), avšak až v relativně vysoké dávce [53].

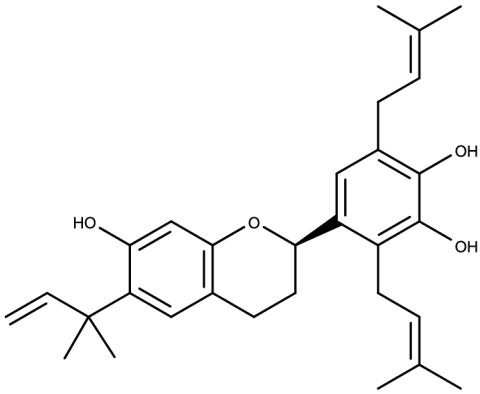
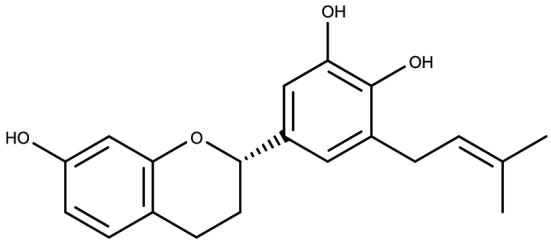
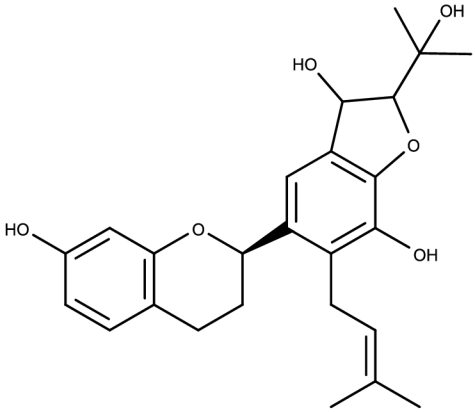
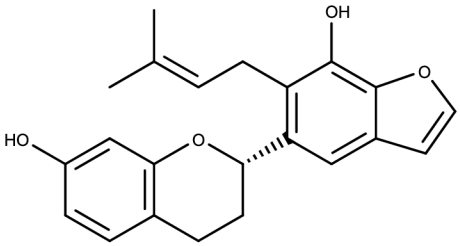
V rozsáhlé práci zabývající se antioxidační aktivitou rostlinných fenolů a vlivu prenylových jednotek na míru jejich účinku vybrali autoři jako strukturně blízké flavany s různým stupněm prenylové substituce kazinoly E, C se třemi prenylovými jednotkami, kazinol I se dvěma prenylovými jednotkami, kazinol B s jednou volnou a jednou zacyklenou prenylovou jednotkou, kazinol U s jednou volnou prenylovou jednotkou a dvě látky bez prenylové substituce. Výsledky ukázaly, že počet prenylových jednotek v molekule významně ovlivňuje antioxidační a cytoprotektivní schopnosti daných molekul. Jako nejúčinnější vyšel kazinol E schopný inhibovat nereceptorovou tyrosin kinázu Fyn, odpovědnou za signalizaci buněčného cyklu, růst a proliferaci buňky, značně ovlivňovanou ROS a oxidativním stresem. Důvod, proč flavany s více prenylovými substituenty vykazují větší efektivitu, je podle autorů zvýšená buněčná permeabilita a lipofilita, která umožňuje internalizaci do buňky při nižších koncentracích a delší setrvání látky v buňce. Podle očekávání tak účinnost kazinolů se snižujícím se počtem prenylů ve struktuře klesala [54]. Protinádorové účinky inhibicí DNA methyltransferázy a indukcí ROS byly popsány u triprenylované látky kazinol Q [55].

Novou látkou izolovanou z *B. papyrifera* je bropapyriferol, strukturně podobný daphnegiravanu F (také izolován z *B. papyrifera* [45]). Obě látky ale vykazovaly jinou míru účinku. Daphnegiravan F vykazoval antimikrobiální účinky proti G+ bakteriím srovnatelné s triclosanem použitým jako pozitivní kontrola, zatímco bropapyriferol vykazoval antimikrobiální účinek jen slabý [45]. Antimikrobiální účinky proti G+ bakteriím vykazoval také kazinol B [56].

Tab. 6: Přehled vybraných flavanů *B. papyrifera* a jejich struktura

Broussin	

Broussoflavan A	
Kazinol A	
Kazinol B	
Kazinol E	

Kazinol Q	
3'–(3–methylbut–2–enyl)–3',4',7–tri-hydroxyflavan	
Bropapyriferol	
Daphnegiravan F	

2.7.5 Flavony

Flavony mají rozmanité spektrum biologických účinků, byly popsány flavony s protizánětlivými, antimikrobiálními, antioxidačními, vaskulárními, protinádorovými a cytotoxickými účinky. Strukturně jsou charakterizovány dvojnou vazbou mezi C–2 a C–3, karbonylovou skupinou na C–4 a na rozdíl od flavonolů absencí hydroxylové skupiny v poloze C–3 [57].

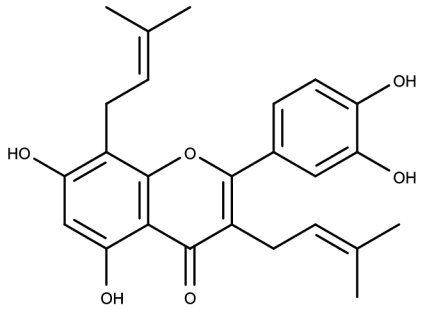
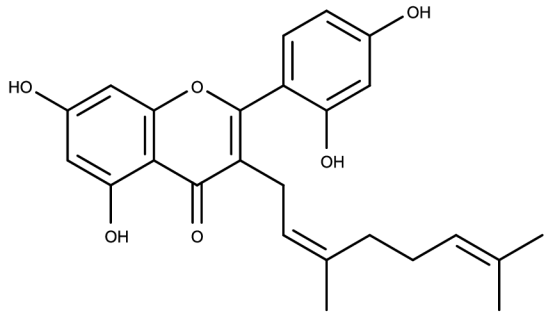
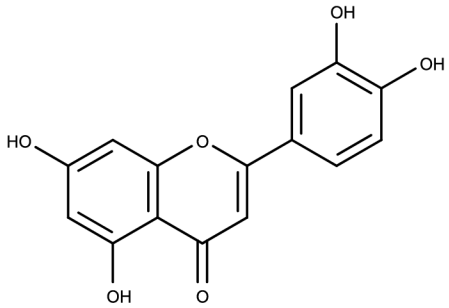
Nově izolovaná látka, ačkoliv strukturou odpovídající flavonu, byla pojmenována broussoflavonol H a byla u ní testována schopnost inhibovat tyrozinázu a cytotoxické a protizánětlivé účinky. Jak již bylo zmíněno, podle výsledků této práce prenylový substituent snižuje schopnost látky inhibovat tyrozinázu, takže prenylovaný broussoflavonol H nevykazoval tak silné účinky jako neprenylovaný broussoflavonol J, ale v rámci prenylovaných flavonoidů dosahoval v inhibici tyrozinázy nejvyšší aktivity ze všech zkoušených látek [46]. Dále *in vitro* inhiboval růst nádorových buněčných linií, a to zejména HepG2 (human hepatic carcinoma) a u T–lymfocytů (Jurkat buňky), aktivovaných phytohaemaglutininem a forbol myristát acetátem, inhiboval produkci IL–2 [46].

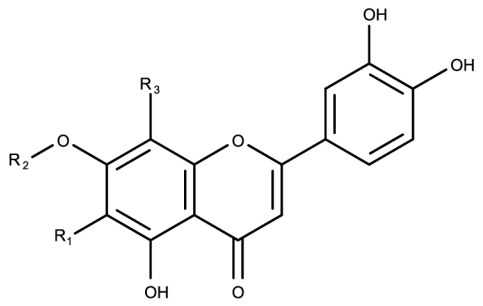
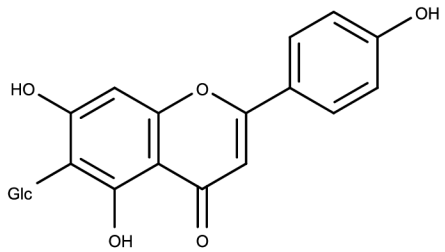
Dalším prenylovaným flavonem izolovaným z papírovníku je 5,7,2',4'–tetrahydroxy–3–geranylflavon, který vykazoval pozitivní výsledky v inhibici aromatázy. Podle výsledků této práce je patrné, že aktivitu sloučenin ovlivnila pozice prenylové a geranylové skupiny. Zkoušené látky s prenylovým nebo geranylovým substituentem v pozici C–6 vykazovaly velice slabou aktivitu, podle autorů brání tak objemný substituent interakci s enzymem, zatímco 5,7,2',4'–tetrahydroxy–3–geranylflavon s geranylovou skupinou v pozici C–3 byl aktivní. Ukazuje se tedy, že pozice prenylové či geranylové substituce je pro účinek stěžejní [43].

V nevelké skupině flavonů izolovaných z *B. papyrifera* značně převažují neprenylované látky. Některé z nich, prezentované v práci zabývající se inhibicí biosyntézy estrogenu a antioxidační aktivitou, vykazovaly pozitivní účinky. Izolovány byly látky apigenin, luteolin, apigenin–7–*O*–*β*–D–glukosid, chrysoeriol–7–*O*–*β*–D–glukosid, isovitexin, luteolosid, orientin, vitexin a isoorientin. Apigenin vykazoval cytotoxické účinky, proto byl z dalšího zkoumání vyloučen. Luteolin vykazoval výborné výsledky v inhibici biosyntézy estrogenu a zhášení volných radikálů. Silné antioxidační účinky vykazovaly také luteolosid, orientin a isoorientin, všechny látky dosahovaly lepších účinků než kyselina L–askorbová, použitá jako referenční látka [33]. Isovitexin (apigenin–6–*C*–*β*–D–

glukopyranosid) pak vykazoval cytotoxické účinky vůči HepG2 buňkám [58].

Tab. 7: Přehled vybraných flavonů *B. papyrifera* a jejich struktura

Broussoflavonol H	
5,7,2',4'–tetrahydroxy–3–geranylflavon	
Luteolin	

Luteolosid (A) Orientin (B) Isoorientin (C)	 A: R_1 = R_3 = H, R_2 = Glc B: R_1 = H, R_2 = H, R_3 = Glc C: R_1 = Glc, R_2 = H, R_3 = H
Isovitexin	

2.7.6 Flavonoly

Flavonoly jsou nejbohatší a nejprozkoumanější skupinou flavonoidů. Byly popsány flavonoly s antioxidačními, antimikrobiálními, hepatoprotektivními, protizánětlivými, vasodilatačními a protinádorovými účinky. Hydroxylová skupina na C–3 může být volná nebo substituovaná, často se jedná o *O*–glykosidy [59].

Mezi první flavonoly izolované z papírovníku patří broussoflavonoly A a B, poprvé popsané v roce 1985 [60]. Účinky broussoflavonolu A byly zatím zkoumány spíše sporadicky, zatímco broussoflavonol B byl předmětem mnoha vědeckých prací a jeho účinky jsou v nich detailně popsány. Strukturně jsou látky téměř analogické, rozdílná je prenylová substituce na C–6, kdy broussoflavonol B má volný prenylový řetězec, zatímco broussoflavonol A má prenylový substituent zacyklený do struktury dimethylpyranu. U obou látek byly testovány protizánětlivé účinky a obě látky vykazovaly pozitivní účinky v inhibici prozánětlivých transkripčních faktorů NF–κB a AP–1 a snižovaly produkci prozánětlivých cytokinů IL–1β a TNF–α [31]. Další zkoušenou látkou byl 5,7,3',4'–tetrahydroxy–3–methoxy–8,5'-diprenylflavon, který vykazoval signifikantní výsledky pouze v inhibici NF–κB a AP–1. Ze všech zkoušených látek

vykazoval 5,7,3',4'–tetrahydroxy–3–methoxy–8,5'-diprenylflavon nejvýraznější antioxidační účinky, které jsou připisovány zejména 3',4'–dihydroxy substituci. Látka byla aktivnější než kvercetin, za což jsou odpovědné 5,7–*m*–dihydroxy uspořádání na kruhu A, volná poloha C–6 a prenylace v poloze C–5', která zvyšuje antioxidační účinek pravděpodobně tak, že usnadňuje prostup membránou do buňky [31]. Broussoflavonol B dále vykazoval protinádorové účinky různými mechanismy jako inhibice estrogen non–dependentních MDA–MB–231 nádorových buněk a nádorových kmenových buněk, indukce zástavy buněčného cyklu ve fázích G_0/G_1 a G_2/M, indukce apoptózy a v neposlední řadě downregulace exprese několika regulačních proteinů a redukce počtu EGFR (receptor epidermálního růstového faktoru, který přijímá růstové signály a přenáší je dále do buňky) a estrogenového receptoru ER-α36 [61]. Principiálně podobnými účinky pak také inhiboval nádorové buňky slinivky PANC–1 [62]. Broussoflavonol B je také schopný snižovat zánět v adipocytech a inzulinovou rezistenci, redukcí NF–κB transkripční aktivity a aktivací AMP–aktivované proteinové kinázy [30].

Dále byly izolovány a popsány broussoflavonoly C, D, E [63], F, G [64; 65] I a K [46], některé struktury byly v průběhu let opraveny a přejmenovány, avšak prozatím platí, že jejich účinky nebyly nijak významně zkoumány a informace o těchto látkách jsou omezené. U broussoflavonolů I a K byly zkoumány účinky na tyrozinázu, účinky cytotoxické a protizánětlivé. Obě látky vykazovaly v inhibici tyrozinázy jen slabý efekt, ale při testování účinků na plicní (NCI–H1975), jaterní (HepG2) a prsní (MCF–7) nádorové buňky vykazoval broussoflavonol K silný inhibiční efekt na všechny tři buněčné linie a broussoflavonol I inhiboval HepG2 buňky. Ve stejné práci byly testovány také další flavonoly, a to glycyrrhiza flavonol A, papyriflavonol A, broussoflavonol F a B, a isolicoflavonol, u nichž byly také popsány cytotoxické účinky (zejména na HepG2 a MCF–7) [46]. Výsledky pak potvrdily hypotézu, že prenylované sloučeniny jsou v inhibici nádorových buněk účinnější než neprenylované látky. Dále se ukázalo, že cyklizace prenylového řetězce a sousední hydroxylové skupiny může cytotoxický účinek zvyšovat a v rámci látek s touto strukturou pak lze také pozorovat snižující se účinek s absencí dvojné vazby v dimethylpyranové struktuře, což koresponduje s výsledky broussoflavonolu K a glycyrrhiza flavonolu A, kdy první zmíněná látka vykazovala silnější efekt než druhá [46].

Další významnou látkou ze skupiny flavonolů je již zmíněný papyriflavonol A. Od roku 2001, kdy byl poprvé izolován [66], byl testován na

široké spektrum účinků a mnoho z nich u něj bylo potvrzeno. Jako první byla zkoumána jeho schopnost inhibovat cyklooxygenázy COX-1 a COX-2 a lipooxygenázy 5-LOX a 12-LOX. Výsledky ukázaly, že papyriflavonol A je schopný inhibovat pouze lipooxygenázy [67], avšak při dalším výzkumu této látky bylo zjištěno, že je také schopný inhibovat sekreční fosfolipázu A_2, IgE indukovanou kožní anafylaktickou reakci u myší a bylo potvrzeno, že je schopný inhibovat produkci leukotrienů, má tak potenciál být pro své protizánětlivé a antialergické účinky dále zkoumán [68]. Dále vykazoval signifikantní antibakteriální a antimykotický účinek proti G+ (*S. epidermis, S. aureus*) i G- (*E. coli, S. typhimurium*) bakteriím a kvasinkám (*C. albicans, S. cerevisiae*), za současné nízké cytotoxicity testované na HepG2 buňkách [56]. O pár let později byl detailněji prozkoumán antifungální účinek vůči *C. albicans* a bylo zjištěno, že papyriflavonol A narušuje integritu buněčné membrány těchto patogenů, avšak na rozdíl od využívaného antimykotika amfotericinu B, nezpůsobuje tímto mechanismem rozsáhlou hemolýzu [69]. Ve stejné době byl pak popsán jeho silný inhibiční účinek na α–glukosidázu [40]. Výzkum, zabývající se účinkem několika rostlinných fenolů včetně papyriflavonolu A na proteázy virů SARS a MERS, který vedl k pozitivním výsledkům a ve kterém papyriflavonol A dosahoval z testovaných látek nejlepších výsledků [29], vedl k dalšímu testování účinnosti těchto látek proti viru SARS CoV–2. Navzdory několika odlišnostem je genová sekvence kódující hlavní proteázu (Mpro, $3CL^{pro}$) u obou virů SARS i SARS CoV–2 z více než 96 % stejná a je tak vhodným cílem látek, které se ukázaly jako efektivní v inhibici proteáz viru SARS. Pomocí *in silico* molekulového dokování bylo zjištěno, že komplexy fenolů a proteáz jsou velice stabilní a že zkoušené látky izolované z *B. papyrifera* včetně papyriflavonolu A by mohly být potenciálně účinnými inhibitory proteáz viru SARS CoV–2 [70]. Nově byla také u této látky zjištěna schopnost inhibovat bakteriální neuraminidázu, enzym štěpící kyselinu sialovou glykoproteinů na povrchu buněk, která se účastní interakcí mezi buňkou a jejím okolím [71].

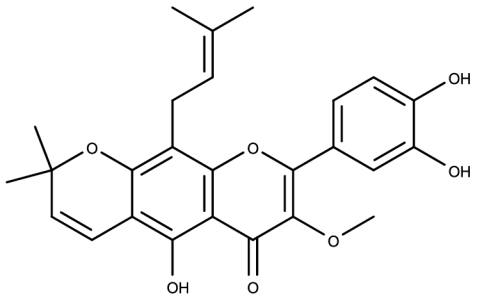
Široké spektrum účinků pak bylo pozorováno i u látky 8–(1,1–dimethylallyl)–5'–(3–methylbut–2–enyl)–3',4',5,7–tetrahydroxyflavonolu, a to inhibice bakteriální neuraminidázy [71], inhibice α–glukosidázy [40], inhibice protein–tyrosin fosfatázy 1B (PTP1B), která potlačuje normální aktivaci inzulinové signální kaskády a podílí se tak na vzniku inzulinové rezistence [72] a inhibice acetylcholinesterázy [73].

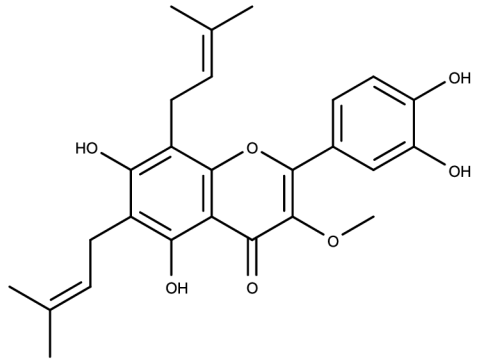
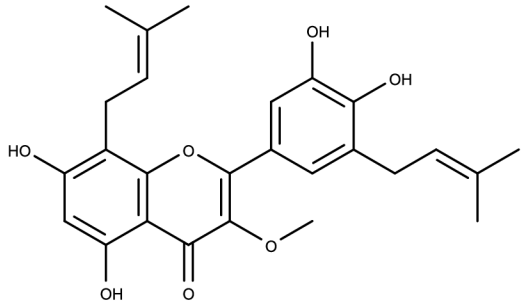
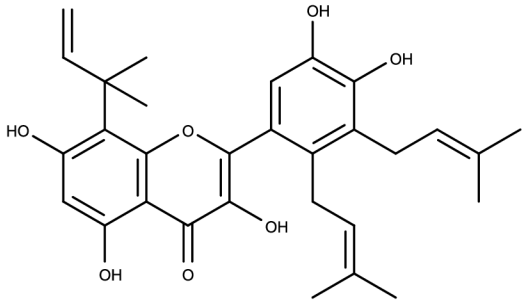
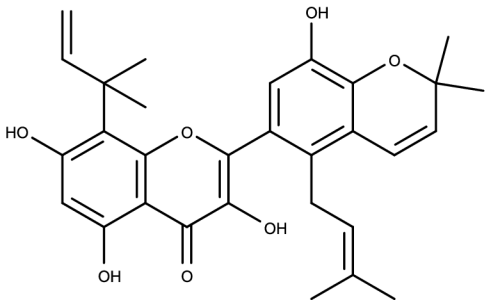
Další látkou s protinádorovými účinky ze skupiny flavonolů je 5,7,3',4'–tetrahydroxy–3–methoxy–8,5'–diprenylflavon. Spolu

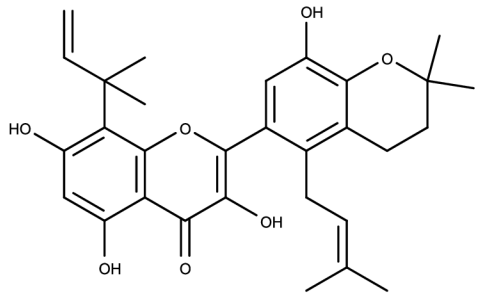
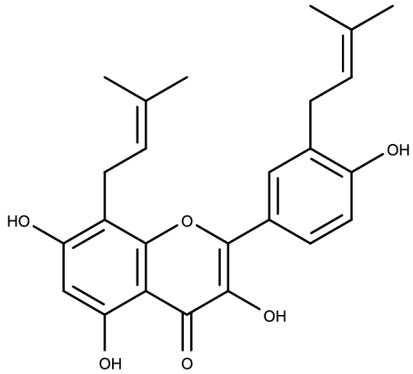
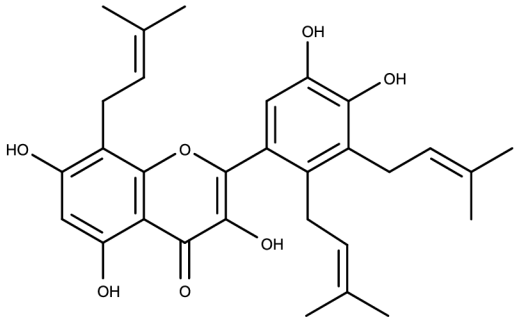
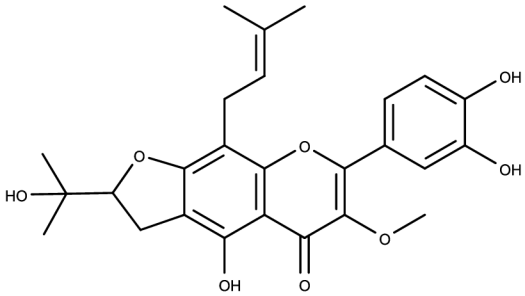
s broussoflavonolem B vykazoval antiproliferační účinky na prsní nádorové buňky včetně downregulace estrogenových receptorů (ER–α) [74]. Dále byly zjištěny jeho silné antimikrobiální účinky, a to zejména proti G+ bakteriím [45]. Jako účinné při inhibici tyrozinázy pak vycházely látky 3,5,7,4'–tetrahydroxy–3'–(2–hydroxy–3–methylbut–3–enyl)flavon, uralenol, quercetin a broussoflavonol F [42]. V inhibici aromatázy pak byly zaznamenány signifikantní výsledky zejména u isolicoflavonolu [43]. Kromě toho byl isolicoflavonol účinný proti MRSA (methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*) a některým dalším patogenům [75] a inhiboval COX-1 i COX-2 [76].

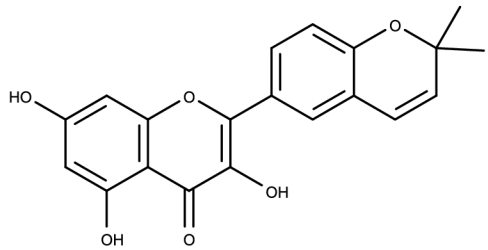
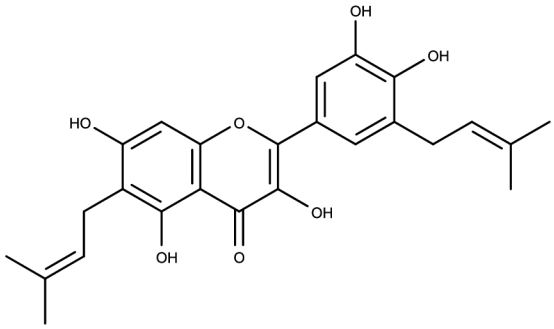
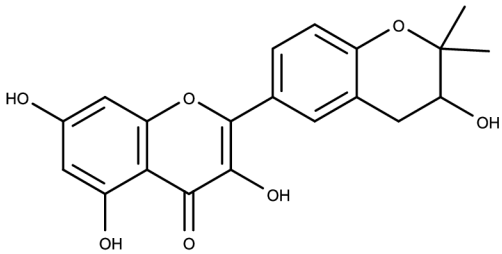
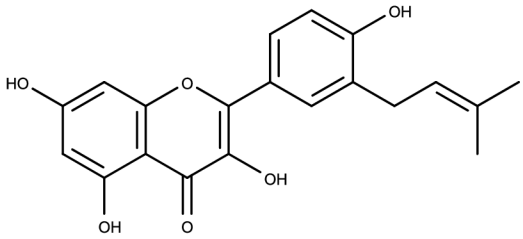
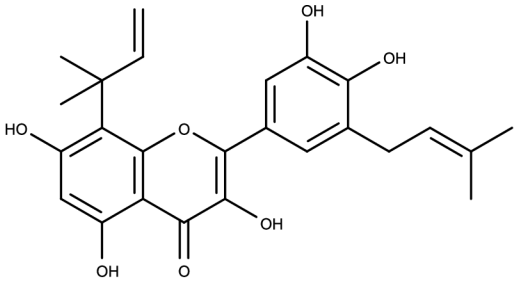
Z hlediska struktury zajímavé látky broussofluorenon A a B, u nichž dochází k raritnímu spojení do furanového kruhu mezi hydroxylovou skupinou na C–3 a polohou C–6', byly izolovány z kořene papírovníku a byla u nich potvrzena významná účinnost při inhibici α–glukosidázy, srovnatelná s terapeuticky využívanou voglibózou [40]. Dále byly schopny inhibovat enzym acetylcholinesterázu, avšak v nižší míře než ostatní zkoušené látky [73]. Nově byl objeven i broussofluorenon C, který vykazoval protizánětlivé účinky inhibicí transkripčních faktorů NF–κB a AP–1, srovnatelné s prednisonem, použitým jako pozitivní kontrola [31].

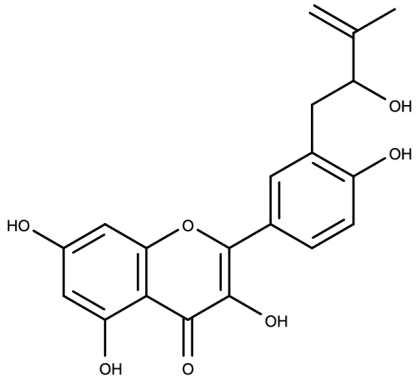
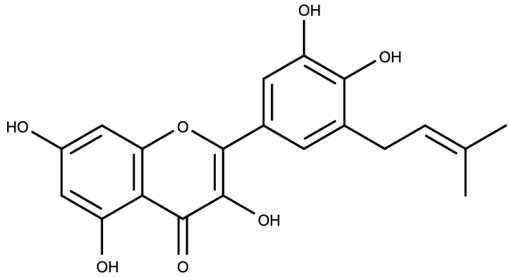
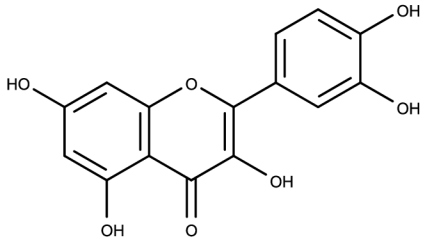
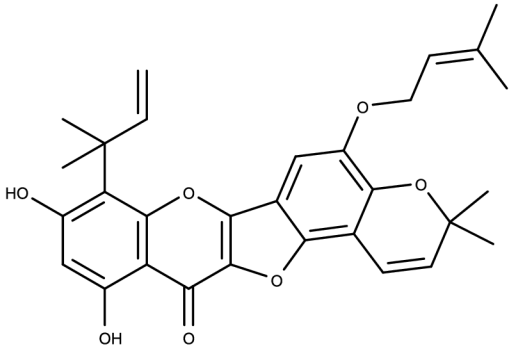
Tab. 8: Přehled vybraných flavonolů *B. papyrifera* a jejich struktura

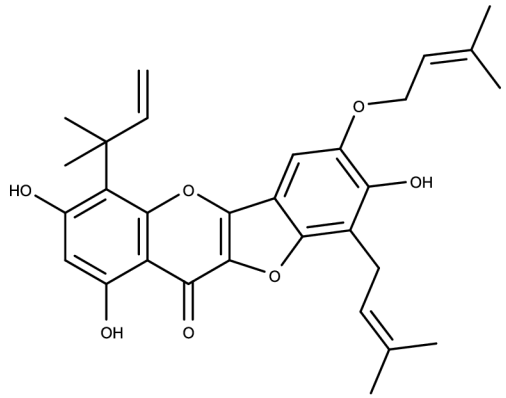
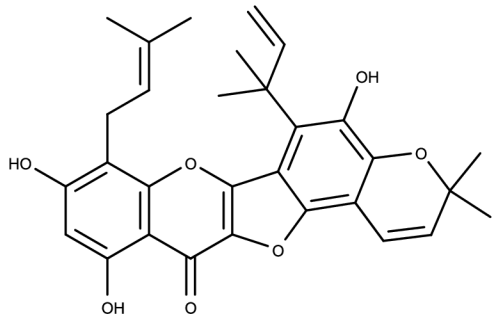
Broussoflavonol A	

Broussoflavonol B	
5,7,3',4'–tetrahydroxy–3–methoxy–8,5'-diprenylflavon	
Broussoflavonol C	
Broussoflavonol D	

Broussoflavonol E	
Broussoflavonol F	
Broussoflavonol G	
Broussoflavonol I	

Broussoflavonol K	
Papyriflavonol A	
Glycyrrhiza flavonol A	
Isolicoflavonol	
8–(1,1–dimethylallyl)–5'–(3–methylbut–2–enyl)–3',4',5,7–tetra-hydroxyflavonol	

3,5,7,4'–tetrahydroxy–3'–(2–hydroxy–3–methylbut–3–enyl)flavon	
Uralenol	
Quercetin	
Broussofluorenon A	

Broussofluorenon B	
Broussofluorenon C	

3 Experimentální část

Cílem této části práce je popsat dílčí kroky, které vedly k výběru frakce z chloroformového podílu extraktu *B. papyrifera*, následné separaci vybrané frakce pomocí sloupcové chromatografie a u vybraného podílu izolaci jednotlivých látek a jejich následnou identifikaci pomocí analýzy UV, IČ a NMR spekter.

3.1 Použitý materiál a přístroje

3.1.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál v podobě nasekaných dřevních částí byl získán z areálu VFU Brno a identifikován prof. PharmDr. Karlem Šmejkalem, Ph.D. Jeho zpracováním se zabývala Mgr. Monika Paulíková ve své diplomové práci [77], která extrakcí pomocí nemísitelných kapalin rozdělila ethanolový extrakt rostlinného materiálu nejdříve na čtyři frakce a následně získanou chloroformovou frakci podrobila sloupcové chromatografii. Výsledkem bylo několik desítek pospojovaných nebo samostatných frakcí, které byly výchozími vzorky této diplomové práce.

3.1.2 Chemikálie

Rozpouštědla použitá při tenkovrstvé a sloupcové chromatografii

- chloroform p.a. (Lach–Ner)
- methanol p.a. (Lach–Ner)
- *n*–hexan p.a. (Penta)
- tetrahydrofuran pro HPLC (Sigma–Aldrich)
- ethylacetát p.a. (Lach–Ner)
- toluen p.a. (Penta)
- roztok kyseliny sírové v diethyletheru

Rozpouštědla použitá při analytické a semipreparativní HPLC

- acetonitril pro HPLC (VWR)
- methanol pro HPLC (VWR)
- voda pro HPLC (deionizovaná, připravená v systému na úpravu vody)
- kyselina mravenčí 98% p.a. (Sigma–Aldrich)

Rozpouštědla pro NMR

- deuterovaný methanol (CD_3OD–d_4, Sigma–Aldrich)
- deuterovaný chloroform ($CDCl_3$–d, Sigma–Aldrich)
- deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO–d_6, Sigma–Aldrich)

3.1.3 Laboratorní pomůcky, přístroje a zařízení

- analytické váhy ANALYTICAL plus (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 (λ = 253 a 366 nm)
- laboratorní sklo a ostatní pomůcky

3.1.4 Pomůcky, přístroje a zařízení pro TLC, sloupcovou chromatografii, HPLC, IČ a NMR

TLC

- hliníková fólie TLC Silikagel 60 F_{254}, rozměr 20 × 20 cm, tloušťka vrstvy 0,2 mm (Merck)

Sloupcová chromatografie

- mořský písek p.a. (Dorapis)
- silikagel Kieselgel 60, velikost částic 0,04–0,063 mm (Merck)
- skleněná kolona o délce 70 cm a průměru 4 cm

HPLC

- vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent 1100 s detektorem s diodovým polem (DAD) (Agilent Technologies, USA)
- analytická kolona Ascentis® Express RP–Amide, 10 cm × 2,1 mm, velikost částic 2,7 µm (Supelco, USA)
- semipreparativní HPLC Dionex Ultimate 3 000 s UV detektorem (Thermo Scientific, USA)
- semipreparativní kolona Ascentis® RP–Amide, 25 cm × 10 mm, velikost částic 5 µm (Supelco, USA)

IČ

- spektrofotometr s Fourierovou transformací FT–IR Impact 410 (Nicolet, USA)

NMR

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

3.2 Použité separační a identifikační metody

3.2.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie je analytická chromatografická metoda založená na rozdílné afinitě dělených látek k mobilní a stacionární fázi, kdy dochází k opakovanému ustavování fázové rovnováhy mezi tyto nemísitelné fáze, které jsou vůči sobě v pohybu [78]. Tato metoda byla využita k získání primárních orientačních výsledků o složení jednotlivých frakcí a k nalezení vhodné mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii.

3.2.2 Sloupcová chromatografie

Separační chromatografická metoda, při které mobilní fáze prochází přes stacionární fázi, umístěnou ve skleněné koloně s fritou a kohoutem, a unáší s sebou vzorek. Vlivem různé chemické afinity látek ke stacionární fázi dochází k rozdělení rozpuštěných látek do oddělených zón [78]. Tento typ kolonové chromatografie byl využit k separaci vybrané frakce z chloroformového podílu, čímž bylo získáno 45 frakcí.

3.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Při této analytické metodě působící na stejném principu jako výše zmíněné je nadávkovaný vzorek unášen tokem mobilní fáze pod vysokým tlakem do chromatografické kolony a následně do detektoru. Kolony používané pro HPLC jsou homogenně vyplněny malými částicemi pravidelného tvaru a je u nich zaručena reprodukovatelnost. Konstantní, reprodukovatelný a bezpulsní průtok mobilní fáze kolonou zajišťuje vysokotlaká pumpa. Spektrofotometrický detektor (u HPLC nejčastější) pak měří absorbanci při jedné vlnové délce nebo v celém UV/VIS spektru (DAD) a poskytuje tak spektra k identifikaci látky nebo určení čistoty píku (změna spektra v různých částech píku ukazuje na směs nerozlišených analytů) [78]. Metoda použitá pro účely této práce je záměrně uvedená zde, protože platí pro všechna uvedená měření.

Tab. 9: Parametry metody použité při analytické HPLC

Mobilní fáze	Směs acetonitrilu (A) a 0,2% HCOOH (B)
Gradientová eluce	0. min = 10 % (A) + 90 % (B) 36. min = 100 % (A)
Průtok	0,3 ml/min
Nástřik	1 µl
Teplota kolonového bloku	40 °C
Detekce	DAD při λ = 215, 254, 280 a 350 nm

3.2.4 Semipreparativní HPLC

Separační metoda na principu HPLC, směs látek je zde rozdělována a jednotlivé látky s mobilní fází jsou sbírány na základě retenčních časů [78]. Tímto způsobem byly separovány látky z vybrané frakce získané sloupcovou chromatografií, které byly dále identifikovány. V obou případech použití této metody byly použity jiné parametry, jsou proto uváděny v příslušných kapitolách.

3.2.5 Infračervená spektroskopie (IČ)

Identifikační metoda založená na absorpci infračerveného záření, kdy frekvence absorbovaného záření odpovídá frekvenci vibrace vazby mezi atomy testované látky [78].

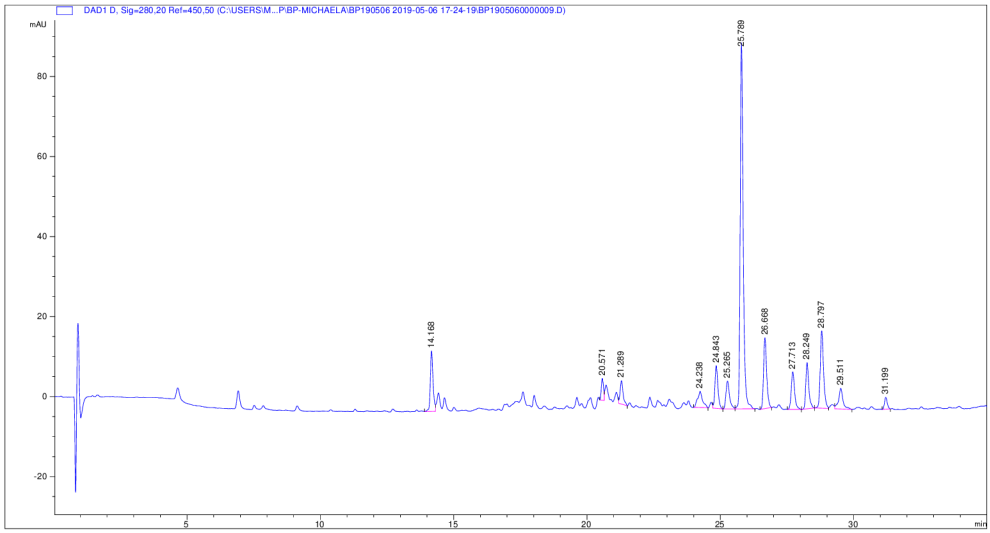
3.2.6 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Metoda pro strukturní analýzu, jejíž principem je interakce jader atomů umístěných v silném elektromagnetickém poli s radiofrekvenčním zářením. Po ozáření vzorku vysokofrekvenčním pulzem a následné excitaci jader je návrat do rovnovážného stavu sledován jako tzv. FID – volné doznívání indukce, představující záznam závislosti intenzity signálu na čase, který je následně pomocí Fourierovy transformace převeden na NMR spektrum, tedy závislost intenzity signálu na frekvenci [78]. Pro výslednou identifikaci látek byly vzorky rozpuštěny ve vhodném deuterovaném rozpouštědle a byly provedeny 1D (^{1}H NMR) a 2D (HSQC, HMBC, COSY a NOESY) NMR experimenty. Získaná spektra byla vyhodnocena PharmDr. Milanem Malaníkem, Ph.D.

3.3 Výsledky a diskuse

3.3.1 Separace frakce BP/CHCl$_3$/23–24

Výchozí vzorky, tedy frakce získané sloupcovou chromatografií chloroformového podílu extraktu *B. papyrifera* M. Paulíkovou, byly podrobeny TLC a HPLC analýze. Vzorky byly rozpuštěny v methanolu nebo tetrahydrofuranu (THF) a jako mobilní fáze pro tenkovrstvou chromatografii byla použita směs chloroformu, methanolu a hexanu v poměru 80:10:10. Na základě chromatogramů z HPLC byla pro další separaci látek vybrána frakce BP/CHCl$_3$/23–24, a to zejména z důvodu přítomnosti několika látek s retenčními časy mezi 25. a 30. minutou, což je rozmezí odpovídající lipofilním prenylovaným sloučeninám. Z chromatogramu této frakce je dále vidět, že píky látek jsou od sebe dostatečně vzdálené, měly by proto být dobře separovatelné, čemuž odpovídalo i několik od sebe vzdálených skvrn na TLC. Hmotnost frakce BP/CHCl$_3$/23–24 odpovídala 1,492 g.



Obr. 6: Chromatogram frakce BP/CHCl$_3$/23–24 při 280 nm

Následujícím krokem bylo hledání vhodné mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii vybrané frakce metodou tenkovrstvé chromatografie. K tomuto účelu byla část vybrané frakce rozpuštěna ve směsi chloroformu a methanolu v poměru 90:10 a následně bylo provedeno několik desítek tenkovrstvých chromatografií s různými poměry rozpouštědel použitých jako mobilní fáze. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna klasickým způsobem, kdy vzorek zkoumané látky byl nanesen na TLC destičku se silikagelem s odstřihnutými dolními rohy, 1,5 cm od

spodní hrany na vyznačený start a následně vložen do kyvety nasycené parami mobilní fáze k vyvíjení. Detekce byla po vysušení prováděna pomocí UV lampy při 253 a 366 nm a následně roztokem kyseliny sírové v diethyletheru a teplým vzduchem. Zkoušené mobilní fáze byly směsi toluenu, chloroformu a methanolu v různém poměru, chloroformu, methanolu a ethylacetátu v různém poměru a hexanu, ethylacetátu a methanolu v různém poměru. Na základě těchto výsledků byla jako optimální mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii zvolena směs hexanu, ethylacetátu a methanolu v poměru 55:40:5.

Následně byla připravena skleněná kolona s kohoutem k separaci látek z frakce BP/$CHCl_3$/23–24. Kolona byla naplněna suspenzí silikagelu a mobilní fáze a suspenze byla následně překryta kruhem filtračního papíru zatíženého mořským pískem, na který byla po usazení nanesena frakce rozpuštěná v mobilní fázi. Prvních 400 ml mobilní fáze bylo odpuštěno a následně byly sbírány jednotlivé frakce po zhruba 120 ml za současného doplňování mobilní fáze do kolony. Sbírané frakce byly kontinuálně odpařovány na vakuové odparce a porovnávány metodou tenkovrstvé chromatografie. Některé frakce byly následně na základě stejných výsledků TLC spojeny. Vzorky byly rozpuštěny v methanolu nebo THF a byla provedena HPLC analýza. Výsledné frakce získané sloupcovou chromatografií uvádí tabulka 10. Frakce 1 není uvedena z důvodu příliš brzkého sběru, kdy po odpařování na vakuové odparce bylo zjištěno, že sbíraná část obsahuje pouze rozpouštědla mobilní fáze.

Tab. 10: Frakce získané sloupcovou chromatografií BP/$CHCl_3$/23–24

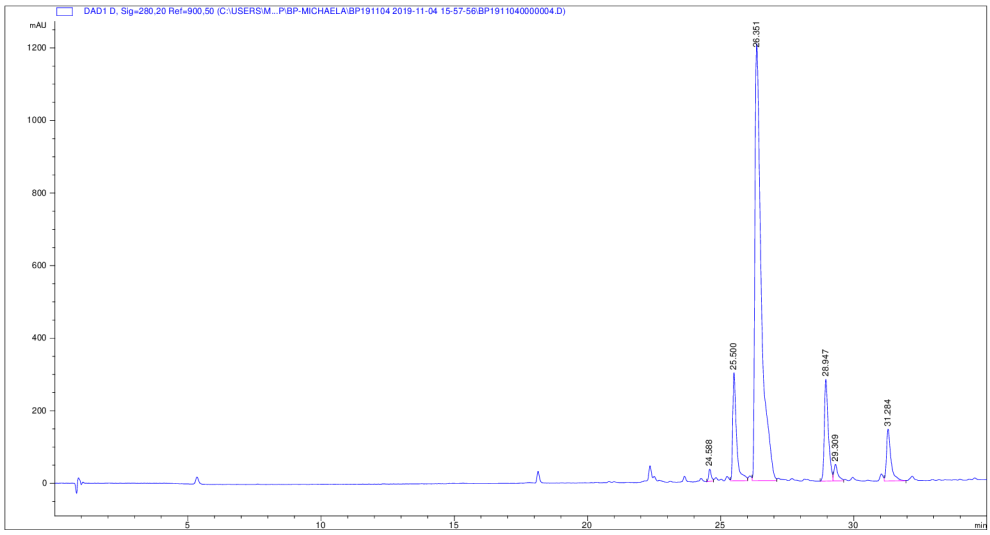
Frakce	Hmotnost [mg]
2	0,8
3	5,1
4	6,0
5	420,0
6	344,2
7	130,4
8	43,2
9	16,1
10	13,3
11	19,1
12	13,5
13	9,1

Frakce	Hmotnost [mg]
20	3,1
21	2,0
22	3,4
23	2,1
24	2,7
25	2,5
26	1,7
27	2,0
28	1,7
29	1,7
30–32	5,4
33–35	8,8

14	3,9
15	3,4
16	2,1
17	4,3
18	7,2
19	5,7

36–40	10,9
41–43	7,8
44	3,7
45	20,6
46	428,8

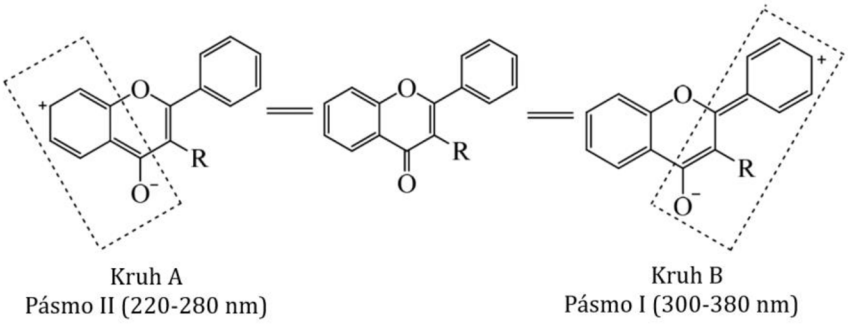
Následně byly porovnány chromatogramy získaných frakcí a z těchto byla pro další separaci vybrána frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5. Na chromatogramu vybrané frakce (Obr. 7) je vidět, že obsahuje čtyři majoritní látky s retenčními časy 25,500 min, 26,351 min, 28,947 min a 31,284 min a dvě minoritně zastoupené látky s retenčními časy 24,588 min a 29,309 min v oblasti, kde se mohou vyskytovat prenylované sloučeniny. Dalším důvodem pro výběr frakce pro preparativní HPLC byla relativně vysoká hmotnost 420 mg.



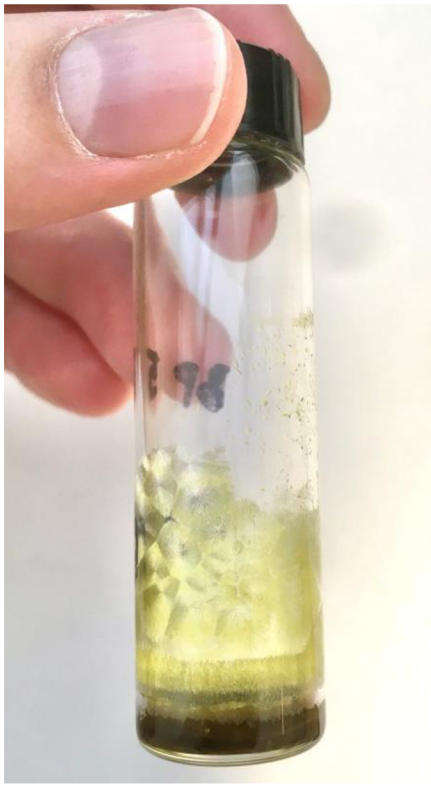
Obr. 7: Chromatogram frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5 při 280 nm

Po primárním zhodnocení UV spekter látek přítomných v této frakci bylo zjištěno, že první čtyři integrované látky na uvedeném chromatogramu mají UV spektrum typické pro flavany, kdy pásmo označované jako pásmo I (300 až 380 nm), které odpovídá absorpčním maximům kruhu B, je z důvodu absence konjugovaného systému dvojných vazeb u flavanů slabé nebo se v něm nevyskytuje žádné absorpční maximum [79]. Další dvě integrované látky, jejichž píky jsou na chromatogramu vidět, pak vykazovaly UV spektra typická spíše pro flavony a flavonoly, kdy

jsou viditelná absorpční maxima v pásmech I i II. Pásmo II (220–280 nm) odpovídá kruhu A flavonoidů [79].



Obr. 8: Pásma absorpčních maxim flavonoidů [80]



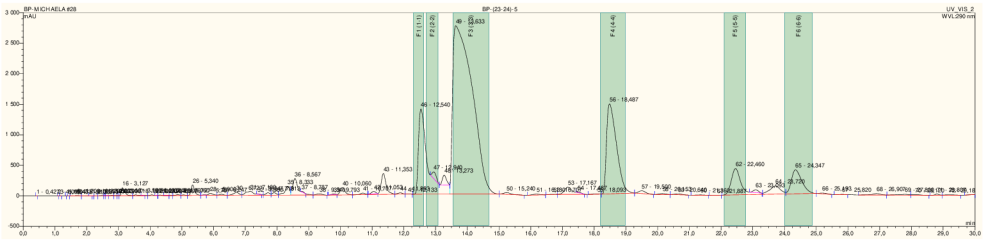
Obr. 9: Vykrystalizovaná frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5

3.3.2 Separace frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5

Následovala izolace šesti látek z frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5 metodou semipreparativní HPLC. K tomuto účelu byla frakce rozpuštěna v 1,5 ml THF. Poté byly zkoušeny různé poměry acetonitrilu a 0,2% kyseliny mravenčí k nalezení vhodné metody pro úspěšnou separaci. Po stanovení vhodných parametrů, které uvádí tabulka 11, bylo provedeno měření, při kterém byly zjištěny časové úseky sběru separovaných látek. Tyto časy byly po prvním sběru dále upraveny na optimální rozmezí. Detekce látek probíhala při vlnových délkách 270, 290 a 380 nm.

Tab. 11: Metoda separace BP/$CHCl_3$/23–24/5 pomocí semipreparativní HPLC

Čas [min]	Průtok [ml/min]	MeOH [%]	MeCN [%]	0,2% HCOOH [%]
0	5	0	65	35
25	5	0	90	10
25,1	5	0	100	0
30	5	0	100	0
30,1	5	100	0	0
35	5	100	0	0
35,1	5	0	65	35
40	5	0	65	35



Obr. 10: Chromatogram BP/$CHCl_3$/23–24/5 ze semipreparativní HPLC při 290 nm

Zeleně je vyznačeno 6 sbíraných látek.

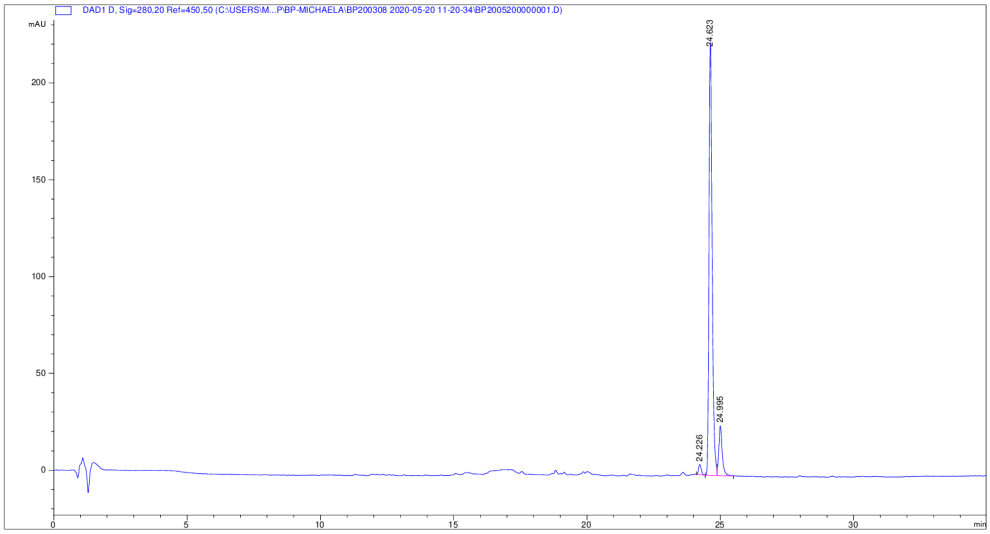
Látky byly sbírány do kádinek, dokud nebyla rozdělena celá frakce, následně byla organická rozpouštědla odstraněna pomocí vakuové odparky a voda pomocí lyofilizátoru. Podařilo se získat šest frakcí, které uvádí tabulka 12. Tyto frakce byly dále analyzovány pomocí HPLC.

Tab. 12: Frakce izolované pomocí semipreparativní HPLC z BP/$CHCl_3$/23–24/5

Látka	Hmotnost [mg]	Rozpustnost	Retenční čas [min]
A	21,77	THF	24,623 (hlavní látka)
B	12,83	THF	24,643 (hlavní látka)
C	244,70	THF	25,556
D	37,69	THF	27,973
E	1,99	MeOH	28,592
F	13,20	THF	29,010

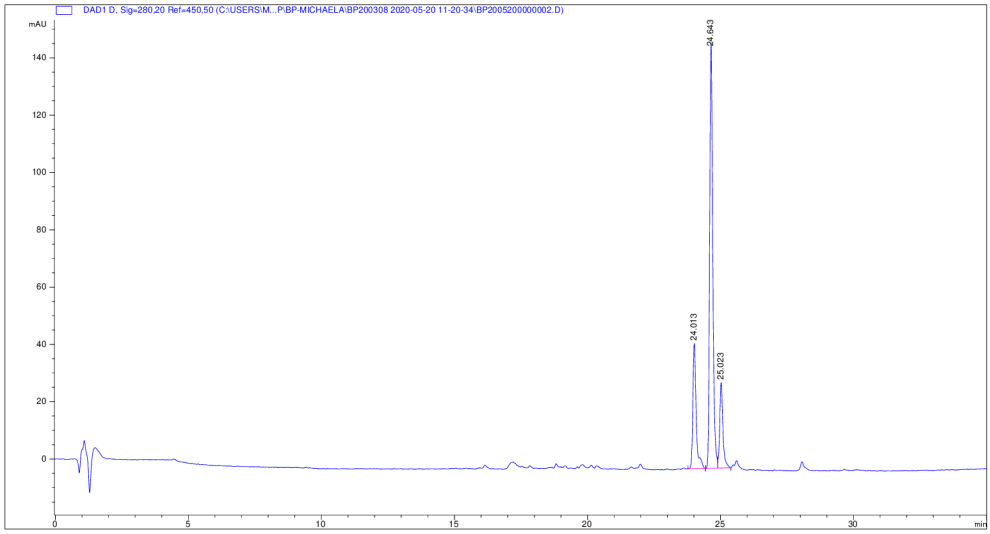
3.3.3 Separace BP/$CHCl_3$/23–24/5/A a BP/$CHCl_3$/23–24/5/B

Na chromatogramu frakce BP/23–24/5/A je vidět, že kromě majoritní látky s retenčním časem 24,623 min je ve frakci přítomna ještě minoritní látka s retenčním časem 24,995 min. Čistota hlavní látky je 87,3 %.



Obr. 11: Chromatogram frakce BP/23–24/5/A při 280 nm

Na chromatogramu frakce BP/23–24/5/B je opět vidět jedna majoritní látka s retenčním časem 24,643 min a další dvě minoritní látky s retenčními časy 24,013 min a 25,023 min. Čistota hlavní látky je pouze 64,7 %.



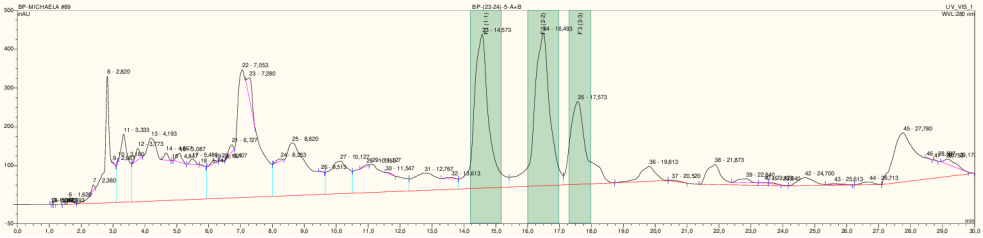
Obr. 12: Chromatogram frakce BP/23–24/5/B při 280 nm

Po analýze UV spekter majoritních látek z obou frakcí bylo zjištěno, že mají stejná absorpční maxima $UVmax_1$ = 227 nm a $UVmax_2$ = 284 nm. Obě UV spektra vykazovala shodu více než 94 % se spektrem kazinolu Q, což je triprenylovaný flavan. Vedlejší látka z frakce BP/23–24/5/A (t_R = 24,995 min) měla absorpční maxima $UVmax_1$ = 224 nm a $UVmax_2$ = 278 nm, při porovnání s UV knihovnou látek pak vykazovala největší shodu (98 %) s broussinem (flavan). Minoritní látka s t_R = 24,013 min měla absorpční maxima $UVmax_1$ = 227 nm a $UVmax_2$ = 375 nm, největší shoda s isoliquiritigeninem (chalkon); látka s t_R = 25,023 min měla $UVmax_1$ = 226 nm a $UVmax_2$ = 276 nm, největší shoda s kazinolem M (diprenylovaný difenylpropan).

Na základě shody v retenčních časech a UV spektrech majoritních látek bylo předpokládáno, že tyto látky jsou stejné a frakce BP/23–24/5/A a BP/23–24/5/B byly spojeny s cílem separovat společnou hlavní látku a látky vedlejší. Spojená směs látek byla rozpuštěna v 750 µl THF. Pro separaci látek ze spojených frakcí byla použita metoda semipreparativní HPLC s parametry uvedenými v tabulce 13. Látky byly detekovány při 280 a 375 nm.

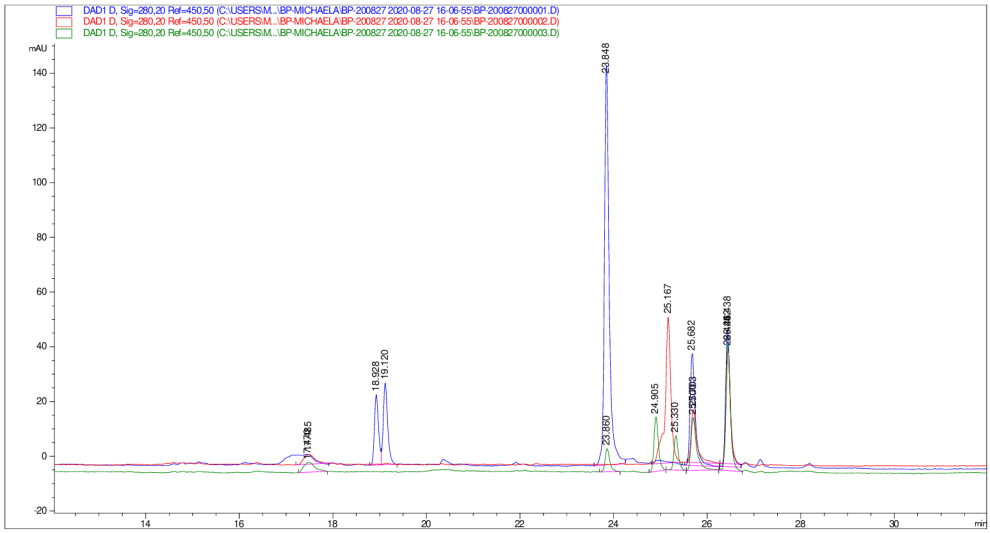
Tab. 13: Metoda separace BP/23–24/5/A+B pomocí semipreparativní HPLC

Čas [min]	Průtok [ml/min]	MeOH [%]	MeCN [%]	0,2% HCOOH [%]
0	5	0	60	40
25	5	0	80	20
25,1	5	0	100	0
30	5	0	100	0
30,1	5	100	0	0
35	5	100	0	0
35,1	5	0	60	40
40	5	0	60	40



Obr. 13: Chromatogram BP/23–24/5/A+B ze semipreparativní HPLC při 280 nm

Z chromatogramu získaného ze semipreparativní HPLC, na základě kterého byly určeny časové úseky sběru látek, je vidět, že ve spojené frakci jsou tři hlavní látky v rozmezí 14. a 18. minuty a několik vedlejších látek, které nebyly sbírány. Po dokončení separace tří látek byla opět odstraněna rozpouštědla pomocí vakuové odparky a voda pomocí lyofilizátoru a z látek byly připraveny vzorky pro HPLC. Bylo očekáváno, že výsledkem z HPLC budou tři samostatné látky s retenčními časy a UV spektry odpovídajícími výše uvedenému popisu, které budou dále identifikovány, ale získané chromatogramy obsahovaly velké množství píků s retenčními časy, které látkám výše uvedeným vůbec neodpovídaly. Píky vykazovaly velmi nízkou odezvu, kromě jediné výjimky nepřesahovala 50 mAU. Majoritní látka přítomná v obou frakcích s retenčním časem 24,6 min nebyla přítomná ani v jednom ze tří získaných chromatogramů. S největší pravděpodobností došlo k rozpadu původních látek na několik segmentů, které dále nebyly identifikovány. Chromatogram získaných frakcí je záměrně přiložen ve formě výřezu rozmezí od 12. do 32. minuty z důvodu lepší přehlednosti.



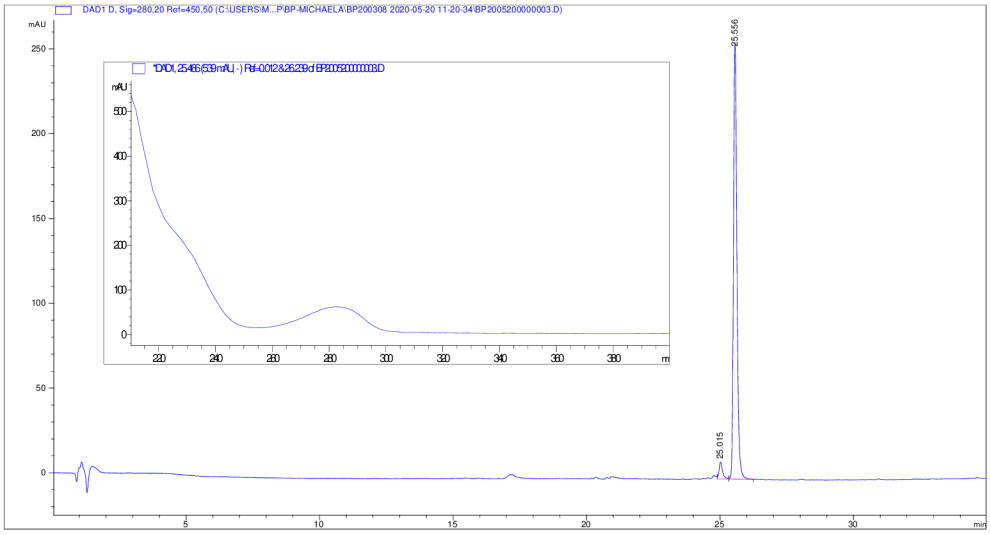
Obr. 14: Chromatogramy tří frakcí získaných z BP/23–24/5/A+B při 280 nm

3.3.4 Identifikace získaných látek

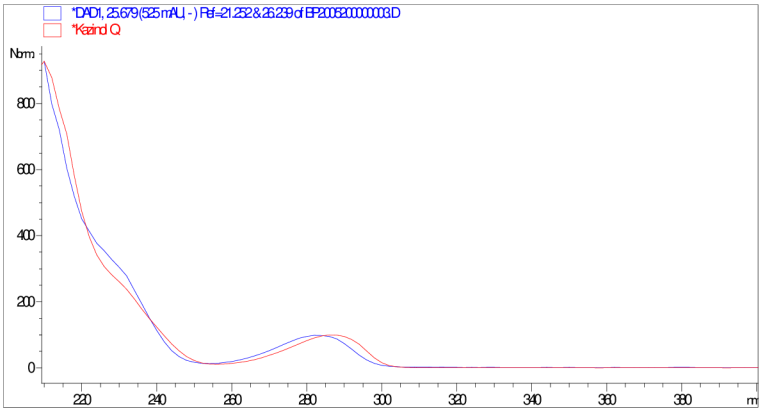
Ostatní získané látky z frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5 byly analyzovány metodou HPLC a získaná UV spektra byla vyhodnocena a porovnána s knihovnou UV spekter látek izolovaných z *B. papyrifera*. Následně byly látky identifikovány metodami IČ a NMR.

Identifikace látky BP/$CHCl_3$/23–24/5/C

Látka C s retenčním časem 25,556 min byla izolována s čistotou 96,1 %. Absorpční maxima odpovídají $UVmax_1$ = 228 nm v rameni a $UVmax_2$ = 282 nm. Takové spektrum naznačuje, že by se mohlo jednat o flavan. Již výše bylo popsáno, že flavany neabsorbují v pásmu I (zpravidla nad 300 nm) nebo absorbují slabě, z důvodu nepřítomnosti konjugovaného systému dvojných vazeb mezi kruhy C a B [79]. Hlavní maximum odpovídající kruhu A se nachází mezi 270 a 290 nm, což je poněkud nespecifické [81], a je proto potřeba použít další identifikační metody. Látka C vykazovala při porovnání s knihovnou největší shodu (98,9 %) s kazinolem Q, což podporuje možnost, že se jedná o látku s flavanovým skeletem, avšak rozdíl v retenčních časech obou látek vyvrací možnost, že by se jednalo přímo o kazinol Q. Retenční čas triprenylovaného kazinolu Q je 30,320 min.



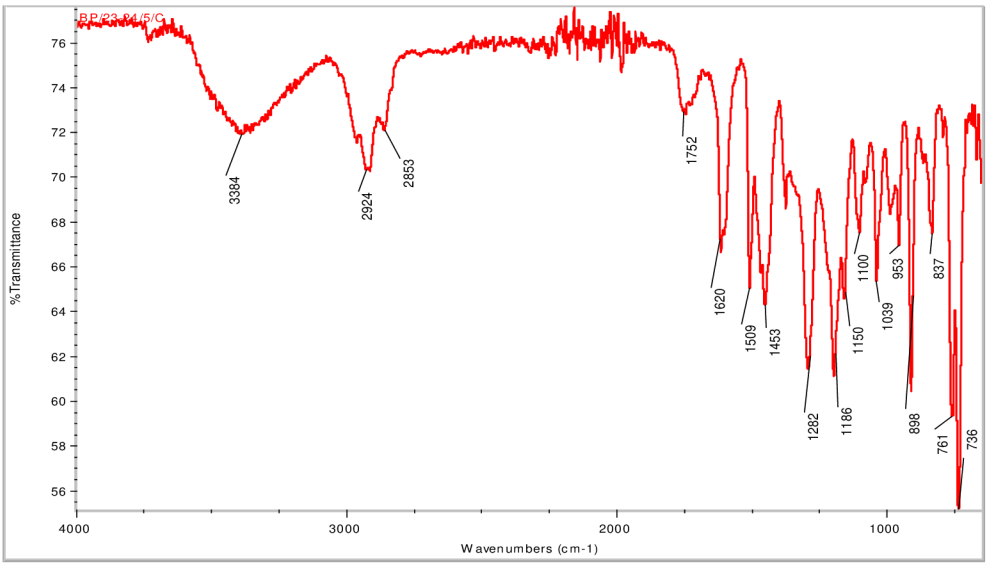
Obr. 15: Chromatogram látky BP/23–24/5/C při 280 nm a UV spektrum



Obr. 16: UV spektrum látky BP/23–24/5/C a kazinolu Q

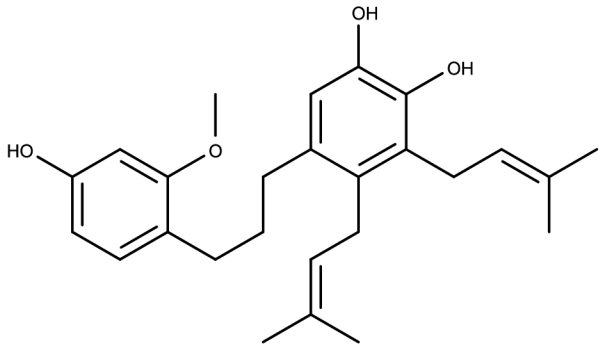
Látka C byla dále analyzována metodou infračervené spektroskopie, technikou ATR (attenuated total reflection), pro získání bližších informací o funkčních skupinách nacházejících se v dané molekule. Získané spektrum má v oblasti charakteristických vibrací výrazný absorpční pás s vlnočtem 3384 cm^{-1}, což svědčí o přítomnosti hydroxylové skupiny. Vazba O-H by mohla být potvrzena valenční vibrací s vlnočtem 1282 cm^{-1}. Oblast okolo 2900 cm^{-1} pak odpovídá skupinám $-CH_2-$ a $-CH_3$ zastoupeným absorpčními pásy s vlnočty 2924 cm^{-1} a 2853 cm^{-1}. O přítomnosti nenasycené alkenylové vazby, která absorbuje v rozmezí 1680–1620 cm^{-1}, může svědčit pás s vlnočtem 1620 cm^{-1}, nižší hodnota vlnočtu a relativně intenzivní pás může znamenat, že dvojná vazba je konjugována s jinou dvojnou vazbou nebo aromátem. Přítomnost

aromatického jádra pak naznačují absorpční pásy s vlnočtem 1509 cm^{-1} a 1453 cm^{-1}. Pásy s vlnočtem 1186 cm^{-1} a 1150 cm^{-1} by mohly odpovídat fenolické vazbě C-O, která absorbuje okolo 1200 cm^{-1}. Velké množství pásů v oblasti 900–600 cm^{-1} pak svědčí o přítomnosti benzenového jádra [82]. Absence výrazného pásu okolo 1700 cm^{-1} typického pro karbonylovou skupinu C=O pak naznačuje, že by se mohlo jednat o látku s flavanovým skeletem, čemuž napovídalo také UV spektrum.



Obr. 17: IČ spektrum látky BP/23–24/5/C

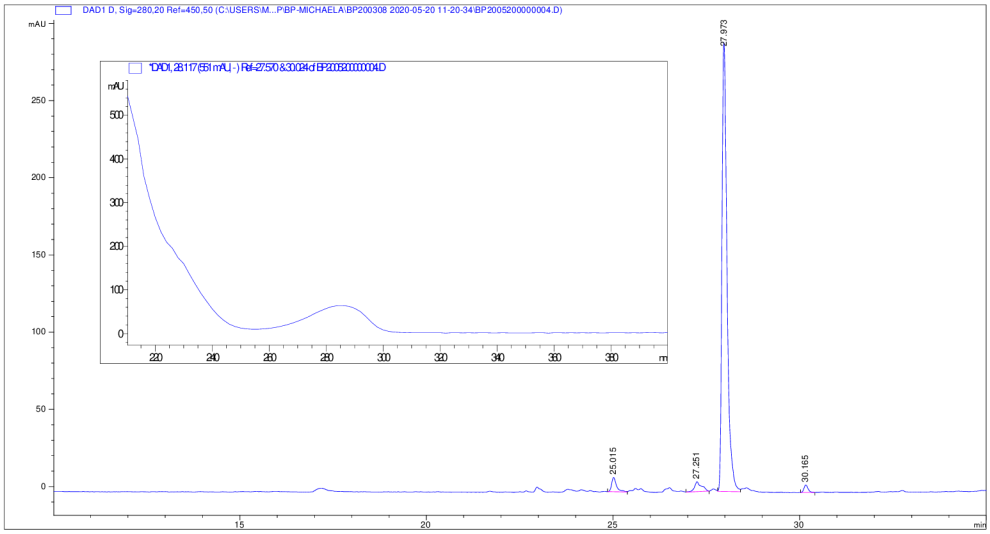
Finální identifikace látky byla provedena metodou NMR a látka BP/23–24/5/C byla označena za kazinol J na základě porovnání s daty dostupnými v literatuře [83].



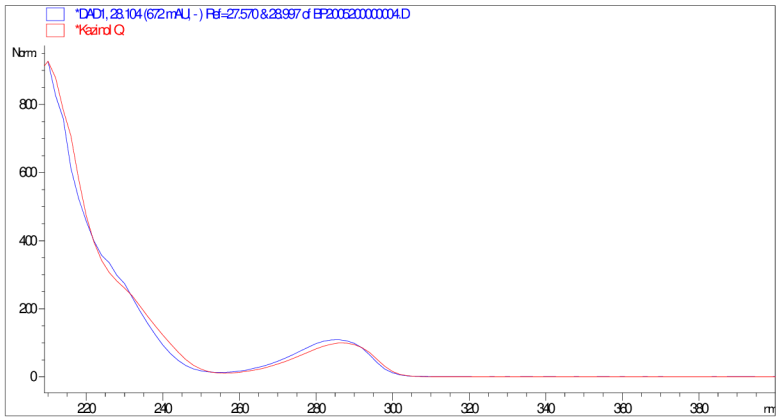
Obr. 18: Struktura kazinolu J

Identifikace látky BP/CHCl$_3$/23–24/5/D

Látka D s retenčním časem 27,973 min byla izolována s čistotou 93,0 %. UV spektrum je podobné látce předchozí, mohlo by se opět jednat o látku s flavanovým skeletem. Absorpční maxima látky jsou UVmax$_1$ = 226 nm v rameni a UVmax$_2$ = 285 nm. Po porovnání s knihovnou vykazuje látka největší shodu opět s kazinolem Q, a to 99,4 %, avšak retenční časy látky D a kazinolu Q se stejně jako v předchozím případě neshodují.



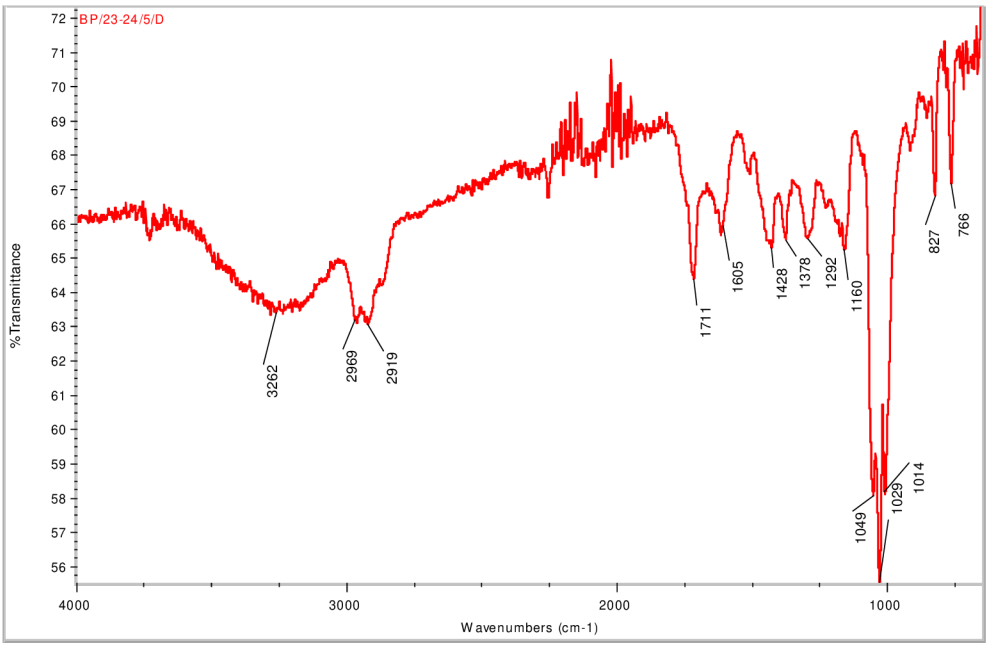
Obr. 19: Chromatogram látky BP/23–24/5/D při 280 nm a UV spektrum



Obr. 20: UV spektrum látky BP/23–24/5/D a kazinolu Q

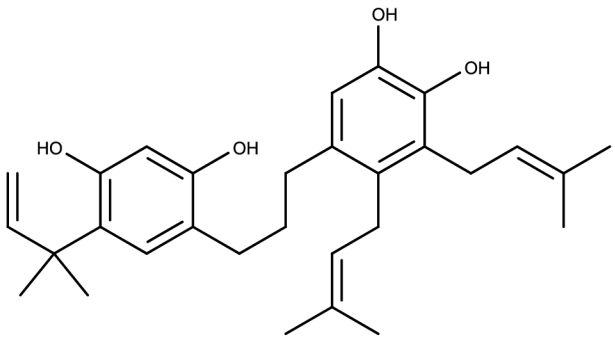
Pro další identifikaci bylo pořízeno IČ spektrum látky D. Absorpční pás s vlnočtem 3262 cm^{-1} odpovídá valenční vibraci vazby O-H a přítomnost hydroxylové skupiny v molekule naznačuje také pás s vlnočtem 1292 cm^{-1}. Pásy s vlnočty 2969 cm^{-1} a 2919 cm^{-1} pak odpovídají

hodnotám valenčních vibrací skupin -CH_2- a -CH_3, které typicky absorbují v oblasti okolo 2900 cm^{-1}. Přítomnost těchto skupin naznačují také pásy s vlnočty 1428 cm^{-1} a 1378 cm^{-1}. Pás s vlnočtem 1711 cm^{-1} je příliš slabý na to, aby byl přiřazen karbonylové skupině C=O a spíše by se mohlo jednat o pás, který se může vyskytnout u jednoduchých aromatických sloučenin v rozmezí 2000–1700 cm^{-1} a bývá slabší než pás karbonylové skupiny. Přítomnost konjugované dvojné vazby nebo aromátu naznačuje pás s vlnočtem 1605 cm^{-1} a o přítomnosti fenolické vazby C-O by mohla svědčit valenční vibrace s vlnočtem 1160 cm^{-1}. Silný pás v oblasti okolo 1029 cm^{-1} pak může mít původ v etherové vazbě C-O-C. U oblasti fingerprintu (1300–600 cm^{-1}), která popisuje uhlíkový skelet látky, je hodnocení spíše přibližné z důvodu obtížné orientace v jednotlivých pásech [82].

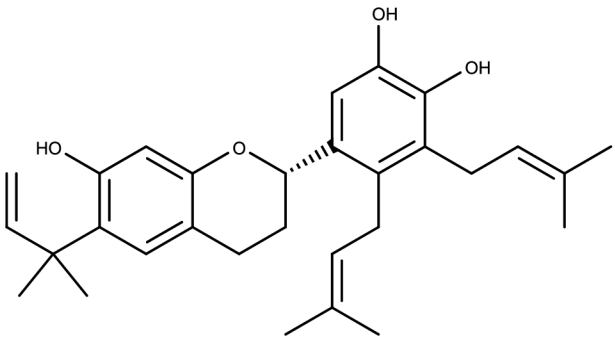


Obr. 21: IČ spektrum látky BP/23–24/5/D

Přestože se dle přiloženého chromatogramu jeví frakce BP/23–24/5/D jako čistá, na základě NMR analýzy byla označena za směs kazinolu C a kazinolu E. Jedná se o strukturně velmi podobné látky a je tedy možné, že docházelo ke koeluci a uvedené látky se proto nepodařilo oddělit použitou metodou. Přečištění frakce BP/23–24/5/D za účelem izolace kazinolu C a kazinolu E v chemicky čisté podobě bude předmětem dalšího zkoumání.



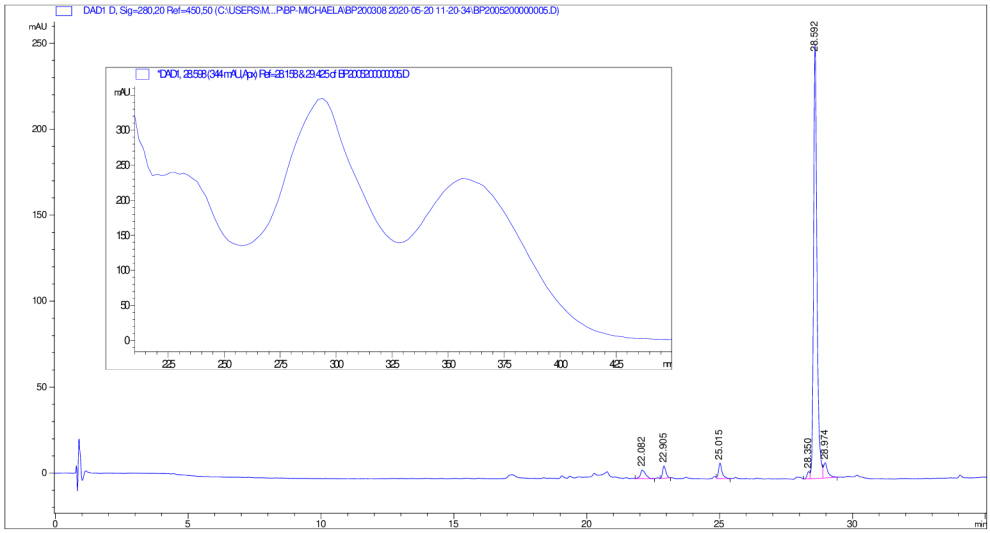
Obr. 22: Struktura kazinolu C



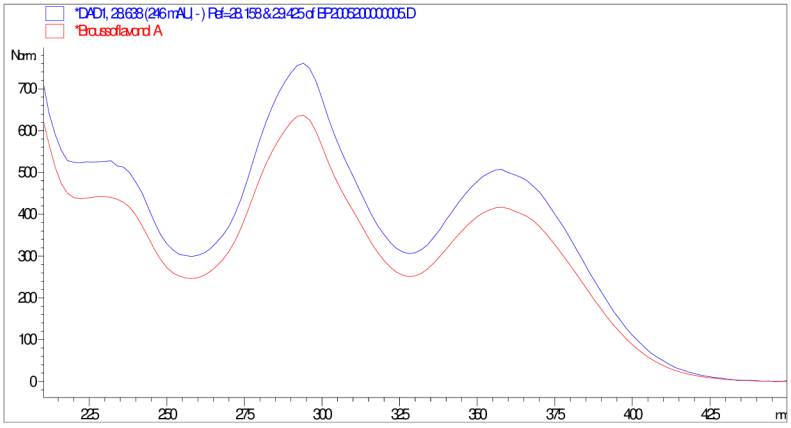
Obr. 23: Struktura kazinolu E

Identifikace látky BP/$CHCl_3$/23–24/5/E

Látka E s retenčním časem 28,592 min byla izolována s čistotou 86,9 %. Absorpční maxima látky jsou $UVmax_1$ = 230 nm, $UVmax_2$ = 294 nm, $UVmax_3$ = 357 nm. Získané UV spektrum má na rozdíl od předchozích látek výrazný absorpční pás v oblasti pásma I, který poskytuje informace o typu flavonoidu a oxidačním stupni. Flavony typicky absorbují v oblasti 304–350 nm, flavonoly v oblasti 352–385 nm. Pokud je hydroxylová skupina flavonolu na C–3 substituována (methylace nebo glykosylace), dochází k posunu pásma I do oblasti 328–357 nm a takové spektrum pak může připomínat spektrum flavonů. Opačným směrem pak absorpční maxima posouvá zvyšující se množství hydroxylových skupin na kruhu B [79]. Při porovnání spektra s knihovnou byla nalezena shoda s broussoflavonolem A dosahující 99,9 %. Retenční čas broussoflavonolu A byl podobný, a to 29,210 min. Na základě této shody bylo předpokládáno, že látka E je broussoflavonol A.



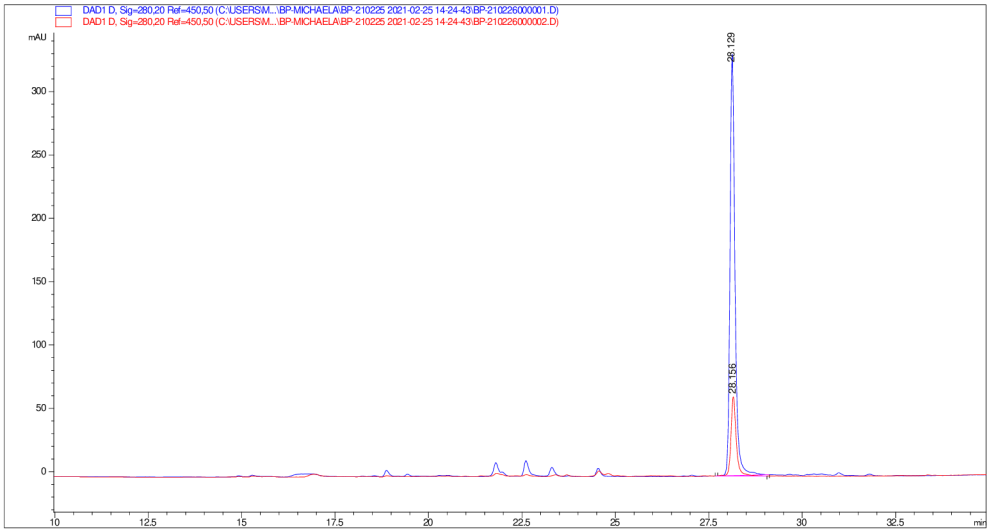
Obr. 24: Chromatogram látky BP/23–24/5/E při 280 nm a UV spektrum



Obr. 25: UV spektrum látky BP/23–24/5/E a broussoflavonolu A

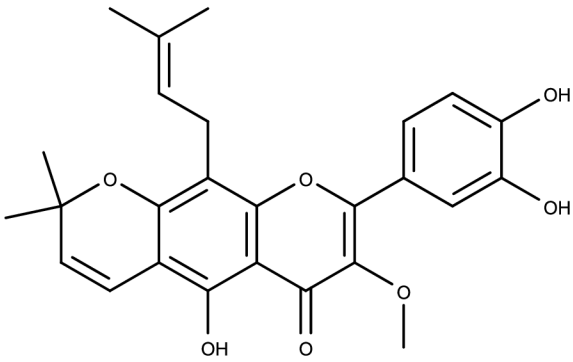
Pro ověření byl proveden společný nástřik látky BP/23–24/5/E a broussoflavonolu A dříve izolovaného z *B. papyrifera* [21]. Výsledkem společného nástřiku byl HPLC chromatogram s jedním píkem s retenčním časem 27,984 min, což potvrdilo hypotézu, že se jedná o stejné látky a látka BP/23–24/5/E byla označena za broussoflavonol A. Chromatogram látky BP/23–24/5/E a broussoflavonolu A v překryvu je záměrně přiblížen na oblast od 10. do 35. minuty a potvrzuje shodu v retenčních časech obou látek. Rozdílná intenzita píku je způsobena jinou koncentrací vzorku použitého pro HPLC analýzu, kdy vzorek látky BP/23–24/5/E byl připraven v koncentraci 0,2 mg/ml a vzorek standardu broussoflavonolu A v koncentraci 1 mg/ml. Mírné odlišnosti v rámci retenčních časů různých vzorků broussoflavonolu A jsou pravděpodobně způsobeny

měřením s několikaměsíčním odstupem, který mohl způsobit rozdílný tlak během měření nebo použitím odlišných kolon se stejnými parametry.



Obr. 26: Chromatogram látky BP/23–24/5/E a broussoflavonolu A při 280 nm

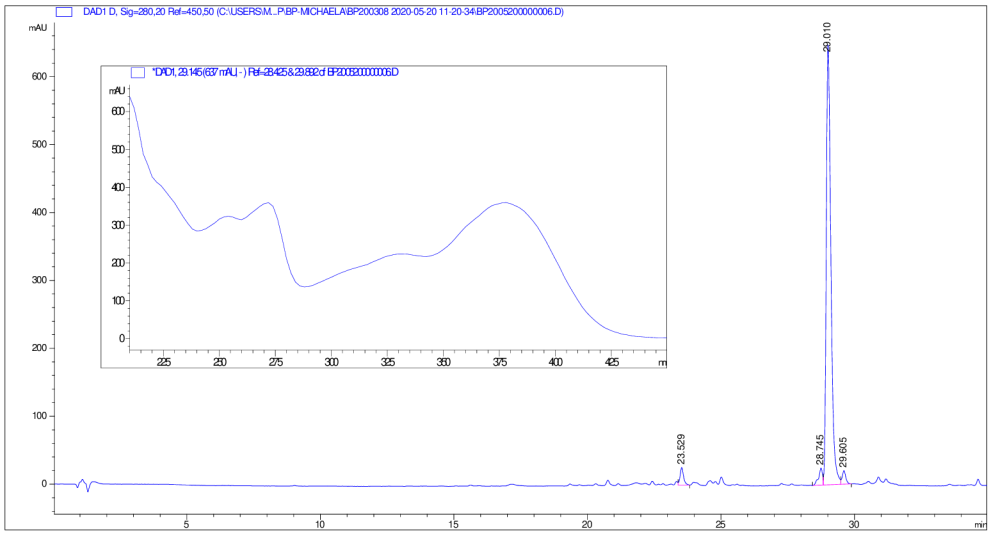
Červeně je vyznačen chromatogram látky BP/23–24/5/E, modře je vyznačen chromatogram broussoflavonolu A.



Obr. 27: Struktura broussoflavonolu A

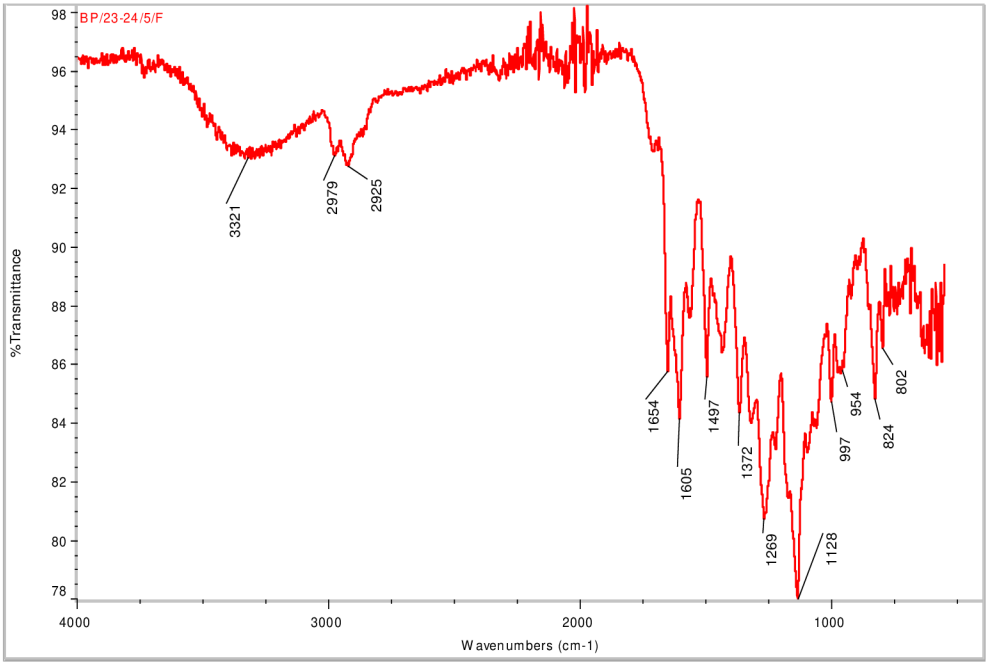
Identifikace látky BP/$CHCl_3$/23–24/5/F

Látka F s retenčním časem 29,010 min byla izolována s čistotou 92,0 %. Absorpční maxima látky odpovídala $UVmax_1$ = 255 nm, $UVmax_2$ = 273 nm, $UVmax_3$ = 331 nm a $UVmax_4$ = 378 nm. U flavonoidů s dvěma absorpčními pásy v oblasti mezi 250 a 275 nm bývají přítomny dvě hydroxylové skupiny na kruhu B [79]. Výrazný pás s maximem při 378 nm značí, že se může jednat o látku ze skupiny flavonolů, které obecně absorbují ve vyšších vlnových délkách než flavony [79]. Při porovnání UV spektra s knihovnou byla nalezena 88,9% shoda s 5,7,3',4'–tetrahydroxy–3–methoxy–8,5'–diprenylflavonem.



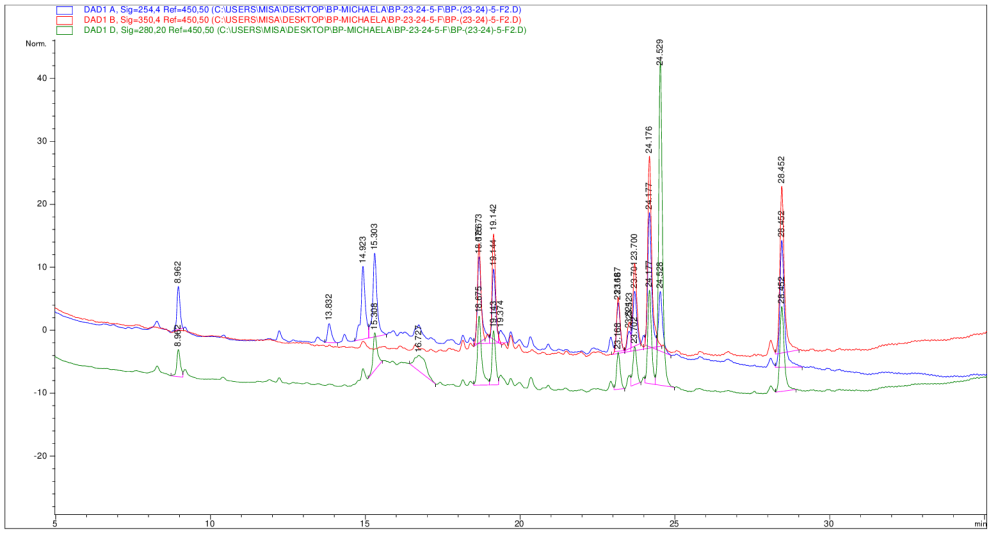
Obr. 28: Chromatogram látky BP/23–24/5/F při 280 nm a UV spektrum

Pro další identifikaci bylo pořízeno IČ spektrum látky F. V oblasti charakteristických vibrací je opět vidět pás odpovídající valenční vibraci O-H skupiny s vlnočtem 3321 cm^{-1} a pásy odpovídající skupinám $-CH_2-$ a $-CH_3$ s vlnočty nad 2900 cm^{-1}. O přítomnosti karbonylové skupiny C=O může svědčit pás s vlnočtem 1654 cm^{-1}. Ačkoliv je opět patrná absence výrazného absorpčního pásu v oblasti kolem 1700 cm^{-1}, která běžně odpovídá přítomnosti karbonylové skupiny C=O ve struktuře látky, pás s vlnočtem 1654 cm^{-1} by mohl značit přítomnost karbonylu konjugovaného s dvojnou vazbou, která posouvá vlnočty karbonylových skupin k nižším hodnotám [82]. Přítomnost aromatického jádra pak naznačují pásy 1605 cm^{-1} a 1497 cm^{-1}. Intenzivní pás s vlnočtem 1128 cm^{-1} by mohl značit přítomnost etherové vazby C-O-C nebo fenolické vazby C-O [82].



Obr. 29: IČ spektrum látky BP/23–24/5/F

Látku F se nepodařilo metodou IČ spektroskopie identifikovat a byla proto podrobena NMR analýze. Na základě výsledků bylo ovšem zjištěno, že došlo k rozpadu na několik fragmentů a finální identifikace látky tak nebyla možná. Rozpad byl následně potvrzen i pomocí HPLC analýzy. Na získaném chromatogramu je namísto jednoho majoritního píku s retenčním časem okolo 29. minuty a intenzivní odezvou (Obr. 28) vidět velké množství píků s velmi nízkou odezvou, které neodpovídají svými retenčními časy předtím izolované látce F. Chromatogram druhého měření látky F (Obr. 30) je záměrně uveden v rozmezí od 5. do 35. minuty. Izolace látky z rostliny za šetrnějších podmínek, které by mohly zabránit rozpadu látky, bude na ÚPL dále předmětem zájmu.



Obr. 30: Chromatogram látky BP/23–24/5/F po rozpadu při 254, 280 a 350 nm

4 Závěr

První část práce představuje stručný popis rostliny z hlediska botanické charakteristiky, historie a využití v oblasti tradičního lidového léčitelství a výroby papíru. Důraz je pak v této části kladen zejména na obsahové látky, které jsou tématem práce, konkrétně tedy na prenylované flavonoidy a jejich biosyntézu. V přehledu těchto látek byla popsána jejich struktura a biologická aktivita a je zřejmé, že rostlina je bohatým zdrojem biologicky aktivních a potenciálně dále využitelných látek. Právem je tedy stále hojně využívána jako prostředek tradiční čínské medicíny stejně jako je i nadále předmětem nových vědeckých prací.

V druhé části práce je popsán postup zpracování vybrané frakce BP/$CHCl_3$/23–24 sloupcovou chromatografií a následná izolace látek z dílčí frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5 pomocí semipreparativní HPLC. Látky byly po izolaci identifikovány metodami UV a IČ spektroskopie a NMR. Izolace látek byla zaměřena na látky s retenčními časy nad 25 minut a podařilo se tak izolovat sloučeniny s prenylovými substituenty.

Z frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5 bylo izolováno šest dílčích frakcí A–F. Po vyhodnocení UV spekter získaných z HPLC bylo zjištěno, že frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5/A a BP/$CHCl_3$/23–24/5/B obsahují směs stejných látek a tyto frakce byly spojeny za účelem další separace. Pomocí semipreparativní HPLC byly ze směsi obou frakcí separovány tři dílčí frakce s očekáváním izolace jednotlivých látek, avšak výsledná UV spektra ukazují přítomnost několika segmentů, které mají odlišné retenční časy a UV spektra než látky přítomné ve směsi před separací, je proto předpokládáno, že došlo k rozpadu látek a tyto segmenty nebylo možné dále identifikovat.

Látka BP/$CHCl_3$/23–24/5/C byla izolována s výtěžkem 244,7 mg a identifikována jako kazinol J. Diprenylovaný 1,3–difenylpropan kazinol J byl poprvé izolován v roce 1985 z kůry druhu *Broussonetia kazinoki* Sieb. [83]. Bylo zjištěno, že je schopen účinně inhibovat transkripční aktivitu faktoru NF–κB indukovanou prozánětlivě působícím cytokinem TNF–α v adipocytech prostřednictvím aktivace AMP–aktivované proteinové kinázy. Tímto mechanismem je schopen snižovat chronický zánět v adipocytech, což má za následek snížení inzulinové rezistence a takové účinky jsou potenciálně využitelné v léčbě diabetes mellitus 2. typu a metabolického syndromu [30]. Kromě toho vykazoval také pozitivní účinky při inhibici koronavirových proteáz, zejména při inhibici papain–like

proteázy (PL^{pro}) [29]. Inhibice koronavirových proteáz zkoumaná u viru SARS sloučeninami izolovanými z *B. papyrifera* vedla k testování interakcí těchto látek s virem SARS CoV-2. Prozatím byla zkoumána stabilita komplexů látek s hlavní virovou proteázou pomocí *in silico* molekulového dokování [70] a pozitivní výsledky kazinolu J naznačují, že se jedná o látku, jež má potenciál být na účinky proti viru SARS CoV-2 dále testována.

Frakce BP/$CHCl_3$/23–24/5/D byla identifikována jako směs kazinolu C a kazinolu E. Výtěžek směsi činil 37,6 mg. Obě látky byly poprvé izolovány současně z kůry kořene *B. kazinoki* Sieb. [84] a v obou případech se jedná o triprenylované sloučeniny s analogickými substituenty lišící se typem flavonoidního skeletu, kdy v případě kazinolu C se jedná o 1,3–difenylpropan, zatímco kazinol E je flavan. U kazinolu C i kazinolu E byly prokázány antioxidační účinky. Vysoká účinnost těchto látek je připisována právě třem prenylovým řetězcům [54]. Kromě vysoké antioxidační kapacity byla u kazinolu E popsána také schopnost inhibovat nereceptorovou tyrosin kinázu Fyn odpovědnou za signalizaci buněčného cyklu, růst a proliferaci buňky, značně ovlivňovanou ROS a oxidativním stresem. Tyto faktory vedoucí k mitochondriální dysfunkci jsou působením kazinolu E eliminovány a výsledkem je významný cytoprotektivní účinek [54]. U obou látek byly potvrzeny i další pozitivní účinky, kazinol C vykazoval protektivní účinky u zánětlivými cytokiny indukovaného poškození β–buněk pankreatu inhibicí transkripčního faktoru NF–κB [85], cytotoxické účinky aktivací AMP–aktivované proteinové kinázy vedoucí k apoptóze nádorových buněk tlustého střeva [86], kazinol E jako inhibitor ERK (extracellular signal–regulated kinase) vykazoval cytotoxické účinky na prsní kmenové nádorové buňky [53] a byla popsána jeho schopnost inhibovat enzym α–glukosidázu [40].

Látka BP/$CHCl_3$/23–24/5/E byla izolována s výtěžkem 1,9 mg a identifikována jako broussoflavonol A, což je diprenylovaný flavonol, který byl poprvé popsán v roce 1985 [60] a od té doby nebyl izolován z žádného jiného rostlinného druhu a informace o biologické aktivitě jsou značně omezené. Jedním z možných důvodů pro výše uvedené může být fakt, že byl izolován z kůry, zatímco předmětem většiny vědeckých prací popisujících aktivitu izolovaných látek je kořen, případně plod. Ojedinělá práce popisující izolaci a aktivitu broussoflavonolu A [31] pracuje, stejně jako tato diplomová práce, s rostlinným materiálem ve formě nasekaných dřevních částí. Broussoflavonol A vykazoval protizánětlivé účinky inhibicí prozánětlivých transkripčních faktorů NF–κB a AP–1 a

prozánětlivých cytokinů IL–1β a TNF–α srovnatelné s prednisonem a byla u něj pozorována signifikantní antioxidační aktivita [31].

Látka BP/$CHCl_3$/23–24/5/F s výtěžkem 13,2 mg nebyla identifikována z důvodu rozpadu na několik fragmentů. Na prvním chromatogramu látky F, získaném po separaci a s několikaměsíčním odstupem od NMR a druhé HPLC analýzy, kdy byl rozpad látky popsán, je jeden majoritní pík látky s konzistentním UV spektrem v rámci celého píku, což značilo, že se jedná o čistou látku. K rozpadu tedy pravděpodobně došlo při skladování v podmínkách, které pro tuto látku nebyly optimální.

Z výše uvedeného je patrné, že látky, které se podařilo izolovat, jsou biologicky aktivní a mají tak potenciál být dále zkoumány. Nacházíme u nich účinky typické pro flavonoidy (protizánětlivé, antioxidační, protinádorové), ale i relativně bezprecedentní účinky antidiabetické. Vzhledem k relativně omezenému množství možností podpůrné terapie diabetu přípravky charakteru doplňků stravy či čajových směsí, by po důkladném dalším výzkumu na toto téma mohla *B. papyrifera* kromě jiného najít využití i v této oblasti. Ačkoliv nejsou prenylované flavonoidy v přírodě běžné, *B. papyrifera* jako nenáročný, odolný a rychle se množící druh by v budoucnu mohla poskytovat dostatek materiálu pro izolaci látek, u kterých by bylo zjištěno potenciální praktické využití. Látky, které se podařilo izolovat mohou být také spojeny s látkami izolovanými v rámci předchozích prací, čímž bude umožněno další testování biologické aktivity na Farmaceutické fakultě. Zejména broussoflavonol A, o jehož bioaktivitě je prozatím známo jen málo, je vhodným kandidátem pro další výzkum. Přínosná by také mohla být opětovná izolace látky BP/$CHCl_3$/23–24/5/F za šetrnějších podmínek, kdy z důvodu nízké stability, a tedy obtížné izolovatelnosti, se můžeme domnívat, že by se mohlo jednat o látku, která doposud nebyla popsána nebo byla popsána pouze okrajově.

Použité zdroje

[1] Kew Science: *Broussonetia papiryfera* (L.) L'Hér. ex Vent. *Plants of the World Online* [online]. [cit. 2020-11-21]. Dostupné z: http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:850861-1

[2] WANG, Guo-Wei, Bao-Kang HUANG a Lu-Ping QIN. The genus *Broussonetia*: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Phytotherapy Research*. Wiley Online Library, 2012, **26**(1), 1-10. ISSN 0951-418X.

[3] ŠMEJKAL, Karel. Cytotoxic potential of *C*-prenylated flavonoids. *Phytochemistry Reviews*. Springer, 2014, **13**(1), 245-275. ISSN 1568-7767.

[4] CHASE, Mark W, MJM CHRISTENHUSZ, MF FAY, et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society.* Oxford University Press, 2016, **181**(1), 1-20. ISSN 0024-4074.

[5] *Broussonetia papiryfera* (L.) L'Hér. ex Vent. *World Flora Online* [online]. [cit. 2020-10-12]. Dostupné z: http://www.worldflora-online.org/taxon/wfo-0000572577

[6] BARKER, Christine. Plate 432. *Broussonetia papyrifera*. *Curtis's Botanical Magazine*. Wiley Online Library, 2002, **19**(1), 8-18. ISSN 1355-4905.

[7] *Broussonetia papyrifera*. *Missouri Botanical Garden* [online]. [cit. 2020-10-20]. Dostupné z: http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=e434

[8] *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. *India Biodiversity Portal* [online]. [cit. 2020-10-26]. Dostupné z: https://indiabiodiversity.org/species/show/228947

[9] *Broussonetia papyrifera* (Linnaeus) L'Héritier ex Ventenat. *Flora of China* [online]. [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200006341

[10] WU, Zhengyi, Zhou ZHE-KUN a Michael G. GILBERT. Moraceae. *Flora of China* [online]. [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10583

[11] Květ (flos; flower; Blüte; řecky anthos). *Katedra botaniky: Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita* [online]. [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: https://botanika.prf.jcu.cz/morfologie/MorfologieKvet.htm

[12] Plod (fructus; fruit; Frucht). *Katedra botaniky: Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita* [online]. [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: https://botanika.prf.jcu.cz/morfologie/MorfologiePlod.htm

[13] *Broussonetia* L'Héritier ex Ventenat. *Flora of China* [online]. [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=104684

[14] CSURHES, Steve. Invasive plant risk assessment: Paper mullbery, *Broussonetia papyrifera. Business Queensland* [online]. 2016 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: https://www.daf.qld.gov.au/__data/assets/pdf_file/0011/67898/IPA-Paper-Mulberry-Risk-Assessment.pdf

[15] ELEVITCH, Craig R, ed. *Traditional trees of Pacific Islands: their culture, environment, and use*. Permanent Agriculture Resources, 2006. ISBN 0970254458.

[16] Sarong. *Wikipedie: Otevřená encyklopedie* [online]. 2019 [cit. 2020-11-22]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Sarong

[17] Pharmacopoeia of the PPRC Plant List. *Southern Cross University* [online]. [cit. 2020-12-23]. Dostupné z: https://www.scu.edu.au/southern-cross-plant-science/facilities/herbal-authentication/pharmacopoeial-monographs/pharmacopoeia-of-the-pprc-plant-list/#B

[18] SUN, Jie, Shao-fang LIU, Chu-shu ZHANG, Li-na YU, Jie BI, Feng ZHU a Qing-li YANG. Chemical composition and antioxidant activities of *Broussonetia papyrifera* fruits. *Plos One.* Public Library of Science, 2012, **7**(2), e32021. ISSN 1932-6203.

[19] DWECK, Anthony C. A review of the Paper Mulberry (*Broussonetia papyrifera*)(L.) Hert. ex Vent. [online]. 2004 [cit. 2020-12-23].

Dostupné z: https://rarefruitblog.files.word-press.com/2016/06/papermulberry.pdf

[20] POSPÍŠILOVÁ, Tereza. *Izolace a identifikace obsahových látek z chloroformového podílu Broussonetia papyrifera II.* Brno, 2020. Diplomová práce. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta. Vedoucí práce PharmDr. Milan Malaník, Ph.D.

[21] MALANÍK, Milan. *Isolation and Structural Characterization of Bio-active Secondary Metabolites of Broussonetia papyrifera*. Brno, 2020. Disertační práce. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta. Vedoucí práce prof. PharmDr. Karel Šmejkal, Ph.D.

[22] DEWICK, Paul M. *Medicinal Natural Products*. John Wiley & Sons, Ltd, 2002. ISBN 0470846275.

[23] ŠMEJKAL, Karel, Renata KUBÍNOVÁ a Václav SUCHÝ. *Farmakognozie obecná část.* Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2016. ISBN 978-80-7305-785-5.

[24] PANCHE, Archana N, Arvind D DIWAN a SR CHANDRA. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. Cambridge University Press, 2016, **5**. ISSN 2048-6790.

[25] CHEN, Xi, Emmanuel MUKWAYA, Man-Sau WONG a Yan ZHANG. A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. *Pharmaceutical Biology*. Taylor & Francis, 2014, **52**(5), 655-660. ISSN 1388-0209.

[26] TAKASUGI, Mitsuo, Masaki ANETAI, Tadashi MASAMUNE, Akira SHIRATA a Kokichi TAKAHASHI. Broussonins A and B, new phytoalexins from diseased paper mulberry. *Chemistry Letters*. The Chemical Society of Japan, 1980, **9**(3), 339-340. ISSN 1348-0715.

[27] LEE, Dongho a A Douglas KINGHORN. Bioactive compounds from the genus *Broussonetia*. *Studies in Natural Products Chemistry.* 28. Elsevier, 2003, s. 3-33. ISSN 1572-5995.

[28] TAKASUGI, Mitsuo, Nobuyuki NIINO, Shigemitsu NAGAO, Masaki ANETAI, Tadashi MASAMUNE, Akira SHIRATA a Kokichi TAKAHASHI. Eight minor phytoalexins from diseased paper mulberry. *Chemistry Letters.* The Chemical Society of Japan, 1984, **13**(5), 689-692. ISSN 1348-0715.

[29] PARK, Ji-Young, Heung Joo YUK, Hyung Won RYU, Su Hwan LIM, Kyung Su KIM, Ki Hun PARK, Young Bae RYU a Woo Song LEE. Evaluation of polyphenols from *Broussonetia papyrifera* as coronavirus protease inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. Taylor & Francis, 2017, **32**(1), 504-512. ISSN 1475-6366.

[30] LEE, Jae Min, Sun Sil CHOI, Mi Hyeon PARK, et al. *Broussonetia papyrifera* root bark extract exhibits anti-inflammatory effects on adipose tissue and improves insulin sensitivity potentially via AMPK activation. *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020, **12**(3), 773.

[31] MALANÍK, Milan, Jakub TREML, Veronika LELÁKOVÁ, Daniela NYKODÝMOVÁ, Michal ORAVEC, Jaromír MAREK a Karel ŠMEJKAL. Anti-inflammatory and antioxidant properties of chemical constituents of *Broussonetia papyrifera*. *Bioorganic Chemistry*. Elsevier, 2020, **104**, 104298. ISSN 0045-2068.

[32] RYU, Hyung Won, Mi Hyeon PARK, Ok-Kyoung KWON, et al. Anti-inflammatory flavonoids from root bark of *Broussonetia papyrifera* in LPS-stimulated RAW264. 7 cells. *Bioorganic Chemistry.* Elsevier, 2019, **92**, 103233. ISSN 0045-2068.

[33] YANG, Chunyan, Fu LI, Baowen DU, Bin CHEN, Fei WANG a Mingkui WANG. Isolation and characterization of new phenolic compounds with estrogen biosynthesis-inhibiting and antioxidation activities from *Broussonetia papyrifera* leaves. *Plos One*. Public Library of Science, 2014, **9**(4), e94198. ISSN 1932-6203.

[34] Chalcones: an overview. ScienceDirect Topics. *ScienceDirect* [online]. [cit. 2021-03-03]. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/chalcones

[35] WANG, Jih-Pyang, Lo-Ti TSAO, Shue-Ling RAUNG a Chun-Nan LIN. Investigation of the inhibitory effect of broussochalcone A on respiratory burst in neutrophils. *European Journal of Pharmacology.* Elsevier, 1997, **320**(2-3), 201-208. ISSN 0014-2999.

[36] LIN, Chun-Nan, Chai-Ming LU, Hsien-Cheng LIN, et al. Novel antiplatelet constituents from Formosan Moraceous plants. *Journal of Natural Products.* ACS Publications, 1996, **59**(9), 834-838. ISSN 0163-3864.

[37] CHENG, Zhi-Jiao, Chun-Nan LIN, Tsong-Long HWANG a Che-Ming TENG. Broussochalcone A, a potent antioxidant and effective suppressor of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochemical Pharmacology.* Elsevier, 2001, **61**(8), 939-946. ISSN 0006-2952.

[38] PARK, See-Hyoung, Jongsung LEE, Jong Cheol SHON, Nguyen Minh PHUC, Jun Goo JEE a Kwang-Hyeon LIU. The inhibitory potential of Broussochalcone A for the human cytochrome P450 2J2 isoform and its anti-cancer effects via FOXO3 activation. *Phytomedicine*. Elsevier, 2018, **42**, 199-206. ISSN 0944-7113.

[39] SHIN, Sora, Younglim SON, Kwang-Hyeon LIU, Wonku KANG a Sangtaek OH. Cytotoxic activity of broussochalcone A against colon and liver cancer cells by promoting destruction complex-independent β-catenin degradation. *Food and Chemical Toxicology.* Elsevier, 2019, **131**, 110550. ISSN 0278-6915.

[40] RYU, Hyung Won, Byong Won LEE, Marcus J CURTIS-LONG, Sunin JUNG, Young Bae RYU, Woo Song LEE a Ki Hun PARK. Polyphenols from *Broussonetia papyrifera* displaying potent α-glucosidase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* ACS Publications, 2010, **58**(1), 202-208. ISSN 0021-8561.

[41] KUETE, Victor a Louis P SANDJO. Isobavachalcone: an overview. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. Springer, 2012, **18**(7), 543-547. ISSN 1993-0402.

[42] ZHENG, Zong-Ping, Ka-Wing CHENG, Jianfei CHAO, Jiajun WU a Mingfu WANG. Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). *Food Chemistry*. Elsevier, 2008, **106**(2), 529-535. ISSN 0308-8146.

[43] LEE, Dongho, Krishna PL BHAT, Harry HS FONG, Norman R FARNSWORTH, John M PEZZUTO a A Douglas KINGHORN. Aromatase Inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *Journal of Natural Products.* ACS Publications, 2001, **64**(10), 1286-1293. ISSN 0163-3864.

[44] Flavanones: an overview. ScienceDirect Topics. *ScienceDirect* [online]. [cit. 2021-03-05]. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/flavanones

[45] GENG, Chang-An, Meng-Hong YAN, Xue-Mei ZHANG a Ji-Jun CHEN. Anti-oral microbial flavanes from *Broussonetia papyrifera*

under the guidance of bioassay. *Natural Products and Bioprospecting*. Springer, 2019, **9**(2), 139-144. ISSN 2192-2209.

[46] TIAN, Jin-Long, Tian-Lin LIU, Jing-Jing XUE, et al. Flavanoids derivatives from the root bark of *Broussonetia papyrifera* as a tyrosinase inhibitor. *Industrial Crops and Products.* Elsevier, 2019, **138**, 111445. ISSN 0926-6690.

[47] Flavans: an overview. ScienceDirect Topics. *ScienceDirect* [online]. [cit. 2021-01-29]. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/flavans

[48] LEE, Hyejin, Hua LI, Ji Hye JEONG, Minsoo NOH a Jae-Ha RYU. Kazinol B from *Broussonetia kazinoki* improves insulin sensitivity via Akt and AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. *Fitoterapia*. Elsevier, 2016, **112**, 90-96. ISSN 0367-326X.

[49] RYU, Jae-Ha, Hanna AHN a Hwa Jin LEE. Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kazinoki*. *Fitoterapia*. Elsevier, 2003, **74**(4), 350-354. ISSN 0367-326X.

[50] SONG-CHWAN, Fang, Shieh BOR-JINN a Lin CHUN-NAN. Phenolic constituents of Formosan *Broussonetia papyrifera*. *Phytochemistry*. Elsevier, 1994, **37**(3), 851-853. ISSN 0031-9422.

[51] KO, Horng-Huey, Sheu-Meei YU, Feng-Nien KO, Che-Ming TENG a Chun-Nan LIN. Bioactive constituents of *Morus australis* and *Broussonetia papyrifera. Journal of Natural Products*. ACS Publications, 1997, **60**(10), 1008-1011. ISSN 0163-3864.

[52] PARK, Soojong, Ahmad FUDHAILI, Sang-Seok OH, et al. Cytotoxic effects of kazinol A derived from *Broussonetia papyrifera* on human bladder cancer cells, T24 and T24R2. *Phytomedicine*. Elsevier, 2016, **23**(12), 1462-1468. ISSN 0944-7113.

[53] JUNG, Yu-Chae, Seula HAN, Li HUA, et al. Kazinol-E is a specific inhibitor of ERK that suppresses the enrichment of a breast cancer stem-like cell population. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier, 2016, **470**(2), 294-299. ISSN 0006-291X.

[54] KIM, A Young, Chan Gyu LEE, Hua LI, Raok JEON, Jae-Ha RYU a Sang Geon KIM. Enhanced antioxidant effect of prenylated

polyphenols as Fyn inhibitor. *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 2012, **53**(5), 1198-1208. ISSN 0891-5849.

[55] WENG, Jing-Ru, I-Lu LAI, Hsiao-Ching YANG, Chun-Nan LIN a Li-Yuan BAI. Identification of kazinol Q, a natural product from Formosan plants, as an inhibitor of DNA methyltransferase. *Phytotherapy Research*. Wiley Online Library, 2014, **28**(1), 49-54. ISSN 0951-418X.

[56] SOHN, Ho-Yong, Kun-Ho SON, Chong-Suk KWON, Gi-Seok KWON a Sam Sick KANG. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussnetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine.* Elsevier, 2004, **11**(7-8), 666-672. ISSN 0944-7113.

[57] VERMA, Alok K a Ram PRATAP. Chemistry of biologically important flavones. *Tetrahedron*. Elsevier, 2012, **68**(41), 8523-8538. ISSN 0040-4020.

[58] XIAO-KU, Ran, Wang XIAO-TONG, Liu PEI-PEI, Chi YU-XIN, Wang BO-JIA, Dou DE-QIANG, Kang TING-GUO a Wei XIONG. Cytotoxic constituents from the leaves of *Broussonetia papyrifera*. *Chinese Journal of Natural Medicines.* Elsevier, 2013, **11**(3), 269-273. ISSN 1875-5364.

[59] Flavonols: an overview. ScienceDirect Topics. *ScienceDirect* [online]. [cit. 2021-02-09]. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/flavonols

[60] MATSUMOTO, Junko, Tomoko FUJIMOTO, Chie TAKINO, Masahito SAITOH, Yoshio HANO, Toshio FUKAI a Taro NOMURA. Components of *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. I. Structures of two new isoprenylated flavonols and two chalcone derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. The Pharmaceutical Society of Japan, 1985, **33**(8), 3250-3256. ISSN 0009-2363.

[61] GUO, MingXi, MoLin WANG, Hao DENG, XinTian ZHANG a Zhao-Yi WANG. A novel anticancer agent Broussoflavonol B downregulates estrogen receptor (ER)-α36 expression and inhibits growth of ER-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 2013, **714**(1-3), 56-64. ISSN 0014-2999.

[62] JEONG, Ji Hye a Jae-Ha RYU. Broussoflavonol B from *Broussonetia kazinoki* Siebold exerts anti-pancreatic cancer activity through downregulating FoxM1. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020, **25**(10), 2328.

[63] FUKAI, Toshio a Taro NOMURA. Revised structures of broussoflavonols C and D, and the structure of broussolflavonol E. *Heterocycles (Sendai)*. 1989, **29**(12), 2379-2390. ISSN 0385-5414.

[64] FANG, Song-Chwan, Bor-Jinn SHIEH, Ru-Rong WU a Chun-Nan LIN. Isoprenylated flavonols of formosan *Broussonetia papyrifera*. *Phytochemistry*. Elsevier, 1995, **38**(2), 535-537. ISSN 0031-9422.

[65] LIN, Chun-Nan, Pao-Hui CHIU, Song-Chwan FANG, Bor-Jinn SHIEH a Ru-Rong WU. Revised structure of broussoflavonol G and the 2D NMR spectra of some related prenylflavonoids. *Phytochemistry*. Elsevier, 1996, **41**(4), 1215-1217. ISSN 0031-9422.

[66] SON, Kun-Ho, SJ KWON, Hyeun Wook CHANG, Hyun Pyo KIM a Sam Sik KANG. Papyriflavonol A, a new prenylated flavonol from *Broussonetia papyrifera*. *Fitoterapia*. Elsevier, 2001, **72**(4), 456-458. ISSN 0367-326X.

[67] CHI, Yeon Sook, Hyon Gun JONG, Kun Ho SON, Hyeun Wook CHANG, Sam Sik KANG a Hyun Pyo KIM. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology*. Elsevier, 2001, **62**(9), 1185-1191. ISSN 0006-2952.

[68] KWAK, Wie Jong, Tae Churl MOON, Chang Xiu LIN, et al. Papyriflavonol A from *Broussonetia papyrifera* inhibits the passive cutaneous anaphylaxis reaction and has a secretory phospholipase A2-inhibitory activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. The Pharmaceutical Society of Japan, 2003, **26**(3), 299-302. ISSN 0918-6158.

[69] SOHN, Ho-Yong, Chong-Suk KWON a Kun-Ho SON. Fungicidal effect of prenylated flavonol, papyriflavonol A, isolated from *Broussonetia papyrifera* (L.) vent. against *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. The Korean Society for Microbiology and Biotechnology, 2010, **20**(10), 1397-1402. ISSN 1017-7825.

[70] GHOSH, Rajesh, Ayon CHAKRABORTY, Ashis BISWAS a Snehasis CHOWDHURI. Identification of polyphenols from *Broussonetia papyrifera* as SARS CoV-2 main protease inhibitors using in silico docking and molecular dynamics simulation approaches. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* Taylor & Francis, 2020, 1-14. ISSN 0739-1102.

[71] PARK, Mi Hyeon, Sunin JUNG, Heung Joo YUK, et al. Rapid identification of isoprenylated flavonoids constituents with inhibitory activity on bacterial neuraminidase from root barks of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier, 2021. ISSN 0141-8130.

[72] CHEN, Rong Min, Li Hong HU, Tian Ying AN, Jia LI a Qiang SHEN. Natural PTP1B inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier, 2002, **12**(23), 3387-3390. ISSN 0960-894X.

[73] RYU, Hyung Won, Marcus J CURTIS-LONG, Sunin JUNG, Il Yun JEONG, Dong Sub KIM, Kyu Young KANG a Ki Hun PARK. Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and their kinetic studies. *Food Chemistry*. Elsevier, 2012, **132**(3), 1244-1250. ISSN 0308-8146.

[74] GUO, Fujiang, Li FENG, Cheng HUANG, Hongxia DING, Xintian ZHANG, Zhaoyi WANG a Yiming LI. Prenylflavone derivatives from *Broussonetia papyrifera*, inhibit the growth of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Phytochemistry Letters*. Elsevier, 2013, **6**(3), 331-336. ISSN 1874-3900.

[75] FUKAI, Toshio, Ai MARUMO, Kiyoshi KAITOU, Toshihisa KANDA, Sumio TERADA a Taro NOMURA. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*. Elsevier, 2002, **73**(6), 536-539. ISSN 0367-326X.

[76] JANG, Dae Sik, Muriel CUENDET, Michael E HAWTHORNE, et al. Prenylated flavonoids of the leaves of *Macaranga conifera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *Phytochemistry*. Elsevier, 2002, **61**(7), 867-872. ISSN 0031-9422.

[77] PAULÍKOVÁ, Monika. *Separácia obsahových látok Broussonetia papyrifera.* Brno, 2019. Diplomová práce. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta. Vedoucí práce prof. PharmDr. Karel Šmejkal, Ph.D.

[78] ŠMEJKAL, Karel, Jan MUSELÍK a Petr MOKRÝ. *Laboratorní metody experimentální fytochemie*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2013. ISBN 978-80-7305-649-0.

[79] MABRY, Tom, Kenneth R MARKHAM a Michael Barrie THOMAS. *The systematic identification of flavonoids*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1970. ISBN 978-3-642-88458-0.

[80] FENG, Weisheng, Zhiyou HAO a Meng LI, JUSTINO, Goncalo C, ed. Isolation and structure identification of flavonoids. *Flavonoids, from biosynthesis to human health*. IntechOpen, 2017, s. 17-43. ISBN 978-953-51-3424-4.

[81] TSIMOGIANNIS, Dimitrios, Martina SAMIOTAKI, George PANAYOTOU a Vassiliki OREOPOULOU. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules.* Molecular Diversity Preservation International, 2007, **12**(3), 593-606.

[82] COATES, John. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encyclopedia of analytical chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, 2006.

[83] KATO, Susumo, Toshio FUKAI, Junko IKUTA a Taro NOMURA. Components of *Broussonetia kazinoki* SIEB.(2).: Structures of Four New Isoprenylated 1, 3-Diphenylpropane Derivatives, Kazinols J, L, M, and N. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* The Pharmaceutical Society of Japan, 1986, **34**(6), 2448-2455. ISSN 0009-2363.

[84] IKUTA, Junko, Yoshio HANO, Taro NOMURA, Yoshiyuki KAWAKAMI a Tadashi SATO. Components of *Broussonetia kazinoki* SIEB. I.: structures of two new isoprenylated flavans and five new isoprenylated 1, 3-diphenylpropane derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. The Pharmaceutical Society of Japan, 1986, **34**(5), 1968-1979. ISSN 0009-2363.

[85] BAE, Ui-Jin, Hyun-Young JANG, Jung Min LIM, Li HUA, Jae-Ha RYU a Byung-Hyun PARK. Polyphenols isolated from *Broussonetia kazinoki* prevent cytokine-induced β-cell damage and the development of type 1 diabetes. *Experimental & Molecular Medicine.* Nature Publishing Group, 2015, **47**(4). ISSN 2092-6413.

[86] KIM, Hak-Su, Jihyun LIM, Da Yeon LEE, Jae-Ha RYU a Jong-Seok LIM. Kazinol C from *Broussonetia kazinoki* activates AMP-

activated protein kinase to induce antitumorigenic effects in HT-29 colon cancer cells. *Oncology Reports*. Spandidos Publications, 2015, **33**(1), 223-229. ISSN 1021-335X.