

Vliv podmínek extrakce na množství látek extrahovaných z námele

Bc. Věra Stočková

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Věra STOČKOVÁ**
Osobní číslo: **T10529**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vliv podmínek extrakce na množství látek
extrahovaných z námele**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika námelových alkaloidů
2. Biologie námele a hostitelské rostliny
3. Farmakologie námelových alkaloidů a využití v lékařství
4. Toxikologické účinky
5. Princip HPLC

II. Praktická část

1. Materiál a metody
2. Výsledky a diskuse
3. Závěr

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. SCHULZOVÁ V., J. HAJŠLOVÁ. Toxické alkaloidy v potravním řetězci člověka. Praha, VŠCHT, 2007.
2. TUDZYNSKI P., T. CORREIA, U. KELLER. Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. Applied Microbiology and Biotechnology. 2001, 57, s. 593–605. ISSN 0175–7598.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Iva Burešová, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

6. ledna 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

21. května 2012

Ve Zlíně dne 15. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 2.5.2012

Hořčíková
.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

(3) *Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

³⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

(1) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá vlivem podmínek extrakce na množství látek extrahovaných z námele. Cílem práce bylo zjistit, pomocí kterého z vybraných rozpouštědel lze dosáhnout nejvyšší výtěžnosti námelových alkaloidů.

Teoretická část je věnována charakteristice námelových alkaloidů, je popsána jejich chemická struktura, toxikologické a farmakologické vlastnosti. Zabývá se také biologií námele a popisem hostitelských rostlin. Dále je podrobně popsán princip metody UPLC (ultra-kapalinové chromatografie).

Pro experimentální část bylo vybráno 5 různých extrakčních činidel. Jako kontrolní vzorek bylo vybráno rozpouštědlo používané v praxi aceton:26% amoniak:voda. Bylo ověřeno, že rozpouštědlo má vysokou výtěžnost námelových alkaloidů ze vzorku, z vybraných rozpouštědel bylo v tomto směru nejlepší. Pro srovnání byly uvedeny výsledky získané analýzou vzorku připraveného zjednodušeným postupem, vzniklým zjednodušením stávající metody. Výtěžnost alkaloidů v tomto případě byla oproti předpokladu vyšší než u rozpouštědla používaného v praxi. Jelikož tento fakt může do praxe přinést zvýšení efektivity při analýzách vzorků námele, bylo by vhodné metodiku zavést do praxe.

Klíčová slova: námel, námelové alkaloidy, žito, ergotismus, účinek námelových alkaloidů, ultra-kapalinová chromatografie (UPLC), extrakce

ABSTRACT

The diploma thesis focuses on the effect of extraction conditions on the amount of substance extracted from the ergot. The aim of the thesis was to determine which of the chosen solvents gives highest yield of ergot alkaloids.

The theoretical part is dedicated to the characterization of ergot alkaloids, their chemical structure, toxicological and pharmacological properties are described. The biology of ergot and description of host plant is included too. Furthermore the principles of UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) are described.

Five solvents were chosen for the experimental part. The solvent acetone:26% ammonia:water, that is used in practice, was chosen to be the standard. The results confirmed that this solvent gives highest yield of ergot alkaloids.

The results obtained from the analysis of sample prepared by a simplified way of the standard method are also included. Against hypothesis the yield of alkaloids in this case was higher than with the standard solvent. Since this fact can bring a rise of efficiency of ergot analyses, it could be worthwhile to bring this method into practice.

Key words: ergot, ergot alkaloids, rye, ergotism, ergot alkaloid effect, ultra performance liquid chromatography (UPLC), extraction

Děkuji vedoucí mé diplomové práce Mgr. Ivě Burešové, Ph.D za velkou pomoc, odborné vedení, trpělivost, poskytnuté konzultace a za cenné rady k vyhodnocení výsledků této diplomové práce.

Dále mé poděkování patří panu Ing. Miroslavu Petrakovičovi a Ing. Jiřímu Holaňovi z firmy Teva Czech Industries, s.r.o. Opava za realizaci měření, poskytnutí materiálu, odbornou pomoc a zároveň děkuji této firmě za poskytnutý materiál.

Velké poděkování patří hlavně mému manželovi, dětem ale i celé rodině za velkou trpělivost a umožnění studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 CHARAKTERISTIKA NÁMELOVÝCH ALKALOIDŮ	13
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA NÁMELOVÝCH ALKALOIDŮ.....	14
1.2 KLAVINOVÉ ALKALOIDY	16
1.3 JEDNODUCHÉ DERIVÁTY KYSELINY LYSEGOVÉ	16
1.4 PEPTIDOVÉ NÁMELOVÉ ALKALOIDY (ERGOPEPTINY)	17
2 BIOLOGIE NÁMELE A HOSTITELSKÉ ROSTLINY	18
2.1 BIOLOGIE NÁMELE	18
2.2 VÝVOJOVÝ CYKLUS NÁMELE	18
2.3 HOSTITELSKÉ ROSTLINY.....	21
2.3.1 Obiloviny	21
2.3.2 Žito.....	21
2.3.3 Očkování žita námelem	22
3 FARMAKOLOGIE NÁMELOVÝCH ALKALOIDŮ A VYUŽITÍ V LÉKAŘSTVÍ	23
3.1 FARMAKOLOGIE.....	23
3.1.1 Farmakon-receptorové interakce	23
3.1.2 Účinky námelových alkaloidů na živý organismus.....	23
3.2 VYUŽITÍ V LÉKAŘSTVÍ.....	25
3.2.1 Terapeuticky významné kyseliny lysergové.....	25
3.2.1.1 Ergometrin, ergobasin	25
3.2.1.2 Methylergometrin.....	26
3.2.2 Terapeuticky významné peptidové alkaloidy	26
3.2.2.1 Ergotamin	26
3.2.2.2 Dihydroergotamin	26
3.2.2.3 Alkaloidy skupiny ergotoxinové	26
3.2.3 Halucinogenní námelové alkaloidy	27
3.3 TOXIKOLOGICKÉ ÚČINKY	27
4 PRINCIP KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE	29
4.1 POROVNÁNÍ HPLC A UPLC	29
4.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	29
4.3 VLIV TEPLoty NA RETENCI LÁTKY.....	31
4.4 VLIV pH MOBILNÍ FÁZE	31
4.5 CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY	31
4.6 DÁVKOVACÍ ZAŘÍZENÍ.....	32
4.7 TYPY DETEKTORŮ	32
4.7.1 UV/VIS detektory.....	32
4.7.2 Fluorescenční detektory.....	32
4.7.3 Refraktometrický detektor	32
4.7.4 Vodivostní detektor	32

4.8	PRINCIP ANALÝZY VZORKŮ NA KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII	33
II	PRAKTICKÁ ČÁST	34
	CÍL PRÁCE	35
5	MATERIÁL A METODY	36
5.1	VZORKY	36
5.2	EXTRAKČNÍ ČINIDLA	36
5.3	CHEMIKÁLIE	36
5.4	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	36
5.5	LABORATORNÍ POSTUPY	37
5.5.1	Příprava mobilní fáze.....	37
5.5.2	Příprava standardu	37
5.5.3	Příprava vzorků.....	37
5.5.4	Použitý přístroj a kolona	38
5.5.5	Výsledek analýzy.....	39
5.5.6	Statistické vyhodnocení výsledků	41
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	42
6.1	ROZPOUŠTĚDLO ACETON:AMONIAK:H ₂ O	42
6.2	ROZPOUŠTĚDLO ACETON.....	43
6.3	ROZPOUŠTĚDLO 90% METANOL	44
6.4	ROZPOUŠTĚDLO ETHER:ETANOL.....	45
6.5	ROZPOUŠTĚDLO TOLUEN:ETANOL	46
6.6	ROZPOUŠTĚDLO 90% METANOL_NEODPAŘENO	47
6.7	POROVNÁNÍ OBSAHŮ ERGOTAMINU A OSTATNÍCH NEČISTOT ZÍSKANÝCH JEDNOTLIVÝCH ČINIDEL	48
6.8	PŘEHLED VÝTĚŽNOSTI JEDNOTLIVÝCH ROZPOUŠTĚDEL.....	49
	ZÁVĚR.....	49
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	58
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	59
	SEZNAM TABULEK	60
	SEZNAM PŘÍLOH	61

ÚVOD

Obiloviny patří k nejstarším zdrojům potravy. Pro lidskou výživu je výhradně využíváno zrno. [1] Pro využití ve farmaceutickém průmyslu se obiloviny úmyslně očkují námelovou drogou, ze které se získává námel. Účinnými látkami námele jsou alkaloidy, které se využívají pro lékařské účely a jejich využití je významné.[4]

Námel je produkt houby Paličkovice nachové (*Claviceps purpurea*), parazitující na obilovinách zejména na žitu a na jiných druzích obilnin a divokých trav. Pro využití ve farmaceutickém průmyslu se nejlepší hostitelskou obilovinou ukázalo žito, protože je nejodolnější proti nepříznivým vlivům. Druhem námele, který se používá v lékařství je žitný námel (*Secale cornutum*). [2,3]

Doložené informace o námelu pocházejí z raného středověku, kdy docházelo k masovým otravám tisíců osob. Dlouhou dobu nebylo známo, že příčinou těchto onemocnění je námel, který se mlýnským zpracováním dostal do mouky. V té době totiž mouka obsahovala 6–10 % námele a dnes je známo, že k poškození lidského zdraví stačí již množství 0,2 %. Onemocnění se vyskytovalo ve dvojí formě konvulzivní a gangrenózní. [4]

První zmínka o léčebném použití námelu jako léku, který vyvolával porod je uveden v herbáři Adama Lonitzera. Jeho užívání v porodnictví je uváděno až do roku 1808, kdy oficiálně vstoupil do akademického lékařství. Lékařští odborníci od použití námele jako ekbolika rychle opustili, protože si uvědomovali velkého nebezpečí pro děti a u rodičky vyvolával poporodní krvácivost. Užívání námele v porodnictví bylo zastaveno.

Počátkem roku 1930 počala nová éra výzkumu námele a začaly výzkumy, které směřovaly k určení chemické struktury námelových alkaloidů. Účinnost těchto látek je vysoká a současně umožňuje nízké dávkování při velmi nízké toxicitě. [2,5]

V současnosti se účinné látky z námele extrahují po dobu dvou hodin v extrakčním činidle aceton:amoniak:voda, následně jsou odpařeny, ředěny 90% metanolem a analyzovány. Cílem diplomové práce bylo zjistit, jak významný vliv na extrakci účinné látky z námelové drogy má použité rozpouštědlo.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA NÁMELOVÝCH ALKALOIDŮ

Alkaloidy tvoří známou a významnou skupinu přírodních látek, které mají schopnost vytvářet s kyselinami ve vodě rozpustné soli. Jsou to heterocyklické dusíkaté báze, produkované zpravidla rostlinami. Struktura alkaloidů je velice rozmanitá, mohou být alifatické, cyklické i aromatické, často mají také steroidní (fyziologické a farmakologické vlastnosti) povahu. Vyskytují se nejčastěji ve vyšších dvouděložných rostlinách, v menší míře i v jednoděložných např. čeledi liliovité (*Liliaceae*), také v nahosemenných rostlinách se nacházejí alkaloidy např. v tisu (*Taxus*), chvojníku (*Ephedra*) atd., ale jsou obsaženy i v některých houbách. V průběhu vegetačního období, ale také během dne obsah alkaloidů kolísá. [6,7]

Alkaloidy jsou lipofilního charakteru, jsou to většinou tuhé, bezbarvé, ve vodě málo rozpustné látky. Rozpouštějí se ve zředěných roztocích minerálních kyselin. Jedovatost alkaloidů může rostlině působit ochranu proti býložravcům a parazitům. [8]

Biogeneticky jsou alkaloidy odvozené většinou od aminokyseliny ornitinu, lysinu, fenylalaninu, tyrozinu, tryptofanu a histidinu. Z chemického hlediska se dělí na dvě základní skupiny alkaloidů, alkaloidy heterocyklické a alkaloidy s encyklickými atomy dusíku. Významnější jsou alkaloidy heterocyklické, mezi které se řadí také námelové alkaloidy (EA) patřící mezi nejvýznamnější léčiva a toxiny v lidské historii. [4,7]. Pro jejich výrobu je výchozí surovinou námel a jeho účinnými látkami jsou alkaloidy obsahující tetracyklický skelet, který je velmi účinným univerzálním farmakoforem. Ve větším množství je námel toxický a do 19. století způsoboval rozsáhlá onemocnění, která byla považována za epidemii. Hlavními příznaky je demence, halucinace, může způsobit potrat. Otravy námelem závisí na směsi alkaloidů. [2]

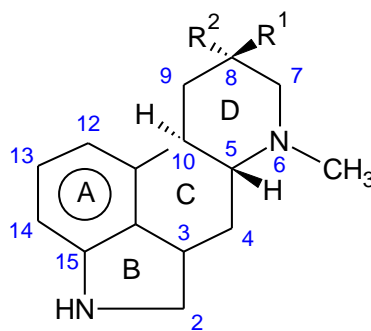
Hlavními producenty námelových alkaloidů jsou houby rodu *Claviceps*. Tato houba syntetizuje řadu biologicky aktivních látek včetně acetylcholinu, histaminu, tyraminu a mnoho jedinečných námelových alkaloidů, které mají účinky jako α -adrenergní receptory, působí jako dopaminové receptory, receptory serotoninu. [4,9]

Počátky moderního výzkumu námelových alkaloidů zasahují do roku 1918, kdy A. Stoll izoloval v krystalické formě ergotamin, alkaloid přítomen ve sklerociích houby *Claviceps purpurea* a patentoval ho. Firma Sandoz se na dlouho stala hlavním producentem námelových alkaloidů a její farmakologové položili základ pro průmyslovou výrobu EA a jejich terapeutické využití. Ergotamin vinnan měl velký význam v porodnictví.

Mezi další alkaloidy, které se postupně dostaly do terapeutického využití patří ergometrin, dihydroergotamin, dihydroergotoxin, bromokryptin, methylergometrin. [9,10]

1.1 Chemická struktura námelových alkaloidů

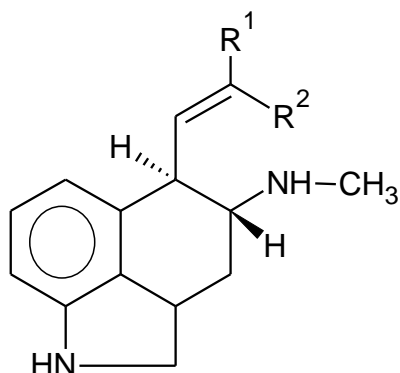
Námelové alkaloidy patří mezi skupinu alkaloidů odvozených od L-tryptofanu. Od tryptofanu jsou odvozeny tzv. indolové alkaloidy, kde patří látky s rozličnou chemickou strukturou. Na jejich biogenezi se kromě aminokyseliny účastní terpenické jednotky. Podle toho jsou rozděleny na jednoduché, složené a dimerní indolové alkaloidy. Složené indolové alkaloidy se ještě dělí podle počtu obsažených izoprenových jednotek na hemiterpenické a monoterpenické. Mezi hemiterpenické indolové alkaloidy jsou zařazeny alkaloidy námelové, představující největší skupinu dusíkatých metabolitů hub. [9,10,11] Společná část EA je tetracyklický kruhový systém, kterému je přiřazen triviální název Ergoline. [4,8] Ergolin je částečně hydrogenovaný indolo- [4,3-f,g] chinolin. (obr.1) [4] Námel sklerocia (tvrdý útvar, vzniklý ze spletených houbových vláken) obsahuje 0,15–0,5 % alkaloidů. Dělí se do dvou tříd: ve vodě rozpustné deriváty aminoalkoholu (asi 20 % z celkové alkaloidové směsi) a ve vodě nerozpustné peptidové deriváty (až 80 % celkových alkaloidů). [9,11]



Obr. 1: Ergolin

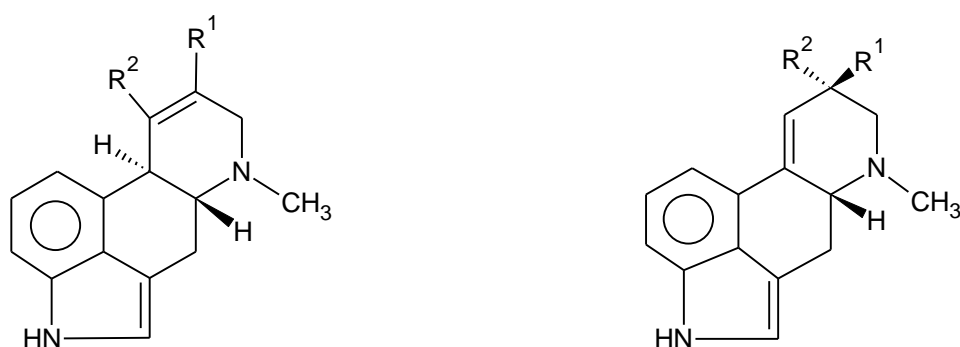
EA mohou být rozděleny do 3 hlavních skupin: [12,13]

- Klavinové alkaloidy a 6-7-sekoergoleny (alk. s otevřeným D-kruhem) (obr. 2)
- Jednoduché deriváty kyseliny lysergové
- Peptidové námelové alkaloidy (Ergopeptiny)



Obr. 2: 6,7 - sekoergolen

Námelové alkaloidy obsahují několik center chirality odlišných konfigurací, ale R-chiralita na C-5 je konstantní a nemění se, což odráží původ těchto alkaloidů z L-tryptofanu (aminokyselina, která je předchůdcem indolového prstenu), stejně jako C-4, C-5, 6 a N-atomu. V medicíně užitečné námelové alkaloidy jsou všechny C-8 amid/peptid deriváty (+)- kyseliny lysergové, směs nesoucí R-chiralitu na C-8. [10] Alkaloidy s nenasyceným D kruhem se nazývají ergoleny. [9] Podle pozice dvojné vazby se rozdělují na Δ 8,9-ergoleny a s dvojnou vazbou mezi uhlíku C(8) a C(9) a na Δ 9,10-ergoleny s dvojnou vazbou mezi uhlíky C(9) a C(10). (obr.3) [12,13,15]



8,9-Ergoleny

9,10-Ergoleny

Obr. 3: Ergolen

1.2 Klavinové alkaloidy

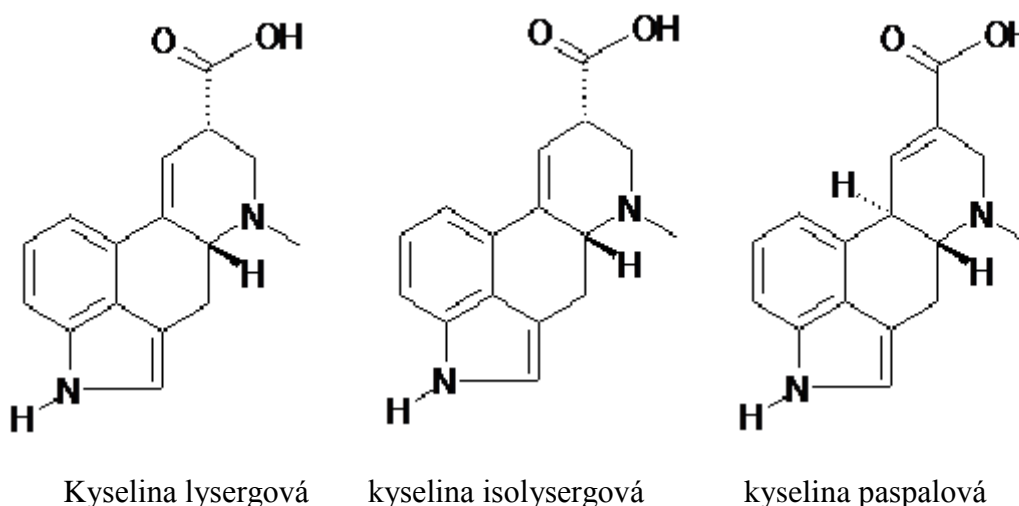
U klavinových alkaloidů se dvojná vazba nachází v poloze 8,9 nebo 9,10 nebo je kruh D zcela nenasycen. Bylo izolováno a charakterizováno nejméně 35 alkaloidů tohoto typu, ale žádný z této skupiny se nepoužívá jako lék. [9,10,12]

1.3 Jednoduché deriváty kyseliny lysergové

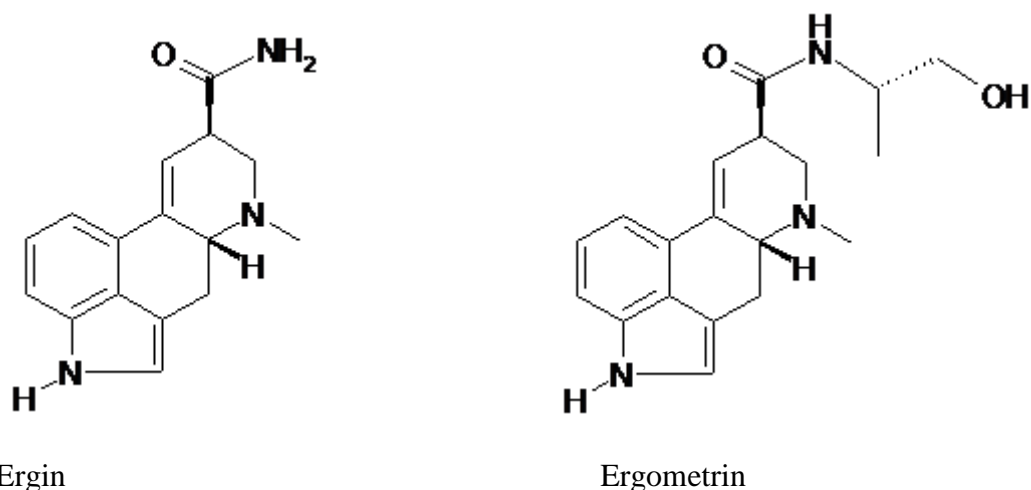
Deriváty kyseliny lysergové jsou amidy, součástí amidu je malý peptid nebo jednoduché alkylamidy. [13] Zásaditost kyseliny lysergové je způsobena přítomností dusíku v poloze 6. [9,12]

Nonpeptidové amidy kyseliny lysergové vyskytující se v námelu jsou ergometrin (obr.5), 2-hydroxyethylamid kyseliny lysergové, amid kyseliny lysergové (Ergin) (obr.5) a paspalová kyselina (obr.4). Kyselina paspalová je produkovaná rodem *Claviceps paspali* a liší se od kyseliny lysergové dvojnou vazbou v poloze 8,9. [13]

Deriváty kyseliny D-lysergové (obr.4) jsou označeny příponou –in, jsou levotočivé, proto vykazují vysokou farmakologickou aktivitu a jsou fyziologicky účinnější než deriváty kyseliny D-isolysergové (obr.4) končící příponou –inine, ty jsou pravotočivé a vykazují jen slabé farmakologické účinky. [9,14]



Obr.4: Ergolenové kyseliny

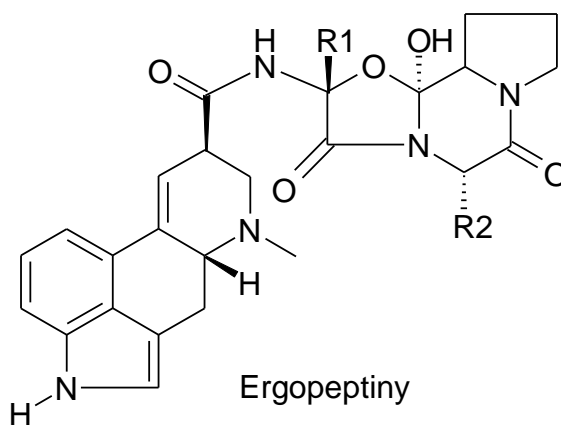


Obr.5: Deriváty kyseliny lysergové (Ergin, Ergometrin)

1.4 Peptidové námellové alkaloidy (Ergopeptiny)

Mezi alkaloidy peptidového typu (ergopetiny) (obr. 6) a jejich deriváty patří ergotamin, dihydroergotamin, dihydroergocristin, dihydroergotoxin atd. Jsou terapeuticky využívány v lékařství. [12] Získávají se buď izolací parazitně (polní námelo) nebo saprofytně z fermentačního mycelia, které je kultivováno speciálně k tomuto účelu z vyšlechtěných kmenů *Claviceps purpurea*. [4]

Ergotamin a další ergopetiny jsou složeny z (+)-lysergové kyseliny a L-prolinu obsahující komplexní jednotky, tripeptid. Ergotamin je jediným přirozeně se vyskytujícím ergopeptinem. Další běžně se vyskytující aminokyseliny přítomné v tripeptidové části ergopetinů jsou L-alanin, L-fenylalanin, L-valin, L-leucin, L-isoleucin, kyselina 2-aminomáselná. [9]



Obr. 6: Ergopeptiny

2 BIOLOGIE NÁMELE A HOSTITELSKÉ ROSTLINY

2.1 Biologie námele

Námelové alkaloidy jsou metabolity produkované houbami *Claviceps* z čeledi *Clavicipitacea*, řádu *Hypocreale*, skupiny řádu *Hypocreales*, skupiny řádů *Pyrenomycetes*, podtřídy *Ascohymenomycetidae*, třídy *Ascomycetes*. [4,16,17]

Námel neboli *Secale cotnutum* představuje tmavě hnědé, růžkovité útvary, které vyrůstají z klasu žita. Obilovina napadená parazitem rodu *Claviceps* obsahuje alkaloidy a tím se stává nebezpečnou pro zvířata a lidi. [18] Nachází se několik druhů lišících se v morfologii námele a hostitelské rostlině. *Claviceps purpurea* (Paličkovice nachová) snadno infikuje žito, ale také napadá ječmen, pšenici a více než 100 druhů trav. Vzniká při nákaze žitného květu přirozenou cestou nebo umělým zásahem. Námel určený k lékařským účelům se pěstuje uměle, jeho infekce do žitných semen je spojena s výtrusy houby *Claviceps* a očkuje se uměle vytvořenou očkovací látkou tzv. námelovinou, což je suspenze namnožených konidií. Takto získaná surovina je na alkaloidy obsahově bohatší a má lepší kvalitu než přírodní infekce. [4,18]

2.2 Vývojový cyklus námele

Paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*) je vřeckovýtrusná houba na různých trávách, ale i na žitě. Její životní cyklus začíná na jaře, kdy na mladé klásky jsou vzdušnými proudy přenášeny houbové výtrusy. Z jedné spory se mohou vyvíjet všechny vzniklé fáze jejího životního cyklu. [4,12] Vývojový cyklus námele se skládá z asexuálního a sexuálního cyklu. První cyklus sestává z vláknitého podhoubí, které se reprodukuje přes konidie. Druhý cyklus začíná vytvořením sklerocia, což jsou protáhlé a výrazně vyčnívající růžkovité útvary (obr. 7), které ve stádiu zralosti vypadávají, přezimují v půdě a v následujícím roce z nich vyrůstají paličkovitá stromata. Tvoří se askospory prorůstající do semeníku jako pyl a postupně nahradí květní orgány. Vznikem sklerocii jsou alkaloidy zodpovědné za toxicitu námelových produktů. [4]

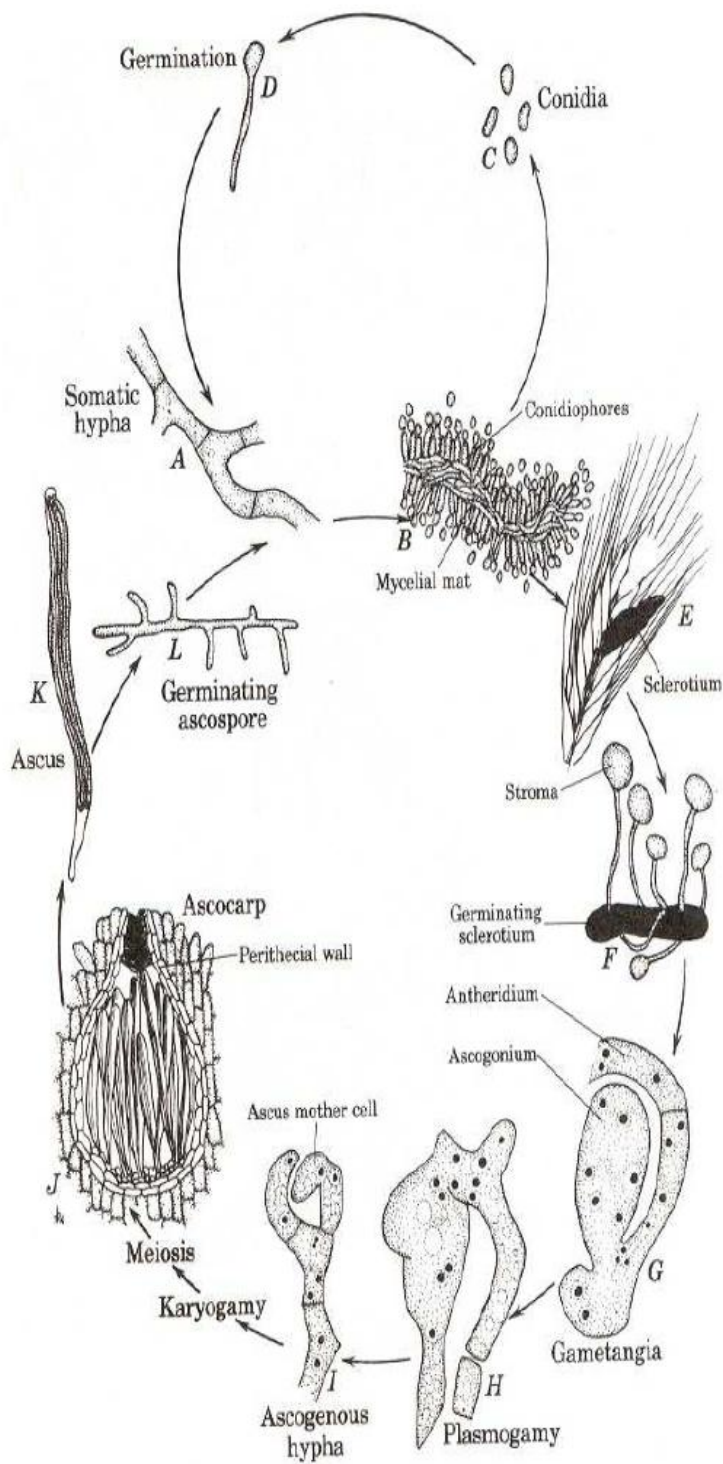
Sklerocia jsou považována za počáteční fázi sexuální diferenciaci *Claviceps* a jejich množství závisí na druhu obilí. K pěstitelským účelům námele je převážně využíváno žito, které nese značné množství sklerocii oproti pšenici, která má sklerocii relativně málo. [16]

Sklerocia jsou 1–2 cm dlouhá, rovná nebo zahnutá, černofialová a uvnitř bílá. Sklerocia rostoucí na žitě setém (*Secale cereale*) dorůstají až do délky 50 mm. Ze semeníku teče sladká šťáva (medovice), která je plná konidií. Drobný hmyz, který je

přilákán sladkou medovicí, roznáší na svých tělech konidie a působí tak druhotnou infekci trav. Námel, který dozraje, vypadne z klásku. Přezimuje na povrchu půdy a z jara opět vyklíčí ve stromata. [4,12,16]



Obr. 7: Námel – růžkovité útvary [19]



Obr. 8: Shrnutí životního cyklu [20]

2.3 Hostitelské rostliny

2.3.1 Obiloviny

Obiloviny jsou trávy, které se pěstují pro svůj jedlý podíl. Jsou také nejčastěji používanými hostitelskými rostlinami námele. Jejich energetická hodnota je cca 45 % z celkové energetické potřeby člověka. Mezi základní obiloviny patří pšenice, ječmen a žito, přičemž pšenice a žito jsou nejvíce využívanými obilovinami pro lidskou výživu v ČR. [21]

Obilniny patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*), řádu lipnicokvěté (lipnicotvaré) (*Poales*). Jsou to jednoleté i víceleté byliny se svazčítým kořenovým systémem. V jejich přirozené formě (celé zrno), jsou bohatým zdrojem vitaminů, minerálních látek, sacharidů, tuků, olejů a bílkovin. [21,22] Žito se ve farmakologii ukázalo jako nejvhodnější obilovina k pěstování námelových alkaloidů, které se námelem uměle infikuje. Námel se zkoušel také pěstovat na triticales což je kříženec pšenice a žita, ale zjistilo se, že výnosy nejsou tak velké, jak se předpokládalo.

2.3.2 Žito

Žito je cizosprašná jednoletá i víceletá rostlina, ozimého i jarního charakteru. V praxi se uplatňuje žito ozimé. Je vysoké 1–2 m, kořenový systém je mohutný, a proto ho lze pěstovat i na chudších půdách, má menší nároky na prostředí a půdu. Snáší chladné klima a středně vlhké podnebí, pěstuje se v podhorských a horských polohách. Květenstvím je klas, zrno je delší a nahé a má zelenkavou až modrozelenou barvu. [21]

Žitné zrno se využívá na chlebovou mouku, jako náhražka kávy (melta, cikorka), k výrobě perníků, jako krmivo nebo se z něj vyrábí i alkohol (gin). Pro jeho nižší výživovou hodnotu a hořkou chuť se využívá ke krmným účelům jen omezeně. [22] Žito je tolerantní na předplodinu, nejlepší předplodinou je olejnína, luskovina, pícnina, okopanina. Jeho využití je pro potravinářské, krmivářské, případně technické a farmaceutické účely. [22,23] Je velmi citlivé na infikaci námelem a konzumace infikovaného žita může způsobit velmi vážný zdravotní stav známý jako ergotismus, proto se žito ukázalo z hlediska produkce množství námele a obsahu námelových alkaloidů jako nejvhodnější hostitelská rostlina. Podle získaných poznatků se využívá hlavně sterilní žito hybridních odrůd. Jejich hlavní předností je 10–20 % vyšší výnos zrna. Hybridní odrůdy žita jsou tolerantnější k řadě chorob, snášejí nízké teploty, mají velmi dobrou mrazuvzdornost a vyšší odolnost vůči stresům. [24]

2.3.3 Očkování žita námelem

Při pěstování námele na žitě je očkování hostitelské rostliny námelem rozhodující operace. Hostitelská rostlina se infikuje konidiami houby *Claviceps purpurea*. Výnos a kvalita námele závisí na včasném a kvalitním provedení infekce. Při očkování námele se používají dvě technologie a to očkování postřikem a očkovacími stroji. [25]

Další vývoj žita, klíčení konidií a růst námele silně závisí na vývoji počasí v daném období. Prvními znaky úspěšné infekce jsou kapky medové rosy, medovice na klasech žita a to v období 7–10 dnů po očkování. Sterilní žita kvetou otevřeně, v době kvetení jsou velmi citlivá vůči sekundární infekci. Rozhodující pro tvorbu a výnos námele při pěstování na sterilním žitě je sekundární očkování propř. i třetí očkování námelovu očkovací látkou. [25,26]

Kvalita sklizené hmoty je velmi vysoká, pokud se dodrží za příznivých klimatických podmínek granulovaná sterilita. Sklizená hmota obsahuje do 3–5 % příměsí zrna. Příměs zrna do 10 % je ještě relativně přijatelná, ale jsou kladené zvýšené nároky na čištění a třídění sklizené hmoty. Po vyčištění se náměl plní do velkoobjemových vaků v čisté hmotnosti 400 kg s tolerancí ± 1 %. [26,27]

3 FARMAKOLOGIE NÁMELOVÝCH ALKALOIDŮ A VYUŽITÍ V LÉKAŘSTVÍ

3.1 Farmakologie

Farmakologie je věda zabývající se účinkem xenobiotik (léčiva, ale také jedy) na organismus. Pohybem neboli osudem xenobiotik v organismu (vstřebáváním, rozdělením, vyloučením, atd.) se zabývá **farmakokinetika**. Naopak jak se léčivo chová k organismu, co s ním dělá a co způsobuje, se zabývá **farmakodynamika**. Konkrétními léčivy a skupinami léčiv, které ovlivňují určité orgány nebo chorobné stavy studuje speciální farmakologie. [28,29,30]

K podávání léčiv jsou zejména preventivní (předcházení nemocem), diagnostické (rozpoznávání nemoci) a terapeutické důvody (léčba nemoci). Nadměrné užívání léčiv může vést k předávkování a může ohrozit zdraví i život člověka. [30]

3.1.1 Farmakon-receptorové interakce

Agonista neboli účinná látka je látka, která má afinitu i vnitřní aktivitu. Agonista aktivuje receptory a vyvolává účinek na organismus. Látka, která má pouze afinitu a nemá vnitřní aktivitu, se nazývá antagonist – neúčinná látka. Antagonista receptory pouze obsahuje, a tím brání agonistům ve vyvolání účinku. [30,31]

Působením více látek v organismu najednou může dojít k vzájemnému ovlivnění a tím se jejich účinky mohou změnit. V některých případech jsou interakce různých látek prospěšné a využívá se jich při terapii. [29]

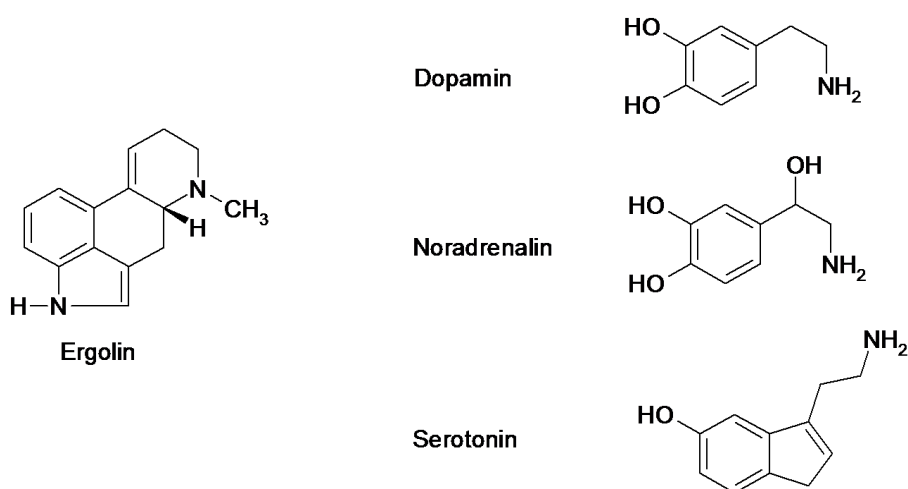
3.1.2 Účinky námelových alkaloidů na živý organismus

Námelové alkaloidy vyvolávají jednotlivé účinky agonistickým a antagonistickým ovlivněním adrenergních α -receptorů (adrenergní receptor je označení pro skupinu receptorů spojených s G-proteinem) (obr. 9). Na tyto receptory se vážou různé katecholaminy, jako je zejména noradrenalin a adrenalin. Všechny adrenergní receptory se běžně dělí na α -adrenoreceptory a β -adrenoreceptory. Receptory skupiny alfa jsou citlivější k adrenalinu než izoproterenolu, β -adrenoreceptory reagují přesně naopak. Noradrenalin se v těle převážně váže na α -adrenoreceptory a adrenalin na adrenoreceptory skupiny beta. [29,30,31,32]

Dopamin je chemická látka vznikající v mozku. Funguje jako neurotransmiter, aktivuje dopaminové receptory. Umělé vpravení dopaminu do organismu vede ke zrychlení tepu nebo zvýšení krevního tlaku. Dopamin se nemůže vstřebat přímo z krve do mozku, a proto dopamin podaný jako lék neovlivní centrální nervovou soustavu. Pacientům trpícím Parkinsonovou chorobou je možno vpravit dopamin nepřímo a to podáním prekursoru dopaminu. [28,33]

Serotonin je biologicky aktivní látka obsažená v krevních destičkách, v buňkách gastrointestinálního traktu a v menší míře i CNS (centrální nervová soustava). Význam má jako neurotransmiter, ovlivňuje serotoninergní systém, tvořený soustavou neuronů v prodloužené míše, mozku, středním mozku a mezimozku. Nedostatek způsobuje snížení přenosu nervových vzruchů, změny nálady, celkovou depresi, případně poruchy spánku, podrážděnost až agresivitu. [28,34]

Noradrenalin je hormon a neurotransmiter řazený mezi stresové hormony, je vylučován dření nadledvinek. Jeho funkcí je krátkodobé zvýšení aktivity v organismu tj. urychlení srdečního tepu, zvýšení rozkladu glykogenu na jednodušší monosacharidy. Také roztahuje cévy v kosterních svalech a zvyšuje tak jejich okysličování. [28]



Obr.9: Ergolinový skelet a neuroreceptory

Hlavní farmakologické účinky námelových alkaloidů

Uterotonický účinek je spojený s vyvoláním buď pravidelných, periodických kontrakcí dělohy nebo dlouhodobou retrakci myometria. Z přírodních alkaloidů se jako uterotonika využívá ergotamin a ergometrin. [28]

Sympatolytický účinek (hypo- a hepertenzivní) způsobuje inhibici hormonů adrenalinu, serotoninu dopaminu a noradrenalinu, tím dochází k působení na prodlouženou míchu a rozšíření žil. Může dojít ke snížení krevního tlaku, srdeční frekvence a síly stahu. [28]

3.2 Využití v lékařství

Nejstarší ověřené zprávy o vlivu námelu na lidské zdraví se objevily v čínských spisech přibližně roku 1100 př. n. l., kdy byla látka používána v porodnictví. [35] Odkazy na onemocnění po konzumaci zrna obilniny byly také nalezeny v různých knihách Bible ve Starém zákoně (850–550 př. n. l.). V roce 550 př. n. l. Hearstův papyrus z Egypta popsal konkrétní přípravek, ve kterém byla směs námelu, oleje a medu, a který byl doporučován pro růst vlasů. V 370 př. n. l. Hippokrates popsal, že po použití námele se zastavilo poporodní krvácení. [4,35]

V roce 1582 byla příprava námelu popsána lékařem a botanikem Adamem Lonizerem v jeho obsáhlé knize „Kreuterbuch“. Využití námelu jako léku při porodu se stalo velmi populární ve Francii, Německu a Spojených státech. První použití drogy v oficiální medicíně popsal americký lékař John Stearns v roce 1808, když informoval o děložních kontrakcích přípravku získaného z námele. Prvním lékopisem, ve kterém se objevil výraz námel byl „The Pharmacopoeia of the United States of America“ z roku 1820. Další zmínka o námelu byla zavedena do londýnského lékopisu v roce 1836. Skutečný převrat způsobily výzkumné práce A. Stolla, který jako první izoloval roku 1918 v čistém stavu alkaloid ergotamin. Prokazatelně se zjistilo, že právě alkaloidy mohou značně ovlivnit činnost některých orgánů. [36]

3.2.1 Terapeuticky významné kyseliny lysergové

3.2.1.1 Ergometrin, ergobasin

Ergonovin byl objeven ve čtyřech různých laboratořích téměř současně a se čtyřmi různými jmény (ergometrin, ergotoxin, ergosterin a ergobasin). Struktura ergonovinu byla objasněna v roce 1935. Ergonovin je na světlo citlivá a ve vodě rozpustná sloučenina. Jeden z nejvýraznějších účinků ergonovinu je přímá stimulace hladké děložní svaloviny.

Lék se podává po vypuzení placenty, protože před podáním může dojít k zachycení placenty. Ergonovin maleát se obvykle podává intramuskulárně nebo intravenózně (pro nouzové použití). Nežádoucí účinky jsou většinou gastrointestinální a jsou omezeny na nevolnost a zvracení (1–10 %). [15,36]

3.2.1.2 *Methylergometrin*

Přírozně se nevyskytuje v námelu, poprvé byl představen jako syntetický produkt pro lékařské účely v roce 1946. Lék se v současnosti připravuje reakcí přes (+)-kyselinu lysergovou s (L)-(+)-aminobutanol. Má nízkou rozpustnost ve vodě a používá se terapeuticky hodně ve stejném způsobu jako ergonovin. [15]

3.2.2 Terapeuticky významné peptidové alkaloidy

3.2.2.1 *Ergotamin*

Ergotamin byl zaveden do světového obchodu v roce 1921 a je dodáván na trh jako ve vodě rozpustné soli vinanu. Alkaloid ergotaminu je považován za užitečný v léčbě středně těžkých a těžkých záchvatů migrény a je nejefektivnější - pokud je podán na počátku migrény. Dále se využívá v šestinedělí při nedokonalé involuci dělohy, při poporodním krvácení a jiných poruchách vegetativního nervového systému. [4,15,36] Nežádoucí účinky jsou nevolnost a zvracení, slabost únava, tlak na hrudi a průjem.

3.2.2.2 *Dihydroergotamin*

Dihydroergotamin se přírozně v námelu nevyskytuje, poprvé byl představen jako semisyntetický produkt v roce 1946. Lék se v současnosti připravuje buď hydrogenací ergotaminu izolovaného z námele, nebo fermentací. Dihydroergotamin má velmi nízkou rozpustnost ve vodě a je prodáván pro parenterální použití jako vodorozpustné soli mesylátu. Používá se při akutní léčbě migrény. [15]

3.2.2.3 *Alkaloidy skupiny ergotoxinové*

Původně se předpokládalo, že peptidový alkaloid ergotoxin byl původně jediná sloučenina, následně bylo zjištěno, že se jedná o směs tří peptidů námelových alkaloidů: ergocristine, ergokryptine a ergocornine. Každý z ergotoxinových alkaloidů obsahuje tripeptidový prsten, který se skládá ze dvou aminokyselin (valin, prolin) a třetí složka se liší. Alkaloidy skupiny ergotoxinové mají sympatolytický účinek a patří k nejúčinnějším z dihydroderivátových přípravků, jsou nejméně toxické. Dočasně snižují krevní tlak a ovlivňují srdeční činnost. [4,12,36]

3.2.3 Halucinogenní námelové alkaloidy

K halucinogenním námelovým alkaloidům patří diethylamid kyseliny lysergové (LSD), který byl poprvé syntetizován v roce 1938. Sloučenina byla testována ve srovnání s ergometrinem a zjistilo se, že vykazuje menší oxitoxickou aktivitu, tím byl další rozvoj pozastaven. Bylo zjištěno, že její synteticky připravený diethylamid (LSD) je velice silným psychomimetikem. Nástup účinku LSD je za 30–60 minut po podání, účinek vrcholí za 1–6 hodin a ztrácí se za 8–12 hodin. Akutní toxicita se projevuje gastrointestinálními obtížemi, zimnicí, může se objevit schizofrenie. Předávkování se vyznačuje intenzivní úzkostí, záchvaty bojovnosti, zmatku a paniky. Fyzická závislost a abstinční syndrom chybí a psychická závislost je nízká. [10,15,36]

3.3 Toxikologické účinky

Námel je ve větším množství toxický. Látka, která v malém množství škodí organismu nebo vyvolává v nejhorším případě smrt, je souhrnně nazývaná jedem. [37] Otravou námelem docházelo už ve středověku, medicína nebyla na takové úrovni jako dnes, proto některé z příznaků se spojovaly s jinými nemocí – ergotismus. První doložené epidemie ergotismu pochází z Francie z let 944–945 n. l., kdy zemřelo 20 000 lidí a o 50 let později asi 40 000 lidí. Příčina epidemie byla neznámá, neexistoval žádný lék, dokud lidé nenašli příčinu, umíralo se na otravu námelem. Francie byla centrem závažných onemocnění, protože žito bylo potravou chudých a chladné, vlhké klima bylo příznivé pro rozvoj námele. [4,37,38,39]

Kolem roku 1597 bylo pozorováno, že žito, které se pěstuje a využívá k lidské výživě, je napadeno plísní *Claviceps purpurea*, odolné vůči chladnému a vlhkému období. Později (v roce 1630) bylo zjištěno, že krmení zvířat tímto obilím způsobuje nemoc podobnou lidskému ergotismu a do konce 18. století byla prokázána otrava u zvířat. Zdroj ergotismu byl spojen s konzumací infikovaného žita. Tyto poznatky vedly k zavedení legislativy ve Francii a postupně v dalších zemích. [4,15]

Příznaky ergotismu byly nazývány „ohněm sv. Antonína“, lidé toto onemocnění pojmenovali proto, že se domnívali, že je to odplata za jejich hříchy. Sv. Antonín byl světec, měl zvláštní moc chránit před ohněm, proti požárům, ekzémům, zánětům a epilepsií, je to patron zemědělců, řeznictví. [2,4,10,15,39] Ohniska ergotismu byla charakterizována dvěma odlišnými toxickými formami. První, gangrenózní forma je známá jako „oheň svatého“, „pekelný oheň“, nebo „oheň sv. Antonína“ a druhá forma se nazývá konvulzivní. [15,39]

Gangrenózní forma ergotismu se vyznačuje gangrénou končetin, způsobují zúžení krevních cév vedoucích do končetin. Pokles krve způsobuje infekci a je provázen pálivou bolestí. Těžký průběh způsobuje nekrózu, gangrénu až ztrátu končetiny. Gangrenózní ergotismus je běžný u hospodářských zvířat. [2,15,39]

Konvulzivní (křečovitý) ergotismus se vyznačuje nervovou dysfunkcí, mají různé parestesie, které se šíří do rukou, nohou a celých končetin. V některých případech je doprovázeno křečemi svalů, zmatky, bludy, halucinací. [2,39]

Dnešní doba umožňuje prevenci proti infikaci žita námele. Jsou kladeny vysoké nároky na mlynáře, produkce obilné masy je hlídána. Pomocí analytických metod je možno detekovat škodlivou koncentraci námelových alkaloidů v obilí nebo mouce.

4 PRINCIP KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE

Obsah aktivních látek v námelu se měří pomocí kapalinové chromatografie. Alternativní metodou je metoda UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), metody (HPLC i UPLC) jsou založeny na stejném principu.

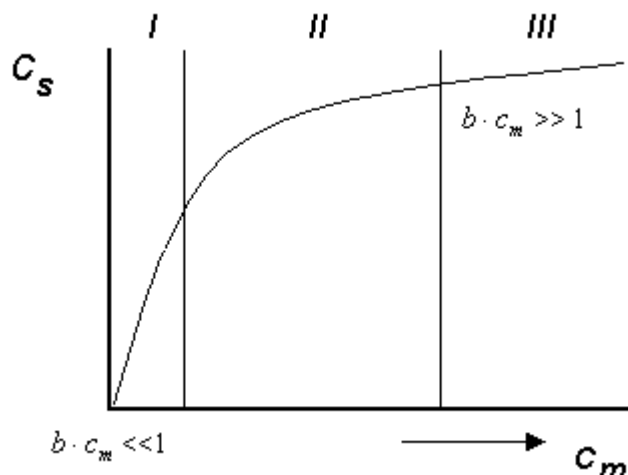
4.1 Porovnání HPLC a UPLC

Vzorky analyzované v rámci experimentální části byly měřeny pomocí UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), což je speciální verze HPLC. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je používána pro identifikaci, kvantifikaci a oddělování jednotlivých složek směsi. Využívá vysoký tlak, aby prošla rozpouštědla kolonou. [41,44] V UPLC mohou být použity částice o velikosti menší než 2 μm , což umožňuje lepší oddělení jednotlivých složek a analýza je provedena za mnohem kratší dobu než u HPLC. Rozdíl je také v tlacích čerpadla, kdy tlak čerpadla u HPLC je 40 MPa a u UPLC může dosáhnout až 100 MPa. [41]

4.2 Kapalinová chromatografie

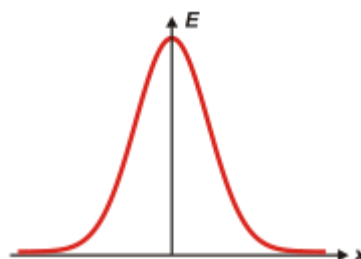
Chromatografie je separační (dělicí) a zároveň i analytická metoda, která poskytuje kvalitativní a kvantitativní informace o vzorku. Všechny chromatografické separační metody jsou založeny na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Aby docházelo k rovnovážné separaci (dělení) látek, musí existovat fázové rozhraní mezi fázemi. Poměr koncentrací složek ve dvou fázích udává distribuční (rozdělovací) konstanta a podle toho se jednotlivé složky dělí.

Je-li látka zadržována na tuhé stacionární fázi adsorpcí, řídí se ustalování rovnováhy tzv. adsorpční izotermou (obr. 10), které lze popsat Freundlichovou nebo Langmuirovou izotermou. Jde o matematické vyjádření závislosti množství adsorbované látky od jejího parciálního tlaku resp. koncentrace. [40,41]



Obr. 10: Langmuirova isoterma [33]

Je-li rozdělovací konstanta za dané teploty konstantní (závislost mezi oběma koncentracemi je lineární), má eluční zóna tvar Gaussova rozdělení (obr. 11), vzniká symetrický pík a retence složky se se zvyšující se koncentrací (objem nástřiku) nemění. [40]



Obr.11: Typický tvar křivky, popisující hustotu pravděpodobnosti Gaussova rozdělení [40]

- **Retenční objem** je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony.
- **Retenční čas** je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně.
- **Mrtvý objem kolony** je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.
- **Mrtvý čas kolony** je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze.
- **Redukovaný retenční čas** je čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi. [40,41,42]

4.3 Vliv teploty na retenci látky

S rostoucí teplotou retence rozpuštěných látek (solutů) klesá a separace neznámého píku se zlepšuje, což se projevuje lepším rozlišením mezi dvěma píky). Většina analýz kapalinové chromatografie probíhá při laboratorní teplotě a nevyžaduje vyšší teplotu kolony při analýze. [41,42,43]

4.4 Vliv pH mobilní fáze

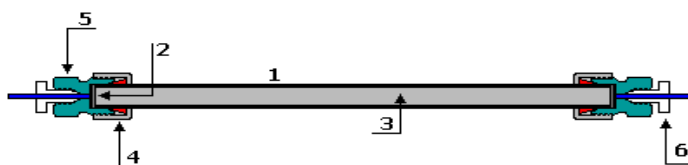
Chemické chování látek iontové povahy lze ovlivnit změnou pH mobilní fáze. Při změně pH mobilní fáze dochází k potlačení disociace slabých kyselin ($\text{pH} < 7$) nebo slabých bází ($\text{pH} > 7$). [40, 43]

Potlačení disociace molekul dochází ke zvýšení retence a zamezení chvostování píku dané chromatografické látky. Pro organické kyseliny dochází k potlačení disociace snížením pH na hodnotu pH 2–5. U organické báze potlačíme disociaci zvýšením pH na hodnotu pH 7–8, ale toto pH je omezeno rozpuštěním silikagelu při $\text{pH} > 7$. [40,41]

4.5 Chromatografické kolony

Chromatografická kolona je kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Většina kolon je vyrobena z nerezové oceli. [43]

Kolona pro kapalinovou chromatografii (obr.12) se skládá z kovového pláště (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2), ta zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. [40, 41, 42, 43] Oba konce kolony jsou ukončeny převlečným ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavicí (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6). [40] Nejrozšířenějším polárním sorbentem chromatografické kolony je silikagel. Nejčastější velikost částic náplně je 3,5 a 10 μm . [40, 44]



Obr. 12: Kolona kapalinové chromatografie [33]

4.6 Dávkovací zařízení

Dávkovací vysokotlaké ventily umožňují dávkovat i při tlaku 60 až 80 MPa a to jednak konstantní objem vnitřního prostoru ventilu nebo při zařazení dávkovací smyčky objem smyčky. [40]

4.7 Typy detektorů

4.7.1 UV/VIS detektor

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně. [40, 42, 44]

4.7.2 Fluorescenční detektor

Založeny na principu fluorescence – schopnost látek absorbovat ultrafialové záření a měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního). Doba trvání fotoluminiscence bývá u fluorescence 10^{-8} až 10^{-5} sekundy. [40,44,45]

4.7.3 Refraktometrický detektor

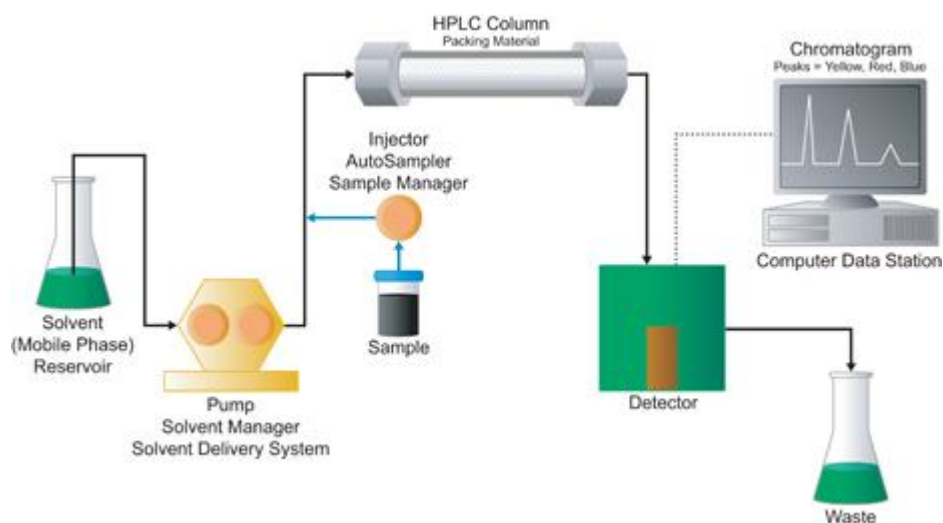
Refraktometrický detektor měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze, procházející měřicí celou. Citlivost je tím větší, čím je větší rozdíl v indexu lomu analytu a mobilní fáze. Odezva je závislá na teplotě, proto je nutné detekční celu temperovat. Není vhodný pro gradientovou eluci, vhodný je naopak pro neabsorbující a nefluoreskující látky jako jsou cukry, lipidy, atd. Používá se v gelové chromatografii. [40,46,47]

4.7.4 Vodivostní detektor

Patří mezi univerzální detektory a měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami. Tento typ detektoru je konstrukčně nenáročný a celu detektoru lze miniaturizovat na objemy menší než 5–1 μl . U tohoto typu detektoru jsou kladené vysoké nároky na mobilní fázi, která by měla být nevodivá a musí chromatografické látky dostatečně rozpouštět a mít dostatečně velkou permitivitu. [40, 47]

4.8 Princip analýzy vzorků na kapalinové chromatografii

Mobilní fáze kontinuálně protéká z čerpadla přes ventil a dávkovací jednotku na chromatografickou kolonu. Tímto je zajištěn kontinuální oplach jehly. Po přepnutí ventilu dochází k naplnění jehly na požadovaný objem přes krokový motor, který ovládá píst injekční stříkačky dávkovače. Po opětovném přepnutí ventilu je proudem mobilní fáze vzorek vytlačen na kolonu. Jednotka se dostane do stavu separace a současně dojde k vyprázdnění injekční stříkačky dávkovače do odpadu. Detektor, který je připojen k počítačové datové stanici, zaznamenává elektrický signál potřebný k vygenerování chromatogramu na jeho displeji, po té dochází k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek. (obr. 13) [40, 41, 43]



Obr.13: Schéma kapalinové chromatografie [40]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv použitého rozpouštědla na technologickou výtěžnost námelových alkaloidů.

Cíle bylo dosaženo:

- analýzou širokého spektra vzorků námelových alkaloidů metodou UPLC
- vyhodnocením obsahů a výtěžnosti námelových alkaloidů, srovnáním mezi jednotlivými extrakčními činidly
- diskusí výsledků s literaturou a formulací závěrů

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Vzorky

Práce byla provedena na vzorcích námele získaných v roce 2011 od pěstitele Zemědělské akciové společnosti Kylešovice. Vzorky poskytla společnost Teva Czech Industries, s.r.o, která zpracovává námel jako zdroj účinných látek pro výrobu léčiv.

5.2 Extrakční činidla

Jako kontrolní vzorek bylo vybráno rozpouštědlo používané v praxi aceton:amoniak:voda 450:50:5 (V/V). Další zkoumaná extrakční činidla jako ether:etanol 9:1 (V/V), aceton 100%, metanol 100%, toluen:etanol 9:1 (V/V) byla vybrána náhodným výběrem a hlavně dle dostupnosti a použitelnosti ve výrobním procesu zpracovatelské společnosti.

5.3 Chemikálie

Standard Ergotaminu vinanu

Reversní osmosou čištěná voda

26 % amoniak

Ethanol p.a. (Fluka, Sigma-Aldrich)

Aceton p.a. (Fluka, Sigma-Aldrich)

Methanol p.a. (Fluka, Sigma-Aldrich)

Toluen p.a. (Fluka, Sigma-Aldrich)

5.4 Přístroje a zařízení

Pro práci bylo použito standardní laboratorní vybavení jako analytické váhy (METTLER TOLEDO), lednice (WHIRLPOOL), magnetické míchadlo (KIKA-WERKE), temperovaná vodní lázeň (SULABO), digestoř (ITES), filtrační aparatura, pH metr (METTLER TOLEDO) a další běžné laboratorní sklo a pomůcky.

K analýze byl použit kapalinový chromatograf (UPLC) Agilent Technologies 1200 series s molekulově vylučovací kolonou typu Zorbax SB-C18 (dodává Chromservis s.r.o., se sídlem v Praze), velikost částic 1,8 μm , pumpa (Binarni), detektor (VWD SL typ G 1314C), autosampler (ALSSL typ G1329B), PC s vyhodnocovacím programem Empower 2, mikrofiltry 0,45 μm , injekční stříkačky a aparatura na filtraci mobilní fáze.

5.5 Laboratorní postupy

Při přípravě vzorku, extrakci námelových alkaloidů a jejich samotném stanovení bylo postupováno dle metody Teva Czech Industries, s.r.o. [48] V práci bylo zjišťováno, jak významný vliv má použité extrakční činidlo na technologickou výtěžnost námelových alkaloidů. Obsahy získané extrakcí námelových alkaloidů v jednotlivých rozpouštědlech a následná analýza na UPLC, byly stanoveny v laboratoři farmaceutického závodu Teva Czech Industries, s.r.o.

5.5.1 Příprava mobilní fáze

Byla použita gradientová eluce.

1. Mobilní fáze byla tvořena pufrém. Pufr byl připraven rozpuštěním 5 ml triethylaminu v 1 litru vody a pH bylo upraveno pomocí koncentrované kyseliny fosforečné na hodnotu 4,40. Následně byl pufr smíchán s acetonitrilem v poměru 4:1 (V/V)

2. Mobilní fáze byla tvořena směsí vody s acetonitrilem v poměru 1:4 (V/V)

Průtok mobilní fáze byl 2,0 ml/min, přičemž je možné průtok měnit od 1,8 – 2,2 ml/min. v závislosti na retenčním čase hlavního píku a dělení nečistot. [48]

5.5.2 Příprava standardu

Připravily se tři navážky standardu ergotaminu vinanu o hmotnosti 50 mg do 50ml odměrné baňky. Takto připravený standard se rozpustil v 90% obj. metanolu. Pro vytvoření kalibrace byl standard ergotaminu vinanu přepočten na ergotaminovou bázi pomocí přepočítávacího koeficientu, který je dán poměrem molárních hmotností vzorku a standardu, kdy pro ergotaminové báze platí [48]

$$M = \frac{2 \cdot 581,7}{1313,4} = 0,8859$$

5.5.3 Příprava vzorků

Vzorek námele zbavený příměsí a nečistot byl semlet na tříštivém mlýnku tak, aby velikost částic byla maximálně 0,3 mm. Ze získané hmoty byly prováděny navážky na jednotlivé extrakce. Z pomletého vzorku se navážilo $0,50 \pm 0,05$ g vzorku do 100ml Erlenmayerovy baňky.

Varianta 1

K navážkám vzorku námele v Erlenmayerových baňkách bylo přidáváno 50 ml extrakčního činidla. Jako extrakční činidla byly použity směsi

aceton:voda:26% amoniak 450:50:5 (V/V), ether:etanol 9:1 (V/V), Aceton 100%, metanol 100%, toluen:etanol 9:1 (V/V). Vzorek námele byl navážen do 100ml zábrusové Erlenmayerovy baňky. Pro každou extrakční směs byly provedeny dvě navážky. Baňky se dobře uzavřely skleněnou zátkou a směs se míchala na elektromagnetické míchače při laboratorní teplotě po dobu 2, 4 a 6 hodin. Po uplynutí příslušné doby se postupně z extraktu odpipetovalo 2ml pipetou, jejíž konec byl obalen skelnou vatou, do 50ml baňky s kulatým dnem a extrakt se odpařil na vakuové rotační odparce při teplotě 50 °C do sucha. Odparek bylo nutno zpracovat do 24 hodin. Pokud vzorek nebyl ihned po extrakci analyzován, uchoval se v lednici. [48]

Před UPLC analýzou se odparek rozpustil ve 2,0 ml 90% metanolu v ultrazvukové lázni a poté se přes membránový filtr převedl do vialky. Takto připravené vzorky byly analyzovány na kapalinovém chromatografu a následně bylo provedeno vyhodnocení.

Varianta 2

Druhou variantou byla příprava vzorku námele o hmotnosti 50 mg, který se navážil do 50ml baňky a zředil se 90% metanolem. Tato extrakce probíhala bez odpaření získaného extraktu a působením jiné doby extrakce než bylo použito v předchozích analýzách. Vzorky byly extrahovány v ultrazvukové lázni po dobu 10 min., 20 min., 30 min. a 1 hodiny. Po uplynutí příslušné doby se vzorky přefiltrovaly přes membránový filtr do vialky, poté byly analyzovány a následně vyhodnoceny.

Varianta 3

Varianta 3 byla označena jako stabilitní studie. Jejím cílem bylo sledovat a vyhodnotit stabilitu vzorků. Je známo, že připravené vzorky nejsou v roztoku dlouhou dobu stabilní, proto musí být zpracovány do 24 hodin. Na základě tohoto poznatku byla provedena stabilitní studie. Vzorky byly připraveny až na odparek (viz. varianta 1). Poté byly uchovávány po dobu pěti dní při teplotě 2–8 °C, následně zředěny, analyzovány a vyhodnoceny stejným způsobem jako vzorky varianty 1 a 2.

5.5.4 Použitý přístroj a kolona

Obsah námelových alkaloidů v námelu byl analyzován na UPLC chromatografu. Metoda, podle které se analýza provádí, dovoluje využití obou (HPLC a UPLC) způsobů analýzy. [48] Dnes se více využívá UPLC analýza pro lepší separační účinnost, kratší dobu analýzy, atd. HPLC analýza je alternativním způsobem analýzy námelových alkaloidů.

Dávkované množství vzorku potřebného k analýze bylo 3 µl. Standardně se měří při teplotě kolony 30°C, v případě potřeby změny separace se může teplota snížit. Na teplotě kolony závisí dělení určitých skupin píků. [48]

5.5.5 Výsledek analýzy

Naměřené hodnoty byly zpracovány softwarem Empower 2.

Nejprve byla provedena kalibrace ze tří navážek standardu. Jednotlivé navážky standardu byly pomocí koeficientu přepočteny na ergotaminovou bázi. Z této kalibrace vznikla kalibrační křivka, ze které byl vypočítán responzní faktor (průměrný odezvoový faktor) (tab. č. 1). Na kalibrační křivku byly přepočteny jednotlivé vzorky.

Tabulka č. 1: Příprava a výpočet kalibrační křivky

STD	hmotnost std (mg)	ředění std (ml)	Potence (přepočteno na bázi)	Area	RF
1	50,54	50	0,846	1031860	1206948
2	51,13	50	0,846	1031867	1205714
3	50,58	50	0,846	1045442	1208437

RF Průměrný responzní faktor = **1207033** – s touto hodnotou byly přepočítávány jednotlivé vzorky

STD standard ergotaminu vinanu (počet navážek)

hmotnost std ... množství naváženého standardu [mg]

Výsledkem analýzy vzorků byla relativní plocha píku (Area%). Tyto hodnoty byly použity pro výpočet hmotnostního podílu ergotaminu ve vzorcích podle následujícího vzorce.

$$w_{(hm\%)} = \frac{A_i \cdot d}{RF \cdot m_v} \cdot 100$$

A_i plocha i-tého píku na chromatogramu vzorku

d celkové ředění vzorku nebo standardu [ml]

M poměr molárních hmotností vzorku a standardu

m_v navážka vzorku, respektive drogy [mg]

RF responzní faktor, jeho výpočet se provádí podle vzorce

$$RF = \frac{A_{Sj} \cdot dilution}{m \cdot potence}$$

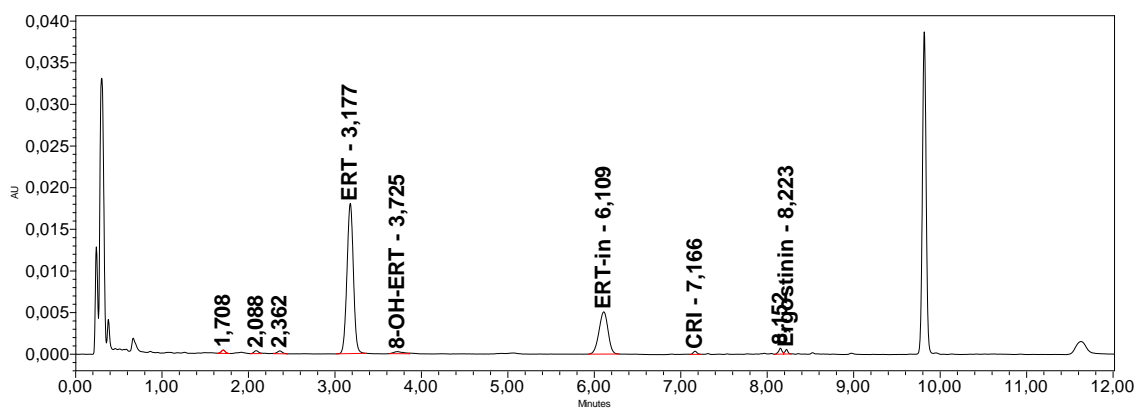
A_{Sj} plocha píku ergotaminu v j-tém standardu

dilution..... ředění standardu [ml]

m..... hmotnost naváženého standardu [mg]

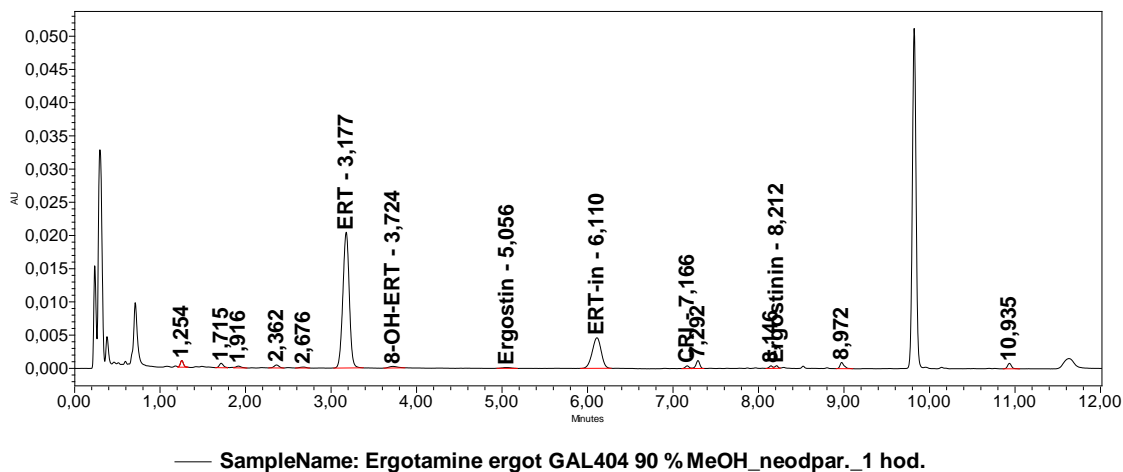
potence..... čistota standardního přípravku [bez jednotky]

Pro výpočet obsahu účinných látek ve vzorku byly posuzovány píky ergotaminu a ergotamininu. Z ploch jednotlivých píků byl softwarem vypočítán hmotnostní podíl (průměrný obsah % (m/m)) účinných látek. Výsledkem analýzy byl chromatogram. (obr. 14) Získané chromatogramy měly rozdílný počet píků v závislosti na polaritě použitého extrakčního činidla. (obr. 15)



— SampleName: Ergotamine ergot GAL404 Aceton:H2O:Cpavek_2 hod.

**Obr. 14: Chromatogram ERT námelových alkaloidů při extrakci směsi
aceton:H₂O:amoniak**



Obr. 15: Chromatogram ERT námelových alkaloidů při extrakci směsi 90% metanol

5.5.6 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledkem analýzy byl parametr relativní plocha píku ERT+ininu (Area%). Významnost rozdílu mezi hodnotami parametrů byla hodnocena metodou parametrické analýzy rozptylu (ANOVA). Zjištěné hodnoty byly zpracovány softwarem Statistica 9.0 (StatSoft ČR, s.r.o) na hladině průkaznosti $p < 0,01$.

Pokud byly hypotézy správné, pak se statisticky prokázalo, že testované odchylky sledovaných parametrů neměly náhodný charakter a byly způsobeny účinkem zkoumaných faktorů, tedy použitím různých extrakčních činidel a působením rozdílné extrakční doby vzorků (2, 4, 6 hodiny).

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem předkládané diplomové práce bylo vyhodnotit vliv podmínek extrakce na množství látek extrahovaných z námele. Byl studován vliv extrakční doby a použitého rozpouštědla. Ke stanovení obsahu extrahovaných alkaloidů byla použita UPLC chromatografie. Naměřené výsledky obsahů alkaloidů pro jednotlivá rozpouštědla byly vztaženy k hodnotě zjištěné při použití rozpouštědla aceton:voda:26% amoniak, standardně používaného ve farmaceutické praxi a vyjádřeny jako výtěžnost.

6.1 Rozpouštědlo aceton:amoniak:H₂O

Při použití extrakční směsi tvořené acetonem, 26% amoniakem a vodou byla statisticky průkazně nejvyšší průměrná hodnota relativní plochy Area% (92,41 %) zjištěna u vzorku po 2hodinové extrakci a nejvyšší průměrný obsah námelových alkaloidů (1,118 %) byl naměřen po 6hodinové extrakci (tab. č. 2). Nejnižší relativní plocha Area% (91,20 %) byla změřena po 6 hodinách extrakce, naopak vyšší plocha (92,24 %) byla naměřena po 4hodinové extrakci. Zvyšováním doby extrakce se průměrné obsahy námelových alkaloidů ERT+ininu postupně zvyšovaly, zvýšení však nebylo významné. Nejnižší průměrný obsah námelových alkaloidů byl naměřen po 2 hodinách extrakce (1,095 %). Sledováním stability vzorků byla zjištěna nejvyšší průměrná hodnota relativní plochy Area% ERT+inin (91,82 %) po 2hodinové extrakci a nejnižší relativní plocha Area% ERT+inin (91,60 %) byla naměřena po 6hodinové extrakci.

Jak bylo zjištěno experimentálním srovnáním jednotlivých rozpouštědel vyšší výtěžnost extrakce alkaloidů pomocí této sestavy rozpouštědel je dána slabou bazicitou molekuly alkaloidů. Alkaloidy jsou v jakémkoli rozpouštědle přítomny ve formě soli, přidáním NH₄OH (hydroxid amonný) se potlačí disociace molekul, a ty se lépe extrahují ve slabě polárním rozpouštědle. [50,51]

Porovnáním jednotlivých obsahů námelových alkaloidů s obsahy námelových alkaloidů stabilitní studie (viz. tab. č. 2) bylo zjištěno, že výsledky se výrazně neliší, příčinou toho může být odparek, ve kterém se námelové alkaloidy nerozkládají. EA rozpuštěné v roztoku delší dobu se začnou vlivem citlivosti na roztok rozkládat. V odparku byly námelové alkaloidy po celou sledovanou dobu stabilní.

Tabulka č.2: Zjištěné obsahy ERT+ininu v rozpouštědle aceton:amoniak:H₂O

doba (hod.)	ØArea % (ERT+inin)	ERT+inin (hm%)	ØERT+inin (hm%)	stabilitní studie	
				ØArea % (ERT+inin)	ØERT+inin (hm%)
2	92,41 ^a	1,078	1,095	91,82 ^c	1,123
		1,111			
4	92,24 ^b	1,079	1,106	91,74 ^d	1,15
		1,133			
6	91,20 ^f	1,106	1,118	91,60 ^e	1,15
		1,129			

6.2 Rozpouštědlo aceton

Statisticky nejvyšší průměrná hodnota relativní plochy Area% ERT+inin (88,11 %) a nejnižší průměrný obsah ERT+ininu (0,855 %) byly zjištěny u vzorku po 2hodinové extrakci. Nejnižší průměrná plocha Area% ERT+ininu (87,35 %) byla naměřena po 6hodinách extrakce a nejvyšší průměrný obsah ERT+ininu (0,872 %) byl naměřen u vzorku po 4hodinové extrakci. Po 6hodinové extrakci byla naměřena nejnižší průměrná plocha Area% (87,35 %) a průměrný obsah ERT+inin (0,865 %). Naměřené hodnoty jednotlivých vzorků stabilitní studie se moc neliší a odpovídají tomu, že nejnižší průměrná hodnota Area% (86,81 %) a nejnižší průměrný obsah ERT+inin (0,888 %) byly naměřeny po 2hodinové extrakci.

Výsledky použitého rozpouštědla acetonu jsou shrnuty v tabulce č. 3. Dalo by se předpokládat, že zvyšováním doby extrakce se budou snižovat relativní plochy a obsahy jednotlivých námelových alkaloidů se budou také zvyšovat. Zjištěné nižší hodnoty námelových alkaloidů použitím rozpouštědla aceton nám udávají, že samotné extrakční činidlo aceton není vhodné pro extrakci námelových alkaloidů. Jeho reaktivita je způsobena přítomností karboxylové skupiny, ze strany polarity je vysoce polárním rozpouštědlem, což může způsobit neúplnou extrakci námelových alkaloidů. [51] Vzorky námele jsou v tomto rozpouštědle stabilní, výsledky jsou srovnatelné s běžnými výsledky a rovněž vykazují nízké průměrné hodnoty obsahu ERT+ininu (0,946 %) po 4 hodinách extrakce byl naměřen nejvyšší průměrný obsah a po 6 hodinách byl naměřen průměrný obsah ERT+ininu (0,903 %). Stejně jako u rozpouštědla aceton:H₂O:amoniak je stabilita vzorku extrahovaného acetonem stabilní.

Tabulka č. 3: Zjištěné obsahy ERT+ininu v rozpouštědle aceton

doba (hod.)	ØArea % (ERT+inin)	ERT+inin (hm%)	ØERT+inin (hm%)	stabilitní studie	
				ØArea % (ERT+inin)	ØERT+inin (hm%)
2	88,11 ^a	0,833	0,855	86,81 ^f	0,888
		0,877			
4	87,41 ^b	0,867	0,872	87,01 ^e	0,946
		0,877			
6	87,35 ^c	0,864	0,865	87,15 ^d	0,903
		0,865			

6.3 Rozpouštědlo 90% metanol

Statistickým vyhodnocením vzorků s použitím rozpouštědla 90% metanolu, byla naměřena nejvyšší průměrná hodnota relativní plochy Area% (86,31 %) u vzorku po 2hodinové extrakci a nejvyšší průměrný obsah ERT+ininu byl naměřen po 6hodinové extrakci (1,031 %).

Po 6hodinové extrakci námělových alkaloidů z námele byla naměřena nejnižší relativní plocha Area% (85,30 %). Nejnižší průměrný obsah ERT+ininu (1,003 %) byl naměřen po 2hodinové extrakci. U stabilitní studie vzorků byla naměřena nejnižší průměrná relativní plocha Area % (84,29 %) po 4hodinové extrakci a nejnižší průměrný obsah ERT+ininu (1,030 %) byl naměřen po 6 hodinách extrakce.

Průměrné obsahy a průměrné relativní plochy jednotlivé doby extrakce jsou shrnuty v tabulce č. 4. Bylo dosaženo obdobných výsledků jako u výsledků použitím extrakční směsi aceton:voda:amoniak (tab. č. 2). Prodlužující doba extrakce zvyšuje obsahy námělových alkaloidů a relativní plochy se snižují. Metanol je nejjednodušší alifatický alkohol dobře mísitelný s vodou. Patří mezi extrakční činidla, která dobře rozpouští alkaloidy. [50] Po 6hodinové extrakci je obsah EA o 20 % větší. U stabilitní studie dle výsledků (tab. č. 4) zvyšující se extrakční dobou se obsahy námělových alkaloidů snižují. Obsahy se mohly změnit působením mnoha faktorů, např. dobou extrakce, odparku, odpařování, délkou uskladnění vzorků, atd.

Tabulka č. 4: Zjištěné obsahy ERT+ininu v rozpouštědle 90% Methanolu

doba (hod.)	ØArea % (ERT+inin)	ERT+inin (hm%)	ØERT+inin (hm%)	stabilitní studie	
				ØArea % (ERT+inin)	ØERT+inin (hm%)
2	86,31 ^a	0,994	1,003	84,34 ^d	1,078
		1,011			
4	86,06 ^b	1,026	1,026	84,29 ^e	1,087
		1,026			
6	85,30 ^c	1,027	1,031	84,31 ^d	1,030
		1,035			

6.4 Rozpouštědlo ether:etanol

Porovnáním výsledků rozpouštědla ether:etanol bylo zjištěno, že průkazně nejvyšší průměrná relativní plocha Area% (94,84 %) byla naměřena po 2hodinách extrakce a v této době byl naměřen nejnižší průměrný obsah ergotaminu+ininu (0,803 %). Po 4 hodinách extrakce byla naměřena průměrná relativní plocha Area% (91,28 %) a průměrný obsah ERT+ininu (0,828 %). Nejnižší průměrná relativní plocha Area% (90,36 %) a nejvyšší průměrný obsah ERT+ininu (0,864 %) byly zjištěny po 6hodinové extrakci. Stabilitní studií vzorků byla zjištěna nejvyšší průměrná plocha Area% (92,81 %) po 2 hodinách extrakce a nejvyšší průměrný obsah ERT+ininu (0,888 %) po 4 hodinách extrakce.

Zjištěné výsledky (tab. č. 5) vykazují v porovnání s ostatními rozpouštědly nejnižší hodnoty sledovaných parametrů, které jsou pravděpodobně způsobeny vysokou polaritou rozpouštědel a tím brání extrakci ergotaminu. [50] Porovnáním vzorků a vzorků ze stabilitní studie vyplývá, že obsah námelových alkaloidů je srovnatelný a vzorky jsou stabilní i použitím tohoto rozpouštědla, proto ether:etanol můžeme zařadit mezi méně účinná rozpouštědla používaná při extrakci EA.

Tabulka č. 5: Zjištěné obsahy ERT+ininu v rozpouštědle ether:etanol

doba (hod.)	ØArea % (ERT+inin)	ERT+inin (hm%)	ØERT+inin (hm%)	stabilitní studie	
				ØArea % (ERT+inin)	ØERT+inin (hm%)
2	94,84 ^a	0,803	0,803	92,81 ^b	0,883
		0,802			
4	91,28 ^c	0,821	0,828	89,48 ^e	0,888
		0,835			
6	90,36 ^d	0,869	0,864	89,36 ^f	0,863
		0,858			

6.5 Rozpouštědlo toluen:etanol

Nejvyšší průměrná relativní plocha Area% (86,74 %) byla naměřena po 4hodinové extrakci a nejvyšší průměrný obsah ERT+ininu (0,989 %) byl naměřen po 6 hodinách extrakce. Nejnižší průměrná relativní plocha Area% (85,33 %) a nejnižší průměrný obsah ERT+ininu (0,973 %) byl naměřen po 2hodinové extrakci. Stabilitní studií vzorků byla naměřena nejvyšší relativní plocha Area% (86,95 %) po 2hodinové extrakci a nejvyšší průměrný obsah ERT+ininu (1,032 %) po 6 hodinách extrakce.

Získané výsledky uvedené v tabulce č. 6 ukazují opět na nižší hodnoty pravděpodobně způsobené koncentrací vody v rozpouštědle, která brání rozpouštění a extrakci ergotaminu. [50,51] Z námele se vyextrahovaly další alkaloidy, které ovlivnily výtěžnost ergotaminu z námele. Zvyšující se dobou extrakce, se zvyšuje obsah ergotaminu.

Tabulka č. 6: Zjištěné obsahy ERT+ininu v rozpouštědle toluen:etanol

doba (hod.)	ØArea % (ERT+inin)	ERT+inin (hm%)	ØERT+inin (hm%)	stabilitní studie	
				ØArea % (ERT+inin)	ØERT+inin (hm%)
2	85,33 ^f	0,984	0,973	86,95 ^c	1,007
		0,962			
4	86,74 ^d	0,946	0,983	87,49 ^a	1,021
		1,019			
6	85,92 ^e	0,972	0,989	87,34 ^b	1,032
		1,007			

6.6 Rozpouštědlo 90% metanol_neodpařeno

Nejnižší průměrná plocha Area% (84,43 %) byla naměřena u vzorku, který byl extrahován po dobu 60 min. a zároveň v této době byl naměřen nejvyšší průměrný obsah ERT+ininu (1,16 %). Ze statistické analýzy dat jednotlivých vzorků vyplývá, že průměrné obsahy ERT+inin jsou rozdílné délkou analýzy. Po 10minutové extrakci byla naměřena průměrná plocha Area% (85,88 %) a průměrný obsah ERT+ininu (1,111 %), po 20minutách extrakce se průměrná plocha Area% (85,39 %) snížila a průměrný obsah ERT+ininu (1,134 %) se zvýšil.

Extrakční činidlo (90% metanol) použito při této analýze se používá při rozpouštění extrahovaných a odpařených vzorků [48], proto bylo zařazeno do této práce. Tato extrakce probíhala bez odpaření získaného extraktu a působením jiné doby extrakce než bylo použito v předchozích analýzách, proto nemůžeme získané výsledky porovnávat s výsledky z předešlých analýz. Při analýze bylo zjištěno, že výtěžnost získána tímto způsobem extrakce je největší. Pravděpodobně se v tomto rozpouštědle námelové alkaloidy dobře rozpouštěly, mohlo to být způsobeno tím, že metanol je alkohol, ve kterém se EA dobře rozpouštějí. [51] Na dobrou výtěžnost mohly mít vliv další faktory jako např. způsob extrakce, kdy byl vzorek námele extrahován bez odparku a následně analyzován. Při samotné extrakci dochází ke ztrátám, které mohou způsobit změnu obsahu proti skutečnému obsahu. Také u tohoto extrakčního činidla platí, že se zvyšující se dobou extrakce se zvyšuje obsah ergotaminu.

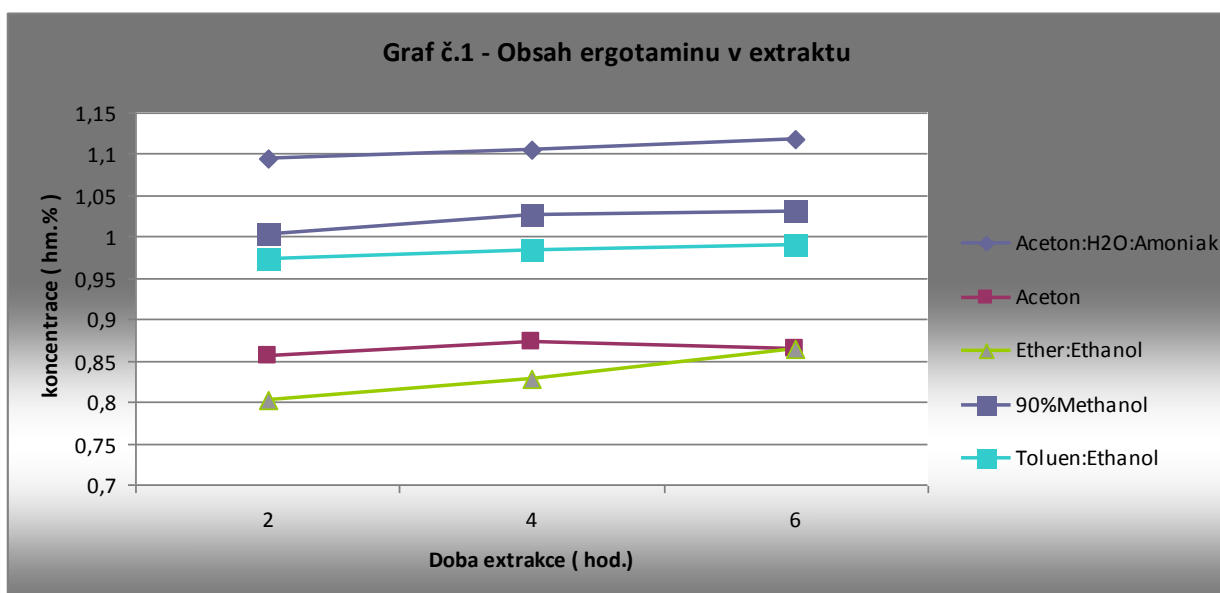
Tabulka č. 7: Zjištěné obsahy ERT+ininu v rozpouštědle 90% metanol_neodpařeno

doba (min.)	ØArea % (ERT+inin)	ERT+inin (hm%)	ØERT+inin (hm%)
10	85,88^b	1,114	1,111
		1,102	
		1,118	
20	85,39^c	1,126	1,134
		1,138	
		1,138	
30	86,06^a	1,139	1,142
		1,141	
		1,146	
60	84,43^d	1,158	1,16
		1,167	
		1,155	

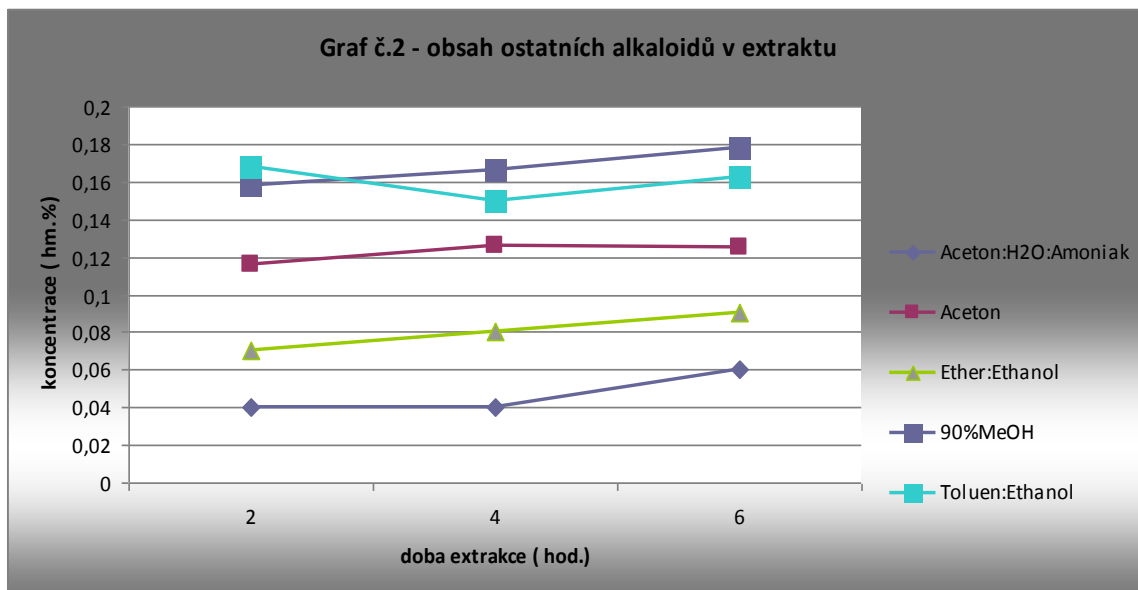
6.7 Porovnání obsahů ergotaminu a ostatních nečistot získaných z jednotlivých extrakčních činidel

Vyhodnocení účinnosti extrakce je graficky znázorněno v podobě trendů koncentrací ergotaminu (graf č. 1) a ostatních alkaloidů (graf č. 2) v jednotlivých extraktech všech použitých rozpouštědel. Z obou grafů je patrný trend zvyšující se koncentrace jak ostatních alkaloidů, tak ergotaminu v extraktu s prodlužující se dobou extrakce, což je v souladu s teoretickými principy extrakce. [51]

Z hlediska účinnosti byla použita rozpouštědla rozdělena do tří skupin. Nejúčinnějším rozpouštědlem pro ergotamin byl amoniakový aceton. Koncentrace ergotaminu v extraktu po 6 hodinách byl o 20 % vyšší než u nejméně účinných rozpouštědel, kterými byly společně aceton a směs éter-etanol. Průměrnou extrakční účinnost vykazovala rovněž dvojice rozpouštědel, a to směsi metanolu a vody a metanolu a toluenu. U směsi metanolu a vody byla snižená účinnost způsobena pravděpodobně koncentrací vody v rozpouštědle, které bránilo rozpouštění a extrakci ergotaminu. Ten samý efekt byl u směsi toluen-etanol, rozpustnost ergotaminu v toluenu byla také velmi nízká.



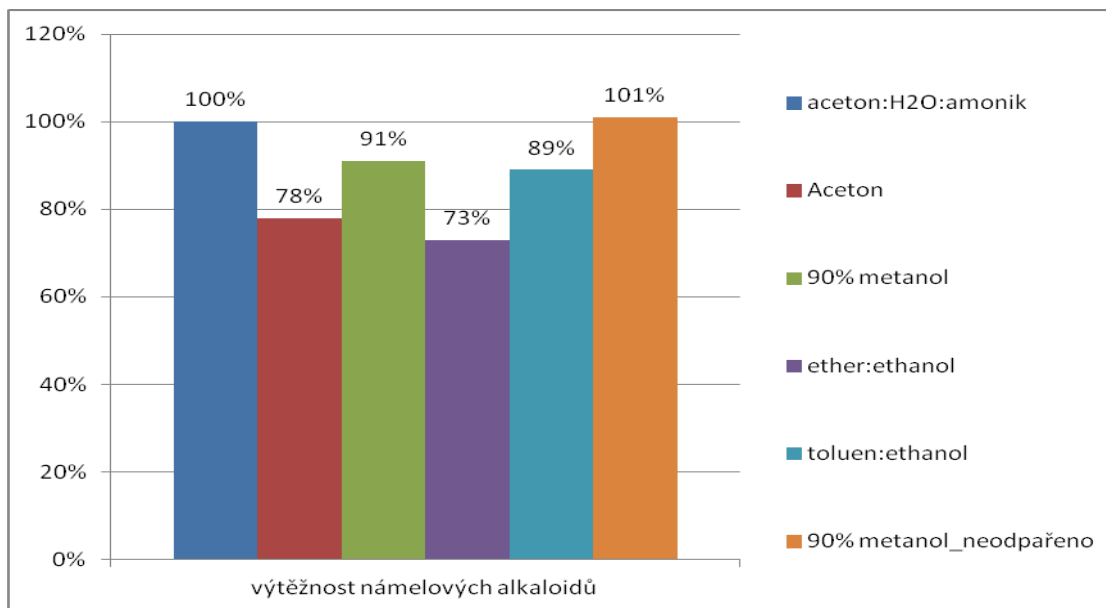
Graf č. 1 – Obsah ergotaminu v extraktu



Graf č. 2 – Obsah ostatních alkaloidů v extraktu

6.8 Přehled výtěžnosti námelových alkaloidů jednotlivých rozpouštědel

V grafu č. 3 jsou přepočítány a shrnuty výsledky všech rozpouštědel a vyhodnocena výtěžnost jednotlivých rozpouštědel. Hodnoty jsou vztaženy na rozpouštědlo aceton:26% amoniak:H₂O, které se používá při běžném technologickém zpracování. Nejvyšší výtěžnost (101,1 %) byla získána extrakcí námelových alkaloidů z rozpouštědla 90% metanol-neodpařeno. Druhým nejlepším extrakčním činidlem je aceton:voda:amoniak, kde je výtěžnost 100%. Průměrná výtěžnost (91%) a (89 %) byla získána z rozpouštědel 90% metanol a toluen:etanol. Z extrakčního činidla aceton bylo získáno 78 % výtěžnosti námelových alkaloidů. Nejnižší výtěžnost 73 % byla zjištěna při použití rozpouštědla ether:etanol.



Graf č. 3: Přehled výtěžnosti námellových alkaloidů jednotlivých rozpouštědel

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak významný vliv má použité rozpouštědlo na extrakci účinných látek z námelové drogy ergotaminu. Bylo vybráno 5 různých extrakčních činidel, včetně rozpouštědla aceton:voda:amoniak standardně používaného pro tuto metodu v praxi. Další použitá extrakční činidla byla ether:etanol, aceton, metanol, toluen:etanol.

První variantou přípravy byl vzorek námele extrahován v rozpouštědlech aceton:amoniak:voda, ether:etanol, aceton, toluen:etanol. Nejúčinnějším rozpouštědlem pro extrakci ergotaminu z námele bylo rozpouštědlo aceton:voda s přidavkem amoniaku. Průměrná extrakční účinnost byla zjištěna u směsi metanolu a vody a metanolu a toluenu, snížená účinnost byla pravděpodobně způsobena koncentrací vody v rozpouštědle, která bránila extrakci námelových alkaloidů. Ten samý efekt byl u směsi toluen:etanol, kdy rozpustnost ergotaminu v toluenu byla velmi nízká.

Druhou variantou byly vzorky námele extrahovány a analyzovány odlišným postupem přípravy, vzniklým zjednodušením stávající metody s použitím rozpouštědla 90% metanolu. Výsledky získané z této analýzy byly překvapivě nejvyšší.

Třetí varianta měla ověřit stabilitu vzorků alkaloidů vyextrahovaných z námele. Vzorky byly po extrakci odpařeny a poté uchovány po dobu pěti dní při teplotě 2 – 8 °C.

Ukázalo se, že s prodlužující se dobou extrakce se zvyšuje výtěžnost námelových alkaloidů. Dále bylo zjištěno, že vzorky jsou i po pěti dnech přípravy stabilní. Vzorky získané analýzou vzorku připraveného odlišným způsobem byly oproti předpokladu vyšší než u rozpouštědla používaného v praxi. Tento fakt může do praxe přinést zvýšení efektivity při analýzách vzorků námele.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PŘÍHODA, J. SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M.: *Atlas obilnin* 1. vyd. Státní zemědělské nakladatelství v Praze, 1958. počet stran 280
- [2] MANN, J.: MANN, J. *Jedy, drogy, léky*. Academia, nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha, 1996, počet stran 203, ISBN 80-200-0508-0
- [3] TUDZYNSKI, P. CORREIA, T., KELLER, U.: *Biotechnology and genetics or ergot alkaloids*. Springer Berlin, 2001
- [4] CVAK, L. KŘEN, V. *Ergot, The Genus Claviceps*. Harwood Academic Publisher, The Netherlands, 1999, počet stran 518, ISBN 90-5702-375-X.
- [5] HOFFMAN A., VERLAG, E. F. *Die Mutterkornalkaloide*. Stuttgart, 1964, počet stran 354
- [6] OPLETAL, L., ŠIMERDA B. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Výzkumný ústav pro výživu zvířat Praha-Uhřetěves, Hradec Králové, Šumperk, červen 2009
- [7] HESSE, M. *Alkaloids. Nature's Curse or Blessing?* VHCA, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich (Switzerland) 2000., počet stran 395, ISBN 0-906390-24-1
- [8] PELETIER, W. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. volume 15, Elsevier Science Ltd., UK, 2001, počet stran 635, ISBN 0-08-044025-8
- [9] ŘEHÁČEK, Z. SAJDL P. *Ergot alkaloids. Chemistry, Biological Effects, Biotechnology*. Academia, Prague 1990, počet stran 384, ISBN 80-200-0283-9
- [10] BRUNETON, J. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. 2. vydání, Technique Documentation, 1999. počet stran 1119, ISBN 189829863, 9781898298632
- [11] CVAK, L. *Nové peptidické námelové alkaloidy a jejich deriváty*. Disertační práce. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 2000

[12] OLŠOVSKÁ, J. *Izolace a identifikace námelových alkaloidů a jejich využití jako chorálních selektorů v HPLC*. Disertační práce. Univerzita Karlova, Praha 1999

[13] MANSKE, R. H. F. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. Volume XV., Academic Press, INC. London 1975. počet stran 315, ISBN 0-12-469545-9

[14] SAJDL, P. *Biosyntéza námelových alkaloidů a její regulace*. Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha, 1989, počet stran 69

[15] ŘEHÁČEK, Z., SAJDL, P. *Námelové alkaloidy a jejich deriváty*. Academia, nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 1983, počet stran 129, 509-21-827

[16] KŘEN, V. *Submerzní produkce elymoklavinu volnými a imobilizovanými buňkami houby Claviceps*. Kandidátská a disertační práce Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha 1987

[17] ONDREJKOVIČOVÁ, I., BAKOŠOVÁ M., HOJEROVÁ J., JANTOVÁ S., KASZONYI A., KLEIN E., KOREŇOVÁ A., KOVAŘÍK P., REMKO M., SCHMIDT Š., ŠTEFÁNIKOVÁ S. *Pokroky v chémii a v biológii, vyššia kvalita života*. 1. vydanie, Slovenská technická univerzita ve vydavatelství STU, Bratislava 2008, počet stran 98, ISBN 978-80-227-2932-1

[18] CORDELL, G. A. *Chemistry and Biology*. Academic Press, London 1990, počet stran 591, ISBN 0-12-469550-7

[19] ANONYM: Námel-Syngenta.

<http://www.syngenta.com/country/cz/cz/reseni-syngenta/choroby/Pages/namel.aspx>

[online, cit. 2012-4-10]

[20] ANONYM: Mykologie. mykoweb.prf.jcu.cz/mykologie2010.pdf [online, cit. 2012-4-10]

[21] ANONYM: www.sos-veseli.cz/download/Obilniny.ppt [online, cit. 2012-4-10]

[22] KUČHTÍK, F., PROCHÁZKA, I., TEKSL, M., VALEŠ, J. *Pěstování rostlin II. - Celostátní učebnice pro střední zemědělské školy*. Nakladatelství FEZ, Třebíč, 1995

[23] SCHLEGEL, R. "Rye (*Secale cereale* L.) - a younger crop plant with bright future". In R. J. Sing and P. Jauhar. *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Vol. II Cereals*, CRC Press, Boca Raton, 2006, ISBN 0849314305

[24] DUDÁŠ, F., PELIKÁN, M. *Využití produktů rostlinné výroby*. ES VŠZ v Brně, 1989, počet stran 247

[25] JIRGLOVÁ, M. *Hybridní žito s vyšší odolností proti námelu*. Zemědělec, odborný a stavovský týdeník, 2009, č. 29 15-20 s.

[26] ULMAN, L. *Agrotechnika ozimého žita*. Metodiky pro zavádění výsledků výzkumů do praxe, 1971, počet stran 20

[27] TRISVAJTSKIJ, L. A. *Skladování obilí*. SZN Praha, 1954, počet stran 349

[28] GUYTON, Arthur C., HALL, John E. *Textbook of Medical Physiology*. 11. vydání. Elsevier, 2006. počet stran 709; ISBN 978-0-7216-0240-0

[29] LÜLLMANN H., MOHR K., WEHLING M. *Pharmakologie und Toxikologie*. Praha 2004, počet stran 725, ISBN 8024708361 9788024708362

[30] HYNIE, S. *Obecná farmakologie*. díl 1. Praha - Karolinum, 2000, počet stran 499, ISBN 80-7066-778-8

[31] HYNIE, S. *Obecná farmakologie*. díl 2. Praha - Karolinum, 2000, počet stran 499, ISBN 80-7066-779-6

[32] HYNIE, S. *Farmakologie v kostce*. nakladatelství Triton, Praha, 2009, počet stran 520, ISBN 80-7254-181-1

[33] LEHRER J. *How we decide*. Publishing Company, New York, 2009, počet stran 302, ISBN 978-0-618-62011-1

[34] ANONYM: *What is Serotonin*.
<http://www.whatisserotonin.com/> [online, cit. 2012-4-10]

[35] TERENCE, K. *Pokrm bohů: hledání pravého stromu poznání*. DharmaGaia, Praha, 1999, počet stran 396, ISBN 80-86013-85-5

[36] WHITE, J. F., Jr., BACON, CH. W., HYWEL-JONES, N., SPATAFORA, J. W. *Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol and Cultural Impacts*. This edition Publisher in the Taylor & Francis e-Library, New York, 2005, počet stran 537, ISBN: 0-8247-4255-9

[37] SWAN, G. A. *An Introduction to the Alkaloids*. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1967, počet stran 326

[38] ANISZEWSKI, T. *Alkaloids – Secrets of Life: Alkaloids chemismy, biological, significance, applications and ecological role*. The Netherlands, UK, 2007, počet stran 316, ISBN 978-0-444-52736-3

[39] ROBERTS, M. F., WINK, M. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Application*. Plenum Press, New York, 1998, počet stran 459, ISBN 0-306-45465-3

[40] ANONYM: Princip HPLC.
<http://www.hplc.cz/Teorie/uvod.html#top> [online, cit. 2012-4-10]

[41] WATERS: HPLC - High Performance Liquid Chromatography.
http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US
[online, cit. 2012-4-10]

[42] HANAI, T. *HPLC – a Practical Guide*. Published by The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK, 1999, počet stran 137, ISBN 0-85404-515-5

[43] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Učebnice základů instrumentálních analytických metod. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003. ISBN 80-902155-0-5

[44] SCHOENMAKERS, P. J. *Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development*. Elsevier Science Publishers B.V., 1986, počet stran 345, ISBN 0-444-42681-7

[45] HIEFTJE, G. M., TRAVIS, J. C., LYTLE, F. E. *Laser in Chemical Analysis*. The Human Press, USA 1981, počet stran 280, ISBN 0-89603-027-X

[46] BAKER, G., DUNN, S., HOLT, A. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Practical Neurochemistry Method*. Abel Lathja, New York 2007, počet stran 485. ISBN 13:978-0-978-387-30359-8

[47] PARRIOT, D. *A Practical guide to HPLC detection*. Academia Press, 1993, počet stran 293

[48] Miroslav Petrakovič: Interní metodika ID:C-GA-AM-QC-LC239 *Ergot alkaloids: Crude concentrate, Ergot Drug, Water Bases (GAL 012, GAL020, GAL130, GAL310 and GAL404) and intermediates (ergotamine, ergocristine and ergokryptine) – determination of identity, relative content of individual alkaloids and assay by HPLC*. Teva Czech Industries s.r.o. Opava 2011

[49] JANDERA, P., CHURÁČEK, J. *Gradient Elution in column Liquid Chromatography: Theory and Practice*. vol. 31, Elsevier, Amsterdam 1985, počet stran 510, ISBN 0-444-42121-6

[50] VERPOORTE, A., SVENDSEN, A. B. *Chromatography of Alkaloids*. vol. 23 B, Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, NY 10017, 1984, počet stran 466, ISBN 0-444-42265-X

[51] MOFFAT, A. C., OSSELTON, D. M., WIDDOP, B., CLARKE, E. G. C. *Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem materil.* svazek 1, Pharmaceutical Press, 2004, počet stran 1931

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC	Hight Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV/VIS	Ultraviolet-Visible, ultrafialová a viditelná oblast světla
EA	Námelové alkaloidy
LSD	Diethylamind kyseliny lysergové
ERT	Ergotamin
H₂O	Voda
RF	Responzní faktor

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Ergolin	14
Obrázek 2	6,7 sekoergolen	15
Obrázek 3	Ergolen	15
Obrázek 4	Ergolenové kyseliny	16
Obrázek 5	Deriváty kyseliny lysergové (Ergin, Ergometrin)	17
Obrázek 6	Ergopetiny	17
Obrázek 7	Námel – růžkovité útvary [19]	19
Obrázek 8	Shrnutí životního cyklu námele [20].....	20
Obrázek 9	Ergolinový skelet a neuroreceptory	24
Obrázek 10	Langmuirova isoterma [33]	30
Obrázek 11	Typický tvar křivky, popisující hustotu pravděpodobnosti Gaussova rozdělení [40]	30
Obrázek 12	Kolona kapalinové chromatografie [33]	31
Obrázek 13	Schéma kapalinové chromatografie [40]	33
Obrázek 14	Chromatogram ERT námelových alkaloidů při extrakci směsi aceton:H ₂ O:amoniak	40
Obrázek 15	Chromatogram ERT námelových alkaloidů při extrakci směsi 90% metanol.....	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Příprava a výpočet kalibrační křivky.....	39
Tabulka 2	Zjištěné obsahy ERT+ininu rozpouštědla aceton:H ₂ O:amoniak	43
Tabulka 3	Zjištěné obsahy ERT+ininu rozpouštědla aceton.....	44
Tabulka 4	Zjištěné obsahy ERT+ininu rozpouštědla 90% metanol	45
Tabulka 5	Zjištěné obsahy ERT+ininu rozpouštědla ether:ethanol.....	46
Tabulka 6	Zjištěné obsahy ERT+ininu rozpouštědla toluen:ethanol.....	46
Tabulka 7	Zjištěné obsahy ERT+ininu rozpouštědla 90% metanol_neodpařeno.....	47

SEZNAM PŘÍLOH

P I: ŽITNÝ NÁMEL (*SECALE CORNUTUM*)

PŘÍLOHA P I: ŽITNÝ NÁMEL (*SECALE CORNUTUM*)

