



Středoškolská technika 2019

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

ALKALOIDY U VYBRANÝCH ROSTLIN Z ČELEDI *ASTERACEAE*

Ondřej Klusák

Gymnázium, Kadaň, 5. května 620, p. o.

5. května 620, 432 01 Kadaň

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Kadani dne 14. března 2019

Ondřej Klusák

Poděkování

Chtěl bych velice poděkovat PaedDr. Haně Kožíškové za její ochotnou pomoc v průběhu mé práce, četné konzultační schůzky, fotografie, studijní materiály, užitečné rady a komentáře.

Dále bych rád poděkoval PharmDr. Anně Hošťálkové, Ph.D. za vedení během práce v laboratoři i odborné vypracování práce; za cenné rady, poskytnutí studijních materiálů, a především za doporučení tématu.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Farmaceutické fakultě UK zejména katedře farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí.

Anotace

Tato práce se zabývá hledáním a následným určením alkaloidů u vybraných rostlin z čeledi *Asteraceae*. V práci jsou obsaženy nově zjištěné poznatky o účincích nalezených alkaloidů vůči lidským cholinesterasám (AChE, BuChE) podílejících se na odbourávání ACh na synapsi, jehož funkce se u pacientů s AD zhoršuje. Dále práce obsahuje výsledky měření cytotoxicity alkaloidů vůči nádorovým buňkám.

Klíčová slova

alkaloid; cholinesterasa; *Asteraceae*; Alzheimerova choroba; cytotoxicita

Annotation

This work is about finding and resulting determination of alkaloids of selected plants in the family *Asteraceae*. In this work is also contained newly discovered finding about effects of discovered alkaloids to human cholinesterases (AChE, BuChE) participate in elimination of ACh in a synapse, whose function is worsened at people with AD. Then the work contains results of cytotoxic measurements of alkaloids to tumoral cells.

Keywords

alkaloid; cholinesterase; *Asteraceae*; Alzheimer's disease; cytotoxicity

Seznam zkratek

AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesterasa
A β	Amyloid beta
BuChE	butyrylcholinesterasa
E	extrakt
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50% inhibici enzymu
TLC deska	tenkovrstvá chromatografie
w/v	weight/volume – hmotnost podílu/objem celku

Obsah

- 1 Úvod8
- 2 Cíle práce9
- 3 Metodika10
- 4 Teoretická část12
 - 4.1 Choroby12
 - 4.1.1 Neurodegenerativní onemocnění12
 - 4.1.2 Nádorová onemocnění13
 - 4.2 Rostliny14
 - 4.2.1 Čeleď Asteraceae14
 - 4.2.2 Seznam rostlin15
- 5 Experimentální část19
 - 5.1 Vytvářecí směsi19
 - 5.2 Pomocné materiály20
 - 5.3 Detekční činidla20
 - 5.4 Chromatografické absorbenty21
 - 5.5 Rozpouštědla21
 - 5.6 Chemikálie21
 - 5.7 Přístroje22
 - 5.8 Obecné postupy23
 - 5.9 Metody24
 - 5.10 Postupy25
 - 5.10.1 Postup práce v roce 201725
 - 5.10.2 Postup práce v roce 201827
- 6 Výsledky31
 - 6.1 Přítomnost alkaloidů31
 - 6.2 Určení alkaloidů33
 - 6.3 Inhibiční účinky alkaloidů vůči AChE a BuChE34
 - 6.4 Cytotoxicita alkaloidů vůči vybraným nádorovým buňkám35
- 7 Závěr36
- 8 Diskuze37
- 9 Zdroje38

1 ÚVOD

Již od nepaměti se lidé při léčbě různých nemocí obraceli k bylinám, protože si uvědomovali, že všechno, co v přírodě najdou, je léčivé. Každá rostlina, nerost i živočich. Mít zásadní důvěru k přírodě byla hlavní společná vlastnost léčitelů všech dob a známých kultur.

Vždyť i sám slavný švýcarský alchymista a lékař Paracelsus prohlásil, že proti každé chorobě vyrostla nějaká rostlina [1]. Nesmíme ovšem zapomenout, že v dřívějších dobách lidé neznali přesnou podstatu nemocí a už vůbec ne účinky rostlin. Jaké účinky má konkrétní rostlina se zjišťovalo pouze pomocí pokusů a omylů. V té době se také vůbec neuvažovalo o tom, že by se daly z rostlin izolovat čisté účinné látky. Hlavní zlom přišel až v 19. století, kdy se poprvé povedlo účinné látky izolovat a také zkoušet měnit jejich strukturu, jímž se začala rozvíjet výroba samotných syntetických organických molekul. I když v dnešní době jsou veliké možnosti výroby syntetických léčiv, zůstává příroda nadále hlavním zdrojem nových látek [2].

Ve své práci se zabývám výskytem alkaloidů u vybraných rostlin z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*) a jejich určením. Na dané téma mě přivedla moje odborná konzultantka práce PharmDr. Anna Hošťálková, Ph.D., která pracuje jako odborná asistentka na katedře farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

Danou práci jsem si vybral především pro svůj zájem o studium farmacie a botaniky. Možnost pracovat v rámci SOČ na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové můj zájem o farmacii ještě posílila.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem mé práce bylo prozkoumat alkaloidy u vybraných rostlin z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*).

Stanovil jsem si tyto dílčí cíle:

1. Zjistit přítomnost alkaloidů u vybraných rostlin z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*).
2. Určit nalezené alkaloidy.
3. Provést testy na inhibiční účinky alkaloidů vůči AChE a BuChE.
4. Změřit cytotoxicitu alkaloidů vůči vybraným nádorovým buňkám.

3 METODIKA

První sběr rostlin proběhl v srpnu 2017, kdy bylo celkem sesbíráno cca 5 kvetoucích rostlin s kořeny od 7 vybraných zástupců rostlin z čeledi hvězdnicovitých:

bodlák obecný (*Carduus acanthoides* L.)
pupava obecná (*Carlina vulgaris* L.)
pcháč rolní (*Cirsium arvense* (L.) Scop.)
pcháč bělohlavý (*Cirsium eriophorum* (L.) Scop.)
pcháč obecný (*Cirsium vulgare* (Savi) Ten.)
bělotrn kulatohlavý (*Echinops sphaerocephalus* L.)
ostropes trubil (*Onopordum acanthium* L.)

Místem sběru se pro mě stal především bývalý kadaňský kaolinový lom, který se nachází na východním okraji města. Rostliny s větší hmotností byly po usušení ještě rozděleny na kořenovou část a naťovou část. Celkem bylo vytvořeno 11 vzorků (a k nim i kódy). Poté byly vzorky rostlin poslány na hradeckou fakultu. Zde byly zváženy (viz tabulka 1).

V září 2017 jsem navštívil hradeckou fakultu, kde jsem se účastnil vytvoření EtOAc extraktů z vybraných rostlin, ze kterých byla poté zjišťována přítomnost alkaloidů (+ jejich přesné určení), inhibiční účinky alkaloidů vůči lidským cholinesterasám a cytotoxicita alkaloidů vůči vybraným nádorovým buňkám.

Tabulka 1: Hmotnost jednotlivých nasbíraných rostlin

Kód	Rostlina	Část	Množství drogy [g]
AL-644	<i>Carlina vulgaris</i> L.	nať+kořen	24,0
AL-645	<i>Echinops sphaerocephalus</i> L.	Nať	109,5
AL-646	<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Ten.	Nať	117,7
AL-647	<i>Carduus acanthoides</i> L.	nať+kořen	38,7
AL-648	<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	nať+kořen	35,1
AL-649	<i>Cirsium eriophorum</i> (L.) Scop.	Kořen	33,2
AL-650	<i>Echinops sphaerocephalus</i> L.	Kořen	19,2
AL-651	<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Ten.	Kořen	12,1
AL-652	<i>Onopordum acanthium</i> L.	Kořen	19,6
AL-653	<i>Onopordum acanthium</i> L.	Nať	259,3
AL-654	<i>Cirsium eriophorum</i> (L.) Scop.	Nať	135,2

Další sběr byl uskutečněn z důvodu výsledků inhibičních účinků vůči lidským cholinesterasám (viz tabulka 2). Tento sběr byl naplánovaný na červenec 2018, při kterém bylo nasbíráno velké množství bodláku obecného (*Carduus acanthoides* L.).

Místem sběru se znovu stal především bývalý kaolinový lom a další okrajové části města. Po usušení bylo naváženo 4,965 kg sušené drogy, která byla poslána na hradeckou fakultu.

Poté jsem uskutečnil druhou návštěvu hradecké fakulty (srpen 2018), kdy jsem znovu pomáhal na vytvoření EtOAc a CHCl_3 extraktů, se kterými se dále pracovalo (určení alkaloidů atd.).



Obrázek 1: Bývalý kadaňský kaolinový lom (foto: autor 2018)



Obrázek 2: První sběr rostlin (foto: Hana Kožíšková 2017)

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Choroby

4.1.1 Neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní choroby jsou stavy, při kterých z dosud neznámé příčiny dochází k dezintegraci nervového systému. Jsou způsobeny pozvolným a nenávratným zánikem již vyvrálých neuronů a vznikem gliových jizev. U některých neurodegenerativních chorob jsou postiženy jen určité neurony spojené anatomicky či funkčně, u jiných jsou postiženy neurony méně selektivně (např. Alzheimerova choroba) [3].

Alzheimerova choroba

Alzheimerova nemoc (AD) patří mezi nejčastější a svým sociálním dopadem také k nejzávažnějším typům neurodegenerace a je rovněž nejčastější příčinou demence (přes 60 % případů). Hlavními příznaky je ztráta paměti a dalších kognitivních funkcí (např. špatná orientace v prostoru či poruchy řeči). Dále se u pacienta objevují poruchy chování a nálady [3].

Ačkoliv pravá příčina onemocnění dosud nebyla zjištěna, byla popsána celá řada patologických procesů, které onemocnění doprovázejí, například nadměrná tvorba $A\beta$, jeho agregace a vznik senilních plaků, vytvoření neurofibrilárních klubek z proteinu τ (tangles), tvorba volných radikálů, mitochondriální dysfunkce, zánět neuronů, porucha metabolismu ACh a další [4].

Konečným důsledkem zmíněných procesů je pak apoptický již nezvratný zánik neuronů [3].

Doposud neexistuje žádný lék na Alzheimerovu nemoc, jen přípravky, které prodlužují pacientovi život. Protože se zjistilo, že tyto přípravky působí stejně dobře na enzym acetylcholinesterasu (AChE), jsou označovány jako inhibitory AChE. To znamená, že AChE funguje jako ukazatel účinku vybrané látky tak, jak by reagoval na Alzheimerovu chorobu. AChE patří mezi enzymy, které se podílejí na odbourávání ACh v nervových synapsích během přenosu nervového vzruchu, čímž tlumí jeho působení na synapsi [5]. Během AD dochází ke snížení syntézy i uvolňování ACh do synapsí. Množství AChE se ale nemění a navíc se do odbourávání ACh zapojuje také BuChE (začíná se zvyšovat její koncentrace v mozku) [6].

4.1.2 Nádorová onemocnění

Jedná se o skupinu různorodých civilizačních chorob, jejichž společným rysem je ztráta kontroly organismu nad buněčným bujením a rozmnožováním. Dochází tak ke vzniku nekontrolovatelných souborů buněk tkání – nádorů. Po kardiovaskulárních onemocněních se řadí na druhé místo nejčastějších příčin úmrtí. I když medicína během let učinila řadu pokroků v léčbě těchto onemocnění, lze předpokládat v krátké době další prudký nárůst počtu nemocných pacientů (uvádí se, že v roce 2030 dojde až ke ztrojnásobení celkového počtu pacientů s nádorovým onemocněním) [7].

Hlavní příčinou tohoto nárůstu je stárnutí populace a špatný životní styl. Mezi nepříznivé civilizační faktory, které jsou spojeny s rizikem vzniku nádorového onemocnění, patří kouření, nedostatek fyzické aktivity, stres, zvýšená konzumace alkoholu, obezita a v neposlední řadě i nadměrné a nechráněné (bez použití krémů s UV filtrem) slunění [7].

K nejčastějším nádorovým onemocněním patří především nádory plic, prostaty, žaludku (u mužů) a nádory prsu, děložního čípku a tlustého střeva (hlavně u žen) [8].

Léčba nádorových onemocnění probíhá kombinací chirurgie, radioterapie, chemoterapie, transplantací kostní dřeně, hormonální terapie a psychologických přístupů. Protože je již známo několik druhů nádorových onemocnění, musí se u každého pacienta individuálně vybrat správná kombinace výše zmíněných terapií [7].

4.2 Rostliny

4.2.1 Čeleď Asteraceae

Taxonomické řazení a klasifikace

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheophyta*)

Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída: vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

Řád: hvězdicotvaré (*Asterales*)

Čeleď: hvězdicovité (*Asteraceae*)

Rostliny této čeledi tvoří druhově nejpočetnější čeleď dvouděložných rostlin (zhruba 25 000 druhů). Drobné květy skládají charakteristické úbory podepřené zákrovem z listenů. Květy jsou oboupohlavné i jednopohlavné, buď pravidelné (trubkovité květy) nebo souměrné (jazykovité květy). Kalich bývá většinou přeměněn v chmýr, nebo může také chybět. Tyčinek je celkem pět a se svými prašníky srůstají v trubičku. Pestík je vždy dvouplocholístový, spodní semeník dozrává v nažku, která je obvykle opatřena chmýrem (anemochorie), popř. ostny či háčky (zoochorie) [9].

Typickým znakem všech rostlin v této čeledi je přítomnost zásobního polysacharidu inulinu, který má funkci nahradit obvyklý škrob (u mnoha zástupců se v pletivech vyskytují článkované mléčnice). Hvězdicovité mají celosvětové rozšíření [9].

4.2.2 Seznam rostlin

Bodlák obecný (*Carduus acanthoides* L.)

Jedná se o hustě ostnitou vytrvalou dvouletou rostlinu, dorůstající přibližně metrové výšky, od poloviny přímo větvenou. Plodem je nažka s centimetrovým chmýrem. Roste především na polích, při cestách a na rumištích. Má ráda výhřevné, vysychavé, písčitohlinité půdy. Kvetे od června do září [10].



Obrázek 4: Bodlák obecný (foto: autor 2018)



Obrázek 3: Bodlák obecný (foto: autor 2018)

Pupava obecná (*Carlina vulgaris* L.)

Dvouletá, planě rostoucí rostlina s přímou, až 0,4 m vysokou lodyhou, jednoduchou nebo i v horní části chudě větvenou. Nalezneme ji růst na suchých výslunných kopcích, pastvinách, u cest či ve světlých lesích. Roste od července do září [10].



Obrázek 5: Pupava obecná (foto: Hana Kožíšková 2017)



Obrázek 6: Pupava obecná, detail úboru (foto: Hana Kožíšková 2017)

Pcháč rolní (*Cirsium arvense* (L.) Scop.)

Přes 1 m vysoká vytrvalá rostlina s přímou lodyhou, až nahoru listnatou a nahoře větvenou. Jedná se o velmi obtížně zlikvidovatelný plevel šířící se snadno podzemními (oddenkovými) výběžky [11]. Roste hojně podél cest, opuštěných polí, na rumišťích či na lesních světlinách. Kvete od června do října [12].



Obrázek 7: Pcháč rolní (foto: Hana Kožíšková 2017)



Obrázek 8: Pcháč rolní (foto: Hana Kožíšková 2017)

Pcháč bělohlavý (*Cirsium eriophorum* (L.) Scop.)

Dvouletá rostlina dorůstající 1,5 m s přímou a beztrnnou lodyhou. Všechny listy jsou hustě štětinaté. Kulovitý zákrov je charakteristicky pavučinatě bíle vlnatý. Plodem jsou nažky s leskle bílým chmýrem. Vyskytuje se na teplých a pustých místech (např. u železnic či na rumišťích). Je řazen Červeným seznamem ČR mezi rostliny ohrožené (C3). Kvete od července do konce září [13].



Obrázek 9: Pcháč bělohlavý, detail kulovitého zákrovu (foto: Hana Kožíšková 2017)



Obrázek 10: Pcháč bělohlavý (foto: Hana Kožíšková 2017)

Pcháč obecný (*Cirsium vulgare* (Savi) Ten.)

Silně ostnatá dvouletka s až 1,5 m vysokou, po celé své délce ostnatou lodyhou. Patří mezi značně variabilní druhy. Roste především na slunných a otevřených místech. U nás se vyskytuje na rumišťích, pasekách a okrajích lesa. Obvykle kvete od června až do konce října [14].

Bělotrn kulatohlavý (*Echinops sphaerocephalus* L.)

Statná vytrvalá rostlina dorůstající výšky až 2 m. Lodyha je hranatá a zpravidla nevětvená. Patří mezi medonosné rostliny. Jejím původním domovem byly stepi a polopouště ve Střední Asii. Úbory jsou nahlouchené v kulovité strbouly (hlávky). Vyskytuje se především na rumišťích, v bývalých pískovnách a lomech či na skládkách. Rostlina kvete od konce června do začátku srpna [15].

Ostropes trubil (*Onopordum acanthium* L.)

Dvouletá rostlina dorůstající až přes 2 m se velice podobá statnému bodláku. Hustě vlnatě chlupaté listy vyrůstají v přízemní listové růžici. Plodem jsou velké nažky, světle hnědé. Lze ji spatřit na suchých pastvinách, pustých místech a na rumišťích. Kvete od začátku červa do srpna [16].



Obrázek 11: Ostropes tubil, detail květenství (foto: Hana Kožíšková 2017)



Obrázek 12: Ostropes tubil (foto: Hana Kožíšková 2017)

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Vytvájecí směsi

cHx + Aceton + NH₃ (30:60:2)

To + Aceton + EtOH + NH₃ (40:40:6:2)

To + EtOAc + DEA (25:70:5)

5.2 Pomocné materiály

Křemelina Celite C 535

Síran sodný bezvodý (Na_2SO_4)

Silikagel sušící perly

5.3 Detekční činidla

Činidlo Dragendorffovo (podle Muniera)

- vzniká smícháním roztoku A, roztoku B (v poměru 1:1) a roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody
- roztok A: je vytvořen z 1,7 g bazického dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné, které jsou rozpuštěny v 80 ml vody
- roztok B: je vytvořen rozpuštěním 16 g jodidu draselného v 40 ml vody
- činidlo používané pro detekci alkaloidů na chromatografických deskách; po postřiku činidla vznikají intenzivní oranžové skvrny

Činidlo jodoplatinátové

- vzniká smícháním 3 ml vodného roztoku hexachloroplaticité kyseliny s 97 ml vody a 100 ml 6 % vodného roztoku jodidu draselného
- fungovalo obdobně jako Dragendorffovo činidlo (= detektor alkaloidů na chromatografických deskách; po postřiku také vznikají různobarevné skvrny)

Činidlo Mayerovo

- vzniká přidáním 1,35 g práškového HgCl_2 do roztoku, ve kterém je 5 g KI rozpuštěno ve 30 ml vody
- činidlo bylo používáno během přípravy extraktu pro ověření přítomnosti alkaloidů (v případě přítomnosti alkaloidů dochází k vyloučení bílošedé sraženiny)

5.4 Chromatografické absorbenty

TCL Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, CZ) = TCL hliníkové fólie 20 x 20 cm (komerční desky)

Silicagel 60 GF₂₅₄ (Merck, CZ) = silikagel používaný na přípravu litých (skleněných) desek

5.5 Rozpouštědla

Aceton, p. a. (Penta)

Cyklohexan, č., cHx

Diethylether, p. a. (Penta), Et₂O

Ethanol 95% (Penta), EtOH

Ethylacetát, p. a. (Penta), EtOAc

Chloroform, č. (Penta), CHCl₃

Methanol, p. a. (Penta), MeOH

Methanol LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)

Toluen, p. a. (Penta), To

voda

5.6 Chemikálie

0,1M Fosfátový pufr, pH 7,4; chemikálie pro přípravu pufru: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema)

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, ≥ 98% (Sigma-Aldrich), DTNB

Acetylthiocholin jodid (Sigma- Adrich)

Amoniak 25-29% vodný roztok p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha), NH₃

Butyrylthiocholin jodid (Sigma- Adrich)

Diethylamin, p. a. (Penta), DEA

Dimethylsulfoxid, (Sigma-Adrich), DMSO

Dusičnan bizmutitý zásaditý, č. (Lachema)

Galanthamin hydrobromid, (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Huperzin A, (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Chlorid rtuťnatý p. a. (Fisher Scientific), HgCl₂

Chlorid sodný p. a. (Lachema), NaCl

Jodid draselný č. (Lach-Ner), KI

Kyselina chlorovodíková 35% (Penta), HCl

Kyselina vinná p. a. (Penta)

Síran sodný bezvodý, p. a. (Penta), Na₂SO₄

Uhličitan sodný bezvodý, č. (Penta), Na₂CO₃

5.7 Přístroje

Knihovna spekter NIST Virtual Library (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA)

Odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)

pH metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)

Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

Spektrometr EI/MS na GC-MS Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona DP-5 MS (30 x 25 mm x 0,25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)

Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)

Statistický program GraphPad Prism 5.0 2006 (Graph PaD Software, SanDiego, California, USA)

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)

Vakuová odparka Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Germany)

Vakuová odparka pro poloprovozní použití Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach Germany)

5.8 Obecné postupy

Příprava skleněných preparativních TLC desek

Na skleněné desky o velikosti 15x15 cm byla nalita suspenze silikagelu (6,5 g) a vody (19 ml). Před použitím byly desky za pokojové teploty sušeny (minimálně 24 hodin).

Nanášení směsi alkaloidů na chromatografické desky

Získaná směs alkaloidů byla rozpuštěna ve směsi EtOH + CHCl₃ (1:1) a nanášena na desky v linii 1,5 cm od spodní hrany a 1 cm obou okrajů. Maximální nanáška alkaloidů byla 1 mg/cm na komerční desku, na skleněnou desku 2-3 mg/cm.

Chromatografie

Po odvětrání rozpouštědel z nanášené směsi byla provedena chromatografie ve vyvíjecích komorách. Vyvíjecí komory byly alespoň 10 minut syceny mobilní fází. Po vyjmutí desek byla rozpouštědla mobilní fáze odvětrána.

Detekce a separace alkaloidů na chromatografických deskách

Po odvětrání rozpouštědel na chromatografických deskách byly za pomoci UV záření a Dragendorffova činidla (postřík celé desky při analytické TLC či úzkého pruhu desky při preparativní TLC) na deskách určeny zóny s alkaloidy. Při separaci byly jednotlivé zóny označeny preparativní jehlou. Ty byly jednotlivě seškrábány z desek.

Eluce alkaloidů

Každá zóna byla smíchána s obdobným objemem křemeliny a promytím pomocí dostatečného množství směsi EtOH + CHCl₃ (1:1) přes vrstvu vaty a křemeliny byly získány roztoky

rozdělených alkaloidů. Úplné vymytí alkaloidů z absorbentu bylo prověřeno pomocí Dragendorffova činidla.

Odpařování

Odpařování rozpouštědel z extraktů bylo uskutečněno na vakuové odparce při teplotě vodní lázně přizpůsobené podle typu rozpouštědla.

Skladování

Alkaloidní extrakty či frakce z různých fází zpracování byly ponechány ve vakuovém exsikátoru nad sušícími perlami silikagelu. Usušené extrakty a frakce byly uloženy do chladničky.

5.9 Metody

GC/MS analýza

Alkaloidy rostlin byly identifikovány pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona DP-5 MS (30 x 25 mm x 0,25 μ m) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Teplotní program byl následující: ze 100 °C na 180 °C (15 °C/min), stabilizace na 180 °C (1 min), ze 180 °C na 300 °C (5 °C/min), stabilizace na 300 °C (15 minut). Při teplotě 280 °C byl proveden postřík vzorku (1 μ l).

Helium zde bylo použito jako nosný plyn s průtokovou rychlostí 0,8 ml/min.

Identifikace alkaloidů byla provedena porovnáváním získaných hmotnostních spekter s daty v knihovně spekter NIST Virtual Library (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA).

Měření inhibiční aktivity alkaloidů vůči lidské AChE a BuChE

Pro stanovení biologické aktivity byla použita Ellmannova metoda s použitím roztoku DTNB ve fosfátovém pufru pH 7,4, který byl smíchán společně s roztokem enzymového preparátu o určité koncentraci a sledovaným alkaloidem o určité koncentraci v DMSO.

Protřepaná směs byla poté vložena do readru Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader. Zde probíhala 5 minut dlouhá inkubace při stálé teplotě (37 °C).

K slepému vzorku bylo posléze přidáno množství DMSO a k ostatním vzorkům stejné množství enzymového substrátu AChE nebo BuChE. Absorpce probíhala 2 minuty při vlnové délce 436 nm pro AChE a 412 nm pro BuChE.

Každý vzorek byl měřen šestkrát. Na vypočítání hodnoty IC₅₀ byl použit program GraphPad Prism.

Cytotoxicita

Byla vybrána celkem 1 nenádorová linie a 9 nádorových buněčných linií, které byly udržovány za standardních podmínek (při teplotě 37 °C ve vlhčené atmosféře 5% oxidu uhličitého a 95% vzduchu).

Po stanovení optimální hustoty buněk na jamku byly buňky ošetřeny alkaloidními extrakty po dobu 48 hodin. Pro kontrolu byl použit i doxorubicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentraci 1 μM.

Poté byl proveden test WST-1 (Roche, Basel, Switzerland) a byla změřena proliferace (bujení) buněk pomocí přístroje Tecan Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Výsledné číslo vyjádřené v procentech představuje proliferaci buněk během 48 hodin. 100 % znamená, že růst buněk látka (doxorubicin) či alkaloidní extrakt neovlivňuje.

5.10 Postupy

5.10.1 Postup práce v roce 2017

Po rozdrcení (viz obrázek 13) byly usušené rostlinné vzorky extrahovány 95% EtOH v poměru (w/v) vařeny po dobu 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Vyvařování bylo ještě

jednou stejným způsobem opakováno. Ethanolové výluhy byly zfiltrány přes křemelinu a posléze odpařeny do sucha (viz obrázek 14).

Z každého vzorku ethanolového extraktu bylo odebráno cca 100 mg extraktu (bylo uchováno).

Zbylé extrakty byly okyseleny 2% HCl na pH 1-2 a rozpuštěny pomocí zahřívání a ultrazvukové lázně a nakonec zředěny destilovanou vodou (v poměru 1:1).

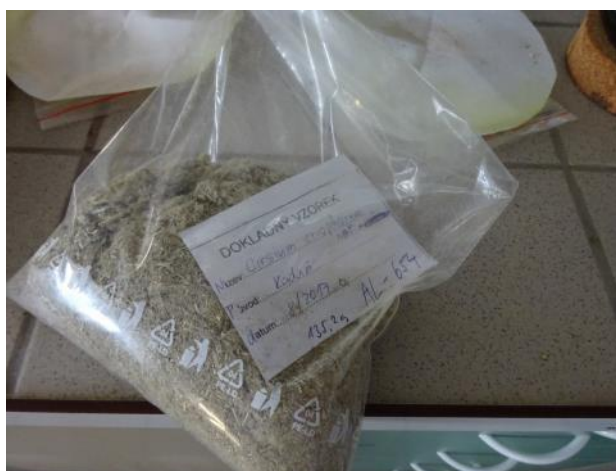
Vzniklé suspenze byly zfiltrány přes vrstvu křemeliny (viz obrázek 15). Vrstva křemeliny byla promyta 50 ml destilované vody.

Zředěné roztoky byly poté jednotlivě přelity do dělicích nálevek. K nim bylo přilito potřebné množství EtO₂ (v poměru 5:1). Po protřepání směsí a ustálení vrstev byla vodná (spodní) vrstva oddělena od organické vrstvy s nečistotami. Extrakce nečistot z vodné vrstvy byla ještě jednou opakována, organické fáze dále nebyly zpracovávány.

Vodné fáze byly následně alkalizovány na pH 9-10 pomocí 10% Na₂CO₃. Vodné vrstvy byly extrahovány ethylacetátem (9:1), přičemž emulze byly důkladně protřepány. Po ustálení vrstev byly organické vrstvy (ethylacetátové) jímány do baněk s Na₂SO₄ (sušidlo). Vytřepávání vodných fází byla provedena celkem 5x.

Absence alkaloidů ve vodné fázi po vytřepání byla kontrolována reakcí s Mayerovým činidlem.

Alkaloidové roztoky byly nejprve zfiltrány přes filtrační papíry, dále odpařeny do sucha a uskladněny.



Obrázek 13: Rozdrcené usušené rostlinné vzorky (foto: Hana Kožíšková 2017)



Obrázek 14: Odpařené ethanolové výluhy (foto: Hana Kožíšková 2017)



Obrázek 15: Filtrování extraktu přes vrstvu křemeliny (foto: Hana Kožíšková 2017)

5.10.2 Postup práce v roce 2018

V srpnu 2018 byla nasbírána nať bodláku obecného (*Carduus acanthoides* L.). Po usušení (4,965 kg) a rozemletí byl vzorek extrahován 95% EtOH v poměru 1:9 (w/v). Celková směs v baňce byla přivedena k varu a vařena na vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 20 minut. Následně byl extrakt zfiltrován přes vrstvu křemeliny a droga znovu stejným postupem extrahována EtOH. Zfiltrovaný extrakt (přes vlizelín) byl odpařen do sucha (viz obrázek 16).

K odparku bylo přidáno potřebné množství 5% HCl k docílení pH 1-2 (zkouška provedena pH indikátorovým papírkem) a zhruba 3,6 l destilované vody. Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes vrstvu křemeliny. Zředěný vodný roztok (4 l) byl poté převeden do 8 dělicích nálevek (do každé nálevky bylo vliáno 500 ml roztoku). Do dělicí nálevky bylo dále přidáno prvních 100 ml Et₂O. Po důkladném protřepání směsi a ustálení vrstev byla oddělena spodní vodná vrstva od vrstvy druhé, organické, která obsahovala lipofilní (rozpustné v tucích) nečistoty. Extrakce nečistot z vodné vrstvy byla opakována ještě 1x, organické fáze dále nebyly zpracovávány.

Poté byl vodný roztok alkalizován na pH 9-10 (použito asi 70 ml 10% roztoku Na₂CO₃). Do dělicích nálevek byla znovu nalita vodná vrstva, ke které byla přidána zhruba v poměru 3:1 směs (EtOAc + MeOH, v poměru 9:1). Směs byla protřepána a po ustálení vrstev byla organická fáze jímána do baňky s bezvodným Na₂SO₄, který byl použit jako sušidlo. Vytřepávání bylo opakováno ještě 3x. Výtřepky byly poté zfiltrány přes filtrační papír. Roztok alkaloidů byl odpařen, baňka s extraktem (8,43 g) byla vložena do exsikátoru a byla uložena pro pozdější zpracování.

Pomocí Mayerova činidla byla ve vodné fázi prokázána stálá přítomnost alkaloidů, a proto bylo použito další organické rozpouštědlo (CHCl₃). Do každé dělicí nálevky bylo přilито 500 ml roztoku a k němu bylo přidáno 250 ml CHCl₃. Po pečlivém vytřepání a ustálení vrstev byla spodní chloroformová vrstva jímána do baňky s Na₂SO₄ (viz obrázek 17). Opakováno ještě 3x. Poté byly výtřepky zfiltrány také přes filtrační papír a byly jako předešlé výtřepky odpařeny a uskladněny.

(...znovu použito Mayerovo činidlo)

K chloroformovému odparku (810 mg) bylo po vysušení v exsikátoru přidáno potřebné množství 3% HCl. Po filtraci přes vrstvu křemeliny byl v dělicích nálevkách 2x vytřepány 50 ml Et₂O. Vodná fáze byla posléze alkalizována 10% Na₂CO₃, čtyřikrát vytřepána 50 ml CHCl₃ a organická fáze byla jímána do baňky se sušidlem Na₂SO₄. Po zfiltrování přes filtrační papír a částečném odpaření byl získán přečištěný CHCl₃ alkaloidní extrakt.

Pro separaci alkaloidů na preparativních TLC deskách byla nalezena optimální vyvíjecí směs (cHx + Aceton + NH₃, v poměru 30:60:2).

Pro TLC chromatografii chloroformového výtřepku (290 mg) bylo použito 10 skleněných desek o velikosti 15x15 cm. Alkaloidní extrakt byl nanesen na desky a byla provedena chromatografie ve vyvíjecích komorách. Vyvíjecí komory byly syceny alespoň 10 minut mobilní fází (vyvíjecí směs cHx + Aceton + NH₃ v poměru 30:60:2). Nebylo zapotřebí chromatografii opakovat. Po vyjmutí desek a odvětrání rozpouštědel byly za pomoci UV záření (viz obrázek 18) a Dragendorffova činidla (postřik úzkého pruhu desky) na deskách určeny zóny s alkaloidy (celkem 6 zón). Zóny byly označeny preparativní jehlou (viz obrázek 19), seškrábány z desek a odpovídající byly spojeny dohromady a eluovány.

Rozdělení alkaloidů bylo zkontrolováno pomocí analytické TLC (použity dvě vyvíjecí směsi: cHx + Aceton + NH₃, v poměru 30:60:2; následně po vyvinutí odvětrání rozpouštědel první

mobilní fáze $\text{To} + \text{Aceton} + \text{EtOH} + \text{NH}_3$ v poměru 40:40:6:2). Po tomto testu bylo za pomoci UV záření a Dragendorffova činidla zjištěno, že se alkaloidy nalézají ve frakcích 2., 4. a 5. zóny (označeno CA2, CA4, CA5).

Jednotlivé frakce CA2, CA4 byly separovány pomocí TLC vyvíjecí směsi ($\text{To} + \text{Aceton} + \text{EtOH} + \text{NH}_3$, v poměru 40:40:6:2) a frakce CA5 byla chromatografována na TCL deskách pomocí vyvíjecí směsi ($\text{cHx} + \text{Aceton} + \text{NH}_3$, v poměru 30:60:2).

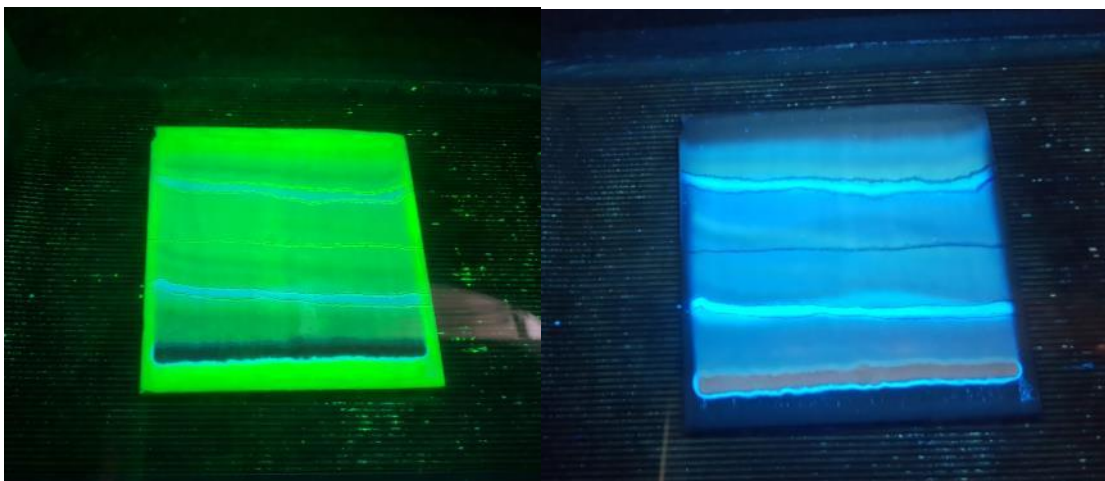
A zbývající část chloroformového výtřepku, která zůstala v baňkách, byla odpařena a uskladněna.



Obrázek 16: Odpaření zfiltrovaného extraktu (foto: autor 2018)



Obrázek 17: Roztok s CHCl_3 v dělící nálevce, již po ustálení vrstev (foto: autor 2018)



Obrázek 18: Určení zón s alkaloidy pomocí UV záření; vlevo: s vlnovou délkou 254 nm a vpravo: s vlnovou délkou 366 nm (foto: autor 2018)



Obrázek 19: Označené zóny na deskách (foto: autor 2018)

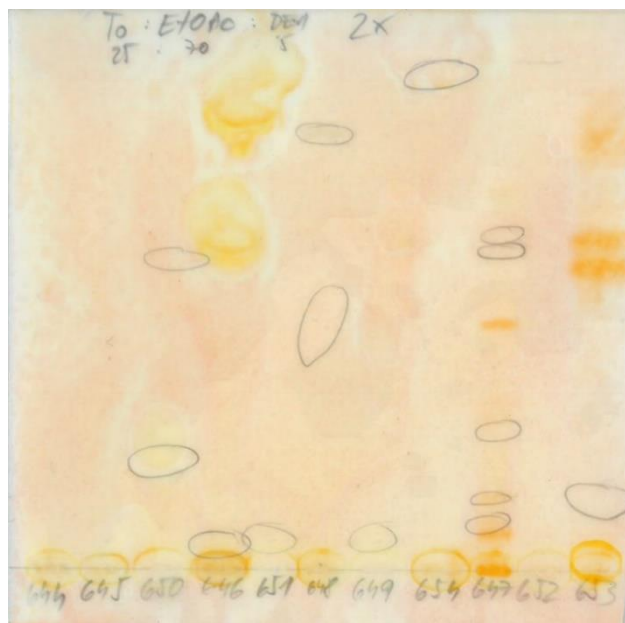
6 VÝSLEDKY

6.1 Přítomnost alkaloidů

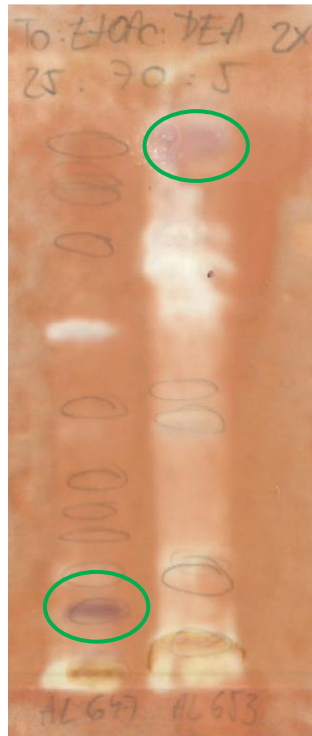
Ve všech 11 EtOAc extraktů (ze 7 zástupců rostlin), které byly vytvořeny v září 2017, byla následně zjišťována přítomnost alkaloidů. Ta byla provedena chromatografií na tenké vrstvě (TCL). Přítomnost alkaloidů byla doložena po postřících Dragendorffovým činidlem na chromatogram. Místa, ve kterých byly obsaženy alkaloidy, reagovala s činidlem za vzniku oranžovočervené sraženiny.

Tímto způsobem byla prokázána přítomnost alkaloidů u 2 extraktů, a to konkrétně u vzorků AL-647 a AL-653 (viz obrázek č.20).

Posléze se provedla ještě jedna chromatografie, ale pouze už s těmito 2 extrakty. Přítomnost alkaloidů byla nyní provedena postřikem jodoplaticitého činidla na chromatogram. Zde vznikaly fialovočervené sraženiny (viz obrázek č.21).



Obrázek 20: Chromatogram po postřiku Dragendorffovým činidlem (dráha vzorku AL-647 ohraničena červeně, dráha vzorku AL-653 modře) (foto: Anna Hošťálková 2018)



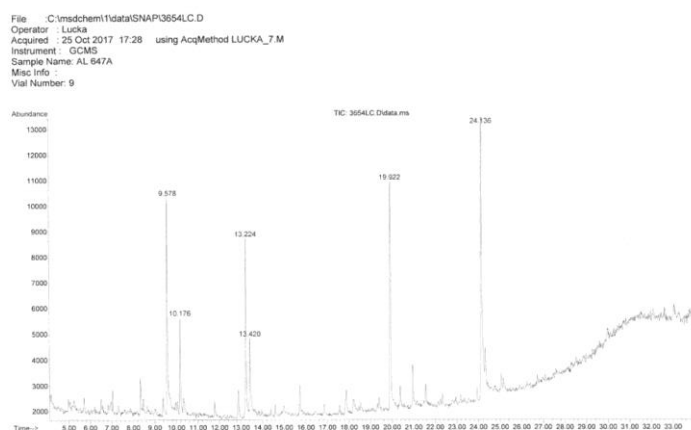
Obrázek 21: Chromatogram po postřiku jodoplatickým postřikem (místa s přítomností alkaloidů vyznačena zeleně) (foto: Anna Hošťálková 2018)

6.2 Určení alkaloidů

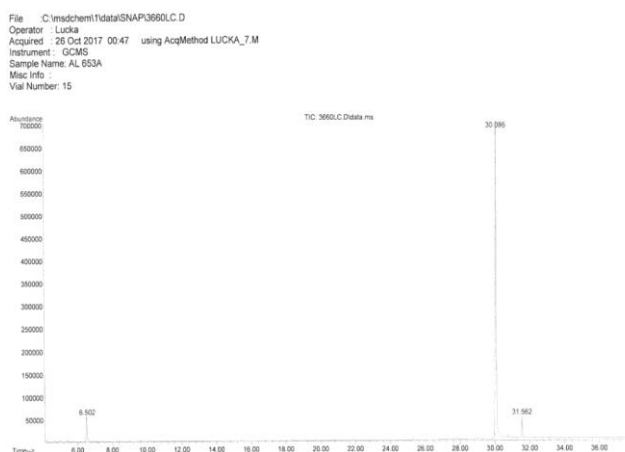
Extrakty (E) obsahující alkaloidy (konkrétně vzorek AL-647 E a AL-653 E) byly podrobeny testům na přesné určení alkaloidů.

Analýza alkaloidních extraktů byla provedena na plynovém chromatografu s detekcí (GC/MS analýza).

Nicméně se píky látek nepodařilo identifikovat se známými alkaloidy z knihovny spekter NIST 11.



Obrázek 22: Výsledek GC/MS analýzy u vzorku AL-647 E (Anna Hošťálková 2018)



Obrázek 23: Výsledek GC/MS analýzy u vzorku AL-653 E (Anna Hošťálková 2018)

6.3 Inhibiční účinky alkaloidů vůči AChE a BuChE

Oba alkaloidní extrakty (vyznačeny v tabulce tučně) včetně dalších, ve kterých se přítomnost alkaloidů nepotvrdila, byly podrobeny stanovení vůči lidským cholinesterasám (AChE a BuChE).

Tabulka 2: Výsledky stanovení inhibičních účinků alkaloidů vůči lidským cholinesterasám

Vzorek	IC ₅₀ µg/ml	
	AChE	BuChE
AL-644 E	8355,6 ± 4417,3	150,35 ± 6,85
AL-645 E	n. d.	n. d.
AL-646 E	n. d.	n. d.
AL-647 E	189,5 ± 16,9	67,14 ± 4,43
AL-648 E	569,86 ± 74,15	148,87 ± 26,31
AL-649 E	3408,5 ± 1209,91	601,6 ± 32,74
AL-650 E	9049,0 ± 540,22	462,4 ± 16,1
AL-651 E	n. d.	n. d.
AL-652 E	1381,1 ± 665,95	1407,5 ± 842,16
AL-653 E	543,63 ± 141,81	389,37 ± 32,88
AL-654 E	185,96 ± 15,99	369,45 ± 38,31

Jak je zřejmé z tabulky 2, nejnižší hodnotu IC₅₀ u AChE i BuChE má vzorek AL-647 E (extrakt *Carduus acanthoides* L.).

6.4 Cytotoxicita alkaloidů vůči vybraným nádorovým buňkám

Posléze byl ještě stanoven vliv pouze těchto dvou alkaloidních extraktů (AL-647 E, AL-653 E) na proliferaci různých linií nádorových buněk (viz seznam linií nádorových buněk).

Pro porovnání byl do tabulky přidán protinádorový lék doxorubicin (antibiotikum produkované *Streptomyces peucetius* (Grein)) [17].

Tabulka 3: Výsledky stanovení cytotoxicity alkaloidů vůči vybraným nádorovým buňkám

Buněčná linie	Testovaná látka/ extract		
	AL-653 E 50 µg/ml	AL-647 E 50 µg/ml	Doxorubicin 1 µM
	GP %		
Jurkat	0,5 ± 0,2	79,2 ± 0,3	9,0 ± 6,8
MOLT-4	7,4 ± 6,1	67,3 ± 7,4	3,5 ± 1,7
A549	24,0 ± 4,1	93,7 ± 6,1	6,8 ± 4,4
HT-29	43,3 ± 5,4	84,1 ± 7,6	39,4 ± 7,5
PANC-1	8,8 ± 4,4	89,1 ± 3,33	63,0 ± 4,9
A2780	0,8 ± 0,5	106,3 ± 6,2	5,1 ± 1,3
HeLa	19,3 ± 5,6	91,0 ± 6,7	10,1 ± 5,5
MCF-7	3,4 ± 1,9	97,0 ± 12,4	36,1 ± 2,4
SAOS-2	13,5 ± 5,6	87,7 ± 1,6	35,9 ± 13,7
MRC-5	13,4 ± 8,2	99,9 ± 11,8	25,9 ± 18,7

0-25
26-50
51-75

Hodnoty v tabulce vyjadřují míru inhibice (v %) dělení buněčných linií – **growth percent** (GP).

Z těchto dvou vzorků výrazně inhiboval růst buněk extrakt *Onopordum acanthium* L. (AL-653 E). Má dokonce i někdy lepší inhibiční účinky než doxorubicin.

7 ZÁVĚR

Cílem mé odborné práce bylo prozkoumat alkaloidy u vybraných rostlin z čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*).

V práci bylo vytvořeno 11 EtOAc extraktů (ze 7 zástupců rostlin z čeledi hvězdnicovité). Ty byly následně podrobeny testům na přítomnost alkaloidů a inhibiční účinky alkaloidů vůči AChE a BuChE.

Bylo zjištěno, že 2 EtOAc extrakty obsahují alkaloidy, a to konkrétně vzorky AL-647 (*Carduus acanthoides* L.) a AL-653 (*Onopordum acanthium* L.).

Ty byly posléze podrobeny GC/MS analýze na určení jednotlivých alkaloidů. Bohužel za využití GC/MS techniky nebyly identifikovány jednotlivé alkaloidy.

Inhibiční účinky alkaloidů vůči lidským cholinesterasám (AChE, BuChE) byly měřeny u všech vytvořených extraktů. Ze všech nejvíce inhiboval růst alkaloidový extrakt *Carduus acanthoides* L. (AL-647 E), a to jak vůči AChE ($IC_{50} = 189,5 \pm 16,9 \mu\text{g/ml}$), tak i vůči BuChE ($IC_{50} = 67,14 \pm 4,43 \mu\text{g/ml}$).

Cytotoxicita byla měřena jen u extraktů rostlin, u kterých byla potvrzena přítomnost alkaloidů. Z testovaných rostlin vykázal nejlepší inhibiční aktivitu vůči liniím nádorových buněk alkaloidní extrakt *Onopordum acanthium* L. (AL-653 E). Bohužel také výrazněji zastavoval růst linie nenádorových (zdravých) buněk než již používaný doxorubicin.

8 DISKUZE

Prokázání alkaloidů ve dvou ze sedmi rostlin z čeledi *Asteraceae* bylo pro mě příjemným překvapením. Je sice pravda, že jsem se v několika publikacích dočetl o výskytu alkaloidů v těchto rostlinách (výskyt neurčitého alkaloidu v zelené části rostliny *Cirsium arvense* (L.) Scop. [18] nebo semena *Echinops sphaerocephalus* L. obsahující alkaloid echinopsin [19]), ale hovořilo se zde pouze o možné přítomnosti. Možné, protože doposud nebyl proveden rozsáhlejší výzkum, který by toto tvrzení potvrzoval (výjimkou je pouze výzkum z roku 1962, kdy byly u rostliny *Carduus acanthoides* L. nalezeny dva nové alkaloidy, které byly pojmenovány acanthoin a acanthoidin [20]).

Jak jsem mohl během mé práce zjistit, přesné určení objevených alkaloidů nemusí být vždy jednoduché. I když je již prokázáno, že se v extraktu nacházejí alkaloidy (pomocí detekčních činidel), nelze vždy očekávat, že se nalezené látky dají identifikovat. Je zde totiž přítomno mnoho faktorů, které tomu mohou zabránit.

V mém případě se jednalo o nedostatečné množství alkaloidů a zvýšenou přítomnost nečistot v extraktech. Tyto problémy se mi také staly osudné po druhém pokusu, a to u identifikace alkaloidů z CHCl_3 extraktu *Carduus acanthoides* L. nasbíraném v roce 2018, kterého bylo mnohem více než o rok dříve.

Zbývá ještě možnost použít EtOAc výtřepek *Carduus acanthoides* L. (2018), kterého bylo získáno výrazně větší množství, tudíž by bylo možné získat větší množství jednotlivých alkaloidů pro identifikaci a případné stanovení biologické aktivity (inhibiční aktivita vůči lidským cholinesterasám či cytotoxická aktivita).

I když měl extrakt *Carduus acanthoides* L. ze všech ostatních extraktů nejlepší inhibiční účinky vůči AChE a BuChE, je jeho biologická aktivita oproti již známým inhibitorům stále nízká.

Naproti tomu u výsledků cytotoxicity, kde nejlépe pozastavoval růst nádorových buněk extrakt *Onopordum acanthium* L., můžeme počítat s plány do budoucna. Rostlina by mohla v budoucnu sloužit jako zdroj alkaloidů, u kterých by měl smysl sledovat jejich cytotoxickou aktivitu a pomoci ní i hledat protirakovinné látky.

9 ZDROJE

- [1] ODY, Penelope. *Velký atlas léčivých rostlin*. Martin: Vydavatel'stvo OSVETA, 1995. ISBN 80-217-0521-3.
- [2] PETROVSKA B. B.: Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6/11, 1-5, (2012).
- [3] SOUČEK, Miroslav, Jindřich ŠPINAR a Jiří VORLÍČEK, ed. *Vnitřní lékařství 2.díl*. Praha: Grada, 2011, s. 1277-1278. ISBN 978-80-247-2110-1.
- [4] CAHLÍKOVÁ Lucie, K. Macáková, N. Benešová, J. Chlebek, A. Hošťálková, L. Opletal, v knize: *Studies in Natural Products Chemistry* (Atta-ur-Rahman, ed.), sv 42, kap. 6., Elsevier, Amsterdam 2014.
- [5] AUTOR NEUVEDEN. *VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK* [online]. [cit. 2018-12-21]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/acetylcholinesteraza-zkr-ache>
- [6] BRUNOVSKÝ, Martin. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *NEUROLOGIE PRO PRAXI* [online]. 2007, (2), s. 122-127 [cit. 2018-12-20]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2007/02/12.pdf>
- [7] MAREK, Josef. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2010, s. 529-530. ISBN 978-80-247-2639-7.
- [8] BEDNÁŘ, Blahoslav. *Základy klasifikace nádorů a jejich léčení*. Praha: AVICENUM, zdravotnické nakladatelství, 1987.
- [9] KINCL, Lubomír, Miloslav KINCL a Jana JAKRLOVÁ. *Biologie rostlin: pro 1. ročník gymnázií*. 4., přeprac. vyd. Praha: Fortuna, 2006. ISBN 80-716-8947-5.
- [10] STARÝ, František. *Rostliny a jejich půvab v ilustracích Karla Svobinského*. Praha: Aventinum, 2006. Artia (Aventinum). ISBN 80-868-5824-3.
- [11] JAŠKOVÁ, Věra. *BOTANY.cz: Cirsium arvense* [online]. 2008 [cit. 2018-12-19]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/cirsium-arvense/>

- [12] HECKER, Frank. *Atlas živočichů a rostlin*. V Praze: Ikar [i.e. Knižní klub], 2015. Nový průvodce přírodou, s. 376. ISBN 978-80-242-4571-3.
- [13] FIŠER, Radek. *BOTANY.cz: Cirsium eriophorum* [online]. 2007 [cit. 2018-12-08]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/cirsium-eriophorum/>
- [14] HOSKOVEC, Ladislav. *BOTANY.cz: Cirsium vulgare* [online]. 2007 [cit. 2018-12-08]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/cirsium-vulgare/>
- [15] KOVÁŘ, Ladislav. *BOTANY.cz: Echinops sphaerocephalus* [online]. 2007 [cit. 2018-12-04]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/echinops-sphaerocephalus/>
- [16] MIŽÍK, Peter. *BOTANY.cz: Onopordum acanthium* [online]. 2008 [cit. 2018-12-08]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/onopordum-acanthium/>
- [17] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007, s. 339. ISBN 978-80-247-1356-4.
- [18] KADLÍKOVÁ, Lenka. *Příroda.cz: Pcháč oset* [online]. 2004 [cit. 2018-12-08]. Dostupné z: <https://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=149>
- [19] AUTOR NEUVEDEN. *Herbář Wendys: Echinops sphaerocephalus* [online]. 2015 [cit. 2019-01-14]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/385-echinops-sphaerocephalus-belotr-n-kulatohlavy>
- [20] BUCKINGHAM, J. *Dictionary of natural products*. New York, 1998, s. 24. ISBN 04-124-6620-1.

