

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Katedra aplikované chemie

DISERTAČNÍ PRÁCE

Významné sirné metabolity v rostlinách čeledi

Alliaceae (česnekovité)

Vypracovala:

Ing. Petra Krejčová

Vedoucí disertační práce:

doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne 26.7.2013

Poděkování

Ráda bych velmi poděkovala svému školiteli doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a přátelské prostředí, které mi poskytoval v průběhu celého mého doktorského studia.

Ráda bych také poděkovala doc. Ing. Ivanu Mrázovi, CSc. z Ústavu molekulární biologie rostlin (Biologické centrum AV ČR) za srdečné přijetí do kolektivu a poskytnutí vybavení pro testování antimikrobiálních aktivit, také prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, CSc. za poskytnutí zázemí k experimentům s plísňovými kulturami na Katedře rostlinné výroby a agroekologie (Biotechnologické centrum ZF JU). Nemalé díky patří RNDr. Aleně Zíkové, Ph.D. za vlídné přijetí do vědecké skupiny na Parazitologickém ústavu (Biologické centrum AV ČR) a možnost testování antiparazitické aktivity. Ing. Petře Kučerové bych velmi ráda poděkovala nejen za pomoc na zahraniční stáži v Kodani při testování biologických vlastností látek, ale také za vytvoření kamarádského prostředí ve společné laboratoři.

V neposlední řadě děkuji své rodině za trpělivost a psychickou podporu v průběhu celého studia.

Za finanční podporu patří dík také Grantové agentuře Jihočeské univerzity (GAJU 067/2010/Z, GAJU 028/2010/P a GAJU 068/2011/P).

Souhrn

Tato práce byla zaměřena na studium sirných sloučenin v méně známých rostlinách čeledi Alliaceae (česnekovité). Pozornost byla věnována především druhům *Allium stipitatum* (česnek stopečkatý) a *Tulbaghia violacea*, které doposud nebyly vědecky detailněji studovány. Tyto rostliny jsou v oblasti svého přirozeného výskytu (Střední Asie resp. jižní Afrika) již dlouhá léta používány nejenom k přípravě a ochucování pokrmů, ale též v lidovém léčitelství.

V česneku stopečkatém (*Allium stipitatum*) se podařilo identifikovat, izolovat a spektrálně plně charakterizovat novou, v odborné literatuře dosud nepopsanou sirnou aminokyselinu, (*R*)-*S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxid. Významná část práce byla věnována detailnímu studiu a popisu mechanismu tvorby sirných sloučenin vznikajících rozkladem této heterocyklické sirné aminokyseliny. Tato látka se rozkládá působením enzymu alliinasy za vzniku celé řady dalších sekundárních metabolitů, mj. *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thionu (pyrithionu), 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxidu, 2-[(methylthio)methylthio]pyridin-*N*-oxidu, di(2-pyridyl)disulfid-*N*-oxidu a di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu. Struktura těchto látek byla identifikována využitím několika spektroskopických technik (NMR, MS, UV a IČ spektroskopie) a potvrzena následnou syntézou.

U všech izolovaných sirných sloučenin byla též sledována jejich biologická aktivita. Pozornost byla zaměřena na studium antimikrobiální a antiparazitické aktivity, jakož i na jejich protizánětlivé vlastnosti či schopnost inhibovat acetylcholinesterasu nebo přenos serotoninu. Několik z testovaných látek vykazovalo významné antimikrobiální a antiparazitické vlastnosti, často srovnatelné nebo i převyšující aktivitu komerčně používaných léčiv. Některé studované sloučeniny také vykazovaly nezanedbatelné protizánětlivé účinky, jakož i další biologickou aktivitu.

Z jihoafrické rostliny *Tulbaghia violacea* (lidově označované jako „společenský či sladký česnek“) byl izolován marasmicin (2,4,5,7-tetrathiaoktan-*S*₄-oxid). Tento thiosulfínát vykazoval nejenom zajímavé sensorické vlastnosti, ale také významné antimikrobiální a antiparazitické účinky, které jsou srovnatelné s biologickou aktivitou allicinu, hlavní sirné sloučeniny vznikající v česneku (*Allium sativum*). Byl též studován mechanismus tvorby a struktura sirných sloučenin vznikajících dalším rozkladem marasmicinu.

Získané výsledky jednoznačně potvrzují, že v mnoha doposud méně známých druzích česnekovitých rostlin se může nacházet celá řada sloučenin vykazujících nejenom atraktivní

senzorické vlastnosti, ale také významnou biologickou aktivitu. Díky tomu by tak tyto rostliny mohly najít širší využití v potravinářském popř. farmaceutickém průmyslu.

Klíčová slova: *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxid, 2-sulfanylpyridin-*N*-oxid, pyrithion, marasmin, marasmicin, biologická aktivita, česnek stopečkatý, *Allium stipitatum*, *Tulbaghia*

Summary

The thesis dealt with sulfur compounds occurring in some less known family Alliaceae species. Attention was primarily focused on two species, i.e., *Allium stipitatum* Regel and *Tulbaghia violacea* Harv. These two plants are frequently used not only as a condiment, but also in folk medicine in Central Asia or South Africa, respectively.

A novel sulfur amino acid, (*R*)-*S*-(2-pyridyl)cysteine *N*-oxide, was found in the bulbs of *Allium stipitatum*. Sulfur compounds formed by decomposition of this heterocyclic amino acid were studied in detail. It was found that *S*-(2-pyridyl)cysteine *N*-oxide is cleaved by alliinase to form a number of sulfur compounds, including *N*-hydroxypyridine-2(1*H*)-thione (pyrithione), 2-(methylthio)pyridine *N*-oxide, 2-[(methylthio)methylthio]pyridine *N*-oxide, di(2-pyridyl) disulfide *N*-oxide and di(2-pyridyl) disulfide *N,N'*-dioxide. The structures of these compounds were determined by spectroscopic methods (NMR, MS, UV and IR spectroscopy) and verified by organic syntheses.

Biological activity of the sulfur compounds isolated from *A. stipitatum* was also tested. Attention was focused on evaluation of their antimicrobial and antiparasitic activity as well as anti-inflammation effects and acetylcholinesterase or serotonin transfer inhibition. Some of the tested compounds showed significant antimicrobial and antiparasitic activity, which was comparable or even exceeding that of the commonly used pharmaceuticals. Some of the compounds exhibited also considerable anti-inflammation effects and other kinds of biological activity.

Another important sulfur compound, marasmicin (2,4,5,7-tetrathiaoctane *S*₄-oxide), was isolated from the roots of the South African species *Tulbaghia violacea*, also known as “society” or “sweet” garlic. This thiosulfinate showed not only remarkable sensory properties, but it also exhibited considerable antimicrobial and antiparasitic activity comparable to alliin, the major sulfur compound occurring in garlic (*Allium sativum*). Structure and formation pathways of sulfur compounds formed by decomposition of marasmicin were also studied in detail.

This study clearly showed that many less known family Alliaceae species contain numerous (often novel) sulfur compounds exhibiting attractive sensory properties as well as significant biological activity. Thus, it can be concluded that many of these scientifically overlooked plants deserve to attract closer attention of both food and pharmaceutical industries.

Key words: *S*-(2-pyridyl)cysteine *N*-oxide, 2-sulfanylpuridine *N*-oxide, pyrithione, marasmin, marasmicin, biological activity, Persian shallot, *Allium stipitatum*, *Tulbaghia*

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	ČELEĎ ALLIACEAE.....	3
2.2	ROD <i>ALLIUM</i>	5
2.3	SIRNÉ LÁTKY V ROSTLINÁCH RODU <i>ALLIUM</i>	5
2.3.1	<i>S-Substituované deriváty cysteinu</i>	6
2.3.2	<i>Enzymově katalyzovaný rozklad S-alk(en)ylcystein-S-oxidů</i>	9
2.3.3	<i>Biologická aktivita sirných látek v rostlinách rodu Allium</i>	13
2.4	VYBRANÉ ROSTLINY ČELEDI ALLIACEAE	15
2.4.1	<i>Rostliny podrodu Melanocrommyum</i>	15
2.4.2	<i>Rostliny rodu Tulbaghia</i>	19
2.4.3	<i>Rostliny rodu Prototulbaghia</i>	22
2.5	CHARAKTERISTIKA POUŽÍVANÝCH MIKROORGANISMŮ	23
2.6	CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH PARAZITŮ	26
2.7	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA PROVÁDĚNÝCH TESTŮ BIOLOGICKÉ AKTIVITY.....	29
3	CÍLE PRÁCE.....	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
4.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	33
4.2	SPECIÁLNÍ NÁDOBÍ A POMŮCKY	35
4.3	ROSTLINNÝ MATERIÁL	35
4.4	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	35
4.5	SEZNAM METOD	38
4.5.1	<i>HPLC-PDA metody</i>	38
4.5.2	<i>GC-MS metody</i>	43
4.5.3	<i>Další používané metody</i>	44
4.6	POUŽITÝ SOFTWARE.....	46
4.7	IZOLACE A SYNTÉZY SIRNÝCH SLOUČENIN	46
4.7.1	<i>Izolace a syntézy látek vyskytujících se v cibulkách A. stipitatum</i>	46
4.7.2	<i>Izolace látek vyskytujících se v rostlinách rodů Tulbaghia a Prototulbaghia</i>	55
4.8	TESTOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY	57
4.9	TESTOVÁNÍ ANTIPARAZITICKÉ AKTIVITY	59
4.10	TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY POMOCÍ COX, SERT, GABA, AChE A MAO	63
4.10.1	<i>Inhibice cyklooxygenasy 1 a 2</i>	63
4.10.2	<i>Inhibice transportního proteinu pro serotonin (SERT)</i>	64
4.10.3	<i>Testování afinity ke GABA_A receptoru</i>	66
4.10.4	<i>Inhibice acetylcholinesterasy (AChE)</i>	67
4.10.5	<i>Inhibice monoaminoxidasy A (MAO-A)</i>	68
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	71
5.1	SIRNÉ SLOUČENINY ČESNEKU STOPEČKATÉHO (<i>A. STIPITATUM</i>)	71
5.1.1	<i>Sírné aminokyseliny a oligopeptidy česneku stopečkatého</i>	71
5.1.2	<i>Sírné látky vznikající v česneku stopečkatém</i>	75
5.2	BIOLOGICKÁ AKTIVITA SIRNÝCH SLOUČENIN Z <i>A. STIPITATUM</i>	85
5.2.1	<i>Antimikrobiální aktivita sirných látek z A. stipitatum</i>	87
5.2.2	<i>Antiparazitická aktivita sirných látek z A. stipitatum</i>	90
5.2.3	<i>Testování biologické aktivity pomocí COX, GABA, AChE, MAO a SERT</i>	91
5.3	SIRNÉ SLOUČENINY V ROSTLINÁCH RODU <i>TULBAGHIA</i>	99
5.3.1	<i>Sírné aminokyseliny v rostlinách rodu Tulbaghia</i>	99
5.3.2	<i>Sírné látky vznikající v T. violacea</i>	100
5.3.3	<i>Senzorické hodnocení marasmicinu</i>	101
5.3.4	<i>Těkavé sírné látky vznikající při zpracování T. violacea</i>	101
5.4	BIOLOGICKÁ AKTIVITA MARASMICINU	104
5.4.1	<i>Antimikrobiální aktivita marasmicinu</i>	104
5.4.2	<i>Antiparazitická aktivita marasmicinu</i>	106

6	ZÁVĚR.....	107
7	LITERATURA	109
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	119
9	SEZNAM PUBLIKACÍ.....	123
10	SEZNAM PŘÍLOH.....	125

1 ÚVOD

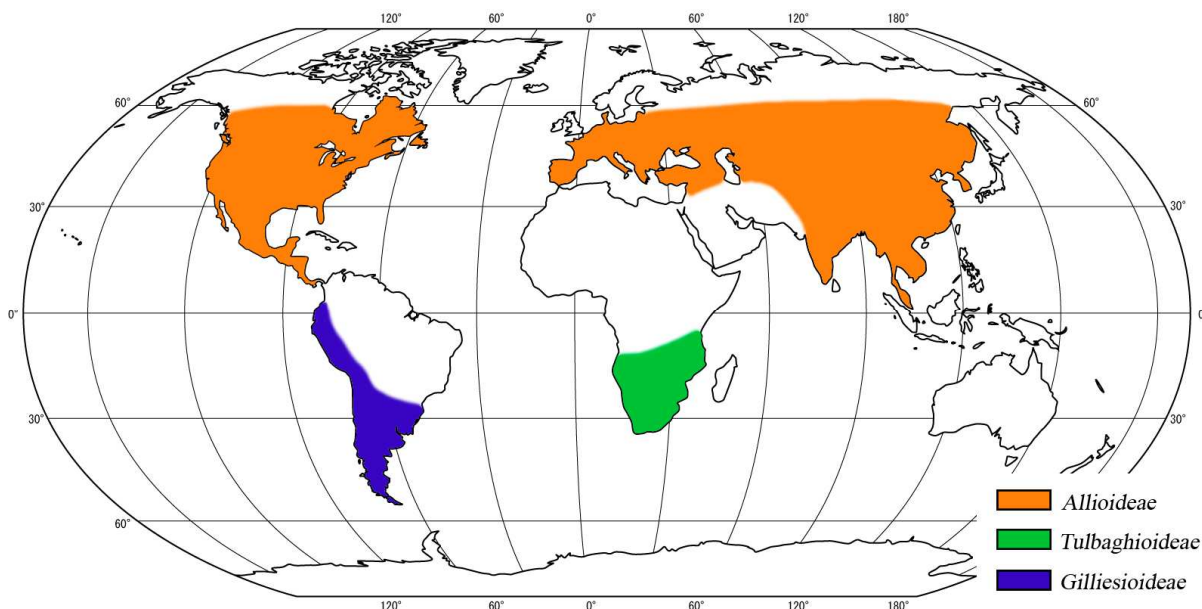
Čeď Alliaceae (česnekovité) zahrnuje více než 800 různých druhů rostlin rostoucích po celém světě. Mezi nejvíce rozšířené a velmi oblíbené česnekovité rostliny patří zejména česnek, cibule a pór. Tyto rostliny se u nás konzumují především pro jejich typickou chuť a výrazné aroma, které se utváří při narušení jejich pletiva (krájením, drcením, žvýkáním apod.). Prekurzory těchto sensoricky mimořádně výrazných sloučenin jsou unikátní sirmé aminokyseliny, *S*-substituované deriváty cysteinu. Tyto látky jsou při narušení pletiva enzymově rozkládány za tvorby velmi pestrého spektra sekundárních produktů, především thiosulfínátů a sulfínů. Předpokládá se, že thiosulfínáty, sulfiny a ostatní vznikající sirmé sloučeniny jsou součástí obranného mechanismu, který je aktivován při napadení česnekovitých rostlin predátory (např. hmyzem, býložravci apod.). Tyto sloučeniny vykazují nejenom repelentní účinky (díky palčivé chuti a slzotvorným vlastnostem), ale zároveň i výraznou antimikrobiální aktivitu, čímž napadenou část rostliny chrání proti mikrobiální infekci. Desítky vědeckých prací navíc potvrzují, že spektrum biologických účinků těchto sirmých látek je podstatně rozsáhlejší, neboť celá řada z nich vyazuje také protirakovinné, hypoglykemické, hypotenzivní, protizánětlivé a antitrombotické vlastnosti.

Zatímco sirmé sloučeniny ekonomicky nejvýznamnějších druhů česnekovitých rostlin (zejména česneku, cibule a póru) již byly prozkoumány poměrně detailně, naprostá většina ostatních druhů zůstává vědecky téměř neprobádána. Tyto rostliny jsou přitom často hojně konzumovány či používány v lidovém léčitelství v jihovýchodní Evropě, Asii, Africe i jiných částech světa, kde se přirozeně vyskytují. Ve stále větší míře se však začínají pěstovat také v České republice (povětšinou zatím pouze jako okrasné rostliny). Je přitom vysoce pravděpodobné, že tyto „exotické“ druhy mohou obsahovat zcela nové, v odborné literatuře dosud nepopsané sekundární sirmé metabolity. Díky tomu se tyto rostliny mohou stát nejenom zajímavou surovinou pro potravinářský průmysl (např. pro výrobu koření a aromat), ale zároveň potenciálně představují zdroj nových biologicky aktivních sloučenin.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Čeleď *Alliaceae*

Čeleď *Alliaceae* J. Agardh (česnekovitě) zahrnuje přibližně 30 různých rodů a více než 800 druhů rostlin rostoucích po celém světě [1]. Rostliny čeledi *Alliaceae* se taxonomicky dělí do tří podčeledí: *Allioideae*, *Tulbaghioideae* a *Gilliesioideae*. Oblasti přirozeného výskytu druhů patřících do jednotlivých podčeledí česnekovitých rostlin znázorňují obrázek 1 a tabulka 1.



Obrázek 1: Mapa světa znázorňující výskyt druhů podčeledí *Allioideae*, *Tulbaghioideae* a *Gilliesioideae*.¹

Podčeleď *Allioideae*

Zdaleka nejpočetnější skupinou podčeledi *Allioideae* Herb. je rod *Allium* L., který zahrnuje i několik podrodů, např. *Nectaroscordum* Lindl., *Caloscordum* Herb., *Melanocrommyum* (Webb & Berthel.) Rouy a *Milula* Prain [1, 2]. Rostliny podčeledi *Allioideae* se nacházejí především v oblastech mírného pásu severní polokoule. Výjimkou je pouze rostlina *Allium dregeanum* Kunth, která roste v Jihoafrické republice jako jediný druh přirozeně se vyskytující na jižní polokouli. Zástupci podčeledi *Allioideae* se od ostatních členů čeledi *Alliaceae* liší především stavbou květů. I rostliny podrodů *Nectaroscordum* a *Caloscordum* lišící se stavbou svých květů byly dříve vyřazeny z rodu *Allium*, ovšem po

¹ http://mapasveta.info/svet/images/svet_slepa_mapa2.gif; staženo 6. 3. 2013; upraveno

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

jejich prozkoumání moderními biochemickými metodami byly zařazeny zpět. Také jediný zástupce podrodu *Milula*, *M. spicata* Prain, přestože má odlišné květenství, byl na základě molekulárních studií nakonec přiřazen k rodu *Allium* [1, 3].

Tabulka 1: Rozdělení čeledi Alliaceae a zeměpisné rozšíření jednotlivých rodů/podrodů [4]

podčeled'/rod/podrod	počet druhů	rozšíření
Allioideae	> 500	
<i>Allium</i> L.		severní polokoule
<i>Nectaroscordum</i> Lindl.	2	Střední Asie, Středomoří
<i>Caloscordum</i> Herb	5	Střední Asie, Čína
<i>Milula</i> Prain	1	Himaláj
<i>Melanocrommyum</i> (Webb & Berthel.) Rouy	~ 200	Střední Asie
Tulbaghioideae	> 25	
<i>Tulbaghia</i> L.	~ 25	jižní Afrika, Zimbabwe
<i>Prototulbaghia</i> Vosa	1	Jihoafrická republika
Gilliesioideae		
<i>Gethyum</i> Phil.	~ 2	
<i>Ancrumia</i> Harvey ex Baker		jižní Chile
<i>Gilliesia</i> Lindl.	~ 6	Chile
<i>Miesia</i> Lindl.	~ 6	Chile
<i>Solaria</i> Phil.	3	jižní Chile, Argentina
<i>Ipheion</i> Raf.	3	Jižní Amerika
<i>Leucocoryne</i> Lindl.	~ 20	Chile
<i>Pabellonia</i> , <i>Stemmatium</i>		Jižní Amerika
<i>Nothoscordum</i> Kunth.	~ 25	zejména Chile a Argentina
<i>Tristagma</i> Poeppig.	14	Chile, Argentina, Uruguay
<i>Schickendantziella</i> Speg.	1	Argentina
<i>Speea</i> Loes	2	Chile
<i>Trichlora</i> Baker	2	Peru

Podčeled' *Tulbaghioideae*

Podčeled' *Tulbaghioideae* (Endl. ex Meisn.) zahrnuje především rod *Tulbaghia* L., který obsahuje přibližně 25 druhů. Nedávno byl do této podčeledi zařazen ještě další rod, *Prototulbaghia* Vosa, který ovšem prozatím zahrnuje pouze jediný, teprve nedávno objevený druh *P. siebertii* Vosa [5]. Rostliny obou rodů jsou specifické tím, že nemají cibulky jako ostatní zástupci čeledi Alliaceae, ale relativně drobné oddenky (rhizomy) [1].

Podčeled' *Gilliesioideae*

Podčeled' *Gilliesioideae* (Lindl.) zahrnuje všechny rody česnekovitých rostlin rostoucích v Americe kromě rostlin rodu *Allium*. Zástupci těchto rodů pocházejí výhradně z Jižní Ameriky, hlavně z jižního Chile, Argentiny a Peru. Výjimku tvoří rostliny rodu

Nothoscordum, které rostou po celé Jižní Americe a některé druhy i v severní části tohoto kontinentu. Taxonomické zařazení druhů v podčeledi *Gilliesioideae* je ovšem stále poměrně problematické. Mnoho druhů bylo zařazeno do více různých rodů najednou, situaci navíc komplikuje používání velkého množství synonymních názvů. Dodnes je například nesnadné určit přesné hranice mezi rody *Ipheion* a *Nothoscordum* [1].

2.2 Rod *Allium*

Rod *Allium* L. je široce rozšířený téměř po celé severní polokouli od suchých subtropů až po severní oblasti [6]. Hlavním místem výskytu těchto rostlin je Evropa a Asie [7], přičemž hlavní oblast vysoké druhové diverzity se rozkládá mezi Středomořím a Střední Asií, další významné centrum druhové rozmanitosti se pak nachází na západě Severní Ameriky [6]. Většina zástupců tohoto rodu roste na otevřených, slunečných a suchých místech v mírně vlhkém klimatu [8]. Několik druhů se dokonce vyskytuje v subarktickém pásu (např. *A. schoenoprasum* L.). V menší míře je možné druhy rodu *Allium* nacházet v horách nebo vysočinách subtropických a tropických pásů (např. *A. stracheyi* Baker) [6]. Rostliny rodu *Allium* se snadno přizpůsobují a šíří na další místa, takže často tvoří velké množství rozmanitých morfortypů [8].

Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.) a česnek setý (*Allium sativum* L.) jsou dva celosvětově známé a ekonomicky nejvýznamnější druhy. Pěstování ostatních druhů má význam spíše regionálního charakteru. V Evropě je velmi známý pór zahradní (*A. porrum* L.) a pažitka pobřežní (*A. schoenoprasum* L.), popularitu si v poslední době začíná získávat i konzumace česneku medvědího (*A. ursinum* L.). Jiné druhy se pěstují ve východních částech Středomoří (*A. ampeloprasum*) nebo ve Východní Asii, např. cibule zimní (*A. fistulosum* L.), rakijo (*A. chinense* G. Don) a čínský pórek (*A. ramosum* L. syn. *A. tuberosum* Roxburgh). Uvádí se, že asi dva tucty dalších druhů rodu *Allium* pěstovaných na různých místech světa jsou běžně používány jako zelenina, koření nebo léčivé rostliny, nicméně většina těchto rostlin se dosud nedočkala podrobnějšího vědeckého zkoumání [8].

2.3 Sírné látky v rostlinách rodu *Allium*

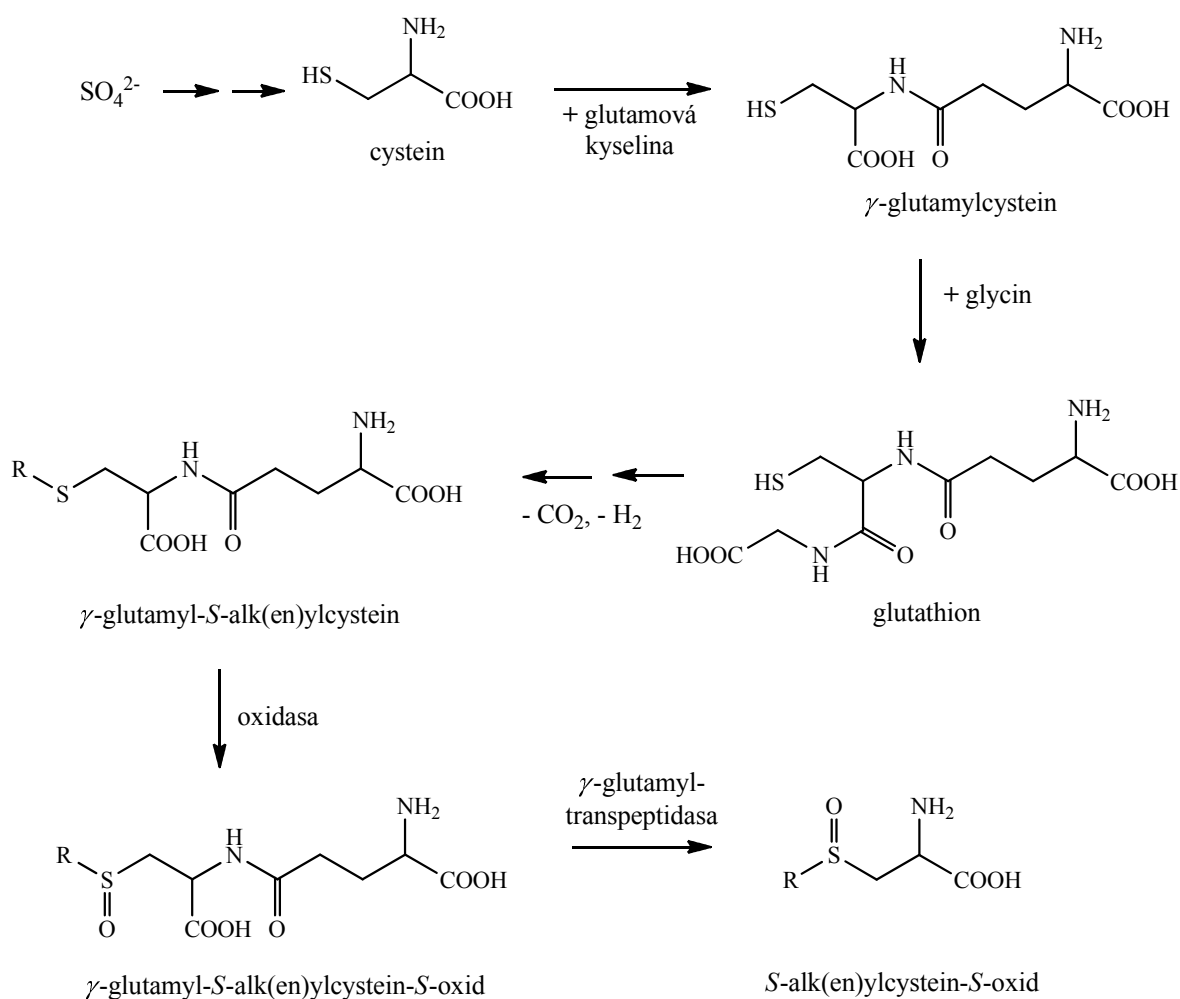
Rostliny rodu *Allium* jsou velmi oblíbenou zeleninou stále většího okruhu lidí, především pro jejich typickou chuť a vůni, díky kterým se staly nedílnou součástí pokrmů na celém světě. Ovšem stále více lidí konzumuje tyto rostliny také pro jejich pozitivní biologické vlastnosti, mezi které patří např. antimikrobiální, antikarcinogenní, antitrombotická či

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

antihypercholesteremická aktivita, jakož i celá řada dalších pozitivních biologických účinků [9]. Za naprostou většinu těchto sensorických a biologických vlastností jsou zodpovědné unikátní sírné látky, které se často jinde v přírodě nenachází.

2.3.1 S-Substituované deriváty cysteinu

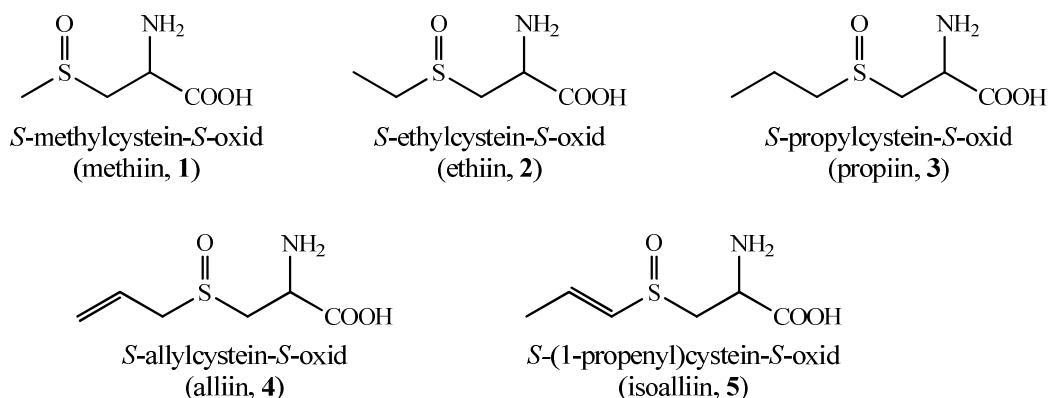
Primárními prekurzory sensoricky a biologicky aktivních sírných sloučenin česnekovitých rostlin jsou nebílkovinné aminokyseliny S-alk(en)ylcystein-S-oxidy. Biogeneze těchto sloučenin je uvedena na obrázku 2. Rostliny rodu *Allium* jsou schopny vázat síru ze síranových iontů (SO_4^{2-}) vyskytujících se přirozeně v půdě a zabudovávat ji do aminokyseliny cysteinu, ze které dále vzniká celá řada odvozených sírných aminokyselin a dipeptidů.



Obrázek 2: Pravděpodobná biogeneze S-alk(en)ylcystein-S-oxidů v česnekovitých rostlinách [9].

V listech vzniká γ -glutamylcystein a glutathion, který je pak převeden na různé γ -glutamyl-S-alk(en)ylcysteiny a jejich S-oxidy. Během růstu a vývoje rostliny jsou tyto látky

transportovány do podzemních částí, kde slouží jako zásobní formy síry a dusíku. Z těchto dipeptidů se dále účinkem γ -glutamyltranspeptidasy tvoří *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidy (obrázek 2) [9]. Mezi *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidy vyskytující se v běžných zástupcích rodu *Allium* patří *S*-methyl-, *S*-ethyl-, *S*-propyl-, *S*-allyl- a (*E*)-*S*-(1-propenyl)cystein-*S*-oxid [triviálními názvy methiin (**1**), ethiin (**2**), propiin (**3**), alliin (**4**) a isoalliin (**5**)] (obrázek 3) [9–12]. Tyto látky jsou v jednotlivých druzích česnekovitých rostlin zastoupeny v různém poměru (tabulka 2), čehož důsledkem je různá chuť a vůně těchto rostlin.



Obrázek 3: Prekurzory senzoryicky aktivních sirných látek v běžných druzích rodu *Allium*.

Alliin, *S*-allylcystein-*S*-oxid (**4**), je pravděpodobně vůbec nejznámější *S*-substituovaný derivát cysteinu. Nalézá se zejména v česneku (*A. sativum* L.) a několika málo dalších česnekovitých rostlinách, jako je česnek šikmý (*A. obliquum* L.), česnek medvědí (*A. ursinum* L.) a česnek ořešec (*A. scorodoprasum* L.) [13].

Polohový isomer alliinu, isoalliin [(*E*)-*S*-(1-propenyl)cystein-*S*-oxid, **5**], je hlavním derivátem vyskytujícím se v cibuli (*A. cepa* L.), pažitce pobřežní (*A. schoenoprasum* L.), cibuli prorůstavé (*A. proliferum*), póru zahradním (*A. ampeloprasum* var. *porrum* L.) nebo šalotce (*A. ascalonicum* Auct.) [10, 13].

Nejrozšířenějším derivátem, přítomným ve všech druzích rodu *Allium*, je methiin (*S*-methylcystein-*S*-oxid, **1**). Naopak výskyt propiinu, *S*-propylcystein-*S*-oxidu (**3**), je poněkud rozporuplný. Zatímco některé studie uvádí [11, 14–16], že je tato aminokyselina přítomna v celé řadě česnekovitých rostlin (např. v cibuli a póru), výzkumy jiných autorů jeho přítomnost nepotvrzují [17, 18]. Mezi minoritní deriváty patří ethiin (*S*-ethylcystein-*S*-oxid,

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2), který byl sice detekován ve většině významných druhů rodu *Allium*, ale s ohledem na jeho množství je jeho význam pro tvorbu aroma těchto rostlin spíše okrajový [11].

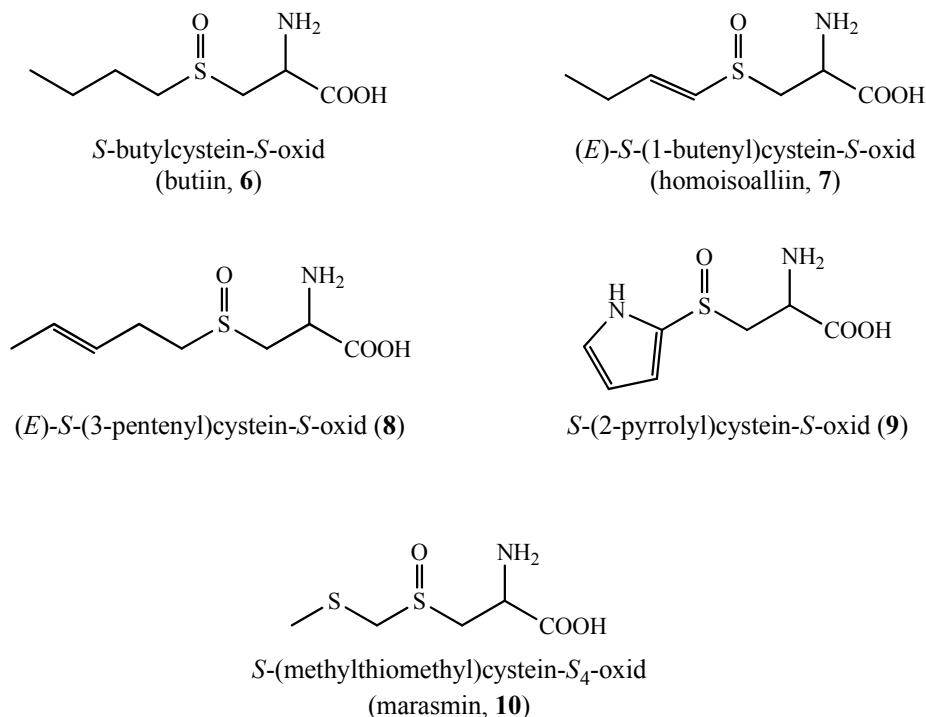
Tabulka 2: Relativní zastoupení *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů v rostlinách rodu *Allium*

	analyzovaná část	zastoupení (rel. %)					lit.
		methiin (1)	ethiin (2)	propiin (3)	alliin (4)	isoalliin (5)	
cibule (<i>A. cepa</i> L.)	cibule	16	–	6	stopy	78	[14]
	cibule	7–15	–	–	–	85–93	[17]
	cibule	15	–	–	–	85	[18]
cibule zimní (<i>A. fistulosum</i> L.)	listy	26	3	8	stopy	62	[11]
	listy	10	–	–	–	90	[17]
	cibule	24	–	65	–	10	[16]
	celá rostlina	17	–	53	–	30	[15]
pór (<i>A. porrum</i> L.)	nadzemní č.	19	stopy	stopy	stopy	81	[11]
	nadzemní č.	8	–	–	–	92	[17]
	nadzemní č.	27	–	–	–	73	[18]
	nadzemní č.	29	–	62	–	8	[16]
	nadzemní č.	27	–	42	–	31	[15]
česnek (<i>A. sativum</i> L.)	stroužky	6–11	< 1	stopy	89–94	stopy	[20]
	stroužky	5	–	–	84	11	[17]
	stroužky	17	–	–	83	stopy	[18]
	stroužky	13	–	2	85	–	[16]
	stroužky	2–24	–	–	74–95	2–11	[15]
pažitka (<i>A. schoenoprasum</i> L.)	listy	44	1	9	3	43	[11]
	listy	48	–	–	6	46	[17]
	cibulky	29	–	64	–	7	[16]
	listy	9	–	72	–	19	[15]
česnek medvědí (<i>A. ursinum</i> L.)	listy	59	< 1	1	40	stopy	[11]
	listy	67	–	–	33	–	[19]
	stroužky	52	–	–	48	–	[19]
	stroužky	32	–	5	64	–	[16]

V posledních deseti letech došlo k objevu ještě několika dalších *S*-substituovaných derivátů cysteinu, které byly izolovány z méně známých druhů česnekovitých rostlin. V červené cibuli Tropea (*A. cepa* var. *tropeana*), rostoucí v Kalábrii, byl identifikován (*E*)-*S*-(3-pentenyl)cystein-*S*-oxid (**8**) [21]. V cibuli obří (*A. giganteum* Regel) a několika jí příbuzných druzích byl zjištěn výskyt *S*-(2-pyrrolyl)cystein-*S*-oxidu (**9**) [22] a v mnoha rostlinách podrodu *Melanocrommyum* byla nalezena aminokyselina *S*-(methylthiomethyl)-cystein-*S*₄-oxid (marasmin, **10**), jejíž přítomnost byla dosud výhradně spojována pouze s rostlinami rodu *Tulbaghia* (podčeleď *Tulbagioideae*) [23].

V *A. siculum* (Ucria) Lindl. a *A. tripedale* (Trautv.) Grossh, jediných známých zástupcích podrodu *Nectaroscordum*, byly identifikovány dva deriváty se čtyřuhlíkatým

postranním řetězcem, a sice *S*-butylcystein-*S*-oxid (butiin, **6**) a (*E*)-*S*-(1-butenyl)cystein-*S*-oxid (homoisoalliin, **7**) (obrázek 4) [12, 24].



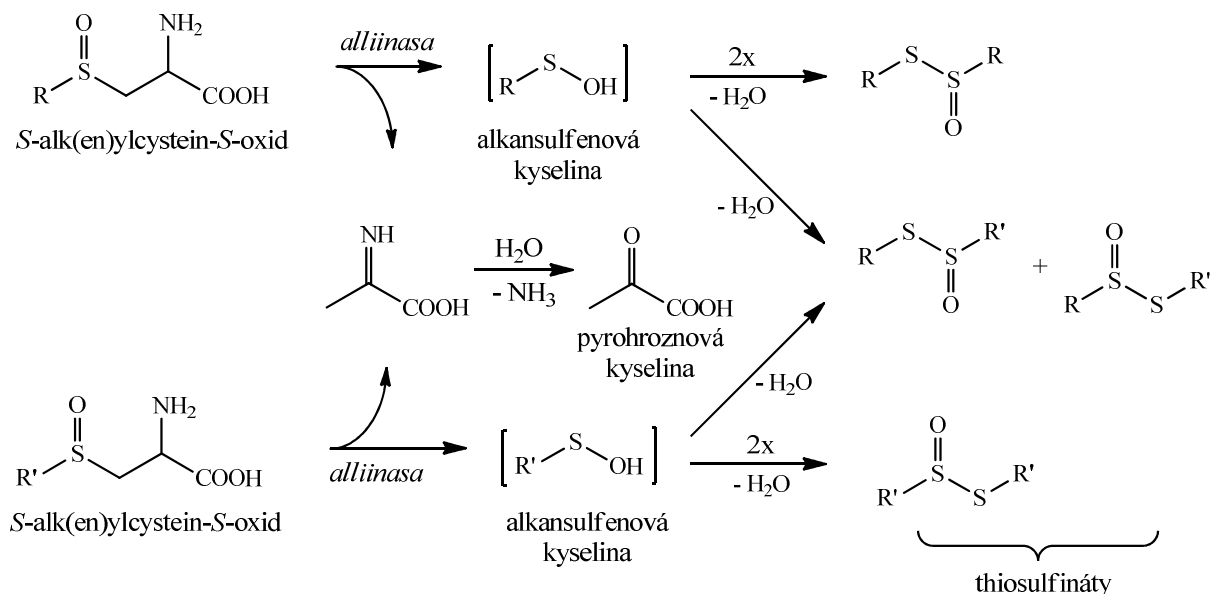
Obrázek 4: *S*-Substituované deriváty cysteinu nedávno identifikované v česnekovitých rostlinách

2.3.2 Enzymově katalyzovaný rozklad *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů

Poměrné zastoupení jednotlivých *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů určuje charakteristické aroma a chuť jednotlivých druhů česnekovitých rostlin. Tyto aminokyseliny samy o sobě nejsou sensoricky aktivní – sensorickou aktivitu vykazují až jejich rozkladné produkty.

S-Alk(en)ylcystein-*S*-oxidy jsou v rostlinách přítomny v cytoplazmě. Ve vakuolách je naopak obsažen enzym alliinasa označovaný také jako C-*S* lyasa (EC 4.4.1.4), který se při porušení rostlinného pletiva uvolní a katalyzuje rozklad *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů na příslušné alkan- či alkensulfenové kyseliny. Tyto mimořádně reaktivní sloučeniny následnými spontánními reakcemi poskytují velmi pestrou směs sirných sloučenin, především thiosulfinátů. Tvorba těchto sirných látek je obecně uvedena na obrázku 5 [25].

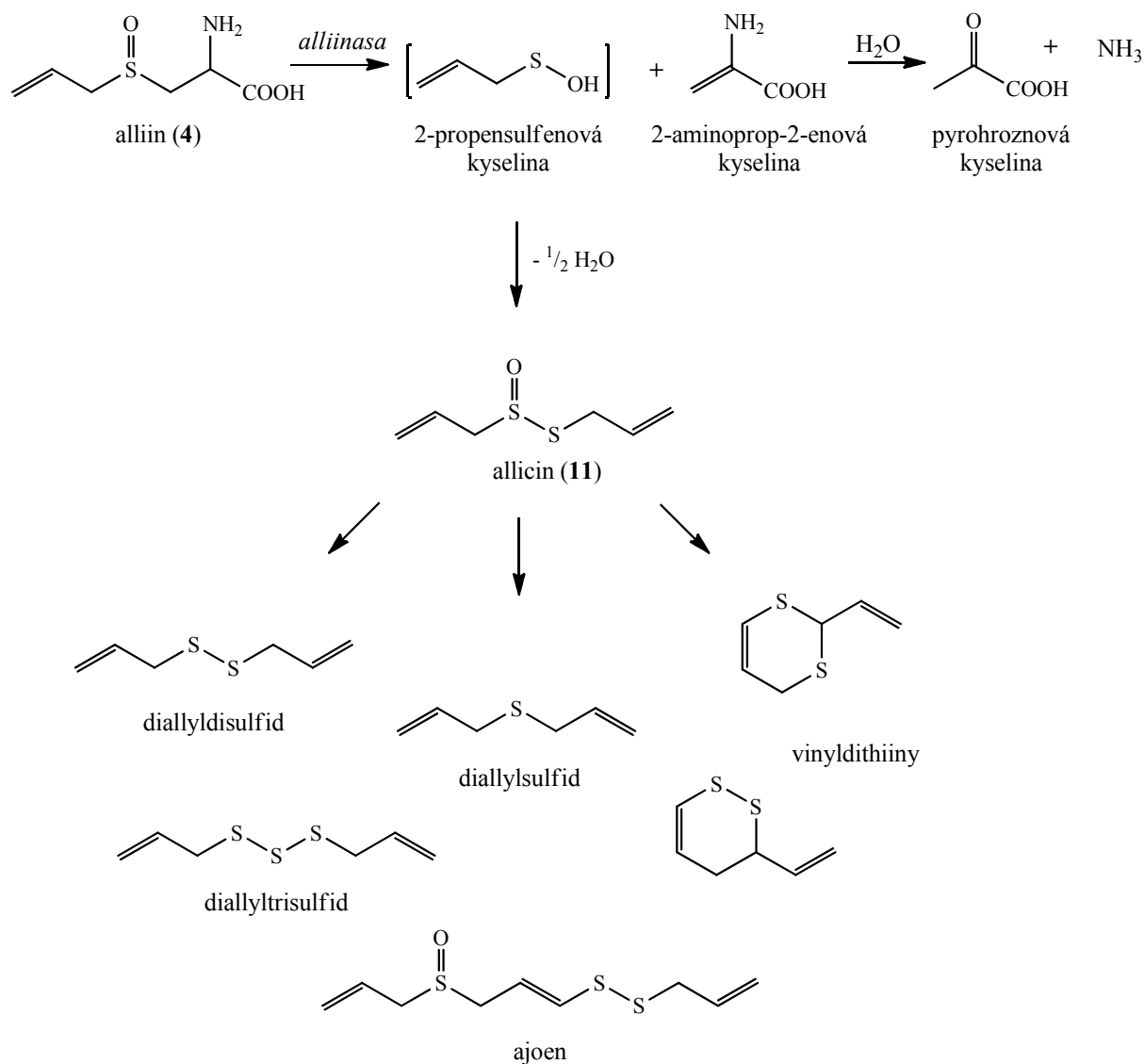
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY



Obrázek 5: Mechanismus vzniku thiosulfinátů.

Alliin (**4**) je prekurzorem nezaměnitelné chuti a aroma česneku, které vzniká při porušení rostlinného pletiva. Hlavním rozkladným produktem alliiinu je thiosulfinát allicin (**11**), z něhož vznikají při kulinárním zpracování další sensoricky i biologicky významné sloučeniny, včetně diallyloligosulfidů, vinyldithiinů a ajoenů (španělsky *ajo* = česnek) (obrázek 6) [9, 26].

Ajoeny mají několik zajímavých strukturních vlastností. Dvě molekuly této látky vznikají ze tří molekul allicinu. Díky přítomnosti dvojné vazby uprostřed molekuly ajoeny tvoří geometrické (*E/Z*) izomery, přičemž obě formy se mírně liší svou biologickou aktivitou. Ajoeny také stejně jako alliin obsahují chirální sulfoxidovou skupinu $-\text{S}=\text{O}$, takže dohromady jsou známy celkem čtyři stereoizomery [(*R*)-(*E*)-, (*S*)-(*E*)-, (*R*)-(*Z*)- a (*S*)-(*Z*)-]. *R* a *S* formy jsou od sebe obtížněji oddělitelné než *E/Z* izomery, předpokládá se také rozdílná jejich biologická aktivita. Ajoeny jsou významné mimo jiné i pro svojí antikarcinogenní a antimikrobiální aktivitu [27].

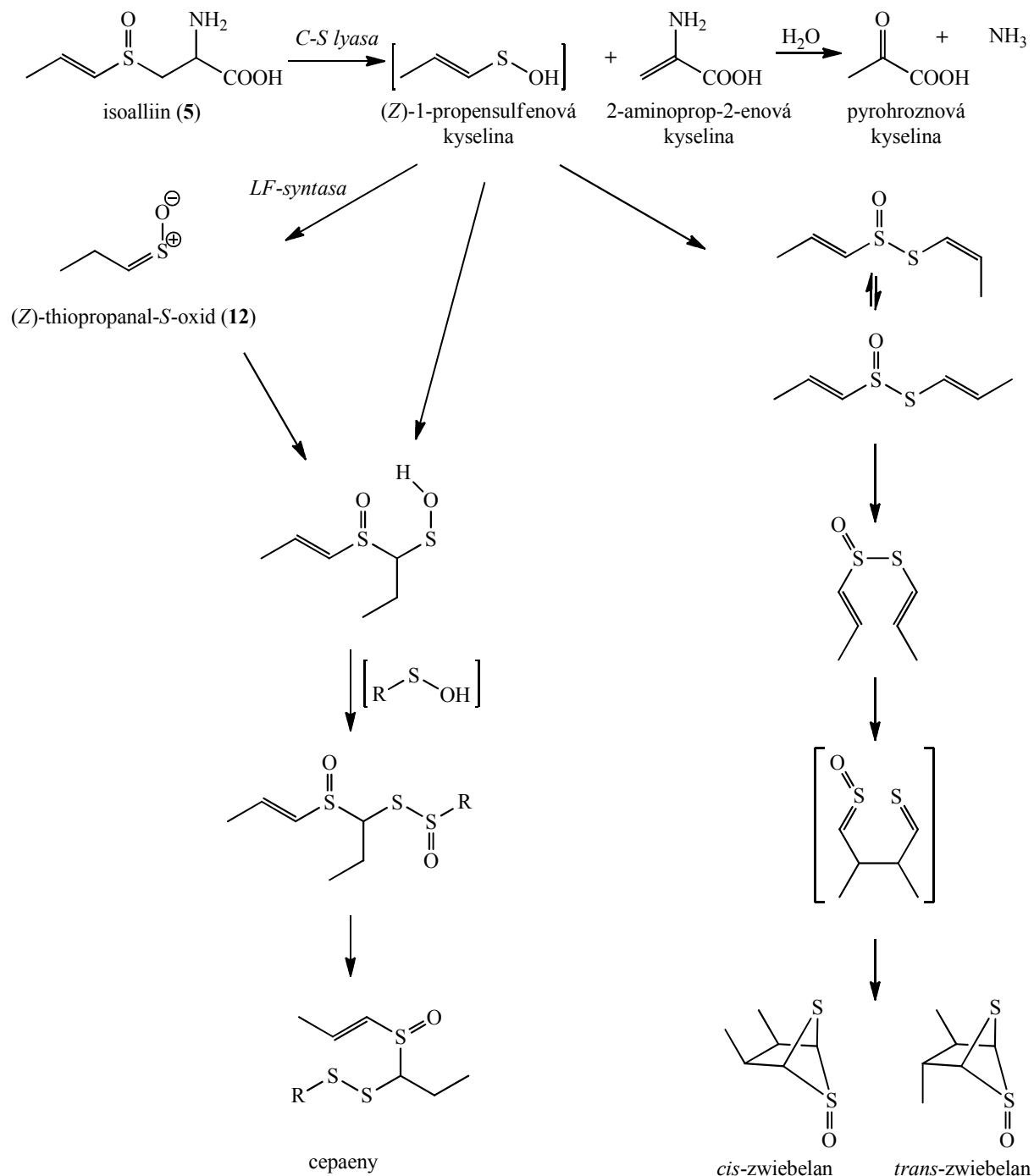


Obrázek 6: Tvorba sirných látek při zpracování česneku (*A. sativum*).

Poněkud specifický a výrazně komplexnější je enzymový rozklad isoalliinu (5). Tato aminokyselina je sice také rozkládána katalytickým účinkem C-S lyasy (alliinasy) na 1-propensulfenovou kyselinu, která dále spontánně kondenzuje s ostatními přítomnými sulfenovými kyselinami za vzniku thiosulfinátů. Ovšem účinkem dalšího enzymu, LF-syntasy, je část vzniklé 1-propensulfenové kyseliny přeměněna také na (Z)-thiopropanal-S-oxid (12). Tento sulfín vykazuje silné slzotvorné účinky tvořící se při krájení cibule. Další produkty, cepaeny, vznikají vzájemnou reakcí 1-propensulfenové kyseliny a (Z)-thiopropanal-S-oxidu. Tyto látky jsou velice podobné ajoenům v česneku nejen strukturně, ale i svými biologickými vlastnostmi (obě skupiny sloučenin mají výrazné antitrombotické účinky). Další strukturně unikátní skupinou látek vznikajících z isoalliinu jsou bicyklické 2,3-dimethyl-5,6-

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

dithia-bicyklo[2.1.1]hexan-5-oxidy, triviálně označované jako zwiebelany (něm. *die Zwiebel* = cibule) (obrázek 7) [9, 28, 29].



Obrázek 7: Tvorba sírných látek při zpracování cibule (*A. cepa*).

2.3.3 Biologická aktivita sirných látek v rostlinách rodu *Allium*

Česnek a cibule jsou již po století používány v lidovém léčitelství proti bakteriím, plísním, parazitům a virům. Významné antimikrobiální vlastnosti vykazují zejména thiosulfináty, které jsou přítomny především v čerstvě zhomogenizovaných česnekovitých rostlinách. Hlavním thiosulfinátem v česneku se silným antibiotickým účinkem je allicin (**11**). I nízké koncentrace této látky zastavují růst grampozitivních a gramnegativních bakterií, např. druhů *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus* a *Bacillus*. Obecně jsou vůči allicinu gramnegativní bakterie citlivější než grampozitivní. Allicin působí podobně jako konvenční antibiotikum ampicilin a zesiluje účinek streptomycinu nebo chloramfenikolu. V medicíně se antibakteriální efekt uplatňuje hlavně proti chorobám sliznice dutiny ústní, dýchacích cest, zánětu mandlí a kataru průdušek. Na počátku 20. století (před objevem penicilinu a dalších antibiotik) byl česnek aplikován při epidemiích tyfu, paratyfu, cholery, tuberkulózy a dalších nemocí [9, 27, 29, 30]. Antibiotické účinky vykazují také thiosulfináty nalezené v cibulovém extraktu (např. *S*-methyl-methanthiosulfinát a *S*-propyl-propanthiosulfinát) [9].

Sirné aminokyseliny a thiosulfináty z rostlin rodu *Allium* také hrají důležitou roli v zažívacím traktu. Při kousání se buněčné pletivo těchto zelenin v ústech zcela nerozmělní, značná část *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů tak projde do zažívacího traktu beze změny. Zatímco allinasa je nevratně denaturována žaludečními šťávami, bakterie přítomné v zažívacím traktu rozštěpí *S*-oxidy na příslušné disulfidy. Thiosulfináty, které vzniknou enzymatickým rozkladem ještě před denaturací enzymu, vydrží krátkou expozici nízké hodnotě pH v žaludku, a mohou tak inhibovat růst patogenních mikroorganismů [9].

Česnek velmi dobře působí i proti patogenním plísním a kvasinkám. Hlavními účinnými látkami s fungicidními a fungistatickými vlastnostmi jsou kromě allicinu i ajoeny a diallyl oligosulfidy. Bylo zjištěno, že tyto látky již v malé koncentraci potlačují růst kvasinek rodu *Candida* a patogenních plísní (např. *Aspergillus* spp.) [31–34]. I olejový macerát z cibule velmi významně působí proti plísním rodu *Aspergillus* [35].

Virostatické účinky v česneku vykazují allicin, diallyl disulfid a diallyl trisulfid. Mezi viry citlivé na extrakt z česneku patří např. chřipkový virus typu B, herpes simplex typu 1 a 2, lidský papilomavirus typu 3 a další. Pravidelná konzumace česneku navíc posiluje imunitní systém [9, 34, 36, 37].

Česnekovité rostliny působí významně i proti parazitům. Například cibulový extrakt vykazoval inhibiční aktivitu proti pěti různým druhům prvoků *Leishmania* s průměrnou

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

hodnotou LD₅₀ 375 ppm [38]. Extrakty z česneku působily proti *L. major* již v koncentraci LD₅₀ 5 ppm [39]. Samotný diallyltrisulfid byl testován proti *Trypanosoma brucei* a jemu příbuzným prvokům, které způsobují spavou nemoc. LD₅₀ diallyltrisulfidu byla zjištěna mezi 0,8 až 5,5 µg/ml [40].

Pozitivní vliv na činnost srdce a krevní oběh patří k dalším významným účinkům sirných látek v česnekovitých rostlinách. Za účinné látky jsou považovány kromě thiosulfínátů i jejich sekundární rozkladné produkty. U česneku se jedná o ajoeny, oligosulfidy a dithiiny, u cibule zejména o cepaeny. Tyto látky brání shlukování trombocytů, inhibují tvorbu cholesterolu a příznivě regulují obsah lipidů v krvi [9, 29, 41]. Zařazení česnekovitých rostlin do jídelníčku tak pomáhá snižovat riziko infarktu a jiných srdečních chorob [9].

Bylo pozorováno, že zvýšená konzumace česneku, póru a čínské pažitky vedla k významnému snížení rizika výskytu rakoviny žaludku. Předpokládá se, že je to způsobeno hned několika mechanismy. Jednak velké množství antioxidantů (např. deriváty cysteinu, thiosulfínáty) chrání buňky před oxidativním stresem. Významná je také regulace dusitanů, které ovlivňují tvorbu karcinomu žaludku, neboť konzumací česneku se výrazně sníží jejich koncentrace v žaludeční šťávě. V neposlední řadě se z česneku tvoří diallyldisulfid, který má schopnost inaktivovat nitrosaminy, a nepřímo tak působí proti rakovině [9, 42]. Mnohé studie také prokázaly, že česnekovité rostliny působí proti vzniku celé řady dalších nádorových onemocnění (rakoviny tlustého střeva, ledvin, plic, slinivky břišní, prsu a jater) [36, 43–46]. Proti leukemii významně působí i ajoeny a diallyltrisulfid [47, 48].

Nejvíce zodpovědné za antiastmatické a protizánětlivé účinky v cibuli jsou thiosulfínáty, zwiebelany a cepaeny. Tyto sloučeniny mají celou řadu farmakologických účinků, jako je inhibice cyklooxygenasy a lipoxygenasy a regulace metabolických drah kyseliny arachidonové [9, 49, 50]. U česneku tuto aktivitu vykazují zejména *S*-allylcystein, diallylsulfid a 1,2-vinyldithiin [51–53].

Dipropyltrisulfid izolovaný z cibule svou antioxidační aktivitou ovlivňuje patofyziologii Alzheimerovy choroby [54]. Také u česneku bylo zjištěno, že jeho extrakt významně podporuje činnost nervových buněk, což by mohlo pomoci v léčbě neurodegenerativních onemocnění, jako je již zmíněná Alzheimerova choroba nebo demence [55]. V roce 2004 bylo zjištěno, že hlavní účinnou látkou v česneku proti této chorobě je (*Z*)-ajoen [56].

2.4 Vybrané rostliny čeledi *Alliaceae*

2.4.1 Rostliny podrodu *Melanocrommyum*

Melanocrommyum (Webb & Berthel.) Rouy je druhý největší podrod rodu *Allium* zahrnující asi 150–200 druhů a poddruhů. Centrum výskytu těchto rostlin je ve Střední a Přední Asii (zejména Tádžikistán, Uzbekistán, Turkmenistán, severozápadní oblasti Číny, Pákistán, Írán a Turecko). Mnoho zástupců podrodu *Melanocrommyum* je v těchto oblastech hojně používáno jako zelenina (ačkoliv jsou výrazně méně aromatické než česnek či cibule) i jako léčivé rostliny. Běžně jsou konzumovány druhy *A. stipitatum* Regel, *A. severtzovioides* R. M. Fritsch (používá se též k léčbě onemocnění dvanáctníku a žaludku), listy z *A. motor* Kamelin et Levichev a *A. rosenorum* R. M. Fritsch (*A. rosenbachium* auct.) jsou přidávány do polévek. Rostlina *A. komarowii* Lipsky se používá jako anabolikum pro koně. Kromě těchto mimořádných použití se tyto česnekovité rostliny uplatňují také při léčbě chudokrevnosti a onemocnění oběhového systému. *A. suworowii* Regel se používá v počátečním stádiu bronchitidy a tuberkulózy, *A. hissaricum* Vved. proti bolestem hlavy a horečce [2, 57, 58].

Rostliny podrodu *Melanocrommyum* jsou ovšem jen velmi málo prostudovanou skupinou rostlin. Přitom u těch, které byly studovány, byly zjištěny významné biologické vlastnosti. Například sirné pyridylové sloučeniny nedávno objevené v těchto rostlinách mají dokonce mnohonásobně vyšší antimikrobiální účinky než látky z česneku [59]. S ohledem na zjištěné pozitivní biologické účinky těchto a jim příbuzných rostlin se tedy jejich detailní výzkum jeví jako mimořádně aktuální.

Allium stipitatum (česnek stopečkatý)

Rostliny *A. stipitatum* Regel dorůstají výšky 60–150 cm. Mají dlouhé a široké listy, příjemně vonící květ má kulovité květenství růžovo-fialové, někdy i bílé barvy (obrázek 8). Jako kořenová zelenina i léčivá rostlina se běžně konzumuje ve Střední Asii. V Íránu je tato rostlina nazývána „*musir*“ (též „*mooseer*“ či „*moosir*“), v zemích bývalého Sovětského svazu (např. v Tádžikistánu) je známá pod jménem „*anzur*“ [58, 57]. Český název je česnek stopečkatý, anglicky je tato rostlina často označována jako „*Persian shallot*“. Dle současných poznatků je *A. stipitatum* identický s *A. hirtifolium* Boiss., ačkoliv někteří botanici považují tyto rostliny za dva samostatné druhy [6, 60, 61]. Přesvědčivý důkaz o tom, že se v případě *A. stipitatum* a *A. hirtifolium* skutečně jedná o identické druhy, podal Dr. Fritsch za využití moderních genetických metod [61, 62].

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY



Obrázek 8: Rostlina² (a) a květenství³ (b) česneku stopečkatého (*A. stipitatum*).

Bílé nebo nažloutlé cibulky česneku stopečkatého se běžně používají v kulinářství, nakládané nebo sušené rozdrčené cibulky se ve Střední Asii hojně používají jako koření. Mimořádně oblíbená je také konzumace rozdrčených cibulek *A. stipitatum* s jogurtem („*mast-o-moosir*“) [57, 62, 63] (obrázek 9). V íránském lidovém léčitelství jsou cibulky *A. stipitatum* používány k léčbě revmatických a zánětlivých onemocnění, dny, artritidy, průjmů, bolestí břicha a hemeroidů [64]. Bylo zjištěno, že sírné látky v *A. stipitatum* mají silné antibiotické účinky a předpokládá se, že mohou mít i další biologickou aktivitu [59]. Bylo též zjištěno, že vodný extrakt z cibulí *A. stipitatum*, lokálně používaný jako ústní voda, má schopnost inhibovat široké spektrum bakterií i plísní [60].



Obrázek 9: Sušené plátky česneku stopečkatého a typický pokrm „*mast-o-moosir*“ (*A. stipitatum* s jogurtem).⁴

² <http://www.biol.uni.wroc.pl/obuwr/archiwum/2/image/15.jpg>; staženo 6. 3. 2013

³ http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/flowr_my/p5080408.jpg; staženo 6. 3. 2013

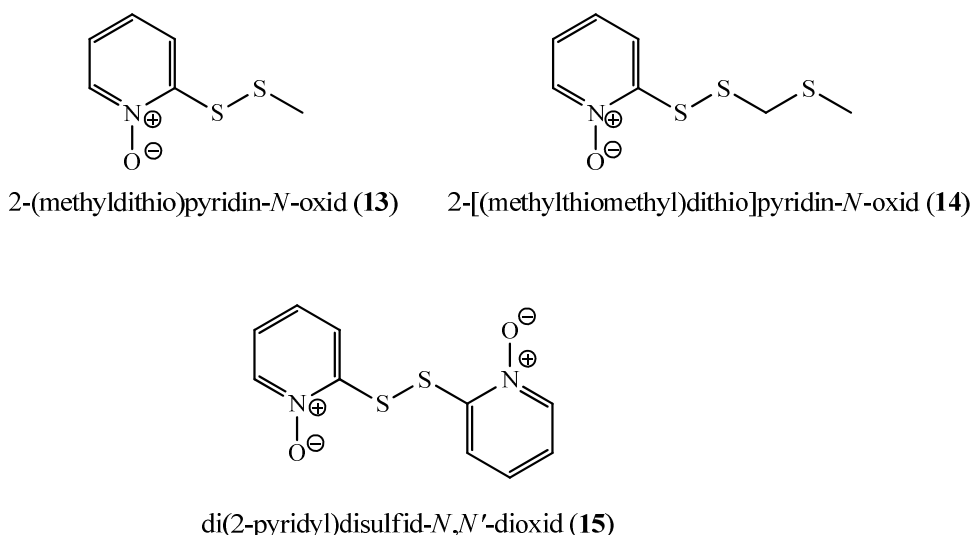
⁴ <http://internationalfooddictionary.com/persian-herbs-sabzi-khordan/#persian-shallot>; staženo 6. 6. 2013

<http://www.aseuromediterraneanmkt.com/products-page/dried-vegetables/>; staženo 6. 6. 2013

<http://razzletravels.blogspot.cz/2007/05/persian-food-in-nyc.html>; staženo 6. 6. 2013

Sírné látky v *Allium stipitatum*

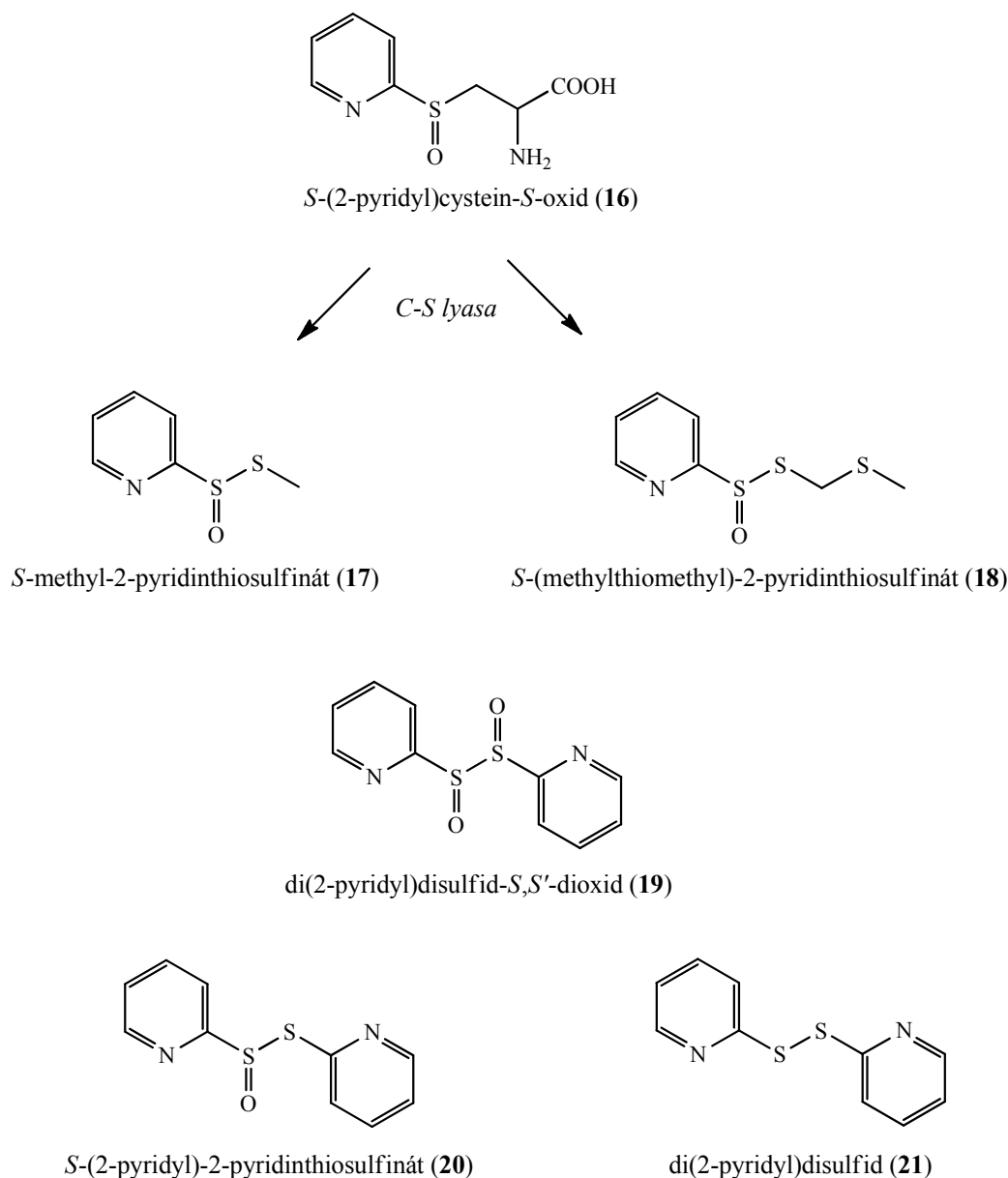
Obsah, struktura a tvorba sírných látek v *A. stipitatum* nebyla dosud zcela objasněna. Teprve nedávno (v roce 2009) O'Donnellová a kol. popsali izolaci třech mimořádně strukturně unikátních sírných derivátů pyridin-*N*-oxidu, a sice 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxidu (**13**), 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxidu (**14**) a di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (**15**) z cibulek této rostliny (obrázek 10). U všech těchto látek byla také zjištěna jejich vysoká antimikrobiální aktivita proti řadě bakterií včetně několika typů *Staphylococcus aureus*. U prvních dvou zmíněných sloučenin (**13**, **14**) byla navíc pozorována vysoká aktivita proti bakteriím *Mycobacterium tuberculosis* (původce TBC) a významný účinek proti několika typům zhoubného bujení (prsů, plic a tlustého střeva) [59].



Obrázek 10: Struktury sírných látek identifikovaných O'Donnellovou a kol. [59].

V roce 2010 byla publikována jiná studie, ve které vědci popsali, že v *A. stipitatum* údajně identifikovali nový *S*-substituovaný cystein-*S*-oxid, a to *S*-(2-pyridyl)cystein-*S*-oxid (**16**). Na základě analogie s enzymově katalyzovaným rozkladem ostatních *S*-substituovaných derivátů cysteinu v jiných druzích česnekovitých rostlin pak usoudili, že rozkladem **16** vzniká *S*-methyl-2-pyridinthiosulfinát (**17**), *S*-(methylthiomethyl)-2-pyridinthiosulfinát (**18**), di(2-pyridyl)disulfid-*S,S'*-dioxid (**19**), *S*-(2-pyridyl)-2-pyridinthiosulfinát (**20**) a di(2-pyridyl)-disulfid (**21**) (obrázek 11) [58].

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY



Obrázek 11: Struktury sirných látek popsanych Kustererem a kol. [58].

Jak je z obrázků 10 a 11 zřejmé, látky popsané v obou zmíněných publikacích se liší polohou navázaného kyslíku. Zatímco O'Donnellová a kol. identifikovali tyto sloučeniny jako pyridin-*N*-oxidy (**13–15**), Kusterer a kol. dospěli k závěru, že tyto *N*-oxidy jsou pouze rozkladné produkty sekundárně vznikající z příslušných thiosulfínátů (tedy *S*-oxidů) (**17–20**). Tento zásadní rozpor ve strukturách sloučenin popsanych v obou publikacích se podařilo rozluštit v této práci (viz kap. 5.1).

2.4.2 Rostliny rodu *Tulbaghia*

Tulbaghia L. (podčeď *Tulbaghioideae*) je relativně málo početný rod čítající asi 25 druhů. Rostliny rodu *Tulbaghia* jsou botanicky velmi příbuzné česneku, cibuli a dalším členům rodu *Allium* [65]. Původem jsou zástupci tohoto rodu z jižní Afriky, kde velmi hojně rostou na skalnatých pastvinách. Přesněji se území jejich přirozeného růstu rozprostírá od jižní Tanzanie do Malawi přes Mosambik, Zimbabwe až do Jihoafrické republiky, kde je hlavní centrum jejich výskytu. Tradičně jsou rostliny rodu *Tulbaghia* využívány v lidovém léčitelství na území jižní Afriky, kde jsou pro mnohé domorodé obyvatele jednou z nejdůležitějších léčivých rostlin [66].

Zástupci rodu *Tulbaghia* jsou většinou skromné, nenáročné rostliny s malými, atraktivními květy, dlouhými listy, často s pronikavou česnekovitou vůní a robustními oddenky. Ačkoli je vhodnější některé choulostivější druhy pěstovat ve sklenících, většina druhů dobře snáší venkovní podmínky mírného pásma severní polokoule. Dlouhou dobu byly rostliny rodu *Tulbaghia* pouze botanické kuriozity kultivované v Evropě a Severní Americe zahradnickými nadšenci, v posledních letech však jejich popularita značně vzrostla. V současné době se tyto rostliny staly nejen populární okrasnou rostlinou rostoucí v mnoha zahradách, ale zvyšuje se i počet lidí, kteří v nich objevili atraktivní alternativu k česneku a pažitce. Oceňují jejich jemně štiplavou chuť a neobvyklou vůni podobnou česneku [67, 68].

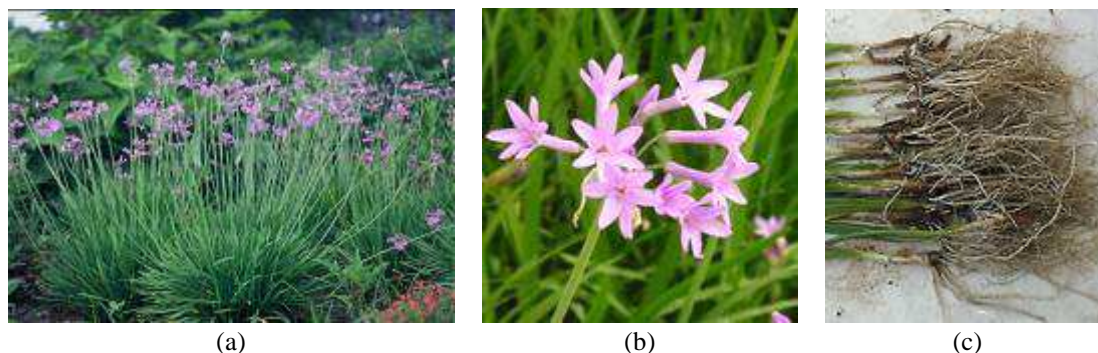
Rostlina *Tulbaghia violacea*

Nejnámějším zástupcem rodu *Tulbaghia* je nepochybně *Tulbaghia violacea* Harv. Tato rostlina dorůstá výšky cca 50 cm, její listy obvykle vyrůstají ve svazcích, jsou úzké, holé, dlouhé až 30 cm a široké 1,5 cm (obrázek 12) [7]. *T. violacea* je původem z Natalu, Transvaalu a východní kapské oblasti v Jihoafrické republice (JAR). Stále zelené listy *T. violacea* mají po porušení charakteristickou vůni, díky níž se také používají v některých oblastech jako náhrada česneku a pažitky. Rostlina má několik triviálních názvů, jako např. „společenský česnek“, „sladký česnek“ nebo „divoký česnek“. Tyto názvy vznikly na základě víry, že navzdory její česnekové vůni konzumace *T. violacea* není doprovázena tvorbou nepříjemného dechu, jako je tomu u běžného česneku (*A. sativum*) [9, 13]. Jak však bylo zjištěno, tato domněnka není pravdivá. Bylo totiž pozorováno, že po žvýkání a požití listů byla silná vůně v dechu znatelná ještě několik hodin, stejně tak po manipulaci s jejími kořeny je česnekový pach z rukou cítit velmi dlouhou dobu [69].

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Kořeny (rhizomy) *T. violacea* se v jižních oblastech Afriky hojně používají v lidovém léčitelství při léčbě horeček, astmatu, nachlazení, tuberkulózy, žaludečních problémů a dokonce i při léčbě některých typů rakoviny (např. jícnu) [66]. Konzumace této rostliny údajně též pomáhá hubit střevní parazity [70]. Louhováním kořenů a listů ve vodě po dobu jednoho dne se připravuje také lék na revma, artritidu či k tišení příznaků horečnatých onemocnění. Domorodí obyvatelé JAR (Zuluové) pěstují tuto rostlinu kolem svých domovů, protože údajně odpuzuje hady. Uvádí se také, že *T. violacea* odhání krtky [67, 68]. Na východě kapské oblasti se rostlinou *T. violacea* léčí koliky, nervozita, bolesti hlavy a horečnatá onemocnění, ve velké míře se podává i malým dětem [7]. V Zimbabwe tato rostlina nachází uplatnění zejména při přípravě pokrmů, kde jsou její listy používány jako ochucovadlo a kořeny vařeny s masem nebo praženy jako zelenina [66].

Bylo však popsáno, že nadměrná konzumace rostlin rodu *Tulbaghia* může způsobit žaludeční problémy. Mezi tyto nežádoucí příznaky patří bolesti břicha, gastroenteritida, akutní záněty, narušení střevní mikroflóry a střevní peristaltiky či celkový útlum organismu [7, 66].



Obrázek 12: Rostlina⁵ (a), detail květu⁶ (b) a kořeny (rhizomy)⁷ (c) *Tulbaghia violacea*.

Sírné látky v rostlinách rodu *Tulbaghia*

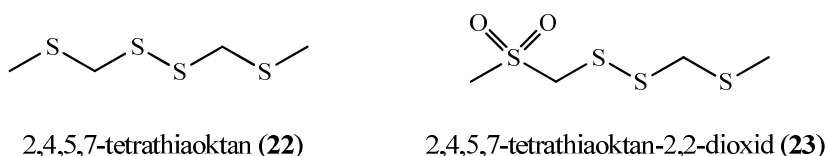
Ačkoliv rostliny rodu *Tulbaghia* jsou botanicky známy poměrně dlouhou dobu, z chemického pohledu jim doposud nebyla věnována velká vědecká pozornost. Dlouhou dobu byly považovány jen za okrasné rostliny. Od 60. let 20. století již byla dobře známa chemická povaha vonných látek a enzymatické pochody probíhající při drcení česneku (*A. sativum*). Jasobsen a kol. se roku 1968 pokusili tyto poznatky aplikovat též na druh *T. violacea*.

⁵ http://www.mgonlinestore.com/SocietyG/Society_Garlic09.jpg; staženo 6. 3. 2013

⁶ http://www.bbc.co.uk/gardening/plants/plant_finder/images/large_db_pics/large_tulbaghia_violacea.jpg; staženo 6. 3. 2013

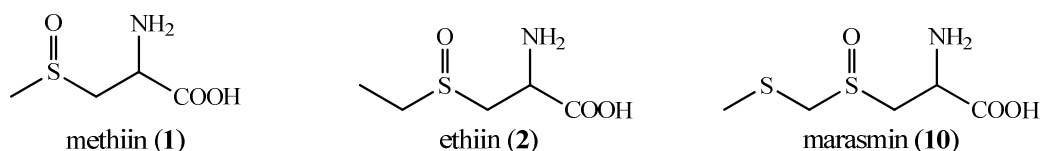
⁷ [http://i.ebayimg.com/00/s/MTE5NVgxNjAw/\\$T2eC16VHJHQE9nzEymDqBQsCrOnksg~~60_35.JPG](http://i.ebayimg.com/00/s/MTE5NVgxNjAw/$T2eC16VHJHQE9nzEymDqBQsCrOnksg~~60_35.JPG); staženo 6. 3. 2013; upraveno

Potvrdili přítomnost C-S lyasy a třech *S*-substituovaných cystein-*S*-oxidů, které se jim ale nepodařilo blíže identifikovat [71]. Později, v roce 1992, se podařilo Burtonovi a kol. izolovat a identifikovat z listů *T. violacea* 2,4,5,7-tetrathiaoktan (**22**) a 2,4,5,7-tetrathiaoktan-2,2-dioxid (**23**) (obrázek 13) [72].



Obrázek 13: Sírné sloučeniny izolované z listů *Tulbaghia violacea*.

Teprve v roce 2002 Kubec a kol. identifikovali v *T. violacea* tři substituované deriváty cysteinu, a sice (*S*_S,*R*_C)-*S*-methyl- a (*S*_S,*R*_C)-*S*-ethylcystein-*S*-oxid (methiin, **1** a ethiin, **2**) a (*R*_S,*R*_C)-*S*-(methylthiomethyl)cystein-*S*₄-oxid (marasmin, **10**) (obrázek 14). První dvě aminokyseliny (**1** a **2**) byly ovšem v rostlině přítomny pouze v minimálním množství, majoritní složkou byl marasmin (**10**). Bylo zjištěno, že tato aminokyselina je hlavním prekurzorem senzoryicky aktivních látek vznikajících v *T. violacea*. *S*-(Methylthiomethyl)-cystein-*S*₄-oxid, avšak s opačnou absolutní konfigurací sulfoxidové skupiny, byl poprvé izolován z hub rodu špička (*Marasmius* Fr.), proto se tato aminokyselina označuje triviálním názvem marasmin [69].

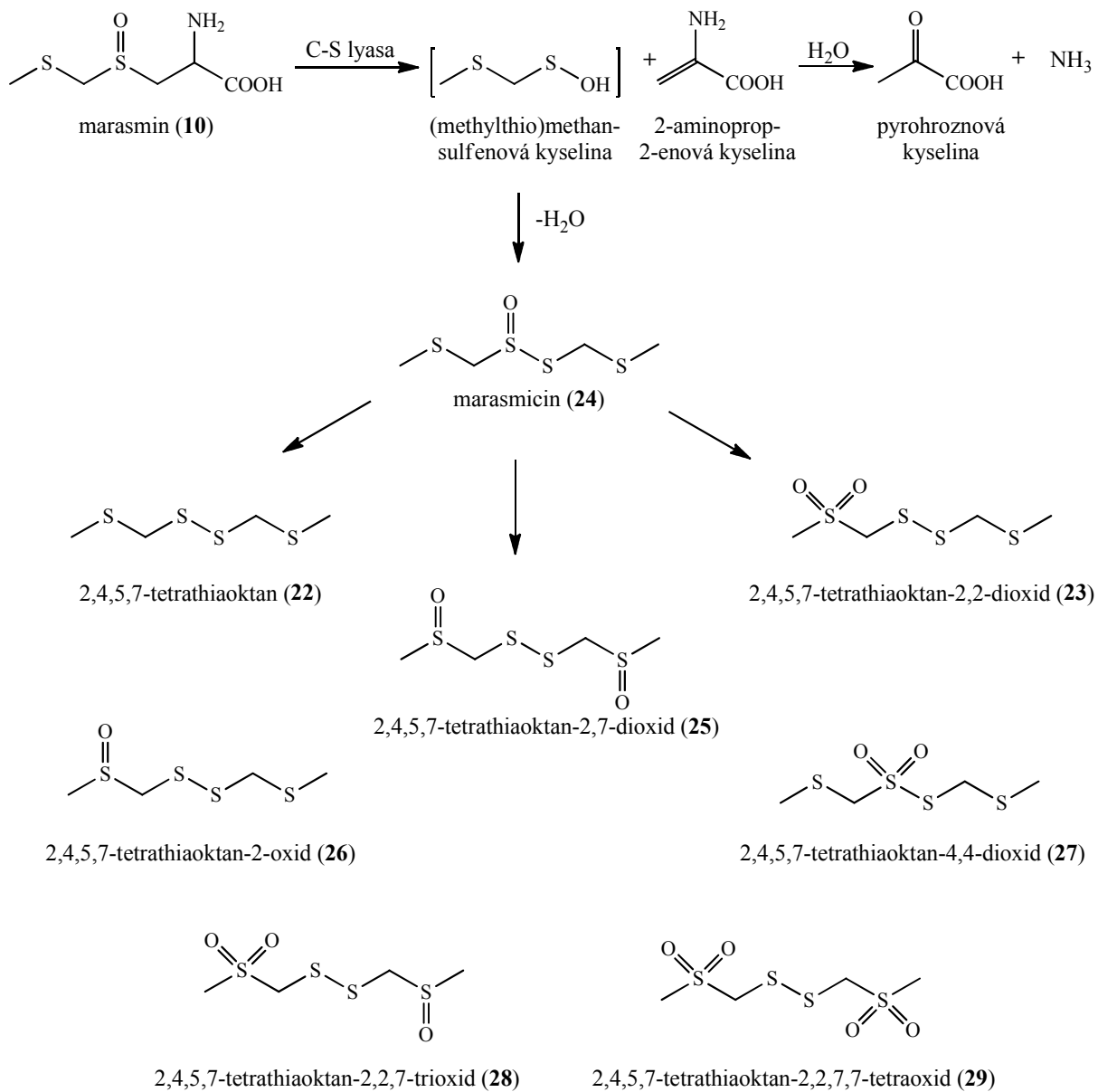


Obrázek 14: *S*-Substituované deriváty cysteinu v *T. violacea*.

Již dříve bylo zjištěno, že proces enzymatického štěpení marasminu (**10**) je analogický štěpení alliinu (**4**) v česneku a jiných česnekovitých druzích [69]. Primární rozkladnou látkou marasminu (**10**) je thiosulfinát 2,4,5,7-tetrathiaoktan-*S*₄-oxid. Látka byla pojmenována triviálním názvem marasmicin (**24**) (analogicky jako u česneku alliin/allicin). Stejně jako ostatní thiosulfináty je i marasmicin relativně nestálý a rozkládá se na další produkty, např. 2,4,5,7-tetrathiaoktan (**22**), 2,4,5,7-tetrathiaoktan-2,2-dioxid (**23**), 2,4,5,7-tetrathiaoktan-4,4-dioxid (**27**) nebo 2,4,5,7-tetrathiaoktan-2,2,7,7-tetraoxid (**29**) (obrázek 15). Mnohé

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

z těchto látek vykazují silné antimikrobiální, antifungicidní a antitrombotické účinky. Předpokládá se, že dalšími látkami, které jsou nositeli charakteristické česnekovité vůně rostlin rodu *Tulbaghia*, jsou (methylthio)methanthiol, bis(methylthiomethyl)oligosulfidy, sulfony a disulfoxidy [69, 73].



Obrázek 15: Tvorba siřných látek v rostlině *T. violacea* [74].

2.4.3 Rostliny rodu *Prototulbaghia*

Doposud jediný známý zástupce rodu *Prototulbaghia* Vosa, *P. siebertii*, byl popsán teprve v roce 2007. Vyskytuje se v pohoří Leolo v Jihoafrické republice v oblasti města

Sekhukhuneland na území o rozloze pouze cca 20 km². Malé rostliny mají tmavě zelené listy zakroucené do malých háčků. Poškozením pletiva listy uvolňují česnekovou vůni. Drobné bílé, růžové nebo také červené květy velikosti 6–7 mm vykvétají počátkem období letních dešťů (obvykle v listopadu) (obrázek 16). Zvláštní je, že tato rostlina nebyla objevena již dříve, neboť po celé léto kvete poutavými barevnými květy v oblasti, kde žijí lidé. Je možné, že botanici rostlinu přehlíželi díky paralelnímu výskytu podobné, ale vzrůstem větší rostliny *Zantedeschia jucunda* (Araceae), a také proto, že pohoří Leolo nepatří k centřům botanického zájmu [5].



Obrázek 16 Rostlina⁸ (a) a detail květu⁹ (b) *Prototulbaghia siebertii*

2.5 Charakteristika používaných mikroorganismů

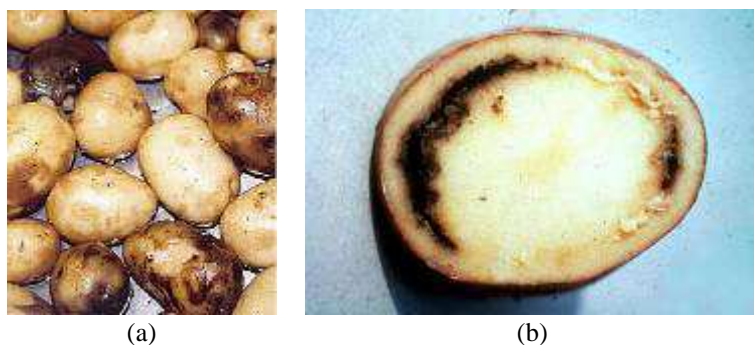
K testování antimikrobiální aktivity byly použity známé bakterie vyskytující se v zažívacím traktu teplokrevných živočichů a člověka *Escherichia coli* (Migula) Castellani a Chalmer a *Enterococcus faecalis* (Andrewes a Horder) Schleifer a Kilpper-Bälz. Dále bakterie *Micrococcus luteus* (Schroeter) Cohn vyskytující se na kůži savců a člověka a *Bacillus cereus* Frankland a Frankland způsobující alimentární intoxikace. Dalšími používanými mikroorganismy byly pekařská či pivovarnická kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen, kvasinka *Candida albicans* (C. P. Robin) Berkhout napadající kůži (původce kandidos) a plíseň *Aspergillus niger* způsobující onemocnění dýchacích cest, rohovky a středního ucha (původce aspergilos) [75–77]. Méně známé mikroorganismy napadající hospodářsky významné rostliny jsou detailněji popsány níže.

⁸ http://www.nwu.ac.za/p-news/pm_1073.html; staženo 6. 6. 2013

⁹ http://www.tulbaghia.com/bmz_cache/5/565e1a880eb50f638b2b8b439b30ef80.image.360x360.jpg; staženo 6. 3. 2013; upraveno

Bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

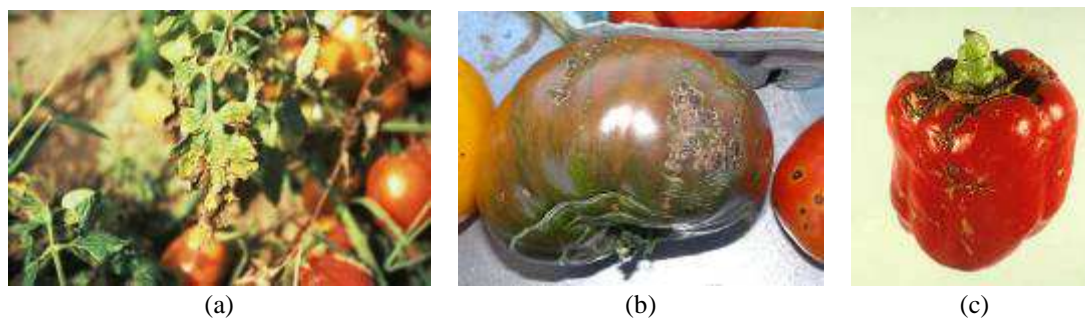
Bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann a Kotthoff) Davis a kol. způsobuje kroužkovitost brambor charakteristickou na podélném řezu hlízami (obrázek 17). V zemích, kde se patogen nevyskytuje nebo se vyskytuje jen lokálně, se uplatňují přísná karanténní opatření. Karanténní inspekci podléhají hlízy [78].



Obrázek 17: Hlízy¹⁰ (a) a řez hlízou¹¹ (b) napadené bakterií *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Bakterie *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*

Patogenní bakterie *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* Vauterin a kol. napadá listy, lodyhy a plody paprik a rajčat, kde způsobuje bakteriální skvrnitost (obrázek 18). Karanténní inspekci podléhají semena a sazenice [78].



Obrázek 18: Rostlina¹² (a), plod rajčete¹³ (b) a plod papriky¹⁴ (c) napadené bakterií *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*.

¹⁰ [http://www.epandi.com/ukpandi/resource.nsf/Files/ctc8-p16-1/\\$FILE/ctc8-p16-1.jpg](http://www.epandi.com/ukpandi/resource.nsf/Files/ctc8-p16-1/$FILE/ctc8-p16-1.jpg); staženo 6. 3. 2013

¹¹ <http://www.forestryimages.org/images/768x512/0656084.jpg>; staženo 6. 3. 2013; upraveno

¹² http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/images/tomatoes/diseases/tomato_bacterial_spot4_zoom.jpg; staženo 6. 3. 2013

¹³ <http://blog.lib.umn.edu/efans/ygnews/bacterial%20spot%20Y%26G.jpg>; staženo 6. 3. 2013

¹⁴ http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/Images/Impt_Diseases/76B_Pep_Bact.jpg; staženo 6. 3. 2013; upraveno

Bakterie *Erwinia amylovora*

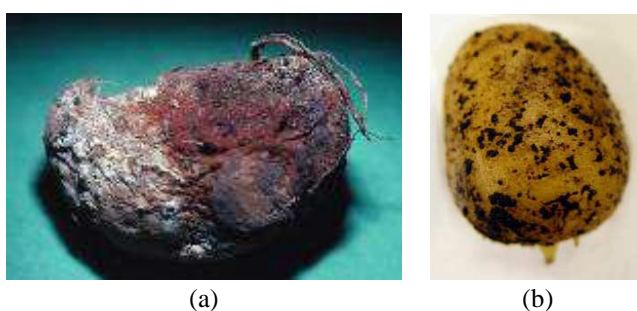
Fytopatogenní bakterie *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow a kol. napadá rostliny čeledi růžovitých (Rosaceae), podčeledi *jabloňovitých* (Malaceae), u kterých způsobuje spálu. Za hlavní hostitele se považují hrušeň, jabloň, kdouloň, jeřáb a další (obrázek 19). Karanténní inspekci podléhají všechny rostlinné části včetně plodů, vyjma semen [78].



Obrázek 19: Větev jabloně¹⁵ (a) a plod hrušky¹⁶ (b) napadené bakterií *Erwinia amylovora*.

Plísně napadající brambory

Plísněmi použitými při testování antiplísňové aktivity byly *Fusarium solani* (Martius) Saccardo a *Rhizoctonia solani* Kuhn. *F. solani* se vyskytuje v půdě a napadá příležitostně bramborové hlízy (obrázek 20a), plody rajčat a semen obilí, ovšem jen druhotně na poraněných místech nebo současně s jiným houbovým parazitem [79].



Obrázek 20: Hlíza bramboru napadená plísní *F. solani*¹⁷ (a) a plísní *R. solani*¹⁸ (b).

¹⁵ <http://www.plantsolutionsnj.com/wp-content/uploads/2012/06/fireblight.jpg>, staženo 6. 3. 2013

¹⁶ http://www.apsnet.org/publications/imageresources/PublishingImages/PDCover2003/oct_3.jpg; staženo 6. 3. 2013

¹⁷ <http://www.insectimages.org/images/768x512/1563331.jpg>; staženo 6. 3. 2013; upraveno

¹⁸ <http://www.potatodiseases.org/images/rhizoctonia/FIG-1sclerotia-tubers.jpg>; staženo 6. 3. 2013; upraveno

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Plíseň *R. solani* způsobuje chorobu bramborových hlíz (obrázek 20b) již na skládkách, a ta se pak přenáší na pole a při klíčení se šíří na spodní části stonku. Je rovněž původcem skládkové hniloby mrkve [79].

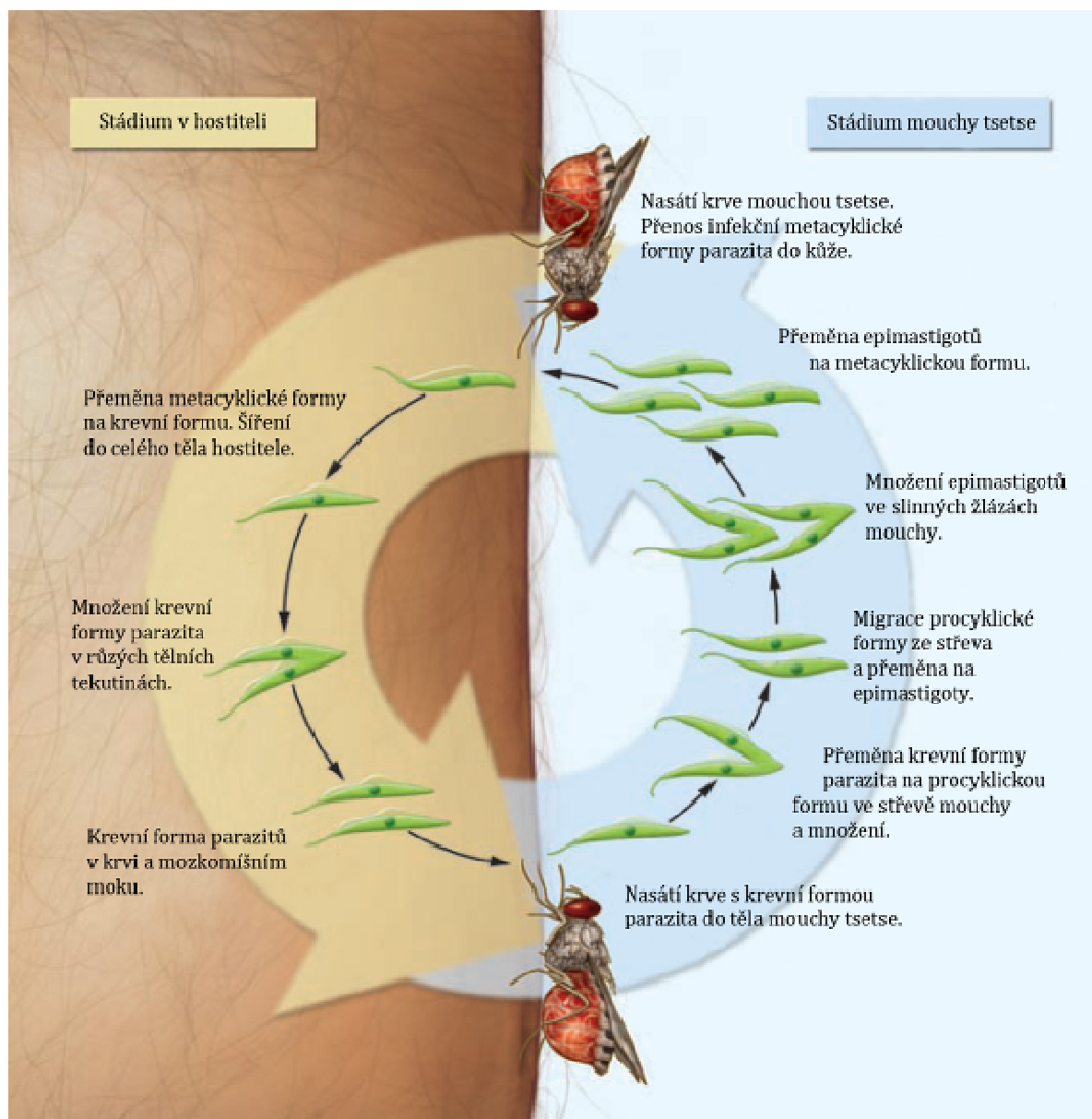
2.6 Charakteristika použitých parazitů

Pro testování antiparazitické aktivity sledovaných látek byli vybráni prvoci, kteří parazitují v těle člověka i zvířat. Oba vybraní paraziti mají několik životních stádií, přičemž testy byly provedeny na obou hlavních formách.

Prvok *Trypanosoma brucei*

Lidské trypanosomiasy patří v Africe mezi nejčastější onemocnění člověka. Toto onemocnění způsobují dva ze tří poddruhů *Trypanosoma brucei* [80]. *T. b. gambiense* a *T. b. rhodesiense* jsou extracelulární parazitické prvoci způsobující lidskou africkou trypanosomiasu neboli spavou nemoc, zatímco *T. b. brucei* není infekční pro člověka, ale způsobuje chorobu zvanou Nagana u domácích přežvýkavců. Parazit napadá domácí i divoká zvířata. Všechny tři poddruhy jsou morfologicky nerozeznatelné. *T. b. brucei* v lidském séru podléhá lýze, zatímco *T. b. gambiense* a *T. b. rhodeseiense* jsou odolné. Tito parazité jsou přenášeni hmyzem, mouchou tsetse. Oblastí jejich výskytu je subsaharská Afrika [81].

Životní cyklus prvoků *T. brucei* znázorňuje obrázek 21. Do slin mouchy tsetse se parazit dostává krví, kterou moucha nasaje z infikovaného zvířete nebo člověka. Po dobu čtyř týdnů probíhá řada morfologických a fyziologických změn parazita v zažívacím traktu a ve slinných žlázách, které se stanou infekčními. Během sání moucha tsetse vstříkne do kůže hostitele infikované parazity. Parazité se rozšiřují prostřednictvím lymfatického systému do krevního oběhu a dále krví do celého organismu. V pozdější fázi onemocnění parazité napadají centrální nervovou soustavu a usadí se mozkomíšní kapalině a mezibuněčných prostorech [80].



Obrázek 21: Životní cyklus parazitických buněk *Trypanosoma brucei* [80].

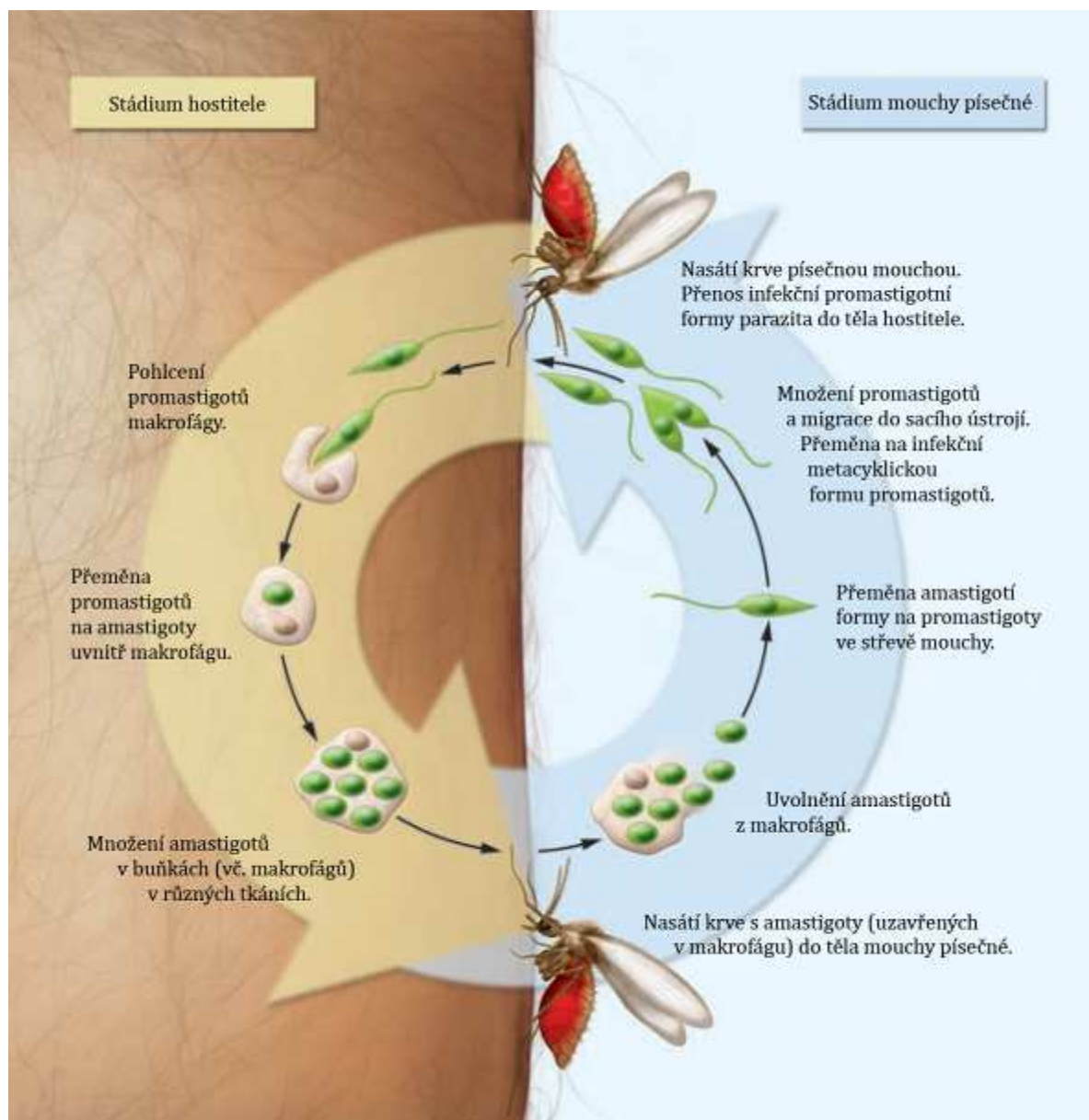
Prvok *Leishmania mexicana*

Druh *L. mexicana* patří do rodu *Leishmania*, jehož zástupci způsobují obávané onemocnění zvané leishmanioza. *L. mexicana* je vnitrobuněčný cizopasník, který způsobuje nejmírnější formu těchto onemocnění. Druh *L. mexicana* se vyskytuje převážně v Jižní a Střední Americe [82].

Kožní infekce vyvolaná druhem *L. mexicana* může být lokálního charakteru v místě bodnutí, nebo se rozšířit po celém těle. Lokální infekce se projevuje po několika dnech až měsících od bodnutí hmyzu. V místě vpichu se vytvoří vřed, který se dále po těle nerozšiřuje a vředy se postupně samy zahojí. Má-li hostitel oslabený imunitní systém, může se

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

onemocnění rozšířit po celém těle. Léčba je pak obtížná, nemocný trpí bolestmi a vředy po celém těle [82, 83].



Obrázek 22: Životní cyklus parazitických buněk *Leishmania mexicana* [80].

Životní stádia parazitů *Leishmania* spp. zobrazuje obrázek 22. Tyto parazitické prvky přenáší písečné mouchy vstříknutím infekčního parazita v promastigotní formě do krve hostitele. V těle savců jsou parazité pohlceny makrofágy, kde se přeměňují na amastigoty a množí se velkou rychlostí. Makrofágy prasknou a uvolní se bezbičkaté buňky. Do mouchy se parazit dostane při nasávání krve z infikovaného člověka. Ve střevě mouchy dochází k přeměně amastigotní formy parazita zpět na promastigotní. Promastigoti putují do sacího ústrojí hmyzu, přičemž tato forma je infekční pro člověka [80].

2.7 Základní charakteristika prováděných testů biologické aktivity

Inhibice cyklooxygenasy

Cyklooxygenasy (COX) jsou enzymy, které zajišťují přeměnu arachidonové kyseliny na prostaglandiny a tromboxany [84]. V organismu se tento enzym vyskytuje ve dvou základních formách – COX-1 a COX-2. Enzym COX-1 je běžně v organismu přítomen a syntetizuje prostaglandiny v mnoha různých buňkách (např. v buňkách trávicího traktu nebo krevních destičkách), zatímco COX-2 je zodpovědný za tvorbu prostaglandinů v zánětlivých buňkách a v buňkách CNS [85]. Prostaglandiny hrají významnou roli v rozvoji zánětu a zvyšují bolestivost [86]. Nesteroidní protizánětlivé léky (např. ibuprofen) inhibují COX-2, a brání tak tvorbě prostaglandinů. Obecně lze konstatovat, že je žádoucí, aby farmakologicky použitelné protizánětlivé sloučeniny selektivně inhibovaly aktivitu COX-2.

Inhibice transportního proteinu pro serotonin (SERT)

Serotonin svým antidepresivním účinkem významně ovlivňuje spánek a náladu. U dospělého člověka se v těle nachází v gastrointestinálním traktu. Můžeme ho nalézt také v CNS většiny živočišných druhů. Je uvolňován presynaptickými serotonergními neurony do synaptické štěrbině, aktivuje specifické receptory a poté je částečně vstřebáván zpět. U zdravých lidí je jeho koncentrace velmi nízká, ale při zánětech či imunitních reakcích je uvolňován ve vysokých koncentracích. Serotoninový transporter (SERT) je monoaminový membranový transportní protein, který přenáší serotonin ze synaptických prostor do presynaptických neuronů. SERT protein ukončuje působení serotoninu a recykluje ho [87]. Nástup deprese je spojován s poklesem neurotransmiterů (serotoninu) v mozku. Úlohou antidepresiv je inhibovat serotoninový transportér (SERT) a tím zabránit zpětnému vychytávání serotoninu.

Testování afinity ke GABA_A receptoru

Kyselina γ -aminomáselná (GABA) je hlavní inhibiční neurotransmitter v CNS savců. Hraje důležitou roli při regulaci přenosu vzruchů neuronů. U člověka je GABA přímo odpovědná za regulaci svalového napětí [88]. GABA má uvolňující a uklidňující účinky, také působí proti křečím [89, 90]. Principem působení uklidňujících léků je podpora účinků GABA a tedy útlum neuronové aktivity.

Inhibice acetylcholinesterasy

Acetylcholinesterasa (AChE) je enzym katalyzující rozklad acetylcholinu za vzniku cholinu a acetátu. Nachází se hlavně v CNS, kde jeho účinek ukončuje synaptický přenos [91]. Acetylcholin se váže na acetylcholinový receptor a funguje jako přenašeč vzruchů u mnoha živočichů včetně člověka. V CNS acetylcholin ovládá řadu vzruchů a odpovědí, má také důležitou roli při aktivaci vnímání po probuzení [92] a při udržování pozornosti [93]. Porucha acetylcholinových drah v mozku může vést až k rozpadu osobnosti, konkrétně způsobuje např. Alzheimerovu chorobu. Látky snižující aktivitu acetylcholinesterasy proto mj. mohou potenciálně působit právě proti rozvoji této nemoci [94].

Inhibice monoaminoxidasy A (MAO-A)

Monoaminoxigenasy jsou enzymy, které katalyzují oxidativní deaminaci monoaminů (např. katecholaminy a serotonin). Při jejich nedostatku dochází ke vzniku depresí. U lidí existují dva typy MAO. MAO-A se vyskytuje v játrech, zažívacím traktu a placentě, zatímco MAO-B se nachází v krevních destičkách [95]. V lékařství se inhibice aktivity MAO využívá při léčbě depresí a úzkosti.

3 CÍLE PRÁCE

Tato disertační práce se zabývá studiem sirných sekundárních metabolitů ve vybraných rostlinách čeledi Alliaceae (česnekovité). Pozornost byla zaměřena především na druhy, které nebyly doposud detailněji studovány, jmenovitě zástupce podčeledi *Tulbaghioideae* (rody *Tulbaghia* a *Prototulbaghia*) a česnek stopečkatý (*Allium stipitatum*) z podrodu *Melanocrommyum*. Rostliny rodu *Tulbaghia* i *A. stipitatum* jsou již dlouhá léta používány k přípravě a ochucování pokrmů, ale také v lidovém léčitelství. U těchto česnekovitých rostlin bylo tedy možné předpokládat, že by potenciálně mohly obsahovat sloučeniny vykazující výrazné sensorické vlastnosti, jakož i biologickou aktivitu.

Hlavními cíli této práce bylo:

- 1) detailní studium sirných sloučenin vyskytujících se (popř. vznikajících) ve výše uvedených druzích česnekovitých rostlin;
- 2) objasnění jejich struktury a mechanismů jejich vzniku;
- 3) posouzení jejich biologické aktivity.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a zařízení

Chromatografický systém pro HPLC-PDA, Varian

- binární systém vysokotlakých pump Dynamax SD-210 Varian (Palo Alto, CA, USA)
- PDA detektor Varian 335
- analytická kolona: Varian Microsorb-MV 100-5 C-18, 250 × 4,6 mm (5 μm)
- analytická kolona: Varian Microsorb-MV 100-5 C-8, 250 × 4,6 mm (5 μm)
- preparativní kolona: Varian Dynamax Microsorb 100-5 C-18, 250 × 21,4 mm (5 μm)
- preparativní kolona: Varian Dynamax Microsorb 100-5 C-8, 250 × 21,4 mm (5 μm)

Chromatografický systém pro HPLC-MS/UV

- autosampler Thermo ACCELA (Erembodegem, Belgie)
- HPLC Accela 600 (Erembodegem, Belgie)
- UV detektor 1000 Spectra System Thermo Finnigan (Erembodegem, Belgie)
- hmotnostní spektrometr Thermo LTQ XL (Erembodegem, Belgie)
- analytická kolona Varian Microsorb-MV 100-5 C-8, 250 × 4,6 mm (5 μm)

Chromatografický systém GC-MS

- GC Varian 3800 (Varian, Palo Alto, CA, USA)
- hmotnostní detektor Varian 4000 MS
- kapilární kolona HP-5MS (30 m × 0,25 mm), tloušťka filmu 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- ionizace nárazem elektronu (EI, 70 eV)

NMR spektrometr

- spektrometr Varian INOVA 500 MHz (Palo Alto, CA, USA)
- spektrometr Varian Mercury 300 MHz (Palo Alto, CA, USA)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

LC-NMR spektrometr

- spektrometr Varian INOVA 500 MHz (Palo Alto, CA, USA)
- kryosonda H/C/N (60 µl aktivní objem)
- PDA detektor Varian (Palo Alto, CA, USA)
- HPLC Varian ProStar 230 (Palo Alto, CA, USA)

IČ spektrometr

- spektrometr Nicolet FTIR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

ESI HRMS

- hmotnostní spektrometr LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

DART-MS

- iontový zdroj DART (DART-SVP, IonSense, Saugus, MA, USA)
- hmotnostní spektrometr Exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Dalšími použitými přístroji byl polarimetr Autopol IV (Rudolph Research Analytical, Hackettstown, NJ, USA) a bodotávek Stuart SMP (Stone, VB).

Přístroje použité při testování biologické aktivity studovaných látek:

fluorimetr Tecan Infinite 200 PRO (Curych, Švýcarsko);

spektrofotometr Tecan Spectra (Curych, Švýcarsko);

spektrofotometr Microplate reader, BioTek, EL 808, Holm & Halby (Winooski, VT, USA);

přístroj stanovující počet buněk, Beckman Coulter Z1 D/T Particle Counter (Ramsey, MN, USA);

kapalinový scintilační analyzátor Counter-2000CA tri-Carb, Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA).

4.2 Speciální nádoby a pomůcky

Scintilační vialky Wheaton-liquid scintillation vials (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA);

filtry Advantec GC50, 25 mm (Dublin, CA, USA);

mikrotitrační destičky, FALCON (Corning, Tewksbury, MA, USA);

mikrotitrační destičky, TPP, Test plate 96F (Trasadingen, Švýcarsko).

4.3 Rostlinný materiál

Cibule rostliny *Allium stipitatum* byly získány od Dr. Leonida Bondarenka (Lithuanian rare bulb garden, Vilnius, Litva) v roce 2009. Tato rostlina původně pocházela z oblasti Hodja-obi-Garm (pohoří Hissar, Pamír, Tádžikistán). Rostlina *Prototulbaghia siebertii* byla získána od Dr. Stefana Sieberta (North-West University, Potchefstroom, JAR) (A). Rostliny rodu *Tulbaghia* byly získány z následujících zdrojů: Hoyland Plant Centre (Hoyland, VB) (B), Silverhill Seeds (Cape Town, JAR) (C) a NCCPG National Collection of *Tulbaghia* (Prime Perennials Nursery, Llanilar, Aberystwyth, VB) (D).

4.4 Použité chemikálie

Chemikálie použité pro syntézy a izolace

Di(2-pyridyl)disulfid (98 %), pyridin-2-thiol (99 %), 2-sulfanylpyridin-*N*-oxid (99 %), dansylchlorid (98 %), L-cystein (99 %), glutathion (98 %), Dowex 50WX4 H⁺ (mesh 50–100), Dowex 50WX4 H⁺ (200–400 mesh), Amberlite IR-120 H⁺ (mesh 16–45) a toluensulfonylfluorid (99 %) byly zakoupeny od firmy **Acros Organics** (Geel, Belgie); *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-on (98 %), 2-brompyridin-*N*-oxid hydrochlorid (97 %), diallyldisulfid (80 %), chlorid cínatý (≥ 99,9 %), chlormethyl(methyl)sulfid (95 %), natrium-2-sulfanyl-pyridin-*N*-oxid (98 %), pyridin (≥ 99 %) a pyridoxal-5-fosfát (≥ 97 %) od firmy **Sigma Aldrich** (St. Louis, MO, USA); aceton (99,5 %), acetylchlorid, amoniak (25 %), chelaton III, kyselina chlorovodíková (35 %), diethylether (p.a.) a glycerol (bezvodý, ≥ 99,5 %) od firmy **Penta** (Praha, Česká republika); acetonitril (99,8 %) od firmy **J. T. Baker** (Griesheim, Německo); ethyl-chlorformiát (> 98 %), methyljodid (99 %) a Silikagel 60 od firmy **Fluka** (Buchs, Švýcarsko); dichlormethan (≥ 99,5 %), hydroxid draselný (≥ 85 %), hydroxid sodný (≥ 98 %), jodid sodný (≥ 99,5 %), kyselina mravenčí (98 %), kyselina octová (99,8 %), síran amonný (99,4 %), síran hořečnatý (bezvodý, 99 %), ninhydrin, methanol

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

(99,97 %), octan sodný (≥ 99 %), oxid manganičitý (90 %) a tetraboritan sodný (≥ 99 %) od firmy **Lach-Ner** (Neratovice, Česká republika); thiomčovina (98 %), peroxid vodíku (30 %) a dihydrogenfosforečnan draselný (99 %) od firmy **Lachema** (Brno, Česká republika); ethanol (96 %) od firmy **Merck** (Darmstadt, Německo). Methiin a marasmin byly získány doc. Ing. Romanem Kubcem, Ph.D. dle postupu popsáném v [96].

Chemikálie použité při testování antimikrobiální aktivity

Agar ST, kvasniční autolyzát, pepton a živný agar č. 2 byly zakoupeny od firmy **Imuna Pharm** (Šarišské Michaľany, Slovensko); bramborovo-dextrosový agar a bramborovo-dextrosový bujón od firmy **Himedia** (Mumbai, Indie); trypton od firmy **Scharlau** (Barcelona, Španělsko); chlorid sodný ($\geq 99,9$ %) od firmy **Penta** (Praha, Česká republika); sójový pepton od firmy **Fluka** (Buchs, Švýcarsko); D-glukosa (p.a.) a Tween 80 od firmy **Lach-Ner** (Neratovice, Česká republika); antibiotikové disky (ampicilin 10, gentamicin 10, chloramfenikol 30 a tetracyklin 30) od firmy **BD Sensi-Disc, Beton Dickinson** (Franklin Lakes, NJ, USA); antibiotika (ampicilin sodný ≥ 98 %, gentamicin sulfát, chloramfenikol ≥ 98 %, tetracyklin hydrát 99 %, tioconazol 97 %) od firmy **Sigma Aldrich** (St. Louis, MO, USA); ethanol (96 %) od firmy **Merck** (Darmstadt, Německo).

Chemikálie použité při testování antiparazitické aktivity

Adenosin (≥ 99 %), bathocuproin sulfát (p.a.), 6-biopterin (5 mg/ml, ≥ 97 %), biotin (≥ 99 %), D-glukosa ($\geq 99,5$ %), D-glukosamin hydrochlorid (≥ 99 %), guanosin (≥ 98 %), hydrogenuhlíčan sodný, kyselina listová (premium), L-alanin ($\geq 98,5$ %), L-serin (98,5–101,0 %), L-tyrosin (≥ 99 %), L-arginin (98,5–101,0 %), hemin (2 mg/ml, ≥ 98 %), M-199 médium, pentamidin isethionát, natrium-pyruvát (≥ 99 %), resazurin sodný, Schneiderovo médium, 2-sulfanylethanol (≥ 99 %), kyselina *p*-aminobenzoová (≥ 99 %) a thymidin byly zakoupeny od firmy **Sigma Aldrich** (St. Louis, MO, USA); dimethylsulfoxid ($\geq 99,5$ %), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES, $\geq 99,5$ %), hypoxanthin ($\geq 99,5$ %), L-cystein (≥ 99 %), L-glutamin (≥ 99 %), L-methionin (≥ 99 %), L-fenylalanin (≥ 99 %), L-prolin (≥ 99 %), L-aurin (≥ 99 %), L-threonin (≥ 99 %) a 3-(*N*-morfolin)propansulfonová kyselina (MOPS, $\geq 99,5$ %) od firmy **AppliChem** (St. Louis, MO, USA); natrium-citrát (≥ 99 %), dihydrogenfosforečnan sodný (≥ 99 %), hydrogenfosforečnan sodný (≥ 98 %) a hydroxid sodný (≥ 98 %) od firmy **Lach-Ner** (Neratovice, Česká republika); MEM aminokyseliny (50 \times), MEM neesenciální aminokyseliny (100 \times), IMD médium (IMDM) a penicilin/streptomycin od firmy **Gibco** (Praha, Česká republika);

Gracovo médium + L-glutamin a MEM + Earlvův fyziologický roztok + L-glutamin od firmy **Lonza** (Basel, Švýcarsko); fetální hovězí sérum (FBS) od firmy **Biochrom** (Holliston, MA, USA); formaldehyd od firmy **Penta** (Praha, Česká republika) a hemasol od firmy **Hemax diagnosa** (Krnov, Česká republika).

Chemikálie a enzymy použité při testování dalších biologických vlastností

(-)-Epinefrin (≥ 97 %), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (≥ 98 %), acetylcholinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7, typ VI-s, z *Electrophorus electricus*, 200–1000 U/mg), acetylthiocholinjodid (98 %), hovězí sérový albumin (BSA, min. 96 %), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, 99 %), cyklooxygenasa-1 (COX-1, EC 1.14.99.1, ≥ 95 %, ≥ 4000 U/mg), cyklooxygenasa-2 (COX-2, EC 1.14.99.1, lidská, ≥ 70 %, ≥ 8000 U/mg), monoaminoxidasa-A (MAO A, EC 1.4.3.4, lidská), ethanol (96 %), ethyl-acetát (99,7 %), hematin, chlorid draselný (99 %), chlorid sodný (99 %), L-glutathion redukovaný (99 %), methanol (99,9 %), peroxidasa (EC 1.11.1.7, typ II, z křenu), prostaglandin E₂ (≥ 99 %), prostaglandin F₂ (≥ 99 %), *p*-tyramin (99 %), tris(hydroxymethyl)aminomethan (99 %), Tris báze (≥ 99 %), Tween 20, diethylthiokarbamat sodný (98 %), hexan, indomethacin (≥ 99 %), nimesulid, paroxetin (≥ 98 %), diazepam a galanthamin-hydrobromid (94 %) byly zakoupeny od firmy **Sigma Aldrich** (St. Louis, MO, USA); [*N*-methyl-³H]flumazenil, [*N*-methyl-³H]citalopram, [1-¹⁴C]arachidonová kyselina a scintilační roztok Ultima Gold XR byly získány od firmy **Perkin Elmer** (Waltham, MA, USA); dihydrogenfosforečnan draselný (99 %), octová kyselina (100 %), kyselina vanilinová (98 %) a trihydrát hydrogenfosforečnanu draselného od firmy **Merck** (Darmstadt, Německo); hexahydrát chloridu hořečnatého (p.a., 99 %) od firmy **Fluka** (Buchs, Švýcarsko); 1,4-dioxan (99,8 %) a 4-aminoantipyrin (> 99 %) od firmy **VWR** (Radnor, PA, USA).

4.5 Seznam metod

4.5.1 HPLC-PDA metody

Metoda 1

- kolona: Varian Microsorb MV 100-5 C-8, 250 × 4,6 mm, 5 μm
- mobilní fáze: 50mM KH₂PO₄ (pH 5,5), acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0–5 min	3 % acetonitrilu
	5–10 min	3–60 % acetonitrilu
	10–15 min	60 % acetonitrilu
	15–25 min	60–3 % acetonitrilu

- průtok: 0,9 ml/min
- nastříkovaný objem: 20 μl
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 220$ nm

Metoda 2

- kolona: Varian Microsorb MV 100-5 C-8, 250 × 4,6 mm, 5 μm
- mobilní fáze: voda, acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0–10 min	10–15 % acetonitrilu
	10–40 min	15–90 % acetonitrilu
	40–50 min	90 % acetonitrilu
	50–55 min	90–10 % acetonitrilu

- průtok: 0,9 ml/min
- nastříkovaný objem: 20 μl
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 210$ nm

Metoda 3

- kolona: Varian Microsorb MV 100-5 C-8, 250 × 4,6 mm, 5 μm
- mobilní fáze: voda, acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0–20 min	10–90 % acetonitrilu
	20–25 min	90 % acetonitrilu
	25–30 min	90–15 % acetonitrilu

- průtok: 0,9 ml/min
- nastříkovaný objem: 20 μ l
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 210$ nm

Metoda 4

- kolona: Varian Microsorb MV 100-5 C-8, 250 \times 4,6 mm, 5 μ m
- mobilní fáze: voda, acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0–15 min	15–70 % acetonitrilu
	15–17 min	70–90 % acetonitrilu
	17–20 min	90 % acetonitrilu
	20–22 min	90–15 % acetonitrilu

- průtok: 0,9 ml/min
- nástřik: 20 μ l
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 210$ nm

Metoda 5

- kolona: Varian Dynamax Microsorb 100-5 C-18, 250 \times 4,6 mm, 5 μ m
- mobilní fáze: 50mM octan sodný (pH 5,0), acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0–35 min	30–40 % acetonitrilu
	35–50 min	40–55 % acetonitrilu
	50–55 min	55 % acetonitrilu
	55–60 min	55–75 % acetonitrilu
	60–65 min	75 % acetonitrilu
	65–70 min	75–30 % acetonitrilu

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

- průtok: 0,9 ml/min
- nástřik: 20 μ l
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 265$ nm

Metoda 6

- kolona: Varian Microsorb MV 100-5 C-8, 250 \times 4,6 mm, 5 μ m
- mobilní fáze: voda, acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0–16 min	20–39 % acetonitrilu
	16–20 min	39–85 % acetonitrilu
	20–30 min	85 % acetonitrilu
	30–35 min	85–20 % acetonitrilu

- průtok: 0,9 ml/min
- nástřik: 20 μ l
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 210$ nm

Metoda 7

- kolona: Varian Microsorb MV 100-5 C-8, 250 \times 21,4 mm, 5 μ m
- mobilní fáze: 50mM KH_2PO_4 (pH 5,5), acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0–5 min	3 % acetonitrilu
	5–10 min	3–60 % acetonitrilu
	10–15 min	60 % acetonitrilu
	15–25 min	60–3 % acetonitrilu

- průtok: 18 ml/min
- nastřikovaný objem: 1 ml
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 220$ nm

Metoda 8

- kolona: Varian Dynamax Microsorb 100-5 C-18, 250 × 21,4 mm, 5 μm
- mobilní fáze: voda, acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0 min	15 % acetonitrilu
	0–18 min	15–83 % acetonitrilu
	18–20 min	83 % acetonitrilu
	20–22 min	83–15 % acetonitrilu
- průtok: 18 ml/min
- nástřik: 1 ml
- kvůli fotolabilitě jímaných sloučenin byl eluent před vstupem do detektoru rozdělen v poměru 1:4 (do detektoru vstupovalo pouze 20 %, 80 % bylo jímano ihned po výstupu z kolony)
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 210$ nm

Metoda 9

- kolona: Varian Dynamax Microsorb 100-5 C-18, 250 × 21,4 mm, 5 μm
- mobilní fáze: voda, acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0–15 min	45–80 % acetonitrilu
	15–17 min	80 % acetonitrilu
	17–20 min	80–45 % acetonitrilu
- průtok: 18 ml/min
- nástřik: 1 ml
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 260$ nm
- kvůli fotolabilitě jímaných sloučenin byl eluent před vstupem do detektoru rozdělen v poměru 1:4 (do detektoru vstupovalo pouze 20 %, 80 % bylo jímano ihned po výstupu z kolony)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Metoda 10

- kolona: Varian Dynamax Microsorb 100-5 C-18, 250 × 21,4 mm, 5 μm
- mobilní fáze: voda, acetonitril

<i>gradientová eluce:</i> 0–4 min	15–25 % acetonitrilu
4–6 min	25–80 % acetonitrilu
6–8 min	80 % acetonitrilu
8–10 min	80–15 % acetonitrilu
- průtok: 18 ml/min
- nástřik: 1 ml
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 285$ nm
- kvůli fotolabilitě jímáných sloučenin byl eluent před vstupem do detektoru rozdělen v poměru 1:4 (do detektoru vstupovalo pouze 20 %, 80 % bylo jímáno ihned po výstupu z kolony)

Metoda 11

- kolona: Varian Dynamax Microsorb 100-5 C-18, 250 × 21,4 mm, 5 μm
- mobilní fáze: voda, acetonitril

<i>gradientová eluce:</i> 0–10 min	15–83 % acetonitrilu
10–12 min	83 % acetonitrilu
12–15 min	83–15 % acetonitrilu
- průtok: 18 ml/min
- nástřik: 1 ml
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 290$ nm
- kvůli fotolabilitě jímáných sloučenin byl eluent před vstupem do detektoru rozdělen v poměru 1:4 (do detektoru vstupovalo pouze 20 %, 80 % bylo jímáno ihned po výstupu z kolony)

Metoda 12

- kolona: Varian Dynamax Microsorb 100-5 C-18, 250 × 21,4 mm, 5 μm
- mobilní fáze: voda, acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0–15 min	15–70 % acetonitrilu
	15–17 min	70–90 % acetonitrilu
	17–20 min	90 % acetonitrilu
	20–22 min	90–15 % acetonitrilu
- průtok: 18 ml/min
- nástřik: 1 ml
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 210$ nm

Metoda 13

- kolona: Varian Dynamax Microsorb 100-5 C-18, 250 × 21,4 mm, 5 μm
- mobilní fáze: voda, acetonitril

<i>gradientová eluce:</i>	0–16 min	20–39 % acetonitrilu
	16–20 min	39–85 % acetonitrilu
	20–30 min	85 % acetonitrilu
	30–35 min	85–20 % acetonitrilu
- průtok: 18 ml/min
- nástřik: 1 ml
- monitorovací vlnová délka: $\lambda = 210$ nm

4.5.2 GC-MS metody**Metoda 14**

- kolona: HP-5MS, 30 m × 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm
- nosný plyn: helium
- nástřiková teplota/teplota detektoru: 180 °C/250 °C

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

<i>teplotní gradient:</i>	0–3 min	130 °C
	3–48 min	130–220 °C (po 2 °C/min)

- průtok: 1,3 ml/min
- nástřik: 1 μ l

Metoda 15

- kolona: HP-5MS, 30 m \times 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μ m
- nosný plyn: helium
- nástřiková teplota/teplota detektoru: 180 °C/250 °C

<i>teplotní gradient:</i>	0–3 min	40 °C
	3–55,5 min	40–250 °C (po 4 °C/min)

- průtok: 1,3 ml/min
- nástřik: 1 μ l

4.5.3 Další používané metody

NMR

- spektrometr Varian INOVA 500 MHz popř. spektrometr Varian Mercury 300 MHz
- rozpouštědlo: D₂O popř. CDCl₃
- v případě použití D₂O byly chemické posuny vztaženy k signálu DSS, u látek měřených v CDCl₃ byly jejich ¹H posuny vztaženy k signálu HMDSS (δ 0,04 ppm) a ¹³C posuny k signálu rozpouštědla (δ 76,99 ppm); ¹⁵N chemické posuny byly vztaženy k signálu nitromethanu (δ 0,00 ppm)

¹H LC-NMR

- spektrometr Varian INOVA 500 MHz
- chemické posuny byly vztaženy k signálu CH₃CN (δ 2,00 ppm)
- H/C/N kryosonda (60 μ l aktivní objem)
- mód stop-flow (WET potlačení signálu rozpouštědla)
- sběr dat: 2 s po 90° RF pulsu (3,4 μ s), spektrální šířka 10 kHz
- zpoždění relaxace: 1 s

IČ

- spektrometr Nicolet FTIR spektrometr
- tablety KBr

ESI HRMS

- hmotnostní spektrometr LTQ-Orbitrap
- rozlišení: $R = 50\,000$ (fwhm)
- provozní napětí: 3,5 kV
- teplota iontového zdroje: 200 °C

DART-MS

- iontový zdroj DART
- hmotnostní spektrometr Exactive
- vzdálenost mezi výstupem ze zdroje DART a keramickou trubicí: 10 mm
- vzdálenost mezi keramickou trubicí a přívodem do kapiláry spektrometru: 2 mm
- vzorky nanášeny manuálně pomocí Dip-It skleněných kapilár
- desorpční čas: 5 s
- ionizace: pozitivní a negativní
- průtok helia: 2,5 l/min
- teplota vzduchu: 350 °C
- napětí na vylučovací jehle: 5 kV
- napětí na mřížkované elektrodě: 350 V
- napětí na kapiláře: 50 V
- napětí na čočce trubice: 120 V
- teplota kapiláry: 50 °C
- rozlišovací schopnost přístroje pro m/z 200: $R = 50\,000$ (fwhm).

4.6 Použitý software

Varian (Palo Alto, CA, USA)

GrafPad Prism (La Jolla, CA, USA)

GraFit 5, Erithacus Software Ltd. (East Grinstead, VB)

4.7 Izolace a syntézy sirných sloučenin

4.7.1 Izolace a syntézy látek vyskytujících se v cibulkách *A. stipitatum*

Izolace aminokyselin z cibulek Allium stipitatum

Oloupané cibulky rostliny *A. stipitatum* o hmotnosti 337 g byly homogenizovány pomocí kuchyňského mixéru s jedním litrem směsi methanol/H₂O/HCl (90/9/1, v/v/v). Směs byla povařena pod zpětným chladičem 5 minut a přefiltrována přes plátno. Filtrační koláč byl ještě jednou povařen s jedním litrem stejného extrakčního činidla a zfiltrován. Oba filtráty byly spojeny a zakoncentrovány na rotační vakuové odparce (RVO) při 40 °C na objem 400 ml. Koncentrát byl odstředěn při 12000 rpm po dobu 12 minut. Hodnota pH supernatantu byla upravena na 2,5 pomocí 5M roztoku KOH. Získaný extrakt byl nanesen na iontoměničovou kolonu Amberlite IR-120 H⁺ (mesh 16–45) o rozměrech 3 × 21,5 cm. Kolona byla po nanesení vzorku nejdříve promyta 1 l destilované vody (eluát nebyl jímán) a aminokyseliny byly z kolony eluovány 1M NH₄OH, přičemž byly jímány frakce o objemu 350 ml [97]. Frakce, které poskytovaly pozitivní reakci s ninhydrinem (0,2% (w/v) v acetonu), byly spojeny, zakoncentrovány na RVO (objem 10 ml) a kyselinou mravenčí byla hodnota pH upravena na 6,0. Získaný vzorek byl analyzován pomocí HPLC-PDA s použitím metody 1.

Před použitím preparativní HPLC byl roztok naředěn 50mM roztokem KH₂PO₄ o pH 5,5 na objem 20 ml. Izolace jednotlivých aminokyselin byla prováděna pomocí preparativní C-8 HPLC (metoda 7). Jímány byly látky s retenčním časem 7,2 minut (látka **30**) a 11,3 minut (látka **31**). Najímané frakce byly spojeny, lyofilizovány, extrahovány 2 × 150 ml methanolu a nerozpuštěný podíl (anorganické soli z použitého pufru) byl odfiltrován. Po odpaření rozpouštědla bylo získáno 569 mg látky **30** a 50 mg látky **31**.

Izolace rozkladných látek z homogenátu *A. stipitatum*

Cibulky *A. stipitatum* o hmotnosti 94 g byly homogenizovány pomocí kuchyňského mixéru se 150 ml destilované vody po dobu 2 minut. Vzniklý homogenát byl ponechán 30 minut při laboratorní teplotě a poté byl extrahován 200 ml diethyletheru a zfiltrován přes plátno. Filtrát byl odstředěn při 3000 rpm (10 minut), organická fáze byla oddělena a vodná fáze byla opětovně extrahována 100 ml diethyletheru. Směs byla opět odstředována při 3000 rpm (10 minut), organické fáze byly spojeny a přesušeny bezvodým MgSO_4 . Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO při teplotě 20 °C, získaný odparek (28 mg) byl rozpuštěn v acetonitrilu, přefiltrován přes PTFE filtr (0,45 μm) a poté analyzován pomocí HPLC-PDA (metoda 2).

Izolace alliinasy z cibulek *A. stipitatum*

Cibulky *A. stipitatum* o hmotnosti 321 g byly homogenizovány pomocí kuchyňského mixéru s 500 ml fosfátového pufru o pH 7,5 [obsahující 0,1 M KH_2PO_4 , 5 mM chelatonu III, 0,5 mM toluensulfonylfluoridu, 10 μM pyridoxal-5-fosfátu, 0,05 % (w/v) cysteinu a 10 % (v/v) glycerolu]. Homogenát byl neustále chlazen ledem. Bylo získáno 800 ml homogenátu, který byl zfiltrován přes plátno. Filtrát byl odstředován při 9000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 15 minut. Supernatant byl slit (400 ml) a postupně k němu bylo přidáno 165 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (58% nasycení). Tato směs byla míchána jednu hodinu za chlazení baňky v ledové tříšti. Směs byla poté odstředována při 9000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 15 minut. Supernatant byl odstraněn a získaný precipitát byl rozpuštěn v minimálním objemu fosfátového pufru (0,1 M, pH 7,5) [98]. Bylo získáno 32,5 ml extraktu obsahujícího alliinasy, který byl dialyzován proti fosfátovému pufru (0,1 M, pH 7,5). Po 18 hodinách dialýzy byl pufr vyměněn a dialýza pokračovala dalších 8 hodin. Poté byl obsah dialyzačního střívka rozdělen do vialek a uchováván při teplotě -80 °C.

Modelové experimenty

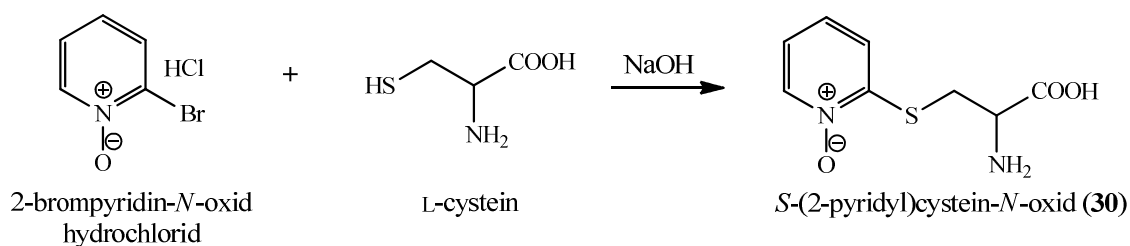
Do 10ml skleněné vialky bylo napipetováno po 1 ml roztoků 2-pyridylcystein-*N*-oxidu (**30**), methiinu (**1**) a marasminu (**10**) o koncentracích 25 mM v 20mM KH_2PO_4 pufru o pH 6,5. Ke směsi aminokyselin bylo přidáno 0,5 ml roztoku alliinasy (10 mg/ml), směs byla míchána při 23 °C po dobu 30 minut a poté extrahována 3 ml dichlormethanu. Organické rozpouštědlo ze vzorku bylo odfoukáno pomocí argonu. Vzorek byl rozpuštěn v 300 μl acetonitrilu, přefiltrován přes PTFE filtr (0,45 μl) a analyzován pomocí C-8 HPLC

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

(metoda 2). Stejně připravené modelové směsi byly analyzovány také pomocí DART-MS po inkubaci jednu minutu (bez filtrace a extrakce).

Pro zjištění mechanismu štěpení *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**) byla směs aminokyseliny (10 mg v 0,3 ml D₂O) s alliinasou (0,4 ml, 10 mg/1 ml) vložena do NMR kyvety a průběžně byla měřena ¹H NMR spektra.

Syntéza *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu



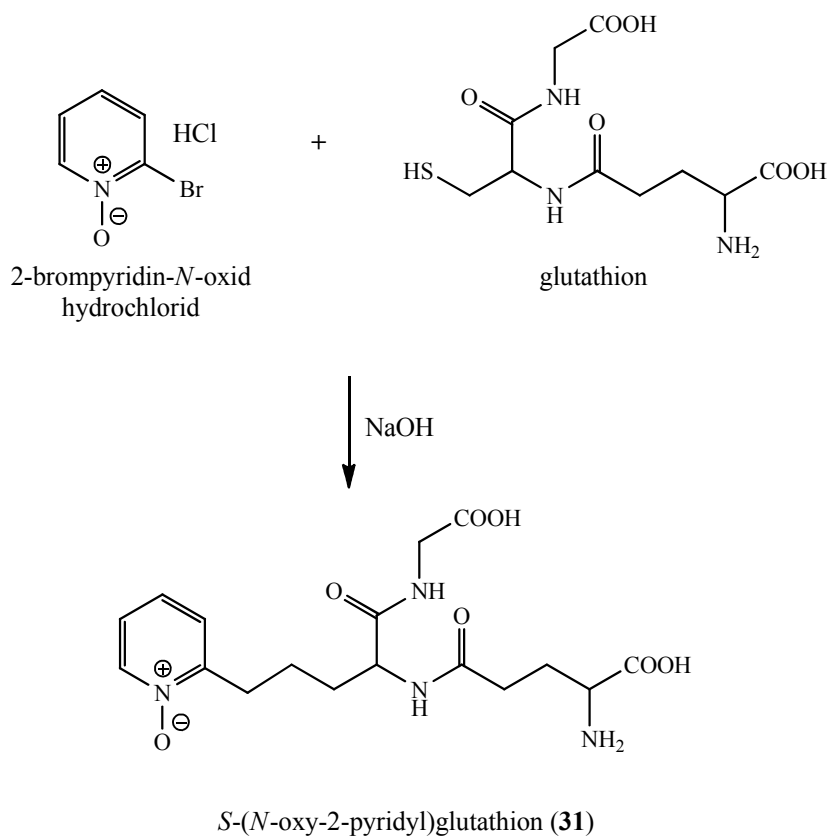
Obrázek 23: Syntéza *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu.

V tříhrdlé 50ml baňce bylo v 10 ml vody rozpuštěno 1,1 g 2-brompyridin-*N*-oxid hydrochloridu (5 mmol) a 0,6 g L-cysteinu (5 mmol) (obrázek 23). Směs byla chlazená studenou vodou a postupně byly přikapány 4 ml 5M roztoku NaOH. Po přidání roztoku NaOH byla reakční směs zahřívána na teplotu 50 °C a míchána pod zpětným chladičem 18 hodin [99]. Přečištění produktu bylo provedeno pomocí sloupcové ionexové chromatografie (Dowex 50WX4, 3 × 11 cm). Analyty byly eluovány z kolony pomocí 1M NH₄OH, přičemž uchovány byly frakce, které poskytovaly pozitivní reakci s ninhydrinem (0,2% (w/v) v acetonu). Po zakoncentrování na RVO (40 °C) byly frakce analyzovány pomocí HPLC (metoda 3) a ty, které obsahovaly *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxid (**30**), byly spojeny. Produkt byl vysrážen smícháním s acetonem v poměru vzorek:aceton 1:4 (v/v). Bylo získáno 0,95 g bílé práškovité látky (výtěžek 89 %), jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí NMR a MS (přílohy A a C).

Syntéza a přečištění *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu

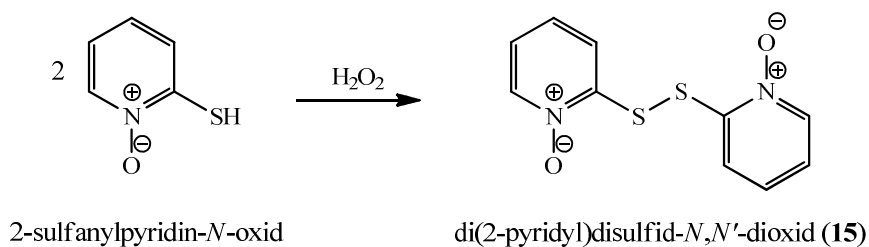
V tříhrdlé 50ml baňce bylo v 10 ml vody rozpuštěno 1,1 g 2-brompyridin-*N*-oxid hydrochloridu (5 mmol) a 1,5 g glutathionu (5 mmol). Směs byla chlazená studenou vodou a postupně byly přikapány 4 ml 5M roztoku NaOH. Po přidání roztoku NaOH byla reakční směs zahřívána na teplotu 50 °C a pod zpětným chladičem míchána 3 hodiny (obrázek 24) [99].

Přečištění bylo provedeno analogickým postupem jako při přečištění *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu. Analýza najímaných frakcí byla provedena pomocí HPLC (metoda 3). Frakce obsahující *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (**31**) byly spojeny a lyofilizovány. Bylo získáno 1,5 g látky (výtěžek 75 %). Čistota a identita produktu byly ověřeny pomocí NMR a MS (přílohy A a C).



Obrázek 24: Syntéza *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu.

Syntéza di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu

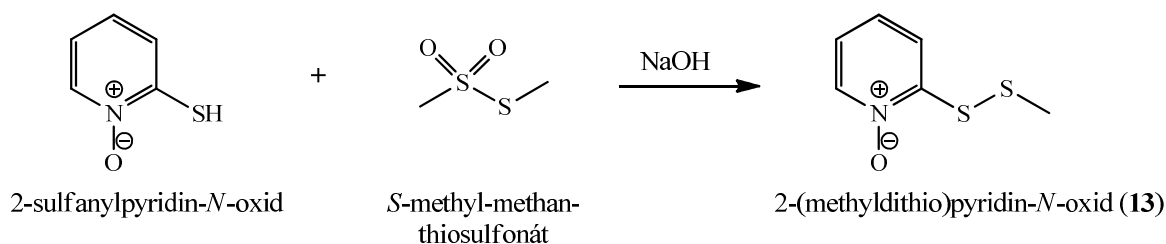


Obrázek 25: Syntéza di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxid (**15**) byl připraven oxidací 2-sulfanylpyridin-*N*-oxidu (obrázek 25). Ve 30 ml destilované vody bylo rozpuštěno 4,23 g (33 mmol) 2-sulfanylpyridin-*N*-oxidu. Do roztoku bylo přidáno 3,5 ml H₂O₂ (30%, 33 mmol) a reakční směs byla míchána 1 hodinu při teplotě 45 °C pod zpětným chladičem [100]. Analýza byla provedena pomocí HPLC (metoda 3, *t_R* 5,4 min). Získaný produkt byl přečištěn rekrystalizací z vroucího methanolu. Bylo získáno 2,3 g světle růžových šupinkovitých krystalů (výtěžek 57 %). Čistota a identita produktu byly ověřeny pomocí NMR a MS (přílohy A a C).

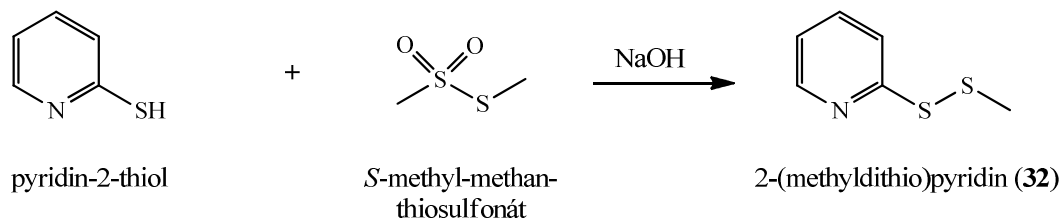
Syntéza 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxidu



Obrázek 26: Syntéza 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxidu.

V 50 ml 0,5M roztoku NaOH (25 mmol) bylo rozpuštěno 3,18 g 2-sulfanylpyridin-*N*-oxidu (25 mmol), ke kterému bylo postupně přikapáno 3,15 g *S*-methyl-methan-thiosulfonátu (25 mmol) (obrázek 26). Reakční směs byla míchána 30 minut za laboratorní teploty a poté extrahována 4 × 30 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze se po vysušení bezvodým MgSO₄ zbarvily do fialova a po odpaření na RVO při 40 °C byla získána šedo-fialová pevná látka [101]. Oddělení barevných vedlejších produktů bylo provedeno na koloně silikagelu (2 × 18,5 cm). Mobilní fází byla směs diethyletheru a dichlormethanu v poměru 1:5 (v/v). Analýza byla provedena pomocí HPLC (metoda 3, *t_R* 8,2 min). Čistota a identita získaného produktu byly ověřeny pomocí NMR a MS (přílohy A a C).

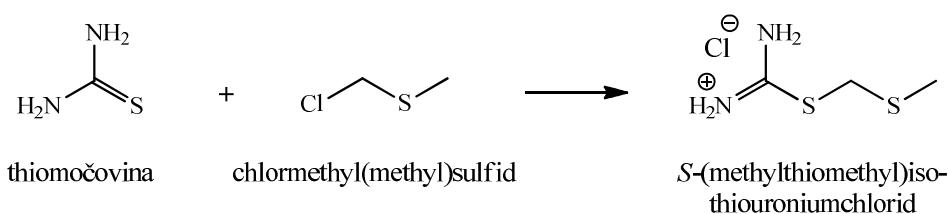
Syntéza 2-(methyldithio)pyridinu



Obrázek 27: Syntéza 2-(methyldithio)pyridinu.

V 50 ml 0,5M vodného roztoku NaOH (25 mmol) bylo rozpuštěno 2,8 g pyridin-2-thiolu (25 mmol). Postupně bylo přidáváno 3,15 g *S*-methyl-methanthiosulfonátu (25 mmol) (obrázek 27). Vytvořil se mléčně zakalený roztok s kapkami žluté olejovité látky, který byl míchán 30 minut za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs extrahována 4 × 30 ml dichlormethanu, spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo odpařeno na RVO při 40 °C. Byla získána žlutá olejovitá látka [101], která byla dále přečištěna na silikagelové koloně (2 × 13 cm). Mobilní fází byla směs diethyletheru a dichlormethanu v poměru 1:5 (v/v). Přečištění pomocí silikagelu bylo prováděno opakovaně, dokud nebyl získán zcela čistý 2-(methylthio)pyridin (**32**). Analýza byla provedena pomocí HPLC (metoda 3, *t_R* 14,5 min). Byly získány 3,0 g krystalů (výtěžek 76 %). Čistota a identita produktu byly ověřeny pomocí NMR a MS (přílohy A a C).

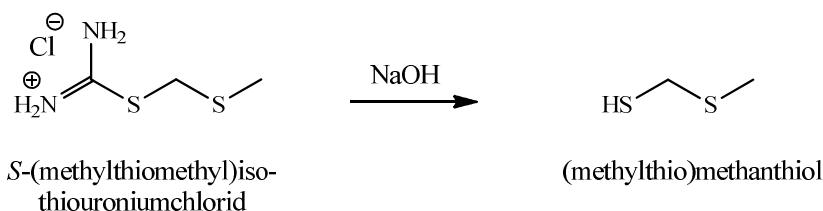
Syntéza *S*-(methylthiomethyl)isothiuroniumchloridu



Obrázek 28: Syntéza *S*-(methylthiomethyl)isothiuroniumchloridu.

V 1l varné baňce s 600 ml acetonu bylo rozpuštěno 20 g thioočoviny (0,26 mol). Ke směsi bylo za stálého míchání po částech přidáno 22,8 ml chlormethyl(methyl)sulfidu (0,26 mol) (obrázek 28). V průběhu přikapávání se roztok zakalil a začala se tvořit žlutá, s acetonem nemísitelná kapalina a v dalším průběhu se začaly tvořit bílé krystalky. Reakční směs byla po 1,5 hodině míchání ochlazená na teplotu 4 °C a vytvořené světle růžové krystalky byly zfiltrvány a rekrystalizovány z ethanolu (výtěžek 64 g, 71 %) [102].

Syntéza (methylthio)methanthiolu

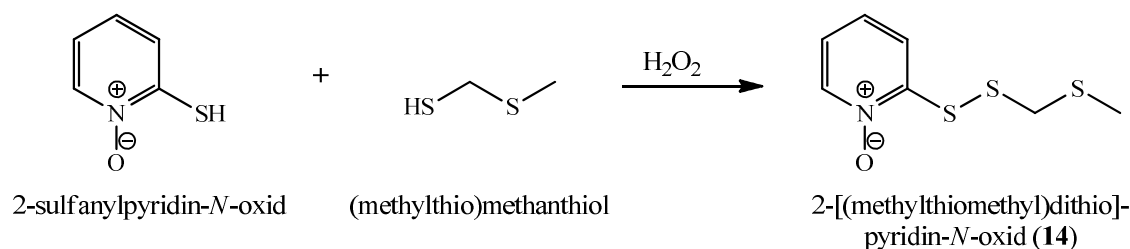


Obrázek 29: Syntéza (methylthio)methanthiolu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Do 100ml varné baňky bylo naváženo 9,8 g *S*-(methylthiomethyl)isothiuroniumchloridu (72 mmol). Tato látka byla nejprve rozpuštěna v minimálním množství destilované vody, poté bylo přidáno 12,3 ml 5M roztoku NaOH a směs byla 2 hodiny míchána při laboratorní teplotě (obrázek 29). Vzniklý (methylthio)methanthiol byl extrahován 2 × 30 ml dichlormethanu. Organická fáze byla extrahována s několika mililitry destilované vody pro odstranění NaOH [103]. Získaná organická fáze obsahující (methylthio)methanthiol již nebyla dále přečišťována a byla využita v dalších syntézách.

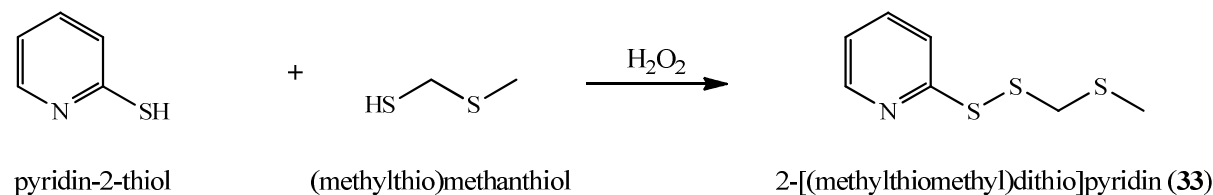
Syntéza 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxidu



Obrázek 30: Syntéza 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxidu.

V 500ml varné baňce bylo v 70 ml acetonu rozpuštěno 9,1 g 2-sulfanylpiperidin-*N*-oxidu (72 mmol). Poté byl ke směsi přidán roztok (methylthio)methanthiolu v dichlormethanu (získaný v předchozí syntéze). K reakční směsi bylo za stálého míchání přikapáno 7,3 ml H₂O₂ (30%, 72 mmol) (obrázek 30). V průběhu 2hodinového míchání směs nejprve zežloutla a poté se začaly tvořit bílé krystalky, které se postupně rozpustily za vytvoření fázového rozhraní. Izolace čistého 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxidu (**14**) byla prováděna pomocí preparativní C-18 HPLC (metoda 8, *t_R* 11,0 min). Z najímaných frakcí byl nejprve odpařen acetonitril na RVO (20 °C), vodná fáze byla vyextrahována 2 × 70 ml dichlormethanu, spojené organické fáze přesušeny bezvodým MgSO₄ a odpařeny na RVO (20 °C). Byla získána bílá krystalická látka, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí NMR a MS (přílohy A a C).

Syntéza 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridinu

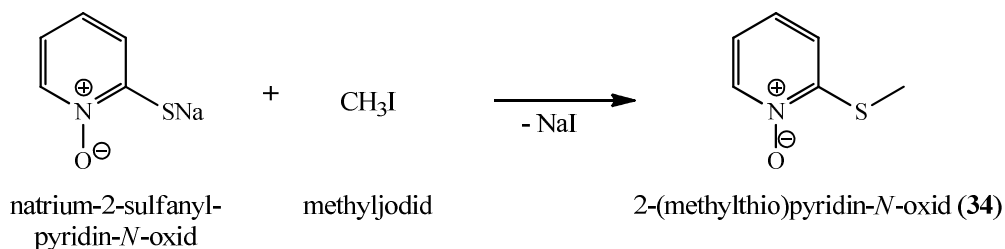


Obrázek 31: Syntéza 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridinu.

Do 500ml varné baňky bylo naváženo 8 g pyridin-2-thiolu (72 mmol) a přilito 70 ml acetonu. Dále byl ke směsi přidán (methylthio)methanthiol v dichlormethanu (získaný pomocí předchozí syntézy) a poté přikapáno 7,3 ml H₂O₂ (30%, 72 mmol). Žlutý roztok se zakalil a zesvětlal. Reakční směs byla poté míchána 2 hodiny za laboratorní teploty (obrázek 31) a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO při 20 °C.

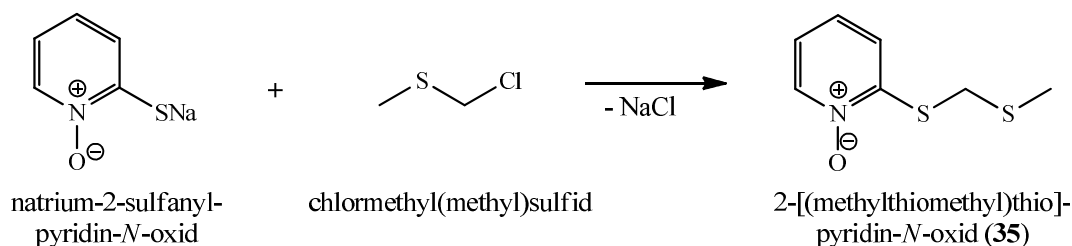
Izolace čistého 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridinu (**33**) byla prováděna pomocí preparativní C-18 HPLC (metoda 9, *t_R* 17,0 min). Následná extrakce této látky z najímaných frakcí byla provedena stejným postupem jako při izolaci 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxidu (**33**) (viz výše). Byla získána bílá krystalická látka, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí NMR a MS (přílohy A a C).

Syntéza 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxidu

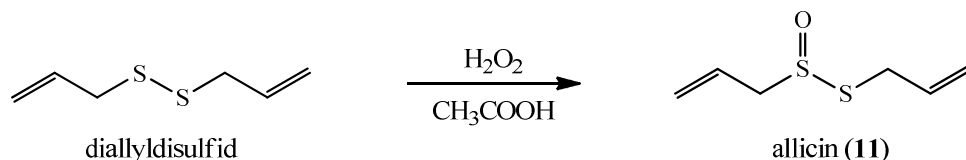


Obrázek 32: Syntéza 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxidu.

Do 100ml reakční baňky bylo naváženo 1,7 g natrium-2-sulfanylpyridin-*N*-oxidu (10 mmol) a rozpuštěno ve 25 ml acetonu (látka se rozpustila jen z části). Za stálého míchání byl v 10% molárním přebytku přikapáván CH₃I (obrázek 32). Reakční směs, která byla zahřáta na teplotu 40 °C, se zbarvila do žluta a začaly se tvořit krystalky NaI. Směs byla míchána 5 hodin, poté byly vzniklé krystaly NaI odděleny filtrací a žlutý filtrát byl zakoncentrován na RVO (30 °C) [104]. Izolace čistého 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxidu (**34**) byla prováděna pomocí preparativní C-18 HPLC (metoda 10, *t_R* 3,7 min). Extrakce této látky z najímaných frakcí byla provedena jako v předchozím případě. Byla získána bílá krystalická látka, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí NMR a MS (přílohy A a C).

Syntéza 2-[(methylthiomethyl)thio]pyridin-*N*-oxidu**Obrázek 33:** Syntéza 2-[(methylthiomethyl)thio]pyridin-*N*-oxidu.

Do 100ml odpařovací baňky bylo naváženo 1,7 g natrium-2-sulfanylpicridin-*N*-oxidu (10 mmol), který byl rozpuštěn ve 25 ml ethanolu. Do roztoku byl přikapán chlormethyl(methyl)sulfid (0,96 g, 11 mmol) a reakční směs byla míchána po dobu 5 hodin při teplotě 40 °C (obrázek 33) [104]. Vzniklé krystalky NaCl byly zfiltrvány a filtrát zakoncentrován na RVO. Izolace 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxidu (34) byla prováděna pomocí preparativní C-18 HPLC (metoda 11, t_R 7,4 min). Extrakce této látky z najímaných frakcí byla provedena stejně jako v předchozím postupu. Byla získána bílá krystalická látka, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí NMR a MS (přílohy A a C).

Syntéza allicinu (*S*-allyl-2-propenthiosulfínátu)**Obrázek 34:** Syntéza allicinu.

Ve 100ml varné baňce bylo spolu s 10 ml acetonitrilu a 10 ml kyseliny octové rozpuštěno 7,3 ml diallyldisulfidu (50 mmol). Roztok byl ochlazen na 0 °C a za stálého míchání byla přikapána peroxooctová kyselina (připravena smísením 6,6 ml 30% peroxidu vodíku v 7 ml kyseliny octové) za vytvoření bílého zákalu (obrázek 34). Po 5 hodinách byla reakce ukončena neutralizací reakční směsi vodným roztokem KOH. Poslední stopy kyseliny octové bylo odstraněny pomocí vodného roztoku NaHCO₃. Hodnota pH roztoku byla poté upravena na 5,0 a reakční směs byla extrahována dichlormethanem (4 × 50 ml). Spojené organické fáze byly přesušeny bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO [105]. Získaný produkt byl analyzován pomocí C-8 HPLC s použitím metody 4. Přechištění allicinu

bylo provedeno pomocí preparativní C-18 HPLC (metoda 12, t_R 12,0 min). Z najímaných frakcí byl nejprve odpařen acetonitril na RVO (20 °C), vodná fáze byla poté extrahována 4 × 50 ml dichlormethanu, spojené organické fáze přesušeny bezvodým MgSO₄ a odpařeny na RVO (20 °C). Byla získána žlutá olejovitá látka, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí MS (příloha C).

4.7.2 Izolace látek vyskytujících se rostlinách rodů *Tulbaghia* a *Prototulbaghia*

Izolace aminokyselin

Kořeny rostlin rodů *Tulbaghia* resp. *Prototulbaghia* o hmotnosti 5–10 g byly homogenizovány se 150 ml směsí methanol/voda/kyselina chlorovodíková (90/9/1, v/v/v). Směs byla povařena pod zpětným chladičem cca 5 minut a přefiltrována přes plátno. Filtrační koláč byl ještě jednou povařen se 150 ml stejného roztoku a zfiltrován. Oba filtráty byly spojeny a zakoncentrovány na RVO při 40 °C na objem 400 ml [97]. Takto připravený extrakt byl před derivatizací a HPLC analýzou uchováván v –28 °C.

Derivatizace pro HPLC analýzu byla prováděna smícháním 300 µl vzorku, 200 µl roztoku dansylchloridu (10 mM v acetonitrilu) a 200 µl borátového pufru (20 mM, pH 9,2) [97]. Analýza byla prováděna pomocí HPLC-PDA (metoda 5).

Pro derivatizaci na GC byl extrakt přečištěn odstředěním při 12000 rpm (12 minut). Hodnota pH supernatantu byla upravena na 2,5 pomocí vodného roztoku KOH. Roztok byl nanesen na iontoměničovou kolonu Dowex 50WX4 H⁺ (mesh 50–100) o rozměrech 1 × 5 cm. Kolona byla promyta 20 ml destilované vody. Aminokyseliny byly z kolony eluovány 50 ml 1M NH₄OH. Eluát byl odpařen na RVO do sucha (40 °C) a získaný odparek byl derivatizován rozpuštěním ve 400 µl směsí ethanol/voda/pyridin (32/60/8/, v/v/v). Poté bylo přidáno 200 µl ethylesteru chlormravenčí kyseliny, 200 µl vodného roztoku NaI (1 g/ml) a 50 µl acetylchloridu. Směs byla ponechána reagovat přes noc a poté bylo přidáno několik krystalků SnCl₂ (pro odstranění vytvořeného jódu). Po rozpuštění byly derivatizované aminokyseliny extrahovány 400 µl dichlormethanu [97] a organická fáze byla analyzována pomocí GC-MS (metoda 14).

Izolace marasmicinu

Lyofilizované kořeny *T. violacea* o hmotnosti 37 g byly homogenizovány s 800 ml destilované vody, ponechány 30 min při laboratorní teplotě a poté byl homogenát přefiltrován přes plátno. Filtrační koláč byl opět homogenizován se stejným objemem destilované vody a

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

zfiltrován. Filtrát byl extrahován dichlormethanem v poměru 1:2 (v/v). V důsledku vzniku emulze bylo nutno směs odstředit při 12000 rpm po dobu 4 minut. Po oddělení organické fáze byla vodná fáze znovu extrahována dichlormethanem v poměru 1:1 (v/v). Organické fáze byly spojeny, přesušeny bezvodým MgSO₄ a extrakční činidlo bylo odpařeno na RVO [69]. Byl získán žlutozelený, silně aromatický odparek sirupovité konzistence. Pro získání dostatečného množství rozkladných látek z kořenů *T. violacea* byl tento postup několikrát opakován, přičemž průměrný výtěžek rozkladných látek byl 1,68 %. Získaný extrakt byl analyzován pomocí C-8 HPLC s použitím metody 6.

Izolace čistého marasmicinu byla prováděna pomocí preparativní C-18 HPLC (metoda 13, t_R 15,0 min). Extrakce marasmicinu z najímaných frakcí byla provedena stejným způsobem jako v případě allicinu. Byla získána světle žlutá, olejovitá látka, jejíž čistota a identita byly ověřeny pomocí NMR a MS (přílohy A a C).

Senzorické hodnocení marasmicinu

Čistý marasmicin byl rozpuštěn v ethanolu na koncentraci 2 mg/ml. Poté bylo 0,1 ml tohoto roztoku naředěno na objem 1 l vodou a roztok byl ponechán 10 minut míchat. Další ředění bylo prováděno vodou a po každém naředění byl roztok míchán 5 minut. Vzorby byly hodnoceny ve třech různých koncentracích. Chuťový práh byl stanovován trojúhelníkovým testem. Senzorické hodnocení bylo provádělo osmi hodnotiteli.

Izolace těkavých látek z kořenů *Tulbaghia violacea*

Čerstvé kořeny *T. violacea* o hmotnosti 25 g byly homogenizovány pomocí kuchyňského mixéru s 250 ml vody a ponechány 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byl homogenát přemístěn do reakční baňky o objemu 1 l a 30 minut vařen pod zpětným chladičem. Poté byla směs ochlazená na laboratorní teplotu a přefiltrována. Filtrát byl extrahován 2 × 200 ml diethyletheru, organické fáze byly spojeny, přesušeny přes MgSO₄, extrakt byl zakoncentrován na 10 ml odfoukáním rozpouštědla dusíkem a analyzován pomocí GC-MS (metoda 15).

4.8 Testování antimikrobiální aktivity

Testování s bakteriálními a kvasinkovými kulturami jsem prováděla na ústavu mikrobiální biologie rostlin (Biologické centrum AV ČR, České Budějovice – pracovní skupina doc. Ing. Ivana Mráze, CSc.), aktivitu látek proti plísním jsem testovala na katedře rostlinné výroby a agroekologie (ZF JU, České Budějovice – pracovní skupina Prof. Ing. Vladislava Čurna, CSc.).

Mikrobiální kultury

Mikrobiální kultury byly získány z několika sbírek mikroorganismů CCM (Česká sbírka mikroorganismů, Brno), ATCC (American Type Culture Collection), BCCM/LMG (Belgian Coordinatel Collections of Microorganisms), RICP (Research Institute of Crop Production - Výzkumný ústav rostlinné výroby, Ruzyně, Praha) a KRV/ZF/JU (sbírka katedry rostlinné výroby a agroekologie, ZF JU, České Budějovice).

Na testování antimikrobiální aktivity byly použity bakteriální kultury *Escherichia coli* (CCM 3954), *Micrococcus luteus* (CCM 1048), *Bacillus cereus* (CCM 869) a *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), fytopatogenní bakterie *Erwinia amylovora* (RICP 121A), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (BCCM/LMG 931) a *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (RICP 1297/99). Z kvasinkových kultur byla na testování používána *Candida albicans* (ATCC 10231). Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* byla získána ze sbírky KRV/ZF/JU. Testované kultury plísní byly *Fusarium solani* (CCM F-1036), *Rhizoctonia solani* (CCM F-1) a *Aspergillus niger* (získána ze sbírky hub oddělení rostlinolékařství, KRV/ZF/JU). Všechny mikroorganismy byly uchovávány v kryozkumavkách při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Příprava živných bujónů a agarů

Trypton-sójový bujón (TSB) byl připraven o koncentraci 15 g/l tryptonu, 5 g/l sójového peptonu a 5 g/l NaCl ve vodě (pro přípravu agaru TSA bylo přidáno ještě 15 g/l agaru). C-médium (bujón) bylo připraveno rozpuštěním 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 5 g/l NaCl a 5 g/l glukosy ve vodě. Maso-peptonový agar obohacený glukosou (MPAg) obsahoval 40 g/l živného agaru č. 2, 10 g/l glukosy, 5 g/l kvasničného autolyzátu a 20 g/l agaru ve vodě. U zmíněných bujónů i agarů byla upravena hodnota pH pomocí 1M vodného roztoku NaOH na hodnotu 7,2. Bramborovo-dextrosový bujón (PDB) byl rozpuštěn

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

ve vodě v koncentraci 24 g/l (výsledné pH 5,1) a PDA 39 g/l (výsledné pH 5,6). Všechna živná média byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Podmínky kultivace

Bakterie *E. coli*, *M. luteus*, *B. cereus* a *E. faecalis* byly kultivovány v TSB/TSA 24 hodin při 37 °C. Fytopatogenní bakterie byly kultivovány následovně: *E. amylovora* 24 hodin, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* a *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* 48 hodin při 25 °C v C-médiu/MPAg. Kvasinka *C. albicans* byla pěstována v TSB/TSA po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C a *S. cerevisiae* KRV/ZF byla kultivována v PDB/PDA 24 hodin při 25 °C. Plísněvé kultury *F. solani*, *R. solani* a *A. niger* byly kultivovány při 25 °C na PDA 48 hodin (pro vytvoření spor trvala kultivace 30 dnů).

Disková difúzní metoda

Optimálně narostlé bakterie na živném agaru byly odebrány do sterilní vody a byla připravena bakteriální suspenze o hustotě 10^9 CFU/ml (10^6 buněk/ml). Na Petriho misky s živným agarem bylo nanášeno 0,5 ml bakteriální suspenze, která byla rovnoměrně rozetřena a nechána asi 3 hodiny absorbovat do agaru. Na sterilní papírové disky o průměru 6 mm bylo nanášeno 5 µl roztoku zkoumané látky o koncentracích 2 mg/ml ve vodě/ethanolu. Disky napuštěné testovaným roztokem byly několik minut ponechány, aby se vypařil ethanol, a pak byly pokládány na živný agar se zapaštěnou bakteriální suspenzí. Vodné roztoky byly nanášeny rovnou na disk položený na agar. Bakterie byly kultivovány při optimální teplotě pro daný druh. Zóny byly odečítány po viditelném nárůstu bakterií (zpravidla 1–2 dny). Aktivní látky byly ty, u kterých byla pozorována inhibiční zóna > 6 mm [106, 107].

Mikrodiluční metoda

Testování bylo prováděno v mikrotitračních destičkách o 96 jamkách. Testované sloučeniny byly převedeny do roztoku rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle (voda, ethanol). Byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 5120 µg/ml. Antibiotika byla rozpuštěna ve vodě nebo ethanolu na koncentraci 160 µg/ml. Po úplném rozpuštění byly testované roztoky přefiltrovány přes sterilní filtr (Millex-GV 0,22 µm). Testované roztoky byly dále zředěny příslušným bujónem 10×. Další ředění bylo prováděno již přímo v mikrotitrační destičce na koncentraci od 512 do 1 µg/ml (ředění 2×). V případě potřeby byla u některých biologicky aktivnějších látek použita nižší počáteční koncentrace. Ve všech jamkách byl celkový objem roztoku 100 µl. Jamky byly zaočkovány 5 µl mikrobiální suspenze o koncentraci 10^7 CFU/ml

(10^4 buněk/ml) ve sterilním bujónu. Kultivace probíhala při optimální teplotě 24 popř. 48 hodin. Zákal byl měřen před a po inkubaci na spektrofotometru TECAN SPECTRA při 405 nm [108, 109].

Testování aktivity proti plísním bylo prováděno analogicky jako u testování inhibičních účinků proti bakteriím a kvasinkám jen s drobnými úpravami. Místo bujónu byl použit agar. Testované látky byly ředěny agarem při teplotě 70 °C. Po ztuhnutí agaru v jamkách byla nanášena suspenze plísňových spór o koncentraci 10^7 CFU/ml v 0,05% (v/v) Tweenu 80 [110, 111].

MIC byla vypočítána jako rozdíl zákalu před nárůstem daného mikroorganismu a zákalu po nárůstu mikroorganismu v testovaném roztoku. Rozdíl byl porovnán se zákalem při optimálním růstu mikroorganismu (bez použití testovaných látek nebo antibiotik). Koncentrace testované látky byla považována za aktivní, pokud inhibice růstu daného mikroorganismu byla ≥ 80 %. Získané hodnoty byly průměrem třech opakování. Test byl prováděn ve dvou nezávislých experimentech, popř. dokud nebyla dvě měření shodná.

4.9 Testování antiparazitické aktivity

Testování jsem prováděla na Parazitologickém ústavu (Biologické centrum AV ČR, České Budějovice) v pracovní skupině RNDr. Aleny Zíkové, Ph.D.

Parazitické kultury

Pro testování antiparazitické aktivity byly použity dva druhy parazitů v obou svých životních stádiích (v těle hmyzu – procyklická/promastigotní forma, v těle hostitele – krevní/amastigotní forma). Procyklická forma (PF) *Trypanosoma brucei brucei* 427 a krevní forma (BF) *Trypanosoma brucei brucei* byly získány na Parazitologickém ústavu BC AV ČR, promastigotní forma *Leishmania mexicana* 379 byla získána od katedry parazitologie Univerzity Karlovy v Praze. Prvoci byli uchováváni v kryozkumavkách při -80 °C ve vhodném médiu obohaceném do 10 % (v/v) DMSO. Amastigotní forma *Leishmania mexicana* byla transformována z promastigotní dle postupu popsaného níže.

Podmínky kultivace

Procyklická forma *T. brucei brucei* byla kultivována při 27 °C v 5% atmosféře CO_2 v médiu SDM-79 obohaceném 10 % (v/v) tepelně inaktivovaného fetálního hovězího séra (FBS). Krevní forma *T. brucei brucei* byla kultivována při 37 °C v 5% atmosféře CO_2

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

v médiu HMI-9 obohaceném 10 % (v/v) tepelně inaktivovaného FBS. Promastigotní forma *L. mexicana* byla kultivována při teplotě 23 °C v médiu M-199. Amastigotní forma *L. mexicana* byla kultivována při teplotě 32 °C ve Schneiderově médiu (SIM) s 20 % (v/v) tepelně inaktivovaného FBS. Buňky byly pěstovány v 75ml kultivačních lahvích ve vodorovné poloze a pasážovány každý druhý až třetí den podle rychlosti jejich růstu. Koncentrace buněk byla měřena na přístroji Beckman Particle Counter. Buňky byly při měření fixovány roztokem TRYP-FIX.

Příprava živných médií a roztoků

Médium SDM-79 obsahovalo 40 ml/l penicilinu/streptomycinu, 6,24 g/l MEM + Earlvův fyziologický roztok + L-glutamin, 8 ml/l MEM s aminokyselinami, 6 ml/l MEM s neesenciálními aminokyselinami, 22 g/l Graceova média + L-glutaminu, 100 mg/l natrium-pyruvátu, 10 mg/l adenosinu, 2 mg/l *p*-aminobenzoové kyseliny, 0,2 mg/l biotinu, 1 g/l glukosy, 8 g/l HEPES, 5 g/l MOPS, 2 g/l NaHCO₃, 200 mg/l L-alaninu, 100 mg/l L-argininu, 300 mg/l L-glutaminu, 70 mg/l L-methioninu, 80 mg/l L-fenylalaninu, 600 mg/l L-prolinu, 60 mg/l L-serinu, 160 mg/l L-aurinu, 350 mg/l L-threoninu, 100 mg/l L-tyrosinu, 10 mg/l guanosinu, 50 mg/l hydrochloridu D-glukosaminu a 4 mg/l kyseliny listové. Inaktivovaný FBS (100 ml/l) a hemin (7,5 mg/l) byly do tohoto média přidány jako poslední. Hodnota pH média byla upravena na 7,3 pomocí vodného roztoku NaOH.

Médium HMI-9 bylo připraveno v koncentracích 3 g/l NaHCO₃, 17,7 g/l IMDM, 136 mg/l hypoxanthinu, 110 mg/l natrium-pyruvátu, 39 mg/l thymidinu, 112 mg/l bathokuproin sulfátu, 728 mg/l L-cysteinu, 56 µl/l 2-sulfanylethanolu, 10 ml/l roztoku penicilinu/streptomycinu a 100 ml tepelně inaktivovaného FBS. Pomocí vodného roztoku NaOH bylo pH média upraveno na hodnotu 7,4.

Médium M-199 obsahovalo 9,5 g/l M-199, 100 g/l penicilinu/streptomycinu, 2 mg/l biopterinu, 2 mg/l heminu a 25 mM HEPES. Hodnota pH média byla upravena pomocí vodného roztoku NaOH na 7,4.

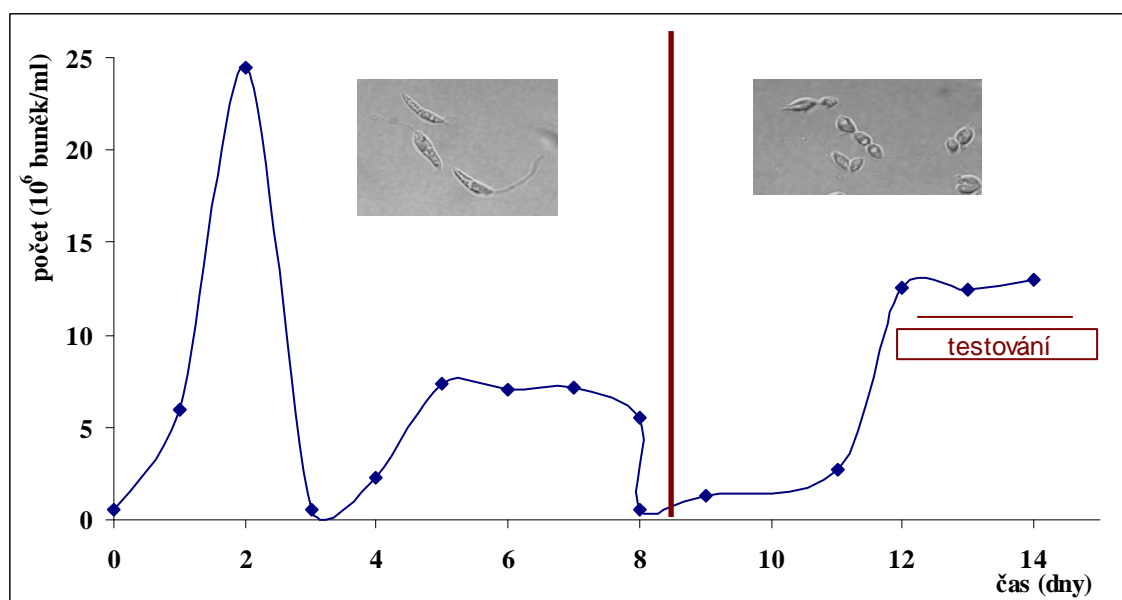
Médium SIM bylo obohaceno 20 % (v/v) tepelně inaktivovaného FBS. Pomocí kyseliny chlorovodíkové bylo pH média upraveno na hodnotu 5,5.

Živné látky přidávané do všech médií byly rozpouštěny ve vodě. Po jejich úplném rozpuštění byla média přefiltrována přes sterilní filtr (0,22 µm) a uchovávána při 4 °C. Tepelná inaktivace fetálního hovězího séra (FBS) byla prováděna při 55 °C 45 minut. Vodný roztok 10% PBS byl připraven v koncentracích 14,2 g/l Na₂HPO₄, 12 g/l NaH₂PO₄ a 85 g/l

NaCl. Pro přípravu roztoku resazurinu byl použit 1% PBS. Pro přípravu 100 ml TRYP-FIX bylo smícháno 5 ml 20% roztoku SSC (3M NaCl a 300mM citrát sodný), 10 ml 36% formaldehydu a 85 ml vody. Roztok byl použit k fixování buněk při počítání jejich koncentrace.

Transformace promastigotní formy *L. mexicana* do amastigotní formy

Buňky *L. mexicana* (v promastigotní formě) byly nechány narůst při teplotě 23 °C na koncentraci 10^7 buněk/ml v M-199 s 10 % (v/v) FBS. Promastigotní buňky byly přepasážovány na koncentraci 5×10^5 buněk/ml do SIM média s 20 % (v/v) FBS (pH 5,5) a inkubovány při teplotě 23 °C. Buňky byly nechány růst při 23 °C bez ředění tak dlouho, aby tři dny byla koncentrace buněk ve stacionární fázi. Buňky pak byly přepasážovány na koncentraci 5×10^5 buněk/ml do stejného média (SIM) a teplota kultivace byla zvýšena na 32 °C. Promastigotní buňky se přeměnily na amastigotní během 24 hodin [112]. Amastigotní buňky měly kulatý tvar bez bičíku a nebyly pohyblivé (na rozdíl od promastigotních oválných pohyblivých buněk s dlouhým bičíkem). Amastigotní buňky byly ihned po nárůstu na koncentraci 2×10^7 buněk/ml použity na testování. Obrázek 35 znázorňuje průběh růstu obou typů buněk při transformaci.

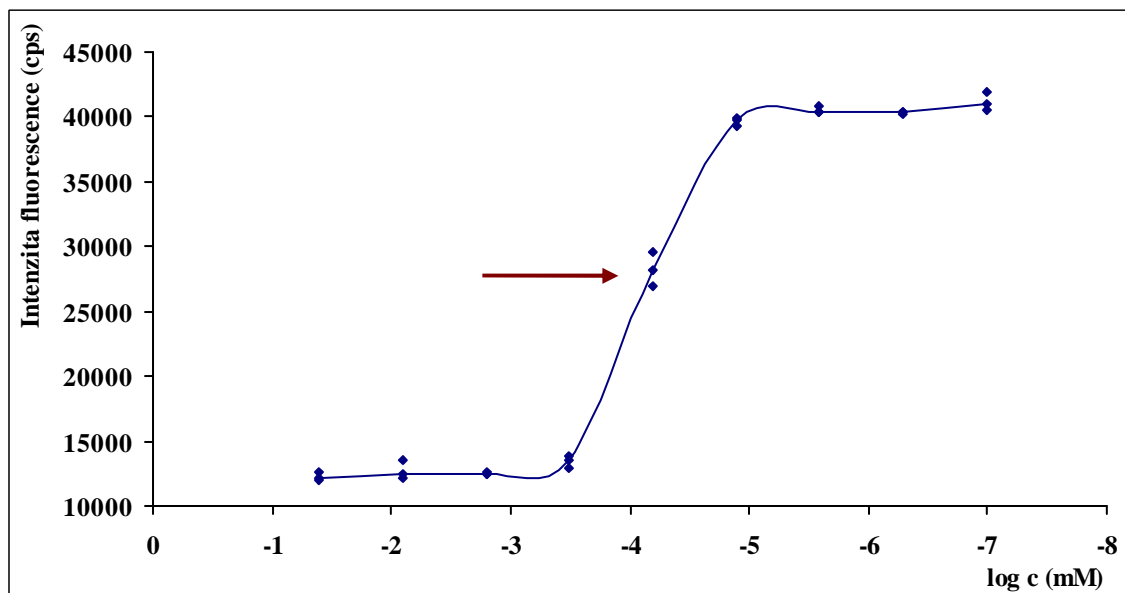


Obrázek 35: Průběh růstu buněk *L. mexicana* během přeměny z promastigotní fáze do amastigotní.

Metoda testování antiparazitické aktivity

Testování bylo prováděno v mikrotitračních destičkách o 96 jamkách. Roztoky testovaných sloučeniny byly připraveny v koncentraci 10 mM rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle [voda, 20% (v/v) vodný roztok DMSO, 40% (v/v) vodný roztok DMSO]. Pentamidin byl použit jako standard proti *T. brucei brucei*. Vodný roztok pentamidinu byl připraven o koncentraci 1 mM pro procyklickou formu (PF) a 0,01 mM pro formu vyskytující se v krvi živočichů (BF). Koncentrace testovaných vzorků byla řaděna od 1 mM do 0,02 nM vhodným médiem (5×). V každé jamce byl objem roztoku zkoumané látky 100 μl. Zaočkování bylo provedeno 100 μl suspenze parazitických buněk o koncentraci 4×10^6 buněk/ml (2×10^6 buněk/jamku) pro PF a 4×10^5 buněk/ml (2×10^5 buněk/jamku) pro BF *T. brucei brucei* a 4×10^6 buněk/ml (2×10^6 buněk/jamku) pro promastigoty a 10^6 buněk/ml (5×10^4 buněk/jamku) pro amastigoty *L. mexicana*. Inkubace probíhala při optimální teplotě 23 hodin. Po 23 hodinách inkubace bylo přidáno 20 μl roztoku resazurinu sodného (0,125 mg/ml v 1% PBS) a inkubace pokračovala dalších 6 hodin.

Měření fluorescence bylo prováděno na fluorimetru TECAN Infinite při excitační vlnové délce 560 nm a emisní vlnové délce 590 nm. Test byl prováděn dvakrát ve třech opakováních. Vyhodnocování dat bylo provedeno pomocí GraphPad Prism softwaru použitím nelineární regrese (obrázek 36).



Obrázek 36: Grafické znázornění matematického odečítání hodnot IC-50.

4.10 Testování biologické aktivity pomocí COX, SERT, GABA, AChE a MAO

Protizánětlivou aktivitu (inhibice cyklooxygenasy 1 a 2), antiepileptickou aktivitu (podpora účinků GABA) a schopnost inhibovat acetylcholinesterasu (AChE), monoaminoxidasu A (MAO-A) či přenos serotoninu (SERT) sirných látek identifikovaných v *A. stipitatum* jsem testovala během zahraniční stáže v Kodani (Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Copenhagen) v pracovní skupině Prof. Anny K. Jäger.

4.10.1 Inhibice cyklooxygenasy 1 a 2

Příprava pufrů, reakčních roztoků a elučních činidel

Tris pufr byl vodný roztok o koncentraci 12,1 g/l (100 mM). Hodnota pH pufru byla upravena pro COX-1 na pH 8,0 a pro COX-2 na pH 8,2 pomocí HCl. Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním 2,6 g KH_2PO_4 a 18,5 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ v 1 l vody a hodnota pH byla upravena na 7,4. Zásobním pufrem byl Tris-HCl (80 mM) s 0,1 % (v/v) Tweenu 20 a 300 μM diethyldithiokarbamátu sodného o pH 8,0. Roztok izotopově substituované kyseliny arachidonové byl připraven z fosfátového pufru, 0,2% (v/v) vodného roztoku Na_2CO_3 a $[1-^{14}\text{C}]$ arachidonové kyseliny v poměru 98:1:1 (v/v/v) a před použitím byl uchováván v ledu. Zásobní roztok indomethacinu byl připraven o koncentraci 200 μM v ethanolu. Roztok kofaktoru byl připraven rozpuštěním 3 mg L-adrenalinu (epinefrinu) a 3 mg redukovaného glutathionu v 10 ml Tris pufru (pH 8,0). Hematinový roztok byl připraven rozpuštěním 1,26 mg hematinu a 96,9 mg Tris ve 100 ml vody. Roztok COX-1 byl připraven smícháním 200 μl zásobního roztoku (0,3 μg COX-1 v 0,1M Tris pufru) s 1250 μl roztoku kofaktoru (směs byla inkubována 15 minut v ledu). Roztok COX-2 byl připraven smícháním 200 μl zásobního roztoku (0,3 μg COX-2 v 0,1M Tris pufru) s 1250 μl roztoku kofaktoru a 40 μl roztoku hematinu (roztok byl inkubován 15 minut v ledu). Roztok prostaglandinů E_2 a F_2 v ethanolu byl připraven o koncentraci 0,1 mg/ml. Eluční činidlo A bylo připraveno smícháním hexanu, dioxanu a kyseliny octové v poměru 350:150:1 (v/v/v) a eluční činidlo B bylo připraveno z ethyl-acetátu a methanolu v poměru 85:15 (v/v).

Testování inhibice COX-1 a COX-2

Do všech reakčních vialek bylo napipetováno 17,5 μl vody (pro vzorky rozpuštěné v ethanolu, zatímco pro vzorky rozpuštěné ve vodě bylo pipetováno 15 μl vody a 2,5 μl

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

ethanolu), dále bylo přidáno 2,5 µl vzorku o koncentraci 4 mM nebo indomethacinu o koncentraci 200 µM (pro pozitivní kontrolu). Potom bylo přidáno 60 µl aktivovaného roztoku enzymu a směs byla inkubována při pokojové teplotě 10 minut. Poté bylo přidáno 20 µl roztoku ($1\text{-}^{14}\text{C}$)arachidonové kyseliny a druhá fáze inkubace probíhala ve vodní lázni při 37 °C 10 minut. Reakce byla zastavena přidáním 10 µl 2M kyseliny chlorovodíkové a okamžitým vložením vialek do ledu. Poté byly do směsi přidány 4 µl roztoku prostaglandinů. Do Pasteurových pipet bylo nanášeno 1,2 ml silikagelu suspendovaného v elučním činidle A. Do směsi v reakčních vialkách bylo přidáno 0,5 ml elučního činidla A a roztok byl nanášen na připravenou silikagelovou kolonku. Reakční vialka byla ještě vypláchnuta 0,5 ml elučního činidla A a roztok byl opět nanášen na kolonku. Arachidonová kyselina byla eluována 4 ml elučního činidla A. Prostaglandiny byly následně eluovány 3 ml elučního činidla B do scintilačních vialek a smíchány se 4 ml scintilačního roztoku. Směs byla ponechána 30 minut v temnu a poté byla změřena její radioaktivita [113].

Testování inhibice COX-2 bylo prováděno podobným způsobem jako testování inhibice COX-1 pouze roztok enzymu měl odlišné složení. 6,9 µl roztoku COX-2 bylo zředěno na objem 50 µl zásobním pufrům a ke směsi bylo přidáno 200 µl 0,1M Tris pufru a 1250 µl roztoku kofaktoru s hematinem.

Základní testování vzorků bylo prováděno v konečné koncentraci 0,1 mM ve dvou opakováních. Vzorky s pozitivním nálezem aktivity v základní koncentraci byly dále ředěny a testovány v pěti dalších koncentracích. Výpočet procentického navázání byl prováděn podle následujícího vzorce:

$$\text{Vazba (\%)} = \frac{\text{dpm}_{\text{vzorku}} - \text{dpm}_{\text{pozadí}}}{\text{dpm}_{\text{rozpuštědla}} - \text{dpm}_{\text{pozadí}}} \cdot 100$$

Vyhodnocením dat pomocí Grafit softwaru s použitím nelineární regrese byly zjištěny hodnoty IC-50 testovaných látek.

4.10.2 Inhibice transportního proteinu pro serotonin (SERT)

Příprava pufrů a potřebných roztoků

Pufr A byl vodný roztok o složení 5 mM Tris, 150 mM NaCl a 20 mM EDTA o pH 7,5. Pufr B byl vodný roztok o koncentraci 5 mM Tris a 5 mM EDTA o pH 7,5. Pufr C byl vodný roztok 50 mM Tris, 120 mM NaCl a 5 mM KCl o pH 7,5.

Příprava membránové suspenze

Příprava membránové suspenze byla prováděna při teplotách 0–4 °C. Celé krysí mozky byly zbaveny mozečků a homogenizovány v poměru 1:10 (w/v) s pufrům A. Homogenát byl odstředován při 16000 g 10 minut. Supernatant byl odstraněn a ke sraženině byl přidán pufr A o stejném objemu a sraženina byla rozpuštěna. Suspenze byla opět odstředována 10 minut při 16000 g. Sraženina byla rozpuštěna ve stejném objemu pufru B. Suspenze byla inkubována v ledu 20 minut a poté odstředována po dobu 10 minut při 16000 g. Sraženina byla rozpuštěna ve stejném objemu pufru C a odstředována při 16000 g 10 minut. Výsledná sraženina byla opět rozpuštěna ve stejném objemu pufru C a suspenze uchována při teplotě –80 °C.

Testování inhibiční aktivity

Do zkumavek bylo napipetováno 25 µl vzorku ve vhodném rozpouštědle (voda, ethanol) o koncentraci 4 mM popř. 25 µl vody/ethanolu (pro stanovení úplné vazby), nebo 25 µl 120µM roztoku paroxetinu (pro stanovení nespecifické vazby). Dále bylo do zkumavek přidáno 50 µl 4nM roztoku [*N*-methyl-³H]citalopramu v pufru C a 225 µl membránové suspenze (zředěna 3,5× pufrům C). Směs byla inkubována 2 hodiny při 25 °C. Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 5 ml pufru C. Roztok byl filtrován přes filtr ze skelných vláken (Advantec GC50-25 mm) a zkumavka byla vypláchnuta dalšími 5 ml pufru C. Filtry byly vloženy do scintilačních vialek a zality 4 ml scintilačního roztoku. Filtry se scintilačním roztokem byly ponechány 30 minut v temnu a poté byla změřena jejich radioaktivita [114].

Základní testování vzorků bylo prováděno v konečné koncentraci 333 µM ve třech opakováních. Vzorky s pozitivním nálezem v základní koncentraci byly nařaděny do pěti různých koncentrací a dále testovány. Výpočet procentického navázání byl prováděn podle následujícího vzorce:

$$\text{Vazba (\%)} = \frac{dpm_{\text{vzorku}} - dpm_{\text{nespecifické vazby}}}{dpm_{\text{úplné vazby}} - dpm_{\text{nespecifické vazby}}} \cdot 100$$

Vyhodnocením dat pomocí Grafit softwaru s použitím nelineární regrese byly zjištěny hodnoty IC-50 testovaných látek.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.10.3 Testování afinity ke GABA_A receptoru

Příprava membránové suspenze

Mozečky ze čtyř krysích mozků byly homogenizovány po dobu 5 s ve 20 ml Tris-citrátového pufru (50 mM, pH 7,1) při teplotě 0–4 °C. Homogenát byl odstředován při 27000 g 15 minut. Sraženina byla takto promyta pufrem celkem třikrát a poté byla homogenizována s 20 ml pufru a inkubována ve vodní lázni při teplotě 37 °C 30 minut. Nakonec byla suspenze odstředěna při 27000 g po dobu 15 minut, rozpuštěna ve 30 ml pufru a uchována při –80 °C.

Před samotným použitím byla membránová suspenze přečištěna. Potřebné množství (1 ml) bylo rozpuštěno v 19 ml Tris-citrátového pufru (50 mM, pH 7,1) o teplotě 0–4 °C a odstředováno při 27000 g 10 minut. Sraženina byla rozpuštěna ve 20 ml pufru (vzniklá koncentrace 2 mg tkáně na 1 ml pufru).

Testování afinity ke GABA_A receptoru

Do zkumavek bylo napipetováno 25 µl vzorku o koncentraci 40 mM ve vhodném rozpouštědle (voda, ethanol) popř. 25 µl vody/ethanolu (pro stanovení úplné vazby), nebo 25 µl 1 µM roztoku diazepamu (pro stanovení nespecifické vazby). Dále bylo přidáno 25 µl 0,5nM roztoku [*N*-methyl-³H]flumazenilu v pufru a 500 µl přečištěné membránové suspenze. Směs byla protřepána a inkubována 40 minut při teplotě 0–4 °C. Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 5 ml Tris-citrátového pufru (50 mM, pH 7,1) o teplotě 0–4 °C a roztok byl filtrován přes filtr ze skelných vláken (Advantec GC50, 25 mm). Zkumavka byla vypláchnuta dalšími 5 ml pufru, filtry byly vloženy do scintilačních vialek, zality 4 ml scintilačního roztoku a ponechány 30 minut v temnu. Poté byla změřena jejich radioaktivita [115].

Základní testování vzorků bylo prováděno v konečné koncentraci 1,818 mM ve třech opakováních. Vzorky, u kterých byla nalezena pozitivní aktivita při základní koncentraci, byly naředěny do dalších pěti koncentrací a testovány. Výpočet procentického navázání byl prováděn podle vzorce:

$$\text{Vazba (\%)} = \frac{dpm_{\text{vzorku}} - dpm_{\text{nespecifické vazby}}}{dpm_{\text{úplné vazby}} - dpm_{\text{nespecifické vazby}}} \cdot 100$$

Vyhodnocením dat pomocí Grafit softwaru s použitím nelineární regrese byly zjištěny hodnoty IC-50 testovaných látek.

4.10.4 Inhibice acetylcholinesterasy (AChE)

Příprava pufrů a roztoků

Pufr A byl vodný roztok 50mM Tris-HCl o pH 8,0. Pufr B byl vodný roztok 50mM Tris-HCl o pH 8,0 obohacený o 0,1 % hovězím sérovým albuminem. Pufr C byl vodný roztok 50 mM Tris-HCl o pH 8,0 obohacený 100 mM NaCl a 20 mM MgCl₂·6H₂O. Substrátem byl 15mM roztok acetylthiocholinjodidu ve vodě. Ellmanovo činidlo obsahovalo 3 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoové kyseliny) v pufru C.

Testování inhibiční aktivity

Testování bylo prováděno v mikrotitračních destičkách o 96 jamkách. Do jamek bylo pipetováno 25 μl vzorku o koncentraci 4 mM rozpuštěném ve vhodném rozpouštědle (voda/ethanol) nebo pufru B (slepý pokus). Dále bylo do jamek přidáno 25 μl substrátu, 50 μl pufru B a 125 μl Ellmanova činidla. Vzorky byly měřeny ve třech opakováních s přidáním 25 μl roztoku acetylcholinesterasy zředěného v poměru 1:3 (v/v) pufr B (0,2 U/ml) a ve třech opakováních bez přídavku enzymu (přidáno 25 μl pufru B). Absorbance (při 405 nm) odpovídající spontánní hydrolýze byla měřena celkem 11× každých 30 s [116].

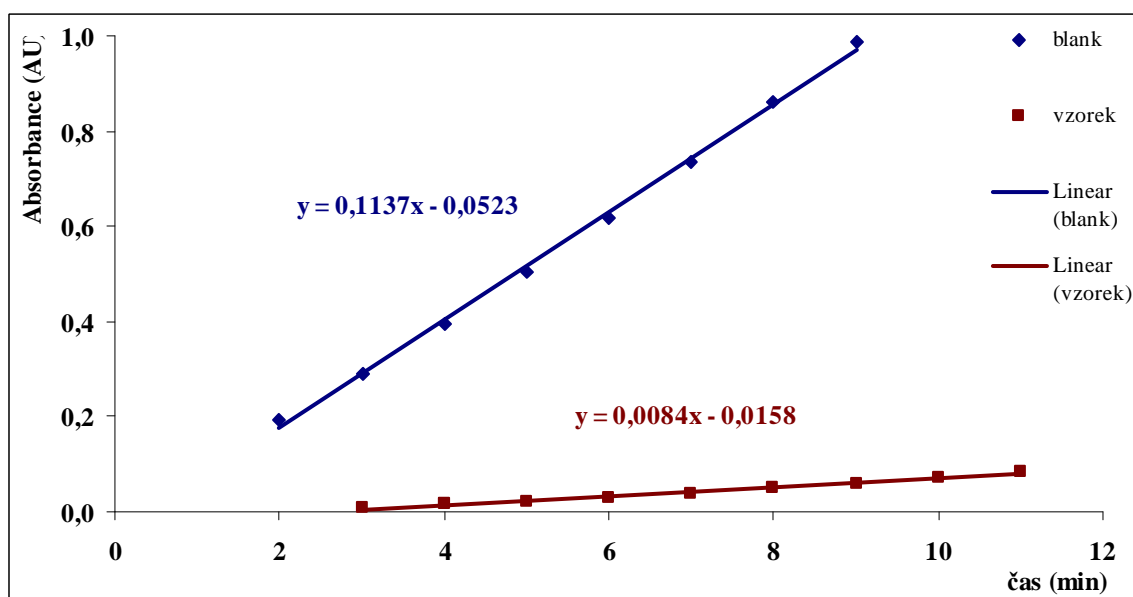
Základní testování všech vzorků bylo prováděno v koncentraci 400 μM ve třech opakováních. Vzorky, které při této koncentraci vykazovaly významnou aktivitu, byly dále naředěny a testovány v pěti dalších koncentracích. Inhibiční aktivita byla vypočítána podle vzorce:

$$\text{Inhibice (\%)} = \left(1 - \frac{\text{smernice}_{\text{testované látky}}}{\text{smernice}_{\text{blank}}} \right) \cdot 100$$

Příklad výpočtu:

Průběh hydrolýzy vzorku/blanku byl sledován měřením absorbance v časových intervalech. Získané hodnoty byly proloženy přímkou a odečteny jejich směrnice (obrázek 37).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



Obrázek 37: Graf znázorňující získání hodnot směrnic pro výpočet inhibiční aktivity.

$$\text{Inhibice (\%)} = \left(1 - \frac{0,1173}{0,0084}\right) \cdot 100 = 92,6$$

Dosažením do vzorce byla vypočítána procenta inhibice testované látky o dané koncentraci. Pomocí softwaru Grafit s použitím nelineární regrese byly zjištěny hodnoty IC-50 testovaných látek.

4.10.5 Inhibice monoaminoxidasy A (MAO-A)

Příprava pufrů a roztoků

Chromogenní roztok obsahoval 0,8 mM vanilinové kyseliny a 417 μM 4-aminoantipyrinu ve fosfátovém pufru (0,2 M K_2HPO_4 , pH 7,6). Substrát byl připraven v koncentraci 3 mM *p*-tyraminu rozpuštěním ve fosfátovém pufru (0,2 M K_2HPO_4 , pH 7,6). Roztok peroxidasy byl připraven rozpuštěním 0,23 mg peroxidasy v 5 ml chromogenního roztoku. Roztok MAO-A byl připraven v koncentraci 8 U/ml ve fosfátovém pufru (0,2 M K_2HPO_4 , pH 7,6).

Testování inhibiční aktivity

Testování bylo prováděno v mikrotitračních destičkách o 96 jamkách. Do jamek bylo pipetováno 25 μl vzorku o koncentraci 4 mM rozpuštěném ve vhodném rozpouštědle (voda,

ethanol), nebo 25 μl pufru (blank). Dále bylo do jamek přidáno 50 μl roztoku peroxidasy a 100 μl substrátu. Vzorky byly měřeny ve třech opakováních s přidáním 50 μl roztoku MAO-A resp. ve třech opakováních s 50 μl fosfátového pufru (bez enzymu). Inkubace byla prováděna při 37 °C a po 5 minutách po dobu půl hodiny byla proměřována absorbance při 492 nm [117].

Základní testování vzorků bylo prováděno v konečné koncentraci 400 μM ve třech opakováních. Vzorky, které při této koncentraci vykazovaly významnou aktivitu, byly naředěny do dalších pěti koncentrací a testovány. Enzymová aktivita byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$\text{Inhibice (\%)} = \left(1 - \frac{\text{smernice}_{\text{testované látky}}}{\text{smernice}_{\text{blank}}} \right) \cdot 100$$

Vyhodnocením dat pomocí softwaru Grafit s použitím nelineární regrese byly zjištěny hodnoty IC-50 testovaných látek.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 *Sírné sloučeniny česneku stopečkatého (A. stipitatum)*

V úvodní části této práce byla pozornost zaměřena na objasnění zjevného rozporu mezi strukturou látek, které v česneku stopečkatém identifikovali O'Donnellová a kol. [59], a sloučeninami, které popsali Kusterer a kol. [58] (viz obrázky 10 a 11, kap. 2.4.1). K tomu bylo zapotřebí izolovat a identifikovat jejich prekurzory, o kterých se dalo s velkou pravděpodobností předpokládat, že se jedná o *S*-substituované deriváty cysteinu (stejně jako v případě ostatních česnekovitých rostlin).

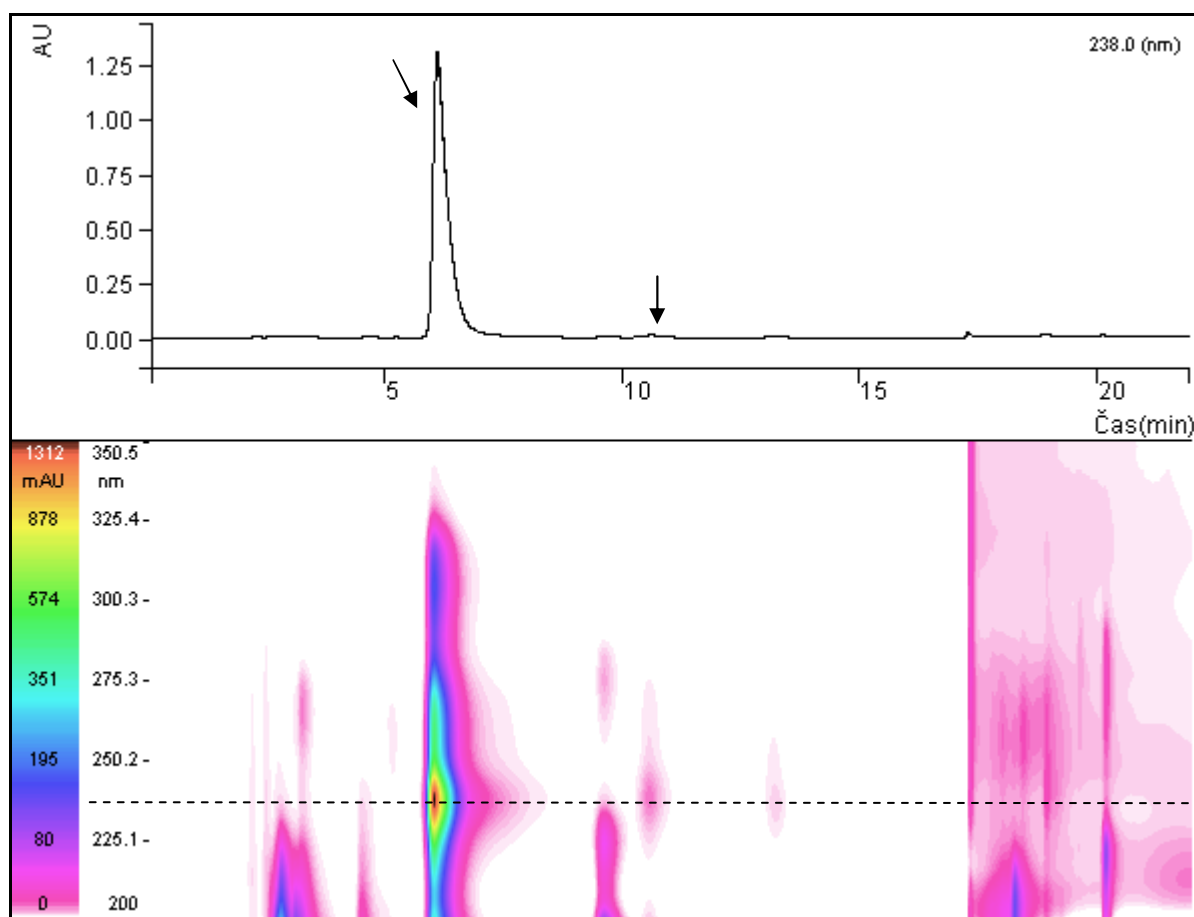
5.1.1 Sírné aminokyseliny a oligopeptidy česneku stopečkatého

Izolace a identifikace S-(2-pyridyl)cystein-N-oxidu (30)

Extrakce aminokyselin z cibulek *A. stipitatum* byla provedena okyseleným methanolem a následným přečištěním pomocí iontově výměnné chromatografie. Získaná frakce byla poté analyzována pomocí C-8 HPLC, která v extraktu potvrdila přítomnost dominantní sloučeniny (**30**) vykazující výraznou absorpci při vlnové délce $\lambda = 237$ nm (obrázek 38). Tato látka byla izolována pomocí preparativní C-8 HPLC a následně identifikována kombinací spektroskopických metod.

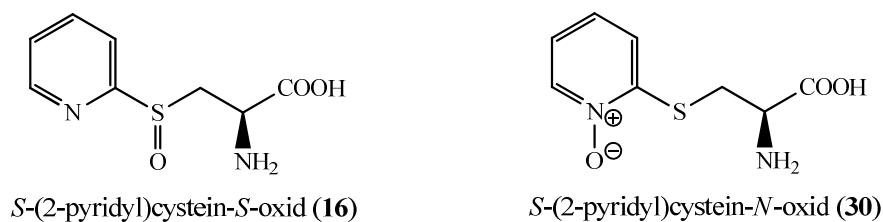
ESI-TOF HRMS data látky **30** odpovídala sumárnímu vzorci $C_8H_{11}N_2O_3S$ (změřená hodnota $[M + H]^+$ 215,0485 Da, vypočtená 215,0485 Da). ^{13}C NMR spektra této sloučeniny naznačila přítomnost celkem pěti aromatických atomů uhlíku (δ 122,6–139,5), dvou sp^3 hybridizovaných atomů uhlíku (δ 31,8 a 53,3) a jednoho karboxylového uhlíku (δ 173,1). Další NMR experimenty (COSY, HETCOR a HMBC) potvrdily, že se sloučenina skládá ze dvou vzájemně oddělených podjednotek, a sice *C*-monosubstituovaného pyridylového jádra a řetězce $-CH_2CH(X)COOH$. Pozice, kde je pyridylové jádro substituováno, byla jednoznačně určena měřením 1H NMR spekter za využití selektivního decouplingu. Tato spektra potvrdila přítomnost čtyř vodíků (δ 7,27; 7,52; 7,58 a 8,22) navázaných na vzájemně sousedící atomy uhlíku aromatického jádra ($-CH=CH-CH=CH-$), čímž se jednoznačně prokázalo, že pyridylové jádro je substituováno v poloze 2 (příloha A).

5 VÝSLEDKY A DISKUSE



Obrázek 38: HPLC-PDA chromatogram aminokyselinové frakce z *A. stipitatum*.

Na základě MS a NMR dat bylo tedy možné konstatovat, že izolovaná sloučenina **30** je oxidovaná forma *S*-(2-pyridyl)cysteinu. Nejobtížnějším úkolem bylo správné určení pozice atomu kyslíku, neboť existovaly dvě reálné možnosti (viz obrázek 39). Jednou variantou byla vazba na atom síry (**16**), jak tomu je u ostatních *S*-substituovaných derivátů cysteinu vyskytujících se v česnekovitých rostlinách. K tomuto závěru dospěli Kusterer a kol. v roce 2010 [58]. Druhou možností pak bylo navázání kyslíku na atom dusíku (**30**).



Obrázek 39: Uvažované struktury oxidované formy *S*-(2-pyridyl)cysteinu.

Ke zjištění polohy atomu kyslíku v izolované aminokyselině byla využita především ^{13}C a ^{15}N NMR spektroskopie spolu s IČ spektroskopií. Ve ^{13}C NMR spektru byl pozorován výrazně odlišný posun uhlíku C-3, než je tomu u všech ostatních *S*-substituovaných cystein-*S*-oxidů. Z literárních pramenů vyplývá, že v *S*-substituovaných derivátech cysteinu se NMR signál uhlíku C-3 vždy vyskytuje v oblasti δ 31–35, zatímco v odpovídajících *S*-oxidech je to v rozmezí δ 50–55. Je důležité podotknout, že struktura substituentu navázaného na atomu síry má pouze velmi malý vliv na hodnotu posunu tohoto signálu (příloha A). Chemický posun uhlíku C-3 v izolované sloučenině byl δ 31,8, což naznačovalo, že se v bezprostřední blízkosti tohoto uhlíku nevyskytuje žádný substituent s výrazným záporným indukčním efektem (např. atom kyslíku). Navíc ^{15}N NMR spektrum látky **30** ukázalo přítomnost $-\text{N}=\text{O}$ skupiny (δ 115,5) a IČ spektrum neobsahovalo žádný významný absorpční pás v oblasti 980–1040 cm^{-1} , který by prokazoval přítomnost $-\text{S}=\text{O}$ funkční skupiny. Z těchto spektroskopických dat tak jednoznačně vyplynulo, že aminokyselinou izolovanou z cibulek *A. stipitatum* je (poněkud překvapivě) *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxid (**30**).

Nepochybným potvrzením správnosti určení struktury látky **30** pak bylo porovnání jejích NMR, MS a UV spekter se synteticky připraveným standardem (*R*)-*S*-(2-pyridyl)-cystein-*N*-oxidu. Sloučenina izolovaná z *A. stipitatum* byla ve všech ohledech identická se standardem, a to i v hodnotě specifické optické otáčivosti ($[\alpha]_{\text{D}} +29,4^\circ$), čímž se zároveň potvrdila absolutní konfigurace na chirálním uhlíku C-2 jako (*R*).

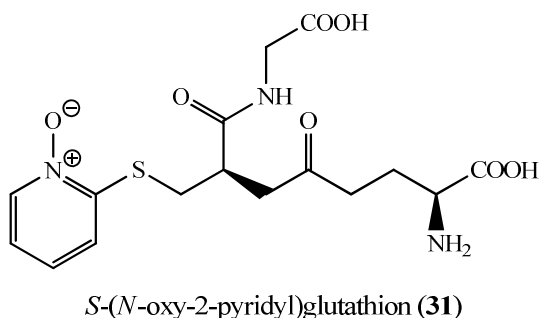
Struktura izolované aminokyseliny **30** je poněkud překvapivá. Nejenomže tato látka nebyla dosud jinde v přírodě nalezena, ale je to také první příklad *S*-substituovaného derivátu cysteinu, který není *S*-oxidem, ale naopak *N*-oxidem. Zároveň se jedná teprve o třetí známý, přirozeně se vyskytující aromatický *S*-substituovaný derivát cysteinu. Dalšími dvěma aromatickými deriváty jsou *S*-benzylcystein-*S*-oxid (petiveriin) z amazonské rostliny *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae, líčidlovité) a *S*-(2-pyrrolyl)cystein-*S*-oxid z cibule obří (*Allium giganteum* Regel) [22, 118].

Struktura sloučeniny **30** zjištěná v této práci je však v přímém rozporu s výsledky publikovanými Kustererem a kol. [58]. Tito autoři totiž tvrdili, že v česneku stopečkatém údajně identifikovali *S*-(2-pyridyl)cystein-*S*-oxid (**16**). Těmto autorům se však nepodařilo získat tuto aminokyselinu v čisté formě, ale pouze jako její OPA-derivát. Při bližším porovnání hodnot ^1H a ^{13}C NMR posunů sloučeniny izolované v této práci a onoho OPA derivátu získaného Kustererem a kol. je ale zřejmé, že se velmi pravděpodobně jedná o identické sloučeniny. ^{13}C NMR posun uhlíku C-3 v tomto OPA derivátu byl δ 35,5

(v CD₃CN), což jasně naznačuje, že se nejednalo o *S*-oxid. Lze se tedy oprávněně domnívat, že Kusterer a kol. s největší pravděpodobností chybně identifikovali strukturu jimi izolované látky.

Izolace a identifikace S-(N-oxy-2-pyridyl)glutathionu (31)

Spolu s *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidem (**30**) byla pomocí preparativní C-8 HPLC získána ještě druhá sloučenina (**31**), která se ovšem v cibulkách *A. stipitatum* vyskytovala v mnohem menším množství (viz obrázek 38). Výsledky ESI-TOF HRMS měření naznačovaly její relativní molekulovou hmotnost $[M + H]^+$ 401,1127 Da, což odpovídalo sumárnímu vzorci C₁₅H₂₀N₄O₇S (vypočteno $[M + H]^+$ 401,1125 Da). Měření ¹³C NMR spekter byla zjištěna přítomnost celkem 15 atomů uhlíku, včetně pěti atomů v aromatickém kruhu (δ 122,3–151,3) a čtyř karbonylových/karboxylových uhlíkových atomů (δ 171,2–176,7). Pomocí dalších NMR měření (COSY, HETCOR, HMBC a HSQC) byla zjištěna přítomnost čtyř izolovaných strukturních jednotek, a sice *N*-oxy-2-pyridylového kruhu a řetězců -C(O)CH₂CH₂CH(X)COOH, -CH₂CH(X)CO- a -CH₂(X)COOH. Tato data naznačovala, že izolovaná sloučenina je tripeptid *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathion (obrázek 40). Potvrzení této domněnky bylo provedeno porovnáním NMR, MS a UV spekter látky **31** se spektry syntetického standardu, přičemž spektroskopická data izolovaného tripeptidu se ve všech ohledech shodovala se synteticky připraveným *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionem.

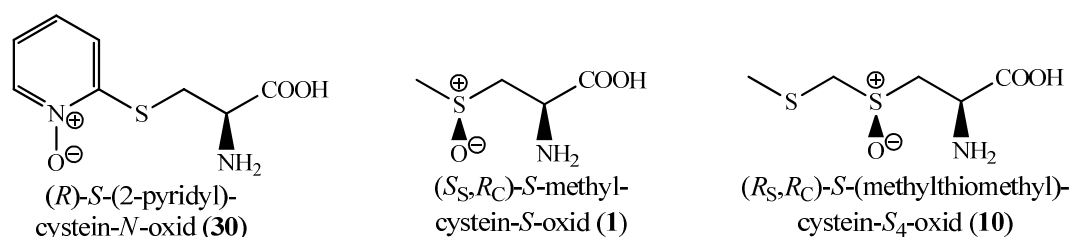


Obrázek 40: Struktura *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (**31**) izolovaného z *A. stipitatum*.

Přítomnost tohoto *S*-substituovaného derivátu glutathionu v česneku stopečkatém není příliš překvapivá, jelikož v cibuli, česneku a dalších česnekovitých rostlinách byly analogické deriváty glutathionu (např. *S*-2-karboxypropyl- nebo *S*-methyl-) objeveny již dříve. Tyto tripeptidy jsou považovány za prekurzory *S*-substituovaných derivátů cysteinu při jejich biogenezi (viz obrázek 2, kap. 2.3.1) [119]. Lze se tedy domnívat, že látka **31** je pravděpodobně biochemickým prekurzorem *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**).

Identifikace dalších derivátů cysteinu

Kromě (*R*)-*S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**) byla v cibulkách *A. stipitatum* pomocí GC-MS a HPLC technik zjištěna přítomnost ještě dvou dalších *S*-substituovaných derivátů cysteinu, a sice (*S_S*,*R_C*)-*S*-methylcystein-*S*-oxidu (methiinu, **1**) a (*R_S*,*R_C*)-*S*-(methylthiomethyl)-cystein-*S*₄-oxidu (marasminu, **10**) (obrázek 41). Identita a absolutní konfigurace těchto aminokyselin byly potvrzeny jejich porovnáním se standardy.



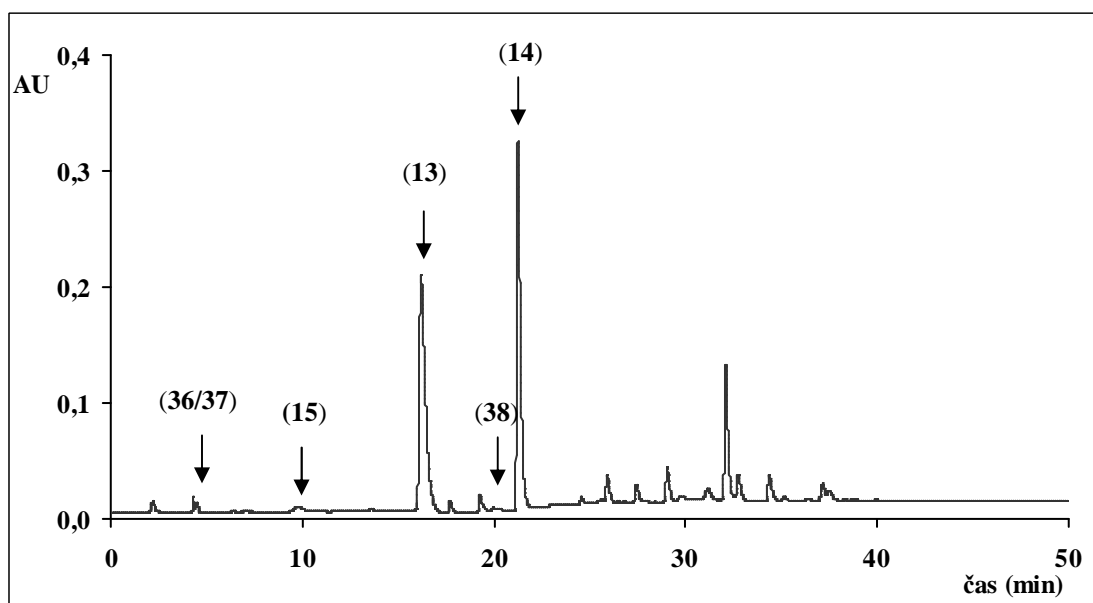
Obrázek 41: Struktura *S*-substituovaných derivátů cysteinu přítomných v *A. stipitatum*.

Relativní poměr *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**), methiinu (**1**) a marasminu (**10**) v analyzovaných cibulkách *A. stipitatum* byl 51:17:32. Zatímco methiin je hojně zastoupen ve všech rostlinách rodu *Allium* [11, 13, 22, 24, 97], marasmin nebyl dosud identifikován v žádné jiné česnekovité rostlině s výjimkou rostlin rodu *Tulbaghia* [12]. Teprve nedávno byla přítomnost této aminokyseliny potvrzena ještě v některých druzích taxonomicky řazených do podrodu *Melanocrommyum* [23].

5.1.2 Sirné látky vznikající v česneku stopečkatém

V další etapě výzkumu sirných sloučenin česneku stopečkatého byla pozornost zaměřena na identifikaci struktury látek vznikajících enzymově katalyzovaným rozkladem třech přítomných derivátů cysteinu, tedy *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**), methiinu (**1**) a marasminu (**10**). Tvorba a struktura těchto látek byla studována pomocí HPLC-MS, HPLC-PDA, DART-HRMS a ¹H NMR.

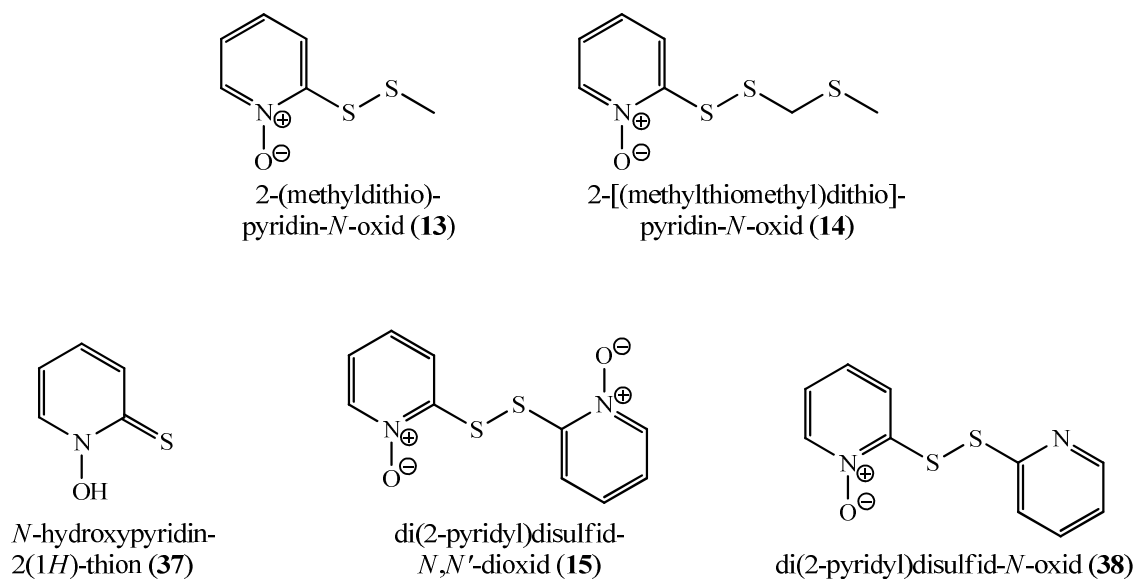
Látky vznikající při narušení pletiva česneku stopečkatého byly extrahovány diethyletherem a ihned analyzovány pomocí HPLC-PDA. Jak je z chromatogramu uvedeného na obrázku 42 patrné, extrakt z homogenizovaných cibulek obsahoval dvě majoritně zastoupené látky (**13** a **14**), které zaujímaly 74 % z celkové plochy všech píků (při $\lambda = 210$ nm).



Obrázek 42: HPLC chromatogram diethyletherového extraktu z cibulek *A. stipitatum* (při λ 210 nm).

Za využití HPLC-MS/UV bylo zjištěno, že tyto dvě majoritní látky (t_R 16,8 resp. 21,8 minut) mají relativní molekulovou hmotnost M_r 173 resp. 219 Da. Díky znalosti struktury přítomných prekurzorů (**30**, **1** a **10**) a MS/MS fragmentace těchto látek bylo možno usoudit, že se pravděpodobně jedná o 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxid (**13**) resp. 2-[(methythiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxid (**14**). Tato domněnka byla poté potvrzena porovnáním chromatografických a spektroskopických charakteristik obou látek se synteticky připravenými standardy. Stejným způsobem (pomocí UV, MS a srovnáním s příslušnými standardy) byly identifikovány i další látky přítomné v extraktu, a sice *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thion (**37**, M_r 127 Da), di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxid (**15**, M_r 252 Da) a di(2-pyridyl)disulfid-*N*-oxid (**38**, M_r 236 Da) (obrázek 43).

Je vhodné zmínit, že v průběhu izolace zmíněných sloučenin bylo zjištěno, že většina těchto látek je fotolabilní a během pokusů o jejich přečištění pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu se tyto látky rozkládaly na blíže neidentifikované produkty modrošedé barvy. Proto bylo nutné při jejich přečištění pomocí preparativní HPLC eluent před vstupem do PDA detektoru rozdělit, aby nedošlo k rozkladu těchto látek UV-Vis zářením lamp v detektoru. Do detektoru tak vstupovalo pouze 20 %, zbylé množství (80 %) bylo jímáno ihned po výstupu z kolony.



Obrázek 43: Struktura sloučenin identifikovaných v extraktu z cibulek česneku stopečkatého.

K detailnímu pochopení mechanismu tvorby výše uvedených sloučenin byla využita také technika DART-HRMS. Tato měkká ionizační desorpční technika je velmi šetrná a dovoluje sledovat tvorbu látek přímo v rostlinném materiálu ihned po porušení pletiva, což umožňuje detekci i velmi reaktivních meziproduktů s velmi krátkou dobou existence.

Cibulka *A. stipitatum* byla propíchnuta vzorkovací kapilárou, která byla během 2–3 sekund po porušení pletiva vložena do iontového zdroje. Pomocí NI-DART-HRMS byla ve vzorku zjištěna přítomnost látky o relativní molekulové hmotnosti $[M - H]^-$ 126,0008 Da, které odpovídal sumární vzorec C_5H_5NOS (vypočteno 126,0019 Da, tabulka 3). Touto majoritní sloučeninou byl s velkou pravděpodobností 2-sulfanylpyridin-*N*-oxid (**36**) vznikající enzymatickým působením alliinasy na *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxid (**30**). Analogickým způsobem vznikají i dvě sulfenové kyseliny detekované ve vzorku v menším množství. Methansulfenová kyselina (**39**) vzniká enzymatickým rozkladem methiinu (**1**), zatímco (methylthio)methansulfenová kyselina (**40**) rozkladem marasminu (**10**). Je ovšem známo, že 2-sulfanylpyridin-*N*-oxid (**36**) je poměrně nestálý a ochotně tautomerizuje na stabilnější *N*-hydroxypyridin-2(*1H*)-thion (pyrithion, **37**) (obrázek 44). Bylo zjištěno, že ve vodných roztocích převládá thion (**37**) nad *N*-oxidem (**36**) přibližně v poměru 54/1 [120, 121]. Lze tedy předpokládat, že intenzita detekovaného iontu $[M - H]^- = 126,0008$ Da odpovídala součtu zastoupení obou tautomerních forem.

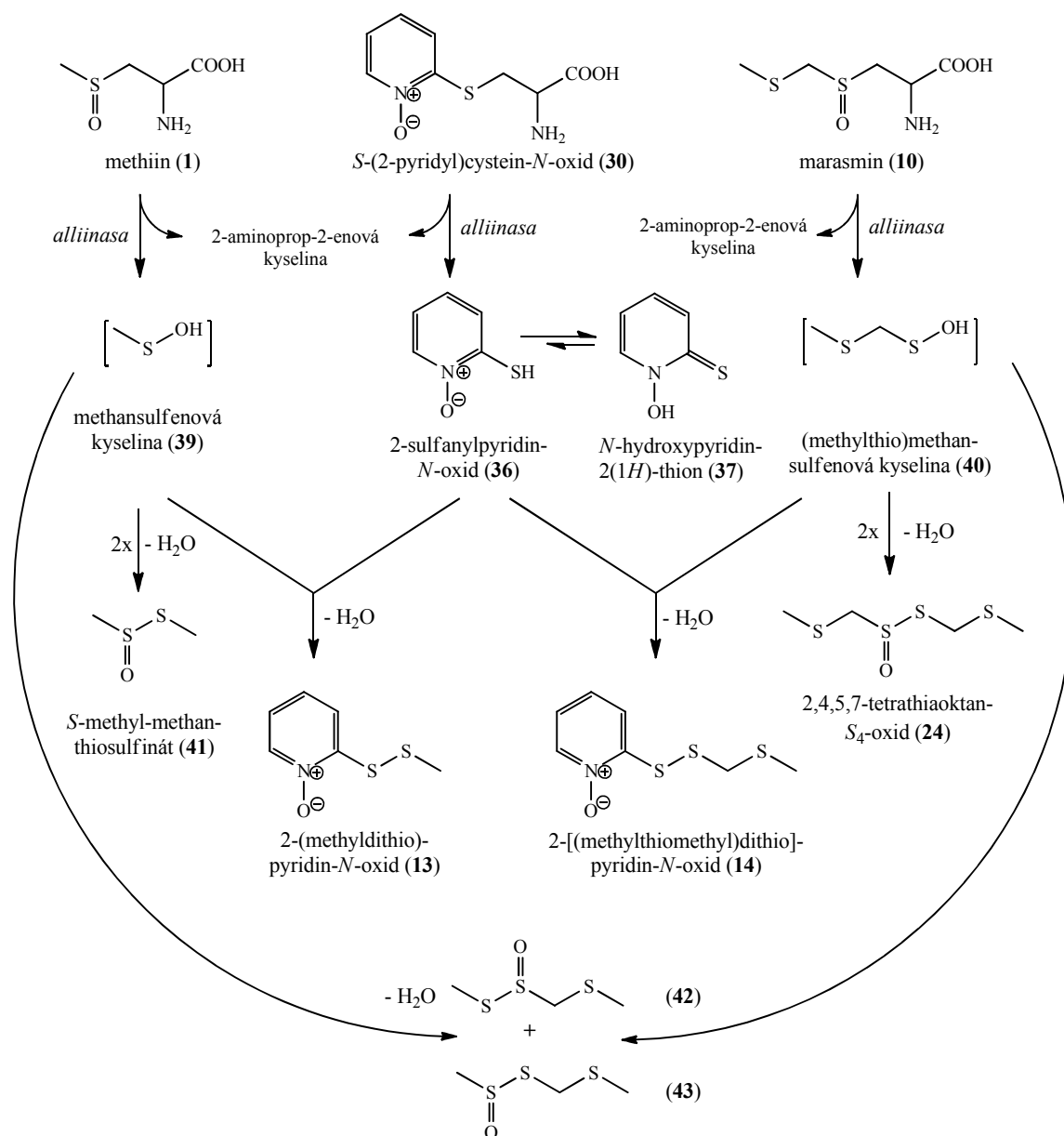
vznikají *S*-methyl-methanthiosulfinát (**41**), 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxid (**13**), 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxid (**14**) a di(2-pyridyl)disulfid-*N*-oxid (**38**).

V *A. stipitatum* byl také očekáván vznik dvojice izomerních thiosulfinátů **42** a **43**. Tyto látky však byly detekovány pomocí DART pouze v modelových směsích při smíchání methiinu (**1**) a marasminu (**10**) s alliinasou, tedy za nepřítomnosti *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**). V reálném extraktu z homogenizovaných cibulek tyto dvě sloučeniny nalezeny nebyly. Pravděpodobný mechanismus jejich vzniku je vzájemná kondenzace methansulfenové kyseliny (**39**) a (methylthio)methansulfenové kyseliny (**40**).

Enzymově katalyzovaný rozklad *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**) byl studován také pomocí ¹H NMR spektroskopie. Roztok *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu v D₂O byl v NMR kyvetě smíchán s alliinasou a průběžně bylo měřeno ¹H NMR spektrum. Bylo pozorováno, že veškeré množství **30** bylo rozloženo během 3 minut po přidání alliinasy. Jediným detekovatelným produktem tohoto rozkladu byl dle očekávání *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thion (**37**) (příloha A).

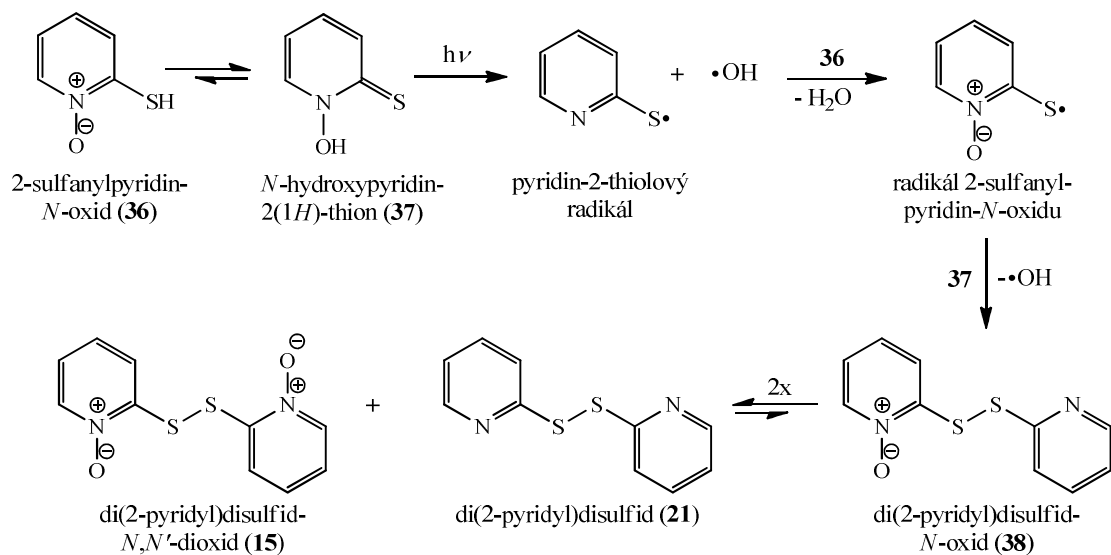
Na základě všech výše uvedených zjištění bylo možné sestavit pravděpodobné schéma tvorby sirných látek v cibulkách *A. stipitatum* (obrázek 45).

5 VÝSLEDKY A DISKUSE



Obrázek 45: Pravděpodobný mechanismus tvorby sírných sloučenin v *A. stipitatum*.

Dalšími pyridin-*N*-oxidy identifikovanými v *A. stipitatum* pomocí PI-DART-HRMS a HPLC-MS byly di(2-pyridyl)disulfid-*N*-oxid (38) a di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxid (15). Tyto látky jsou však pravděpodobně tvořeny až sekundární přeměnou z 2-sulfanylpyridin-*N*-oxidu (36) resp. *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thionu (37) (obrázek 46) [121–123]. Tomu nasvědčuje i skutečnost, že při HPLC analýze etherového extraktu z cibulek *A. stipitatum* se tyto látky objevily pouze v nízkých koncentracích. Při měření pomocí DART-MS nebyl di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxid (15) detekován vůbec (možná kvůli jeho nízké těkavosti).



Obrázek 46: Vznik dalších pyridylových sloučenin z 2-sulfanylpiperidin-*N*-oxidu (podle [124], upraveno).

V tabulkách 4 a 5 jsou uvedena UV, IČ, MS a NMR data sloučenin identifikovaných v česneku stopečkatém. Reprezentativní UV, IČ, MS a NMR spektra těchto látek jsou také uvedena v přílohách A–D.

Tabulka 4: UV, IČ a MS data sirných sloučenin izolovaných z česneku stopečkatého.

identifikovaná látka	bod tání (°C)	UV spektrum ^a nm (rel. %)	IČ spektrum cm ⁻¹ (KBr)	ESI-TOF HRMS [M + H] ⁺ vypočteno	
S-(2-pyridyl)cystein- <i>N</i> -oxid (30)	179–181	237 (100), 262 (33), 304 (11)	3090–2540, 1628, 1574, 1361, 1219, 833, 764	215,0485	215,0485
S-(<i>N</i> -oxy-2-pyridyl)glutathion (31)	neměřeno	238 (100), 261 (39), 307 (15)	3530–2650, 1658, 1608, 1419, 1222, 837	401,1127	401,1125
di(2-pyridyl)disulfid- <i>N,N'</i> -dioxid (15)	215–218	236 (100), 262 (47), 302 (15)	1462, 1419, 1250, 1227, 837, 764	253,0100	253,0100
di(2-pyridyl)disulfid- <i>N</i> -oxid (38)	neměřeno	236 (100), 266 (80), 308 (18)	neměřeno	237,0150	237,0151
2-(methylthio)pyridin- <i>N</i> -oxid (13)	107–110	237 (100), 264 (41), 303 (12)	1466, 1423, 1246, 1142, 833, 752	174,0041	174,0042
2-[(methylthiomethyl)dithio]-pyridin- <i>N</i> -oxid (14)	kapalina	239 (100), 265 (51), 304 (14)	1462, 1423, 1261, 836, 760	219,9920	219,9919

^aměřeno na HPLC-PDA (acetonitril/voda)

Tabulka 5: NMR data sirných sloučenin izolovaných z česneku stopečkatého.

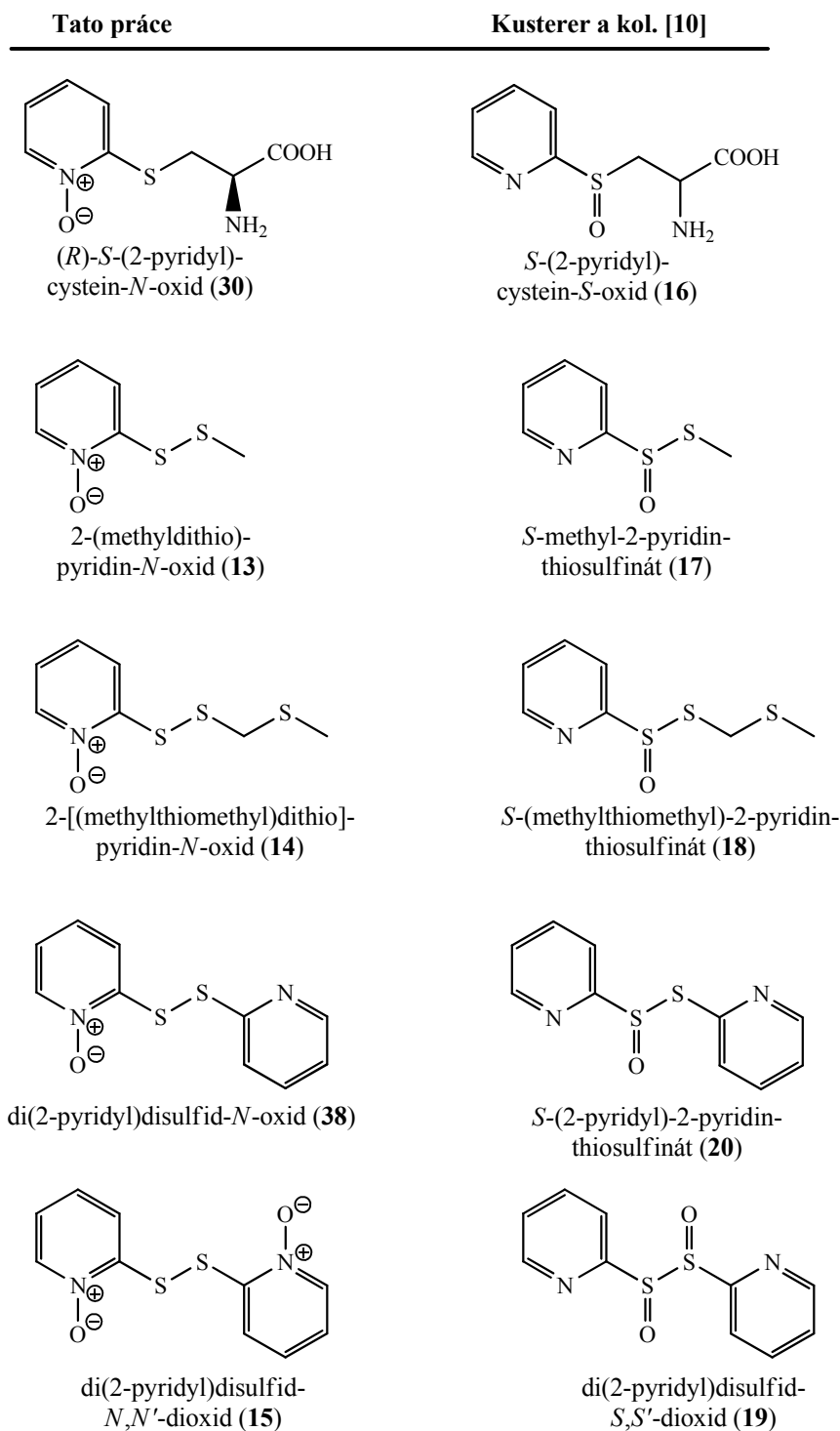
identifikovaná látka	¹ H NMR (500 MHz) chemický posun [ppm] (charakterizovaný atom, multiplicita, intenzita signálu, interakční konstanty)	¹³ C NMR (125 MHz)	¹⁵ N NMR (50,7 MHz)
<i>S</i> -(2-pyridyl)cystein- <i>N</i> -oxid (30)	3,38 (H-3a, dd, 1H, 14,7/8,5); 3,62 (H-3b, dd, 1H, 14,7/3,9); 3,95 (H-2, dd, 1H, 8,5/3,9); 7,27 (H-5', ddd, 1H, 7,5/6,5/1,5); 7,52 (H-3', ddd, 1H, 8,0/1,5/1,1); 7,58 (H-4', ddd, 1H, 8,0/7,5/0,6 Hz); 8,22 (H-6', ddd, 1H, 6,5/1,1/0,6) (D ₂ O)	31,8 (C-3); 53,3 (C-2); 122,6 (C-5'); 123,6 (C-3'); 131,7 (C-4'); 139,5 (C-6'); 150,6 (C-2'); 173,1 (C-1) (D ₂ O)	342,8 (NH ₂); 115,5 (N=O) (D ₂ O)
<i>S</i> -(<i>N</i> -oxy-2-pyridyl)-glutathion (31)	1,89 (H-3, dd, 2H, 14,5/7,5); 2,33 (H-4, dt, 2H, 7,5/3,0); 3,30 (H-12a, dd, 1H, 14,3/8,8); 3,45 (H-2, t, 1H, 5,9); 3,54 (H-12b, dd, 1H, 14,3 a 5,1); 3,62 (H-10, q, 2H, 17,2); 4,68 (H-7, dd, 1H, 9,0/4,9); 7,25 (H-5', ddd, 1H, 7,6/6,5/1,6); 7,52 (H-3', ddd, 1H, 8,4/1,6/0,4); 7,56 (H-4', ddd, 1H, 8,4/7,6/1,3); 8,20 (H-6', ddd, 1H, 6,5/1,3/0,4) (D ₂ O)	27,7 (C-3); 31,6 (C-12); 31,8 (C-4); 43,6 (C-10); 52,0 (C-7); 54,7 (C-2); 122,3 (C-5'); 123,4 (C-3'); 131,5 (C-4'); 139,4 (C-6'); 151,3 (C-2'); 171,2 (C-8); 175,5 (C-5); 176,4 (C-11); 176,7 (C-1) (D ₂ O)	neměřeno
di(2-pyridyl)disulfid- <i>N,N'</i> -dioxid (15)	7,19 (H-5/H-5', ddd, 2H, 7,8/6,4/1,8); 7,28 (H-4/H-4', ddd, 2H, 8,2/7,8/1,1); 7,60 (H-3/H-3', ddd, 2H, 8,2/1,8/0,5); 8,30 (H-6/H-6', ddd, 1H, 6,5/1,1/0,5) (CDCl ₃)	122,9 (C-3/C-3'); 123,5 (C-5/C-5'); 127,5 (C-4/C-4'); 139,6 (C-6/C-6'); 150,2 (C-2/C-2') (CDCl ₃)	96,0 (CDCl ₃)
di(2-pyridyl)disulfid- <i>N</i> -oxid (38)	7,31 (H-5, t, 1H, 5,8); 7,39 (H-5', t, 1H, 6,5); 7,56–7,62 (H-4/H-4', m, 2H); 7,76–7,82 (H-3/H-3', m, 2H); 8,32 (H-6, d, 1H, 6,2); 8,40 (H-6', s, 1H); měřeno na LC- ¹ H NMR (D ₂ O/CH ₃ CN)	neměřeno	neměřeno
2-(methylthio)-pyridin- <i>N</i> -oxid (13)	2,45 (CH ₃ , s, 3H); 7,15 (H-5', ddd, 1H, 7,6/6,4/1,8), 7,38 (H-4', ddd, 1H, 8,3/7,6/1,2); 7,87 (H-3', ddd, 1H, 8,3/1,8/0,5); 8,25 (H-6', ddd, 1H, 6,4/1,2/0,5) (CDCl ₃)	21,7 (CH ₃); 121,3 (C-3'); 121,6 (C-5'); 126,2 (C-4'); 138,7 (C-6'); 151,7 (C-2') (CDCl ₃)	97,6 (CDCl ₃)
2-[(methylthiomethyl)-dithio]pyridin- <i>N</i> -oxid (14)	2,31 (CH ₃ , s, 3H); 3,88 (CH ₂ , s, 2H); 7,15 (H-5', ddd, 1H, 7,6/6,4/1,8); 7,36 (H-4', ddd, 1H, 8,6/7,6/1,2); 7,90 (H-3', dd, 1H, 8,3/1,8); 8,24 (H-6', ddd, 1H, 6,4/1,2/0,5) (CDCl ₃)	15,8 (CH ₃); 43,7 (CH ₂); 121,6 (C-3'); 121,8 (C-5'); 126,0 (C-4'); 138,6 (C-6'); 151,6 (C-2') (CDCl ₃)	97,5 (CDCl ₃)

Tvorba pyridin-*N*-oxidů zjištěná v této práci je ve značném rozporu s výsledky Kusterera a kol. [58], kteří v extraktu z cibulek *A. stipitatum* údajně identifikovali několik thiosulfínátů obsahujících 2-pyridylovou skupinu a dokonce jeden vicinální *S,S'*-dioxid (obrázek 47). Struktury těchto sloučenin byly navrženy především na základě HPLC-MS/MS dat bez jakéhokoli srovnání se standardy. Jak již bylo uvedeno dříve, tato vědecká skupina navíc s největší pravděpodobností chybně identifikovala strukturu hlavního prekurzoru těchto látek [jako *S*-(2-pyridyl)cystein-*S*-oxid namísto *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu]. V následujících odstavcích pak budou podrobně vysvětleny důvody, na základě kterých se lze domnívat, že ani struktura dalších sloučenin (**16–20**) nebyla Kustererem a kol. určena správně.

Jedinou látkou, kterou Kusterer a kol. podrobněji spektroskopicky charakterizovali (pomocí NMR a IČ), byla sloučenina **19**, identifikovaná jako di(2-pyridyl)disulfid-*S,S'*-dioxid. Přítomnost této sloučeniny v *A. stipitatum* je však velmi nepravděpodobná. Proti hovoří především skutečnost, že se látku údajně podařilo izolovat za běžné laboratorní teploty. *vic*-Disulfoxidy jsou ovšem mimořádně nestabilní, neizolovatelné látky, jejichž existence byla dosud prokázána pouze za velmi nízkých teplot (−40 °C) [125, 126]. Při detailním porovnání ¹H NMR spekter látky izolované Kustererem a kol. a di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (**15**) syntetizovaného v této práci bylo zjištěno, že obě spektra jsou téměř totožná.

Také porovnání UV spekter sloučenin popsaných Kustererem a kol. (**16–20**) naznačilo, že tyto látky ve skutečnosti téměř s jistotou odpovídají příslušným *N*-oxidům (**13–15** a **38**). Bylo totiž zjištěno, že všechny pyridin-*N*-oxidy nalezené v této práci vykazují velmi charakteristická UV spektra s absorpčními maximy v rozmezí $\lambda_{\max} = 236\text{--}239$ nm a dvěma dalšími lokálními maximy kolem $\lambda = 262$ nm a 304 nm (měřeno pomocí PDA detektoru v acetonitrilu/vodě). Naopak sloučeniny, které neobsahují –N=O skupinu, mají λ_{\max} kolem 282 nm (viz tabulka 4 a příloha B), kde naopak *N*-oxidy nevykazují významnou absorbanci. Ovšem všechny sloučeniny popsané Kustererem a spol. vykazovaly absorbanci při 238, 260–264 a 310 nm (v CH₃OH). Je tedy velmi pravděpodobné, že tyto látky byly nesprávně identifikovány a jednalo se ve skutečnosti o *N*-oxidy, nikoli *S*-oxidy.

Ke stejnému výsledku, tedy že v rostlinách *A. stipitatum* jsou obsaženy *N*-oxidy, dospěla i O'Donnellová a kol. v roce 2009. Tito badatelé izolovali a identifikovali 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxid (**13**), 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxid (**14**) a di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxid (**15**) [59].



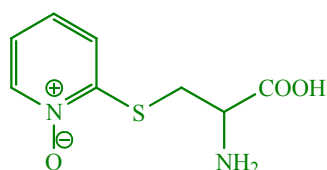
Obrázek 47: Struktura sloučenin identifikovaných v *A. stipitatum* během této práce a látek popsanych Kustererem a kol. [58].

5.2 Biologická aktivita sirných sloučenin z *A. stipitatum*

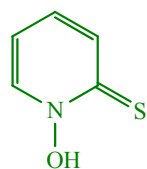
Pět sirných sloučenin identifikovaných v rostlinách *A. stipitatum* (**13–15**, **30** a **37**, na obrázku 48 jsou zvýrazněny zelenou barvou) bylo podrobena testování jejich

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

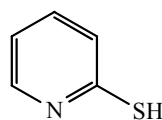
antimikrobiální a antiparazitické aktivity. U těchto látek byla zjišťována také jejich schopnost inhibovat cyklooxygenasu 1 a 2, acetylcholinesterasu, monoaminoxidasu A, přenos serotoninu či podporovat účinky γ -aminomáselné kyseliny. Pro lepší pochopení mechanismu jejich potenciálního účinku byly testovány také některé jejich strukturální analogy, které jsou buď komerčně dostupné nebo byly laboratorně připraveny. Těmito analogy byly jednak redukované formy (**21**, **44**, **46** a **47**) přirozeně se vyskytujících sloučenin, dále jejich monosulfidové analogy (**48** a **49**) a také kyslíkatá obdoba pyrithionu (**37**), tedy *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-on (**45**).



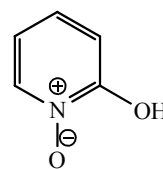
S-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxid (**30**)



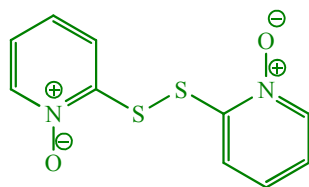
N-hydroxypyridin-2(1*H*)-thion (pyrithion, **37**)



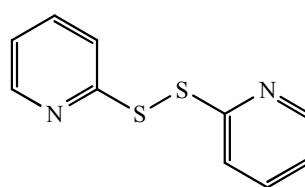
pyridin-2-thiol (**44**)



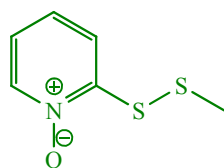
N-hydroxypyridin-2(1*H*)-on (**45**)



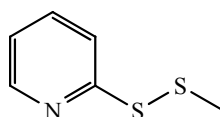
di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxid (**15**)



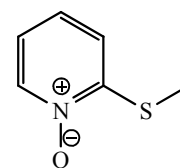
di(2-pyridyl)disulfid (**21**)



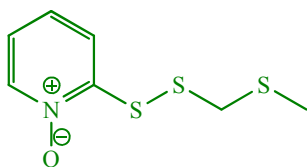
2-(methylthio)pyridin-*N*-oxid (**13**)



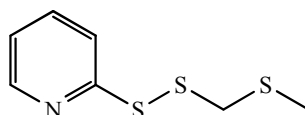
2-(methylthio)pyridin (**46**)



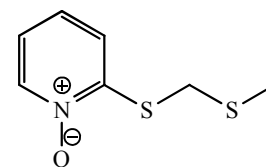
2-(methylthio)pyridin-*N*-oxid (**48**)



2-[(methylthiomethyl)dithio]-pyridin-*N*-oxid (**14**)



2-[(methylthiomethyl)dithio]-pyridin (**47**)



2-[(methylthiomethyl)thio]-pyridin-*N*-oxid (**49**)

Obrázek 48: Struktura testovaných sirných sloučenin z *A. stipitatum* a jejich analogů.

5.2.1 Antimikrobiální aktivita sirných látek z *A. stipitatum*

Inhibiční aktivita měřená na agarových discích a minimální inhibiční koncentrace (MIC) v tekutých médiích byla sledována u sloučenin uvedených na obrázku 48. Látky byly podrobeny testování proti bakteriím *Escherichia coli* (dále *Ec*) a *Enterococcus faecalis* (dále *Ef*) vyskytujících se v zažívacím traktu teplokrevných živočichů a člověka, *Micrococcus luteus* (*MI*) napadajících kůži savců a člověka, *Bacillus cereus* (*Bc*) způsobujících alimentární intoxikace a proti bakteriím *Erwinia amylovora* (*Ea*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*) a *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) napadající některé hospodářsky významné plodiny (rajčata, papriky, brambory a zástupce čeledi růžovitých – např. jabloně a hrušně). Dále byla testována aktivita proti kvasinkám *Candida albicans* (*Ca*) a *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) a plísním *Fusarium solani* (*Fs*), *Rhizoctonia solani* (*Rs*) a *Aspergillus niger* (*An*).

Disková difúzní metoda

Testování inhibiční aktivity bylo prováděno na agarových discích s vhodným živným médiem pro daný mikroorganismus. Papírové disky napuštěné testovanou látkou popř. antibiotiky byly položeny na agar s daným mikroorganismem a společně kultivovány při optimální teplotě. Po viditelném nárůstu mikroorganismů byly odečítány průměry inhibičních zón (včetně průměru papírového disku 6 mm). Tato metoda byla prováděna jako screening inhibičních aktivit testovaných sirných látek s množstvím 10 µg látky na disku. Hodnoty inhibičních zón jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Průměr inhibičních zón testovaných sloučenin (v mm).

testované sloučeniny	bakterie						kvasinky	
	<i>Ec</i>	<i>MI</i>	<i>Bc</i>	<i>Ea</i>	<i>Xav</i>	<i>Cms</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>
30	na ^a	na	na	na	na	na	na	na
37	21,8±0,8	12,5±1,5	12,0±1,2	18,0±0,8	33,2±0,7	15,8±0,9	18,2±1,3	21,7±0,7
44	na	na	na	na	na	na	na	na
45	na	na	na	na	7,7±0,5	na	na	na
15	19,2±0,7	12,2±0,7	9,3±0,5	18,8±0,7	35,3±1,5	16,6±1,0	18,0±1,5	19,5±1,0
21	na	na	na	na	8,7±1,4	10,0±1,0	na	7,3±0,5
13	18,7±0,7	12,8±0,9	9,2±0,4	18,5±1,3	30,8±0,9	19,2±0,7	18,8±0,7	16,5±1,1
46	11,0±0,0	na	na	na	na	na	na	11,5±1,0
14	16,3±0,5	11,5±0,5	8,2±0,4	10,2±2,1	20,4±2,4	11,7±0,7	13,2±1,3	na
47	na	na	na	7,2±0,4	na	12,7±0,7	na	9,0±0,8
48	na	na	na	na	8,8±1,5	na	na	na
49	na	na	na	na	na	na	na	10,3±2,1
ampicilin	11,4±0,5	34,8±0,7	na	8,2±1,5	22,4±2,9	34,5±1,0	– ^b	–
gentamicin	17,7±0,5	13,7±0,5	11,2±0,4	8,0±0,8	26,0±1,0	23,5±1,5	–	–
tioconazol	–	–	–	–	–	–	19,3±0,7	22,6±1,6

^aneaktivní (žádná inhibiční zóna), ^bneměřeno

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Mnohem vyšší inhibiční aktivita byla obecně pozorována u sloučenin obsahujících ve své struktuře –N=O skupinu, tedy *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thion (**37**), di(2-pyridyl)-disulfid-*N,N'*-dioxid (**15**), 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxid (**13**), 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin-*N*-oxid (**14**). Významně nižší inhibiční aktivitu naopak vykazovaly jejich bezkyslíkaté analogy, pyridin-2-thiol (**44**), di(2-pyridyl)disulfid (**21**), 2-(methyldithio)pyridin (**46**) a 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin (**47**). Velmi nízká popř. žádná inhibiční aktivita byla pozorována u obou testovaných monosulfidů, tedy 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxidu (**48**) a 2-[(methylthio)methylthio]pyridin-*N*-oxidu (**49**).

Proti testovaným sloučeninám byly odolnější G^+ bakterie *M. luteus* (*Ml*) a *B. cereus* (*Bc*) v porovnání s G^- bakterií *E. coli* (*Ec*). I další G^- bakterie *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*) způsobující bakteriální skvrnitost rajčat a paprik byla na testované látky citlivější než zbylé dvě fytopatogenní bakterie (*Ea* a *Cms*).

Mikrodiluční metoda

Antimikrobiální aktivita dvanácti studovaných sloučenin (obrázek 48) byla testována proti sedmi kmenům bakterií, dvěma druhům kvasinek a třem plísním také pomocí mikrodiluční metody. Tato metoda umožňuje určit přesnou hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC), za kterou se považuje taková koncentrace testované látky, která pro daný mikroorganismus inhibuje zákal v mikrotitrační jamce z 80 %. Zjištěné hodnoty MIC testovaných látek jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Minimální inhibiční koncentrace sirných látek (v $\mu\text{g/ml}$).

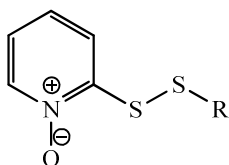
testované sloučeniny	bakterie							kvasinky		plísně		
	<i>Ec</i>	<i>Ml</i>	<i>Bc</i>	<i>Ef</i>	<i>Ea</i>	<i>Xav</i>	<i>Cms</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>	<i>Fs</i>	<i>Rs</i>	<i>An</i>
30	na ^a	na	na	na	na	512	na	na	256	na	na	na
37	4	8	4	4	1	1	1	2	0,031	1	1	16
44	na	128	128	256	128	64	8	16	128	64	64	256
45	256	256	512	32	128	64	8	na	512	256	256	na
15	4	8	8	8	1	1	1	2	0,031	0,5	1	512
21	128	8	16	32	32	16	2	16	8	8	8	32
13	1	1	1	2	0,5	0,5	1	4	0,016	0,5	16	16
46	16	8	16	64	2	4	2	8	4	4	4	4
14	8	8	4	8	2	2	1	4	0,031	1	1	16
47	32	8	16	32	8	8	2	16	4	8	4	16
48	na	na	na	na	na	na	na	na	64	512	na	na
49	512	512	256	na	256	128	128	256	4	128	512	na
ampicilin	8	0,25	32	4	8	8	0,125	– ^b	–	–	–	–
gentamicin	2	2	1	16	2	1	0,25	–	–	–	–	–
tetracyklin	1	0,25	0,031	32	1	0,5	0,125	–	–	–	–	–
chloramfenikol	4	1	4	8	1	4	1	–	–	–	–	–
tioconazol	–	–	–	–	–	–	–	2	0,031	64	64	4

^aneaktivní (MIC > 512 $\mu\text{g/ml}$), ^bneměřeno

Z tabulky lze odvodit velmi podobné závěry jako z výsledků testování inhibiční aktivity sloučenin na agarových discích. Látky obsahující ve své struktuře $-N=O$ skupinu vykazovaly výrazně vyšší aktivitu než jejich bezkyslíkaté strukturní analogy. Výjimkou je pouze prekurzor těchto látek, *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxid (**30**), který žádnou inhibiční aktivitu nevykázal. Mezi neaktivnější látky naopak patřily *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thion (**37**), di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxid (**15**) a 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxid (**13**) společně s 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxidem (**14**). Porovnáním hodnot MIC testovaných látek a antibiotik lze konstatovat, že tyto čtyři látky vykazovaly podobnou, v některých případech dokonce silnější antimikrobiální aktivitu než běžně používaná antibiotika.

Mikrodiluční metody bylo využito i pro zjištění inhibiční aktivity testovaných látek proti plísním. Vyšší inhibiční aktivita byla opět prokázána u sloučenin obsahujících $-N=O$ skupinu (**13–15** a **37**) oproti jejich bezkyslíkatým strukturním analogům. Aktivita studovaných *N*-oxidů byla většinou mnohonásobně vyšší než aktivita tioconazolu. Ze tří testovaných plísní byl vůči aktivním sírným sloučeninám nejvíce odolný *A. niger* (*An*). Zbylé dvě plísně napadající hlízy bramboru, tedy *F. solani* (*Fs*) a *R. solani* (*Rs*), vykazovaly vyšší, vzájemně podobnou citlivost na testované látky (tabulka 7).

Obecně lze tedy konstatovat, že jednou z antimikrobiálně neaktivnějších látek izolovaných z česneku stopečkatého je pyrithion (**37**) spolu s několika dalšími pyridin-*N*-oxidy (**13–15**). Antimikrobiální aktivita těchto látek je skutečně poměrně vysoká, v mnoha případech převyšující aktivitu standardních antibiotik. Na základě získaných výsledků lze usoudit, že důležitou strukturní podmínkou pro látky vykazující výraznou antimikrobiální aktivitu (s výjimkou pyrithionu) je přítomnost (*N*-oxy-2-pyridyl)disulfanylové skupiny (obrázek 49).



Obrázek 49: Strukturní jednotka společná všem sloučeninám vykazujícím významnou antimikrobiální aktivitu (s výjimkou pyrithionu).

Významná antimikrobiální aktivita *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thionu (pyrithionu, **37**), který je vzdáleným strukturním analogem aspergilové kyseliny, je známa velmi dlouhou dobu [127, 128]. Například MIC natrium-2-sulfanylpyridin-*N*-oxidu (sodné soli pyrithionu) proti *E. coli* a *C. albicans* byla zjištěna 4 $\mu\text{g/ml}$ [127]. Pyrithion se synteticky běžně vyrábí a

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

používá jako biocidní složka do různých polymerů, barev a nátěrů, které se používají především ke konzervaci lodí. Pyrithion a jeho zinečnatá sůl se přidává také do šamponů pro své účinky proti tvorbě lupů resp. kvasinkám *Pityrosporum ovale*, které jejich tvorbu způsobují [129].

Antimikrobiální aktivita 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxidu (**13**), 2-[(methylthiomethyl)-dithio]pyridin-*N*-oxidu (**14**) a di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (**15**) již byla studována také O'Donnellovou a kol. [59]. Tito autoři stanovili hodnoty MIC těchto látek proti třem typům bakterie *Staphylococcus aureus* v rozmezí 0,5–2 µg/ml a proti vybraným druhům bakterií rodu *Mycobacterium* tyto hodnoty činily 2–8 µg/ml, což jsou údaje srovnatelné s výsledky zjištěnými v této práci.

5.2.2 Antiparazitická aktivita sirných látek z *A. stipitatum*

Inhibiční koncentrace (IC-50), při které za daných podmínek dochází k 50% poklesu aktivity daných parazitů, byla sledována u pěti sirných sloučenin identifikovaných v *A. stipitatum* a látek jim strukturně podobných (obrázek 48).

Prvoci mají složitý životní cyklus, při kterém dochází k přeměnám v morfologii parazitických buněk. Jinou stavbu buněk mají v těle (v krvi) hostitele a jinou v zažívacím traktu daného hmyzu (přenašeče). Testování antiparazitické aktivity bylo prováděno proti dvěma druhům prvoků *T. brucei brucei* a *L. mexicana* v obou jejich hlavních životních stádiích. Zjištěné hodnoty IC-50 jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Antiparazitická aktivita testovaných látek (IC-50, v µM).

testované sloučeniny	parazit			
	<i>T. brucei brucei</i>		<i>L. mexicana</i>	
	v těle hmyzu	v krvi hostitele	v těle hmyzu	v krvi hostitele
30	na ^a	na	na	na
37	0,051±0,013	5,90±0,10	0,037±0,002	0,026±0,005
44	na	na	na	na
45	na	na	na	na
15	0,133±0,022	2,15±0,38	0,027±0,002	0,019±0,007
21	15,7±2,6	na	14,7±0,2	na
13	0,566±0,200	4,60±0,51	0,047±0,005	0,034±0,006
46	23,6±1,9	30,9±1,3	96,8±4,9	na
14	0,198±0,022	6,52±0,72	0,041±0,005	0,033±0,008
47	38,5±13,2	na	43,5±12,1	na
48	na	na	na	na
49	33,9±2,5	na	29,6±2,9	4,52±0,46
pentamidin	0,305±0,076	0,008±0,001	– ^b	–

^aneaktivní (IC-50 ≥ 100 µM), ^bneměřeno

Jak je z tabulky 8 patrné, velmi vysoká inhibiční aktivita proti oběma parazitům ve stádiu vyskytujícím se v zažívacím traktu hmyzu byla zjištěna u *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thionu (**37**), di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (**15**), 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxidu (**13**) a 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin-*N*-oxidu (**14**). Tyto čtyři látky mnohdy vykazovaly až o tři řády vyšší aktivitu oproti svým redukovaným strukturním analogům a zároveň i vyšší aktivitu v porovnání s komerčně používaným léčivem pentamidinem (v případě pyrithionu byla pozorována až 6× vyšší aktivita). Naopak výrazně nižší aktivita studovaných látek byla pozorována proti formě *T. brucei brucei* vyskytující se v krvi člověka.

Ze získaných výsledků je možno vyvodit závěr, že nejvyšší antiparazitická aktivita byla pozorována u stejných čtyřech sloučenin, které zároveň vykazovaly nejvyšší antimikrobiální vlastnosti. Lze se tedy domnívat, že klíčovou strukturní částí těchto sloučenin je opět (*N*-oxy-2-pyridyl)disulfanylová skupina (obrázek 49).

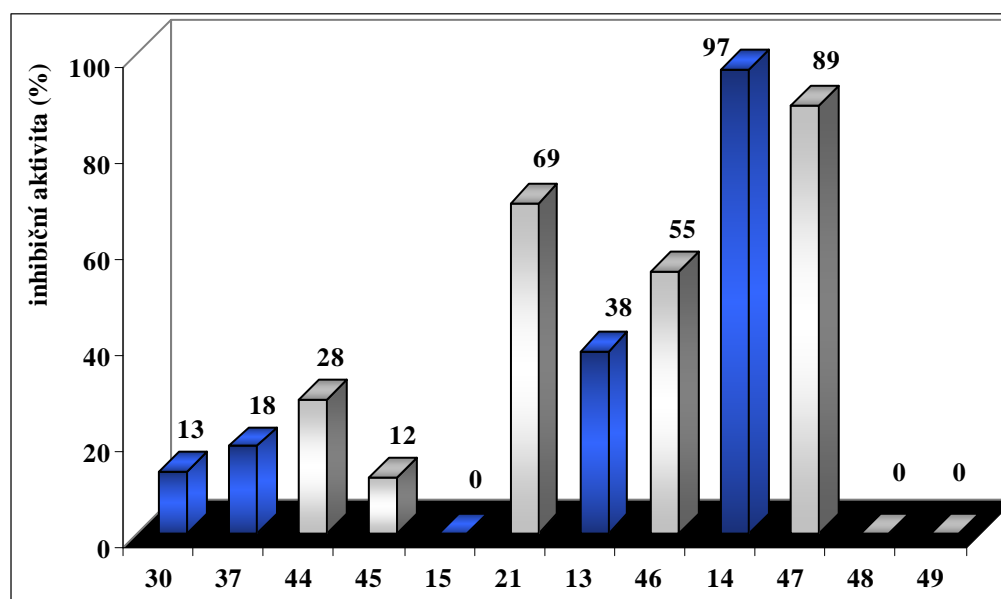
Získané výsledky jsou v také dobrém souladu s některými publikacemi, které uvádějí hodnoty IC-50 0,080 μM pro pyrithion (**37**) a 0,190 μM pro natrium-2-merkaptopyridin-*N*-oxid proti prvokům *T. cruzi* vyskytujícím se v zažívacím traktu hmyzu [130, 131].

5.2.3 Testování biologické aktivity pomocí COX, GABA, AChE, MAO a SERT

Protizánětlivé vlastnosti sloučenin uvedených na obrázku 48 byly stanoveny mírou inhibice aktivity cyklooxygenasy 1 a 2, zatímco neuroaktivita byla testována podle schopnosti těchto látek inhibovat acetylcholinesterasu (AChE), monoaminoxidasu A (MAO-A), ovlivňovat přenos serotoninu (SERT) či podporovat účinek γ -aminomáselné kyseliny (GABA).

Inhibice cyklooxygenasy

Protizánětlivé účinky a účinky proti bolestem hlavy byly testovány inhibiční aktivitou studovaných látek proti enzymům COX-1 a COX-2. Na obrázku 50 jsou graficky znázorněny inhibiční aktivity testovaných sloučenin o koncentraci 100 μM proti enzymu COX-1. Barevně zvýrazněné sloupce označují sloučeniny, které byly identifikované v *A. stipitatum*, ostatní látky jsou různé strukturní analogy, které se v této rostlině přirozeně nevyskytují.

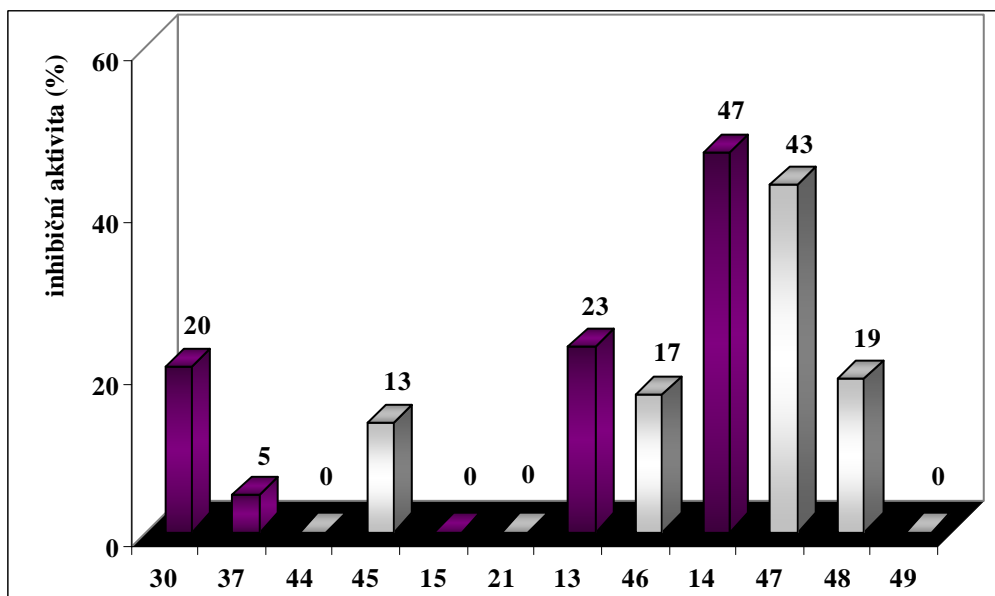


Obrázek 50: Inhibiční aktivita testovaných látek o koncentraci 100 µM proti COX-1.

Z výsledků je patrné, že velmi vysokou inhibiční aktivitu vykazovaly dvě sloučeniny, a sice 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin-*N*-oxid (**14**) a 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin (**47**). Je zajímavé, že sloučenina **14**, která v koncentraci 100 µM inhibovala aktivitu COX-1 téměř kompletně (97 %), je jednou z hlavních látek přítomných v homogenizovaných cibulkách *A. stipitatum* (viz obrázek 42). U této látky byla dále stanovena hodnota IC-50 $7,8 \pm 1,7$ µM. Druhá sloučenina 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin (**47**) s 89% inhibiční aktivitou je redukováným analogem 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin-*N*-oxidu (**14**), přičemž hodnotu IC-50 této látky je $14,1 \pm 4,0$ µM.

Na obrázku 51 jsou uvedeny výsledky inhibičních aktivit testovaných sírných látek (o koncentraci 100 µM) proti COX-2, která je zodpovědná za tvorbu prostaglandinu v zánětlivých buňkách a buňkách CNS. Nejvyšší inhibiční aktivitu opět vykazovaly 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin-*N*-oxid (**14**) (47 %) a 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin (**47**) (43 %). Hodnoty IC-50 pro tyto dvě sloučeniny byly $15,4 \pm 4,9$ µM (**14**) a $33,4 \pm 8,8$ µM (**47**).

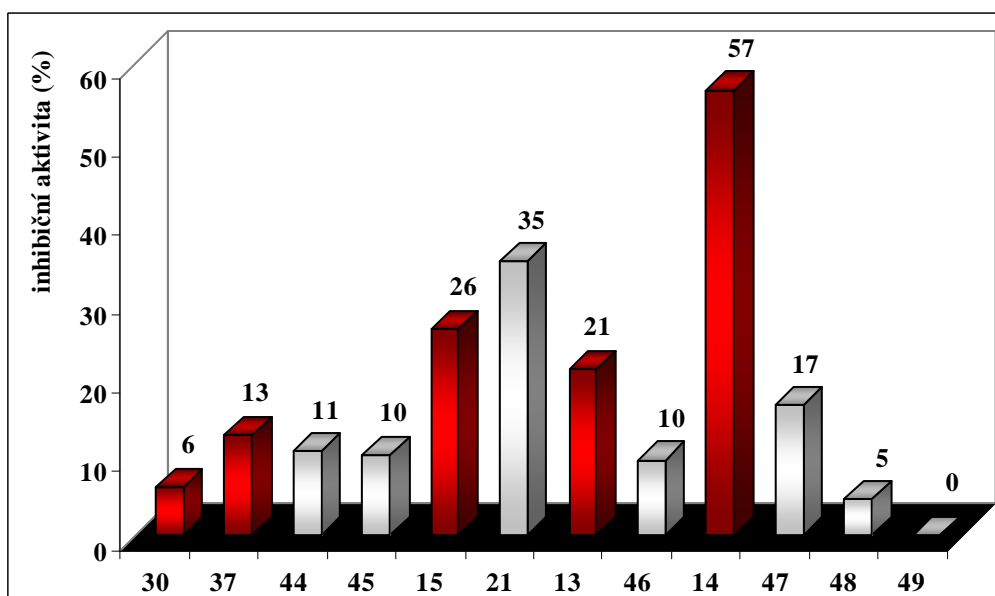
Z výsledků lze usuzovat, že hlavní skupinou odpovědnou za inhibiční aktivitu proti oběma cyklooxygenasám je u těchto látek (methylthiomethyl)disulfanylový řetězec $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{SS}-$, který je přítomen u obou významněji aktivních sloučenin (**14** a **47**).



Obrázek 51: Inhibiční aktivita testovaných látek o koncentraci 100 µM proti COX-2.

Inhibice transportního proteinu pro serotonin (SERT)

Deprese je často spojena s poklesem koncentrace neurotransmiterů v mozku. Úlohou některých antidepresiv je inhibice serotoninového přenašeče (SERT) a tím zabránění zpětnému vychytávání serotoninu. U testovaných látek o koncentraci 330 µM byla zjištěna afinita proti SERT pomocí vazebného testu na [*N*-methyl-³H]citalopram. Výsledky byly poté přepočítány na procenta inhibice aktivity SERT (obrázek 52).



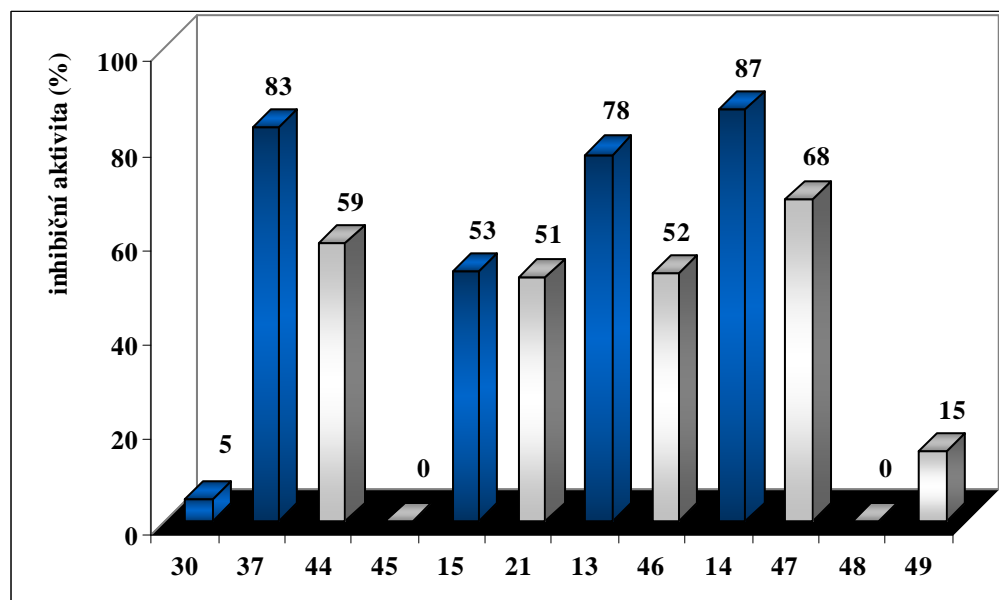
Obrázek 52: Inhibiční aktivita testovaných látek o koncentraci 330 µM proti SERT.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Testování sloučenin na hladině 330 μM ukázalo, že pouze 2-[(methylthio)methyl]dithio]pyridin-*N*-oxid (**14**), který je přírodním produktem, vykazoval významnější účinky na aktivitu SERT. Hodnota IC-50 této sloučeniny byla $195 \pm 39 \mu\text{M}$. Na základě získaných výsledků tak lze konstatovat, že studované látky významnou aktivitu proti SERT nevykazují.

Inhibice monoaminoxidasy A

Druhou metodou pro mírnění depresí a stavů úzkosti je inhibice monoaminoxidasy (MAO-A). Tento enzym je zodpovědný za oxidační deaminace monoaminů (mimo jiných i serotoninu). Inhibice enzymu MAO-A ovlivňuje převážně hladinu těchto neurotransmiterů, které hrají důležitou roli při léčbě deprese a úzkosti.



Obrázek 53: Inhibiční aktivita testovaných látek o koncentraci 400 μM proti MAO-A.

Prvotní posouzení inhibiční aktivity testovaných látek proti MAO-A bylo provedeno při koncentraci látek 400 μM (obrázek 53). Osm z dvanácti testovaných sloučenin vykazovalo poměrně vysokou inhibiční aktivitu (> 50 %). Patřily mezi ně čtyři sloučeniny přirozeně se vyskytující v cibulkách *A. stipitatum*, *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thion (**37**), di(2-pyridyl)-disulfid-*N,N'*-dioxid (**15**), 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxid (**13**) a 2-[(methylthio)methyl]dithio]pyridin-*N*-oxid (**14**). Tyto látky vykazovaly vždy vyšší inhibiční aktivitu než jejich redukované strukturní analogy. U těchto osmi aktivních látek byla stanovena hodnota IC-50 (tabulka 9).

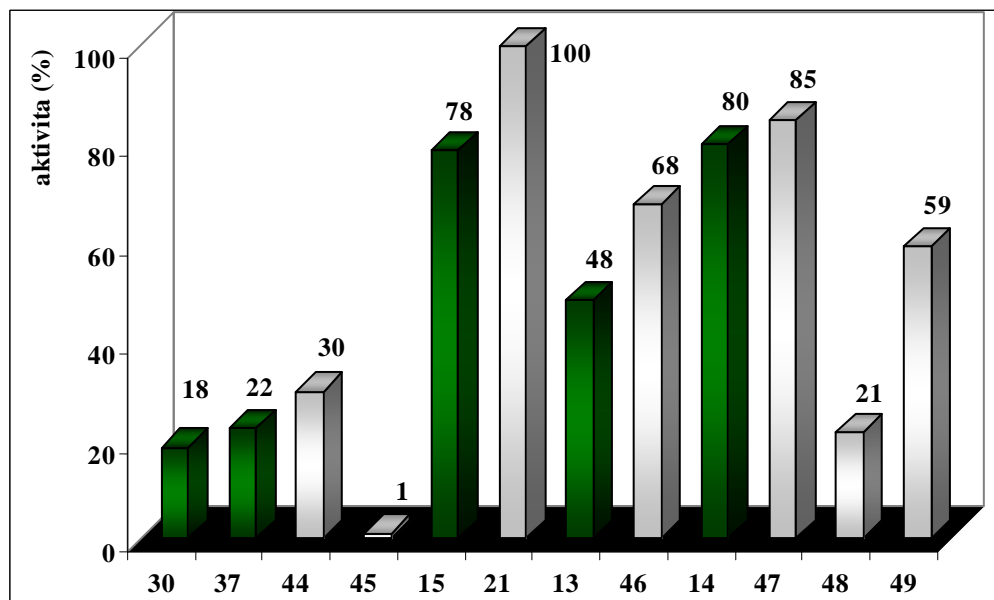
Tabulka 9: IC-50 sirných sloučenin s inhibiční aktivitou proti MAO-A.

testované sloučeniny	IC-50 (μM)
<i>N</i> -hydroxypyridin-2(1 <i>H</i>)-thion (37)	97,6 \pm 9,2
pyridin-2-thiol (44)	388 \pm 55
di(2-pyridyl)disulfid- <i>N,N'</i> -dioxid (15)	241 \pm 47
di(2-pyridyl)disulfid (21)	538 \pm 89
2-(methyldithio)pyridin- <i>N</i> -oxid (13)	139 \pm 36
2-(methyldithio)pyridin (46)	912 \pm 214
2-[(methylthio)methyldithio]pyridin- <i>N</i> -oxid (14)	161 \pm 49
2-[(methylthio)methyldithio]pyridin (47)	291 \pm 70

Výsledky opět ukazují na zdatně nižší hodnoty IC-50 u přírodních disulfidů obsahující $-\text{N}=\text{O}$ skupinu. Lze tedy usuzovat, že důležitou roli v inhibiční aktivitě proti MAO-A opět hraje přítomnost (*N*-oxy-2-pyridyl)disulfanylové skupiny (obrázek 49).

Testování afinity ke GABA_A receptoru

Cílem některých postupů při léčbě epileptických záchvatů je zvýšit citlivost GABA_A receptoru pro endogenní γ -aminomáselnou kyselinu (GABA). V této práci bylo k hodnocení antiepileptické aktivity studovaných látek využito [*N*-methyl- ^3H]flumazenil vazebného testu. Počáteční testování bylo provedeno při koncentraci 1,82 mM. Vazebná aktivita byla přepočítána na schopnost vytěsnit [*N*-methyl- ^3H]flumazenil z GABA_A receptoru (obrázek 54).

**Obrázek 54:** Afinita testovaných sirných látek (o koncentraci 1,82 mM) ke GABA_A receptoru.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

U některých testovaných sloučenin se prokázala poměrně silná aktivita. Zejména 2-[(methylthio)methylthio]pyridin-*N*-oxid (**14**) a di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxid (**15**), látky přirozeně se vyskytující v cibulkách *A. stipitatum*, vykazovaly významnou afinitu. U látek, které vykazovaly významnou aktivitu (> 45 %), byly stanoveny hodnoty IC-50 (tabulka 10).

Tabulka 10: IC-50 sírných sloučenin podporujících účinky GABA.

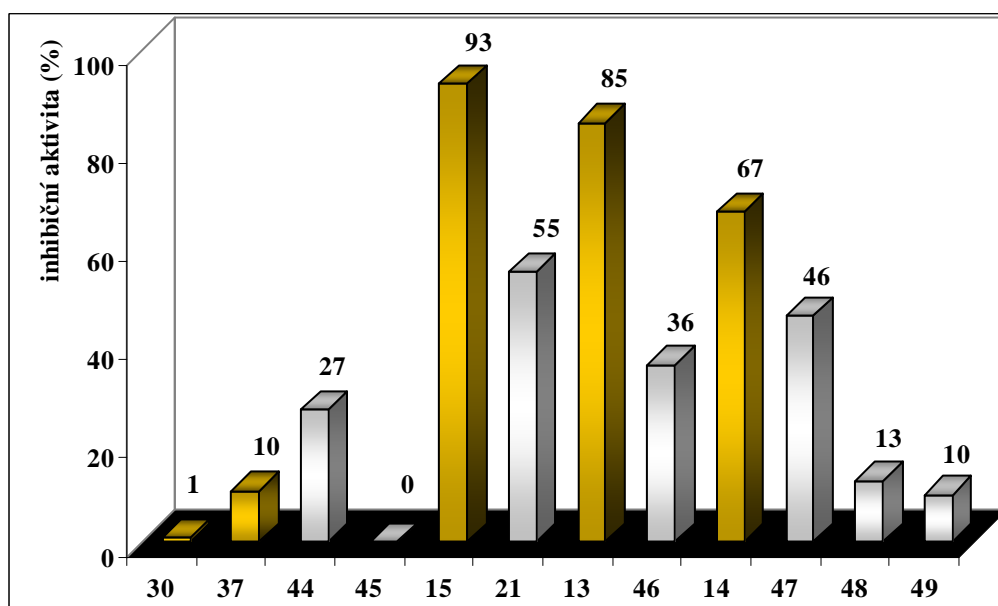
testované sloučeniny	IC-50 (μM)
di(2-pyridyl)disulfid- <i>N,N'</i> -dioxid (15)	nm ^a
di(2-pyridyl)disulfid (21)	74,6±17,4
2-(methylthio)pyridin- <i>N</i> -oxid (13)	1994±260
2-(methylthio)pyridin (46)	995±75
2-[(methylthio)methylthio]pyridin- <i>N</i> -oxid (14)	505±60
2-[(methylthio)methylthio]pyridin (47)	429±1
2-[(methylthio)methylthio]pyridin- <i>N</i> -oxid (49)	1242±123

^avzhledem k omezené rozpustnosti nebylo měřeno

Z výsledků lze vyčíst, že sloučeniny bez –N=O skupiny měly obecně vyšší aktivitu než příslušné, přirozeně se vyskytující *N*-oxidy. Za zmínku stojí zejména velmi silný účinek látky **21**.

Inhibice acetylcholinesterasy

Jednou z možností léčby Alzheimerovy choroby je zvýšení hladiny acetylcholinu v CNS inhibicí acetylcholinesterasy (AChE). Výsledkem je vyšší hladina acetylcholinu a lepší cholinergní přenos. Schopnost studovaných sloučenin inhibovat AChE byla nejdříve testována při koncentraci 400 μM (obrázek 55).



Obrázek 55: Inhibiční aktivita testovaných látek o koncentraci 400 μM proti AChE.

Významná aktivita byla pozorována pouze u šesti disulfidů (**13–15**, **21**, **46** a **47**), které inhibovaly aktivitu AChE v rozmezí 36–93 %. Mezi nejaktivnější látky patřily tři přirozeně se vyskytující *N*-oxidy **13–15**. Hodnoty IC-50 těchto aktivních sloučenin jsou uvedeny v tabulce 11. Výraznější rozdíly účinků testovaných látek jsou velmi dobře patrné na zmíněném obrázku 55. Disulfidy, které obsahovaly –N=O skupinu, vykazovaly výrazně vyšší inhibiční aktivitu než disulfidy bez této funkční skupiny. Dá se tedy usuzovat, že významou roli v inhibiční aktivitě proti acetylcholinesterase opět hraje (*N*-oxy-2-pyridyl)disulfanylová skupina (obrázek 49).

Tabulka 11: IC-50 sirných sloučenin s inhibiční aktivitou proti AChE.

testované sloučeniny	IC-50 (μM)
di(2-pyridyl)disulfid- <i>N,N'</i> -dioxid (15)	104±3
di(2-pyridyl)disulfid (21)	1041±115
2-(methyldithio)pyridin- <i>N</i> -oxid (13)	185±26
2-(methyldithio)pyridin (46)	227±72
2-[(methylthio)methyldithio]pyridin- <i>N</i> -oxid (14)	226±47
2-[(methylthio)methyldithio]pyridin (47)	348±81

Shrnutí

Všechny čtyři sirné látky nejvýznamněji zastoupené v čerstvě zhomogenizovaných cibulkách česneku stopečkatého, tedy *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thion (pyrithion, **37**), di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxid (**15**), 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxid (**13**) a 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin-*N*-oxid (**14**), vykazovaly velmi výraznou biologickou aktivitu. Všechny tyto látky významně inhibovaly růst všech testovaných mikroorganismů, jakož i obou druhů parazitů, přičemž jejich aktivita byla mnohdy vyšší než aktivita v praxi používaných léčiv. Při testování účinků těchto sloučenin proti zánětu (inhibice COX) a depresím (inhibice SERT a MAO-A) vykazoval nejvyšší aktivitu 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin-*N*-oxid (**14**). Dalšími vysoce účinnými látkami proti depresím byly pyrithion (**37**) a 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxid (**13**), proti Alzheimerově chorobě (inhibice AChE) ještě di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxid (**15**).

Je nutno podotknout, že koncentrace těchto sloučenin v čerstvě zhomogenizovaném česneku stopečkatém jsou pravděpodobně mnohem vyšší, než jsou zjištěné hodnoty MIC popř. IC-50. Např. hodnoty MIC pro většinu testovaných mikroorganismů se pohybovaly řádově v jednotkách μg/ml (tabulka 7), zatímco obsah jejich třech prekurzorů (**30**, **1** a **10**) je udáván v rozmezí 2–4 mg/g čerstvé hmoty [23]. Lze tedy předpokládat, že už konzumací

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

relativně malého množství homogenizovaného česneku stopečkatého lze docílit znatelného biologického efektu.

Na druhou stranu je třeba biologické účinky některých sloučenin prozkoumat mnohem důkladněji, je totiž možné, že pravidelná konzumace česneku stopečkatého s sebou může nést také určitá zdravotní rizika. Je např. známo, že pyrithion (**37**), je velmi fotolabilní a při ozáření UV i viditelným světlem snadno dochází k jeho rozpadu na reaktivní hydroxylové radikály $\cdot\text{OH}$ [121–123]. Hydroxylové radikály pak mohou způsobovat přeměny nukleových kyselin, což může vést až ke vzniku zhoubného bujení a oxidačnímu poškození buněk vedoucímu k řadě dalších chorob [132–134]. Pyrithion a jeho degradační produkty jsou také podezřelé z embryotoxických účinků u ryb a jiných mořských organismů. Tyto látky mohou též být potenciálně cytotoxické a genotoxické [135–137].

5.3 Sírné sloučeniny v rostlinách rodu *Tulbaghia*

5.3.1 Sírné aminokyseliny v rostlinách rodu *Tulbaghia*

Z čerstvých kořenů (rhizomů) 18 zástupců podčeledi *Tulbaghioideae* (17 druhů rodu *Tulbaghia* a 1 druh rodu *Prototulbaghia*) byly pomocí okyseleného methanolu extrahovány přítomné aminokyseliny. Získaný extrakt byl dále přečištěn pomocí sloupcové ionexové chromatografie a analyzován za využití HPLC-PDA a GC-MS. Před HPLC-PDA analýzou byla směs aminokyselin derivatizována dansylchloridem a před GC-MS analýzou ethylesterem kyseliny chlormravenčí.

V kořenech všech zkoumaných rostlin, s výjimkou druhu *T. ludwigiana*, byl detekován (R_C, R_S)-*S*-(methylthiomethyl)cystein- S_4 -oxid (marasmin, **10**) v množství pohybujícím se mezi 0,01–1,68 mg/g čerstvé hmoty. Tato aminokyselina tvořila 93–100 % z celkového množství přítomných *S*-substituovaných derivátů cysteinu, pouze minoritně se v některých analyzovaných druzích vyskytoval také (R_C, S_S)-*S*-methylcystein-*S*-oxid (methiin, **1**) (tabulka 12). Žádné jiné *S*-substituované deriváty cysteinu (např. alliin nebo isoalliin) v analyzovaných rostlinách detekovány nebyly.

Tabulka 12: *S*-substituované cystein-*S*-oxidy v rostlinách podčeledi *Tulbaghioideae*.

rod	druh	původ ^a	zastoupení (rel. %)		obsah (mg/g č. h.)
			methiin (1)	marasmin (10)	
<i>Prototulbaghia</i>	<i>P. siebertii</i> Vosa	A	0	100	0,28±0,03
<i>Tulbaghia</i>	<i>T. acutiloba</i> Harv.	B	stopy ^b	100	0,01
	<i>T. alliacea</i> L.f.	B	0	100	1,68±0,13
	<i>T. capensis</i> L.	C	5	95	1,62±0,18
	<i>T. cernua</i> Fisch Mey Avé-Lall	D	7	93	0,22±0,03
	<i>T. coddii</i> Vosa Burgb.	D	stopy	100	1,18±0,15
	<i>T. cominsii</i> Vosa	D	stopy	100	0,74±0,08
	<i>T. dregeana</i> Kunth.	E	0	100	0,02
	<i>T. galpinii</i> Schltr.	D	stopy	100	0,15±0,02
	<i>T. leucantha</i> Baker	D	stopy	100	1,05±0,11
	<i>T. ludwigiana</i> Harv.	C	0	100	nq ^c
	<i>T. montana</i> Vosa	D	stopy	100	0,12±0,02
	<i>T. natalensis</i> Baker	D	0	100	0,98±0,14
	<i>T. simmleri</i> Beauverd	D	0	100	0,12±0,02
	<i>T. simmleri</i> var. <i>alba</i> Beauverd	D	0	100	0,07±0,02
	<i>T. violacea</i> var. <i>maritima</i> Vosa	D	stopy	100	1,26±0,17
	<i>T. violacea</i> var. <i>obtusa</i> Baker	D	stopy	100	1,17±0,20
<i>T. violacea</i> var. <i>violacea</i> Harv.	D	6	94	1,58±0,22	

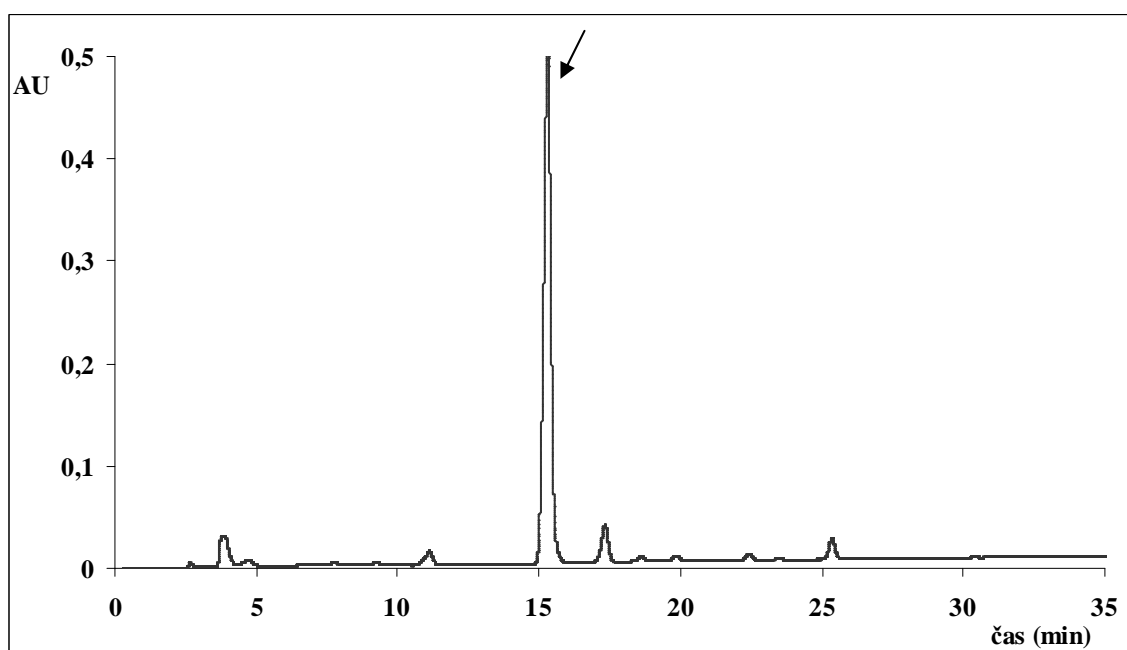
^aviz kap. 4.3, ^b< 0,01 mg/g čerstvé hmoty, ^cnekvantifikováno (<0,01 mg/g čerstvé hmoty)

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Je pozoruhodné, že ve studovaných rostlinách byl většinou nalezen pouze jeden derivát cysteinu (marasmin). Takové jednosložkové zastoupení je totiž u rostlin rodu *Allium* velmi neobvyklé (většinou se vyskytují 2–3 různé deriváty současně).

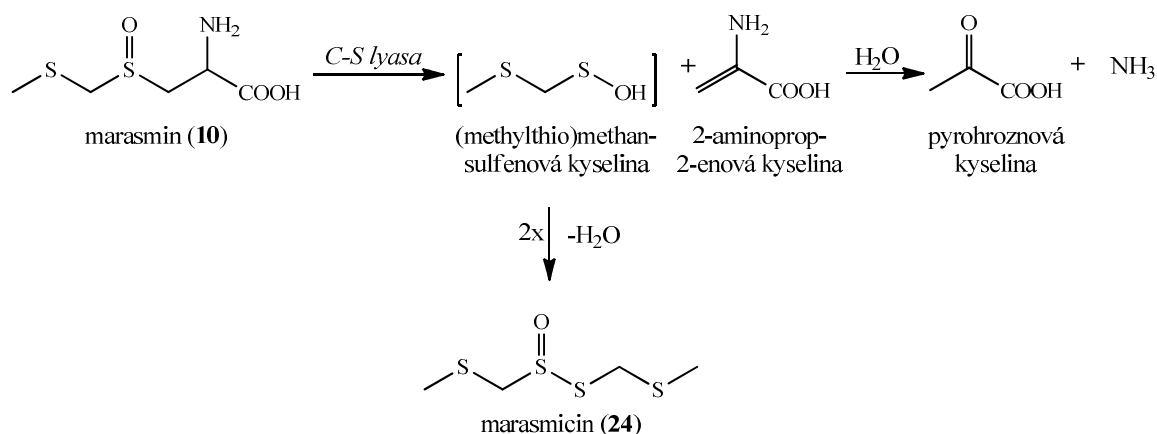
5.3.2 Sirné látky vznikající v *T. violacea*

V rostlinách rodu *Tulbaghia* byly dále studovány sirné sloučeniny vznikající z marasminu při narušení pletiva. K těmto experimentům byla vybrána rostlina *T. violacea*, která je druhem zdaleka nejpoužívanějším v jihoafrickém lidovém léčitelství, jakož i rostlinou hojně využívanou pro přípravu pokrmů. Látky vznikající při homogenizaci kořenů této rostliny byly extrahovány dichlormethanem a analyzovány pomocí HPLC-PDA. Jak je z obrázku 56 patrné, profil látek detekovaných v tomto extraktu byl velice jednoduchý. Tento výsledek ovšem není příliš překvapivý, vezme-li se v úvahu fakt, že v *T. violacea* je přítomen téměř výhradně pouze jeden *S*-substituovaný cystein-*S*-oxid (marasmin, **10**) (tabulka 12).



Obrázek 56: HPLC chromatogram extraktu homogenizovaných kořenů *T. violacea* (při $\lambda = 210$ nm).

Hlavní látka **24** přítomná v extraktu (t_R 15,0 min) byla izolována pomocí preparativní C-18 HPLC a její struktura následně určena využitím ^1H a ^{13}C NMR a MS spektroskopie (viz přílohy A a C). Dle předpokladu bylo potvrzeno, že touto látkou je thiosulfinát marasmicin (2,4,5,7-tetrathiaoktan- S_4 -oxid, **24**), který vzniká enzymově katalyzovaným rozkladem marasminu (obrázek 57).



Obrázek 57: Enzymově katalyzovaný rozklad marasminu.

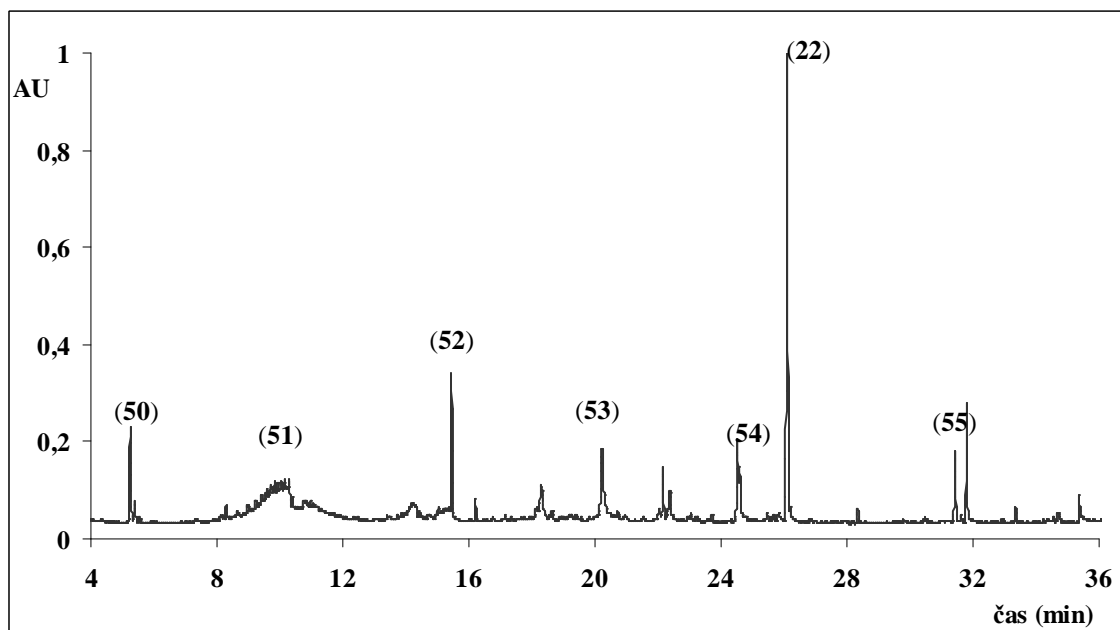
5.3.3 Senzorické hodnocení marasmicinu

Pomocí preparativní C-18 HPLC byl získán čistý marasmicin, který byl mimo jiné použit i k hodnocení jeho sensorických vlastností. Zásobním roztokem byl marasmicin o koncentraci 2 mg/ml v ethanolu. Tento roztok byl dále ředěn vodou až na výsledné koncentrace 5–50 ppb. Testování bylo prováděno trojúhelníkovým testem. Pro sensorickou analýzu byly použity vzorky v koncentracích 5, 10 a 20 ppb. Chuťový práh marasmicinu byl stanoven na 10 ppb, což je 10× nižší hodnota, než je chuťový práh allicinu (100 ppb), hlavní sensoricky aktivní látky česneku [138]. Vodný roztok marasmicinu měl při vyšších koncentracích (200–500 ppb) pálivou chuť silně připomínající česnek, v nízkých koncentracích (10–50 ppb) byla chuť stále hodnocena jako česneková ovšem s podtóny připomínajícími vařenou kedlubnu. Vůni marasmicinu lze popsat jako příjemnou, silně česnekovou se sirnými či masovými podtóny.

5.3.4 Těkavé sirné látky vznikající při zpracování *T. violacea*

K simulaci typické kulinární úpravy *T. violacea* byly kořeny této rostliny homogenizovány s vodou a vařeny po dobu 30 minut. Vzniklé těkavé produkty byly extrahovány diethyletherem a analyzovány pomocí GC-MS (obrázek 58).

5 VÝSLEDKY A DISKUSE



Obrázek 58: GC-MS chromatogram těkavých látek v kořenech *T. violacea*.

Jak je z uvedeného GC chromatogramu patrné, analyzovaný extrakt z kořenů *T. violacea* obsahoval relativně malý počet těkavých sloučenin, přičemž většinu z nich tvořily látky sirné. Jako majoritní složky byly identifikovány 2,3,5-trithiahexan (**53**) a 2,4,5,7-tetrathiaoktan (**22**), které tvořily 20,1 % resp. 38,5 % všech detekovaných látek. Dalšími nalezenými těkavými látkami, ovšem přítomnými ve výrazně nižších koncentracích, byly dimethyldisulfid (**50**), (methylthio)methanthiol (**51**), dimethyltrisulfid (**52**), 2,3,4,6-tetrathiaheptan (**54**) a 2,3,4,6,8-pentathianonan (**55**) (tabulka 13, obrázek 58).

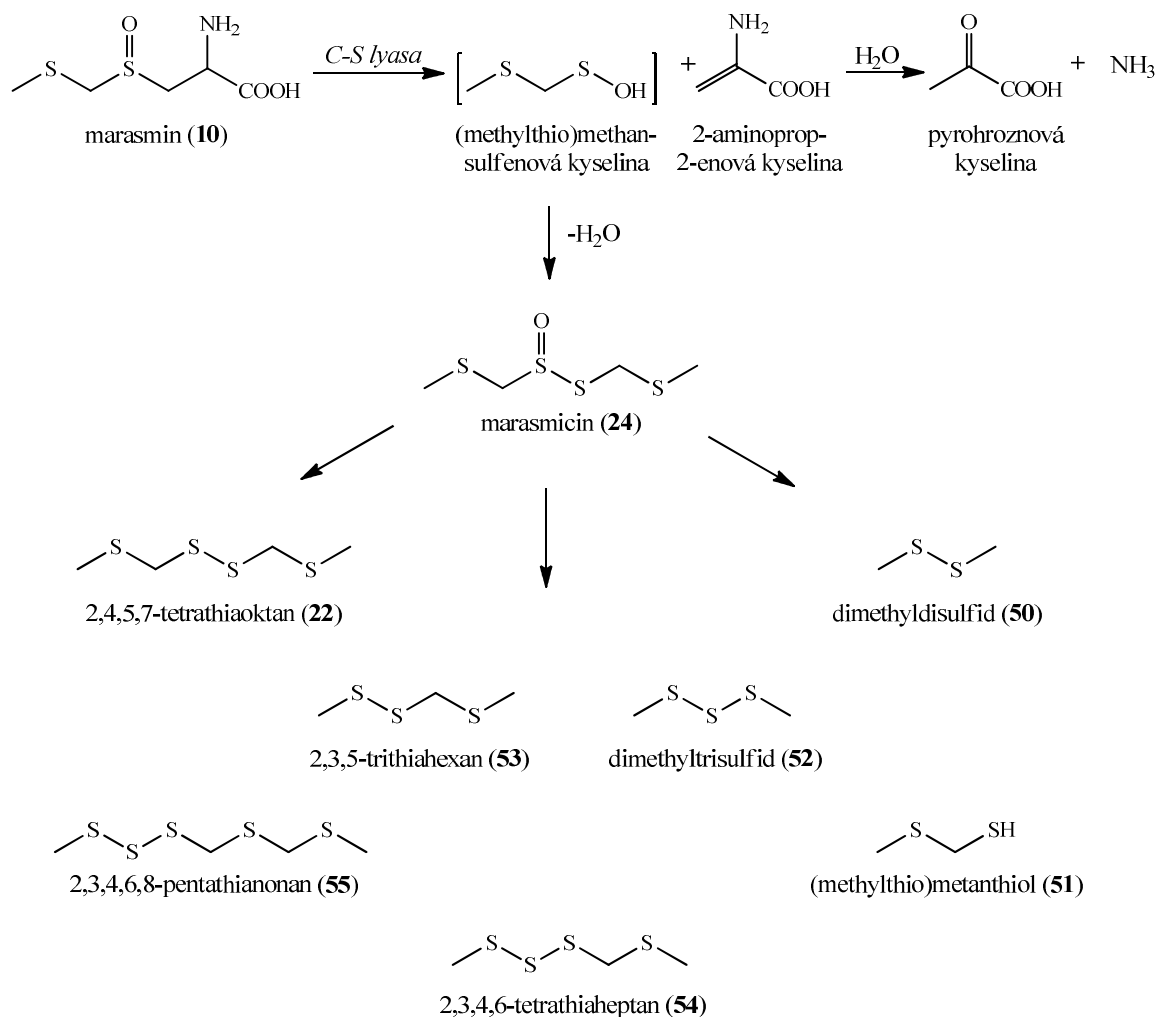
Tabulka 13: Těkavé sirné sloučeniny vznikající při vaření kořenů *T. violacea*.

těkavé sirné sloučeniny	strukturní vzorec	KI ^c	obsah (rel. %)
dimethyldisulfid ^a (50)	CH ₃ SSCH ₃	745	2,4±0,6
(methylthio)methanthiol ^a (51)	CH ₃ SCH ₂ SH	798	0,2±0,1
dimethyltrisulfid ^a (52)	CH ₃ SSSCH ₃	972	0,9±0,2
2,3,5-trithiahexan ^a (53)	CH ₃ SSCH ₂ SCH ₃	1146	20,1±3,2
2,3,4,6-tetrathiaheptan ^b (54)	CH ₃ SSSCH ₂ SCH ₃	1351	3,2±0,4
2,4,5,7-tetrathiaoktan ^a (22)	CH ₃ SCH ₂ SSCH ₂ SCH ₃	1490	38,5±4,7
2,3,4,6,8-pentathianonan ^a (55)	CH ₃ SSSCH ₂ SCH ₂ SCH ₃	1684	3,3±0,8

^aidentifikováno srovnáním s autentickým standardem, ^bidentifikace pouze podle MS dat, ^cKovatsovy indexy

Jak je z obrázku 58 a tabulky 13 patrné, většina nalezených sloučenin byly acyklické oligosulfidy obsahující CH₃SCH₂- skupinu (poskytující v MS spektrech typický fragment *m/z* 61). Protože žádná z těchto sirných těkavých látek nebyla detekována v čerstvě

zhomogenizovaném extraktu *T. violacea* (pomocí HPLC-MS), je velmi pravděpodobné, že tyto sloučeniny jsou tvořeny až tepelným rozkladem marasmicinu (obrázek 59). Vzhledem k vysoké tepelné nestabilitě mnoha sirných sloučenin je také možné, že některé z těchto látek mohly vzniknout až během GC-MS analýzy (např. během nástřiku).



Obrázek 59: Vznik těkavých látek při vaření kořenů rostliny *T. violacea*.

Naprostá většina z výše uvedených těkavých látek již byla ve vědecké literatuře popsána. Velmi podobné zastoupení sirných sloučenin bylo nalezeno v extraktech z kůry několika tropických stromů, např. *Scorodophloeus zenkeri* Harms. a *Hua gabonii* Pierre ex De Wild. rostoucích v centrální Africe, *Scorodocarpus borneensis* Becc. pocházejícího z Malajsie či *Gallesia gorazema* (Vell.) Moq. z Jižní Ameriky. Kůra a plody těchto stromů (často označovaných jako „wood garlic“) jsou lokálně využívány jako koření. Tato podobnost

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

ve struktuře těkavých sloučenin naznačuje, že marasmin je jejich pravděpodobným prekurzorem také v těchto stromech [139–142].

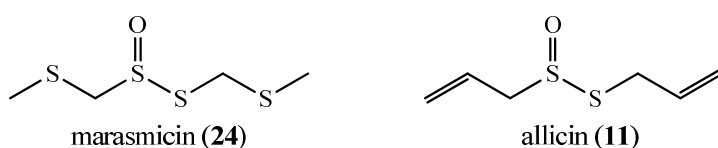
Senzorické vlastnosti hlavních dvou těkavých sirných látek nalezených ve vařených kořenech *T. violacea*, tedy 2,3,5-trithiahexanu (**53**) a 2,4,5,7-tetrathiaoktanu (**22**), byly popsány Kubotou a Kobayashim [143]. V případě 2,3,5-trithiahexanu byl stanoven práh vnímání chuti (ve vodě) na 40 ppb a pro 2,4,5,7-tetrathiaoktan 3,5 ppb. Hodnotitelé popsali vůni **53** jako česnekovitou nebo připomínající cibuli, zatímco aroma 2,4,5,7-tetrathiaoktanu (**22**) ohodnotili jako poněkud dráždivé a výrazně cibulové.

5.4 Biologická aktivita marasmicinu

5.4.1 Antimikrobiální aktivita marasmicinu

Ačkoliv jsou rostliny rodu *Tulbaghia* hojně využívány v lidovém léčitelství pro léčbu celé řady infekčních onemocnění, antimikrobiální aktivita marasmicinu v odborné literatuře zatím popsána nebyla. Dosavadní studie byly zaměřeny pouze na testování antimikrobiální aktivity extraktů z rostlin *Tulbaghia* [144, 145], které skutečně odhalily jejich významné antimikrobiální účinky.

Antimikrobiální aktivita marasmicinu byla testována pomocí následujících mikroorganismů: *E. coli* (*Ec*), *E. faecalis* (*Ef*), *M. luteus* (*Ml*), *B. cereus* (*Bc*), *E. amylovora* (*Ea*), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*), *C. albicans* (*Ca*), *S. cerevisie* (*Sc*), *F. solani* (*Fs*), *R. solani* (*Rs*) a *A. niger* (*An*). Antimikrobiální aktivita marasmicinu byla zároveň porovnána s aktivitou hlavního thiosulfinátu česneku, allicinu (**11**), a několika komerčně používaných antibiotik.



Obrázek 60: Struktura marasmicinu a allicinu.

Disková difúzní metoda

Testování inhibiční aktivity bylo prováděno na agarových discích s vhodným živným médiem pro daný mikroorganismus. Papírové disky napuštěné sledovanou látkou byly položeny na agar s daným mikroorganismem a společně kultivovány při optimální teplotě. Po viditelném nárůstu mikroorganismů byly odečítány průměry inhibičních zón (včetně

průměru papírového disku 6 mm). Tato metoda byla prováděna jako screening inhibičních aktivit testovaných sirných látek při množství 10 µg látky na disku. Hodnoty inhibičních zón jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14: Průměr inhibičních zón testovaných sloučenin (v mm).

testované sloučeniny	bakterie						kvasinky	
	<i>Ec</i>	<i>Ml</i>	<i>Bc</i>	<i>Ea</i>	<i>Xav</i>	<i>Cms</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>
marasmicin	9,7±0,2	na ^a	na	7,8±0,3	8,2±0,6	13,7±0,5	6,7±0,5	9,7±0,5
allicin	10,0±0,4	na	na	6,5±0,0	9,7±0,9	17,0±1,0	6,7±0,5	8,8±0,2
ampicilin	11,4±0,5	34,8±0,7	na	8,2±1,5	22,4±2,9	34,5±1,0	– ^b	–
gentamicin	17,7±0,5	13,7±0,5	11,2±0,4	8,0±0,8	26,0±1,0	23,5±1,5	–	–
tioconazol	–	–	–	–	–	–	19,3±0,7	22,6±1,6

^aneaktivní (žádná inhibiční zóna), ^bneměřeno

Jak je z tabulky 14 patrné, marasmicin vykazoval velice podobné antimikrobiální vlastnosti proti testovaným mikroorganismům jako allicin. Zároveň nebyly pozorovány jednoznačné rozdíly v aktivitě proti G⁻ a G⁺ bakteriím. Účinky marasmicinu byly porovnány také s aktivitou běžných antibiotik (ampicilinu, gentamicinu a tioconazolu). Bylo zjištěno, že marasmicin vykazoval podobnou inhibiční aktivitu proti bakterii *E. coli* (*Ec*) jako ampicilin, zatímco růst bakterie způsobující spálu růžovitých rostlin *E. amylovora* (*Ea*) inhiboval s podobnou intenzitou jako ampicilin a gentamicin. Ve většině ostatních případů však byla aktivita testovaných antibiotik významně vyšší.

Mikrodiluční metoda

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) marasmicinu a allicinu byla následně testována pomocí mikrodiluční metody. Hodnoty MIC jsou uspořádány v tabulce 15.

Tabulka 15: Minimální inhibiční koncentrace testovaných látek (v µg/ml).

testované sloučeniny	bakterie							kvasinky		plísňe		
	<i>Ec</i>	<i>Ml</i>	<i>Bc</i>	<i>Ef</i>	<i>Ea</i>	<i>Xav</i>	<i>Cms</i>	<i>Ca</i>	<i>Sc</i>	<i>Fs</i>	<i>Rs</i>	<i>An</i>
marasmicin	64	32	32	512	32	8	4	64	4	4	8	16
allicin	32	32	32	64	8	8	2	32	4	4	8	4
ampicilin	8	0,25	32	4	8	8	0,125	– ^a	–	–	–	–
gentamicin	2	2	1	16	2	1	0,25	–	–	–	–	–
tetracyklin	1	0,25	0,031	32	1	0,5	0,125	–	–	–	–	–
chloramfenikol	4	1	4	8	1	4	1	–	–	–	–	–
tioconazol	–	–	–	–	–	–	–	2	0,031	64	64	4

^aneměřeno

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Zjištěné hodnoty MIC naznačují o něco slabší inhibiční schopnost marasmicinu v porovnání s allicinem proti některým testovaným mikroorganismům. Při porovnání inhibiční schopnosti s antibiotiky měl ovšem marasmicin stejný účinek jako ampicilin proti dvěma bakteriím *B. cereus* (*Bc*) a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*). Proti plísním *F. solani* (*Fs*) a *R. solani* (*Rs*) vykazoval marasmicin dokonce 16× silnější inhibiční aktivitu než tioconazol. Získané výsledky tak potvrzují, že používání rostlin rodu *Tulbaghia* při léčbě infekčních onemocnění má své opodstatnění (zejména u africké populace, která má omezený přístup ke komerčním antibiotikům).

5.4.2 Antiparazitická aktivita marasmicinu

U marasminu a allicinu byla testována také jejich antiparazitická aktivita. Tyto dva thiosulfináty byly podrobeny testování jejich účinků proti dvěma parazitům (*T. brucei brucei* a *L. mexicana*) v jejich dvou hlavních životních stádiích. Zjištěné hodnoty IC-50 jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Antiparazitická aktivita testovaných sloučenin (IC-50, v μM).

testované sloučeniny	parazit			
	<i>T. brucei brucei</i>		<i>L. mexicana</i>	
	v těle hmyzu	v krvi hostitele	v těle hmyzu	v krvi hostitele
marasmicin	16,5±2,4	19,5±0,3	14,3±1,3	26,8±5,6
allicin	19,3±0,7	22,±0,3	24,8±5,0	19,2±1,2
pentamidin	0,3±0,08	0,008±0,001	– ^a	–

^aneměřeno

Marasmicin i allicin vykazovaly velmi podobnou inhibiční aktivitu proti oběma testovaným parazitům v obou hlavních životních stádiích (IC-50 14,3–26,8 μM). Jak je ovšem z tabulky 16 zřejmé, antiparazitická aktivita obou thiosulfinátů je významně nižší než účinky antiparazitika pentamidinu. Přesto lze konstatovat, že s ohledem na snadnou dostupnost rostlin rodu *Tulbaghia* (na rozdíl od komerčních léčiv) se jejich využití v africkém lidovém léčitelství v boji s parazitickými onemocněními jeví jako smysluplné.

6 ZÁVĚR

Získané výsledky prokázaly, že v dosud méně známých česnekovitých rostlinách *A. stipitatum* a rostlinách rodu *Tulbaghia* se nachází celá řada sirných sloučenin vykazujících nejen atraktivní senzorycké vlastnosti, ale také významnou biologickou aktivitu.

Cibulky rostlin *A. stipitatum* jsou ve Střední Asii hojně používány k léčbě revmatických a zánětlivých onemocnění, dny, artritidy, průjmů, bolestí břicha a hemeroidů, nebo také ve formě vodného extraktu jako ústní voda. Bylo zjištěno, že za tyto pozitivní účinky jsou zodpovědné sirné deriváty pyridin-*N*-oxidu, které vykazují schopnost inhibovat široké spektrum bakterií, plísní, parazitů a mají i další biologickou aktivitu. Antimikrobiální aktivita těchto pyridin-*N*-oxidů je často vyšší než aktivita běžných antibiotik. Extraktů z této rostliny by tak potenciálně mohlo být využito také v ekologickém zemědělství v boji proti celé řadě fytopatogenních mikroorganismů. Nicméně pyrithion je sloučenina s poněkud rozporuplnými biologickými účinky. Bylo totiž prokázáno, že tato látka může potenciálně vykazovat také embryotoxickou a genotoxickou aktivitu. Proto je žádoucí prostudovat účinky pravidelné konzumace česneku stopečkatého a jemu příbuzných druhů na zdraví člověka ještě detailněji.

V jižní Africe jsou rostliny rodu *Tulbaghia* jedněmi z nejdůležitějších léčivých rostlin. Jejich kořeny jsou hojně používány při léčbě horeček, astmatu, nachlazení, tuberkulózy, žaludečních problémů a dokonce i při léčbě některých typů rakoviny. Konzumace těchto rostlin pomáhá hubit střevní parazity, což bylo potvrzeno i v této studii. Bylo zjištěno, že za významné biologické účinky jsou opět zodpovědné sirné látky. V zástupcích rodu *Tulbaghia* biologickou aktivitu zastává hlavně marasmicin, hlavní sirná sloučenina vznikající při zpracování těchto rostlin.

Rostliny rodu *Tulbaghia* i *A. stipitatum* se v zemích svého přirozeného výskytu široce uplatňují v místní kuchyni. Zejména zástupci rodu *Tulbaghia* by díky své příjemné česnekové vůni, chuti a významným biologickým účinkům mohli najít širší využití v potravinářském popř. farmaceutickém průmyslu jako alternativa česneku či pažitky. Nezanedbatelnou výhodou těchto rostlin je též snadnost jejich kultivace i v evropských klimatických podmínkách, jakož i jejich esteticky přitažlivé květenství, díky čemuž jsou již nyní pěstovány v mnoha zahrádkách po celé severní polokouli a v USA se dokonce vysazují v parcích či jiných veřejných prostranstvích.

7 LITERATURA

- 1 Fay, M. F.; Rudall, P. J.; Chase, M. W. Molecular studies of subfamily *Gilliesioideae* (Alliaceae). *Aliso* **2006**, 22, 367–371.
- 2 Fritsch, R. M.; Blattner, F. R.; Gurushidze, M. New classification of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb & Berthel.) Rouy (Alliaceae) based on molecular and morphological characters. *Phyton* **2010**, 49, 145–320.
- 3 Hongguan, T.; Meng, L.; Ao, S.; Liu, J. Origin of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Milula* (Liliaceae): further insights from karyological comparisons with *Allium*. *Caryologia* **2005**, 58, 320–331.
- 4 Fay, M. F.; Chase, M. W. Resurrection of Themidaceae for the *Brodiaea* alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. *Taxon* **1996**, 45, 441–451.
- 5 Vosa, C. G. *Prototulbaghia*, a new genus of the Alliaceae family from the Leolo Mountains in Sekhukhuneland, South Africa. *Caryologia* **2007**, 60, 273–278.
- 6 Rabinowitch, H. D.; Currah, L. *Allium* Crop Science: recent advances. *CABI Publishing series* **2002**, ISBN 0-85-199-510-1.
- 7 Maoela, M. S. Studies on some biologically active natural products from *Tulbaghia alliacea*. *Master thesis* **2005**, University of the Western Cape.
- 8 Jedelská, J. Pharmaceutical value of onions (*Allium* L.) and related species of central Asia. *Dissertation* **2007**, Universität Marburg.
- 9 Block, E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implication for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 1135–1178.
- 10 Kubec, R.; Dadáková, E. Quantitative determination of *S*-alk(en)ylcysteine *S*-oxides by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1212, 154–157.
- 11 Kubec, R.; Svobodová, M.; Velíšek, J. Distribution of *S*-alk(en)ylcysteine sulfoxides in some *Allium* species. Identification of a new flavor precursor: *S*-ethylcysteine sulfoxide (ethiin). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 428–433.
- 12 Kubec, R.; Kim, S.; McKeon, D. M.; Musah, R. A. Isolation of *S*-*n*-butylcysteine sulfoxide and six *n*-butyl-containing thiosulfinates from *Allium sicutum*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 65, 960–964.
- 13 Fritsch, R. M.; Keusgen, M. Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. (Alliaceae). *Phytochemistry* **2006**, 67, 1127–1135.
- 14 Edwards, S. J.; Musker, D.; Collin, H. A.; Britton, G. The analysis of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (flavour precursor) from species of *Allium* by high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **1994**, 5, 4–9.
- 15 Block, E.; Naganathan, S.; Putman, D.; Zhao, S. H. *Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 2418–2430.
- 16 Freeman, G. G.; Whenham, R. J. A survey of volatile components of some *Allium* species in terms of *S*-alk(en)yl-L-cystine sulphoxides present as flavour precursors. *J. Sci. Food Agric.* **1975**, 26, 1869–1886.

7 LITERATURA

- 17 Yoo, K. S.; Pike, L. M. Determination of flavor precursor compound *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species. *Sci. Hortic.* **1998**, *75*, 1–10.
- 18 Thomas, D. J.; Parkin, K. L. Quantification of alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in *Alliums* by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, *42*, 1632–1638.
- 19 Sendl, A.; Wagner, H. Isolation and identification of homologues of ajoene and alliin from bulb-extracts of *Allium ursinum*. *Planta Med.* **1991**, *57*, 361–362.
- 20 Kubec, R.; Svobodová, M.; Velíšek, J. Gas chromatographic determination of *S*-alk(en)ylcysteine sulfoxides. *J. Chromatogr. A* **1999**, *862*, 85–94.
- 21 Dini, I.; Tenore, G. C.; Dini, A. *S*-Alkenyl cysteine sulfoxide and its antioxidant properties from *Allium cepa* var. *tropeana* (red onion) seeds. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 2036–2037.
- 22 Kučerová, P.; Kubec, R.; Šimek, P.; Václavík, L.; Schraml, J. *Allium* discoloration: The precursor and formation of the red pigment in giant onion (*Allium giganteum* Regel) and some other subgenus *Melanocrommyum* species. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1821–1828.
- 23 Kusterer, J.; Fritsch, R. M.; Keusgen, M. *Allium* species from central and southwest Asia are rich sources of marasmin. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8289–8297.
- 24 Kubec, R.; Cody, R. B.; Dane, A. J.; Musah, R. A.; Schraml, J.; Vattekkatte, A.; Block, E. Applications of direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. (*Z*)-Butanethial *S*-oxide and 1-butenyl thiosulfinates and their *S*-(*E*)-1-butenylcysteine *S*-oxide precursor from *Allium siculum*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1121–1128
- 25 Lanzotti, V. The analysis of onion and garlic. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 3–22.
- 26 Martínez, M. C.; Corzo, N.; Villamiel, M. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci. Tech.* **2007**, *18*, 609–625.
- 27 Block, E. Garlic and other *Alliums*. The lore and the science. *RCS Publishing* **2010**, ISBN 978-0-85404-190-9.
- 28 He, Q.; Kubec, R.; Jadhav, A. P.; Musah, R. A. First insights into the mode of action of a “lachrymatory factor synthase”– Implications for the mechanism of lachrymator formation in *Petiveria alliacea*, *Allium cepa* and *Nectaroscordum* species. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1939–1946.
- 29 Konvička, O. Česnek (*Allium sativum* L.). Základy biologie a pěstování, obsahové látky a léčivé účinky. *Vlastním nákladem – Olomouc* **1998**, ISBN 80-238-1928-3.
- 30 Curtis, H.; Noll, U.; Stoermann, J.; Slusarenko, A. J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2004**, *65*, 79–89.
- 31 Tsao, S.; Yin, M. *In vitro* activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2001**, *47*, 665–670.
- 32 Lemar, K. M.; Aon, M. A.; Cortassa, S.; O’Rourke, B.; Müller, C. T.; Lloyd, D. Diallyl disulfide depletes glutathione in *Candida albicans*: oxidative stress-mediated cell death studied by two-photon microscopy. *Microbiology* **2005**, *151*, 3257–3265.
- 33 Shadkhan, Y.; Shemesh, E.; Mirelman, D.; Miron, T.; Rabinkov, A.; Wilchek, M.; Osherov, N. Efficacy of allicin, the reactive molecule of garlic, in inhibiting *Aspergillus* spp. *In vitro*, and in a murine model of disseminated aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemotherapy* **2004**, *53*, 832–836.

- 34 Ankri, S.; Mirelman, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* **1999**, 1, 125–129.
- 35 Zohri, A.; Abdel-Gawad, K.; Saber, S. Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. *Microbiol. Res.* **1995**, 150, 167–172.
- 36 Milner, J. A. Preclinical perspectives on garlic and cancer. *J. Nutr.* **2006**, 136, 827–831.
- 37 Weber, N. D.; Anderson, D. O.; North, J. A.; Murray, B. K.; Lawson, L. D.; Hughes, B. G. In vitro virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med.* **1992** 58, 417–423.
- 38 Saleheen, D.; Ali, S. A.; Yasinzai, M. M. Antileishmanial activity of aqueous onion extract *in vitro*. *Fitoterapia* **2004**, 75, 9–13.
- 39 Khalid, F. A.; Abdalla, N. M.; Mohamed, H. E. O.; Toum, A. M.; Magzoub, M. M. A.; Ali, M. S. In vitro assessment of anti-cutaneous leishmaniasis activity of some Sudanese plants. *Turkiye Parazitol. Derg.* **2005**, 29, 3–6.
- 40 Lun, Z. R.; Burri, C.; Menzinger, M.; Kaminsky, R. Antiparasitic activity of diallyl trisulfide (Dasuansu) on human and animal pathogenic protozoa (*Trypanosoma* sp., *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*) *in vitro*. *Ann. Soc. Belg. Med. Tropicale* **1994**, 74, 51–59.
- 41 Block, E.; Gulati, H.; Putman, D.; Sha, D.; You, N.; Shu-Hai, Z. *Allium* chemistry: Synthesis of 1-[alk(en)ylsulfinyl]propyl alk(en)yl disulfides (cepaenes), antithrombotic flavorants from homogenates of onion (*Allium cepa*). *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 4414–4422.
- 42 Borek, C. Garlic reduces dementia and heart-disease risk. *J. Nutr.* **2006**, 136, 810S–812S.
- 43 Yang, C. S.; Chhabra, S. K.; Hong, J.-Y.; Smith, T. J. Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic. *J. Nutr.* **2001**, 131, 1041S–1045S.
- 44 Hatono, S.; Jimenez, A.; Wargovich, M. Chemopreventive effect of *S*-allylcysteine and the relationship to the detoxification enzyme glutathione *S*-transferase. *Carcinogenesis* **1996**, 17, 1041–1044.
- 45 Fukushima, S.; Takada, N.; Hori, T.; Wanibuchi, H. Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **1997**, 27, 100–105.
- 46 Boivin, D.; Lamy, S.; Lord-Dufour, S.; Jackson, J.; Beaulieu, E.; Cote, M.; Moghrabi, A.; Barrette, S.; Gingras, D.; Béliveau, R. Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: a comparative study. *Food Chem.* **2009**, 112, 374–380.
- 47 Dirsch, V. M.; Antlsperger, D. S.; Hentze, H.; Vollmar, A. M. Ajoene, an experimental anti-leukemic drug: mechanism of cell death, *Leukemia* **2002**, 16, 74–83.
- 48 Hassan, H. T. Ajoene (natural garlic compound): a new anti-leukemia agent for AML therapy. *Leukemia Res.* **2004**, 28, 667–671.
- 49 Bayer, T.; Wagner, H.; Block, E.; Grisoni, S.; Zhao, S. H.; Neszmelyi, A. Zwiebelanes: novel biologically active 2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexane 5-oxides from onion. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 3085–3086.
- 50 Wagner, H.; Dorsch, H.; Bayer, T.; Breu, W.; Willer, F. Antiasthmatic effects of onions: inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase *in vitro* by thiosulfinates and “cepaenes.” *Prostag. Leukotr. Ess.* **1990**, 39, 59–62.
- 51 Ashafaq, M.; Khan, M. M.; Raza, S. S.; Ahmad, A.; Khuwaja, G.; Javed, H.; Khan, A.; Islam, F.; Siddiqui, M. S.; Safhi, M. M.; Islam, F. *S*-allyl cysteine mitigates oxidative damage and

7 LITERATURA

- improves neurologic deficit in a rat model of focal cerebral ischemia. *Nutrition Res.* **2012**, 32, 133–143.
- 52 Lee, H.-S.; Lee, C.-H.; Tsai, H.-C.; Salter, D. M. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression by diallyl sulfide on joint inflammation induced by urate crystal and IL-1 β . *Osteoarthr. Cartilage* **2009**, 17, 91–99.
- 53 Keophiphath, M.; Priem, F.; Jacquemond-Collet, I.; Clément, K.; Lacasa, D. 1,2-Vinyldithiin from garlic inhibits differentiation and inflammation of human preadipocytes. *J. Nutr.* **2009**, 139, 2055–2060.
- 54 Nishimura, H.; Higuchi, O.; Tateshita, K.; Tomobe, K.; Okuma, Y.; Nomura, Y. Antioxidative activity and ameliorative effects of memory impairment of sulfur-containing compounds in *Allium* species. *Biofactors* **2006**, 26, 135–146.
- 55 Chauhan, N. B. Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 108, 385–394.
- 56 Yamada, N.; Hattori, A.; Hayashi, T.; Nishikawa, T.; Fukuda, H.; Fujino, T. Improvement of scopolamine-induced memory impairment by Z-ajoene in the water maze in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, 78, 787–791.
- 57 Keusgen, M.; Fritsch, R. M.; Hisoriev, H.; Kurbonova, P. A.; Khassanov, F. O. Wild *Allium* species (Alliaceae) used in folk medicine of Tajikistan and Uzbekistan. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2006**, 2, 18.
- 58 Kusterer, J.; Vogt, A.; Keusgen, M. Isolation and identification of a new cysteine sulfoxide and volatile sulfur compounds from *Allium* Subgenus *Melanocrommyum*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 520–526.
- 59 O'Donnell, G.; Poeschl, R.; Zimhony, O.; Gunaratnam, M.; Moreira, J. B. C.; Neidle, S.; Evangelopoulos, D.; Bhakta, S.; Malkinson, J. P.; Boshoff, H. I.; Lenaerts, A.; Gibbons, S. Bioactive pyridine-*N*-oxide from *Allium stipitatum*. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 360–365.
- 60 Amin, M.; Jahangirneyhad, M.; Rasaei, N.; Pipelzadeh, M. H.; Rafiee, M. Evaluation of the effect of Persian shallot (*Allium hirtifolium*, Boiss) aqueous extract on mouth bacterial count compared with chlorhexidine mouth rinse. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2012**, 6, 5809–5813.
- 61 Dilys, D. *Alliums: the ornamental onions*, *Hardy Plant Society*, London **1992**, ISBN 0-7134-7030-5.
- 62 Fritsch, R. M. The Iranian species of *Allium* subg. *Melanocrommyum* sect. *Megaloprason* (Alliaceae). *Nord. J. Bot.* **1996**, 16, 9–17.
- 63 Ebrahimi, R.; Zamani, Z.; Kashi, A. Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. *Sci. Hort.* **2009**, 119, 345–351.
- 64 Asili, A.; Behravan, J.; Naghavi, M. R.; Asili, J. Genetic diversity of Persian shallot (*Allium hirtifolium*) ecotypes based on morphological traits, allicin content and RAPD markers. *Open Access J. Med. Arom. Plants.* **2010**, 1, 1–6.
- 65 Burbidge, R. B. A revision of the genus *Tulbaghia* (Liliaceae). *Notes from the Royal Botanic Garden* **1978**, 36, 77–103.
- 66 Lyantagaye, S. L. Ethnopharmacological and phytochemical review of *Allium* species (sweet garlic) and *Tulbaghia* species (wild garlic) from Southern Africa. *Tanz. J. Sci.* **2011**, 37, 58–72.
- 67 Hutchings, A.; Scott, A. H.; Lewis, G.; Cunningham, A. Zulu medicinal plants. An Inventory. *University of Natal Press*, Scottsville **1996**, ISBN 0-86980-923-7.

- 68 Wyk, B. E.; Oudtshoorn, B.; Gericke, N. Medicinal plants of South Africa. *Briza Publications*, Pretoria **2000**, ISBN 978-1875093373.
- 69 Kubec, R.; Velíšek, J.; Musah, R. A. The amino acid precursors and odor formation in society garlic (*Tulbaghia violacea* Harv.). *Phytochemistry* **2002**, 60, 21–25.
- 70 Dyson, A. Discovering Indigenous Healing plants of the herb and fragrance gardens at Kristenbosch (National Botanical Garden), *National botanical institute* 1998, ISBN 978-1919684093.
- 71 Jacobsen, J. V.; Yamaguchi, Y.; Mann, L. K.; Howard, F. D. An alkyl-cysteine sulfoxide lyase in *Tulbaghia violacea* and its relation to other alliinase-like enzymes. *Phytochemistry* **1968**, 7, 1099–1108.
- 72 Buton, S. G.; Kaye, P. T. Isolation and charakterisation of sulphur compounds from *Tulbaghia violacea*. *Planta med.* **1992**, 58, 295–296.
- 73 Kubec, R.; Kim, S.; Velíšek, J.; Musah, R. A. Flavour precursors and aroma formation in society garlic (*Tulbaghia violacea* Harv.). *The 10th Weurman Flavour Research Symposium Beaune France* **2003**, 409–412, ISBN 2-7430-0639-0.
- 74 Kubec, R.; Velíšek, J.; Musah, R. A. Sírné látky tzv. sladkého česneku (*Tulbaghia violacea* Harv.). *XXXIII. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin* **2002**, 120–122.
- 75 Sedláček, I. Taxonomie prokaryot, *Masarykova univerzita*, Brno **2007**, ISBN 80-210-4207-9.
- 76 Klazan, V. Ilustrovaný mikrobiologický slovník, *Galén*, Praha **2005** ISBN 80-7262-341-9.
- 77 Kalina, T.; Váňa, J. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, *Karolinum*, Praha **2005**, ISBN 80-246-1036-1.
- 78 Kúdela, V.; Novacky, A.; Fucikovsky, L. Rostlinolékařská bakteriologie. *Akademie věd České republiky*, Praha **2002**, ISBN 80-200-0899-3.
- 79 Fassatiová, O. Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii. *SNTL*, Praha **1979**.
- 80 Stuart, K.; Brun, R.; Croft, S.; Fairlamb, A.; Gürtler, R. E.; McKerrow, J.; Reed, S.; Tarleton, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* **2008**, 118, 1301–1310.
- 81 Radwanska, M.; Claes, F.; Magez, S.; Magnus, E.; Perez-Morga, D.; Pays, E.; Büscher, P. Novel primer sequeces for polymerase chain reaction – based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, 67, 289–295.
- 82 Majumdar, D.; Elsayed, G. A.; Buskas, T.; Boons, G. J. Synthesis of proteophosphoglycans of *Leishmania major* and *Leishmania mexicana*. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1691–1697.
- 83 Vinetz, J. M.; Soong, L. *Leishmania mexicana* infection of the eyelid in a traveler to Belize. *Braz. J. Infect. Dis.* **2007**, 11, 149–152.
- 84 Marnett, L. J.; Kalgutkar, A. S. Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, 20, 465–469.
- 85 Marnett, L. J.; Kalgutkar, A. S. Design of selective inhibitors of cyclooxygenase-2 as nonulcerogenic anti-inflammatory agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 482–490.
- 86 Simopoulos, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* **2002**, 21, 495–505.
- 87 Okénková, K. Úloha serotoninu v nespecifické imunitní odpovědi – vliv na oxidativní vzplanutí profesionálních fagocytů. *Rigorozní práce* **2008**, Masarykova univerzita Brno.

7 LITERATURA

- 88 Watanabe, M.; Maemura, K.; Kanbara, K.; Tamayama, T.; Hayasaki, H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol.* **2002**, 213, 1–47.
- 89 Foster, A. C.; Kemp, J. A. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 7–17.
- 90 Chapouthier, G.; Venault, P. A pharmacological link between epilepsy and anxiety. *Trends Pharmacol. Sciences* **2001**, 22, 491–493.
- 91 Quinn, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* **1987**, 87, 955–79.
- 92 Jones, B. E. From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol. Sciences* **2005**, 26, 578–86.
- 93 Himmelheber, A. M.; Sarter, M.; Bruno, J. P. Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats. *Cognitive Brain Res.* **2000**, 9, 313–325.
- 94 Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* **1999**, 66, 137–147.
- 95 Shih, J. C.; Chen, K. Regulation of MAO-A and MAO-B gene expression. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 1995–2005.
- 96 Kubec, R.; Kim, S.; Musah, R. A. *S*-Substituted cysteine derivatives and thiosulfinate formation in *Petiveria alliacea*—part II. *Phytochemistry* **2002**, 61, 675–680.
- 97 Kubec, R.; Dadáková, E. Chromatographic methods for determination of *S*-substituted cysteine derivatives—A comparative study. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 6957–6963.
- 98 Shen, C.; Parkin, K. L. *In vitro* biogenesis of pure thiosulfonates and propanethial sulfoxide. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 6254–6260.
- 99 Kalopissis, G.; Bouillon, C. Process for the preparation of the compounds of this invention *US Patent 4,002,634* **1977**.
- 100 Barton, D. H. R.; Jaszberenyi, J. C.; Morrrell, A. I. The generation and reactivity of oxygen centered radicals from the photolysis of derivatives of *N*-hydroxy-2-thiopyridone. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 311–314.
- 101 Kitson, T. M.; Loomes, K. M. Synthesis of methyl 2- and 4-pyridyl bisulfide from 2- and 4-thiopyridone and methyl methanethiosulfonate. *Anal. Biochem.* **1985**, 146, 429–430.
- 102 Hasselstrom, T.; Clapp, R. C.; Mann, L. T.; Long, L. Synthesis of methylthiomethyl isothiocyanate. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 3026.
- 103 Altamura, M. R.; Hasselstrom, T.; Long, L. Synthesis of di(methylthiomethyl) polysulfides. *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 2438–2440.
- 104 Dose, C. A.; Ranke, J.; Stock, F.; Bottin-Weber, U.; Jastorff, B. Structure-activity relationships of pyrithiones – IPC-81 toxicity tests with the antifouling biocide zinc pyrithione and structural analogs. *Green Chem.* **2004**, 6, 259–266.
- 105 Kubec, R.; Hrbáčová, M.; Musah, R. A.; Velíšek, J. *Allium* discoloration: precursors involved in onion pinkening and garlic greening. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 5089–5094.
- 106 Kim, S.; Kubec, R.; Musah, R. A. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 104, 188–192.
- 107 Baumamba, K.; Gammon, D. W.; Meyers, P.; Dijoux-Franca, M.-G. Scott, G. Antimycobacterial activity of five plant species used as traditional medicines in the Western Cape Province (South Africa). *J. Ethnopharmacol.* **2008**, 117, 285–390.

- 108 Clinical and laboratory standards institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-Eighth edition: Approved standard M07-A8 Wayne, PA, USA, **2009**, 29.
- 109 Kokoška, L.; Havlík, J.; Valtrová, I.; Sovová, H.; Sajfrtová, M.; Jankovská, I. Comparison of chemical composition and antibacterial activity of *Nigella sativa* seed essential oils obtained by different extraction methods. *J. Food Protect* **2008**, 71, 2475–2480.
- 110 National committee for clinical laboratory standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. Document M38-A. **2002** Wayne, PA.
- 111 Oard, S.; Rush, M. C.; Oard, J. H. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, 97, 169–180.
- 112 Bates, P. A. Complete development cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology* **1994**, 108, 1–9.
- 113 Jäger, A. K.; Hutchings, A.; Staden, J. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. *J. Ethnopharm.* **1996**, 52, 95–100.
- 114 Bay-Smidt, M. G. K.; Jäger, A. K.; Krydsfeldt, K.; Meerow, A. W.; Stafford, G. I.; Van Staden, J.; Rønsted, N. Phylogenetic selection of target species in Amaryllidaceae tribe Haemantheae for acetylcholinesterase inhibition and affinity to the serotonin reuptake transport protein. *J. Ethnopharm.* **2011**, 77, 175–183.
- 115 Svenningsen, A. B.; Madsen, K. D.; Liljefors, T.; Stafford, G. I.; Van Staden, J.; Jäger, A. K. Biflavones from *Rhus* species with affinity for the GABAA/benzodiazepine receptor. *J. Ethnopharm.* **2006**, 103, 276–280.
- 116 Larsen, M. M.; Adersen, A.; Davis, A. P.; Lledó, M. D.; Jäger, A. K.; Rønsted, N. Using a phylogenetic approach to selection of target plants in drug discovery of acetylcholinesterase inhibiting alkaloids in Amaryllidaceae tribe Galantheae. *Biochem. Syst. Ecol.* **2010**, 38, 1026–1034.
- 117 Stafford, G. I.; Pedersen, P. D.; Jäger, A. K.; Van Staden, J. Monoamine oxidase inhibition by southern African traditional medicinal plants. *South Afric. J. Bot.* **2007**, 73, 384–390.
- 118 Kubec, R.; Musah, R. A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry* **2001**, 58, 981–985.
- 119 Lancaster, J. E.; Shaw, M. L.; Joyce, M. D. P.; McCallum, J. A.; McManus, M. T. A novel alliinase from onion roots. Biochemical characterization and cDNA cloning. *Plant Physiol.* **2000**, 122, 1269–1279.
- 120 Jones, R. A.; Katritzky, A. R. *N*-Oxides and related compounds. Part XVII. The tautomerism of mercapto- and acylamino-pyridine 1-oxides. *J. Chem. Soc.* **1960**, 2937–2942.
- 121 Aveline, B. M.; Kochevar, I. E.; Redmond, R. W. Photochemistry of the nonspecific hydroxyl radical generator, *N*-hydroxypyridine-2(1*H*)-thione. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10113–10123.
- 122 Barton, D. H. R.; Chen, C.; Wall, G. M. Synthesis of disulfides *via* sulfenylation of alkyl and aryl dithiopyridine *N*-oxides. *Tetrahedron* **1991**, 47, 6127–6138.
- 123 Lapinski, L.; Gerega, A.; Sobolowski, A. L.; Nowak, M. J. Thioperoxy derivative generated by UV-induced transformation of *N*-hydroxypyridine-2(1*H*)-thione isolated in low-temperature matrixes. *J. Phys. Chem. A* **2008**, 112, 238–248.

7 LITERATURA

- 124 Boivin, J.; Crépon, E.; Zard, S. Z. Generation of hydroxyl radicals from 1-hydroxypyridine-2(1*H*)-thione and their application to organic synthesis. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1992**, 129, 145–150.
- 125 Freeman, F. *vic*-Disulfoxides and *OS*-sulfenyl sulfinates. *Chem. Rev.* **1984**, 84, 117–135.
- 126 Ishii, A. Syntheses and properties of *vic*-disulfoxides. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2006**, 64, 395–405.
- 127 Tenenbaum, S.; Opdyke, D. L. Antimicrobial properties of the pyrithione salts VII. In vitro methods for comparing pyrithiones to standard antimicrobials. *Fd. Cosmet. Toxicol.* **1969**, 7, 223–232.
- 128 Khattar, M. M.; Salt, W. G.; Stretton, R. J. The influence of pyrithione on the growth of microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.* **1988**, 64, 265–272.
- 129 Marks, R.; Pearse, A. D.; Walker, A. P. The effects of a shampoo containing zinc pyrithione on the control of dandruff. *Br. J. Dermatol.* **1985**, 112, 415–422.
- 130 Vieites, M.; Smircich, P.; Guggeri, L.; Marchán, E.; Gómez-Barrio, A.; Navarro, M.; Garat, B.; Gambino, D. Synthesis and characterization of a pyridine-2-thiol *N*-oxide gold(I) complex with potent antiproliferative effect against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania sp.* insight into its mechanism of action. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, 103, 1300–1306.
- 131 Turrens, J. F.; Newton, C. L.; Zhong, L.; Hernandez, F. R.; Whitfield, J.; Docampo, R. Mercaptopyridine-*N*-oxide, an NADH-fumarate reductase inhibitor, blocks *Trypanosoma cruzi* growth in culture and in infected myoblasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, 175, 217–221.
- 132 Adam, W.; Marquardt, S.; Saha-Möller, C. R. Oxidative DNA damage in the photolysis of *N*-hydroxy-2-pyridone, a specific hydroxylradical source. *Photochem. Photobiol.* **1999**, 70, 287–291.
- 133 Epe, B.; Ballmaier, D.; Adam, W.; Grimm, G. N.; Saha-Möller, C. R. Photolysis of *N*-hydroxypyridinethiones: a new source of hydroxyl radicals for the direct damage of cell-free and cellular DNA. *Nucleic Acids Res.* **1999**, 24, 1625–1631.
- 134 Chaulk, S. G.; Pezacki, J. P.; MacMillan, A. M. Studies of RNA cleavage by photolysis of *N*-hydroxypyridine-2(1*H*)-thione. A new photochemical footprinting method. *Biochemistry* **2000**, 39, 10448–10453.
- 135 Goka, K. Embryotoxicity of zinc pyrithione, an antidandruff chemical, in fish. *Environ. Res. A* **1999**, 81, 81–83.
- 136 Möller, M.; Adam, W.; Saha-Möller, C. R.; Stopper, H. Studies on cytotoxic and genotoxic effects of *N*-hydroxypyridine-2-thione (Omadine) in L5178Y mouse lymphoma cells. *Toxicol. Lett.* **2002**, 136, 77–84.
- 137 Onduka, T.; Mochida, K.; Harino, H.; Ito, K.; Kakuno, A.; Fujii, K. Toxicity of metal pyrithione photodegradation products to marine organisms with indirect evidence for their presence in water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2010**, 58, 991–997.
- 138 Block, E.; Calvey, E. M.; Gillies, C. W.; Gillies, J. Z.; Uden, P. Organosulfur and -selenium phytochemicals in genus *Allium* plants. In *Functionality of Food Phytochemicals*; Johns, T., Romeo, J. T., Eds.; *Plenum Press*, New York **1997**, 1–30, ISBN 978-1-4615-5919-1.
- 139 Kubota, K.; Hirayama, H.; Sato, Y.; Kobayashi, A.; Sugawara, F. Amino acid precursors of the garlic-like odour in *Scorodocarpus borneensis*. *Phytochemistry* **1998**, 49, 99–102.
- 140 Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Teixeira, R. R.; Madruga, M. S. Chemical constituents of the bark of *Gallesia gorazema*. *Fitoterapia* **1999**, 70, 152–256.

- 141 Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Ngassoum M. B.; Geissler, M. Analysis of the headspace aroma compounds of the seeds of the Cameroonian "garlic plant" *Hua gabonii* using SPME/GC/FID, SPME/GC/MS and olfactometry. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 214, 212–215.
- 142 Kouokam, J. C.; Zapp, J.; Becker, H. Oxygen-containing sulfur-rich compounds from the bark of the tropical garlic tree *Scorodophloeus zenkeri* Harms. *Phytochemistry* **2002**, 60, 403–407.
- 143 Kubota, K.; Kobayashi, A. Sulfur compounds in wood garlic (*Scorodocarpus borneensis* Becc.) as versatile food components. In sulfur compounds in foods; Mussinan, C. J., Keelan, M. E., Eds.; *American Chemical Society*, Washington, DC **1994**, 238–246, 978-0841229433.
- 144 Ncube, B.; Ngunge, V. N. P.; Finnie, J. F.; Van Staden, J. A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated *Tulbaghia violacea* Harv. plants. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, 134, 775–780.
- 145 Buwa, L. V.; Afolayan, A. J. Antimicrobial activity of some medicinal plants used for the treatment of tuberculosis in the Eastern Cape Province, South Africa. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, 8, 6683–6687.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AChE	acetylcholinesterasa
An	<i>Aspergillus niger</i>
ATCC	American Type Culture Collection (Americká sbírka mikroorganismů)
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
BCCM/LMG	Belgian Coordinatel Collections of Microorganisms (Belgická sbírka mikroorganismů)
BF	blood form (krevní forma parazitů <i>Trypanosoma brucei brucei</i>)
Ca	<i>Candida albicans</i>
CCM	Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)
CFU	colony-forming unit
Cms	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
CNS	centrální nervová soustava
COSY	correlation spectroscopy
COX	cyklooxygenasa
cps	counts per second
DART	direct analysis in real time (přímá analýza v reálném čase)
dmp	disintegrations per minute
DMSO	dimethylsulfoxid
DSS	natrium-4,4-dimethyl-4-silapentan-1-sulfonová kyselina
Ea	<i>Erwinia amylovora</i>
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (chelaton II)
Ef	<i>Enterococcus faecalis</i>
ESI-TOF	electrospray ionisation - time of flight
FBS	fetal bovine serum (fetální hovězí sérum)

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>Fs</i>	<i>Fusarium solani</i>
fwhm	full width at half maximum (šířka píku v poloviční výšce)
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GC	gas chromatography
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HETCOR	heteronuclear correlation spectroscopy
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMDSS	hexamethyldisilan
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRMS	high resolution molecular spectroscopy
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IC-50	inhibiční koncentrace, při které za daných podmínek dochází k 50% poklesu aktivity sledované populace
IČ	infračervená spektrometrie
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's medium
JAR	Jihoafrická republika
KRV/ZF/JU	sbírka Katedry rostlinné výroby agroekologie - Biotechnologické centrum, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
LD ₅₀	letální dávka látky podaná testovaným jedincům, která způsobí úhyn 50 % testovaných živočichů do 24 hodin
MAO	monoaminoxidasa
MEM	minimum essential medium
MIC	minimum inhibitory concentration (minimální inhibiční koncentrace)
<i>Ml</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolin)propansulfonová kyselina
MPAg	masopeptonový agar obohacený o glukosu
<i>Mr</i>	relativní molekulová hmotnost

MS	mass spectrometry
NCCPG	National Council for the Conservation of Plants and Garden
NMR	nuclear magnetic resonance (spectroscopy)
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd
PBS	roztok Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ a NaCl
PDA	photo diode array (detektor diodového pole)
PDA	potato dextrose agar (bramborovo-dextrosový agar)
PDB	potato dextrose broth (bramborovo-dextrosový bujón)
PF	procyclic form (procyklická forma parazitů <i>Trypanosoma brucei brucei</i>)
RICP	Research Institute of Crop Production
RVO	rotační vakuová odparka
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SERT	serotoninový transporter
SIM	Schneider's insect medium (Schneiderovo médium)
SSC	roztok chloridu sodného a citrátu sodného
TBC	tuberkulosa
<i>Tr</i>	retenční čas
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRYP-FIX	roztok na fixování prvků při počítání jejich koncentrace
TSA	trypton sojový agar
TSB	trypton sojový bujón
<i>Xav</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>

9 SEZNAM PUBLIKACÍ

Precursors and formation of pyrithione and other pyridyl-containing sulfur compounds in drumstick onion, *Allium stipitatum*. Kubec R., Krejčová P., Šimek P., Václavík L., Hajšlová J., Schraml J. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 5763–5770.
(IF– 2,823; osobní podíl 40 %)

Flavor precursors and sensory-active sulfur compounds in Alliaceae species native to South Africa and South America. Kubec R., Krejčová P., Mansur L., Garcia N. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61,1335–1342.
(IF– 2,906; osobní podíl 35 %)

Antiinflammatory and neurological activity of pyrithione and related sulfur-containing pyridine *N*-oxides from Persian shallot (*Allium stipitatum*). Krejčová P., Kučerová P., Stafford G. I., Jäger A. K., Kubec R., připravováno k odeslání do *J. Ethnopharmacol.*
(osobní podíl 50 %)

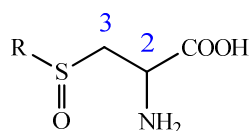
10 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A** NMR spektra: *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**) (^1H , ^{13}C , HETCOR, gHMBC a selektivně dekaplovaná ^1H spektra), *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (**31**) (^1H , ^{13}C , HETCOR a gHMBC spektra), di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (**15**) (^1H , ^{13}C , gCOSY, gHMBC a gHSQC spektrum), di(2-pyridyl)disulfid-*N*-oxidu (**37**) (LC- ^1H NMR spektru), 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxidu (**13**) (^1H a ^{13}C spektra), 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxidu (**14**) (^1H , ^{13}C a HETCOR spektra), *N*-hydroxypyridin-2(1*H*)-thionu (**36a**) (^1H spektrum), 2,4,5,7-tetrathiaoktan-*S*₄-oxidu (marasmicinu, **24**) (^1H a ^{13}C spektra)
- Příloha B** UV spektra: *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**), *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (**31**), di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (**15**), di(2-pyridyl)disulfid-*N*-oxidu (**37**), 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxidu (**13**), 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin-*N*-oxidu (**14**), 2,4,5,7-tetrathiaoktan-*S*₄-oxidu (marasmicinu, **24**)
- Příloha C** MS spektra: *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**) (pozitivní a negativní ionizace), *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (**31**) (pozitivní a negativní ionizace), di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (**15**) (pozitivní ionizace), di(2-pyridyl)disulfid-*N*-oxidu (**37**) (pozitivní ionizace), 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxidu (**13**) (pozitivní ionizace), 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin-*N*-oxidu (**14**) (pozitivní ionizace), 2,4,5,7-tetrathiaoktan-*S*₄-oxidu (marasmicinu, **24**) (pozitivní ionizace), *S*-allyl-2-propenthiosulfinátu (allicinu, **11**) (pozitivní ionizace)
- Příloha D** IČ spektra: *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**), *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (**31**), di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (**15**), 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxidu (**13**), 2-[(methylthio)methyldithio]pyridin-*N*-oxidu (**14**)

PŘÍLOHA A

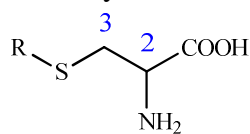
NMR spektra

^{13}C NMR chemické posuny C-2 a C-3 v různých *S*-substituovaných cystein-*S*-oxidech (D_2O)



R-	C-2	C-3	lit.
CH_3-	51,2/51,9	53,1/54,0	[a]
CH_3CH_2-	51,3/51,9	50,9/51,2	[a]
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$	51,3/52,0	51,5/51,9	[a]
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-$	51,2/51,8	50,5/50,7	[a]
(<i>Z</i>)- $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}-$	51,4/51,8	51,0/51,5	[a]
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$	51,1	50,9	[b]
CH_3SCH_2-	50,9	50,5	[c]
(<i>E</i>)- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$	50,8	53,0	[d]
(<i>E</i>)- $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_2-$	51,6/52,0	50,0/50,3	[a]
2-pyrrolyl-	51,5	55,2	[e]
3-pyrrolyl-	51,3	53,8	[e]
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$	50,5	50,7	[f]
$\text{HO-CH}_2\text{CH}_2-$	50,3	51,0	[g]

^{13}C NMR chemické posuny C-2 a C-3 v různých *S*-substituovaných derivátech cysteinu (D_2O)

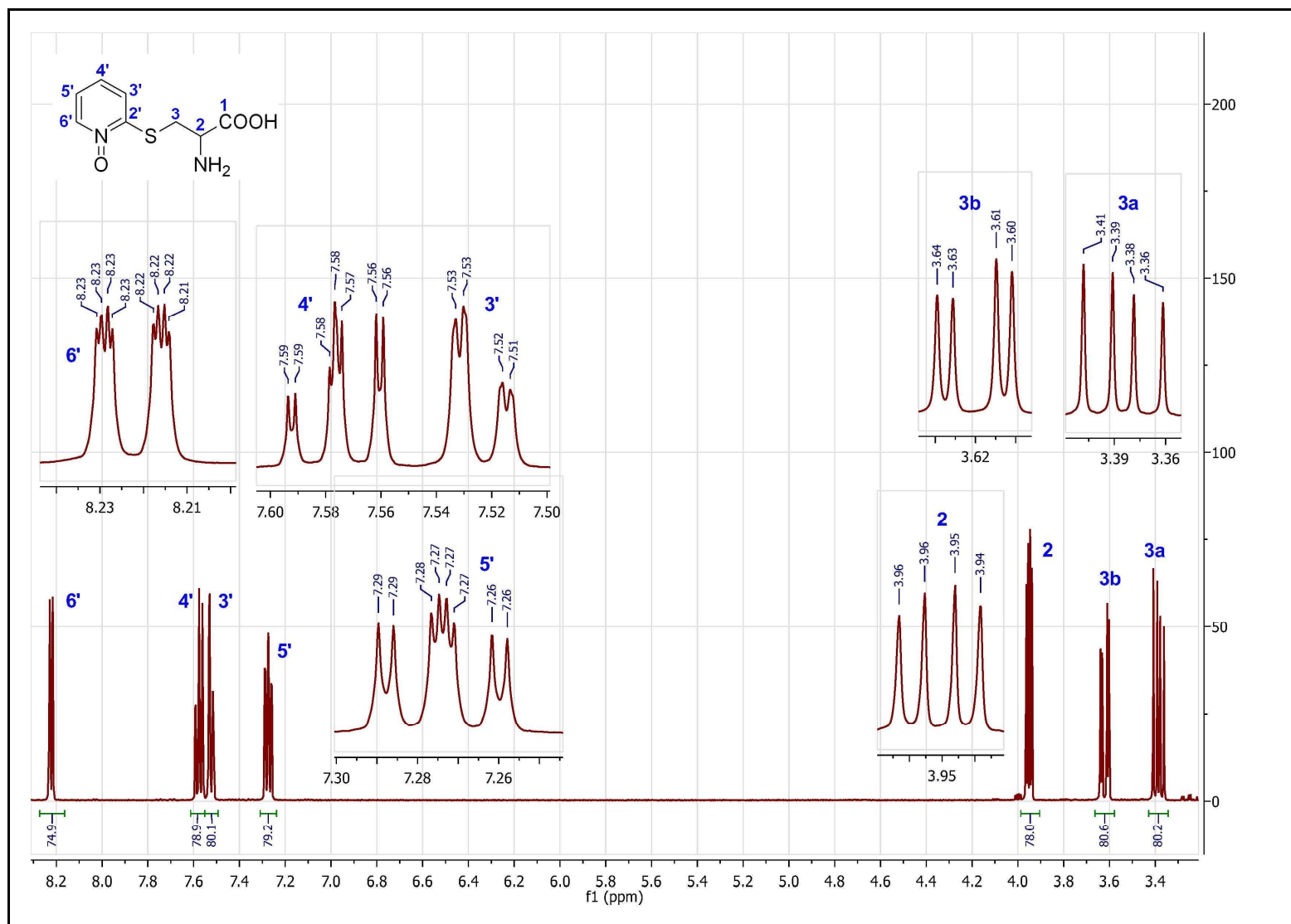


R-	C-2	C-3	lit.
CH_3-	54,1	35,4	[a]
CH_3CH_2-	54,6	32,6	[a]
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$	53,8	32,5	[a]
$(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$	54,9	31,6	[a]
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-$	57,0	34,2	[a]
(<i>Z</i>)- $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}-$	53,7	33,6	[a]
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$	53,5	32,3	[a]
CH_3SCH_2-	54,6	32,4	[a]
(<i>E</i>)- $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_2-$	54,6	31,7	[a]
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$	53,3	32,1	[a]
$\text{HO-CH}_2\text{CH}_2-$	53,9	32,3	[g]
aminokyselina (30)	53,3	31,8	tato studie

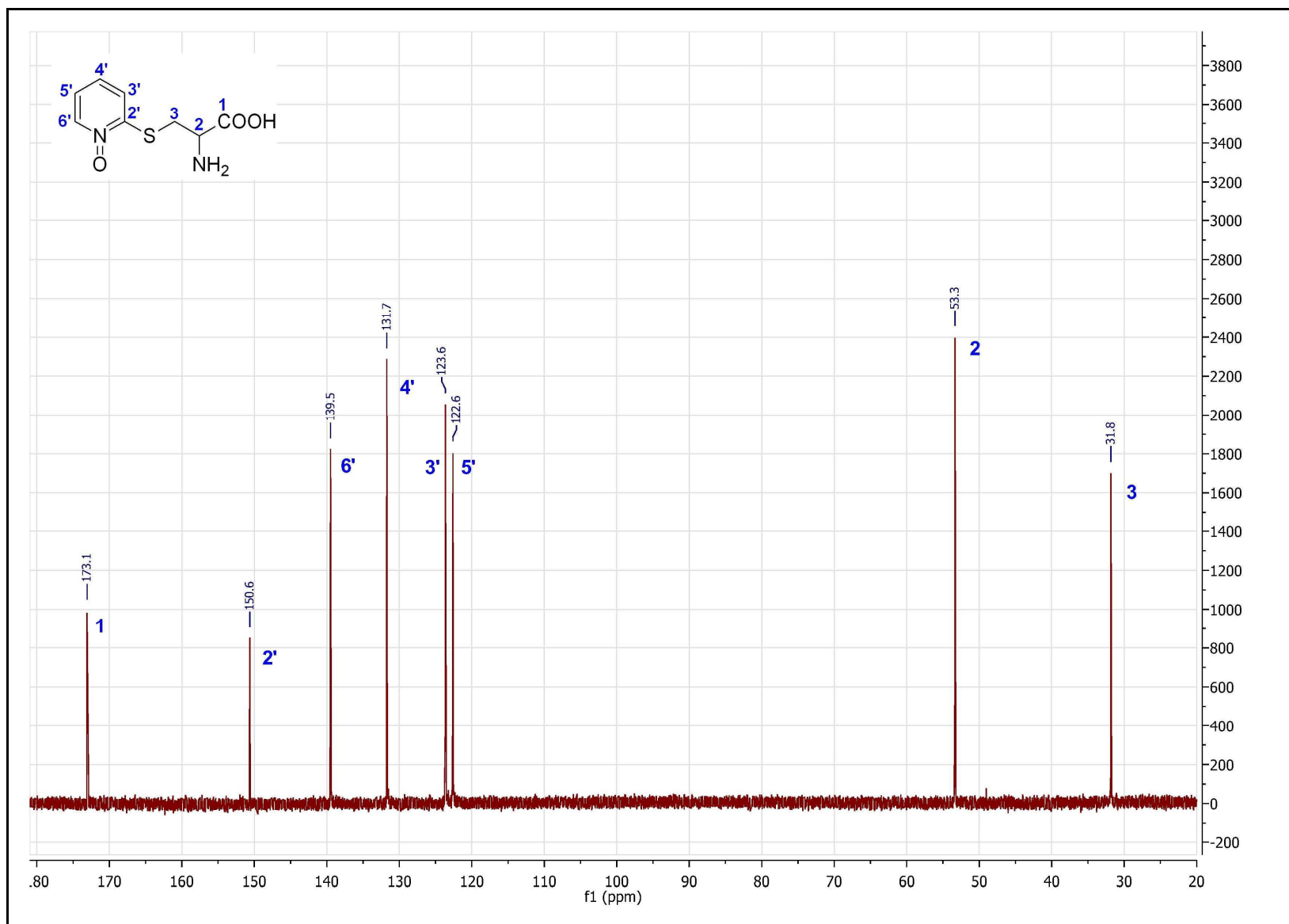
Literatura

- [a] Kubec, R. Occurrence and nonenzymatic degradation of *S*-alk(en)ylcysteine derivatives. *PhD. thesis*, ICT Prague, **1999**.
- [b] Kubec, R.; Kim, S.; McKeon, D. M.; Musah, R. A. Isolation of *S*-n-butylcysteine sulfoxide and six n-butylcontaining thiosulfinates from *Allium siculum*. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 960–964.
- [c] Kubec, R.; Velíšek, J.; Musah, R. A. The amino acid precursors and odor formation in society garlic (*Tulbaghia violacea* Harv.). *Phytochemistry* **2002**, 60, 21–25.

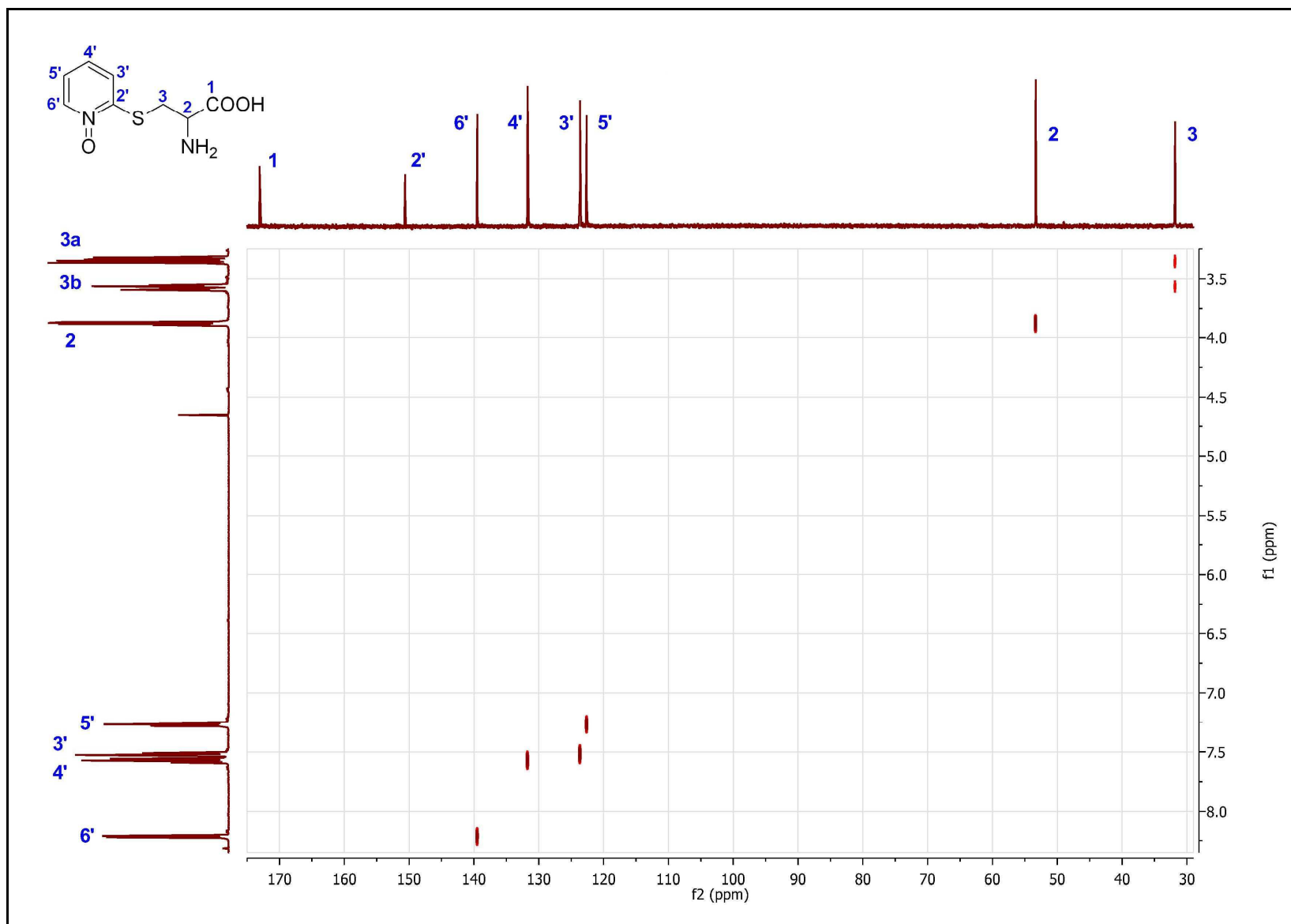
- [d] Kubec, R.; Cody, R. B.; Dane, A. J.; Musah, R. A.; Schraml, J.; Vattekkatte, A.; Block, E. Applications of direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. (*Z*)-Butanethial *S*-oxide and 1-butenyl thiosulfinates and their *S*-(*E*)-1-butenylcysteine *S*-oxide precursor from *Allium sicutum*. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1121–1128.
- [e] Kučerová, P.; Kubec, R.; Šimek, P.; Václavík, L.; Schraml, J. *Allium* discoloration: The precursor and formation of the red pigment in giant onion (*Allium giganteum* Regel) and some other subgenus *Melanocrommyum* species. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1821–1828.
- [f] Kubec, R.; Musah, R. A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 981–985.
- [g] Kubec, R.; Kim, S.; Musah, R. A. *S*-Substituted cysteine derivatives and thiosulfinate formation in *Petiveria alliacea* - part II. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 675–680.



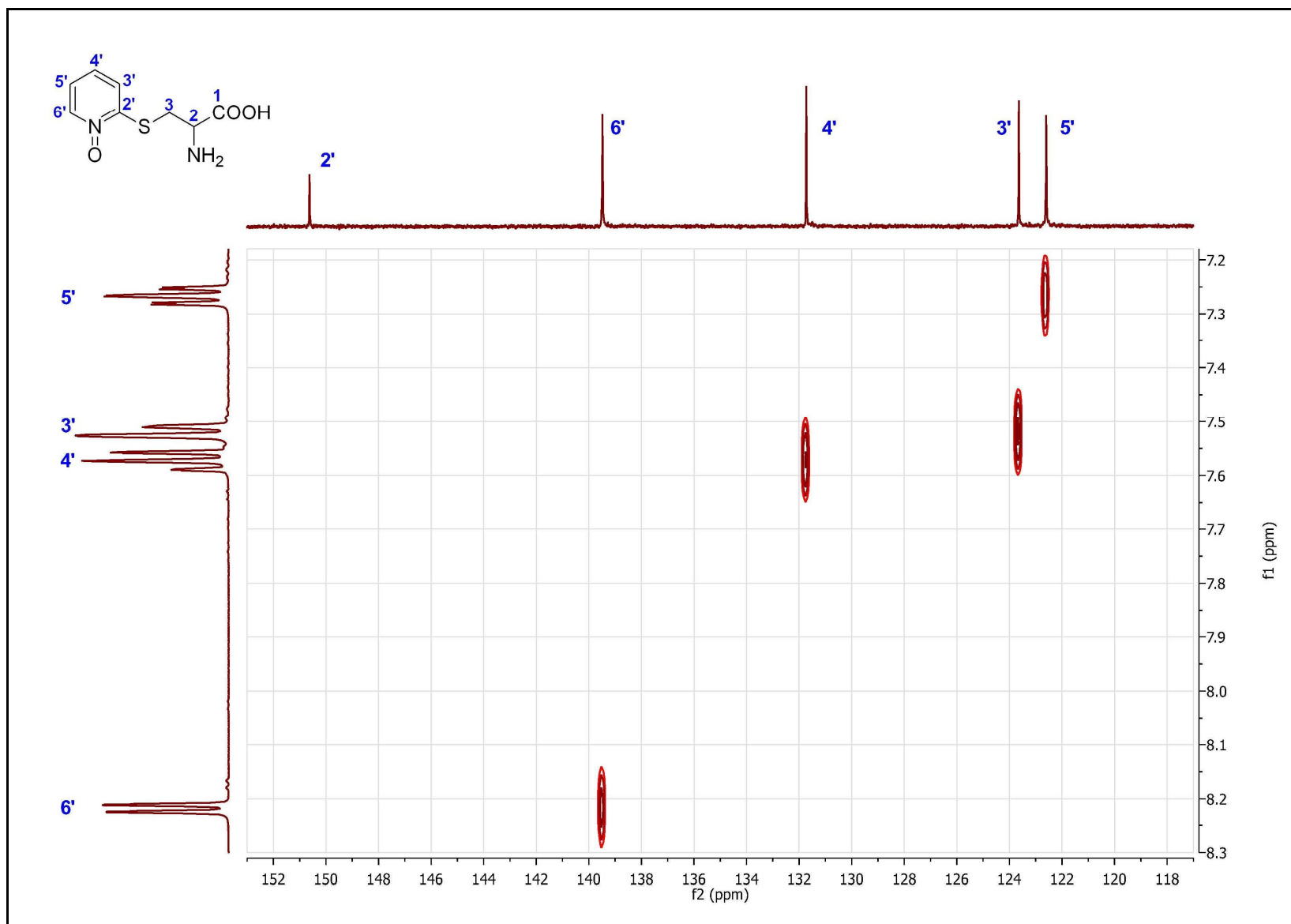
Obrázek A.1 ¹H NMR spektrum *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (30)



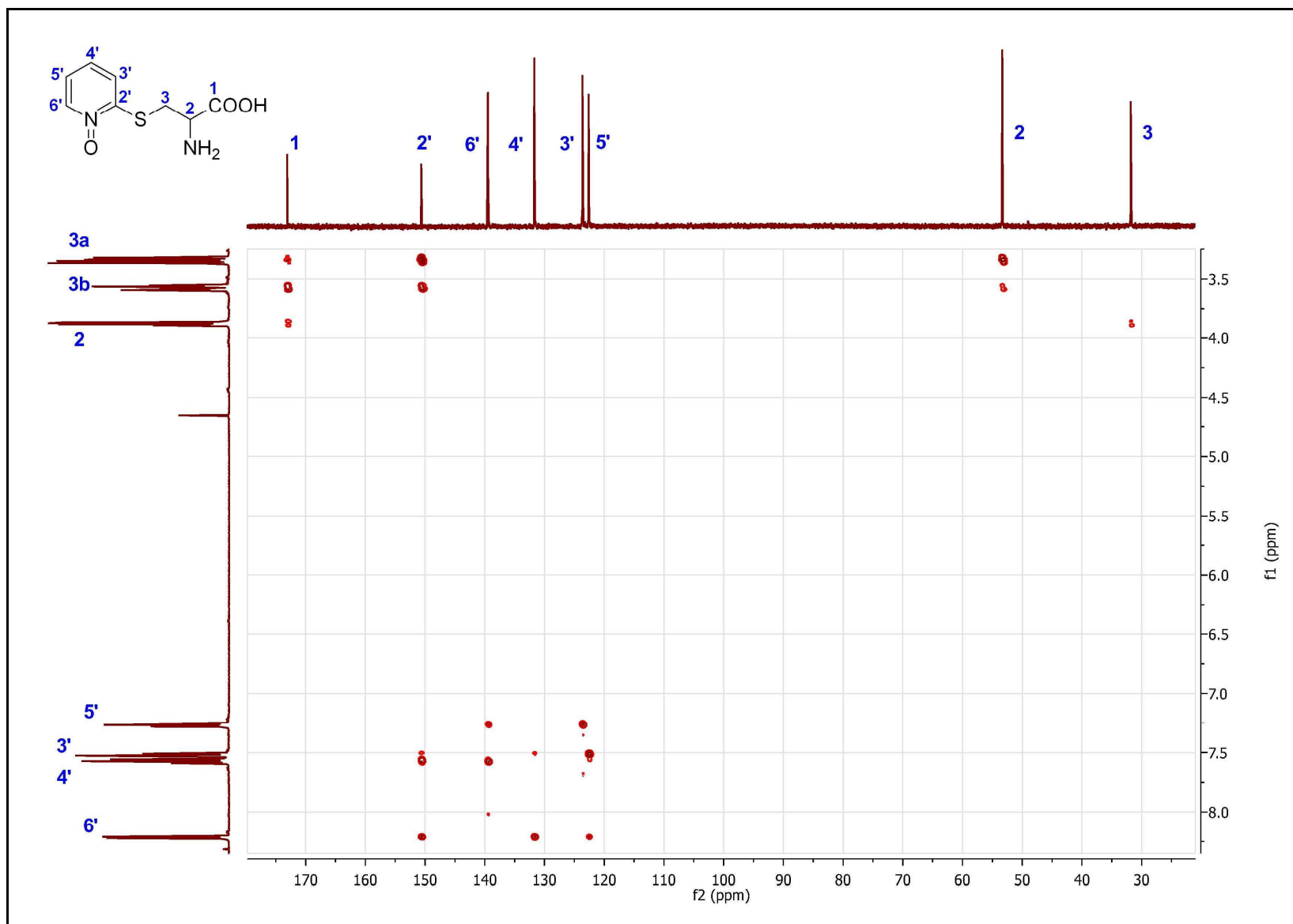
Obrázek A.2 ^{13}C NMR spektrum *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (30)



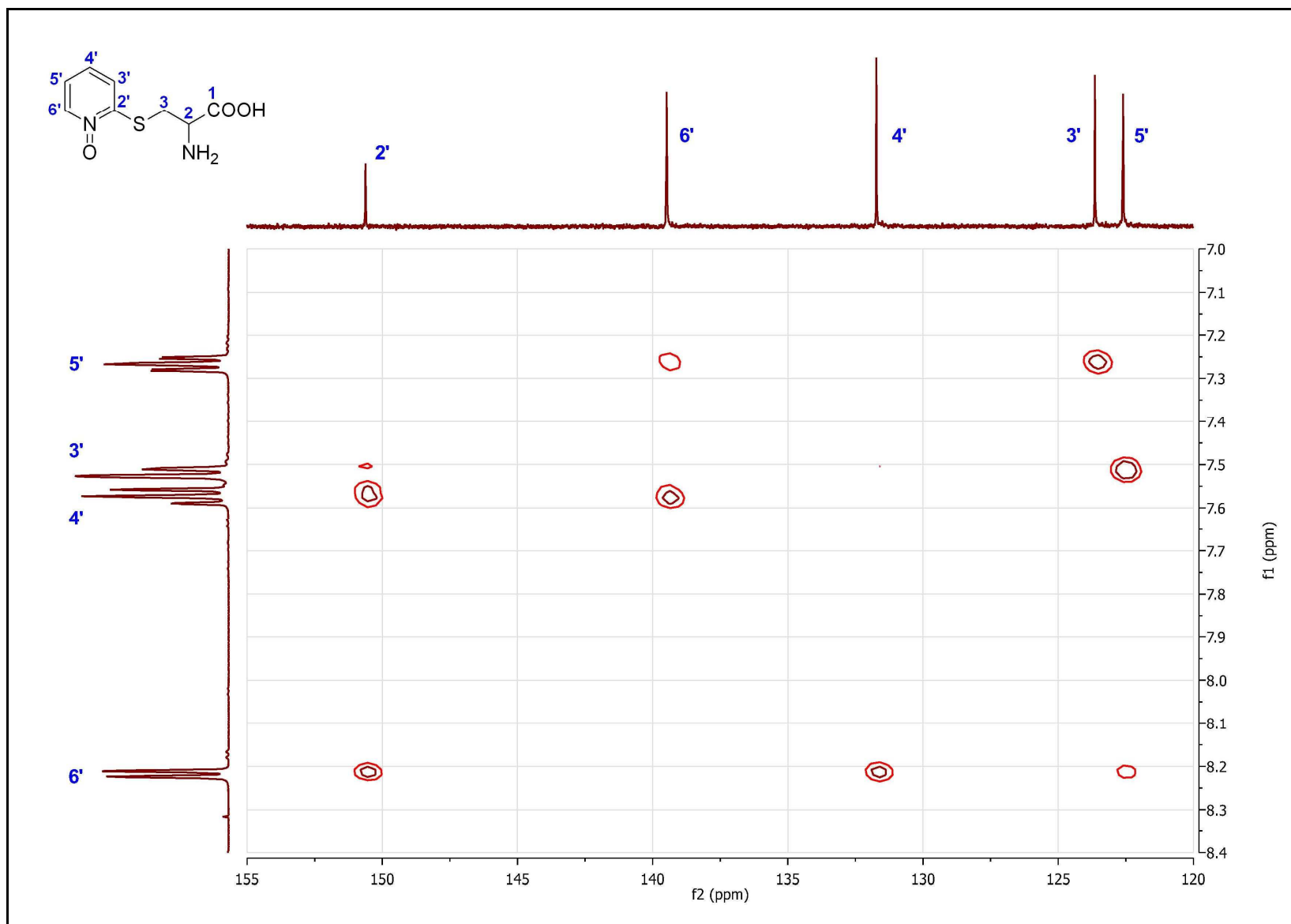
Obrázek A.3 HETCOR spektrum *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (30)



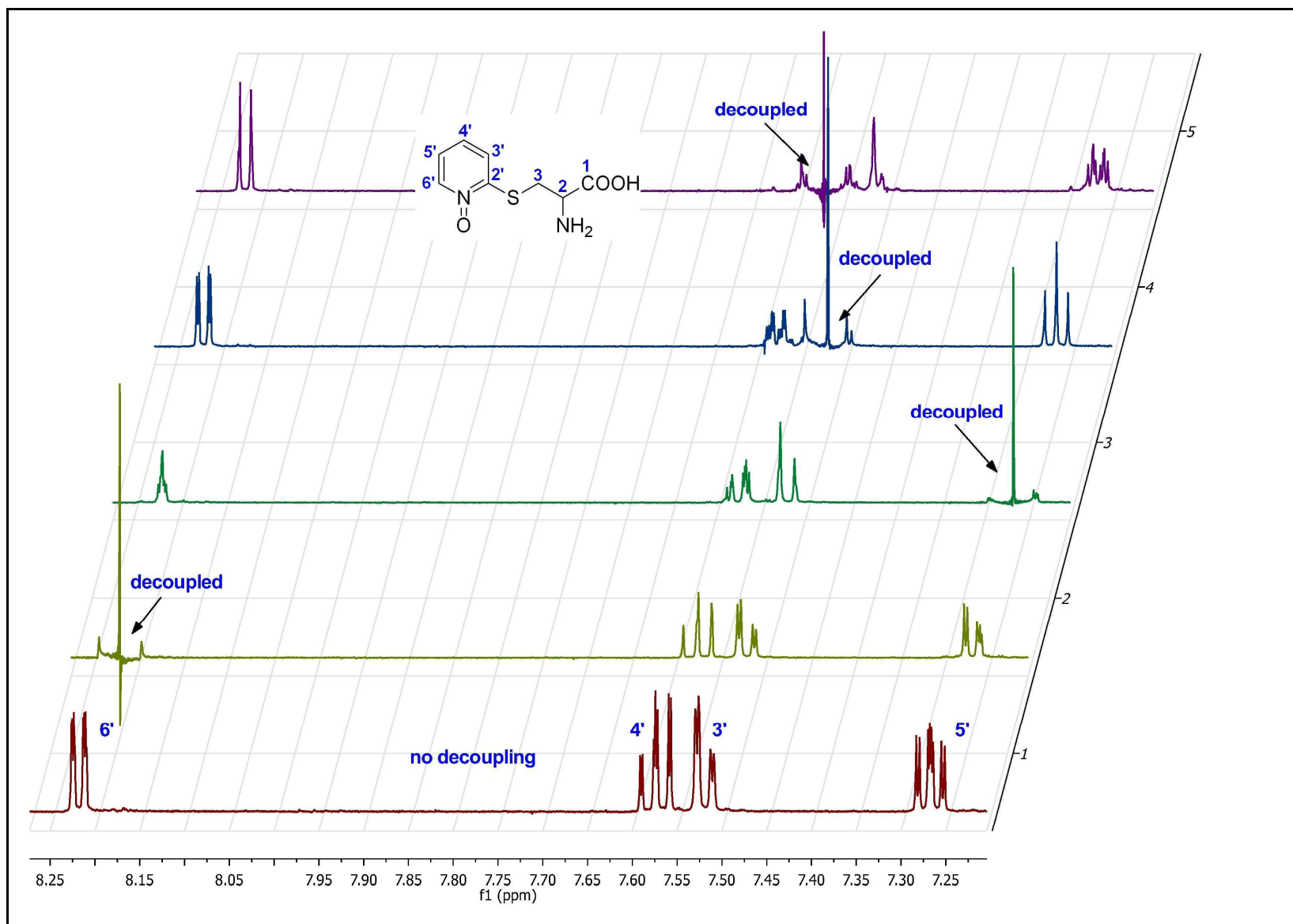
Obrázek A.4 HETCOR spektrum aromatické části *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (30)



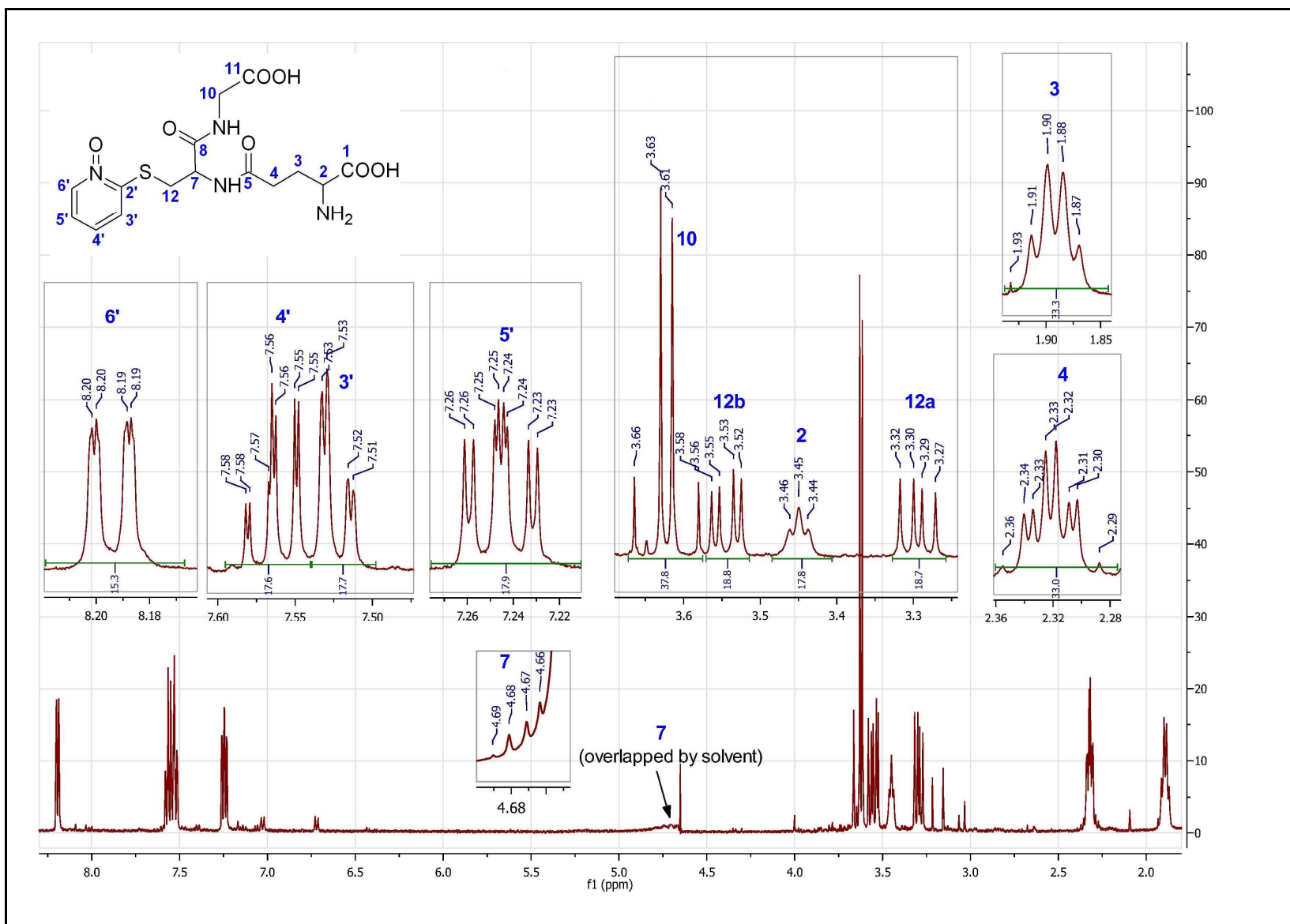
Obrázek A.5 gHMBC spektrum *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (30)



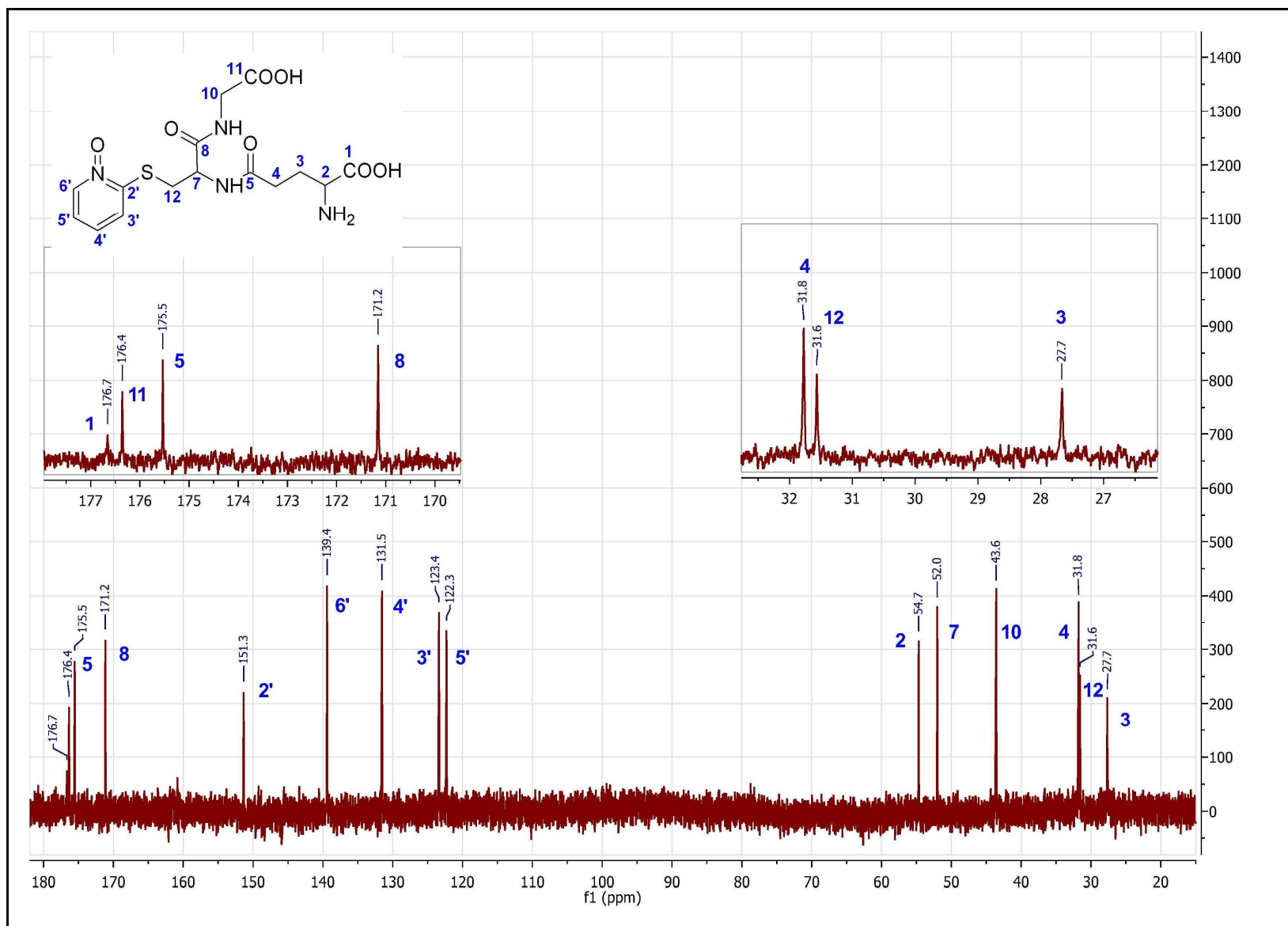
Obrázek A.6 gHMBC spektrum aromatické části *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**)



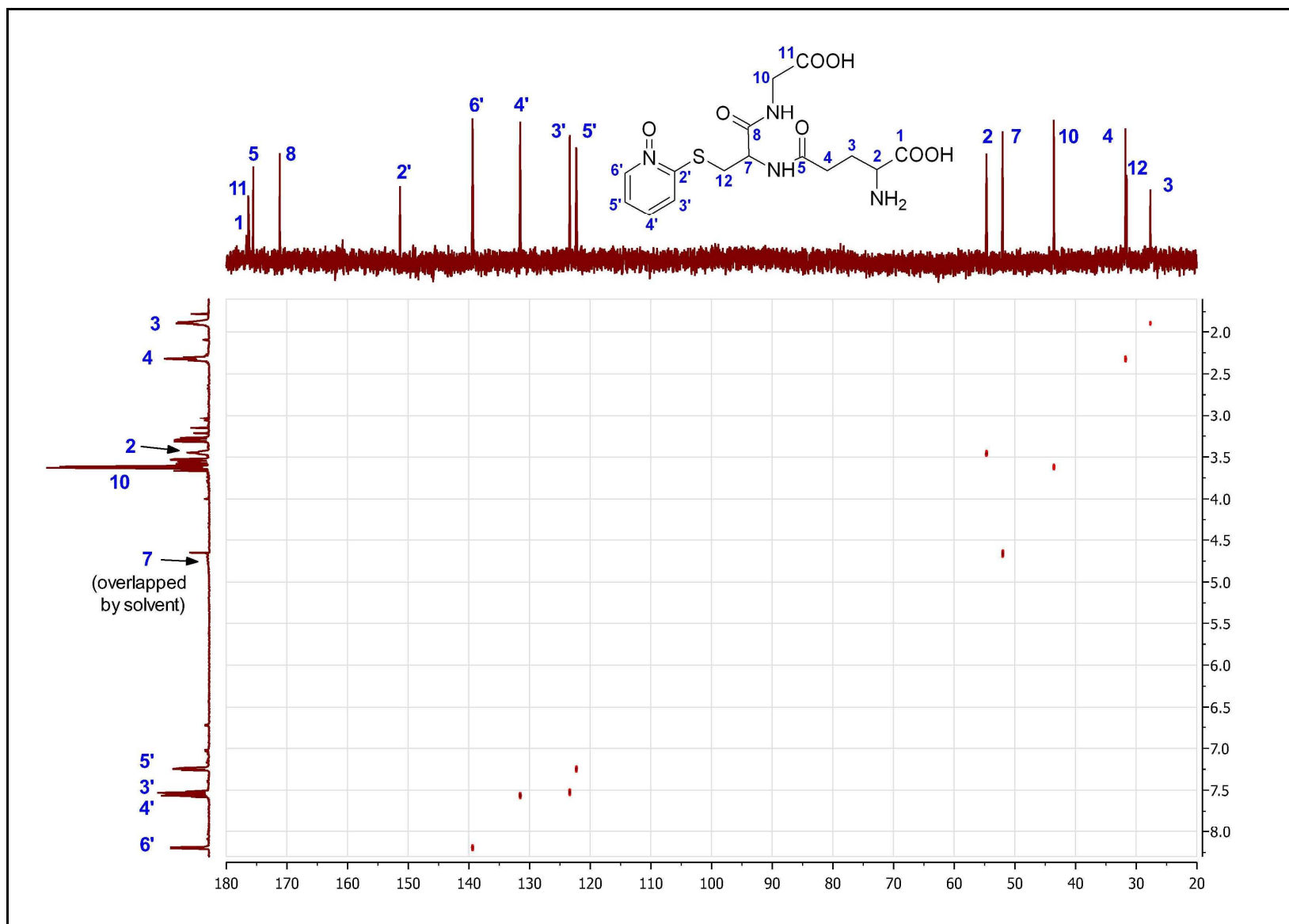
Obrázek A.7 Selektivně dekaplovaná ^1H NMR spektra *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (30)



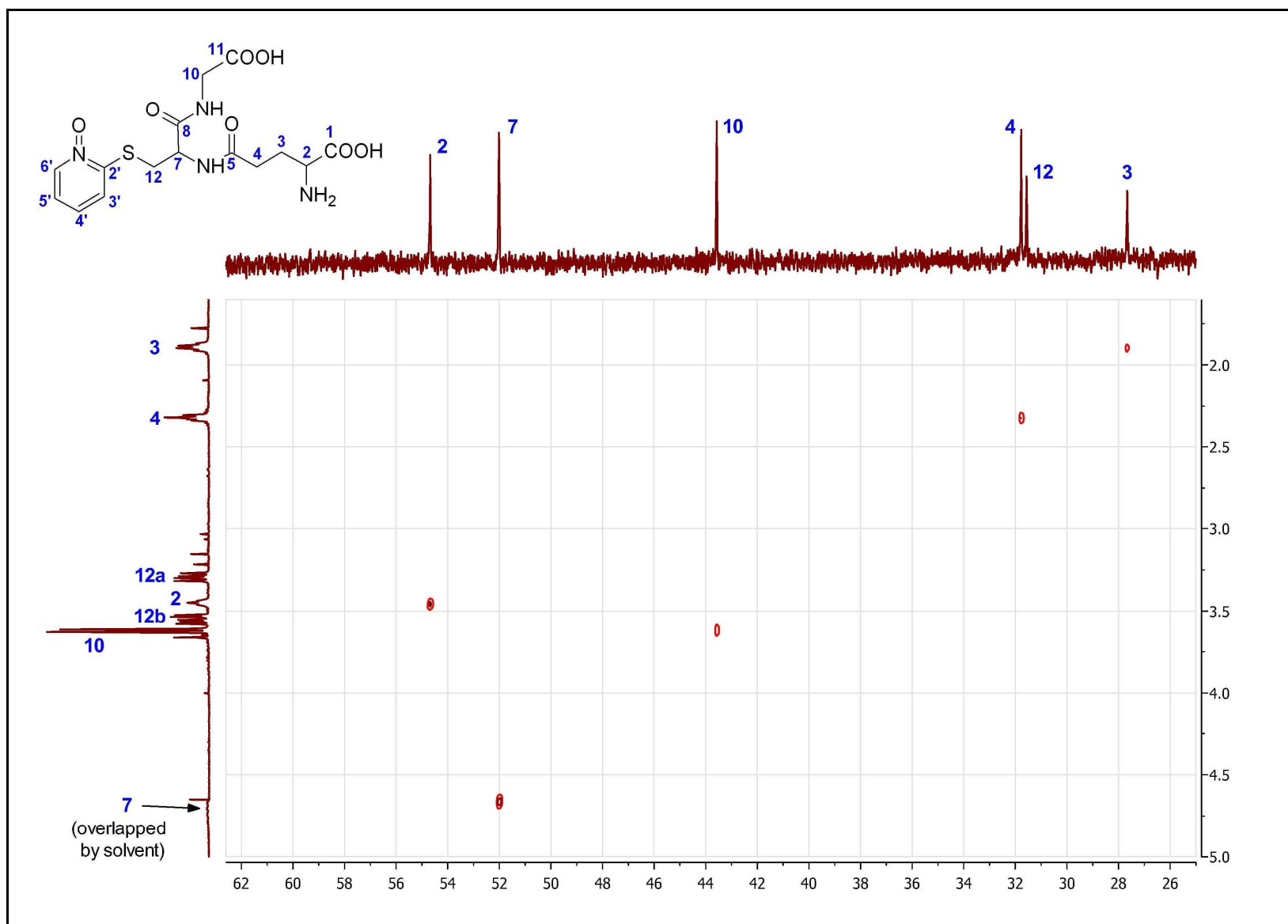
Obrázek A.8 ¹H NMR spektrum S-(N-oxy-2-pyridyl)glutathionu (31)



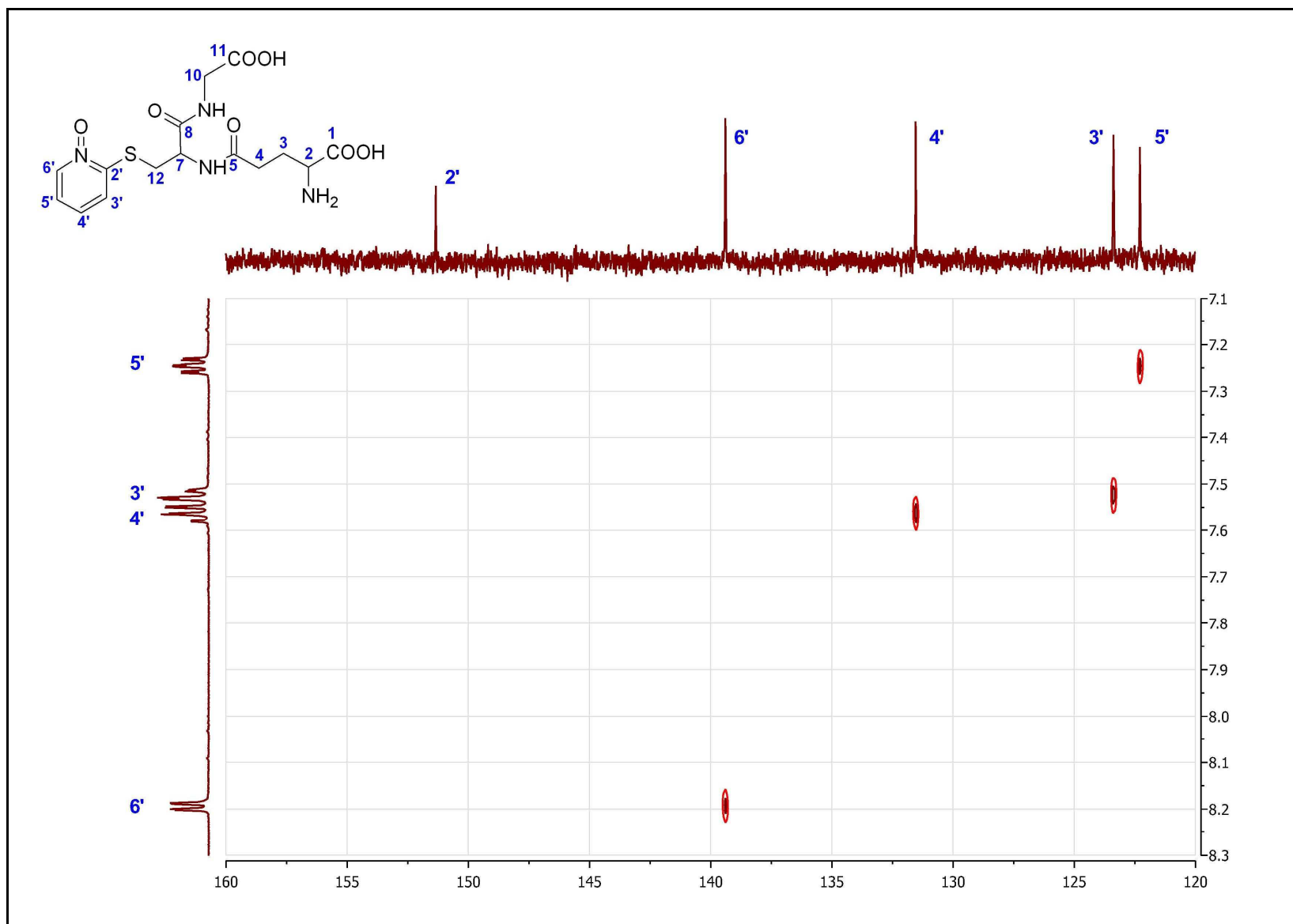
Obrázek A.9 ¹³C NMR spektrum *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (31)



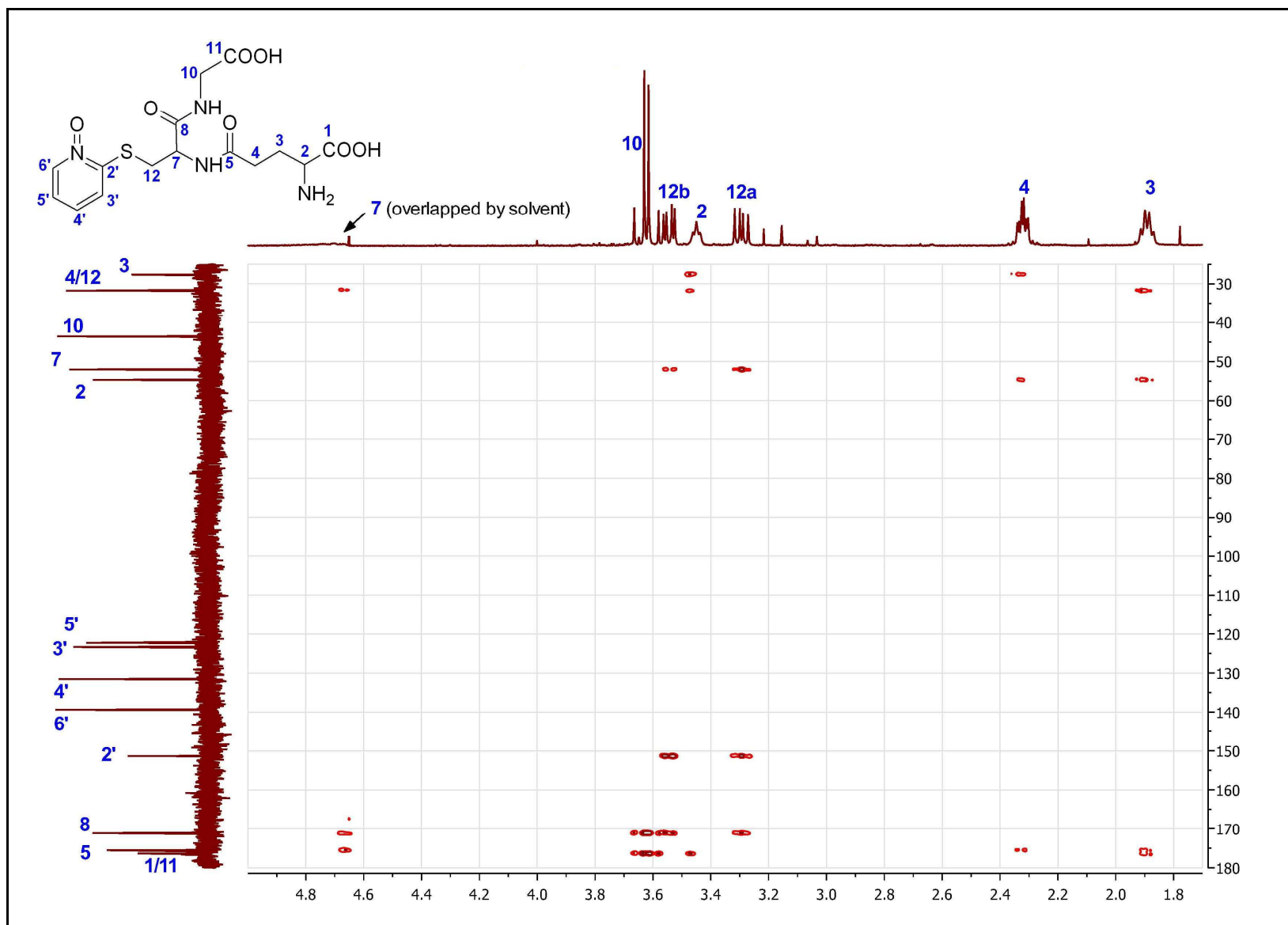
Obrázek A.10 HETCOR spektrum *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (31)



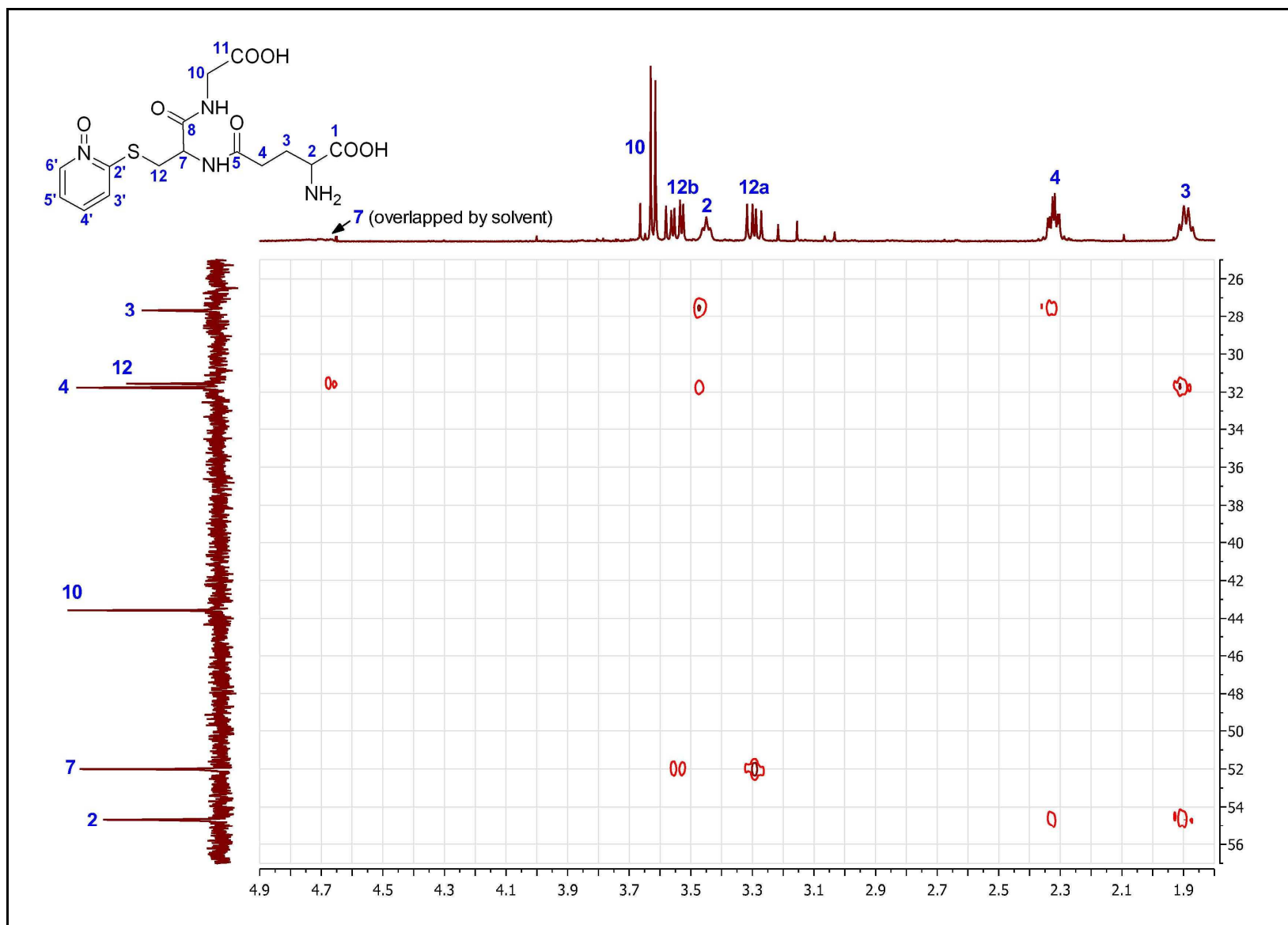
Obrázek A.11 HETCOR spektrum alifatické části *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (31)



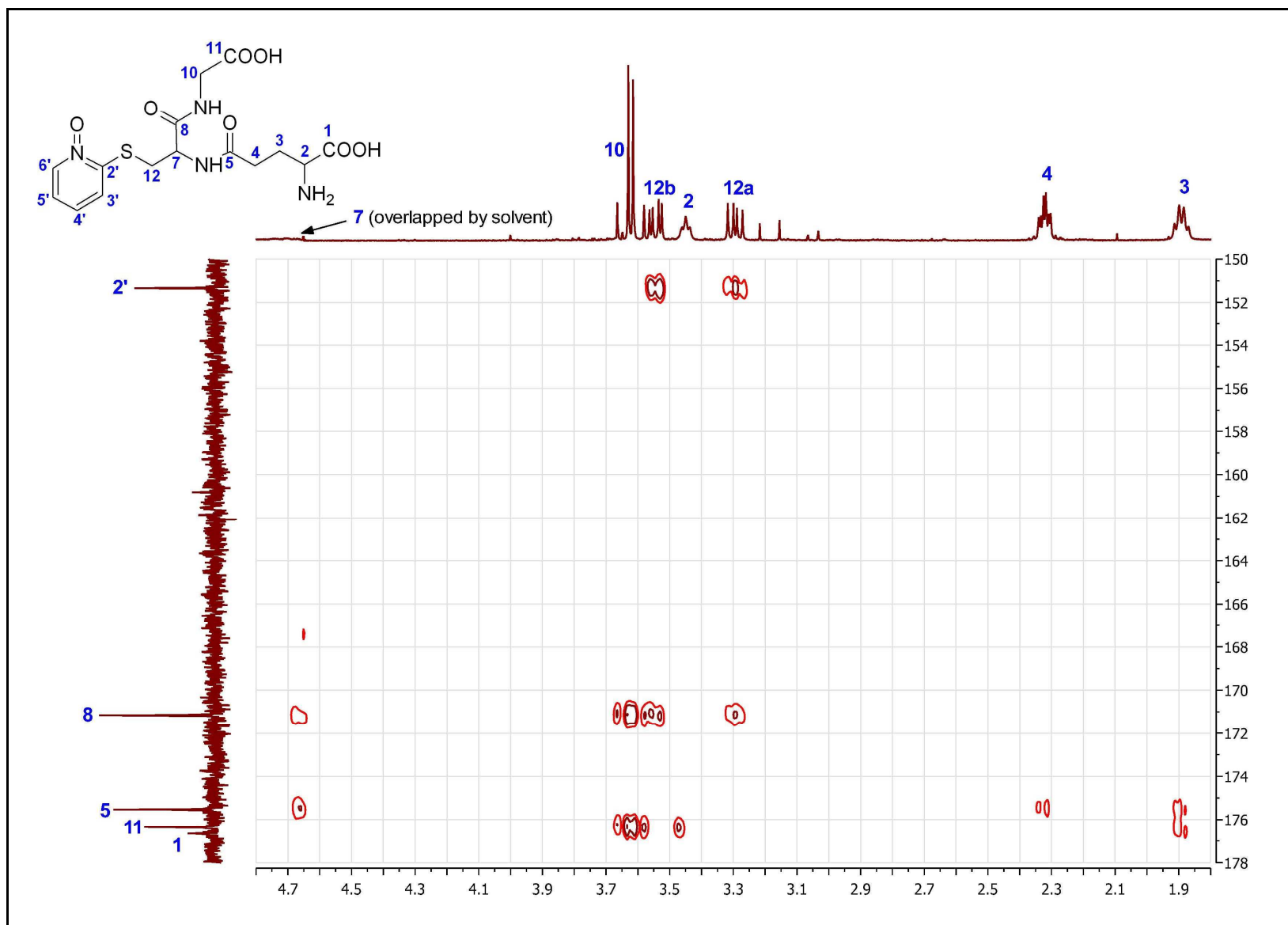
Obrázek A.12 HETCOR spektrum aromatické části *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (31)



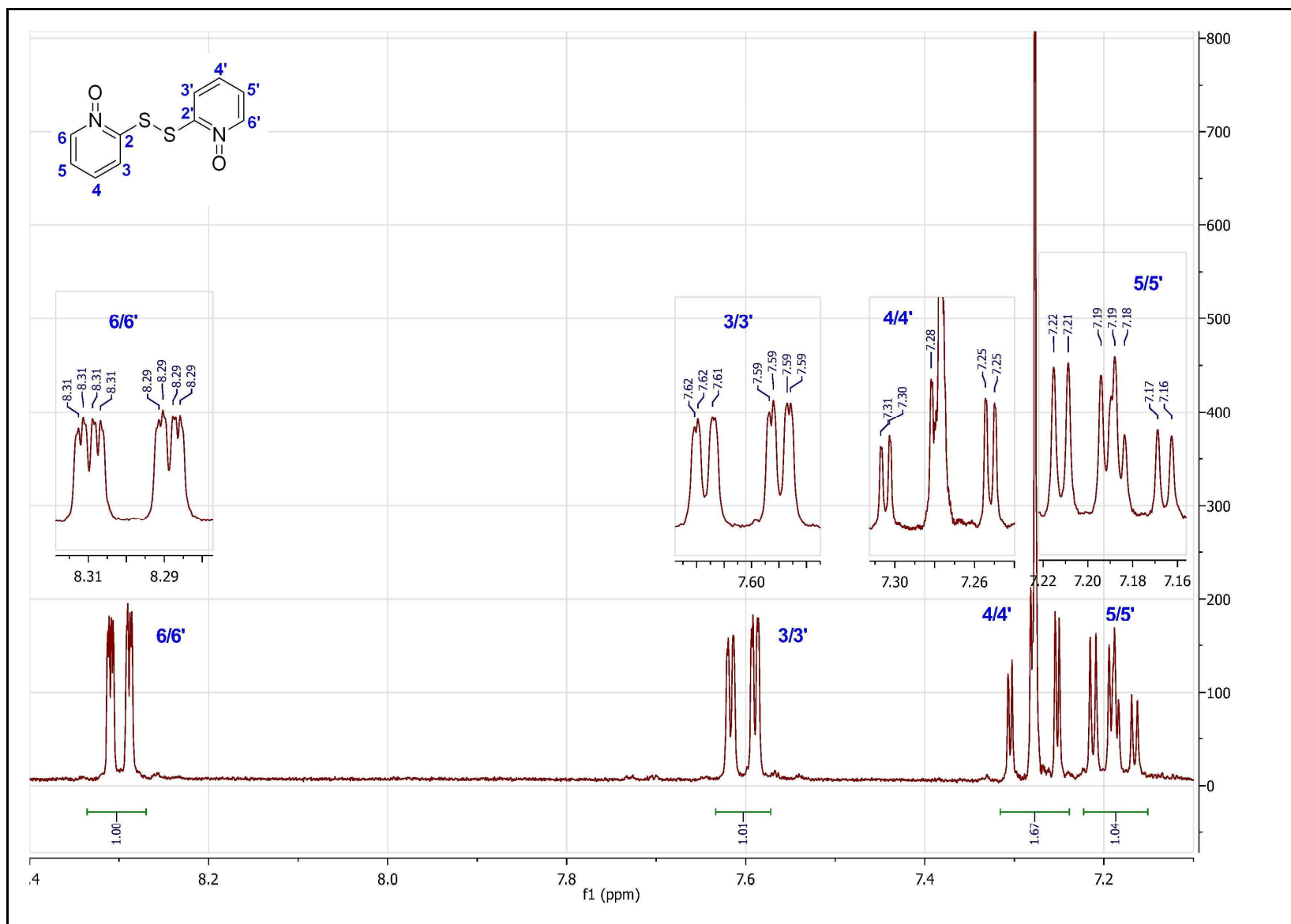
Obrázek A.13 gHMBC spektrum *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (31)



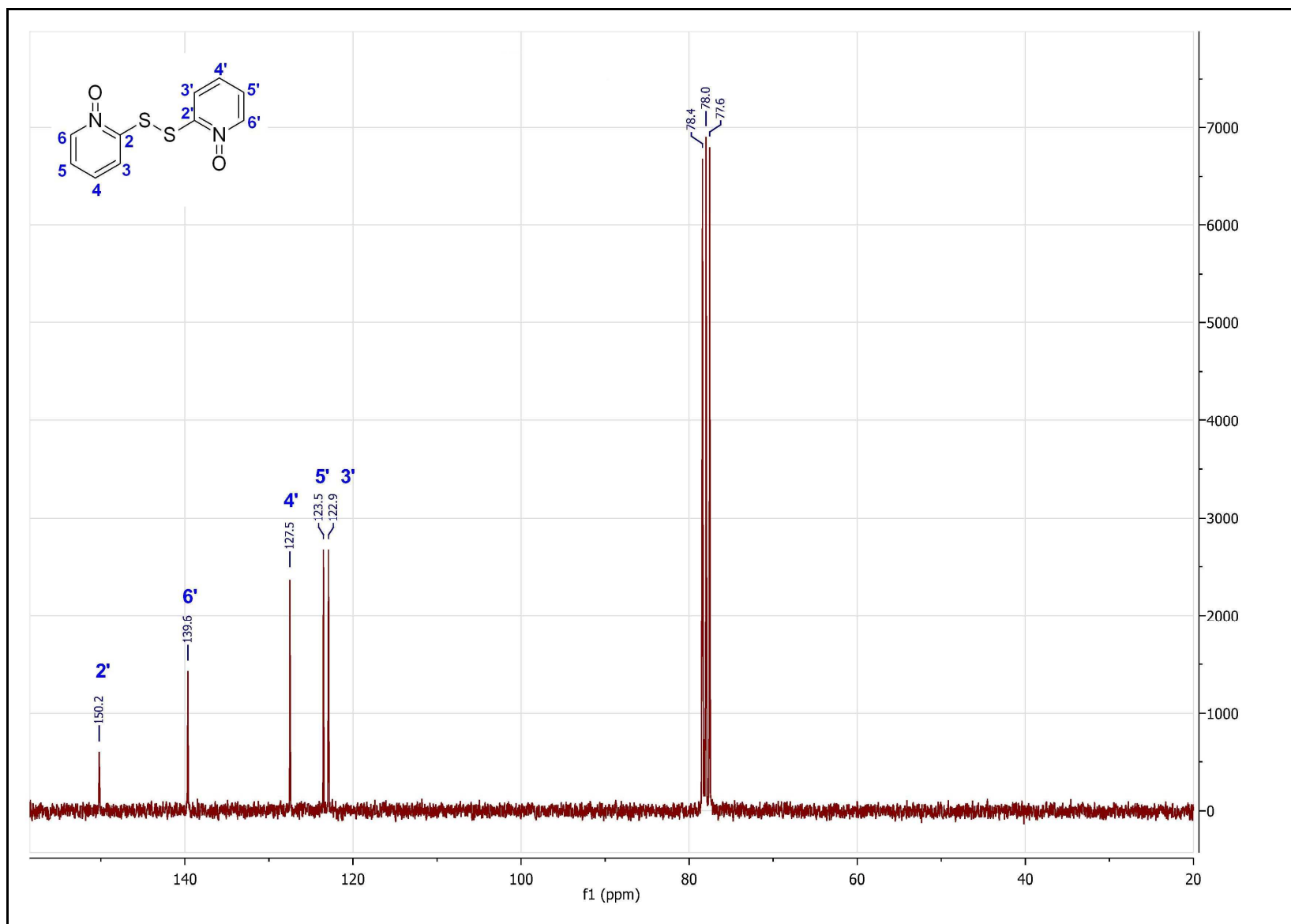
Obrázek A.14 gHMBC spektrum *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (**31**) (25–60 ppm)



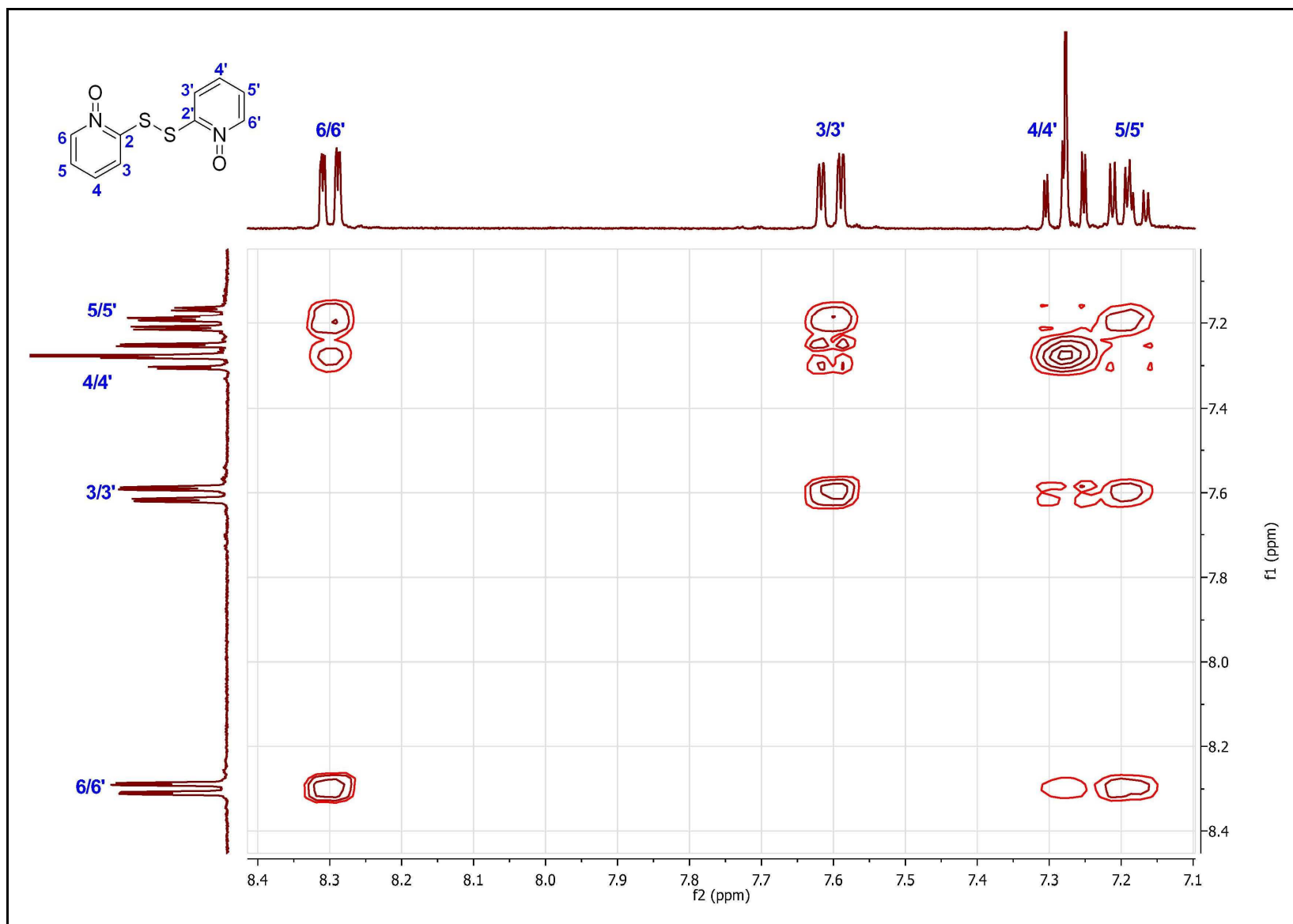
Obrázek A.15 gHMBC spektrum *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (31) (150–180 ppm)



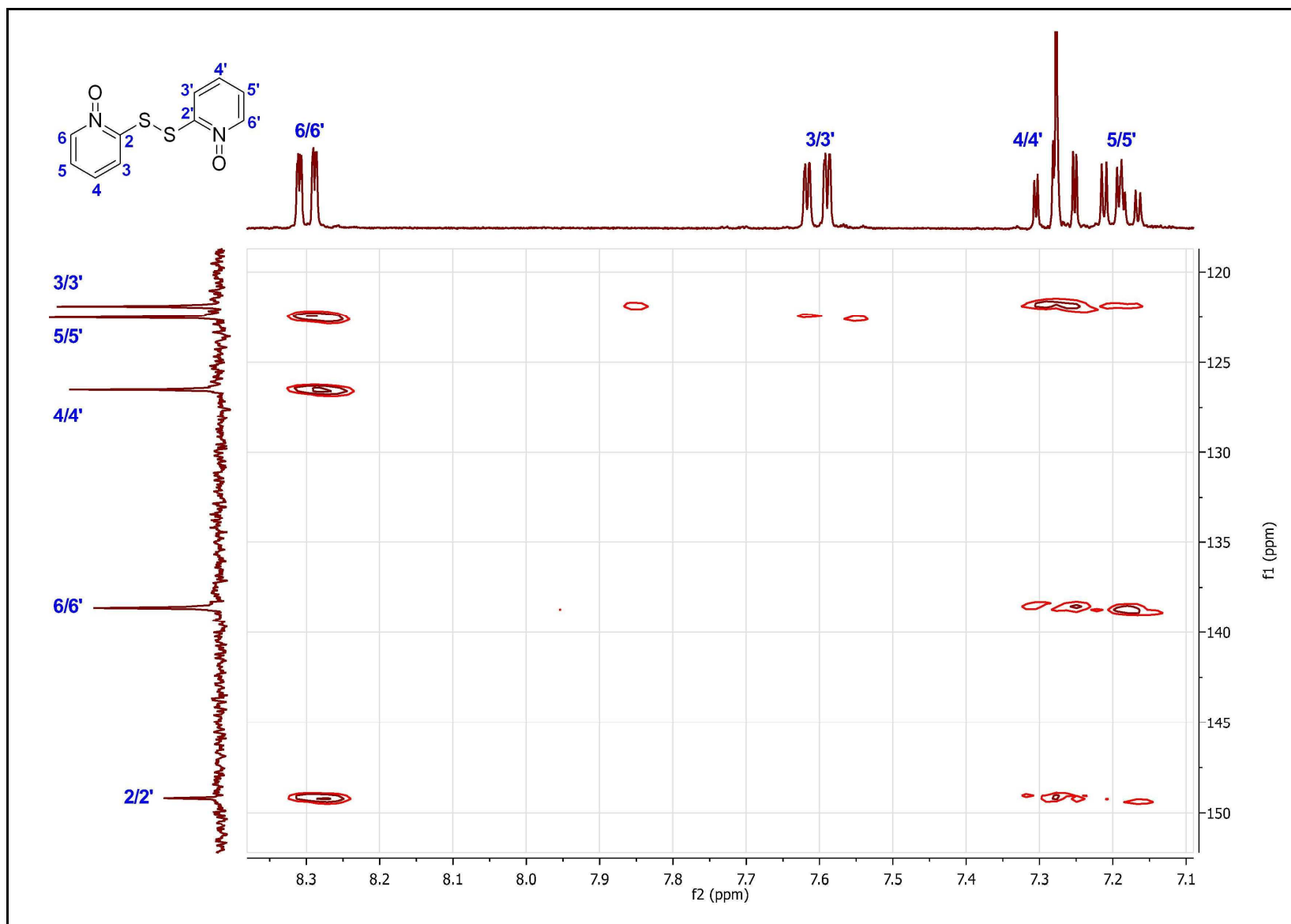
Obrázek A.16 ^1H NMR spektrum di(2-pyridyl)disulfid- N,N' -dioxidu (**15**)



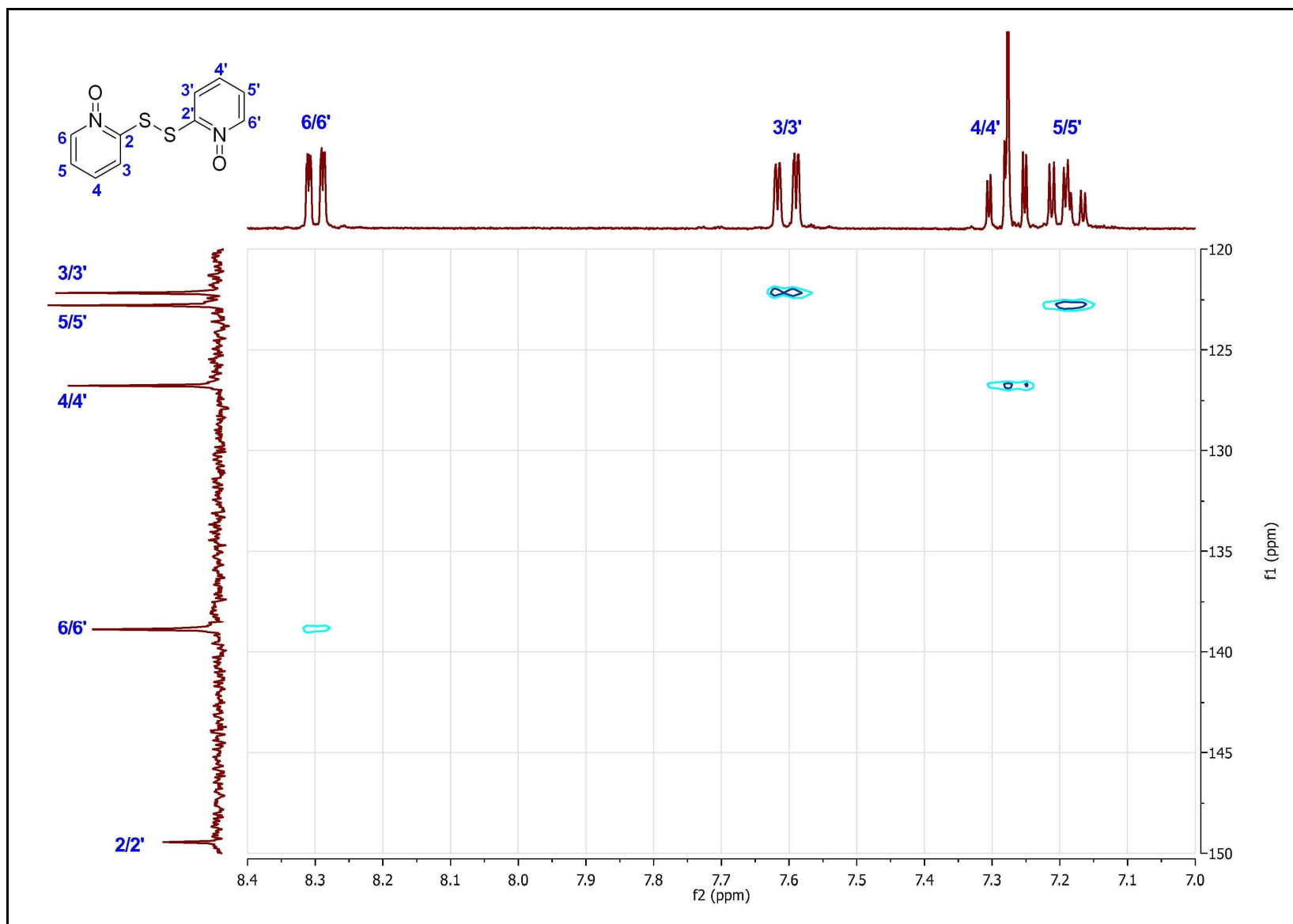
Obrázek A.17 ^{13}C NMR spektrum di(2-pyridyl)disulfid- N,N' -dioxidu (15)



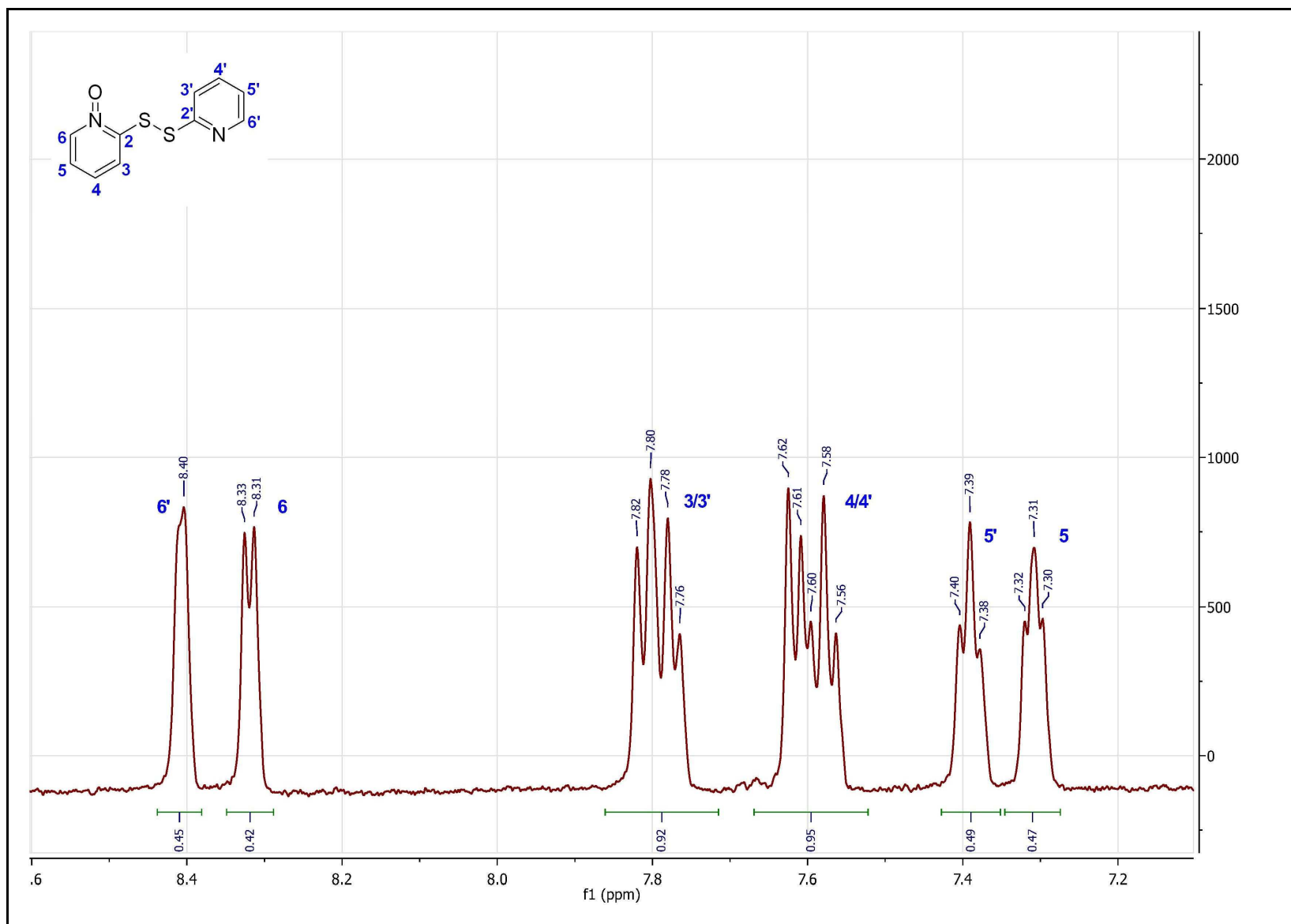
Obrázek A.18 gCOSY spektrum di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (15)



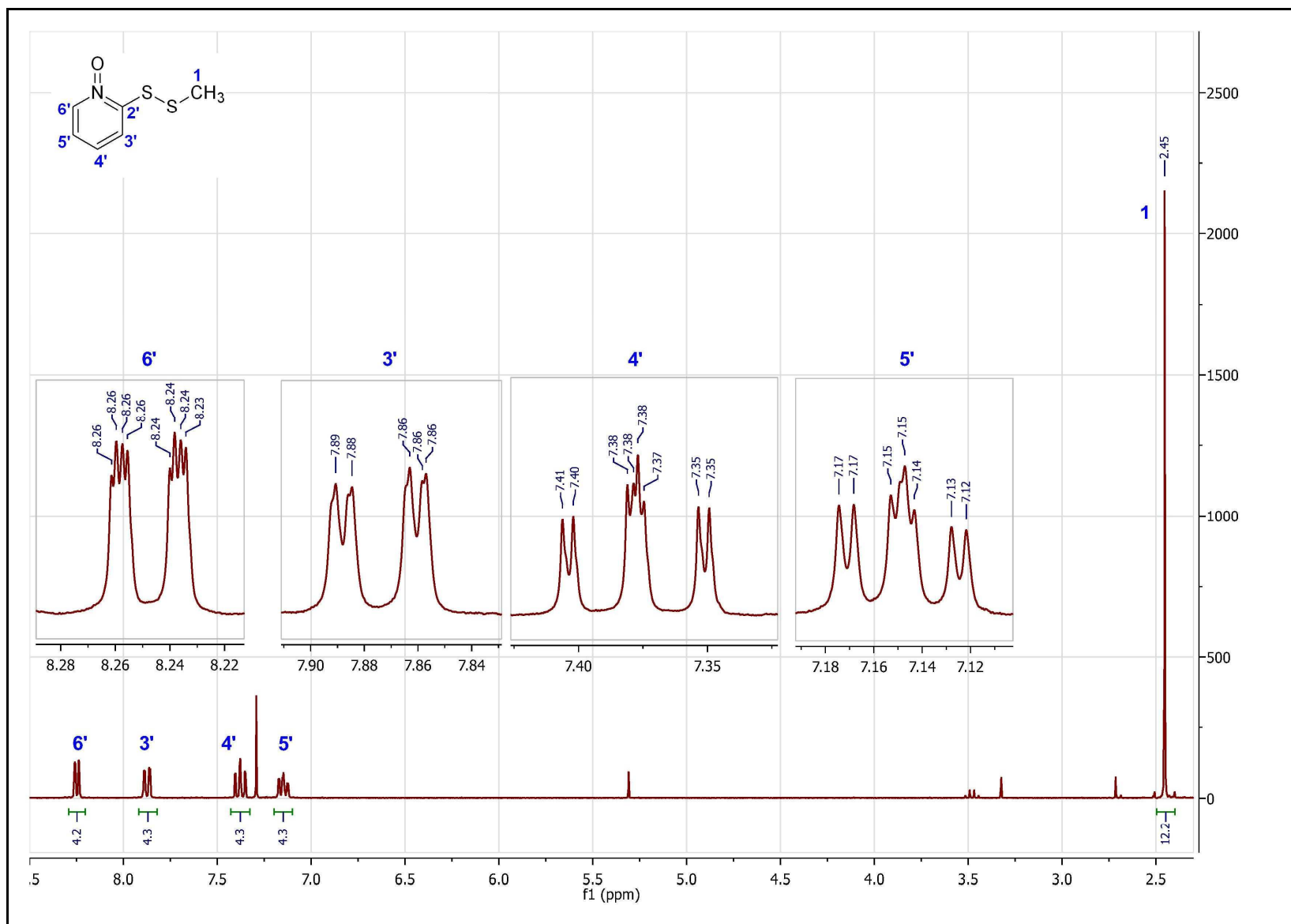
Obrázek A.19 gHMBC spektrum di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (15)



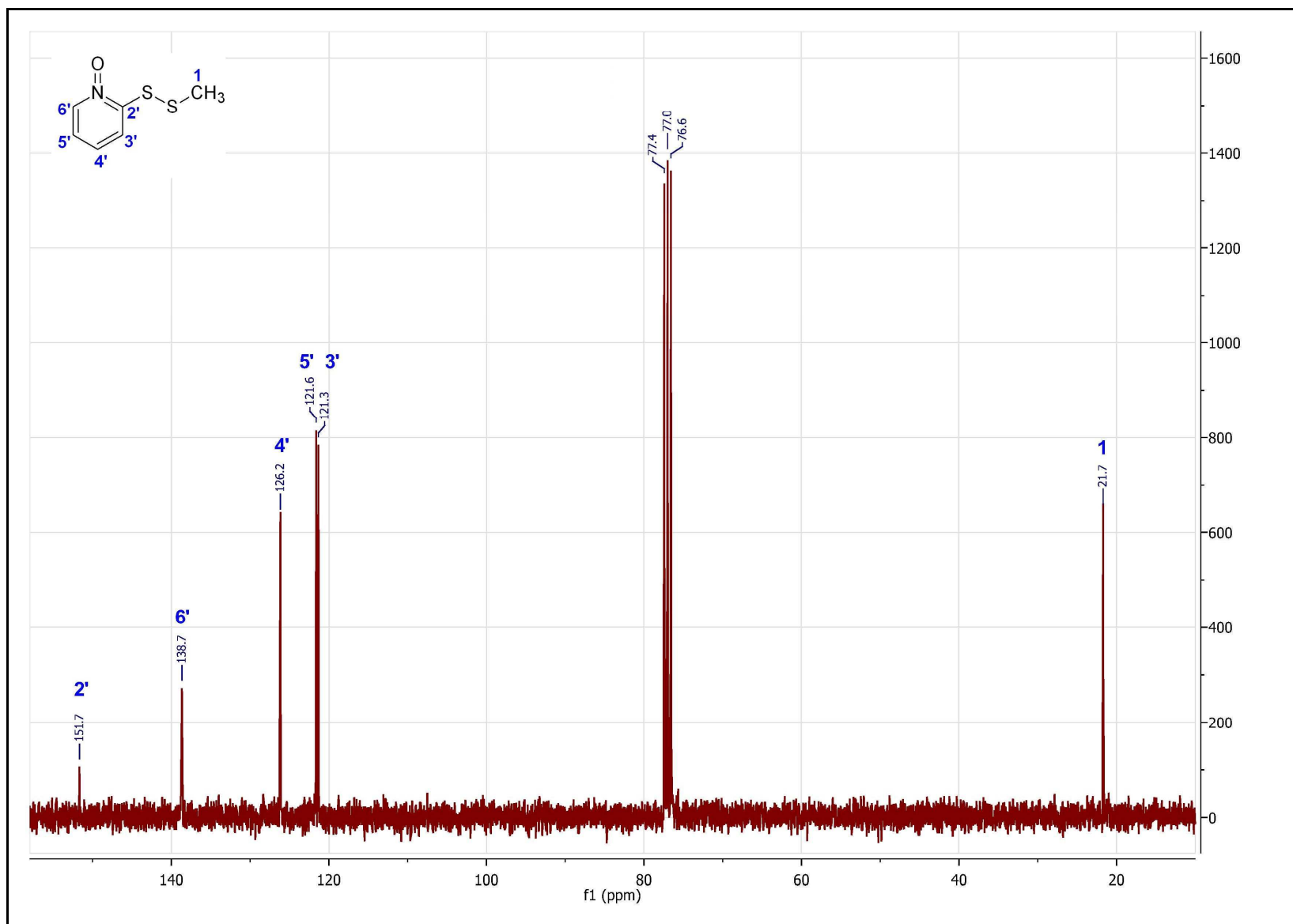
Obrázek A.20 gHSQC spektrum di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (15)



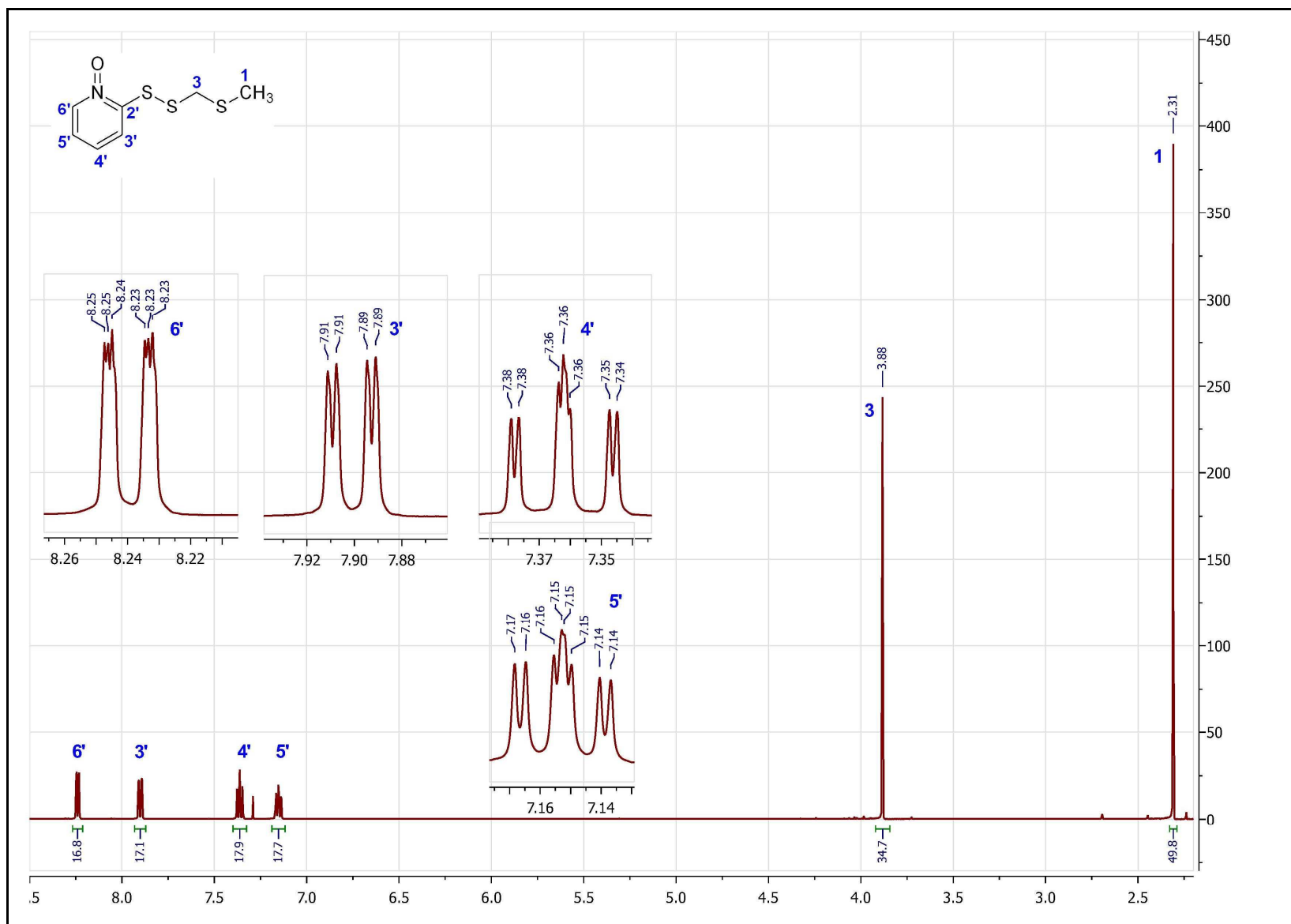
Obrázek A.21 LC- ^1H NMR spektrum di(2-pyridyl)disulfid-N-oxidu (38)



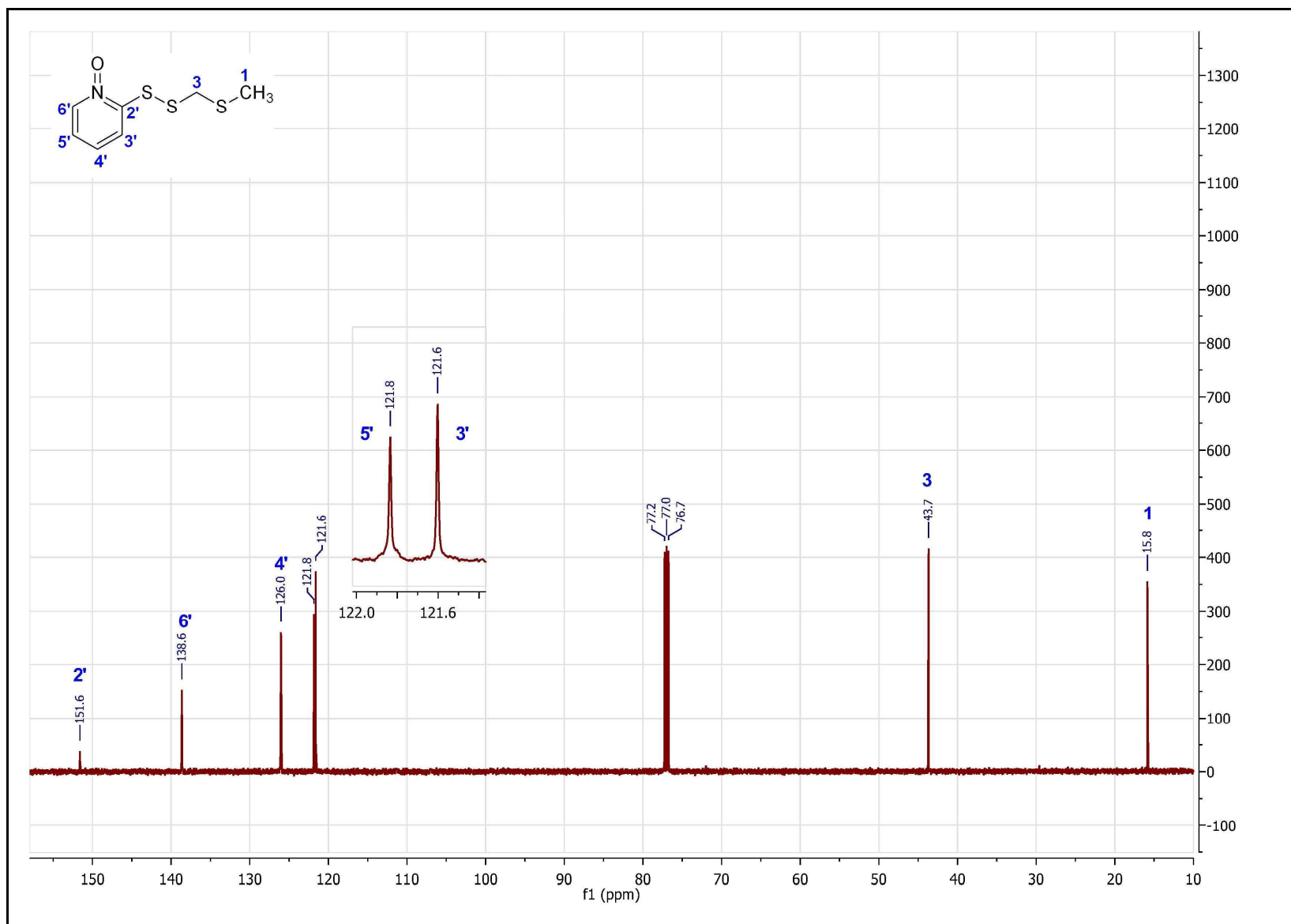
Obrázek A.22 ¹H NMR spektrum 2-(methylthio)pyridin-N-oxidu (13)



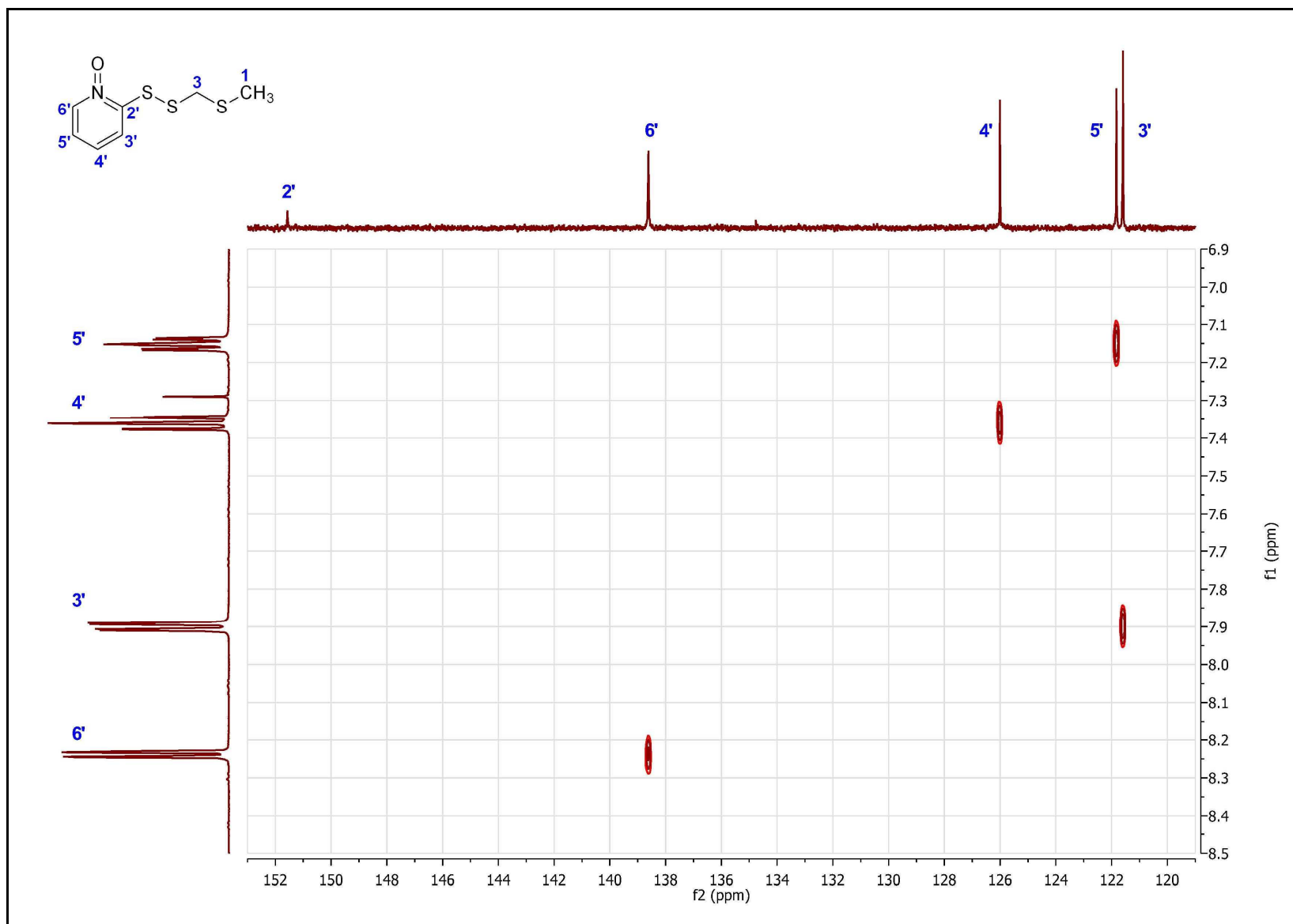
Obrázek A.23 ^{13}C NMR spektrum 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxidu (13)



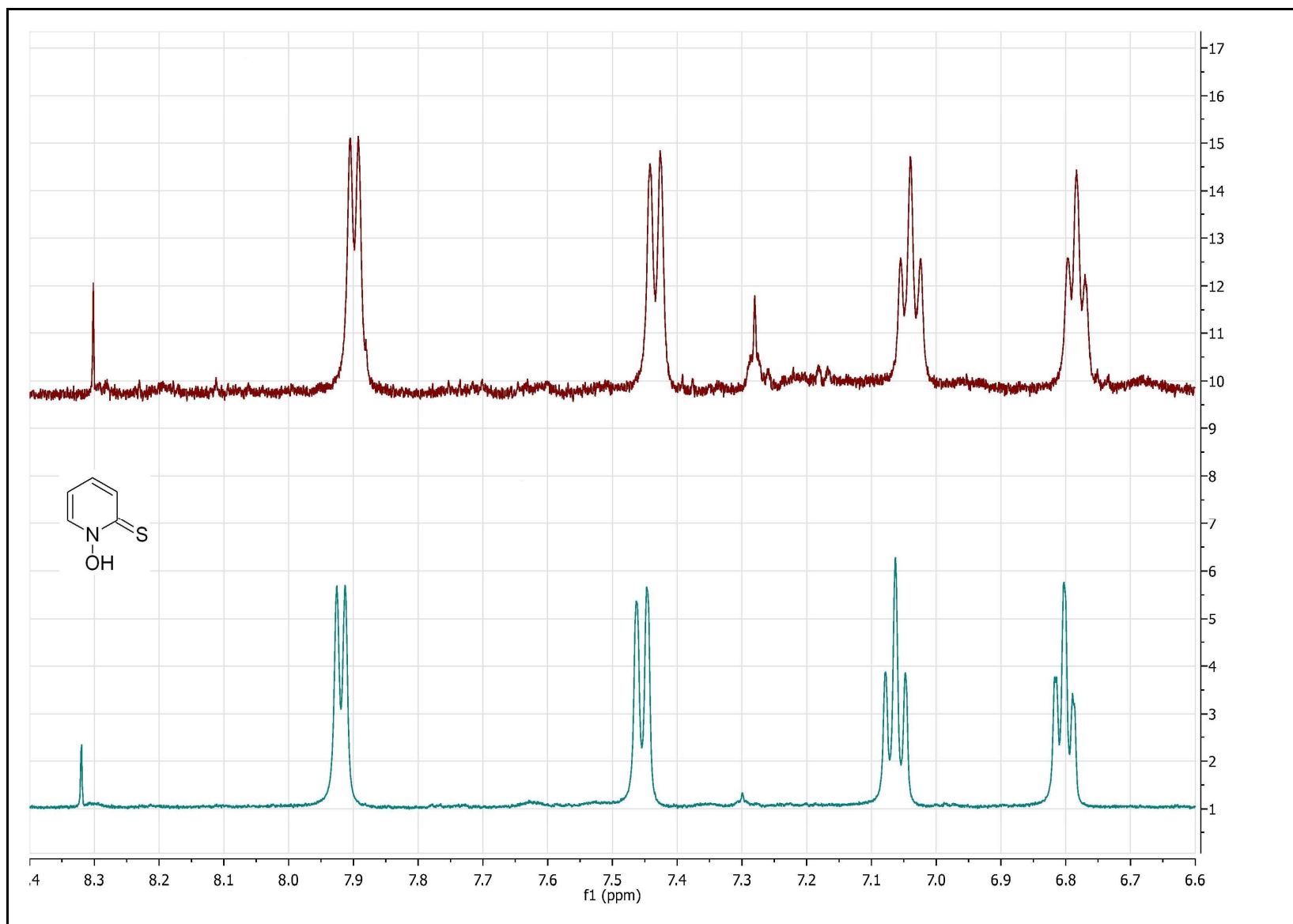
Obrázek A.24 ^1H NMR spektrum 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxidu (14)



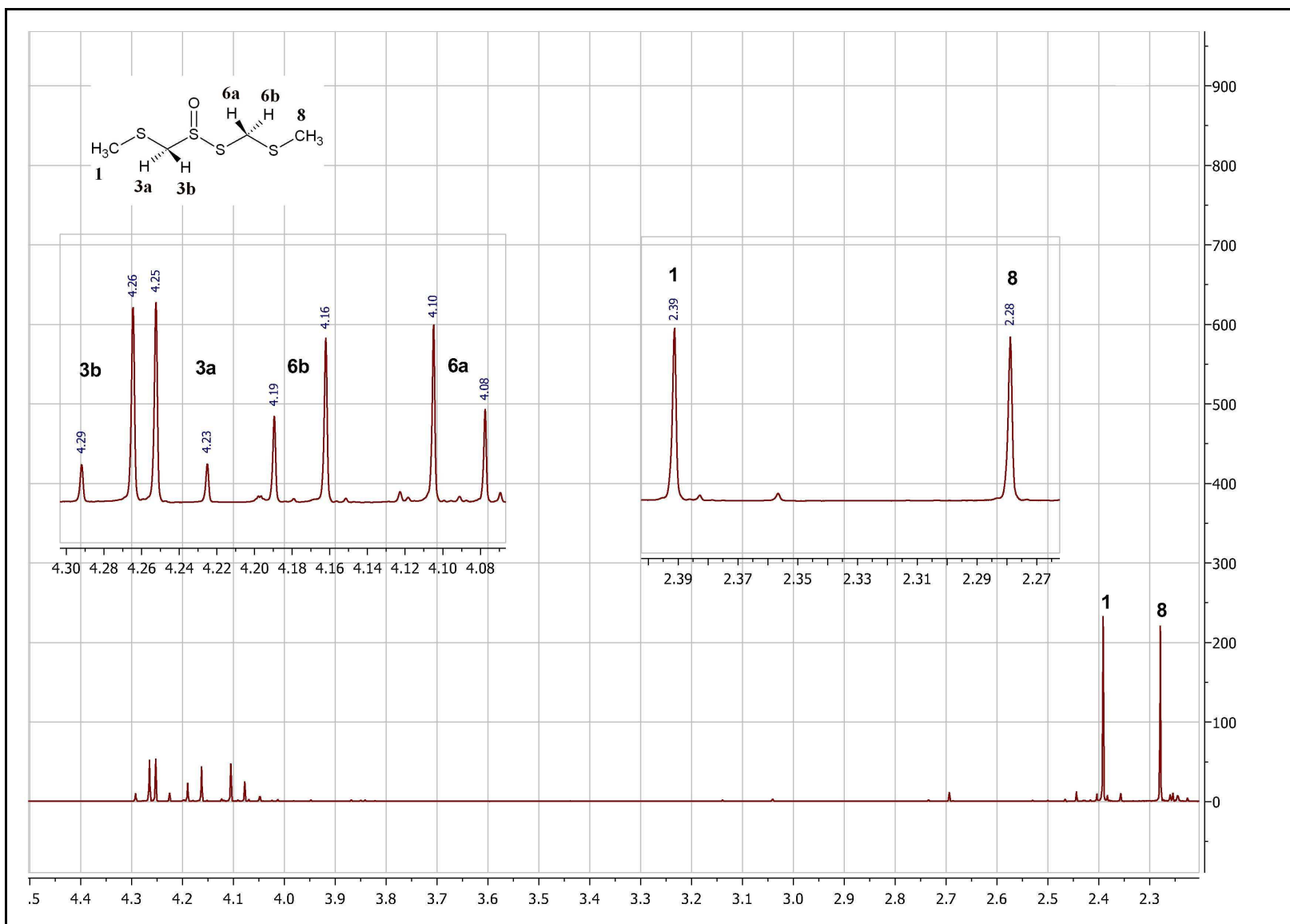
Obrázek A.25 ^{13}C NMR spektrum 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxidu (14)



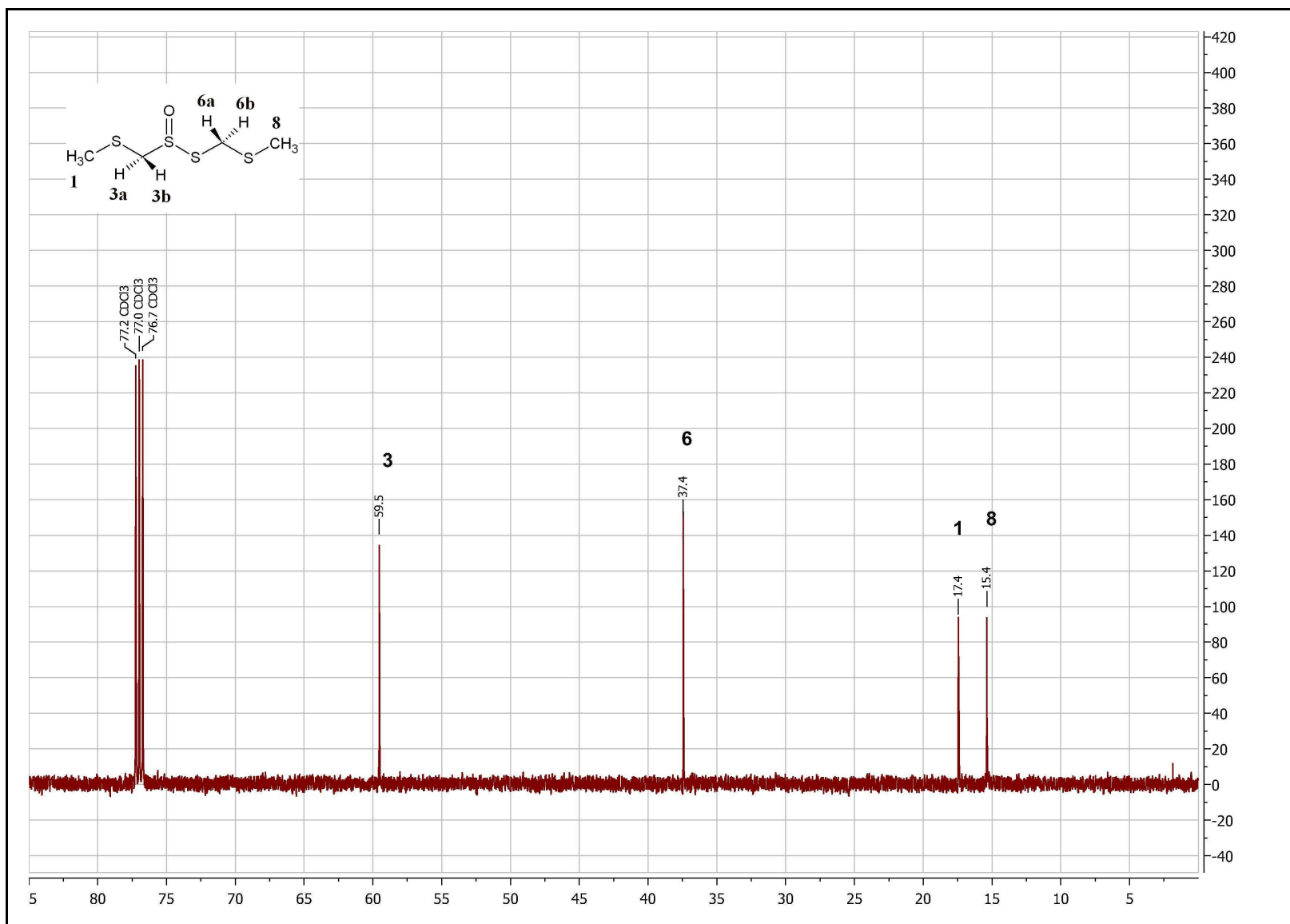
Obrázek A.26 HETCOR spektrum aromatické části 2-[(methylthiomethyl)dithio]pyridin-*N*-oxidu (14)



Obrázek A.27 ^1H NMR spektrum látky vznikající z *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**) působením alliinasy (nahore) a *N*-hydroxypyridin-2(*1H*)-thionu (**37**) (dole)



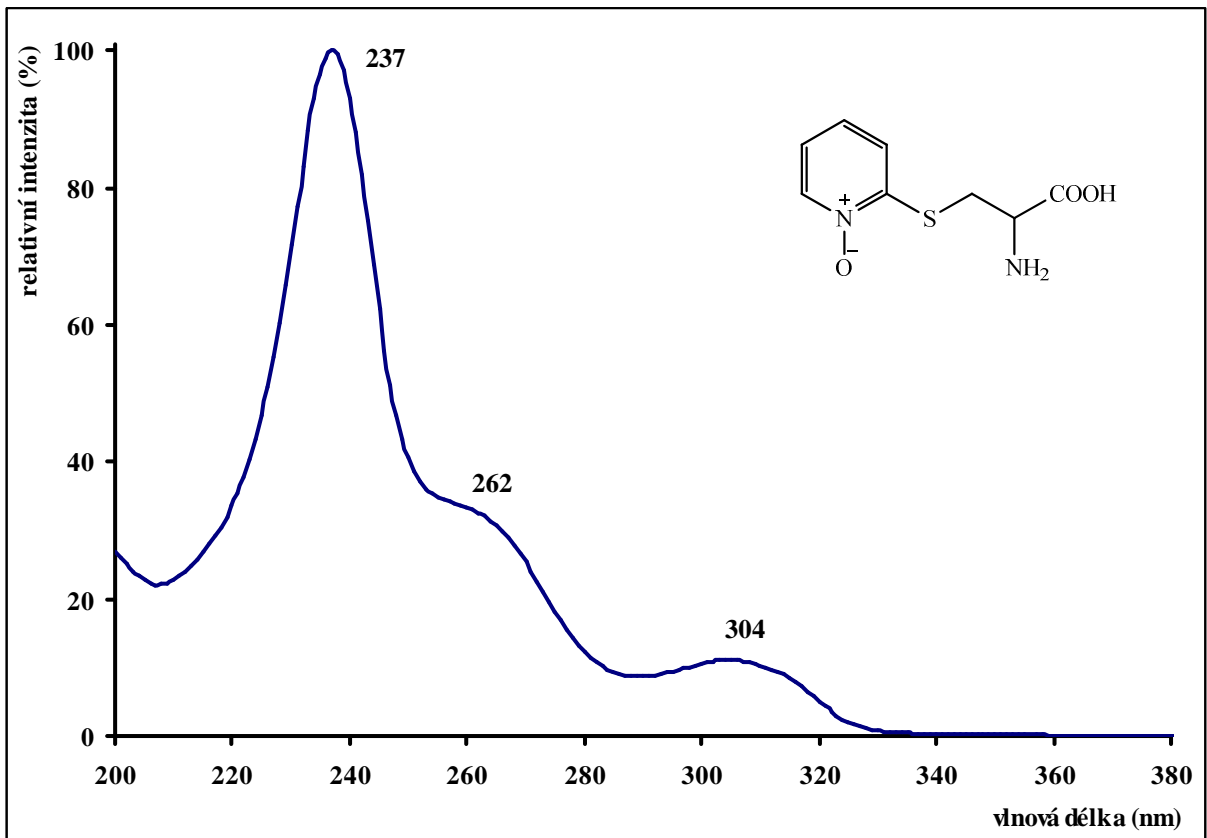
Obrázek A.28 ^1H NMR spektrum 2,4,5,7-tetrathiaoktan- S_4 -oxidu (marasmicinu, **24**)



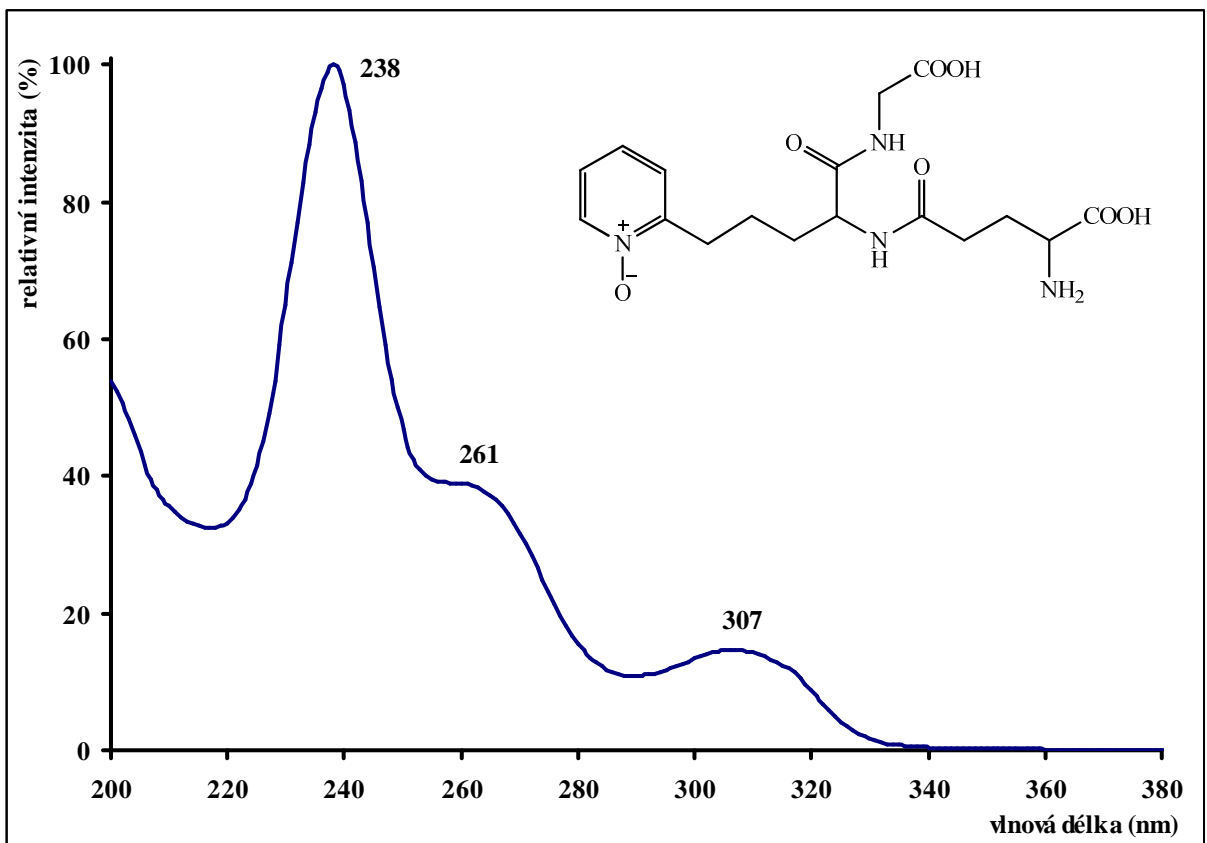
Obrázek A.29 ^{13}C NMR spektrum 2,4,5,7-tetrathiaoctan- S_4 -oxidu (marasmicinu, **24**)

PŘÍLOHA B

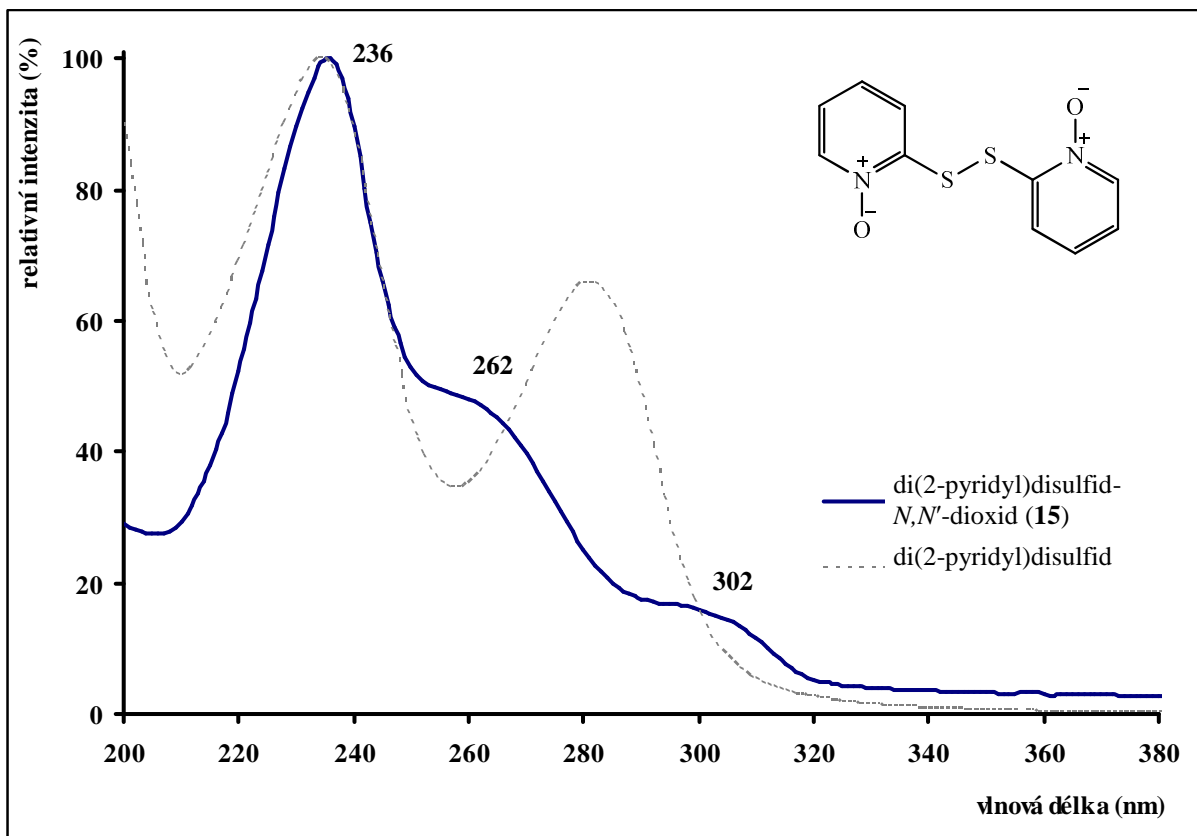
UV spektra



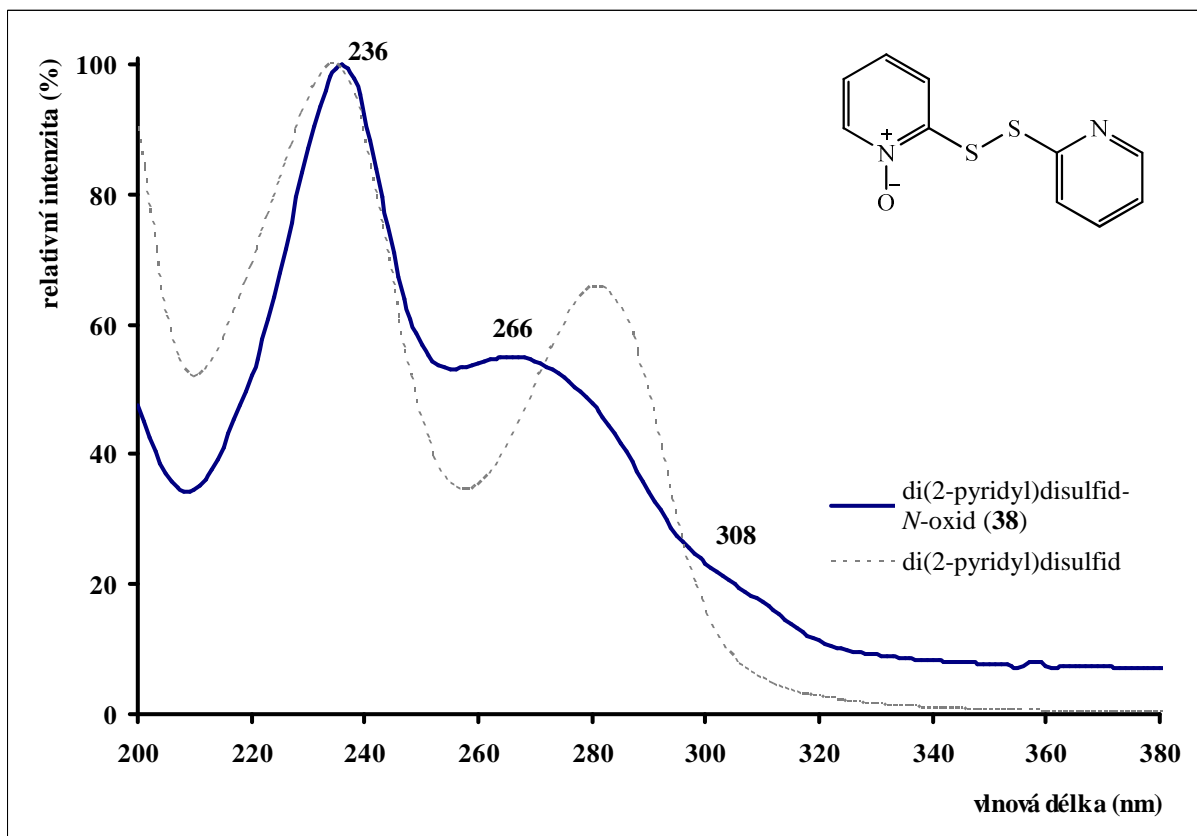
Obrázek B.1 UV spektrum *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (30)



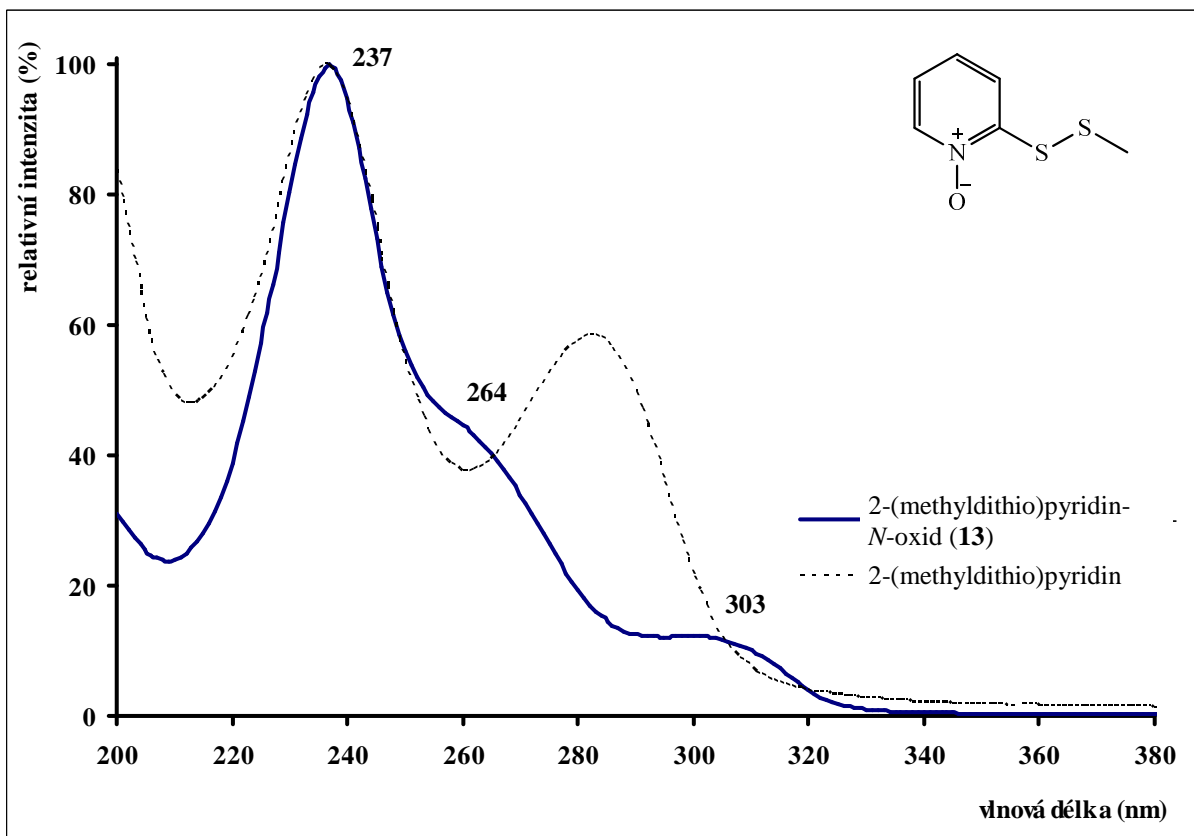
Obrázek B.2 UV spektrum *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (31)



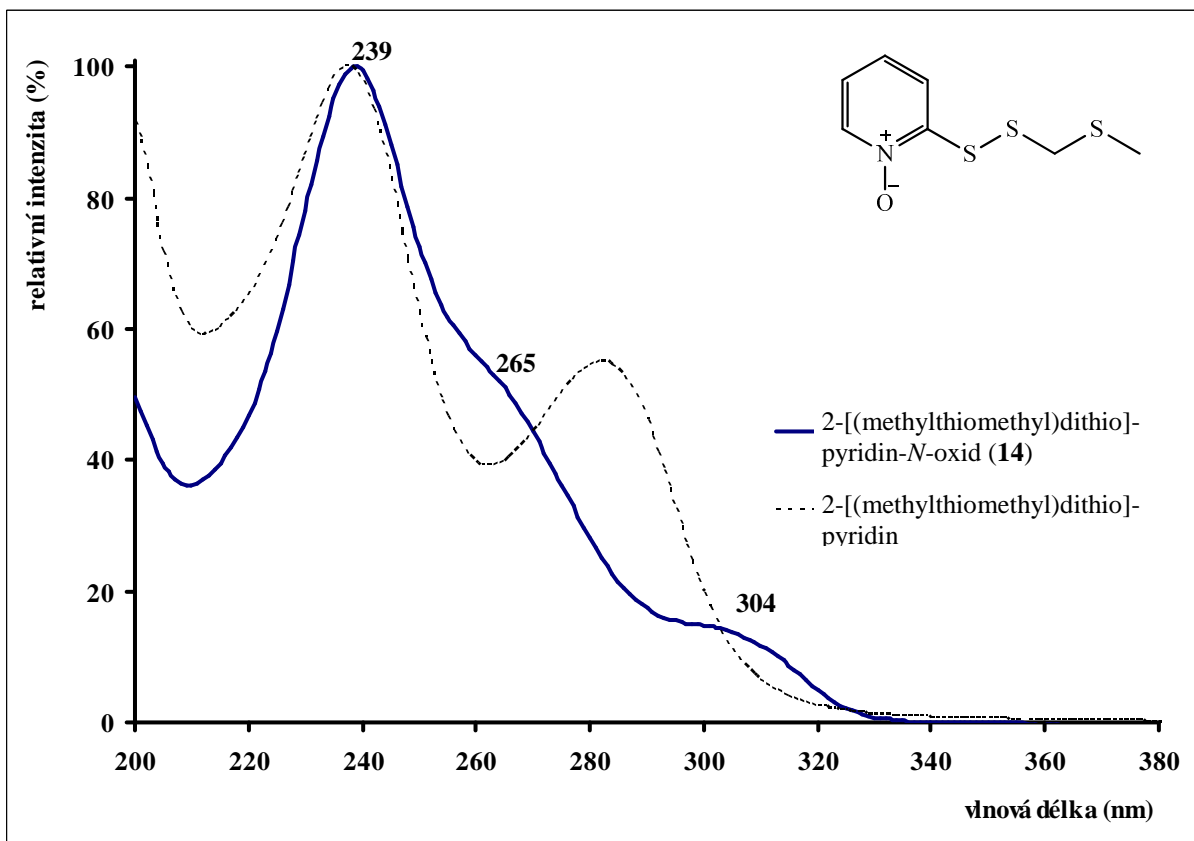
Obrázek B.3 UV spektrum di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (15)



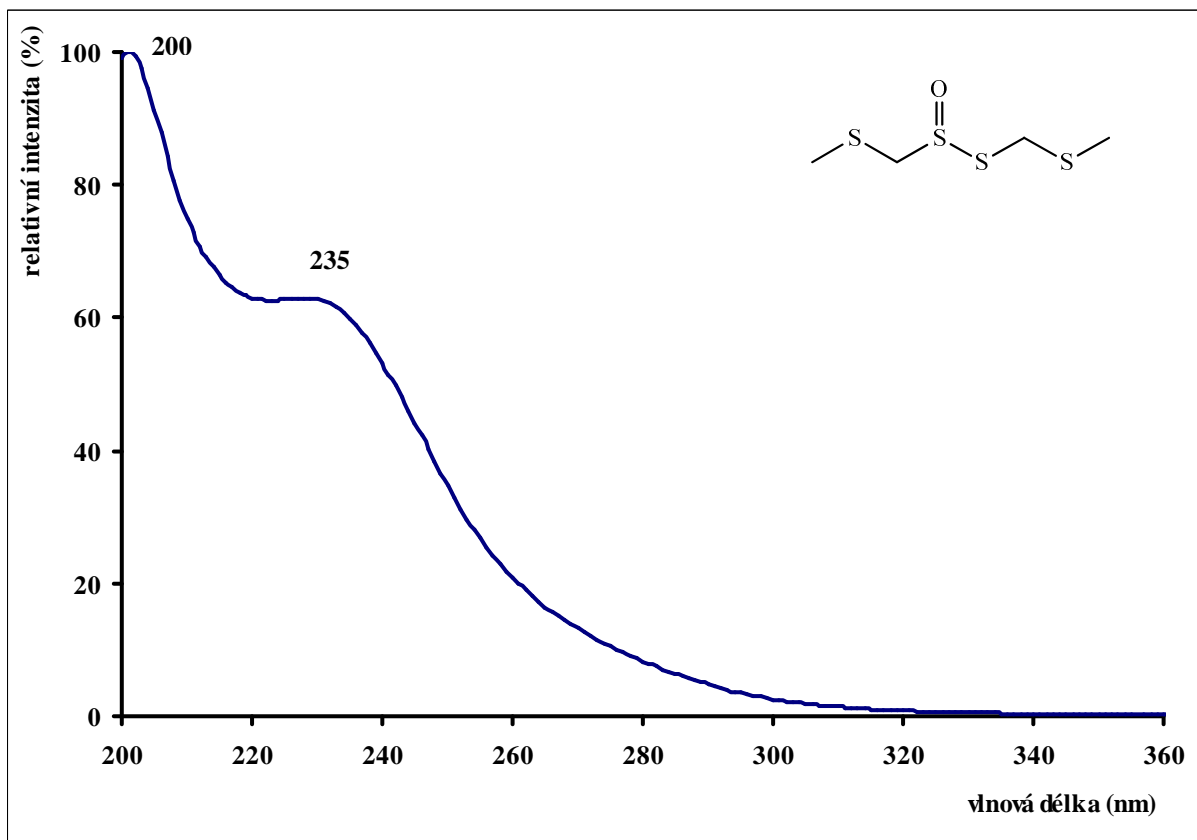
Obrázek B.4 UV spektrum di(2-pyridyl)disulfid-*N*-oxidu (38)



Obrázek B.5 UV spektrum 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxidu (13)



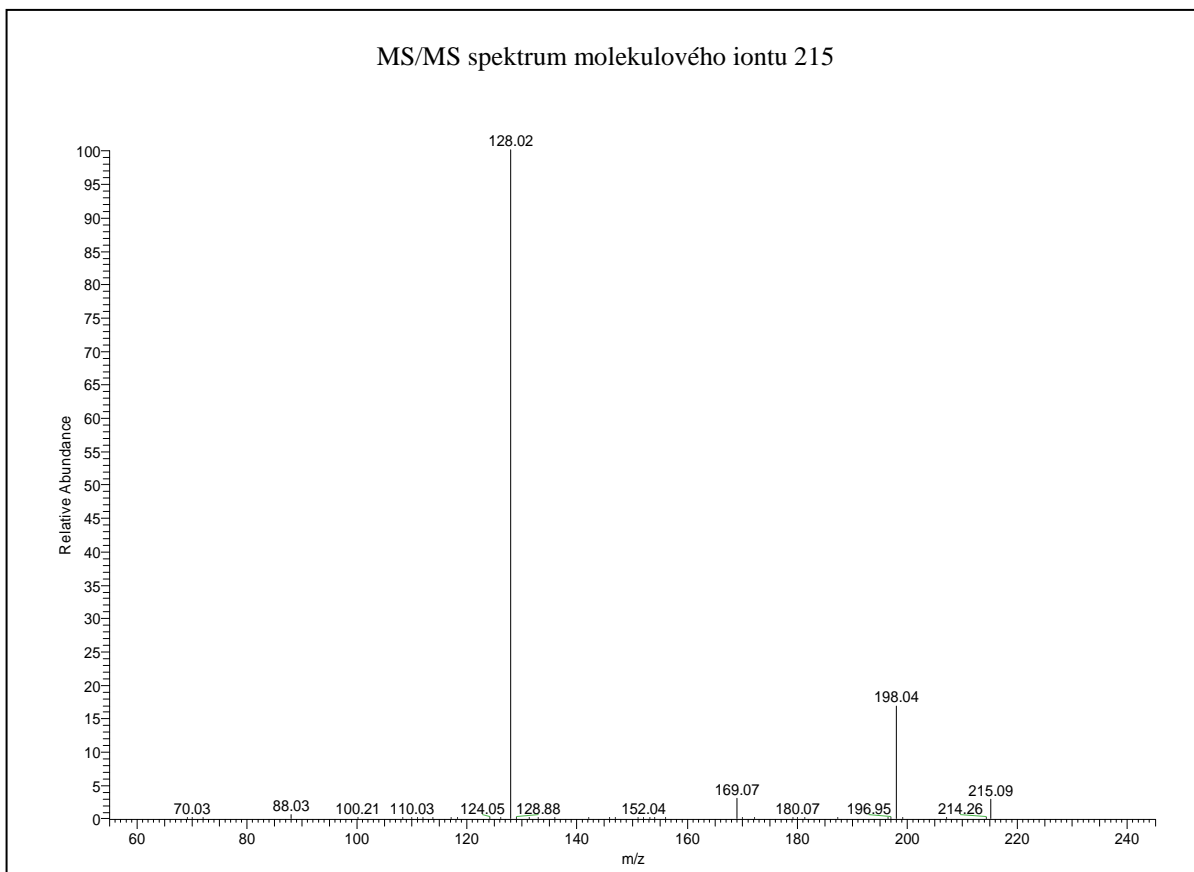
Obrázek B.6 UV spektrum 2-[(methylthio)methyl]dithio]pyridin-*N*-oxidu (14)



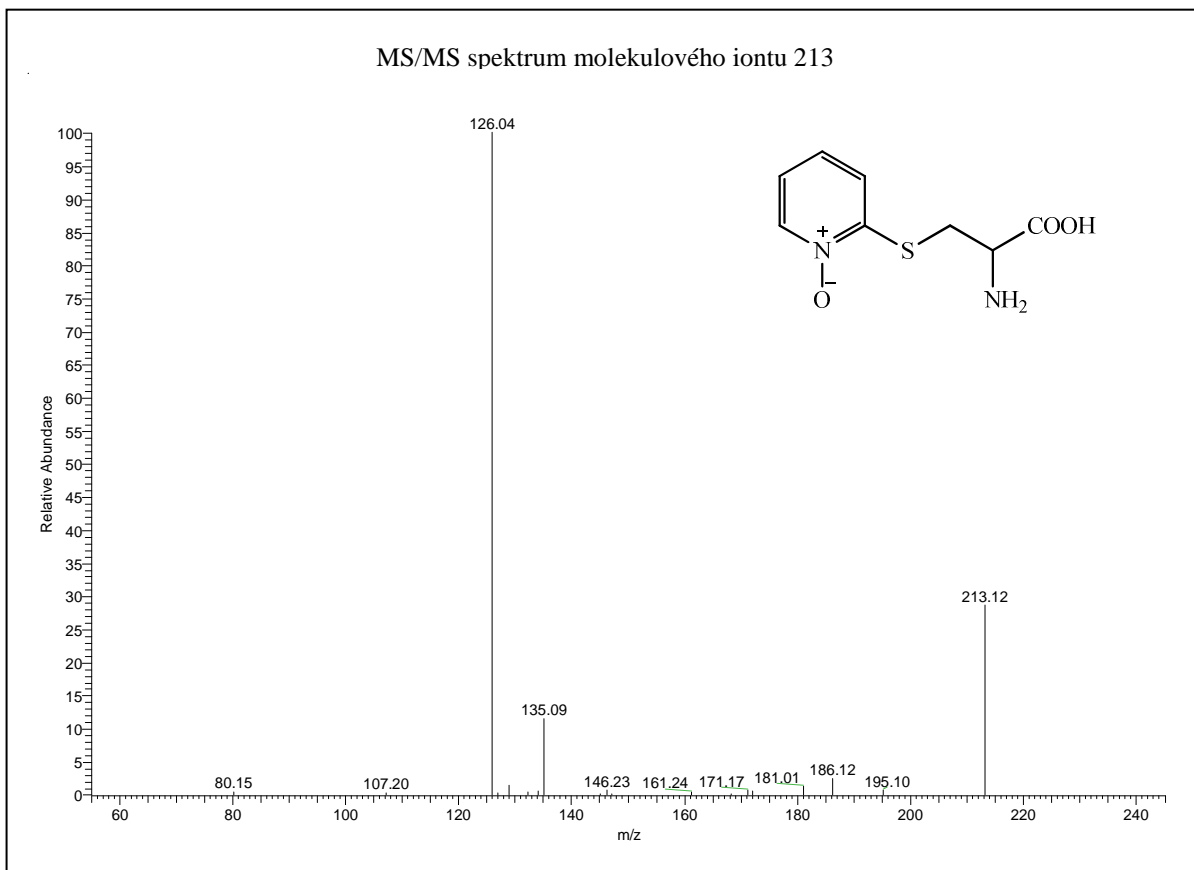
Obrázek B.7 UV spektrum 2,4,5,7-tetrathiaoktan-S₄-oxidu (marasmicinu, 24)

PŘÍLOHA C

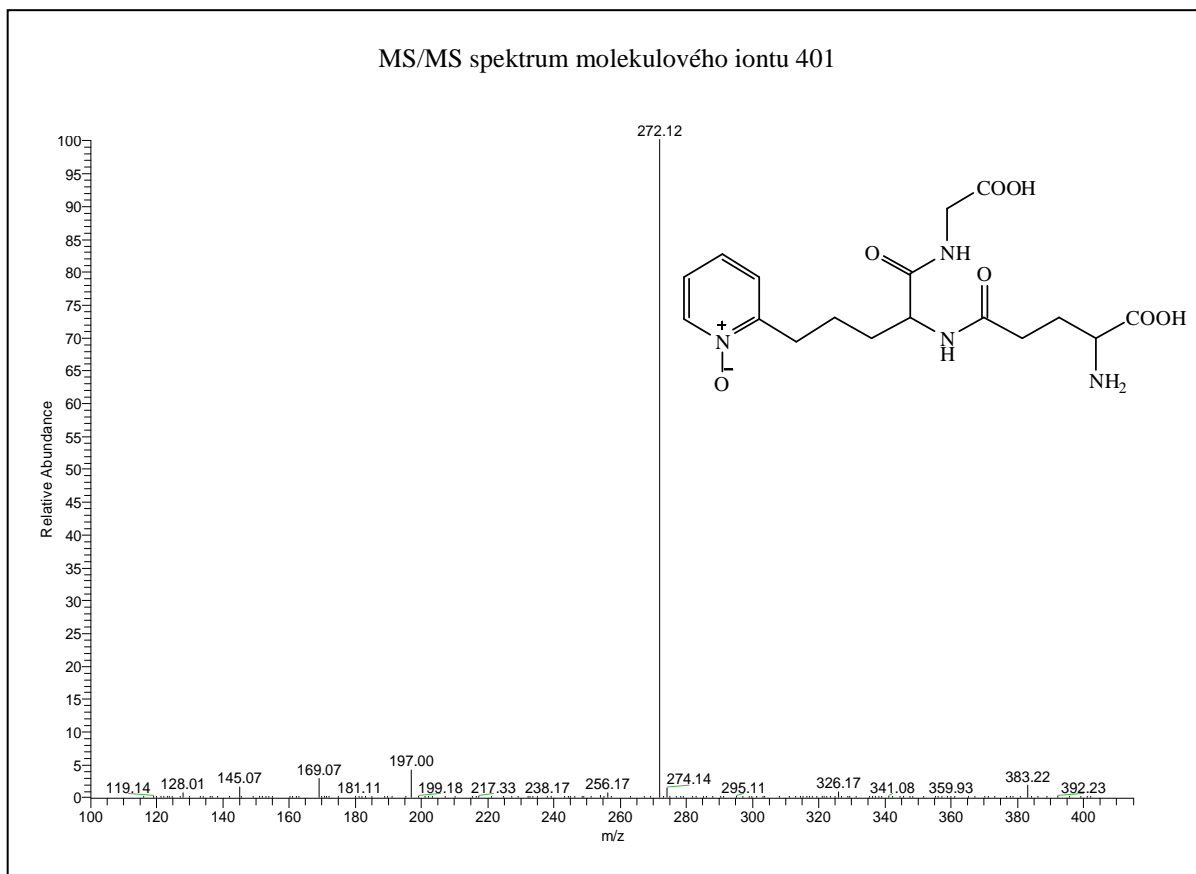
MS spektra



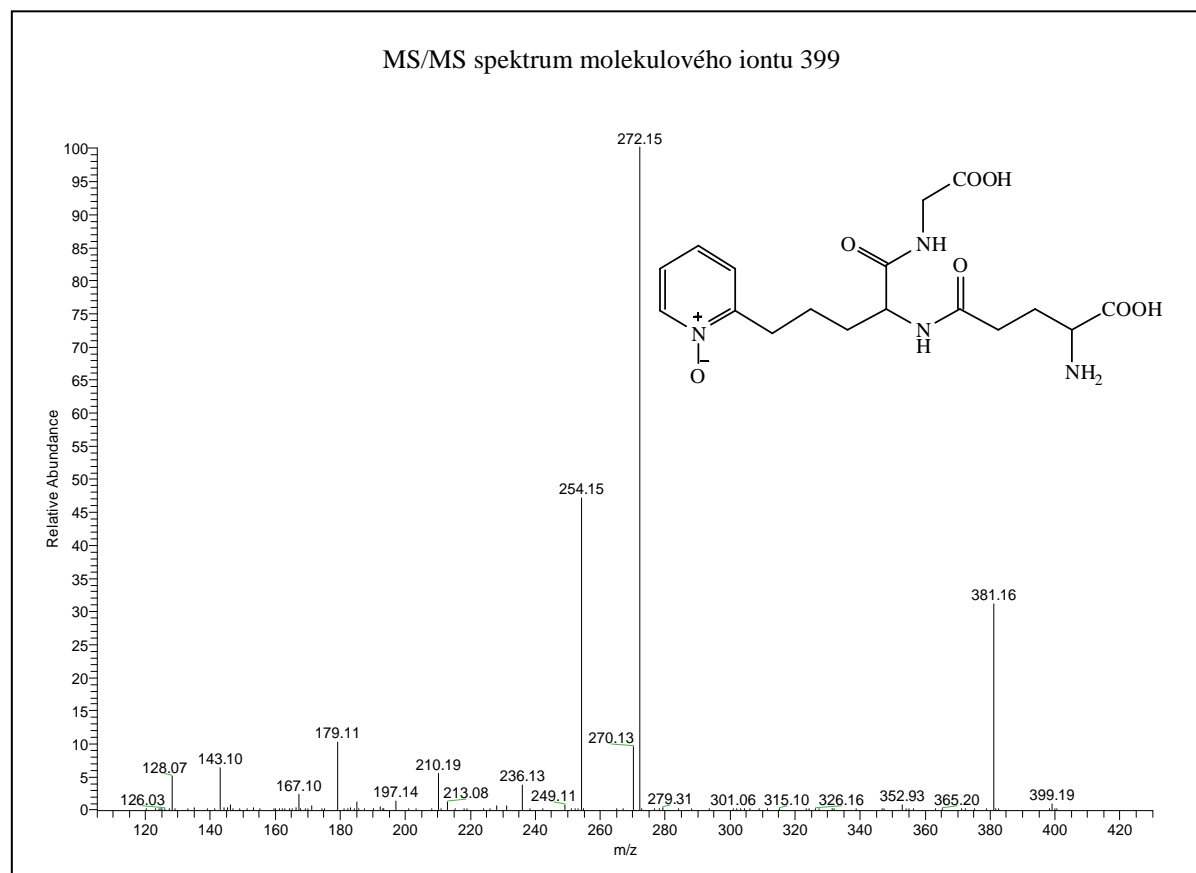
Obrázek C.1 MS/MS spektrum *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**) – pozitivní ionizace



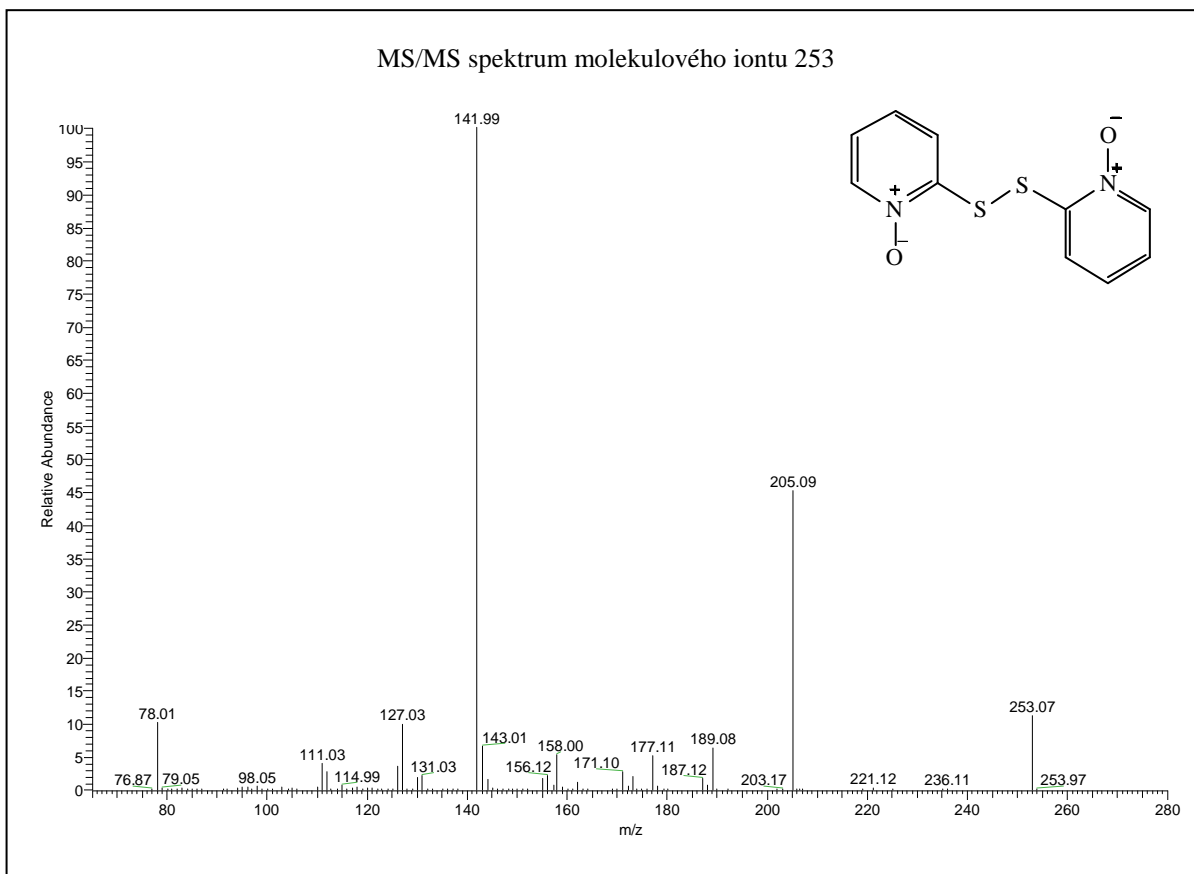
Obrázek C.2 MS/MS spektrum *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (**30**) – negativní ionizace



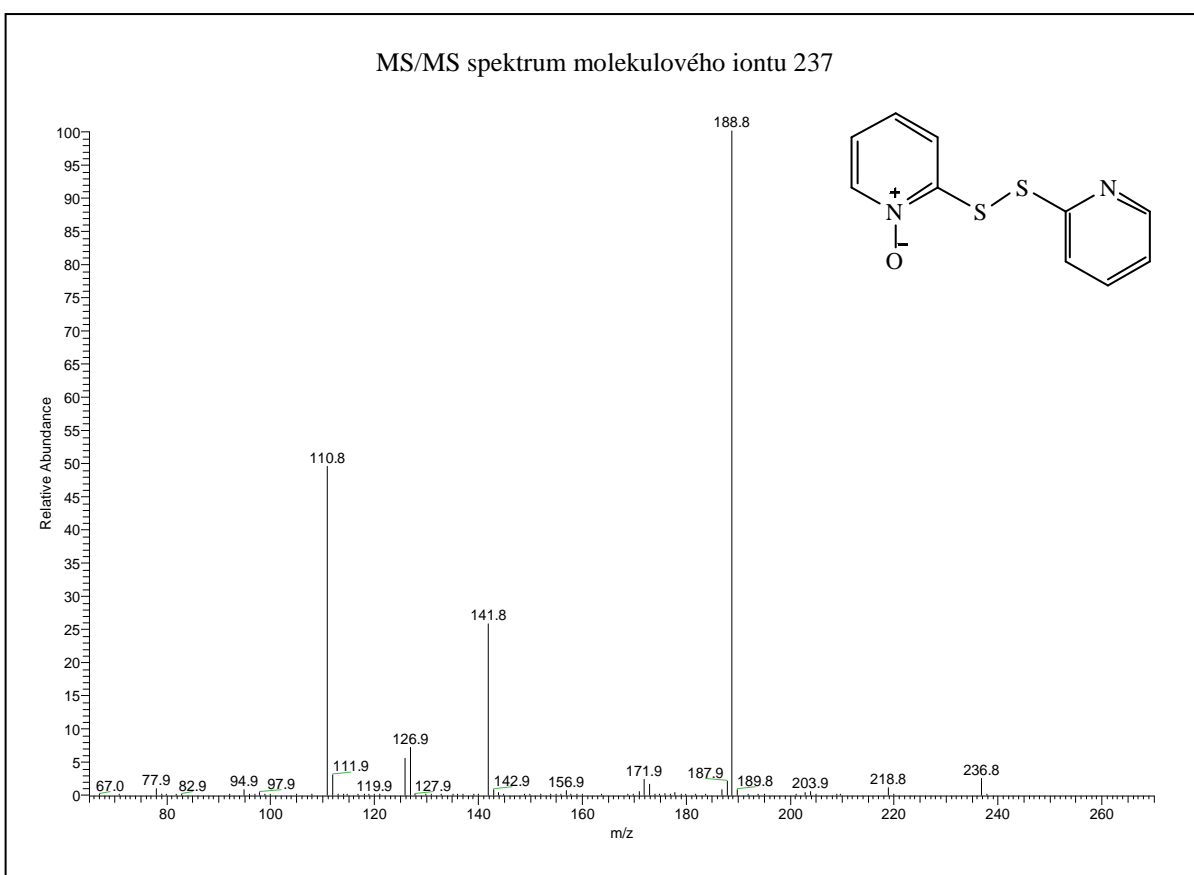
Obrázek C.3 MS/MS spektrum *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (**31**) – pozitivní ionizace



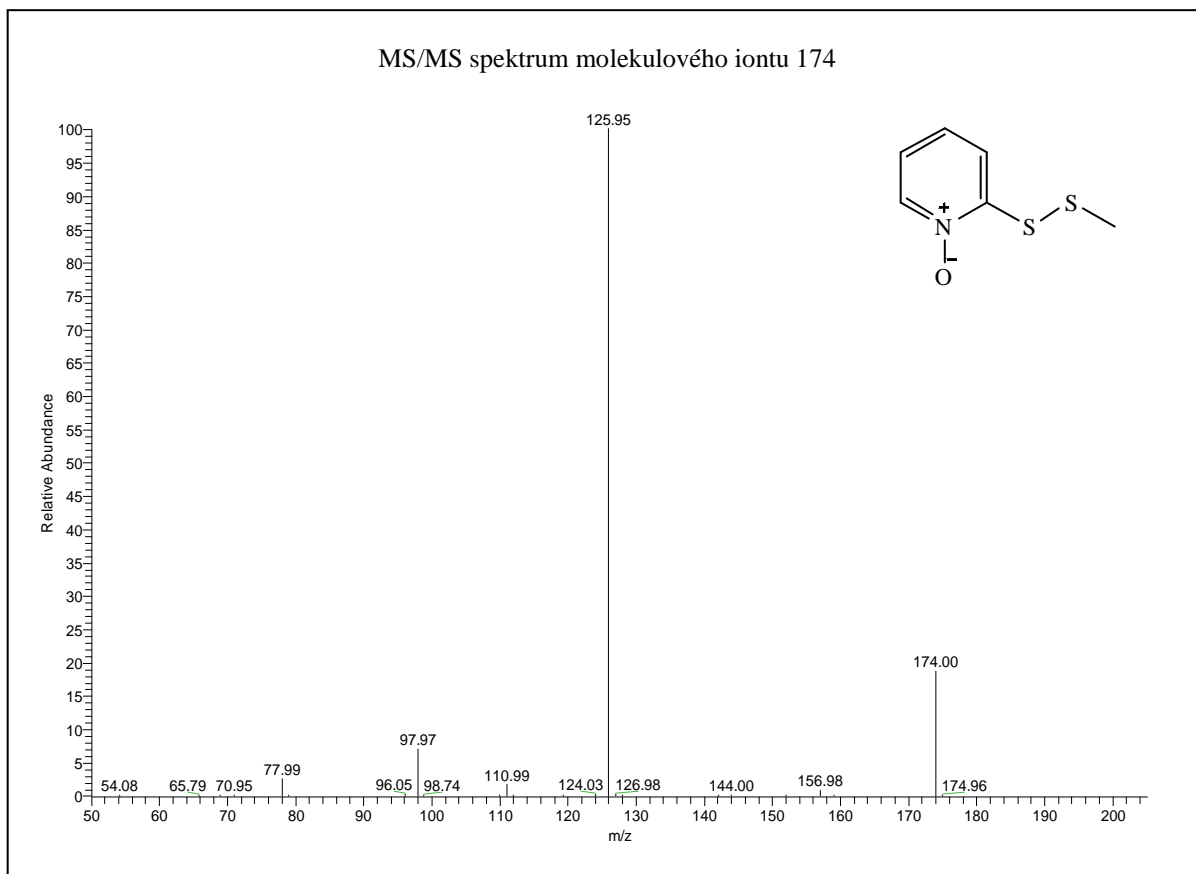
Obrázek C.4 MS/MS spektrum *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (**31**) – negativní ionizace



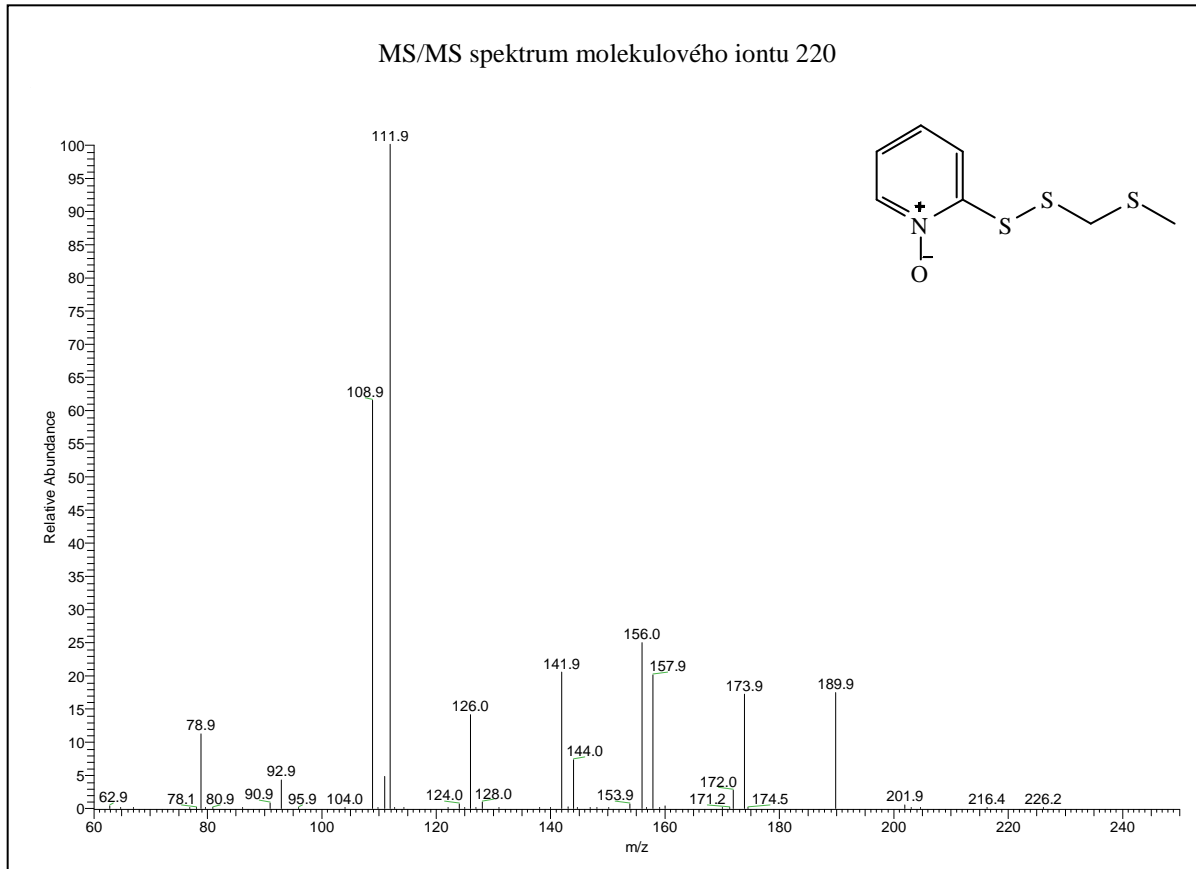
Obrázek C.5 MS/MS spektrum di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (**15**) – pozitivní ionizace



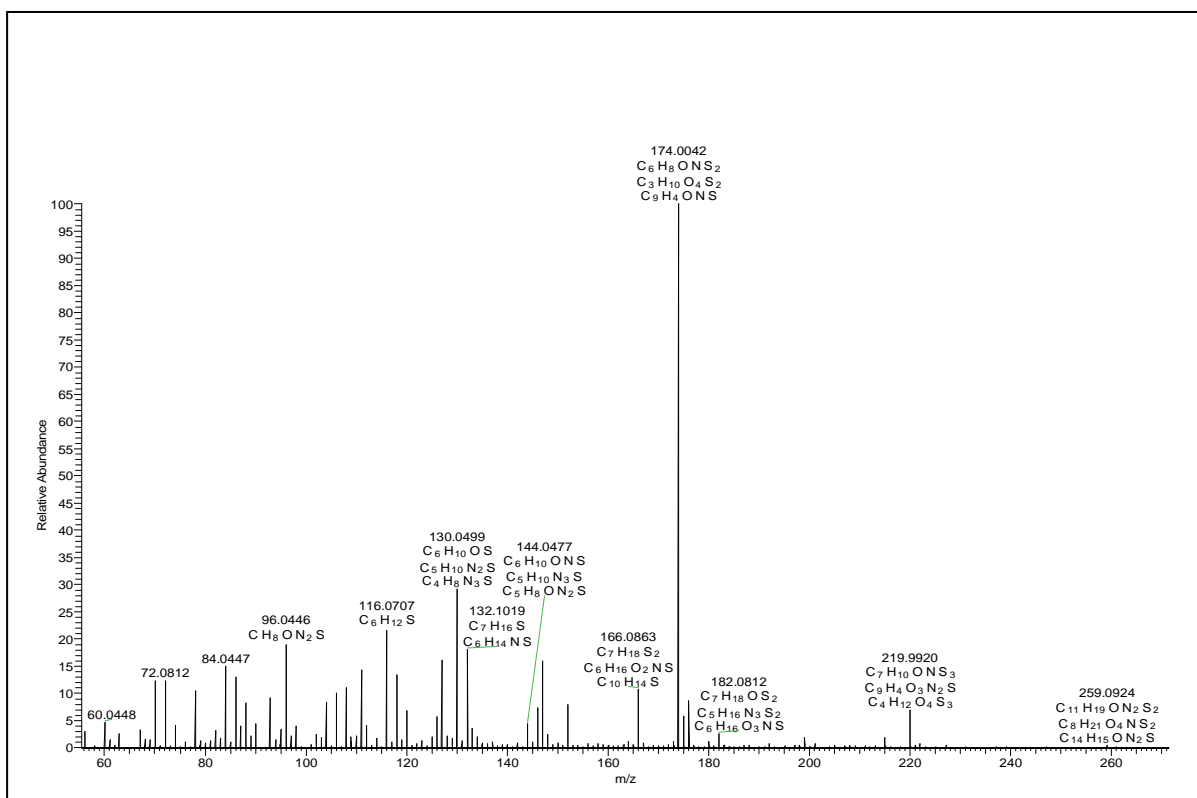
Obrázek C.6 MS/MS spektrum di(2-pyridyl)disulfid-*N*-oxidu (**38**) – pozitivní ionizace



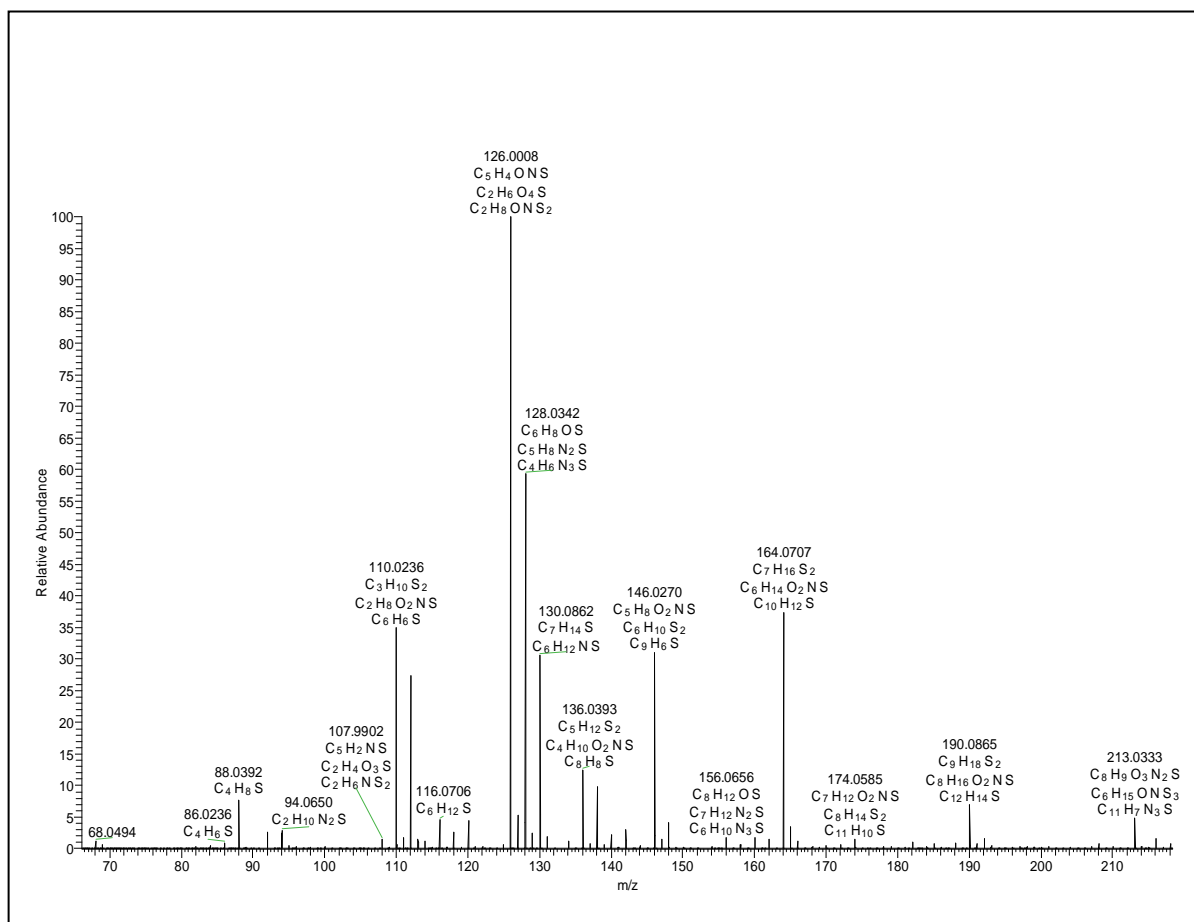
Obrázek C.7 MS/MS spektrum 2-(methylthio)pyridin-*N*-oxidu (**13**) – pozitivní ionizace



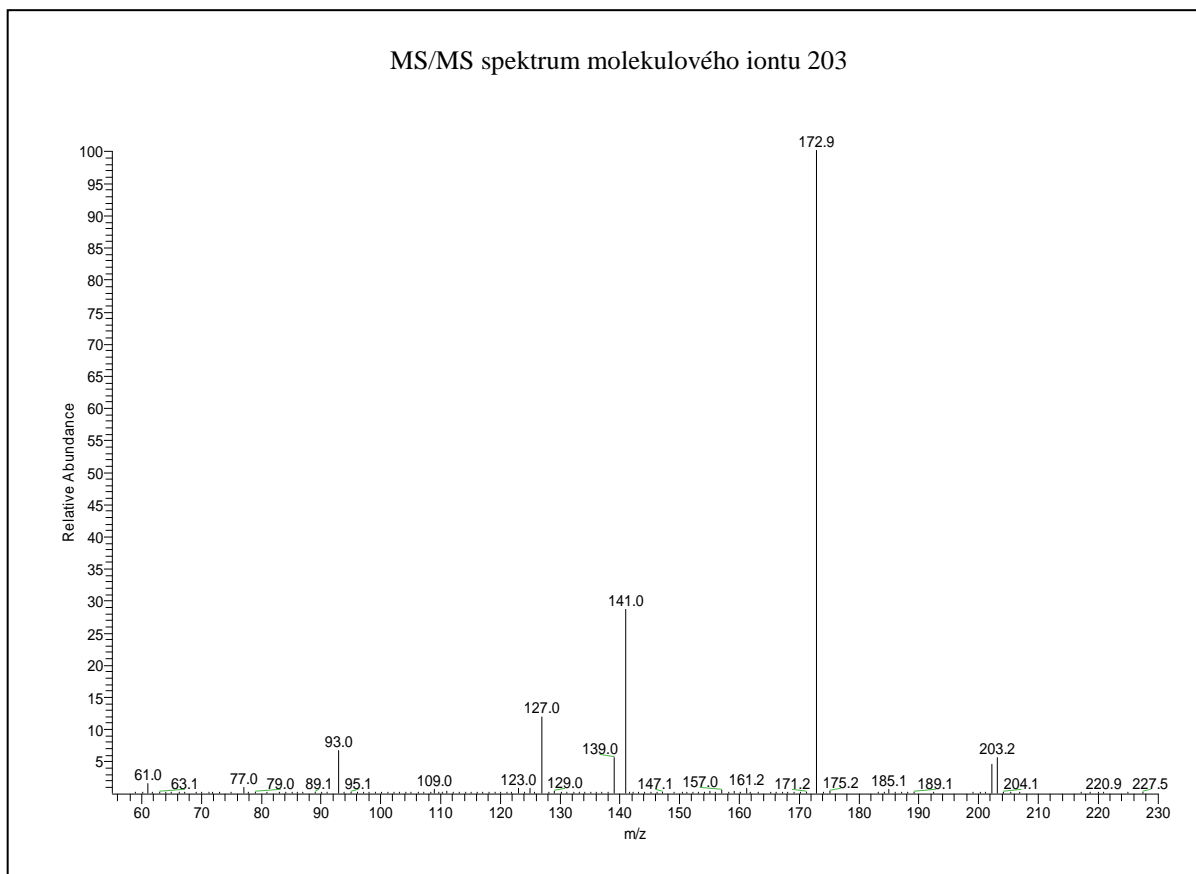
Obrázek C.8 MS/MS spektrum 2-[(methylthio)methylthio]pyridin-*N*-oxidu (**14**) – pozitivní ionizace



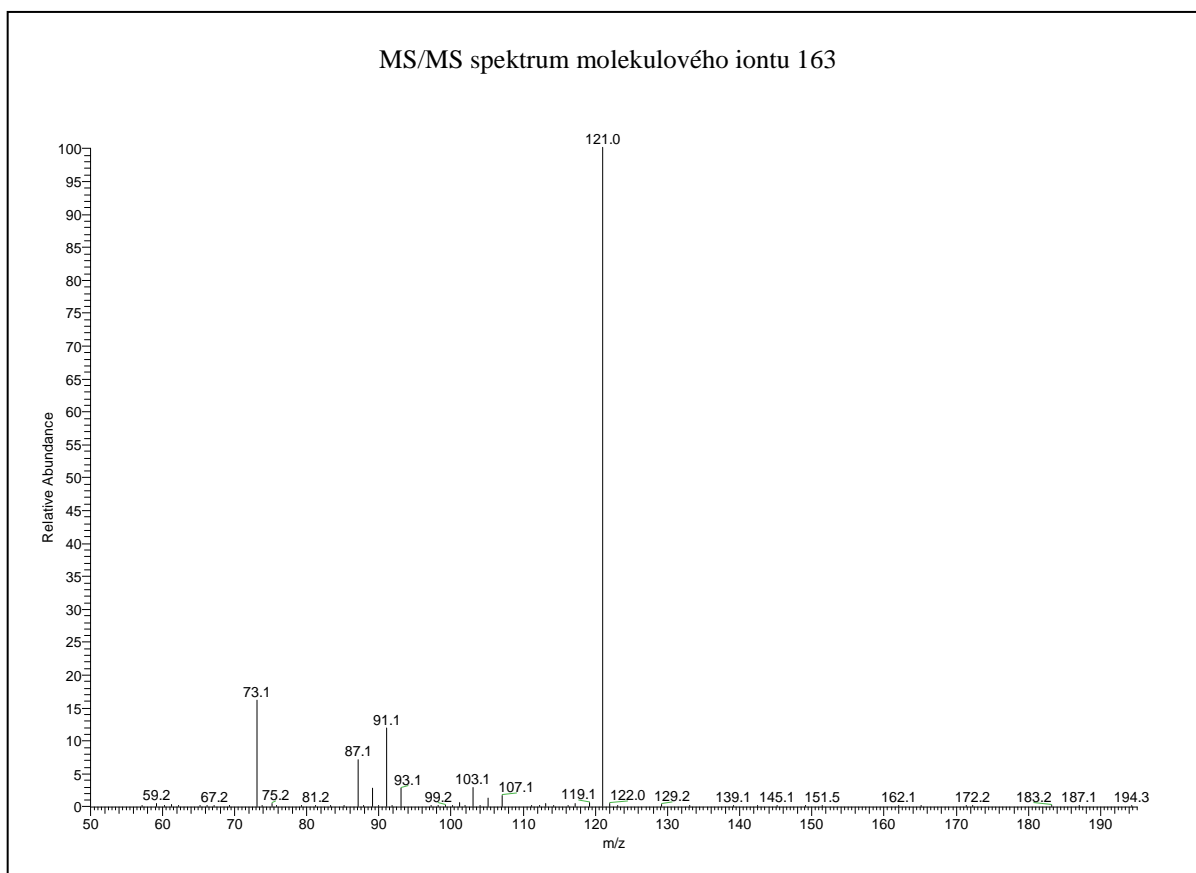
Obrázek C.9 PI-DART-HRMS spektrum látek vznikajících při porušení cibulky *A. stipitatum*



Obrázek C.10 NI-DART-HRMS spektrum látek vznikajících po smíchání *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (30) s alliinaseou z *A. stipitatum*



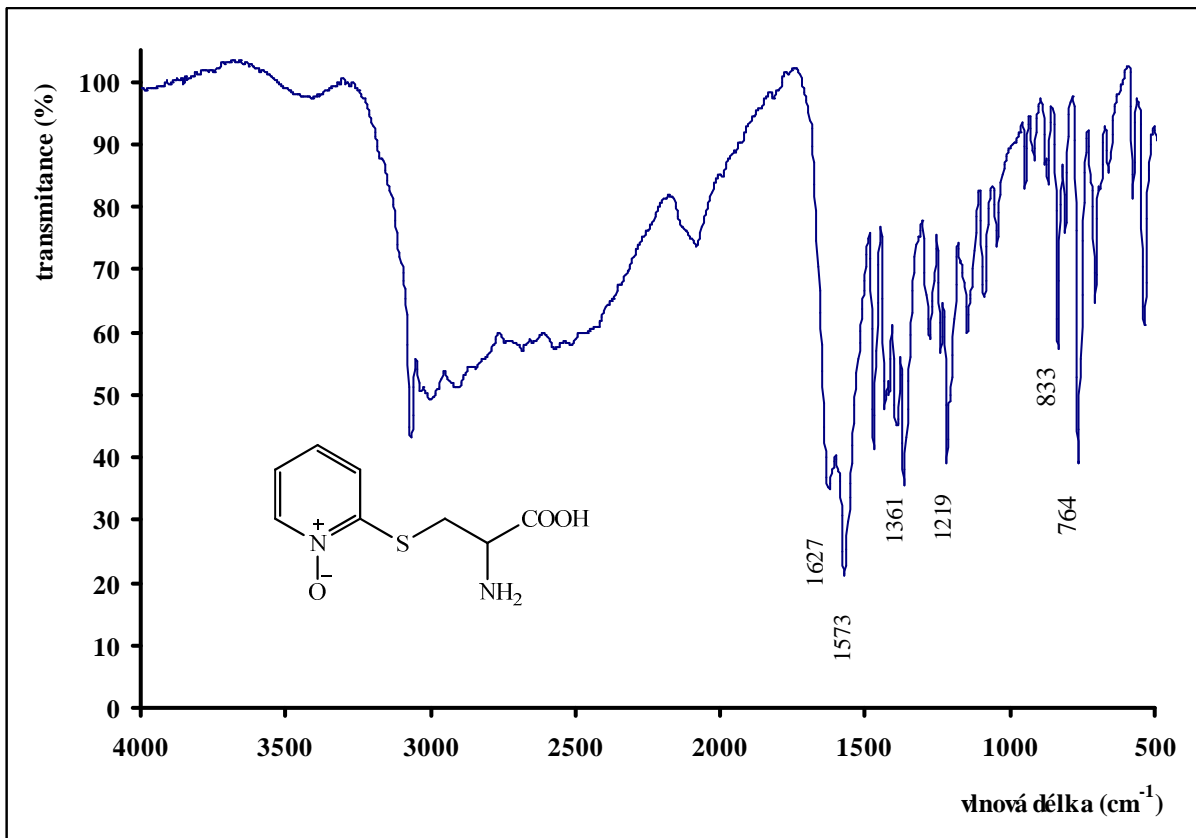
Obrázek C.11 MS/MS spektrum 2,4,5,7-tetrathiaoktan- S_4 -oxidu (marasmicinu, **24**) – pozitivní ionizace



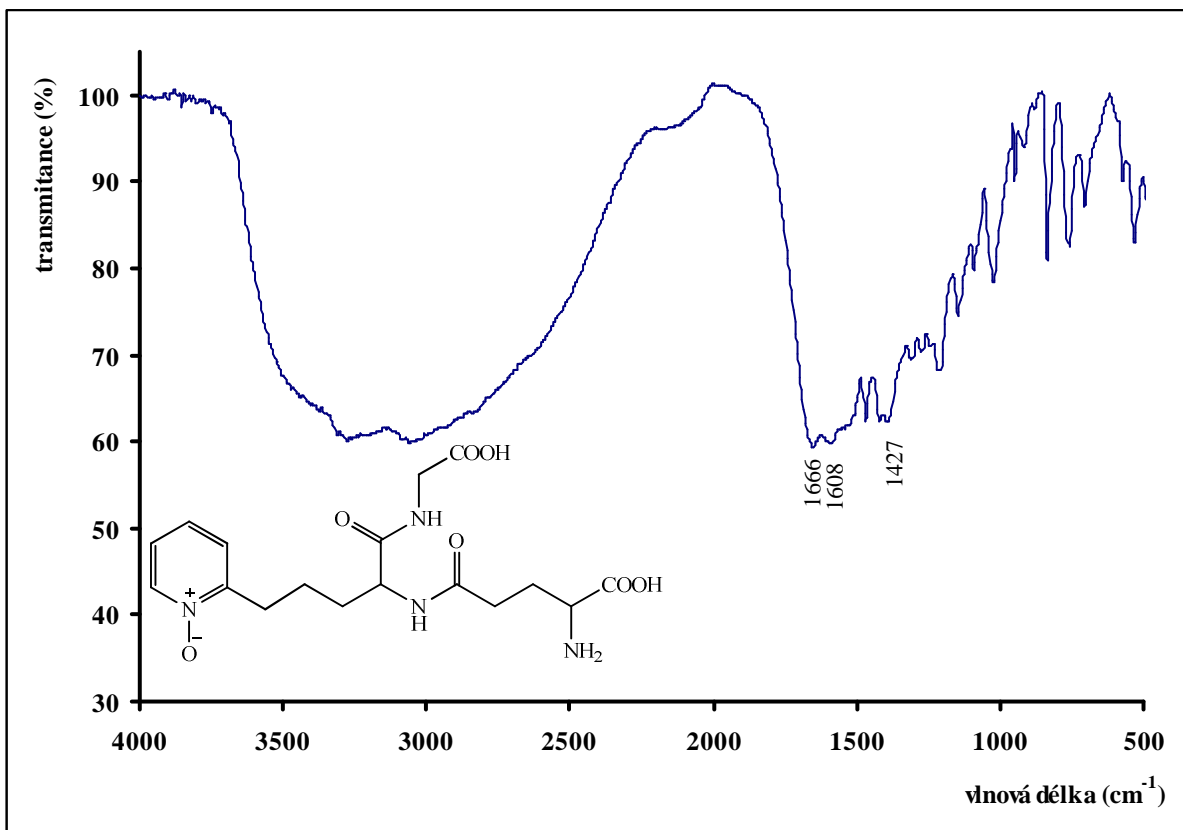
Obrázek C.12 MS/MS spektrum *S*-allyl-2-propenthiosulfinátu (allicinu, **11**) – pozitivní ionizace

PŘÍLOHA D

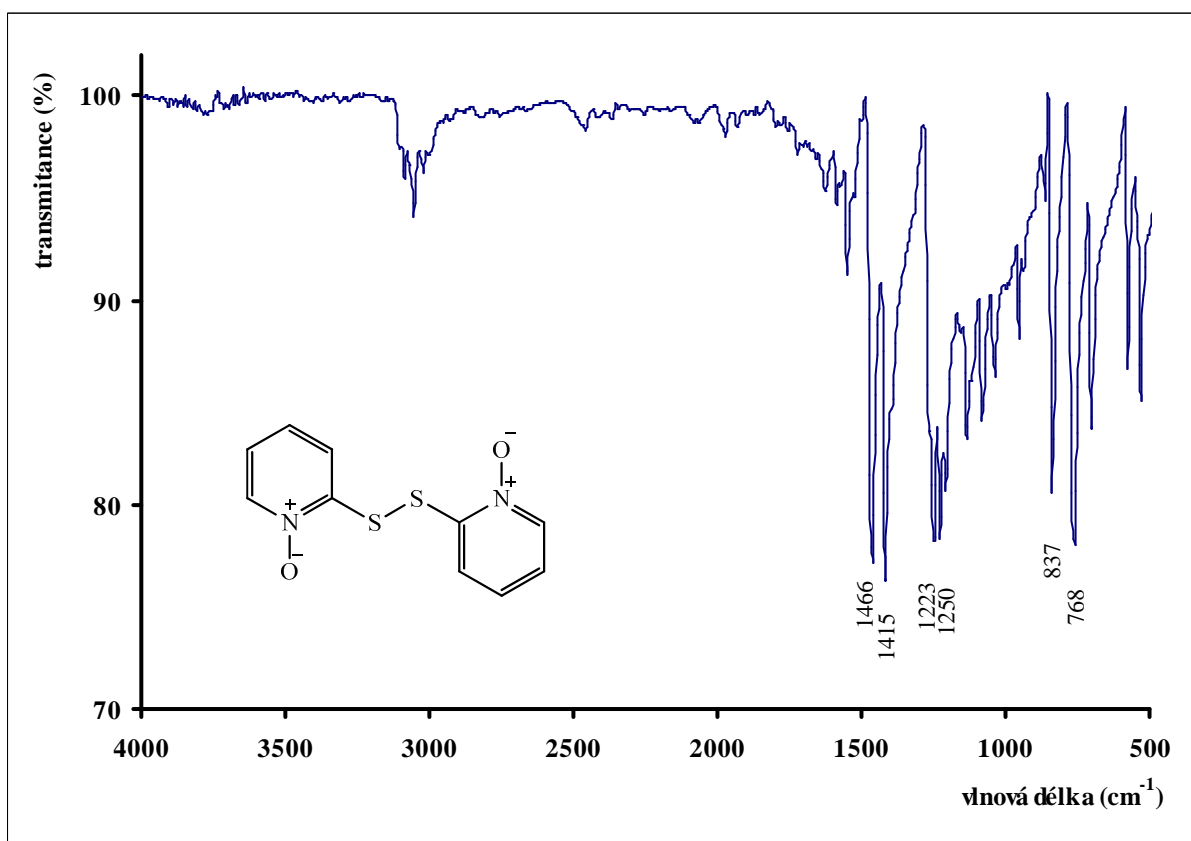
IČ spektra



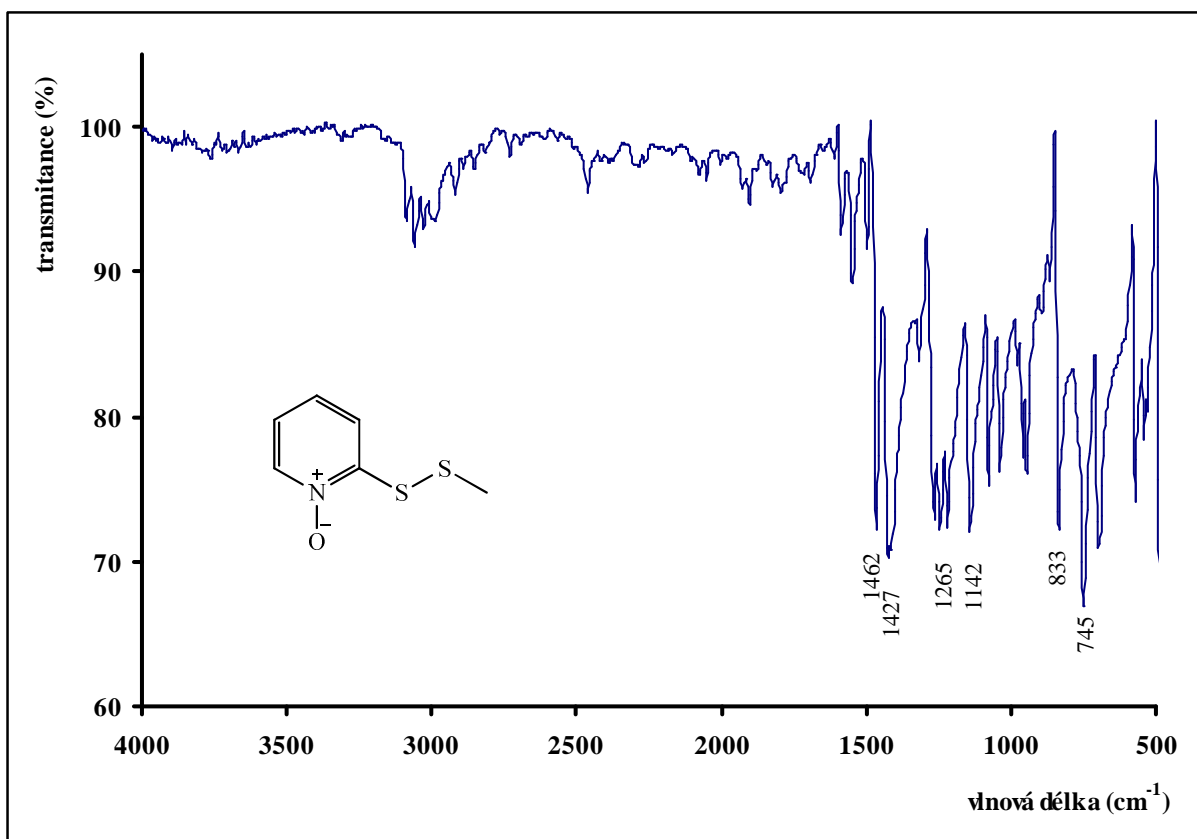
Obrázek D.1 IČ spektrum *S*-(2-pyridyl)cystein-*N*-oxidu (30)



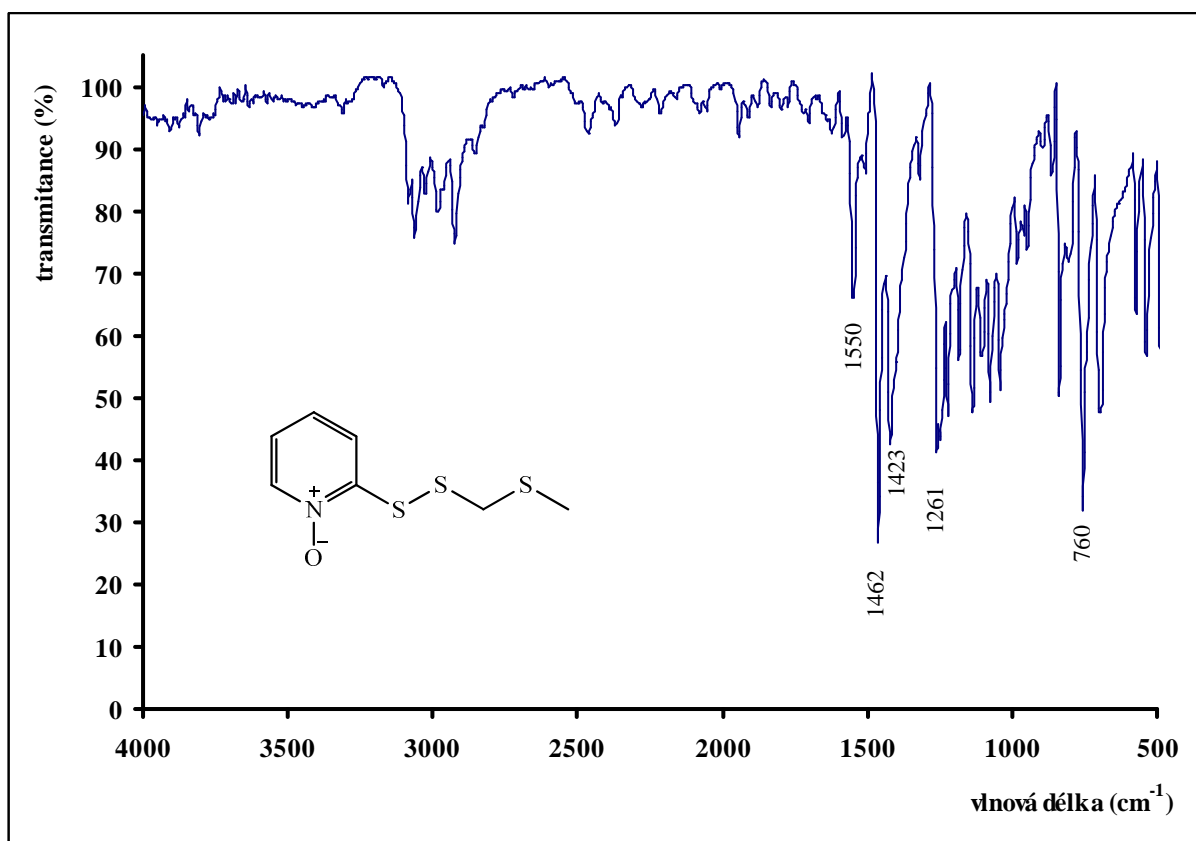
Obrázek D.2 IČ spektrum *S*-(*N*-oxy-2-pyridyl)glutathionu (31)



Obrázek D.3 IČ spektrum di(2-pyridyl)disulfid-*N,N'*-dioxidu (15)



Obrázek D.4 IČ spektrum 2-(methyldithio)pyridin-*N*-oxidu (13)



Obrázek D.5 IČ spektrum 2-[(methylthio)methylthio]pyridin-*N*-oxidu (**14**)