

NAPHTHOQUINONES – APPEARANCE IN NATURE, BIOLOGICAL PROPERTIES

NAFTOCHINONY – VÝSKYT V PŘÍRODĚ, BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI

Babula P.¹⁾, Mikelová R.²⁾, Potěšil D.²⁾, Kizek R.²⁾, Havel L.³⁾, Sladký Z.¹⁾

¹⁾ Ústav přírodních léčiv, FaF VFU Brno, Palackého 1/3, 612 46 Brno

²⁾ Ústav chemie a biochemie, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

³⁾ Ústav botaniky a fyziologie rostlin, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

E-mail: petr_babula@email.cz

ABSTRACT

Naphthoquinones, compounds of natural origin, mostly appeared as chromatic pigments. They are deposited in cells vacuoles, where they are dissolved (in glycoside form). They are synthesised by range of chemical reactions, where shikimate acid, L-alanine (*Nepenthes*), parahydroxybenzoic acid and C₁₀ isoprenoid unit are initial substrates for biosynthesis of juglone, droserone, plumbagin and 7-methyljuglone. In nature they occur in wide range of plants species and also in fungi and microorganisms as group of secondary metabolite. Naphthoquinones are very toxic, antimicrobial, antifungal, antiviral and antiparasitic effects were observed. Plants with naphthoquinones content have wide use mostly in therapy of different tumour deceases in traditional medicines mainly in Asia (China) and South America areas. In academic medicine, plant drug *Juglans nigra* (*juglans folium*) and/or *Drosera rotundifolia* (*droserae herba*) are used for astringent effects and/or against dry irritating cough due to content of tanning agents and/or slimes content, respectively.

Keywords: naphthoquinones, plumbagin, juglone, droserone, 7-methyljuglone

ABSTRAKT

Naftochinony jsou látky přírodního původu; ve většině případů se jedná o barevné pigmenty. V buňkách jsou deponovány ve vakuolách, kde jsou rozpuštěny (ve formě glykosidů). Vznikají celou řadou chemických reakcí, kde kyselina šikimová, L-alanin (*Nepenthes*), p-hydroxybenzoová kyselina a C₁₀ izoprenová jednotka (*Boraginaceae*) jsou výchozím substrátem pro biosyntézu juglonu, droseronu, plumbaginu a 7-methyljuglonu. Jako skupina sekundárních metabolitů se v přírodě vyskytují v celé řadě rostlinných druhů a rovněž v rámci hub a mikroorganismů. Naftochinony jsou vysoce cytotoxické, byly pozorovány antimikrobní, antifungální, antivirální a antiparazitální efekty. V tradičních medicínách, zejména v oblasti Asie (Čína) a Jižní Ameriky mají rostliny s obsahem naftochinonů široké

uplatnění především v léčbě různých nádorových onemocnění. V univerzitní medicíně je rostlinná droga *Juglans nigra* (*juglans folium*) využívána pro své adstringentní účinky díky obsahu tříslovin a *Drosera rotundifolia* (*droserae herba*) užívána proti suchému dráždivému kašli pro obsah slizů.

Klíčová slova: naftochinony, plumbagin, juglon, droseron, 7-methyljuglon

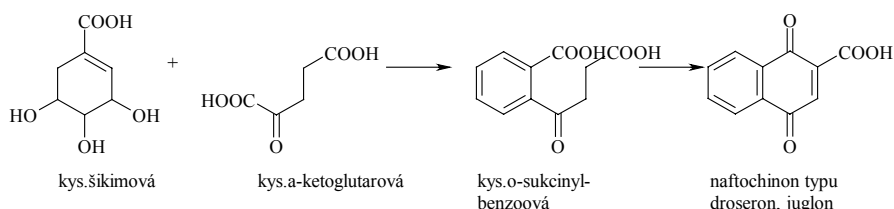
ÚVOD

Naftochinony jsou látky přírodního původu; ve většině případů se jedná o barevné pigmenty. V buňkách jsou deponovány ve vakuolách, kde jsou rozpuštěny (ve formě glykosidů)¹. Naftochinony jako skupina sekundárních metabolitů se v přírodě vyskytují v rámci různých čeledí rostlin (*Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Ebenaceae*, *Boraginaceae*, *Dioncophyllaceae*, *Ancistrocladaceae*, *Iridaceae*, *Verbenaceae*, *Scrophulariaceae*, *Avicenniaceae*, *Balsaminaceae*, *Bignoniaceae*, *Gentianaceae*, *Droseraceae*, *Nepenthaceae*, *Lythraceae*, *Euphorbiaceae*)²⁻⁵ a rovněž u hub a mikroorganismů (*Streptomyces*, *Fusarium*)⁶. Biosyntéza naftochinonů probíhá šesti možnými biosyntetickými cestami, některé jsou charakteristické pro určité čeledi nebo rody rostlin. Bylo zjištěno, že základním prekurzorem biosyntézy většiny naftochinonů je kyselina šikimová.

Základní přehled biosyntézy naftochinonů u rostlin a bakterií

Při první cestě biosyntézy naftochinonů dochází ke kondenzaci molekuly kyseliny šikimové a kyseliny α -ketoglutarové za přítomnosti enzymu thiaminpyrofosfázy (schéma 1). Vzniká kyselina o-sukcinylnbenzoová, ze které vzniká naftochinon typu juglonu nebo droseronu.

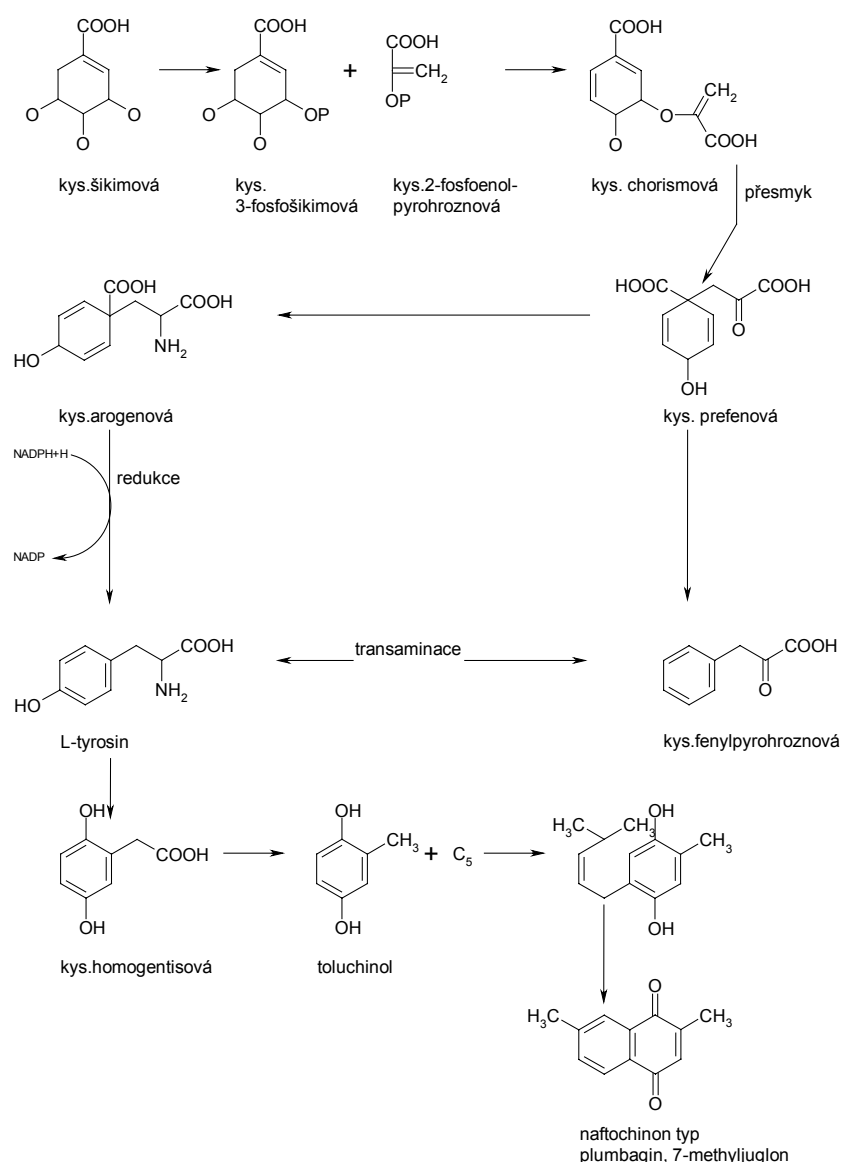
Schéma 1: Biosyntéza naftochinonů první cesta



Druhá cesta je rovněž zahájena reakcí kyseliny šikimové, ze které vzniká kyselina 3-fosfošikimová (schéma 2). Ta reaguje s kyselinou 2-fosfoenolpyrohroznovou za vzniku kyseliny chorismové, ze které přesmykem vzniká kyselina prefenová. Z kyseliny prefenové

vzniká kyselina arogenová, ze které redukcí vzniká tyrosin. Rovněž je možná cesta, kdy z kyseliny prefenové odštěpením molekuly vody a oxidu uhličitého vzniká kyselina fenyropyrohroznová, která po transaminaci dává vznik tyrosinu. Inkorporace tyrosinu do molekuly naftochinonu probíhá nepřímo. Sledem reakcí vzniká kys. homogentisová a toluchinol. Ten kondenzuje s izoprenovou jednotkou (C₅) a následnou cyklizací vznikají již substituované naftochinony typu plumbaginu a methyljuglonu. Z kyseliny šikimové vzniká chinonový kruh.

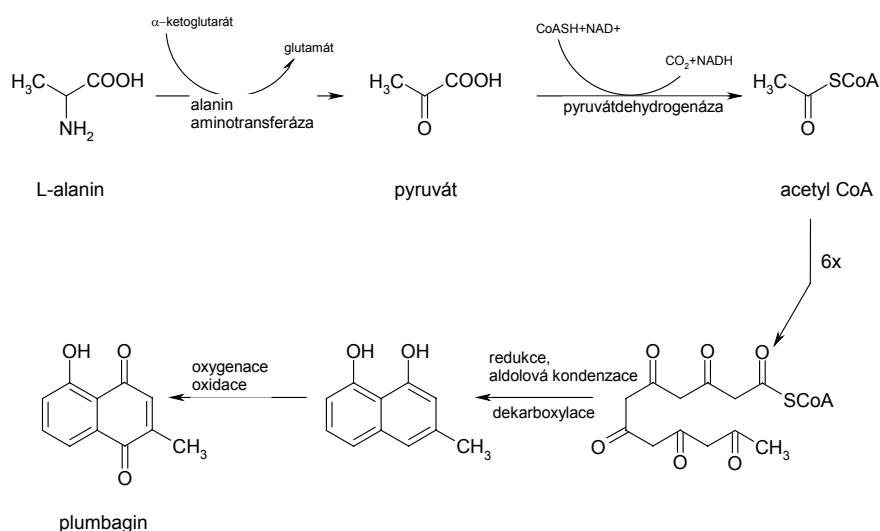
Schéma 2: Biosyntéza naftochinonů 2



Specifická biosyntetická cesta plumbaginu, byla objevena u *Nepenthes insignis* (*Nepenthaceae*)⁷, kdy byla zjištěna inkorporace skeletu L-alaninu (C₂) do struktury

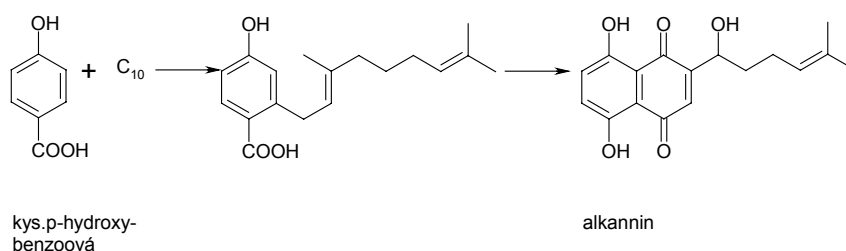
plumbaginu (schéma 3). Zdrojem L-alaninu je zde kořist chycená lapacími orgány rostlin. Vlastní biosyntetický proces probíhá tak, že L-alanin se přemění prostřednictvím alaninaminotranferázy na pyruvát, ze kterého za díky pyruvátdehydrogenáze vzniká acetylCoA. Šest těchto acetylkoenzymů A kondenzuje, následuje redukce, aldolová kondenzace a dekarboxylace a vzniká 3-methyl-1,8-naftalendiol, který se dále oxiduje a vzniká 1,4-naftochinonový skelet.

Schéma 3: Biosyntéza naftochinonů u zástupců rodu Nepenthes



U některých rodů (rod *Plagiobothrys*, *Boraginaceae*)⁸ představuje biosyntézu naftochinonů hydroxybenzoátová cesta (schéma 4). Příkladem mohou být alkannin nebo shikonin (izomer alkanninu)⁹, které vznikají kondenzací kyseliny p-hydroxybenzoové a C₁₀ izoprenové jednotky (geranyl pyrofosfát, GPP). Sledem reakcí vzniká substituovaný 1,4-naftochinon.

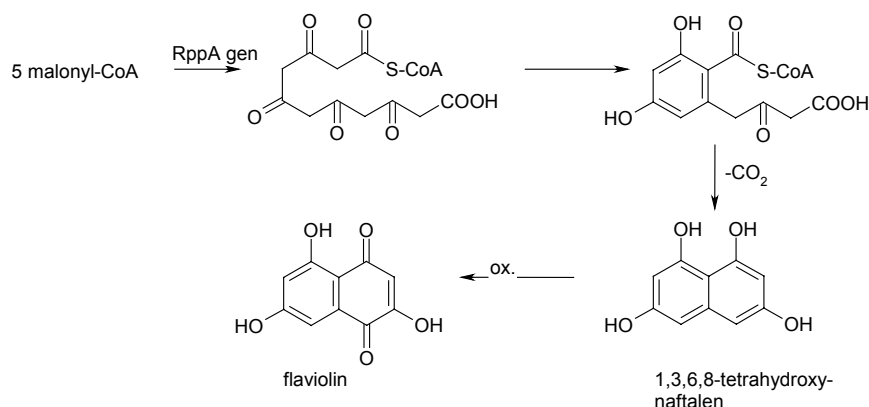
Schéma 4: Hydroxybenzoátová cesta biosyntézy naftochinonů



U čeledi *Plumbaginaceae* (rod *Plumbago*)^{8,9} vznikají naftochinony typu plumbaginu acetát-malonátovou cestou, kdy dochází ke kondenzačním reakcím mezi acetyl-koenzymem A a malonyl-koenzymem A.

V roce 2001 byla objasněna biosyntetická cesta substituovaných naftochinonů a dalších polyketidů u mikroorganismů (schéma 5). Příkladem může být biosyntéza flaviolinu, 2,5,7-trihydroxy-1,4-naftochinonu, který produkují některé kmeny r. *Streptomyces*. Jedná se o kondenzační reakci pěti molekul malonyl-koenzymu A, po dekarboxylaci a oxidaci vzniká flaviolin⁶.

Schéma 5: Biosyntéza naftochinonů u mikroorganismů r. *Streptomyces*



Využití naftochinonů v tradiční medicíně

Naftochinony se již dlouhou dobu používají v tradičních medicínách různých národů, a to většinou ve formě extraktů, které je obsahují. V Číně a některých dalších asijských zemích se používají rostliny rodu olověnc (Plumbago; *P. zeylanica*, *P. rosea* a *P. europaea*) ve formě extraktů k léčbě rakoviny, revmatoidní artritidy a bolestivé menstruace, zevně pak při léčbě otoků a zhmožděnin¹⁰. Ve Francii se dosud používá *Plumbago europaea* ke zmírnění bolestí zubů¹¹. *Plumbago zeylanica* se v lidovém léčitelství využívá pro své diaforetické účinky¹¹, v Indii má používání tohoto druhu širokou tradici na různé nemoci, jako je průjem, poruchy trávení a různé kožní problémy; používání této drogy může vést k trvalé sterilitě¹² a používá se i k vyvolání potratu¹³.

Obr. 1: *Plumbago europaea*



Kůra z kmene Bolivijské *Pera benensis* je využívána Indiány k léčbě kožní formy leishmaniózy¹⁴ (parazitóza způsobená prvoky rodu *Leishmania*). Kůra a listy z ořešáku (*Juglans nigra*) se využívají pro své svíravé, projímavé a detergentní účinky k léčbě kožních chorob, zejména ekzémů, oparů a kožních vředů¹⁵. Kůra *Juglans regia* se používá pro své mírně projímavé účinky. Tradiční medicíny doporučují kůru rovněž k léčbě syfilis a parazitóz. Zevně se používá ve formě různých extraktů jako rubefaciens¹⁶ (látky dráždící pokožku a sliznice, které způsobují jejich překrvení; tímto mechanismem ohraničují a urychlují zánět).

Obr. 2: V horní řadě *Juglans nigra*, v dolní *Juglans regia*



V ČR má dlouhou tradici (od 13. století) používání extraktů z rosnatky *Drosera rotundifolia* proti infekčním nemocem dýchacích cest, jako je nachlazení, bronchitida, kašel a astma¹⁷. Přípravky z této rostliny se ještě dnes doporučují pro prevenci aterosklerózy, při cukrovce a jako silný antibakteriální a antivirální prostředek. Uvádí se rovněž účinek spasmolytický¹⁸ a sekretolytický¹. V Americe jsou extrakty oblíbeny jako geriatrikum¹⁹. V indické tradiční medicíně se používá *Drosera burmannii* jako účinné rubefaciens, v Jižní Americe zase jiné druhy k léčbě bradavic, kuřích ok, keratóz a k odstranění pih.

Obr. 3: *Drosera rotundifolia*



Využití naftochinonů v univerzitní medicíně

Při kašli a nachlazení se používá v ČR schválený přípravek Tussilen® kapky, který obsahuje extrakt z druhu *Drosera rotundifolia*²⁰. Jiné zdroje doporučují homeopatické zpracování *Drosera rotundifolia* na nemoci dýchacích cest²¹; v katalozích pro zdravotnictví – MEDI stránky – jsou uvedena schválená homeopatika z *Drosera rotundifolia* v četných lékových formách – tablety, roztok, globule, čípky, masti v několika potencích – homeopatických ředěních²².

Mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*) nemá v současnosti v ČR terapeutické využití. V Německu se vyrábí přípravek Carnivora® - extrakt z mucholapky v lékových formách kapky a injekce – použití jako imunomodulans při malignitách, jako imunostimulans, podpůrná léčba Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitis, není zde však schválen a registrován²³. Extrakt z mucholapky je dostupný v USA, kde je vyráběn firmou Vital Health Products jako potravinový doplněk²⁴.

Obr. 4: *Dionaea muscipula*



EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

MATERIÁL A METODY

Rostliny *Dionaea muscipula* Ell. pocházely z tkáňových kultur (Ústav přírodních léčiv, Farmaceutické fakulty, Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně), kde byla kultivována na médiu Murashige Skoog Medium (MS)²⁵ s přidavkem sacharózy (30 g/l) a

aktivního uhlí. *Drosera rotundifolia* a *Drosera spathulata* pocházely z explantátových kultur Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně a byla pěstována za stejných podmínek. Části *Paulownia tomentosa* (listy, plody) byly sbírány z rostliny kultivované v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně 26. 8. 2004 v dopoledních hodinách.

Chemikálie

Naftochinony 1,4-naftochinon, juglon, lawson a plumbagin čistoty p.a. byly zakoupeny od firmy Sigma. Methanol pro HPLC a ostatní analytická činidla ACS čistoty byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich Chemical Corp. (St. Louis, USA). Standardní roztoky byly připraveny o koncentraci 100 µg/ml ACS methanolu (Sigma Aldrich, USA) a uchovávány ve tmě při 4 °C. Všechny roztoky byly filtrovány přes 0,45 µm teflonové membránové filtry (MetaChem, Torrance, CA, USA) před započítím HPLC analýzy.

HPLC analýza

HP 1100 chromatografický systém (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) byl vybaven vakuovým degaserem (G1322A), kvartérní pumpou (G1311A), autosamplerem (G13113A), kolonovým termostatem (G1313A) a detektorem diodového pole (model G1315B). ChemStation software (Rev A07.01) řídí celý kapalinový chromatografický systém. Isoflavony byly separovány na chromatografické koloně Zorbax C18-AAA (150 mm x 4,6 mm, velikostí částic 3,5 µm, Agilent Technologies USA, reverzní fáze) izokratickou elucí. Mobilní fází A byla 0,1% kyselina octová a mobilní fází B metanol. V poměru 35% kyselina a 65% methanol. Průtok byl 0.8 ml/min. Teplota na koloně byla nastavena na 40°C. Spektra byla snímána v rozmezí 190–400 nm.

Příprava reálného vzorku

Části rostlin byly lyofilizovány při teplotě –51°C po dobu 48 hodin. Po té byly jednotlivé části rostlin nahrubo drceny v třecí misce a nejemno zhomogenizovány pomocí mlýnku Ika A11 basic. 0,02-0,1 g biologického vzorku bylo přeneseno do 5 ml 100% methanolu a sonikováno při 38 kHz, 150 W (K5, Kraintek) za laboratorní teploty 30 minut. Rostlinný extrakt byl přefiltrován přes teflonový membránový filtr (0,45 µm).

VÝSLEDKY

Naftochinony mají pro své výrazné cytotoxické účinky nepochybně budoucnost v terapii různých onemocnění, včetně nádorových²⁶⁻²⁹. Je jen otázkou času, kdy budou vhodnou technologickou úpravou jejich nežádoucí účinky omezeny a naopak se zvýší jejich terapeutická účinnost, tj. terapeutický index. Proto je velmi důležité vytvořit a optimalizovat metody jejich izolace a identifikace, neboť se v rostlinách nevyskytují nikdy samostatně, ale v komplexu celé řady látek různé povahy (flavonoidy, třísloviny, organické kyseliny atd.). Bylo proto nutné optimalizovat metody HPLC z hlediska vodné a organické fáze a jejich vzájemného poměru, průtoku a teploty kolony, aby vyhovovaly detekci nejen jediného naftochinonu, ale naftochinonům několika.

Optimalizace stanovení naftochinonů

Při volbě mobilní fáze pro separaci naftochinonů (lawson, 1,4-naftochinon, juglon a plumbagin) jsme pro vodnou složku mobilní fáze vybírali ze dvou kyselin – kyseliny mravenčí a kyseliny octové³⁰. Porovnáním elučních charakteristik byla pro naše podmínky vhodnější kyselina octová. Retenční čas byl v jejím případě nižší než u kyseliny mravenčí, výška píků byla srovnatelná, plocha píků byla větší a píky byly více symetrické než v případě kyseliny mravenčí. Byl studován vliv koncentrace kyseliny octové na průběh separace. Zjistili jsme, že koncentrace 0,1 mol.l⁻¹ byla nejvhodnější, a to jak při změně průtoku, tak i při změně poměru mobilních fází. Jako organická část mobilní fáze byl testován acetonitril a methanol. Ač má acetonitril vyšší eluční sílu než methanol, v případě naftochinonů při použití uvedené kolony se to neprojevovalo. Retenční časy separovaných naftochinonů byly u stejných poměrů organická/vodná fáze přibližně stejné, symetrie píků však byla nízká, píky byly malé a široké. Plochy píků při použití acetonitrilu byly nižší než v případě methanolu.

Při testování vzájemného poměru organické a vodné složky mobilní fáze byl jako nejvhodnější zvolen poměr 35 % vodné složky (kys. octová) a 65 % organické složky (methanol), kdy byl pro většinu naftochinonů nejvýhodnější retenční čas, výška píků dosahovala maxima, plocha byla nejvýhodnější (s poměrem fází se měnila jen nepatrně) a byla zřejmá maximální symetrie píků. Protože naftochinony měly vysoký rozdělovací faktor, byla zvolena izokratická eluce.

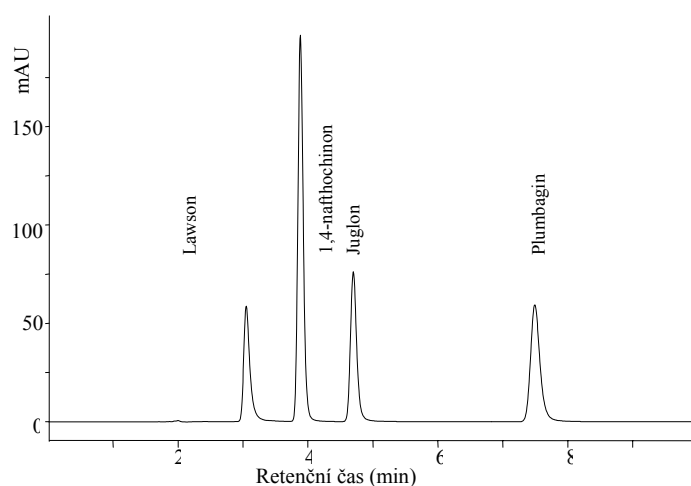
Byl testován průtok 0,5 až 1 ml.min⁻¹. Retenční čas se s průtokem snižoval, ale při průtoku vyšším jak 0,9 se neúměrně zvyšoval tlak v chromatografické soustavě. Byl proto zvolen průtok 0.8 ml.min⁻¹, při kterém byly píky naftochinonů vesměs nejvíce symetrické, výška píků dosahovala svého maxima a jejich plocha byla dostatečná pro detekci a separaci

naftochinonů. Teplota kolony byla testována v rozmezí 10°C až 40°C; Teplota 40°C byla zvolena jako maximální pro termolabilnost naftochinonů. Se zvyšující se teplotou kolony se snižoval retenční čas, zvyšovala se výška píků (měla rostoucí tendenci). Symetrie a plocha píků byly téměř konstantní. Pro analýzu byla tedy vybrána teplota 40°C.

Vliv koncentrace na stanovení naftochinonů pomocí HPLC-UV

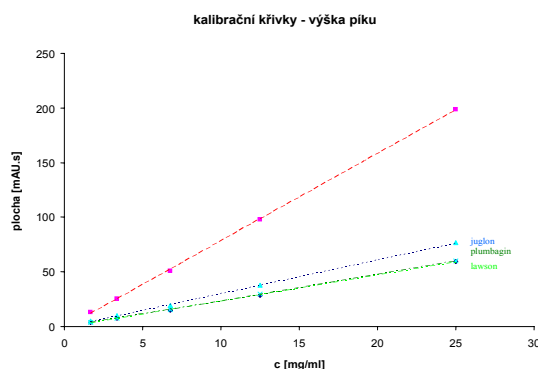
V případě, že byly zvoleny všechny optimální podmínky separace naftochinonů (lawson, 1,4-naftochinon, juglon a plumbagin), získali jsme velmi dobře separované a symetrické píky (jak je ukázáno na Graf. 1).

Graf 1: Chromatogram analýzy naftochinonů lawsonu, 1,4-naftochinonu, juglonu a plumbaginu



Závislosti odpovědi detektoru diodového pole (DAD) na koncentraci jednotlivých naftochinonů byly ve sledovaném intervalu lineární a relativní střední chyba (R.S.D.) se pohybovala kolem 4.5% ($n = 5$), jak je dobře vidět na grafu 2.

Graf 2: Kalibrační přímky jednotlivých naftochinonů



Rovnice kalibrační přímky a hodnota spolehlivosti závislosti proudové odezvy na koncentraci jsou uvedeny v tabulce 1. Limity detekce byly pro lawson 65 ng/ml, 1,4-naftochinon 50 ng/ml, juglon 75 ng/ml a plumbagin 39 ng/ml .

Tab. 1: Charakteristika analyzovaných naftochinonů

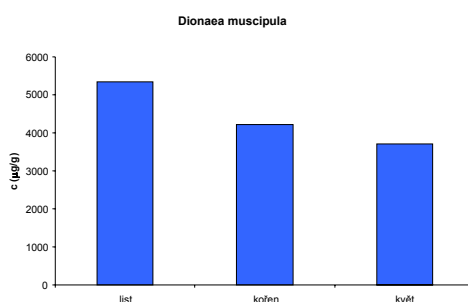
Naftochinon	t_R (min)	Regresní rovnice	R^2	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	LOQ ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	R.S.D. (%)	Symbol
1,4-naftochinon	3,8	$y = 4,2140x - 0,1826$	0,9999	0,0505	0,1683	1,91	■
Juglon	4,7	$y = 3,3388x - 0,2224$	0,9998	0,0756	0,2520	2,25	▲
Lawson	3,0	$y = 3,2256x - 0,1805$	0,9998	0,0653	0,2177	2,86	◆
Plumbagin	7,4	$y = 2,0054x - 0,0472$	0,9999	0,0385	0,1283	1,11	×

Určení obsahu naftochinonů v rostlinách

Dionaea muscipula

Po optimalizaci stanovení, byla metoda použita pro studium obsahu naftochinonů u několika rostlinných druhů. U masožravé rostliny mucholapky podivné (*Dionaea muscipula*; *Droseraceae*) byl určen obsah naftochinonů v jednotlivých rostlinných orgánech – list, kořen a květ. Zjistili jsme, že nejvíce plumbaginu obsahovaly listy (nerozdělené na řapík a čepel listovou) – 5338 $\mu\text{g/g}$, což odpovídá 100 % obsahu plumbaginu. Méně plumbaginu obsahovaly kořeny – 4230 $\mu\text{g/g}$ (79 %), nejméně pak květy – 3698 $\mu\text{g/g}$ (69 %).

Graf 3: Obsah plumbaginu – *Dionaea muscipula*



Drosera

Na obsah plumbaginu byly rovněž analyzovány tři druhy rodu rosnatka (*Drosera*) – *D. rotundifolia*, rostoucí i v ČR, *D. spathulata* a *D. capensis* (graf 4). Na základě našich analýz byl detekován nejvyšší obsah plumbaginu v případě *D. rotundifolia* – 18 $\mu\text{g/g}$ (100 %), dále

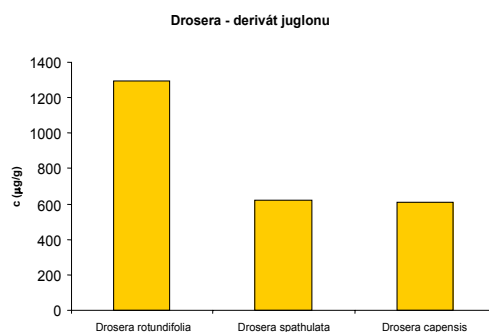
pak u *D. spathulata* – 16 µg/g (88 %). Nejnižší obsah plumbaginu byl detekován v případě *D. capensis* – 8 µg/g (44 %).

Graf 4: Obsah plumbaginu – jednotlivé druhy rodu *Drosera*



Ve všech druzích byl detekován rovněž derivát juglonu, pravděpodobně 7-methyljuglon, viz. graf 5 (porovnáním spekter juglonu a ostatních naftochinonů). Nejvyšší obsah tohoto naftochinonu byl zjištěn u *D. rotundifolia* – 1297 µg/g (100 %). Obsah juglon-derivátu v případě *D. spathulata* a *D. capensis* byl vyrovnaný – 623 µg/g (48 %) a 608 µg/g (46 %). Předpokládáme, že námi stanoveným derivátem juglonu je 7-methyljuglon. Z dostupné literatury je také patrné, že dosud nebyl potvrzen výskyt plumbaginu v případě *in vitro* pěstované *D. rotundifolia*, který se nám však podařilo detekovat. Dříve bylo popsáno, že druhy *D. rotundifolia* a *D. capensis* obsahují majoritní podíl plumbaginu³¹. My jsme však zjistili majoritní podíl 7-methyljuglonu.

Graf 5: Obsah derivátu juglonu – jednotlivé druhy rodu *Drosera*

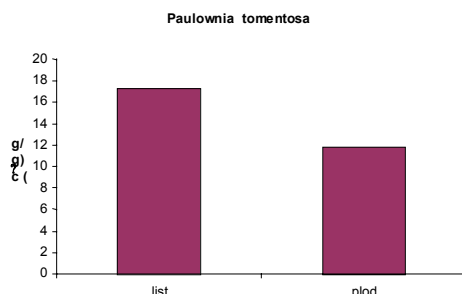


Paulownia tomentosa

Bylo pro nás velkým překvapením, že jsme naftochinon plumbagin detekovali rovněž v listech a plodech (mezokarp) pavlovnie plstnaté *Paulownia tomentosa*, kde tento naftochinon nebyl nikdy dosud detekován. Skutečností zůstává, že jeho obsah byl nízký – 17

μg/g (100 %) v případě listů a 11 μg/g (65 %) v případě plodů – mezokarpu. Literatura dosud výskyt tohoto naftochinonu v případě tohoto druhu neudává.

Graf 6: Obsah plumbaginu – *Paulownia tomentosa*



ZÁVĚR

Nejvyšší obsah plumbaginu byl jednoznačně detekován v listech *Dionaea muscipula*. I když je jeho obsah v dalších rostlinných orgánech nižší, stále svou koncentrací převyšuje koncentrace plumbaginu u dalších testovaných rostlin. V případě tohoto druhu nebyly další naftochinony detekovány. Překvapením je, že majoritním naftochinonem v případě *D. rotundifolia* a *D. capensis* není plumbagin, ale v rozporu s dostupnou literaturou juglonderivát, s největší pravděpodobností 7-methyljuglon. Velkým překvapením byla identifikace plumbaginu v případě *Paulownia tomentosa*, kdy dostupná literatura výskyt tohoto naftochinonu neuvádí. Plumbagin byl zde detekován jak v listech, tak i plodech – mezokarpu.

Poděkování

Príspevek vznikl za podpory IGA FaF VFU IG342012, IGA MZLU 3/2004, GAČR č. 525/04/P132 a Národního výzkumného centra LN00A081.

LITERATURA

Wagner, H. *Pharmaceutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe* (Gustav Fischer, Stuttgart, 1993).

Zhong, S. M., Waterman, P. G. & Jeffreys, J. A. D. Naphthoquinones and triterpenes from african Diospyros species. *Phytochem.* 23, 1067-1072 (1984).

Zakaria, M. B., Jeffreys, J. A. D., Waterman, P. G. & Zhong, S. M. Naphthoquinones and triterpenes from some asian Diospyros species. *Phytochem.* 23, 1481-1484 (1984).

- Dinda, B., Das, S. K. & Hajra, A. K. Chemical constituents of *Plumbago indica* roots. *Indian J. Chem. Sect. B.* 37, 672-675 (1998).
- Binder, R. G., E., B. M. & Flath, R. A. Eight 1,4-naphthoquinones from juglans. *Phytochem.* 28 (1989).
- Moore, S. B. & Hopke, N. J. Discovery of New Bacterial Polyketide Biosynthetic Pathway. *Chem. Biochem.* 2, 35-38 (2001).
- Rischer, H., Hamm, A. & Bringman, G. *Nepenthes insignis* uses a C2-portion of the carbon skelet of L-alanine acquired via its carnivorous organs, to build up the alleochemical plumbagin. *Phytochem.* 59, 603-609 (2002).
- Anonymous. (www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e20/20.htm, 2004).
- Bruneton, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants* (England UK, Andover, 1995).
- Anonymous. (<http://bodd.cf.ac.uk/BotDermFolder/BotDermP/PLUM.html>, 1999).
- Grieve, M. (<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/p/plumba54.html>, 2004).
- Satyavati, G. V., Gupta, A. K. & Tandon, N. in *Indian Council of Medicinal Research* 472 (New Delhi, 1987).
- Premakumari, P., Rathinam, K. & Santhakumari, G. Antifertility activity of plumbagin. *Ind. J. Med. Res.* 65, 829-838 (1977).
- Fournet, A. et al. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.* 32, 159-164 (1992).
- Grieve, M. (<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/w/walnut06.html#recpre>, 2004).
- Grieve, M. (<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/b/butnut98.html>, 2004).
- Czygan, F. C. *Sonnentaukraut. In Teedrogen und Phytopharmakd* (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1989).
- Janča, J. & Zentrich, J. *Herbář - 6 díl* (Eminem, Praha, 1998).
- Grieve, M. (<http://www.botanical.com/botanical/mgmh/s/sundew99.html>, 2004).
- Švihovec, J., Novotná, H., Kašparová, L. & all., e. *Pharmindex brevír* (MediMedia Information, spol. s. r. o., Praha, 2002).
- Janča, J. *Praktická homeopatie - cesta ke zdraví, rádce pro celou rodinu* (Eminem, Praha, 1992).
- MEDI stránky - katalog pro zdravotnictví* (Mediatel, Praha, 2002).
- FDA. (http://www.fda.gov/ora/fiars/ora_import_ia6663.html, 1992).
- Anonymous. (<http://users.quake.net/xderlab/hp/venus.html>, 1999).
- Murashige, T. & Skoog, F. *Physiol. Plant* 15, 473 (1962).
- Thangaraju, M., Kaufmann, S. H. & Couch, F. J. BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 275, 33487-22496 (2000).
- Tala, R. H. & Kendall, B. W. Differential mechanismus of cell killing by redox cycling and arylating quinones. *Arch. Toxicol.* 70, 482-489 (1996).

Babula, P., Havel, L., Strnad, M., Sladký, Z. & Kizek, R. in *XXVIII. Brněnské onkologické dny* (eds. Vyzula, R. & Žaloudík, J.) 273-277 (Masarykův onkologický ústav, Brno, 2004).

Babula, P., Kizek, R., Havel, L., Strnad, M. & Sladký, Z. in *VIII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů* (eds. Wimmerová, M., Beneš, P., Trnkova, L. & Zbořil, P.) 10 (Masarykova univerzita v Brně, Brno, 2004).

Lobstein, A. et al. Quantitative Determination of Naphthoquinones of *Impatiens* species. *Phytochem. Anal.* 12, 202-205 (2001).

Anonymous. (<http://bodd.cf.ac.uk/BotDermFolder/BotDermP/DROS.html>, 1999).