

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

IZOLACE ALKALOIDŮ DRUHU *GEISSOSPERMUM VELLOSI*  
ALLEMÃO A STUDIUM JEJICH BIOLOGICKÉ AKTIVITY VII.

Autor: Veronika Strašková

Vedoucí práce: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové 2023

**CHARLES UNIVERSITY**

**FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ**

**DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL BOTANY**



## **DIPLOMA THESIS**

**ISOLATION OF ALKALOIDS OF THE SPECIES *GEISSOSPERMUM*  
*VELLOSII* ALLEMÃO AND STUDY THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY VII.**

Author: Veronika Strašková

Thesis supervisor: PharmDr. Marcela Šafratová, Ph.D.

Hradec Králové 2023

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, 2023

.....

Veronika Strašková

## **Poděkování**

Nejprve bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Marcele Šafratové, Ph.D. za odborný dohled, za pomoc a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Také děkuji za trpělivost a čas strávený při experimentální práci v laboratoři. Děkuji doc. PharmDr. Jakubu Chlebkovi Ph.D. za pomoc při flash chromatografii. Mé díky patří i ostatním pracovníkům kateder Farmaceutické fakulty za poskytnuté rady a pomoc při identifikaci alkaloidů. Také bych ráda poděkovala mé babičce Jitce Fidrové za poskytnutí prostředí pro sepsání této diplomové práce.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 662.

# Obsah

Seznam obrázků.....	9
Seznam tabulek.....	10
Seznam použitých zkratek .....	11
1 Úvod.....	12
2 Cíl práce .....	14
3 Teoretická část .....	15
3.1 Čeleď Apocynaceae .....	15
3.1.1 Morfologický popis.....	15
3.1.2 Zástupci čeledě Apocynaceae s terapeutickým významem.....	16
3.1.2.1 <i>Catharantus roseus</i> G. Don.....	16
3.1.2.2 <i>Alstonia scholaris</i> R. Br. ....	17
3.1.2.3 <i>Carissa carandas</i> L. ....	18
3.1.2.4 <i>Nerium oleander</i> L. ....	19
3.1.2.5 <i>Plumeria rubra</i> L. ....	20
3.1.2.6 <i>Tabernaemontana divaricata</i> L.....	21
3.1.2.7 <i>Vinca minor</i> L.....	22
3.2 <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão.....	23
3.2.1 Taxonomické zařazení .....	24
3.2.2 Rozšíření a morfologický popis .....	25
3.2.3 Lidové léčení.....	25
3.2.4 Obsahové látky.....	26
3.2.5 Biologická aktivita .....	29
3.2.5.1 Antineoplastická aktivita.....	30
3.2.5.2 Antiplazmodiální aktivita.....	31
3.2.5.3 Anticholinesterásová aktivita .....	33

3.2.5.4	Antinociceptivní aktivita .....	35
3.2.5.5	Antimikrobiální aktivita .....	35
4	Experimentální část .....	37
4.1	Materiál a laboratorní vybavení .....	37
4.1.1	Rozpouštědla .....	37
4.1.2	Chemikálie .....	37
4.1.3	Chromatografické sorbenty .....	38
4.1.4	Pomocný materiál .....	38
4.1.5	Detekční činidla .....	38
4.1.5.1	Dragendorffovo činidlo .....	38
4.1.5.2	Mayerovo činidlo .....	38
4.1.6	Mobilní fáze pro chromatografii na tenké vrstvě .....	39
4.1.7	Přístrojové vybavení .....	39
4.1.8	Rostlinný materiál .....	40
4.2	Obecné postupy .....	40
4.2.1	Příprava rozpouštědel a skladování .....	40
4.2.2	Příprava litých desek .....	40
4.2.3	Deaktivace adsorbentů pro flash chromatografii .....	40
4.2.4	Příprava suchého roztěru do předkolony .....	40
4.2.5	Tenkovrstvá chromatografie .....	41
4.2.6	Detekce alkaloidů .....	41
4.2.7	Eluce a odpaření rozpouštědel .....	41
4.2.8	Vytřepávání .....	42
4.2.9	Skladování alkaloidů .....	42
4.2.10	Strukturní analýza .....	42
4.2.10.1	GS-MS analýza .....	42

4.2.10.2	NMR analýza.....	43
4.2.10.3	Optická otáčivost.....	43
4.3	Stanovení biologické aktivity .....	44
4.3.1	Chemikálie .....	44
4.3.2	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči <i>hAChE</i> a <i>hBChE</i> .....	44
4.3.3	Pufry.....	44
4.3.4	Rekombinantní enzymy .....	45
4.3.5	Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů.....	45
4.4	Izolace alkaloidů .....	46
4.4.1	Frakce GV-2.....	46
4.4.1.1	Frakce GV-2-B.....	47
4.4.1.2	Frakce GV-2-F .....	47
4.4.2	Frakce GV-7-D .....	48
4.4.2.1	GV-7-D-3 .....	48
4.4.2.2	GV-7-D-5 .....	48
4.4.3	Frakce GV-4-F .....	49
4.4.3.1	Frakce GV-4-F-(22-26).....	52
4.4.3.2	Frakce GV-4-F-(27-28).....	52
5	Výsledky .....	54
5.1	Izolované alkaloidy .....	54
5.1.1	GV-2-B-B – 1-acetyl- $\beta$ -karbolin.....	54
5.1.1.1	MS analýza:.....	54
5.1.1.2	NMR analýza: .....	54
5.1.1.3	Optická otáčivost:.....	54
5.1.2	GV – 2 – F – 3 – Eburnamonin.....	55
5.1.2.1	MS analýza:.....	55

5.1.2.2	NMR analýza: .....	55
5.1.2.3	Optická otáčivost:.....	55
5.1.3	GV-7-D-3: nová látka .....	56
5.1.3.1	MS analýza:.....	56
5.1.3.2	NMR analýza: .....	56
5.1.3.3	Optická otáčivost:.....	56
5.1.4	GV-7-D-5 – Harmin.....	57
5.1.4.1	MS analýza:.....	57
5.1.4.2	NMR analýza: .....	57
5.1.5	GV-4-F-(22-26)-1-A – <i>O</i> -demethylaspidokarpin .....	58
5.1.5.1	MS analýza:.....	58
5.1.5.2	NMR analýza: .....	58
5.1.5.3	Optická otáčivost:.....	58
5.1.6	GV-4-F-(27-28)-H – Aspidokarpin.....	59
5.1.6.1	MS analýza:.....	59
5.1.6.2	NMR analýza: .....	59
5.1.6.3	Optická otáčivost:.....	59
5.1.7	GV-4-F-(27-28)-S – Aspidolimidin.....	60
5.1.7.1	MS analýza:.....	60
5.1.7.2	NMR analýza: .....	60
5.1.7.3	Optická otáčivost:.....	60
5.2	Biologická aktivita izolovaných látek.....	61
6	Diskuse a závěr .....	62
7	Seznam použité literatury.....	65
	Abstrakt .....	74
	Abstract.....	75

## Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Catharanthus roseus</i> G. Don .....	17
Obrázek 2: <i>Alstonia scholaris</i> R. Br. ....	18
Obrázek 3: <i>Carissa carandas</i> L. ....	19
Obrázek 4: <i>Nerium oleander</i> L. ....	20
Obrázek 5: <i>Plumeria rubra</i> L. ....	21
Obrázek 6: <i>Tabernaemontana divaricata</i> L. ....	22
Obrázek 7: <i>Vinca minor</i> L. ....	23
Obrázek 8: <i>G. vellosii</i> Allemão .....	24
Obrázek 9: <i>G. vellosii</i> kmen (vlevo) a listy (vpravo) .....	25
Obrázek 10: Chromatogram frakce GV-2 vyvinutý v soustavě S <sub>2</sub> po detekci Dragendorffovým činidlem se zaměřením na podfrakci B a F .....	47
Obrázek 11: Záznam průběhu separace alkaloidů z flash chromatografie .....	50
Obrázek 12: Chromatogram spojených podfrakcí GV-4-F-(1-21) – GV-4-F-(166) po flash chromatografii umístěný pod UV lampu .....	51
Obrázek 12: Strukturní vzorec 1-acetyl-β-karbolinu .....	54
Obrázek 13: Strukturní vzorec eburnamoninu .....	55
Obrázek 12: Strukturní vzorec nové látky .....	56
Obrázek 15: Strukturní vzorec harminu .....	57
Obrázek 14: Strukturní vzorec <i>O</i> -demethylaspidokarpinu .....	58
Obrázek 15: Strukturní vzorec aspidokarpinu .....	59
Obrázek 16: Strukturní vzorec aspidolimidinu .....	60

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Taxonomické zařazení <i>G. vellosi</i> Allemão.....	24
Tabulka 2: Přehled chemických struktur alkaloidů izolovaných z <i>G. vellosii</i> s provedenými studiiemi biologické aktivity.....	27
Tabulka 3: Antiplazmodiální aktivita extraktu <i>G. vellosii</i> testovaná <i>in vitro</i> .....	32
Tabulka 4: Antiplazmodiální aktivita extraktu <i>G. vellosii in vivo</i> .....	32
Tabulka 5: <i>In vitro</i> a <i>in vivo</i> analýza alkoholového macerátu <i>G. vellosii</i> .....	32
Tabulka 6: Přehled antiplazmodiální aktivity methanolového extraktu a alkaloidů z kůry <i>G. vellosii</i> vůči kmeni <i>P. falciparum</i> citlivému na chlorochin.....	33
Tabulka 7: Souhrnný přehled výsledků testů anticholinesterásové aktivity. ....	34
Tabulka 8: Výsledky antibakteriální aktivity ethanolového extraktu <i>G. vellosii</i> diskovou difúzí na agaru (v závorce jsou uvedeny zóny bakteriální inhibice).....	36
Tabulka 9: Přehled použitých rozpouštědel.....	37
Tabulka 10: Přehled použitých chemikálií .....	37
Tabulka 11: Mobilní fáze pro chromatografii na tenké vrstvě .....	39
Tabulka 12: Přehled použitých chemikálií .....	44
Tabulka 13: Hmotností frakcí GV-2-A – GV-2-F.....	46
Tabulka 14: Hmotností frakcí GV-2-B-A a GV-2-B-B.....	47
Tabulka 15: Hmotností frakcí GV-2-F-1 – GV-2-F-3.....	48
Tabulka 16: Hmotností frakcí GV-7-D-1 – GV-7-D-5 .....	48
Tabulka 17: Eluční gradient chromatografie .....	50
Tabulka 18: Hmotností frakcí GV-4-F-(1-21) – GV-4-F-(166).....	51
Tabulka 19: Hmotností frakcí GV-4-F-(22-26)-1-A – GV-4-F-(22-26)-1-C.....	52
Tabulka 20: Hmotností frakcí GV-4-F-(27-28)-H a GV-4-F-(27-28)-S .....	52
Tabulka 21: Hmotností frakcí GV-4-F-(27-28)-H a GV-4-F-(27-28)-S .....	53
Tabulka 22: Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů.....	61

## Seznam použitých zkratek

<b>AD</b>	Alzheimerova choroba
<b>AChE</b>	acetylcholinesteráza
<b>BChE</b>	butyrylcholinesteráza
<b>c-Myc</b>	buněčná cytomatóza
<b>CNS</b>	centrální nervová soustava
<b>CRCP</b>	kastračně rezistentní karcinom prostaty
<b>DPPH</b>	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
<b>GC</b>	plynová chromatografie
<b>GC-MS</b>	plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
<b>GV</b>	<i>Geissospermum vellosii</i>
<b>HIV</b>	lidský virus imunitní nedostatečnosti
<b>IC<sub>50</sub></b>	inhibiční koncentrace enzymu na 50 %
<b>LNCaP</b>	karcinom lymfatických uzlin prostaty
<b>MCF-7</b>	buněčná linie karcinomu prsu
<b>MDA-MB-231</b>	buněčná linie lidského adenokarcinomu prsu
<b>MF</b>	mobilitní fáze
<b>MS</b>	hmotností spektrometrie
<b>NMR</b>	nukleární magnetická rezonance
<b>ORSA</b>	oxacilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>P21</b>	protein 21
<b>P27</b>	protein 27
<b>P53</b>	protein 53
<b>PC3</b>	buněčná linie karcinomu prostaty
<b>TLC</b>	tenkovrstvá chromatografie
<b>USA</b>	Spojené státy americké
<b>UV</b>	ultrafialový
<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace

# 1 Úvod

Léčivé rostliny byly lidstvem používány k prevenci a léčbě různých onemocnění již od nepaměti. V třetích zemích, kde se nachází velká většina světové populace, představuje léčba založená na rostlinných drogách nebo extraktech primární zdroj zdravotní péče často z důvodu lepší kulturní přijatelnosti, lepší dostupnosti a kompatibility s lidským tělem. Dodnes jsou v některých komunitách rostliny mnohdy jediným způsobem léčby některých onemocnění. Znalost léčivých rostlin a jejich využití v tradičním lidovém léčitelství přispěla k objevu nových biologicky aktivních molekul, a to vedlo k vývoji současně používaných léčiv. [1]

V tradičním léčitelství i v konvenční medicíně je velmi významná čeleď Apocynaceae (toješťovitě). Rostliny z této čeledi byly používány v lidovém léčitelství po celém světě. Jejich léčivá aktivita je převážně dána obsahem alkaloidů indolového a steroidního typu. [2] Součástí této čeledi je i strom *Geissospermum vellosii* Alemao pocházející z amazonského deštného pralesa. Tato rostlina byla v tradiční medicíně hojně využívána k léčbě různých patologických stavů zahrnujících bakteriální, zánětlivá a plísňová onemocnění. Z tohoto důvodu byla rostlina výzkumníky usilovně zkoumána. Od šedesátých let minulého století se začaly objevovat analytické studie dokumentující přítomnost indolových alkaloidů v kmenové kůře tohoto stromu. Indolové alkaloidy z *G. vellosii* prokázaly ve studiích významné biologické aktivity, a to především antineoplastickou, antiplazmodiální a anticholinesterázovou aktivitu. Vzniklo také malé množství studií dokumentující antinociceptivní, protizánětlivou a antimikrobiální aktivitu. [3, 4]

Alkaloidy, u kterých byla objevena význačná biologická aktivita, mohou sloužit jako potenciální terapeutické alternativy nebo se jejich molekulární struktura může využít pro vývoj nových léčiv. Dle biologických aktivit mohou být alkaloidy *G. vellosii* užitečné při terapii nádorových onemocnění, malárie a Alzheimerovy choroby (AD). Tyto typy onemocnění v současnosti představují závažný celosvětový problém a jsou příčinou úmrtí milionů lidí. [4] Dle statistik jsou nádorové onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtí ve Spojených státech, a i když úmrtnost na rakovinu kvůli pokroku v léčbě klesá, stále roste incidence rakoviny prostaty, prsu a děložního čípku s velkými rasovými rozdíly v úmrtnosti. [5] Pozornost je třeba věnovat i malárii, u které potřeba vyvinout nová léčiva pramení ze vzniku rezistence původců na současná antimalarika a také kvůli stoupající

odolnosti vektorů na dostupné insekticidy. [6] Neméně závažným onemocněním je AD, u které dochází ke zvýšení incidence z důvodu prodloužení průměrné délky života. V současnosti dostupná léčiva pouze ovlivňují progresi tohoto onemocnění a neexistuje lék, který by onemocnění dokázal zcela vyléčit. [7]

Při terapii AD se převážně využívá léčiv cílících na cholinesterázy. Jedná se o enzymy, jejichž blokádou dochází k zabránění nadměrnému odbourávání acetylcholinu, a to vede ke zlepšení acetylcholinergní transmise. Tento přístup sice nevede k vyléčení AD, ale ovlivní postižené kognitivní funkce a zmírní tak projevy tohoto onemocnění. Jelikož je těchto léčiv zatím nedostatek a zároveň dostupná léčiva vykazují řadu nežádoucích účinků, je stále snaha vyvinout léčiva nová. [7]

## 2 Cíl práce

- 1) Zpracování literární rešerše se zaměřením na alkaloidní rostliny čeledi Apocynaceae
- 2) Izolace alespoň 3 čistých alkaloidů a podíl na určení jejich fyzikálně-chemických vlastností
- 3) Podíl na stanovení biologické aktivity u izolovaných látek
- 4) Vyhodnocení výsledků.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Čeleď Apocynaceae

Čeleď Apocynaceae (toješťovitě) patří mezi deset největších a nejvýznamnějších čeledí kvetoucích rostlin. [8] Jedná se o krytosemenné, dvouděložné rostliny z řádu Gentianales (hořcotvaré). Tato čeleď se dělí na pět podčeledí: Apocynoideae, Asclepiadoideae, Periplocoideae, Rauvolfioideae, Secamonoideae a zahrnuje přibližně 4500 druhů zařazených do cca 370 rodů. [8, 9] Čeleď zahrnuje velké i malé stromy, keře, polokeře, liány, sukulenty, trvalky a vzácně i jednoleté bylinky. [10] Zástupci této čeledi jsou rozšířeny globálně s největším výskytem v tropických a subtropických oblastech. [8, 9] Na území České republiky se vyskytují původní druhy *Vinca minor* L. (barvínek menší) a *Vincetoxicum hirundinaria* Medik. (tolita lékařská) a invazivní druh původem z východního pobřeží Severní Ameriky *Asclepias syriaca* L. (klejicha hedvábná). [11, 12]

#### 3.1.1 Morfologický popis

Pro tuto čeleď jsou charakteristické jednoduché listy s převážně vstřícným postavením. Ve výjimečných případech se může vyskytovat i postavení přeslenité nebo střídavé. Listy bývají nejčastěji řapíkaté, ale u některých rostlin mohou být i přisedlé. Čepele jsou většinou celokrajné, vzácně vroubkované nebo s ostny na okraji. [10] Listy mají dle čepele tvar vejčitý, obvejčitý, čárkovitý, kopinatý nebo eliptický. [13] Palisty většinou chybí. Obvykle je přítomen v mléčnicích vznikající latex, který je nejčastěji bílé barvy. Příležitostně se může vyskytovat latex čirý, krémový, žlutý nebo narůžovělý. Různě zbarvené květy jsou často uspořádány do cymózních (vrcholičnatých) květenství nebo se vyskytují jednotlivě. Květy jsou vždy oboupohlavné, většinou 5četné a vzácně 4četné (rod *Leuconotis* Jack). Koruna bývá pravidelná a tvořená navzájem srostlými korunními lístky. Plodem může být bobule, peckovice, měchýřek, nažka a popřípadě tobolka. [10] Pro semena, která mohou být ochmýřena nebo křídlatá, je typický olejovitý endosperm. [14]

### 3.1.2 Zástupci čeledě Apocynaceae s terapeutickým významem

Zástupci čeledi Apocynaceae se stali bohatým zdrojem léčivých látek, které nacházejí uplatnění v tradiční i konvenční medicíně. [1] Jejich biologická aktivita pravděpodobně souvisí s přítomností sekundárních metabolitů různých strukturních typů např. alkaloidů, flavonoidů, terpenických látek, ale i uhlovodíků a jednoduchých fenolů. [15] Významné jsou především indolové alkaloidy, které jsou v této čeledi hojně zastoupeny. [1] Tradičně se druhy čeledi Apocynaceae používají k léčbě horečky, bolesti, gastrointestinálních onemocnění a diabetu mellitu. [9] Uplatňují se i v léčbě kožních a ektoparazitických onemocnění. [1] Kromě medicíny se různé části rostlin této čeledi používají jako potraviny, krmivo, jedy i parfémy. Hojně se v průmyslu využívá i jejich dřevo. Díky velkým a barevným květům se staly oblíbenými i jako okrasné rostliny. [1]

Mezi terapeuticky významné druhy se řadí *Catharanthus roseus* G. Don, *Alstonia scholaris* R. Br., *Carissa carandas* L., *Nerium oleander* L., *Plumeria rubra* L., *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex Kurz, *Strophanthus gratus* Baill., *Tabernaemontana divaricata* L., *Thevetia peruviana* K. Schum., *Vinca minor* L. a další. [1, 16, 17]

#### 3.1.2.1 *Catharanthus roseus* G. Don

*Catharanthus roseus* G. Don (barvínkovec růžový) (Obrázek 1) je z medicínského hlediska nejdůležitější rostlinou této čeledi, protože izolované látky se používají na léčbu různých typů rakoviny. [1] Jedná se o stálezelený keř nebo bylinu původem z Madagaskaru. V současnosti je *C. roseus* rozšířen celosvětově s největší distribucí v tropických a subtropických oblastech. Ve volné přírodě je vnímán jako ohrožený druh. [1, 18] Charakteristické jsou leskle zelené oválné až podlouhlé listy uspořádané v protilehlých párech. Květy se vyznačují bílým až tmavě růžovým zbarvením s tmavě červeným středem. Plodem je souplodí měchýřků. [18, 19]

V minulosti se droga používala v lidovém léčitelství na snížení hladiny glukózy v krvi, protože se věřilo, že podporuje produkci inzulínu nebo zvyšuje spotřebu cukrů z potravy. [1, 18] Droga se dále tradičně používá zevně při krvácení z nosu a dásní, vosích bodnutí a bolesti svalů. Rovněž se používá vnitřně k léčbě ztráty paměti, gastritidy, enteritidy a cystitidy. [18]

Udává se, že se v této rostlině vytváří více než 100 monoterpenoidních alkaloidů. [18] Alkaloidy obsažené v rostlině se vyznačují hypotenzním, sedativním

a protirakovinným účinkem, dále mohou způsobovat relaxaci hladkého svalstva a depresi CNS. [1] Mezi nejdůležitější izolované alkaloidy s antineoplastickým účinkem se řadí vinblastin a vinkristin, jejichž hlavním zdrojem jsou listy. Tyto alkaloidy se používají v léčbě Hodgkinových lymfomů, lymfoblastické leukemie, rakoviny prsu a kůže. [19] Od těchto látek byla dále odvozena některá dnes používaná chemoterapeutická léčiva. Z kořenů byly izolovány další biologicky aktivní alkaloidy, které dříve našly uplatnění v terapii, jako ajmalicin, serpentin a reserpin. Tyto alkaloidy se vyznačují antihypertenzním účinkem. [18]



**Obrázek 1: *Catharanthus roseus* G. Don [20]**

### **3.1.2.2 *Alstonia scholaris* R. Br.**

*Alstonia scholaris* R. Br. (Obrázek 2) je velký stálezelený strom pocházející z Indočíny. Dnes hojně roste v Indii, jižní Číně, severní Austrálii, na Srí Lance a Šalamounových ostrovech. [21] V posledních letech se *A. scholaris* začala vysazovat i v teplejších oblastech USA, kde se před tím nikdy nenacházela. [22] Latinský název rostlina získala, jelikož se její dřevo často používalo na výrobu školních tabulí. Typická je hrubá, šedavě hnědá kůra, z které po poranění vytéká mléčný latex. Kožovité, eliptické listy vyrůstají v přeslenu. Zelenavě bílé květy jsou uspořádány v očnicových latách. Plodem je měchýřek obsahující papilózní semena s nahnědlými vlásky. [21]

Droga se v minulosti používala k léčbě chronických respiračních onemocnění. [23] Rostlina se tradičně používá k léčbě dalších onemocnění, kdy se kůra ve formě odvarů používá při horečce, průjmu, dyspepsii, malárii, úplavici a kožních

chorobách. Mléčný latex se v rámci tradiční medicíny aplikuje na bércové vředy a ulevuje při revmatických bolestech. Šťáva z listu se společně s čerstvým kořenem zázvoru podává ženám po porodu pro zvýšení laktace, zlepšuje trávení a zmírňuje poporodní slabost. Droga se rovněž uplatňuje jako antidotum při hadím uštknutí. [21, 22]

Z rostliny bylo doposud izolováno a identifikováno téměř 400 sloučenin. Jedná se o alkaloidy, flavonoidy, steroidy a fenolové kyseliny. [21, 22] Mezi izolované indolové alkaloidy patří pikrinin, vallesamin a scholaricin. Tyto alkaloidy v *in vitro* testech prokázaly analgetickou a protizánětlivou aktivitu inhibicí zánětlivých mediatorů cyklooxygenázy 1 a 2 a arachidonát 5 -lipoxygenázy. [23] Rostlina také díky obsahovým látkám vykazuje antioxidační, antineoplastickou, antimikrobiální, antimalarickou a antiastmatickou aktivitu. [21]



**Obrázek 2: *Alstonia scholaris* R. Br. [24]**

### **3.1.2.3 *Carissa carandas* L.**

*Carissa carandas* L. (karanda obecná) (Obrázek 3) je stálezelený opadavý keř s širokou distribucí v tropických a subtropických oblastech. Pravděpodobně pochází z Himalájí, ale někteří botanici přisuzují jeho původ na Jávě. Vyznačuje se ostrými ostny na větvích, podlouhlými kuželovitými listy a bílými květy. Plodem jsou bobule uspořádané ve shlucích po 3 až 10 plodech. [1, 25]

*C. carandas* je známá jako tradiční léčivá rostlina již po tisíce let. [25] Kořeny jsou prospěšné při problémech s močovými cestami. Používají se také jako stomachikum a anthelmintikum. Kořenová pasta je tradičně používána jako repelent proti hmyzu a při

diabetických vředech. Z listů se připravuje odvar vhodný v raném stadiu remitentní horečky. Antipyretické účinky mají i nezralé růžově bílé plody. Naopak zralé červené až tmavě fialové plody pomáhají ulevit od žlučových potíží. [1]

Za hlavní farmakologicky aktivní metabolity se považují alkaloidy, flavonoidy, kardioaktivní glykosidy, saponiny, fenoly, triterpenické látky a třísloviny. V kořenech jsou obsaženy látky jako 2-acetylphenol, karinol, lupeol, seskviterpeny karisson a karindon,  $\beta$ -sitosterol a  $\alpha$ -amarin. Listy jsou bohaté na třísloviny a triterpenoidy. Zatímco u plodů se vyskytuje karisol, linalool, karisson, kyselina karissová, karindon, kyselina ursolová, kyselina askorbová a další. Díky obsahovým látkám má rostlina širokou škálu farmakologických účinků a to protirakovinné, antioxidační, kardiovaskulární, protizánětlivé, analgetické, antipyretické, antikonvulzivní, antidiabetické, antimikrobiální a mnoho dalších účinků. [25]



**Obrázek 3: *Carissa carandas* L. [26]**

#### **3.1.2.4 *Nerium oleander* L.**

*Nerium oleander* L. (oleandr obecný) (Obrázek 4) je pěstován jako okrasný stálezelený keř nebo malý strom. Pochází se středomořských oblastí Afriky a Evropy. [27] Pro *N. oleander* jsou charakteristické tmavě zelené až šedozelené čárkovité, kožovité listy s výraznou žilnatinou a bílé, červené, růžové nebo fialové květy, které jsou uspořádány ve shlucích a umístěny na špičkách větvíček. [1, 27] Plodem je úzký lusk obsahující mnoho ochmýřených semen. [27]

Všechny části této rostliny mohou způsobit smrtelnou otravu. Tato toxicita je způsobena produkcí kardioaktivních glykosidů, mezi které patří oleandrin, folineriin,

adynerin a digitoxigenin. Největší množství těchto látek obsahují kořeny a semena. Srdeční glykosidy inhibují Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasu na cytoplazmatické membráně srdečních buněk. To vede k pozitivně inotropnímu účinku, zvýšení klidového membránového potenciálu a hyperkalemii. [27] Kromě glykosidů *N. oleander* obsahuje alkaloidy, flavonoidy, třísloviny, fenoly, saponiny, pregnany, triterpeny a steroidy. [28]

V lidovém léčitelství byla rostlina navzdory toxicitě používána k léčbě srdečního selhání, malárie, lepry, kožních a gastrointestinálních onemocnění. [27] Tradičně se připravuje odvar z listů ke snížení otoků. Macerované listy přispívají ke snížení míry vypadávání vlasů. Květy se používají k léčbě zánětů, chronické bolesti kloubů a svalů, bolesti hlavy a lumbaga. [1] V minulosti byla rostlina zneužívána jako abortivum. [27] Uplatnění oleandr nalezl také v léčbě rakoviny, diabetu mellitu a některých mikrobiálních infekcí. [29]



**Obrázek 4: *Nerium oleander* L. [30]**

### **3.1.2.5 *Plumeria rubra* L.**

*Plumeria rubra* L. (plumerie červená) (Obrázek 5) je opadavý keř nebo malý strom často pěstovaný jako okrasná rostlina. Pochází z Mexika, odkud došlo k rozšíření do celého světa. [31] *P. rubra* se vyznačuje silnými větvemi s šedou kůrou. Při jejich poranění dochází k vytékání bílého latexu, který může iritovat pokožku. [32] Tmavě zelené listy obvejčitého nebo kopinatého tvaru jsou střídavě uspořádány. [32, 33] Rostlina je pěstována hlavně kvůli krásně vonícím květům červené, růžové, žluté nebo bílé barvy. Plodem je souplodí měchýřků. [31]

Tradičně se droga používá na léčbu různých onemocnění. Odvar z kůry je v domorodém léčitelství připravován k léčbě pohlavních chorob, revmatismu, lepry a průjmu. Odvar rovněž slouží k léčbě astmatu, podpoře menstruace a zmírnění horečky. Listy jsou nápomocny při léčbě vředů, zánětů a lepry. Květy a latex se tradičně využívají při zástavě vaginálního krvácení a při bolesti zubů. [33]

Z rostliny bylo izolováno více než 110 látek. Mezi obsahové látky se řadí iridoidní glykosidy, terpeniody, flavonoidy, alkaloidy, kardioaktivní glykosidy, estery mastných kyselin, aminokyseliny, sacharidy, kumariny, lignany a silice. Nejdůležitější obsahovou látkou s významnou farmakologickou aktivitou je cytotoxický iridoid fulvoplumierin, u kterého byla prokázána schopnost inhibice HIV-1 a HIV-2 reverzní transkriptázy. Rostlina má významné antibakteriální, antivirové, protirakovinné, protizánětlivé, antipyretické, hepatoprotektivní, anthelmintické a další účinky. [31]



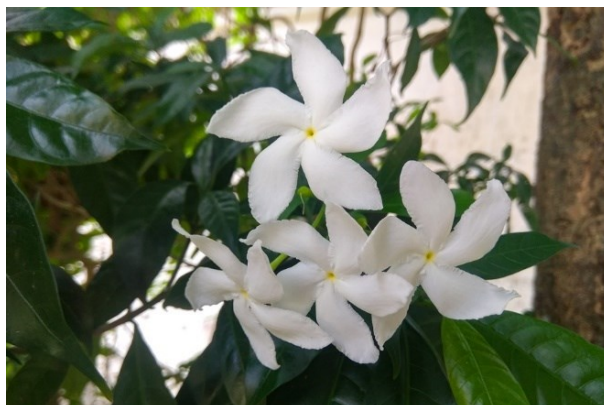
**Obrázek 5: *Plumeria rubra* L. [34]**

### **3.1.2.6 *Tabernaemontana divaricata* L.**

*Tabernaemontana divaricata* L. (Obrázek 6) je malý stálezelený keř. [1] Rostlina je široce rozšířena v tropických a subtropických oblastech. Převážně se pěstuje v Thajsku a Číně. [35] Charakteristické jsou vodorovné větve se stříbřitě šedou kůrou, mléčný latex a velké, lesklé, sytě zelené listy. Bílé voskové květy vypadající jako větrníky jsou shromážděny v malých shlucích na špičkách stonku. [36, 37] Plodem jsou oranžové až červené měchýřky vyskytující se vzácně. [37]

V tropech se *T. divaricata* velmi hojně používá jako léčivá rostlina. Považuje se za „všelék“ na gastrointestinální a dermální onemocnění. Odvar z kořenů zmírňuje průjem a břišní obtíže. Kořeny, listy a květy se používají jako antidota při uštknutí hady a štíry. Nálev z rostliny se podává při tropické horečce. [1]

Z *T. divaricata* bylo doposud izolováno a identifikováno více než 66 alkaloidů. Mezi další izolované složky patří flavonoidy, terpenoidy, fenolové kyseliny a steroidy. Díky obsahovým látkám má rostlina antioxidační, antineoplastické, protinfekční a anestetické účinky. Také způsobuje zvýšení cholinergní aktivity v centrální a periferní nervové soustavě, tato biologická aktivita může přinášet benefity při léčbě neurodegenerativních onemocnění zahrnující Alzheimerovu chorobu a myastenii gravis. [36]



Obrázek 6: *Tabernaemontana divaricata* L. [38]

### 3.1.2.7 *Vinca minor* L.

*Vinca minor* L. (barvínek menší) (Obrázek 7) je vytrvalý polokeř pěstovaný jako významná léčivá rostlina. Díky krásným šedivě modrým květům se *V. minor* stala oblíbená i jako okrasná rostlina. Původně pochází ze střední a jižní Evropy. Dnes je již rozšířena po celém světě včetně území České republiky. [11, 39]

*V. minor* se v evropském lidovém léčitelství používá vnitřně na léčbu poruch mozku a paměti. [40] Zejména podporuje látkovou výměnu a zlepšuje prokrvení mozku. Kromě mozkových poruch se užívá vnitřně při hypertenzi, zvýšené hladině glukózy v krvi, gastritidě, enteritidě, cystitidě, průjmu a také pomáhá při odvykání. Rostlina se

používá i zevně při bolestech v krku a k zastavení krvácení. Zároveň podporuje léčbu ekzémů, abscesů a podlitin. [11, 40]

Z rostliny bylo doposud izolováno více než 60 alkaloidů. [39] Mezi nejvýznamnější patří vinkamin – indolový alkaloid eburnaminového typu s největší koncentrací v listech. Vinkamin se vyznačuje modulačními účinky na mozkovou cirkulaci a neuronální homeostázu. Zároveň má antihypoxické a neuroprotektivní účinky. [40] Mezi další alkaloidy, které byly z rostliny izolovány se řadí například vinkamidin, vincamon, vincaminol, vincaminorin, reserpin a minovin. Nedávno došlo k izolaci dvou nových alkaloidů – vallesiachotamin a isovallesiachotamin. Bylo zjištěno, že alkaloidní extrakt z rostliny vykazuje vysokou inhibiční aktivitu vůči lipidové peroxidaci a jsou schopny vychytávat DPPH radikály. Tato schopnost umožňuje jejich využití v terapii různých typů maligních nádorů. [39, 41] Kromě alkaloidů rostlina obsahuje další látky jako např. hořčiny a flavonoidy. [42]



**Obrázek 7: *Vinca minor* L. [43]**

### **3.2 *Geissospermum vellosii* Allemão**

*Geissospermum vellosii* Allemão (Obrázek 8) je středně velký strom známý i pod názvem *Geissospermum laeve*, *Tabernaemontana leavis*, Pau-Pereira, Pao-de-pente, Pereiroá, Paoforquilha, Uba-açú, Camará-de-bilro, Camará-domato, Canudo amargoso, Triguaba nebo Pinguaciba. Tento strom byl v některých vědeckých pracích zařazen mezi deset nejvýznamnějších brazilských léčivých stromů. Díky svým léčivým vlastnostem se

od roku 1838 stal předmětem rozsáhlého zájmu a zkoumání z chemického a farmakologického hlediska. [6, 7]



Obrázek 8: *G. vellosii* Allemão [44]

### 3.2.1 Taxonomické zařazení

Tabulka 1: Taxonomické zařazení *G. vellosii* Allemão. [45, 46]

Klasifikace		Název	
Česky	Latinsky	Česky	Latinsky
Říše	Regnum	Rostliny	Plantae
Kmen	Phylum	Cévnaté rostliny	Tracheophyta
Oddělení	Divisio	Krytosemenné rostliny	Magnoliophyta
Třída	Cladus	Vyšší dvouděložné	Eudicots
Řád	Ordo	Hořcotvaré	Gentianales
Čeleď	Familia	Toješťovité	Apocynaceae
Podčeleď	Subfamilia	Rauvolfioideae	
Rod	Genus	<i>Geissospermum</i>	

### 3.2.2 Rozšíření a morfologický popis

*G. vellosii* pochází ze severu Jižní Ameriky, kde je v současnosti široce rozšířen. Roste zde na území amazonského pralesa rozkládajícího se v Brazílii, Venezuele, Kolumbii, Bolívii, Ekvádoru, Surinamu, Guyaně a Francouzské Guyaně. [6]

*G. vellosii* dorůstá do výšky až 30 metrů. Kmen stromu (Obrázek 9) bývá nepravidelně a hluboce rozpučaný v podélném směru s malým množstvím latexu. Bělavý latex je nejčastěji pozorován na koncích mladých větví. Válcovité větve mohou být hnědé, bílé, našedlé nebo nazelenalé. Jednoduché listy jsou uspořádány střídavě (Obrázek 9). Květenství tohoto stromu jsou vrcholičnatá. [15]



Obrázek 9: *G. vellosii* kmen (vlevo) a listy (vpravo) [47]

### 3.2.3 Lidové léčitelství

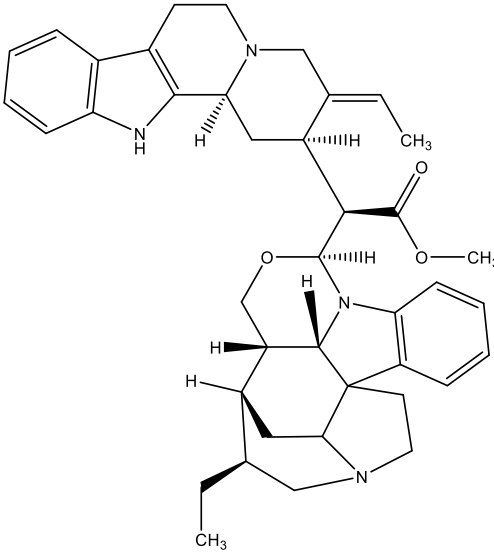
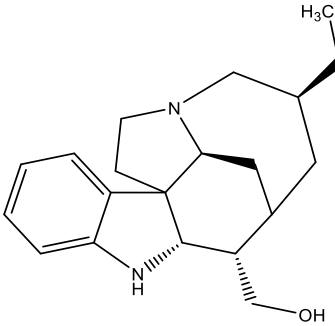
Domorodé národy žijící v Amazonském pralesu používají části stromu k léčbě několik různých onemocnění. Nejčastěji se používá kůra charakteristická svojí hořkostí, z které se připravují nálevy a vodné odvary. Droga našla velice široké uplatnění jako sexuální stimulant i trávicí tonikum. [15] Podává se při onemocnění malárií, ale rovněž i v rámci její prevence. [6] Zmírňuje horečku a bolest, tudíž působí antipyreticky a analgeticky. Používá se také k léčbě plísňových onemocnění, závratí, zácpy a nechutenství. Přispívá k prevenci a léčbě rakoviny prostaty. [15] Kromě medicínského

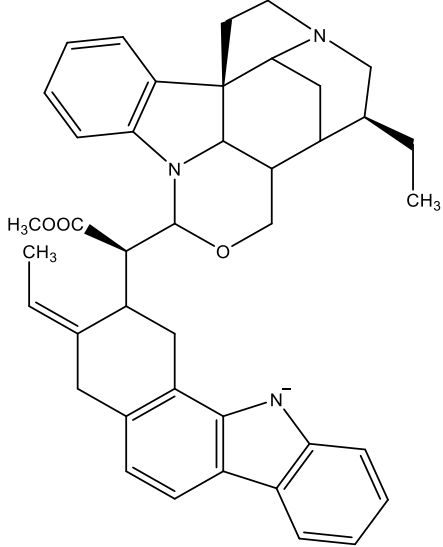
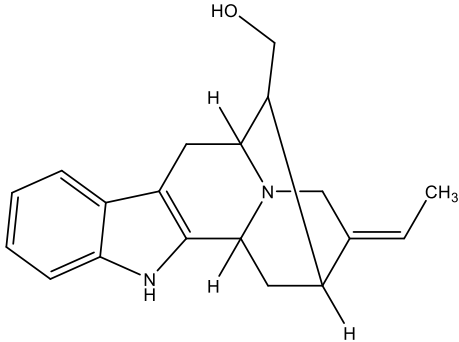
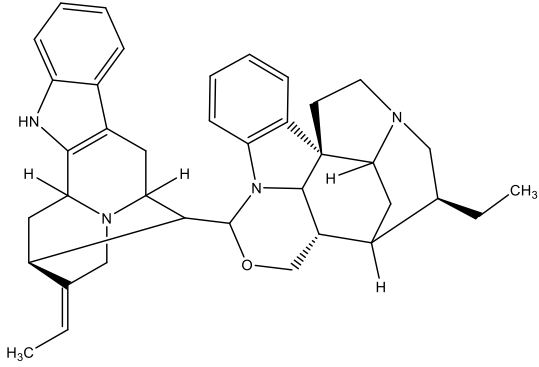
využití se dřevo tohoto stromu používalo na stavbu a výrobu násad zemědělských nástrojů. [48]

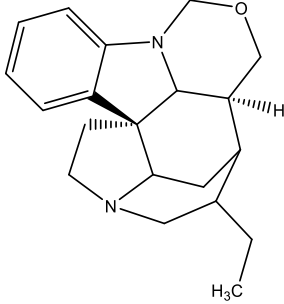
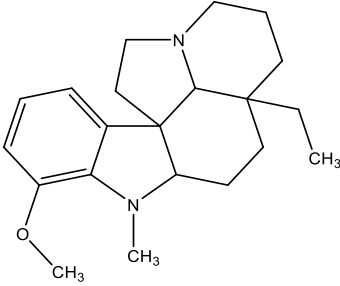
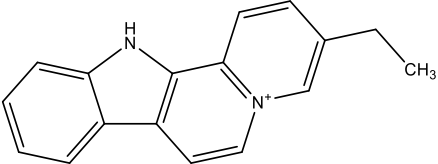
### 3.2.4 Obsahové látky

Kmenová kůra *G. vellosii* je bohatým zdrojem indolových alkaloidů. První izolaci účinné látky z kůry *G. vellosii* provedl v roce 1838 brazilský lékárník Ezequiel Corrêa dos Santos. [15] Látka byla považována za první alkaloid z *G. vellosii*, ačkoli se dle dalších studií mohlo jednat spíše o komplexní směs alkaloidů. [48] Corrêa dos Santos nazval tento alkaloid (směs alkaloidů) pereirin. [15] Pereirin byl následně používán lékaři z Rio de Janeiro ke zmírnění horečky různého původu. V následujících letech došlo k objevu několika dalších monoterpenoidních indolových alkaloidů. Jako hlavní alkaloid *G. vellosii* byl stanoven geissospermin. [48] Kromě monoterpenoidních indolových alkaloidů byl z rostliny izolován i  $\beta$ -karbolinový alkaloid flavopereirin. [49] Izolace a identifikace přírodních látek je velmi důležitá z důvodu objevování nových účinných léčivých látek na nejrůznější onemocnění. [51] V následující tabulce (Tabulka 2) jsou uvedeny alkaloidy izolované z *G. Vellosii*, u kterých byly provedeny studie biologické aktivity.

**Tabulka 2: Přehled chemických struktur alkaloidů izolovaných z *G. vellosii* s provedenými studiiemi biologické aktivity [7, 15, 51, 53, 54]**

Název alkaloidu	Molekul. hmotnost (Mr)	Sumární a strukturní vzorec
<p><b>Geissospermin</b></p>	<p>638,2</p>	<p><math>C_{40}H_{48}N_4O_3</math></p> 
<p><b>Geissoschizolin (pereirin)</b></p>	<p>298,4</p>	<p><math>C_{19}H_{26}N_2O</math></p> 

Název alkaloidu	Molekul. hmotnost (Mr)	Sumární a strukturální vzorec
<p style="text-align: center;"><b>3',4',5',6'- tetrahydrogeissospermin</b></p>	<p style="text-align: center;">326,5</p>	<p style="text-align: center;"><math>C_{41}H_{44}N_3O_3^-</math></p> 
<p style="text-align: center;"><b>Vellosiminol</b></p>	<p style="text-align: center;">294,3</p>	<p style="text-align: center;"><math>C_{19}H_{22}N_2O</math></p> 
<p style="text-align: center;"><b>Geissolosimin</b></p>	<p style="text-align: center;">572,8</p>	<p style="text-align: center;"><math>C_{38}H_{44}N_4O</math></p> 

Název alkaloidu	Molekul. hmotnost (Mr)	Sumární a strukturální vzorec
<b>Geissoschizon</b>	310,4	$C_{20}H_{26}N_2O$ 
<b>12-methoxy-1-methyl aspidospermidin</b>	326,5	$C_{21}H_{30}N_2O$ 
<b>Flavopereirin</b>	247,3	$C_{17}H_{15}N_2^+$ 

### 3.2.5 Biologická aktivita

U *G. vellosii* byla zjištěna a prokázána široká škála léčebných použití. Byly provedeny klinické studie, které rostlině připisují antineoplastickou, antimalarickou, anticholinesterásovou, antinociceptivní, protizánětlivou, antimikrobiální, antitrypanozomální, antioxidační a anti HIV aktivitu. *G. vellosii* je biologicky aktivní díky přítomnosti indolových alkaloidů hojně obsažených v kmenové kůře toto stromu. [15]

### 3.2.5.1 Antineoplastická aktivita

Na antineoplastickou aktivitu *G. vellosii* proběhlo teprve od roku 2008 několik studií. Byly zkoumány extrakty z kůry rostliny obohacené o  $\alpha$ -karbolinové alkaloidy. Extrakty vykazovaly výraznou antineoplastickou aktivitu *in vitro* i *in vivo* vůči prototypické buněčné linii rakoviny prostaty LNCaP. Po dobu 6 týdnů byl rostlinný extrakt nebo kontrolní vehikulem podáván žaludeční sondou imunodeficientním myším s implantovanými LNCaP buňkami. V závislosti na dávce došlo k významnému potlačení buněčného růstu, což vedlo k apoptóze. Růst nádoru byl potlačen až o 80 % ve srovnání s myšími modely ošetřenými vehikulem. Studie tak podporuje potenciální využití extraktu z kůry při léčbě rakoviny prostaty, ačkoli jeho účinnost může být omezena úzkým rozmezím terapeutických dávek. [15, 55]

Později byla provedena studie zaměřená na protirakovinnou aktivitu extraktu z kůry obohaceného o  $\beta$ -karbolinové alkaloidy. Rostlinný extrakt byl testován samostatně a v kombinaci s chemoterapeutickým léčivem karboplatinou. Oba extrakty vykazovaly u myšího modelu selektivní inhibici růstu rakovinových buněk vaječníku. Samostatný rostlinný extrakt inhiboval růst nádoru o 79 %. Extrakt v kombinaci s karboplatinou potlačil růst nádoru o 97 %. Bylo vyhodnoceno, že rostlinný extrakt má potenciál při léčbě rakoviny vaječníků, jelikož vysoce zvyšuje cytotoxickou aktivitu karboplatiny. Díky tomu může dojít ke snížení dávky karboplatiny 1,2–10  $\times$  a tím dojde i ke snížení její toxicity. [15, 56]

Pomocí dalšího experimentu byla popsána protirakovinná aktivita extraktu z *G. vellosii* vůči buňkám metastatického kastročtě rezistentního karcinomu prostaty (CRPC). Výsledkem byla inhibice růstu buněk PC3 karcinomu prostaty prostřednictvím indukce apoptózy a zastavení buněčného cyklu. Došlo k indukci inhibitorů buněčného cyklu, proteinu 21(P21), proteinu 27 (P27) a k potlačení proliferujícího buněčného jaderného antigen (PCNA), cyklinu A a cyklinu D1. Díky této studii z roku 2014 se zdá, že extrakt z *G. vellosii* by mohl být užitečný jako ochrana proti CRPC. [6, 57]

Významnou antineoplastickou aktivitu prokázal  $\beta$ -karbolinový alkaloid flavopereirin. Studie z roku 2019 udává jeho působení na buňky kolorektálního karcinomu. Flavopereirin u těchto rakovinových buněk indukoval zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi a podpořil apoptózu. Rovněž se zjistilo, že flavopereirin zvýšil expresi a fosforylaci proteinu 53 (P53) v buňkách karcinomu. Zároveň došlo k upregulaci

P53 a P21 a k indukci apoptózy a tím se významně potlačil růst xenograftů buněk kolorektálního karcinomu. Jelikož studie prokázala supresi rakovinových buněk v závislosti na dávce prostřednictvím signální dráhy P53-P21 (nezávisí na signální dráze JAKs-STATs-c-Myc), má flavopereirin potenciál stát se využitelný ke klinické léčbě kolorektálního karcinomu. [58]

Antineoplastická aktivita flavopereirinu byla prokázána u dalších typů lidských rakovin, například u rakoviny prsu. Zde byla odhalena schopnost flavopereirinu narušit G0/G1 fázi v buňkách MCF 7 a narušit S fázi v buňkách MDA-MB-231. Došlo se k závěru, že flavopereirin indukuje zástavu buněčného cyklu a apoptózu rakovinových buněk, a to v závislosti na signální dráze AKT/p38 MAPK/ERK1/2. [59]

### 3.2.5.2 Antiplazmodiální aktivita

Malárie v současnosti patří mezi velmi vážná onemocnění. Dle WHO je polovina světové populace ohrožena touto nemocí. Malariční parazité si navíc postupně vytvářejí rezistenci na řadu antimalarických léků. Zároveň komáři, kteří parazity přenášejí, jsou stále odolnější vůči dostupným insekticidům. Z tohoto důvodu je potřeba nalézt nová účinná antimalarická léčiva. [6]

Antiplazmodiální aktivita *G. vellosii* byla podrobněji zkoumána během druhé světové války, jelikož byla rostlina tradičně využívána převážně k prevenci a někdy i k samotné léčbě malárie. Surový extrakt kůry *G. vellosii* byl orálně podáván kuřatům infikovaným sporozoity *Plasmodium gallinaceum*. Extrakt prokázal velmi vysokou antimalarickou aktivitu ekvivalentní antimalariku chininu. [6]

V roce 2000 byl proveden screening extraktů z třiceti rostlin včetně *G. vellosii*. Hodnocené rostlinné extrakty *G. vellosii* jsou používány jako antimalarická léčiva původním etnikem zvaným Chacobo žijícím na území bolivijské Amazonie. Studované extrakty byly podrobeny *in vitro* testování na kmenech *Plasmodium falciparum* citlivých na chlorochin a rezistentních na chlorochin. Následně byl proveden klasický 4denní supresivní test s 28 extrakty na hlodavcích infikovaných *P. berghei* a s 16 extrakty na hlodavcích infikovaných *P. vinckei*. *G. vellosii* byl v *in vitro* testech vyhodnocen jako rostlina s velmi dobrou antiplazmodiální aktivitou vůči chlorochin citlivých i rezistentních kmenů. Antiplazmodiální aktivita se potvrdila i v *in vivo* experimentech. V následující tabulce jsou uvedeny výsledky testování antiplazmodiální aktivity *G. vellosii in vitro* (Tabulka 3) a *in vivo* (Tabulka 4). [15, 60]

**Tabulka 3: Antiplazmodiální aktivita extraktu *G. vellosii* testovaná *in vitro* [60]**

Testovaný kmen	IC <sub>50</sub>
<i>P. falciparum</i> citlivý na chlorochin	3,1 µg/ml
<i>P. falciparum</i> rezistentní na chlorochin	2 µg/ml

**Tabulka 4: Antiplazmodiální aktivita extraktu *G. vellosii* *in vivo* [60]**

Testovaný kmen	Dávka extraktu	Inhibice růstu
<i>P. vinckei</i>	50 mg/kg	42 %
<i>P. berghei</i>	50 mg/kg	36 %
<i>P. berghei</i>	100 mg/kg	> 50 %

Další studie zaměřená na antiplazmodiální aktivitu byla provedena v roce 2005. Pojednává o tradičních přípravcích používaných k léčbě malárie ve Francouzské Guyaně. Antiplazmodiální aktivita zde byla testována *in vitro* ve formě tradičního přípravku (alkoholový macerát) vůči *P. falciparum* rezistentním na chlorochin. Rovněž byla provedena *in vivo* analýza na hlodavcích infikovaných *P. yoelii*. Výsledek *in vitro* experimentu byl vyhodnocen jako negativní vůči *P. falciparum*. Naproti tomu při *in vivo* experimentu došlo k inhibici parazitémie vůči *P. yoelii* (Tabulka 5). [15, 61]

**Tabulka 5: *In vitro* a *in vivo* analýza alkoholového macerátu *G. vellosii* [61]**

IC <sub>50</sub> <i>P. falciparum</i> ( <i>in vitro</i> )	Dávka alkoholového macerátu	Inhibice růstu <i>P. yoelii</i> ( <i>in vivo</i> )
neaktivní	23 mg/kg	35 %

V roce 2011 byla provedena studie zabývající se antiplazmodiální aktivitou indolových alkaloidů izolovaných z methanolového extraktu kůry *G. vellosii*. Antiplazmodiální aktivita byla testována *in vitro* na methanolovém extraktu a na přečištěných alkaloidech proti kmeni *P. falciparum* citlivému na chlorochin. Alkaloidy, na kterých byl experiment proveden, zahrnovaly geissolosimin, geissospermin, geissoschizolin, geissoschizon a vellosiminol. Největší aktivitu z purifikovaných látek vykázal indolový alkaloid geissolosimin, proto je možné jeho molekulární strukturu využít pro vývoj nového antimalarického léčiva. Naproti tomu vellosiminol byl vyhodnocen jako neaktivní vůči *P. falciparum*. V následující tabulce (Tabulka 6) jsou zaznamenány výsledky studie antiplazmodiální aktivity. [4, 6]

**Tabulka 6: Přehled antiplazmodiální aktivity methanolového extraktu a alkaloidů z kůry *G. vellosii* vůči kmeni *P. falciparum* citlivému na chlorochin [6]**

Zkoumaný vzorek	IC <sub>50</sub> <i>P. falciparum</i>
Geissolosimin	0,96 ± 0,08 μM
Geissospermin	5,02 ± 0,74 μM
Geissoschizolin	13,96 ± 1,57 μM
Geissoschizon	10,29 ± 1,32 μM
Vellosiminol	157,00 ± 3,00 μM
Methanolový extrakt	2,22 ± 0,23 μg/ml

### 3.2.5.3 Anticholinesterásová aktivita

AD je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které se projevuje paměťovými deficity. [52] U seniorů je AD nejčastější formou demence (tvoří 60-80 % případů demence celosvětově). Odhaduje se, že více než 45 milionů lidí trpí tímto onemocněním. Očekává se, že do roku 2050 se počet nemocných ztrojnásobí z důvodu prodloužení průměrné délky života. [7] Závažnost poruchy paměti souvisí se stupněm cholinergní hypofunkce. Z tohoto důvodu se využívají centrálně působící inhibitory acetylcholinesterázy (AChE), které zvyšují hladinu acetylcholinu v mozku. Díky tomu dochází ke zmírnění symptomů a k oddálení progresu onemocnění. V současnosti způsobují některé používané inhibitory AChE hepatotoxicitu a výskyt periferních cholinergních nežádoucích účinků. To vede k omezení jejich předepisování. Proto je potřeba vyvinout nová účinná léčiva s minimem nežádoucích účinků. [52]

V roce 2009 byla vypracována studie zaměřená na anticholinesterásovou aktivitu extraktu alkaloidů z kůry *G. vellosii in vitro* (Tabulka 7) a na vliv tohoto extraktu na paměťové testy. Hlavním anticholinesterásovým indolovým alkaloidem identifikovaným z extraktu byl geissospermin. Rostlinný extrakt způsobil inhibici AChE krysího mozku s hodnotou IC<sub>50</sub> 39,3 μg/ml a elektrického úhoře s hodnotou IC<sub>50</sub> 2,9 μg/ml a také došlo k inhibici sérové butyrylcholinesterázy (BChE) koně s hodnotou IC<sub>50</sub> 1,6 μg/ml. Následně byl alkaloidní extrakt podáván myším v dávce 30 mg/kg. Podání zapříčinilo významné snížení amnézie vyvolané skopolaminem v behaviorálních testech pasivního vyhýbání se a v Morrisově vodním bludišti. Nejvyšší terapeuticky účinná dávka (60 mg/kg) se vyhodnotila bez výrazných centrálních a periferních vedlejších nežádoucích účinků. Při podání dávky 200 mg/kg se u myši objevily křeče celého těla vedoucí k jejich smrti. Tato studie prokázala významnou anticholinesterásovou aktivitu

látek obsažených v kůře stromu *in vitro* s mírnou selektivitou pro BChE oproti AChE. Zároveň studie prokázala zlepšení paměti *in vivo* na myších modelech s cholinergním deficitem. [52] Na tuto studii navázala studie z roku 2011. Práce se zabývala interakcemi, konformací a orientací geissosperminu vůči aktivnímu místu AChE. Byly navrženy strukturální změny v molekule geissosperminu s cílem poskytnout základ pro návržení nových potenciálních inhibitorů AChE, které by se mohly využít při léčbě AD. [51]

Z *G. vellosii* byly v roce 2020 izolovány čtyři indolové alkaloidy – geissoschizolin, geissoschizon, geissospermin a 3',4',5',6'-tetrahydrogeissospermin. Následně byla u těchto alkaloidů provedena zkouška jejich anticholinesterásové aktivity (Tabulka 7). Geissospermin inhiboval výhradně BChE, zatímco ostatní alkaloidy byly vyhodnoceny jako neselektivní inhibitory AChE a BChE. Dále byla zkoumána schopnost cytotoxicity izolovaných alkaloidů na mikrogliové buňky, kde pouze geissoschizolin tuto schopnost nepotvrdil. Z tohoto důvodu byly u geissoschizolinu provedeny testy účinnosti na lidské cholinesterázy (Tabulka 7). Geissoschizolin dvakrát silněji inhiboval BChE ( $IC_{50} = 10,21 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ) než AChE ( $IC_{50} = 20,40 \pm 0,93 \mu\text{M}$ ). Dále byly provedeny molekulární dokovací studie, které prokázaly dvoumístný inhibiční profil, a to interakci geissoschizolinu s aktivním místem a periferním aniontovým místem AChE a BChE (díky inhibici periferního aniontového místa dochází k neuroprotekcí). Výsledkem studie bylo zjištění, že geissoschizolin je látka potenciálně využitelná v terapii AD. [7]

**Tabulka 7: Souhrnný přehled výsledků testů anticholinesterásové aktivity. [7, 52]**

Zkoumaný vzorek	$IC_{50}$ AChE	$IC_{50}$ BChE
Extrakt alkaloidů	39,3 $\mu\text{g/ml}$ (krysa) 2,9 $\mu\text{g/ml}$ (elektrický úhoř)	1,6 $\mu\text{g/ml}$ (kůň)
Geissoschizolin	$5,86 \pm 0,31 \mu\text{M}$	$7,89 \pm 0,33 \mu\text{M}$
Geissoschizon	$8,50 \pm 0,43 \mu\text{M}$	$11,46 \pm 0,44 \mu\text{M}$
Geissospermin	$> 100 \mu\text{M}$	$82,98 \pm 0,95 \mu\text{M}$
3',4',5',6'- tetrahydrogeissospermin	$0,45 \pm 0,01 \mu\text{M}$	$0,32 \pm \mu\text{M}$
Geissoschizolin	$10,21 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (lidská AChE)	$20,40 \pm 0,93 \mu\text{M}$ (lidská BChE)

#### 3.2.5.4 Antinociceptivní aktivita

V roce 2009 byl proveden experiment zkoumající antinociceptivní aktivitu *G. vellosii* na behaviorálních modelech nocicepce. Orálně byl myším samcům podáván surový extrakt *G. vellosii* nebo jeho dichlormethanová frakce o koncentraci 1-100 mg/ml. Kontrolním myším byl podán stejný objem vehikula. Po 60 minutách byla myším aplikovaná intraperitoneální injekce kyseliny octové nebo formalinu, která nocicepci vyvolala. Jelikož došlo k inhibici nocicepce, studie potvrdila tuto aktivitu. Zároveň naznačuje, že do antinocicepce je zapojena interakce látek obsažených v *G. vellosii* se serotoninovými receptory 5-HT<sub>1A</sub>. Rovněž se zjistilo, že alkaloid 12-methoxy-1-methyl-aspidospermidin, izolovaný z dichlormethanové frakce v koncentraci 0,001-1 mg/ml také vykazuje antinocicepci. [53]

Hodnocením antinociceptivních účinků se zabývala i studie z roku 2016. Na experiment byla použita frakce kmenové kůry a ethanolový extrakt *G. vellosii*. Oba vzorky byly v dávce 30 mg/ml orálně podávány myším modelům obou pohlaví. 60 minut po aplikaci vzorku nebo vehikula byla kyselinou octovou vyvolána abdominální konstrikce. Oba vzorky způsobily významné snížení této konstrikce (ethanolový extrakt o 34,8 % a frakce kůry o 47,5 %). Experiment byl také proveden s formalinem jako indukčním činidlem bolesti. I zde došlo k významné inhibici nocicepce. Výsledky testů se porovnály s nesteroidním antiflogistikem indometacinem. U testu s kyselinou octovou byla antinocicepce vzorků srovnatelná s indometacinem. U testu s formalinem byly vzorky dvakrát účinnější ve vyvolání antinocicepce než podobná dávka indometacinu. Dle výsledků má *G. vellosii* antinociceptivní aktivitu nesouvisející s aktivací opioidního systému. [62]

#### 3.2.5.5 Antimikrobiální aktivita

Infekční onemocnění představují v současnosti závažný problém o to především z důvodu vzniku multirezistentních organismů. Jedná se především o bakterie *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteriální infekce postihují miliony lidí po celém světě a jsou jednou z hlavních příčin úmrtí. Proto je důležité vyvinout nová účinná antimikrobiální léčiva. Toho by se dalo docílit hledáním nových terapeutických alternativ pomocí rostlin vykazujících antimikrobiální účinky. [63]

Ve studii z roku 2012 byla posouzena antibakteriální aktivita extraktu z *G. vellosii* proti kmenům *S. aureus* rezistentním na oxacilin (ORSA) a multirezistentních kmenů *P. aeruginosa* z lidských vzorků (Tabulka 8). Tato studie je první a dosud jedinou prací zabývající se antibakteriální aktivitou *G. vellosii*. Výsledek testu potvrdil aktivitu proti ORSA (v koncentraci extraktu 500 a 250 µg/ml), ale nepotvrdil aktivitu proti *P. aeruginosa*. Z tohoto důvodu by se *G. vellosii* mohl stát potenciální terapeutickou alternativou pro vývoj nových léků využitelných při infekcích způsobených ORSA. [63]

**Tabulka 8: Výsledky antibakteriální aktivity ethanolového extraktu *G. vellosii* diskovou difúzí na agaru (v závorce jsou uvedeny zóny bakteriální inhibice) [63]**

Koncentrace ethanolového extrakt <i>G. vellosii</i>	<i>S. aureus</i> (Kmen 1)	<i>S. aureus</i> (Kmen 2)	<i>P. aeruginosa</i> (Kmen 1)	<i>P. aeruginosa</i> (Kmen 2)	<i>P. aeruginosa</i> (Kmen 3)
500 µg/ml	Citlivý (10 mm)	Citlivý (10 mm)	Rezistentní (0 mm)	Rezistentní (0 mm)	Rezistentní (0 mm)
250 µg/ml	Citlivý (9 mm)	Citlivý (8 mm)	Rezistentní (0 mm)	Rezistentní (0 mm)	Rezistentní (0 mm)

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál a laboratorní vybavení

#### 4.1.1 Rozpouštědla

Tabulka 9: Přehled použitých rozpouštědel

Rozpouštědlo	Výrobce
Acetonitril p. a. (CH <sub>3</sub> CN)	Penta a.s., Praha
Amoniak p. a. (NH <sub>3</sub> )	Penta a.s., Praha
Benzin lékařský p. a.	Penta a.s., Praha
Cyklohexan p. a. (cHex)	Penta a.s., Praha
Diethylamin p. a. (Et <sub>2</sub> NH)	Penta a.s., Praha
Diethylether p. a. (Et <sub>2</sub> O)	Penta a.s., Praha
Dichlormethan (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Penta a.s., Praha
Ethanol 95 % (EtOH)	Lihovar Chrudim
Ethylester kyseliny octové p. a. (EtOAc)	Penta a.s., Praha
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Penta a.s., Praha
Isopropylalkohol p. a. (IPA)	Penta a.s., Praha
Methanol p. a. (MeOH)	Penta a.s., Praha
Toluen p. a. (To)	Penta a.s., Praha
Voda destilovaná (H <sub>2</sub> O)	Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie, HK

#### 4.1.2 Chemikálie

Tabulka 10: Přehled použitých chemikálií

Chemikálie	Výrobce
Dusičnan bismutitý [Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ]	Penta a.s., Praha
Chlorid rtuťnatý (HgCl <sub>2</sub> )	Fisher Scientific, Pardubice
Jodid draselný (KI)	Lach-Ner, Neratovice
Kyselina chlorovodíková 35 % (HCl)	Penta a.s., Praha
Kyselina vinná (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub> )	Penta a.s., Praha
Síran sodný bezvodý (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Penta a.s., Praha
Uhličitan sodný (CaCO <sub>3</sub> )	Penta a.s., Praha

### 4.1.3 Chromatografické sorbenty

- Komerční analytické desky pro TLC Silica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck, Praha)
  - velikost 20 × 20 cm
  - tloušťka 0,2 mm
- Silica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck, Praha) použitý pro přípravu preparativních litých desek

### 4.1.4 Pomocný materiál

- Čištěná vata
- Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma-Aldrich, Praha)

### 4.1.5 Detekční činidla

#### 4.1.5.1 Dragendorffovo činidlo

Jedná se o činidlo, které se používá k důkazu alkaloidů. Po postřiku dochází k reakci s alkaloidy a k tvorbě oranžové až oranžovočervené sraženiny.

##### **Zásobní roztok:**

Vznikne smísením roztoku A s roztokem B v objemovém poměru 1:1.

**Roztok A** se skládá z bazického  $[\text{Bi}(\text{NO}_3)_3]$  (1,7 g) a z  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$  (20 g) rozpuštěných ve vodě (20 ml).

**Roztok B** tvoří KI (16 g) rozpuštěný ve  $\text{H}_2\text{O}$  (40 ml).

##### **Detekční roztok:**

K zásobnímu roztoku (5 ml) se přidá  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$  (10 g) a  $\text{H}_2\text{O}$  (50 ml).

#### 4.1.5.2 Mayerovo činidlo

Činidlo se používá pro stanovení přítomnosti alkaloidů v roztoku, která se projeví vytvořením bílé opalescence či zákalu.

Připravuje se rozpuštěním KI (5 g) ve vodě (30 ml). Do takto připraveného roztoku se přidá  $\text{HgCl}_2$  (1,35 g). Následně se objem roztoku doplní vodou do 100 ml.

#### 4.1.6 Mobilní fáze pro chromatografii na tenké vrstvě

Tabulka 11: Mobilní fáze pro chromatografii na tenké vrstvě

Soustava	Vyvíjecí směs	Poměr
S <sub>1</sub>	To:MeOH (0,1 % NH <sub>3</sub> )	5:0,1
S <sub>2</sub>	cHEX: Et <sub>2</sub> NH	95:5
S <sub>3</sub>	cHex:EtOac: Et <sub>2</sub> NH	50:50:5
S <sub>4</sub>	To:EtOAc: Et <sub>2</sub> NH	50:70:5
S <sub>5</sub>	To:IPA:Et <sub>2</sub> NH	50:50:5
S <sub>6</sub>	To:EtOAc: Et <sub>2</sub> NH	20:70:5
S <sub>7</sub>	Benzin:ACN:IPA	25:5:15
S <sub>8</sub>	cHEX:IPA: Et <sub>2</sub> NH	95:3:2
S <sub>9</sub>	Benzin:ACN:IPA: Et <sub>2</sub> NH	25:5:5
S <sub>10</sub>	Benzin:ACN:IPA: Et <sub>2</sub> NH	25:3:1:1

#### 4.1.7 Přístrojové vybavení

- Analytická váha KERN ABJ (KERN & SOHN GmbH)
- Magnetická míchačka s ohřevem Heidolph MR3001 K (Heidolph Instruments GmbH & Co)
- Vakuová rotační odparka Heidolph HEI-VAP Advantage (Heidolph Instruments GmbH & Co)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 110P (Bandelin, Germany)
- UV lampa
- GC-MS systém s GC zařízením typu 5975 inert MSD a MS detektorem typu Agilent Technologies 7890 (Agilent Technologies Inc., USA)
- Spektrometr VNMR S 500 (Varian, Palo Alto, USA)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)
- Flash chromatograf BÜCHI Sepacore flash systém X10, kontrolní jednotka BÜCHI C-620, sběrač frakcí BÜCHI C-660, detektore UV C-640, pumpa BÜCHI C-605
- Skleněná předkolona 150 x 125 mm (YMC, Chromservis, Praha)
- Skleněná kolony 15 × 200 mm (YMC, Chromservis, Praha)

#### **4.1.8 Rostlinný materiál**

Na experiment byla použita kůra jihoamerického stromu *Geissospermum vellosi* Allemão, dodaná firmou Amazon Herbs Surinam. Konkrétně se jednalo o 43 kg nařezané sušené kůry. Droga byla na katedře podrobena screeningu, který odhalil zajímavou inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterásám (AChE:  $IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ , BuChE:  $IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$ ). [64] Rostlinný materiál byl následně zpracován. V rámci předchozích diplomových prací byla provedena sloupcová chromatografie, pomocí které se extrakt předrozdělil na 16 frakcí. V mé diplomové práci byly zpracovány frakce GV-2, GV-4 a GV-7.

### **4.2 Obecné postupy**

#### **4.2.1 Příprava rozpouštědel a skladování**

Rozpouštědla použitá v experimentu prošla před použitím destilací. Pro zachování jejich kvality byla uchovávána ve tmavých skleněných lahvích sloužících jako ochrana před světlem. Veškerá rozpouštědla byla skladována za laboratorní teploty na tmavém místě za nepřístupu světla.

#### **4.2.2 Příprava litých desek**

Skleněné desky o rozměru  $15 \times 15$  cm byly nejprve očištěny od předchozích nečistot pomocí  $\text{CHCl}_3$ . Smísením 6,5 g silikagelu a 20,5 ml vody byla připravena suspenze silikagelu. Následně byla suspenze nanášena na desky a rovnoměrně rozetřena pomocí skleněné tyčinky. Schnutí skleněných desek trvalo minimálně 24 hodin, poté byly desky připraveny k použití.

#### **4.2.3 Deaktivace adsorbentů pro flash chromatografii**

Pro separaci na silikagelu 60  $15 \mu\text{m}$  byla provedena deaktivace adsorbentu 5 % vody. K odváženému množství adsorbentu (25 g) se postupně přidalo vypočtené množství vody a silikagel se nechal promíchávat na magnetické míchačce po dobu 60 minut.

#### **4.2.4 Příprava suchého roztěru do předkolony**

Frakce byly rozpuštěny v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (1:1) a smíchány s dvojnásobným množstvím silikagelu k hmotnosti frakce. Na přípravu roztěru byl použit adsorbent stejné

kvality jako pro následnou separaci. Odpařením rozpouštědel na vodní lázni při 60 °C za stálého míchání došlo k adsorpci směsi alkaloidů na chromatografické adsorbenty. Přípravené roztěry byly dosušeny v exsikátoru za sníženého tlaku po dobu 24 hodin.

#### **4.2.5 Tenkovrstvá chromatografie**

Směs alkaloidů se rozpustila ve velmi malém množství rozpouštědla nebo kombinaci rozpouštědel. Mezi použitá rozpouštědla patřil MeOH, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Ze skleněné trubičky a vaty se vyrobilo chromatografické pero, které se plnilo roztokem alkaloidů. Pomocí pera se alkaloidy v tenké vodorovné linii 1-2 cm od spodního okraje nanosly v několika vrstvách na chromatografické desky, tak aby celková navážka na desce odpovídala 35 mg. Následně se rozpouštědlo z TLC desek nechalo vytékat a poté se desky umístily do předem připravených chromatografických komor nasycených mobilní fází (MF). Když došlo k vyvinutí (MF dosáhla stanoveného čela desky), byly desky z komor vyjmuty a sušeny v digestoři pod proudem teplého vzduchu, dokud se rozpouštědlo neodpařilo.

#### **4.2.6 Detekce alkaloidů**

Chromatografické desky byly po odpaření mobilní fáze umístěny pod UV lampu. Detekce byla prováděna při vlnové délce 254 nm. Alkaloidy pod UV lampou byly zobrazeny jako tmavé skvrny (z důvodu pohlcení UV světla) na zeleně fluoreskujících TLC deskách. Pro další ověření přítomnosti alkaloidů bylo na desky nastříknuto Dragendorffovo činidlo, díky kterému došlo ke zviditelnění skvrn (vznik oranžové až oranžovočervené sraženiny). Toto činidlo bylo použito při hledání optimální mobilní fáze. Po vytřepání alkaloidů z vodné do organické fáze (z důvodu odstranění nečistot) byla vodná fáze překontrolována pomocí Mayerova činidla. Do vodné fáze se přidala HCl, aby ve vodném prostředí vytvořila pH okolo 3-4. Poté se do takto připravené směsi přidalo pár kapek činidla. Nesmí se vytvořit bílá opalescence nebo zákal. Pokud by k tomu došlo, znamenalo by to, že ve vodné fázi jsou stále přítomny alkaloidy a vytřepávání by se muselo opakovat.

#### **4.2.7 Eluce a odpaření rozpouštědel**

Pomocí eluce byly alkaloidy odděleny od silikagelu. Jednotlivé zóny alkaloidů se stejným retenčním faktorem byly společně se silikagelem seškrabány

z chromatografických desek a spojeny. Seškrabaná směs se smísila s křemelinou v poměru 1:1. Směs se vložila do skleněné eluční trubice, ve které byla na dně umístěna vata. Jako eluční činidlo k vymývání alkaloidů se použil MeOH. Během eluce byla přítomnost alkaloidů kontrolována po nanesení na malý kousek komerční desky nanesená pomocí UV lampy a Dragendorffova činidla. Při nepřítomnosti alkaloidů byla eluce ukončena.

Větší množství rozpouštědel byl ze vzorků odpařen za sníženého tlaku pomocí rotační vakuové odparky při teplotě kolem 40 °C. Na odpaření malého množství rozpouštědel byla použita vodní lázeň o teplotě 50 °C.

#### **4.2.8 Vytřepávání**

Vytřepávání bylo provedeno u některých vzorků z důvodu odstranění tuků a dalších nečistot. Vzorek byl rozpuštěn v HCl a takto připravený roztok (vodná fáze) byl převeden do dělicí nálevky. Následně bylo k roztoku přidáno organické rozpouštědlo – Et<sub>2</sub>O. Vytřepávání probíhalo v digestoři. Poté byl k oddělené vodné fázi přidán EtOAc a 10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> z důvodu zvýšení pH na hodnotu okolo 10. Proběhlo další vytřepávání v digestoři. Do oddělené organické fáze s alkaloidy bylo přidáno sušidlo pro odstranění zbylé vodné fáze Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Směs byla přefiltrována do odpařovací baňky a následně bylo organické rozpouštědlo odpařeno pomocí vakuové odparky. Vodná fáze, která po vytřepání zbyla, se okyselila HCl na pH 3-4. Následně bylo přidáno pár kapek Mayerova činidla. Pokud by vznikl bílý zákal nebo opalescence vytřepávání by se muselo opakovat.

#### **4.2.9 Skladování alkaloidů**

Veškeré vzorky byly skladovány v ledničce při teplotě 2-8 °C. Izolované čisté alkaloidy byly před vložením do chladničky vysušeny v exsikátoru.

#### **4.2.10 Strukturní analýza**

##### **4.2.10.1 GS-MS analýza**

K další analýze separovaných alkaloidů byl použit plynový chromatograf Agilent 7890A GC 5975 s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV. GC-MS analýza probíhala v teplotním programu 100 °C (1 min), 100-180 °C (15 °C/min), 180 °C

(1 min), 180-300 °C (10 °C/min), 300 °C (12 min). Na analýzu byla použita kolona Hp-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent Technologies, USA). Jako nosný plyn (MF) bylo použito Helium (He) s průtokovou rychlostí 1 ml/ min. Byl proveden nástřik 1 μl methanolickeho roztoku alkaloidu v split poměru 1:10 při teplotě 270 °C. Jednotlivé alkaloidy byly identifikovány pomocí porovnání vyšlých spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a se standardy již izolovanými na pracovišti.

#### 4.2.10.2 NMR analýza

K identifikaci alkaloidů byla také použita NMR analýza, která byla provedena na katedře organické chemie. Pro změření NMR spekter byl zvolen spektrometr VNMR S 500 pracující s frekvencí 499,87 MHz pro jádra <sup>1</sup>H a 125,70 MHz pro jádra <sup>13</sup>C. Měření probíhala při teplotě 25 °C za použití rozpouštědla CDCl<sub>3</sub> (deuterovaný chloroform). Hodnoty δ pars per milion (ppm) byly použity pro vyjádření chemických posunů látek a byly vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako vnitřnímu standardu. Hodnoty chemického posunu CDCl<sub>3</sub> byly pro atomy <sup>1</sup>H δ = 7,26 ppm a pro <sup>13</sup>C δ = 77,0 ppm. Data, která byla získaná měřením, byla ve výsledcích uvedena v tomto pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita <sup>1</sup>H NMR spekter, multiplicita (s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, dd = dublet dubletů, m = multiplet) a interakční konstanta J (Hz).

#### 4.2.10.3 Optická otáčivost

Hodnota optické otáčivosti jednotlivých izolovaných alkaloidů rozpuštěných v methanolu byla změřena polarimetrem P3000. Pomocí naměřené otáčivosti byla vypočtena specifická otáčivost dle následujícího vzorce:

$$[\alpha_D^t] = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

#### Vzorec pro výpočet optické otáčivosti

t...teplota měření [°C]

D...spektrální linie sodíkového světla (λ = 589,3 nm)

α...naměřená optická otáčivost [°]

c...koncentrace látky [g/100 ml]

l...délka kyvety [dm]

### 4.3 Stanovení biologické aktivity

#### 4.3.1 Chemikálie

Tabulka 12: Přehled použitých chemikálií

Chemikálie	Výrobce
Acetylthiocholin jodid p. a. (ATChI)	Sigma Aldrich, Praha)
Butyrylthiocholin jodid p. a. (BTChI)	(Sigma Aldrich, Praha)
Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a. (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	(Lach-Ner, Neratovice)
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	(ing. Švec – Penta, Praha)
Dimethylsulfoxid p. a. (DMSO)	(Sigma Aldrich, Německo)
5,5'-dithiobis-2-nitrobenzová kyselina ≥ 98% (DTNB)	(Sigma Aldrich, Praha)
Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	(ing. Švec – Penta, Praha)
Chlorid sodný p. a. (NaCl)	(Lachema, Brno)

#### 4.3.2 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči *hAChE* a *hBChE*

**Roztok 5mM DTNB:** roztok byl připraven přímým rozpuštěním naváženého množství DTNB v takovém množství 100mM fosfátovém pufru pH 7,4, aby vznikl 5mM roztok. Roztok je slabě nažloutlý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týden.

**Roztok 10mM ATChI:** roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

**Roztok 10mM BTChI:** roztok byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky ve vodě, aby bylo dosaženo koncentrace 10 mM a roztok zůstal čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

#### 4.3.3 Pufry

100mM fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven smísením 57 ml roztoku A, 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 200mM roztokem NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 litr roztoku obsahuje 24,0 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Zásobní roztok B je 200mM roztokem Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 litr roztoku obsahuje 28,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

#### 4.3.4 Rekombinantní enzymy

Enzymy jsou připravovány rekombinantní technologií na Katedře chemie, Přírodovědné fakulty, Univerzity Hradec Králové. Používá se médium obsahující enzymy, které se v čas potřeby naředí 100mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 tak aby hodnota absorbance byla pro AChE 0,08 – 0,15 a pro BChE 0,15 – 0,20. Médium je rozpipetováno dle potřeby (dle vypočítaného množství potřebného pro následné ředění k měření) do eppendorfků, zamrazeno a uchováváno v mrazáku při teplotě při -22 °C do doby použití.

#### 4.3.5 Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Pro stanovení hodnoty IC<sub>50</sub> byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) [ $\lambda = 436$  nm (AChE), nebo  $\lambda = 412$  nm (BChE) při použití krve, při použití rekombinantních enzymů se oboje měří při  $\lambda = 412$  nm]. Během stanovení je sledován nárůst absorbance za 1 min. Hodnoty IC<sub>50</sub> jsou vypočítány ze získaných hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC<sub>50</sub> známých inhibitorů cholinesterás – galanthaminem, fysostigminem a huperzinem A. Procenta inhibice (% I) jsou počítána podle vzorce:

$$\% I = 100 - \left( 100 \times \frac{\Delta ABL}{\Delta ASA} \right)$$

**% I** – procento inhibice

**$\Delta ABL$**  – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min

**$\Delta ASA$**  – absorbance testovaného vzorku během 1 min.

Stanovení aktivity enzymů: do 6 jamek mikrotitrační destičky je napipetováno 8,3  $\mu$ l plazmy, hemolyzátu nebo média a přidáno 283  $\mu$ l 5mM DTNB a 8,3  $\mu$ l DMSO, vše je po dobu 1 min promícháváno na mikrotřepačce a poté je směs inkubována v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut. Po inkubaci je přidáno 33,3  $\mu$ l roztoku substrátu (10mM ATChI nebo 10mM BuTChI) a při vlnové délce 412 nm je proměřena absorbance. Způsobem popsaným výše je vypočten rozdíl a stanovena průměrná hodnota inhibice se směrodatnou odchylkou.

Stanovení aktivity látek: do mikrotitrační destičky jsou použity stejné objemy činidel a roztoku substrátu a shodný je též postup měření jako u stanovení aktivity enzymů, ale místo 8,3  $\mu\text{L}$  DMSO se pipetuje roztok látky příslušné koncentrace. Pro každou látku je použito 6 jamek (1 řada) a do poslední řady je pipetován DMSO jako slepý vzorek. Nejprve se provádí screeningové měření, kdy se všechny látky měří při koncentraci 4 mM. U látek, které vykazují při této koncentraci inhibiční potenciál vyšší než 60 %, je stanovena  $\text{IC}_{50}$ .

Získané inhibiční aktivity  $\text{IC}_{50}$  hAChE a  $\text{IC}_{50}$  hBChE pro jednotlivé látky byly porovnávány s inhibičními aktivitami referenčních látek – galanthaminem ( $\text{IC}_{50}$ , hAChE =  $2,01 \pm 0,14 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$ , hBChE =  $33,69 \pm 2,66 \mu\text{M}$ ), fysostigminem ( $\text{IC}_{50}$ , hAChE =  $0,20 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$ , hBuChE =  $0,30 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ) a huperzinem A ( $\text{IC}_{50}$ , hAChE =  $0,04 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ).

## 4.4 Izolace alkaloidů

### 4.4.1 Frakce GV-2

Frakce GV-2 (Fr – 19 – 31) o hmotnostní 100 mg byla rozpuštěna v  $\text{CHCl}_3$  a MeOH v poměru 2:1. Pomocí chromatografického pera byl rozpuštěný vzorek nanesen na 9 komerčních analytických desek o rozměrech  $10 \times 20 \text{ cm}$  (na jednu desku se vejde 10-15 mg látky). Komerční desky byly vyvíjeny v soustavě  $\text{S}_1$ . Po dokončení vyvíjení byly TLC desky vysušeny pod digestoří proudem teplého vzduchu. Pod UV lampou bylo vyznačeno 6 zón, které se označily jako A-F (Tabulka 13). Jednotlivé zóny byly vyškrabány a výškrabky se stejným retenčním faktorem byly spojeny a eluovány. Jako eluční činidlo, kterým se alkaloidy vymyly, se použil MeOH. Po dokončení eluce se eluční činidlo nechalo odpařit v rotační vakuové odparce. Izolované látky se znovu rozpustily v malém množství MeOH a přefiltrovaly přes vatku z důvodu odstranění zbylého silikagelu.

**Tabulka 13: Hmotností frakcí GV-2-A – GV-2-F**

Frakce	Hmotnost
GV-2-A	54,4 mg
GV-2-B	19,8 mg
GV-2-C	10,3 mg
GV-2-D	8,2 mg
GV-2-E	11,5 mg
GV-2-F	28,7 mg

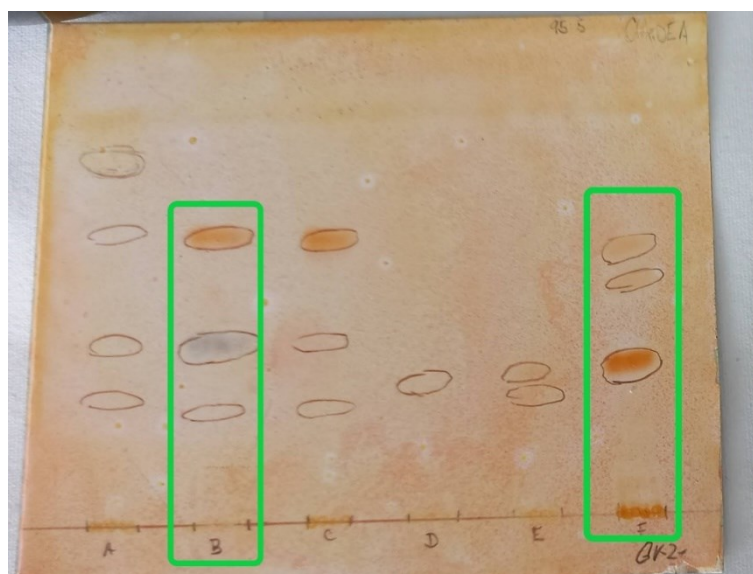
Pro další zpracování byla vybrána frakce GV-2-B (19,8 mg) a GV-2-F (28,7 mg).

#### 4.4.1.1 Frakce GV-2-B

Frakce GV-2-B (Obrázek 10) o hmotnosti 19,8 mg byla rozpuštěna v malém množství MeOH. Alkaloidy byly nanosen na dvě komerční chromatografické desky. Na separaci byla použita soustava S<sub>2</sub>. Byly izolovány 2 podfrakce označené jako B-A a B-B (tabulka 14).

**Tabulka 14: Hmotnosti frakcí GV-2-B-A a GV-2-B-B**

Frakce	Hmotnost
GV-2-B-A	6,9 mg
GV-2-B-B	6,6 mg



**Obrázek 10: Chromatogram frakce GV-2 vyvinutý v soustavě S<sub>2</sub> po detekci Dragendorffovým činidlem se zaměřením na podfrakci B a F**

Získané látky byly analyzovány pomocí GC/MS. Frakce GV-2-B-B byla vyhodnocena jako téměř čistá látka, která byla následně přetřepána. PO vytřepání bylo získáno 2,2 mg čisté látky.

#### 4.4.1.2 Frakce GV-2-F

Frakce GV-2-F (Obrázek 10) o hmotnosti 28,7 mg byla rozpuštěna v malém množství MeOH a vyvíjena na lité desce v soustavě S<sub>2</sub>. Byly získány 3 podfrakce označené F-1 – F-3 (Tabulka 15).

**Tabulka 15: Hmotnosti frakcí GV-2-F-1 – GV-2-F-3**

<b>Frakce</b>	<b>Hmotnost</b>
GV-2-F-1	1,6 mg
GV-2-F-2	5,9 mg
GV-2-F-3	15,4 mg

Získané látky byly podrobeny GC/MS analýze. Frakce GV-2-F-3 byla vyhodnocena jako látka s molekulovou hmotností  $M_r = 294,39$ . Z důvodu přítomnosti drobných nečistot byla frakce nanášena na desky a přečištěna soustavou  $S_3$ . Výsledné množství čistého alkaloidu činilo 12,0 mg.

#### **4.4.2 Frakce GV-7-D**

Frakce GV-7-D o hmotnosti 125 mg byla rozpuštěna v MeOH a nanášena na 3 lité desky. Tyto desky byly vyvíjeny v soustavě  $S_4$ . Vzorek byl rozdělen na 5 podfrakcí označených jako  $D_1$ - $D_5$  (Tabulka 16). Všechny podfrakce byly po zpracování zváženy.

**Tabulka 16: Hmotnosti frakcí GV-7-D-1 – GV-7-D-5**

<b>Frakce</b>	<b>Hmotnost</b>
GV-7-D-1	10,1 mg
GV-7-D-2	4,4 mg
GV-7-D-3	19,3 mg
GV-7-D-4	22 mg
GV-7-D-5	35,1 mg

Pro další zpracování byly vybrány frakce GV-7-D-3 a GV-7-D-5.

##### **4.4.2.1 GV-7-D-3**

Frakce GV-7-D-3 o hmotnosti 19,3 mg byla po rozpuštění v MeOH nanášena na dvě komerční TLC desky. Pro separaci se použila soustava  $S_5$ . Z chromatogramů byla vyškrabána pouze jedna zóna. Po eluci a odpaření rozpouštědla byla získána bílá krystalická látka. Vzorek byl následně analyzován pomocí GC/MS jako čistá látka o molekulové hmotnosti  $M_r = 294$ .

##### **4.4.2.2 GV-7-D-5**

Frakce GV-7-D-5 o hmotnosti 35,1 mg byla opět rozpuštěna v MeOH a nanášena na tři komerční TLC desky. Pro vyvíjení se použila soustava  $S_6$ . Přečištěním na deskách

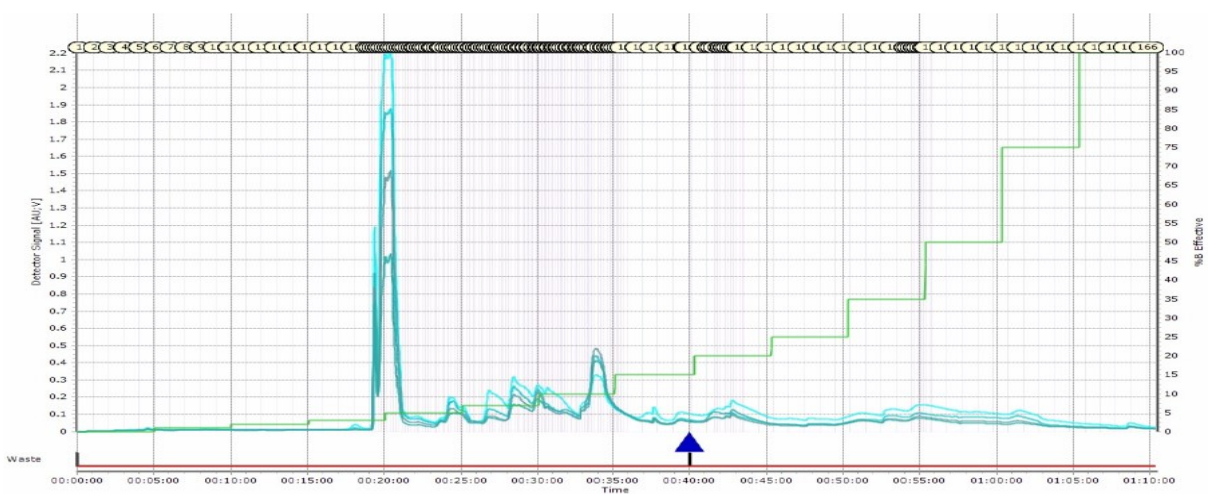
byla získána bílá krystalická látka o  $m = 27,7$  mg. Po analýze pomocí GC/MS byla zjištěno, že  $M_r = 212,2$

#### **4.4.3 Frakce GV-4-F**

Další zpracovávanou frakcí byla frakce GV-4-F o hmotnosti 1,2846 g. Frakce byla separována pomocí flash chromatografického systému BÜCHI Sepacore flash system X10. Kolona byla před samotnou separací kondicionována (promyta) trojnásobným kolonovým objemem mobilní fáze složené z dichlormethanu s průtokem 40 ml/min. Alkaloidy ve formě roztěru umístěné na předkoloně, byly separovány stupňovitou elucí, kdy složení mobilní fáze je uvedeno v tabulce 16, po dobu 1 h 10 min a průtoku 15 ml/min. Sběr frakcí v průběhu píku byl po 15 ml, sběr frakcí mimo pík probíhal po 50 ml. Detekce alkaloidů probíhala při vlnových délkách 254, 270, 280 a 290 nm. Celkově bylo jímáno 166 frakcí, které byly za pomoci TLC analýzy spojeny do 22 frakcí (Tabulka 18), (Obrázek 11 a 12).

**Tabulka 17: Eluční gradient chromatografie**

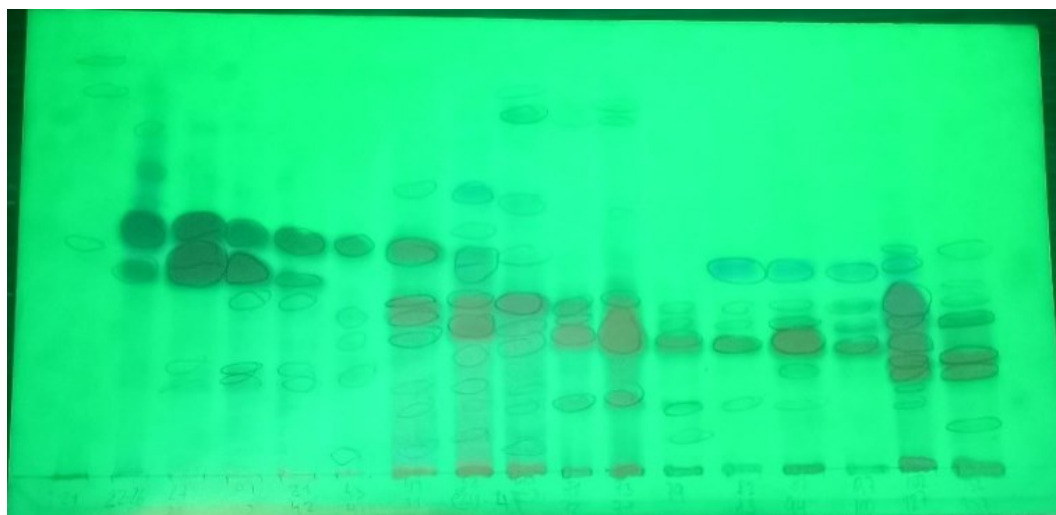
Start %B	End %B	min	s
0	0	5	0
0	1	0	1
1	1	5	0
1	2	0	1
2	2	5	0
2	3	0	1
3	3	5	0
3	5	0	1
5	5	5	0
5	7	0	1
7	7	5	0
7	10	0	1
10	10	5	0
10	15	0	1
15	15	5	0
15	20	0	1
20	20	5	0
20	25	0	1
25	25	5	0
25	35	0	1
35	35	5	0
35	50	0	1
50	50	5	0
50	75	0	1
75	75	5	0
75	100	0	1
100	100	5	0



**Obrázek 11: Záznam průběhu separace alkaloidů z flash chromatografie**

**Tabulka 18: Hmotnosti frakcí GV-4-F-(1-21) – GV-4-F-(166)**

<b>Frakce</b>	<b>Hmotnost</b>
GV-4-F-(1-21)	8,1 mg
GV-4-F-(22-26)	152,2 mg
GV-4-F-(27-28)	144,9 mg
GV-4-F-(29-30)	63,6 mg
GV-4-F-(31-42)	29,0 mg
GV-4-F-(43-48)	9,0 mg
GV-4-F-(49-51)	11,2 mg
GV-4-F-(52-59)	16,2 mg
GV-4-F-(60-70)	16,2 mg
GV-4-F-(71-72)	8,5 mg
GV-4-F-(73-78)	19,1 mg
GV-4-F-(79-80)	9,5 mg
GV-4-F-(81-84)	21,2 mg
GV-4-F-(85-94)	37,8 mg
GV-4-F-(95-101)	22,4 mg
GV-4-F-(102-127)	158,1 mg
GV-4-F-(128-137)	56,2 mg
GV-4-F-(138-150)	107,2 mg
GV-4-F-(151-156)	79,3 mg
GV-4-F-(157-159)	30,9 mg
GV-4-F-(160-165)	24,1 mg
GV-4-F-(166)	11,8 mg



**Obrázek 12: Chromatogram spojených podfrakcí GV-4-F-(1-21) – GV-4-F-(166) po flash chromatografii umístěný pod UV lampu**

Pro další zpracování byla vybrána frakce GV-4-F-(22-26) a GV-4-F-(27-28).

#### 4.4.3.1 Frakce GV-4-F-(22-26)

Frakce GV-4-F-(22-26) o hmotnosti 152,2 mg byla rozpuštěna v MeOH a EtOAc. Poté byla pomocí pera nanášena na 4 lité chromatografické desky. Na vyvíjení se použila soustava S<sub>7</sub>. Vzorek byl rozdělen na dvě podfrakce označené jako F-(22-26)-1 (37,7 mg) a F-(22-26)-2 (107,1 mg). Frakce GV-4-F-(22-26)-1, která byla rozpuštěna v malém množství MeOH a EtOAc a nanášena na 3 komerční TLC desky. Na vyvíjení se použila soustava S<sub>8</sub>. Vzorek byl rozdělen na 3 podfrakce označené jako A – C (Tabulka 19).

**Tabulka 19: Hmotnosti frakcí GV-4-F-(22-26)-1-A – GV-4-F-(22-26)-1-C**

Frakce	Hmotnost
GV-4-F-(22-26)-1-A	4,3 mg
GV-4-F-(22-26)-1-B	8,6 mg
GV-4-F-(22-26)-1-C	8,2 mg

Izolované látky byly zanalyzovány pomocí GC/MS. Frakce GV-4-F-(22-26)-1-A byla vyhodnocena jako čistá látka o molekulové hmotnosti  $M_r = 340,5$ .

#### 4.4.3.2 Frakce GV-4-F-(27-28)

Frakce GV-4-F-(27-28) o hmotnosti 144,9 mg byla opět rozpuštěna v malém množství MeOH a EtOAc. Roztok byl nanášen na 4 lité desky a vyvíjen v soustavě S<sub>9</sub>. Frakce byla rozdělena na dvě podfrakce označené jako F-(27-28)-H a F-(27-28)-S (Tabulka 20).

**Tabulka 20: Hmotnosti frakcí GV-4-F-(27-28)-H a GV-4-F-(27-28)-S**

Frakce	Hmotnost
GV-4-F-(27-28)-H	60,8 mg
GV-4-F-(27-28)-S	43,3 mg

Oba vzorky byly podrobeny GS/MS analýze. Frakce GV-4-F-(27-28)-H byla zanalyzována jako čistá látka o molekulové hmotnosti  $M_r = 370,5$ .

Frakce GV-4-F-(27-28)-S byla dle kontrolní TLC analýzy složena ze dvou alkaloidů. Frakce byla opětovně rozpuštěna a nanášena na 3 komerční TLC desky. Na separaci těchto dvou alkaloidů byla použita soustava S<sub>10</sub> (Tabulka 21).

**Tabulka 21: Hmotnosti frakcí GV-4-F-(27-28)-H a GV-4-F-(27-28)-S**

<b>Frakce</b>	<b>Hmotnost</b>
GV-4-F-(27-28)-H	13,3 mg
GV-4-F-(27-28)-S	24,3 mg

Izolované látky byly zanalyzovány pomocí GC/MS a TLC. Jeden z vyizolovaných alkaloidů odpovídal předchozí izolované látce GV-4-F-(27-28)-H o molekulové hmotnosti  $M_r = 370,5$ . Frakce GV-4-F-(27-38)-S byla vyhodnocena jako čistá látka o molekulové hmotnosti  $M_r = 384,2$ .

## 5 Výsledky

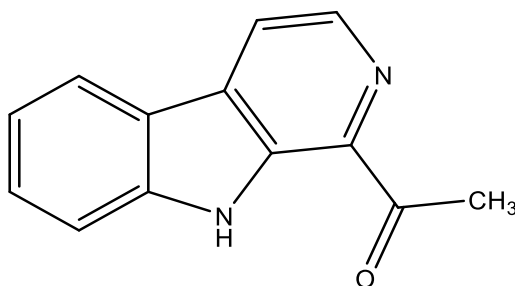
### 5.1 Izolované alkaloidy

#### 5.1.1 GV-2-B-B – 1-acetyl- $\beta$ -karbolin

Sumární vzorec: C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 210,23

Strukturní vzorec:



Obrázek 13: Strukturní vzorec 1-acetyl- $\beta$ -karbolinu

##### 5.1.1.1 MS analýza:

EI-MS  $m/z$  (%) = 211 (11), 210 (88), 208 (10), 207 (45), 182 (48), 168 (100), 167 (36), 140 (38)

##### 5.1.1.2 NMR analýza:

Alkaloid byl identifikován dle spekter uvedených v literatuře. [65]

##### 5.1.1.3 Optická otáčivost:

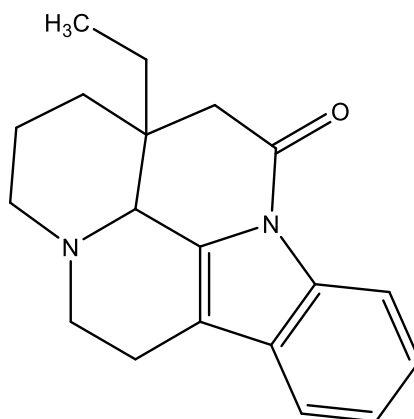
Z důvodu izolace malého množství alkaloidu nebyla měřena optická otáčivost.

### 5.1.2 GV – 2 – F – 3 – Eburnamonin

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 294,4

Strukturní vzorec:



Obrázek 14: Strukturní vzorec eburnamoninu

#### 5.1.2.1 MS analýza:

EI-MS  $m/z$  (%) = 295 (20), 294 (100), 293 (85), 237 (34), 265 (27), 180 (17), 168 (16), 167 (20)

#### 5.1.2.2 NMR analýza:

Alkaloid byl identifikován dle spekter uvedených v literatuře. [66]

#### 5.1.2.3 Optická otáčivost:

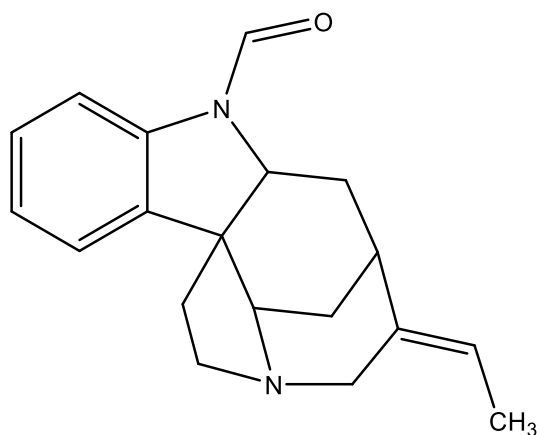
$[\alpha]_D^{25} = -74^\circ$  (c = 0,10; CHCl<sub>3</sub>)

### 5.1.3 GV-7-D-3: nová látka

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnost: 294,4

Strukturní vzorec:



Obrázek 15: Strukturní vzorec nové látky

#### 5.1.3.1 MS analýza:

EI-MS  $m/z$  (%) = 295 (20), 294 (100), 293 (17), 280 (14), 279 (72), 171 (16), 144 (17), 143 (16), 136 (97), 121 (47)

#### 5.1.3.2 NMR analýza:

NMR analýza není z důvodu přípravy publikace u nové látky publikována.

#### 5.1.3.3 Optická otáčivost:

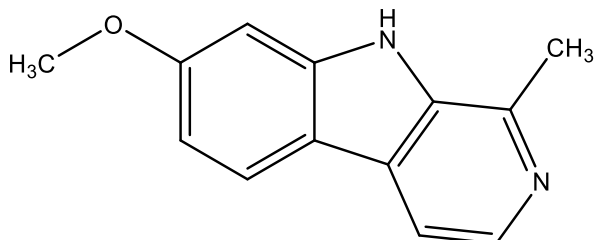
Optická otáčivost není z důvodu přípravy publikace u nové látky publikována.

#### 5.1.4 GV-7-D-5 – Harmin

Sumární vzorec:  $C_{13}H_{12}N_2O$

Molekulová hmotnost: 212,2

Strukturní vzorec:



Obrázek 16: Strukturní vzorec harminu

##### 5.1.4.1 MS analýza:

EI-MS  $m/z$  (%) = 213 (16), 212 (100), 197 (21), 170 (8), 169 (58), 168 (9)

##### 5.1.4.2 NMR analýza:

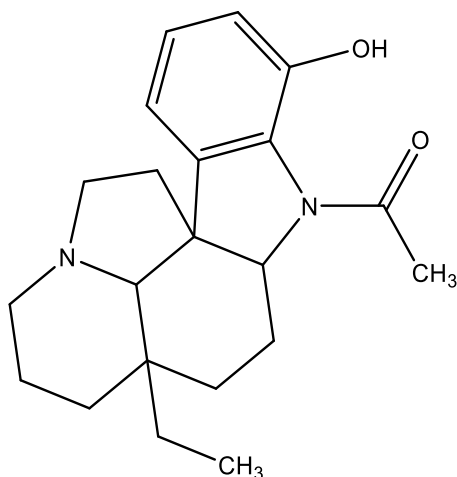
Alkaloid byl identifikován dle spekter uvedených v literatuře. [67]

### 5.1.5 GV-4-F-(22-26)-1-A – *O*-demethylaspidokarpin

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 340,5

Strukturální vzorec:



Obrázek 17: Strukturální vzorec *O*-demethylaspidokarpinu

#### 5.1.5.1 MS analýza:

EI-MS  $m/z$  (%) = 341 (5), 340 (24), 339 (29), 125 (9), 124 (100)

#### 5.1.5.2 NMR analýza:

Alkaloid byl identifikován dle spekter uvedených v literatuře. [68]

#### 5.1.5.3 Optická otáčivost:

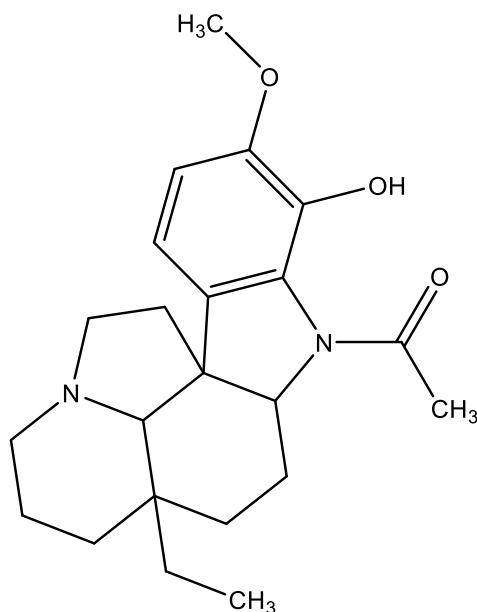
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +74^{\circ}$  (c = 0,10; MeOH)

### 5.1.6 GV-4-F-(27-28)-H – Aspidokarpin

Sumární vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 370,5

Strukturální vzorec:



Obrázek 18: Strukturální vzorec aspidokarpinu

#### 5.1.6.1 MS analýza:

EI-MS  $m/z$  (%) = 371 (10), 370 (44), 369 (35), 152 (7), 125 (11), 124 (100)

#### 5.1.6.2 NMR analýza:

Alkaloid byl identifikován dle spekter uvedených v literatuře. [69]

#### 5.1.6.3 Optická otáčivost:

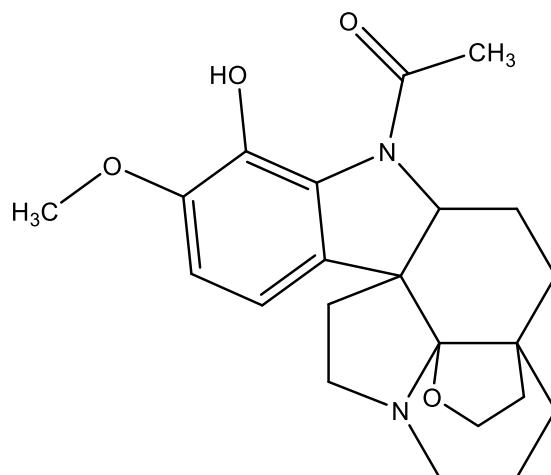
$[\alpha]_D^{25} = + 89^\circ$  (c = 0,10; MeOH)

### 5.1.7 GV-4-F-(27-28)-S – Aspidolimidin

Sumární vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

Molekulová hmotnost: 384,2

Strukturální vzorec:



Obrázek 19: Strukturální vzorec aspidolimidinu

#### 5.1.7.1 MS analýza:

EI-MS  $m/z$  (%) = 385 (7), 384 (25), 356 (27), 341 (11), 340 (37), 339 (22), 161 (13), 160 (25), 139 (10), 138 (100)

#### 5.1.7.2 NMR analýza:

Alkaloid byl identifikován dle spekter uvedených v literatuře. [70]

#### 5.1.7.3 Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{25} = +230^\circ$  (c = 0,50 ; CHCl<sub>3</sub>)

## 5.2 Biologická aktivita izolovaných látek

Tabulka 22: Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů

Název látky	% inhibice AChE (100 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> AChE $\mu$ M	% inhibition BuChE (100 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> BUCHE $\mu$ M
Aspidolimidin	3,24 $\pm$ 0,39	>100	31,92 $\pm$ 5,43	-
Nová látka	19,50 $\pm$ 3,69	>100	45,46 $\pm$ 2,39	-
Harmin	35,03 $\pm$ 1,14	>100	<b>85,38 <math>\pm</math> 1,50</b>	27,13 $\pm$ 0,87
Eburnamonin	24,64 $\pm$ 2,38	>100	-	93,49 $\pm$ 15,90
Galanthamin	-	2,01 $\pm$ 0,14	-	33,69 $\pm$ 2,66
Fysostigmin	-	0,20 $\pm$ 0,01	-	0,30 $\pm$ 0,01
Huperzin A	-	0,04 $\pm$ 0,01	-	-

## 6 Diskuse a závěr

Čeleď Apocynaceae je jednou z nejvýznamnějších čeledí kvetoucích rostlin. Její význam souvisí s přítomností sekundárních metabolitů, především indolových alkaloidů. Součástí této čeledi je i jihoamerický strom *Geissospermum vellosii*, jehož kmenová kůra je bohatým zdrojem právě tohoto typu alkaloidů. Díky jejich přítomnosti droga vykazuje četné biologické aktivity (např. antineoplastickou, antimalarickou, anticholinesterázovou). Právě z tohoto důvodu byl na Farmaceutické fakultě UK proveden screening zaměřený na inhibiční aktivitu alkaloidního extraktu vůči lidským cholinesterázám. Výsledek základního screeningu prokázal zajímavou inhibiční aktivitu vůči lidským rekombinantním cholinesterázám (AChE:  $IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ , BuChE:  $IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$ ).

Pro zpracování byly vybrány frakce GV-2, GV-7-D a GV-4-F. Frakce byly získány z etherového výtřepku extraktu ze sušené kůry pomocí sloupcové chromatografie, která byla provedena v rámci předchozích diplomových prací. Celkem bylo vyizolováno 7 čistých alkaloidních látek, proto je tato diplomová práce především fytochemického zaměření a biologickým aktivitám se věnuje spíše okrajově. V rámci práce již nezbyl čas všechny izolované látky otestovat.

Pro izolaci a separaci alkaloidů frakce GV-2 byla použita preparativní tenkovrstvá chromatografie. Po prvním dělení bylo získáno 6 podfrakcí, z kterých byly vybrány dvě, jež se jeví jako vhodné pro další zpracování. Z první podfrakce GV-2-B byl pomocí TLC vyizolován alkaloid 1-acetyl- $\beta$ -karbolin (označen jako GV-2-B-B) v množství 2,2 mg. V rámci diplomové práce u tohoto alkaloidu nebyly provedeny testy inhibiční aktivity vůči cholinesterázám. V minulosti byl 1-acetyl- $\beta$ -karbolin získán fermentací *Marinactinospora thermotolerans*, dále byl kromě rostlin obsahujících  $\beta$ -karbolinové alkaloidy izolován i z mořských organismů např. *Orthoscuticella ventricosa* a dalším poněkud neobvyklým zdrojem je *Cordyceps sinensis*. [71, 72, 73] Zatím nebyly provedeny testy biologické aktivity. Z druhé podfrakce GV-2-F byl získán alkaloid eburnamonin (označen jako GV-2-F-3) v množství 12,0 mg. U eburnamoninu byla naměřena nízká inhibiční aktivita vůči AChE ( $24,64 \pm 2,38 \%$ ). Eburnamonin byl v minulosti izolován ze semen *Hunteria umbellata* a z kůry *Hunteria zeylonica*. [74, 75] Tento alkaloid je v některé literatuře uváděn pro jeho neuroprotektivní potenciál, na základě jeho působení dochází k lepšímu prokrvení mozkové tkáně. [76] Tato aktivita

může být prospěšná v rámci léčby demencí jiné etiologie, protože inhibiční aktivita vůči cholinesterásám není nijak významná.

Separace a izolace alkaloidů frakce GV-7-D byla také provedena pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie. Po separaci bylo získáno 5 podfrakcí, z kterých byly dvě vyhodnoceny jako čisté látky. První z nich, označená jako GV-7-D-3 o hmotnosti 19,3 mg byla vyhodnocena jako nová doposud neizolovaná látka. Nová látka rovněž vykazovala nízké hodnoty inhibice AChE ( $19,50 \pm 3,69 \%$ ) a BuChE ( $45,46 \pm 2,39 \%$ ). Druhým vyizolovaným alkaloidem byl harmin (označený jako GV-7-D-5) o hmotnosti 27,7 mg. Harmin nevykázal dostatečnou inhibiční aktivitu vůči AChE ( $35,03 \pm 1,14 \%$ ), ale vůči BuChE prokázal významnou inhibici ( $85,38 \pm 1,50 \%$ ). Proto byla stanovena hodnota  $IC_{50}$ , která činila  $27,13 \pm 0,87 \mu\text{M}$ . V porovnání se standardy galanthaminem ( $IC_{50} = 33,69 \pm 2,66 \mu\text{M}$ ) a fysostigminem ( $IC_{50} = 0,30 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ) vykazuje hodnota poměrně významnou inhibiční aktivitu vůči BuChE. U harminu, izolovaném ze semen *Peganum harmala*, bylo již provedeno mnoho studií zabývajících se biologickou aktivitou. Studie dokumentují protizánětlivou, neuroprotektivní, antidibetickou a antineoplasmatickou aktivitu. Navíc vykazuje i antibakteriální, antivirové a insekticidní účinky. [77] Zároveň jako jediný z izolovaných alkaloidů v rámci této diplomové práce prokázal významnější inhibiční aktivitu vůči BuChE a mohl by tak sloužit jako předloková struktura pro deriváty s vyšší biologickou aktivitou.

Jako poslední byla zpracovávána frakce GV-4-F. Tato frakce byla separována pomocí flash chromatografie. Celkově bylo získáno 22 frakcí, které byly dále děleny. Pro další zpracování byly vybrány dvě frakce označené jako GV-4-F-(22-26) a GV-4-F-(27-28). První z frakcí byla pomocí TLC rozdělena na 3 podfrakce. Byl získán alkaloid *O* demethylaspidokarpin (označený jako GV-4-F-(22-26)-1-A) v množství 4,3mg. V rámci této diplomové práce u tohoto alkaloidu nebyla měřena inhibiční aktivita vůči cholinesterásám. V minulosti byl izolován z kmenové kůry *Aspidosperma album* a zatím nebyly provedeny žádné studie dokumentující jeho biologickou aktivitu. [78] Z druhé frakce byl získán alkaloid aspidokarpin (označený jako GV-4-F-(27-28)-H) o celkové hmotnosti 74,1 mg. U tohoto alkaloidu rovněž nebyla měřena inhibiční aktivita vůči cholinesterásám. Aspidocarpin byl již izolován z kůry *Aspidosperma vargasii* a *A. desmanthum*. Tento alkaloid vykázal *in vitro* inhibici vůči rezistentnímu kmeni *P. falciparum*. [79] Zároveň byla ve studii z roku 2022 pozorována antihypertenzní

aktivita. [80] Dále byl z této frakce získán alkaloid aspidolimidin (označený jako GV-4-F-(27-28)-S) v množství 24,3 mg. Aspidolimidin vykázal nízkou inhibiční aktivitu vůči AChE ( $3,24 \pm 0,39$  %) i BuChE ( $31,92 \pm 5,43$  %). Alkaloid byl již izolován z kmenové kůry *Aspidosperma megalocarpon*. Byl podroben testováním na antimalarickou aktivitu, kde prokázal silnou inhibiční aktivitu. [81]

V rámci izolačních prací byla pouze jediná látka vyizolována z druhu *Geissospermum*. Konkrétně se jedná o aspidolimidin, který byl izolován z druhu *G. reticulatum*. [70] Ostatní alkaloidy jsou izolovány z tohoto rodu poprvé.

Z izolovaných látek by pouze harmin mohl být v budoucnu využitelný jako potenciální vzor pro vývoj léčiv inhibujících BuChE. Ostatní izolované alkaloidy, u kterých byla měřena inhibiční aktivita vůči cholinesterásám, nejsou dle výsledků využitelné pro terapii AD. U všech izolovaných alkaloidů, které vykazovaly inhibiční aktivitu, bude do budoucna změřena jejich prostupnost skrz hematoencefalickou bariéru a toxicita vůči nervovým buňkám. Zároveň by bylo vhodné u všech alkaloidů otestovat i jejich hepatotoxicitu a u netoxických látek se zaměřit na případnou antimalarickou aktivitu, která je u tohoto rodu v rámci tradičního využití popisována.

## 7 Seznam použité literatury

- [1] Islam M. S., Lucky R. A. A study on different plants of Apocynaceae family and their medicinal uses. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*, 2019, 4(1), 40-44, DOI: 10.22270/ujpr.v4i1.235
- [2] Anand U., Nandy S., Mundhra A., et al. A review on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from Apocynaceae family: Possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms. *Drug resistance updates*, 2020, 51, DOI: 10.1016/j.drug.2020.100695
- [3] Aigotti R., Santoro V., Gastaldi D., et al. Characterization of alkaloids in bark extracts of *Geissospermum vellosii* by HPLC-UV-diode array-multistage high-resolution mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 2022, 1203, DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123307
- [4] Camargo M. R. M., das Neves Amorim R. C., Rocha e Silva L. F., et al. Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum* Allemão species (Apocynaceae Juss.). *Revista Fitos*, 2013, 8(2), 137-146, DOI: 10.5935/1808-9569.20130002
- [5] Siegel R. L., Miller K. D., Wagle N. S., et al. Cancer statistics, 2023. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2023, 73(1), 17-48, DOI: 10.3322/caac.21763
- [6] Mbeunkui F., Grace M. H., Lategan C., et al. *In vitro* antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 139(2), 471-477, DOI: 10.1016/j.jep.2011.11.036
- [7] Lima J. A., Costa T. W. R., Da Fonseca A. C. C., et al. Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 104, DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104215
- [8] Fishbein M., Livshultz T., Straub S. C. K., et al. Evolution on the backbone: Apocynaceae phylogenomics and new perspectives on growth forms, flowers, and fruits. *American Journal of Botany*, 2018, 105(3), 495-513, DOI: 10.1002/ajb2.1067

- [9] Mohammed A. E., Abdul-Hameed Z. H., Alotaibi M. et al. Chemical Diversity and Bioactivities of Monoterpene Indole Alkaloids (MIAs) from Six Apocynaceae Genera. *Molecules*, 2021, 26(2), DOI: 10.3390/molecules26020488
- [10] Middleton D.J. Apocynaceae (subfamilies Rauvolfioideae and Apocynoideae). *Flora Malesiana - Series I, Spermatophyta*, 2007, 18(1), 1–152.
- [11] Apocynaceae – toješťovitě. *Natura Bohemica*, 2019, dostupné z: [http://www.naturabohemica.cz/2\\_cestina/170\\_apocynaceae-tojestovite/](http://www.naturabohemica.cz/2_cestina/170_apocynaceae-tojestovite/)
- [12] *Vincetoxicum hirundinaria* – tolitá lékařská. *Pladias: Databáze české flóry a vegetace*, 2023, dostupné z: <https://pladias.cz/taxon/data/Vincetoxicum%20hirundinaria>
- [13] El-Taher A., El-Gendy A., Lila M. Morphological and anatomical studies on some taxa of family Apocynaceae. *Al-Azhar Journal of Agricultural Research*, 2019, 44(1), 136-147, DOI: doi.org/10.21608/ajar.2019.59750
- [14] Apocynaceae: Characters, Distribution and Types. *Biology Discussion*, 2016, dostupné z: <https://www.biologydiscussion.com/angiosperm/dicotyledons/apocynaceae-characters-distribution-and-types/48288>
- [15] Marques D. de A., Zanchi F. B., Evaristo G. P. C. Ethnopharmacological review, phytochemistry and bioactivity of the genus *Geissospermum* (Apocynaceae). *Research, Society and Development*, 2023, 12(2), DOI: 10.33448/rsd-v12i2.40047
- [16] LV Y. N., Yang C. Y., Shi L. C., et al. Identification of medicinal plants within the Apocynaceae family using ITS2 and psbA-trnH barcodes. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2020, 18(8), 594-605, DOI: 10.1016/S1875-5364(20)30071-6
- [17] Fjell I. Anatomy of the xeromorphic leaves of *Allamanda nerifolia*, *Thevetia peruviana* and *Vinca minor* (Apocynaceae). *Nordic Journal of Botany*, 1983, 3(3), 383-392, DOI: 10.1111/j.1756-1051.1983.tb01953.x
- [18] Gajalakshmi S., Vijayalakshmi S., Devi, R. V. Pharmacological activities of *Catharanthus roseus*: a perspective review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2013, 4(2), 431-439.
- [19] Mishra J. N., Verma N. K. A brief study on *Catharanthus roseus*: A review. *Intern J Res Pharmacy Pharmaceut Sci*, 2017, 2(2), 20-23

- [20] *Catharanthus roseus*. *CABI Digital Library*, 2009, dostupné z: [https://www.cabidigitallibrary.org/cms/10.1079/cabicompendium.16884/asset/332e201d-2b26-4be8-b4fe-fc8e36361340/assets/graphic/16884\\_06.jpg](https://www.cabidigitallibrary.org/cms/10.1079/cabicompendium.16884/asset/332e201d-2b26-4be8-b4fe-fc8e36361340/assets/graphic/16884_06.jpg)
- [21] Arulmozhi, S., Mazumder, P. M., Ashok, P., et al. Pharmacological activities of *Alstonia scholaris* Linn.(Apocynaceae)-A review. *Pharmacognosy Reviews*, 2007, 1(1), 163-170.
- [22] Baliga M. S. Review of the phytochemical, pharmacological and toxicological properties of *Alstonia Scholaris* Linn. R. Br (Saptaparna). *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2012, DOI: 10.1007/s11655-011-0947-0
- [23] Shang J. H., Cai X. H., Feng T., et al. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: Anti-inflammatory and analgesic effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 129(2), 174-181, DOI: 10.1016/j.jep.2010.02.011
- [24] *Alstonia scholaris*. *SpringerLink*, 2021, dostupné z: [https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-3-030-45597-2\\_17-2/MediaObjects/454779\\_0\\_En\\_17-2\\_Fig1\\_HTML.jpg](https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-3-030-45597-2_17-2/MediaObjects/454779_0_En_17-2_Fig1_HTML.jpg)
- [25] Singh A., Uppal G. K. A review on *Carissa carandas* phytochemistry, ethnopharmacology, and micropropagation as conservation strategy. *Asian J Pharm Clin Res*, 2015, 8(3), 26-30.
- [26] *Carissa Carandas*. *Radio Generis*, 2019, dostupné z: <https://mlvldlzbgrf.i.optimole.com/w:750/h:500/q:mauto/https://radiogeneris.com/wp-content/uploads/2019/07/carissa-carandas-595eb6db-b6f7-46d8-ae22-876765f6e80-resize-750.jpeg>
- [27] Bandara V., Weinstein S. A., White J., et al. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon*, 2010, 56(3), 273-281, DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.03.026
- [28] Al-Snafi A. E. Bioactive ingredients and pharmacological effects of *Nerium oleander*. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2020, 10(9), 19-32.
- [29] Sinha S. N., Biswas K. A concise review on *Nerium oleander* L.—an important medicinal plant. *Trop. Plant Res*, 2016, 3, 408-412.

- [30] *Nerium oleander*. CABI Digital Library, 2016, dostupné z: [https://www.cabidigitallibrary.org/cms/10.1079/cabicompendium.36220/asset/f548fd51-5e26-487d-96ab-920815aa4049/assets/graphic/36220\\_09.jpg](https://www.cabidigitallibrary.org/cms/10.1079/cabicompendium.36220/asset/f548fd51-5e26-487d-96ab-920815aa4049/assets/graphic/36220_09.jpg)
- [31] Bihani T. *Plumeria rubra* L.– A review on its ethnopharmacological, morphological, phytochemical, pharmacological and toxicological studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 264, DOI: 10.1016/j.jep.2020.113291
- [32] Verma S. Multipurpose ornamental plant *Plumeria rubra* Linn (Apocynaceae). *Int J Sci Res Sci Eng Technol*, 2016, 2, 646-649.
- [33] Zaheer Z., Konale A. G., Patel K. A., et al. *Plumeria Rubra* Linn., An Indian Medicinal Plant. *International Journal of Pharmacy & Therapeutics*, 2010, 1(2), 116-119.
- [34] *Plumeria rubra*. CABI Digital Library, 2011, dostupné z: [https://www.cabidigitallibrary.org/cms/10.1079/cabicompendium.42060/asset/82bfc08a-f58f-4dc5-add2-7c596f8ace97/assets/graphic/42060\\_12.jpg](https://www.cabidigitallibrary.org/cms/10.1079/cabicompendium.42060/asset/82bfc08a-f58f-4dc5-add2-7c596f8ace97/assets/graphic/42060_12.jpg)
- [35] Hirsawa Y., Dai X, Deguchi J., et al. New vasorelaxant indole alkaloids, taberniacins A and B, from *Tabernaemontana divaricata*. *Journal of Natural Medicines*, 2019, 73(3), 627-632, DOI: 10.1007/s11418-019-01293-9
- [36] Pratchayasakul W., Pongchaidecha A., Chattipakorn N., et al. Ethnobotany & ethnopharmacology of *Tabernaemontana divaricata*. *The Indian journal of medical research*, 2008, 127(4), 317–335.
- [37] Ghosh P., Poddar S., Chatterjee S. Morphological features, phytochemical and ethnopharmacological attributes of *Tabernaemontana divaricata* Linn: A comprehensive review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2021, 10(6), 31-36, DOI: 10.22271/phyto.2021.v10.i6a.14253
- [38] *Tabernaemontana divaricata*. CABI Digital Library, 2019, dostupné z: [https://www.cabidigitallibrary.org/cms/10.1079/cabicompendium.52519/asset/6998daf0-969c-45e5-862b-ed2f0de3b01d/assets/graphic/52519\\_13.jpg](https://www.cabidigitallibrary.org/cms/10.1079/cabicompendium.52519/asset/6998daf0-969c-45e5-862b-ed2f0de3b01d/assets/graphic/52519_13.jpg)
- [39] Farahanikia B., Akbarzadeh T., Jahangirzadeh A., et al. Phytochemical Investigation of *Vinca minor* Cultivated in Iran. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 2011, 10(4), 777–785.
- [40] Khanavi M., Pourmoslemi S., Farahanikia B., et al. Cytotoxicity of *Vinca minor*. *Pharmaceutical biology*, 2010, 48(1), 96-100.

- [41] Smeyers Y. G., Smeyers N. J., Randez J. J., et al. A structural and pharmacological study of alkaloids of *Vinca minor*. *Molecular Engineering*, 1991, 1, 153-160, DOI: 10.1007/BF00420051
- [42] Cheryatova Y. S. Actual aspects of anatomical research of medicinal plant material of *Vinca minor* L. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 723(2), DOI: 10.1088/1755-1315/723/2/022036
- [43] *Vinca minor*. *BioLib.cz*, dostupné z: <https://www.biolib.cz/IMG/GAL/3167.jpg>
- [44] Dos Santos N. P., Pinto A. C., *Geissospermum vellosii*. *Revista Virtual de Química*, 2012, 4(2), 162-172.
- [45] HVAA Taxonomy Explorer: *Geissospermum vellosii* Allemão. *Herbario Virtual Austral Americano*, dostupné z: <https://herbariovaa.org/taxa/taxonomy/taxonomydynamicdisplay.php>
- [46] *Geissospermum vellosii* Allemão. *Global Biodiversity Information Facility*, 2022, dostupné z: <https://www.gbif.org/species/3616313>
- [47] *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers. *Pl@ntNet*, 2021, dostupné z: [https://identify.plantnet.org/cs/the-plant-list/species/Geissospermum%20laeve%20\(Vell.\)%20Miers/data](https://identify.plantnet.org/cs/the-plant-list/species/Geissospermum%20laeve%20(Vell.)%20Miers/data)
- [48] Almeida M. R., Lima J. A., dos Santos N. P., et al. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil?. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2009, 19(4), 942-952, DOI: 10.1590/S0102-695X2009000600026
- [49] Da Silva E Silva J. V., Cordovil Brigido H. P., Oliveira De Albuquerque K. C., et al. Flavopereirine—An Alkaloid Derived from *Geissospermum vellosii*—Presents Leishmanicidal Activity *In Vitro*. *Molecules*, 2019, 24(4), DOI: 10.3390/molecules24040785
- [50] Mbeunkui F., Grace M. H., Lila M. A. Isolation and structural elucidation of indole alkaloids from *Geissospermum vellosii* by mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2012, 885-886, 83-89, DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.12.018
- [51] Araújo J. Q., Lima J. A., Pinto A. da C., et al. Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Modeling*, 2011, 17(6), 1401-1412, DOI: 10.1007/s00894-010-0841-2

- [52] Lima J. A., Costa R. S., Epifânio R. A., et al. *Geissospermum vellosii* stem bark. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2009, 92(3), 508-513, DOI: 10.1016/j.pbb.2009.01.024
- [53] Werner J. A. T., Oliveira S. M., Martins D. F., et al. Evidence for a role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 125(1), 163-169, dostupné z: DOI: 10.1016/j.jep.2009.05.026
- [54] National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 71594129, Geissoschizone*, 2023, dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Geissoschizone>
- [55] Bemis D. L., Capodice J. L., Desai M., et al. Beta-carboline alkaloid-enriched extract from the amazonian rain forest tree pao pereira suppresses prostate cancer cells. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, 2009, 7(2), 59–65.
- [56] Yu J., Chen Q. The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. *Pharmaceutical Biology*, 2013, 52(1), 36-43, DOI: 10.3109/13880209.2013.808232
- [57] Chang C., Zhao W., Xie B., et al. Pao Pereira Extract Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Cell Growth, Survival, and Invasion Through Inhibition of NF $\kappa$ B Signaling. *Integrative Cancer Therapies*, 2014, 13(3), 249-258, DOI: 10.1177/1534735413510557
- [58] Li J. M., Huang Y. C., Kuo Y. H., et al. Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence. *Cancers*, 2019, 11(7), DOI: 10.3390/cancers11071034
- [59] Yeh H. T., Tsai Y. S., Chen M. S., et al. Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the AKT/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 863, DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172658
- [60] Muñoz V., Sauvain M., Bourdy G., et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 69(2), 127-137, DOI: 10.1016/S0378-8741(99)00148-8

- [61] Bertania S., Bourdyb G., Landaua I., et al. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 98(1-2), 45-54, DOI: 10.1016/j.jep.2004.12.020
- [62] Lima J. A., Costa T. W. R., Silva L. L., et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2016, 88(1), 237-248, DOI: 10.1590/0001-3765201520140374
- [63] Saraiva R. M. C., da Silva Borges E., Ferreira F. A., et al. Antibacterial activity of medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2012, 3(12), 4841-4847.
- [64] Richter L., Screeningová studie různých rostlinných taxonů a jejich vliv na lidské enzymatické systémy II., Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie, 2022.
- [65] Trieu T. H., Dong J., Zhang Q., et al. Total Syntheses of Eudistomins Y1–Y7 by an Efficient One-Pot Process of Tandem Benzylic Oxidation and Aromatization of 1-Benzyl-3,4-dihydro- $\beta$ -Carbolines. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013, 16, 3271-3277, DOI: 10.1002/ejoc.201300080
- [66] Reimann Ch. E., Ngamnithiporn A., Hayashida K., et al. The Enantioselective Synthesis of Eburnamonine, Eucophylline, and 16'-epi-Leucophyllidine. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(33), 17957-17962, DOI: 10.1002/anie.202106184
- [67] Huang Y. Q., Song H. J., Liu Y. X., et al. Dehydrogenation of N-Heterocycles by Superoxide Ion Generated through Single-Electron Transfer. *Chemistry – A European Journal*, 2017, 24(9), 2065-2069, DOI: 10.1002/chem.201705202
- [68] Guimarães H. A., Braz-Filho R., Vieira I. J. C. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR Data of the Simplest Plumeran Indole Alkaloids Isolated from *Aspidosperma* Species. *Molecules*, 2012, 17(3), 3025-3043, DOI: 10.3390/molecules17033025
- [69] Pérez N. M., Torrico F. B., Morales A. Acute toxicity, antinociceptive activity and indole alkaloids of aqueous extract from bark of *Aspidosperma cuspa* (Kunth) Blake. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 143(2), 599-603, DOI: 10.1016/j.jep.2012.07.021

- [70] Reina M., Ruiz-Mesia W., López-Rodríguez M., et al. Indole Alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(5), 928-934, DOI: 10.1021/np300067m
- [71] Kleks G., Duffy S., Lucantoni L., et al. Orthoscuticellines A–E,  $\beta$ -Carboline Alkaloids from the Bryozoan *Orthoscuticella ventricosa* collected in Australia. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(2), 422-428, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00933
- [72] Yang M. L., Kuo P. Ch., Hwang T. L., et al. Anti-inflammatory Principles from *Cordyceps sinensis*. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(9), 1996-2000, DOI: 10.1021/np100902f
- [73] Huang H., Yao Y., He Z., et al. Antimalarial  $\beta$ -Carboline and Indolactam Alkaloids from *Marinactinospora thermotolerans*, a Deep Sea Isolate. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(10), 2122-2127, DOI: 10.1021/np200399t
- [74] Ajiboye T.O., Hussaini A. A., Nafiu B. Y., et al. Aqueous seed extract of *Hunteria umbellata* (K. Schum.) Hallier f. (Apocynaceae) palliates hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, inflammation and oxidative stress in high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 198, 184-193, DOI: 10.1016/j.jep.2016.11.043
- [75] Awang K., Ismail N. H., Velu S. S., et al. Alkaloids from the Malayan *Hunteria zeylanica* Gard. *Malaysian Journal of Science*, 2009, 28(2), 205–208, DOI: 10.22452/mjs.vol28no2.9
- [76] Fandy T., Abdallah I., Colby D., et al. (2016). *In vitro* characterization of transport and metabolism of the alkaloids: vincamine, vinpocetine and eburnamonine. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2016, 77(2), 259-267, DOI: 10.1007/s00280-015-2924-3.
- [77] Zhang L., Li D., Yu S. Pharmacological effects of harmine and its derivatives: a review. *Archives of Pharmacal Research*, 43, 1259-1275, 2020, DOI: 10.1007/s12272-020-01283-6
- [78] Ferrari C., McLean S., Marion L., et al. A New Aspidosperma alkaloid: *O*-Demethylaspidocarpine. *Canadian Journal of Chemistry*, 2011, 41(6), 1531-1534, DOI: 10.1139/v63-208

- [79] Andrade-Neto V. F. de, Pohlit A. M., Pinto A. C. S., et al. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2007, 102(3), 359-266, DOI: 10.1590/S0074-02762007000300016
- [80] Monteiro N. O., Monteiro T. de M., Nogueira T. S. R., et al. Antihypertensive Activity of the Alkaloid Aspidocarpine in Normotensive Wistar Rats. *Molecules*, 2022, 27(20), 6895, DOI: 10.3390/molecules27206895
- [81] Reina M., Ruiz-Mesia W., Ruiz-Mesia L., et al. Indole Alkaloids from *Aspidosperma rigidum* and *A. schultesii* and their Antiparasitic Effects. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2011, 66(5-6), 225-234, DOI: 10.1515/znc-2011-5-605

## Abstrakt

Strašková, V.: Izolace alkaloidů druhu *Geissospermum vellosii* Allemão a studium jejich biologické aktivity VII. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2023, 75 s.

Klíčová slova: *Geissospermum vellosii*, kůra, alkaloidní extrakty, izolace alkaloidů, GC/MS analýza, biologická aktivita, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa.

Hlavním cílem diplomové práce byla izolace čistých alkaloidů z kmenové kůry *Geissospermum vellosii* a otestování jejich biologické aktivity. *G. vellosii* je jihoamerický strom z čeledi Apocynaceae. V lidovém léčitelství se využívá na různé patologické stavy (např. bakteriální, zánětlivá a plísňová onemocnění). Indolové alkaloidy izolované z kmenové kůry tohoto stromu vykazují významné biologické aktivity jako antineoplastickou, antimalarickou, anticholinesterásovou a další.

V této diplomové práci byly pro zpracování vybrány frakce GV-2, GV-7-D a GV-4-F. Frakce byly získány v rámci předchozích diplomových prací z původního alkaloidního extraktu kmenové kůry vykazující zajímavou inhibiční aktivitu vůči AchE a BuChE (AchE:  $IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ , BuChE:  $IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$ ). Z frakcí GV-2 a GV-7-D byly s použitím preparativní tenkovrstvé chromatografie získány čtyři alkaloidy: 1-acetyl- $\beta$ -karbolin, eburnamonin, harmin a nový alkaloid. Frakce GV-4-F byla separována prostřednictvím flash chromatografie a preparativní tenkovrstvé chromatografie. Byly získány tři alkaloidy *O*-demethylaspidokarpin, aspidokarpin a aspidolimidin. Identifikace získaných látek byla provedena porovnáváním naměřených hmotnostních spekter získaných pomocí GC/MS analýzy a NMR spekter se spektry dostupnými v literatuře.

Na závěr byly provedeny testy biologické aktivity se zaměřením na anticholinesterásovou aktivitu. Cholinesterázy jsou enzymy, na které se cílí při terapii Alzheimerovy choroby. Blokáda těchto enzymů ovlivňuje poškozené kognitivní funkce a zmírňuje tak projevy dosud nevléčitelného onemocnění. Izolované látky by při průkazu významné inhibiční aktivity mohly sloužit jako nové terapeutické možnosti.

## Abstract

Strašková, V.: Isolation of alkaloids of the species *Geissospermum vellosii* Allemão and study of their biological activity VII. Diploma thesis, Charles University, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové, Department of pharmacognosy and pharmaceutical botany, Hradec Králové 2023, 75 s.

Key words: *Geissospermum vellosii*, bark, alkaloidal extracts, isolation of alkaloids, GC/MS analysis, biological activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.

The main goal of this diploma thesis was isolation of pure alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii* and test their biological activity. *G. vellosii* is a South American tree from the Apocynaceae family. It is used in traditional medicine for various pathological conditions (e.g., bacterial, inflammatory, and fungal diseases). Indole alkaloids isolated from the stem bark of this tree exhibit significant biological activities such as antineoplastic, antimalarial, and anticholinesterase activities.

For processing, the GV-2, GV-7-D, and GV-4-F fractions were selected in this diploma thesis. These fractions were obtained in previous studies from the original alkaloid extract of the stem bark, which showed interesting inhibitory activity against AchE and BuChE (AChE:  $IC_{50} = 15,19 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ , BuChE:  $IC_{50} = 0,37 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$ ). Four alkaloids, namely 1-acetyl- $\beta$ -carboline, eburnamonine, harmine, and a new alkaloid, were obtained from the GV-2 and GV-7-D fractions using preparative thin-layer chromatography. The GV-4-F fraction was separated through flash chromatography and preparative thin-layer chromatography, resulting in the isolation of three alkaloids: *O*-demethylaspidocarpine, aspidocarpine, and aspidolimidine. The identification of the isolated compounds was performed by comparing the measured mass spectra obtained through GC/MS analysis and NMR spectra with spectra available in the literature.

At the end, biological activity tests were conducted with a focus on anticholinesterase activity. Cholinesterases are enzymes targeted in Alzheimer's disease therapy. Blocking these enzymes affects impaired cognitive functions, alleviating the symptoms of an incurable disease. The isolated compounds, if they demonstrate significant inhibitory activity, could serve as novel therapeutic options.