

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologicky aktivní metabolity rostlin 10.

Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich biologická aktivita

Biologically active metabolites of plants 10.

Alkaloids of *Fumaria officinalis* L. and their biological activity

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

2013, Hradec Králové

Marcela Šafratová

PROHLÁŠENÍ

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

Hradec Králové

2013

Marcela Šafratová

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV/2013/267002

Děkuji Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D., Mgr. Jakubu Chlebkovi, Ph.D.;
Prof. RnDr. Lubomíru Opletalovi CSc. za pomoc se zpracováním diplomové práce, za jejich rady a poskytnuté materiály. Dále bych chtěla poděkovat Dominice Kassemové za její pomoc v průběhu celé práce, Mgr. Zdeňku Novákovi za změření a interpretaci NMR spekter, Ing. Kateřině Macákové Ph.D. za měření biologických aktivit a celému kolektivu katedry Farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí. Poděkování patří i mé rodině za její podporu a trpělivost.

Obsah

Obsah	4
1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 Demence	13
3.1.1 Definice demence	13
3.1.2 Rozdělení jednotlivých typů demencí.....	13
3.1.3 Epidemiologie	13
3.2 Alzheimerova choroba.....	14
3.2.1 Definice.....	14
3.2.2 Historie.....	14
3.2.3 Epidemiologie	15
3.2.4 Etiopatogeneze.....	15
3.2.5 Klinický obraz.....	17
3.2.6 Stádia Alzheimerovy choroby	17
3.2.7. Diagnóza	18
3.2.8 Terapie Alzheimerovy choroby	18
3.2.8.1 Léky zlepšující kognitivní funkce.....	19
3.2.8.2. Látky ovlivňující působení volných radikálů	21
3.2.8.3 Látky tlumící excitotoxicitu.....	22
3.2.8.2 Látky ovlivňující nekognitivní funkce.....	22
3.2.8.3 Nefarmakologické přístupy v léčbě	22
3.2.9 Přírodní látky působící jako inhibitory cholinesteráz	23
3.3 <i>Fumaria officinalis</i> - Zemědým lékařský (Fumariaceae)	27
3.3.1. Synonyma	27
3.3.2 Taxonomické zařazení	27
3.3.3 Botanický popis čeledi <i>Fumariaceae</i>	28
3.3.4 Botanický popis rostliny	29
3.3.5 Lidové léčitelství.....	29

3.3.6	Obsahové látky <i>Fumaria officinalis</i>	29
3.3.6.1	Protopinové alkaloidy	30
3.3.6.2	Protoberberinové alkaloidy	30
3.3.6.3	Aporfinové alkaloidy	31
3.3.6.4	Ftalidisochinolinové alkaloidy	32
3.3.6.5	Spirobenzylisochinolinové alkaloidy	33
3.3.6.6	Benzofenantridinové alkaloidy	34
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1	Všeobecné postupy	38
4.1.1	Destilace a odpařování	38
4.1.2	Chromatografie	38
4.1.2.1	Sloupcová chromatografie	38
4.1.2.2	Tenkovrstvá chromatografie	38
4.1.3	Teplota tání	38
4.2	Materiál a vybavení	39
4.2.1	Rozpouštědla a chemikálie	39
4.2.2	Chemikálie a materiál používaný pro stanovení inhibiční aktivity erytrocytární AChE a sérové BuChE	39
4.2.3	Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity	40
4.2.4	Detekční činidla	40
4.2.5	Chromatografické adsorbenty	40
4.3	Příprava sumárního extraktu z <i>Fumaria officinalis</i>	41
4.3.1	Původ drogy	41
4.3.2	Příprava sumárního extraktu	41
4.3.3	Příprava a zpracování etherového výtřepku A ze sumárního extraktu	43
4.3.4	Sloupcová chromatografie	43
4.3.5	Zpracování frakce 50 – 54	45
4.3.6	Zpracování frakce 55-67	46
4.4	Stanovení inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů	47
4.4.1	Příprava erytrocytárních pouzder	48
4.4.2	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity	48
4.5	Určení struktury izolovaných alkaloidů	48

4.5.1 Měření hmotnostního spektra	48
4.5.2 Měření NMR spekter	49
5. VÝSLEDKY	50
5.1 Strukturní analýza stylopinu	51
5.1.1 MS studie stylopinu	51
5.1.2 NMR studie stylopinu	51
5.2 Strukturní analýza sinaktinu	53
5.2.1 MS studie sinaktinu	53
5.2.2 NMR studie sinaktinu	53
5.3 Strukturní analýza fumarilinu	56
5.3.1 MS studie fumarilinu	56
5.3.2 NMR studie fumarilinu	56
5.3.2.1 ¹ H NMR studie fumarilinu	57
5.3.2.2 ¹³ C NMR studie fumarilinu	57
5.4 Optická otáčivost	58
5.5 Teploty tání	58
5.6 Výsledky inhibičních aktivit vůči AChE a BuChE	59
6. DISKUZE	60
7. LITERATURA	63
8. SEZNAM ZKRATEK	70

1.ÚVOD

Již v dávných dobách lidé okolo sebe mezi rostlinami hledali takové, které by pokryly jejich potřeby. Snaha zabezpečit si přežití vedla především k rozvoji pěstování výnosných plodin pro člověka a zdomácnělá zvířata. Spotřebu léčivých rostlin v této době pokryl pouhý sběr v přírodě. Přibližně 25% rostlinných druhů má nějaký léčivý účinek. Dědictví po našich předcích se vyvinulo do podoby izolací a samotné produkce čisté aktivní složky obsažené v rostlinách. Posléze vývoj dospěl k výrobě jednotlivých syntetických obměn těchto sloučenin. Některé z těchto syntéz byly prospěšné (kyselina acetylsalicylová), jiné už byly prospěšné méně (heroin). Statistika ukazuje, že v posledních desetiletích se nově vyvinutým léčivům staly předlohou právě přírodní produkty [1].

Izolace aktivní složky v její čisté formě a hodnocení jejích farmakologických vlastností vede k tomu, že nalezení samotného léčiva je cestou dlouhou a drahou. Klinický výzkum představuje dvě třetiny celkového rozpočtu pro vývoj nového léčiva. Padesát procent všech potenciálních léčiv je vyřazeno kvůli špatné absorpci, distribuci, metabolismu, exkreci nebo toxicitě. Rostlinné buňky produkují dva druhy metabolitů. Primární metabolity se vytvářejí během samotného růstu, fotosyntézou. Sekundární metabolity jsou produktem sekundárního metabolismu a nezačleňují se do metabolických aktivit rostlin [2, 3]. Mezi nejvýznamnější sekundární metabolity patří alkaloidy. Jedná se o látky bazického charakteru, které vznikají přeměnou aminokyselin, jejich význam pro rostliny není prozatím zcela objasněn, zřejmě se jedná o určitou formu ochrany před živočichy. Je známo, že rostliny stejného druhu obsahují vždy chemicky příbuzné alkaloidy [4]. Alkaloidy jsou významné z hlediska jejich farmakologických vlastností. Některé mají nezanedbatelný vliv na aktivitu cholinesteráz, jedná se především o alkaloidy isochinolinové struktury. Tato skupina alkaloidů má významné zastoupení v čeledích *Papaveraceae*, *Fumariaceae*, *Ranunculaceae*, *Amaryllidaceae*, *Berberidaceae* a dalších.

Inhibiční aktivita vůči cholinesterázám je důležitou vlastností, které se využívá při léčbě Alzheimerovy choroby (AD). Jedná se neurodegenerativní onemocnění, které je spojeno s celosvětovým stárnutím populace. AD je nejčastější příčinou demence a je nevyléčitelná, končí smrtí. Projevuje se poruchami kognitivních funkcí, paměti, úzkostí, poruchami spánku, v těžkých stádiích jsou pacienti plně odkázáni na pomoc druhých. Mezi mikroskopické znaky této nemoci patří senilní plaky a neurofibrilární klubka, dále

úbytek neuronů a acetylcholinu. Právě úbytek acetylcholinu má za následek poruchy kognitivních funkcí [5].

V současnosti však neznáme vhodný farmakoterapeutický postup, jak tomuto onemocnění zabránit. V léčbě se uplatňují dva základní postupy, a to pomocí inhibitorů cholinesteráz (IChE), nebo inhibitorů glutamátových NMDA-receptorů, které pouze prodlužují jednotlivá stadia, samotné nemoci však nezabrání. Inhibitory cholinesteráz zvyšují obsah acetylcholinu v synapsích a tím dochází ke zlepšení přenosů v CNS, jsou indikovány především v lehkých až středních stádiích choroby. Do této skupiny patří donepezil, rivastigmin a galanthamin. Pro těžká stadia nemoci jsou určeny inhibitory NMDA-receptorů, látky z této skupiny zabraňují nadměrné excitaci neuronů. Jako jedinou látku sem řadíme memantin [6].

V dnešní době je k dispozici málo léčiv, které mají potřebné vlastnosti. Proto se pomocí biologických screeningů stále hledají nové potencionální zdroje, bohužel valná většina takto nalezených látek má závažné nežádoucí účinky. Z tohoto důvodu se nemohlo pokračovat v dalším testování. Za jeden z potencionálních zdrojů inhibitorů cholinesteráz je považován i zemědělný lékářský (*Fumaria officinalis*), respektive sekundární metabolity, které jsou produkovány touto rostlinou. Právě izolace alkaloidů z této rostliny a jejich biologická aktivita se staly předmětem této práce.

2.CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce:

- 1) Rozdělení etherového extraktu z drogy *Fumaria officinalis* na chromatografické koloně na jednotlivé frakce.
- 2) Zpracování dvou frakcí za účelem izolace alespoň dvou alkaloidů v čisté formě.
- 3) Stanovení základních fyzikálně-chemických vlastností izolovaných látek a jejich strukturní identifikace.
- 4) Stanovení biologických aktivit (inhibiční aktivity vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze, antioxidační aktivity) izolovaných alkaloidů.
- 5) Zpracování výsledků a sepsání práce.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Demence

3.1.1 Definice demence

Jedná se o skupinu duševních poruch, jejichž nejzákladnějším rysem je podstatný úbytek kognitivních funkcí, především paměti a intelektu. Tento úbytek je způsobený mozkovým onemocněním, při kterém dochází i k narušení běžných činností postiženého jedince. Narušení těchto funkcí musí být tak velké, aby interferovalo s běžnými životními aktivitami [7]. Demence je syndrom zahrnující různé symptomy, přičemž kognitivní poruchy jsou obvykle ze všech symptomů nejvýznamnější. Demenci zařazujeme mezi organická onemocnění, uplatňují se zde choroby, které můžeme samostatně definovat a které poškozují tkáň mozku [8, 9].

3.1.2 Rozdělení jednotlivých typů demencí

Příčin demencí může být mnoho. Podle jednotlivých příčin dochází k dělení demencí na degenerativní onemocnění nervového systému, cerebrovaskulární onemocnění (multiinfarktový syndrom), infekční demence (prionové choroby, komplex-AIDS-demence), metabolické poruchy s postižením mozku, neoplazie, epilepsie, endokrinní poruchy, toxické demence (oxid uhelnatý, alkohol), psychiatrická afekce (deprese), poranění, demyelinizace (roztřesená skleróza) [10].

Degenerativní onemocnění nervového systému rozdělujeme do tří skupin - na kortikální, subkortikální a smíšené kortiko-subkortikální formy. Kortikální demence je charakteristická postižením paměti, přičemž poruchy v chování se objevují později. Tento typ je charakteristický pro AD. Druhý typ, subkortikální demence, se projevuje v poruše úsudku, v plánování a samotné realizaci některých činností. Tento typ je spojován často s depresí, doprovází onemocnění postihující bazální ganglia jako je Parkinsonova nemoc [11].

3.1.3 Epidemiologie

Mezi nejčastější zdravotní problémy ve stáří patří kardiovaskulární choroby, poruchy pohybového aparátu, metabolické a gastrointestinální choroby, kognitivní poruchy a demence. Postižení jsou často kombinována a není snadné je správně

identifikovat. Proto se stává, že některá onemocnění bývají nesprávně diagnostikována. K tomuto problému často dochází u depresí a demencí [12]. U osob starších 65 let je prevalence 10 %, s rostoucím věkem se však výskyt dále zvyšuje, u osob nad 80 let je četnost více než 30 %. V souvislosti s celosvětovým stárnutím populace se demence stává jedním z nejzávažnějších socioekonomických problémů. Nejméně v 60 % případů je příčinou AD, vzácnější je frontotemporální demence a Parkinsonova nemoc. Druhou nejčastější příčinou je multiinfarktová encefalopatie (15 %), jedná se o nejčastější příčinu demencí ze skupiny sekundárních demencí. U geriatrických pacientů jsou časté i smíšené formy, AD a vaskulární demence. Presenilní demence začíná před 65 rokem života, senilní demence později [13].

3.2 Alzheimerova choroba

3.2.1 Definice

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demencí ve středním a vyšším věku. Jedná se o chronicko-progresivní onemocnění šedé kůry mozkové, podkladem je degenerativní zánik neuronů s tvorbou charakteristických histopatologických změn. Podle toho chorobu dělíme na presenilní formu (začátek před 65. rokem věku) a formu senilní (nástup příznaků po 65. roce věku). Délka onemocnění se pohybuje mezi 2 až 12 lety, má tři stádia: časné, střední a těžké [8, 12].

3.2.2 Historie

Onemocnění je pojmenované podle Aloise Alzheimerera (14. června 1864 – 19. prosince 1915), který byl ředitelem Královské psychiatrické kliniky v Mnichově. Počátkem výzkumu bylo roku 1892 objevení senilních plaků Blocqem a Marinescem. Mezi lety 1906 a 1907 byla A. Alzheimerem pronesena přednáška o jedné z jeho pacientek. Pacientka trpěla řadou symptomů, které se týkaly poruch paměti, potíží porozumět a zmatenosti. Po několika letech pacientka zemřela a byla jí provedena pitva mozku. Při pitvě byly nalezeny senilní plaky obklopující nervové buňky a uvnitř nervových buněk fibrily. V šedesátých letech dvacátého století byla objevena souvislost mezi počtem senilních plaků a fibril a kognitivními funkcemi. Teprve poté byla

odbornou komunitou uznána AD jako nemoc a již dále nebyla považována za pouhou součást přirozeného stárnutí [14, 15].

3.2.3 Epidemiologie

Prevalence AD se exponenciálně zvyšuje s věkem nad 65 let. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem je věk a přítomnost alely apolipoproteinu E4, mezi vedlejší rizikové faktory řadíme ženské pohlaví, výskyt AD nebo Downova syndromu v rodině, cerebrovaskulární onemocnění, arteriální hypertenze či trauma hlavy v osobní anamnéze. Mezi ochranné vlivy patří užívání nesteroidních antirevmatik, postmenopauzálních estrogenů a statinů. V 90 % případů je prokázána kongofilní amyloidová angiopatie, dochází k ukládání amyloidu ve stěně tepen [11, 16].

3.2.4 Etiopatogeneze

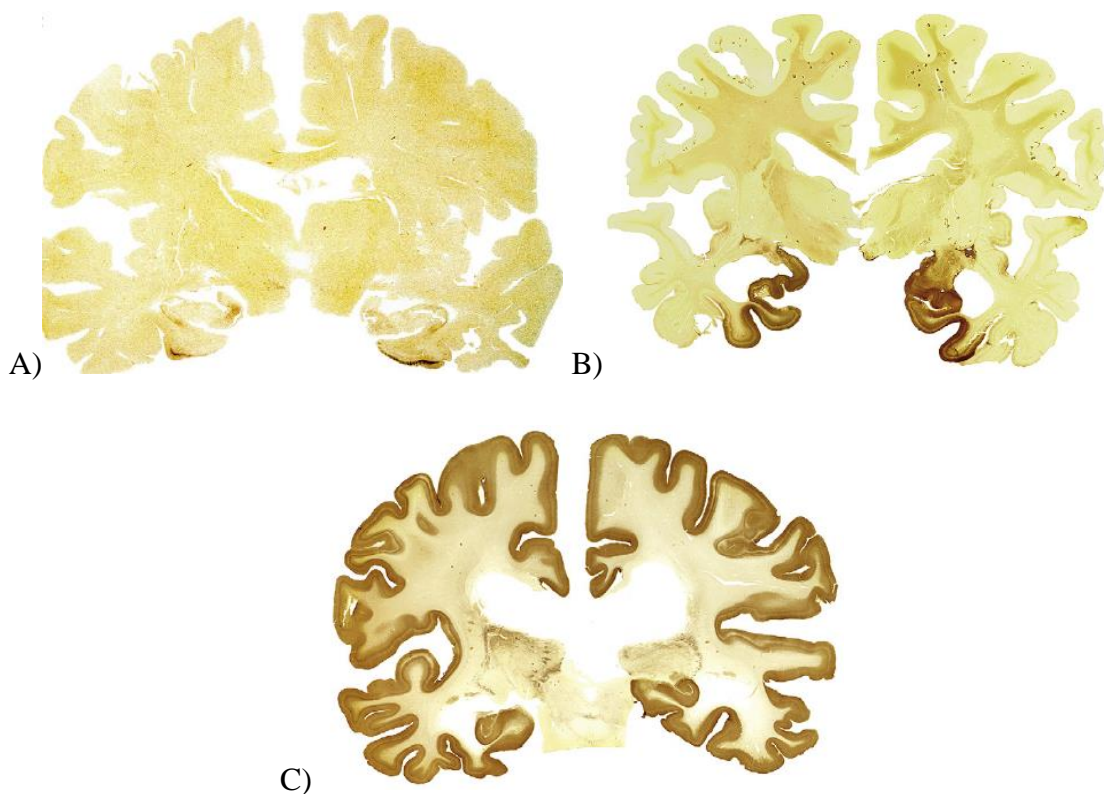
Mechanismy a příčiny AD nejsou zcela objasněny, nejspíše se na nich podílí několik faktorů, mezi nejdůležitější patří genetické. Této skutečnosti nasvědčuje i fakt, že u jedinců postižených Downovým syndromem se vyvíjejí histologické změny typické pro AD.

AD se projevuje kortiko-subkortikální atrofií. Mezi makroskopické změny patří ztenčení mozkové kůry, rozšíření mozkových komor, zmenšení hipokampů a rozšíření temporálních rohů postranních komor. Mikroskopické změny mohou být jak extracelulární (senilní plaky), tak intracelulární (neurofibrilární klubka) [12].

Senilní, nebo také alzheimerovské plaky, jsou tvořeny shluky β -amyloidu. Kolem těchto depozit vznikají další neurodegenerativní procesy. Platí přímá úměra mezi počtem plaků a postižením demencí. Depozita jsou tvořena fragmenty amyloidového prekurzorového proteinu (APP). APP je ve zdravém mozku štěpen α -sekretázou na fragmenty, které jsou dále rozpustné. V mozku, který je postižen AD, je APP štěpen β a γ -sekretázami. Dochází tak ke štěpení na fragmenty, které jsou nerozpustné a koagulují. Tento proces vede ke vzniku β -amyloidu, v jehož okolí vlivem dalších degenerativních procesů dojde k apoptóze dalších neuronů [12, 17].

Intracelulární změny jsou z neznámého důvodu způsobeny tím, že neurony začnou vytvářet abnormálně fosforylovaný tau protein, který se neváže na mikrotubuly a leží volně v cytosolu [18, 19]. Ukládání tau proteinu rozděluje do 4 fází (Obr. 1) [20].

V první a druhé fázi (Obr. 1A) jsou depozita tau proteinu většinou lokalizována uvnitř entorhinální korové oblasti. V průběhu této první fáze se kortikální neurony, které jsou náchylné k degračním procesům AD, nacházejí na příčně přiléhající transentorhinální oblasti spánkového laloku [21]. V třetím stadiu (Obr. 1B) jsou patologické změny omezeny na několik míst v prostřední části spánkového laloku. V tomto stádiu je u některých pacientů diagnostikováno mírné zhoršení kognitivních funkcí [22]. V poslední fázi AD (Obr. 1C) je vidět značné neuronální poškození. Jedinci v této fázi AD nemají již plně funkční mozkovou kůru a jsou téměř vždy dementní. Nicméně právě v tento okamžik dochází ke stanovení správné klinické diagnózy [23].



Obr. 1: Změny mozkové kůry způsobené ukládáním tau proteinu

V oblasti senilních plaků dochází ke vzniku sterilního zánětu, to vede k aktivaci mikroglíí, které se transformují do podoby makrofágů. Uvolněním cytokininů, hlavně interleukinu 1, dojde k aktivaci cyklooxygenázy a k syntéze prostaglandinů. Ve vyšší míře se uvolňují excitační aminokyseliny (glutamát, aspartát), které se váží na receptory

otvírající iontové kanály, především NMDA-receptory. Aktivací receptorů dojde ke zvýšenému influxu kalciových iontů do neuronu a to způsobuje destabilizaci vnitřního prostředí. Důsledkem celé kaskády je spuštění apoptických enzymů a zánik neuronu.

3.2.5 Klinický obraz

V časných stádiích je onemocnění bezpříznakové, v tomto období je aktivována latentní mozková rezerva a díky tomu jsou zajištěny normální kognitivní funkce. Téměř neznatelně se objevuje zapomnětlivost, poruchy prostorového vnímání a orientace, neschopnost abstraktního myšlení [24]. Později dochází ke snížení výkonosti natolik, že si to uvědomuje i sám nemocný nebo jeho okolí. Paměť bývá porušena difúzně, ve všech složkách, méně však bývá porušena zásobní paměť, zvláště pokud se jedná o vyvolávání starých zafixovaných informací [25]. Opakem je krátkodobá paměť, která bývá postižena nejvýrazněji. V pozdějších stádiích nahrazují pacienti výpadky paměti konfabulací, odpověď sice zapadá do kontextu, ale není pravdivá, oni jsou však přesvědčeni o pravdivosti svého tvrzení [26]. V pozdějších stádiích dochází až k amnestické dezorientaci [11].

Významné jsou emoční a motivační poruchy. Pacient ztrácí své sociální vnímání, někdy mohou být přítomné manie či deprese [24]. V některých případech může docházet až k nepřiměřeným afektům. Mezi motivační poruchy patří ztráta základní péče pacienta o sebe samého. V pokročilých stádiích přestává být pacient postupně schopen se sám o sebe postarat a stává se tak závislým na svém okolí [9, 11, 24]

3.2.6 Stádia Alzheimerovy choroby

V počátečním stadiu se projevují především poruchy schopnosti učení se novým informacím. Pacient má obtíže s pozorováním a vybavováním nedávných událostí [27]. U některých postižených se může objevit potíže s vybavováním si jmen osob nebo obvykle používaných slov. Pokles paměti a další poruchy v tomto stadiu jsou překážkou v běžných denních činnostech, ale neomezují nemocného v tom, aby se o sebe dokázal postarat [11].

Ve středním stádiu onemocnění je porušena ta část paměti, která uchovává hluboce vštípenou nebo dobře známou látku. Nové informace si je schopen člověk vštípit pouze na velmi krátkou dobu, nebo vůbec. Pacient si nepamatuje ani svoji adresu a základní informace, co nedávno dělal, je dezorientovaný a ztrácí se v místech, která dříve dobře znal [11].

V pozdním těžkém stádiu se onemocnění vyznačuje úplnou ztrátou paměti. Pacient je neschopen cokoliv si zapamatovat a vybavuje si pouze zbytky informací, nepoznává svoji rodinu a je zcela nesoběstačný [28].

3.2.7. Diagnóza

Diagnóza vychází ze standardizovaných diagnostických kritérií demence, neexistuje totiž žádný neuropsychologický, morfologický nebo biochemický nález, který by spolehlivě prokázal AD. Základní neurologické vyšetření je schopno odhalit ložiskové poškození mozku a případné podezření demence je ověřováno orientačními vyšetřeními kognitivního stavu pomocí otázek a úkolů, které jsou zaměřené na orientaci, paměť, pozornost a další schopnosti [29].

Další možností, jak odhalit AD, je použití pomocných vyšetřovacích metod. Jejich hlavním účelem je zachytit léčitelné příčiny demence. Patří sem zobrazovací metody, jako je CT či MR mozku [30]. U nemocných s AD jsou prokázány abnormality krevního průtoku během řešení paměťových úloh a nedostatečné prokrvení v temporoparietálních oblastech mozku [31].

Za velmi důležitý makroskopický nález se považují neurofibrilní klubka, senilní plaky, amyloidová angiopate a úbytek neuronů. Nitrobuněčné změny neurofibril a proteinová depozita jsou odhalena pomocí specifických vyšetření, která používají speciální barvicí metody nebo elektronovou mikroskopii [13].

3.2.8 Terapie Alzheimerovy choroby

Při terapii AD musíme brát v úvahu fakt, že etiopatogeneze AD není zcela objasněna, a proto není možné provádět léčbu kauzálně, snažíme se pouze ovlivňovat jednotlivé známé etiopatogenetické řetězce. Při léčbě AD používáme jak farmakoterapii, tak i reedukační techniky a socioterapii. Při léčbě se můžeme setkat s pojmem ABC-symptomatologie Alzheimerovy choroby, jedná se o určení tří cílových

skupin léčby. Jsou to behaviorální změny, kognitivní poruchy a aktivity denního života. Léky pro léčbu demence můžeme rozdělit do dvou skupin: léky zlepšující kognitivní funkce a léky ovlivňující nekognitivní funkce [32].

3.2.8.1 Léky zlepšující kognitivní funkce

Porucha kognitivních funkcí je základní poruchou u AD. První volbou léčby jsou kognitiva, což jsou látky zvyšující kognitivní výkonnost. Můžeme je dělit do několika skupin vzhledem k mechanismu ovlivnění cholinergního systému [14].

a) Prekurzory syntézy acetylcholinu (ACh)

Podávání samotného acetylcholinu není možné, a to z toho důvodu, že ACh má velmi krátký poločas. Cholin se neosvědčil, protože velmi špatně prochází hematoencefalickou bariérou. Nejvíce se využívají lecitiny, které pozvolna uvolňují cholin, z kterého se syntetizuje acetylcholin. V praxi se lecitiny používají v kombinaci s inhibitory acetylcholinesteráz [33, 34].

b) Inhibitory cholinesteráz (IChE) (Obr. 2)

Dnes se jedná o nejdůležitější přístup v terapii AD. Enzymy cholinesteráz odbourávají ACh na cholin a kyselinu octovou. V CNS převažuje acetylcholinesteráza (AChE), naopak na periférii převažuje butyrylcholinesteráza (BuChE). Tím, že dojde k zablokování těchto enzymů, dojde ke zvýšení nabídky molekul acetylcholinu k vazbě na receptory. Od těchto látek nelze očekávat vyléčení nemoci, dojde pouze ke zpomalení jejího průběhu. Při včasném podání, u lehkých stádií demence, je prodlouženo období, kdy je pacient schopen zvládat běžné denní aktivity bez větší pomoci. Inhibitory jsou různého chemického složení, byly zjištěny tři způsoby mechanismů působení: reversibilní, ireversibilní a pseudoireversibilní způsob [35].

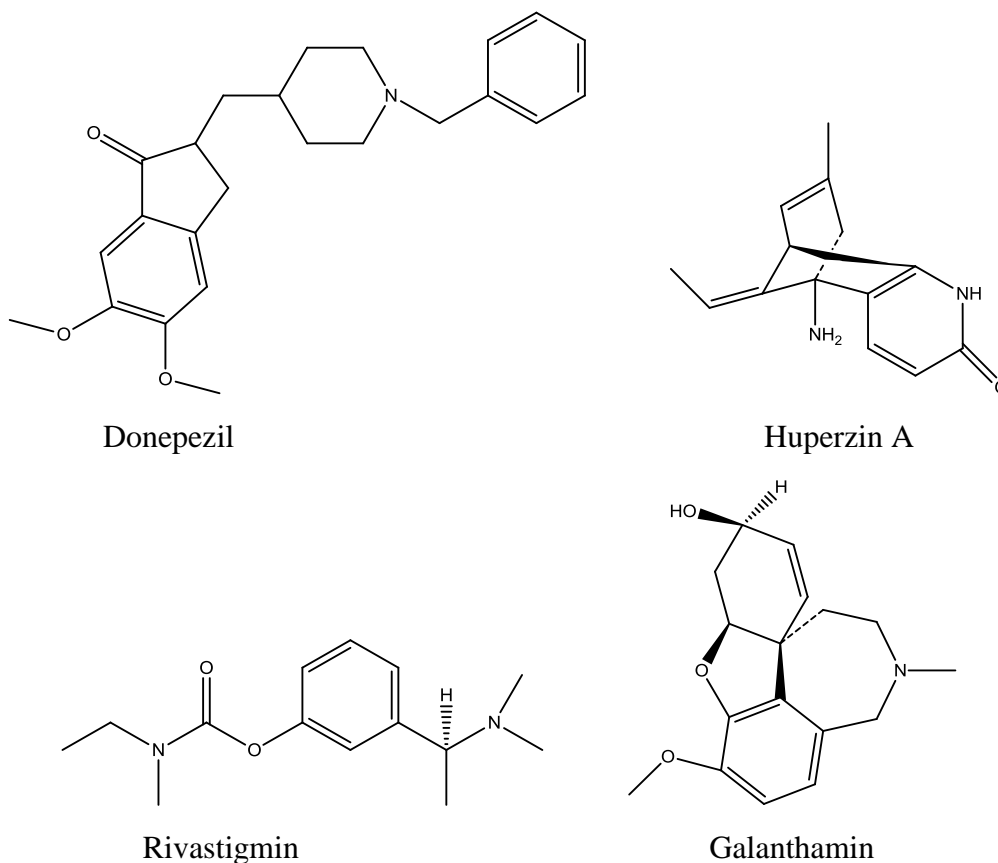
Mezi reversibilní inhibitory patří akridinové deriváty, jejich vývoj je však pouze ve fázi klinických zkoušek, nejznámějším z této skupiny je takrin. Další látkou patřící mezi reversibilní inhibitory je donepezil, patřící mezi piperidinové deriváty. Jedná se pouze o inhibitor AChE a je nejdéle na trhu. Donepezil dokáže zlepšit či stabilizovat kognitivní funkce, maximálně však po dobu jednoho roku. Donepezil je odbouráván systémem jaterních

enzymů, i přes tento způsob metabolismu není hepatotoxický a málo interferuje s ostatními farmaky [34].

Další skupinou jsou karbamátové deriváty, patřící mezi pseudoireverzibilní inhibitory. Nejrozšířenější látkou této skupiny je rivastigmin. Kromě AChE výrazně blokuje i BuChE. Minimálně zatěžuje organismus, jeho metabolismus totiž probíhá přímo na receptoru [35].

Alkaloidy patří mezi reverzibilní inhibitory, z této skupiny se osvědčily galanthamin a huperzin A. Huperzin A se pro léčbu již využívá v Číně, proto je jen otázkou času, kdy se bude používat i v České republice. Naopak galanthamin je již klinicky využíván. Jeho zvláštností je to, že se jedná o IChE a zároveň alostericky moduluje nikotinové presynaptické a postsynaptické receptory. Tato alosterická modulace zvyšuje acetylcholinergní přenos a zčásti brání vzniku hyposenzitivity muskarinových receptorů.

V klinickém testování byl organofosfát metrifonat, ireverzibilní inhibitor AChE. Byl však stažen z důvodů nežádoucích účinků [14].



Obr. 2: Klinicky využívané inhibitory acetylcholinesterázy

a) Agonisté muskarinových a nikotinových receptorů

Tento léčebný postup je v dnešní době ve fázi klinického zkoušení. Ze specifických inhibitorů je zkoušen xanomelin [36].

b) Látky ovlivňující acetylcholinergní systém pomocí jiných transtmiterových systémů

Acetylcholinergní systém je pod inhibičním vlivem GABAergního systému. Z tohoto důvodu jsou hledány látky, které by parciálně inhibovaly GABAerní systém. Mezi nadějně látky patří β -karboliny, zatím nebyly zavedeny do klinické praxe z důvodů řady nežádoucích účinků [37].

3.2.8.2. Látky ovlivňující působení volných radikálů

Volné radikály v těle přirozeně vznikají a jsou příslušnými enzymy likvidovány. Za patologických podmínek je jejich počet mnohem vyšší a enzymy je nestíhají

likvidovat. K likvidaci volných radikálů jsou určeny scavengery, mezi něž patří: vitamin E, vitamin C, retinol, melatonin, pyritinol a extrakt z ginga biloby. Selegilin, inhibitor monoaminoxidázy B, snižuje tvorbu volných kyslíkových radikálů, které vznikají při odbourávání dopaminu. Navíc působí jako růstový faktor pro nervové buňky [33, 34].

3.2.8.3 Látky tlumící excitotoxicitu

Glutamát a aspartát, excitační aminokyseliny, jsou nezbytné pro správnou funkci paměti. Jejich nadměrné působení však vede ke zvýšenému influxu vápníku do neuronu, takže dochází k destabilizaci vnitřního prostředí, aktivaci enzymů a následně k apoptóze. Ze zaniklého neuronu dochází k uvolnění dalších aminokyselin a tím se vytvoří kaskádovitá reakce. Právě proto se hledají inhibitory či modulátory NMDA-receptorů, takto se uplatňuje selegilin, memantin, kyselina hydroxykinurenová [32].

3.2.8.2 Látky ovlivňující nekognitivní funkce

Tato terapie se používá k léčbě poruch, které se přidávají k AD. Mezi přidružené nekognitivní symptomy patří deprese, halucinace, poruchy spánku a úzkostné stavy. Při léčbě depresivních epizod je nutné vyhnout se tricyklickým antidepresivům a ireverzibilním inhibitorům monoaminoxidázy. Pro léčbu nespavosti se musíme vyhnout benzodiazepinům, a to z toho důvodu, že může docházet ke zhoršení kognitivních funkcí. V některých případech se mohou používat nootropika, jedná se o případy, kdy je posunut cyklus spánku a bdění. Pro léčbu halucinací jsou vhodná neuroleptika, jako je risperidon, melperon a haloperidol [32, 14].

3.2.8.3 Nefarmakologické přístupy v léčbě

Důležitou součástí léčby AD jsou psychologické a sociální metody. Psychoterapie představuje významný léčebný přístup a je velmi důležité její využití v počátečních fázích choroby. Terapie klade důraz na zachování soběstačnosti pacienta. Dalším důležitým momentem je trénování paměti. Důležitou součástí léčby pacienta je i edukace a sociální podpora osob, které o něho pečují [32].

Vzhledem k zaměření práce bych ráda věnovala krátkou kapitulu přírodním látkám inhibujícím cholinesterázy.

3.2.9 Přírodní látky působící jako inhibitory cholinesteráz

Inhibitory cholinesteráz se nejčastěji využívají k terapii změn vyvolaných nedostatkem acetylcholinu. Nejstarším využitím je terapie glaukomu, dnes se nejčastěji využívají pro léčbu AD. Acetylcholinesteráza urychluje ukládání extracelulárních plaků β -amyloidu, které jsou charakteristickým histologickým znakem pro pacienty s AD.

Fysostigmin (Obr. 3) je prototypem acetylcholinesterázového inhibitoru. Poprvé byl izolován v roce 1864 z *Physostigma venenosum*, ale farmakologické studie byly provedeny až po roce 1926 [38, 39]. Molekula působí v celém těle, ale vzhledem k její polaritě není ve velkém množství distribuována do CNS [40]. Klinické použití této látky je omezeno jejím krátkým poločasem, proto logicky následovala snaha o přípravu jejích derivátů. Mezi deriváty patří neostigmin a pyridostigmin, používající se k léčbě poruch periferního nervového systému. Rivastigmin, který díky své struktuře proniká přes hematoencefalickou bariéru, se používá jako dlouhodobě působící reversibilní inhibitor [41].

Huperzin A (Obr. 3), izolovaný z *Huperizia serrata* z čeledi *Lycopodiaceae*, se již stovky let využívá v tradiční čínské medicíně k léčbě horečky, zánětu a také ke zlepšení paměti. Huperzin se také nachází v dalších druzích rostlin rodu *Lycopodium* [42]. Jedná se o reversibilní inhibitor acetylcholinesterázy. Molekula je opticky aktivní, v přírodě se vyskytuje pouze (-)-enantiomer, který má větší inhibiční aktivitu nežli synteticky vyrobená racemická směs [43]. Další studium vlastností huperzinu A ukazuje, že přispívá ke snižování odumírání mozkových buněk vlivem vysokých hodnot glutamátu, také vykazuje určitou ochrannou funkci proti apoptóze vyvolané β -amyloidem [44].

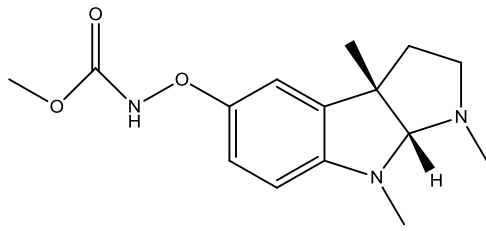
Galanthamin (Obr. 3) byl poprvé izolován roku 1952 z cibulí *Galanthus woronowi*, čeleď *Amaryllidaceae*. Ve východní Evropě byla tato látka využívána v terapii poruch nervové soustavy [45]. Galanthamin je reverzibilní selektivní inhibitor acetylcholinesterázy a alosterický modulátor nikotinových receptorů. Toto působení na nikotinové receptory vede ke zvýšení produkce acetylcholinu [46]. Cílovými místy účinku galanthaminu jsou nervosvalová spojení a cholinergní synapse. Galanthamin

působí v synapsích tak, že zvyšuje hladinu acetylcholinu v postsynaptických muskarinových receptorech, poněvadž inhibuje AChE. Dalším způsobem, kterým galanthamin působí, je alosterická modulace nikotinových receptorů, při které dochází ke zvýšení afinity ACh na receptor. Selektivita galanthaminu je vyšší k AChE ($IC_{50}=1,71\mu M$) než k BuChE ($IC_{50}= 42,30\mu M$) [47, 48]. Nedávné studie se zmiňují o jeho indukci antiapoptického proteinu, což vede k delší životnosti neuronů [49].

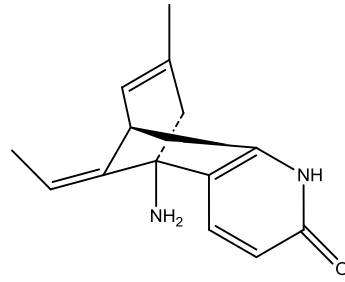
Po zjištění inhibiční aktivity galanthaminu začalo testování dalších alkaloidů izolovaných z rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. Aktivita izolovaných alkaloidů byla porovnávána s aktivitou galanthaminu. Zajímavou aktivitu prokázaly alkaloidy galanthaminového a lykorinového typu. Mezi nejaktivnější alkaloidy patří sanguinine (Obr. 3) a hydroxygalanthamin. V porovnání s galanthaminem je jejich aktivita srovnatelná, či vyšší (sanguinin: $IC_{50}= 0,10\mu M$, hydroxygalanthamin: $IC_{50}= 1,61\mu M$). Sanguinine je metabolitem galanthaminu, který je velice rychle metabolizován, proto se v klinické praxi nepoužívá. V některých případech se prokázalo synergické působení mezi jednotlivými přítomnými alkaloidy [50].

Další zajímavou skupinou jsou steroidní alkaloidy z čeledi *Buxaceae*, známé svojí antibakteriální, antitumorovou a anticholinesterázovou aktivitou. Alkaloidy izolované z druhů *Sarcococca* jsou selektivnější k BuChE, jedná se například o funtumafrin a phulchowkiamid (Obr. 3) [51].

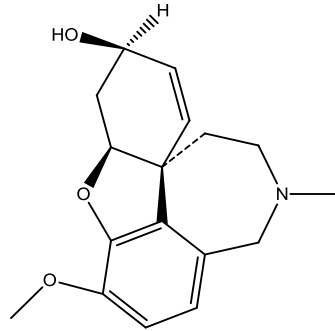
Isochinolinové alkaloidy nacházející se v čeledích *Papaveraceae* a *Fumariaceae* projevují také inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám. Inhibiční aktivita v této skupině alkaloidů je ovlivněna přítomností kvartérního dusíku (Obr. 3) [52]. Míra inhibice cholinesteráz je závislá na hodnotě pH, což dokazuje skutečnost, že přítomnost kvartérní skupiny je důležitá pro požadovanou aktivitu [53]. Mozek je izolován od vnějších vlivů pomocí hematoencefalické bariéry, mechanismus průchodu berberinu přes tuto překážku není zcela objasněn. Předpokládaným mechanismem transportu jsou pasivní difúze s pomocí transmembránových proteinů.



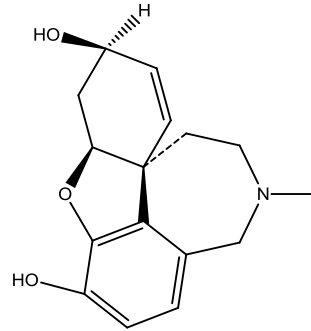
Fysostigmin



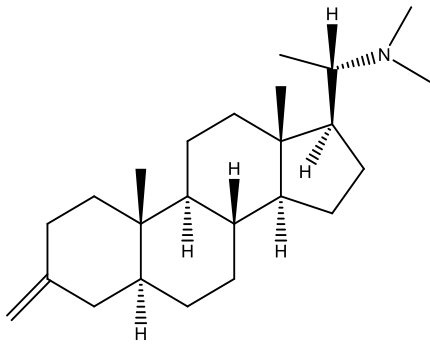
Huperzin A



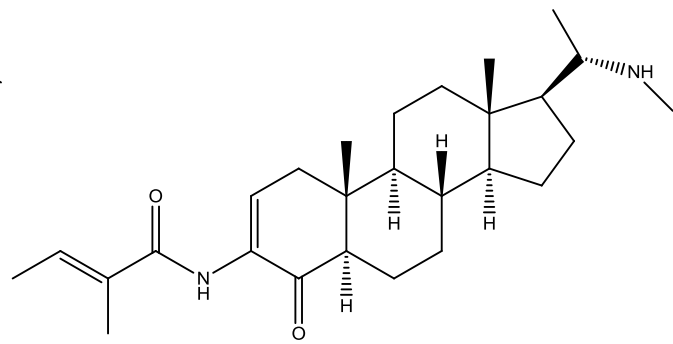
Galanthamin



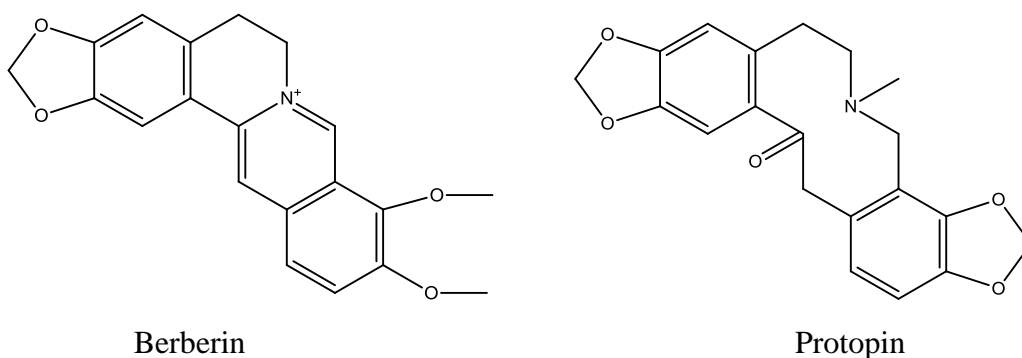
Sanguinine



Funtumafrin



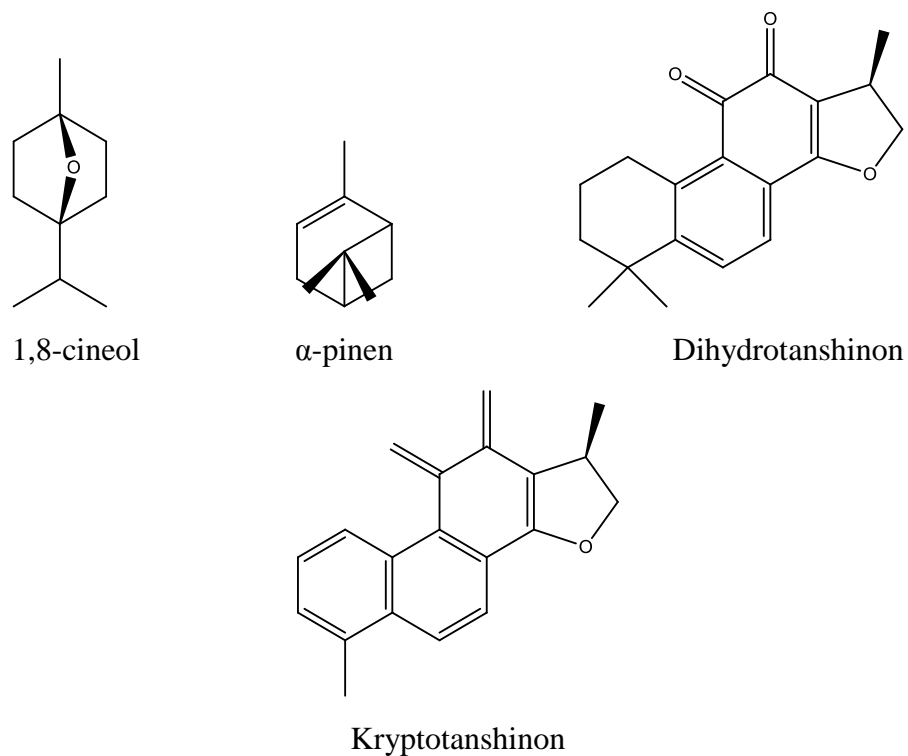
Phulchowkiamid



Obr. 3: Přírodní látky alkaloidního typu schopné inhibovat AChE

Mezi další čeledi obsahující aktivní alkaloidy patří *Ranunculaceae*, *Lycopodiaceae*, *Rubiaceae*, *Liliaceae*, *Menispermaceae*.

Mezi další významnou skupinu nealkaloidních inhibitorů AChE patří terpenoidy (Obr. 4). Nejvíce aktivní monoterpenické látky nalezené v *Salvia officinalis* a *S. lavandulaefolia* patří 1,8-cineol a α -pinen [54]. Další monoterpeny vykazují pouze slabou inhibiční aktivitu. První diterpenoidy s inhibiční aktivitou byly izolovány z kořenů *Salvia miltiorrhiza*, jedná se o dihydrotanshinon a kryptotanshinine [55].



Obr. 4: Struktury vybraných terpenoidních inhibitorů acetylcholinesterázy

Inhibitory cholinesteráz se nenacházejí pouze v rostlinách, některé z nich můžeme najít i v houbách. Jedním ze zdrojů je *Aspergillus terreus* a rod *Penicillium* [56, 57].

3.3 *Fumaria officinalis* - Zemědým lékařský (Fumariaceae)

3.3.1. Synonyma

Lidové názvy: routa polní, routička pospolitá, zemská pára

Anglický název: Common Fumitory

Německý název: Echter Erdrauch [58]

3.3.2 Taxonomické zařazení

Říše: Plantae

Podříše: Cormobionta

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Rosopsida

Podtřída: Ranunculidae

Řád: Papaverales

Čelěd': Fumariaceae

Rod: Fumaria



Obr. 5: *Fumaria officinalis* [59]

3.3.3 Botanický popis čeledi *Fumariaceae*

Jedná se o jednoleté až vytrvalé byliny bez mléčnic. Listy jsou trojčetné nebo zpeřené, mají řapíky bez palistů a vyrůstají střídavě. Květy jsou oboupohlavní a skládají se do lat či hroznů. Kalich tvoří dva lístky, které jsou opadavé, nebo úplně chybí. Koruna je tvořena čtyřmi plátky ve dvou kruzích. Tyčinky, nacházející se v květu, se v horní části dělí na tři části. Okrajové části tyčinky na sobě nesou jednopouzdré

prašníky, prostřední část má prašník dvoupouzdrý. Semeník je svrchní a srůstá ze dvou plodolistů. Plody jsou nažky nebo tobolky.

Do této čeledi je řazeno 18 rodů se 450 druhy. Čeleď je rozšířena především na severní polokouli v mírném pásu. Tyto rostliny jsou příbuzné s čeledí *Papaveraceae*-makovité. Od této čeledi se liší několika znaky: nemají mléčnice, pouze idioblasty, které obsahují alkaloidy. Na rozdíl od zemědýmovitých může semeník rostlin z čeledi *Papaveraceae* srůstat z většího počtu plodolistů [60].

3.3.4 Botanický popis rostliny

Zemědým je jednoletá lysá bylina dorůstající výšky 10-30cm. Lodyha je přímá, dutá, rýhovaná, větvená a hustě pokrytá listy, které mají modrozelenou barvu. Lístky vyrůstají na krátkých řapících, jsou dlanité a větvené na jemné čárkovité úkrojky. Květy jsou souměrné, oboupohlavní, dlouhé asi 8 mm a skládají se do hroznů. Kalich je kopinatý, kratší a užší než koruna. Koruna je tvořena čtyřmi plátky, přičemž horní plátky spolu vytvářejí ostruhu a dolní spolu srůstají. Dvě tyčinky srůstají nitkami. Svrchní semeník vzniká srůstem dvou plodolistů. Plody jsou okrouhlé nažky. Zemědým kvete od dubna do září [58, 61]

3.3.5 Lidové léčení

Tato rostlina byla využívána již ve starověku, arabští lékaři používali čaj ze zemědýmu pro čištění krve. Dnes se používá při kožních chorobách, proti akné a různým vyrážkám. Droga uvolňuje křeče hladkého svalstva a podporuje vylučování žluče. Přináší úlevu při migréně, upravuje srážlivost krve a má příznivý vliv na červené krvinky. Drogou je nať, která je plně rozvinutá, ale nevykvetlá.

Silný odvar se používá k omývání lišejů a ekzémů. Přidává se do sedacích koupelí při hemoroidech. Při vnitřním užívání zemědýmu je nutno drogu dávkovat opatrně v menším množství, protože by mohlo dojít k dýchacím nebo srdečním obtížím [62].

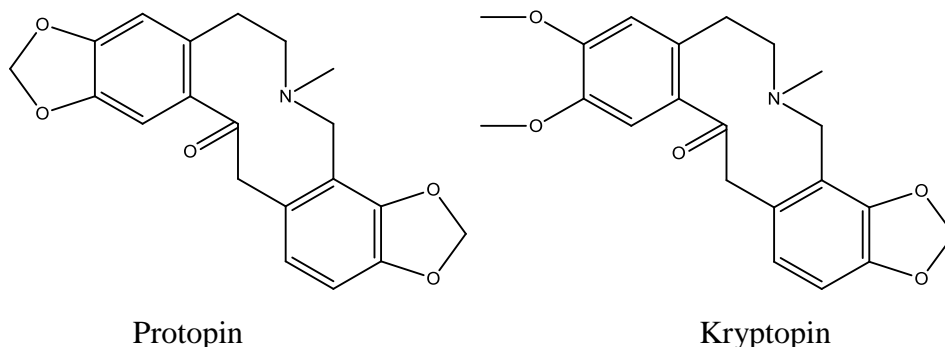
3.3.6 Obsahové látky *Fumaria officinalis*

V rostlinné nati jsou obsaženy pryskyřice, hořčiny, fenolické kyseliny, třísloviny, slizy, flavonoidy, glykosidy a alkaloidy. Přítomné alkaloidy patří do skupiny

isochinolinových alkaloidů [63]. Tato skupina alkaloidů je dobře prozkoumána a patří do ní několik strukturních typů: tetrahydroprotoberberinové, protopinové, spirobenzylisochinolinové a ftalidisochinolinové. Isochinolinové alkaloidy jsou v přírodě hojně zastoupeny, prekurzorem pro jejich syntézu je tyrosin.

3.3.6.1 Protopinové alkaloidy

Protopinové alkaloidy v sobě neobsahují isochinolinový kruh, jsou charakteristické desetičlenným heterocyklickým kruhem s atomem dusíku v sedmé poloze a na 14 uhlíku ketonickou skupinou [64]. Oxidací protoberberinových alkaloidů vznikají protopinové. Struktura protopinu a kryptopinu (Obr. 6) byla objasněna před více než padesáti lety W.H.Perkinem a kryptopin byl poprvé izolován v roce 1867 z opia [65]. Alkaloidy portopinového typu zpomalují srdeční frekvenci a zvyšují průtok krve koronární artérií. Protopin a kryptopin mají krátkodobý stimulační účinek na dělohu [66]. Protopinové alkaloidy se dále nacházejí v čeledi *Berberidaceae*, *Papaveraceae* a *Ranunculaceae* [67].

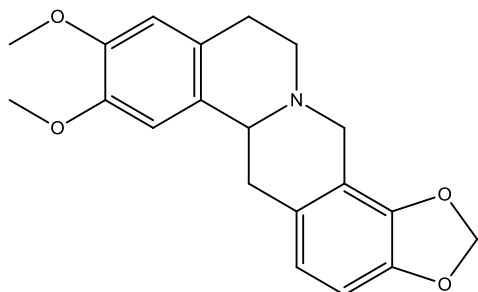


Obr. 6: Struktury protopinových alkaloidů

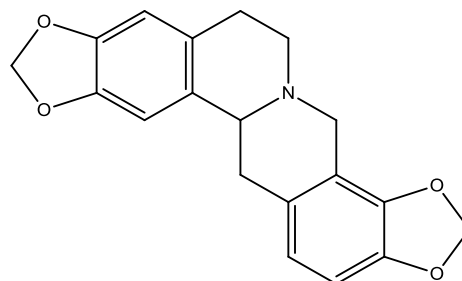
3.3.6.2 Protoberberinové alkaloidy

Vyskytují se v tetrahydroprotoberberinové formě nebo ve formě kvartérních solí (Obr 7) [68]. Nejčastějším místem výskytu substituentů jsou polohy 2, 3 dále 9, 10 nebo 10, 11. Základem je benzylisochinolinový skelet, charakteristickým znakem je tzv. berberinový most, který se nachází mezi dusíkem a C-8 [69]. Berberin se vyznačuje antibakteriální a antiprotozoální aktivitu. Působí tak, že dochází k vytvoření komplexu

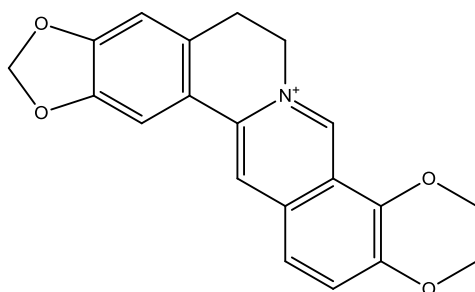
s DNA [70]. Alkaloidy této skupiny můžeme nalézt také v následujících rostlinných čeledích, jako jsou: *Lauraceae*, *Ranunculaceae*, *Rutaceae*, *Papaveraceae* a *Menispermaceae* [67].



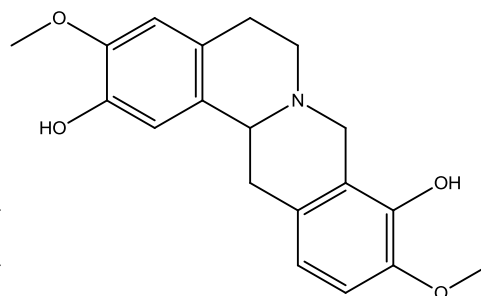
Sinaktin



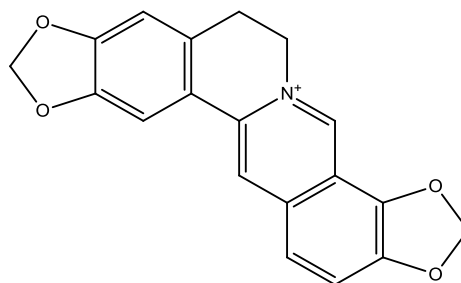
Stylopin



Berberin



Skulerin



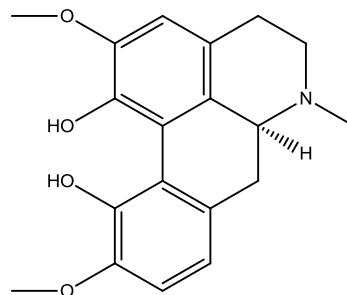
Koptisin

Obr. 7: Struktury protoberberinových alkaloidů

3.3.6.3 Aporfinové alkaloidy

Aporfinové alkaloidy jsou druhou největší skupinou po benzylochinolinových alkaloidech [71]. Methylová skupina je nejčastěji připojena na dusíkový atom. Pokud je

dusík sekundární, pak se tyto alkaloidy nazývají noraporphinové. Je také známo několik málo kvartérních solí, kdy jsou k atomu dusíku připojeny dvě methylové skupiny. Pozice 1 a 2 je vždy substituována hydroxylovou, methylovou nebo methoxy skupinou [67]. Korytuberin (Obr. 8) způsobuje zrychlení dechové frekvence a zpomaluje puls [72]. Mezi další čeledi, ve kterých se vyskytují aporphinové alkaloidy, patří: *Berberidaceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae*, *Papaveraceae* a *Ranunculaceae* [67].

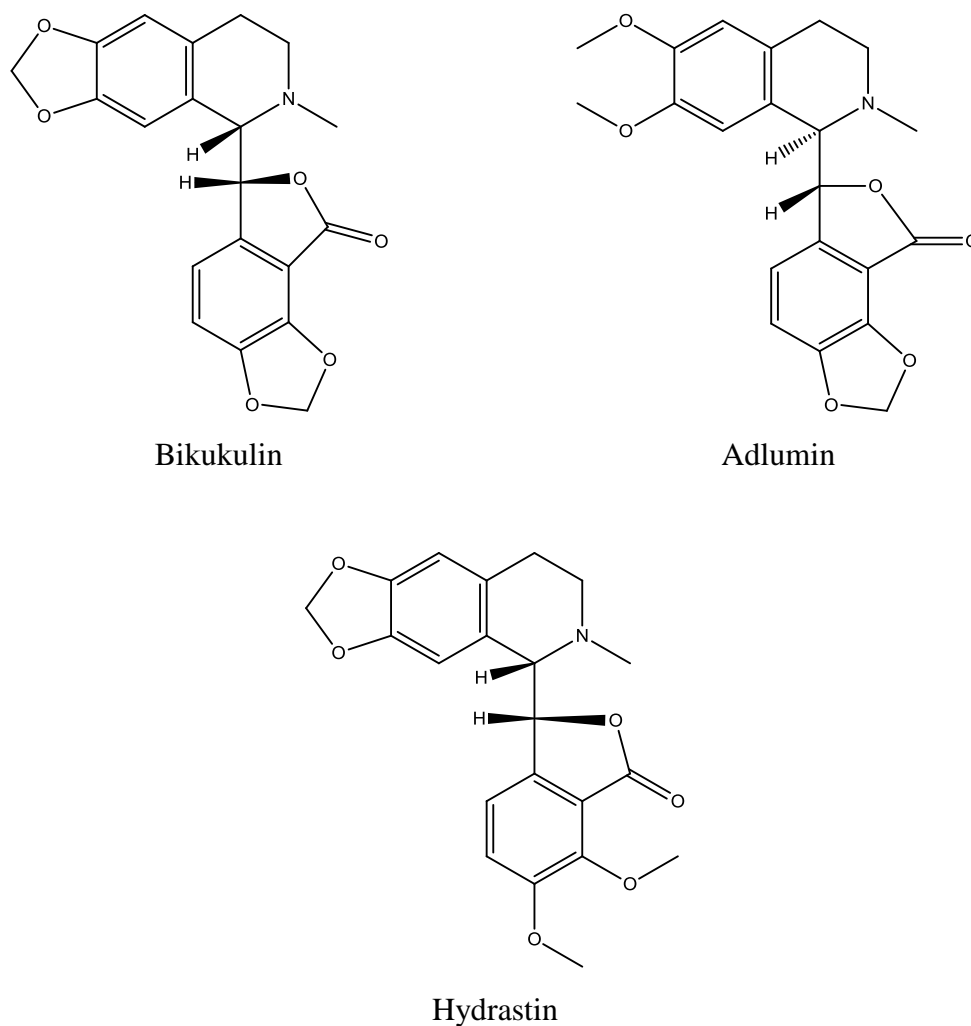


Korytuberin

Obr. 8: Struktury aporphinových alkaloidů

3.3.6.4 Ftalidisochinolinové alkaloidy

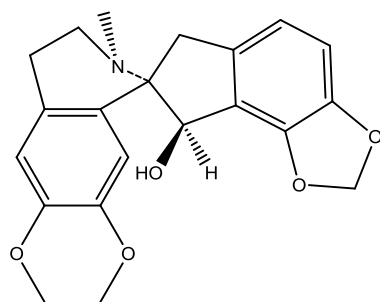
Prekurzory této skupiny alkaloidů jsou tyrosin, tyramin, dopamin a methionin. Tato podskupina isochinolonových alkaloidů je charakteristická jádrem, které je tvořeno čtyřmi cykly, jedním z nich je i laktonový kruh (Obr. 9). Jednotlivé alkaloidy se mezi sebou liší postavením substituentů na aromatickém jádře a stereochemií na asymetrických uhlících C-1 a C-9 [73]. Ftalidisochinolinové alkaloidy se nacházejí dále v čeledích *Berberidaceae*, *Papaveraceae* a *Ranunculaceae* [67].



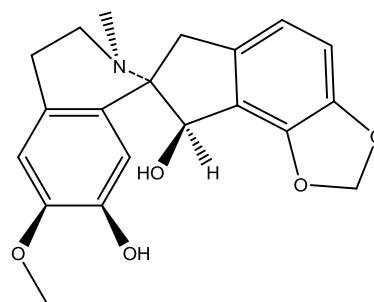
Obr. 9: Struktury fthalidisochinolinových alkaloidů

3.3.6.5 Spirobenzylisochinolinové alkaloidy

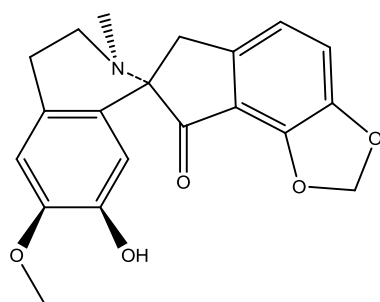
Spirobenzylisochinolinové alkaloidy (Obr. 10) [74] jsou charakteristické pro čeled' Fumariaceae, zvláště pro rod *Fumaria* a *Corydalis*. V přírodě se syntetizují z protoberberinových prekurzorů. Skelet, který je společný pro celou skupinu, se může být nazýván jako ochotensinový systém [67].



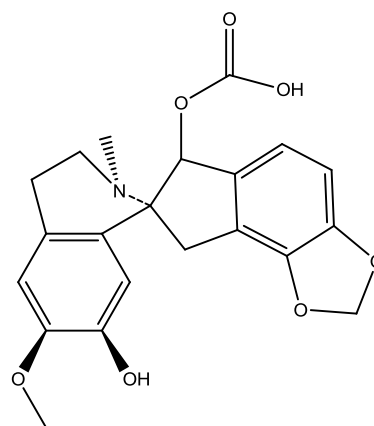
Fumaricin



Fumaritin



Parfumin

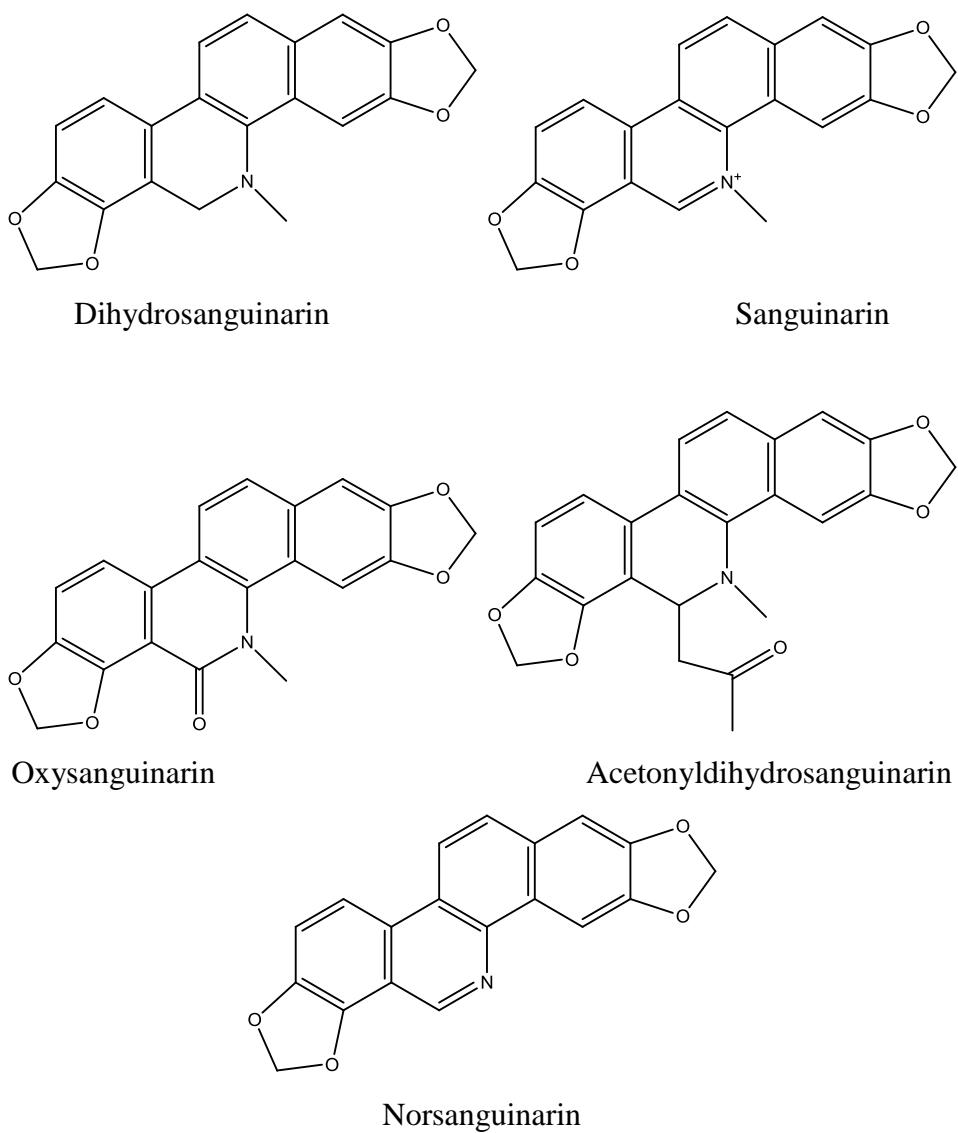


Fumarophycin

Obr. 10: Struktury spirobenzylisochinolinových alkaloidů

3.3.6.6 Benzofenantridinové alkaloidy

Podskupina může být rozdělena do dalších třech skupin, které se mezi sebou liší přítomností alkoholické skupiny, nebo aromaticitou. Mezi neznámější alkaloidy této skupiny patří sanguinarine (Obr. 11), který je znám pro svoji antimikrobiální a antitumorovou aktivitu [75]. V rostlinách se benzofenantridinové alkaloidy syntetizují z protoberberinových. Jedná se přibližně o 30 alkaloidů, které je možné nalézt v čeledích *Papaveraceae* a *Rutaceae* [67].



Obr. 11: Struktury bentofenantridinových alkaloidů

V následující tabulce (Tab. 1) je shrnut výskyt jednotlivých výše uvedených alkaloidů v jednotlivých druzích rodu *Fumaria*.

Tab 1: Alkaloidy izolované z jednotlivých druhů rodu *Fumaria*

Alkaloid	Druh rodu <i>Fumaria</i>
Protopin	<i>Fumaria capreolata</i> , <i>F. Bastardii</i> , <i>F. officinalis</i> , <i>F. spicata</i> [76]
Kryptopin	<i>F. densiflora</i> , <i>F. schramii</i> , <i>F. officinalis</i> , <i>F. parviflora</i> [74], [76]
Sinaktin	<i>F. officinalis</i> , <i>F. densiflora</i> , <i>F. parviflora</i> [76], [77]
Stylopin	<i>F. capreolata</i> , <i>F. bastardii</i> , <i>F. officinalis</i> , <i>F. densiflora</i> , <i>F. muralis</i> , <i>F. parviflora</i> [74],
Berberin	<i>F. indica</i> [78]
Skulerin	<i>F. officinalis</i> [79]
Koptisin	<i>F. agraria</i> , <i>F. muralis</i> , <i>F. officinalis</i> , <i>F. parviflora</i> , <i>F. spicata</i> , <i>F. vaillantii</i> [76]
Korytuberin	<i>F. agraria</i> , <i>F. officinalis</i> [76]
Bikukulin	<i>F. macrosepala</i> [74]
Adlumin	<i>F. officinalis</i> [77]
Hydrastin	<i>F. officinalis</i> [77]
Fumaricin	<i>F. capreolata</i> , <i>F. bastardii</i> , <i>F. officinalis</i> [76]
Fumarilin	<i>F. capreolata</i> , <i>F. bastardii</i> , <i>F. densiflora</i> , <i>F. schramii</i> , <i>F. officinalis</i> , <i>F. indica</i> [76], [78]
Parfumin	<i>F. officinalis</i> , <i>F. muralis</i> , <i>F. capreolata</i> [76]
Fumarophycin	<i>F. capreolata</i> , <i>F. bastardii</i> , <i>F. officinalis</i> [76]
Dihydrosanguinarin	<i>F. parviflora</i> , <i>F. vaillantii</i> [80]
Sanguinarin	<i>F. parviflora</i> , <i>F. schramii</i> [80]
Oxysanguinarin	<i>F. indica</i> , <i>F. parviflora</i> , <i>F. vaillantii</i> [80]
Acetonyldihydrosanguinarin	<i>F. vaillantii</i> [80]
Norsanguinarin	<i>F. indica</i> [80]

4.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Destilace a odpařování

Všechna rozpouštědla byla před použitím destilována, tak aby byla zajištěna jejich čistota. Nejdříve se zachytil předeček, jednalo se asi o 5 % celkového množství s vodným azeotropem. Následně bylo vydestilováno zbylých 90 % rozpouštědla.

Všechna rozpouštědla byla uchovávána v hnědých skleněných nádobách.

Odpařování frakcí, získaných z chromatografie, bylo uskutečněno na vakuové odparce Büchi Rotovapor R 114, která je vybavena vodní lázní. Odpařování probíhalo při 40°C za sníženého tlaku.

4.1.2 Chromatografie

4.1.2.1 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie se prováděla systémem gradientové eluce na neutrálním oxidu hlinitém. Suspenze adsorbentu byla obvyklým způsobem nalita do chromatografické kolony, na takto připravený sloupec byl nanesen vzorek rozpuštěný v malém množství rozpouštědla.

4.1.2.2 Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna v systému normálních komor, které byly nasyceny mobilní fází. Nasycení komor trvalo 20-30 minut. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

4.1.3 Teplota tání

Teploty tání izolovaných alkaloidů byly měřeny na bodotávku Büchi Melting Point B-540. Výhřevnost byla nastavena tak, aby teplota výhřevného bloku stoupala nejdříve rychle a 10°C před předpokládanou teplotou tání se zvedala po 0,5°C.

4.2 Materiál a vybavení

4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie

Rozpouštědla

Lékařský benzín (Penta a.s.)
Cyklohexan (Penta a.s.)
Diethylamin (LachNer)
Ethanol 95% (lihoval Chrudim)
Diethylether (LachNer)
Chloroform (Penta a.s.)
Toluen (Penta a.s.)

Chemikálie

Uhličitán sodný (Penta a.s.)
Kyselina chlorovodíková 35% (Penta a.s.)
Dusičnan bismutitý zasaditý (LachNer)
Jodid draselny (Penta a.s.)
Chlorid rtuťnatý (Fisher Scientific)
Kyselina vinná (Penta a.s.)

4.2.2 Chemikálie a materiál používaný pro stanovení inhibiční aktivity erytrocytární AChE a sérové BuChE

Chemikálie

10mM acetylthiocholin jodid (Sigma-Adrich)
10mM butyrylthiocholin jodid (Sigma-Adrich)
0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (chemikálie pro přípravu pufru: dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lachema); dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Lachema)
5 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina \geq 98% (Sigma-Aldrich)
Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Adrich)

Materiál

Jako zdroj acetylcholinesterázy byla použita pouzdra lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy byla lidská plazma.

Měření bylo prováděno na mikrotitračních destičkách.

4.2.3 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

4.2.4 Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo dle Muniera

Toto činidlo slouží k detekci alkaloidů a dalších sloučenin, které ve své molekule obsahují vázaný dusík.

Skládá se z roztoku A a roztoku B. Roztok A se připravuje rozpuštěním 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody. Roztok B byl připraven rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40ml vody. Zásobní roztok získáme smísením roztoku A a B v poměru 1:1.

Mayerovo činidlo

Mayerovo činidlo se používá ke zjištění obsahu alkaloidů, které jsou přítomné v organickém rozpouštědle.

Pro jeho přípravu je potřeba 1,36 g chloridu rtuťnatého, 5 g jodidu draselného a 100 ml vody. Po smísení vzniká tetrajodortuťnatan draselný, který reaguje s alkaloidy.

4.2.5 Chromatografické adsorbenty

Sloupcová chromatografie: oxid hlinitý pro sloupcovou chromatografii, Brockmann III, Across, velikost zrn 40 - 200 μm , deaktivovaný 6 % H_2O , množství adsorbentu 2625 g.

Analytická TLC: Kieselgel 60 F₂₅₄ TLC desky 20×20 cm (Merck)

Preparativní TLC: Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck)

4.3 Příprava sumárního extraktu z *Fumaria officinalis*

4.3.1 Původ drogy

Drogou bylo 25,15 kg sušené nati. Dodavatelem byla firma Megafyt s.r.o., Vrané nad Vltavou.

4.3.2 Příprava sumárního extraktu

Suchá nať (25,15 kg) byla perkolována 95 % ethanolem. Získaný extrakt byl zahuštěn na cca 7 l a následně se nechal rozehrát při 70°C. K rozehrátému extraktu byly přidány 3 litry horké vody. Vzniklá emulze byla okyselena 2 litry 2 % kyseliny chlorovodíkové na pH=1,5. Emulze se dále zředila 5 litry vody a došlo ke zchlazení na 30°C. Následovala filtrace přes vlizelín. Zbytek na filtru byl promyt 3 litry 0,1 % HCl a 2 litry vody. Filtrát byl doplněn do 20 l.

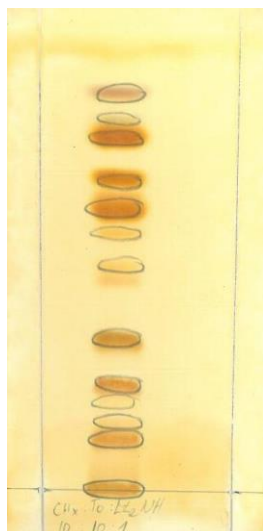
Čirý filtrát byl zalkalizován na pH=9,5 přidáním 10 % uhličitanu sodného. Vzniklá suspenze byla vytřepávána 5x po částech 5 l diethyletheru. Získaný etherový výtřepok byl zbaven vody v dělicí nálevce a organická vrstva byla odpařena.

Bylo získáno 99 g tmavě hnědého, viskózního odparku. Po čase se z odparku vyloučilo malé množství drobných krystalků (výtřepok A).

Vodný zbytek byl vytřepán 4x5 l chloroformu. Organická vrstva byla odpařena a bylo získáno 17,46 g tmavě hnědého odparku (výtřepok B), který nebyl použit pro výzkumné cíle této práce.

Při srážecí reakci s Mayerovým činidlem nebyla prokázána přítomnost žádných alkaloidů, proto nedošlo k dalšímu zpracování primárního extraktu.

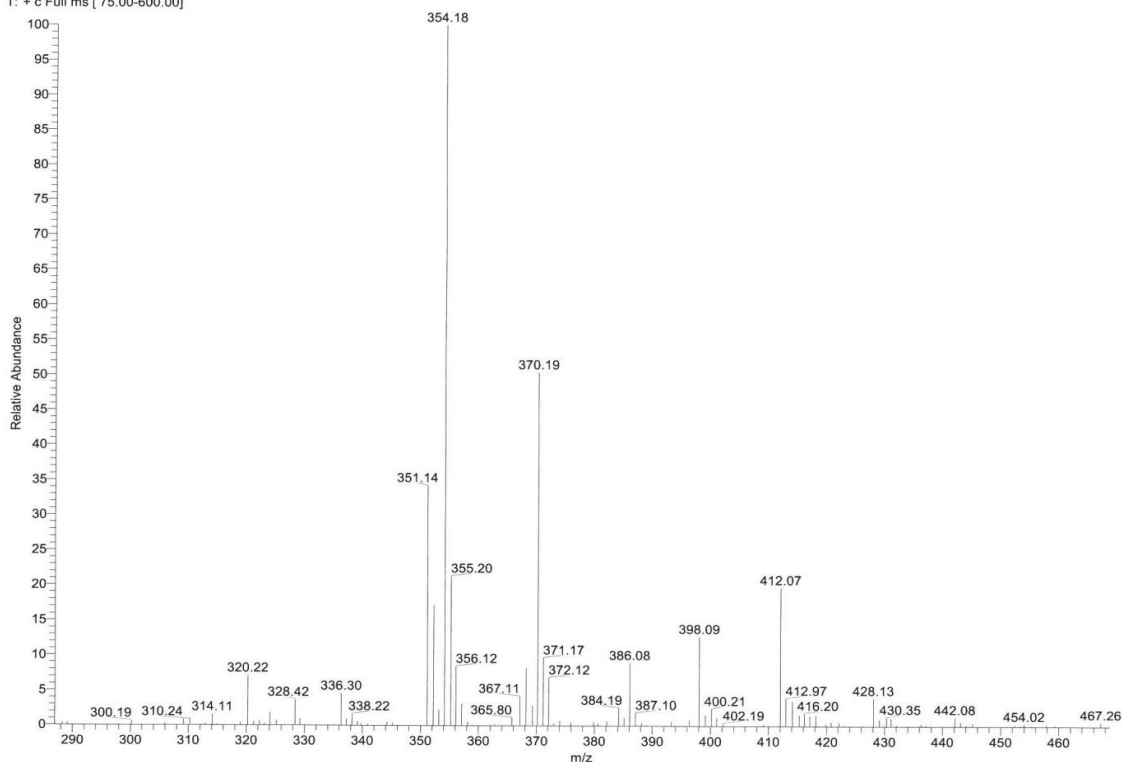
Sumární etherový výtřepok A obsahuje nejméně 10 alkaloidů (viz Obr. 12). Retenční faktory nalezených alkaloidů byly následující: 0,76; 0,67; 0,61; 0,55; 0,48; 0,33; 0,24; 0,12; 0. Nalezeny byly také další dvě látky, které nevykazovaly charakteristické zbarvení s Dragendorfovým činidlem (Rf: 0,85 a 0,80).



Obr. 12: Sumární etherový výtřepok A z *Fumaria officinalis*

TLC bylo vyvíjeno v soustavě: cyklohexan+toluen+diethylamin 10:10:1, dráha 8,5 cm. Pro lepší rozdělení bylo vyvíjeno 2x. Detekce proběhla pod UV 254 a následně pomocí Dragendorfova činidla.

Bylo změřeno ESI-MS hmotnostní spektrum za účelem odhadu Mr přítomných alkaloidů (Obr. 13).



Obr. 13: MS sumárního výtřepku

4.3.3 Příprava a zpracování etherového výtřepku A ze sumárního extraktu

Pro usnadnění vytřepávání byl extrakt rozdělen na poloviny rozpuštěním v chloroformu (47,6 a 48,2 g). Obě poloviny byly rozpuštěny ve 400 ml 2 % HCl na pH=1-2 a doplněny destilovanou vodou do 1 l a přefiltrovány přes vrstvu křemeliny. Získané vodné roztoky byly alkalizovány 10 % Na₂CO₃ na pH=9-10. Vodné roztoky byly 6x vytřepávány 200 ml chloroformu. Po každém vytřepávání byla prováděna zkouška Mayerovým činidlem do té doby, dokud nebyla přítomnost alkaloidů ve vodné fázi prokázána. Oba přečištěné podíly byly spojeny, hmotnost přečištěného sumárního extraktu byla 87,5 g.

4.3.4 Sloupcová chromatografie

87,5 g přečištěného extraktu bylo rozpuštěno v chloroformu a smícháno s 350 g oxidu hlinitého (poměr 4:1) deaktivovaného 6% H₂O, velikost zrn 40-200 μm. Následně byla směs odpařena na vodní lázni do sucha a dosušena v exsikátoru.

Celý průběh sloupcové chromatografie je popsán v následujících tabulkách (Tab. 2 a Tab. 3). Nakonec bylo provedeno TLC všech získaných frakcí (Obr. 14).

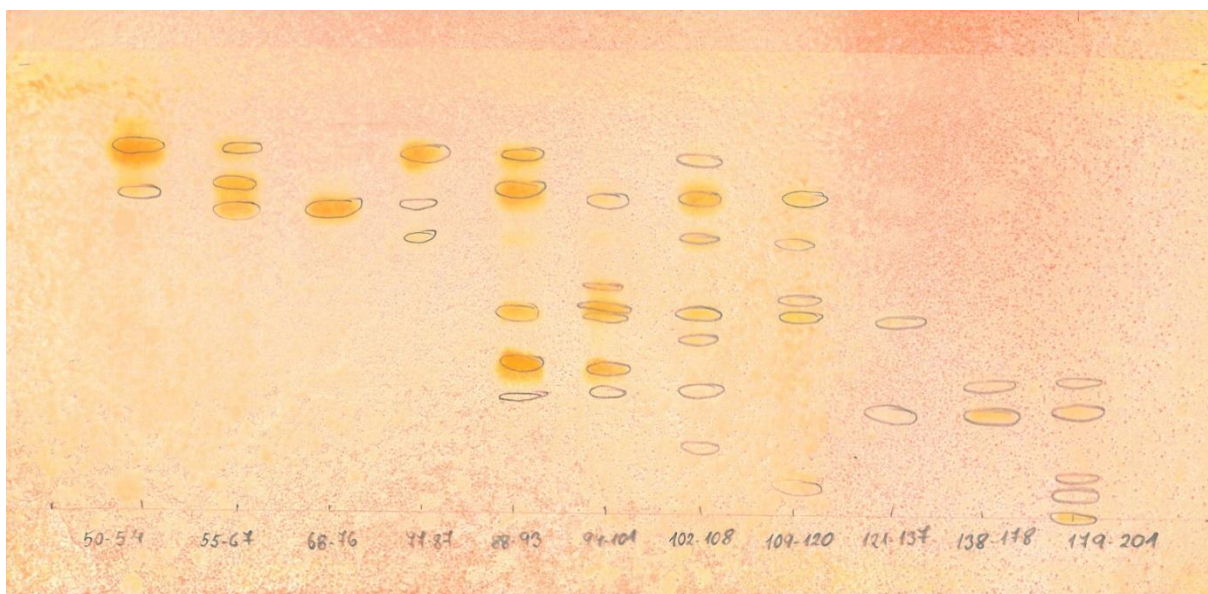
Tab. 2: Sloupcová chromatografie

Označení extraktu	A
Hmotnost vzorku	87,5g
Druh a množství adsorbentu	oxid hlinitý pro sloupcovou chromatografii, Brockmann III, Across, velikost zrn 40 - 200 μm , deaktivovaný 6 % H_2O , množství adsorbentu 2625 g.
Průměr kolony	9,5 cm
Výška sloupce adsorbentu	34cm
Mrtvý objem kolony	1760 ml
Průtok	1500ml/hod

Tab. 3: Výsledky sloupcové chromatografie

Spojené frakce	Mobilní fáze	Tára baňky (g)	Hmotnost frakcí (g)
50-54	B+CH (3:2)	49,10	0,30
55-67	B+CH (3:2)	46,01	19,89
68-76	B+CH (3:2)	107,40	6,30
77-87	B+CH (3:2; 1:1)	152,10	9,60
88-93	B+CH (1:1)	63,11	13,59
94-101	B+CH (1:1)	53,20	7,70
102-108	B+CH (1:1)	70,30	1,00
109-120	B+CH (1:1)	66,54	1,46
121-137	B+CH (1:1; 2:3)	68,51	2,00
138-178	B+CH (2:3; 1:4), CH	100,25	8,75
179-201	CH, CH+Et (3:1; 1:1)	109,50	10,90
Celková hmotnost:			75,49

B...benzín, Ch...chloroform, Et...ethanol

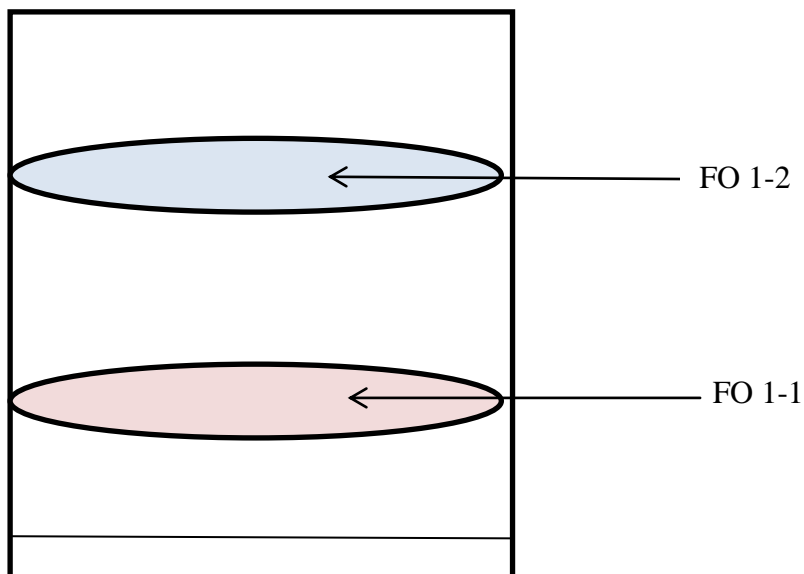


Obr. 14. Souhrnné TLC získaných frakcí

Pro mou práci byly použity frakce číslo 50-54 a 55-67.

4.3.5 Zpracování frakce 50 – 54

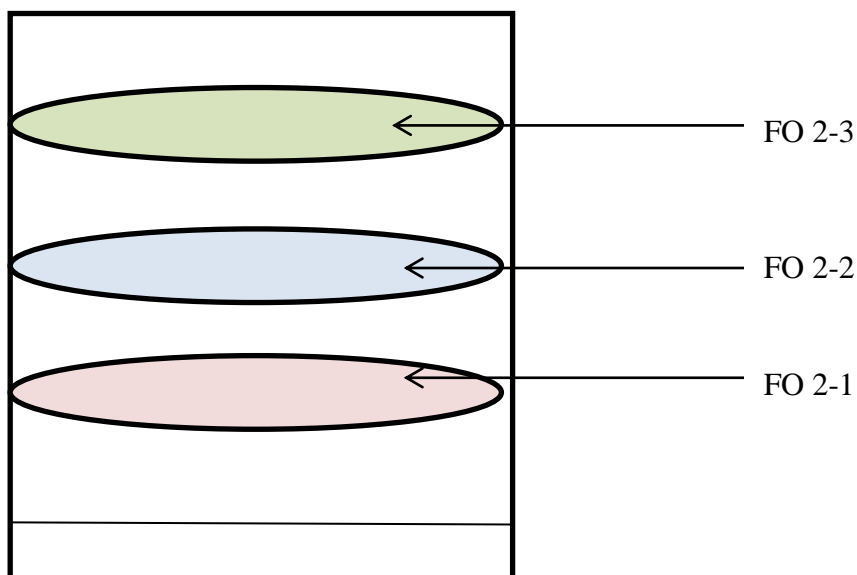
0,30 g hnědé viskózní hmoty bylo rozpuštěno v chloroformu a následně podrobena preparativní tenkovrstvé chromatografii. Vyvíjení desek probíhalo ve směsi cyklohexanu a diethylaminu a vyvíjelo se vždy dvakrát. Za pomoci UV detekce byly vypreparovány dvě zóny, které byly pracovně označeny FO 1- 1 a FO 1- 2 (Obr. 15). Obě fáze byly promyty chloroformem a přefiltrovány přes vrstvu Al_2O_3 tak, aby se odstranily mechanické nečistoty. Po odstranění nečistot byl získaný filtrát podroben krystalizaci ve směsi chloroformu a ethanolu. Bylo získáno 0,0244 g lehce oranžových krystalků alkaloidu FO 1- 2 a 0,0417 g krystalků alkaloidu FO 1- 1, které byly podrobeny strukturní analýze (MS a NMR), za účelem jejich identifikace.



Obr. 15: Preparativní TLC frakce 50-54

4.3.6 Zpracování frakce 55-67

Frakce o hmotnosti 13,89 g byla rozpuštěna v chloroformu a nanášena na skleněné desky s vrstvou Al_2O_3 - preparativní TLC. Vyvíjení desek probíhalo ve směsi cyklohexan – diethylamin v poměru 95:5. Pomocí UV detekce bylo zjištěno, že se na preparativním TLC nacházejí 3 podfrakce (Obr. 16). Stejně jako u předchozí frakce byly fáze promyty přes vrstvu Al_2O_3 a podrobeny krystalizaci ve směsi CHCl_3 a EtOH: U alkaloidu s označením FO 2- 1 však ke krystalizaci nedošlo. Jednotlivé podfrakce byly označeny FO 2- 1, FO 2- 2 a FO 2- 3. Z TLC bylo zjištěno, že alkaloid označovaný jako FO 2- 2 je totožný s alkaloidem FO 1- 1, proto bylo u těchto podfrakcí sjednoceno značení a dále bylo používáno označení FO 2- 2. Jako u předchozí frakce byly izolované látky podrobeny strukturní analýze za účelem jejich identifikace.



Obr. 16: Preparativní TLC frakce 55-67

4.4 Stanovení inhibičních aktivit izolovaných alkaloidů

Chemikálie

10mM acetylthiocholin jodid (Sigma-Adrich)

10mM butyrylthiocholin jodid (Sigma-Adrich)

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

5 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)

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

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Adrich)

4.4.1 Příprava erytrocytárních pouzder

Z čerstvě odebrané krve byla erytrocytární pouzdra připravena přidáním 1 ml citrátu na 10 ml krve. Pro odstranění plazmy (HuBuChE) byla použita centrifuga při rychlosti 4000 ot/min. Erytrocyty byly umístěny do 50ml zkumavek, kde se promyly 5mM fosfátovým pufrům s 15mM chloridem sodným. Takto promyté erytrocyty se spolu s fosfátovým pufrům míchaly a tím došlo k lýze. Dalším krokem byla jejich centrifugace při 20 000 ot/min. Vzniklá pouzdra (HuAChE) byla znovu promyta fosfátovým pufrům.

4.4.2 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Pro stanovení IC_{50} se použila Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substrát se používají estery thiocholinu, které se účinkem esteráz štěpí na thiocholin a kyselinu. SH- skupina thiocholinu se váže na DTNB a vzniká žlutě zbarvený produkt, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regresí v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteráz: galataminem (IC_{50} HuAChE = $1,71 \pm 0,07 \mu\text{M}$, HuBuChE = $42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$), huperzinem A (IC_{50} HuAChE = $0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$, HuBuChE $>1000 \mu\text{M}$). % I (inhibice) byla počítána dle vzorce $\%I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) * 100$, kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku.

4.5 Určení struktury izolovaných alkaloidů

4.5.1 Měření hmotnostního spektra

Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji Agilent 7890A GC 5975, v režimu EI při 70eV. Separace byla prováděna na DB-5 sloupci MS ($30 \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$). Teplotní program analýz: 100°C ; $15^\circ\text{C}/\text{min}$; $180^\circ\text{C}/1\text{min}$; $5^\circ\text{C}/\text{min}$; 300°C ; 35min.. Teplota nástřiku byla 280°C . Nosným plynem bylo helium, jehož průtok byl 0,8

ml/min. Teplota detektoru byla 200°C a jeho rozsah měření byl 35-600 m/z. Identifikace jednotlivých alkaloidů byla založená na porovnání získaných MS spekter s těmi, která jsou uložena v NIST knihovně a také s těmi, která byla už dříve izolována na katedře. Využito bylo taktéž i porovnání s daty v odborné literatuře.

4.5.2 Měření NMR spekter

Všechna NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian Iniova 500. Pracovní frekvence byla pro jádra ^1H 499,9 MHz a pro ^{13}C jádra 125,7 MHz. Spektra ^{13}C NMR byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě. ^1H NMR spektra byla měřena v inverzní 5 mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních frekvencí. Všechna měření byla prováděna v deuteriochloroformu při teplotě 25 °C. Hodnoty chemických posunů jsou uváděny v jednotkách ppm. Hodnoty ^1H NMR spekter jsou vztaženy k inertnímu standardu (hexamethyldisilan, 0,04 ppm). Naproti tomu hodnoty ^{13}C NMR spekter jsou vztaženy k signálu solventu (76,99 ppm).

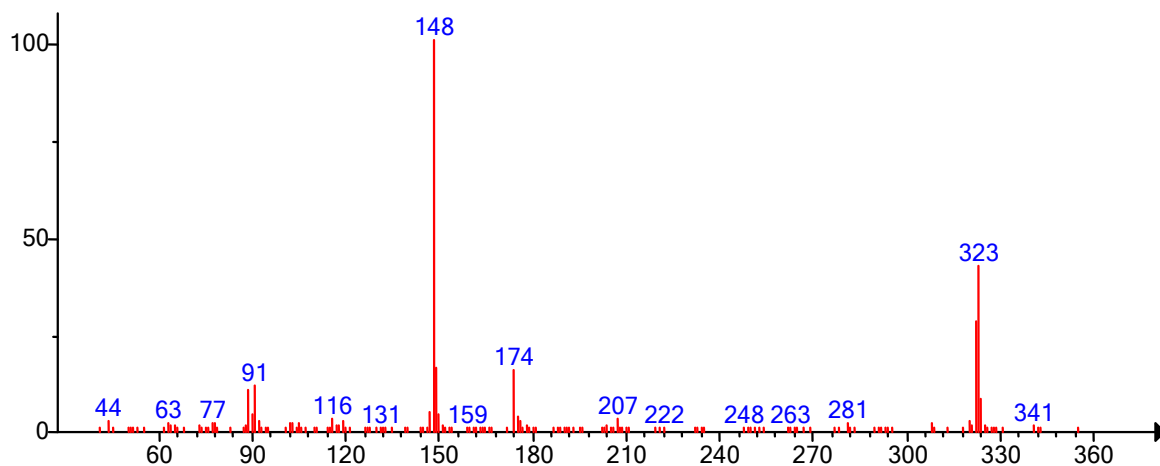
5. VÝSLEDKY

Na základě MS a NMR studií a porovnání získaných dat s literaturou byly izolované látky identifikovány jako stylopin, sinaktin a fumarilin.

5.1 Strukturní analýza stylopinu

5.1.1 MS studie stylopinu

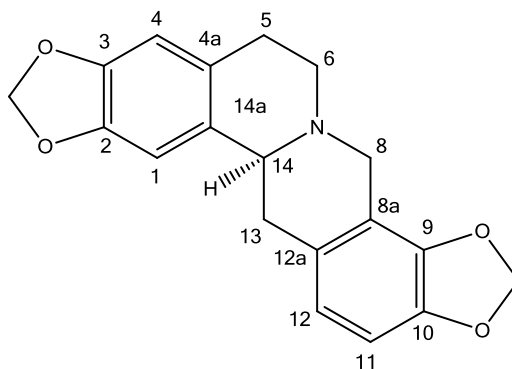
EI-MS (m/z) 323(42), 322(28), 174(16), 148(100), 91(12), 89(11)



Obr. 17: EI-MS studie stylopinu

5.1.2 NMR studie stylopinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s literaturou [81].



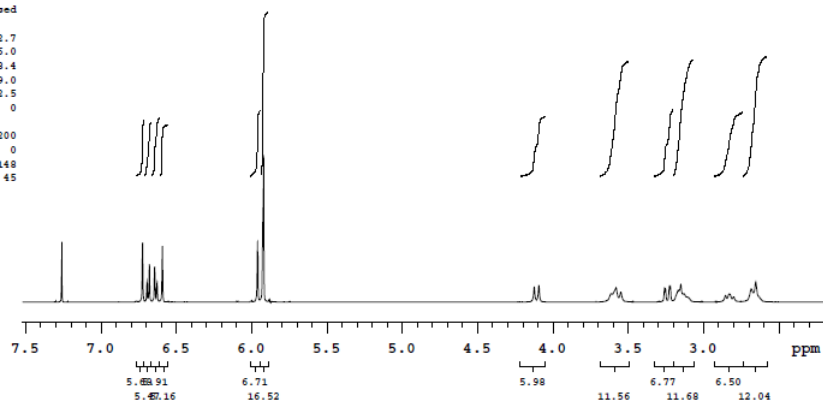
Obr. 18: Struktura stylopinu

NMR studie je shrnuta v tabulce (Tab. 4 a Tab. 5).

MS-1

exp5 PROTON

```
SAMPLE      PRESATURATION
date Jan 17 2012 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file /home/vmr1/v- SPECIAL
nmrsvs/data/Lucie/- temp not used
Pumaria_officiali- gain not used
s/MS-1/MS-1_H.fid spin 20
ACQUISITION hat 0.008
sw 3906.2 pw90 8.700
at 2.097 alfa 10.000
np 16384 FLAGS
fb 4000 il n
bs 32 in n
dl 1.000 dp y
nt 16 hs mn
ct 16 PROCESSING
tn H1 fn not used
tn H1 DISPLAY
sfrq 499.865 sp 1092.7
tof -329.1 wp 2666.0
tpwr 60 rfl 3418.4
pw 4.350 rfp 3629.0
DECOUPLER C13 rp 82.5
dn C13 lp 0
dof 0 PLOT
dm nnn wc 200
decwave W40_OneNMR sc 0
dpwr 39 ve 148
dmf 32258 th 45
ai odc ph
```

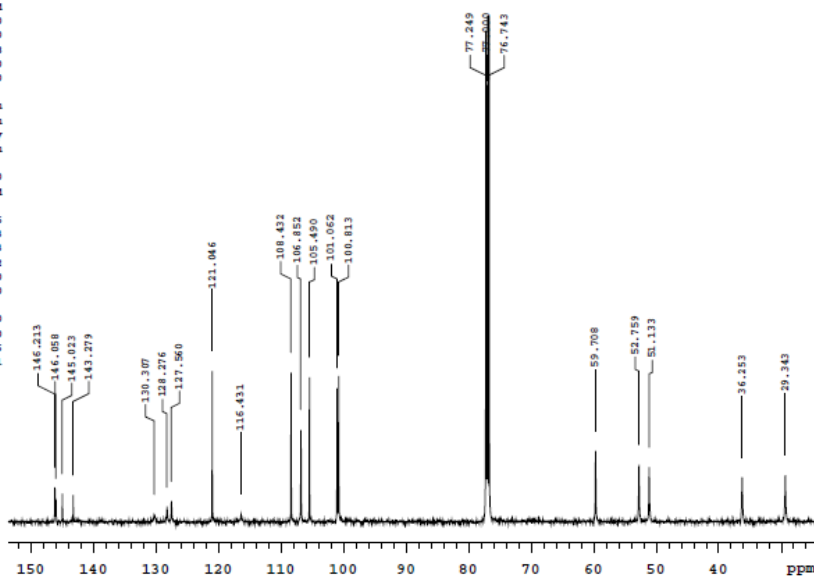


Obr. 19: ^1H NMR spektrum stylopinu

MS-1

exp5 CARBON

```
SAMPLE      PRESATURATION
date Jan 17 2012 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file /home/vmr1/v- SPECIAL
nmrsvs/data/Lucie/- temp not used
Pumaria_officiali- gain 30
s/MS-1/MS-1_C.fid spin 20
ACQUISITION hat 0.008
sw 32051.3 pw90 10.400
at 1.022 alfa 10.000
np 65536 FLAGS
fb 17000 il n
bs 64 in n
dl 5.000 dp y
nt 2000 hs mn
ct 2000 PROCESSING
tn C13 fn not used
tn C13 DISPLAY
sfrq 125.705 sp 2955.5
tof 1913.9 wp 16354.3
tpwr 56 wp 11881.3
pw 10.400 rfl 9678.2
DECOUPLER H1 rfp -72.0
dn H1 lp 0
dof 0 PLOT
dm YYY wc 200
decwave w sc 0
dpwr 40 vs 87496
dmf 11293 th 1
ai odc ph
```

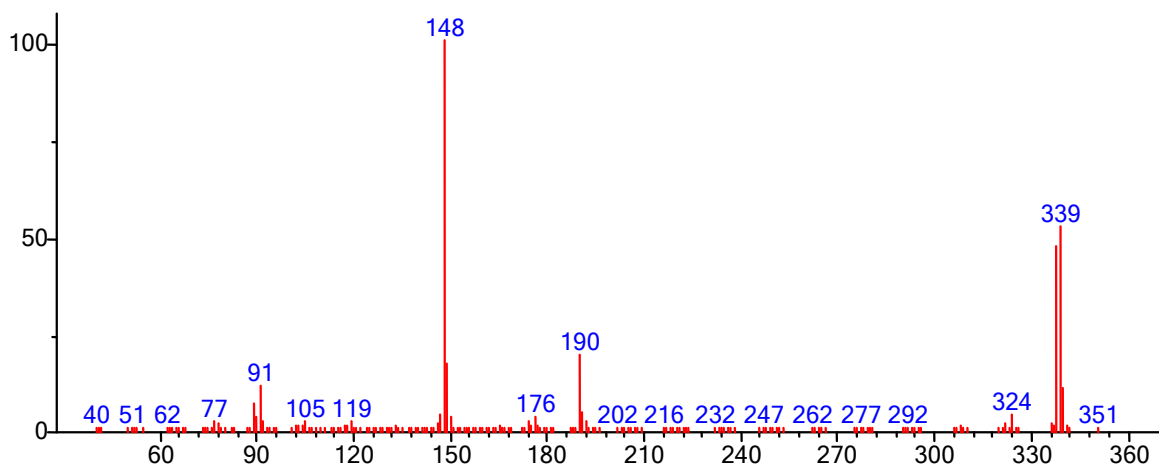


Obr. 20: ^{13}C NMR spektrum stylopinu

5.2 Strukturní analýza sinaktinu

5.2.1 MS studie sinaktinu

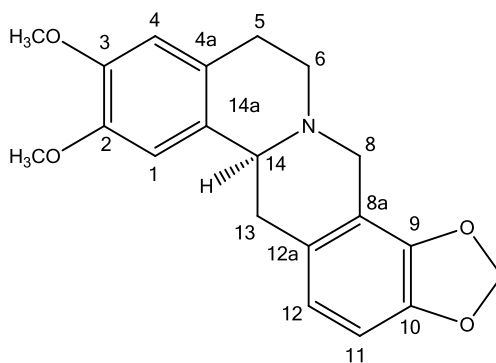
EI-MS (m/z) 339(54), 338(49), 324(5), 190(20), 148(100), 91(11), 89(7).



Obr. 21: EI-MS spektra sinaktinu

5.2.2 NMR studie sinaktinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s literaturou [81].



Obr. 22: Struktura sinaktinu

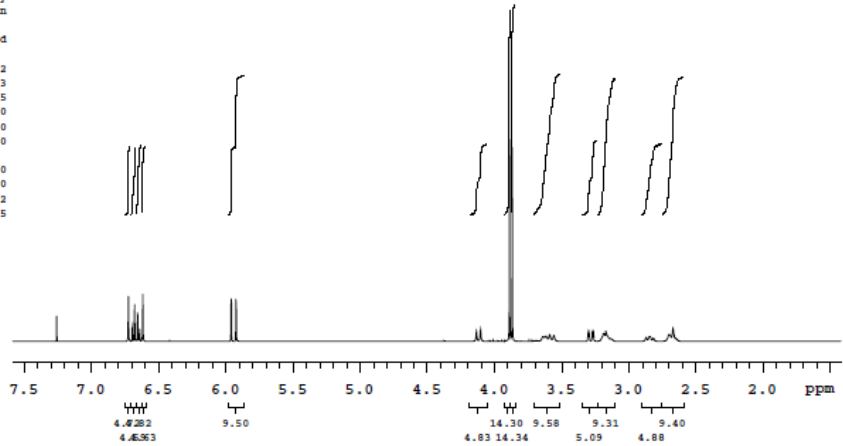
NMR studie je shrnuta v tabulce (Tab. 4 a Tab. 5).

5/067

exp3 PROTON

```
SAMPLE      PRESATURATION
date Dec 17 2012 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file /home/vnmr1/v- SPECIAL
nmrsva/data/Lucio/- temp 25.0
Fumaris_official1- gain 30
s/s-067/5-067_H.fl- spin 20
                   d het 0.008
ACQUISITION pw90 9.100
sw 4251.7 alfa 10.000
at 1.927 FLAGS
np 16384 il n
fb 4000 in n
bs 1 dp y
dl 3.000 hs nn
nt 32 PROCESSING
ct 32 fn not used

TRANSMITTER H1 sp DISPLAY
tn H1 sp 711.2
sfrq 499.865 wp 3080.3
tof -504.5 rfl 3767.5
tpwr 60 rfp 3629.0
pw 4.550 rp 83.0
DECOUPLER C13 lp 0
dn C13 PLOT
dof 0 wc 200
dm nn sc 0
decwave W40_0mhzNL- vs 32
                   _W018 th 45
dpwr 37 ai cdc ph
dmf 32258
```

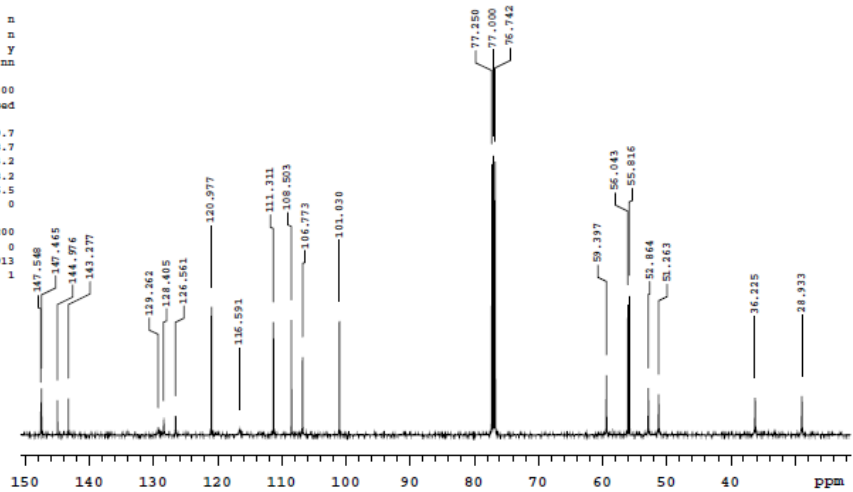


Obr 23: ¹H NMR spektrum sinaktinu

5/067

exp3 CARBON

```
SAMPLE      PRESATURATION
date Dec 17 2012 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file /home/vnmr1/v- SPECIAL
nmrsva/data/Lucio/- temp 25.0
Fumaris_official1- gain 30
s/s-067/5-067_C.fl- spin 20
                   d het 0.008
ACQUISITION pw90 11.300
sw 31250.0 alfa 10.000
at 1.049 FLAGS
np 65536 il n
fb 17000 in n
bs 16 dp y
dl 3.000 hs nn
nt 3000 PROCESSING
ct 3000 lb 2.00
TRANSMITTER C13 fn not used
tn C13 DISPLAY
sfrq 125.705 sp 2689.7
tof 1913.9 wp 16248.7
tpwr 55 rfl 11483.2
pw 5.650 rfp 9678.2
DECOUPLER H1 rp -75.5
dn H1 lp 0
dof 0 PLOT
dm yyy wc 200
dm w sc 0
decwave 41 vs 28913
dmf 12346 th 1
                   ai cdc ph
```



Obr. 24: ¹³C NMR spektrum sinaktinu

Tab. 4 ^1H NMR posuny a multiplicita signálů v CDCl_3 (25 °C) při 500 MHz stylopinu a sinaktinu

H	Stylopin	Sinaktin
1	6.72 s	6.73 s
4	6.60 s	6.62 s
5A	3.18 m	3.14 m
5B	2.69 m	2.64 m
6A	3.20 m	3.14 m
6B	2.72 m	2.64 m
8A	4.14 d	4.10 d
8B	3.61 d	3.55 d
11	6.69 d	6.69 d
12	6.64 d	6.65 d
13A	3.25 dd	3.26 dd
13B	2.89 dd	2.81 dd
14	3.67 dd	3.58 dd
-OCH ₃ (2')	-	3.89 s
-OCH ₃ (3')	-	3.86 s
-O-CH ₂ -O- (2', 3')	5.92 s	-
-O-CH ₂ -O- (9', 10')	5.93, 5.96 d	5.92, 5.95 d

Tab. 5 ^{13}C NMR posuny a multiplicita signálů v CDCl_3 (25 °C) při 125 MHz stylopinu a sinaktinu

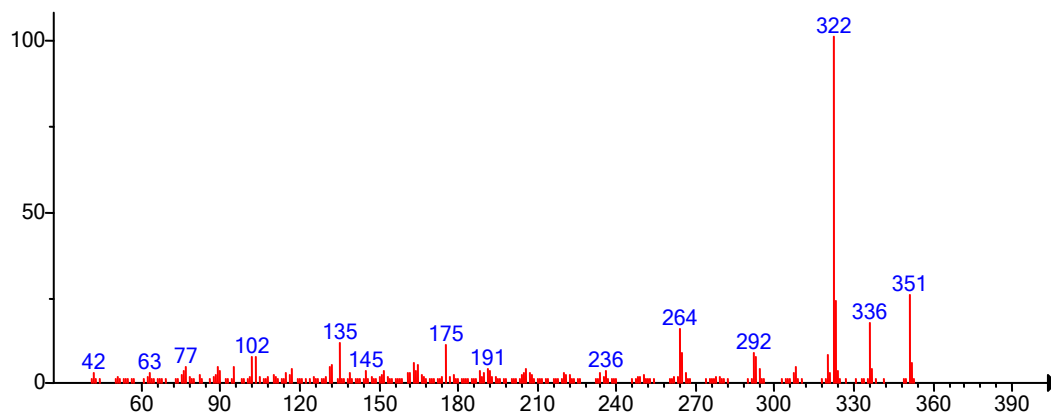
C	Stylopin	Sinaktin
1	105.7 d	108.7 d
2	146.5 s	147.5 s
2a	101.1 s	-
3	146.4 s	147.6 s
4	108.7 d	111.5 d
4a	127.7 s	126.8 s
5	29.4 t	29.1 t
6	51.3 t	51.3 t
8	52.9 t	53.0 t
8a	125.1 s	117.0 s
9	143.6 s	143.3 s
9a	101.4 s	-
10	145.4 s	145.0 s
11	107.2 d	106.7 d
12	121.3 d	121.0 d
12a	128.4 s	128.6 s
13	36.3 t	36.4 t
14	59.9 t	59.5 t
14a	130.3 s	129.6 s
-OCH ₃ (2')		56.1 q
-OCH ₃ (3')		55.9 q
-O-CH ₂ -O- (9', 10')		101.0 t

Použité zkratky: s singlet, d dublet, t triplet, q kvartet

5.3 Strukturní analýza fumarilinu

5.3.1 MS studie fumarilinu

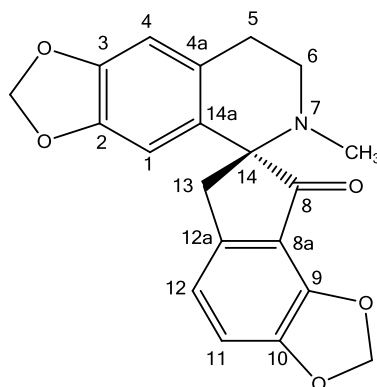
EI-MS (m/z) 351(38), 336(14), 322(100), 320(10), 264(156), 175(13), 135(18).



Obr. 25: EI-MS spektrum fumarilinu

5.3.2 NMR studie fumarilinu

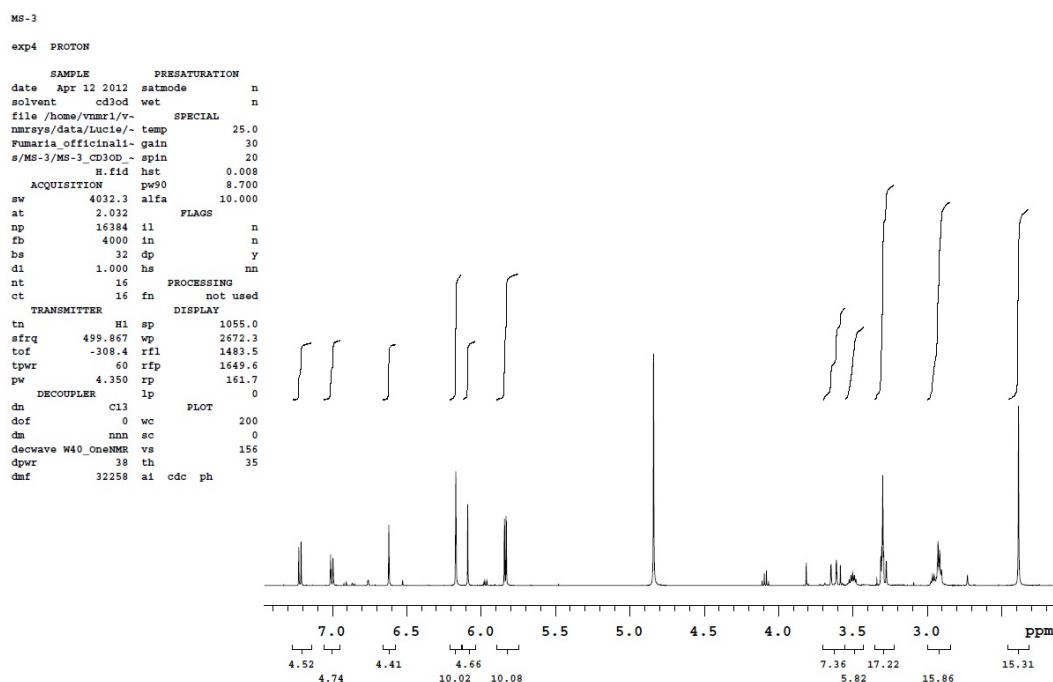
Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace ^1H - a ^{13}C -NMR spekter a jejich porovnání s literaturou [81].



Obr. 26: Struktura fumarilinu

5.3.2.1 ^1H NMR studie fumarilinu

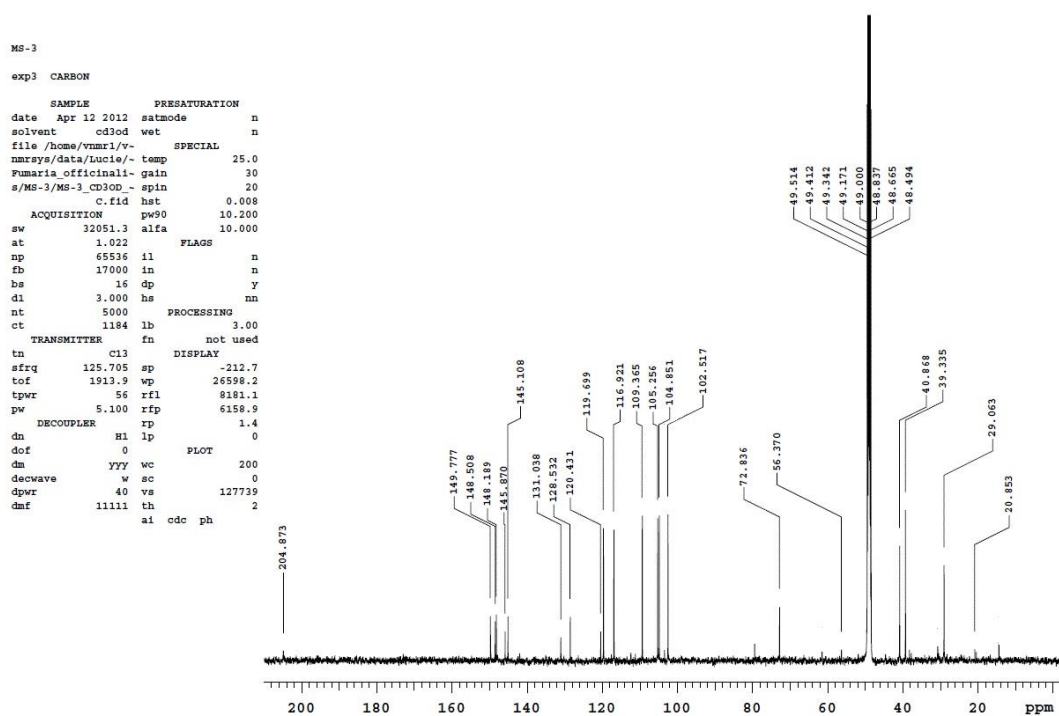
^1H NMR: (500 MHz, CD_3OD) δ 7.22 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H10), 7.00 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H9), 6.62 (1H, s, H4), 6.17 (2H, s, 11,12- OCH_2O -), 6.09 (1H, s, H1), 5.84 (2H, dd, $J=6.5, 1.0$ Hz, 2,3- OCH_2O -), 3.63 (1H, d, $J=18.5$ Hz, H8), 3.54-3.47 (1H, m, H6), 3.29 (1H, d, $J=18.5$ Hz, H8), 2.98-2.94 (1H, m, H6), 2.94-2.90 (2H, m, H5), 2.39 (3H, s, NCH_3).



Obz 27: ^1H NMR spektrum fumarilinu

5.3.2.2 ^{13}C NMR studie fumarilinu

^{13}C NMR: (125 MHz, CD_3OD) δ 204.9 (C13), 149.8 (C11), 148.5 (C3), 148.2 (C2), 145.9 (C12), 145.1 (C8a), 131.0 (C14a), 128.5 (C4a), 120.4 (C12a), 119.7 (C9), 116.9 (C10), 109.4 (C4), 105.3 (C1), 104.9 (11,12- OCH_2O -), 102.5 (2,3- OCH_2O -), 72.8 (C14), 49.4 (C6), 40.9 (C8), 39.3 (NCH_3), 29.1 (C5).



Obr. 28: ^{13}C NMR spektrum fumarilinu

5.4 Optická otáčivost

Optická otáčivost izolovaných alkaloidů je shrnuta v tabulce (Tab. 6)

Tab. 6: Optická otáčivost izolovaných alkaloidů

Izolovaný alkaloid	Optická otáčivost
Sinaktin	$-347,7^\circ$
Stylopin	-95°
Fumarilin	$+77^\circ$

5.5 Teploty tání

U všech izolovaných alkaloidů byla změřena teplota tání (Tab. 7), která byla porovnána s databází Dictionary of natural products on CD-ROM. U fumarilinu se

naměřená hodnota od hodnot uvedených v databázi liší, což může být způsobeno tím, že se alkaloid nepovedlo vykristalizovat a jevil se jako amorfní látka.

Tab. 7: Teploty tání izolovaných alkaloidů

Alkaloid	Teplota tání
Sinaktin	174-175 °C
Stylopin	206-207 °C
Fumarilin	122-124 °C

5.6 Výsledky inhibičních aktivit vůči AChE a BuChE

Izolované alkaloidy byly testované na inhibiční aktivitu vůči erytrocytární acetylcholinesteráze (HuAChE) a sérové butyrylcholinesteráze (HuBuChE). Získané výsledky jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 8).

Tab 8: Inhibiční aktivita získaných alkaloidů

Alkaloid	IC₅₀ HuAChE** (μM)	IC₅₀ HuBuChE** (μM)
(-)-Stylopin	>1000	>1000
(-)-Sinaktin	632 ± 22	>1000
(+)-Fumarilin	>1000	330 ± 12
Galanthamin*	1,71 ± 0,07	42,30 ± 1,30
Huperzin A*	0,033 ± 0,001	>1000

*standardy, ** každé měření opakováno třikrát

6.DISKUZE

Mezi nejvíce používané látky pro léčbu Alzheimerovy choroby patří inhibitory acetylcholinesterázy. V nedávném výzkumu bylo dokázáno, že v pozdějších stádiích hraje významnou roli také BuChE. Výzkum se proto v dnešní době zaměřuje na hledání léčiv, které jsou inhibičně aktivní vůči oběma enzymům, tzv. duálních inhibitorů.

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie byly provedeny screeningové studie několika druhů rostlin. Na základě výsledků těchto výzkumů byla vybrána *Fumaria officinalis*. Výsledky sumárních extraktů vykazovaly zajímavé inhibiční aktivity vůči acetylcholinesteráze ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 39.2 \pm 2.1 \mu\text{g/mL}$) i butyrylcholinesteráze ($IC_{50 \text{ HuBuChE}} = 40,32 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$).

Předmětem této diplomové práce bylo zpracování suché drogy z *Fumaria officinalis*, příprava alkaloidního extraktu a následná izolace tří alkaloidů v čisté formě. Izolované alkaloidy byly podrobeny strukturní analýze

První izolovaný alkaloid byl identifikován na základě NMR a MS analýzou určen jako sinaktin. Jedná se o protoberberinový alkaloid, který byl již dříve z této rostliny izolován. Tato sloučenina byla izolována v čeledích Menispermaceae (*Sinomenium acutum*) a Fumariaceae (rod *Corydalis*).

Druhá izolovaná sloučenina byla na základě získaných NMR a MS spekter identifikován jako stylopin. Stylopin patří mezi protoberberinové alkaloidy. Izolovat stylopin se povedlo i z dalších druhů rodu *Fumaria* (*parviflora*, *schleicheri*, *vaillantii*) a rodu *Corydalis* (*bractea*, *emanuelii*, *stricta*). K dalším čeledím, v nichž můžeme tuto látku najít, patří *Papaveraceae* (*Papaver rhoeas*, *Chelidonium majus*).

Třetí izolovanou látkou, která byla identifikována po porovnání MS a NMR spekter, byl fumarilin. Fumarilin patří mezi spirobenzylisochinolinové alkaloidy a byl izolován pouze z rodu *Fumaria*. Mezi další zástupce toho rodu, ze kterých byl izolován, patří *Fumaria vaillantii*.

V rámci této diplomové práce byla provedena studie, která porovnává inhibiční aktivitu izolovaných látek se standardy galanthaminu ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 1,71 \pm 0,07 \mu\text{M}$ a $IC_{50 \text{ HuBuChE}} = 42,03 \pm 1,30 \mu\text{M}$) a huperzinu A ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$ a $IC_{50 \text{ HuBuChE}} < 1000 \mu\text{M}$) vůči sérové butyrylcholinesteráze (HuBuChE) a erytrocytární acetylcholinesteráze (HuAChE). Pro určení těchto hodnot byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina.

Hodnoty IC_{50} stylopinu stanovené pro HuAChE a HuBuChE byly vyšší než $1000\mu\text{M}$. V porovnání s referenčními látkami byl proto shledán neaktivním a pro možné využití v terapii Alzheimerovy choroby jako nevyužitelným.

U sinaktinu byly stanovené hodnoty pro $IC_{50 \text{ HuAChE}} = 632 \pm 22 \mu\text{M}$ a $IC_{50 \text{ HuBuChE}} < 1000 \mu\text{M}$. I tento izolovaný alkaloid nevykazoval dostatečně zajímavou inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám, proto byl stejně jako v předchozím případě shledán pro využití v terapii AD prakticky nevyhovujícím.

Posledním izolovaným alkaloidem byl fumarilin, jehož hodnoty byly stanoveny pro $IC_{50 \text{ HuAChE}} = < 1000 \mu\text{M}$ a $IC_{50 \text{ HuBuChE}} = 330 \pm 12 \mu\text{M}$. Stejně jako v předchozích případech se inhibiční aktivity fumarilinu neblíží referenčním hodnotám, proto se jeho případné využití jako léčiva v terapii AD jeví jako nevhodné.

Závěrem lze říci, že izolované alkaloidy nebyly zodpovědné za inhibiční aktivitu sumárního extraktu, proto je nutno pokračovat v izolaci a testování dalších frakcí. Další zkoumání může dospět k nalezení prakticky využitelné látky.

7.LITERATURA

- [1] K. G. Ramawat, *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, Berlin: Springer, 2009, s. 402.
- [2] K. G. Ramawat, *Biotechnology: Secondary metabolites*, Enfield: Science Publishers, 2007, s. 393.
- [3] K. G. Ramawat, *Biotechnology: Secondary Metabolites: Plants and Microbes*, Enfield: Science Publishers, 2007, s. 565.
- [4] O. Červenka, V. Dědek a M. Ferles, *Organická chemie*, Praha: SNTL, 1980, s. 792.
- [5] F. Koukolík a R. Jiráček, *Diagnostika a léčení syndromu demence*, Praha: Grada, 1999, s. 156.
- [6] E. Růžička, *Diferenciální diagnostika a léčba demencí*, Praha: Galén, 2003, s. 175.
- [7] R. Jiráček, I. Holmerová a C. Brozová, *Demence a jiné poruchy paměti*, Praha: Grada, 2009, s. 176.
- [8] R. Jiráček a spol., *Demence*, Praha: Maxdorf, 1999, s. 226.
- [9] R. Jiráček a F. Koukolík, *Demence: neurobiologie, klinický obraz, terapie*, Praha: Galén, 2004, s. 335.
- [10] H. Mattle a M. Mementhaler, *Neurobiologie*, Praha: Grada, 2001, s. 649.
- [11] J. Bednařík, Z. Ambler, E. Růžička, J. Tichý a kol., *Klinická neurologie část speciální I*, Praha: Triton, 2010, s. 707.
- [12] V. Pidrman, *Demence*, Praha: Grada, 2007, s. 184.
- [13] S. Nevšímalová, E. Růžička, J. Tichý a kol., *Neurologie*, Praha: Galén, Karolinum, 2002, s. 368.
- [14] F. Koukolík a R. Jiráček, *Alzheimerova nemoc a další demence*, Praha: Grada, 1998, s. 232.
- [15] [Online]. 14. Listopadu 2012:
<http://www.ahaf.org/alzheimers/about/understanding/history.html>.
- [16] J. Klán, „Demence- závažný medicínský problém stárnoucí populace,“ č. 5, str. 18-21, 2011.
- [17] K. Blennow, M. de Leon a H. Zetterberg, „Alzheimer’s disease,“ *The Lancet*, č. 368, str. 387-403, 2006.
- [18] C. Bancher, C. Brunner a H. Lassmann, „Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease,“ *Brain Research*, č. 477, str. 90-99, 1989.
- [19] E. Braak, H. Braak a E. M. Mandelkow, „A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads,“ *Acta Neuropathologica*, č. 87, str. 554-567, 1994.

- [20] H. Braak a E. Braak, „Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections,“ *Brain Pathology*, č. 1, str. 213-216, 1991.
- [21] H. Braak, D. R. Thal, E. Ghebremedhin a K. del Tredici, „Stages of pathological process in Alzheimer’s disease,“ *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, č. 70, str. 960-969, 2011.
- [22] W. R. Markesbery, F. A. Schmitt, R. J. Kryscio, D. G. Davis, C. D. Smith a D. R. Wekstein, „Neuropathologic substrate of mild cognitive impairment,“ *Archives of Neurology*, č. 63, str. 38-46, 2006.
- [23] K. A. Wollen, „Alzheimer’s disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from perspective of patients and practitioners,“ *Alternative Medicine Review*, č. 15, str. 223-244, 2010.
- [24] H. Först a A. Kurz, „Clinical features of Alzheimer’s disease,“ *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, č. 249, str. 288-290, 1999.
- [25] G. A. Carlesimo a M. Oscar-Berman, „Memory deficits in Alzheimer’s patients: a comprehensive review,“ *Neuropsychology Review*, č. 3, str. 119-169, 1992.
- [26] E. M. Frank, „Effect of Alzheimer’s disease on communication function,“ *Journal of the South Carolina Medical Association*, č. 90, str. 417-423, 1994.
- [27] L. Bäckman, S. Jones, A. K. Berger, E. J. Laukka a B. J. Small, „Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer’s disease,“ *Journal of Internal Medicine*, č. 256, str. 195-204, 2004.
- [28] P. N. Tariot, „Medical management of advanced dementia,“ *Journal of the American Geriatrics Society*, č. 51, str. 305-313, 2003.
- [29] F. Koukolík, Vybrané přednášky o vztahu mozku a chování, Praha: Karolinum, 1995, s. 141.
- [30] L. O. Wahlund, „Magnetic resonance imaging and computer tomography in Alzheimer’s disease,“ *Acta Neurologica Scandinavica*, č. 168, str. 50-53, 1996.
- [31] E. Ryding, „SPECT measurements of brain functions in dementia,“ *Acta Neurologica*, č. 168, str. 54-58, 1996.
- [32] J. Bouček a V. Pidrman, Psychofarmaka v medicíně, Praha: Grada, 2005, s. 286.
- [33] O. Benešová, J. Krejčí a A. Pavlík, Nootropic drugs, Praha: Avicenum, 1991, s. 202.
- [34] R. Jiráček, „Farmakoterapie kognitivních funkcí u demencí zaměřených na Alzheimerovu chorobu- současné možnosti a perspektivy,“ *Remedia*, č. 7, str. 92-96, 1997.
- [35] R. Jiráček, „Farmakoterapie Alzheimerovy choroby,“ *Klinická Farmakologie a Farmacie*, č. 18, str. 212-214, 2004.
- [36] N. C. Bodick, W. W. Offen, H. E. Shannon, J. Sattewitte, R. Lucas, R. van Lier a

- S. M. Paul, „The selective muscarinic agonist xanomeline improves both the cognitive deficits and behavioral symptoms of Alzheimer’s disease,“ *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, č. 11, str. 16-22, 1997.
- [37] M. Sarter, H. H. Schneider a D. N. Stephens, „Treatment and strategies for senile dementia: antagonist beta-carbolines,“ *Trends in Neuroscience*, č. 11, str. 13-16, 1988.
- [38] B. Holmstedt, *Plants in development of modern medicine*, Harvard University Press, 1972, str. 303-360.
- [39] P. L. Julian a J. Píkl, „Studies in indole series V. The complete synthesis of physostigmine (eserine),“ *Journal of American Chemical Society*, č. 51, str. 755-75-, 1935.
- [40] A. Mohhamed, N. H. Kamal, A. S. Grieg a A. A. Abdulaiziz, „Kinetics of human acetylcholinesterase inhibition by novel experimental Alzheimer’s disease,“ *Biochemical Pharmacology*, č. 60, str. 561-570, 2000.
- [41] R. J. Polinsky, „Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for treatment of Alzheimer’s disease,“ *Clinical Therapeutics*, č. 20, str. 634-647, 1998.
- [42] X. Ma a D. R. Gang, „The lycopodium alkaloids,“ *Natural Products Report*, č. 21, str. 752-772, 2004.
- [43] X. C. Tang, G. H. Kindel, A. P. Kozikowski a I. Hanin, „Comparison of the effects of natural and synthetic huperzine A on rat brain cholinergic function in vitro and in vivo,“ *Journal of Ethnopharmacology*, č. 44, str. 147-155, 1994.
- [44] J. Patočka, „Huperzin A- an interesting anticholinesterase compound from the chinese herbal medicine,“ *Acta Medica*, č. 41, str. 155-157, 1998.
- [45] M. Marco a M. do Carmo Carreiras, „Galanthamin, a natural product for the treatment of Alzheimer’s disease,“ *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, č. 1, str. 105-111, 2006.
- [46] G. Krejčová a L. Ševelová, „Současné poznatky o galanthaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy,“ *Vojenské Zdravotnické Listy*, č. 1, str. 37-44, 2003.
- [47] M. J. R. Howes a N. S. L. Perry, „Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer’s disease and other cognitive disorders,“ *Phytotherapy Research*, č. 17, str. 1-18, 2003.
- [48] X. C. Tang a Y. F. Han, „Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from chinese herb,“ *CNS Drug Reviews*, č. 5, str. 281-300, 1999.
- [49] M. Villaroya, A. G. Garcia a J. L. Marco, „New classes of AChE inhibitors with additional pharmacological effects of interest for the treatment of Alzheimer’s

- disease," *Current Pharmaceutical Design*, č. 10, str. 3177-3184, 2004.
- [50] S. Lopez, J. Bastida a F. Viladomat, „Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts," *Life Science*, č. 71, str. 2521-2529, 2002.
- [51] S. K. Kalauni, M. I. Choudhary, A. Khalid, M. D. Manandhar, F. Shaheen, Atta-ur-Rahman a M. B. Gewali, „New cholinesterase inhibiting steroidal alkaloids from the leaves of *Sacococus coriacea* of nepalese origin," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, č. 50, str. 1423-1426, 2002.
- [52] J. Ulrichová, D. Walterová, V. Preiniger, J. Slavík, J. Lenfeld, M. Cushman a V. Šimánek, „Isolation, chemistry and biology of alkaloids from plant *Papaveraceae*. Inhibition of acetylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids," *Planta Medica*, č. 48, str. 111-115, 1983.
- [53] C. G. Whitley a S. Daya, „Protein ligand interactions. Part 5: Isoquinolin alkaloids as inhibitors of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*," *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, č. 9, str. 285-294, 1995.
- [54] N. S. L. Perry, P. J. Houghton, A. Theobald, P. Jenner a E. Perry, „In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, č. 52, str. 895-902, 2000.
- [55] Y. Ren, P. J. Houghton, R. C. Hider a M. J. R. Howea, „Novel diterpenoid acetylcholinesterase inhibitors from *Salvia miltiorhiza*," *Planta Medica*, č. 70, str. 201-204, 2004.
- [56] J. W. Chen a K. H. Ling, „Territrems: naturally occurring specific irreversible inhibitors of acetylcholinesterase," *Journal of Biomedical Science*, č. 3, str. 54-58, 1996.
- [57] K. Otoguro, F. Kuno a S. Omura, „Arisugacins, selective acetylcholinesterase inhibitors of microbial origin," *Pharmacology and Therapeutics*, č. 76, str. 45-54, 1997.
- [58] J. Kresánek, Atlas léčivých rostlín a lesných plodov, Martin: Osveta, 1988, s. 400.
- [59] J. Volák, J. Stodola a F. Severa, Velká kniha léčivých rostlín, Bratislava: Příroda, 1987, s. 319.
- [60] [Online]. 3. Prosince 2012:
<http://rostliny.prirodou.cz/zemedymovite/zemedym/zemedym-lekarsky>.
- [61] A. Pilát a O. Ušák, Kapesní atlas rostlin, Praha: SPN, 1988, s. 254.
- [62] A. Dugasová a D. Dugas, Babkine bylinky, Praha: Ottovo nakladatelství, 1995, s. 216.
- [63] K. Míka, Fytoterapia, Martin: Osveta, 1988, s. 427.
- [64] R. H. F. Manske a F. Šantavý, The alkaloids, vol.12, New York: Academic press,

- 1970, s. 637.
- [65] W. H. Perkin, „LXXI.- Cryptopine and protopine. Section I,“ *Journal of Chemical Society*, č. 109, str. 815-877, 1916.
- [66] R. H. Manske, E. L. McCauley a A. K. Reynolds, *The alkaloids*, vol. 5., New York: Academic press, 1995, s. 559.
- [67] M. Shamma, *The isoquinoline alkaloids*, Londýn, New York: Academic press, 1972, s. 594.
- [68] R. H. F. Manske a P. W. Jeffs, *The alkaloids*, vol. 9., New York: Academic press, 1967, s. 589.
- [69] R. Robinson, *The structural relations of natural products*, Oxford: Clarendon press, 1955, s. 150.
- [70] A. K. Krey a F. E. Hahn, „Berberine: complex with DNA,“ *Science*, č. 166, str. 755-757, 1969.
- [71] M. Shamma a W. A. Slusarchyk, „The aporphine alkaloids,“ *Chemical Reviews*, č. 64, str. 59-79, 1964.
- [72] A. K. Reynolds a L. O. Randall, *Morphine and related drugs*, Toronto: University of Toronto press, 1957, s. 393.
- [73] A. R. Pinder, „Lactonic alkaloids,“ *Chemical reviews*, č. 64, str. 551-572, 1964.
- [74] R. Sauau, B. Cabezudo, R. Rico, F. Nájera a J. M. López-Romero, „Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria* species by GC-MS,“ *Phytochemical Analysis*, č. 13, str. 363-367, 2002.
- [75] I. Macraj, G. Thirumala a G. Prem, „Sanguinarine,“ *Cardiovascular Drug Reviews*, č. 26, str. 75-83, 2008.
- [76] J. Soušek, D. Guédon, T. Adam, H. Bochořáková, E. Táborská, I. Válka a V. Šimánek, „Alkaloids and organic acids content of eight *Fumaria* species,“ *Phytochemical Analysis*, č. 10, str. 6-11, 1999.
- [77] C. Seger, S. Sturm, E. Strasser, E. Ellmerer a H. Stuppner, „¹H and ¹³C NMR signal assignment of benzylisoquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. (Papaveraceae),“ *Magnetic Resonance Chemistry*, č. 42, str. 882-886, 2004.
- [78] P. C. Gupta, N. Sharma a C. V. Rao, „A review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Fumaria indica* (Fumitory),“ *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, str. 665-669, 2012.
- [79] Z. H. Mardirossian, H. G. Kiryakov, J. P. Ruder a D. B. MacLean, „Alkaloids of *Fumaria officinalis*,“ *Phytochemistry*, č. 22, str. 759-761, 1983.
- [80] V. Šimánek, „Benzophenanthridine alkaloids,“ v *The alkaloids: Chemistry and pharmacology*, Academic press, 1985, str. 185-240.
- [81] J. Soušek, T. Adam, H. Bochořáková, E. Táborská a V. Šimánek, „HPLC a GC-MS

analýza alkaloidů a kyselin v druzích rodu *Fumaria*,“ *Česká a Slovenská Farmacie*,
č. 1, str. 36-39, 1998.

8.SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
APP	Amyloidový prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervová soustava
CT	počítačová tomografie
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EtOH	ethanol
GABA	γ-aminomáselná kyselina
HuAChE	lidská acetylcholinesteráza
HuBuChE	lidská butyrylcholinesteráza
IACHe	inhibitor acetylcholinesterázy
IC	inhibiční koncentrace
IChe	inhibitor cholinesterázy
MR	magnetická rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
NIST	národní institut standardů a technologií
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
R _f	retenční faktor
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialové záření

ABSTRAKT

Šafratová M.: Biologicky aktivní metabolity rostlin 10. Alkaloidy *Fumaria officinalis* L. a jejich biologická aktivita. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové, 2013. Diplomová práce. 70 s.

Předmětem diplomové práce bylo zpracování výtřepku alkaloidů z *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae). Pomocí sloupcové chromatografie a následně preparativního TLC byly izolovány tři alkaloidy, které byly podrobeny strukturní analýze (MS a NMR). První látka byla identifikována jako isochinolinový alkaloid stylopin, druhým izolovaným alkaloidem byl sinaktin a třetím izolovaným alkaloidem byl fumarilin. Všechny tři alkaloidy již byly dříve z *F. officinalis* izolovány.

U všech tří alkaloidů byla testována jejich inhibiční aktivita vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze (HuAChE) a lidské sérové butyrylcholinesteráze (HuBuChE). U stylopinu byly stanovené hodnoty $IC_{50 \text{ HuAChE}} < 1000 \mu\text{M}$ a $IC_{50 \text{ HuBuChE}} < 1000 \mu\text{M}$. Pro sinaktin byly naměřeny hodnoty $IC_{50 \text{ HuAChE}} = 632 \pm 22 \mu\text{M}$ a $IC_{50 \text{ HuBuChE}} < 1000 \mu\text{M}$. Hodnoty fumarilinu byly $IC_{50 \text{ HuAChE}} < 1000 \mu\text{M}$ a $IC_{50 \text{ HuBuChE}} = 330 \pm 12 \mu\text{M}$. V porovnání se standardy byly stylopin, sinaktin i fumarilin málo aktivní. Žádná z izolovaných látek se proto nejeví jako léčivo vhodné v terapii Alzheimerovy choroby.

Klíčová slova: *Fumaria officinalis* L., isochinolinové alkaloidy, fumarilin, sinaktin, stylopin, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, Alzheimerova choroba.

ABSTRACT

Šafratová M.: Biologically active metabolites of plants 10. Alkaloids of *Fumaria officinalis* L. and their biological activity. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové. Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové, 2013. Diploma thesis. 70 s.

The object of this diploma thesis was to process the pool of alkaloids from *Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae). Using column chromatography and preparative TLC three alkaloids were isolated which have been subjected to structural analysis (MS, NMR). The first substance was identified as isoquinoline alkaloid stylopin, others isolated alkaloid was sinactin and third isolated alkaloid was fumarilin. All three alkaloids have been previously isolated from *F. officinalis*.

For all three alkaloids were tested for their inhibitory activity against human erythrocyte acetylcholinesterase (HuAChE) and human serum butyrylcholinesterase (HuBuChE). For stylopin IC_{50} values were determined $IC_{50 \text{ HuAChE}} < 1000 \mu\text{M}$ and $IC_{50 \text{ HuBuChE}} < 1000 \mu\text{M}$. For sinactine were measured $IC_{50 \text{ HuAChE}} = 632 \pm 22 \mu\text{M}$ and $IC_{50 \text{ HuBuChE}} < 1000 \mu\text{M}$. Values for fumariline $IC_{50 \text{ HuAChE}} < 1000 \mu\text{M}$ and $IC_{50 \text{ HuBuChE}} = 330 \pm 12 \mu\text{M}$. In comparison with standards were stylopin, sinactine and fumariline not very active. None of the isolated compounds are therefore does not seem appropriate as a drug therapy for Alzheimer's disease

Keywords: *Fumaria officinalis* L., isoquinoline alkaloids, stylopin, sinactine, fumariline, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease.