

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HR. KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita obsahových látek rostlin VI.
Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Školitel: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, 2007

Lucie Řepová

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE, FACULTY OF PHARMACY IN HR. KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY

DIPLOMA THESIS

Biological activity of plant metabolites VI.
Influence of alkaloids from several taxons of plants on acetylcholinesterase

Head of department: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Supervisor: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové, 2007

Lucie Řepová

I.	ÚVOD	- 2 -
II.	CÍL PRÁCE	- 6 -
III.	TEORETICKÁ ČÁST	- 7 -
	1. SCREENING LÁTEK S ANTICHOLINESTERÁZOVOU AKTIVITOU	- 7 -
	2. POPIS ROSTLIN ZKOUMANÝCH V DIPLOMOVÉ PRÁCI	- 11 -
IV.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 29 -
	1. VŠEOBECNÉ POSTUPY	- 29 -
	2. POTŘEBY	- 30 -
	3. PŘÍPRAVA SEKVENČNÍCH EXTRAKTŮ (VÝTŘEPKŮ)	- 32 -
	4. BIOAUTOGRAFICKÁ METODA	- 36 -
V.	VÝSLEDKY	- 37 -
	1. C-C – CORYDALIS CAVAE RHIZOMA	- 37 -
	2. U-T – UNCARIAE TOMENTOSAE CORTEX	- 39 -
	3. T-I - TABEBUIAE IMPETIGINOSAE CORTEX	- 41 -
	4. P-S – PAPAVERIS IMMATURI FRUCTUS	- 43 -
	5. P-B – BOLDO FOLIUM	- 45 -
	6. ZAZNAMENÁNÍ POČTU SKVRN INDIKUJÍCÍCH INHIBICI ACETYLCHOLINESTERÁZY	- 46 -
	7. VLIV VYVÍJECÍ SOUSTAVY NA DETEKCI INHIBICE AChE	- 47 -
VI.	DISKUSE	- 48 -
VII.	ABSTRAKT	- 54 -

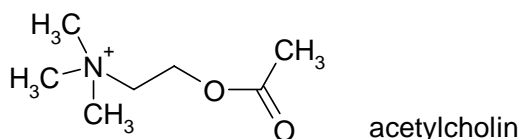
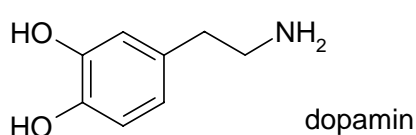
I. Úvod

Jedním z často diskutovaných problémů moderní doby jsou tzv. civilizační choroby. Tímto termínem se označuje skupina onemocnění, jejichž výskyt je spojován s životním stylem dneška. Jedná se především o špatný způsob stravování, úbytek fyzické aktivity, stres, kouření, změny životního prostředí atd. Je to různorodá skupina nemocí, mezi které řadíme například: onemocnění kardiovaskulárního systému (ateroskleróza, infarkt myokardu, hypertenze, cévní mozková příhoda), různé typy alergií, astma, obezita, diabetes mellitus, nádory, zánětlivá revmatická onemocnění kloubů, deprese, některé vrozené vývojové vady a v neposlední řadě demence různé etiologie včetně Alzheimerovy choroby.

Tato diplomová práce má fragmentárně přispět k poznání účinku přírodních látek s ohledem na jejich další studium v rámci neurodegenerativních poruch, u kterých dochází k poškozování a odumírání některých typů nervových buněk. K degeneraci nervových buněk CNS způsobující jejich smrt vedou patologické procesy jako excitotoxicita, oxidační stres a apoptóza. Neurony CNS mají ve srovnání s jinými tělesnými buňkami velmi omezenou schopnost regenerace, proto je při jejich smrti ztráta trvalá. Úbytek nervových buněk vyvolává změny řady různých funkcí CNS, spojené s demencí, což je stav ireverzibilních a postupujících poruch vyšších kortikálních funkcí, kdy jsou poškozeny učení a paměť, kontrola emocionálních reakcí, kvalita vědomí. Demence může mít původ vaskulární (multiinfarktová demence), nebo je nejčastěji spojena se stavy, jako jsou Alzheimerova, Parkinsonova či Huntingtonova nemoc^[1]. Farmakoterapie demencí může být dělena na farmakoterapii kognitivních (poznávacích) funkcí, které jsou postiženy primárně, a ostatních funkcí (poruch chování, spánku, emocí, léčbu přidružených delirií atd.)^[2].

Parkinsonova nemoc je neurologická extrapyramidová porucha způsobená neurodegenerací zejména dopaminergních neuronů bazálních ganglií (nucleus caudatus, putamen, pallidum). Symptomaticky obdobný parkinsonský syndrom může vzniknout jako následek virové encefalitidy, cerebrovaskulárních poruch, anoxie při úrazech hlavy nebo otravách (např. těžkými kovy nebo oxidem uhelnatým). Ztráta dopaminergních neuronů je největší v substantia nigra a degenerace postihuje též dopaminergní zakončení v corpus striatum, kde jsou přítomny ve velké denzitě dopaminové receptory D1 (excitační) a D2 (inhibiční). Proto příznaky obdobné Parkinsonově nemoci – ztrátu kontroly nad volními pohyby – způsobuje také potlačení funkce dopaminových receptorů při aplikaci klasických neuroleptik (fenothiazinů, butyrofenonů), benzamidů, reserpinu či metyldOPA. Jedná se zvláště o hypokinezi. Další hlavní příznaky parkinsonismu – svalová rigidita a tremor

(mizející jen ve spánku) – jsou způsobeny kompletními změnami v aktivitě i dalších neurotransmitterových systémů (acetylcholin, noradrenalin, 5-HT, GABA), podobně jako doprovodné mentální změny. Léky užívané při Parkinsonově nemoci mají za úkol působit proti nerovnováze dopaminergních a acetylcholinergních funkcí ve striatu zejména posílením dopaminergních funkcí, nebo také vlivem anticholinergním. Lékem volby je prekurzor dopaminu L-DOPA, protože dopamin sám neprochází hematoencefalickou bariérou (HEB). L-DOPA je ovšem z 99 % odbourána už na periférii a centrálních účinků by dosahovalo pouze 1 % z podané dávky, proto se kombinuje s karbidopou nebo benserazidem – inhibitory DOPA-dekarboxylázy. Z dalších skupin léčiv jsou důležité selektivní inhibitory MAO-B (selegilin), deriváty námelových alkaloidů (stimulují dopaminergní receptory), amantadin (zvyšuje uvolňování dopaminu), anticholinergika a převahou účinku v CNS (trihexyfenidyl, benzatropin, biperiden, orfenadrin), některá H1-antihistaminika a tricyklická antidepresiva^[3].



Na rozdíl od Parkinsonovy choroby, charakteristické převažující hypokinezi, je Huntingtonova nemoc poruchou hyperkinetickou s výskytem abnormálních pohybů určitých svalových skupin (chorea). Podobně jako u parkinsonismu je neuropatologický nález nejvýraznější v bazálních gangliích, kde neurodegenerace postihuje nejvíce cholinergní a GABA-ergní neurony. Dopaminová aktivita ve striatu je zvýšená, zřejmě pro ztrátu inhibičního vlivu GABA. Pohybová porucha je spojená s demencí a začne se projevovat nejčastěji ve středním věku (30-50 let). Je dědičně přenášena autosomálně dominantním genem. Bílkovina kódovaná tímto genem (huntingtin) ovlivňuje funkci některých dalších regulačních neuronových proteinů, čímž napomáhá procesům excitotoxicity a apoptózy. V současné době preferovaná farmakoterapie Huntingtonovy nemoci využívá léčiv z řady neuroleptik potlačujících dopaminovou aktivitu na úrovni specifických receptorů. Léčba ovšem nepostihuje demenci, která má zřejmě původ v neurodegenerativním postižení kortikálních neuronů. Alternativní možností je podávání léků přispívajících k depleci dopaminu (reserpin, meserpin, tetrabenazin), které však mají závažné nežádoucí účinky – vyvolávající depresi a hypotenzi. Ke zmírňování motorických příznaků nemoci se využívají též GABA-ergní centrální myorelaxancia např. baklofen. Ke zpomalení progresu demence je možno podávat léky snižující excitotoxicitu^[4].

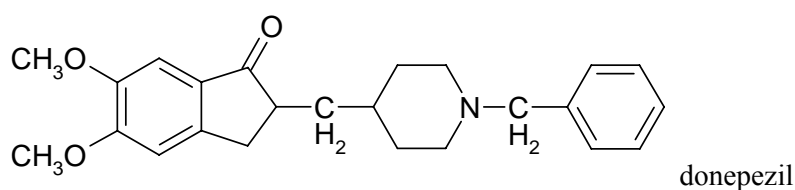
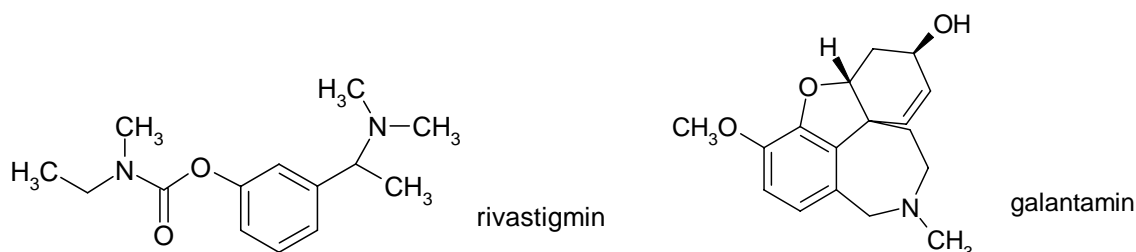
Těžiště této diplomové práce ovšem spočívá ve screeningu alkaloidů s potenciálně anticholinesterázovou aktivitou. Z toho vyplývá, že největší uplatnění by mohly mít tyto látky v léčbě Alzheimerovy choroby, kde jsou právě inhibitory acetylcholinesterázy základní terapeutickou skupinou léků.

Alzheimerova choroba je nejen nejčastěji se vyskytující demencí, ale také jedna z nejčastějších primárních příčin smrti. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby vychází z dosud známých patogenetických mechanismů. Onemocnění se vyznačuje tím, že již v počátcích je porušen centrální acetylcholinergní systém, který je důležitý mimo jiné pro mechanismy krátkodobé paměti a paměťové konsolidace (vštipivosti). Je podstatně snížena tvorba a uvolnění acetylcholinu z presynaptických zakončení. Snížena je hladina cholinacetyltransferázy a zároveň je snížen vstup cholinu do neuronů i využitelnost acetylkoenzymu A. Současně je snížen i počet nikotinových receptorů, zatímco počet muskarinových zůstává relativně nezměněn. Acetylcholin je odbouráván v synaptické štěrbině enzymy acetylcholinesterázami. V lidském mozku se vyskytují dvě formy acetylcholinesterázy, majoritní forma G4 a minoritní G1, jejíž proporce se však u Alzheimerovy choroby výrazně zvyšuje. U Alzheimerovy choroby se na odbourávání acetylcholinesterázy podílejí také butyrylcholinesterázy, které jsou tvořené v oblasti akumulací patického proteinu beta-amyloidu. Látky zlepšující funkci centrálního acetylcholinergního systému se nazývají kognitiva. Mezi ně náleží např. prekursorů tvorby acetylcholinu, inhibitory cholinesteráz, agonisté muskarinových a nikotinových receptorů. Nejdůležitější v klinické praxi jsou inhibitory cholinesteráz. Jsou to dosud nejúčinnější léčiva pro terapii lehkých až středně pokročilých alzheimerovských demencí a demencí s Lewyho tělísky. Klinickými studii se ověřuje jejich účinnost u jiných typů demencí – vaskulárních, parkinsonských, Huntingtonovy chorey a dalších. Centrální inhibitory cholinesteráz musí dobře procházet hematoencefalickou bariérou, ovlivňovat specificky mozkové formy cholinesteráz a být dobře tolerovány. Podstatou terapeutického působení je zablokování enzymů odbourávajících acetylcholin, a tím prodloužení jeho vazby na své receptory s následujícím zvýšením acetylcholinergní transmise. Inhibitory acetylcholinesteráz mají efekt především na zpomalení průběhu demencí a na oddálení přechodu demence do těžkých stádií, kdy jsou již pacienti nesoběstační. Inhibice probíhá buď reverzibilním způsobem – inhibitor nebo jeho aktivní metabolit jsou odbourávány v játrech a jejich působení trvá po dobu jejich přítomnosti v plazmě, nebo pseudoireverzibilním způsobem – inhibitory jsou odbourávány přímo cholinesterázami a jejich působení trvá déle než je jejich přítomnost nebo přítomnost jejich aktivních metabolitů v plazmě. Nejčastější nežádoucí účinky jsou

gastrointestinální příznaky – nechutenství, dyspepsie, průjmy, nauzea a zvracení, dále zpomalení tepové frekvence, křeče, bolesti hlavy, neklid v končetinách. Kontraindikace jsou především aktivní vředová choroba gastroduodenální a těžší převodní poruchy srdce. V současnosti jsou používány 3 látky: donepezil, rivastigmin a galanthamin. V klinických testech mají tyto látky přibližně stejnou účinnost, mají však svá určitá specifika. Donepezil je značně selektivní inhibitor acetylcholinesteráz s dlouhým poločasem odbourávání okolo 70 hodin umožňující podávání per os 1x denně. Rivastigmin je cholinergní dualista, inhibuje acetyl- i butyrylcholinesterázy. Galanthamin je poměrně selektivní inhibitor acetylcholinesteráz, a kromě toho také allostericky moduluje nikotinové pre- i postsynaptické receptory.

Z ostatních kognitiv jsou někdy používány látky uvolňující prekuzory acetylcholinu. Jsou to především sojové lecitiny nebo cholin-alfoscerát. U těchto látek však nebyl prokázán dostatečný efekt, zřejmě především pro malou prostupnost přes HEB.

S postupující progresí Alzheimerovy choroby dochází k poškození mozkového systému excitačních aminokyselin (glutamatergního systému). Tento systém, který je vůbec nejrozšířenější neuromediátorový systém mozku, je velmi významný pro mechanismy učení a paměti. U demencí alzheimerovského typu i u dalších neurodegenerativních i cerebrovaskulárních onemocnění dochází k nadměrnému uvolňování molekul glutamátu i dalších excitačních aminokyselin. Terapeuticky užitečné jsou proto parciální inhibitory NMDA receptorů. V praxi je zatím používaná jediná látka této skupiny, memantin. Může se kombinovat s inhibitory acetylcholinesteráz i dalšími látkami. Dalšími látkami spíše podpůrného charakteru využívanými v léčbě jsou nootropika - piracetam, pyritinol, nicergolin, extrakty *Ginkgo biloba*, dále vazodilatancia – pentoxifylin, naftidrofuryl, látky vychytávající volné kyslíkové radikály, růstové faktory a další skupiny léčiv^[5].



II. Cíl práce

Tato diplomová práce navazuje na již započatý výzkumný projekt na katedře farmaceutické botaniky a ekologie zabývající se screeningem rostlinných látek alkaloidní povahy (založené na struktuře různých heterocyklů) s potenciální anticholinesterázovou aktivitou. Cílem diplomové práce bylo:

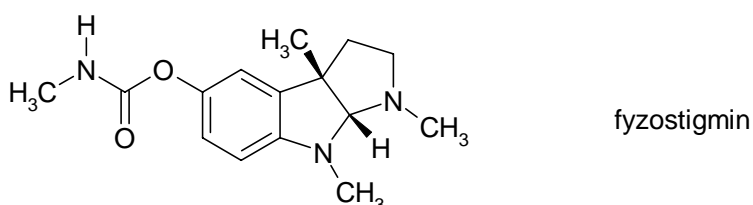
- vypracovat metodu pro hodnocení inhibice acetylcholinesterázy u typů předčištěných alkaloidních extraktů z rostlin (středně bazické a silně bazické terciární base, případně jodidy kvarterních bazí získatelné z kyselého anebo bazického prostředí) za pomoci tenkovrstvé chromatografie,
- porovnat je se standardy (fysostigminem a galanthaminem),
- v případě srovnatelné aktivity stanovit tuto aktivitu *in vitro* Elmannovou metodou,
- vyhodnotit přípravu extraktů a navrhnout izolaci účinných alkaloidů,
- zpracovat tímto způsobem 5 morfologických částí rostlin různých taxonů.

Jak již vyplývá z tématu diplomové práce, její přínos by měl spočívat především v nalezení dalších možných rostlinných látek potenciálně použitelných v léčbě neurodegenerativních onemocnění, především Alzheimerovy choroby. V úvodu bylo zmíněno, jakým způsobem probíhají patologické procesy u těchto onemocnění a jak je možné do těchto dějů zasáhnout. Jedná se zvláště o ovlivnění acetylcholinergního systému. Za standardy látek s anticholinesterázovou aktivitou, s kterými byly porovnávány námi izolované alkaloidy, jsou považovány fysostigmin a galanthamin. Dalším bodem diplomové práce bylo optimalizovat samotný postup přípravy a čištění extraktů s následnou izolací účinných alkaloidů.

III. Teoretická část

1. Screening látek s anticholinesterázovou aktivitou

Acetylcholin (ACh) je jedním z hlavních neurotransmiterů CNS. Aby se předešlo nežádoucím účinkům vyvolaných nadbytečnou stimulací cholinergního systému, je acetylcholin po uvolnění do synaptické štěrbině rychle hydrolyzován enzymem nazývaným acetylcholinesteráza (AChE). Vyskytuje se rovněž podobný enzym – butyrylcholinesteráza (BuChE). Pokud je cholinesteráza inhibována, neprobíhá odbourávání ACh tak rychle a jeho hladina roste. Klasickým inhibitorem cholinesterázy je fyzostigmin, také nazývaný eserin.



Byl izolován ze semen *Physostigma venenosum* Balf. (kalabarský bob) v 19. století. Toxické účinky extraktu ze semen se projevují nadměrnou cholinergní stimulací ústí ve zvýšenou salivaci, nauzeu, bradykardii, svalové křeče a selhání dechu, nervozitu a agitaci CNS. Bylo zjištěno, že nadměrnou stimulaci způsobuje fyzostigmin inhibicí odbourávání ACh. V posledních letech byla určena struktura AChE a byl objasněn způsob vazby jejích inhibitorů. Tyto inhibitory, jak již bylo zmíněno, způsobují nadměrnou stimulaci mnoha funkcí a to u různých živočišných druhů. Značné toxické účinky vykazují již při nízkých dávkách. Toho se využívalo v oblasti insekticidů. Karbaryl byl získán jako syntetický analog fyzostigminu. V terapii bylo až donedávna použití omezeno pouze na oftalmologii a léčbu myasthenia gravis. Nicméně nový zájem vzbudil objev, že použití AChE inhibitorů vede ke zlepšení časných příznaků Alzheimerovy demence (AD). Po zjištění, že fyzostigmin je schopný procházet hematoencefalickou bariérou, bylo provedeno mnoho studií *in vivo*, které ukázaly jeho účinek na zlepšení symptomů vznikajících následkem deficitu ACh v CNS. Byl zdokumentován také ochranný vliv fyzostigminu proti poškození kyslíkovým deficitem u myši a zlepšení učení u krys. Klinické studie prokázaly významný prospěch u kognitivních funkcí a to jak u zdravých lidí, tak u jedinců trpících Alzheimerovou nemocí, ale krátký biologický poločas zabránil jeho podávání v léčbě AD. Fyzostigmin inhibuje zároveň také butyrylcholinesterázu nacházející se rovněž v CNS, což způsobuje někdy se vyskytující nežádoucí účinky projevující se gastrointestinálními poruchami. Nicméně nedávno byla prokázána účast BuChE v etiologii a progresi AD, a tak může být její inhibice rovněž

prospěšná, a inhibitory jako fyzostigmin nebo rivastigmin mohou mít větší klinický účinek než selektivní AChE inhibitory. K upravení farmakokinetiky byly syntetizovány analogy fyzostigminu. Neostigmin byl nejrozšířenější látkou v léčbě myasthenia gravis. Je to kvartérní amoniová sůl, tím je značně snížena jeho schopnost procházet hematoencefalickou bariérou a tak je nepoužitelný v léčbě AD. Naproti tomu rivastigmin byl vytvořen právě za účelem léčby AD. Inhibuje specificky typ G1 AChE v kůře a hippokampu, což jsou oblasti týkající se právě kognitivních funkcí. Klinické studie dokázaly přínos rivastigminu (Exelon®) při mírných formách AD a je povolen k symptomatické léčbě AD od roku 2000. Galanthamin se nachází u zástupců čeledi Amaryllidaceae, například v čínské léčivé rostlině *Lycoris radiata* Herb. a v evropských *Galanthus nivalis* L. a *Narcissus* spp. Jeho anticholinergní vlastnosti byly poprvé využity v Bulharsku v polovině dvacátého století k léčbě obrny, ale do popředí se dostal teprve v poslední dekádě dvacátého století jako lék AD. V Evropě byl k léčbě povolen v roce 2001. Multicentrické randomizované studie dokázaly, že je dobře tolerován a významně zlepšuje kognitivní funkce při podávání pacientům s AD. Galanthamin se dobře absorbuje po perorálním podání a je více selektivní k AChE než BuChE. Nepřímo stimuluje allostericky také nikotinové receptory a tím také stimuluje cholinergní funkce a paměť. To předpokládá vyšší účinnost galanthaminu oproti jiným AChE inhibitorům a jeho přínos v léčbě vaskulárních demencí stejně jako AD dokazují nedávné studie. Bylo nalezeno několik dalších alkaloidů s anticholinesterázovou aktivitou v čeledi Amaryllidaceae, ty ale dosud nebyly podrobeny důslednějším studiím. Studie dvou druhů *Crinum* užívaných v tradičním nigerijském lékařství k posílení paměti skončila izolací čtyř alkaloidů, z nichž nejaktivnější byl hamayn, přesto jeho IC_{50} 250 μ M byla o tři řády slabší než u fyzostigminu, a tak je nepravděpodobné, že by mohl být podán v tak velkém množství, aby měl dostatečný terapeutický účinek. Zatímco v západním světě byly do lékopisu zařazeny fyzostigmin a galanthamin, v Číně se začal k léčbě AD používat huperzin A. Je to jeden z alkaloidů nacházejících se v plavuni *Huperzia serrata* Thunb. (Huperziaceae) a je používán v různých formách v tradiční čínské medicíně na problémy s pamětí, na podporu oběhu, horečku a zánět. Huperzin A je příbuzný chinolizidinovým alkaloidům a reverzibilně inhibuje AChE *in vivo* a *in vitro*. Ukázalo se, že huperzin zlepšuje paměť u krys s poškozeným kognitivním vnímáním. Výsledky bádání dokazují, že by huperzin A mohl být klinicky účinný u cerebrovaskulárních poruch stejně jako u AD. Dále bylo objeveno jeho neuroprotektivní působení, neboť zjištěné klinické účinky nemohly být vysvětlovány pouze na základě inhibice AChE. Ukázala se jeho neuroprotektivita vůči β -amyloidovým fragmentům 25-53 a proti cytotoxicitě indukované

volnými radikály a utlumení apoptózy inhibicí kaspázového řetězce. V multicentrické, dvojitě slepé studii huperzin A významně zlepšil paměť a chování u pacientů s AD a byl označen za více selektivní k AChE než BuChE a méně toxický než syntetické AChE inhibitory donepezil a takrin. Z dalších rostlinných alkaloidů, u kterých se prokázaly pomocí studií anticholinergní vlastnosti, můžeme jmenovat koptisin, palmatin, berberin, rutekarpin. U posledně jmenovaného byl dokázán také protizánětlivý účinek způsobený inhibicí COX-2 a neméně významné bylo zvýšení krevního průtoku mozkiem. Steroidní alkaloidy s anticholinergní aktivitou jsou zastoupeny v zelených částech rodu *Solanum*, jejich použití k léčbě nebylo v tradiční medicíně zaznamenáno, podle všeho pro jejich toxicitu.

Inhibice cholinesterázy látkami alkaloidního typu je snadná na základě molekulární struktury, těžší je to u sloučenin jiných fytochemických druhů, u kterých byly zjištěny stejné vlastnosti. Velmi širokou skupinu představují terpeny. Skupina přírodních látek složená ze dvou a více 5-ti uhlíkatých jednotek vznikajících ze společného prekurzoru kyseliny mevalonové. Většinou se jedná o sloučeniny cyklického charakteru, lipofilní, takže mohou procházet hematoencefalickou bariérou. Monoterpeny a některé seskviterpeny jsou těkavé, tím lze dosáhnout jejich účinků inhalací. První zjištění že monoterpeny vykazují inhibici AChE bylo učiněno v polovině devadesátých let. Jednou skupinou zkoumaných rostlin byly evropské druhy rodu *Salvia*. Inhibice byla dosažena již při nízkých koncentracích, přesto však byly zhruba o tři řády vyšší než u fyzostigminu. Za část účinku zodpovídaly monoterpeny 1,8-cineol a α -pinen, vyšší účinek ovšem vykazovaly směsi všech látek - silice. Další rostlinou obsahující účinné monoterpeny je *Melissa officinalis* L. Zajímavou rostlinou je také *Salvia miltiorrhiza* Bge. Extrakt z kořene se užívá v léčbě cerebrovaskulárních nemocí a mnoho výzkumů dokazuje možný mechanismus ochranného účinku proti mozkové ischemii. Při screeningu rozličných indiánských léčivých rostlin a koření se ukázala jako nejúčinnější *Origanum majorana* L., jejíž účinnost dosahuje téměř úrovně takrinu. Aktivní sloučeninou v droze je triterpenická ursolová kyselina.

Withanolidy jsou skupinou sloučenin příbuzných steroidům a nacházejí se v některých rodech čeledi Solanaceae, především *Withania somnifera* L. Kořen této rostliny je jednou z nejvíce žádaných drog ajurvédské medicíny a je znám přes 4000 let. Mechanismus účinku na paměť a učení je nejasný, ale zřejmě zasahuje cholinergní neurotransmisi oblastí mozkových kognitivních funkcí. Je třeba ještě dalších průkaznějších studií. Glykowitzanolidy vykazují mimo to také anxiolytické a antidepresivní účinky, což by mělo pomocný význam při léčbě symptomů AD, a také vlastnosti antioxidační a protizánětlivé.

Další skupinou látek jsou fenoly, jichž existuje velmi mnoho typů, ale pouze neolignany obsažené v rostlině *Magnolia officinalis* Rebd. & Wils. vykazují anticholinergní vlastnosti. Kořen *Magnolia officinalis* obsahuje bifenolické lignany, honokiol a magnolol, které zvyšují aktivitu acetylcholintransferázy a inhibují AChE. Anxiolytické působení se vysvětluje jejich schopností potencovat GABA-ergní transmissi. Jejich antioxidační a neuroprotektivní vlastnosti jsou předmětem dalšího zkoumání pro možné využití v léčbě AD^[6].

Další skupinou látek neobsahujících dusík, u kterých byla zjištěna inhibiční aktivita, jsou xanthy. Aktivita těchto látek byla identifikována pomocí jednoduché metody na mikrotitrační destičce, která ovšem zachycuje kompletní kinetickou analýzu AChE inhibitorů. Její aplikace na celou řadu nealkaloidních látek vedla k nalezení sedmi aktivních sloučenin, z nichž šest bylo xanthonové povahy. U čtyřech z nich již byla dříve zjištěna inhibice MAO^[7].

Tyto a další zkoušky ukazují na důležitost přírodních sloučenin a jejich vyžívání jako zdrojů aktivních látek v léčbě různých onemocnění.

2. Popis rostlin zkoumaných v diplomové práci

Výpis morfologických částí rostlin:

Corydalis cavae rhizoma

Uncariae tomentosae cortex

Tabebuiae impetiginosae cortex

Papaveris immaturi fructus

Boldo folium

1 *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte - Fumariaceae

1.1 Synonyma: *Borkhausenia cava*, *Bulbocapnus cavus*, *Capnoides cava*, *Corydalis bulbosa*, *Fumaria bulbosa* var. *cava*, *Pseudofumaria maior*

1.2 Droga - *Corydalis cavae rhizoma*

Makroskopie

Chuť: hořká

Zápach: bez vůně

Vzhled: kuželovité až nepravidelně laločnaté hlízy, šedohnědé, nahoře se zbytkem stonků, spodní okraj s důlkem a dovnitř zahnutým okrajem, lom hladký, plocha lomu zelenožlutá

1.3 Botanický popis

Je to vytrvalá, 10-35 cm vysoká rostlina. Hlízy jsou hluboko v zemi, kulovité, hnědé, do velikosti vlašského ořechu. Lodyha je vzpřímená, masitá, zelená až červenohnědá, holá, s dvěma řapíkatými, dvojitě trojčetnými, holými, modrozelenými listy. Lístičky jsou na klínovém základě, obvejčité, s více či méně hluboce vykrojenými laloky, vpředu široce vejčitými, tupými až úzce podlouhlými a špičatými. Kvete až čtvrtým nebo pátým rokem ve tvaru koncových, vzpřímených hroznů tvořených deseti až dvaceti téměř přilehlými květy. Květy jsou krvavě červené nebo žlutavě bílé, zřídka fialové, hnědočervené nebo tmavě modré, 18 až 28 mm dlouhé, s ostře vyhraničeným horním a spodním pyskem a dlouhou, na konci dolu zakřivenou ostruhou. Květy voní po pryskyřici a jsou podpírány velkými vejčitými celokrajnými listeny. Lusky jsou bledě zelené, 20 až 25 mm dlouhé, na 5 – 7 mm dlouhé stopce, mnohosemenné. Semena jsou 3 mm široká, černá, kulatá, hladká a lesklá.

1.4 Rozšíření

Jižní a střední Evropa, ve světlých křovinách, listnatých lesích, ovocných sadech a hájích, na živých plotech a ohradách, od rovin do 1800 m nadmořské výšky, na čerstvých, jílovitých půdách.

1.5 Obsahové látky

Alkaloidy

V nadzemních částech do 0,84 %. Hlavním alkaloidem je s obsahem 0,25 až 0,35 % aporfinový alkaloid bulbokapnin, další jsou glaucin, nantenin (domestín), pravděpodobně také dehydronantenin, predicentrin, isoboldin. Kromě toho obsahuje také adlumidicein, apokavidin, domesticin, isokorybulbin, isokorydin a další alkaloidy, které se vyskytují i v hlízách.

V semenech se vyskytuje asi 0,45 % isochinolinových alkaloidů, mezi nimi bulbokapnin. U alkaloidů s chininovou strukturou, jako je bulbodion nebo jeden dehydroaporfin-10,11-chinon, se zřejmě jedná o artefakty vzniklé při zpracování. Kalusová pletiva vytváří například bulbokapnin nebo korydalin.

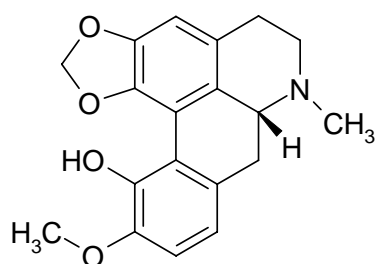
Obsah alkaloidů v rhizoma *Corydalis cavae* 4 až 6 %, obsah a složení silně kolísá podle stanoviště. Byly izolovány následující skupiny alkaloidů:

Protoberberinový typ: koptisin, (+)-korydalin, (+)-korybulbin, (+)-korypalmin, korysamin, (+)-isokorypalmin a (±)-isokorypalmin, dehydrokorydalin, (+)-kanadin [(+)-tetrahydroberberin], (-)-skoulerin, (+)-skoulerin, (+)-stylopin, (+)- a (±)-tetrahydropalmatin, (+)- a (±)-thaliktrikavin; podle novějších výzkumů kromě nich také (+)-tetrahydrokorysamin, dehydrokorybulbin, dehydroapokavidin, α-methoxyhydroxy (+)-stylopinu a tetrahydrokorysaminu

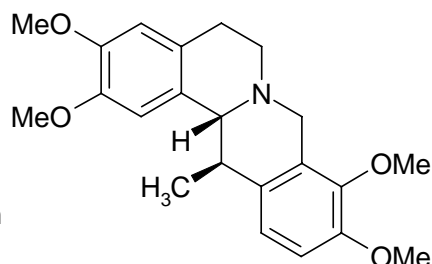
Protopinový typ: vedle protopenu, korykavamin, (+)- a (±)-korykavidin, allokryptopin

Aporfinový typ: (+)-bulbokapnin, dále (+)-korydin, (+)-korytuberin, (+)-bulbokapninmethoxyhydroxid a magnoflorin

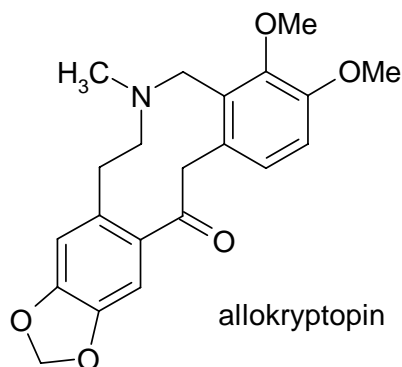
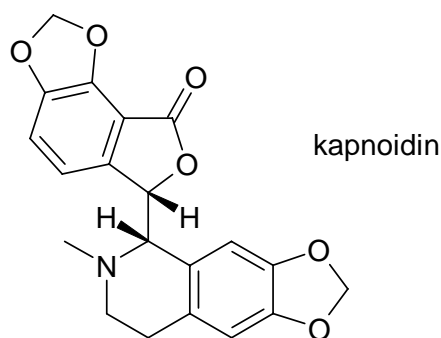
Ftalidisochinolinový typ: kapnoidin



(S)-bulbokapnin



D-korydalin



1.6 Účinky

Spasmolytické působení

Pokus s blíže nedefinovanými extrakty různých částí rostliny *Corydalis cava* inhibuje kontrakci na izolovaném střevě morčete navozenou pomocí histaminu, draslíku, kallidinu a acetylcholinu. Výsledky nejsou opakovatelné. Chybí dostačující údaje o extraktu, o koncentraci a stejně tak i o použitých částech rostliny.

Sedativní působení

Nejsou zaznamenány prokazatelné farmakologické výzkumy drogového extraktu. Četné doklady o účinku izolovaných čistých látek nejsou dostačující k odůvodnění používání preparátů s *Corydalis cava* jako sedativa.

1.7 Oblasti využití v lidovém léčitelství

Zevně se výtažek z drogy používá ve formě obkladů u špatně se hojících ran a vředů. Čajový nálev a tinktura při léčbě endoparazitóz a menstruačních potíží. Dalšími indikacemi jsou parkinsonismus a Menierova choroba. Účinnost nebyla doložena u žádného použití.

1.8 Akutní otrava

Dosud nejsou známy žádné případy předávkování. Jelikož vysoké dávky bulbokapninu a korytuberinu vedou ke klonickým křečím se svalovým třesem, je u značného překročení dávky nutné počítat s projevy otravy. Při správném dávkování by množství drogy obsažené v léčivých přípravcích nemělo vést k otravě.

Projevy chronické otravy při dlouhodobém užívání jsou stejné jako u akutních otrav.

2 *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC. - Rubiaceae

2.1 Synonyma: *Nauclea aculeata* auct., *Nauclea cinchoneae*, *Nauclea polycephala*, *Nauclea tomentosa*, *Ourouparia polycephala*, *Uncaria surinamensis*, *Uruparia tomentosa*

2.2 Droga - *Uncariae tomentosae cortex*

2.3 Botanický popis

Mladé větve mají v průměru asi 0,5 cm, jsou jemně žíhané. Postavení listů je vstřícné, dospělé jsou 5-10 cm dlouhé a 3-6 cm široké, celokrajné, tvar obvejčitý a asymetricky zašpičatělý, přisedlé na krátkém řapíku (asi 0,5 cm). Svrchní strana je hustě ochlupená jen podél hlavních cév, zatímco spodní je ochlupená celá. Podél zřetelně vystupující žilnatiny na spodní straně listu je ještě další typ chloupků. V paždí listů nalezneme přímé až srpovitě zahnuté trny. Svrchní strany plodolistů jsou nápadně silně ochlupené. Díky krátkým chloupkům které se drží navzájem spojeny, protože mají často zakřivené špičky, a díky dlouhým chloupkům na okraji listů, které je obklopují, zůstávají dva plodolisty na svých okrajích dlouhý čas pevně spojeny, později tvoří svrchní semeník. Postranní větvičky květenství se větví. Poupata jsou max. 2 mm velká. Koruna téměř přisedlých květů tvoří tvar rourky nebo trychtýře. Kalich je pěticípý, malý 0,6 až 0,8 mm dlouhý, téměř do poloviny srostlý, přetrvávající na špičce plodu. Úzká část koruny je zevně hustě ochlupená stejně jako cípy. Tyčinky s krátkými ochlupenými nitkami i čnělky s kulovitými bliznami vyčnívají daleko z koruny. Tobolkové plody jsou 1 cm velké, téměř přisedlé a stejnoměrně hustě ochlupené. Exokarp se otvírá lokulicidně. Obě části zůstávají pevně spojeny jen na špičce plodu. Silný, rohovitý endokarp se, když dozraje, úplně odloučí od vnější vrstvy, nejprve septicidně (podél hranice plodolistu jednou střední prasklinou) a dále lokulicidně ve formě čtyř rychle se rozevírajících klapek.

2.4 Rozšíření

Střední Amerika a sever Jižní Ameriky, od britského Hondurasu a Guatemaly jižně směrem k Peru, Venezuele, Trinidadu a Surinamu.

2.5 Obsahové látky

Alkaloidy – celkový obsah 0,150 až 0,461 %

Pentacyklické oxindolové: isomitrafyllin (0,013-0,054 %), isopteropodin (0,047-0,121 %), mitrafyllin (0,015-0,074 %), pteropodin (0,062-0,158 %), speciofyllin (0,0065-0,030 %) a unkarin F (0,0077-0,026 %)

Tetracyklické oxindolové: isorhynchofyllin (0,061 %) a rhynchofyllin (0,0105 %)

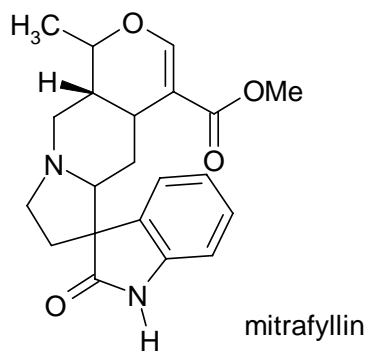
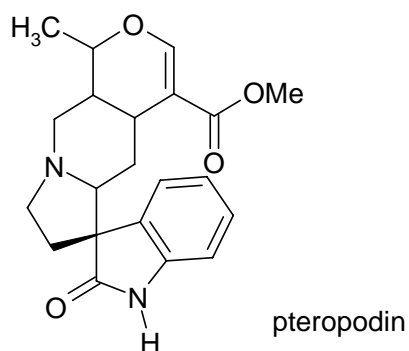
Glykosidický vázané: 5 α -karboxystriktozin (0,026 %)

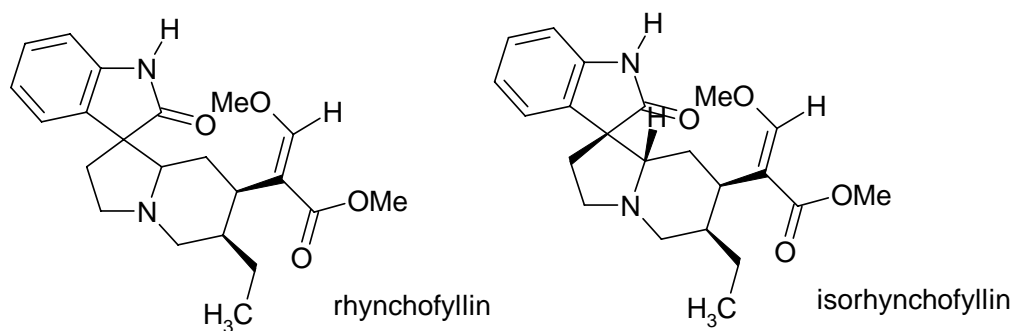
Deriváty kyseliny chinovinové: 3 β -O-(β -D-chinovopyranosyl)-(27 \rightarrow 1)- β -D-glukopyranosylester kys. chinovinové (0,0015 %), 3 β -O-(β -D-chinovopyranosyl)-(28 \rightarrow 1)- β -D-glukopyranosylester kys. chinovinové (0,0031 %), 3 β -O-[β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-fukopyranosid] kys. chinovinové (0,0082 %), 3 β -O-[β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-fukopyranosyl]-(27 \rightarrow 1)- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-fukopyranosyl-(27 \rightarrow 1)- β -D-glukopyranosylester kys. chinovinové (0,0035 %), 3 β -O-[β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-fukopyranosyl]-(28 \rightarrow 1)- β -D-glukopyranosylester kys. chinovinové (0,0088 %), 3 β -O-[β -D-glukopyranosyl-(28 \rightarrow 1)- β -D-glukopyranosylester kys. chinovinové (0,0025 %), (28 \rightarrow 1)- β -D-glukopyranosyl- β -D-glukopyranosylester kys. chinovinové (0,00031 %)

Deriváty kys. ursolové a oleanolové: oleanolová kys. (0,019 %), 23-nor-24-exomethylen-3 β ,6 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-olová kys. (0,016 %), 3 β ,6 β ,19 α -trihydroxy-23-oxours-12-en-28-olová kys. (0,028 %), 3 β ,6 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-olová kys. (0,032 %), dimethylester kys. β ,6 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-23,28-olové (0,0037 %), ursolová kys. (0,013 %)

Steroly: β -sitosterol (60 % všech sterolů), kampesterol a stigmasterol

Flavanové deriváty: (-)-epikatechin (0,16 %), procyanidin A₁, B₁, B₂ a B₄ (0,2 %)





2.6 Účinky

Cytostatické působení

Pteropodin nevykazuje v *in vitro* ani v *in vivo* systémech žádnou speciální aktivitu proti nádorovým buňkám. Různé extrakty byly testovány na sarkomových buňkách ascitu krysy v testu na zabudování ³H-thymidinu podle Weitzela. Nejsilnější inhibice byla popsána u extraktu z drogy chudého na třísloviny se žlutohnědou barvou lýka (81,2 % v porovnání s methotrexátem 473,3 %).

Kontraceptivní působení

Jeden blíže nedefinovaný extrakt vykazoval v dávce 6,25 mg/kg popřípadě 25 mg/kg kontraceptivní působení u myši.

Stimulace fagocytózy

Směs surových alkaloidů (0,9 % vztažených na sušinu drogy) vykazoval v dávce od 10⁻² do 10⁻⁴ g/l v testu na granulocytech vystupňování fagocytózy od 10,3 do 21 %, v chemoluminiscenčním testu od 31,5 do 75,2 % oproti kontrole. Ze zkoušených čistých alkaloidů byl nejúčinnější isopteropodin. Pteropodin, isomitrafyllin a isorhynchofyllin měly jen poloviční účinnost, zatímco mitrafyllin a rhynchofyllin nevykazovaly žádnou účinnost. Směsi alkaloidů bohaté na isopteropodin působily silnější vystupňování fagocytózy než směsi na isopteropodin chudé.

Protivirové působení

Glykosidy kyseliny chinovinové obsažené v droze byly testovány *in vitro* proti dvěma RNA virům (VSV – vesiculare stomatitis viry, Indiano serotyp a rhinovirus typu 1 – HV 1B). Při testu proti VSV byla inhibice tvorby zubního plaku vyšší o 50 % oproti kontrole. Testování

proti rhinoviru HRV 1B mělo také 50% účinnost. Inkubovaly se HeLa buňky společně s testovanou látkou a rhinovirem. V době kdy v kontrolní skupině bylo 100 % HeLa buněk zničeno virem, ve skupině s testovanou látkou byly cytopatické účinky pouze 50%. Cytotoxicita testované látky byla určena pomocí inkubace HeLa buněk neinfikovaných virem a spočítáním případně mikroskopickým sledováním morfologie buněk. Proti VSV vykazovaly všechny zkoušené sloučeniny inhibiční působení, nutná dávka byla ovšem vysoká. Souvislost mezi strukturou (počet a druh navázaných cukrů) a účinností nebyla zjištěna. Proti rhinoviru typu 1B byly téměř všechny sloučeniny neúčinné, pouze (28→1)-β-D-glukopyranosyl-β-D-glukopyranosylester kys. chinovinové s dvěma glukózovými jednotkami redukovala při dávce 30 μg/ml virové cytopatické účinky o 50 %.

Antiedematózní působení

Antiedematózní aktivita byla testována u otoků krysích tlapek navozených karagenanem (aplikace extraktů, frakcí nebo čistých látek p. o. jako suspenze v 0,5% karboxymethylcelulóze po 12-ti hodinovém lačnění, 1 hod po aplikaci anestezie). Chloroform-methanolvý extrakt a vodný extrakt zbrzdil edém tlapek v rozsahu 69,2 resp. 41,2 % po dobu trvání 3 hodin oproti kontrolní skupině. Podle rozdělení frakcí na chromatogramu byla izolována jedna velmi aktivní frakce, působící inhibiči o 46,8 %. Z ní izolované deriváty kyseliny ursolové, které tvořily hlavní složku, ale vykazovaly jen velmi nízkou aktivitu. Dosud tedy nebyl zjištěn princip antiedematózní aktivity, možná spočívá v kombinaci více látek. Stejně extrakty při p. o. podávání testovaným osobám s gastritidou nebo duodenálním vředem vedly po třech týdnech ke zmizení subjektivních potíží.

Antimutagenní působení

Některé extrakty vykazovaly v Amesově testu na buňkách *Salmonella typhimurium* ochranné působení proti fotomutagenezi. Nejméně účinný byl chloroformový extrakt (27 %), nejvíce methanolvý (59 %). V porovnání k tomu působí β-karoten ve stejné dávce inhibiči o 68 %. Pro zkoušení antimutagenní aktivity *in vivo* byla testována moč kuřáků a nekuřáků po přidání vodného extraktu testované drogy a *Salmonella typhimurium*. U nekuřáků nevykazovala moč žádnou mutagenní aktivitu. U kuřáků byla zachycena významná mutagenní aktivita, která byla přidavkem extraktu výrazně snížena.

Působení na CNS

U směsi surových alkaloidů bylo popsáno působení na krysí CNS projevující se ptózou, ataxií a ztrátou reflexů. Dále se významně snížila tělesná teplota krysy.

2.7 Oblasti použití v lidovém léčitelství

Vodné nebo alkoholové nálevy byly v Peru používány v léčbě artritidy, gastritidy a dalších gastrointestinálních obtíží. Užívala se také proti rakovině a jiným kožním onemocněním. V některých evropských zemích např. Německo, Rakousko byla droga používána ve formě vodných odvarů nebo galenických přípravků, jako jsou tobolky, kapky, masti jako imunostimulans. K indikacím patřila náchylnost k infekcím, alergické, virové a revmatické onemocnění, nemoci autoimunitního původu. Dále našla využití v adjuvantní léčbě maligních nádorových onemocnění. Účinnost drogy v těchto indikacích nebyla doložena.

2.8 Toxikologické údaje

LD hodnoty: LD₅₀ (myš p. o.) > 16 g/kg, LD₅₀ (myš i. v.) > 300 mg/kg; 1000 mg/kg i. p. vede po 17 až 24 hod ke smrti a 3000 mg/kg po 4 až 16 hod

LC hodnoty: Při *in vitro* testech cytotoxicity u glykosidů chinovinové kyseliny proti CER a HeLa buňkám byla získána hodnota LC₅₀ zkoušených sloučenin mezi 80 a 150 µg/ml pro CER buňky a maximální netoxická dávka pro HeLa buňky byla okolo 60 µg/ml.

3 *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Stangl.- Bignoniaceae

3.1 Synonyma: *Gelsemium avellaneda*, *Tabebuia avellaneda*, *Tabebuia nicaraguensis*, *Tecoma adenophylla*, *Tabebuia integra*, Ipé roxo, Lapacho

3.2 Droga – *Tabebuia impetiginosae cortex*

Makroskopie

Vzhled: tmavě hnědé kousky kůry, vláknitá struktura, těžká

Chuť: stahující

Vůně: po vanilce

3.3 Botanický popis

Je to až 20 m vysoký strom, jehož kmen dosahuje průměru 70 cm. Kůra je relativně hladká, zvenku šedá, uvnitř červenohnědá. Dřevo je velmi tvrdé, zelenohnědé. Cévy obsahují žluté

krystaly (lapachol). Listy jsou vstřícné, pěti až sedmičetné, oválné až eliptické, celokrajné nebo jemně pilovité. Koncové lístky jsou 5 až 19 cm dlouhé, 1,5 až 8 cm široké, uprostřed stojící lístky 4 až 16 cm dlouhé, 2,8 až 9 cm široké a bazální lístky 2,2 až 11 cm dlouhé a 1,5 až 8,3 cm široké. Květy jsou pětičetné, v jednoduchých okolíčnatých květenstvích. Koruna je růžovočervená až temně červená, trychtýřovitá s pěti pysky, vnitřek koruny je žlutý. Květy jsou 4 až 7,5 cm dlouhé, koruna má průměr od 1,2 do 5 cm. Doba květu leží na počátku suchého období (prosinec až únor).

3.4 Rozšíření

Tropické deštné lesy mezi severním Mexikem a Argentinou, Brazílie

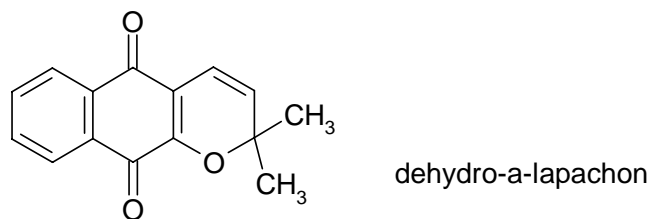
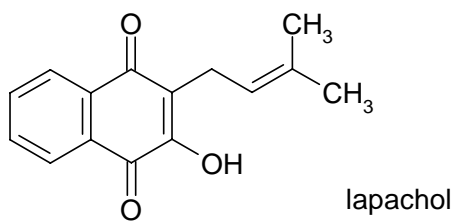
3.5 Obsahové látky

Z listů byly izolovány iridoidy 6-O-(p-hydroxy)-benzoylepimonomelittosid, 6-O-(p-methoxy)-benzoylepimonomelittosid a 6-epimonomelittosid.

Z květů byly získány antokyany cyanidin-3-glukosid, cyanidin-3-rutinosid, delphinidin-3-glukosid, delphinidin-3,5-diglukosid a paeonidin-3-rutinosid a identifikovány na základě porovnání s odpovídajícími čistými látkami.

Ze dřeva pak byly izolovány anthrachinony 2-acetoxymethylanthrachinon, 2-karboxylanthrachinon, 2-formylanthrachinon, 1-hydroxyanthrachinon, 2-hydroxymethylanthrachinon, 2-hydroxy-3-methylanthrachinon, 1-methoxyanthrachinon, 2-methylanthrachinon; deriváty kyseliny benzoové 2-hydroxybenzoová kyselina a 4-hydroxybenzoová kyselina; flavonoidy kvercetin a kvercetin-3-diglukosid; naftochinony dehydro- α -lapachon (xyloidon), deoxylapachol, lapachenol, lapacholmethylether, lapachol, α -lapachon, β -lapachon, stopy lapachononu a 2-methyl-3-(dimethylallyl)-1,4-naftochinonu.

Vedle blíže nespecifikovaných kumarinů a saponinů byly z kůry nedávno izolovány četné sloučeniny a pomocí spektroskopických metod byla určena jejich struktura. Byly definovány tyto nejdůležitější sloučeniny: 2-acetylnafto[2,3-b]furan-4,9-dion, benzo[b]furan-6-aldehyd, 6,8-dihydroxy-3-methyl-3,4-dihydroisokumarin, dehydro-iso- α -lapachon, 3,4-dimethoxybenzaldehyd, 3,4-dimethoxybenzoová kyselina, dehydro- α -lapachon, lapachol, eudesminová kyselina, 4-hydroxybenzoová kyselina, vanilinová kyselina, vanilin, anisaldehyd, anisová kyselina a 4',7-dihydroxyflavon-7-O-rutinosid.



3.6 Účinky

Protinádorové působení

Perorálně aplikovaný lapachol vykazuje 82% zpomalení progresu u Yoshidovo sarkomu a 50% inhibici ve Walkerově testu. α -Lapachon a xyloidon se ukázaly být ve stejných testech neúčinné. β -Lapachon byl o něco méně účinný než lapachol. Lipofilní hexanový extrakt v dávce 150 mg/kg byl při perorální aplikaci zřetelně účinnější než vodný extrakt o dávce 500 mg/kg.

Inhibice reverzní transkriptázy

β -lapachon inhibuje reverzní transkriptázu u Arian-myeloblastózoového viru a Rauscher viru leukémie při 60 minutové inkubaci o 50 %.

Analgetické působení

V hot-plate testu (50-55 °C) prokázal lapachol u myši zřetelně analgetické působení (7,4 s) v porovnání s kontrolou (3,88 s).

Antimikrobní působení

Aktivita byla prokazována na testovacím systému s bakterií *Staphylococcus aureus* v porovnání s účinky cefazolinu. Účinný byl jak vodný extrakt tak čistý lapachol.

Cytotoxické účinky

Na KB buňkách vykazovaly 2-acetylfuranonaftochinon, 5- popř. 8-hydroxy-2-(1'-hydroxyethyl)furanonaftochinon a 2-(1'-hydroxyethyl)furanonaftochinon inhibici nádoru. Téměř stoprocentně účinný byl methanolový i vodný extrakt kůry při zkoušce na nádorových buňkách myši pokožky. Lapachol v koncentraci 0,1 μ g/ml ukázal zpomalení o 90,4 %.

Protizánětlivé působení

U otoků myších tlapek vyvolaných injekcí karagenanu způsobila perorální dávka 100 mg/kg lapacholu 76% zmenšení otoku. Podobné působení bylo prokázáno také na hnisavý absces. Účinky byly porovnávány s fenylbutazonem.

3.7 Nežádoucí účinky a kontraindikace

Byly popsány alergické reakce jako je podráždění horních dýchacích cest, dermatitidy. Bývají připisovány především naftochinonům. Žádné zvláštní kontraindikace dosud nebyly zjištěny. Při koupelích je nežádoucí větší poranění pokožky, těžší horečnatá a infekční onemocnění, srdeční nedostatečnost a těžší hypertenze.

3.8 Oblasti použití v lidovém léčitelství

Vnitřně i zevně při nádorech, leukémii, bronchitidě, horečnatých onemocněních, astmatu, gastritidách a obecně při bolestech. Dále při revmatismu, ekzémech, mykózách, bércových vředech. Tradiční použití je doloženo především u indiánských kmenů v Bolívii, Peru a Paraguayi.

3.9 Toxikologické údaje

LD₅₀ lapacholu i.p. u bílých myší je 1,6 g/kg, u xyloidonu 600 mg/kg a u β-lapachonu 80 mg/kg

Psům byl lapachol v dávce 2 g/kg podáván 24 dní, aniž by některý zemřel. Opice uhynuly po 6 denních dávkách 0,5 g/kg.

4 *Papaver somniferum* L. - Papaveraceae

4.1 Droga - *Papaveris fructus*

4.1.1 Synonyma: *Capita Papaveris immaturi*, *Capsulae Papaveris*, *Codia*

4.1.2 Makroskopie

Droga se skládá se zelenavých až šedožlutých polovin plodů popřípadě slámově žlutých tobolek zralých plodů. Tyto mají vejcovitý až kulovitý tvar o průměru 3 až 3,5 cm a jsou 1,5 až 2 g těžké. Na jedné polovině je bezprostředně pod plodem zachovaný knoflíkovitý zbytek stopky. Nahoře nesou poloviny tobolek silně svráštělé mnohopaprsčité půlkruhovitě zbytky

blizen. Na vnitřní straně plodů zbyly četné vystupující semeníky. Na řezné ploše jsou hnědavé zbytky zaschlé šťávy. Naproti tomu řezné plochy zralých plodů nevykazují žádné zbytky nebo kapky uschlé šťávy. Tento rozlišovací znak mezi zralými a nezralými plody je použitelný pouze u nerozdrobněných makovic. Jinak jsou všechny morfologické i anatomické znaky obou typů plodů totožné, takže rozlišení téměř není možné. Nezralé makovice chutnají hořce, zralé jsou naproti tomu pouze lehce nahořklé a bez zápachu.

4.1.3 Obsahové látky

Alkaloidy

Droga obsahuje stejné účinné látky jako opium pouze více zředěné. Celkový obsah alkaloidů i poměr jednotlivých složek závisí na době dozrávání tobolek a také na klimatických, genetických a jiných faktorech. Obsah morfinu kolísá mezi 0,12 a 0,89 %. Je zde jistá korelace mezi tvarem tobolky a barvou semen na jedné straně a obsahem morfinu na straně druhé. Kulovité tobolky mají nejvyšší obsah, hruškovité střední a podélné nejnižší obsah morfinu. Bílé nebo světlé druhy semen mají nepatrný obsah morfinu oproti modrým a tmavým druhům. Maximální množství morfinu obsahují tobolky 10 až 12 dnů před dozráním semen, to se může ale díky atmosférickým vlivům zase snížit. Během dne se množství morfinu také mění, ráno je jeho obsah nejvyšší, kolem poledne nejnižší. Stejně tak kolísá i obsah vedlejších alkaloidů.

Sacharidy: arabinóza, erytritol, D-glycero-D-mannooktulóza, D-mannoheptulóza, myo-inositol, sedoheptulóza, xylóza

Další látky: minerální látky, celulóza, lignin, pektin, pentosan, p-kumarová kyselina, kávová kyseliny, fenoloxidáza, citronová kys., mekonová kys., vinná kys., saponiny

4.2 Opium

4.2.1 Synonyma: laudanum, mekonium, opium crudum, opium nativum, thebaicum

4.2.2 Droga:

Opium je na vzduchu usušená šťáva získaná z nařezaných nezralých plodů maku.

4.2.3 Původ

Pěstování vlčího máku k získávání opia je povoleno pouze v šesti zemích: Bulharsko, země bývalé Jugoslaviie, Řecko, Turecko, Indie a některé státy bývalého sovětského svazu. Hlavní

výrobce opia je Indie (70 % světové legální produkce), za ní Turecko (15 %). Podle původu se rozlišuje několik obchodních druhů opia. Mimo to se pěstuje opium ilegálně k výrobě omamných látek především v zemích tzv. zlatého trojúhelníku – Thajsko, Burma, Laos. Původ opia může být zjištěn na základě analýzy obsahových látek. Legální produkce obnáší ročně kolem 2000 tun opia.

4.2.4 Obsahové látky

Alkaloidy: Mohou tvořit 20 až 25 % hmotnosti opia. Z větší části zde nejsou volné, nýbrž vázané na různé kyseliny: mekonovou, fumarovou, mléčnou, sírovou. Jen asi 20 alkaloidů se vyskytuje přirozeně, další vznikají procesy oxidace, hydrolýzy a racemizace během schnutí latexu. Hlavním alkaloidem je morfin, ten je zastoupen v největším množství. Procentuální podíl alkaloidů kolísá podle původu opia. Zde je udávané průměrné zastoupení jednotlivých vedlejších alkaloidů: kodein – 1 %, thebain – 0,5 %, noskapin (dříve narkotin) – 5 %, papaverin – 1 %, narcein – 0,5 %, laudanin, laudanidin, laudanosin, pseudomorfin, kodamin, protoxin, kryptopin, gnoskopin, neopin, oxynarkotin, papaveraldin, papaveramin, lanthopin, mekonidin, narkotolin, glaudin, skoulerin.

Podle struktury můžeme alkaloidy rozdělit do několika skupin:

Morfinanový typ – morfin, pseudomorfin, kodein, neopin, 10-hydroxykodein, thebain

Benzylisochinolinový typ – papaverin, papaveraldin, palaudin, laudanin, laudanidin, laudanosin, kodamin

Ftalidisochinolinový typ – noskapin, narkotolin, gnoskopin, oxynarkotin, narcein

Tetrahydroisochinolinový typ – hydrokotanin

Protopinový typ – protopin, kryptopin

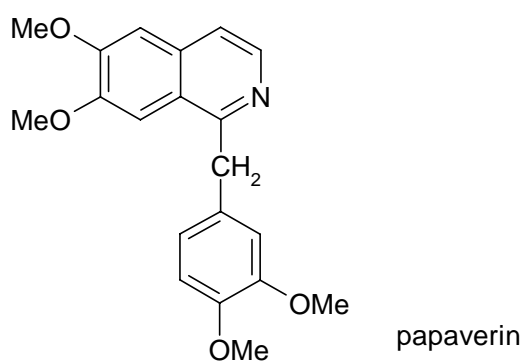
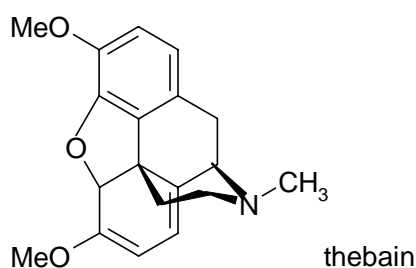
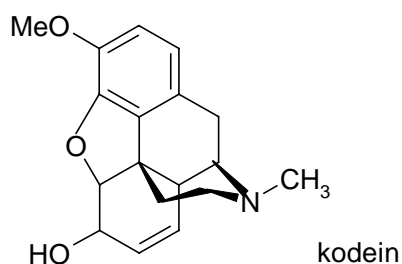
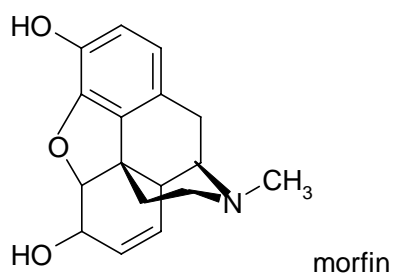
Protoberberinový typ – skoulerin, isokorypalmin

Aporfinový typ – korytuberin, magnoflorin, isoboldin, papaverrubin, porfyroxin, papaverrubin B, papaverrubin C, papaverrubin E, glaudin, N-methyl-14-O-demethylepiporfyroxin

Alkaloidy neznámé struktury – lanthopin, papaveramin

Další obsahové látky: mekonin, mekonosin, kyselina jablečná, kyselina jantarová, kys. octová, kys. mléčná, kaučuk (5-10 %), tuk (1-4 %), stopy cukru, vosku, slizových látek, bílkovin, polypeptidů a volných aminokyselin. Byly dokázány následující aminokyseliny: alanin, γ -aminomáselná kyselina, asparagin, asparagová kyselina a její amid, glutamová kyselina, glycin, isoleucin, fenylalanin, serin, threonin, tyrosin, valin. V čerstvém latexu byl nalezen také glutamin, prolin a sarkosin. Nealkaloidní zbytky opia obsahují nezmýdelnitelnou

frakci složenou z n-nonakosanolu, cyklolaudenolu. Rovněž byly izolovány β -sitosterol, cykloartenol, stigmasterol, cykloartenon, cyklolaudenon. Obsah vody v opiu kolísá podle stupně vysušení mezi 5 až 20 %.



4.2.5 Oblasti použití

Ke zklidnění střev při těžkých průjmech, pokud ostatní léčebné možnosti selžou nebo nejsou k dispozici, dále na tišení silných bolestí.

4.2.6 Nežádoucí účinky

U osob často pracujících s opiem (např. pracovníci farmaceutických závodů, zdravotní sestry) bylo popsáno několik případů alergické kontaktní dermatitidy. Během měsíční pauzy bez kontaktu s opiem se příznaky výrazně zlepšily, ovšem ihned po dalším kontaktu se zase zhoršily na původní úroveň. Alergické nebo anafylaktické reakce po morfinu byly pozorovány velmi zřídka.

4.2.7 Závislost

Potenciál závislosti je u opia velmi vysoký. Zneužívání morfinu a opia jako omamné látky je celosvětového významu. Fyzická závislost se projevuje po vysazení opiátů jako abstinční syndrom. Nejdůležitější projevy syndromu jsou zimnice, hyperventilace, zvýšená sekrece, zrychlená srdeční frekvence, vzestup systolického krevního tlaku, svalové křeče, úzkostné

stavy. Příznaky jsou přímo úměrné získané toleranci. Psychická závislost je rovněž velmi silná a přetrvává dlouho po vysazení. Riziko recidivy po absolvování léčby je vysoké.

4.2.8 Kontraindikace

Těhotenství, onemocnění spojená s dechovými obtížemi, pankreatitida, colitis ulcerosa, zvýšený nitrolební tlak, akutní jaterní porfyrie. Kvůli zvýšení svěračového tonu je relativní kontraindikací také žlučnicková kolika. Při Addisonově chorobě nebo hypotyreóze smějí být opioidy nasazovány jen opatrně a v redukováných dávkách.

4.2.9 Akutní toxicita

Při zachovaném smyslovém vnímání porušení duševní výkonnosti, euforie, sedace, analgésie, mióza, bradykardie, zpomalené dýchání, cyanóza, dechová obrna, tonicko-klonické křeče, spasmy svěračů, atonie střev, nevolnost, zvracení, útlum centra kašle, zadržování vody, edém plic, bolesti hlavy, ospalost, motorický a psychický neklid, hypotermie, v konečném stádiu mydriáza. Extrémní redukce dechu vede k cyanóze a ke smrti zástavou dechu. Pro dospělého člověka jsou smrtelné 2 až 3 g opia. Zvýšené riziko intoxikace je při narušené funkci ledvin (hromadění aktivního metabolitu morfin-6-glukuronidu v těle). Po perorálním předávkování je nejjednodušší smysluplnou metodou výplach žaludku. Vhodné je také přidání ricinového oleje, síranu sodného a aktivního uhlí. Při subkutánní aplikaci musí být co nejučinněji zabráněno šíření drogy pomocí adrenalinové injekce. Nezbytná je okamžitá hospitalizace.

4.2.10 Chronická toxicita

Chronická otrava je v první řadě následkem zneužívání morfinu tzv. morfinismu. Charakteristické příznaky jsou změny nálady, úzké zorničky, nažloutle šedá kůže, hubnutí, impotence, poruchy koordinace. Náhlé odebrání vede k těžkým projevům abstinčního syndromu, který trvá 5 až 8 dní a může být život ohrožující. U novorozenců matek závislých na morfinu jsou typické těžké dyspnoe.

4.2.11 Mutagenita a teratogenita

Opium, stejně jako pyrolyzáty vznikající při kouření, obsahuje mutagenní látky. V několika testech byl prokázán jejich mutagenní potenciál závislý na koncentraci látek v droze. Morfin při testech na zvířatech *in vivo* i *in vitro* ukázal mutagenní i teratogenní účinky. Bylo dokázáno poškození centrální nervové soustavy u myši a křečků a u myši také porušení segmentace^[8].

5 *Peumus boldus* (Molina) - Monimiaceae

5.1 Synonyma: *Boldea fragrans*, *Peumus fragrans*

5.2 Droga: *Boldo folium*

5.3 Botanický popis

Je to pomalu rostoucí vždyzelený strom dosahující výšky 6 až 8 m. Listy jsou kožovité, vejčitého tvaru, šedozelené, na spodní straně hladké, svrchní strana je pokryta mnoha světlými hrbolky. Vůně listů připomíná mátu nebo kafr. Kůra stromu je měkká, hnědá. Patří mezi dvoudomé rostliny, zvlášť samčí a zvlášť samičí rostliny. V létě tvoří bledě zelené květy, z nichž na samičích rostlinách vznikají světle žluté jedlé plody.

5.4 Rozšíření

Původně se nalézá v oblastech Peru a Chile, ale pěstuje se také ve Středozeří, severní Africe, Brazílii a západním pobřeží Severní Ameriky.

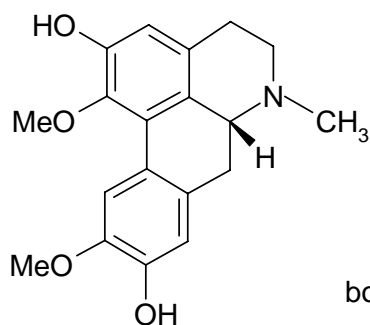
5.5 Obsahové látky

Isochinolinové alkaloidy aporfínového typu (až 0,7%) – boldin, laurilitin, laurotetanin, norboldin, isoboldin, retikulin

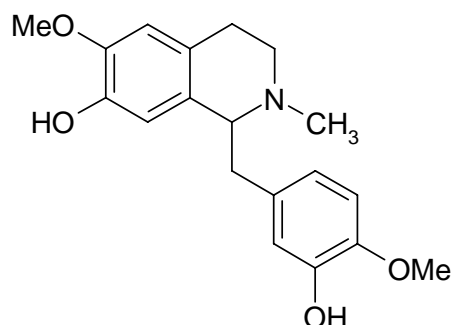
Flavonoidy – peumosid, glykosidy rhamnetinu, isorhamnetinu a kempferolu

Silice (éterické oleje) – p-cymen, askaridol, cineol, cymol, kampferol, thymol

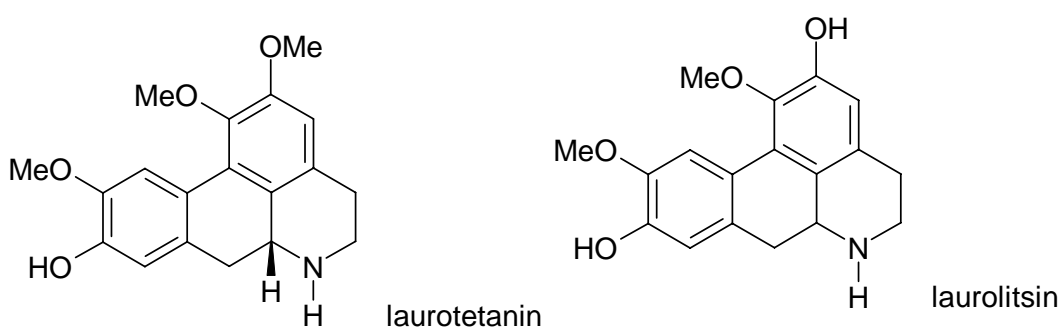
A další: třísloviny, glykosid boldoglucin^[9]



boldin



retikulin



5.6 Účinky

Ve studiích na zvířatech byly prokázány tyto účinky extraktu z listů boldovníku: diuretický, stimulace trávení a zvýšení produkce žluči. Přestože byly tyto účinky připisovány především chemické látce boldinu, jeden pokus na krysách prokázal vyšší účinek u ethanolového extraktu než u čistého boldinu. Ethanolový extrakt podaný myším vykázal protektivní účinek na játra, předcházet poškození jater při chemické expozici. Při lidských studiích byl zjištěn také relaxační účinek na hladké svalstvo a prodloužení střevního průchodu. Na izolovaném krysím střevě dokázal antagonistovat spastický účinek acetylcholinu. Dále byl prokázán antioxidační a protizánětlivý účinek, který byl popsán u morčat po navození edému karagenanem. Antipyrogenní účinek byl dokázán v testech na králících. Podle americké monografie dokáže extrakt z listů zvýšit diurézu až o 50 %. Při studii na krysách v roce 2000 byl prokázán abortivní účinek a také snížení hladiny bilirubinu, glukózy, ALT, AST, močoviny a cholesterolu v krvi^[10].

5.7 Veterinární použití

Ve veterinární medicíně se používá k léčbě hepatických dysfunkcí, cholelithiázy, cirhózy, chronické hepatitidy. Prášek smíchaný s potravou nebo s vodou se podává perorálně v denní dávce 20-40 mg/kg, rozdělený minimálně do dvou podání denně až do remise příznaků (několik dní).

5.8 Použití v lidovém léčitelství

Tradičně je používán při problémech s vylučováním žluči do dvanáctníku a jako zklidňující, močopudný a antibakteriální prostředek působící v žlučových a močových cestách. Je uváděn jako léčivo při žlučových kamenech, bolestivém žlučníku nebo játrech, při zánětu močového měchýře, revmatismu a zvláště pak při bolestivých zánětlivých žlučových kamenech. Dále také při nadýmání, zácpě a špatném trávení. Součástí silice je také askaridol, který působí

proti parazitům. List se také tradičně užíval při kapavce a jaterních onemocněních. Denní perorální dávka pro člověka je 10-50 mg boldinu denně nebo 2-5 g drogy ve formě čajového nálevu^[11].

5.9 Nežádoucí účinky a kontraindikace

Vysoké dávky mohou způsobit podráždění a poškození ledvin, zvláště v případech, kdy ledvinová tkáň je již zatížena jiným onemocněním, nesmí se proto podávat chronicky. List se nedoporučuje používat v těhotenství a době kojení. Silice je pro svůj obsah askaridolu jedovatá, vede k poškození jater a nedoporučuje se používat. Při hemofilii, trombocytopenii nebo při léčbě léky ředícími krev (Warfarin) se smí užívat pouze pod stálým dohledem lékaře. Ve vysokých dávkách může vést ke křečím, svalové obrně až zástavě dechu^[12].

5.10 Toxikologické údaje

Akutní toxicita hlavní aktivní látky boldinu byla testována u krys a morčat. Po perorálním podání 0,5 g/kg resp. 1 g/kg alkaloidu byla pozorována smrt postupně u krys i morčat. Subkutánní injekce 0,25 g/kg a 0,5 g/kg vedla taktéž ke smrti. Po perorálním podání vodnoethanolického extraktu (1:1) Boldo folium myším byla stanovena LD₅₀ na 6 g/kg. Nejsou doloženy žádné údaje o mutagenních nebo karcinogenních účincích.

IV. Experimentální část

1. Všeobecné postupy

1.1 Úprava rostlinného materiálu

Rostlinné části byly sbírány za slunného a suchého počasí a po očištění byly sušeny za normální teploty ve stínu (ztráta sušením ~ 5-10 %). Usušené rostlinné části byly rozemlety na mlýnku na velikost částic 1-3 mm s menším prachovým podílem.

1.2 Úprava rozpouštědel destilací

Rozpouštědla vyžívaná pro přípravu alkaloidních koncentrátů byla před použitím destilována a uchovávána za nepřístupu světla v hnědých zásobních lahvích.

1.3 Perkolace

Rozdrobněný materiál se provlhčí stejným objemovým množstvím lihu jako je navážka drogy v gramech, v uzavřené nádobě se ponechá 1-2 hodiny. Potom se vsype do perkolátoru (trubice uzavřené kohoutem, v dolní části s vatou), ve kterém je 95% (w/w) etanol do výšky asi 10 cm. Navlhčená droga se do rozpouštědla vsypává a slabě utlačuje, současně se přidává 95% (w/w) etanol, až je droga všechna vsypána. Potom se překryje kotoučkem filtračního papíru, zalije rozpouštědlem, perkolátor se zakryje, aby se rozpouštědlo neodpařovalo a ponechá se 24 hodin v klidu. Potom se perkoluje rychlostí zhruba 1/50 objemu naplněné části perkolátoru 95% (w/w) lihem (jako zásobník se použije obrácená odměrná baňka), až se jímá 7násobek hmotnosti drogy v mililitrech. Poté se přestane na sloupec vlévat čisté rozpouštědlo a perkolátor se vypustí.

1.4 Odpařování

Etanolvý perkolát byl zahuštěn na vakuové odparce při sníženém tlaku a teplotě do 40°C. Stejným způsobem byly odpařovány také chloroformové výtřepky. V případě etheru bylo použito oddestilování na vodní lázni bez použití sníženého tlaku.

1.5 Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

Tenkovrstevná chromatografie byla prováděna na komerčně vyráběných deskách (Silikagel 60 F₂₅₄) v systému nasycených komor. Sycení komor probíhalo po nalití a mírném protřepání mobilní fáze 60 minut. Látky byly nanášeny na chromatogram jako ve směsi chloroform-ethanol 1:1 ve formě čárek (délka cca 1 cm) podle zvoleného objemu pomocí kalibrovaných

kapilár qualicolor. Po vyvinutí se chromatogram vyjmul z komory a vysušil se nejprve teplým a poté studeným vzduchem. Chromatogram se detekoval v první fázi pod UV lampou a v další fázi postřikem detekčním činidlem.

2. Potřeby

2.1 Rozpouštědla

Cyklohexan č. (C₆H₁₂)

Chloroform č. (CHCl₃)

Diethylether ČSL 4 (Et₂O)

Ethanol 96%, denaturovaný č. (EtOH)

Methanol č. (MeOH)

Toluen č. (C₆H₅CH₃)

Voda (H₂O)

2.2 Chemikálie

1- naftylacetát č.

Acetylcholinesteráza (AChE) z elektrického úhoře

Amoniak 25% p.a.

Bovinní sérový albumin (SIGMA)

Diethylamin č.

Dusičnan bismutitý p.a.

Dusík 5.0

Fast blue B č.

Hydroxid sodný č.

Chlorid rtuťnatý č.

Jodid draselný č.

Kyselina chlorovodíková konc. 36% č.

Kyselina sírová konc. 96-98% č.

Kyselina vinná č.

Síran sodný bezvodý č.

TRIS č.

Uhličitan sodný bezvodý č.

Standardy: Fysostigmin (Sigma)

Galanthamin (Sigma)

2.3 Detekční činidla

D 1: Dragendorff-Munierovo činidlo v kyselině vinné

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné se rozpustí v 80 ml vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného se rozpustí ve 40 ml vody.

Zásobní roztok se připraví smísením roztoků A a B v poměru 1:1; může být uložen několik měsíců v chladničce.

Činidlo pro analýzu se připraví tak, že se k roztoku 5 g kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidá 5 ml zásobního roztoku^[13].

D 2: Mayerovo činidlo

Činidlo bylo připraveno rozpuštěním 1,35 g chloridu rtuťnatého v 50 ml vody, přidáním 5 g jodidu draselného a zředěním vodou na 100 ml^[14].

D 3: UV

Detekce chromatogramu pod UV lampou při vlnové délce 254 nm.

2.4 Vytvájecí soustavy pro tenkovrstevnou chromatografii

S 1 (alkalická): $C_6H_5-CH_3 : CHCl_3 : Et-OH : Et-NH-Et$ 70 : 20 : 10 : 3
(toluen:chloroform:ethanol:diethylamin)

S 2 (neutrální): $CHCl_3 : Me-OH : H_2O$ 65 : 35 : 5
(chloroform:methanol:voda)

2.5 Chromatografické adsorbenty

Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

3. Příprava sekvenčních extraktů (výtřepků)

3.1 Materiál

Droga	Označení drogy	Výchozí hmotnost drogy	Původ drogy
Corydalis cavae rhizoma	C-C	100 g	hlízy, Megafyt, sběr v Chorvatsku, Jugodrho AD, 03/2005
Uncaria tomentosae cortex	U-T	100 g	23.10. 2006 koupeno v Oxalis, Carrefour Hradec Králové
Tabebuiae impetiginosae cortex	T-I	250 g	fa Valdemar Grešík, 2004, cca 19 kg
Papaveris fructus	P-S	100 g	makovina, ing. Krásný, sbíraná v září 2005
Boldo folium	P-B	100 g	komerční, fa Valdemar Grešík, 2004

Tab. 1: Původ a hmotnost výchozích drog

Výtřepok (mg/ % hm. drogy)	L	A	A1	B	J1	E
C-C	206,6/0,21	354,0/0,35	499,5/0,50	67,2/0,067	278,7/0,28	52,1/0,052
U-T	73,4/0,073	77,4/0,077	6,1/0,0061	3,2/0,0032	-----	-----
T-I	1232/0,49	11,2/0,005	18,7/0,007	51,6/0,021	-----	-----
P-S	36,3/0,036	6,7/0,0067	-----	5,3/0,0053	-----	-----
P-B	707,5/0,71	40,6/0,041	35,4/0,035	14,0/0,014	-----	-----

Tab. 2: Hmotnosti jednotlivých výtřepků po vysušení

3.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

Provede se perkolace podle všeobecného postupu 1.3. Následně se perkolát zahustí. Prvotní zahušťování se provádí v baňce 2 litry, poslední v baňce max. 500 ml. K odparku se přidá 50 ml 1,5% kyseliny sírové, důkladně se protřepe. Změří se pH tohoto roztoku (indikátorovým papírkem), musí se pohybovat mezi pH 1-2. Roztok se opatrně slije přes malý viskózní filtr, zbytek v baňce se znova důkladně promyje (protřepe) s 20 až 25 ml 1,5% kyseliny sírové, zfiltruje a nakonec se filtr promyje cca 10 ml 1,5% kyseliny sírové a filtrát se doplní vodou na 100 ml (pH 1-2).

0,25 ml tohoto roztoku se v malé zkumavce upraví na pH 2-3 (5% amoniakem nebo 1% uhličitánem sodným) a přikápně se několik kapek Mayerova činidla. Musí vzniknout intenzivní žlutavý zákal až sraženina signalizující přítomnost alkaloidů. Pokud sraženina nebo zákal nevznikne, pak droga alkaloidy neobsahovala a extrakt se dále nezpracovává.

Příprava výtřepku L

V tomto výtřepku jsou soustředěny málo bazické alkaloidy.

100 ml primárního kyselého extraktu se vytřepe 4x25 ml éteru, éterové vrstvy se spojí, výtřepou 2x5 ml chladné vody (10°C), vrstva se ostře oddělí a éter oddestiluje do zbytku několika mililitrů. Koncentrát se převede Pasteurovou pipetou do zvážené injekční ampulky a rozpouštědlo se odfouká proudem vzduchu na vodní lázni.

0,25 ml čistící vody se v malé zkumavce upraví na pH 2-3 (7% HCl) a přikápně se několik kapek Mayerova činidla. Pokud nevznikne sraženina nebo výraznější zákal, voda se vylíje, pokud vznikne, přidá se vytřepávací voda k původnímu extraktu.

Příprava výtřepku A

V tomto výtřepku jsou soustředěny středně bazické alkaloidy (vylučují se při pH ~ 8)

Předčištěný kyselý roztok z předchozího vytřepání se zalkalizuje v třepačce 10% roztokem uhličitánu sodného na pH cca 8. Zpravidla se vyloučí sraženina alkaloidů (alkaloidy však mohou být kapalné, a proto se nemusí postřehnout). Suspenze se vytřepe 4x25 ml éteru. Éterové vrstvy se spojí, výtřepou 3x25 ml 1% kyseliny sírové, která rozpustí alkaloidy do formy solí. 75 ml tohoto kyselého roztoku se znova zalkalizuje 10% roztokem uhličitánu sodného a bělavá suspenze se vytřepe znova 3x25 ml éteru. Tím se směs alkaloidů výrazně přečistí. 75 ml éterového roztoku s předčištěnými alkaloidy se ostře oddělí, přenesou do Erlenmayerovy baňky, přidají se 3-5 g bezvodého síranu sodného, po hodinovém vysušení se

éter oddestiluje do několikamililitrového koncentrátu, který se Pasteurovou pipetou převede do zvážené injekční ampulky a zbytek rozpouštědla se odstraní vyfoukáním vzduchem na vodní lázni. (Při neutralizaci uhličitanem sodným se vyvíjí oxid uhličitý a roztok může z třepačky vykypět!)

Příprava výtřepku A1

V tomto výtřepku jsou přítomny středně bazické alkaloidy, které nejsou rozpustné v éteru, ale jen v chloroformu.

Uhličitanový roztok se po vytřepání éterem vytřepe 4x25 ml chloroformu. Vrstvy se spojí, vytřepou 3x25 ml 1% kyseliny sírové, která rozpustí alkaloidy to do formy solí. 75 ml tohoto kyselého roztoku se znova zalkalizuje 10% roztokem uhličitanu sodného a roztok (suspenze) se vytřepe znova 3x25 ml chloroformu. Tím se směs alkaloidů přečistí. 75 ml chloroformového roztoku s předčištěnými alkaloidy se ostře oddělí, přenesse do Erlenmayerovy baňky, přidají se 3-5 g bezvodého síranu sodného, po hodinovém vysušení se chloroform oddestiluje do několikamililitrového koncentrátu, který se Pasteurovou pipetou převede do zvážené injekční ampulky a zbytek rozpouštědla se odstraní vyfoukáním proudem vzduchu na vodní lázni.

Příprava výtřepku B

V tomto výtřepku jsou přítomny silně bazické alkaloidy.

Bazický sodový roztok z předchozího vytřepání se zalkalizuje 50% NaOH (po kapkách na pH 12-12,5) a tento roztok se vytřepe 4x 25 ml éteru. Éterová vrstva se vytřepe 2x5 ml chladné vody (10°C), vodová vrstva se vylíje, éterový roztok se vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří viz. výše.

0,5 ml tohoto alkalického roztoku se okyselí několika kapkami 7% HCl (pH 2-3) a přikápně se několik kapek Mayerova činidla. Pokud vznikne zákal nebo sraženina, zpracovává se extrakt dále, pokud nikoliv, další postup se již neprovádí.

Příprava výtřepku J

V tomto výtřepku jsou přítomny jodidy kvarterních bází

Bazický louhový roztok z předchozího vytřepání se odebere do zkumavky v malém množství (0,5 ml), okyselí se 2 M HCl a přikápně se Mayerovo činidlo. Pokud vznikne zákal, pak se celý louhový roztok zneutralizuje 17% HCl na pH 3-3,5, přidá se roztok 3 g jodidu

draselného ve 3 ml vody a po 3 hodinách stání v klidu se vytřepe 4x25 ml chloroformu. Chloroformová fáze se vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří viz. výše.

Příprava výtřepku E

V tomto výtřepku jsou přítomny zbytky alkaloidních bází.

Kyselý roztok z předchozího vytřepání se odebere do zkumavky v malém množství (0,5 ml), okyselí se 7% HCl a přikápně se Mayerovo činidlo. Pokud vznikne zákal, pak se celý roztok zneutralizuje 25% amoniakem na pH ~ 10 a vytřepe se 4x25 ml chloroformu. Může se stát, že se chloroformová vrstva bude špatně dělit, potom je vhodné provést vytřepání směsí chloroform-ethanol 9:1. Organická fáze se vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří viz. výše.

Po těchto všech vytřepáváních již není pravděpodobné, že by zbylý roztok obsahoval nějaké alkaloidy.

Závěrečná úprava výtřepků

Zahuštěné odparky jednotlivých výtřepků se kvantitativně převedou do injekčních ampulek, do kterých se zavede Pasteurova pipeta a na mírně teplé vodní lázni se odfouká zbytek rozpouštědla proudem vzduchu z akvarijního motorku. Ampulky se suší ve vakuovém exsikátoru 12 hodin nad silikagelem. Po usušení a zvážení se naplní argonem, zataví a do doby zpracování se uchovávají ve tmě při 4°C.

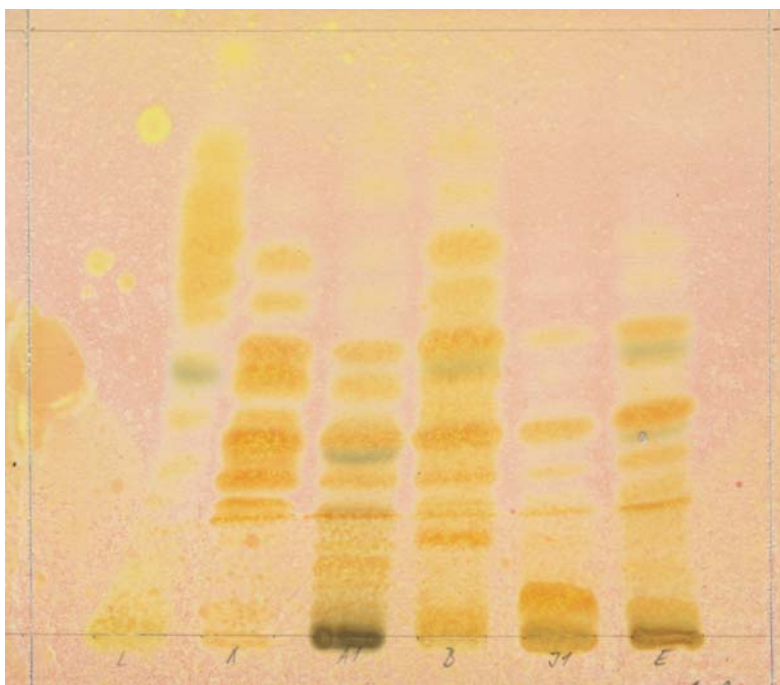
4. Bioautografická metoda

Následující postup je modifikací dříve uvedené studie^[15].

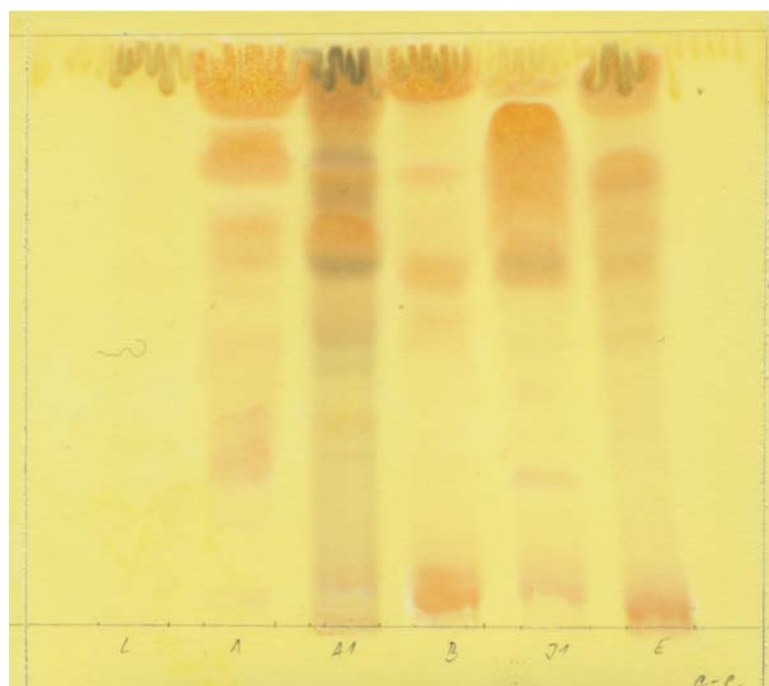
Na start TLC byly naneseny vzorky jednotlivých výtřepků daného objemu (U-T a P-B 5 μ l, ostatní 10 μ l) a k nim byly přidány oba standardy o koncentraci 0,1 μ g/10ml v objemu 10 μ l. Vzorky extraktů pro TLC o koncentraci 1mg/1ml byly připraveny rozpuštěním ve směsi ethanol-chloroform 1:1. Chromatogramy byly vyvinuty v nasycených komorách soustav S1 a S2. Ke stanovování AChE aktivity byla využita pouze neutrální soustava. Po vyvinutí byly chromatogramy vysušeny do kompletního odstranění rozpouštědla, poté rovnoměrně postříkány AChE a znovu hrubě vysušeny. Roztok AChE byl připraven rozpuštěním AChE (1000 jednotek) ve 150 ml Tris pufru při pH 7,8. Dále bylo přidáno 150 mg bovinního sérového albuminu pro stabilizaci enzymu během pokusu. Chromatogramy byly po postříkání AChE inkubovány 20 minut ve vodní páře o teplotě 34-37°C. Po inkubaci byly chromatogramy rovnoměrně postříkány detekčním činidlem vzniklým smísením roztoků 1-naftylacetátu a Fast blue B Salt v poměru 1:4. Roztok 1-naftylacetátu byl připraven rozpuštěním 250 mg látky ve 100 ml ethanolu, roztok Fast Blue B Salt rozpuštěním 400 mg čisté látky ve 160 ml vody. Během 1-2 minut vystoupily bílé skvrny značící pozitivní reakci (látky inhibující AChE) na modrém až modrofialovém pozadí (reakce s neinhibovanou AChE).

V. Výsledky

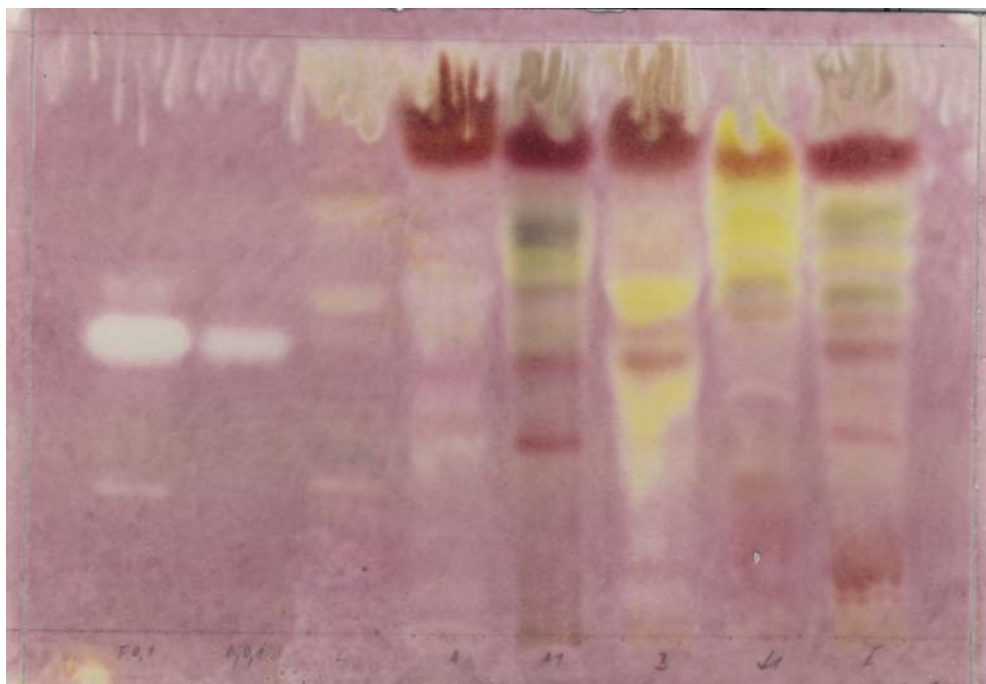
1. C-C – *Corydalis cavae* rhizoma



Obr. 1: TLC C-C v S1 , detekce D1



Obr. 2: TLC C-C v S2, detekce D1

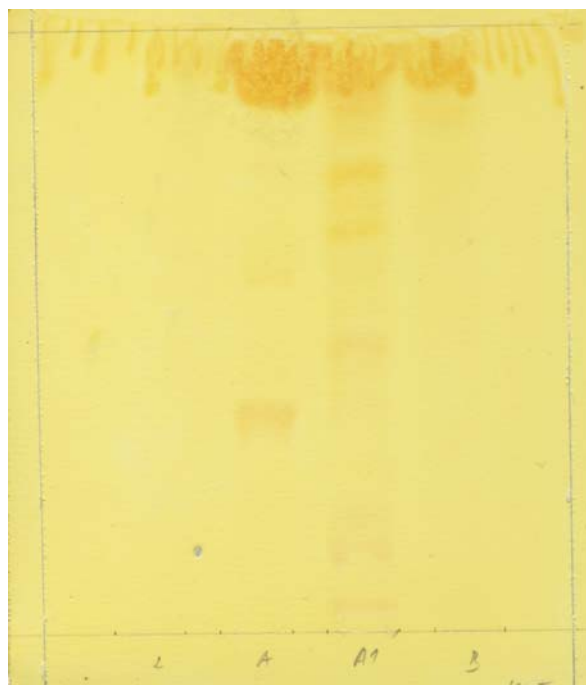


Obr. 3: TLC C-C v S2, test AChE

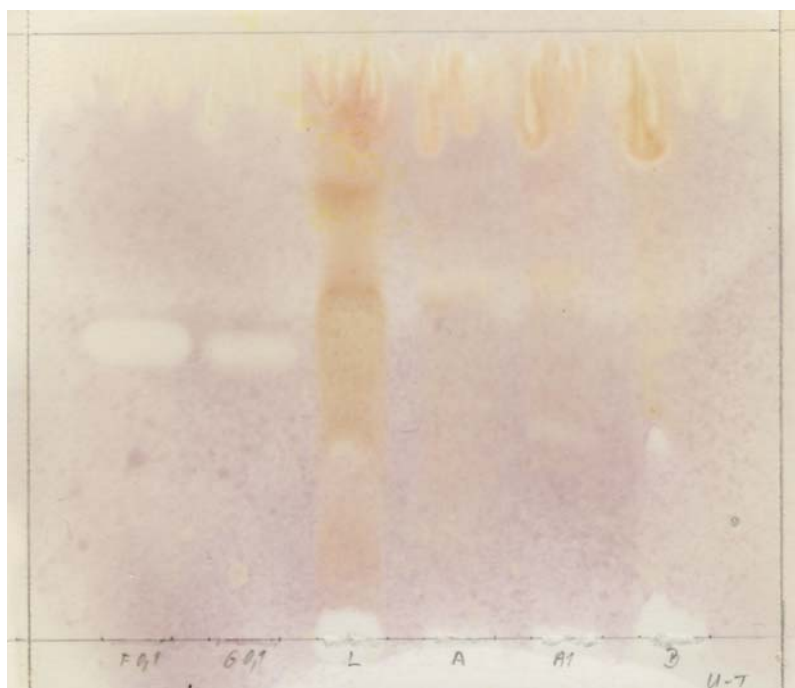
2. U-T – *Uncaria tomentosae* cortex



Obr. 4: TLC U-T v S1, detekce D1

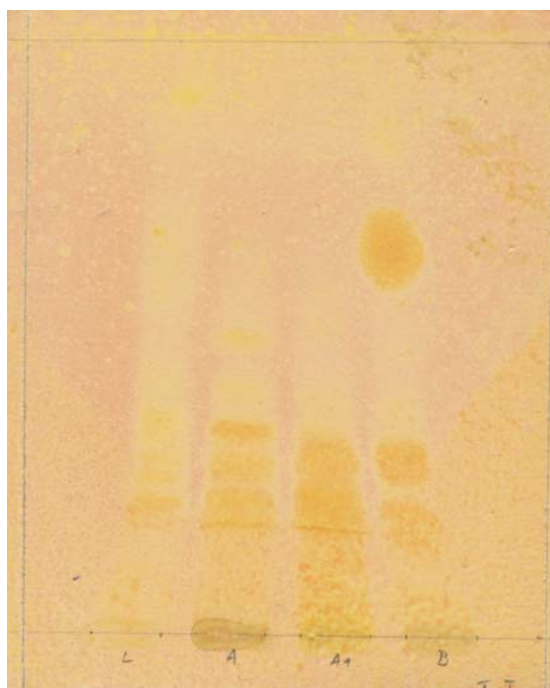


Obr. 5: TLC U-T v S2, detekce D1



Obr. 6: TLC U-T v S2, test AChE

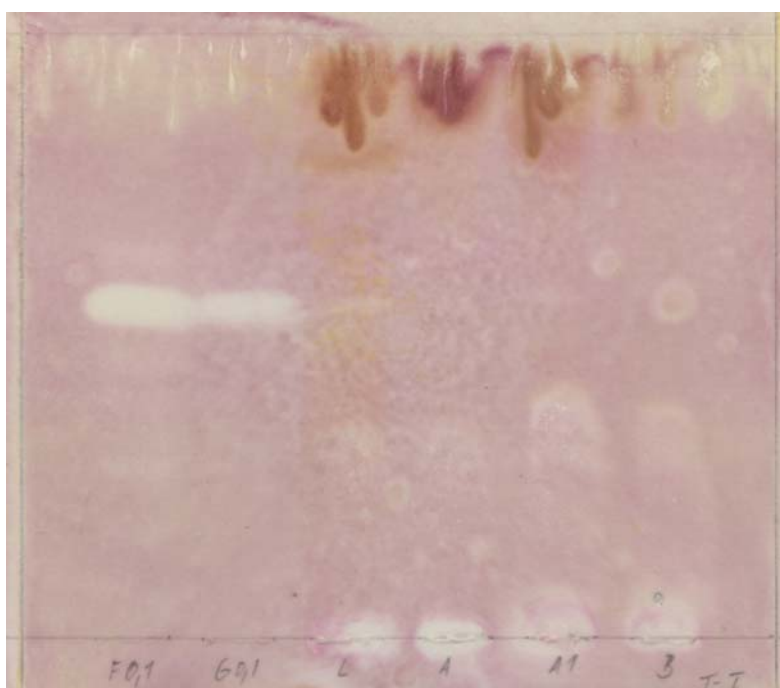
3. T-I - *Tabebuia impetiginosae* cortex



Obr. 7: TLC T-I v S1, detekce D1

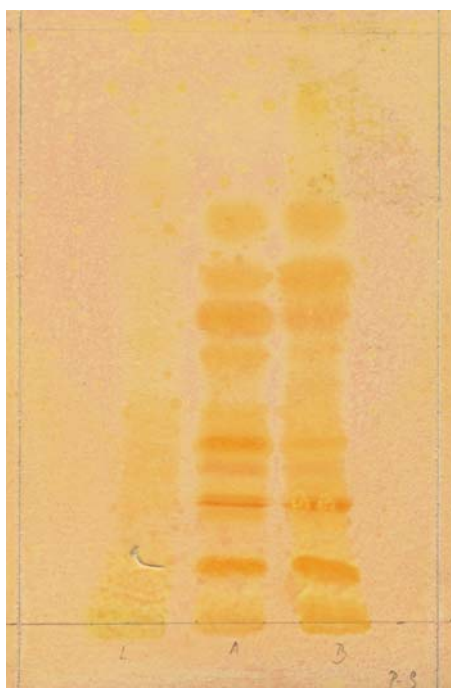


Obr. 8: TLC T-I v S2, detekce D1

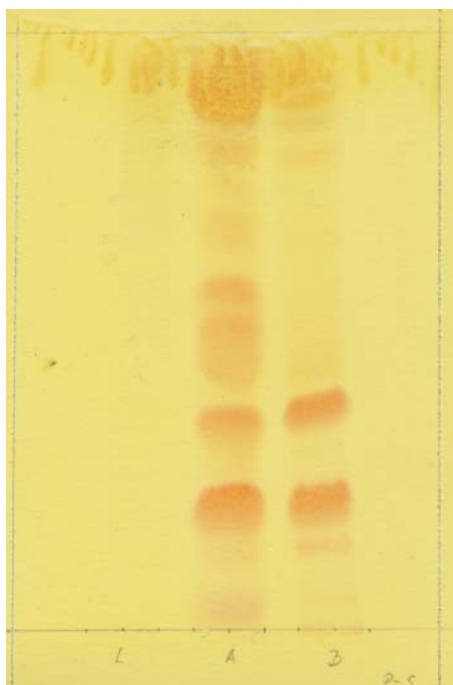


Obr. 9: TLC T-I v S2, test AChE

4. P-S – *Papaveris immaturi fructus*



Obr. 10: TLC P-S v S1, detekce D1

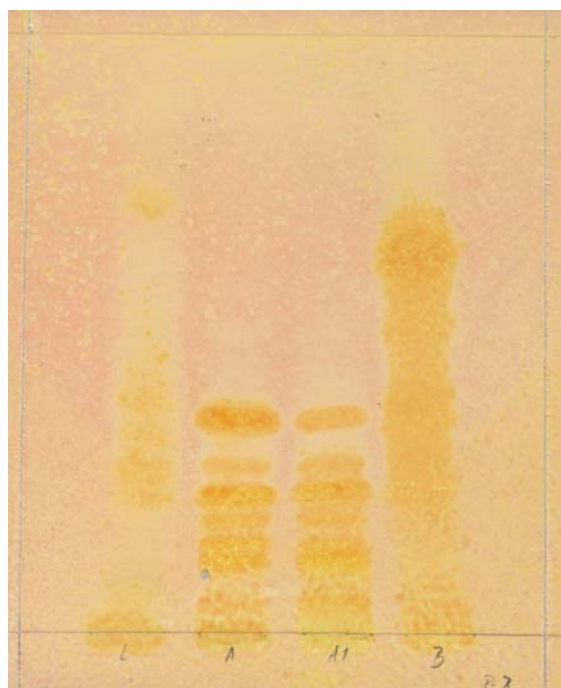


Obr. 11: TLC P-S v S2, detekce D1

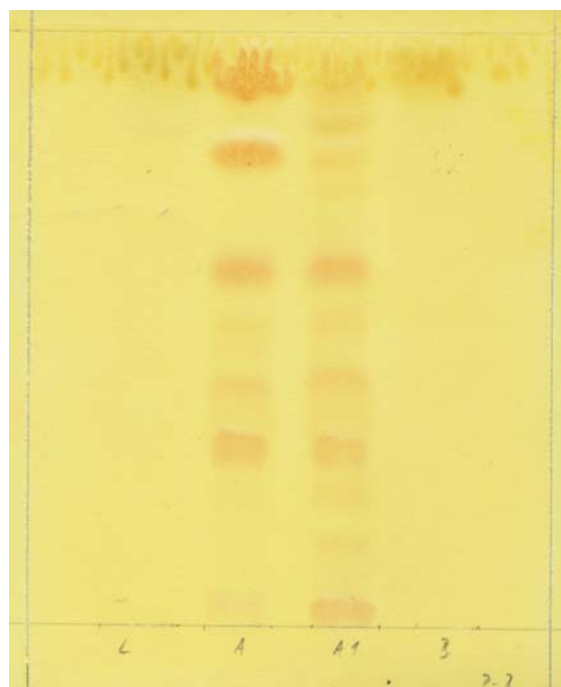


Obr. 12: TLC P-S v S2, test AChE

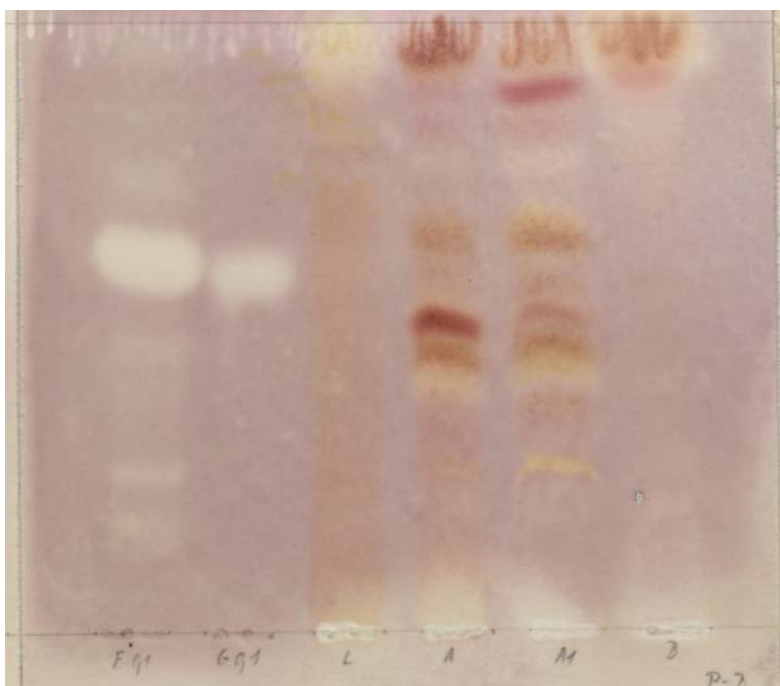
5. P-B – Boldo folium



Obr. 13: TLC P-B v S1, detekce D1



Obr. 14: TLC P-B v S2, detekce D1



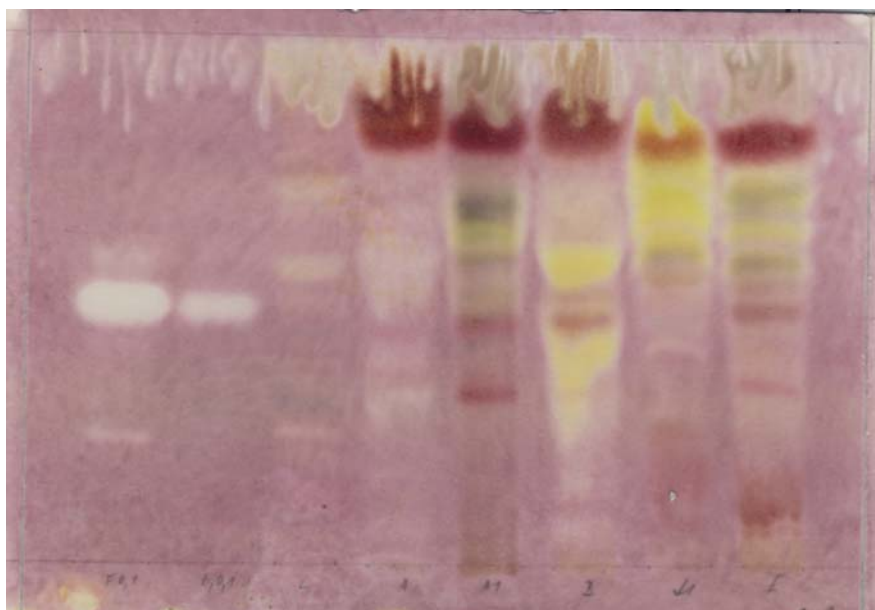
Obr. 15: TLC P-B v S2, test AChE

6. Zaznamenání počtu skvrn indikujících inhibici acetylcholinesterázy

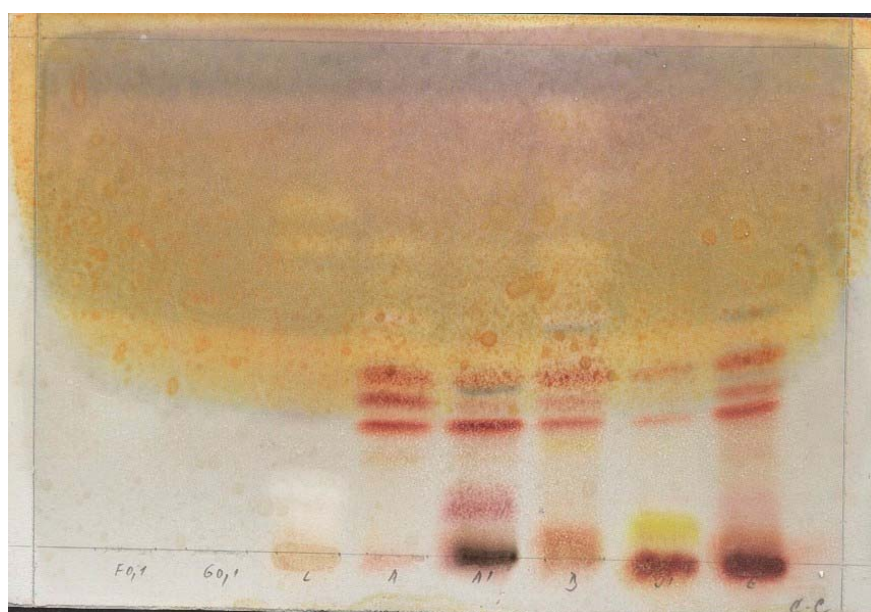
	L	A	A1	B	J1	E
C C-	0	3	3	4	4	3
T U-	1	1	1	2	---	---
T-I	1	1	2	2	---	---
P-S	2	2	---	1	---	---
P-B	1	1	1	1	---	---

Tab. 3: Počty pozitivních skvrn v jednotlivých výtřepcích

7. Vliv vyvíjecí soustavy na detekci inhibice AChE



Obr. 16: TLC C-C v S2, test AChE



Obr. 17: TLC C-C v S1, test AChE

Tyto dva chromatogramy dokládají důležitost správného výběru vyvíjecí soustavy při stanovování antiacetylcholinesterázové aktivity autobiografickou metodou. První chromatogram byl vyvinut v naší používané neutrální soustavě (Obr. 16), druhý v soustavě alkalické obsahující diethylamin (Obr. 17). Ten je zřejmě také důvodem nestability zbarvení chromatogramu, a proto je alkalická soustava pro tuto metodu nevhodná.

VI. Diskuse

Studium látek (potenciálních léčiv), které jsou schopné prakticky (terapeuticky) ovlivnit průběh Alzheimerovy choroby (na různých úrovních patofyziologie tohoto procesu) je velmi živé. Jsou hledána nejen zcela nová syntetická léčiva, ale také látky přírodního typu. Tato snaha je zcela pochopitelná, protože prakticky existuje jen velmi málo reálných léčiv (ať už používaných, nebo potenciálních): dopenezil, rivastigmin, galanthamin, huperzin A (takrin je v současnosti látkou už prakticky neuvažovanou).

Z hlediska přírodních látek je k dispozici relativně široká skupina sloučenin, které v testech *in vitro* vykazují inhibici AChE, jak bylo uvedeno v mé teoretické části. Pokud bychom však uvažovali o jejich praktickém využití, převážná většina z nich bude nepoužitelná (nízká biologická dostupnost, nebo nutná vysoká dávka, po které se objeví ovlivnění jiných metabolických systémů a tím nezanedbatelné vedlejší účinky, současně velká finanční náročnost při jejich získávání z přírodního materiálu atd.). Je nápadné, že nemalá část spektra potenciálních léčiv je představována terciárními alkaloidy. Z toho lze do jisté míry usuzovat, že alkaloidy, které jsou obecně látkami farmakologicky aktivními, budou projevovat svůj účinek i v této oblasti.

Tato práce je zahájením širšího fytochemického screeningu zahájeného na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, jehož cílem je sledování různých alkaloidů rostlin na aktivitu (inhibici) AChE za pomoci jednoduchého testu využívajícího tenkovrstvou chromatografii. Takový postup je ideální: snažila jsem se, aby umožnil relativně rychle a z malého množství rostlinného materiálu určit alkaloidní frakci, která je v tomto směru aktivní. Sledování alkaloidů bylo vybráno ze dvou důvodů. Je známo, že někteří zástupci z čeledí Papaveraceae a Fumariaceae (ale i alkaloidy zástupců z jiných čeledí) obsahují alkaloidy, které jsou aktivní z hlediska inhibice AChE (a proto jsem také tuto studii začínala s některými taxony z těchto čeledí). Alkaloidy (alespoň sekundární a terciární) jsou látkami, které je možné z celého komplexu primárních a sekundárních metabolitů relativně dobře vyčistit na rozdíl např. od terpenů, fenolových glykosidů a dalších, převážně neutrálních látek. Při řešení otázky, jaký postup použít pro frakcionaci těchto bazických látek jsem měla dvě možnosti:

1. připravit z malého množství rostlinné drogy (1-3 g) sumární extrakt, ten nanést na TLC, za použití vhodné soustavy extrakt rozdělit na deskách silikagelu a provést barevnou reakci,

2. připravit extrakt z většího množství drogy (50-200 g suchého materiálu) - nejlépe perkolát (perkolace je prakticky z technologického hlediska vůči metabolitům nejšetrnější) - extrakt zahustit, převést do vodného prostředí a sekvenčně (při různém pH) vytřepat; v jednotlivých výtřepcích jsou alkaloidy různého charakteru.

Pro tuto studii jsem zvolila druhý postup: má jistou nevýhodu v nutnosti zpracovat větší množství drogy, jednotlivé alkaloidní směsi lze však převáděním z bazí na soli (pH ~9 a pH ~2) velmi úspěšně čistit, odstranit tak látky nealkaloidní, které by mohly dávat případné falešné reakce na inhibici AChE. Tento náročnější postup jsem zvolila také proto, že jedním z cílů mé diplomové práce bylo navrhnout postup izolace účinných alkaloidů, což by při volbě předcházející metody nebylo možné.

Pro separaci alkaloidní směsi jsem zvolila rámcový postup, který použila skupina prof. B. Slavíka (Masarykova univerzita Brno) při systematickém studiu isochinolinových alkaloidů rostlin z čeledi Papaveraceae a Fumariaceae a který používala od začátku 60. let minulého století v rozsáhlé řadě studií publikovaných v časopise Collection of the Czechoslovak Chemical Communications. Postup, který se mi zdál optimální pro dělení alkaloidní směsi zahrnuje následující kroky:

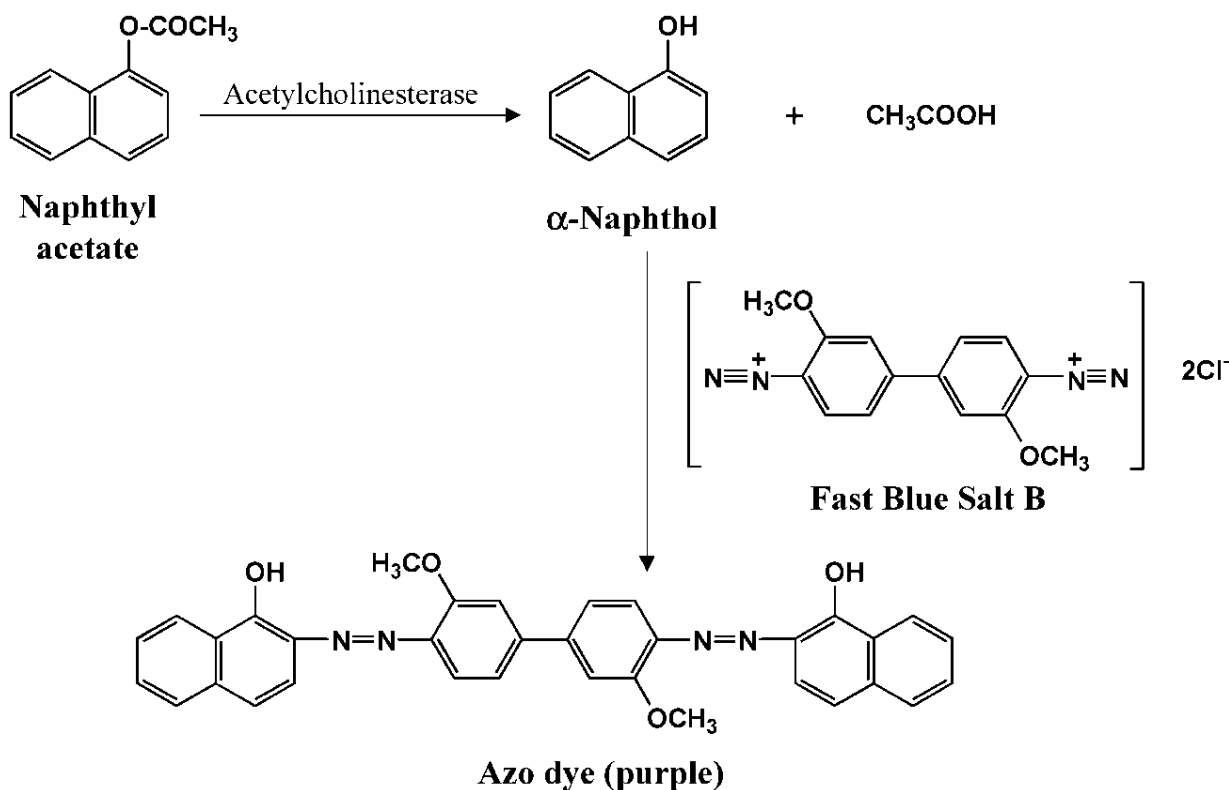
- a) přípravu extraktu vhodnou extrakční metodou za použití nízkomolekulárního alkoholu (zvolila jsem ethanol),
- b) zahuštění extraktu, rozpuštění (dispergování) odparou v 1% kyselině sírové a vodě (pH ~2), filtrace přes křemelinu,
- c) vytřepání kyselého roztoku diethyleterem (L), který extrahuje velmi málo bazické alkaloidy a různé zbylé znečištění; při tomto postupu se může stát, že do diethyletheru přejdou i alkaloidy, které jsou bazičtější, a proto je nutné organickou fází znova vytřepat 1% kyselinou sírovou, zjistit srážecí reakcí (Mayerovým činidlem), zda tento vodný kyselý roztok obsahuje alkaloidy. Pokud je obsahuje, přidává se tato vodná fáze zpět k původnímu vodnému extraktu,
- d) po předchozím přečištění diethyleterem se vodný extrakt zalkalizuje 10% roztokem uhličitanu sodného na pH ~9, vyloučí se terciární alkaloidní báze, které se vytřepou do diethyletheru (A); tento odparek obsahuje alkaloidy schopné tvořit jak nerozpustné pseudokyanidy, tak alkaloidy, které tyto pseudo-soli netvoří (v této první fázi screeningu jsem dělení na obě skupiny nepoužívala),
- e) vodná fáze z předešlého postupu se vytřepe chloroformem, do kterého přecházejí středně bazické látky, které nejsou rozpustné v diethyletheru (A1),

- f) vodný extrakt se opatrně zalkalizuje 50% roztokem hydroxidu sodného a vytřepe několikrát diethyletherem (B); takto lze do organického rozpouštědla získat alkaloidy velmi bazické (např. berberin, koptisin),
- g) zbylý vodný extrakt (je-li srážecí s Mayerovým činidlem pozitivní) se okyselí 17% kyselinou chlorovodíkovou na pH ~3, přidá se nasycený roztok jodidu draselného (celková koncentrace v extraktu 2-4 %) a po 1 hodině se vytřepe chloroformem (J), ve kterém jsou tyto „kyselé“ kvarterní jodidy rozpustné,
- h) pokud vodný extrakt obsahuje dále alkaloidy, pak se zalkalizuje 25% amoniakem na pH ~9-10 a vytřepe se buď chloroformem (E) (pokud se vrstvy špatně dělí, pak se použije směs chloroform-ethanol 95% 9:1). Po tomto postupu je primární extrakt zpravidla dokonale zbaven alkaloidů, a není potřeba používat další (v tomto případě reineckátovou srážecí) metodu.

Jednotlivé typy výtřepků je možné dále velmi účinně čistit převáděním z formy baze do formy soli podle příslušného pH (případně s přidavkem jodidu draselného), čímž se poměrně dokonale odstraní nežádoucí znečištění, které by ztěžovaly separační proces na TLC.

Při výběru metody pro TLC screening vlivu alkaloidů na AChE jsem uvažoval o jedné ze dvou metod:

- a) modifikované Ellmanově metodě^[16], která sleduje dva typy extraktů: ethyl-acetátový (TLC soustava toluen-ethyl-acetát-methanol 30:8:1) a vodný (soustava ethyl-acetát-methanol-voda 100:13,5:10); desky jsou po vysušení postříkány roztokem acetylthiocholinjodidu a 5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoové kyseliny] a po vysušení se postříká roztokem AChE z elektrického úhoře (TRIS, pH 8, inkubace 3-5 min. 37 °C). Vznikají bílé skvrny na žlutém podkladě, nebo
- b) bioautografické metody^[15], využívají také vzniku azobarviva: TLC desky se po nanesení všech výtřepků vyvinou v soustavě chloroform-methanol-voda 65:35:5 (nebo jiné vhodné soustavě), postříkají roztokem AChE, inkubují ve vlhkém prostředí (pH ~8, TRIS pufr, 37 °C, 20 min) a postříkají směsí roztoků 1-naftyl-acetátu a Fast Blue B Salt; po 2-5 min. dochází k barevnému zviditelnění: na světle fialové (fialovém) podkladu zůstávají bílé skvrny označující aktivní látky. Mechanismus reakce je následující:



Obr. 18: Mechanismus reakce acetylcholinesterázy s 1-naftylacetátem

Pro tuto práci jsem vybrala metodu b), protože s ní byla na pracovišti určitá zkušenost a také proto, že průběh reakce byl výraznější než u metody předešlé. Je však nutno říci, že tato metoda je na provedení citlivá: použitá AChE musí mít aktivitu min. 3 U/ml, inkubace musí probíhat v prostředí vodních par v rozmezí teplot 35-37 °C a 1-naftyl-acetát, použitý pro přípravu činidla musí být uchováván při -22 °C, jinak je vybarvení chromatografické desky málo zřetelné.

Pro vlastní screening byla provedena nanáška 5μl nebo 10μl zásobního roztoku extraktů (10 mg/1 ml zásobního roztoku) a 10 μl roztoků standardů (fysostigmin, galanthamin; 0,1 mg/1 ml zásobního roztoku; R_f hodnoty obou standardních alkaloidů jsou bohužel v použité soustavě prakticky stejné); tyto objemy, které se ukázaly jako optimální, byly zjištěny v předpokusech. Standardy alkaloidů byly naneseny z důvodu porovnání relativní intenzity skvrn. Desky pro inkubaci AChE byly vyvíjeny v neutrální soustavě (S2). Zároveň byla na jiných deskách provedena detekce Dragendorffovým čindilem (D1), aby bylo možné provést porovnání.

Corydalis cava – oddenek: tato morfologická část obsahově velké množství alkaloidů (z hlediska typů látek), jak ukazují obr. 1 a obr. 2; pozitivně reagující látky lze detekovat u prvních dvou typů výtřepků (L, A), u dalších typů výtřepků (A1, B, J, E) je reakce sporná.

V tomto případě to však není důležité, protože kvartérní alkaloidní baze (resp. jodidy) nejsou z hlediska inhibice AChE významné. Literatura v této oblasti uvádí, že byla zjištěna inhibiční aktivita u tohoto druhu za pomoci Ellmanovy metody. V této citované studii^[17] reagovaly pozitivně také druhy *Corydalis intermedia*, *Corydalis solida* spp. *laxa* a *Corydalis solida* spp. *slivenensis*.

Uncaria tomentosa – kůra: morfologická část sice alkaloidy obsahuje (dokonce v poměrně širokém spektru), nezdá se však, že by byly minimální aktivní. Ani v literatuře neexistují údaje o tom, že by tato rostlinná droga obsahoval látky inhibující aktivitu AChE anebo BuChE. Je však pravda, že výsledky chromatografie nejsou příliš přesvědčivé a bylo by vhodné pokus opakovat.

Papaver somniferum – makovina: ačkoliv tato odpadová surovina z pěstování olejného máku alkaloidy obsahovala (sumární obsah alkaloidů, resp. hmotnost nečištěného alkaloidního komplexu terciárních bazí však byl nízký, ~0,3 %), u několika alkaloidů (výtěpky L, A, B) se určitá aktivita objevila; v literatuře neexistuje dosud údaj, že by tyto alkaloidy nějakým způsobem AChE a BuChE ovlivňovaly. Pokud se bude jednat o alkaloidy majoritní (především morfinanového typu), je však tato aktivita bezvýznamná, protože by stejně nemohly být terapeuticky využity. Jiné je to v případě, pokud by se jednalo o papaverin, který je významným muskulotropním spasmolytikem a jehož studie by mohla být perspektivní. O jaké sloučeniny se jednalo však nemohu spekulovat, protože standardy výše jmenovaných alkaloidů nebyly na pracovišti k dispozici.

Tabebuia impetiginosa – kůra: alkaloidy obsahuje, jak je patrné z obr. 7, a zdá se, že pozitivně reagují ve výtěpcích... především alkaloidy majoritní. Protože se však jedná o kvartérní baze (L, A, A1, B), nejde o rostlinný materiál perspektivní pro tento typ studia.

Provedla jsem také pilotní porovnání dvou soustav pro TLC: neutrální a bazické. Neutrální soustava nemusí v případě alkaloidů (a často to tak bývá) alkaloidní směs dobře dělit. Vhodnější bývají u méně polárních mobilních fází přísady bazických látek, které sníží disociaci a alkaloidy se pohybují jako baze. Na příkladu výtěpků z nati *Corydalis cava* jsem zjistila, že bazická soustava skutečně lépe (dokonaleji) směs dělí a zároveň je možné po dobrém odvětrání vrstvy použít reakci s AChE, aniž by došlo k její inaktivaci (tento enzym je citlivý na pH, velmi dobře funguje v oblasti pH 7,8-8,1) alkalickým diethylaminem, používaným do soustavy, ačkoliv byla tato alkalizační přísada i po 10min. odvětrávání v proudu studeného vzduchu ještě z vrstvy slabě cítit. Rozdělená alkaloidní směs reagovala v podstatně širším měřítku než při použití neutrální soustavy, což je patrné na první pohled, i když je z bazické soustavy z technického hlediska méně čitelný.

Peumus boldus – list: lze říci, že pozitivní reakce nastala u všech typů sledovaných výtřepků (L, A, A1, B) Tato skutečnost je o zajímavější, že v literatuře nejsou žádné údaje o tom, že by boldin nebo jeho deriváty podobnou aktivitu měly, a proto je tento rostlinný zdroj rozhodně vhodný pro další studium.

Výsledky své diplomové práce bych shrnula takto:

- 1) bioautografická metoda využívající na TLC barevné reakce s 1-naftylaminem a Fast Blue B Salt je vhodná a dobře použitelná,
- 2) pro bližší studium se jako vhodné ukazují taxony *Corydalis cava* – oddenky (L, A, A1, B, J, E), *Papaver somniferum* – makovina (L, A, B) a *Peumus boldus* – list (L, A, A1, B)
- 3) použít vždy soustavu jak neutrální, tak bazickou (které budou vybrány z předběžného studia chromatografického chování extraktů),
- 4) na základě velmi dobře vypracované TLC se pokusit o denzitometrickou kvantifikaci jednotlivých skvrn,
- 5) pro další studium tohoto typu nemá smyslu sledovat aktivitu výtřepků s obsahem kvarterních jodidů: tyto látky nepřečázejí přes hematoencefalickou bariéru a jejich účinek je v živém biologickém systému prakticky nulový.

VII. Abstrakt

V rámci diplomové práce byl proveden screening látek alkaloidní povahy některých zástupců čeledí Papaveraceae a Fumariaceae na inhibici acetylcholinesterázy (AChE). Byla vypracována metoda přípravy optimálních extraktů (alkaloidních koncentrátů určitého typu) z různých morfologických částí rostlin *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte (kořen), *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC. (kůra), *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Stangl. (kůra), *Peumus boldus* (Molina) (list) a *Papaver somniferum* L. (makovina).

Po přípravě primárního extraktu, jeho okyselení a předčištění, byly připraveny výtřepky různé bazicity extrakcí diethyletherem (L, pH ~2; A, pH ~8; B, pH ~12) nebo chloroformem (A1, pH~8; J, pH ~3; E, pH ~10). Jednotlivé typy výtřepků byly analyzovány TLC v neutrální a bazické soustavě na silikagelu a testovány na obsah alkaloidů (Dragendorffovo činidlo). Výtřepky s obsahem alkaloidů byly dále spolu se standardy (fysostigmin, galanthamin) podrobeny bioautografické metodě sloužící ke zjištění inhibiční aktivity na AChE. AChE pocházela z elektrického úhoře, pro barevnou reakci byl zvolen 1-naftylacetát a Fast Blue B sůl; pozitivní reakcí znamenající inhibici AChE byly bílé skvrny na fialovém pozadí.

Ve všech sledovaných vzorcích rostlinného materiálu byla prokázána přítomnost inhibitorů AChE, kteří vykazovaly různý stupeň aktivity. Pro další studium (izolaci účinných látek) však mají význam pouze taxony *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte, *Peumus boldus* (Molina) a *Papaver somniferum* L.

Abstract

Řepová, L.: Biological activity of plant metabolites VI. Influence of alkaloids from several taxons of plants on acetylcholinesterase. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 2007.

In content of the diploma thesis it was realized screening of the alkaloids of some taxons of tribes Papaveraceae and Fumariaceae on acetylcholinesterase inhibition. It was introduced a method for obtaining optimum extracts (alkaloidal concentrates of certain type) from various morphological parts of plants *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte (root), *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC. (bark), *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Stangl. (bark), *Peumus boldus* (Molina) (leaf) a *Papaver somniferum* L. (poppy head).

After the preparation of primary extract, its acidification and preliminary cleaning, extracts of different basicity were prepared by extraction either by diethyl ether (L, pH ~2; A, pH ~8; B, pH ~12) or by chloroform (A1, pH~8; J, pH ~3; E, pH ~10). Single types of extracts were eluted by means of TLC metod both in neutral and in alkaline system of solvents on the silica gel and were tested on contents of alkaloids (detected by Dragendorff agent). Extracts containing alkaloids were further checked together with standards (physostigmine and galanthamine) by aid of bioautographic method serving for detection of inhibition activity on acetylcholinesterase. AChE originated from electric eel, for colour reaction 1-naphtyl-acetate and Fast Blue B salt were chosen. Spots of the TLC plate which contained AChE inhibitors showed up as white spots against the light violet background.

The attendance of AChE inhibitors of variant activity level has been proved in all tested samples of plant materials. But only the taxons of *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte, *Peumus boldus* (Molina) a *Papaver somniferum* L have an importance for the next study (isolation of active substances).

Key words: plants, alkaloids, acetylcholinesterase inhibition, TLC, bioautographic method, *Corydalis cava* (L.) Schweigg. et Koerte, *Uncaria tomentosa* (WILLD.) DC., *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Stangl., *Peumus boldus* (Molina), *Papaver somniferum* L.

Seznam obrázků

Obr. 1: TLC C-C v S1 , detekce D1	- 37 -
Obr. 2: TLC C-C v S2, detekce D1	- 37 -
Obr. 3: TLC C-C v S2, test AChE.....	- 38 -
Obr. 4: TLC U-T v S1, detekce D1	- 39 -
Obr. 5: TLC U-T v S2, detekce D1	- 39 -
Obr. 6: TLC U-T v S2, test AChE.....	- 40 -
Obr. 7: TLC T-I v S1, detekce D1.....	- 41 -
Obr. 8: TLC T-I v S2, detekce D1.....	- 41 -
Obr. 9: TLC T-I v S2, test AChE	- 42 -
Obr. 10: TLC P-S v S1, detekce D1	- 43 -
Obr. 11: TLC P-S v S2, detekce D1	- 43 -
Obr. 12: TLC P-S v S2, test AChE	- 44 -
Obr. 13: TLC P-B v S1, detekce D1	- 45 -
Obr. 14: TLC P-B v S2, detekce D1	- 45 -
Obr. 15: TLC P-B v S2, test AChE.....	- 46 -
Obr. 16: TLC C-C v S2, test AChE.....	- 47 -
Obr. 17: TLC C-C v S1, test AChE.....	- 47 -
Obr. 18: Mechanismus reakce acetylcholinesterázy s 1-naftylacetátem.....	- 51 -

Seznam tabulek

Tab. 4: Původ a hmotnost výchozích drog	- 32 -
Tab. 5: Hmotnosti jednotlivých výtřepků po vysušení	- 32 -
Tab. 6: Počty pozitivních skvrn v jednotlivých výtřepcích	- 46 -

-
- [1] Lincová, D., Farghali, H. et al: Základní a aplikovaná farmakologie, Karolinum, Praha 2002, 1. vydání, s. 140
- [2] Jirák, R.: Klinická farmakologie a farmacie **18** (4/2004), s. 212
- [3] Lincová, D., Farghali, H. et al: Základní a aplikovaná farmakologie, Karolinum, Praha 2002. 1. vydání, s. 141-143
- [4] Lincová, D., Farghali, H. et al: Základní a aplikovaná farmakologie, Karolinum, Praha 2002, 1. vydání, s. 143-145
- [5] Jirák, R.: Klinická farmakologie a farmacie **18** (4/2004), s. 212-214
- [6] Houghton, P. J., Howes, M.-J.: Neurosignals **14** (2005), s. 6-7, 9-15
- [7] Brühlmann, C., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P.-A., Testa, B.: Chemistry & Biodiversity **1** (2004), s. 826
- [8] Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holtzgrabe, U., Kellner, K., Reichling, J., Schnetz, V. et al.: HagerROM 2006: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Springer & Info II Uni. Würzburg, Würzburg 2006.

-
- [9] <http://www.feenkraut.de/herbs/Boldo.html>
- [10] <http://www.rain-tree.com/boldo.htm>
- [11] <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/054899en.pdf>
- [12] <http://www.avicenna.cz/item/peumus-boldus-boldovnik-vonny>
- [13] Thin Layer Chromatography, A Laboratory Handbook edited by Egon Stahl, Springer-Verlag, Berlin, 1969, 2. vydání
- [14] CD ROM ČL2002
- [15] Marston, A., Kissling, J., and Hostettmann, K.: A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors In Plants. *Phytochem. Anal.* 13, 51-54 (2002)
- [16] Sam Medhat Salah, Anna Katharina Jäger: Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J. Ethnopharmacol.* **97**, 145-149 (2005).

[17] Adersen Anne, Gauguin Bente, Gudiksen Lene, Jäger Anna K: Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity, *Journal of ethnopharmacology* **104**, 418-422 (2006)