

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Využití technik hmotnostní spektrometrie v analýze
přírodních látek**

**Using of techniques of mass spectrometry in the analysis of
natural compounds**

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

Hradec Králové, červen 2020

Bc. Alžběta Vopelková

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 548.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat doc. Ing. Lucii Cahlíkové Ph.D. za vedení diplomové práce, za poskytnutí materiálů a za odborné a cenné rady.

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

V Hradci Králové 30. 04. 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'B. Běláček', written in a cursive style.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1 Plynová chromatografie	8
3.1.1 Instrumentace	8
3.1.2 Popis chromatogramu.....	13
3.2 Alkaloidy.....	19
3.2.1 Základní klasifikace alkaloidů na základě jejich biosyntetického původu	20
3.3 Čeleď Amaryllidaceae.....	27
3.3.1 Biosyntéza a strukturní klasifikace Amaryllidaceae alkaloidů	28
4. VYUŽITÍ GC-MS TECHNIK PŘI ANALÝZE ALKALOIDŮ ROSTLIN ČELEDI AMARYLLIDACEAE	32
4.1 Rod <i>Zephyrantes</i>	32
4.2 Rod <i>Nerine</i>	37
4.3 Rod <i>Narcissus</i>	41
5. DISKUSE	49
6. ZÁVĚR.....	51
7. POUŽITÉ ZKRATKY	52
8. SEZNAM TABULEK	54
9. SEZNAM OBRÁZKŮ	55

10.	POUŽITÁ LITERATURA	57
11.	ABSTRAKT	69
12.	ABSTRACT.....	70

1. ÚVOD

Plynová chromatografie (GC) je dnes hojně využívána v analýze přírodních látek. Při použití této metody musí být splněny všechny podmínky pro dosažení kvalitních výsledků. Nejdůležitější podmínkou je těkavost látek. Obecně je chromatografie definována jako fyzikální separační metoda, která distribuuje separované složky mezi nepohyblivou stacionární fází a pohyblivou mobilní fází. Mezi její hlavní výhody patří rychlost separace složitých směsí látek a potřeba malého množství vzorku.^{1,2}

Hmotnostní spektrometrie (MS) dokáže poskytnout informace o struktuře organických látek a biomolekul, kvalitativním a kvantitativním složení vzorku, izotopických poměrech atomu ve vzorku a elementárním složení vzorku. První použití hmotnostní spektrometrie se datuje již od 40. let 20. století, kdy tato metoda byla využita při analýze směsí uhlovodíků v petrochemickém průmyslu. V dnešní době má také široké spektrum uplatnění v analýze přírodních látek.^{2,3}

Po dlouhá léta jsou přírodní látky využívány při léčbě nejrůznějších onemocněních. S vývojem technologií a úrovně vzdělání se postupně zkoumaly obsahové látky v rostlinách, společně s jejich biologickými vlastnostmi, pomocí izolace a systematické klasifikace do jednotlivých skupin.⁴

Významnou, a také zajímavou skupinu látek tvoří alkaloidy, což jsou sekundární metabolity, které vytváří velkou část rostlin na Zemi. Proč tyto látky vytváří rostliny, prozatím není objasněno. Strukturně se jedná o heterocyklické sloučeniny obsahující ve svých molekulách dusík. Každý rostlinný druh má velmi pestré a různorodé spektrum alkaloidů, které působí na člověka toxicky nebo léčebně. Podmínku zde hraje jejich koncentrace.⁵

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS) hraje důležitou roli v analýze přírodních látek. Hlavním účelem je vytipování vhodných druhů k dalším podrobnějším studiím jednotlivých alkaloidů.⁶

2. CÍL PRÁCE

Náplň diplomové práce:

1. Vypracovat teoretickou část se zaměřením na spektrální metody, které se využívají k analýze přírodních látek. A zaměřit se především na spojení GC-MS.
2. Základní klasifikace alkaloidů na základě biosyntetického původu.
3. Přiblížit teoreticky alkaloidy čeledi Amaryllidaceae.
4. Shrnout poznatky o využití GC-MS aplikovaných na analýzu alkaloidů čeledi Amaryllidaceae.

3. TEORETICKÁ ČÁST

V úvodu teoretické části práce budou přiblíženy obecné aspekty GC, základní klasifikace alkaloidů, podrobněji čeleď Amaryllidaceae a taktéž bude zahrnut popis strukturních typů vybraných alkaloidů této čeledi.

3.1 Plynová chromatografie

GC je separační metoda určená k dělení a stanovení plynů, kapalin i pevných látek s bodem varu do cca 400 °C. Principem metody je rozdělení složek mezi dvě fáze, a to fázi pohyblivou – mobilní (MF) a fázi nepohyblivou – stacionární (SF).¹

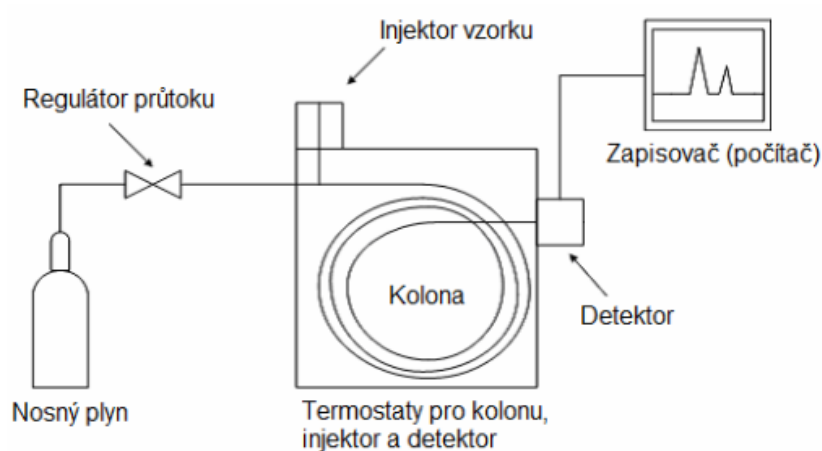
MF je pohyblivý nosný plyn a SF je ukotvena v chromatografické koloně. Kolonou se SF prochází nosný plyn, vzorek je nastříknut do nástříkové komory (injektoru), kde se odpaří a ve formě par je unášen kolonou. Složky se sorbují na začátku kolony ve SF a pak desorbují nosným plynem. Daná složka vzorku je unášena nosným plynem až ke konci kolony a dělicí proces se neustále opakuje.^{1,3} Důležitým aspektem analýzy je skutečnost, že je každá složka unášena jinou rychlostí. Rychlost postupu složky kolonou je závislá na distribuční konstantě této složky. Látky vycházejí postupně z kolony v závislosti rostoucích hodnot distribučních konstant a vstupují do detektoru. Odezva detektoru identifikuje okamžitou koncentraci separovaných látek. Signál detektoru je vždy upraven. Výsledkem je grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase – chromatogram. Tato technika se označuje jako eluční.^{1,7}

Mezi výhody této metody patří rychlost při separaci složitých směsí, to znamená, že stanovované látky mají dostatečný tlak syté páry, jsou tepelně stábe, mají bod varu menší než 400 °C a relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Další výhodou je pak možnost použití malého množství vzorku při analýze. Mezi nevýhody patří naopak její nepoužitelnost při separaci makromolekul, anorganických a organických solí.^{6,7}

3.1.1 Instrumentace

V současné době existuje mnoho variant, přičemž v praxi se nejvíce využívají GC s kapilárními kolonami.⁸

Obrázek č. 1 zachycuje schématické uspořádání GC. Skládá se ze tří základních částí detektoru, kolony a injektoru neboli dávkovače. Vzorek je dávkován přes septum speciálními injekčními stříkačkami, které jsou vybrány dle analyzované látky, a to plynotěsné nebo klasické.^{6, 7} Vlivem vysoké teploty dochází k odpaření vzorku na skleněné vložce (lineru) a vzorek je smísen s nosným plynem a prochází skrze kolonu do detektoru. Detektor reaguje na změnu složení prostřednictvím signálu, který se zaznamenává a je dále vyhodnocen. Výsledkem je eluční křivka, kterou lze vyjádřit jako pík v chromatogramu. Velikost signálu pak závisí na koncentraci složek obsažených v mobilní fázi.^{6, 7}



Obrázek 1 – Schéma GC⁸

3.1.1.1 Stacionární fáze

Podle SF se plynová chromatografie dělí na systém plyn – pevná látka (GSC) a plyn – kapalina (GLC). V případě GSC je principem distribuce analytu mezi SF a MF adsorpce. GLC může být příkladem rozdělovací chromatografie, kde dochází k rozpouštění látky v obou fázích. Kapalná fáze je v koloně ukotvena, proto musí mít nízkou tenzi par, a pro vysoké pracovní teploty musí být chemicky stabilní. Stacionární fázi volíme podle charakteru vzorku a podle rozsahu teplot varu.^{1, 3, 7} Obecně platí, že zvolená stacionární fáze má být podobného typu jako analyzovaný vzorek. Používané fáze jsou na bázi polysiloxanů. Kromě toho se používají ještě další dvě fáze: skvalan (isoalkan $C_{30}H_{62}$) jako fáze s nejmenší polaritou a Carbowax 20M (polyethylenglykol se střední molekulovou hmotností 20 000) jako silně polární stacionární fáze. Pro separaci chirálních látek jsou k dispozici chirální kolony, přičemž nejběžnější chirální kolony jsou na bázi cyklodextrinů (α - β - γ -cyklodextriny).^{9, 10, 11, 12, 13, 14}

3.1.1.2 Mobilní fáze

U GC představuje MF nosný plyn. Nejčastěji používané nosné plyny jsou vodík, helium, argon či dusík. Když se volí nosný plyn, berou se v úvahu hlavně tyto faktory: viskozita, čistota, reaktivita, účinnost, cena plynu a typ používaného detektoru. ^{1,3}

Průtok MF musí být optimalizován, aby se dosáhlo, co nejlepšího rozdělení látek na koloně tzn. nejmenšího rozšíření zón separovaných látek. ⁷

Děje, které se podílí na rozšiřování zón během průchodu kolonou, jsou tyto čtyři hlavní:

- vířivá difúze, kdy různé molekuly musí urazit různou vzdálenost
- odpor proti přenosu hmoty ve SF, kdy různé molekuly difundují různě hluboko do SF ⁶
- odpor proti přenosu hmoty v MF, kde je rychlostní profil MF parabolický ⁶
- podélná molekulární difúze, při níž molekuly putují z míst o vyšší koncentraci do míst o nižší koncentraci, a to po i proti proudění MF ⁶

3.1.1.3 Regulátory tlaku a průtoku

Elektronické regulační zařízení slouží k ovládní průtoků a tlaku nosného plynu. Regulátor zaručuje konstantní průtok plynu kolonou a detektorem bez ohledu na typ nosného plynu, teplotu a rozměry kolony. Podle viskozity plynu, vnitřního průměru a délky kolony se tlak nastaví tak, aby průtok kolonou byl konstantní, tlak je potom proměnnou veličinou. ^{7,8}

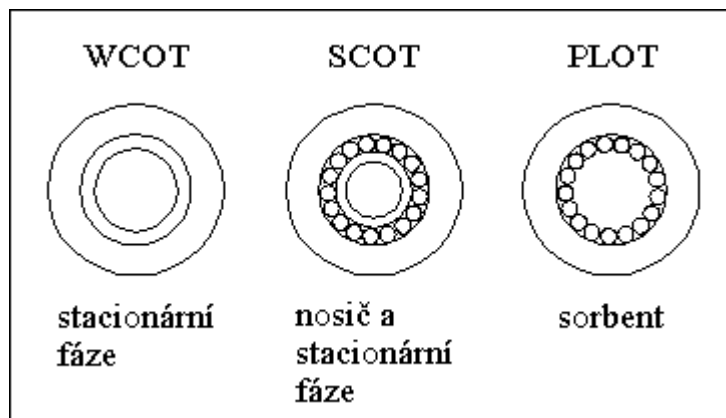
3.1.1.4 Injektory

Injektorem vstupuje analyzovaná látka do GC. Nástřík vzorku se provádí pomocí speciální injekční stříkačky přes septum, které dělí vnitřek injektoru od vnějšího prostoru. Injektor obsahuje liner, ve kterém dochází vysokou teplotou k rychlému odpaření vzorku a ke správnému promíchání par vzorku s MF (nosným plynem). Dělič toku (splitter), který se nachází mezi injektorem a kolonou, umožňuje vést jen část odpařeného vzorku na kolonu (splňovací poměr = split ratio). Nástřík bez splitu (splitless injection) je technika, která se používá při stopové analýze či pro analýzu směsí látek, které se výrazně liší v bodu varu. ^{7,11}

3.1.1.5 Kolony

V koloně dochází k samostatné separaci vzorku. Existují kapilární a náplňové kolony. Náplňové kolony jsou trubice ze skla nebo nerezové oceli, naplněné granulovaným materiálem. Jako nosiči slouží křemelina o průměru částic 0,1 až 0,15 mm. Na nosiči bývá naneseno 3 až 15 % stacionární fáze. Kapilární kolony jsou otevřené kapiláry, kde funkci nosiče zastávají vnitřní stěny kapiláry, které jsou pokryty kapalnou stacionární fází.^{6, 15} Kapilární kolony se zhotovují z taveného křemene, jehož povrch je potažen vrstvičkou polyamidu. Tato vrstvička odstraňuje křehkost křemene a kolony jsou pružné. Vzhledem k vyšší účinnosti se používají převážně kapilární kolony. Kolona délky 50 m může dosáhnout účinnosti 250 000 pater.^{14, 16, 17} V dnešní době jsou náplňové kolony spíše historickou záležitostí.⁷

Kapilární kolony dělíme podle způsobu uložení nosiče na vnitřní stěně kapiláry na SCOT (Support-coated open tubular), které představují vrstvičku nosiče se zakotvenou kapalinou. WCOT (Wall-coated open tubular) kapilární kolony tvoří na vnitřní stěně kapiláry tenký film kapalné fáze a typ kapilárních kolon PLOT (Porous-layer open tubular) má vrstvičku pevného sorbentu na vnitřní stěně kapiláry (Obr. 2).^{6, 15, 18, 19}



Obrázek 2 – Základní typy kapilárních kolon¹⁹

3.1.1.6 Detektory

Detektory jsou konstrukční části měřicích zařízení, ve kterých dochází k převedení fyzikálně chemické vlastnosti analytu na měřitelný, elektrický signál.¹⁵

Aby se zabránilo kondenzaci látek na stěnách detektoru, teplota detektoru by neměla převyšovat teplotu plynů vycházejících z kolony. V GC se používá hned několik druhů detektorů.⁷

a. Plamenově ionizační detektor (FID)

Plyn je zaváděn do plamene tvořeného kyslíkem s vodíkem, kde probíhá chemická ionizační reakce vedoucí ke vzniku nabitých částic. Na špičce mikrohořáku dochází v proudu vzduchu ke spálení této směsi na ionty, které se detekují na polarizovaných elektrodách. FID poskytuje odezvu téměř na všechny organické látky. Odezvu však nedává většina anorganických látek a par ani formaldehyd a chlorid uhličitý.^{6,7}

b. Hmotnostně spektrometrický detektor

Tento detektor kromě detekce přítomnosti analytu, umožňuje také identifikaci na základě hmotnostního spektra.⁶

Při kombinaci GC s MS detektorem dochází k analýze iontů kvadrupólovým analyzátozem nebo iontovou pastí.³

Vzniklé ionty vzorku jsou separovány podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje (m/z). Detektor obsahuje čtyři rovnoběžné tyčové elektrody, kdy na každou z nich je přiváděno stejnosměrné napětí (až stovky voltů) a současně složka radiofrekvenčního pole. Určení těchto hodnot představuje trajektorii drah, po kterých se mezi tyčemi ionty pohybují. K detektoru prochází pouze ionty se stabilní trajektorií určité hodnoty m/z , ostatní ionty k detektoru neprojdou.^{2,11}

Jako další široce užívané detektory lze zařadit:

Plamenový termoionizační detektor – TID, Tepelně vodivostní detektor – TCD, Fotoionizační detektor – PID, Chemiluminiscenční detektor – CLD, Plamenový fotometrický detektor – FPD a detektor elektronového záchytu – ECD.^{1,3,15}

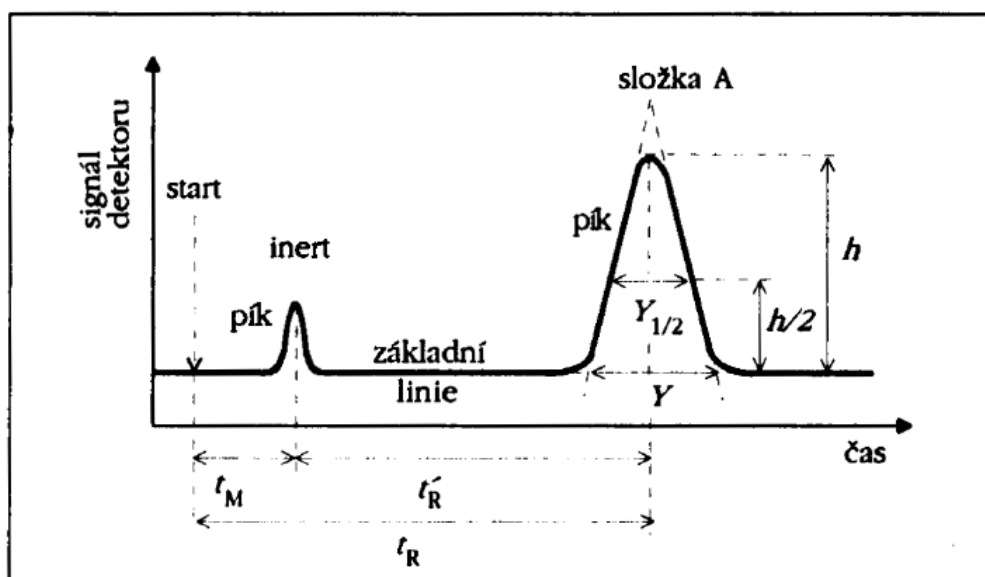
3.1.1.7 Termostat

Rychlost separace složek na koloně závisí na termostatu, protože vlivem teploty ji lze upravovat. Termostat ohřívá dávkovač, kolonu i detektor na teplotu, která udržuje vzorek v plynné fázi, a tak může na koloně probíhat separace v přiměřených časech.

Slouží také jako chladič. Teplotní minima i maxima závisí na typu kolony, které jsou většinou v rozmezí od $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Velkou výhodou je vytvoření programu pro gradientovou eluci, která se využívá pro separaci směsí látek s velkým rozdílem bodů varu, nebo program pro udržení konstantní teploty během celé separace.^{1,3}

3.1.2 Popis chromatogramu

Chromatogram je grafický záznam napěťové odezvy detektoru na čas (Obr.3)¹¹



Obrázek 3 – Chromatogram (h – výška píku, Y – šířka píku v základně)²⁰

3.1.2.1 Základní pojmy

Retenční vzdálenost je vzdálenost píku od počátku chromatogramu, tj. od nástřiku vzorku ke koloně. Velikost píku se vypočítá z retenční vzdálenosti v závislosti retenčního času a objemu.¹ Retenční objem M_F definujeme jako objem, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od začátku až ke konci kolony. Celkový čas, který analyt stráví v separační koloně je definován jako retenční čas.^{18,20}

3.1.2.2 Mrtvé retenční parametry

Analyty s těmito parametry se za daných podmínek v koloně nezadržují, tzn., že jejich distribuční konstanta je nulová.¹

Řadí se zde:

- mrtvý retenční objem ¹
- mrtvý retenční čas ¹
- mrtvá retenční vzdálenost ¹

3.1.2.3 Redukované retenční parametry

Redukované retenční parametry jsou získány, jestliže se od retenčního parametru odečte příslušný mrtvý retenční parametr. ⁸

- redukovaný retenční objem ⁸
- redukovaný retenční čas ⁸
- redukovaná retenční vzdálenost ⁸

3.1.2.4 Vyhodnocení chromatogramu

Vyhodnotit chromatografický záznam lze kvalitativně i kvantitativně. ⁷

a. Kvantitativní analýza

Pokud mluvíme o lineární odezvě detektoru, je plocha či výška píku úměrná k množství látky. Umožňuje tedy určovat koncentraci a množství dané látky v analyzovaném vzorku. Kvalita analýzy je ovlivněna přípravou vzorku, správnou funkcí přístroje a kvalitou zpracování dat, s čímž souvisí správná kalibrační metoda. ⁸

V analýze se využívají 4 metody:

1. Metoda vnitřní normalizace, která určuje obsah látek ve směsích, je-li počet komponent relativně nízký a všechny komponenty jsou známe. ⁸
2. Absolutní kalibrace, která určuje absolutní koncentraci nebo množství látky na základě kalibrační závislosti. ⁸
3. Metoda vnitřního standardu, kdy se ke vzorku přidává určité množství známé látky, tzv. vnitřní standard. Tato látka nesmí být přítomna v původním vzorku, nesmí reagovat s žádnou složkou vzorku, musí být dobře oddělena od všech složek v původním vzorku a musí eluovat v blízkosti stanovované látky. ^{8, 11, 20}

4. Metoda standardního přídavku, kdy se ke vzorku přidá známé množství stanovované látky o známé koncentraci. Množství látky v původním vzorku lze vypočítat z rozdílu plochy píku vzorku a přidané stanovované látky. ^{8, 20}

b. Kvalitativní analýza

Chromatografie jako taková neposkytuje informace o struktuře látek ve vzorku. Při kvalitativní analýze se identifikuje analyt na základě srovnání retenčních dat analytu a standardu. Identifikace složek se může provést i pomocí speciálních detektorů. V současnosti se nejčastěji používá kombinace GC-MS. ^{8, 11}

Přístupy identifikace jsou založené na retenčních časech, retenčních indexech a relativních retenčních časech. ⁸

3.1.2.5 MS techniky využívané v analýze přírodních látek

a. Elektronová ionizace (EI)

EI patří mezi tvrdé ionizační techniky probíhající ve vakuu. Tato technika se využívá nejčastěji v kombinaci s GC-MS. Energetickým procesem dochází k tvorbě iontů interakcí analyzované látky s proudem urychlených elektronů. Princip spočívá ve žhavení vlákna (katoda), které slouží jako zdroj elektronů směřujících prostorem iontového zdroje k anodě. Energii elektronů, které se dostávají do kontaktu s látkou, udává potenciálový rozdíl mezi nimi. ^{10, 21}

b. Chemická ionizace (CI)

CI na rozdíl od EI patří mezi měkké ionizační techniky z plynné fáze a je běžně využívána v kombinaci GC-MS. Princip vzniku iontů je obdobný jako v předchozím případě, ale potenciálový rozdíl je mnohem vyšší. Energie iontů není přenášena přímo na analyzované molekuly, ale zprostředkovaně přes médium v podobě kapaliny nebo plynu. Nevýhodou oproti EI je vyšší tlak, který zvyšuje pravděpodobnost mezimolekulových a meziontových interakcí. Výhodou je vyšší stabilita molekulového iontu vzniklého CI. ^{10, 22}

c. Ionizace elektrosprejem (ESI)

ESI je nejběžněji využívána metoda v kombinaci s kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (LC-MS). ESI je silně endotermická, jelikož přenáší ionty z roztoku do plynné fáze. Vznikají kladně i záporně nabitě ionty. Vznik protonovaných i deprotonovaných molekul závisí na polaritě vloženého napětí. Princip spočívá v zavádění malého množství (μl) zředěného roztoku analytu velmi úzkou kapilárou z vodivého materiálu do rozprašovací komory.^{10,23} K rozprášení dochází vlivem nehomogenního elektrického napětí. Vznikající drobné kapičky mají značnou hustotou povrchového náboje. Rozpouštědlo se rychle odpařuje, tudíž hustota náboje stoupá, dokud nevzniknou podstatně menší částice v důsledku výbuchu. Ty se poté odpařují ještě rychleji. Dusík slouží jako sušící plyn, napomáhá ke zbavení vzorku zbytků rozpouštědla a nadbytečné kinetické energie. Nakonec vytvoří svazek iontů pro MS analýzu s pomocí vakuové clony a štěrbinové elektrody.^{10,23}

d. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Při této ionizaci se přivádí MF pomocí vstupní kapiláry do pneumatického rozprašovače, jehož plášť se vyhřívá na vysokou teplotu. Dochází k efektivnímu rozprášení a odpaření MF. Vzniká koronární výboj, který má za následek vložení náboje na výbojovou jehlu. Dojde k ionizaci molekul MF přítomné v plynné fázi ve velkém nadbytku vůči analytu. Reakční plyn (ionty MF) ionizuje molekuly analytu, podobně jako u klasické CI, přenosem protonu za vzniku protonované nebo deprotonované molekuly.^{10,24}

e. Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)

Tato ionizace se využívá pro analýzu extrémně velkých molekul, především přírodních polymerů, ale i proteinů a peptidů s velkou molekulovou hmotností. Jedná se o měkkou ionizační techniku (hned po ESI také nejšetrnější) při níž je míra fragmentace velmi malá. Než dojde k ionizaci, musí se vzorek smíchat s matricí, kterou je nejčastěji organická kyselina snadno absorbující energii laseru. Poté se směs vysuší a podrobí ionizaci, která zahrnuje krátké intenzivní pulsy laseru. Tím dochází k desorbci a zahřátí matrice a analytu. Náboj z ionizované matrice putuje v podobě protonu k analytu, a tím jej ionizuje.^{21,23}

3.1.2.6 Spojení MS a separačních metod

a. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

GC-MS je široce používaná jako výkonná technika GC v řadě oblastí jako je ekologie, kriminalistika nebo soudní lékařství. Využívá se dokonce při výrobě ropy a zemního plynu. Umožňuje analýzu velmi nízkých koncentrací a zajišťuje informace o molekulární hmotnosti. Důležitá je volba nosného plynu, protože MS je velice citlivý na znečištění kyslíkem, uhlovodíky a vodou.^{2, 25}

Velkou výhodou GC-MS ve srovnání s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografi (HPLC-MS) je možnost využít při charakterizaci jednotlivých sloučenin knihovny spekter. Jsou to databáze obsahující tisíce hmotnostních spekter získaných metodou EI-GC-MS, jelikož EI se standardně provádí za přesně daných podmínek.^{24, 26}

b. Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS)

HPLC je metoda s velmi vysokou schopností separace jednotlivých složek analyzovaného vzorku. Tato metoda je ve spojení s MS, kterou lze považovat za velmi spolehlivou a citlivou techniku, brána za velmi výhodnou. Především z hlediska možnosti analýzy netěkavých, také velmi polárních a termicky nestabilních látek.^{24, 25}

Základním předpokladem spojení těchto metod je dostatečně účinné odstranění složek MF před ionizací.¹⁰

Z hlediska analýzy přírodních látek je velmi důležité použití této metody v analýze kvalitativní i kvantitativní u netěkavých látek. Nejčastěji se jedná o analýzu lipidů, sacharidů, glykoproteinů, proteinů, vitamínu, umělých i přírodních barviv, farmak, antibiotik či růstových hormonů. Významné uplatnění nachází v široké škále oborů, např. ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu nebo v oblasti toxikologie či ekologie.^{10, 26, 27}

c. Kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní detekcí (CE-MS)

Jedná se o komplementární metodu k HPLC-MS. Tato elektromigrační metoda nachází významné uplatnění v oblasti analýzy látek iontové povahy v komplikovaných matricích. Příkladem může být oblast farmaceutické analýzy, kde se často využívá ke stanovení obsahu a struktury peptidových léčiv. Dále bývá využívána při studiích biopolymerů typu bílkovin a fragmentů nukleových kyselin.^{10, 22, 27}

3.2 Alkaloidy

Alkaloidy jsou značně rozsáhlá skupina organických sloučenin, jejichž biosyntetickým prekurzorem jsou aminokyseliny. Jedná se převážně o heterocyklické dusíkaté báze, což znamená, že by měly mít alespoň jeden kruh se začleněným dusíkem.^{28, 29} V širším slova smyslu však alkaloidy chápeme jako dusíkaté báze, které jsou produkovány zpravidla rostlinami. Dosud byly alkaloidy nalezeny asi v 4000 rostlinných druzích. Odhaduje se, že asi 10 až 20 % rostlinných druhů obsahuje alkaloidy. Velké množství alkaloidů produkují zástupci čeledí Apocynaceae, Asclepiadaceae, Berberidaceae, Loganiaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae.^{30, 31} Dále se mohou vzácně vyskytovat i v houbách nebo u obojživelníků, především v jejich sekretech. Struktura alkaloidů je velice rozmanitá. Mohou být alifatické, cyklické i aromatické. Často mají též steroidní povahu.^{32, 33} Význam těchto látek pro rostliny nebyl doposud uspokojivě vysvětlen. Předpokládá se, že jejich jedovatost může rostlině působit ochranu proti býložravcům a parazitům. Ne všechny alkaloidy jsou však v dostatečné míře jedovaté. Sama rostlina na jejich syntézu vynakládá mnoho energie. Předpokládá se, že alkaloidy mají pro rostlinu ještě jiný, dosud neobjasněný význam. Obecně se jedná o jednu z nejvýznamnějších skupin sekundárních metabolitů vzhledem k širokému spektru biologických aktivit.^{28, 34, 35, 36}

Většinou se jedná o krystalické látky, ale mohou to být i kapaliny nebo velmi těkavé látky. Jsou nerozpustné ve vodě, avšak mají velmi dobrou rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech (např. chloroform).³⁰ Alkaloidy jsou hořké chuti a často mají omamné účinky. Ve větším množství bývají velmi nebezpečné a mohou způsobit až smrt.^{29, 32} Každá skupina alkaloidů má odlišné vlastnosti, které se odvíjí od jejich struktury. Vzhledem k tomu, že některé jsou strukturně podobné biogenním aminům (neurotransmitterům), mohou urychlovat nebo naopak tlumit nervový přenos.³¹ Při dlouhodobém zneužívání některých alkaloidů se vytváří tolerance, což vede k nutnosti zvyšování dávek. Jejich účinky na organismus jsou různé. Způsobují podrážděnost, halucinace, bezstarostnost, ale i znečítlivění nebo stavy povzbuzení. Podle funkce je nazýváme například anestetikem, analgetikem, hypnotikem či diuretikem.^{4, 28, 34}

3.2.1 Základní klasifikace alkaloidů na základě jejich biosyntetického původu

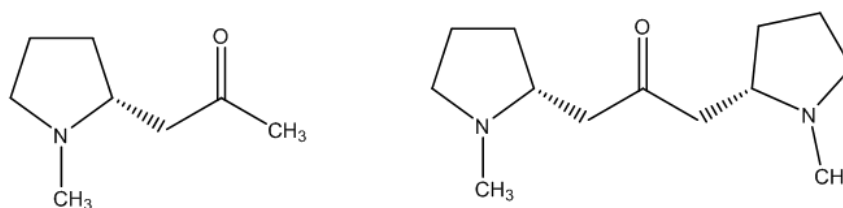
Biogeneticky jsou alkaloidy odvozené většinou od aminokyselin. Jde zejména o aminokyseliny ornithin, lysin, fenylalanin, tyrozin, tryptofan a histidin. Některé alkaloidy vznikají z kyseliny antranilové nebo nikotinové. Další vznikají z meziproductů biosyntézy terpenoidů a steroidů za přítomnosti amoniaku. Na syntéze alkaloidů se mohou zřídka podílet i další aminokyseliny jako je glycin, cystein, methionin, kyselina asparagová a prolin. Poměrně malá skupina alkaloidů je vytvářena příjmem dusíku do polyketidového řetězce (to je např. případ koniinu).^{33, 37}

3.2.1.1 Alkaloidy odvozené od ornithinu

Ornithin je neproteinogenní aminokyselina. Strukturně je příbuzná lysinu, ale její uhlíkatý řetězec je o jeden uhlík kratší. Mezi alkaloidy odvozené od ornithinu patří alkaloidy pyrolidinové, tropanové a pyrolizidinové.^{37, 38}

Pyrolidinové alkaloidy

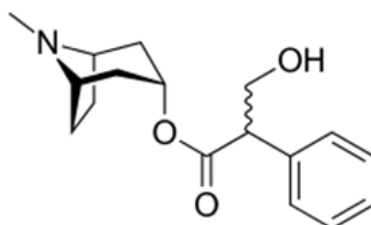
Pyrolidinové alkaloidy se vyskytují zejména v rostlinách čeledi vstavačovitých (Orchidaceae), rudodřevovitých (Erythroxylaceae) a lilkovitých (Solanaceae). Mezi zástupce pyrolidinových alkaloidů patří např. hygrin, kuskohygrin (Obr. 4). Z farmaceutického a toxikologického hlediska je tento strukturní typ alkaloidů málo významný.³⁸



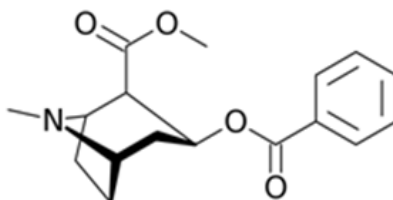
Obrázek 4 – (R)-hygrin a kuskohygrin

Tropanové alkaloidy

Tyto alkaloidy jsou charakteristické přítomností bicycklého tropanového skeletu. Vyskytují se především v čeledích rostlin lilkovitých (Solanaceae) a rudodřevovitých (Erythroxylaceae).³⁹ Významným příkladem těchto alkaloidů jsou atropin (Obr. 5) a kokain (Obr. 6). Atropin působí na centrální nervový systém, tlumí křeče a zpomaluje srdeční tep. Je používán v očních kapkách či jako protijed proti nervovým plynům. Kokain, jako bílá krystalická látka, je alkaloidem rostliny koky pravé (*Erythroxylum coca*). Patří mezi silný stimulant nervové soustavy. Byl využíván jako lokální anestetikum.^{4,33}



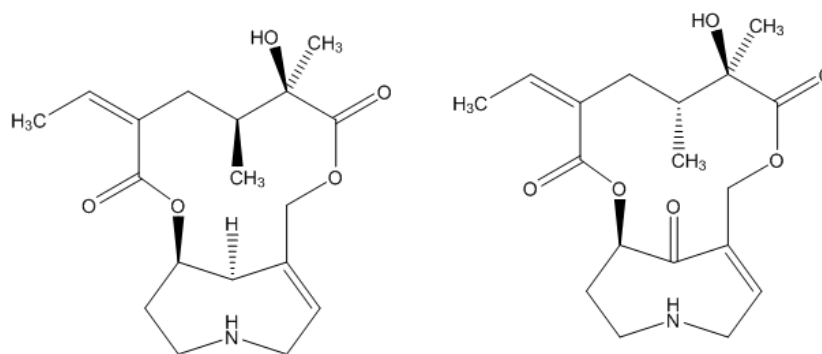
Obrázek 5 – atropin



Obrázek 6 – kokain

Pyrrolizidinové alkaloidy

Nejdůležitějšími zdroji těchto alkaloidů jsou rostliny z čeledi Boraginaceae a Asteraceae. Pyrrolizidinové alkaloidy bývají většinou estery dikarboxylových kyselin. Příkladem je senecionin (Obr. 7), nacházející se v některých rostlinách čeledi hvězdnicovitých (Asteraceae), zejména v rodě starček (Senecio). Dalším příkladem je senkirkin (Obr. 7) přítomný v podbělu lékařském (*Tussilago farfara*). Obsah těchto alkaloidů v rostlinách bývá poměrně nízký, ale vzhledem k tomu, že většina těchto, tzv. necinových alkaloidů, má hepatotoxické účinky, nedoporučuje se dlouhodobá konzumace čajových směsí s obsahem podbělu, devětsilu, stračku.^{29, 35, 40}



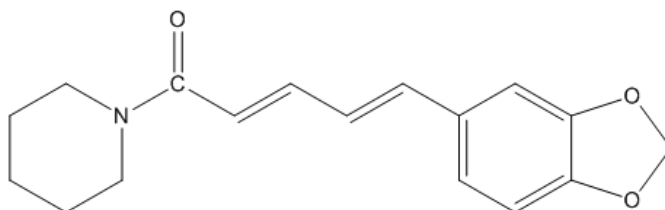
Obrázek 7 – senecionin a senkirkin

3.2.1.2 Alkaloidy odvozené od lysinu

Mezi alkaloidy odvozené od lysinu, patří zejména alkaloidy piperidinové a chinolizidinové.³³

Piperidinové alkaloidy

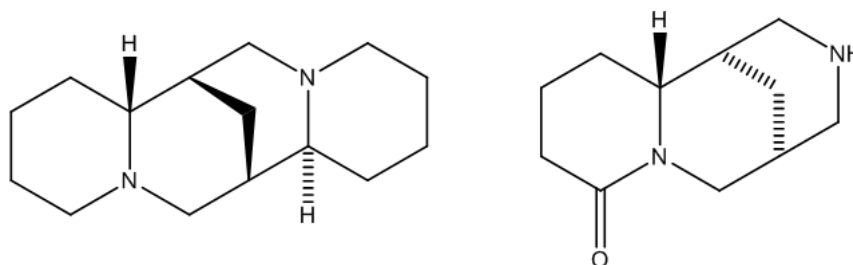
Od lysinu se podobně jako od ornithinu odvozují heterocyklické alkaloidy, jejichž kruh je zde však šestičlenný, nasycený s jedním dusíkem, tj. piperidin. Nejvýznamějším alkaloidem tohoto strukturního je bezesporu piperin (Obr. 8), izolovaný z pepřovníku černého (*Piper nigrum*, Piperaceae). Tato sloučenina je nositelem pálivé chuti plodu pepře černého. Působí jako karminativum a stomachikum. Jeho význam spočívá v tom, že zvyšuje biologické vlastnosti některých látek oproti jejich samotnému podání.³⁶



Obrázek 8 – piperin

Chinolizidinové alkaloidy

Chinolizidinové alkaloidy jsou tvořené bicyklickým heterocyklem chinolizidinem, který je tvořen dvěma šestičlennými cykly se společnou stranou, přičemž jeden ze společných uhlíkatých atomů je nahrazen dusíkem. Vyskytují se zejména v rostlinách čeledi bobovitých (Fabaceae), např. rody lupina (*Lupinus*), janovec (*Sarothamnus*) nebo štědřenec (*Laburnum*).⁴¹ Chinolizidinové alkaloidy jsou významně toxické. Některé se vyznačují teratogenním efektem. Z toxikologického hlediska jsou nejvýznamnější chinolizidinové alkaloidy spartein a cytisin (Obr. 9), které jsou řazeny do čeledi rostlin Fabaceae neboli bobovitých.³⁶

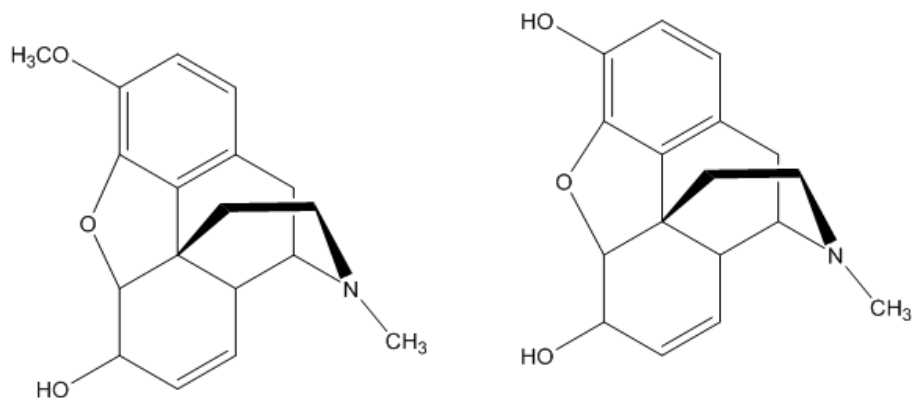


Obrázek 9 – spartein a cytisin

3.2.1.3 Alkaloidy odvozené od fenylalaninu a tyrozinu

Aminokyselina fenylalanin a její hydroxyderivát tyrozin tvoří základ biosyntézy mnohých alkaloidů. Tato skupina alkaloidů je velmi pestrá a rozmanitá. Různé strukturální typy jsou syntetizovány v rámci několika biosyntetických cest, kterým podléhají zmíněné alkaloidy.^{37, 42, 43}

Mezi nejvýznamnější alkaloidy této skupiny patří isochinolinové alkaloidy, které se dále dělí do celé řady strukturálních skupin. Nejvýznamnější čeledě, které produkují tyto alkaloidy, jsou Papaveraceae, Fumariaceae, Berberidaceae, Rutaceae, Monimiaceae a další.^{37, 46} Farmaceuticky nejvýznamnějšími alkaloidy z historického hlediska jsou morfinanové alkaloidy. Tyto alkaloidy jsou základní účinnou složkou opia, které je už od starověku využíváno pro svůj analgetický účinek. Nachází se v rozličných druzích rodu *Papaver*. Nejvýznamnějším alkaloidem této skupiny je morfin (Obr. 10), nejvyšší obsah tohoto alkaloidu je možné nalézt v máku setém (*Papaver somnifera*) a kodein (Obr. 10), který nachází hojně využití jako antitusikum.^{37, 38, 39, 44}



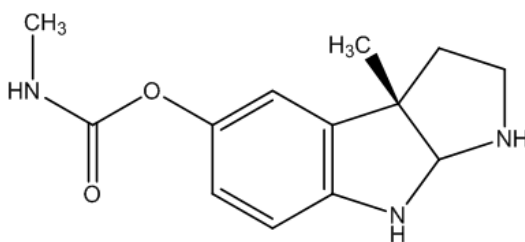
Obrázek 10 – kodein a morfin

Od fenylalaninu se též odvozují alkaloidy, přítomné u rostlin čeledi amarylkovitých (Amaryllidaceae).⁴⁵ Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae (AA) jsou syntetizovány v rámci tzv. norbelladinové cesty (Obr. 15) a dělí se do celé řady strukturních typů. Vzhledem k zaměření této přehledové práce, budou tyto látky podrobněji popsány v následující kapitole (Kap. 3.3).⁴⁶

3.2.1.4 Alkaloidy odvozené od tryptofanu

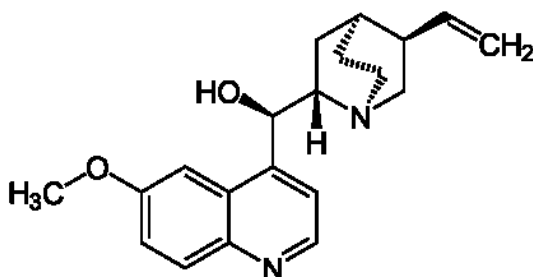
Od tryptofanu odvozujeme tzv. indolové alkaloidy. Patří sem látky s rozličnou chemickou strukturou. Na jejich biogenezi se kromě aminokyseliny účastní také terpenické jednotky. Podle toho rozlišujeme jednoduché, složené a dimerní indolové alkaloidy. Složené indolové alkaloidy můžeme ještě podle počtu obsažených isoprenových jednotek rozdělit na hemiterpenické a monoterpenické.³⁷

Mezi významné jednoduché indolové alkaloidy patří fysostigmin (Obr. 11), nacházející se v semenech puchýrnatce jedovatého (*Physostigma esera*, Fabaceae) z čeledi bobovitých. Fysostigmin působí jako kovalentní reverzibilní inhibitory acetylcholinesterázy, enzymu odpovědného za štěpení acetylcholinu na synaptických štěrbinách nervosvalových plotének.^{37,45} Tato látka byla využívána v terapii Alzheimerovy choroby, ale z důvodu prokázaného hepatotoxického účinku, se přestala tato látka používat a posloužila jako „lead-structure“ pro přípravu derivátu rivastigminu.⁴⁷



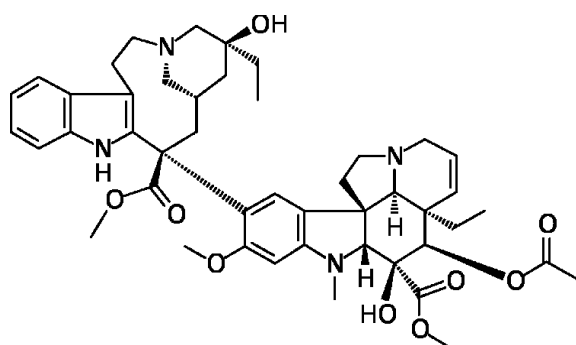
Obrázek 11 – fisostigmin

Mezi farmaceuticky významné složené indolové alkaloidy patří chininové alkaloidy z chinovníku (*Cinchona* sp.). Jde zejména o chinin (Obr. 12) a jemu příbuzné alkaloidy. V humánní medicíně se využívá jako antimalarikum. Působí na parazity v krvi, ale nepůsobí na parazity v játrech. ⁴⁸



Obrázek 12 – chinin

Významným zdrojem složených indolových alkaloidů je i barvínkovec růžový (*Catharanthus roseus*, Apocynaceae). V rostlině je obsaženo více než 70 alkaloidů, přičemž nejvýznamnější jsou vinblastin a vinkristin (Obr. 13), které se využívají terapii různých typů nádorových onemocnění. ⁴⁹



Obrázek 13 – vinblastin a vinkristin

Poslední farmaceuticky významnou skupinou alkaloidů odvozených od tryptofanu jsou sloučeniny produkované vřeckovýtrusnou houbou paličkovicí nachovou (*Claviceps purpurea*), která tvoří podhoubí v semeníku lipnicovitých rostlin (Poaceae, zejména žito) a mění ho v tmavý tvrdý útvar (sklerocium), tzv. námél. Sklerocia obsahují farmaceuticky využitelné alkaloidy tzv. námélové alkaloidy. Tyto látky byly v historii původcem onemocnění zvaného ergotismus. V námelu bylo do dnešní doby identifikováno a popsáno více než 40 těchto alkaloidů, jejichž obsah kolísá mezi 0,024 až 0,4 %, výjimečně až 1 %. Z chemického hlediska se jedná o alkaloidy dvou strukturních typů – farmaceuticky významných derivátů kyseliny lysergové a tripeptidové deriváty ergopeptidy.⁵⁰

Vzhledem k zaměření práce bude dále věnována pozornost AA a možnostem jejich analýzy za využití GC-MS technik.

3.3 Čeleď *Amaryllidaceae*



Obrázek 14 – *Narcissus pseudonarcissus* ⁵¹

Rostliny této čeledi jsou vytrvalé byliny, které mají jako podzemní část oddenky, hlízy nebo nejčastěji cibule. Listy jsou úzké s typicky souběžnou žilnatinou a jsou různě uspořádány. Jako podpěry jim slouží blanité listeny a jejich květenství je šroubovitě či jednotlivě uspořádané. Jedná se rostliny oboupohlavní. Okvětí je různorodé a různobarevné. Jejich plody jsou bobule či tobolky. ^{39, 52}

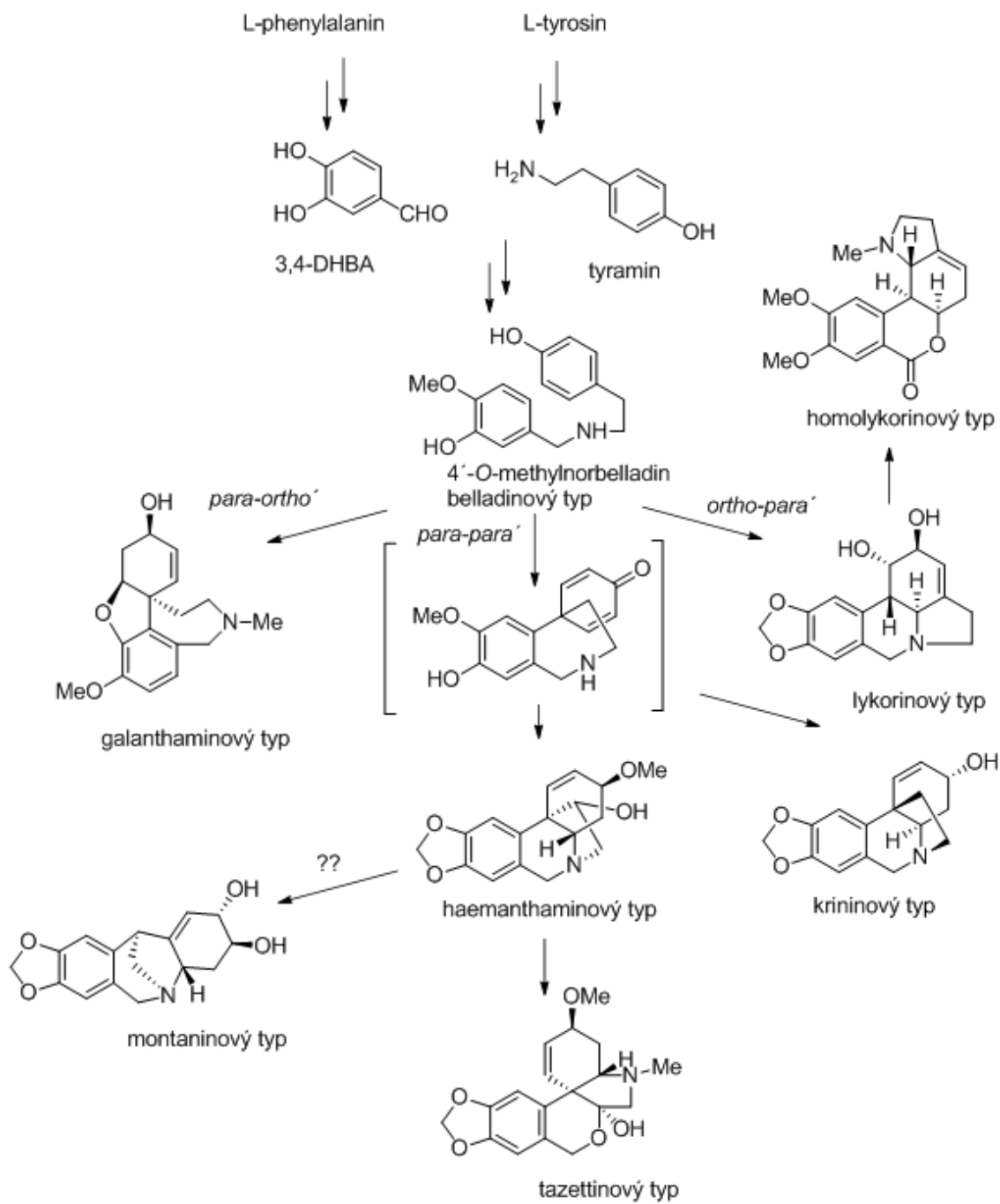
Čeleď *Amaryllidaceae* je velmi bohatá. Tvoří ji okolo 65 až 85 rodů (podle autora), do kterých patří více jak 1100 druhů. ⁵³ Vyskytují se převážně v subtropických a tropických oblastech, ale částečně zasahují i do mírného podnebného pásu. V České republice najdeme rody *Galanthus* (sněženky), *Narcissus* (narcisy) a *Leucojum* (bledule). Pro vědecké účely je tato čeleď zajímavá díky velkému obsahu alkaloidů, které disponují širokou škálou biologických účinků. ^{54, 55} Největší pozornost je těmto látkách věnována z pohledu jejich zásahu do procesů uplatňujících se u neurodegenerativních onemocnění, především Alzheimerovy choroby (AD), a z pohledu jejich cytotoxického působení. Biologická aktivita obsahových látek rostlin čeledi *Amaryllidaceae* byla známá již ve 4. století před Kristem, kdy Hippokrates (přibližně 460–370 př. Kr.) použil extrakt z *Narcissus pseudonarcissus* ⁵⁶ k léčbě nádorů v oblasti dělohy (Obr. 14). Mezi další studované biologické aktivity těchto látek patří antivirová, antibakteriální, protinádorová, antimalarická, antiprotozoální a další. ^{53, 57, 58}

V současnosti bylo popsáno přes 500 těchto alkaloidů, které jsou klasifikovány do celé řady strukturních typů. Tyto látky jsou obsaženy v celé rostlině, ale největší koncentrace je v cibulích, které se v drtivé většině využívají pro analytické, ale především pro fytochemické studie za účelem izolace těchto látek.^{39, 41, 42, 43, 57}

Mezi nejvýznamnější sloučeniny této skupiny patří alkaloid galanthamin, který působí jako selektivní, reverzibilní inhibitor acetylcholinesterázy (AChE). Má schopnost prostupovat hematoencefalickou bariéru a je používaným léčivem v terapii AD.^{43, 46} Mezi další významné alkaloidy, kterým je v literatuře věnována značná pozornost z pohledu jejich protinádorové aktivity patří lykorin, pankracin, narciklasin, haemanthamin, a montanin.⁵⁹

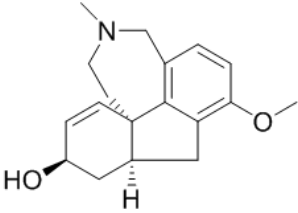
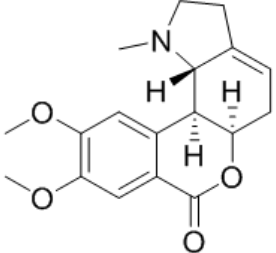
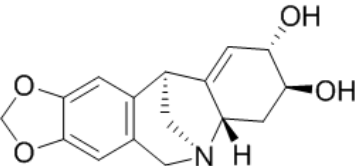
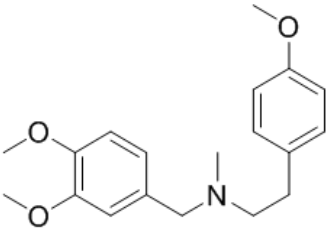
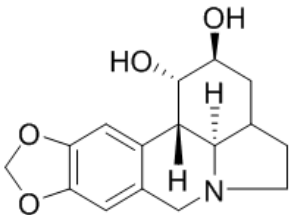
3.3.1 Biosyntéza a strukturní klasifikace Amaryllidaceae alkaloidů

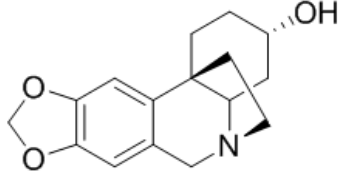
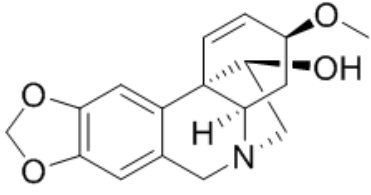
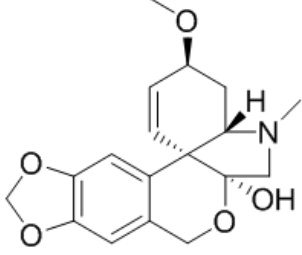
AA jsou odvozeny od norbelladinu a jeho derivátů. Syntéza probíhá tzv. norbelladinovou cestou a začíná u L-fenylalaninu či L-tyrosinu, které po kondenzaci a několika modifikačních krocích vedou ke vzniku klíčového meziprojektu 4-O-methylnorbelladinu (Obr. 15).^{54, 59, 60} Tento meziprojekt podléhá intramolekulárnímu oxidativnímu spojení (*para-ortho'*, *para-para'*, *ortho-para'*) a podle způsobu tohoto spojení vznikají základní strukturní typy těchto alkaloidů (Obr. 15; Tabulka 1): galantaminový, homolykorinový, montaninový, beladinový, lykorinový, krininový, narciklasinový, haemantaminový a tazettinový.^{45, 46, 59, 61} Biosyntetická cesta k montaninovému typu prozatím nebyla zcela uspokojivě vysvětlena. Do dnešní doby bylo identifikováno více než 18 strukturních typů, přičemž u některých z nich není doposud popsána jejich biosyntetická cesta.⁵⁹



Obrázek 15 – Norbelladinová cesta ^{46, 54, 60}

Tabulka 1 – Strukturní typy alkaloidů

STRUKTURNÍ TYP	PŘÍKLAD ALKALOIDŮ	PŘÍKLADY VÝSKYTU
Galanthaminový	 <p style="text-align: center;">galanthamin</p>	<i>Crinum</i> ⁶² <i>Galanthus</i> ^{63, 64} <i>Leucojum</i> ⁶⁵ <i>Narcissus</i> ^{66, 67} <i>Zephyranthes</i> ⁶⁸
Homolykorinový	 <p style="text-align: center;">homolykorin</p>	<i>Hippeastrum</i> ^{69, 70} <i>Narcissus</i> ^{66, 67} <i>Leucojum</i> ⁶⁵
Montaninový	 <p style="text-align: center;">montanin</p>	<i>Hippeastrum</i> ^{69, 70} <i>Lycoris</i> ⁷¹
Belladinový	 <p style="text-align: center;">belladin</p>	<i>Galanthus</i> ⁷² <i>Chlidanthus</i> ⁷³ <i>Nerine</i> ⁶⁶
Lykorinový	 <p style="text-align: center;">lykorin</p>	<i>Hippeastrum</i> ^{69, 70} <i>Leucojum</i> ⁶⁵ <i>Lycoris</i> ^{74, 75} <i>Narcissus</i> ^{66, 67} <i>Zephyranthes</i> ⁶⁸

<p>Krininový</p>	 <p>krinin</p>	<p><i>Crinum</i>⁷⁶ <i>Lycoris</i>^{74, 75} <i>Narcissus</i>^{66, 67}</p>
<p>Haemanthaminový</p>	 <p>haemanthamin</p>	<p><i>Nerine</i>⁷⁷ <i>Zephyranthes</i>⁶⁸</p>
<p>Tazettinový</p>	 <p>tazettin</p>	<p><i>Hippeastrum</i>⁶⁹ <i>Chlidanthus</i>⁷⁸ <i>Zephyranthes</i>⁶⁸</p>

4. VYUŽITÍ GC-MS TECHNIK PŘI ANALÝZE ALKALOIDŮ ROSTLIN ČELEDI AMARYLLIDACEAE

Na katedře farmaceutické botaniky jsou dlouhodobě studovány rostliny čeledi Amaryllidaceae z různých pohledů. Metoda GC-MS je často využívána pro analýzu různých typů (především alkaloidních) extraktů rostlin čeledi Amaryllidaceae za účelem identifikace látek, které se v těchto extraktech vyskytují. Na základě těchto studií jsou pak často vybírány rostliny pro vlastní fytochemickou studii. Dále tyto screeningové studie bývají využívány pro vytipování rostlin s vysokým obsahem požadované látky např. haemanthaminu, montaninu nebo ambellinu.⁶⁸

Vzhledem ke skutečnosti, že do dnešní doby bylo publikováno velké množství studií, které se zabývají zmíněnou technikou, pro tuto diplomovou práci byly vybrány rody čeledi Amaryllidaceae, kterým byla věnována především pozornost na katedře farmaceutické botaniky.

4.1 Rod *Zephyrantes*



*Obrázek 16 – Zephyrantes grandiflora*⁷⁹

Rod čítá více než 90 druhů trvalek s atraktivními květy, které kvetou po vydatných deštích, a dokonce i několikrát do roka.^{80, 81, 82} Tento rod se vyskytuje na západní polokouli ve vyšších nadmořských výškách, například v Argentině, kde se rostlinám daří i při nižších teplotách. Rostlinám se velmi dobře daří v oblastech od mírného pásu až po tropický.⁶² Navzájem se od sebe odlišují velikostí listů, cibule i podle barvy květů.⁷³

Rostliny rodu *Zephyrantes* (Z.) byly v některých zemích využívány v tradičním léčitelství.^{44, 59} Konkrétně druh *Z. rosea* byl využíván v Číně pro léčbu rakoviny prsu nebo *Z. candida* byl používán v oblastech Afriky pro léčbu diabetu.^{56, 59} *Z. carinata* je znám pro léčebné účely při různých dermatologických onemocněních (akné, mykózy), také při dětských virových chorobách (spalničky, soborey).^{56, 83} Využití různých druhů rodu *Zephyrantes* je aplikováno na jednoduché zdravotní potíže, např. bolest hlavy a nachlazení, až po komplikovanější onemocnění, např. tuberkulóza.^{64, 83, 84}

Alkaloidy nacházející se v rodu *Zephyrantes* jsou klasifikovány do různých strukturních typů. Celá řada těchto látek byla studována i z pohledu jejich biologických studií.⁶⁴

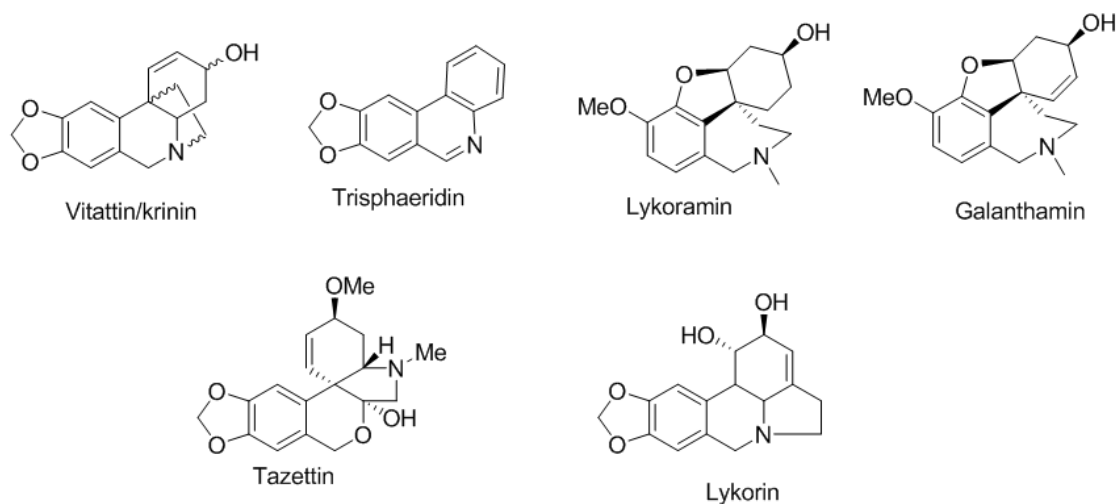
Za využití GC-MS bylo doposud studováno 7 druhů rodu *Zephyranthes* (Tab. 2). V drtivé většině byly studovány alkaloidní extrakty, v nichž se podařilo identifikovat 29 Amaryllidaceae alkaloidů, které patří do různých strukturních typů. Mezi nejvíce zastoupené alkaloidy patří alkaloidy haemanthaminového, lykorinového a galanthaminového typu. V alkaloidním extraktu *Z. carinata* byly v rámci nejnovější studie z roku 2015⁸⁵ jako hlavní alkaloidy identifikovány vittatin, respektive krinin (30,84 % TIC). Tyto látky jsou sobě navzájem enantiomery a za využití GC-MS techniky, není možné tyto látky od sebe odlišit. Pro jejich konečnou identifikaci by tento alkaloid musel být z extraktu izolován a podroben minimálně měření optické otáčivosti. Mezi další hlavní obsahové látky tohoto druhu patří narciklasinový alkaloid trisphaeridin (12,48 % TIC), galanthaminový alkaloid lykoramin (11,13 % TIC) a lykorin (8,66 % TIC), který je hlavní zástupce lykorinového strukturního typu. Tazettin (69,7 % TIC) byl jako hlavní obsahová látka identifikován v *Z. fillifolia*⁸⁶; galanthamin (63 % TIC) byl identifikován jako hlavní obsahová látka u *Z. concolor*⁸⁰. Podrobné výsledky GC-MS studií a struktury hlavních alkaloidů jsou shrnuty v následující tabulce a obrázku (Tab. 2; Obr. 17).

Tabulka 2 – Alkaloidy identifikované pomocí GS-MS v cibulích rostlin druhů rodu *Zephyrantes*

Alkaloidy	<i>Z. car.</i> ⁸⁵	<i>Z. rob.</i> ⁸⁷	<i>Z. grand.</i> ⁸⁸	<i>Z. con.</i> ⁸⁰	<i>Z. fil.</i> ⁸⁶	<i>Z. can.</i> ⁸⁹	<i>Z. ros.</i> ⁸⁹
	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	ng/mg*	ng/mg*
Hordenin	-	-	-	<1	-	-	-
5,6-Dihydrobicolorin	-	-	-	-	1,7	-	-
Galanthamin	-	3	5	63	17,8	0,015	0,095
Chlidantin	-	-	-	24	-	-	-
Methylgalanthamin	-	-	-	<1	-	-	-
11,12-Dehydrolykoramin	0,54	-	-	-	-	-	-
Trisphaeridin	12,48	-	-	-	1,2	0,199	0,364
Lykoramin	11,13	27	30	-	-	0,035	1,968
Sanguinin	-	-	-	3	-	-	-
Epinorgalanthamin	-	-	-	1	-	-	-
Epigalanthamin	-	-	-	<1	-	-	-
Vittatin/Krinin**	30,84	5	21	-	-	0,02	0,508
3-OxoKrinin	1,76	-	-	-	-	-	-
3-O-Demethylmaritidin	4,80	-	-	-	-	-	-
Maritidin	0,07	-	-	-	-	-	-
11,12-Didehydroanhydrolykorin	7,52	-	-	-	-	-	-
Narwedín	-	-	-	1	0,9	-	-
Acetylgalanthamin	-	-	-	<1	-	-	-
Montanin	-	-	-	<1	-	-	-
Nerbowdin	-	2	3	-	-	-	-
Haemanthamin	-	15	23	-	-	1,908	1,329
Tazettin	4,06	6	2	-	69,7	-	-
Galanthin	5,46	42	16	-	-	-	5,72
Lykorin	8,66	-	-	8	-	17,904	1,618
Pseudolykorin	-	-	-	-	-	-	1,236
8-O-Demethylmaritidin	-	-	-	-	-	-	0,035
3-Epimacronin	1,22	-	-	-	-	-	-
Ismín	-	-	-	-	0,7	-	-
Aulicin	-	-	-	-	-	-	0,273

Z. car. – *Zephyrantes carinata*, *Z. rob.* – *Zephyrantes robusta*, *Z. grand.* – *Zephyrantes grandiflora*, *Z. con.* – *Zephyrantes concolor*, *Z. fil.* – *Zephyrantes filifolia*, *Z. can.* – *Zephyrantes candida*, *Z. ros.* – *Zephyrantes rosea*; * počítáno jako ng/mg hmotnosti cibule; ** není možné rozlišit za využití GC-MS techniky.

Relativní podíl každého alkaloidu byl stanoven jako procento z celkového iontového proudu (TIC). U druhů *Z. carinata* a *Z. rosea* byl obsah jednotlivých alkaloidů vyjádřen jako ng/mg hmotnosti cibule.



Obrázek 17 – Struktury vybraných identifikovaných Amarylidaceae alkaloidů v rodu *Zephyranthes*

Většina analyzovaných extraktů byla studována z pohledu jejich inhibičního potenciálu vůči enzymu v AChE, jejíž inhibice se využívá v terapii AD.⁹⁰ Některé extrakty byly také studovány z pohledu inhibičního potenciálu vůči butyrylcholinestráze (BuChE), dalšího enzymu, který se uplatňuje v patogenezi AD. Výsledky těchto studií jsou shrnuty v následující tabulce číslo 3. Zajímavý AChE inhibiční potenciál byl zjištěn u alkaloidních extraktů *Z. carinata*⁸⁵ (IC_{50} AChE $5,97 \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$) a *Z. filifolia*⁸⁶ (IC_{50} BuChE $1,0 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$) za inhibiční potenciál alkaloidního extraktu *Z. filifolia* bude s velkou pravděpodobností zodpovědný galanthamin (17,8 % TIC)⁸⁶, který byl identifikován vedle tazettinu (69,7 % TIC)⁸⁶ jako druhá hlavní obsahová látka tohoto druhu. V případě alkaloidního extraktu *Z. carinata*⁸⁵ je otázkou, který alkaloid je zodpovědný za inhibiční potenciál, neboť v extraktu nebyl identifikován galanthamin a ostatní alkaloidy (izolovány v rámci různých fytochemických studií) nedisponují významnou inhibiční aktivitou vůči AChE ani BuChE.

Tabulka 3 – Inhibiční aktivita AChE a BuChE v cibulích rostlin druhů rodu *Zephyrantes*

Rostlina	IC ₅₀ AChE ± SD (µg/ml)	IC ₅₀ BuChE ± SD (µg/ml)
<i>Z. carinata</i> ⁸⁵	5,97 ± 0,24	-
<i>Z. robusta</i> ⁸⁷	35,9 ± 3,5	190,9 ± 8,2
<i>Z. grandiflora</i> ⁸⁸	39,2 ± 3,0	356 ± 9,3
<i>Z. concolor</i> ⁸⁰	20,2 ± 3,5 % ^a 88,0 ± 0,2 % ^b	-
<i>Z. filifolia</i> ⁸⁶	1,0 ± 0,08	-
<i>Z. candida</i> ⁸⁹	57,2 ± 8,3	-
<i>Z. rosea</i> ⁸⁹	10,2 ± 1,7	-

^a% inhibice AChE při koncentraci 0,1 µg/ml; ^b% inhibice AChE při koncentraci 10 µg/ml (nebyla počítána hodnota IC₅₀ AChE)

4.2 Rod *Nerine*



Obrázek 18 – *Nerine bowdenii* ⁹¹

Rod *Nerine* (*N.*) zahrnuje přibližně 30 druhů rostlin, a proto patří k nejrozsáhlejším rodům čeledi Amaryllidaceae. Jedná se o celoročně rostoucí rostliny, jejich druhy obývají oblasti s letními srážkami a suchými zimami. ^{46, 92} Rostliny se využívají v lidové medicíně v oblastech Jižní Afriky. Domorodé kmeny používali výtažky z cibulí na léčbu nachlazení, jaterních a ledvinných potíží, k úlevě od bolesti zad a také jako lék podporující plodnost. ^{92, 93} Nejvýznamnějším a nejvíce prozkoumaným druhem z fytochemického hlediska je *Nerine bowdenii* (Obr. 18). ^{94, 95}

První zmínka o rostlinách rodu *Nerine* sahá do roku 1635, kdy byl druh *Nerine sarniensis* popsán jako *Narcissus japonicus rutilo*. Až okolo roku 1820 byl klasifikován samostatný rod *Nerine*. ⁹⁶

Během minulého i současného století bylo publikováno několik studií zabývajících se fytochemickou stránkou tohoto rodu. Bylo izolováno mnoho alkaloidů, náležících do několika strukturních typů, a to například undulatin, buphanisin ⁹⁴, belladin, krinamin. ⁹⁵ Ve stopovém množství například ungeremin. ⁹⁷

Do dnešní doby byly podrobeny 4 druhy rodu *Nerine* fytochemické analýze za využití techniky GC-MS. ^{66, 77, 98} Na základě GC-MS analýzy alkaloidních extraktů bylo v cibulích identifikováno 26 AA různých strukturních typů (Tab. 4). Hlavní identifikované alkaloidy patří k různým strukturním typům a to belladinovému, krininovému a homolykorinovému (Tab. 1). Nejprostudovanější rostlinou rodu *Nerine* z fytochemického hlediska je jednoznačně *N. bowdenii*. V rámci screeningové studie za využití GC-MS techniky bylo identifikováno 19 AA, přičemž jako hlavní složka byl identifikován belladin (49 % TIC) ⁷⁷.

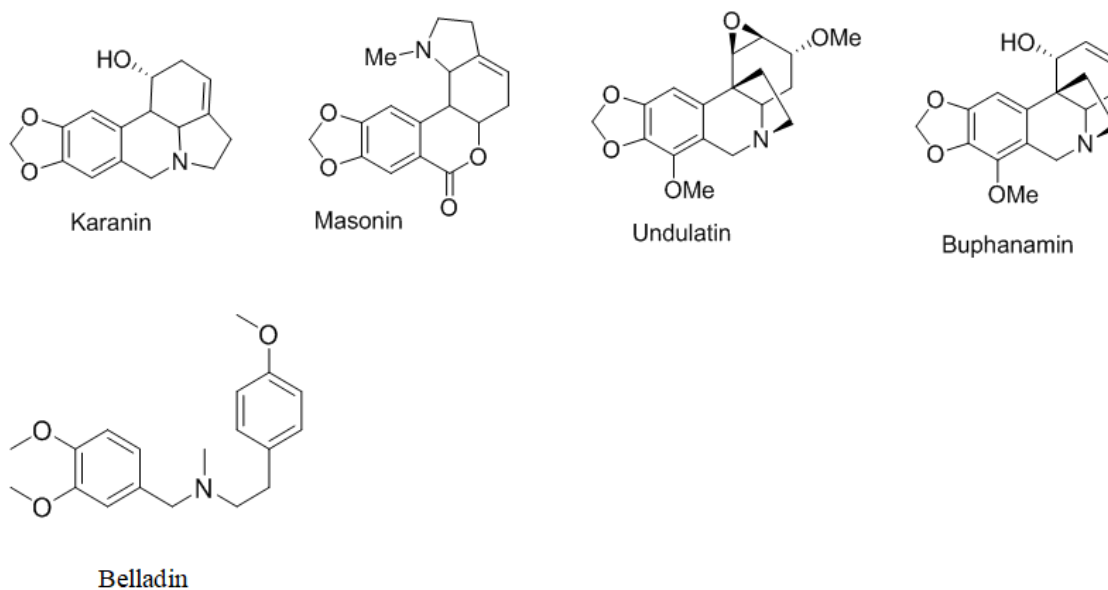
Mezi další, významně zastoupené látky, patří i alkaloidy krininového typu, jichž bylo identifikováno více než 10 (Tab. 4). Hlavní obsahovou složkou alkaloidního extraktu *N. undulata* byl alkaloid krininového typu undulatin (56 %) a významně byl zastoupen i další alkaloid krininového typu buphanamin (11% TIC). Undulatin (45 % TIC) společně s buphanaminem (20 % TIC) byly identifikovány jako hlavní obsahové látky také v extraktu *N. filamentosa* ⁶⁶. Společně s druhem *N. filamentosa* byl také v rámci fytochemické studie z roku 2012 ⁶⁶ studován alkaloidní profil *N. filifolia*, jehož hlavním identifikovaným alkaloidem byl alkaloid homolykorinového typu masonin (71 % TIC). Dalším významným alkaloidem byl například karanin (9 % TIC). Výsledky zmíněných analytických fytochemických studií, společně se vzorci hlavních obsahových složek alkaloidních extraktů, jsou shrnuty v následující tabulce a obrázku (Tab. 4, Obr. 19)

Tabulka 4 – Alkaloidy identifikované pomocí GS-MS v cibulích rostlin rodu *Nerine*

Alkaloidy	<i>N.undulata</i> ⁹⁸	<i>N. bowdenii</i> ⁷⁷	<i>N. filifolia</i> ⁶⁶	<i>N. filamentosa</i> ⁶⁶
	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)
<i>O</i> -Methylodulin	-		1	-
Buphanisin isomer I	-	1,4	-	-
Buphanisin isomer II	-	0,7	-	-
Buphanidrin	5	2,9	-	-
Buphanamin	11	1,1	-	20
Krinamin	-	1,9	-	-
Flexinin	1	-	-	-
Undulatin	56	3,6	-	45
11- <i>O</i> -Acetylbambellin	-	4,5	-	-
Ambellin	3	9,1	-	13
<i>N</i> -Demethylmasonin	-		11	-
Acetylnerbowdine	-	0,7	-	-
Krinamidin	2	0,4	-	-
Bowdesin	3	2,9	-	-
11- <i>O</i> -Acetyl-1,2-epoxyambellin	-	0,4	-	-
Krinin	-	1,3	2	-
Belladin	-	49,9	-	-
Karanin	-	0,2	9	-
Acetylkarenin	-	2,6	1	-
<i>N</i> -Demethylbelladin	-	8,5	-	-
Acetylfalcatin		0,1	-	-
Powellin	-	0,3	-	-
Acetylparkamin	-	-	-	11
Parkamin	-	-	-	3
Masonin	-	-	71	-
Lykorin	-	-	4	2

(m/z = % relative intensity)

Relativní podíl každého alkaloidu byl stanoven jako procento z celkového iontového proudu (TIC).



Obrázek 19 – Struktury vybraných identifikovaných Amarylidaceae alkaloidů v rodu *Nerine*

Alkaloidní extrakty byly dále studovány na jejich inhibiční potenciál vůči enzymům AChE/BuChE. Všechny extrakty vykázaly spíše střední až slabý inhibiční potenciál vůči studovaným enzymům (Tab. 5). Vzhledem k absenci alkaloidů, které disponují schopností inhibovat AChE, jsou slabší inhibiční aktivity těchto extraktů vysvětlitelné. Ani v jednom z extraktů nebyly identifikovány alkaloidy galanthaminového strukturního typu.

Tabulka 5 – Inhibiční aktivita AChE a BuChE v cibulích rostlin druhů rodu *Nerine*

Rostlina	IC ₅₀ AChE ± SD (µg/ml)	IC ₅₀ BuChE ± SD (µg/ml)
<i>N. undulata</i> ⁹⁸	14,3 ± 1,2	33,9 ± 1,9
<i>N. bowdenii</i> ⁷⁷	87,9 ± 3,5	14,8 ± 1,1
<i>N. filifolia</i> ⁶⁶	18,5 ± 0,8	58,6 ± 1,3
<i>N. filamentosa</i> ⁶⁶	21,6 ± 1,1	13,0 ± 0,7

4.3 Rod *Narcissus*



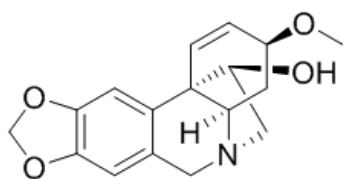
Obrázek 20 – *Narcissus nanus* ⁹⁹

Na světě je známo přibližně 80 botanických druhů rodu *Narcissus* (*N.*). Jsou to jednoděložné byliny s podzemní cibulí. Alkaloidy rodu *Narcissus* jsou zkoumány v rámci fytochemického výzkumu téměř 200 let za účelem poznání jejich biologických aktivit. Již řada těchto alkaloidů i syntetických derivátů byla podrobena velkému množství studií. ⁵⁹

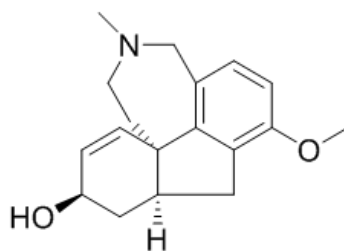
V rámci následujícího přehledu studií, ^{100, 101, 102}, které se zabývaly GC-MS analýzami rostlin rodu *Narcissus*, byla věnována pozornost pěstovaným odrůdám těchto rostlin, protože tyto odrůdy mohou být významným komerčním zdrojem AA pro farmaceutické účely. Pěstované odrůdy jsou snadno komerčně dostupné. K dispozici jsou ve významném množství a také dostupné po finanční stránce. Těmto odrůdám byla věnována značná pozornost na domácím pracovišti, především za účelem výběru vhodné rostliny pro fytochemické studie. Cílem těchto studií byl výběr takové odrůdy, aby z ní mohly být izolovány alkaloidy v množství, které by bylo použitelné pro

podrobné biologické studie a případně i přípravu polosyntetických derivátů. Vzhledem k množství analyzovaných botanických druhů a pěstovaných odrůd rodu *Narcissus* by kompletní přehled těchto prací výrazně přesahoval rámec diplomové práce. Z těchto důvodů jsou v následujícím textu podrobně rozebrány pěstované odrůdy odvozené od *N. nanus* (Obr. 20) a některé další vybrané pěstované odrůdy studované na katedře farmaceutické botaniky v předchozích letech.

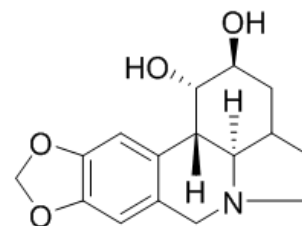
V rámci studie z roku 2014¹⁰¹ byly studovány tři pěstované odrůdy odvozené od *N. nanus* jako potenciální zdroj AA pro biologické studie. Hlavní obsahovou látkou třech odrůd (Little Gem, Topolino a Midget) byl identifikován haemanthamin (Obr. 21), (Little Gem 50 % TIC, Topolino 34 % TIC, Midget 51 % TIC).¹⁰¹ Pouze u odrůdy Elka byl hlavní obsahovou látkou identifikován lykorin (Tab. 6, Obr. 21). Pěstované odrůdy narcisů jsou často studovány z pohledu % zastoupení galanthaminu (Obr. 21), jako potenciální zdroj pro jeho izolaci. V případě diskutovaných odrůd byl galanthamin identifikován pouze u dvou z nich, a to pouze v nízké koncentraci (Topolino 3% TIC; Elka 4 % TIC). Je zřejmé, že tyto kultivary nejsou vhodné jako zdroj galanthaminu. Na druhou stranu obsah již zmíněného haemanthaminu (Tab. 8) je především u třech odrůd zajímavý a mohl by sloužit jako zdroj pro jeho izolaci. To především z důvodu, že na katedře farmaceutické botaniky je dlouhodobě věnována pozornost tomuto alkaloidu z pohledu jeho protinádorové aktivity a přípravě jeho polosyntetických derivátů. Některé extrakty těchto odrůd byly také studovány z pohledu jejich inhibičního potenciálu vůči AChE/BuChE (Tab. 8), přičemž zajímavá aktivita byla zjištěna u *N. nanus* cv. Little Gem v případě inhibice BuChE ($IC_{50} 15,1 \pm 8,4$).¹⁰¹ Otázkou zůstává, která složka extraktu je zodpovědná za tento inhibiční potenciál, vzhledem k tomu, že ani jeden identifikovaný alkaloid tímto potenciálem nedisponuje. Mohlo by se případně jednat o synergické působení více látek, nebo je v extraktu přítomná látka, kterou se nepodařilo identifikovat.



Lykorin



Haemathamin



Galanthamin

Obrázek 21 - Struktury vybraných identifikovaných Amarylidaceae alkaloidů v rodu *Narcissus*

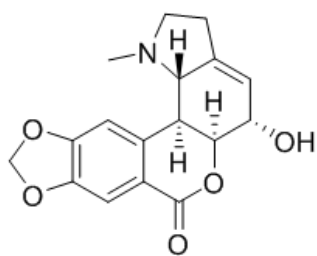
Tabulka 6 – Alkaloidy identifikované pomocí GS-MS v cibulích odrůd druhu *N. nanus*¹⁰¹

Alkaloidy	<i>N. nanus</i> cv. Little Gem	<i>N. nanus</i> cv. Topolino	<i>N. nanus</i> cv. Elka	<i>N. nanus</i> cv. Midget
	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)
Galanthamin	-	3	4	-
Lykoramin	-	1	21	-
Lycoraminon	-	-	1	-
<i>N</i> -Demethyllykoramin	-	-	>1	-
Narwedín	-	-	1	-
Anhydrolykorin	-	-	>1	-
Karanin	4	-	3	4
Acetyllykoramin	-	-	1	-
Pluviin	6	32	-	11
Assoanin	1	4	-	>1
Haemanthamin	50	34	8	51
11-12-Didehydroassoanin	1	1	-	>1
Galanthin	10	11	-	9
Lykorin	5	3	59	4
Inkartin	2	-	-	>1
Narcissidin	2	-	-	3

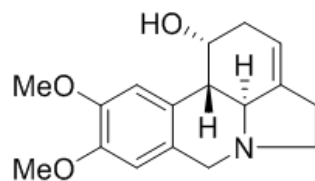
V publikaci z roku 2013¹⁰⁰ byly studovány alkaloidní extrakty 11 pěstovaných odrůd rodu *Narcissus*, jako potenciální zdroje AA, s ohledem na jejich inhibiční potenciál vůči AChE/BuChE. Profil alkaloidů byl stanoven pomocí GS-MS, kde bylo detekováno 42 sloučenin a z nich bylo 29 alkaloidů identifikováno. U odrůd *N. poeticus* cv. Double smiles (38 % TIC), *N. poeticus* cv. Gigantic Star (55 % TIC) a *N. pseudonarcissus* cv. W. P. Milner (64 % TIC) je hlavním alkaloidem galanthamin (Obr 22). U *N. poeticus* cv. Golden Ducat (29 % TIC) a u *N. poeticus* cv. Pink Accent (20 % TIC) byl nejvíce zastoupen galantin (Obr. 22). U *N. poeticus* cv. Pink Parasol byl detekován jako hlavní alkaloid hippeastrin (31 % TIC), (Obr. 22), u *N. nanus* byl detekován v největším zastoupení pluviin (39 % TIC), (Obr. 22). Homolykorin (Obr. 22) byl nejvíce zastoupen u *N. Sir W. Churchill* (61 % TIC) a u *N. cv. Sealing* (29 % TIC). U *N. cv. Brackenhurst* byl detekován jako hlavní alkaloid lykorin (35 % TIC), (Obr. 22).¹⁰⁰ Významný inhibiční potenciál vůči AChE u odrůd odvozených od *N. poeticus* se dá vysvětlit vysokým obsahem alkaloidu galanthaminu u odrůd Double Smiles (38 % TIC), Golden Ducat (27 % TIC), Gigantic Star (55 % TIC), Brackenhurst (19 % TIC), Milner (64 % TIC), kde jeho obsah přesahoval 19 %. U odrůdy Thalia (7 % TIC) byl obsah 7 %, avšak tato odrůda vykazovala také významný inhibiční potenciál vůči AChE. Nedá se tedy jednoznačně určit aktivita inhibičního potenciálu

z procentuálního zastoupení galantaminu. Významná aktivita byla zjištěna u *N. poeticus* cv. Pink Parasol v případě inhibice BuChE (IC_{50} BuChE $3,3 \pm 0,5$).

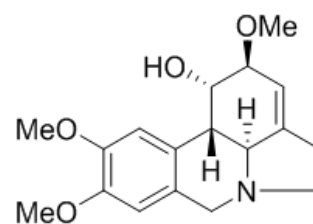
Studie z roku 2018¹⁰² se zabývala narcisy jako potencionálním zdrojem biologicky aktivních látek. Bylo vyhodnoceno 40 okrasných taxonů pro jejich alkaloidní profil a inhibiční aktivitu AChE/BuChE. Jak již bylo zmiňováno největší aktivitu vůči AChE/BuChE má galanthamin (Obr. 22). Nedávný výzkum ukázal farmaceuticky výhodné účinky u lykorinu a haemanthaminu (protinádorové léčiva); (Obr. 22), proto ze studie byli vybráni odrůdy rodu *Narcissus*, u kterých bylo detekováno nejvíce farmaceuticky zajímavých alkaloidů. V tabulce č. 7 je uvedeno zastoupení alkaloidů u *N. cv. Profesor Einstein* (galanthamin 69 % TIC) a *N. cv. Dutch Master* (lykorin 90 % TIC). Všechny extrakty byly podrobeny screeningu na jejich AChE a BuChE aktivitu.¹⁰² Hlavní obsahovou látkou u odrůdy Professor Einstein byl identifikován homolykorin (39 % TIC), (Obr. 22). Další významné alkaloidy u této odrůdy jsou haemanthamin (16 % TIC), hippeastrin (15 % TIC) a lykorin (10 % TIC). Dutch Master, jako další vybraná odrůda, má jako hlavní obsahovou látku haemanthamin (32 % TIC), (Obr. 22). Tyto kultivary nejsou vhodné jako zdroj galantaminu. Na druhou stranu obsah haemanthaminu (Obr. 22) je především u těchto dvou odrůd zajímavý. *N. cv. Professor Einstein* a *N. cv. Dutch Master* by mohli sloužit jako zdroj pro izolaci haemantaminu v dalších fytochemických studiích. Z tabulky č. 8 je patrné, že inhibiční aktivita vůči AChE/BuChE těchto dvou kultivarů není významná.



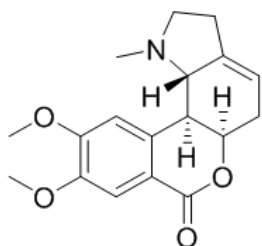
Hippeastrine



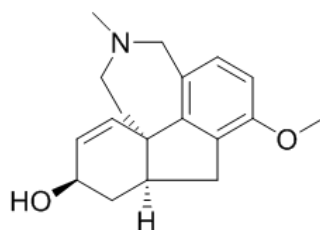
Pluviin



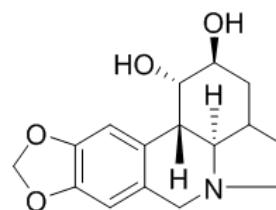
Galanthin



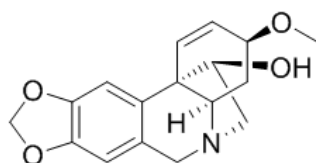
Homolykorin



Galanthamin



Lykorin



Haemanthamin

Obrázek 22 – Struktury vybraných identifikovaných Amarylidaceae alkaloidů v rodu *Narcissus*

Tabulka 7 – Alkaloidy identifikované pomocí GS-MS v cibulích rostlin rodu *Narcissus*

Alkaloidy	<i>N. poeticus</i> cv. Double Smiles ¹⁰⁰	<i>N. poeticus</i> cv. Golden Ducat ¹⁰⁰	<i>N. poeticus</i> cv. Gigantic Star ¹⁰⁰	<i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol ¹⁰⁰	<i>N. poeticus</i> cv. Pink Accent ¹⁰⁰	<i>N. poeticus</i> cv. Brackenhurst ¹⁰⁰	<i>N. cv. Thalia</i> ¹⁰⁰	<i>N. pseudonarcissus</i> cv. W. P. Milner ¹⁰⁰	<i>N. cv. Sir W. Churchill</i> ¹⁰⁰	<i>N. cv. Professor Einstein</i> ¹⁰²	<i>N. cv. Dutch Master</i> ¹⁰²
	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)	TIC (%)
Galanthamin	38	27	55	-	5	19	7	64	6	-	1
Lykoramin	-	2	2	6	-	-	-	-	-	<1	2
Epinykoramin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>O</i> -Methylodulin	-	-	8	6	-	-	-	-	-	-	-
Krinin	1	<1	-	<1	-	-	-	-	-	-	-
Narwedín	-	<1	-	2	2	11	-	5	-	-	-
<i>O</i> -Methyllykorenin	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maritidin	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Karenin	-	-	-	-	2	3	-	6	-	-	-
Odulin	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-
Pluviin	30	-	-	-	4	-	-	-	-	1	3
Norpluviin	<1	<1	-	-	-	-	-	7	-	3	-
11,12-Didehydroanhydrolykorenin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Pankracin	-	-	-	>1	-	-	-	-	-	11	-
Lykorenin	-	2	-	-	-	-	8	-	-	-	7
5-Hydroxyhomolykorenin (Isomer I)	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
5-Hydroxyhomolykorenin (Isomer II)	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
Haemanthamin	-	26	17	-	42	20	40	18	21	16	32
Tazetin	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Masonin	-	-	4	2	-	-	-	-	-	-	9
N-Demethylmasonin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Galantin	8	29	-	6	20	6	-	-	-	-	-
Lykorenin	-	-	-	14	8	33	-	-	5	10	-
Inkartin	-	-	-	2	2	3	-	-	-	-	-
Homolykorenin	-	6	-	3	-	-	20	-	61	39	20
Hippeastrin	-	-	-	31	-	-	-	-	-	15	-
Narcissidin	-	-	-	<1	-	-	-	-	-	-	-

Tabulka 8 – Inhibiční aktivita AChE a BuChE v cibulích rostlin druhů rodu *Narcissus*

Rostlina	IC ₅₀ AChE ± SD (µg/ml)	IC ₅₀ BuChE ± SD (µg/ml)
<i>N. nanus</i> cv. Little Gem ¹⁰¹	309,2 ± 33,4	15,1 ± 8,4
<i>N. nanus</i> cv. Topolino ¹⁰¹	23,1 ± 4,1	91,5 ± 6,7
<i>N. nanus</i> cv. Elka ¹⁰¹	17,3 ± 2,1	25,1 ± 1,8
<i>N. poeticus</i> cv. Double Smiles ¹⁰⁰	3,2 ± 0,5	44,9 ± 4,2
<i>N. poeticus</i> cv. Golden Ducat ¹⁰⁰	3,7 ± 0,8	38,2 ± 2,2
<i>N. poeticus</i> cv. Gigantic Star ¹⁰⁰	3,2 ± 0,6	16,2 ± 1,0
<i>N. poeticus</i> cv. Pink Parasol ¹⁰⁰	191,3 ± 20,2	3,3 ± 0,5
<i>N. poeticus</i> cv. Pink Accent ¹⁰⁰	22,1 ± 3,3	48,3 ± 7,6
<i>N. poeticus</i> cv. Brackenhurst ¹⁰⁰	5,0 ± 0,8	45,8 ± 4,3
<i>N. poeticus</i> cv. Thalia ¹⁰⁰	4,0 ± 0,9	54,7 ± 4,0
<i>N. poeticus</i> cv. W. P. Milner ¹⁰⁰	2,7 ± 0,5	23,1 ± 2,1
<i>N. poeticus</i> cv. Sir W. Churchill ¹⁰⁰	23,0 ± 5,2	41,3 ± 6,4
<i>N.</i> cv. Professor Einstein ¹⁰²	476 ± 60	49,9 ± 5,4
<i>N.</i> cv. Dutch Master ¹⁰²	25,5 ± 0,8	62,9 ± 1,9

5. DISKUSE

Techniky MS jsou hojně využívány v analýze přírodních látek, a to hlavně ve farmakologii, biomedicině či potravinářském průmyslu. Mezi nejčastěji používané techniky patří EI, CI, ESI, APCI a MALDI.⁷ Spojením MS se separační metodou se docílilo kvalitnějších výsledků analýz přírodních látek. Velmi výhodným spojením zvláště pro netěkavé látky, látky velmi polární nebo látky nestabilní povahy je HPLC-MS. CE ve spojení s MS je srovnatelná svou účinností s HPLC-MS a hodí se především pro analýzu látek iontové povahy.^{1, 3} V rámci této přehledové diplomové práce byl kladen důraz na využití GC-MS v analýze extraktů rostlin čeledi Amaryllidaceae.

Léčivé vlastnosti těchto rostlin byly známy již ve čtvrtém století před naším letopočtem, když Hippokrates použil olej z *N. poeticus L.*, pro léčbu nádorů dělohy.¹⁰³ Antimikrobiální aktivita alkaloidů Amaryllidaceae je často uváděna v úvodcích k výzkumným článkům. Ve skutečnosti existuje jen málo zpráv na podporu tohoto tvrzení. V odborných pracích se nejvíce zabývají otázkou inhibiční aktivity cholinesteráz. Bylo publikováno spoustu odborných studií na toto téma, ve kterých se autoři nejprve zabývali stanovením profilu alkaloidů u jednotlivých zástupců rodů z čeledi Amaryllidaceae. Toho jsem využila ve své rešeršní práci a zaměřila se na porovnávání profilů alkaloidů, které byly stanoveny pomocí GC-MS jako záznamy spekter u vybraných rodů čeledi Amaryllidaceae. Identifikace jednotlivých složek byla prováděna především porovnáváním získaných spekter s referenčními spektry především komerčních databází. Pro vypracování rešerše bylo vybráno pět zástupců z čeledi Amaryllidaceae. Jednalo se o rody *Zephyrantes*, *Nerine* a *Narcissus*.

Za využití GC-MS techniky byly identifikovány jednotlivé alkaloidy u všech zmiňovaných rodů. Byly určeny látky různých strukturních typů. Bohužel, ne u všech látek se podařilo určit jejich strukturu. Mohlo se jednat o látky, jejichž hmotnostní spektra nejsou dostupná v literatuře, komerčních knihovných spekter, nebo o látky, které ještě nebyly identifikovány a strukturně určeny v době publikování studií, na které se tato práce zaměřuje.

U rodu *Zephyrantes* bylo doposud studováno 7 druhů, přičemž za využití GC-MS techniky se podařilo identifikovat 29 AA. V největším zastoupení byly detekovány alkaloidy galantamin, lykoramin, vittatin a galantin. Galantamin je alkaloid velmi důležitý pro farmakologickou léčbu Alzheimerovy choroby.

Rostliny rodu *Nerine* představují zajímavý rod s potenciálním využitím ve farmacii. Celá řada druhů tohoto rodu byla podrobena fytochemickým studiím, a to hlavně z pohledu biologické aktivity. Mezi nejvýznamnější biologické účinky alkaloidů rodu *Nerine* patří protinádorové účinky a inhibiční aktivita vůči cholinesterázám.¹⁰³ Alkaloidy, které byly nejvíce zastoupeny u zvolených druhů, jsou undulatin, belladin a masonin.

Rod *Narcissus* byl široce používán v tradiční medicíně k léčbě různých druhů onemocnění. V současné době je známo více než 100 AA spadajících do celé řady strukturních typů.¹⁰⁴ V rámci různých fytochemických studií byla značná pozornost věnována nejen botanickým druhům, ale i pěstovaným odrůdám. Pěstované odrůdy rodu *Narcissus* jsou komerčně dostupné v dostatečném množství, a tak mohou být používány pro izolaci biologicky aktivních alkaloidů Amaryllidaceae. Příkladem může být galantamin, který je do dnešní doby izolován pro komerční účely z některých pěstovaných odrůd narcisů např. Carlton.^{105, 106} Většina fytochemických studií postavených na okrasných rostlinách Amaryllidaceae se zabývá obsahem galantaminu v cibulích a listech. Kromě galantaminu byly u rodu *Narcissus* identifikovány v největším zastoupení alkaloidy galantin, lykorin, haemantamin, hippeastrin, pluviin a homolykorin. U tohoto rodu byl identifikován nejvíce obsáhlý profil alkaloidů ve srovnání s dalšími rody z čeledi Amaryllidaceae.

6. ZÁVĚR

Shrneme-li výsledky této diplomové práce, můžeme říci, že ze studovaných druhů se pro další fytochemické výzkumy nejlépe hodí rostliny obsahující alkaloid galantamin. GC-MS se osvědčila jako užitečný nástroj při identifikaci a kvantifikaci alkaloidů Amaryllidaceae. Tyto techniky se úspěšně použily při vytipování rostlin pro vlastní fytochemické studie za účelem izolace nových struktur z extraktů. Zajímavostí o Amaryllidaceae alkaloidech je nejen jejich potvrzená selektivita působení proti nádorovým buňkám s minimem negativních účinků na zdravé buňky organismu, ale i další biologické aktivity. Naopak nevýhodou pro rozsáhlejší studium alkaloidů s protinádorovým účinkem a jejich použití je náročná izolace z přírodních zdrojů. Závěrem lze říci, že rody *Zephyrantes*, *Nerine* i *Narcissus* jsou vhodné pro izolaci Amaryllidaceae alkaloidů různých strukturních typů.

7. POUŽITÉ ZKRATKY

ZKRATKA	ČESKÝ VÝZNAM
AA	Amaryllidaceae alkaloidy
AChE	acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerovy choroby
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
BuChE	butyrylcholinesteráza
CE-MS	kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní detekcí
CI	chemická ionizace
CLD	chemiluminiscenční detektor
ECD	detektor plamenového záhytu
EI	elektronová ionizace
EI-GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí a elektronovou ionizací
ESI	ionizace elektrosprejem
FID	plamenově ionizační detektor
FPD	plamenový fotometrický detektor
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
GLC	plynová kapalinová chromatografie
GSC	plynová pevná chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostně spektrometrický detektor
m/z	podíl hmotnosti a náboje iontu
PID	fotoionizační detektor
PLOT	kolona s pevným sorbentem na vnitřní stěně kapiláry
SCOT	kolona se zakotvenou kapalinou v nosiči vnitřní stěny kapiláry

SF	stacionární fáze
TCD	tepelně vodivostní detektor
TIC	celkový iontový proud
TID	plamenový termoionizační detektor
WCOT	kolona s tenkým filmem kapalné fáze na vnitřní stěně kapiláry

8. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Strukturní typy alkaloidů	30
Tabulka 2 – Alkaloidy identifikované pomocí GS-MS v cibulích rostlin druhů rodu Zephyrantes	34
Tabulka 3 – Inhibiční aktivita AChE a BuChE v cibulích rostlin druhů rodu Zephyrantes	36
Tabulka 4 – Alkaloidy identifikované pomocí GS-MS v cibulích rostlin rodu Nerine	39
Tabulka 5 – Inhibiční aktivita AChE a BuChE v cibulích rostlin druhů rodu Nerine	40
Tabulka 6 – Alkaloidy identifikované pomocí GS-MS v cibulích odrůd druhu N. nanus¹⁰¹	44
Tabulka 7 – Alkaloidy identifikované pomocí GS-MS v cibulích rostlin rodu Narcissus	47
Tabulka 8 – Inhibiční aktivita AChE a BuChE v cibulích rostlin druhů rodu Narcissus	48

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Schéma GC ⁸	9
Obrázek 2 – Základní typy kapilárních kolon ¹⁹	11
Obrázek 3 – Chromatogram (h – výška píku, Y – šířka píku v základně) ²⁰	13
Obrázek 4 – (<i>R</i>)-hygrin a kuskohygrin	20
Obrázek 5 – atropin	21
Obrázek 6 – kokain	21
Obrázek 7 – senecionin a senkirkin	22
Obrázek 8 – piperin	22
Obrázek 9 – spartein a cytisin	23
Obrázek 10 – kodein a morfin	24
Obrázek 11 – fysostigmin	25
Obrázek 12 – chinin	25
Obrázek 13 – vinblastin a vinkristin	26
Obrázek 14 – <i>Narcissus pseudonarcissus</i> ⁵¹	27
Obrázek 15 – Norbelladinová cesta ^{46, 54, 60}	29
Obrázek 16 – <i>Zephyranthes grandiflora</i> ⁷⁹	32
Obrázek 17 – Struktury vybraných identifikovaných Amarylidaceae alkaloidů v rodu <i>Zephyranthes</i>	35
Obrázek 18 – <i>Nerine bowdenii</i> ⁹¹	37
Obrázek 19 – Struktury vybraných identifikovaných Amarylidaceae alkaloidů v rodu <i>Nerine</i>	40
Obrázek 20 – <i>Narcissus nanus</i> ⁹⁹	41

Obrázek 21 - Struktury vybraných identifikovaných Amarylidaceae alkaloidů v rodu <i>Narcissus</i>	43
Obrázek 22 – Struktury vybraných identifikovaných Amarylidaceae alkaloidů v rodu <i>Narcissus</i>	46

10. POUŽITÁ LITERATURA

1. Zachař P., Sýkora D.: *Plynová chromatografie* [online]. 2012 [cit. 2019-03-14]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>
2. Aplikace v analytických laboratořích: Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS). *Air Products* [online]. [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: <http://www.airproducts.cz/industries/Analytical-Laboratories/analytical-lab-applications/product-list/gc-with-mass-spectrometer-gc-ms-analytical-laboratories.aspx?itemId=9D1D922AB8CC4BED993D498BA5496F8B>
3. Murray R. K.: *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd. Praha: Galén, c2012. ISBN 978-80-7262-907-7.
4. Dewick P. M.: *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3. John Wiley, 2009. ISBN 9780470741689.
5. Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potencionální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chem. Listy*, 2013, (107), s. 701–708.
6. Mikeš O.: *Laboratorní chromatografické metody*. Praha: SNTL, 1980.
7. Nováková L., Douša M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Hradec Králové: Nováková Lucie, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
8. Plynová chromatografie (GC). *Informační systém Masarykovy univerzity* [online]. Brno, 2009 [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2009/C6390/7480488/uvod.pdf>
9. Dohnal J.: *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2009. ISBN 978-80-7305-058-0.
10. Štulík K. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0852-9.
11. Klouda P.: *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.

12. Praus P., Vontorová J.: *Analytická chemie II*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.
13. Volka, K. *Analytická chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0227-8.
14. Schurig V.: Separation of enantiomers by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001, **906**(1-2), s. 275–299. ISSN 00219673.
15. Rozíková V.: *Plynová chromatografie esterů mastných kyselin ve vybraných druzích potravin*. Brno, 2010. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav Technologie potravin. Vedoucí práce Ing. Tomáš Gregor, Ph.D.
16. Komprda T., Ansorgová A., Rozíková V., Němcová B.: Chromatografické stanovení polynenasycených mastných kyselin ve vybraných živočišných tkáních. *Chem. Listy*. 2015, (109), s. 140–146.
17. Separační metody. *Mendelova univerzita v Brně* [online]. [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52964
18. Christie W. W.: *Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide*. Matreya; Oily Press, 1989. ISBN 095141710X.
19. Coufal, P.: *PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE, GC* [online]. 1996 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>
20. Šerksová A.: *Porovnání metod měření kalibračních křivek*. Hradec Králové, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biofyziky a fyzikální chemie. Vedoucí práce Ing. Martin Drastík, Ph.D.
21. Beyermann K.: *Organická stopová analýza*. SNTL: Praha, 1987, s. 309.
22. Milata V., Segľa P.: *Spektrálne metódy v chémii*. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2004. Edícia vysokoškolských učebníc. ISBN 80-227-2049-6.

23. Abian J.: The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *JMS*. 1999, **34**(3), s. 157–168.
24. Holčápek M., Jandera P.: Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chem. Listy*. 1998, **92**, s. 278–286.
25. Švec F.: Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií?. *Chem. listy*. 2009, **103**, s. 266–270.
26. Virus E. D., Sobolevsky T. G., Rodchenkov G. M.: Introduction of HPLC/orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control. *JMS*. 2008, **43**(7), s. 949–957.
27. Sobotníková J., Bosáková Z., Čabala R., Coufal P., Pacáková V., Štulík K.: Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na katedře analytické chemie přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. *Chem. Listy*. Praha, 2010, **104**, s. 1226–1231.
28. Nagy M., Grančai D., Mučaji P.: *Farmakognózia: Biogenéza prírodných látok*. OSVETA, 2011. ISBN 978-80-8063-368-4.
29. Funayama S., Cordell G. A.: *Alkaloids: a treasury of poisons and medicines*. Boston: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-12-417302-6.
30. Glencross B.: Understanding the nutritional and biological constraints of ingredients to optimize their application in aquaculture feeds. *Aquafeed Formulation*. Elsevier, 2016, s. 33–73. ISBN 9780128008737.
31. Marutescu L., Popa M., Saviuc C., Lazar V., Chifiriuc M. C.: Botanical pesticides with virucidal, bactericidal, and fungicidal activity. *New Pesticides and Soil Sensors*. Elsevier, 2017, s. 311–335. ISBN 9780128042991.
32. Hrdina V.: *Přírodní toxiny a jedy*. Praha: Galén, c2004. ISBN 80-726-2256-0.
33. Knoelker H. J.: *Alkaloid Synthesis*. Springer, Berlin, 2014. ISBN 3642440711.
34. Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 3., upr. a dopl. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2015-2.

35. Valíček P.: *Rostlinné omamné drogy*. Benešov: Start, 2000. ISBN 80-862-3109-7.
36. Baloun J. a kol. *Rostliny způsobující otravy a alergie*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství. 1989, s. 276. ISBN 08-083-89.
37. Eguchi R., Ono N., Hirai Morita A., Katsuragi T., Nakamura S., Huang M., Altaf-UI-Amin M., Kanaya S.: Classification of alkaloids according to the starting substances of their biosynthetic pathways using graph convolutional neural networks. *BMC Bioinformatics*. 2019, **20**(380). ISSN 1471-2105.
38. Krmenčík P. ALKALOIDY. *Toxikon* [online]. [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/alkaloidy.php>
39. Hostettmann K., Borloz A., Urbain A., Marston A.: Natural Product Inhibitors of Acetylcholinesterase. *Current Organic Chemistry*. 2006, **10**(8), s. 825–847.
40. Valíček P.: *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. Praha: Academia, 1989. ISBN 80-200-0000-3.
41. Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky *in vitro* a *in vivo*. *Chem. Listy* 2006 (100) s. 30–41.
42. Griffin C., Hamm C., McNulty J., Pandey S.: Pancratistatin induce sapoptosis in clinical leukemia samples with minimal effect on non-cancerous peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Cell International*. 2010, **10**(1), s. 825–847.
43. Cahlíková L.: *Habilitační práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2013.
44. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: *Farmakognozie*, Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-802-4632-643.
45. McNulty J., Nair J. J., Little J. R. L., Brennan J. D., Bastida J.: Structure–activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, **20**(17); s. 5290–5294.

46. Dumont M., Lee Teoh H., Rouzeau S., et al.: Galanthamine from snow drop – the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004, **92**(2–3), s. 147–162.
47. Rivastigmine. *PubChem* [online]. USA [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rivastigmine>
48. Moussian B.: Chitin: Structure, Chemistry and Biology. *Targeting Chitin-containing Organisms*. Singapore: Springer Singapore, 2019, s. 5–18. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ISBN 978-981-13-7317-6.
49. Seneca. Alkaloid Chemistry. *Alkaloids - Secrets of Life*. Elsevier, 2007, s. 61–139. ISBN 9780444527363.
50. Řeháček Z., Sajdl P.: Námelové alkaloidy a jejich deriváty. Academia, nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 1983, s. 129, 509-21-827.
51. *Narcissus pseudonarcissus*. In: *Plantsam* [online]. [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: <https://plantsam.com/narcissus-pseudonarcissus>
52. Unver N.: New skeletons and new concepts in *Amaryllidaceae* alkaloids. *Phytochemistry Reviews*. 2007, **6**(1), s. 125–135. ISSN 1568-7767.
53. Jin, Z. *Amaryllidaceae* and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports*. 2013, **30**(6), s. 849–868. ISSN 0265-0568.
54. Nagy M., Grančai D., Mučaji P.: *Farmakognózia: Biogenéza prírodných látok*. Osveta, 2011; 237 s. ISBN 978-80-8063-368-4.
55. Jahodář L.: *Farmakobotanika - semenné rostliny*. Praha: Karolinum, 2006, 258 s.
56. Kornienko A., Evidente A.: Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews*. 2008, **108**(6), s. 1982–2014. ISSN 0009-2665.

57. Nair J. J., Bastida J., Viladomat F., van Staden J.: Cytotoxic agents of the crinane series of Amaryllidaceae alkaloids. *Nat. Prod. Commun.* 2012, **7**(12), s. 1677–1688.
58. He M., Qu Ch., Gao O., Hu X., Hong X.: Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances*. 2015, **5**(21), 16562–16574. ISSN 2046-2069.
59. Bastida J., Berkov S., Torras Claveria L., Pigni N. B., de Andrade J. P., Martínez-Francés V., Codina C., Viladomat F.: 3. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2011, s. 65–100. ISBN 978-81-7895-528-5.
60. Berkov S., Pavlov A., Georgiev V., Weber J., Bley T., Viladomat F., Bastida J., Codina C.: Changes in apolar metabolites during *in vitro* organogenesis of *Pancreatum maritimum*. *Plant Physiol. Bioch.* 2010, **48**(10-11), s. 827–835.
61. Berkov S., Martínez-Francés V., Bastida J., Codina C., Ríos S.: Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*. 2014, **99**, s. 95–106.
62. Boit H.G., Ehmke H.: Alkaloide von *Sprekelia formosissima*, *Galanthus elwesii*, *Zephyranthes candida* und *Crinum powelii* VIII. *Chemische Berichte*. 1955, **88**, s. 1590–1594.
63. Berkov S., Sidjimova B., Evstatieva L., Popov S.: Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*. 2004, **65**, s. 579–586.
64. Latvala A., Önür M.A., Gözler T., Linden A., Kivcak B., Hesse M.: Alkaloids of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*. 1995, **39**, s. 1229–1240.
65. Szilávik L., Guris Á., Minárovits J., Forgo P., Molnár J., Hohmann J.: Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*. 2004, **70**, s. 871–873.

66. Cahlíková L., Benešová N., Macáková K., Kučera R., Hrstka V., Klimeš J., Jahodář L., Opletal L.: Alkaloids from some *Amaryllidaceae* species and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*. 2012, **7**, s. 571–574.
67. Pigni N.B., Ríos-Ruiz S., Martínez-Francéz V., Nair J.J., Viladomat F., Codina C., Bastida J.: Alkaloids from *Narcissus serotinus* L. *Journal of Natural Products*. 2012, **75**, s. 1643–1647.
68. Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.: Alkaloids from *Zephyranthes robusta* BAKER and their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity*. 2013, **10**, s. 1120–1127.
69. de Andrade J.P., Pigni N.B., Torras-Claveria L., Guo Y., Berkov S., Reys-Chilpa R., El Amrani A., Zuanazzi J.A.S., Codina C., Viladomat F., Bastida J.: Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Revista Latinoamericana de Química*. 2012, **40**, s. 83–98.
70. Giordani R.B., de Andrade J.P., Verli H., Dutilh J.H., Henriques A.T., Berkov S., Bastida J., Zuanazzi J.A.S.: Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (*Amaryllidaceae*). *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2011, **49**, s. 668–672.
71. Kitajima M., Kinoshita E., Kogure N., Takayana H.: Two new alkaloids from bulbs of *Lycoris squamigera*. *Heterocycles*. 2009, **77**, s. 1389–1396.
72. Kaya G.I., Sarikaya B., Onur M.A., Somer M.A., Viladomat F., Codina C., Bastida J., Launiger I.L., Kaiser M., Tasdemir D.: Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochemistry Letters*. 2011, **4**, s. 301–305.
73. Cahlíková L., Macáková K., Zavadil S., Jiroš P., Opletal L., Urbanová K., Jahodář L.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*. 2011, **6**, s. 603–606.

74. Yang H., Yoon K.D., Chin Y.-W., Kim Y.C., Kim J.: The isolation of acetylcholinesterase inhibitory constituents from *Lycoris radiata* using offline HPLC-biochemical detection system. *Natural Product Sciences*. 2010, **16**, s. 228–232.
75. Feng T., Wang Y.Y., Su J., Li Y., Cai X.-H., Luo X.-D.: *Amaryllidaceae* alkaloids from *Lycoris radiata*. *Helvetica Chimica Acta*. 2011, **94**, s. 178–183.
76. Berkov S., Romani S., Herrera M., Viladomat F., Codina C., Momekov G., Ionkova I., Bastida J.: Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytotherapy Research*. 2011, **25**, s. 1686–1692.
77. Cahlíková L., Zavadil S., Macáková K., Valterová I., Kulhánková A., Hošťálková A., Kuneš J., Opletal L.: Isolation and cholinesterase activity of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Natural Product Communications*. 2011, **6**, s. 1827–1830.
78. Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.: Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activity. *Natural Product Communications*. 2013, **8**, s. 1541–1544.
79. *Zephyranthes grandiflora* (Rain Lily). In: *GARDENIA* [online]. [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: <https://www.gardenia.net/plant/zephyranthes-grandiflora?fbclid=IwAR2YD6AeXcw5FZzcYrWuq0xuPm5H3kj1QUsfZfEgnFUScgY85cQ8zP7TwWg>
80. Berkov S., Bastida J., Nikolova M., Viladomat F., Codina C.: Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochemical Analysis*. 2008, **19**(5), s. 411–419.
81. Katoch D., Singh B.: Phytochemistry and pharmacology of genus *Zephyranthes*. *Medicinal & Aromatic Plants*. 2015, **4**(4). ISSN 21670412.

82. Meerow A. W., Fay M. F., Guy C. L., Li Q.-B., Zaman F. Q., Chase W. M.: Systematics of *Amaryllidaceae* based on cladistic analysis of plastid sequence data. *American Journal of Botany*. 1999, **86**(9), s. 1325–1345. ISSN 00029122.
83. Martinez G. J., Barboza G. E.: Natural pharmacopoeia used in traditional Toba medicine for the treatment of parasitosis and skin disorders (Central Chaco, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*. 2010, **132**(1), s. 86–100. ISSN 03788741.
84. Quattrocchi, U.: *CRC world dictionary of medicinal and poisonous plants: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology*. CRC Press, 2012. ISBN 978-142-0080-445.
85. Cortes N., Alvarez R., Osorio E. H., Alzate F., Berkov S., Osorio E., Tasca T.: Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five *Amaryllidaceae* plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, **102**(2), s. 222–228.
86. Ortiz J., Berkov S., Pigni N., Theoduloz C., Roitman G., Tapia A., Bastida J., Feresin G.: Wild Argentinian *Amaryllidaceae*, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor Galanthamine and other alkaloids. *Molecules*. 2012, **17**(11), s. 13473–13482. ISSN 1420-3049.
87. Cahlíková L., Kulhánková A., Urbanová K., Valterová I., Macáková K., Kuneš J.: Analysis of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Zephyranthes robusta* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*. 2010, **5**(8), s. 1201–1204.
88. Cahlíková L., Valterová I., Macáková K., Opletal L. Analysis of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2011, **21**(4), s. 575–580.
89. Shawky E., El Sohafy S. M., de Andrade J. P., de Souza Borges W.: Profiling of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from some *Crinum*, *Habranthus* and *Zephyranthes* species by GC–MS combined with multivariate analyses and *in silico* studies. *Natural Product Research*. 2019, s. 1–8. ISSN 1478-6419.

90. Rojas-Vera J. Del C., Buitrago-Díaz A. A., Possamai L. M., Timmers, L. F. S. M., Tallini L. R., Bastida J.: Alkaloid profile and cholinesterase inhibition activity of five species of Amaryllidaceae family collected from Mérida state-Venezuela. *South African Journal of Botany*. 2020. ISSN 02546299.
91. *Nerine bowdenii* růžová. In: *Plantica* [online]. [cit. 2020-03-21]. Dostupné z: <https://www.plantica.cz/cibuloviny/nerine-bowdenii-ruzova.html?fbclid=IwAR2vUaTIP6NYbOtR2Ogfy4qBG75FMdxTFP8ZvkLQzN3pumvRpbJ7VKJITdQ>
92. Nair J. J., Campbell W. E., Brun R., Viladomat F., Codina C., Bastida J.: Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry*. 2005, **66**(3), s. 373–82. ISSN 00319422.
93. Cahlíková L., Vaněčková N., Šafratová M., Breiterová K., Blunden G., Hulcová D., Opletal L.: The Genus *Nerine* Herb. (Amaryllidaceae): Ethnobotany, Phytochemistry, and Biological Activity. *Molecules*. 2019, **24**(23). ISSN 1420-3049.
94. van Rijn R. M., Rhee I. K., Verpoorte R.: Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Natural Product Research*. 2010, **24**(3), s. 222–225. ISSN 1478-6419.
95. Lyle R. E., Kielar E. A., Crowder J. R., Wildman W. C.: Alkaloids of amaryllidaceae. XV. The alkaloids of *Nerine bowdenii* W. Wats. and *Crinum moorei* J. D. Hook. *J. Am. Chem. Soc.* 1960, **82**, s. 2620–2625.
96. Zonneveld B. J. M., Duncan G. D.: Genome size for the species of *Nerine* Herb. (Amaryllidaceae) and its evident correlation with growth cycle, leaf width and other morphological characters. *Plant Systematics and Evolution*. 2006, **257**(3-4), s. 251–260. ISSN 0378-2697.
97. Rhee I. K., Appels N., Hofte B., Karabatak B., Erkelens C., Stark L. M., Flippin L. A., Verpoorte R.: Isolation of the acetylcholinesterase inhibitor ungeremine from *Nerine bowdenii* by preparative HPLC coupled on-line to a flow assay system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004, **27**(11), s. 1804–1809. ISSN 0918-6158.

98. Cahlíková L., Benešová N., Macáková K., Urbanová K., Opletal L.: GC/MS analysis of three Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*. 2011, **6**(9), s. 1255–1258.
99. Bondarenko L. In: *Lithuanian rare bulb garden* [online]. [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <http://www.litbulbgarden.com/ss/317.jpg>
100. Cahlíková L., Ločárek M., Benešová N., Kučera R., Chlebek J., Novák Z., Opletal L.: Isolation and cholinesterase inhibitory activity of *Narcissus* extracts and Amaryllidaceae alkaloid. *Natural Product Communications*. 2013, **8**(6), s. 781–785.
101. Havlasová J., Šafratová M., Siatka T., Štěpánková Š., Novák Z., Ločárek M., Opletal L., Hrabínová M., Jun D., Benešová N., Kuneš J., Cahlíková L.: Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity. *Natural Product Communications*. 2014, **9**(8), s. 1151–1155.
102. Breiterová K., Ločárek M., Kohelová E., Talácková M., Hulcová D., Opletal L., Cahlíková L.: Daffodils as potential crops of biologically-active compounds: Assessment of 40 ornamental taxa for their alkaloid profile and cholinesterases inhibition activity. *Natural Product Communications*. 2018, **13**(4), s. 419–422.
103. Hodulová A.: *Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae, rod Nerine*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova.
104. Berkov S., Bastida J., Sidjimova B., Viladomat F., Codina C.: Alkaloid diversity in *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis*. *Chemistry & Biodiversity*. 2011, **8**(1), s. 115–130.
105. Hanks G. R.: *Narcissus and daffodils. medicinal and aromatic plants*, Taylor and Francis, 2002.

106. Torras Claveria L., Tallini L., Viladomat Meya F., Bastida Armengol J. Research in natural products: Amaryllidaceae ornamental plants as sources of bioactive compounds. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VII*. 2017, Chapter 5, s. 69–82.
107. Berkov S., Bastida J., Viladomat F. Codina C. Analysis of galanthamine- type alkaloids by capillary gas chromatography–mass spectrometry in plants. *Phytochemical Analysis*. 2008, **19**(4), s. 285–293.

11. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Bc. Alžběta Vopelková

Školitel: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití technik hmotnostní spektrometrie v analýze přírodních látek

Tato diplomová práce se zabývá tématem „Využití technik hmotnostní spektrometrie v analýze přírodních látek“. Cílem práce bylo vytvořit rešeršní práci a přiblížit profil alkaloidů u různých rodů čeledi Amaryllidaceae.

V úvodu teoretické části je rozebrána plynová chromatografie (GC). Jsou zde klasifikovány alkaloidy podle svých heterocyklických částí a v neposlední řadě je popsána čeleď Amaryllidaceae.

Práce vycházela z odborných textů českých i zahraničních autorů, které se zaměřovaly na analýzu alkaloidů v cibulích, nebo v nadzemních částech rostlin u této čeledi, pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS).

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, analýza, přírodní látky

12. ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Bc. Alžběta Vopelková

Supervisor: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Using of techniques of mass spectrometry in the analysis of natural compounds

This diploma thesis deals with the topic " Using of techniques of mass spectrometry in the analysis of natural compounds ". The aim of the work was to create a research work and describe the profile of alkaloids in individual genera of the family Amaryllidaceae.

The introduction to the theoretical part summarizes the analyzes gas chromatography (GC). Alkaloids have been classified according to their heterocyclic parts and the family Amaryllidaceae has been described.

The work was based on professional texts by Czech and foreign authors. Used sources focused on the analysis of alkaloids in bulbs, or in the aboveground parts of plants in this family, using gas chromatography with mass detection (GC-MS).

Key words: mass spectrometry, analysis, natural compounds