

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

---

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Biologicky aktivní metabolity rostlin**

**3. Alkaloidy *Chelidonium majus* L. a jejich inhibiční aktivita vůči  
acetylcholinesteráze**

**Biologically active metabolites of plants.**

**3. Alkaloids from *Chelidonium majus* L. and their inhibiting activity to  
acetylcholinesterase**

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

2010

Lenka Šebestová

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Hradec Králové, 6.4.2010

Lenka Šebestová

Děkuji Ing. Lucii Cáhlikové PhD. za veškerou pomoc s vypracováním diplomové práce, za poskytnuté materiály a cenné odborné rady. Děkuji také panu Ing. Milanovi Kurfürstovi PhD. z Ústavu chemických procesů za změření a interpretaci NMR spekter izolovaných látek. Dále bych chtěla poděkovat celé katedře Farmaceutické botaniky a ekologie za velmi příjemné pracovní prostředí a také mé rodině za veškerou podporu a porozumění.

## **OBSAH**

<b>1. ÚVOD</b>	<b>5</b>
<b>2. CÍL PRÁCE</b>	<b>8</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>10</b>
3.1. Benzofenanthridinové alkaloidy, historie, struktura, biosyntéza, rostlinné zdroje a biologická aktivita	11
3.1.1. Historie benzofenanthridinových alkaloidů	12
3.1.2. Struktura benzofenanthridinových alkaloidů	14
3.1.3. Biosyntéza benzofenanthridinových alkaloidů	15
3.1.4. Výskyt benzofenanthridinových alkaloidů	15
3.1.4.1. Čeleď <i>Papaveraceae</i>	15
3.1.4.1.1. <i>Chelidonium majus</i>	15
3.1.4.1.2. <i>Sanguinaria canadensis</i>	17
3.1.4.1.3. <i>Macleaya cordata</i>	18
3.1.4.2. Čeleď <i>Rutaceae</i>	19
3.1.4.2.1. <i>Zanthoxylum nitidum</i>	20
3.1.4.3. Čeleď <i>Fumariaceae</i>	20
3.1.4.4. Čeleď <i>Ranunculaceae</i>	20
3.1.5. Biologická aktivita benzofenanthridinových alkaloidů	20
3.1.5.1. Inhibiční aktivita vůči cholinesterázám	21
3.1.5.2. Antimikrobiální aktivita	23
3.1.5.3. Antifugální aktivita	23
3.1.5.4. Antivirová aktivita	23
3.1.5.5. Protizánětlivé účinky	24
3.1.5.6. Indukce apoptózy a cytotoxicita	24
3.1.5.7. Interakce s bílkovinami	25
3.2. <i>Chelidonium majus</i>	26
3.2.1. Morfologický popis	26
3.2.2. Výskyt	27
3.2.3. Použití v lidovém léčitelství a medicíně	28
3.2.4. Obsahové látky	29
3.3. Metody používané při izolaci benzofenanthridinových alkaloidů	31
3.3.1. Extrakce benzofenanthridinových alkaloidů	31
3.3.2. Analýza benzofenanthridinových alkaloidů	31
3.4. Alzheimerova choroba	32
3.4.1. Charakteristika a klasifikace	32
3.4.2. Patofyziologie	32
3.4.3. Farmakoterapie	33
3.4.3.1. Kognitiva	34
3.4.3.1.1. Inhibitory cholinesteráz	34
3.4.3.1.2. Látky uvolňující prekurzory acetylcholinu	35
3.4.3.1.3. Inhibitory NMDA receptorů	35

3.4.3.2. Nootropika	36
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>37</b>
4.1. Všeobecné postupy	38
4.1.1. Destilace a odpařování	38
4.1.2. Chromatografie	38
4.1.2.1. Tenkovrstvá chromatografie	38
4.1.2.2. Sloupcová chromatografie	38
4.2. Materiál a vybavení	39
4.2.1. Rozpouštědla	39
4.2.2. Chemikálie	39
4.2.3. Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erytrocytární AChE a BuChE	39
4.2.4. Chemikálie a materiál ke stanovení antioxidační aktivity	40
4.2.5. Chemikálie a materiál ke stanovení antiprotozoální aktivity	40
4.2.6. Přístroje použité při stanovování biologických vlastností izolovaných látek	40
4.2.7. Detekční činidla	41
4.2.8. Chromatografické absorbenty	41
4.2.9. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii	41
4.2.10. Vytvářecí soustavy pro preparativní tenkovrstvou chromatografii	41
4.3. Extrakce alkaloidů z nati <i>Chelidonium majus</i> a zpracování výtřepku A	42
4.3.1. Původ drogy	42
4.3.2. Příprava sumárního extraktu	42
4.3.3. Příprava výtřepku A z primárního extraktu	43
4.3.4. Příprava pseudokyanidů benzofenanthridinových alkaloidů z výtřepku A Gadamerovou metodou	43
4.4. Sloupcová chromatografie výtřepku benzofenanthridinových alkaloidů z <i>Chelidonium majus</i>	44
4.5. Zpracování frakcí 11-14	46
4.6. Zpracování frakcí 18-19	47
4.7. Určení struktury izolovaných látek	48
4.7.1. Měření hmotnostního spektra	48
4.7.2. Měření NMR spektra	48
4.7.3. Měření bodu tání	49
4.8. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů vůči AChE a BuChE	49
4.8.1. Podmínky měření	49
4.8.2. Stanovení inhibiční aktivity	49
4.9. Stanovení antioxidační aktivity získaných alkaloidů	50
4.10. Stanovení antiprotozoální aktivity získaných alkaloidů	50
<b>5. VÝSLEDKY</b>	<b>51</b>
5.1. Strukturní analýza stylopinu	52

5.1.1.	MS studie stylopinu	52
5.1.2.	NMR studie stylopinu	53
5.1.2.1.	<sup>1</sup> H-NMR spektrum stylopinu	54
5.1.2.2.	<sup>13</sup> C-NMR spektrum stylopinu	54
5.2.	Strukturální analýza chelidoninu	55
5.2.1.	MS studie chelidoninu	55
5.2.2.	NMR studie chelidoninu	57
5.2.2.1.	<sup>1</sup> H-NMR spektrum chelidoninu	57
5.2.2.2.	<sup>13</sup> C-NMR spektrum chelidoninu	58
5.3.	Antioxidační aktivita	59
5.4.	Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE	60
5.5.	Antiprotozoální aktivita	60
<b>6.</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>64</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK</b>	<b>71</b>

## **1. ÚVOD**



Již od pradávna se rostliny používaly k terapii nejrůznějších nemocí. Dlouhou dobu šlo pouze o využívání různě upravených celých rostlin nebo jejich částí aniž by bylo známo, která látka je za účinek zodpovědná. Teprve s rozvojem chemických věd se výzkum začal zabývat izolací jednotlivých obsahových látek a zkoumáním jejich účinků. Spektrum obsahových látek rostlin je velmi široké stejně tak, jako spektrum jejich účinků a skýtá mnoho dodnes pro lidstvo skrytých možností, jak léčit některá onemocnění.

Jednou z nejvýznamnějších skupin látek obsažených v rostlinách jsou alkaloidy. Tyto sekundární metabolity vznikající z aminokyselin, které bývají v mnohých případech silně účinné, rostliny syntetizují především jako ochranu před škůdci (tzv. fytoalexiny). Jsou to toxické látky, ale v nízkých subletálních dávkách mívají výhodné farmakologické vlastnosti. Do dnešní doby bylo popsáno kolem 10 000 alkaloidů. Podle své struktury dělí na několik skupin.

Velmi významné jsou z terapeutického hlediska benzofenantridinové alkaloidy patřící mezi alkaloidy isochinolinového typu, kterými se zabývá i tato diplomová práce. Nacházejí se v několika rostlinných čeledích (*Papaveraceae*, *Fumariaceae*, *Meliaceae*, *Capriofilaceae*, *Meliaceae*, *Ranunculaceae* a *Rutaceae*) a mají široké spektrum účinku<sup>1,2</sup>. Jejich biologická aktivita zahrnuje především antimikrobiální, antifugální, antivirový nebo prozánětlivý účinek<sup>3</sup>. Některé také interagují s bílkovinami, jsou cytotoxické nebo indukují apoptózu<sup>4</sup>.

Neméně významná je také schopnost některých benzofenantridinových alkaloidů inhibovat cholinesterázy (acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza). Inhibicí těchto enzymů lze zpomalit průběh Alzheimerovy choroby, nemoci, která tvoří až 50-60% všech demencí a postihuje především paměť, řeč, orientaci a zrakově prostorové funkce<sup>5</sup>. Studium účinků benzofenantridinových alkaloidů, které v současnosti probíhá, je velkým příslibem do budoucnosti v terapii tohoto v současné době nevléčitelného onemocnění<sup>4</sup>.

V dnešní době jsou nejúčinnějšími léčivy pro terapii lehkých až středně pokročilých alzheimerovských demencí inhibitory acetylcholinesteráz, z nichž se využívají tři látky: donepezil, rivastigmin a galanthamin. Tyto látky způsobují zpomalení průběhu nemoci<sup>6</sup>. V těžších stádiích se využívají inhibitory N-metyl-D-aspartátových receptorů. Tato léčba vede k udržení kognitivních funkcí a ke zpomalení progresu Alzheimerovy choroby. Jediným používaným léčivem této skupiny v praxi je memantin<sup>7</sup>.

Významným zdrojem benzofenantridinových alkaloidů je *Chelidonium majus* (vlaštovičník větší) z čeledi *Papaveraceae*, jež se vyskytuje především v Evropě a Asii<sup>8</sup>. Má širokou škálu biologických účinků a byla u něj studována antivirová, antitumorózní, antibakteriální, antimykotická nebo protizánětlivá aktivita<sup>9</sup>. *Chelidonium majus* obsahuje široké spektrum isochinolinových alkaloidů. Nejvyšší obsah alkaloidů ze všech částí této rostliny je v kořeni<sup>10</sup>.

Předmětem této práce byla izolace jednotlivých benzofenantridinových alkaloidů z této rostliny a příprava na studie jejich biologické aktivity (inhibice cholinesteráz, antiprotozoální a antioxidační účinek).

## **2. CÍL PRÁCE**

Cílem diplomové práce bylo:

1. zpracování alkaloidního výtřepku z *Chelidonium majus* (benzofenanthridinové alkaloidy),
2. izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě,
3. stanovení základních fyzikálně-chemických charakteristik získaných látek,
4. a aktivní podílení se na stanovení jejich biologických aktivit (inhibice cholinesteráz, antioxidační a antiprotozoální aktivita).

### **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### 3.1. Benzofenanthridinové alkaloidy, historie, struktura, biosyntéza, rostlinné zdroje a biologická aktivita

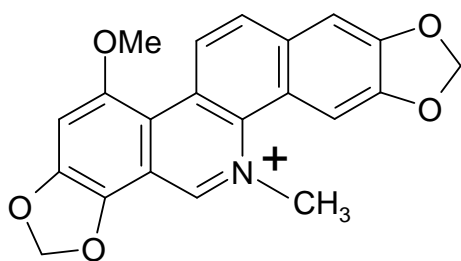
Alkaloidy jsou obecně nízkomolekulární sekundární rostlinné metabolity, které obsahují ve své molekule dusík. Jejich biosyntéza vychází z aminokyselin, popř. mohou také vznikat z meziproductů biosyntézy terpenoidů, steroidů, některých kyselin nebo purinů, účinkem aminů a amoniaku<sup>11</sup>. V určité rostlině nebývá většinou obsažen jen jeden alkaloid, ale nejčastěji jejich směs. Množství a typ alkaloidů bývá v různých částech jednotlivých rostlin závislé na tom, z které části rostliny se získávají, zda ze semen, listů, kůry či z jiné části, a na vegetačním období.

Benzo(c)fenantridinové alkaloidy jsou biogeneticky odvozené od fenylalaninu. Řadí se do skupiny isochinolinových alkaloidů a vyskytují se v čeledích *Papaveraceae* (mákovité), *Fumariaceae* (zemědýmovité), *Rutaceae* (routovité)<sup>3</sup>, *Meliaceae* (zederchovité), *Caprifoliaceae* (zimolezovité) a *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité)<sup>1,2</sup>. Jejich zastoupení v jednotlivých rostlinách se různí, mohou zde být jak dominantními alkaloidy, tak i minoritními. K nejbohatším zdrojům těchto alkaloidů patří *Sanguinaria canadensis* L. (krevnice kanadská), *Chelidonium majus* L. (vlaštovičník větší), *Dicranostigma lactucoides*<sup>3</sup>, *Escholtzia californica* (sluncovka kalifornská) nebo *Macleaya cordata*. Tyto alkaloidy jsou také považované za fytoalexiny, což jsou sekundární metabolity, které rostlina produkuje na ochranu před patogenními mikroorganismy<sup>4</sup>.

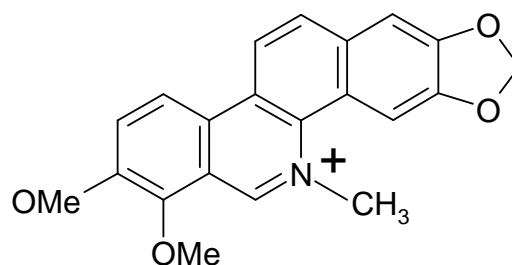
Biologická aktivita těchto alkaloidů je velmi široká. Mají antimikrobiální, antifugální, antivirové nebo protizánětlivé účinky, některé mohou inhibovat proteinkinázu C, cholinesterázy. Působí také na buněčný cytoskelet a interagují s DNA. Mnohé studie se v současné době zabývají jejich schopností vyvolat apoptózu a také cytotoxickými účinky<sup>4</sup>.

### 3.1.1. Historie benzofenanthridinových alkaloidů

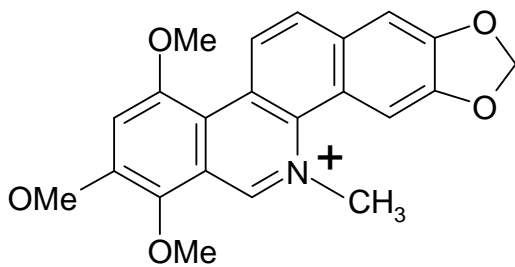
Jeden z nejznámějších benzofenanthridinových alkaloidů sanguinarin popsal poprvé James Dana roku 1827<sup>2</sup>. Izoloval ho jako hlavní barevnou složku *Sanguinaria canadensis*. Později bylo zjištěno, že se nejednalo o čistý alkaloid, ale o směs. Teprve Gadamer a Stichel izolovali čistý sanguinarin z *Chelidonium majus*<sup>3</sup>. Také chelerytrin byl nejprve popsán Probstem v roce 1839 ve směsi několika alkaloidů a až později se Königovi podařilo izolovat čistý alkaloid<sup>12</sup>. V padesátých letech 19. století byly Slavíkem izolovány a strukturně popsány další benzofenanthridinové alkaloidy, které se v rostlinách vyskytovaly spíše minoritně. Šlo o chelilutin a chelirubin izolované v roce 1954 z *Chelidonium majus*<sup>13</sup> a o makarpin izolovaný o rok později z *Macleaya microcarpa*<sup>3</sup>. Roku 1960 pak izoloval další alkaloidy ze *Sanguinaria canadensis* – sanguirubin a sanguilutin. Dalšími vědci, kteří se zasloužili o objev nových benzofenanthridinových alkaloidů byli: Arthur, který izoloval avicin a nitidin, Messmer izoloval fagaronin nebo Torto, který izoloval fagaridin<sup>3</sup>.



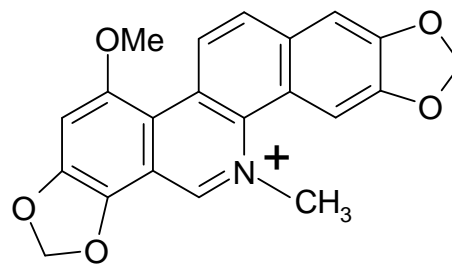
sanguinarin



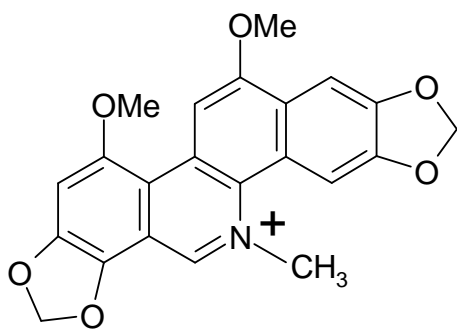
chelerytrin



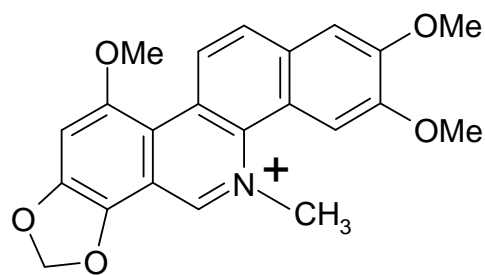
chelilutin



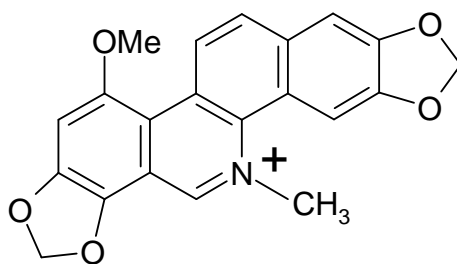
chelirubin



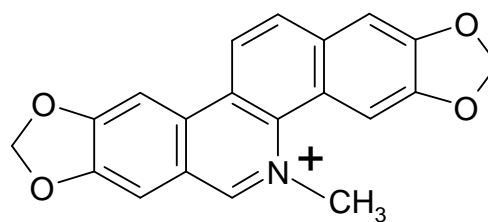
makarpin



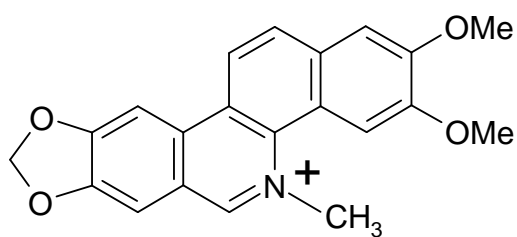
sanguirubin



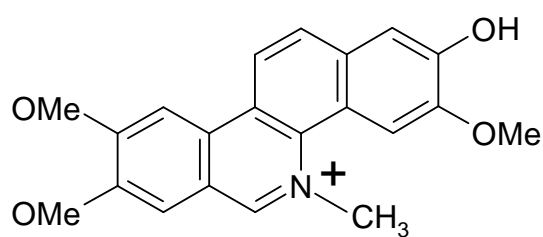
sanguilutin



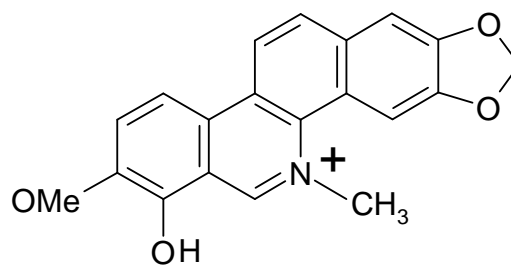
avicin



nitidin



fagaronin



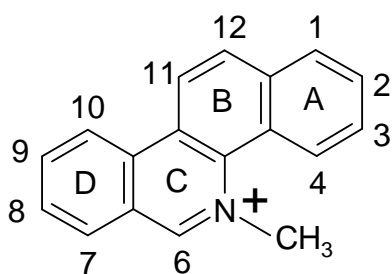
fagaridin

Obr.1: Struktury benzofenanthridinových alkaloidů



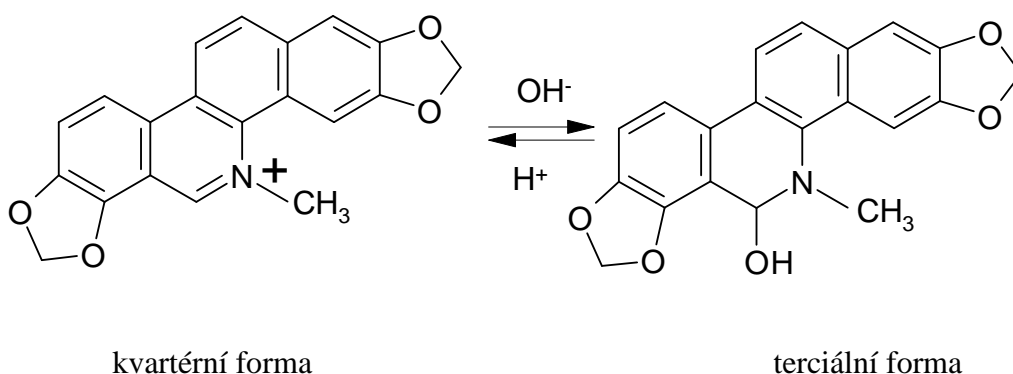
### 3.1.2. Struktura benzofenanthridinových alkaloidů

Z chemického hlediska jsou tvořeny tetracyklickým skeletem, kde jsou čtyři aromatické kruhy označeny A, B, C, D a v pozici 5 se nachází dusíkový atom (obr.2)<sup>3,12</sup>.



Obr.2. Základní struktura benzofenanthridinových alkaloidů

Významnou skupinou benzofenanthridinových alkaloidů jsou alkaloidy sanguinarinového typu mající schopnost měnit svou strukturu v závislosti na pH. Při nižších hodnotách pH se nacházejí v kladně nabitě formě s kvartérním dusíkovým kationtem. Alkalizací přechází do terciální formy tzv. pseudobáze (obr.3). Tyto dvě formy mají velmi rozdílné vlastnosti. Kvartérní forma je polární, relativně dobře rozpustná ve vodě a vždy výrazně zbarvena, zatímco terciální forma je nepolární, málo rozpustná ve vodě a nebarevná<sup>12</sup>.



Obr.3: Strukturální formy kvartérních benzofenanthridinových alkaloidů<sup>12</sup>

### 3.1.3. Biosyntéza benzofenanthridinových alkaloidů

Benzofenanthridinové alkaloidy patří mezi alkaloidy syntetizované z fenylalaninu. Jejich syntéza vychází z norkoklaurinu, který vzniká z dopaminu a 4-hydroxyfenylacetaldehydu. Následuje několik kroků, jejichž vyústěním je vznik prvního alkaloidu s benzofenanthridinovým jádrem dihydrosanguinarinu. Z něj se následně syntetizují další benzofenanthridinové alkaloidy<sup>10</sup>. Celá tato biosyntéza je popsána v článku M.H. Zenka z roku 1994<sup>14</sup>.

### 3.1.4. Výskyt benzofenanthridinových alkaloidů

Benzofenanthridinové alkaloidy jsou nejhojněji zastoupeny v čeledích *Papaveraceae* (mákovité) a *Rutaceae* (routovité)<sup>3</sup>. Dalšími čeleděmi obsahujícími tyto alkaloidy jsou: *Fumariaceae* (zemědýmovitě), *Meliaceae* (zederchovitě), *Caprifoliaceae* (zimolezovitě) a *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité)<sup>1,2</sup>.

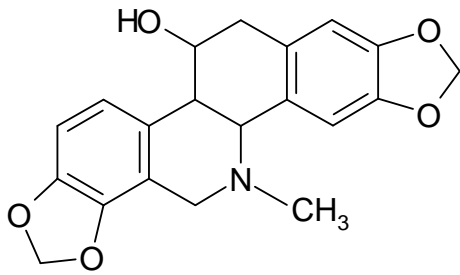
#### 3.1.4.1. Čeleď *Papaveraceae*

Benzofenanthridinové alkaloidy jsou nejhojněji zastoupeny v čeledi *Papaveraceae*, kde jsou nejbohatšími zdroji: *Chelidonium majus*, *Sanguinaria canadensis*, *Macleaya cordata* nebo *Stylophorum lasiocarpum*.

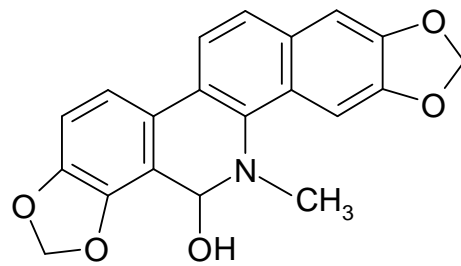
##### 3.1.4.1.1. *Chelidonium majus*

Benzofenanthridinovými alkaloidy izolovanými především z kořene z *Chelidonium majus* jsou: sanguinarine, chelerythrine, chelirubine<sup>15</sup>, chelilutine<sup>3</sup>, chelidonine<sup>16</sup>, 8-hydroxydihydrosanguinarine, 8-hydroxydihydrochelerythrine, dihydrochelerythrine, dihydrosanguinarine<sup>17</sup>, homochelidonin, chelamin, chelamidin, hydroxychelidonin, oxysanguinarin, dihydrochelirubin, dihydrochelilutin, makarpin<sup>10</sup>. Struktury zmíněných alkaloidů jsou uvedeny na následujícím obrázku (obr.5).

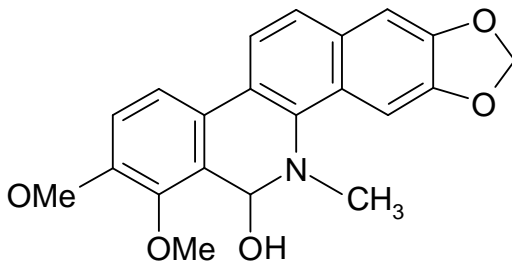
Izolované alkaloidy byly podrobeny různým biologickým studiím a jejich výsledky jsou shrnuty v následujícím textu.



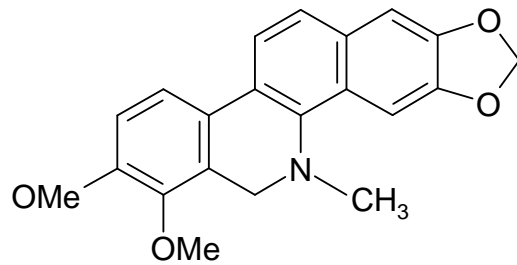
chelidonin



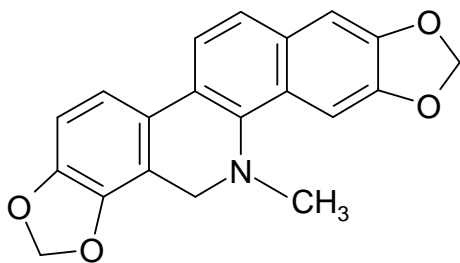
8-hydroxydihydrosanguinarin



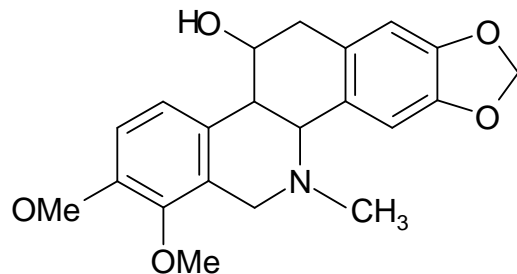
8-hydroxydihydrochelerytrin



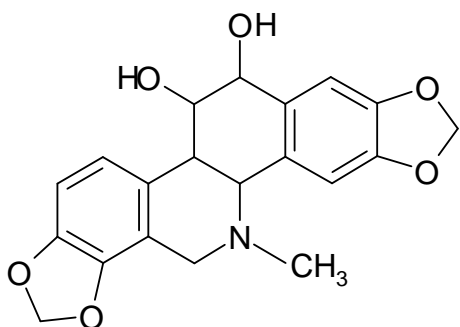
dihydrochelerytrin



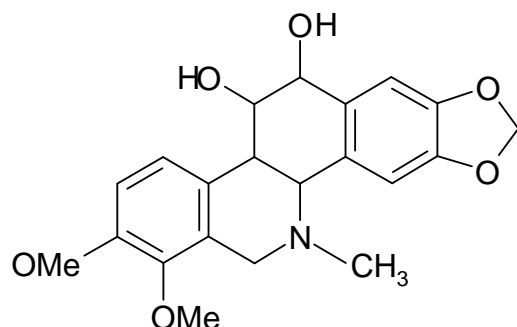
dihydrosanguinarin



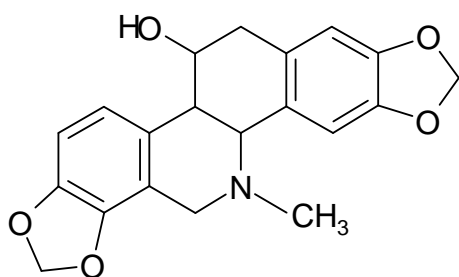
homochelidonin



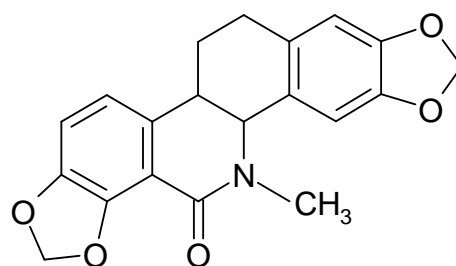
chelamidin



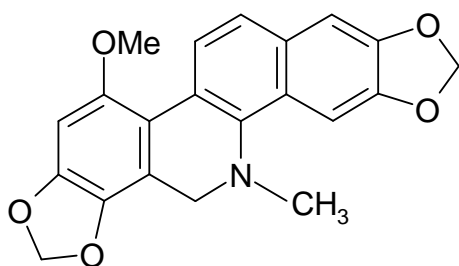
chelamidin



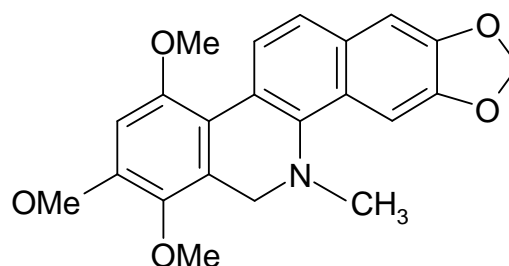
hydroxychelidonin



oxysanguinarin



dihydrochelirubin



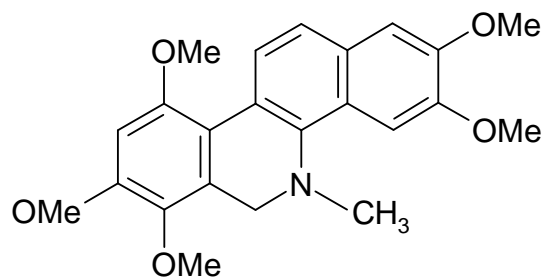
dihydrochelilutin

Obr.5: Alkaloidy izolované z *Chelidonium majus*

#### 3.1.4.1.2. *Sanguinaria canadensis*

*Sanguinaria canadensis* (krevnice kanadská) obsahuje velké množství především kvartérních benzofenanthridinových alkaloidů. 90% těchto alkaloidů se nachází v kořeni<sup>10</sup>.

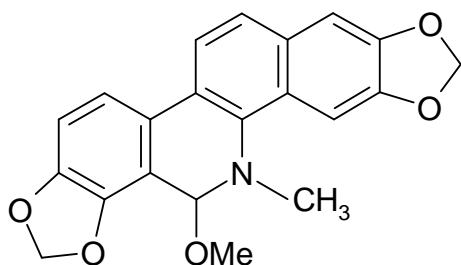
Jedná se o sanguinarin, chelerythrin, sanguilutin (obr.6), chelilutin, chelirubin, sanguirubin<sup>15</sup>, dihydrosanguilutin<sup>18</sup>, oxysanguinarin<sup>19</sup>.



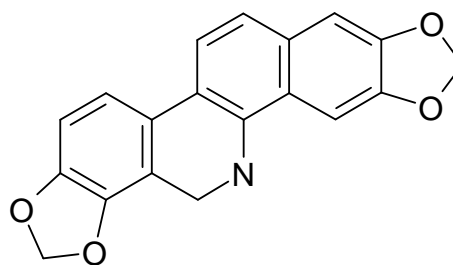
Obr.6: sanguilutin

3.1.4.1.3. *Macleaya cordata*

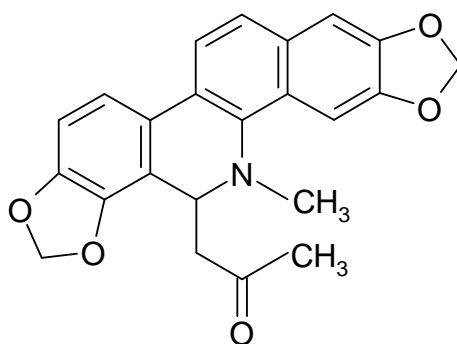
Benzofenanthridinové alkaloidy jsou obsaženy v především kořeni *Macleaya cordata*. Doposud byly izolovány tyto alkaloidy: sanguinarin, chelerythrin, chelirubin, chelilutin<sup>15</sup>, 6-methoxy-dihydrosanguinarin, norsanguinarin, 6-acetyl-dihydrochelerythrin, 6-acetyl-dihydrosanguinarin, sanguidimerin, chelidimerin, dihydrosanguinarin, dihydrochelerythrin<sup>19,20</sup>. Tyto alkaloidy jsou zobrazeny na následujícím obrázku (obr.7).



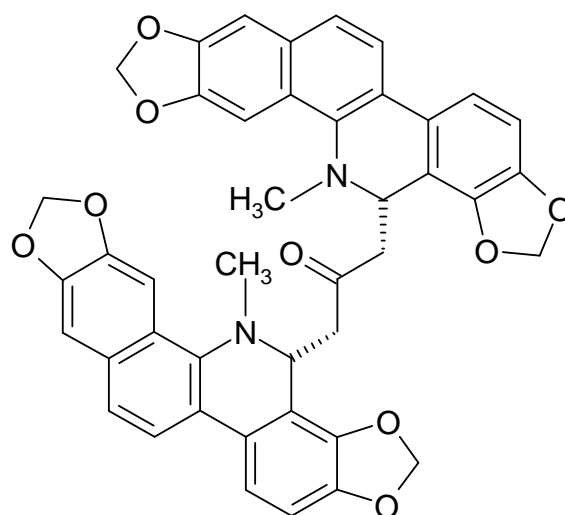
6-methoxydihydrosanguinarin



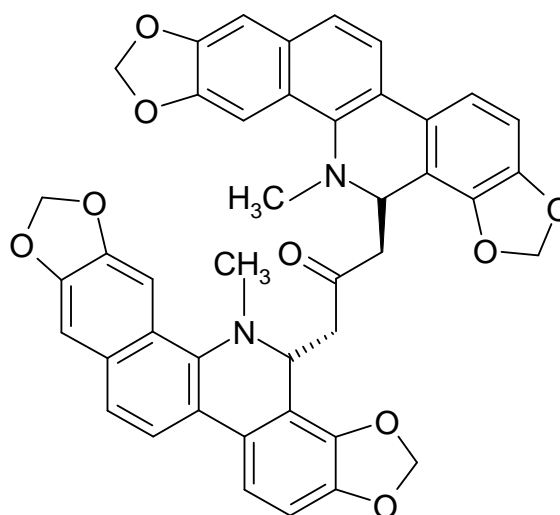
norsanguinarin



6-acetyl-dihydrosanguinarin



chelidimerin



sanguidimerin

Obr.7: Alkaloidy obsažené v *Macleaya cordata*

#### 3.1.4.2. Čeleď *Rutaceae*

Nejvýznamnějším rodem této čeledi obsahující benzofenanthridinové alkaloidy je rod *Zanthoxylum*. Do tohoto rodu se řadí mnoho druhů, ale nejvíce studií bylo provedeno na *Zanthoxylum nitidum*. Dalšími druhy jsou: *Zanthoxylum simulans*, *Zanthoxylum ailanthoides*, *Zanthoxylum myriacantium*, *Zanthoxylum bungeanum*, *Zanthoxylum austrosiense*, *Zanthoxylum schinifolium*, *Zanthoxylum avicennae*, *Zanthoxylum acanthopoidum*, *Zanthoxylum myriacanthum*<sup>21</sup>.

#### 3.1.4.2.1. *Zanthoxylum nitidum*

Z různých částí rostlin (kořen, kůra, dřevo) *Zanthoxylum nitidum* byly izolovány tyto benzofenanthridinové alkaloidy: chelerythrin, sanguinarin, decarin, rhoifolin, avicin, nitidin, dihydrochelerythrynyl-8-acetaldehyd, dihydrochelerythrin, 8-hydroxydihydrochelerythrin, 8-methoxydihydrochelerythrin<sup>21</sup>, 5,6-dihydro-6-methoxynitidin<sup>22</sup>, (*R*)-8-[(*R*)-1-hydroxyethyl]dihydrochelerythrin, 8-methoxynorcheletytrin, oxyavicin<sup>23</sup>, 8-methoxysanguinarin, 8-methoxyisodecarin<sup>24</sup>.

#### 3.1.4.3. Čeleď *Fumariaceae*

V čeledi *Fumariaceae* byl podroben studím především rod *Corydalis*, z kterého bylo izolováno široké spektrum benzofenanthridinových alkaloidů.

Přehled benzofenanthridinových alkaloidů izolovaných z rodu *Corydalis* by byl velmi rozsáhlý. Byl předmětem diplomové práce Kateřiny Salačové v roce 2009 a podrobný přehled alkaloidů tohoto rodu lze nalézt v této práci<sup>25</sup>.

#### 3.1.4.4. Čeleď *Ranunculaceae*

Tato čeleď byla pro obsah benzofenanthridinových alkaloidů také studována. Avšak oproti výše uvedeným čeledím není příliš významná.

### 3.1.5. Biologická aktivita benzofenanthridinových alkaloidů

Rostliny s obsahem benzofenanthridinových alkaloidů byly pro své účinky využívány už od pradávna jak v evropské tak i tradiční čínské medicíně.

Američtí indiáni používali extrakt obsahující sanguinarin a chelerythrin jako expektorans<sup>1,2</sup>.

Extrakt ze *Sanguinaria canadensis* se ve směsi se ZnCl<sub>2</sub> používal, díky svým nekrotickým účinkům, na otevřené kožní nádory<sup>1</sup>. Extrakt z *Chelidonia* se využíval

k léčbě bradavic, hemeroidů nebo infekcím dutiny ústní<sup>2</sup>. V současnosti bývá součástí některých spasmolytik, cholagog a zubních past<sup>9</sup>.

Dnes se z těchto silně účinných rostlin věda snaží izolovat jednotlivé alkaloidy a získat tak látky, které by našly uplatnění v terapii některých nemocí.

Skupina benzofenanthridinových alkaloidů zahrnuje velké množství látek, z nichž mnohé nesou významnou biologickou aktivitu. Jejich účinky jsou antimikrobiální, antimykotické, protizánětlivé, antiplakové a v současné době se také studuje jejich protinádorový efekt nebo využití v terapii Alzheimerovy choroby<sup>3,9,17,26</sup>.

### 3.1.5.1. Inhibiční aktivita vůči cholinesterázám

Benzofenanthridinové alkaloidy jsou považovány za potencionální inhibitory cholinesteráz a celá řada jich byla podrobena studiím jejich inhibičních aktivit. Protože zdroje acetylcholin- (AChE) a butyrylcholinesterázy (BuChE) bývají v jednotlivých publikacích odlišné, je obtížné vzájemně porovnávat získané hodnoty  $IC_{50}$ <sup>27</sup>.

Doposud testované benzofenanthridinové alkaloidy byly izolovány především z *Chelidonium majus*. Ve studii uveřejněné v roce 1983 byly stanoveny hodnoty  $IC_{50}$  pro acetylcholinesterázu původem z elektrického úhoře pro následující alkaloidy: chelirubin, sanguirubin, sanguinarin, chelilutin, sanguilutin, chelerythrin, chelidonin<sup>27</sup>.

Výsledky studie jsou shrnuty v následující tabulce (Tab.I) :

Tab.I. Inhibiční aktivita vůči AChE

Alkaloid	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	Alkaloid	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
chelirubin	90	sanguilutin	11
sanguirubin	60	chelerythrin	9,4
sanguinarin	35	chelilutin	20



V roce 2006 se podařilo z *Chelidonium majus* izolovat 8-hydroxydihydrochelerythrin a 8-hydroxydihydrosanguinarin, které byly podrobeny studii jejich inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE. BuChE na základě posledních studií hraje významnou roli v průběhu Alzheimerovy choroby (AD)<sup>27</sup>. AChE byla původem z elektrického úhoře a BuChE z koňského séra, obojí dodané firmou Sigma-Chemicals Co., Ltd.<sup>28</sup>. U obou sloučenin vycházely, ve srovnání s předcházející studii, dobré hodnoty IC<sub>50</sub>, přičemž oba alkaloidy byly více aktivní vůči AChE. Jako standard byl v této studii použit takrin. Výsledky této studie jsou shrnuty v následující tabulce (Tab.II).

Tab.II: Inhibiční aktivita 8-hydroxydihydrochelerythrinu a 8-hydroxydihydrosanguinarinu vůči AChE a BuChE

	IC <sub>50</sub> (μM)		Selektivita
	AChE	BuChE	BuChE/AChE
8-hydroxydihydrochelerythrin	0,61	34,6	56,7
8-hydroxydihydrosanguinarin	1,37	12,8	9,3
takrin	0,12	0,006	0,05

V práci publikované v roce 2002 byly izolované benzofenantridinové alkaloidy sanguinarin a chelidonin z *Chelidonium majus* testované na inhibiční aktivitu vůči erytrocytální AChE a sérové BuChE. Vzhledem k nepřehlednosti publikovaných výsledků jsou závěry této práce dostupné v následující literatuře<sup>29</sup>.

Kompletní přehled přírodních inhibitorů je přehledně uveden společně s hodnotami IC<sub>50</sub> v práci zveřejněné v roce 2006<sup>30</sup>.

### 3.1.5.2. Antimikrobiální aktivita

Mnohé benzofenanthridinové alkaloidy vykazují větší či menší aktivitu vůči mikroorganismům. Byla u nich popsána jak aktivita bakteriostatická, tak i baktericidní vůči gram-negativním i gram-pozitivním bakteriím. U sanguinarinu a chelerytrinu byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) vůči *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* nebo *Salmonella gallinarum* MIC = 6,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ <sup>9,31</sup>. V roce 2008 byla provedena studie účinnosti 8-hydroxydihydrosanguinarinu a 8-hydroxydihydrochelerytrinu vůči závažné nozokomiální infekci způsobené meticilin-rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA). Na tuto nákazu je v současnosti účinný pouze vankomycin, ale byly hlášeny už i vankomycin-rezistentní kmeny. Proto se intenzivně hledají další možná léčiva. Výše uvedené alkaloidy vykazovaly silný účinek proti kmenům MRSA s MIC 8-16  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a budou dále zkoumány jako potenciální možnost řešení těchto infekcí<sup>17</sup>.

### 3.1.5.3. Antifugální aktivita

Benzofenanthridinové alkaloidy jako chelerytrin nebo sanguinarin jsou účinné vůči některým mykózám, např. *Tricophyton strains*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Aspergillus fumigatus* nebo *Candida albicans*. Jejich možné využití v praxi je stále objektem výzkumů<sup>9,32</sup>.

### 3.1.5.4. Antivirová aktivita

Účinky extraktu z *Chelidonium majus* byly studovány *in vitro* i *in vivo*. Bylo zjištěno, že *in vitro* inhibují virus chřipky i virus encefalomyokarditidy<sup>9</sup>. Jejich antivirová aktivita se také ukázala proti lidskému adenoviru typu 5 a 12 a proti herpes viru simplex<sup>9</sup>.

Významné antivirové účinky byly zjištěny také u nitidinu a fagaroninu. Nitidin vykazoval antimalarickou aktivitu a spolu s fagaroninem inhiboval HIV-1 a HIV-2

reverzní transkriptázu<sup>33</sup>, DNA ligázu I<sup>34</sup> a topoizomerázu I<sup>35</sup>. Fagaronin sám má také schopnost inhibovat topoisomerázu II<sup>36</sup>.

#### 3.1.5.5. Protizánětlivé účinky

Jako látky s velmi silným protizánětlivým účinkem se ukázaly dva kvartérní benzofenanthridinové alkaloidy: sanguinarin a chelerythrin<sup>37</sup>. Přičemž vyšší aktivita byla zjištěna u sanguinarinu<sup>9</sup>. U sanguinarinu nastupuje účinek okamžitě a je kratší, u chelerythrinu je nástup pomalejší ale za to protražovanější<sup>36</sup>.

#### 3.1.5.6. Indukce apoptózy a cytotoxicita

Apoptóza je typ programované buňkové smrti. Mohou k ní vést dvě signální dráhy. První je zprostředkovaná proapoptickými signály a je řízena vzájemným působením molekul rodiny Bcl-2. Spouštěcím mechanismem druhé dráhy je aktivace receptorů na plazmatické membráně buněk. Výsledkem působení obou drah je aktivace specifických proteolytických enzymů kaspas<sup>4</sup>.

Benzofenanthridinovým alkaloidem, který je schopen vyvolat apoptózu je sanguinarin. Jeho působení bylo pozorováno u buněčné linie A431 odvozené od lidského karcinomu kůže, lidských prsních a prostatických nádorových buněčných linií, buněk melanomu, děložního čípku, leukemické buněčné linie, lidských imortilizovaných keratinocytů a fibroblastů. Dalším alkaloidem, který má schopnost vyvolat apoptózu je chelerythrin. Výsledky studií obou těchto alkaloidů prokázaly, že tyto alkaloidy indukují apoptické faktory, ale k dalšímu možnému terapeutickému využití je nutné úplné objasnění mechanismu jejich vlivu na apoptózu<sup>4</sup>.

Cytotoxicita benzofenanthridinových alkaloidů chelidoninu a sanguinarinu byla popsána už v roce 1973. Cytotoxicitou těchto alkaloidů se také zabývá Zdařilová A. ve své práci z roku 2006<sup>4</sup>, kde je v přehledné tabulce uvedena jejich cytotoxicita vůči řadě buněk.

### 3.1.5.7. Interakce s bílkovinami

Významné je také působení těchto alkaloidů na mnohé fyziologicky důležité enzymy. Způsobují tak inhibici enzymů jako jsou: elastáza, pyruvátdehydrogenázový systém,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáza,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPáza, diaminooxidáza,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza, alaninaminotransferáza, asparátaminotransferáza. Chelidonin je specifickým inhibitorem protein kinázy C PK-C<sup>1</sup>. Sanguinarin se váže na angiotensinový receptor AT<sub>1</sub>, čímž se vysvětluje jeho používání v lidovém léčitelství ke snižování krevního tlaku (využití extraktu z kořenů *Bocconia frutescens*)<sup>4</sup>.

## 3.2. *Chelidonium majus*

Říše:	<i>Plantae (rostliny)</i>
Podříše:	<i>Tracheobionta (cévnaté rostliny)</i>
Nadoddělení:	<i>Spermatophyta (semenné rostliny)</i>
Oddělení:	<i>Magnoliophyta (krytosemenné)</i>
Třída:	<i>Rosopsida (vyšší dvouděložné rostliny)</i>
Řád:	<i>Ranunculales (pryskyřníkotvaré)</i>
Čeleď:	<i>Mákovité (Papaveraceae)</i>
Název:	<i>Vlaštovičnick větší (Chelidonium majus L.)</i> <sup>38</sup>

*Chelidonium majus* (vlaštovičnick větší) je jediným zástupcem svého rodu se 3-4 subspeciemi, které bývají někdy považovány za samostatné druhy<sup>8</sup>.

Lidové názvy používané v České republice: bělmové kořeny, celidon, hadí mlíčí, mlíč.

### 3.2.1. Morfologický popis

Lodyha této vytrvalé byliny bývá vysoká 30-90 cm, dutá, větvená a roztroušeně chlupatá. Dolní listy jsou dlouze, horní krátce řapíkaté stejného tvaru. Čepel je jednoduše až přetrhovaně lichožpeřená. Líc je sytě zelený, rub sivě zelený<sup>8</sup>.

Květenství tvoří 2-6květý okolík, květy mají v průměru 1-2 cm. Kalich je žlutý, prchavý, kališní lístky 2 volné. Korunní lístky jsou 4 celokrajné se žlutými tyčinkami a kyjovitě ztlustlými nitkami. Blizna je dvoulaločná a čnělka velmi krátká. Plodem jsou tobolky připomínající šešuli otevírající se odspodu dvěma chlopněmi. Semena jsou černá až 1,5 mm dlouhá<sup>8,39</sup>.



Obr.8: *Chelidonium majus* (botanical.com ©) <sup>40</sup>

### 3.2.2. Výskyt

*Chelidonium majus* se vyskytuje v jižní a střední Evropě, jižní Skandinávii, mírném až subarktickém pásmu Asie včetně Japonska a střední Číny. Byl zavlečen i do Severní Ameriky.

Roste na mírně zastíněných, vlhkých a na dusík bohatých půdách. Nejčastěji ho nalezneme na nábších, zahradách, rumištích, okrajích cest nebo v humózních hájích<sup>8</sup>.



Obr.9: *Chelidonium majus* – detail, (types-of-flowers.com ©)<sup>41</sup>

### 3.2.3. Použití v lidovém léčitelství a medicíně

Už ve starověku se využíval extrakt z *Chelidonium majus*. Uplatnění našel v léčbě bradavic, hemeroidů nebo artritidy<sup>1</sup>.

V lidovém léčitelství je droga doporučována při dně, vodnatelnosti jako diuretický prostředek, při syfilidě, malárii, na regulaci menstruace, při kožní tuberkulóze, břišním tyfu, rakovině kůže, psoriáze. Mléčná šťáva se používá na odstraňování bradavic<sup>42</sup>.

*Chelidonium majus* má širokou škálu biologických účinků. Byla u něj studována antivirová, antitumorózní, antibakteriální, antimykotická nebo protizánětlivá aktivita<sup>9</sup>.

V současné době bývá herba *Chelidonii* součástí cholagog, přípravků používaných při cholecystopatiích, spasmolytik, používá se na doléčení posthepatických stavů, při dyspepsii a žlučových kamenech. Její používání ale bývá stále více spojováno s hepatopatií<sup>9</sup>.

### 3.2.4. Obsahové látky

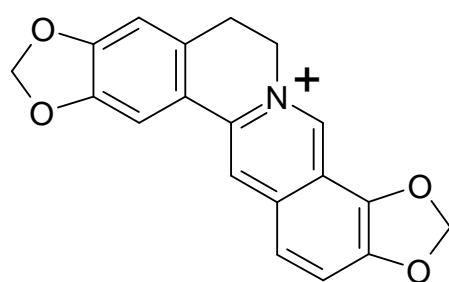
*Chelidonium majus* obsahuje široké spektrum isochinolinových alkaloidů. Nejvyšší obsah alkaloidů ze všech částí této rostliny je v kořeni, který obsahuje až 2,5 % alkaloidů. Množství alkaloidů se ale mění v závislosti na vegetačním období<sup>10</sup>.

Hlavní alkaloidy jsou benzofenanthridinové alkaloidy, které již byly zmíněny v předcházejícím textu.

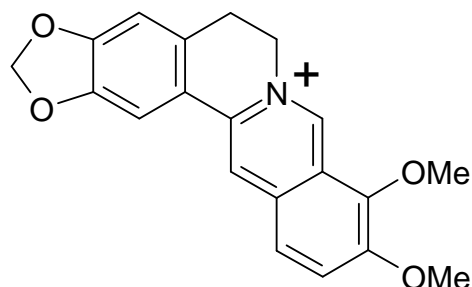
Dalšími typy isochinolinových alkaloidů izolovaných z *Chelidonium majus* jsou:

- protoberberinové alkaloidy: koptisin, berberin, stylopin, korysamin (Obr.10)
- protopinové alkaloidy: protopin, allokryptopin (Obr.11)
- aporfinové alkaloidy: magnoflorin (Obr.12)<sup>10</sup>

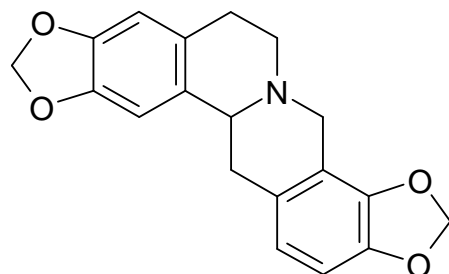
Další obsahové látky izolované z *Chelidonium majus* jsou flavonoidy, silice a biogenní aminy jako cholin, methylamin, tyramin a histamin<sup>10,43</sup>.



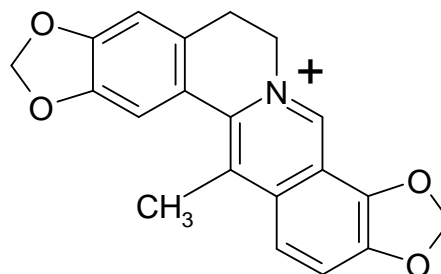
koptisin



berberin



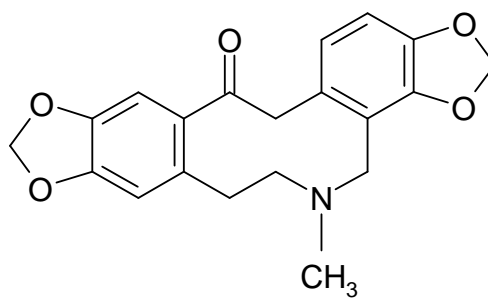
stylopin



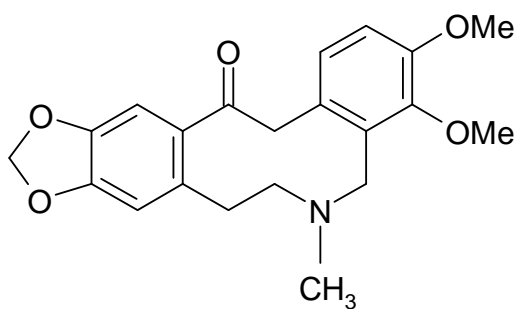
korysamin

Obr.10: Protoberberinové alkaloidy *Chelidonium majus*



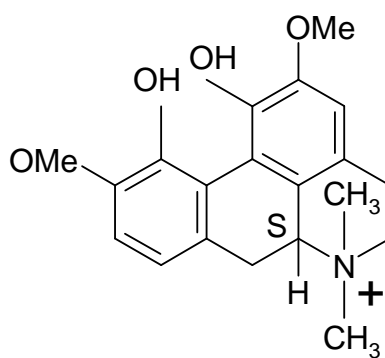


protopin



allokryptopin

Obr.11: Protopinové alkaloidy *Chelidonium majus*



magnoflorin

Obr.12: Aporfinové alkaloidy *Chelidonium majus*

### **3.3. Metody používané při izolaci benzofenanthridinových alkaloidů**

#### **3.3.1. Extrakce benzofenanthridinových alkaloidů**

Extrakce benzofenanthridinových alkaloidů se provádí z nadzemních i podzemních částí rostlin jako je nať, kořen, plody nebo oplodí<sup>44</sup>. Extrahuje se jak organickými tak i anorganickými rozpouštědly (např. methanol, ethanol, kyselina sírová, kyselina chlorovodíková).

Běžně používanou metodou extrakce je využití Soxhletova přístroje, kdy se ale extrakt permanentně zahřívá, a vzniká tak riziko vzniku artefaktů nebo může dojít k rozkladu drogy. Výhodnější je z tohoto pohledu perkolace, která se provádí za běžné teploty<sup>45</sup>. Je ale časově náročnější a spotřeba rozpouštědla je větší.

Další možností extrakce je macerace za studena, kdy se droga zalije rozpouštědlem a nechá se macerovat za pokojové teploty. Alternativou tohoto postupu je macerace za horka, kde se droga s rozpouštědlem vloží do vodní lázně a zahřívá se na 100°C<sup>46</sup>.

#### **3.3.2. Analýza benzofenanthridinových alkaloidů**

K analýze benzofenanthridinových alkaloidů lze využít řadu klasických metod jako jsou: papírová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a plynová chromatografie.

Papírová chromatografie je velmi zdlouhavá a používala se především dříve. V současné době už je nahrazena novějšími a modernějšími metodami. Běžně používaná je dnes tenkovrstvá chromatografie.

K nejpřesnějším metodám patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

### **3.4. Alzheimerova choroba**

Nejčastějším typem neurodegenerativního onemocnění v současné době je Alzheimerova choroba, která zaujímá až 50-60% všech demencí<sup>5</sup>. Bohužel lidí s touto nemocí neustále přibývá. Jedním s hlavních důvodů je celosvětové stárnutí obyvatelstva, jelikož incidence a prevalence tohoto onemocnění se zvyšuje s věkem<sup>6</sup>.

#### **3.4.1. Charakteristika a klasifikace**

Alzheimerova choroba je definována jako primární atroficko-degenerativní onemocnění mozku nejasné etiologie, jejímž znakem je postupný rozvoj demence. K hlavním příznakům této nemoci patří progredující porucha paměti (především krátkodobé) a prostorové orientace, ztráta intelektuálních a sociálních dovedností s emocionální labilitou projevující se agitovaností, úzkostí, depresí nebo agresivitou. Dále bývá narušen cyklus spánek-bdění<sup>5,6</sup>.

Podle doby počátku vzniku onemocnění můžeme Alzheimerovu nemoc rozdělit na onemocnění s časným začátkem (tj. do 65. roku věku) a na onemocnění s pozdním začátkem (tj. po 65. roku věku). Pro první typ je charakteristický rychlý nástup a progresse onemocnění u druhého je typický pozvolnější, postupný nástup a průběh a jako jedno z diagnostických kritérií bývá taky udávána převaha zhoršení paměti nad zhoršením intelektových schopností<sup>6</sup>.

#### **3.4.2. Patofyziologie**

Ke změnám dochází jak na úrovni makroskopické, tak na úrovni mikroskopické. Z makroskopického hlediska dochází ke zmenšování gyrů a rozšiřování sulků a v návaznosti na to se mohou zvětšovat i mozkové komory. K atrofii neuronů dochází zejména v oblasti hippocampu a enterohinálního kortexu<sup>6</sup>.

Mikroskopické změny můžeme rozdělit na extracelulární a intracelulární. Extracelulární jsou spojeny především s ukládáním  $\beta$ -amyloidu. Tato patologická bílkovina vzniká z proteinu běžně obsaženého v neuronech, který se za fyziologických podmínek štěpí a rozpouští. Avšak za patologického stavu dochází k nadměrnému odbourávání tohoto proteinu a k shlukování vzniklých štěpů v amyloidní plaky. Tyto útvary se poté vyskytují v mozkové kůře, podkorových jádrech a mozečku. Ve velmi malém množství se mohou vyskytovat v mozku i při fyziologickém stárnutí. Intracelulární změny jsou spojeny s degenerací  $\tau$ -proteinu. Ten je za normálních okolností vázán v mikrotubulech neuronů. Při Alzheimerově chorobě ale dochází k jeho uvolňování z této vazby a stává se základem pro vznik nových spirálních vláken, ze kterých následně vznikají neuronální klubka. Neurony s tímto poškozením postupně zanikají<sup>6,47,48</sup>.

Na rozvoji Alzheimerovy choroby se pravděpodobně podílejí i další mechanismy. Jedním z nich je např. sterilní zánět, který vzniká v místě senilních plaků, kde poškozená nervová tkáň vyvolává imunitní reakci. Další z reakcí, která probíhá v takto poškozené mozkové tkáni, je nadměrný vznik volných radikálů a jejich nedostatečné odbourávání. Tyto radikály následně porušují membránu neuronů a vedou k jejich apoptóze. V místech plaků také dochází ke sníženému metabolismu neuronů<sup>47</sup>.

Z neuromediátorových systémů je nejvíce poškozen systém cholinergní a to především v oblastech mozku významných pro kognitivní a paměťové funkce. Významně je snížena tvorba a uvolňování acetylcholinu z presynaptických zakončení. Dochází také ke snížení aktivity acetylcholintransferázy a denzita cholinergních receptorů. Na odbourávání acetylcholinu při Alzheimerově chorobě se také významně podílí enzymy BuChE<sup>7,49</sup>.

### 3.4.3. Farmakoterapie

Vzhledem k tomu, že není známa přesná příčina vzniku Alzheimerovy choroby, je v současné době možné léčit pouze její symptomy.

Farmakoterapii můžeme rozdělit na dvě skupiny léčiv: kognitiva (látky zlepšující funkci centrálního acetylcholinergního systému)<sup>7</sup> a nootropika (látky zlepšující činnost mozku a jeho metabolismus)<sup>50</sup>.

#### 3.4.3.1. Kognitiva

Zde se řadí skupina látek příznivě ovlivňující poznávací (kognitivní) funkce, používané zejména k terapii demencí. Posilují především cholinergní přenos na mozkových synapsích<sup>50</sup>.

##### 3.4.3.1.1. Inhibitory cholinesteráz

Doposud nejúčinnější léčiva pro terapii lehkých až středně pokročilých Alzheimerových demencí jsou inhibitory AChE (některé z nich inhibují zároveň i BuChE). Tyto látky způsobují zpomalení průběhu nemoci a oddálení těžších fází<sup>6</sup>.

Principem jejich účinku je zablokování enzymů odbourávajících acetylcholin a tím prodloužení vazby acetylcholinu na své receptory a zvýšení cholinergní transmise<sup>6,7</sup>. Bylo také prokázáno, že inhibice cholinesteráz snižuje toxicitu i tvorbu beta-amyloidu a zasahuje tak do neurodegenerativních mechanismů Alzheimerovy choroby<sup>5</sup>. Základní podmínkou je, že centrální inhibitory cholinesteráz musí procházet hematoencefalickou bariérou, ovlivňovat specificky mozkové formy cholinesteráz a být dobře tolerovány<sup>7</sup>.

Inhibice cholinesteráz může probíhat buď reverzibilním způsobem nebo pseudoireverzibilním způsobem, jehož účinek je delší. V současnosti jsou z této skupiny ve většině zemí Evropy i v USA využívány tři látky: rivastigmin (Exelon®), donepezil (Aricept®) a galanthamin (Reminyl®). Tyto látky mají přibližně stejnou účinnost, ale liší se v délce a místě působení. Donepezil je poměrně selektivní inhibitor AChE a má

relativně dlouhý poločas (podává se jedenkrát denně). Rivastigmin inhibuje AChE i BuChE pseudoireverzibilně a podává se dvakrát denně. Galanthamin je reverzibilní inhibitor AChE a kromě toho také alostericky moduluje nikotinové a acetylcholinové pre- i postsynaptické receptory<sup>7</sup>. Dříve používaný takrin se již neužívá pro své závažné hepatotoxické nežádoucí účinky (u 15-30% pacientů)<sup>49</sup>.

Potenciální antiacetylcholinesterázová léčiva jsou v současné době velmi intenzivně zkoumána (studují se jak synteticky připravené látky, tak i látky izolované z přírodních zdrojů). Studium se zaměřuje zejména na potenciální léčiva s duálním účinkem (inhibující AChE i BuChE)<sup>51,52</sup>. Pozornost je zaměřena zejména na skupinu alkaloidů, kde se jako velmi perspektivní v poslední době ukazuje huperzin A<sup>53</sup>.

#### 3.4.3.1.2. Látky uvolňující prekurzory acetylcholinu

Dalšími látkami využívanými v terapii Alzheimerovy choroby, jejichž účinek ale není dostatečně potvrzen klinickými studiemi, jsou léčiva uvolňující prekurzory acetylcholinu. K nejznámějším patří sójový lecitin. Tyto látky ale mají nízkou prostupnost přes hematoencefalitickou bariéru, a proto se v současnosti používají pouze jako doplňková terapie<sup>49</sup>.

#### 3.4.3.1.3. Inhibitory NMDA receptorů

Pro správnou činnost mozku je také nezbytná činnost glutamátergního systému. Ten bývá v těžších stádiích Alzheimerovy choroby narušen. Dochází k nadměrnému uvolňování glutamátu a dalších excitačních kyselin. Na úrovni receptorů pak dochází k tvorbě přenosových šumů<sup>7</sup>.

Proto se v terapii využívají inhibitory NMDA (N-metyl-D-aspartátových) receptorů. Výsledky klinických studií naznačují, že tato léčba vede k udržení kognitivních funkcí a ke zpomalení progresu Alzheimerovy choroby. V praxi se v současné době používá pouze memantin (Ebixa®)<sup>7</sup>.

### 3.4.3.2. Nootropika

U demencí i lehkých poruch poznávacích funkcí byl zjištěn defekt oxidativního mozkového metabolismu. To vedlo k zavedení nootropik, což jsou látky zlepšující metabolismus mozkových činností<sup>7</sup>.

Jejich účinek je podmíněn dlouhodobým užíváním. Ale zatím žádná klinická studie jednoznačný prospěch těchto léčiv neukázala. V této oblasti se využívají vazodilatancia jako např. pentoxyfyllin (Trental®, Agapurin®) nebo naftidrofuryl (Enelbin®). Z látek zvyšujících mozkový metabolismus se používá piracetam, který kromě toho zlepšuje reologické vlastnosti krve, pyritinol, který má zároveň protizánětlivé účinky nebo nicergolin, který zlepšuje mozkovou mikrocirkulaci. Další z terapeutických možností je využití extraktu z *Ginkgo biloba*<sup>49</sup>.

Dříve se využívaly dihydronámelové alkaloidy, od kterých se ale kvůli nízké účinnosti postupně ustupuje stejně jako od vazodilatačních přípravků s obsahem papaverinu<sup>7</sup>.

K terapii behaviorálních poruch se v těchto případech využívají jak antipsychotika, tak i antidepressiva<sup>49</sup>.

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**



## **4.1. Všeobecné postupy**

### **4.1.1. Destilace a odpařování**

Rozpouštědla byla před použitím destilována, nejprve byl zachycen předeček (asi 5%; většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých cca 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách.

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce Büchi Rotavapor R 114 vybavené vodní lázní Büchi Waterpath B-480 při 40 °C za sníženého tlaku.

### **4.1.2. Chromatografie**

#### **4.1.2.1. Tenkovrstvá chromatografie**

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna v systému normálních komor. Ty byly nasyceny mobilní fází. Sycení komor trvalo 30 minut. V případě komor pro preparativní tenkovrstvou chromatografii 60 minut. Chromatografie byla prováděná vzestupně.

#### **4.1.2.2. Sloupcová chromatografie**

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem gradientové eluce na silikagelu L, 0,1 - 0,2 mm, deaktivovaném 10 % vody. Suspenze adsorbentu v rozpouštědle byla nalita do chromatografické kolony. Na připravený sloupec byl nanesen vzorek rozpuštěný v malém množství rozpouštědla.

## 4.2. Materiál a vybavení

### 4.2.1. Rozpouštědla

Diethylamin, p.a., Lachner

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a.

n-hexan, p.a., PENTA

Chloroform, p.a., PENTA

Toluen, p.a., PENTA

Cyklohexan, p.a., PENTA

### 4.2.2. Chemikálie

Dusičnan bismutitý zásaditý, p. a., (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

Hydroxid sodný, p. a. (PENTA)

Kyselina vinná, p. a., (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

Kyselina chlorovodíková 35%, p. a. (Lachema)

Uhličitan sodný bezvodý, p. a., (RNDr. Jan Kulich, s.r.o.)

### 4.2.3. Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erythrocytární AChE a BuChE

*Chemikálie:*

10 mM acetylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)

10 mM butyrylthiocholin jodid, (Sigma-Adrich)

0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4

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

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema)

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

Galanthamin hydrobromid, (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Dimethylsulfoxid, (Sigma-Adrich)

#### *Materiál:*

Jako zdroj acetylcholinesterázy byl použit hemolyzát lidských erytrocytů:

- plná krev byla odstředěna po dobu 15 minut při 10000 ot./ min, získaná erytrocytární masa byla 3 × promyta 0,1 M fosfátovým puftrem, pH 7,4 aby byly odstraněny zbytky plazmy; 10% (v/v) hemolyzát byl připraven ve vodě.

Zdrojem butyrylcholinesterázy byla lidská plazma.

Jednorázové semimikro-polystyrenové kyvety 1,5 ml PLASTIBRAND<sup>®</sup>.

#### **4.2.4. Chemikálie a materiál ke stanovení antioxidační aktivity**

2,2'-diphenyl-1-pikrylhydrazyl radikál, (Sigma-Adrich)

Kvercetin

Trolox

#### **4.2.5. Chemikálie a materiál ke stanovení antiprotozoální aktivity**

3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid, (Sigma-Adrich)

Dichroman draselný, (Sigma-Adrich)

Tetrahymena pyriformis – prvok (dodáno katedrou parazitologie, Přírodovědecké fakulta, UK Praha)

#### **4.2.6. Přístroje použité při stanovování biologických vlastností izolovaných látek**

Centrifuga typ MPW-340 (Mechanika precyzyjna, Varšava, Polsko)

pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

Spektrofotometr UV-1601 CE SHIMADZU

FIA lab 3000 analyser (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA)

USB 2000-UV/VIS spektrofotometr se zdrojem světla LS-1 (Ocean Optics, USA)

CMA-Z průtoková cela (1- cm délka)

#### 4.2.7. Detekční činidla

**D 1:** Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera<sup>54</sup>

- pro alkaloidy a další sloučeniny obsahující dusík.
- *roztok A:* připraven rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.
- *roztok B:* připraven rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody.
- *zásobní roztok:* získáme smísením roztoků A a B v poměru 1:1.
- *činidlo pro analýzu:* bylo připraveno rozpuštěním 5 ml kyseliny vinné v 50 ml vody a 5ml zásobního roztoku

#### 4.2.8. Chromatografické adsorbenty

A 1: Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck, 5 × 10 cm 32

Hliníková deska s vrstvou silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii. Silikagel 60 F<sub>254</sub>, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

A 2: Silufol UV 254, Kavalier Votice, 20 × 10 cm, hliníková deska s tloušťkou vrstvy 0,1 mm pro tenkovrstvou chromatografii

A 3: Silikagel, 0,063–0,20 mm desaktivovaný 10 % vody, komerční adsorbent

#### 4.2.9. Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (TLC)

S1: Toluén + CHCl<sub>3</sub> + EtOH + Et<sub>2</sub>NH 77:20:3:3

#### 4.2.10. Vyvíjecí soustavy pro preparativní TLC

S1: Hexan+ Et<sub>2</sub>NH 9:1

### **4.3. Extrakce alkaloidů z nati *Chelidonium majus* a zpracování výtřepku A**

Příprava sumárního extraktu a jednotlivých výtřepků nebyla součástí této diplomové práce. Tato práce byla provedena Doc. RNDr. L. Opletalem na katedře farmaceutické botaniky v roce 2008. Postup přípravy pseudokyanidů benzofenanthridinových alkaloidů je uveden v následujícím textu.

#### **4.3.1. Původ drogy**

Sušenou nat' s kořeny dodala firma JUGODRVO AD. Sběr byl proveden v Chorvatsku v období od července do září. Droga byla očištěna a usušena za normálních podmínek a její makroskopickou, mikroskopickou a chemickou identifikaci provedl Doc. RNDr. L. Opletal, CSc.

#### **4.3.2. Příprava sumárního extraktu**

Příprava extraktu byla provedena perkolací 41,8 kg drogy 95% etanolem a bylo získáno 480 l extraktu, který byl zahuštěn na vakuové odparce při 60°C. Přidáním asi 2 l vody vznikl temně hnědý, dehtovitý, sirupovitý roztok. Po zahřátí asi na 40°C bylo přidáno 8 l 1,5% kyseliny sírové. Poté byl oranžový roztok slit a nerozpustný seškrábán a rozpuštěn v bezvodé kyselině octové. Po přidání 7,5 l vody byl kalný roztok slit a pryskyřičný roztok opět rozpuštěn v kyselině octové a opět vysrážen vodou. Spojené dekantáty byly zfiltrvány přes polyamidový filtr, na němž se po promytí vyloučil hnědo-oranžový sediment. Filtráty z kyseliny sírové i kyseliny octové byly spojeny. Vyloučila se bělavá sraženina, která na sebe adsorbovala soli alkaloidů. Tato suspenze byla zfiltrována přes polyamidovou plachetku a promyta vodou. Oba filtry byly suspendovány v 1,5% kyselině sírové a suspenze byla následně zfiltrována. Vzniklý

filtrát byl spojen s kyselým extraktem roztoku. Z takto připraveného extraktu byly dále získány výtřepky A, B, J a E.

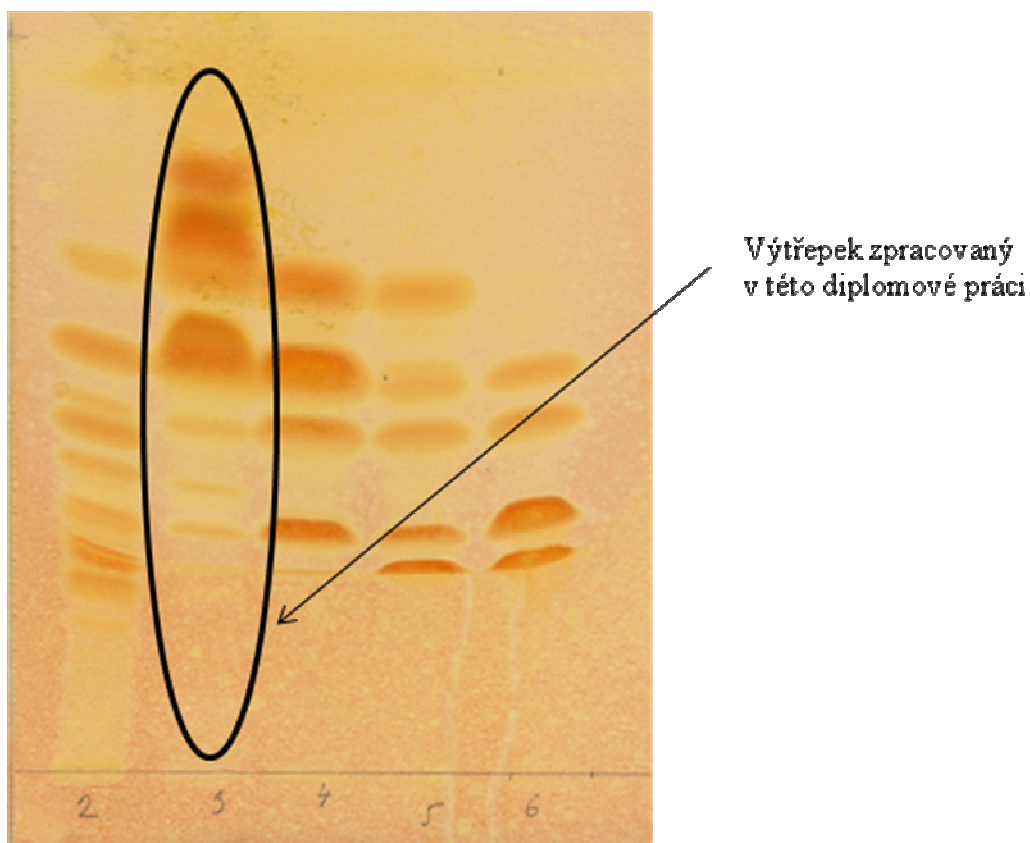
#### **4.3.3. Příprava výtřepku A z primárního extraktu**

Po přidání práškového, bezvodého uhličitanu sodného se kyselý roztok síranů zakalil (došlo k neutralizaci na pH přibližně 9). Poté byl roztok vytřepán 5x15 litry étheru. Étherové vrstvy byly spojeny a odděleny od zbytku vodné fáze. Rozpouštědlo bylo následně oddestilováno. Po prvním vytřepání se oddělil práškovitý, šedočerný podíl, který byl oddělen a vytřepán 2x400 ml étheru a přidán k étherovým výtřepkům. Po odpaření rozpouštědla vznikl odparek A.

#### **4.3.4. Příprava pseudokyanidů benzofenanthridinových alkaloidů z výtřepku A Gadamerovou metodou<sup>55</sup>**

Odparek A byl rozpuštěn v 0,05 M  $H_2SO_4$ , byl přidán KCN do alkalické reakce a roztok byl opět okyselen 0,05 M  $H_2SO_4$ . Z roztoku se vyloučily nerozpustné pseudokyanidy, které odsáty, promyty vodou a vysušeny za sníženého tlaku.

Získané pseudokyanidy byly pro další práci rozloženy hodinovým varem ve směsi chloroform:ethanol:konc. HCl (1:2:1), chloroform a ethanol byly následně oddestilovány, vodný roztok zalkalizován amoniakem a uvolněné báze byly vytřepány etherem (5 x 2000 ml). Tímto byly odděleny od fialových rozkladných produktů. Spojené etherové fáze byly spojeny, oddestilovány a vysušeny. Bylo získáno 6 g tmavě hnědého, pěnového odparku, který byl následně zpracováván v rámci této diplomové práce.



Obr. 13: Detekce výtřepků z *Chelidonium majus*, výtřepok A vyčištěný (Kieselgel UV 254 Merck, 10 cm (dráha 8,5 cm),  $To+Chf+EtOH+Et_2NH = 70:20:10:3$ , komora nasycená, vyvíjení 1x, detekce Dragendorffovým činidlem podle Muniera).

- 2 – A2 fenolické
- 3 – benzofenanthridiny (chelerythrin ad.)
- 4 – baze z chloridů nerozpustných ve vodě
- 5 – AC: chloridy rozpustné v chloroformu
- 6 – AD: chloridy nerozpustné v chloroformu

#### 4.4. Sloupcová chromatografie výtřepku benzofenanthridinových alkaloidů z *Chelidonium majus*

6,0 g výtřepku benzofenanthridinových alkaloidů bylo rozpuštěno v 50 ml chloroformu, naneseno na kolonu a chromatografováno za účelem získání čistých alkaloidů. Frakce obsahující shodné alkaloidy byly na základě tenkovrstvé

chromatografie spojeny. Výsledky chromatografie jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tab. III, IV).

Tab. III: Sloupcová chromatografie

	Benzofenanthridinové alkaloidy, <i>Chelidonium</i>
Označení vzorku	<i>majus</i>
Hmotnost vzorku	6g, hnědá pěna
Druh a množství adsorbentu	Silikagel 0,063-0,2mm, desaktivovaný 10% vody
Vrstva s extraktem	40×40 mm
Dělicí vrstva	40×510 mm
Frakce (ml)/doba toku (min.)	100 ml/ 20 minut
Mrtvý objem	0,5 l

Tab. IV: Výsledky sloupcové chromatografie

Č. frakce	Eluční systém	Popis (Poznámka)
1-5	CHCl <sub>3</sub>	neobsahuje alkaloidy
6-7	CHCl <sub>3</sub>	1,1 g oranžové krystaly
8	CHCl <sub>3</sub>	0,448 g oranžové krystalky
9	CHCl <sub>3</sub>	0,081 g žlutohnědá olejovitá hmota
10	CHCl <sub>3</sub>	neobsahuje alkaloidy
11	CHCl <sub>3</sub>	0,057 g červenohnědé krystalky
12-13	CHCl <sub>3</sub>	0,185 g oranžové krystaly
14	CHCl <sub>3</sub>	0,211 g oranžovohnědé krystalky
15-17	CHCl <sub>3</sub>	0,856 g oranžovohnědá pěna
18-19	CHCl <sub>3</sub>	0,727 g hnědá olejovitá hmota
20-21	CHCl <sub>3</sub>	0,492 g nažloutlá pěna
22-23	CHCl <sub>3</sub>	0,409 g žlutohnědá pěna



24-27	CHCl <sub>3</sub>	0,320 g hnědá pěna
28	CHCl <sub>3</sub>	0,116 g hnědá olejovitá hmota
29-30	CHCl <sub>3</sub>	0,207 g hnědá olejovitá hmota
31	CHCl <sub>3</sub>	0,510 g oranžovohnědá olejovitá hmota
32-34	CHCl <sub>3</sub>	32-42 společně odpařeno
35-37	CHCl <sub>3</sub> + 3%EtOH	32-42 společně odpařeno
38-42	CHCl <sub>3</sub> + 5%EtOH	32-42 0,530g žlutooranžová pěna
43	CHCl <sub>3</sub> + 10%EtOH	0,758 g světle hnědá pěna
44	CHCl <sub>3</sub> + 10%EtOH	neobsahuje alkaloidy
45	EtOH	neobsahuje alkaloidy

#### 4.5. Zpracování frakcí 11-14

0,057 g červenohnědých krystalků frakce 11 bylo rozpuštěno v chloroformu a přečištěno přes kolonu o průměru 1 cm s 2 cm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> neutralizovaného 6% vody. Kolona byla promývána chloroformem.

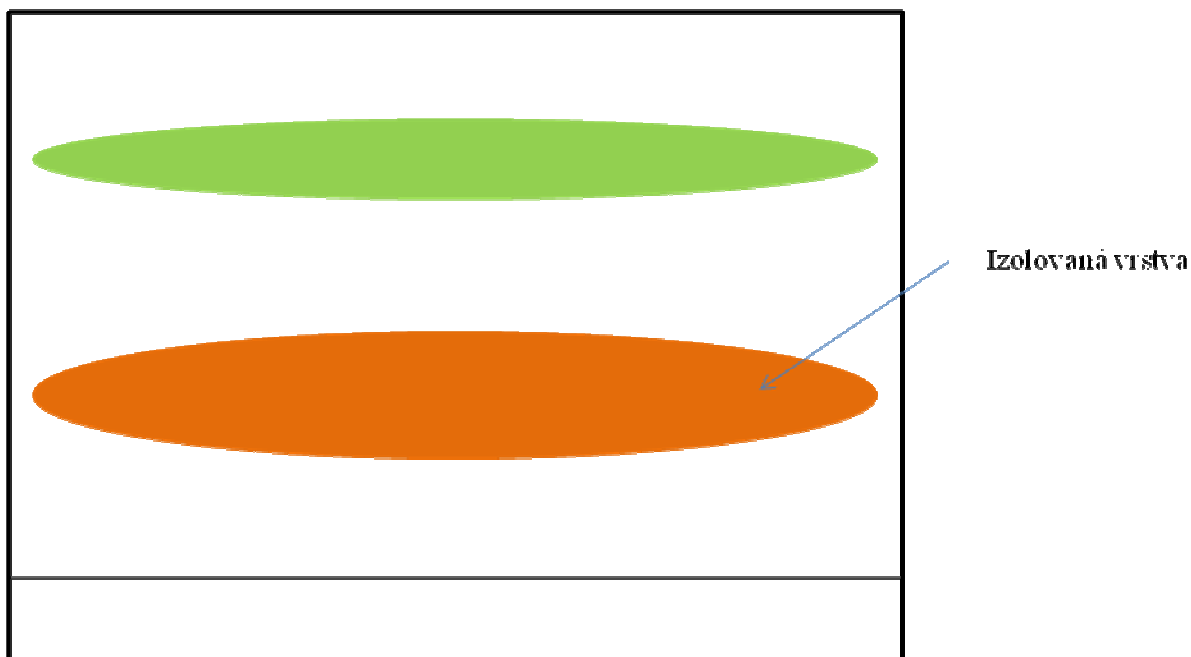
Frakce 12-13 byly na základě shodné tenkovrstvé chromatografie spojeny a také přečištěny přes kolonu o průměru 1 cm s 2 cm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> neutralizovaného 6% vody. Následně byla provedena TLC frakce 11 a spojených frakcí 12-13, která potvrdila, že obě frakce jsou totožné a bylo provedeno jejich spojení a společné odpaření. Byl získán oranžový odparek olejovité konzistence. Ten byl následně překrytalizován ze směsi chloroform:hexan (1:1).

Frakce 14 byla za mírného zahřátí rozpuštěna v chloroformu a uložena do lednice, kde do druhého dne došlo k vyloučení krystalů, které byly zpracovány stejně jako předcházející frakce. Krystaly z frakce 11-13 byly odfiltrovány, promyty a vysušeny v exikátoru.

Spojené frakce 11-13 a frakce 14 byly podrobeny hmotnostní spektrometrii. Výsledek byl u obou frakcí totožný a na tomto základě byly získané krystalky spojeny a označeny jako LŠ1. Celková hmotnost získaných alkaloidů byla 0,123 g. Krystaly byly podrobeny NMR studii. Dále byl u izolovaných alkaloidů stanoven bod tání 198-200 °C.

#### **4.6. Zpracování frakcí 18-19**

Frakce 18 a 19 byly na základě shodného výsledku tenkovrstvé chromatografie spojeny. K získání čistého alkaloidu byla využita preparativní tenkovrstvá chromatografie, kde byla jako vyvíjecí soustava použita směs hexanu a dietylaminu v poměru 9:1. Chromatografie byla provedena na 16 deskách (A2) a bylo nanášeno celkem 400 mg frakce 18-19 rozpuštěných v chloroformu. Vyvíjení každé z desek trvalo 25-30 minut a bylo provedeno dvakrát. Z desek byla na základě UV detekce izolována spodní zóna. Stacionární fáze byla promyta chloroformem (100 ml). Filtrát byl promyt na koloně o průměru 1cm s 2cm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  neutralizovaného 6% vody. Po odpaření byl alkaloid za mírného zahřátí rozpuštěn v chloroformu a uložen do lednice. Vzniklé krystalky byly zdekantovány, přečištěny v ethanolu a vysušeny v exsikátoru. Takto bylo získáno 0,136 g čistého alkaloidu, který byl uložen pod označením LŠ2.



Obr.14: Preparativní tenkovrstvá chromatografie frakcí 18-19

## 4.7. Určení struktury izolovaný látek

### 4.7.1. Měření hmotnostního spektra (MS)

Spektra byla měřena na LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo, iontová past, ionizace elektrosprejem v kladném módu (ESI+). MS/MS spektra byla měřena při kolizní energii 40 eV. Látka byla rozpuštěna v metanolu.

### 4.7.2. Měření NMR spektra

Spektra byla měřena na spektrometru Varian Inova 500 s pracovní frekvencí 499.9 MHz pro  $^1\text{H}$  a 125.7 MHz pro  $^{13}\text{C}$  jádra.  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě,  $^1\text{H}$  a všechna  $^2\text{D}$  spektra v inverzní 5mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních sekvencí. Experimenty byly měřeny v deuteriochloroformu při 25 °C.

Hodnoty chemických posunů jsou v ppm a jsou vztaženy k internímu standardu (hexamethyldisilan, 0,04 ppm, v  $^1\text{H}$  spektrech) nebo signálu solventu (76,99 ppm, v  $^{13}\text{C}$  spektrech). (Dr. M. Kurfürst, Ph.D., Ústav chemických procesů, AV ČR, Praha).

#### **4.7.3. Měření bodu tání**

Teploty tání byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány.

### **4.8. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidu vůči AChE a BuChE**

#### **4.8.1. Podmínky měření**

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při teplotě 25 °C
- v prostředí PB
- při pH 7,4
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v jednorázových plastových kyvetách o tloušťce 1 cm

#### **4.8.2. Stanovení inhibiční aktivity**

Pro stanovení inhibiční aktivity látek byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB. Výsledkem je žlutě zbarvený produkt, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nebo butyrylcholinesterasy nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami

IC<sub>50</sub> známých inhibitorů cholinesteráz: galathaminem (IC<sub>50</sub> AChE = 6,898 μM, BuChE = 156 μM), Huperzin A (IC<sub>50</sub> AChE = 0,25 μM, BuChE >1000 μM)<sup>56</sup>.

#### 4.9. Stanovení antioxidační aktivity získaných alkaloidů

Antioxidační aktivita byla testována *in vitro* DPPH testem. Metoda je založena na reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) se vzorkem. Snížení absorbance DPPH měřené při 525 nm je závislé na koncentraci antioxidantu ve sledovaném vzorku. Byly použity FIALab pro Windows software, FIALab 3000 analyser (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA), 2,5-ml syringe pump, USB2000-UV/VIS spektrofotometr se zdrojem světla LS-1 (Ocean Optics, USA) a SMA-Z průtoková cela (1-cm délka). Antiradikálová aktivita vzorků byla vyjádřena jako 50% účinná koncentrace (EC<sub>50</sub>), která byla vypočítána pomocí programu GraphPad Prism 3.02, a byla porovnána se známými antioxidanty: kvercetinem EC<sub>50</sub> = 25,3 μM a troloxem EC<sub>50</sub> = 27,8 μM<sup>56</sup>.

#### 4.10. Stanovení antiprotozoální aktivity získaných alkaloidů

Pro stanovení antiprotozoální aktivity byla použita spektrofotometrická metoda využívající redukci MTT barviva (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide), který je ukazatelem mitochondriální aktivity a viability prvoka *Tetrahymena pyriformis*, na fialově zbarvený formazan, který se stanovuje při vlnové délce 562 nm. Hodnoty EC<sub>50</sub> byly vypočítány nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA) a porovnány se standardem dichromanem draselným (EC<sub>50</sub> = 4,095 μM)<sup>56</sup>.

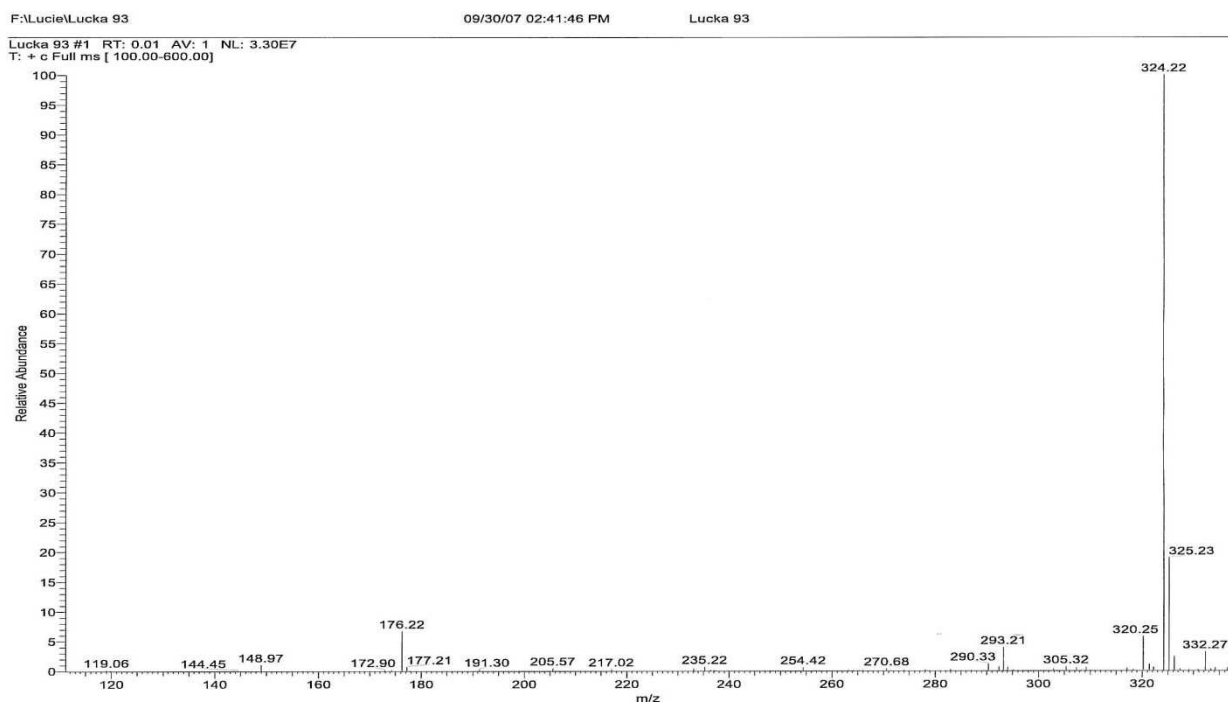
## **5. VÝSLEDKY**

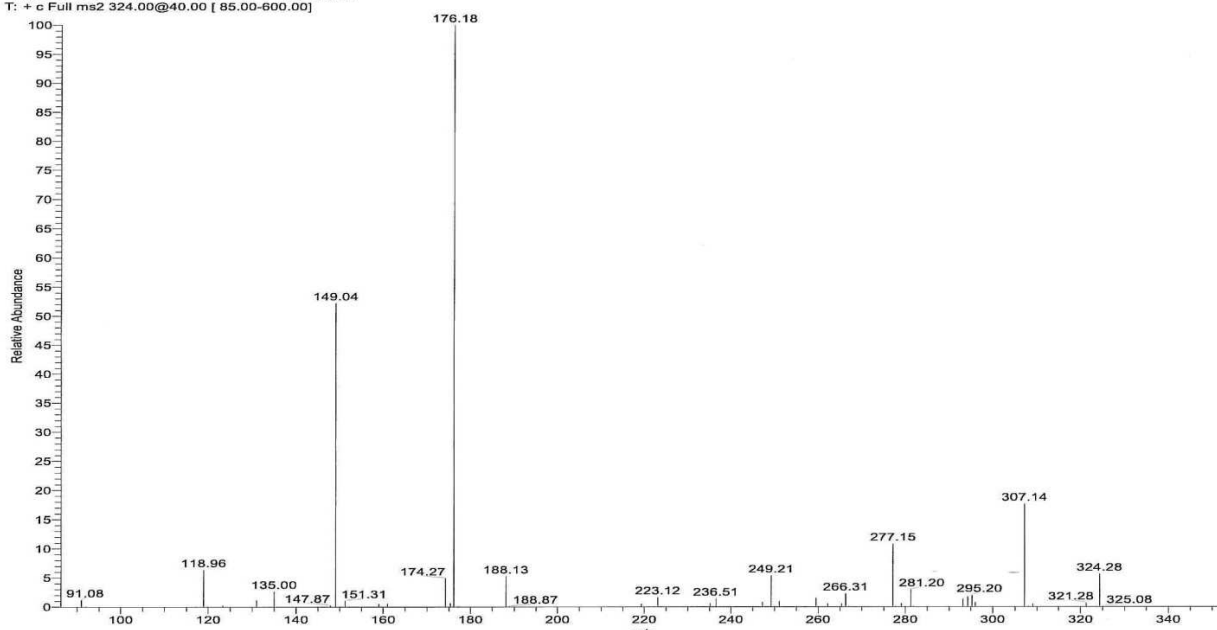
Na základě MS a NMR studií a porovnání dat s literaturou byly izolované látky identifikovány jako stylopin (6,7,12,13-tetrahydro-,4H-Bis[1,3]benzodioxolo[5,6-a:4',5'-g]quinolizin)<sup>57</sup> a chelidonin (5,6,7,12,13,14-hexahydro-13-methyl-[1,3]-benzodioxolo[5,6]-1,3-dioxolo[4,5-]phenanthridin-6-ol)<sup>58</sup>.

## 5.1. Strukturní analýza stylopinu

### 5.1.1. MS studie stylopinu

ESI-MS  $m/z$   $[M+H]^+$  342.22(100). MS/MS  $m/z$  307.14 (18), 277.15 (11), 176.18 (100), 149.04 (52).

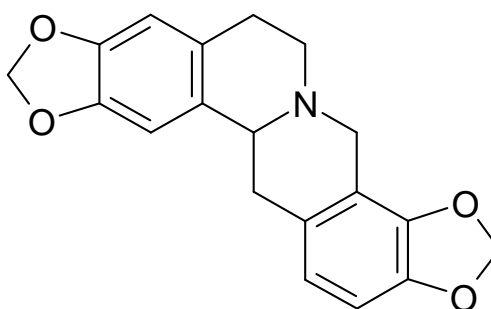


Lucka 93 MS2 324 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.46E7  
T: + c Full ms2 324.00@40.00 [ 85.00-600.00]

Obr. 15: MS a MS2 spektrum stylopinu

### 5.1.2. NMR studie stylopinu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře<sup>41</sup>.



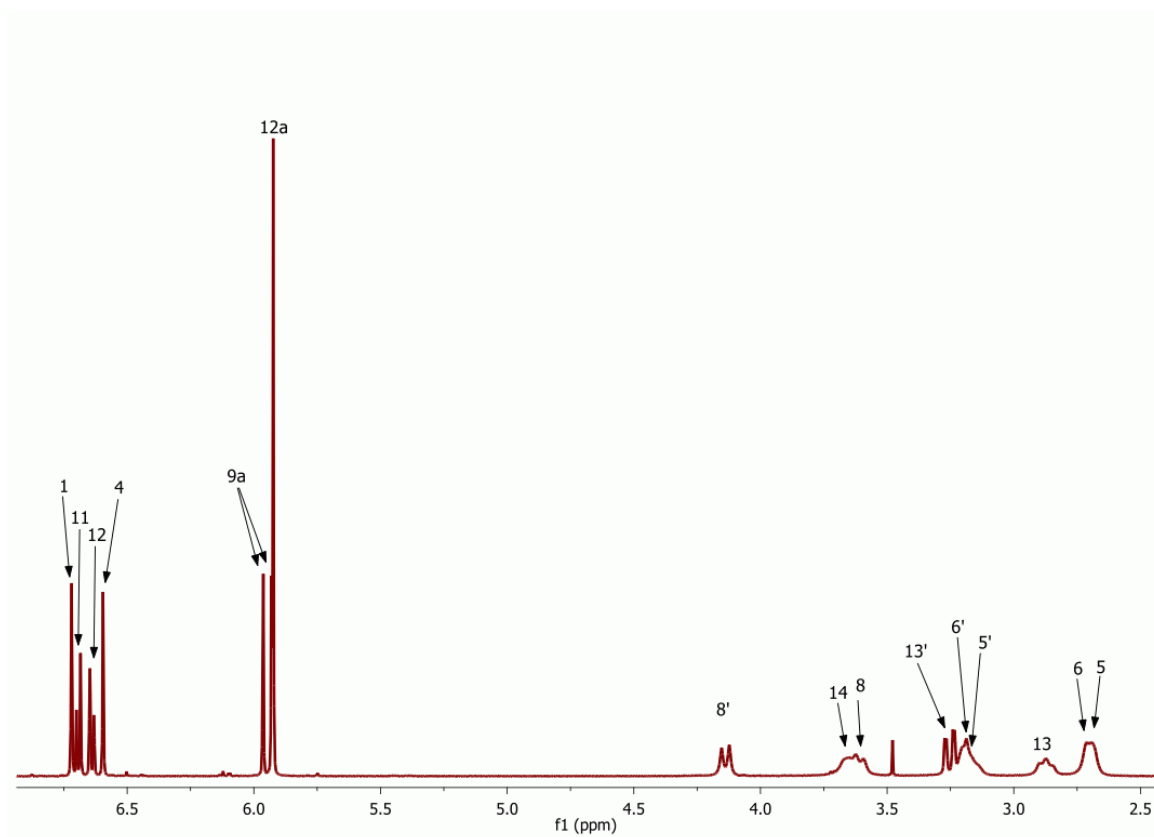
Obr. 13: Struktura stylopinu



### 5.1.2.1. $^1\text{H}$ -NMR spektrum stylopinu

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

2.69 br, 1H, H-5; 2.72 br, 1H, H-6; 2.89 br, 1H, H-13; 3.18 br, 1H, H-5'; 3.20 br, 1H, H-6'; 3.25 dd, ( $^2J_{\text{H}}=16.1$  Hz,  $^3J_{\text{H}}=3.7$  Hz), 1H, H-13; 3.61 br, 1H, H-8; 3.67 br, 1H, H-14; 4.14 d ( $^2J_{\text{H}}=16.1$  Hz), 1H, H-8'; 5.92 s, 2H, H-2a; 5.93 d, ( $^2J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 1H, H-9a; 5.96 d ( $^2J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 1H, H-9a'; 6.60 s, 1H, H-4; 6.64 d ( $^3J_{\text{H}}=8.0$  Hz), 1H, H-12; 6.69 d ( $^3J_{\text{H}}=8.0$  Hz), 1H, H-11; 6.72 s, 1H, H-1.

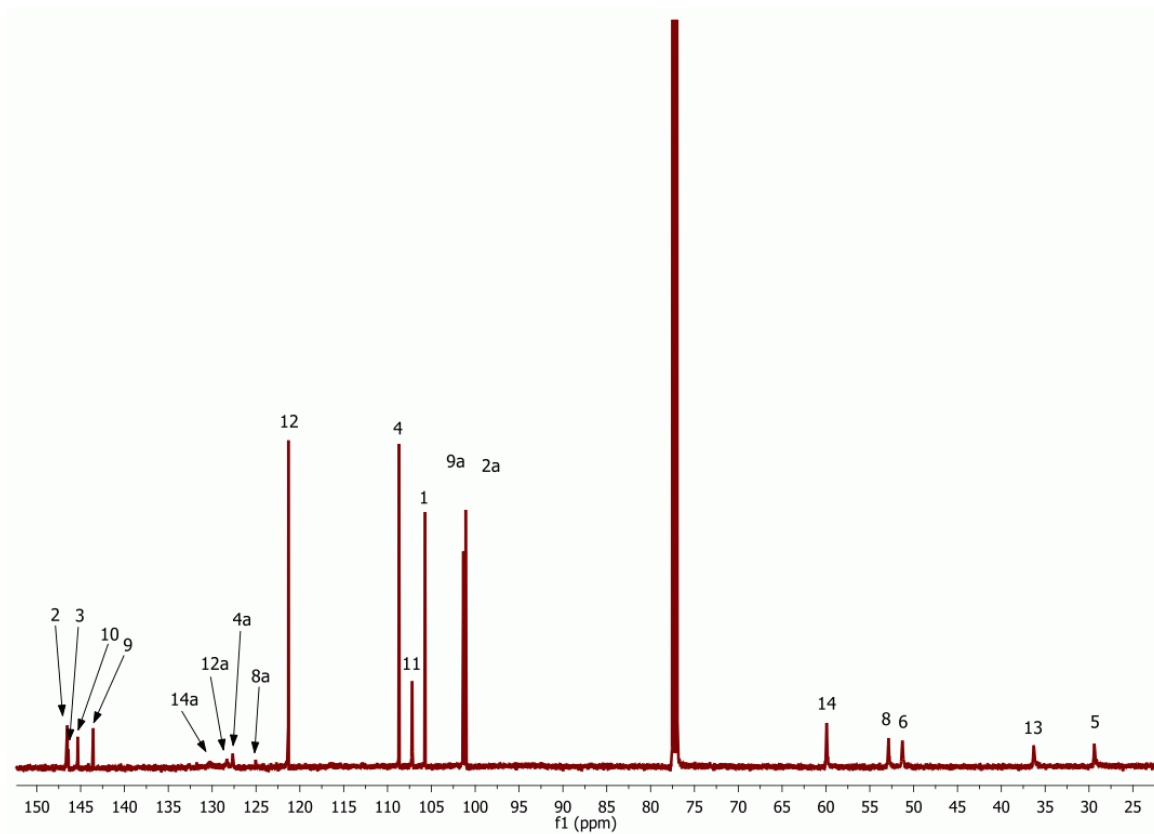


Obr. 16:  $^1\text{H}$ -NMR spektrum stylopinu

### 5.1.2.2. $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum stylopinu

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

29.41, C-5; 36.31, C-13; 51.29; C-6; 52.88, C-8; 59.93, C-14; 101.10, C-2a; 101.36, C-9a; 105.73, C-1; 107.20, C-11; 108.70, C-4; 121.32, C-12; 125.08, C-8a; 127.66, C-4a; 128.36, C-12a; 130.26, C-14a; 143.58, C-9; 145.35, C-10; 146.41, C-3; 146.53, C-2.



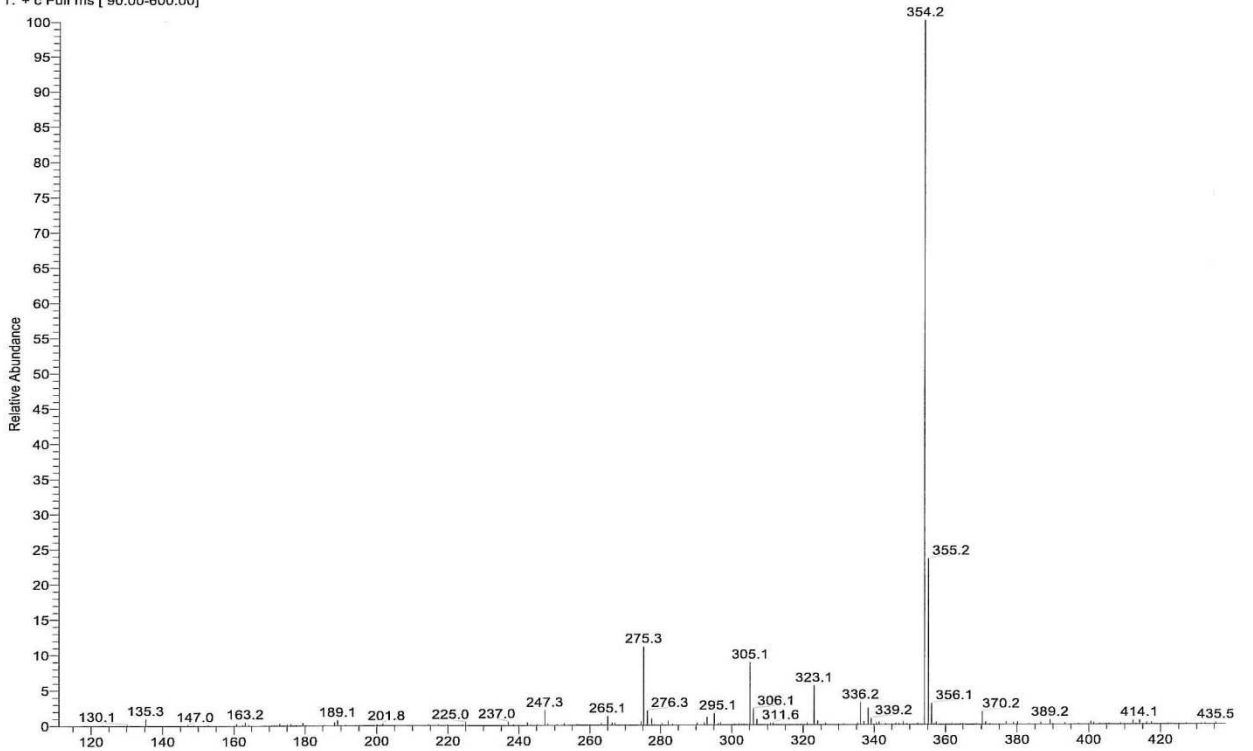
Obr. 17: <sup>13</sup>C-NMR spektrum stylopinu

## 5.2. Strukturní studie chelidoninu

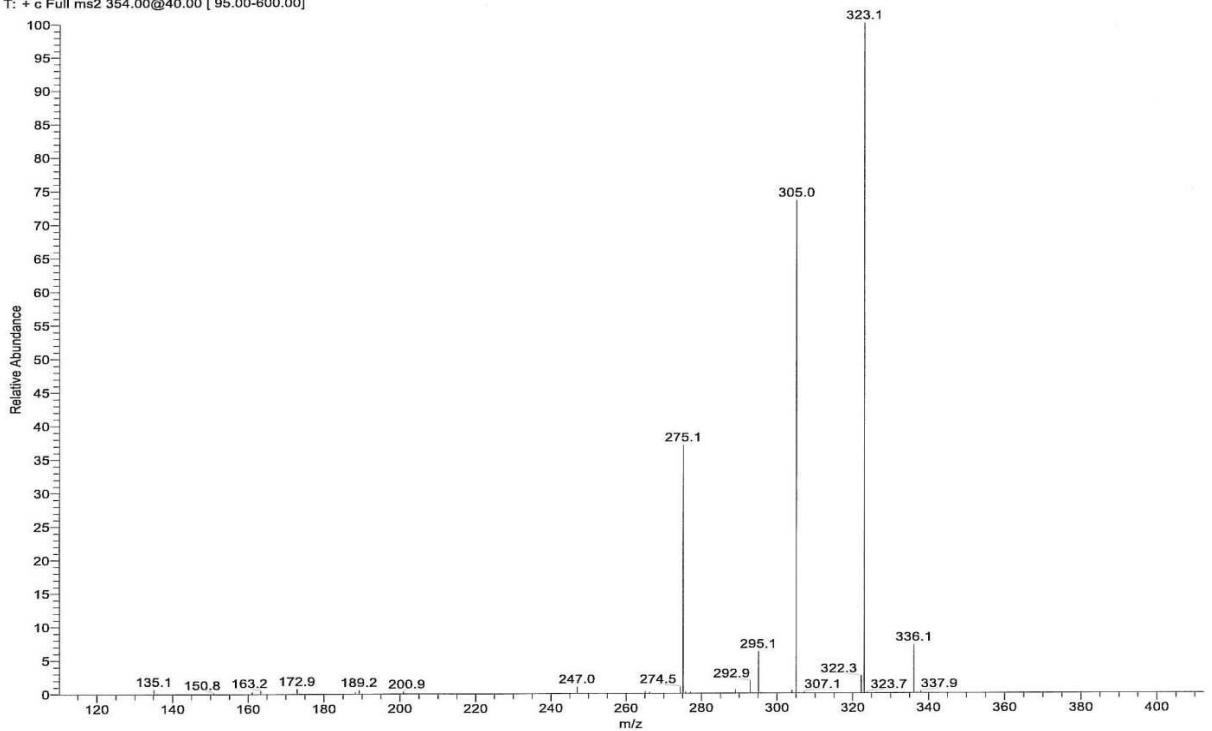
### 5.2.1. MS studie chelidoninu

ESI-MS  $m/z$  354,2 [M+H]<sup>+</sup> (100). MS/MS  $m/z$  323,1 (100), 305,0 (73), 275,1 (36).

LLC 64 Chelidonine #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.44E7  
T: + c Full ms [ 90.00-600.00]



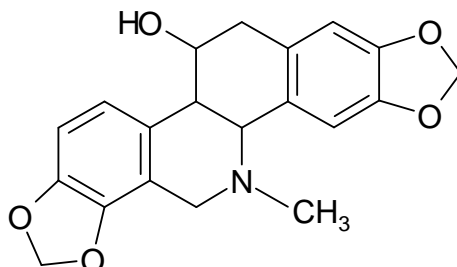
LLC 64 Chelidonine MS 354 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.08E7  
T: + c Full ms2 354.00@40.00 [ 95.00-600.00]



Obr. 18: MS a MS2 spektrum chelidoninu

### 5.2.2. NMR studie chelidoninu

Struktura izolované látky byla určena na základě interpretace  $^1\text{H}$ - a  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter a jejich porovnání s daty v literatuře<sup>42</sup>.

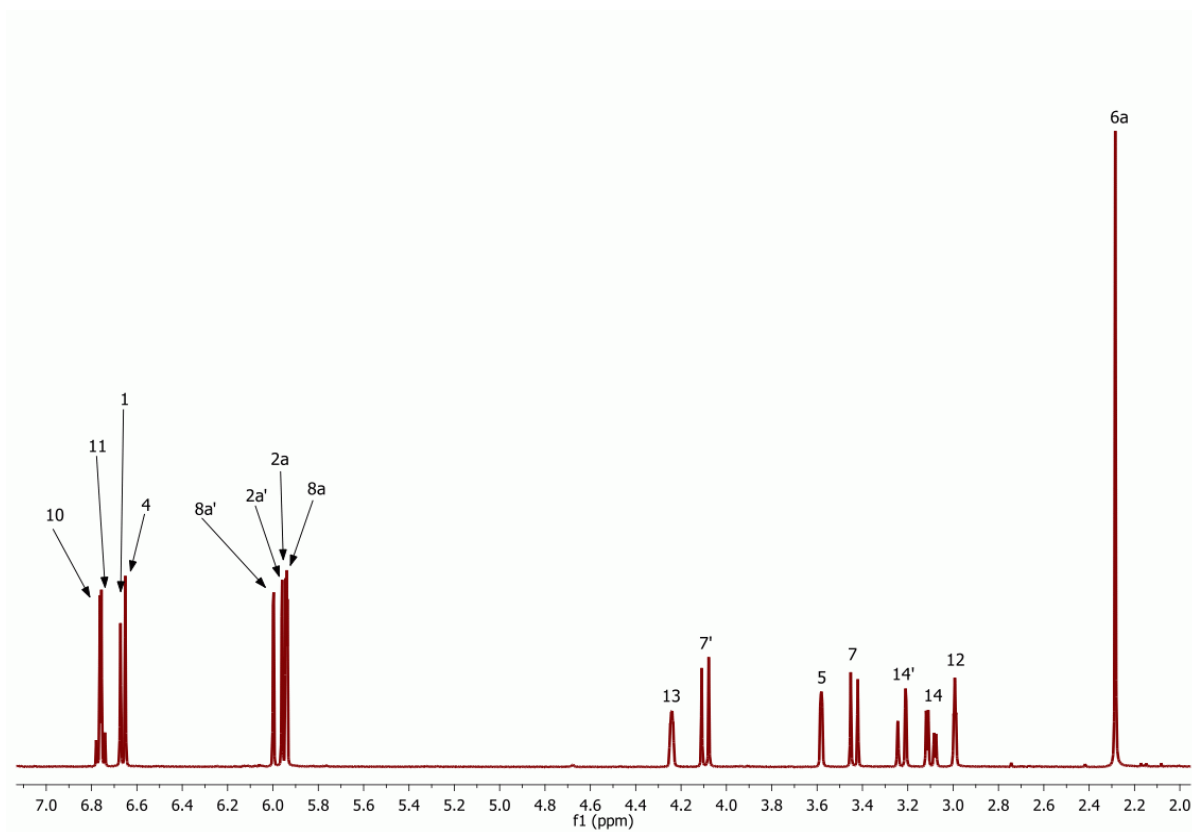


Obr.19: Struktura chelidoninu

#### 5.2.2.1. $^1\text{H}$ -NMR spektrum chelidoninu

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

2.29 s, 3H, H-6a; 2.99 t ( $^3J_{\text{H}}=2.7$  Hz), 1H, H-12; 3.10 dd ( $^2J_{\text{H}}=17.4$  Hz,  $^3J_{\text{H}}=4.7$  Hz), 1H, H-14; 3.23 dd ( $^2J_{\text{H}}=17.4$  Hz,  $^3J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 1H, H-14'; 3.44 d ( $^2J_{\text{H}}=15.5$  Hz), 1H, H-7; 3.58 m, 1H, H-5; 4.09 d ( $^2J_{\text{H}}=15.5$  Hz), 1H, H-7'; 4.24 m, 1H, H-13; 5.94 d ( $^2J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 1H, H-8a; 5.94(2) d ( $^2J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 1H, H-2a; 5.96 d ( $^2J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 1H, H-2a'; 6.00 d ( $^2J_{\text{H}}=1.5$  Hz), 1H, H-8a'; 6.65 s, 1H, H-4; 6.67 s, 1H, H-1; 6.75 d ( $^3J_{\text{H}}=8.1$  Hz), 1H, H-11; 6.77 d ( $^3J_{\text{H}}=8.1$  Hz), 1H, H-10;

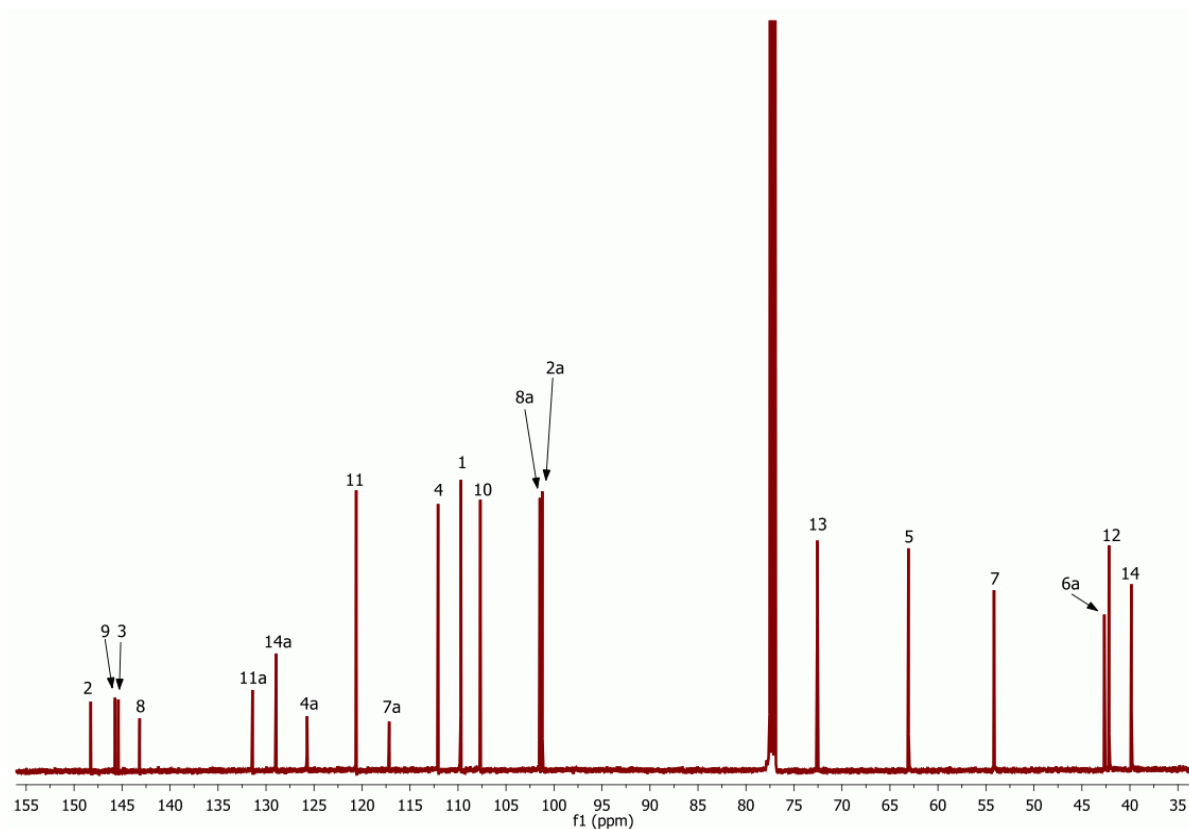


Obr. 20:  $^1\text{H-NMR}$  spektrum chelidoninu

#### 5.2.2.2. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrum chelidoninu

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):

39.85, C-14; 42.18, C-12; 42.67, C-6a; 54.16, C-7; 63.08, C-5; 72.57, C-13; 101.22, C-2a; 101.48, C-8a; 107.69, C-10; 109.72, C-1; 112.09, C-4; 117.18, C-7a; 120.62, C-11; 125.74, C-4a; 128.97, C-14a; 131.42, C-11a; 143.18, C-8; 145.40, C-3; 145.75, C-9; 148.28, C-2.



Obr. 21:  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum chelidoninu

### 5.3. Antioxidační aktivita

Izolované alkaloidy byly podrobeny testování jejich antioxidační aktivity. Výsledky této studie a hodnoty  $\text{EC}_{50}$  jsou uvedeny v následující tabulce (Tab.X)..

Tab. V: Antioxidační aktivita alkaloidů

Látky	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Stylopin	> 1000
Chelidonin	> 1000
Kvercetrin <sup>b</sup>	$25,3 \pm 1,2$
Trolox <sup>b</sup>	$27,8 \pm 0,8$

<sup>a</sup> Každé měření bylo opakováno dvakrát

<sup>b</sup> Referenční látka

## 5.4. Inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE

Získané alkaloidy byly testovány na jejich inhibiční aktivitu vůči erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab.VI).

Tab. VI: In vitro inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči AChE a BuChE

Látky	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	
	AChE	BuChE
Stylopin	114 ± 2,9	>1000
Chelidonin	26,84 ± 1,2	31,86 ± 1,4
Galanthamin <sup>b</sup>	6,9 ± 0,3	156 ± 6,9
Huperzin <sup>b</sup>	0,25 ± 0,01	>1000

<sup>a</sup> Každé měření bylo opakováno dvakrát

<sup>b</sup> Referenční látka

## 5.5. Antiprotozoální aktivita

Izolované alkaloidy byly podrobeny studii antiprotozoální aktivity. Vzhledem k náročnosti experimentů, je studie stále ve fázi měření.

## **6. DISKUZE**



Cílem této práce bylo izolovat alkaloidy z výtřepku benzofenanthridinových alkaloidů z *Chelidonium majus* a stanovit jejich hodnoty  $IC_{50}$  vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE. Na základě rozdělování této frakce chromatografickými a jinými výše popsanými metodami byly získány dva čisté alkaloidy. Tyto byly označeny jako LŠ1 a LŠ2 a podrobeny zkouškám na jejich totožnost a jejich biologickou aktivitu.

Alkaloid LŠ1 izolovaný z *Chelidonium majus* byl na základě MS a NMR studií identifikován jako stylopin (6,7,12,13-tetrahydro-,4H-Bis[1,3]benzodioxolo[5,6-a:4',5'-g]quinolizin)<sup>57</sup>. Jedná se o protoberberinový alkaloid, jehož základem je isochinolinová struktura. Byl změřen jeho bod tání na Koflerově bloku a stanoven na 198-200 °C. V roce 1989 byl Slavíkem u tohoto alkaloidu izolovaného z *Papaver rhoeas var. chelidonioides* naměřen bod tání 196-198°C<sup>59</sup> a v roce 1991 byl bod tání změřen opět Slavíkem u stylopinu izolovaného z *Stylophorum lasiocarpum* a jeho hodnota stanovena na 206-207 °C<sup>60</sup>.

Druhou izolovanou látkou byl alkaloid LŠ2, který byl díky provedeným MS a NMR studiím identifikován jako chelidonin (5,6,7,12,13,14-hexahydro-13-methyl-[1,3]-benzodioxolo[5,6]-1,3-dioxolo[4,5-]phenanthridin-6-ol)<sup>58</sup>. Chelidonin je terciální benzofenanthridinový alkaloid řadící se mezi isochinolinové alkaloidy.

Izolované alkaloidy byly podrobeny studii na inhibiční aktivitu vůči humánní erytrocytární AChE a sérové BuChE. Byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Inhibitory AChE jsou v současné době nejúčinnějšími léčivy v terapii Alzheimerovy choroby. Proto se hledají stále nové a výhodnější látky, které by byly schopny inhibovat nejen AChE ale i BuChE. Ta podle nejnovějších výzkumů hraje také velmi významnou roli v průběhu Alzheimerovy choroby, protože má zřejmě určitou roli v regulaci hladiny mozkového acetylcholinu<sup>27</sup>.

Hodnota  $IC_{50}$  stylopinu stanovená pro AChE byla  $114 \pm 2,9 \mu\text{M}$  a pro BuChE  $>1000 \mu\text{M}$ , takže tento alkaloid byl shledán jako neaktivní a tudíž nevhodný pro terapii

Alzheimerovy choroby. Stylopin byl izolován již v roce 2007 z *Corydalis turtschaninovii* vědci z Jižní Koreje. Současně byl tento alkaloid podroben studii jeho inhibiční aktivity vůči AChE. V tehdejší studii byla stanovena hodnota  $IC_{50} = 15,8 \mu M^{61}$ . Tato hodnota je poměrně výrazně odlišná od hodnoty  $IC_{50}$  stanovené v naší studii, ale vzhledem k odlišnému modelu (AChE byla získána z myších mozků), nelze tyto hodnoty dobře porovnávat.

Námi získaná hodnota  $IC_{50}$  pro chelidonin pro AChE byla  $26,84 \pm 1,2 \mu M$  a pro BuChE  $31,86 \pm 1,4 \mu M$ , z čehož vyplývá, že chelidonin je silnějším inhibitorem než stylopin. Chelidonin také vykázal mnohem lepší inhibiční aktivitu vůči BuChE nežli standart galanthamin, u kterého byla  $IC_{50}$  vůči BuChE  $156 \pm 6,9$ . Účinek tohoto alkaloidu vůči humánní AChE a BuChE by studován již v roce 2000 v Rusku, kde bylo zjištěno, že chelidonin je kompetitivním inhibitorem jak AChE tak i BuChE<sup>29</sup>. Bohužel získané výsledky jsou velmi nepřehledně zpracované a proto je nelze srovnávat s našimi výsledky.

Tyto dva alkaloidy byly také podrobeny studii na jejich antioxidační aktivitu. Jelikož získané hodnoty obou studovaných látek byly vyšší než  $1000 \mu M$ , nevykazují tyto alkaloidy žádnou antioxidační aktivitu.

Závěrem lze konstatovat, že získané hodnoty jsou především u chelidoninu velice zajímavé z důvodu jeho schopnosti inhibovat jak AChE tak i BuChE. Stylopin vzhledem k stanoveným hodnotám  $IC_{50}$  nelze považovat za látku, která by byla v budoucnu využitelná v terapii Alzheimerovy choroby.

## **7. LITERATURA**

1. Vavrečková C., Ulrichová J.: Biologická aktivita kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerytrinu. *Chem. Listy*, 88, (1994), 238 – 248.
2. Walterová D., Ulrichová J., Válka I., Vičar J., Vavrečková C., Táborská E., Harkrader R. J., Meyer D. L., Černá H. a Šimánek V.: Benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine. Biological activities and dental care applications. *Acta univ. Palacki. Olomouc., Fac. Med.*, 139, (1995), 7 – 16.
3. Dostál J., Slavík J.: Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech. *Chem. Listy*, (2000), 94, 15-20.
4. 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, 30-41.
5. Vlček J., Fialová D.: *Klinická farmacie I*. Grada, Praha 2010.
6. Preiss M., Kučerová H.: *Neuropsychologie v neurologii*. Grada, Praha 2006.
7. Jiráček R.: Farmakologie Alzheimerovy choroby. *Klin. Farmakol. Farm.* 2004 (18), 212-214.
8. Kubát K., Hejny S., Slavík B., (eds.): *Květena České republiky I*. Academia, Praha 1988.
9. Colombo M. L., Bosisio E.: Pharmacological activities of *Chelidonium majus*. *Pharmacol. Res.*, Vol.33, No. 2 (1996), 127-134.
10. Dostál J., Potáček M.: Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 55 (12), (1990), 2840-2873.
11. Minařík J.: *Farmakognosie*, 1. vyd., Praha, Avicenum 1979, 384 s.
12. Dostál J., Slavík J.: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in natural products chemistry*. Elsevier Science B.V., (2002), 155-184.
13. Tanahashi T., Zenk M. H.: New hydroxylated benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Eschscholtzia californica* cell suspension cultures. *J. Nat. Prod.*, 1990, 53(3), 579-86.

14. Zenk M. H.: The formation of benzophenanthridine alkaloids. *Pure & Appl. Chem.*, 66 (10/11), (1994), 2023-2028.
15. Suchomelová J., Bochořáková H., Paulová H., Musil P., Táborská E.: HPLC quantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family *Papaveraceae*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, (2007), 283-287.
16. Philchenkov A., Kaminsky V., Zavelevich M., Stoika R.: Apoptogenic activity of two benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* L. does not correlate with their DNA damage effects. *Toxicology in vitro*, 22, (2008), 287-295.
17. Zuo G.Y., Meng F. Y., Hao X. Y., Zhang Y. L., Wang G. C., Xu G. L.: Antibacterial alkaloids from *Chelidonium majus* Linn (*Papaveraceae*) against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Sci.*, 11, (2008), 90-94.
18. Kim D. K., Stermitz F. R.: Dihydrosanguinoline, a new alkaloid from *Sanguinaria canadensis*. *Phytochem. (Elsevier)*, (1975), 14(3), 834.
19. Horn S. P., Foltz K., Huffman J. C.: The crystal and molecular structure of oxysanguinarine obtained from *Sanguinaria canadensis* L., *Papaveraceae*. *Proc. Indiana Acad. Sci.*, (1986), 95, 177-81.
20. Ye F., Feng F., Liu W.: Alkaloids from *Macleaya cordata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, (2009), 34(13), 1683-1686.
21. Hu J., Zhang W., Shen Y., Zhang C., Xu L., Liu R., Wang B., Xu X.: Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. *Biochem. System. Ecol.*, 35, (2007), 114-117.
22. Yang G., Chen D.: Alkaloids from the Roots of *Zanthoxylum nitidum* and Their Antiviral and Antifungal Effects. *Chem. Biodivers.*, Vol. 5, (2008).
23. Hu J., Zhang W., Liu R., Zhang C., Shen Y., Li H., Liang M., Xu X.: Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC, and their analgesic and anti-inflammatory activities. *Chem. Biodivers.*, Vol. 3, (2006).

24. Cui X., Zhao Q., Chen Q., Xu L., Song Y., Jin Y., Xu D.: Two New benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum nitidum*. *Helv. Chim. Act.*, Vol. 91, (2008).
25. Salačová K.: Biologická aktivita obsahových látek XII. Alkaloidy rodu *Corydalis* DC. (*Fumariaceae*) a jejich biologické účinky. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2009, 80 s.
26. Stefano I., Raspaglio G., Zannoni G. F., Travaglia D., Prisco M.G., Mosca M., Ferlini C., Scambia G., Gallo D.: Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. *Biochem. Pharm.*, 78, (2009), 1374–1381.
27. Greig N. H., Lahiri D. K., Sambamurti K.: *Int. Psychogeriatr.* 14, 77-91, (2002).
28. Kyung-Mi Cho, Ick-Dong Yoo, Won-Gon Kim: 8-hydroxydihydrochelerythrin and 8-hydroxydihydrosanguinarin) with a potent acetylcholinesterase inhibitory activity from *Chelidonium majus* L. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(11), (2006), 2317-2320.
29. Kuznetsova L. P., Nikol'skaya E. B., Sochilina E. E., Faddeeva M. D.: Inhibition of human blood acetalcholinesterase and butyrylcholinesterase by some alkaloids. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, Vol. 38, No. 1, 2002, 35-39.
30. Hostettmann K., Borloz A., Urbain A., Marston A.: Natural products inhibitors of acetylcholinesterase. *Cur. Org. Chem.*, 2006, 10, 825-847.
31. Navarro V., Delgado G.: Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. *J. Ethnopharmacol.*, 66, (1999), 223-226.
32. Meng F., Zuo G., Hao X., Wang G., Xiao H., Zhang J., Xu G.: Antifungal activity of the benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* Linn against resistant clinical yeast isolates. *J. Ethnopharmacol.*, 125, (2009), 494-496.
33. Matthée G., Wright A.D., König G.M.: HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Med.*, 65 (6), (1999), 493-505.

34. Tan G.T., Lee S., Lee I-K., Chen J., Leitner P., Besterman J.M., Kinghorn A.D., Pezzuto J.M.: Natural-product inhibitors of human DNA ligase I. *J. Biochem.*, 314, (1996), 993-1000.
35. Wang L-K., Johnson R.K., Hecht S.M.: Inhibition of topoisomerase I function by nitidine and fagaronine. *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 1993, 813-818.
36. Ulrichová J., Dvořák Z., Vičar J., Lata J., Smržová J., Šedo A., Šimánek V.: Cytotoxicity of natural compounds in hepatocyte cell culture models. The case of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Toxicol. Lett.*, 125, (2001), 125 – 132.
37. Lenfeld J., Kroutil M., Maršálek E., Slavík J., Preininger V., Šimánek V.: Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta Med.* (1981), 43(2), 161-165.
38. ---: plant.usda.gov: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=CHELI>, vystaveno dne 21.1.2010.
39. Jahodář L.: *Farmakobotanika*. Karolinum, Praha 2006.
40. ---: botanical.com, <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/c/celles44.html>, vystaveno dne 21.1.2010.
41. ---: types-of-flowers.org, [www.types-of-flowers.org/greater-celandine.html](http://www.types-of-flowers.org/greater-celandine.html), vystaveno dne 21.1.2010.
42. ---: lecive-bylinky.celyden.cz, <http://lecive-bylinky.celyden.cz/vlastovicnik-vetsi/>, vystaveno dne 21.1.2010.
43. Tomko J.: *Farmakognózia*. 2. vyd., Martin, Osveta 1999.
44. Klvana M., Chen J., Lépine F., Legros R., Jolicoeur M.: Analysis of secondary metabolites from *Eschscholtzia californica* by high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.*, 17, (2006), 236-242.
45. Golkiewicz W., Gadzikowska M.: Isolation of some quaternary alkaloids from the extract of roots of *Chelidonium majus* L. by column and thin-layer chromatography. *Chromatographia*, 20 (1/2), (1999), 52-56.

46. Sárközi Á., Kursinszki L., Kéry Á.: Alkaloid composition of *Chelidonium majus* L. studied by different chromatographic techniques. *Chromatographia. Suppl.*, 63, (2006), 81-86 .
47. Preiss M., Kučerová H.: *Neuropsychologie v neurologii*. Grada, Praha 2006.
48. Silbernagel S., Lang F.: *Atlas patofyziologie člověka*. Grada, Praha 2001.
49. Lincová D., Farghali H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén 2007.
50. Vokurky M., Hugo J.: *Praktický slovník medicíny*. Maxdorf, Praha 2007.
51. Greig N. H., Lahiri D. K., Sambamurti K.: Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int. Psychogeriatr.* 14, 77-91 (2002).
52. Patočka J., Kuča K., Jun D.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – Important enzymes of human body. *Acta Med.* 47, 215-230 (2004).
53. Desilets A.R., Gickas J. J., Dunican K. C.: Role of huperzine a in the treatment of Alzheimer's disease. *Ann. Pharmacother.* 43, 514-518 (2009).
54. Stahl, E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
55. Gadamer J., Stichel A.: Chelidonium. alkaloids. III. Bromochelidonine and the oxidation of chelidonine with mercuric acetate *Arch. Pharm.*, 262, 488 (1924).
56. Cahlíková L., Hořčíčková Z., Opletal L., Macáková K., Kufírst M.: Isochinolinové alkaloidy a jejich biologická aktivita, 38. Konference Syntéza a analýza léčiv, 14-16. Zář 2009, Hradec Králové, Sborník abstraktů, 73 s.
57. Weinguang, Z., Wenzao, L. and Guoshi, T.: Chemical study of alkaloids from *Corydalis bungeana*. *Planta Med.*, 53, (1987), 418-420.
58. Takao, N., Kamiguachi, M., Iwasa, K., Morita N. and Kuriyama, K.: Stereochemistry of hydrobenzo[c]phenanthridine alkaloids. Optical properties and absolute configuration of (+)-14-epicoridine, (+)-corydine, (+)-chelidonine and related compounds. *Arch. Pharm.*, 317, (1984), 223-237.



59. Slavik J., Slaviková L., Bochorakova J.: Alkaloids of the *Papaveraceae*. Part LXXXVIII. Alkaloids from *Papaver rhoeas* var. *chelidonioides* O. Kuntze, *P. confine* Jord., and *P. dubium* L. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 54(4), (1989), 1118-25.
60. Slavik J., Hanus V., Slavikova L.: Alkaloids of the *Papaveraceae*. Part XCI. Alkaloids from *Stylophorum lasiocarpum* (Oliv.) Fedde. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 56(5), (1991), 1116-22.
61. Hung, T. M., Na M-K., Dat, N. T., Ngoc, T. M., Youn, U., Kim, H. J., Min, B.-S., Lee, J., Bae., K. Cholinesterase inhibitory and anti-amnestic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *J. Ethnopharmacol.*, 119, 74-80 (2007).

## **8. SEZNAM ZKRATEK**

AChE	acetylcholinesteráza
BuChE	butyrylcholinesteráza
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	hmotnostní spektrometrie
NMDA	N-metyl-D-aspartátový
NMR	nukleární magnetická rezonance
TLC	tenkovrstvá chromatografie

## ABSTRAKT

Šebestová L.: Biologicky aktivní metabolity rostlin 3. Alkaloidy *Chelidonium majus* L. a jejich inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2010, 72 s.

Cílem této práce bylo zpracování výtřepku benzofenanthridinových alkaloidů z *Chelidonium majus*, izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě a stanovení jeho anticholinesterázové, antiprotozoální a antioxidační aktivity.

V rámci této práce byly z daného výtřepku pomocí sloupcové chromatografie izolovány dva alkaloidy. První izolovaná látka byla označena jako LŠ1 a na základě NMR a MS studií identifikována jako stylopin. Druhá látka LŠ2 byla stejným způsobem identifikována jako chelidonin.

Oba izolované alkaloidy byly podrobeny studii inhibice lidské erytrocytární acetylcholinesterázy a lidské sérové butyrylcholinesterázy. U stylopinu byly stanoveny hodnoty:  $IC_{50}$  (AChE) =  $114 \pm 2,9 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (BuChE) =  $>1000 \mu\text{M}$ . Tyto hodnoty jsou výrazně vyšší nežli u použitého standartu a proto se nepředpokládá jeho budoucí využití v terapii Alzheimerovy choroby. U chelidoninu byly stanoveny tyto hodnoty:  $IC_{50}$  (AChE) =  $26,84 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (BuChE) =  $31,86 \pm 1,4 \mu\text{M}$ . Zajímavá je především jeho aktivita vůči BuChE, která je mnohem lepší než u porovnávaného standartu galanthaminu.

Tyto dva alkaloidy byly také podrobeny studii na jejich antioxidační aktivitu. Jelikož získané hodnoty obou studovaných látek byly vyšší než  $1000 \mu\text{M}$ , nevykazují tyto alkaloidy žádnou terapeuticky využitelnou antioxidační aktivitu.

*Klíčová slova:* acetylcholinesteráza, Alzheimerova choroba, benzofenanthridinové alkaloidy, butyrylcholinesteráza, *Chelidonium majus*.

## ABSTRACT

Šebestová L.: Biologically active metabolites of plants. 3. Alkaloids from *Chelidonium majus* L. and their inhibiting activity to acetylcholinesterase. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2010, 72 p.

The thesis aims to process the shake-out of benzophenanthridine alkaloids, of *Chelidonium majus*, to isolate at least one alkaloid in pure form; consequently the thesis aims to give exact figures for the anti-cholinesterase, anti-protozoal and antioxidant activity of the alkaloid.

The method of column chromatography was used to isolate the two alkaloids of the shake-out. The isolated substances were labelled LŠ1 and LŠ2 respectively. The identification of the substances as stylopin and chelidonine respectively, was based on NMR and MS studies.

Both isolated alkaloids were subjected to inhibition study with respect to human erythrocytal acetylcholinesterase and human serum butyrylcholinesterase. Stylopin showed the following set of results:  $IC_{50}$  (AChE) =  $114 \pm 2.9 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (BuChE) =  $>1000 \mu\text{M}$ . The results being considerably higher in comparison with the standard used, no further usage for the treatment of Alzheimer's disease is expected. Chelidonine showed the following set of results:  $IC_{50}$  (AChE) =  $26.84 \pm 1.2 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (BuChE) =  $31.86 \pm 1.4 \mu\text{M}$ . The activity of chelidonine with respect to BuChE, is of interest because it proved to be considerably better in comparison with the standard galanthamin.

Both alkaloids were subjected to a study concerning their antioxidant activity. Due to the fact that the results obtained for both substances proved to be higher than  $1000 \mu\text{M}$ , the alkaloids show no possible therapeutic utilization with respect to their antioxidant activity.

Keywords: acetylcholinesterase, Alzheimer's disease, benzophenanthridine alkaloids, butyrylcholinesterase, *Chelidonium majus*.