

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

---

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Biologická aktivita obsahových látek rostlin XVI.  
Alkaloidy *Papaver somniferum* L. a jejich účinek na acetylcholinesterasu.**



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

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Paskov, květen 2010

Ivana Filáková

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE  
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ  
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY AND ECOLOGY

---

DIPLOMA THESIS

**Biological activity of the substance content of plants XVI.  
Alkaloids of *Papaver somniferum L.* and their activity to acetylcholinesterase.**

Head of the department: prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Supervisor of the diploma thesis: doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Paskov, May 2010

Ivana Filáková

## PROHLÁŠENÍ

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

Tato práce byla finančně podpořena grantem SVV-2010-261-002.

Paskov, 12. května 2010

.....

podpis

Děkuji doc. RNDr. Lubomír Opletalovi, CSc., za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a připomínky k teoretické i experimentální části práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Lucii Cáhlikové, PhD., za změření hmotnostních spekter. V neposlední řadě děkuji celému kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné prostředí a pomoc při řešení technických a teoretických problémů.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Alzheimerova choroba .....</b>	<b>13</b>
3.1.1	Demence.....	13
3.1.2	Patogeneze.....	14
3.1.3	Léčba .....	17
3.1.3.1	Současné farmakologické postupy v terapii Alzheimerovy choroby.....	17
3.1.3.2	Nové perspektivy farmakoterapie .....	20
<b>3.2</b>	<b>Látky přírodního původu aktivní v tomto směru .....</b>	<b>21</b>
3.2.1	Ovlivnění osudu acetylcholinu.....	21
3.2.2	Ovlivnění senilních plaků – produkce amyloidu.....	22
3.2.3	Antioxidační účinek .....	23
3.2.4	Jiné účinky.....	23
<b>3.3</b>	<b>Papaver somniferum L. – mák setý .....</b>	<b>23</b>
3.3.1	Pojmenování.....	23
3.3.2	Systematické zařazení .....	24
3.3.3	Botanický popis.....	24
3.3.4	Obsahové látky .....	24
3.3.5	Farmakologické účinky obsahových látek .....	26
3.3.5.1	<b>Morfin</b> .....	26
3.3.5.2	<b>Kodein</b> .....	26
3.3.5.3	<b>Thebain</b> .....	27
3.3.5.4	<b>Papaverin</b> .....	27
3.3.5.5	<b>Narkotin</b> .....	28
3.3.6	Využití rostliny.....	28
3.3.6.1	<b>Farmaceutický průmysl</b> .....	28
3.3.6.2	<b>Farmaceutický výzkum</b> .....	29
3.3.6.3	<b>Potravinářský průmysl</b> .....	29
3.3.6.4	<b>Průmyslová produkce</b> .....	29

<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Všeobecné postupy .....</b>	<b>31</b>
4.1.1	Destilace a odpařování .....	31
4.1.2	Chromatografie.....	31
4.1.2.1	<i>Tenkvrstvá chromatografie</i> .....	31
4.1.2.2	<i>Sloupcová chromatografie</i> .....	31
<b>4.2</b>	<b>Materiál a vybavení.....</b>	<b>31</b>
4.2.1	Rozpouštědla a chemikálie.....	31
4.2.2	Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erytrocytární AChE (IC <sub>50</sub> ).....	32
4.2.3	Přístroje .....	33
4.2.4	Detekční činidla.....	33
4.2.5	Chromatografické adsorbenty .....	34
4.2.6	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii .....	34
<b>4.3</b>	<b>Postup při izolaci alkaloidu z <i>Papaver somniferum</i> L .....</b>	<b>34</b>
4.3.1	Surovina a příprava extraktu .....	34
4.3.2	Základní extrakt.....	34
4.3.3	Výtřepok A-Et <sub>2</sub> O .....	35
4.3.4	Výtřepok A-CHCl <sub>3</sub> .....	35
4.3.5	Výtřepok Bc-Et <sub>2</sub> O .....	35
4.3.6	Výtřepok Bd-CHCl <sub>3</sub> .....	35
4.3.7	Kvartérní jodidy J.....	35
4.3.8	Kvarterní alkaloidy Q.....	35
<b>4.4</b>	<b>Zpracování A/ Et<sub>2</sub>O (pH 9-10) .....</b>	<b>38</b>
4.4.1	Znečištění z kyselého roztoku a nebazické alkaloidy(L) .....	38
4.4.2	Chloridy rozpustné v chloroformu (AC).....	38
4.4.2.1	<b>Chloridy rozpustné v chloroformu, nefenolové (AC<sub>1</sub>)</b> .....	<b>38</b>
4.4.2.2	<b>Chloridy rozpustné v chloroformu, fenolové (AC<sub>2</sub>)</b> .....	<b>38</b>
4.4.3	Chloridy nerozpustné v chloroformu (AD), baze rozpustné v Et <sub>2</sub> O .....	38
4.4.3.1	<b>Chloridy nerozpustné v chloroformu, nefenolové (AD<sub>1c</sub>)</b> .....	<b>39</b>
4.4.3.2	<b>Chloridy nerozpustné v chloroformu, fenolové (AD<sub>2c</sub>)</b> .....	<b>39</b>
4.4.4	Chloridy nerozpustné v chloroformu (AD), baze nerozpustné v Et <sub>2</sub> O (ADd).....	39
<b>4.5</b>	<b>Chromatografické dělení AC<sub>1</sub> (chloridy alkaloidů R v CHCl<sub>3</sub>, nefenolické).....</b>	<b>39</b>
4.5.1	Čištění odparku přes oxid hlinitý .....	39

4.5.2	Sloupcová chromatografie.....	40
4.5.3	Čištění spojených frakcí 39-62.....	42
<b>4.6</b>	<b>Určení struktury izolované látky .....</b>	<b>43</b>
4.6.1	Měření hmotnostního spektra.....	43
4.6.2	Měření NMR spektra.....	43
<b>4.7</b>	<b>Stanovení účinku alkaloidu na erytrocytární AChE (IC<sub>50</sub>).....</b>	<b>43</b>
4.7.1	Podmínky měření .....	43
4.7.2	Stanovení hodnoty IC <sub>50</sub> .....	43
4.7.3	Matematické zpracování experimentálních dat.....	44
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Stanovení struktury látky PS01 .....</b>	<b>46</b>
5.1.1	Hmotnostní spektroskopie.....	46
5.1.2	Srovnání fyz.-chem. charakteristik.....	46
<b>5.2</b>	<b>Stanovení anticholinesterasové aktivity a butyrylcholinesterasy .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>61</b>

# 1 ÚVOD

Neurodegenerativní onemocnění představují rozsáhlou skupinu chorob centrálního nervového systému (CNS), při kterých předčasně zanikají některé populace nervových buněk, což má za následek velmi vážné psychické a neurologické příznaky.

K degeneraci nervových buněk CNS vedou patologické procesy jako excitotoxicita, oxidační stres, apoptóza a řada dalších faktorů, které nejsou dosud zcela objasněny. Výsledkem jejich působení je poškození a smrt buňky. Excitotoxicitu způsobují excitační aminokyseliny při vystupňované stimulaci NMDA-receptorů, ale i ostatních specifických receptorů pro excitační aminokyseliny, s indukovaným abnormálním zvýšením intracelulární koncentrace vápníkových iontů. Velké množství volných vápníkových iontů v buňce přispívá rovněž k aktivaci proteáz, tvorbě volných radikálů a peroxidaci lipidů. Při oxidačním stresu jsou neurony k procesům excitotoxicity citlivější. K apoptóze spojené s agregací chromatinu a fragmentací DNA v buněčném jádře dochází při nedostatečném působení nervových růstových faktorů, kdy je poškozena genová transkripce, a naopak jsou aktivovány specifické proteázy inaktivující řadu intracelulárních proteinů. Neurony CNS mají ve srovnání s jinými tělovými buňkami velmi omezenou schopnost regenerace, proto je při jejich smrti ztráta trvalá. Úbytek nervových buněk vyvolává změny řady různých funkcí CNS spojené s demencí. Jedním z hlavních možných přístupů k léčbě neurodegenerativních poruch je farmakologický zásah ovlivňující aktivitu jednotlivých neurotransmitterových systémů CNS [1].

Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba představují jedny z nejzávažnějších neurodegenerativních onemocnění [2].

V současnosti trpí jedna čtvrtina lidí starších 85 let demencí. Alzheimerova choroba se na tomto čísle podílí z 50 - 60 %. Ve věku nad 65 let trpí touto nemocí každý 20. člověk. Ve věku nad 85 let dokonce každý 4. člověk. Alzheimerova choroba není nemoc jen těch nejstarších. Ve výjimečných případech, většinou při dědičném výskytu, může ojedinele postihnout osoby kolem 50. roku života. Podle odhadů trpí tímto onemocněním 17 - 25 miliónů lidí na celém světě. V České republice je to zhruba 50 - 70 tisíc osob. Odhaduje se, že počet nemocných v roce 2030 stoupne na 34 miliónů, což souvisí se stárnutím světové populace [3].

V současné době nelze Alzheimerovu chorobu vyléčit, lze však včasným zahájením léčby průběh onemocnění zpomalit. Uplatnění nachází galanthamin, který inhibuje acetylcholinesterázu a zároveň zesiluje působení acetylcholinu na nikotinových receptorech. Dalšími používanými inhibitory acetylcholinesterazy jsou donepezil, rivastigmin [4].



Dalším velmi častým neurodegenerativním onemocněním je Parkinsonova choroba, která má tři hlavní charakteristické příznaky: svalovou ztuhlost (rigor), nehybnost (akineze) a třes v klidu (tremor), který je patrný hlavně na ruce. Toto onemocnění souvisí s narušením dopaminergních neuronů, které se táhnou od substantia nigra ke corpus striatum, kde se podílejí na regulaci extrapyramidových motorických výstupů tím, že tlumí aktivitu cholinergních nervů. Podstatou onemocnění je nedostatek dopaminu s relativní převahou acetylcholinu. Současná léčba spočívá v potlačení cholinergní aktivity nebo vyrovnaní nedostatku neurotransmiteru dopaminu [5].

V dnešní době existuje pouze léčba substituční (L-DOPA) a symptomatická (anticholinergní látky). Pro léčbu parkinsonismu se vedle L-dopy užívá selegilin, který ve vyšších dávkách může mít i antidepressivní účinky, poněvadž deficit dopaminu se podílí i na patogenezi depresivní poruchy [6].

Třetí v pořadí, doprovázená demencí, je Huntingtonova choroba. Toto vzácné progresivní autosomálně dominantně dědičné neurodegenerativní onemocnění, s nejčastějším počátkem ve 4. až 5. dekádě života, se projevuje kombinací neurologické a psychiatrické symptomatologie. Z neurologických příznaků jde typicky o choreatické hyperkineze, distonii, poruchy chůze a z psychiatrických poruch jsou nejčastěji zastoupeny změny osobnosti, afektivní, úzkostné chování, psychotické příznaky a demence. Genetickou podstatou choroby je abnormní zmnožení tripletů CAG v lokusu genů lokalizovaného na krátkém raménku 4. chromozomu, jehož patologickým produktem je vadný protein huntingtin. Jeho fyziologická funkce není doposud přesně objasněna, přítomnost patologicky změněné formy proteinu však zřejmě spouští apoptické procesy zejména ve středně velkých ostnitých GABA-ergních neuronech striata. [7, 8, 10].

Tato progresivní onemocnění postihují především jedince vyššího věku. Vzhledem k celosvětovému stárnutí populace tak představují velmi aktuální problém, kterému v předchozím období nebyla věnována dostatečná pozornost. Tímto se otevírá široké pole pro nový vývoj a výzkum účinných látek syntetického i přírodního původu. V oblasti přírodních léčiv se výzkum soustředí na alkaloidy, které svým mechanismem účinku ovlivňují aktivitu acetylcholinesterasy. Jednu z perspektivních variant představují alkaloidy obsažené v rostlinách z čeledi Papaveraceae.

## **2 CÍL PRÁCE**

V souvislosti se systematickým studiem isochinolinových alkaloidů z rostlin čeledi Papaveraceae a jejich biologické aktivitě na cholinesterasy a oxidační stres provést:

- 1) extrakci 30 kg suché makoviny 95% lihem, zahuštění a předčištění primárního extraktu, podílet se na přípravě jednotlivých typů výtřepků z tohoto primárního extraktu (diethyletherový při pH 10, chloroformový při pH 10, stejné typy výtřepků při pH 12 - 13) prováděné školitelem, rozdělení diethyletherového výtřepku získaného při pH 10 na chloridy v chloroformu rozpustné a nerozpustné; každý z obou podílů dále rozdělit na baze fenolové a nefenolové,
- 2) výtřepok obsahující alkaloidy, jejichž chloridy jsou rozpustné v chloroformu a jsou nefenolové, rozdělit preparativně na sloupci oxidu hlinitého,
- 3) preparativním TLC a dalším procesem čištění získat jeden alkaloid v čistém stavu,
- 4) po zjištění jeho molekulové hmotnosti (mimo rámec diplomové práce) se podílet na stanovení jeho anticholinesterasové aktivity (acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa za použití lidských erytrocytárních pouzder a plasmy).

Body 1) – 3) jsem prováděla pod vedením školitele společně s diplomantkami Tamarou Rosikovou a Petrou Suchánkovou.

### **3 TEORETICKÁ ČÁST**

### 3.1 Alzheimerova choroba

#### 3.1.1 Demence

Pojem senilní demence nalezneme již v Blancardově slovníku anatomických a klinických názvů, který byl vydán v Londýně v roce 1726. V případě demence Alzheimerova typu se po skrytém začátku nemoci objevují klinické příznaky počínající demence u rizikové skupiny osob starších 60 let jako sporadická forma Alzheimerovy nemoci (AD). Téměř 10 % nemocných s AD však trpí geneticky podmíněnou familiární formou nemoci, u nichž lze první příznaky demence pozorovat již po 40. roce života [11].

Demence jsou choroby, vznikající na podkladě poruchy kognitivních funkcí (paměť, vnímání, motivace, myšlení aj., souhrnně označované jako inteligence). Demence lze zjednodušeně rozdělit na demence primárně degenerativní (neurodegenerativní, atroficko-degenerativní poruchy) a na demence sekundární neboli symptomatické, kde demenci spouští systémové onemocnění, intoxikace, infekce a další noxy, postihující také centrální nervový systém. Sekundární demence se dají rozdělit ještě na demence vaskulární a ostatní (např. infekční etiologie, prionové, posttraumatické, alkoholové a další). Alzheimerova choroba je nejčastější příčina demence, představuje minimálně 50 % všech demencí ve své čisté formě a dalších 10 – 20 % demencí je smíšené etiologie, kde je Alzheimerova choroba smíšena s jinou příčinou, jako jsou vaskulární příčiny a jiné [12].

Z hlediska příčiny dělíme syndrom demence takto: primární demence, mající neurodegenerativní základ, sekundární demence na podkladě různých příčin a demence smíšená, která v určité proporcí má zastoupeny obě předchozí formy. Hlavními představiteli primární demence jsou Alzheimerova nemoc (sporadická AD), familiární Alzheimerova nemoc (FAD) a frontotemporální demence (FTD). Nejvýznamnějším zástupcem sekundárních demencí je vaskulární (multiinfarktová) demence.

Vznik AD významně ovlivňují rizikové faktory, jakými jsou narůstající věk osoby, dále její nadváha, hypercholesterolemie a onemocnění cukrovkou typu 2, které zdvojnásobují pravděpodobnost vzniku sporadické (pozdní) formy AD. Tato forma má i své významné genetické riziko. Týká se genu pro apolipoprotein E (APOE), kdy přítomnost dvou kopií alely ε4 představuje 50% riziko vzniku sporadické formy AD. Také příbuzní osoby trpící AD mají téměř 40% riziko, že onemocní AD, pokud se dožijí 85 let. Toto zjištění dokládá, že základ sporadické formy AD je dán jedním nebo více kandidátními geny s neúplnou penetrací jako kombinace těchto genů s rizikovými faktory prostředí. Naopak FAD je monogenně podmíněné onemocnění

vyznačující se autozomálně dominantní dědičností. Tu charakterizuje vysoká penetrance jednoho ze 4 uvedených genů: gen pro amyloidní prekurzorový protein (APP) na dlouhém raménku chromozómu 21, gen pro tau protein na chromozómu 17, gen pro presenilin 2 (PS2) na chromozómu 1 a gen pro presenilin 1 (PS1) na chromozómu 14. Mutace PS1 představuje hlavní genetický defekt u FAD, podmiňující časný začátek nemoci. Příčinou je zvýšené štěpení APP na A $\beta$  peptidy. Proto se současný vědecký výzkum soustřeďuje na studium degradace APP cestou metabolické (amyloidní) kaskády. Rozvíjí-li se cévní poškození společně s AD, vzniká smíšená demence [11].

Demence začíná většinou nenápadně, ztrácením předmětů, poruchami krátkodobé paměti, zapamatování si nových informací, poruchami pozornosti. Poměrně brzy v průběhu tohoto onemocnění se mohou objevit poruchy orientace v čase i prostoru. Nemocní začínají bloudit, a to i ve známých místech. Dochází k poruše logického myšlení, soudnosti, zhoršuje se přesnost vybavení z dlouhodobé paměti. Velmi se zhoršují řečové schopnosti, postižení obtížně hledají slova a výrazy, zapomínají pojmy. Někdy se také vyskytuje porucha řeči v důsledku fatické poruchy. V průběhu choroby se objevují další složky demence – poruchy aktivit denního života, nejdříve těch složitých, později i těch jednoduchých (např. schopnost telefonovat, v pozdních stadiích demence schopnost obléci se, udržovat základní tělesnou hygienu, samostatně se najíst). Dále dochází téměř pravidelně k výskytu tzv. behaviorálních a psychologických příznaků demence (BPSD), jako jsou poruchy emocí typu depresivní nebo úzkostné nálady, poruchy spánku nebo obrácení cyklu spánek – bdění, různé typy poruch chování. Průběh demence Alzheimerova typu bývá obvykle 7 – 10 let od prvních příznaků do smrti, někdy podstatně delší (i více než 15 let), někdy i kratší (hlavně u familiárních forem Alzheimerovy choroby). Postižení většinou umírají na interkurentní choroby nebo úrazy, na které by pravděpodobně stejně starý jedinec bez Alzheimerovy choroby nezemřel [13].

### 3.1.2 Patogeneze

U Alzheimerovy choroby je snížena centrální acetylcholinergní transmise. Postižena jsou zejména acetylcholinergní vlákna, projikující z bazálního Meynertova jádra difuzně do kortexu, ale také další acetylcholinergní vlákna, např. kmenová, podílející se na regulaci kvalitativní úrovně vědomí [14].

Je snížena hladina enzymu, který syntetizuje acetylcholin z cholinu a acetylkoenzymu A - cholinacetyltransferasy. Nižší je také tzv. vysokoafinitní natrium-dependentní cholinové zpětné vychytávání, a tedy nabídka substrátu pro syntézu acetylcholinu. Důsledkem toho je snížené

presynaptické uvolnění acetylcholinu. Je rovněž snížen počet nikotinových acetylcholinergních receptorů, zatímco počet muskarinových acetylcholinergních receptorů zůstává relativně nezměněn. Acetylcholin je odbouráván v synaptické štěrbině enzymy cholinesterasami: naprosto převažují acetylcholinesterasy, zatímco podíl butyrylcholinesteras je za normálních podmínek zanedbatelný. Při Alzheimerově chorobě se podíl molekul butyrylcholinesteras zvyšuje, dochází k novotvorbě těchto molekul ve zmobilizovaných gliových elementech v oblasti plaků. Butyrylcholinesterasa se pak podílí na odbourávání acetylcholinu a přispívá k jeho deficitu. Mění se také zastoupení jednotlivých forem acetylcholinesteras. Za normálních podmínek je v mozku jako majoritní tetramer označovaný jako G4 a jako minoritní (zastoupený asi 3 %) monomer označovaný jako G1, kdežto při Alzheimerově chorobě výrazně roste proporcionální zastoupení G1 [14].

Porucha acetylcholinergní transmise je přítomna již v počátečních stádiích Alzheimerovy choroby. Podílí se především na poruše paměti i dalších kognitivních funkcí, ale také na poruchách aktivit denního života i tzv. behaviorálních a psychologických příznacích demence (poruchy chování, přidružené psychotické příznaky, poruchy emotivity i spánku) [14].

Dalším základním neurodegenerativním článkem je patrně tvorba patologického proteinu  $\beta$ -amyloidu [15].

$\beta$ -amyloid se řadí mezi proteinové klastry. Je to mezibuněčný protein. Tvoří plaky, které mají tu schopnost, že likvidují mitochondrie okolních buněk a navíc znemožňují buněčnou regulaci. Předpokládá se, že zničení plaků by vedlo k zastavení nebo alespoň potlačení AD, to však v nynější době ještě není možné [16].

Je to polypeptid o 39 - 43 AMK a  $M_r$  4,5 kDa. Vzniká při degradaci APP, což je integrální membránový glykoprotein s jedním transmembránovým úsekem, který obsahuje sekvenci  $\beta$ -amyloidu [16].

Předpokládá se, že amyloid funguje jako membránový receptor, autokrinní růstový regulátor nebo protein podílející se na adhezi buněk (podobně jako konektin).

Patogenetické mechanismy vyvolané  $\beta$ -amyloidem, které vedou k poškození funkce a nakonec k odumírání neuronů, a tím k projevům onemocnění, jsou zatím však bohužel nejasné [16].

V mozku pacienta trpícího Alzheimerovou chorobou se vyskytují dva různé proteinové agregáty: smotky chybně složeného cytoskeletárního proteinu *tau* a plaky z proteinových agregátů tvořených fragmenty membránového proteinu:  $\beta$ -amyloidního proteinu ( $\beta$ -APP). Přítomnost dvou druhů proteinových agregátů vedla ve vědecké obci k prudkým sporům o to, který z těchto proteinů je skutečnou příčinou onemocnění a jaký jen vedlejším příznakem.

$\beta$ -APP vzniká koagulací  $\beta$ -peptidu, vzniklého štěpením z amyloidního prekurzorového proteinu. Amyloidní prekurzorový protein je štěpen nadměrně, vznikají pak delší fragmenty (o 42 - 43 aminokyselinách) [16].

$\beta$ -APP je transmembránový protein nejasné biologické funkce. Blízko N-konce tohoto proteinu se vyskytuje sekvence 42 aminokyselin zvaná amyloidní  $\beta$ -peptid. Právě tento fragment totiž vytváří ony proteinové agregáty nalézané v mozku pacientů při diagnostikované Alzheimerově nemoci. Tento peptid snadno vytváří fibrilární agregované struktury, které jsou neurotoxické a vedou k vývoji této choroby [16].

Neuritické plaky se nacházejí sporadicky i u kontrolních jedinců. U pacientů s AN jsou amyloidové plaky přítomny ve velkém množství, zejména v hippocampu. Postupem doby jsou plaky infiltrovány reaktivními mikroglialními buňkami a obkloповány astroglialními buňkami. Přítomnost těchto buněk v okolí amyloidových plaků je spojena s uvolňováním velkého množství volných kyslíkových radikálů a cytokinů, což vede až k projevům aseptického zánětu a nakonec k odumírání okolních neuronů.

$\beta$ -APP je štěpen třemi specifickými proteasami:  $\alpha$ -sekretasou,  $\beta$ -sekretasou,  $\gamma$ -sekretasou [16].

APP je při normálních podmínkách štěpen enzymem  $\alpha$ -sekretasou na fragmenty, které jsou plně solubilní a mají své fyziologické úlohy. Za patologických podmínek Alzheimerovy choroby a demencí s Lewyho tělisky je APP následně štěpen patologickými enzymy  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasou na delší fragmenty, než odštěpuje  $\alpha$ -sekretasa. Tyto fragmenty (42 a více aminokyselin) jsou pak solubilní, koagulují a polymerují v extracelulárním prostoru, a vzniká tak  $\beta$ -amyloid, jenž pak tvoří základ plaků. Toxicita  $\beta$ -amyloidu následně zřejmě vede k dalšímu typu proteinové generace – k degeneraci intraneuronálního  $\tau$ -proteinu. Ten ve své zdegenerované formě tvoří párově helikální filamenta, která jsou podkladem neuronálních klubíček (tangles). Takto postižené neurony pak podléhají buněčné smrti – apoptóze [14].

Je výrazně postižen centrální acetylcholinergní systém, a později i systém excitačních aminokyselin (glutamátergní systém) a další neurotransmiterové systémy [12].

Systém excitačních aminokyselin (glutamát, aspartát aj.) je asi nejrozšířenější mozkový neurotransmiterový systém. Receptory excitačních aminokyselin se dělí na metabotropní (aktivují druhé posly) a ionotropní (otevírají iontové kanály). N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory jsou receptory, které otevírají  $\text{Ca}^{2+}$  kanály. Na NMDA receptorech se odehrává jeden ze základních mechanismů paměti - dlouhodobá potenciace (long-term potentiation); při opakovaném působení stejného podnětu jsou následné excitační postsynaptické potenciály vždy větší. U Alzheimerovy choroby, ale také u jiných neurodegenerativních změn



i u vaskulárních a posttraumatických změn CNS, se nadměrně uvolňují excitační aminokyseliny (excitotoxicita); následně pak dochází ke zvýšenému influxu iontů vápníku do neuronů, k aktivaci enzymů typu proteinkináz a fosfatáz, ke změnám nitrobuněčných proteinů, a nakonec k odkrytí genu pro programovanou buněčnou smrt – apoptózu. Postižené neurony zanikají. Jiný typ excitotoxicity spočívá v tom, že na NMDA receptorech vznikají jakési přenosové šумы – vytváří se velké množství potenciálů, mezi nimiž zaniká potenciál, který má být přenesen. Tím je narušen mechanismus dlouhodobé potenciace [14].

### 3.1.3 Léčba

#### 3.1.3.1 Současné farmakologické postupy v terapii Alzheimerovy choroby

Léčba Alzheimerovy choroby i dalších demencí neurodegenerativního původu vychází ze znalosti jednotlivých patogenetických článků, nikoli ze znalostí základní příčiny. Současná terapie nám tedy umožňuje chorobu modulovat, především prodlužovat lehká stadia a oddalovat těžká stadia demence, která jsou spojena s nesoběstačností a silnou zátěží jak pacientů, tak jejich pečovatelů [12].

Nedávno byly do praxe zavedeny léky prokazatelně zpomalující průběh choroby. Jejich užití je tedy racionální, založené na důkazech (evidence based), získaných z kvalitních, dvojitě zaslepených, placebem kontrolovaných studií. Jedná se o:

- **inhibitory acetylcholinesterasy (ICHE) u lehkých a středních forem AN**
- **inhibitory NMDA receptorů (memantin) v pokročilých stadiích AN [15]**

Existují i další možnosti terapie vycházející ze známých patogenetických řetězců, ale jejich použití již není jednoznačně založeno na důkazech.

#### ***Inhibitory cholinesterasy (ICHE)***

Tato léčiva příznivě ovlivňují centrální acetylcholinergní přenos, náleží do skupiny tzv. kognitiv. Od inhibitorů cholinesteras se očekává, že budou dobře procházet hematoencefalickou bariérou, budou ovlivňovat obě formy mozkových acetylcholinesteras a nebudou ovlivňovat periferní formy cholinesteras, aby nepůsobily nežádoucí vedlejší efekty. Některé z inhibitorů inhibují i mozkové butyrylcholinesterasy. Způsob inhibice cholinesteráz je reverzibilní (inhibice trvá tak dlouho, jak dlouho je přítomna látka nebo její aktivní metabolit

v plazmě) nebo pseudoireverzibilní (inhibice trvá déle, než je přítomnost účinné látky v plazmě, farmakon je odbouráváno přímo molekulami cholinesteras) [12].

Centrální inhibitory cholinesteras jsou dosud nejúčinnější léčiva pro terapii lehkých až středně pokročilých Alzheimerových demencí. Podstata terapeutického působení u Alzheimerovy choroby je zablokování enzymů odbourávajících acetylcholin a tím prodloužení vazby acetylcholinu na jeho receptory s následujícím zvýšením acetylcholinergní transmise. Bylo zjištěno, že molekuly cholinesteras se vyskytují v mozku i v jiných lokalizacích, než jsou distribuována acetylcholinergní vlákna. Podílejí se zřejmě na tvorbě a toxicitě  $\beta$ -amyloidu. Inhibitory acetylcholinesteras především mají efekt na zpomalení průběhu Alzheimerových demencí, na oddálení přechodu demence do těžkých stadií. V současnosti jsou v naší republice i ve většině zemí Evropy a v USA používány 3 látky: **donepezil**, **rivastigmin**, **galanthamin** [17].

#### **Piperidinové deriváty:**

- Donepezil (ARICEPT<sup>®</sup>) je v současnosti nejužívanější centrální inhibitor acetylcholinesteras ve světě, u nás je rovněž užíván.
- Ikopezil, který je v třetím stadiu klinického zkoušení, je ještě specifitější pro molekuly acetylcholinesterasy [18].

#### **Karbamátové deriváty:**

- Rivastigmin (EXELON<sup>®</sup>) je jeden ze tří u nás používaných (a ve světě nejpoužívanějších) inhibitorů cholinesteras. Působí pseudoireverzibilní inhibicí cholinesteras a kromě mozkových acetylcholinesteras účinně inhibuje i butyrylcholinesterasy [18].

### **Alkaloidy:**

- Huperzin A je alkaloid čínského *Huperzia serrata*. V indikaci Alzheimerovy choroby je zkoušen především v Číně, jeví se jako perspektivní látka.
- Galanthamin (REMINYL<sup>®</sup>) je alkaloid z některých druhů sněženek a narcisů. Je to látka používaná i u nás. Má dualistické působení na acetylcholinergní systém; kromě toho, že provádí reverzibilní inhibici acetylcholinesterasy, také allostericky moduluje pre- i postsynaptické nikotinové receptory [18]. A mnoho dalších viz. látky přírodního původu.

### ***Parciální inhibitory NMDA receptorů (memantin)***

Důležitý patogenetický článek, stimulující u Alzheimerovy choroby apoptické děje, je zvýšený vstup kalcia do neuronů. To se děje kalciovými kanály, které jsou u této nemoci pravděpodobně tvořeny více než za normálních podmínek. Inhibitory vápníkových kanálů napětově řízených (otvírají a zavírají se dle změn potenciálu neuronální membrány) nebyly shledány u Alzheimerovy choroby samy o sobě dostatečně účinnými (cinnarizin, nimodipin aj.). Jiný typ vápníkových kanálů je závislý na ionotropních receptorech excitačních aminokyselin. Klinický efekt byl shledán u blokátoru NMDA (N-metyl-D-aspartátového) receptoru memantinu (Akatinol) [18].

### ***Další látky užívané k terapii přídatná farmaka***

Další látky, užívané k zlepšení kognitivních funkcí, nemají účinnost již tak přesvědčivě dokázanou jako inhibitory cholinesteras a memantin. Jejich použití není již jednoznačně založeno na dostatečných důkazech, někdy je spíše empirické [17].

Některé z nich však vykazují mírnější prokazatelné efekty na kognitivní i nekognitivní funkce a jsou vhodné pro kombinaci s inhibitory mozkových cholinesteras i s memantinem. Mezi takováto farmaka náleží např. extractum ginkgo bilobae nebo nicergolin. Dále jsou používána nootropní farmaka (piracetam, pyritinol) – tyto látky však neprokázaly efekty v léčbě demencí v rozsáhlých kontrolovaných klinických studiích, a proto jejich použití není racionální, zametače volných kyslíkových radikálů (E – vitamin aj.), a více dalších farmak [15].

Nervové růstové faktory produkované nervovým systémem, jsou důležité pro plasticitu neuronů a u plodu stimulují jejich růst. Cerebrolysin podporuje funkci nervových buněk, ovlivňuje neuronální plasticitu, zvyšuje penetraci glukosy do mozkové tkáně, ovlivňuje porušený oxidativní metabolismus v mozku [30].

### 3.1.3.2 Nové perspektivy farmakoterapie

Výzkum je hlavně zaměřen na látky blokující působení  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretas. Takovým inhibitorem gama-sekretasy je i gemasekstat, látka, která je již ve III. fázi klinického zkoušení a jeví v terapii AD nadějně výsledky (Fleisher et al., 2008) [19].

Nadějná do budoucna by mohla být vakcinace monoklonálními protilátkami proti  $\beta$ -amyloidu. Na formaci  $\beta$ -amyloidu se podílí enzym glykogensyntasa-kinasa-3- $\beta$  (GSK-3B). Jsou hledány látky schopné tento enzym inhibovat. Jednou z takových látek je dlouho klinicky užívané a v poslední době již opomíjené lithium. Účinek na snížení aktivity GSK-3B byl zjištěn také u antidiabetika rosiglitazonu. Je ověřováno rovněž klinické působení několika látek zlepšujících acetylcholinergní transmissi jinými cestami než inhibicí cholinesteras. Jsou dále vyvíjeny nové typy inhibitorů cholinesteras [14].

U tolserinu a dalších látek se předpokládá, že budou inhibovány zejména cholinesterasy mimo acetylcholinergní vlákna, tedy že podávání těchto látek bude snižovat především toxicitu  $\beta$ -amyloidu. Byly také vyvinuty čisté inhibitory butyrylcholinesteras (cymserin aj.). I když se nejedná o metodu farmakoterapeutickou, je třeba zmínit se rovněž o implantaci kmenových buněk do mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou jako o nadějně léčebné metodě. Další ze skupiny ověřovaných látek jsou statiny [14].

V mnoha recentních studiích byla potvrzena souvislost AD s poruchami lipidového metabolismu. Byl již podrobně popsán vztah AD jak se zvýšenou hladinou cholesterolu, tak s přítomností izoformy ApoE4. Jejich úloha v tomto směru je nyní ověřována v četných studiích [20].

Další cesty ovlivnění cholinergního přenosu v mozku je podávání selektivních agonistů nikotinových cholinergních receptorů. Mnohé studie totiž ukazují, že jejich stimulace vede k poklesu syntézy a ukládání depozit neurotoxického  $\beta$ -amyloidu, což by mohlo mít pro regulaci průběhu choroby velký význam. Jak bylo také zjištěno v řadě epidemiologických studií, u kuřáků je incidence AD významným způsobem snížena a bylo prokázáno, že za tento efekt je zodpovědný nikotin. Jsou proto intenzivně hledány látky s nikotinovým účinkem, ale bez jeho nežádoucích efektů, které by mohly sloužit jako nový typ léčiv AD. Dvě takovéto látky byly nedávno nalezeny v přírodních zdrojích. Jedna v sekretu jedové žlázy severoamerického mravence *Aphaenogaster rudis* a druhá v jedovatém sekretu jihoamerické žáby *Epipedobates tricolor* [21].

### 3.2 Látky přírodního původu aktivní v tomto směru

#### 3.2.1 Ovlivnění osudu acetylcholinu

##### *Uvolňovače acetylcholinu*

- „Voltage-Gated Ion Channels Modulators“
- Stimulátory nikotinových receptorů (nAChRs): kodein, galanthamin, některé analogy arekolinu (studie *in vitro*)
- M<sub>2</sub> antagonisté muskarinu: himbacin (*Galbulimima baccata*, Himantandraceae); vysoce selektivní inhibice M<sub>2</sub>
- Látky jiného působení: O-Acetyl-L-karnitin [23]

##### *Inhibitory acetylcholinesterasy*

**Galanthamin** (*Galanthus woronovii*, *Narcissus sp.*); z alkaloidů čeledi Amaryllidaceae jsou nejaktivnější alkaloidu galanthaminového typu; výrazně méně účinné jsou alkaloidy lykorinového typu (assoanin, 4 × nižší aktivita, patrně z důvodu planárnosti molekuly).

Galanthamin je duální inhibitor tzn. inhibuje acetylcholinesterasu a zároveň zesiluje účinky acetylcholinu na nikotinových receptorech, dobře snášen, určité periferní cholinergní účinky, podstatně účinnější inhibitor než takrin [ 23].

**Huperzin A** (*Huperzia serrata*, Huperziaceae), dlouze působící inhibitor, neuroprotektivní aktivita, s výrazným efektem na zlepšení paměti, zdá se, že prozatím splňuje ideální kritéria pro symptomatickou léčbu AD.

**Saligenamid C** (*Sarcococca saligna*, Buxaceae), zástupce pregnanových steroidních alkaloidů, výrazněji zasahuje do BuChE.

**Zeatin** (*Fiatoua villosa*, Orchidaceae, podzemní část, *Zea mays*, Poaceae, květenství), také inhibice tvorby  $\beta$ -amyloidu. Přírodní cytokinin.

**Dekursinol** (*Angelica gigas*, Apiaceae), vysoká inhibiční aktivita vůči AChE *in vitro*.

**Ursolová kyselina** (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, Lamiaceae a dále některé taxony z čeledi Ericaceae), vysoký inhibiční efekt vůči AChE, v rostlinách obsažené látky navíc vykazují antioxidační aktivitu a jistou aktivitu cholinergní (*Salvia officinalis*) [23, 27, 28, 29].

***Polygala tenuifolia*** (Polygalaceae), nízká toxicita, neuroprotektivní efekt, redukce A $\beta$ -amyloid  $\beta$ -protein, nekompetitivní inhibice AchE.

**Pyripyropen A** (*Aspergillus fumigatus*), velmi perspektivní, protože se stále přesvědčivěji ukazuje, že zvýšená hladina cholesterolu je spojena s regulací intracelulární distribuce cholesterolu a s případným zvýšením biogeneze / depozice amyloidního  $\beta$ -peptidu v mozku (A $\beta$ ).

**Dehydroevodiamin** (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae), inhibice AChE a zvýšení vasodilatace [23].

**Huprin X** – hybridní sloučenina vzniklá kombinací takrinu a huperzinu A s velmi vysokou inhibiční schopností vůči AChE [26].

**$\alpha$ -Onocerin** (*Lycopodium clavatum*, Lycopodiaceae, *Ononis spinosa*, Fabaceae).

**Cynatrosidy A, B, C** (*Cynanchum atratum*, Ranunculaceae), signifikantní inhibitory AChE.

### 3.2.2 Ovlivnění senilních plaků – produkce amyloidu

**Kurkumin** (*Curcuma longa*, Zingiberaceae) [22]

**Tanshinon I** (*Salvia miltiorrhiza*, Lamiaceae) [23], alkaloidy z *Artemisia asiatica* (Asteraceae) kromě inhibice AChE navíc blokují neurotoxické působení  $\beta$ -amyloidu [24].

### 3.2.3 Antioxidační účinek

**Ginkgolid B** (*Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae) antioxidační působení, snížení viskozity krve. V současnosti reálná totální syntéza [23].

### 3.2.4 Jiné účinky

#### *Inhibitory prolylendopeptidasy*

PEP (serinová peptidasa) hraje významnou roli v metabolismu neuropeptidů obsahujících prolin (štěpí peptidovou vazbu na karboxylové straně prolinového zbytku), široce rozšířeny v různých tkáních, také v lidském mozku, kde hydrolyzuje neuropeptidy s obsahem prolinu, které participují na učení a paměťových procesech (vasopresin, substance P, thyrotropin releasing hormon (TRH)).

**Fenanthrenové deriváty** (*Salvia deserta*, Lamiaceae) [23].

## 3.3 **Papaver somniferum L.** – mák setý

### 3.3.1 Pojmenování

Synonyma: *Papaver amplexicaule* STOKES, *Papaver nigrum* CRANTZ, *Papaver officinale* GMD., *Papaver opiiferum* FORSK.

Další názvy: něm.: Gartenmohn, Schlafmohn; angl.: Chess-bolls, garden-poppy, opium-poppy; [31]

### 3.3.2 Systematické zařazení

Tab.1: Systematické zařazení *papaver somniferum* [32].

Říše	<i>Plantae</i>	rostliny
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i>	krytosemenné
Třída	<i>Magnoliopsida</i>	dvouděložné
Řád	<i>Papaverales</i>	Makotvaré
Čeleď	<i>Papaveraceae</i>	Makovité
<b>Rod</b>	<i>Papaver</i>	Mák
<b>Druh</b>	<i>P. somniferum</i>	mák setý

### 3.3.3 Botanický popis

0,3 až 1,5 m vysoká, jednoletá bylina s modrozeleným stonkem. Listy jsou střídavé, podlouhlé, dolní celistvé, střední a horní nepravidelně zubaté, poloobjímavé a zvlněné [31]. Květy jednotlivé, zřídka v chudokvětých okolících, oboupohlavné, bisymetrické až téměř pravidelné, různobalné. Kališní lístky většinou 2 volné nebo srostlé, korunní obvykle 4 ve dvou kruzích, volné; tyčinek mnoho, pylová zrna trikolpátní nebo od tohoto typu odvozená; semeník svrchní, synkarpní, ze 2 - 19 plodolistů, s velkým množstvím obrácených nebo ohnutých dvouobalných vajíček. Plod tobolka. Semena se silně vyvinutým endospermem, bohatým na olej a bílkoviny; embryo malé, zakřivené [33].

### 3.3.4 Obsahové látky

Mák setý obsahuje směs alkaloidů (popsáno až 50 různých derivátů základního benzylochinolinového heterocyklu), která se získává pod označení opium cornatum z nezralých tobolek nebo izolací z makoviny [34].



Hlavními alkaloidy jsou: morfin, kodein, thebain (= alkaloidy morfinového čili fenanthrenového typu), papaverin, narcein, noskapin a retikulin (= alkaloidy benzyloisochinolinového). Další alkaloidy obsažené v této rostlině jsou např. gnoskopin, hydrokotarnin, kodamin, kryptopin, lanthopin, laudanin, laudanidin, laudanosin, mekonin, narkotin, pseudomorfin (oxydimorfin), oxynakortin, papaveramin, protopin, aporhein, rhoeadin, porfyroxin, xanthalin, neopin, narkotolin.

V květech je obsažen kvercetin-3-gentiobiosid a kvercetin-3-glucosid, v kališních lístcích alkaloidy  $C_{17}H_{19}NO$ ,  $C_{18}H_{21}NO_3H_2O$  (neznámého jména), papaverin, paramorfin a narkotin. Kořeny obsahují 0,1 až 0,4% alkaloidů, lodyha 0,1 - 1,0%, semena 0,005 až 0,04% [31].

### Nezralé plody

Plody sbírané po opadání okvětních lístků, před sušením rozdělené na dvě části. Droga obsahuje podobné látky jako opium jen ve velmi malém množství. Celkový obsah alkaloidů je ovlivněn dobou sklizně nebo genetickými faktory.

Obsah morfinu kolísá mezi 0,12 a 0,89 %. Existuje určitá závislost mezi tvarem, barvou tobolky a obsahem morfinu. Tobolky kulovitěho tvaru mají největší obsah morfinu, podlouhlé tobolky obsahují jen nepatrné množství. Hodně morfinu mají tobolky modré až fialové, oproti bílým odrůdám, kde je obsah morfinu zanedbatelný. Maximálního obsahu dosahuje morfin 10. - 12. den před dozráním semen. Celkový obsah vedlejších alkaloidů je kolísavý, jeho hodnoty se pohybují v rozmezí 0,035 a 0,23 % [31].

### Makovina

Alkaloidy: 0,015 až 0,018 % morfin, celkový obsah vedlejších alkaloidů v tobolce je 0,035 až 0,23 %. Další obsahové látky: kyselina kumarová, kyselina fumarová [31].

### Opium

Synonyma: Laudanum, mekoninum, opium crudum, opium nativum [31].

Definice drogy: Opium se získává nařezáním nezralých makovic a usušením bílého latexu. Celkový obsah alkaloidů ovlivňují faktory jako druh odrůdy, povětrnostní podmínky, termín sklizně.

Obsah alkaloidů kolísá také během dne, nejvíce je ho v časných ranních hodinách, nejméně v poledne. Ztráty 60 - 80 % mohou nastat v případě, že alkaloidy jsou vymyty deštěm nebo rosou. Nejvhodnější období pro sklizeň je 8. - 10. den po opadání okvětních lístků. Výnos

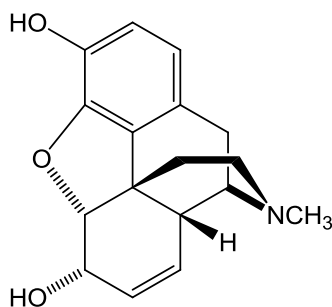
z jedné tobolky je mezi 20 až 50 miligramy. Průměrný výnos z jednoho hektaru je tři až sedm kilogramů. Celosvětová legální produkce opia činí cca 2000 tun [31].

### 3.3.5 Farmakologické účinky obsahových látek

#### 3.3.5.1 **Morfin**

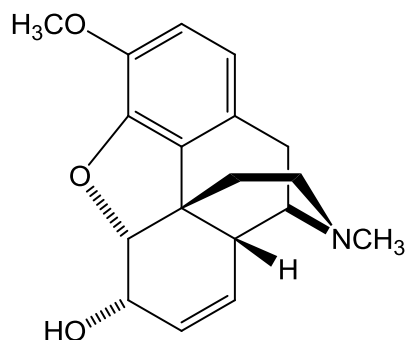
Nejsilnější rostlinné analgetiku. Ve spinální míše inhibuje vedení bolestivého impulzu tím, že imituje aktivaci descendentního nociceptního systému, který uvolňuje opioidy. Endogenní opioidy a morfin inhibují substanci P (neurotransmitter bolesti) z presynaptického nervového zakončení a tím inhibují další vedení bolestivého impulzu. Dále vyvolává útlum dechového centra, euforii, závislost [35].

Kromě centrálních účinků zasahuje i do stavu vnitřních orgánů. Dochází k ovlivnění motility a sekrece v oblasti gastrointestinálního traktu. Konkrétním důsledkem je navození konstipace s opožděným vyprazdňováním žaludku [36].



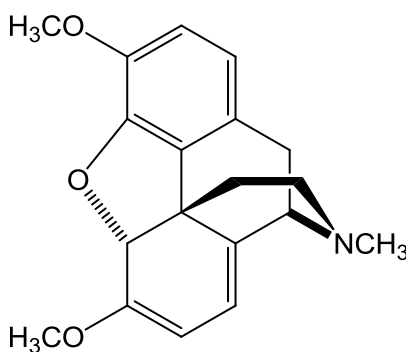
#### 3.3.5.2 **Kodein**

Analgetický účinek kodeinu neboli methylnorfinu je ve srovnání s morfinem podstatně nižší. Po podání per os se dobře vstřebává a jeho malý podíl se v organismu demethyluje na morfin. V kombinaci s neopioidními analgetiky (kyselinou salicylovou nebo paracetamolem) se využívá k léčbě mírné až střední bolesti. Vzhledem k jeho inhibičním účinkům na dechové centrum se velmi často používá jako antitussikum [35, 36].



### 3.3.5.3 Thebain

Má minimální analgetickou aktivitu. Využívá se jako prekursor pro přípravu etorfinu (oxykodon) a opioidního antagonisty naloxonu [36].



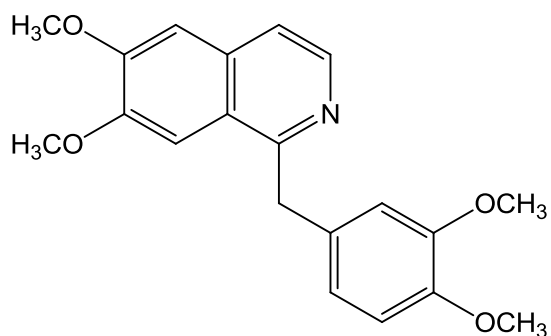
### 3.3.5.4 Papaverin

Klasické muskulotropní spasmolytikum. Na hladkých svalech vyvolává relaxaci nezávisle na inervaci svalstva. Má „chinidinový“ účinek na srdce. Papaverin je alkaloid obsažený v opiu v koncentraci 0,8%. Papaverin je stejně jako morfin derivát isochinolinu, nemá však centrální účinky. Vyvolává systémovou vasodilataci a tím přispívá ke snížení krevního tlaku. Má také relaxační účinek na bronchy [35].

Toxicita papaverinu se vyskytuje zejména po subkutánním podání. Po perorálním podání vykazuje papaverin nižší toxicitu [37].

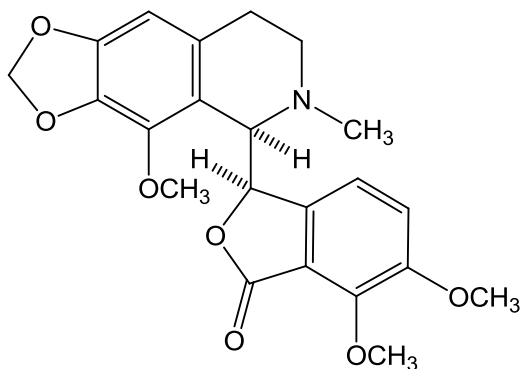
Papaverin může nacházet uplatnění při léčbě mozkových vasospasmů [38].

Kinetickou analýzou bylo dokázáno, že papaverin, berberin a další isochinolinové alkaloidy působí jako reverzibilní inhibitory acetylcholinestřasy [39].



### 3.3.5.5 Narkotin

Neboli noskapin. V opiu potencuje účinek morfinu, je výchozí látkou pro výrobu hydrastininu, kotarninu (látky využívané při děložním krvácení).



### 3.3.6 Využití rostliny

#### 3.3.6.1 Farmaceutický průmysl

Ve farmaceutickém průmyslu je prvotním využitím izolace alkaloidů, které se dále využívají pro své farmakologické účinky.

### 3.3.6.2 Farmaceutický výzkum

Kinetická analýza ukázala, že papaverin, berberin a isochinolinové alkaloidy působí jako reverzibilní inhibitory acetylcholinesterasy [39]. Tento fakt podpořil nové studie zaměřené právě na účinek isochinolinových alkaloidů pro jejich možný pozitivní vliv v léčbě Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních onemocnění.

### 3.3.6.3 Potravinářský průmysl

Tradiční olejnina. Využívají se semena a to největší část v pekárnách a domácnostech a přibližně 15 % se zpracovává na stolní olej, který má žlutou barvu, dobrou chuť a je lehce stravitelný [40]. Pro potravinářské účely se lisuje za studena, pro technické účely se lisuje za tepla. V tomto případě se užívá např. při výrobě fermeží, jádrového mýdla nebo olejových barev pro výtvarníky.

### 3.3.6.4 Průmyslová produkce

Pěstování máku pro zisk opia je povoleno pouze v šesti zemích (Bulharsko, Turecko, Řecko, Indie, bývalá Jugoslávie, některé země SNS). Hlavním producentem opia je Indie, tvoří 70% světové produkce. Nelegálně pěstované opium se získává především na území tzv. Zlatého trojúhelníku, je to hranice mezi Thajskem, Barmou a Laosem [31].

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1 Všeobecné postupy

### 4.1.1 Destilace a odpařování

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předeek (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 při 40 °C za sníženého tlaku.

### 4.1.2 Chromatografie

#### 4.1.2.1 *Tenkovrstvá chromatografie*

Chromatografie na tenké vrstvě byla použita v systému N (normálních) komor. Komory byly použity nasycené mobilní fází. V případě užití malých komor (válcových), průměr 10 cm, trvalo sycení asi 30 minut. U klasických komor (18 × 18 cm) pak asi hodinu. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

#### 4.1.2.2 *Sloupcová chromatografie*

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem stupňovité eluce na oxidu hlinitém neutr., 0,1–0,25 mm, deaktivovaném 5% vody. Sloupec byl plněn obvyklým způsobem – nalitím suspenze adsorbentu do rozpouštědla. Vzorek byl po vysušení v exsikátoru nanesen na roztěru s malým množstvím adsorbentu.

## 4.2 Materiál a vybavení

### 4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie

#### Rozpouštědla:

Cyklohexan, č. (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>)

Diethylamin, č. (Et<sub>2</sub>NH)

Diethylether, č. bez stabilizátoru (Et<sub>2</sub>O)

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, č. (EtOH)

Chloroform, č. (CHCl<sub>3</sub>)

Methanol, č. (MeOH)

Toluen, č. (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>)

Chemikálie:

Dusičnan bismutitý zásaditý, č.

Hydroxid sodný, č.

Jodid draselný, p. a.

Kyanid draselný, č.

Kyselina octová 99%, p. a. (AcOH)

Kyselina sírová 96%, p.a. (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Kyselina vinná, č.

Uhličitan sodný bezvodý, č.

Vodný roztok chlorovodíku 36%, p. a. (HCl)

4.2.2 Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erytrocytární AChE (IC<sub>50</sub>)

Chemikálie:

10 mM acetylcholinjodid (Sigma-Alcrich)

10 mM butyrylcholinjodid (Sigma-Aldrich)

0,1 M fosfátový pufr pH 7,4

5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTND) (Sigma-aldrich)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p. a. (Lachema)

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, p. a. (Lachema)

Eserin (Sigma-Aldrich)

Huperzin A (Tazhonghui Co., Ltd., China)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Herb Inc., China)

Materiál:

Jako zdroj acetylcholinesterasy byl použit hemolyzát lidských erytrocytů z krve zdravých dobrovolníků. Citrátovaná krev se odstředí a získá se klasicky erytrocytární sediment, který se promyje fosfátovým pufrům pH 7,4, erytrocyty se převedou do 50 ml polykarbonátové kyvety a suspendují přibližně v 5násobném objemu 5 mM fosfátového pufru s obsahem 0,15 M chloridu sodného. Suspenze se centrifuguje 10 minut při 12 000 rpm (centrifuga Sorvall RC2-B



s použitím SS34 fixed angle rotor). Promývací procedura se provádí  $3 \times$  při 0-4 °C, pokud není uvedeno jinak.

Erytrocytární stroma se připraví lýzou promytých erytrocytů. Pro zahájení hypotonické hemolýzy se smíchá důkladně 1 ml promyté erytrocytární masy se 40 ml 5 mM fosfátového pufru (fosforečnan sodný) pH 7,4. Hemolýza se provede za míchání 10 minut, potom se erytrocytární stěny sbalí při 20 000 rpm po dobu 10 min. Supernatant a malý tuhý koláč na povrchu se odstraní odtážením. Hmota se promyje  $3 \times$  fosfátovým pufrem (fosforečnan sodný), pH 7,4. Získají se bělavá oddělená těla erytrocytů.

Jako zdroj butyrylcholinesterasy byla použita lidská plazma.

Plastové kyvety DISPOLABKARTELL 1937 PS MICROCUVETTES.

#### 4.2.3 Přístroje

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

pH metr  $\Phi$  72 METER (Beckmann, USA)

UV-spektrofotometr UVIKON 942 (Kontron instruments, Švýcarsko)

Mikrovýhřevný stolek Boetius

Přístroj pro měření optické otáčivosti ADP 220 POLARIMETER B+S

#### 4.2.4 Detekční činidla

D 1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera: [42]

- *roztok A*: se připraví rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.

- *roztok B*: se připraví rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody

- *zásobní roztok*: se připraví smísením roztoků A a B v poměru 1:1. Ta může být uložena několik měsíců v lednici.

- *činidlo pro analýzu*: se připraví tak, že se k roztoku 5 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidá 5 ml zásobního roztoku.

D 2: Mayerovo činidlo: [43]

- 1,35 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného se rozpustí ve vodě a doplní se jí do 100 ml.

#### 4.2.5 Chromatografické adsorbenty

A 1: Kieselgel 60 F254, Merck, 5 × 10 cm 32

Hliníková deska s vrstvou silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii. Silikagel 60 F254, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

A 2: Oxid hlinitý neutrální, 0,1 - 0,25 mm (stanovení aktivity III)

A 3: Silufol UV 254, Kavalier Votice, 20 × 10 cm

Chromatografické desky Silufol UV254.

Komerční chromatografické desky byly před použitím vyvinuty v té chromatografické soustavě, která byla posléze použita k separaci, vysušeny pod proudem teplého vzduchu a bezprostředně zpracovány

#### 4.2.6 Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + CHCl<sub>3</sub> + Et<sub>2</sub>NH 45 : 45 : 10

S 2: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + EtOAc + Et<sub>2</sub>NH 70 : 30 : 4

### 4.3 **Postup při izolaci alkaloidu z *Papaver somniferum* L**

#### 4.3.1 Surovina a příprava extraktu

Extrakt připraven jako směsný ze dvou částí drog různého původu:

- a) Suché zralé makoviny s kousky stonků (sběr 09/2008, mgr. Vrbovský, Oseva Opava), droga byla rozemleta na částice do 0,5 cm, celková hmotnost 23,0 kg.
- b) Suchých zelených nezralých tobolek s kousky stonků do 5 cm (pěstování na ZLR FaF UK, sběr 07-08/2008; nezralé tobolky byly rozříznuty, vyklepány nezralá nevyvinutá semena, tobolky sušeny 2 dny při 50 °C, poté rozemlety na části do 3 mm), celkem 7,0 kg.

#### 4.3.2 Základní extrakt

Výše uvedené drogy byla zalily 95% etanolem denaturovaným metanolem a perkolátor ponechán v klidu po dobu 3 dnů. Celkem bylo použito na 30 kg drogy 265 litrů 95% lihu, tj. 1 : 8,8. Extrakt byl zbaven lihu, rozpuštěn ve 2% HCl na pH ca 2, zředěn vodou, odstraněn chlorofyl obvyklým způsobem, zfiltrován a celkem zředěn na 12 litrů (tmavě hnědý, poněkud pěnicí).

#### 4.3.3 Výtřepék A-Et<sub>2</sub>O

Roztok byl zalkalizován 1,8 litru 10% uhličitanu sodného pH 9,5-10 a vytřepán 4 × 3 litry éteru (vrstvy se dobře dělily), organická fáze byla zfiltrována a odpařena.

#### 4.3.4 Výtřepék A-CHCl<sub>3</sub>

Roztok po vytřepání éterem byl vytřepán 4 × 3 litry CHCl<sub>3</sub>; organická vrstva se hůře oddělovala. Organická fáze byla zahuštěna; vyloučila se žlutavá práškovitá látka.

#### 4.3.5 Výtřepék Bc-Et<sub>2</sub>O

Primární extrakt po chloroformovém výtřepku A byl zalkalizován 50% NaOH na pH 12,5-13 (celkem 16,3 litru roztoku) a vytřepán 5 × 4 litry Et<sub>2</sub>O. Éterový roztok byl po ostrém oddělení (fáze se dobře dělily) odpařen.

#### 4.3.6 Výtřepék Bd-CHCl<sub>3</sub>

Po okyselení malého množství silně alkalického primárního extraktu z předchozího vytřepávání kyselinou sírovou bylo přidáno Mayerovo činidlo; vznikl velmi jemný zákal, a proto nebylo provedeno vytřepávání chloroformem, ale bylo provedeno srážení zbytkových alkaloidů do formy mayerátu.

#### 4.3.7 Kvartérní jodidy J

Nepřipravovány, ale kvartérní baze získány ve formě mayerátu.

#### 4.3.8 Kvartérní alkaloidy Q

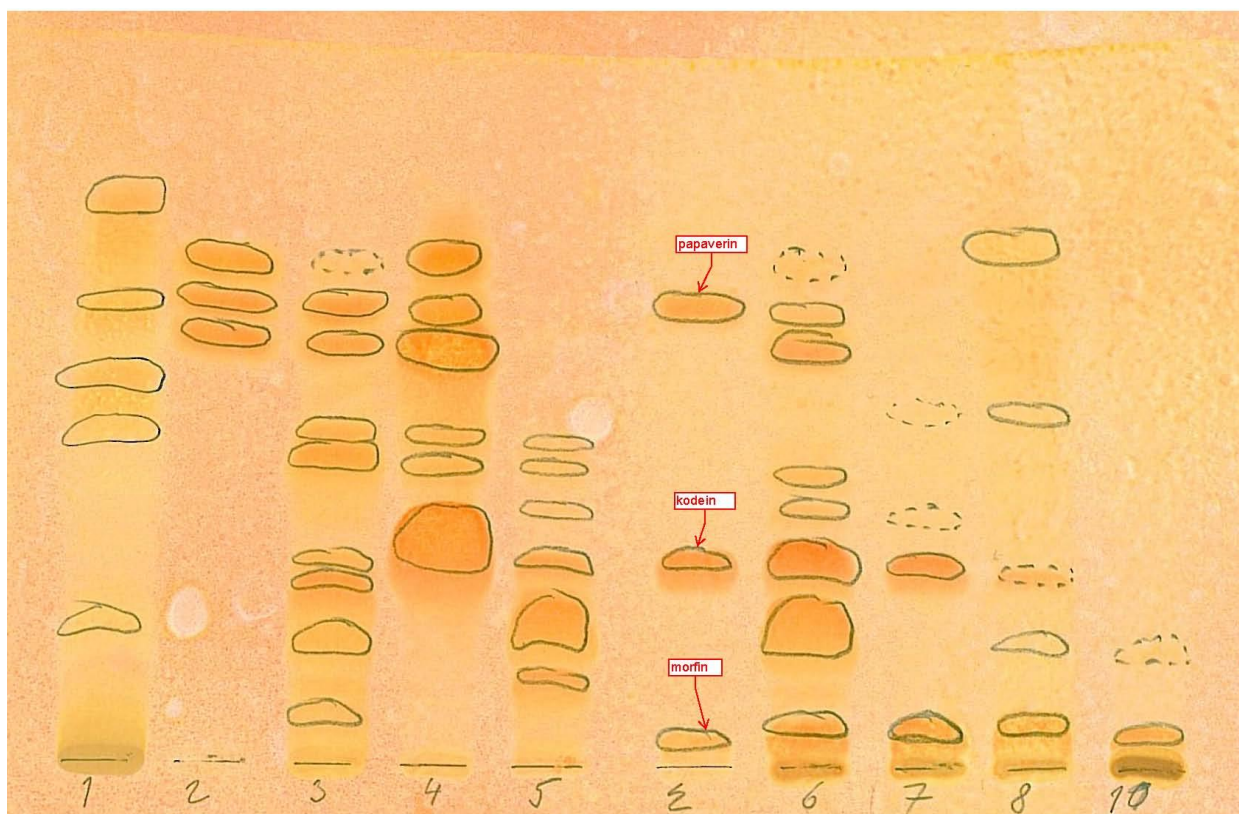
Primární extrakt silně alkalický z vytřepávání éterem při pH 13 byl zneutralizován 3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na pH 3 (během této operace hnědý roztok výrazně zesvětlá, ca 17 litrů), zbytek alkaloidů byl vysrážen přidávkem Mayerova činidla (1 litr). Po sedimentaci drobné černé sraženiny byla provedena dekantace, filtrace na Büchnerově nálevce, sraženina promyta destilovanou vodou (nevážena, odhadem asi 10 g) a rozpuštěna v MeOH za použití ultrazvuku.

Tab. 2: Spojené výtřepky ze směsné makoviny

Označení	Úprava roztoku*	Odparek	Popis
A-Et <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH ~9	51 g	Tmavě hnědý, velmi visk.
A-CHCl <sub>3</sub>	0, pH ~9 (7)	35,6 g	Tmavě hnědý, při zahušťování se vylučovala bělavá práškovitá hmota.
Výsledky po čištění výtřepku A:			
L	A/Et <sub>2</sub> O rozp. v HCl, pH~1-2, (1)	2,85 g	Tmavě hnědý, řídké viskózní, bez náznaku krystalů
AC Cl <sup>-</sup> rozpustné v chloroformu	AC <sub>1</sub> Nefenolové (nF, 2)	K: 4,36 g ML: 1,81 g	Světle okrové drobné kryst. Tmavě hnědý, velmi visk.
	AC <sub>2</sub> Fenolové (F, 3)	0,55 g	Tmavě hnědý, velmi visk. Nekrystalický
AD Cl <sup>-</sup> nerozpustné v chloroformu	AD <sub>1c</sub> (baze R v Et <sub>2</sub> O) Nefenolové (nF, 4)	5,26 g	Světle hnědý medový, velmi viskózní
	AD <sub>2c</sub> (baze R v Et <sub>2</sub> O) Fenolové (F, 5)	7,48 g	Světle hnědý, hrubě krystalický
	ADd (baze rozp. jen v CHCl <sub>3</sub> , 6)	12,25 g	Tmavě hnědý, nafouklý
Sumární hmotnosti ostatních odparek			
Bc (rozp. v Et <sub>2</sub> O)	NaOH, pH~13 (8)	1,07 g	Tmavě hnědý, velmi viskózní s bb krystaly
Bd (rozp. v CHCl <sub>3</sub> )	Nezprac. (9)	000	---
J	Nezprac.	000	---
Q	Mayerát (10)		

\* čísla tučně v závorce označují typ výtřepku (popis na TLC)

Ve své diplomové práci jsem se podílela na přípravě základního extraktu, výtřepku A-Et<sub>2</sub>O (pH 9 - 10) a jeho dalším rozdělení. Ostatní práce v této části byly provedeny mimo rámec mé diplomové práce, pro pochopení celého postupu a z důvodu pokračování dalších diplomantů je zde však uvádím.



Obr. 1: TLC frakcí ze směsné makoviny

(Kieselgel Merck, UV254 nm,  $C_6H_5CH_3 + CHCl_3 + Et_2NH$  45 + 45 + 10, komora nasycená, vyvíjení 1 ×, detekce UV 254 nm, Dragendorff. činidlo).

- 1 L ( $Et_2O$ , pH~1)
- 2  $AC_1$  (chloridy alkaloidů R v  $CHCl_3$ , nefenolické)
- 3  $AC_2$  (chloridy alkaloidů R v  $CHCl_3$ , fenolické)
- 4  $AD_{1c}$  (chloridy alkaloidů nR v  $CHCl_3$ , nefenolické, baze rozp. v  $Et_2O$ )
- 5  $AD_{2c}$  (chloridy alkaloidů nR v  $CHCl_3$ , fenolické, baze rozp. v  $Et_2O$ )
- 6  $ADd$  (chloridy alkaloidů nR v  $CHCl_3$ , baze rozp. v  $CHCl_3$ )
- 7 Ad (pH~10, výtřepek  $CHCl_3$ )
- 8 Bc (pH~12, výtřepek  $Et_2O$ )
- 9 Bd (pH~12, výtřepek  $CHCl_3$ ) – zde nebyl k dispozici
- 10 Q (kvartérní baze ve formě  $Cl^-$  připravené z mayerátu)
- $\Sigma$  standardy: papaverin+kodein+morfin

#### 4.4 Zpracování A/ Et<sub>2</sub>O (pH 9-10)

##### 4.4.1 Znečištěniny z kyselého roztoku a nebazické alkaloidy(L)

51 g odparku A bylo rozpuštěn ve 350 ml 2% HCl za tepla, po zchlazení zředěn vodou a doplněn do 900 ml (pH ca 1). Tento kyselý roztok byl vytřepán 4 × 250 ml Et<sub>2</sub>O.

##### 4.4.2 Chloridy rozpustné v chloroformu (AC)

Vodná fáze (pH~1) byla vytřepána 4 × 300 ml CHCl<sub>3</sub> fáze se poměrně dobře dělily, na rozhraní zůstávala jen malá mezifáze (1 cm). Hnědý roztok byl odpařen.

##### 4.4.2.1 **Chloridy rozpustné v chloroformu, nefenolové (AC<sub>1</sub>)**

Odparek chloridů rozpustných v chloroformu byl rozpuštěn ve 300 ml 2% HCl, přidáno 300 ml vody (pH~1), roztok zfiltrován a alkalizován 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH ~ 10), vytřepán 3 × 200 ml Et<sub>2</sub>O, spojené etherové výtřepky vytřepány 3 × 200 ml 2% HCl, kyselý roztok zalkalizován 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH~10 a znova vytřepán 3 × 200 ml Et<sub>2</sub>O. Tento etherový roztok byl promyt 3 × 50 ml 5% NaOH, poté 2 × 100 ml vody. Promytý etherový výtřepek byl vysušen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařen.

##### 4.4.2.2 **Chloridy rozpustné v chloroformu, fenolové (AC<sub>2</sub>)**

Louhové roztoky fenolátů a promývací voda byly spojeny, zneutralizovány a okyseleny na pH~2 (ca 600 ml), zalkalizovány 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH~10 a mléčně zakalená suspenze vytřepána 3 × 200 ml Et<sub>2</sub>O. Etherový výtřepek byl vysušen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařen.

##### 4.4.3 Chloridy nerozpustné v chloroformu (AD), baze rozpustné v Et<sub>2</sub>O

Kyselá vodná fáze po odstranění chloridů rozpustných v chloroformu byla zalkalizována 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH 9-10 (objem ca 1400 ml) a suspenze vytřepána 6 × 600 ml Et<sub>2</sub>O. Roztok nebyl odpařen, ale zpracováván dále.

#### 4.4.3.1 Chloridy nerozpustné v chloroformu, nefenolové (AD<sub>1c</sub>)

Éterový výtřepok (3600 ml) připravený jak je uvedeno v kapitole 3. byl promyt 3 × 120 ml 5% roztoku NaOH (fenoláty, velmi intenzívně hnědý roztok), potom 2 × 150 ml vody. Alkalické a vodné fáze byly spojeny. Promytá éterová fáze světle žluté barvy byla odpařena do sucha.

#### 4.4.3.2 Chloridy nerozpustné v chloroformu, fenolové (AD<sub>2c</sub>)

Hnědý roztok fenolátů z předcházejícího vytřepávání (~1400 ml) byl zneutralizován teprve 15% HCl na pH~2, potom 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na pH 9-10. Světle hnědá sraženina alkaloidů, která se vyloučila, byla vytřepána 4 × 400 ml Et<sub>2</sub>O. Éterový roztok byl odpařen.

#### 4.4.4 Chloridy nerozpustné v chloroformu (AD), baze nerozpustné v Et<sub>2</sub>O (ADd)

Zbytek vodné fáze z chloridů nerozpustných v chloroformu obsahoval po vytřepání Et<sub>2</sub>O ještě výrazné množství alkaloidů (po reakci s Mayerovým činidlem), proto byl při pH~9-10 vytřepán 5 × 300 ml CHCl<sub>3</sub>.

### 4.5 Chromatografické dělení AC<sub>1</sub> (chloridy alkaloidů R v CHCl<sub>3</sub>, nefenolické)

Při TLC analýze vyloučeného pískovitého krystalického podílu a matečného louhu bylo zjištěno, že se prakticky kvalitativně neliší – obsahují tři hlavní alkaloidy a stopová množství minimálně dvou alkaloidů dalších. Proto bylo chromatografické dělení realizováno směsí obou výchozích surovin.

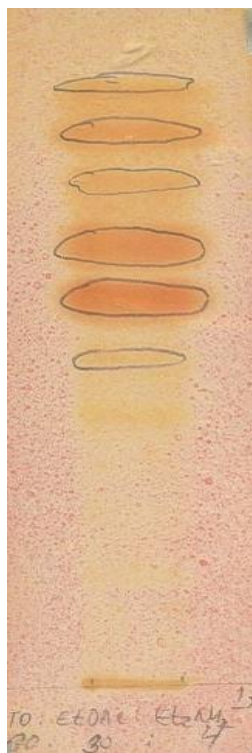
#### 4.5.1 Čištění odparku přes oxid hlinitý

Matečný loup odparku AC<sub>1</sub> (1,81 g) byl rozpuštěn ve 45 ml chloroformu, přidáno 5 ml benzínu (40-60 °C), roztok byl vlit na sloupec s neutrálním oxidem hlinitým 0,1-0,25 mm a promyt 250 ml této směsí (chloroform + benzín 9 : 1).

#### 4.5.2 Sloupcová chromatografie

**Tab. 3: Sloupcová chromatografie výtřepku AC<sub>1</sub> *Papaver Somniferum-makovina*/A/Et<sub>2</sub>O**

Označení vzorku	AC <sub>1</sub> – předčištěný matečný loup + část krystalů
Hmotnost vzorku	1,45 g ML + 0,76 g vyloučené směsi krystalů
Druh a množství adsorb.	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> neutr., st. akt. III (desaktivovaný 5 % vody), 0,1- 0,25 mm, 140 g
Vrstva s extraktem	2,5 × 1,7 cm
Dělicí vrstva	2,5 × 74,5 cm
Frakce (ml)/doba toku	50 ml/ca 20 min.

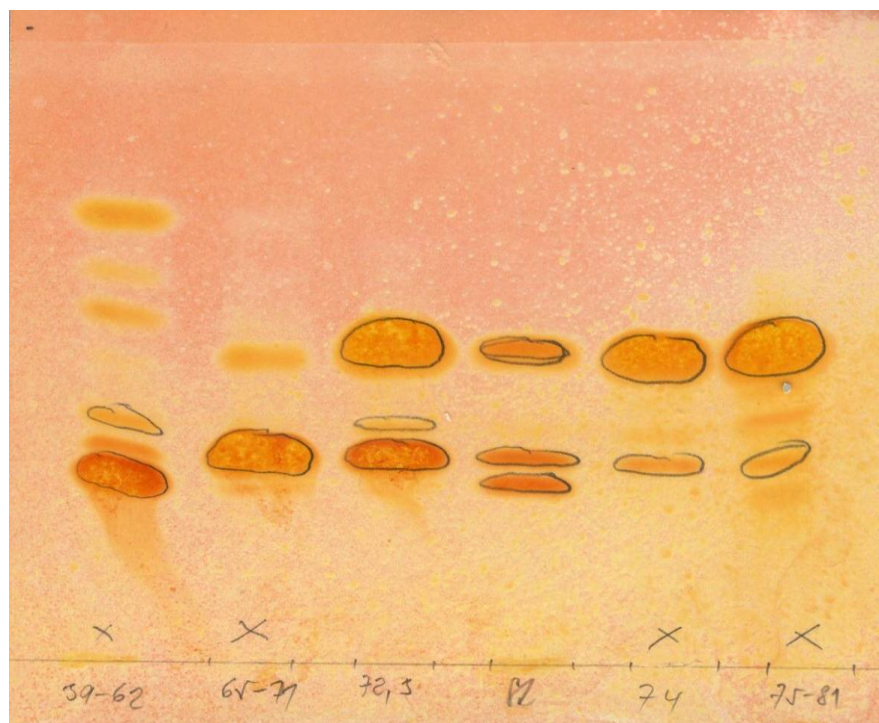


Obr.2 Kontrolní TLC: Kieselgel 60 F254 nm, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> + EtOH + Et<sub>2</sub>NH 70:30:4, vyvíjení 2×, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo.



Tab. 4: Výsledky sloupcové chromatografie výtřepku AC<sub>1</sub>

Spoj. frakce	Č. frakce	Eluční systém	Hmotnost	Popis (Poznámka)
1-38	1- 11	Benzín : CHCl <sub>3</sub> 9:1	0	Světle hnědý, olej., zanedbatelné hmotnosti, bez obsahu alkaloidů
	12-26	Benzín : CHCl <sub>3</sub> 8,5:1,5		
	27-38	Benzín : CHCl <sub>3</sub> 8:2		
39-62	39-56	Benzín : CHCl <sub>3</sub> 8:2	0,800 g	Světle žlutý, krystalický
	57-58	Benzín : CHCl <sub>3</sub> 7,5:2,5		
	59-62	Benzín: CHCl <sub>3</sub> 7,5:2,5		
63-64	63-64	Benzín : CHCl <sub>3</sub> 7:3	0	Světle hnědý, olej., bez alkaloidů
65-71	65-71	Benzín : CHCl <sub>3</sub> 7:3	0,565 g	Nažloutlý, krystalický
72-73	72-73	Benzín : CHCl <sub>3</sub> 7:3	0,390 g	Světle hnědý, krystalický
74	74	Benzín : CHCl <sub>3</sub> 7:3	0,148 g	Světle hnědý, krystalický
75-81	75-81	Benzín : CHCl <sub>3</sub> 7:3	0,464 g	Světle hnědý, krystalický
82-100	82-100	CHCl <sub>3</sub>	2,367 g	Hnědý, nekrystalický



Obr. 3: Kontrolní TLC: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> nm, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>+EtOH+Et<sub>2</sub>NH 70:30:4, vyvíjení 2×, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo.

#### 4.5.3 Čištění spojených frakcí 39-62

0,800 g světle žlutého, krystalického odparku bylo rozpuštěno ve 2,5 ml chloroformu, po rozpuštění přidáno 7,5 ml benzínu, roztok byl zfiltrován přes neutrální skelnou vatu v Pasteurově pipetě a vlit na sloupeček s obsahem 10 g neutrálního oxidu hlinitého (40-250  $\mu\text{m}$ , deaktivovaný 5 % vody, průměr  $\times$  výška = 15  $\times$  45 mm) a následně promyt 65 ml směsí benzín +  $\text{CHCl}_3$  3 : 1. Po odpaření vzniklo 750 mg slabě žlutého odparku, který krystalizoval.

Tento odparek byl rozpuštěn v 10 ml směsí  $\text{CHCl}_3$  + EtOH 1 : 1, nanesen na chromatografickou desku a krystalizován za níže uvedených podmínek (tab. 5).

Tab. 5: Čištění alkaloidu ze spojených frakcí 39-62

Frakce-popis	Slabě nažloutlý
Hmotnost vzorku	750 mg, krystalizující
Chrom. Desky	Silufol UV 254 nm (Kavalier Sázava), 10 $\times$ 20 cm
Počet desek, linie	42 desek, nanášecí linie 18 cm
Eluční systém, vyvíjení	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{EtOH} + \text{Et}_2\text{NH}$ 70:30:4, vyvíjení 2 $\times$
Dráha	8,5 cm (10 cm celá deska)
Detekce	UV 254 nm
Izolovaná zóna	$R_f$ 0,26 (zhášení při 254 nm)

Po vysušení desek byl absorbent se zónou separován, eluován v chromatografické kolonce 50 ml  $\text{CHCl}_3$  a eluát odpařen. Vzniklo 532 mg světle žlutého krystalizujícího odparku; tento hrubý krystalizát byl podroben dvojnásobné rekrystalizaci za vzniku 185 mg krystalické látky vzhledu bezbarvých obdélníkových destiček, označené PS-01, t. tání 189-191,5  $^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{17}$  -208 $^\circ$  (c 0,33, methanol).

## 4.6 Určení struktury izolované látky

### 4.6.1 Měření hmotnostního spektra

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

### 4.6.2 Měření NMR spektra

Spektra jsou 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 2D 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 Stanovení účinku alkaloidu na erythrocytární AChE ( $\text{IC}_{50}$ )

### 4.7.1 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
- 

### 4.7.2 Stanovení hodnoty $\text{IC}_{50}$

*Stanovení anticholinesterasové aktivity:*

Pro stanovení aktivity látek byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda, využívající 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou kyselinu). Za substráty byly zvoleny estery thiocholinu (acetylthiocholin, butyrylthiocholin), které jsou esterasami štěpeny na thiocholin

a příslušnou kyselinu. Principem reakce je vazba thiolové skupiny thiocholinu s DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu o  $\lambda_{\max} = 436 \text{ nm}$ , který je stanoven spektrofotometricky. Při tomto stanovení je sledován nárůst absorbance za 1 minutu.

Slepý vzorek – do kyvety je postupně přidáváno 10-25  $\mu\text{l}$  hemolyzátu nebo plazmy, 200  $\mu\text{l}$  DTNB, 25  $\mu\text{l}$  rozpouštědla, ve kterém jsou rozpuštěny vzorky (DMSO) a doplní se na objem 900  $\mu\text{l}$  pufrém. Následně je přidáno 100  $\mu\text{l}$  substrátu (acetylcholin jodid nebo butyrylcholin jodid). Nárůst absorbance je měřen při vlnové délce 436 nm. Měření je prováděno ve třech opakováních. Pro výpočet poklesu nárůstu absorbance byla použita průměrná hodnota.

Měření vzorku - do kyvety je postupně přidáváno 10 - 25  $\mu\text{l}$  hemolyzátu nebo plazmy, 200  $\mu\text{l}$  DTNB, 25  $\mu\text{l}$  měřeného vzorku v různých koncentracích a doplní se na objem 900  $\mu\text{l}$  pufrém. Následně je přidáno 100  $\mu\text{l}$  substrátu (acetylcholin jodid nebo butyrylcholin jodid). Nárůst absorbance je měřen při vlnové délce 436 nm. Měření je prováděno ve třech opakováních.

#### 4.7.3 Matematické zpracování experimentálních dat

Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nelineární regresi v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA). Pro výpočet poklesu  $\Delta A$  se použije vzorec:

$$\% \text{ poklesu } \Delta A = 100 - (\Delta \text{ASA} / \Delta \text{ABL} \times 100)$$

$\Delta \text{ASA}$  – nárůst absorbance za 1 minutu u měřeného vzorku

$\Delta \text{ABL}$  – nárůst absorbance za 1 minutu u slepého vzorku

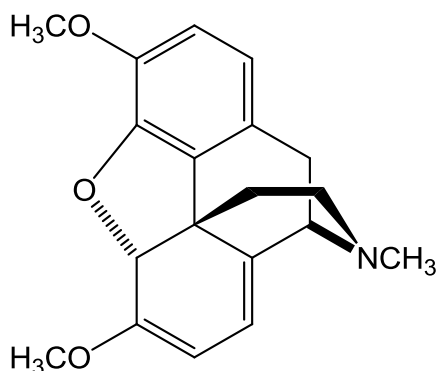
## **5 VÝSLEDKY**

## 5.1 Stanovení struktury látky PS01

### 5.1.1 Hmotnostní spektroskopie

Viz obr. 4 a obr. 5

ESI-MS  $m/z$  (%) 312,11  $[M+H]^+$  (100); MS/MS (fragmentace píku  $m/z$  312.11):  $m/z$  (%) 223.17 (6.7), 249.09 (46.1), 255.05 (22.5), 266.13 (33), 280.24 (17.9), 281.11 (100), 297.01 (5.2), 312.23 (28.7).



Na základě fragmentace ESI-MS (viz obr. 5) lze předpokládat, že izolovaná látka je thebainem (výsledky  $^1H$ - a  $^{13}C$ -NMR spekter, jejichž měření provádí ing. M. Kurfürst, Ph.D., Akademie věd ČR, Ústav chemických procesů, Praha) nejsou ještě k dispozici).

### 5.1.2 Srovnání fyz.-chem. charakteristik

Pro bližší identifikaci látky byl použit vzorek thebainu ze sbírky doc. RNDr. L. Opletala, CSc.

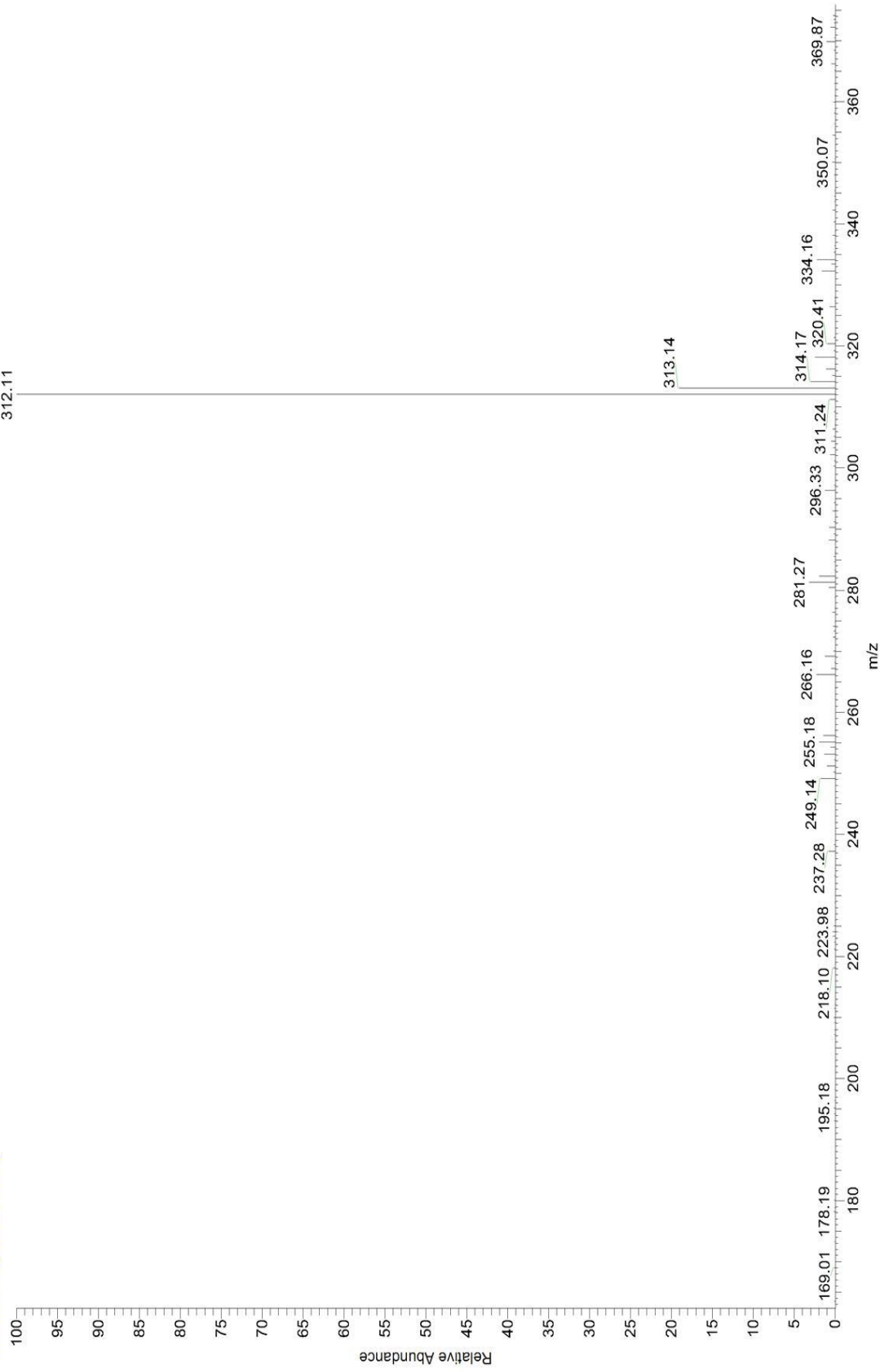
Směsná teplota tání: 189-192 °C (bez deprese)

*Tenkvrstvá chromatografie:*

Kieselgel 60 F254 nm,  $C_6H_5CH_3+CHCl_3+Et_2NH$  70:30:5, vyvíjení 2×, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo,  $R_F$  0,27

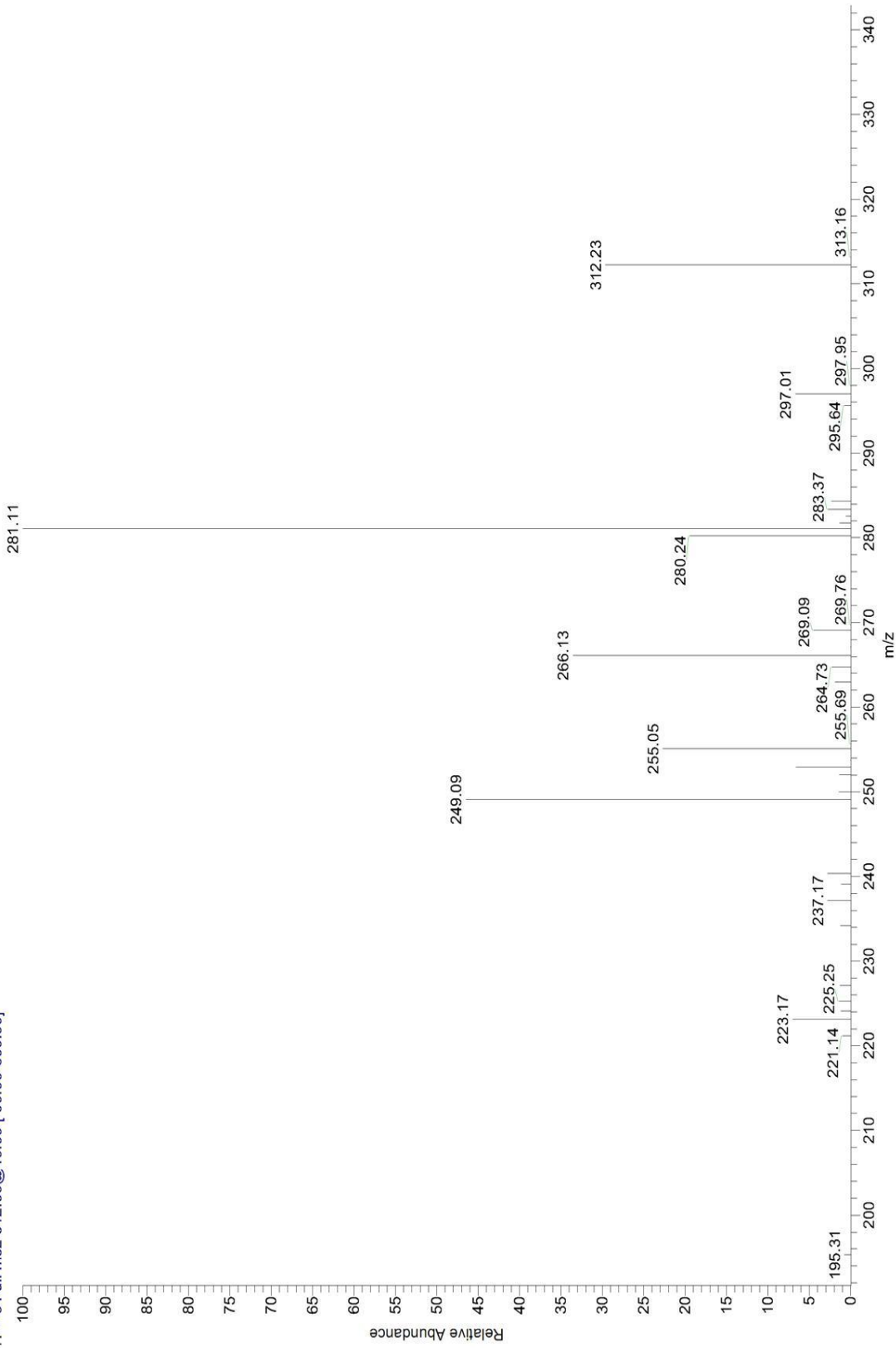
Kieselgel 60 F254 nm,  $C_6H_5CH_3+EtOH+Et_2NH$  70:30:4, vyvíjení 2×, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo,  $R_F$  0,60 (zóny identické)

LC 101 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 9.12E7  
T: + c Full ms [90.00-600.00]



Obr. 4: MS látky PS01

LC 101 MS2 312 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.42E6  
T: + c Full ms2 312.00@40.00 [ 90.00-600.00]



Obr. 5 MS/MS látky PS01



## 5.2 Stanovení anticholinesterasové aktivity a butyrylcholinesterasy

Tab. 6: Výsledky stanovení inhibiční aktivity AchE a BuChE

vzorek	AChE		BuChE	
	% inhibice c = 1 mM	IC <sub>50</sub> mM	% inhibice c = 1 mM	IC <sub>50</sub> mM
Thebain	72,2	186,5	54,43	941,1
Galanthamin		6,9±0,3		156±6,9
Huperzin A		0,25±0,01		>1000

Hodnoty % inhibice při c= 1mM nejsou uváděny.

## **6 DISKUSE**

Léčba neurodegenerativních onemocnění se v současné době stává významným světovým problémem. Zvyšuje se průměrný lidský věk, a proto není překvapením, že narůstá počet případů a lidí postižených Alzheimerovou nemocí (AD), kteří přecházejí do pozdní fáze této choroby a přinášejí tak svému společenskému okolí a zdravotnickému systému nemalé komplikace - jak už z hlediska ošetrovatelské péče, tak terapeutických potřeb. Zásadním problémem, který v současné době existuje, je to, že neznáme příčinu AD. Její léčba probíhá prakticky jen symptomaticky a taky v mnoha případech velmi málo účinně. Velkou nepříjemností se stává skutečnost, že pro účinnou léčbu AD existuje velmi málo efektivních léčiv. Je to patrně způsobeno komplikovaností patofyziologických procesů, jejichž vzájemná souvislost a podstata nebyla do současné doby uspokojivě vysvětlena.

Pro terapii AD (respektive při hledání účinných léčiv) existují dva způsoby vycházející z následujících pracovních teorií. První z nich je tzv. cholinesterasový přístup spočívající v podání léčiv reverzibilně inhibujících aktivaci především mozkové AChE (a také BuChE), čímž dojde ke zvýšení dostupnosti acetylcholinu v transmisních depo-neuronech. V této oblasti existuje řada schůdných cest, bohužel v současné době nedostatečně rozpracovatelných. Druhým přístupem je ovlivnění metabolismu  $\beta$ -amyloidu, snížení tvorby plaků, toxicity v mozku vedoucích ke zvýšení obsahu reaktivních forem kyslíku, a tím k rozvinutí neuronálního zánětu a následně zrychlené apoptózy. Tato cesta je směřována přes ovlivnění aktivity  $\beta$  a  $\gamma$  sekretasy. I přesto, že dnes existuje řada zajímavých a účinných struktur, nemohou být použity, protože jejich studium proběhlo pouze in vitro. V případě in vivo pokusů jsou konstatovány určité toxické vlastnosti, jak se dalo předpokládat. Jsou ale známy poznatky, že látky ovlivňující metabolismus mozkových cholinesteras, mohou zároveň pozitivně zasáhnout do metabolismu  $\beta$ -amyloidu. To je velmi příznivé pole pro farmakochemický výzkum, pokud vezmeme v úvahu, že lze zároveň zasáhnout do metabolismu excitačních aminokyselin (NMDA), allosterické modulace Nreceptorů a dalších procesů. Ve výzkumu léčiv používaných při této chorobě se intenzivně začínají uplatňovat také přírodní látky, zejména alkaloidy. Je to pochopitelné, jelikož mezi nečetnými sloučeninami, které se prakticky využívají k ovlivnění mozkové AChE, hraje významnou roli galanthamin. Další alkaloid huperzin A je ve stadiu konečného hodnocení klinických pokusů.

Na katedře farmaceutické botaniky a ekologie vznikla před několika lety pracovní skupina zabývající se izolací a studiem alkaloidů (zejména isochinolinových) z hlediska jejich účinků na inhibici cholinesteras, antioxidačního a protizánětlivého efektu. Z literatury je patrné, že řada isochinolinových alkaloidů vykazuje účinky vůči mozkové cholinesterase a existuje tedy

oprávněné přesvědčení, že některé strukturní alkaloidní typy by se mohly stát vůdčími strukturami pro matematické modelování a posléze částečné syntézy nových potenciálních látek.

Cílem mé diplomové práce bylo izolovat jeden alkaloid z makoviny v čistém stavu a podílet se na stanovení jeho inhibiční aktivity na erytrocytární AchE a sérové BuChE. Druh *Papaver somniferum* L., respektive jeho alkaloidy jsou zajímavým objektem, protože v opiu bylo nalezeno minimálně 6 strukturních skupin isochinolínových alkaloidů. Zástupce z každé z nich disponuje jinou biologickou aktivitou. Dosud nebyly tyto látky prakticky sledovány z hlediska účinku na mozkovou ChE (kromě papaverinu), ačkoliv nemalá část tohoto spektra má neurotropní aktivitu. Látka s označením PS 01, kterou jsem izolovala, je s největší pravděpodobností thebainem; dosud nejsou k dispozici spektra <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR, které by předpoklad struktury jednoznačně potvrdily. Nepředpokládá se ovšem, že bude navržená struktura změněna, protože všechny analytické testy provedené s referenční látkou prokazují identitu.

Thebain není podle současných literálních zdrojů sloučenina s takovým farmakologickým účinkem, aby mohl být využit jako léčivo přímo, ačkoliv se uvádí, že jde o antitussikum a opioidní analgetikum[44]. Existuje i údaj o tomto analgetickém účinku, avšak účinek je deklarován jako slabý[45].

Často lze v různých literárních zdrojích narazit na sdělení, že thebain je látkou toxickou, nikdy však bez přímého reprezentativního udání míry této toxicity. Z poslední doby existuje pouze zpráva o určité dermatitidě, kterou může thebain vyvolat [46]. Z těchto údajů je tedy zřejmé, že se s přímým terapeutickým použitím thebainu v současné době vůbec nepočítá. Co se týče mé diplomové práce, nejsou výsledky jeho anticholinesterasové aktivity nikterak významné (IC<sub>50</sub> 186.5 pro AChE a IC<sub>50</sub> 941.1 pro BuChE). Hlavní praktické využití thebainu spočívá z hlediska přípravy polosyntetických opioidních analgetik [47,48].

V 70. letech minulého století bylo přistoupeno k produkci máku štětinatého (*Papaver bracteatum*), v jehož kořenech se vyskytuje právě thebain, který slouží jako výchozí surovina pro přípravu polosyntetických opioidních analgetik. Tento postup byl významně finančně podpořen především v USA s cílem omezit výrobu, pašování opia a jeho produktů. Tento projekt však nepřinesl významný protidrogový výsledek, ovšem finanční prostředky vložené do výzkumu přinášejí efekt ještě v současné době.

Thebain se stává velmi žádanou surovinou, protože terapeutický terén se opět navrácí k morfinu a je snaha získávat jej z různých surovin např. z opia nebo makoviny [49,50] nebo ze speciálně vyšlechtěných odrůd např. máku tzv. tasvánského ( Tasmania Alkaloids Pty Ltd.). Tento mák je v Austrálii významně pěstován, jedná se o geneticky modifikované odrůdy,

neobsahuje morfin, ale je velmi významným zdrojem thebainu [51,52]. Samotný thebain tedy slouží jako výchozí látka pro syntézu morfinanových analgetik, ať už morfinu nebo nových polosyntetických derivátů [53, 54, 55, 56,57,57].

V současnosti se při vývoji nových léčiv volí velmi racionální postup. Léty prověřená léčiva jsou zkoumána z hlediska nových účinků (ovlivnění některých enzymových systémů, exprese genů atd.). K tomuto studiu jsou postupně podrobovány alkaloidy morfinového typu z máku a není vyloučeno, že u nich budou nalezeny další zajímavé účinky.

## **7 LITERATURA**

1. Lincová, D., Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, str. 144, Galén, 2. vyd., Praha 2007.
2. Jiráček, R., Obenberger, J., Preiss, M.: *Alzheimerova choroba*. Maxdorf, Praha 1998.
3. [www.ordinace.cz](http://www.ordinace.cz), staženo 31. března 2010.
4. Koulík, F., Jiráček, R.: *Alzheimerove nemoc a další demence*. 1. vyd. Grada Publ., Praha 1998.
5. Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A.: *Atlas farmakologie*, s. 184, Grada Publ., 1. vyd., Praha 1994.
6. Marek, J. a kol.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, s. 641, Grada Publ., 3. vyd., Praha 2005.
7. Perry, T.L., Hansen, S., Kloster, M.: Huntigton's chorea: deficiency of gamma aminobutyric acid in brain. *New Engl. J. Med.*, 288, 337–342, 1973.
8. Rektorová, I., Rektor, I. a kol.: *Centrální poruchy hybnosti v praxi*, s. 21–70, Triton 2003.
9. Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. et al.: Huntigtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*. 95, 55–66, 1998.
10. Spokes E. G. S.: Neurochemical alterations in Huntigton's chorea. A study of post mortem brain tissue. *Brain*. 103, 179–210, 1980.
11. <http://www.genscan.com/cz/alzheimerova-choroba-i>, staženo 31. března 2010.
12. Jiráček, R.: Farmakoterapie demencí. *Prakt. lékařství*. 4 (6), 286–290, 2008.
13. <http://www.genscan.com/cz/alzheimerova-choroba-ii>, staženo 1. dubna 2010.
14. Jiráček, R.: Kongitivní farmakoterapie Alzheimerovy choroby: současný stav a vyhlídky do blízké budoucnosti. *Farmakoterapie*. 6, 604–609, 2005.

15. Tilšer, I.: Léčba demencí (antidemecia, kognitiva) 2008. Přednášky z farmakologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 1. 10. 2008.
16. [www.zbynekmlcoch.cz/new/inc\\_medic/amyloidni\\_protein.doc](http://www.zbynekmlcoch.cz/new/inc_medic/amyloidni_protein.doc), staženo 2. dubna 2010.
17. Jiráček, R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. Klinická farmakologie a farmacie. 18, 212–214, 2004.
18. Jiráček, R.: Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. Neurologie pro praxi. 2, 101–105, 2004.
19. Patočka, J.: Semagacestat- nová cesta v terapii Alzheimerovy nemoci. Psychiatrie. 13(1), 15–17, 2009.
20. Cibíčková, L., Palička, V.: Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E- nové souvislosti. Klin. Biochem. Metab. 13(34), 127–130, 2005.
21. Patočka, J.: Jak může toxikologický výzkum mravenců nebo žab prospět psychiatrii? Psychiatrie, 4(4), 2000.
22. Bremner, P., Heindrich, M.: Natural products and their as inhibitors of the role proinflammatory transcription factor NF- $\kappa$ B. Phytochemistry review. 4, 27–37, 2005.
23. Opletal, L., Opletalová, V.: Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu; Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv; Brno 12–14.9. 2005, 26, 2005.
24. Chung, Y. K., Heo, H. J., Kim, E. K., H. K., Huh, T. L., Lim, Y ., Kim, S. K., Shin, D. H.: Inhibitory effect of Artemisia asiatica alkaloids on acetylcholinesterase activity from rat PC12 cells. Mol Cell. 10, 253–262, 2000.
25. Perry, E. K., A. T., Wang, W. W., J. Houghton, P., Perry, N.S.L.: Medicinal Plants and Alzheimer's Disease: Ethnobotany to Phytotherapy. J. Pharm. Pharmacol. 51, 527-534, 1999.



26. Camps, P., Cusack, B., Mallender, W.D., Rachid el Achab, Morral, J., Muñoz-Torrero, D., Rosenberry, T.L.: Huprine X is a Novel High-Affinity Inhibitor of Acetylcholinesterase That Is of Interest for Treatment of Alzheimer's Disease. *Mol. Pharmacol.* 57, 409–417, 2000.
27. Chung, Y. K., Heo, H. J., Kim, E. K., H. K., Huh, T. L., Lim, Y. ., Kim, S. K., Shin, D. H.: Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L on the acetylcholinesterase. *Mol Cell.* 11, 137–143, 2001.
28. Hohmann, J., Zupkó, I., Rédei, D., Csányi, M., Falkay, G., Máthé, I., Janicsák, G.: Protective Effects of the Aerial Parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Levandula angustifolia* and their Constituents against Enzyme-Dependent and Enzyme-Independent Lipid Peroxidation. *Planta Med.* 65, 576–578, 1999.
29. Wake, G., Court, J., Pickering, A., Lewis, R., Perry, E.: CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J. Ethnopharmacol.* 69, 105–144, 2000.
30. Pydychová, E.: Alzheimerova nemoc. *Solutio* 2000/2003, 21–28, 2002.
31. Blaschek, W., Ebel, S., Hilgenfeldt, U., Holzgrabe, U., Reichling, J., Schulz, V.: *Papaver*. *HagerRom 2008. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. 1, 2, 8–29, Stuttgart 2008.
32. [http://en.wikipedia.org/wiki/Papaver\\_Somniferum](http://en.wikipedia.org/wiki/Papaver_Somniferum), staženo 11.dubna 2010.
33. <http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/PlantFamily.asp?id=55>, staženo 11.dubna 2010.
34. Jahodář, L.: *Farmakobotanika – semenné rostliny*, Karolinum, Praha 2006.
35. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. Grada Publ., 15. vyd. Praha 2004.
36. Fendrich, Z. a kol.: *Farmakologie pro farmaceuty III.*, Karolinum, Praha 2007.

37. Aurousseau, M., Navarro, J.: Comparative acute toxicity of some alkaloids derived from opium. *Pharm. Franc.* 15, 640–653, 1957.
38. Heffez, D. S.; Leong, Kam W.: Sustained release of papaverine for the treatment of cerebral vasospasm: in vitro evaluation of release kinetics and biological activity. *Neurosurgery.* 77(5), 783–787, 1992.
39. Whiteley, C. G., Daya S.: Protein ligand interactions. Part 5: Isoquinoline alkaloids as inhibitors of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*. *J. Enzyme inhibition* 9(4), 285-294, 1995.
40. Sovová, M.: *Vybrané kapitoly z produkce léčivých rostlin*. SPN, Praha 1990.
41. Bajgar, J.: Stanovení aktivity cholinesteráz v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské zdravotní listy* XLI, 78–80, 1972.
42. Stahl, E.: *Thin-layer Chromatography, A Laboratory Handbook*: Springer Verlag Berlin, Heidelberg, s. 873, New York 1969.
43. *Československý lékopis*. Svazek I. Avicenum, vyd. 4., Praha 1987.
44. List of Pharmaceutical Substances 16th edition (T-Tril) AB DATA, Pharma-Daten-Service, Werke und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker mbH, Eschborn/Taunus 2009.
45. Szegi, J., Rausch, J., Magda, J., Nagy, J.: Relation between the chemical structure and pharmacological activity of the opium alkaloids. *Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae.* 16, 325–335, 1959.
46. Waclawski, E. R., Aldridge, R.: Occupation dermatitis from thebaine and codeine. *Contact dermatitis.* 33(1), 51, 1995.
47. Carrol, R. J., Leisch, H., Hudlicky, T., Cox, D. P.: Conversion of thebain to morphine derivatives. *PCT Int. Appl. Publ.*, 2009.

48. Carrol, R. J., Leisch, H., Hudlicky, T.: Conversion of thebain to morphine derivatives. PAT Appl. Publ., 2009.
49. Rokach, Z. S.: Extraction of thebaine with organic solvents and its dependence on pH. *Farmatsevtichnii Zhurnal*, 20(4), 55–58, Kiev 1965.
50. Chandra, P., Srivastava, D. K., Srivastava, H. K.: Recovery of thebaine waste product of opium. *J. of Scientific & Industrial Research*. 57(2), 84–87, 1998.
51. Fist, A. J.: *Papaver somniferum* mutants with high concentration of thebain. PCT Int. Appl., Publ., 2009.
52. Ryan, J.: Tasmanian Alkaloids – value adding in Tasmania. *Chemistry in Australia*. 68(9), 31, 2001.
53. Tolstikov, G. A., Tolstikova, T. G., Shultz, E. E., Mukhametyanova, T. S., Popov, V. G., Davydova, V. A., Lazareva, D. N., Zarudi, F. S., Spirikhin, L. V. et al.: Synthesis and biologic activity of new thebaine derivatives. *Khimiho-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 26(11-12), 39–45, 1992.
54. French, C. E., Hailes, A. M., Rathbone, D. A., Bruce, N. C.: Morphinone reductase: characterization, cloning and application to biocatalytic hydromorphone production. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779 (Enzyme Engineering XIII), 97–101, 1996.
55. Angrist, B., Gerson, S.: Behavioral profile of a potent new psychotoxic compound. *Psychopharmacol.* 30(2), 109-116, 1973.
56. Berenyi, S., Csutoras, C., Sipos, A.: Recent developments in the chemistry of thebain and its transformation products as pharmacological targets. *Current Med. Chem.*, 16(25), 3215–3242, 2009.

57. Tolstikova, T. G., Bolkunov, A. V., Morozova, E. A., Tolstikov, S. E.: Thebaine as a precursor of opioid analgesics. *Khimiya v Interesakh Ustochivogo Razvitiya*. 17(2), 115-133, 2009.
58. Brooks-Korn, H.: Use of opioid compound to treat a neurologic a neurogenic disorder. *PCT Int. App. Publ.*, 2003.

## **8 ABSTRAKT**

Filáková, I.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XVI. Alkaloidy *Papaver somniferum* L. a jejich účinek na acetylcholinesterasu. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2010, 63 s.

V rámci studia rostlin s obsahem alkaloidů, které inhibují aktivitu lidské erytrocytární acetylcholinesterasy a sérové butyrylcholinesterasy, byl sledován Mák setý (*Papaver somniferum* L.).

K izolaci bylo použito 30 kg makoviny. Primární extrakt byl připraven perkolací 95% EtOH. Z tohoto extraktu byly sekvenčním postupem připraveny výtřepky jednotlivých typů alkaloidů.

V této diplomové práci byl zpracován výtřepok A-Et<sub>2</sub>O. Alkaloidy tohoto výtřepku byly rozděleny na baze, jejichž chloridy jsou rozpustné i nerozpustné v chloroformu. Z každé uvedené frakce byly dále získány alkaloidy fenolické a nefenolické.

Práce spočívala v dělení alkaloidů výtřepku AC<sub>1</sub> (chloridy rozpustné v CHCl<sub>3</sub>, nefenolické), z této směsi byl pomocí sloupcové chromatografie na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, preparativní TLC izolován thebain, látka byla předběžně identifikována na základě hmotnostního spektra, teploty tání, optické otáčivosti a srovnáním se standardem.

Při sledování vlivu thebainu na lidskou AChE a BuChE a následném matematickém výpočtu byla pro thebain stanovena hodnota IC<sub>50</sub> 186,5 pro AChE a IC<sub>50</sub> 941,1 pro BuChE.

Klíčová slova: *Papaver somniferum*, thebain, alkaloidy, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa.

Filáková, I.: Biological activity of plant metabolites XVI. Alkaloids of *Papaver somniferum* L. and their activity to acetylcholinesterase. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2010, 63 p.

Within the screening of plants containing alkaloids potentially inhibiting human erythrocytic AChE and human butyrylcholinesterase was studied poppy (*Papaver somniferum* L)

It was used 30 kg of poppy straw, basic extract was prepared by extraction of 95% alcohol. From this primary extract were prepared extracts with individual types of alkaloids by sequent procedue.

In this diploma thesis only one extract was processed (extract type A-ether, pH 9 – 10). Alkaloids from this extract were separated into bases, where its chlorides are soluble and insoluble in chloroform. From each of above mentioned fractions phenolic and non-phenolic alkaloids has been obtained.

In this work were separated alkaloids from extact AC<sub>1</sub> (chlorides soluble in chloroform, non-phenolic. From this mixture was isolated thebain by the using of column chromatogamy on alumina and preparative TLC on silica. This compound has been preliminary identified according to data of MS, melting point, optical rotary and by comparison with standard substance.

It has been found following results of biologiccal test on human AChE and BuChE: IC<sub>50</sub> 186,5 and 941,1.

Keywords: *Papaver somniferum*, thebaine, alkaloids, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.