

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

---

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Neurotropní a antioxidační aktivita vybraných druhů  
jednoděložných alkaloidních rostlin. IV.**

**Neurotropic and antioxidative activity of some selected species  
of monocotyledonous alkaloidal plants *in vitro* IV.**

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

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

Hradec Králové, 2013

Václav Hrstka

# PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové 2013

.....  
Podpis

Děkuji grantům SVV UK 265 002, FRVŠ 664/2011 a FRVŠ 190/2012 za finanční podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

Rád bych na tomto místě velice poděkoval Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za podporu, odbornou pomoc při interpretaci MS spekter a tvorbě této diplomové práce, poskytnuté materiály a cenné rady a připomínky při praktických úkolech. Dále tímto děkuji Ing. Kateřině Macákové, Ph.D. za změření biologických aktivit alkaloidních extraktů a PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za změření GC/MS spekter s chemickou ionizací. Mé poděkování patří také Mgr. Zdeňku Novákovi z katedry anorganické a organické chemie za změření a interpretaci NMR spekter. V neposlední řadě také děkuji celé katedře farmaceutické botaniky a ekologie za příjemné pracovní prostředí a kolegiální.

1	ÚVOD .....	6
2	CÍL PRÁCE .....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	11
3.1	Alzheimerova choroba (AD).....	12
3.1.1	Klinický obraz.....	12
3.1.2	Pathofyziologie Alzheimerovy choroby .....	13
3.1.2.1	Amyloidová teorie .....	13
3.1.2.2	Cholinergní systém .....	14
3.1.2.3	Glutamátergní systém .....	15
3.1.3	Léčba AD.....	15
3.1.3.1	Inhibitory lidských esteráz .....	15
3.1.3.2	Antagonisté NMDA receptorů .....	17
3.1.3.3	Přírodní látky potenciálně využitelné k léčbě či prevenci AD.....	19
3.2	Čeleď <i>Amaryllidaceae</i> .....	20
3.2.1	Taxonomické řazení a klasifikace.....	20
3.2.2	Biosyntéza alkaloidů .....	21
3.2.3	Rod <i>Narcissus</i> .....	22
3.2.3.1	Vybrané alkaloidy rodu <i>Narcissus</i> .....	24
3.2.3.2	<i>Narcissus broussonetii</i> .....	26
3.2.3.3	<i>Narcissus serotinus</i> .....	28
3.2.3.4	<i>Narcissus angustifolius subsp. transcarpaticus</i> .....	29
3.2.3.5	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> cv. CARDILA.....	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	32
4.1	Všeobecné postupy .....	33
4.1.1	Destilace a odpařování .....	33
4.1.2	Preparativní tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	33
4.1.3	Materiál a vybavení .....	33
4.1.3.1	Rozpouštědla .....	33
4.1.3.2	Chemikálie .....	33
4.2	Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza.....	33
4.2.1	Biologický materiál .....	33
4.2.2	Příprava ethanolických a alkaloidních extraktů .....	34
4.2.3	GC/MS analýza a identifikace alkaloidů .....	34

4.3	Izolace a identifikace homolykorinu z rostliny <i>Narcissus</i> Sir. W. Churchilli.....	35
4.3.1	GC/MS analýza s využitím chemické ionizace .....	35
4.3.2	NMR analýza.....	35
4.3.3	Měření optické otáčivosti .....	36
4.4	Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů a čistých alkaloidů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE .....	36
4.4.1	Chemikálie a materiál použité pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity 36	
4.4.1.1	Chemikálie .....	36
4.4.1.2	Materiál .....	36
4.4.2	Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity.....	36
4.4.3	Podmínky měření .....	36
4.4.4	Příprava erythrocytárních pouzder.....	37
4.4.5	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC <sub>50</sub> ).....	37
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
5.1	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus poeticus</i> var. <i>recurvus</i> a jeho GC/MS analýza .....	39
5.2	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus</i> Dutch Master a jeho GC/MS analýza .....	43
5.3	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus</i> Sir. W. Churchilli a jeho GC/MS analýza .....	46
5.4	Strukturní analýza homolykorinu .....	47
5.4.1	NMR analýza homolykorinu.....	47
5.5	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus</i> Jack Snipe a jeho GC/MS analýza .....	51
5.6	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus</i> Katie Heath a jeho GC/MS analýza .....	54
5.7	Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny <i>Narcissus</i> Flower Record a jeho GC/MS analýza .....	56
6	ZÁVĚR.....	59
7	LITERATURA.....	61
8	SEZNAM ZKRATEK .....	68

# 1 ÚVOD

Od nepaměti jsou přírodní látky, rostliny, využívány při potížích a nemocech nejrůznějšího charakteru. Přestože v dávných dobách nebylo takové povědomí o tom, co a jak v rostlinách pomáhá, nebo naopak ubližuje, lidová empirie umožnila postupný vývoj cestou k poznání účinných rostlin a přípravků z nich připravovaných, z nichž mnoho můžeme dodnes potkávat v lidové medicíně. S postupným vývojem společnosti a zvyšováním úrovně vzdělání a dostupných technologií se začalo zjišťovat, co je zdrojem léčivých vlastností rostlin, a tak byly postupně objevovány obsahové látky, jejich biologické vlastnosti, izolace a systematická identifikace a klasifikace.

Zajímavou a významnou obsahovou skupinou látek rostlin jsou alkaloidy. Tyto tzv. sekundární metabolity vytváří početná část veškerých rostlin na Zemi. Důvody, pro které tyto látky rostliny vytvářejí, dosud nejsou zcela objasněny, a zůstávají tedy předmětem spekulací a dohadů. Jedním z obecně uznávaných názorů je jejich využití jakožto obranných látek, neboť se jedná převážně o látky toxické. Možností je také jejich participace na rostlinném metabolismu. Strukturně se jedná o heterocyklické sloučeniny obsahující ve své molekule atom dusíku. S výjimkou tzv. pseudoalkaloidů, které se tvoří jinými specifickými cestami, mají alkaloidy svůj původ v aminokyselinách. Spektrum alkaloidů je velmi pestré a mění se napříč všemi druhy. Jejich obsah v rostlinách v průběhu vegetace kolísá a obvykle nejnižší je v době kvetení. Na člověka mají vliv již ve velmi malých koncentracích, kdy se využívají v terapii různých onemocnění<sup>1,2</sup>. Ve větších koncentracích jsou pro lidi toxické, a to až smrtelně.

Čeled' *Amaryllidaceae* je rozšířena především v tropických oblastech a doposud je známo přibližně 500 struktur různých alkaloidů s vícerymi farmakologickými účinky. Z nich můžeme jmenovat například antiparazitické, antitumorální, antivirotické nebo inhibice cholinesteráz<sup>3</sup>. Právě inhibice acetylcholinesterázy je v současné době jedním z hlavních léčebných postupů při léčbě Alzheimerovy choroby (AD). V současnosti je na trhu dostupná jedna přírodní látka registrovaná jako léčivo při AD, a to galanthamin, který je účinným selektivním inhibitorem acetylcholinesterázy (AChE)<sup>4</sup>. V pozdějších stádiích této nemoci zvyšuje svou roli v patogenezi enzym butyrylcholinesteráza (BuChE). Právě tento fakt ukazuje na potřebu hledat nejen další efektivní inhibitory AChE, ale i BuChE.

Jak již z výše uvedeného vyplývá, mají přírodní látky, a v našem konkrétním případě právě alkaloidy, velký potenciál především v léčbě některých chorob. Tato

práce je zaměřená právě na látky přírodní a její náplní byla příprava sumárních ethanolových a alkaloidních extraktů vybraných zástupců rodu *Narcissus*, stanovení jejich inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE a GC/MS analýza alkaloidů za účelem vytipování vhodných druhů k dalším podrobnějším studiím.



## **2 CÍL PRÁCE**

Cíle diplomové práce:

1. Příprava alkaloidních extraktů vybraných zástupců rodu *Narcissus*.
2. Příprava vzorků pro biologické testování.
3. GC/MS analýza alkaloidních extraktů.
4. Stanovení inhibiční aktivity alkaloidního extraktu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesteráze a sérové butyrylcholinesteráze.
5. Vyhodnocení a vytipování vhodných zástupců rodu *Narcissus* k dalším fytochemickým studiím na základě jejich inhibičních aktivit a alkaloidního spektra.

## **3 TEORETICKÁ ČÁST**

### **3.1 Alzheimerova choroba (AD)**

Je neurodegenerativní onemocnění, též zvané Alzheimerova demence, postihující převážně starší populaci. Odhaduje se, že až 50% všech demencí v České republice (ČR) je právě Alzheimerova choroba.

Přesná etiologie této choroby není dosud známa, třebaže je popsáno několik pathofyziologických mechanismů doprovázejících průběh nemoci. Mezi hlavní patologické procesy patří nefyziologická tvorba beta-amyloidu ( $A\beta$ ) s toxickým působením na neurální tkáň. Dalším velmi důležitým projevem je narušení cholinergního systému a hyperaktivita glutamátergního systému. Jednotlivé patologické procesy jsou detailněji popsány dále<sup>5</sup>.

#### **3.1.1 Klinický obraz**

Alzheimerovu chorobu klasifikujeme do tří základních stádií.

##### *1. Stádium (mírná forma)*

Počáteční stádium AD je nesnadné rozpoznat. Postižený nejprve začíná opakovaně zapomínat jednoduché úkoly, je postížena krátkodobá paměť a postupně se mění osobnost nemocného. Emoční a memorické poruchy jsou rozpoznány nejdříve. Pacient se postupně začíná izolovat a straní se širšího společenského života. Dále dochází k sociopatologickým změnám v chování jako jsou iracionální agresivita či deprese.

##### *2. Stádium (středně těžká forma)*

Toto stádium choroby se projevuje horší schopností nemocného postarat se o své vlastní denní potřeby. Začíná být stále více odkázán na pomoc druhé osoby, což je schopen si uvědomovat, a tento fakt často prohlubuje depresivní a další negativní vlivy na psychiku pacienta. Nejprve postižená krátkodobá paměť se stále zhoršuje a začíná se projevovat i porucha paměti dlouhodobé.

##### *3. Stádium (těžká forma)*

V konečné fázi AD je osobnost takto postiženého člověka často roztržštěna. Návaly depresí i agresivity se projevují často nahodile a ve vysokých frekvencích. Paměťové funkce jsou zdevastovány, postižený nepoznává své příbuzné a není schopen se orientovat v čase a prostoru. Není schopen plnit základní potřeby denního života. Na

denním pořádku je inkontinence moči i stolice. Nemocný je zcela odkázán na pomoc druhé osoby. Konečným stádiem je smrt<sup>6,7</sup>.

### **3.1.2 Pathofyziologie Alzheimerovy choroby**

Jak již bylo výše nastíněno, hlavními pathologicko-fyzikálními procesy doprovázející Alzheimerovu chorobu jsou tzv. amyloidová teorie a poruchy neurotransmise zahrnující postižení cholinergního a glutamatergního systému. Je nasnadě, že oba procesy jsou vzájemně provázané.

#### **3.1.2.1 Amyloidová teorie**

Amyloidová teorie vychází ze vzniku tzv. Alzheimerova plaku (někdy též uváděno senilní plaky). Ten se hromadí kaskádou biochemických procesů, na jejímž začátku je transmembránový protein zvaný amyloidový prekurzorový protein (APP). Za normálních okolností je tento protein rozkládán enzymem  $\alpha$ -sekretázou na krátké sekvence aminokyselin (AMK). Tyto oligopeptidy jsou solubilní a mají svou fyziologickou funkci, která není zatím přesně popsána. Předpokládá se, že jsou tyto krátké úseky využity při tvorbě nových dendritických trnů a synapsí, a tím důležité při ukládání paměťových stop. V případě postižení AD jsou ovšem ve větší aktivitě enzymy  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy, které štěpí APP na delší sekvence AMK. Ty poté oligomerují a jsou velice toxické již samy o sobě. Tyto oligomery dále koagulují a polymerují v intercelulárních prostorách na toxický beta-amyloid ( $A\beta$ ). Výsledkem hromadění  $A\beta$  a neurodegenerativních produktů jsou výše zmíněné Alzheimerovy plaky. Tyto plaky jsou podnětem k uvolnění mediátorů zánětu; interleukinů, prozánětlivých cytokinů a aktivaci cyklooxygenáz. Neurony postupně podléhají apoptóze a hromadění těchto produktů zvyšuje počet Alzheimerových plaků (AP). Množství AP je významným patologickým ukazatelem rozšíření tohoto onemocnění<sup>5</sup>.

Následkem toxického působení oligomerních fragmentů  $A\beta$  je také degradace intraneuronálního proteinu tau ( $\tau$ ). Dochází k jeho hyperfosforylaci a postižená neuronová vlákna polymerují a tvoří postupně tzv. párově neurofibrilární tangles (uzlíčky, košíčky). Postižené neurony podléhají apoptóze. Tuto kaskádu pravděpodobně spouští právě toxické oligomery  $A\beta$ <sup>5</sup>.

### **3.1.2.2 Cholinerní systém**

Porucha cholinerního systému je popisována sníženou aktivitou cholinacetyltransferázy, která produkuje lidský acetylcholin (ACh) z cholinu a acetylkoenzymu A. Dále omezením zpětného vychytávání ACh ze synaptické štěrbině a konečně zvýšením aktivity lidské butyrylcholinesterázy (HuBuChE), která odbourává také lidský acetylcholin. Lidský acetylcholin je důležitý neuromediátor a jeho zvýšený nedostatek způsobený postižením cholinerního systému se projevuje mj. sníženou tvorbou krátkodobých paměťových stop. AChE existuje ve třech globulárních formách obsahující jednu, dvě nebo čtyři katalytické podjednotky (monomerní G1, dimerní G2 a tetramerní G4). G1 AChE existuje výhradně jako rozpustná entita, zatímco G4 AChE existuje jak v rozpustné tak v membránově vázané formě. V lidském mozku se AChE vyskytuje v G1 a G4 formě<sup>8</sup>, přičemž se jejich poměr v různých oblastech mozku liší<sup>9</sup>. V mozku pacientů s AD je v některých oblastech hladina membránově vázané G4 formy selektivně snížena až o 90%. Butyrylcholinesteráza (BuChE) existuje v mozku také ve dvou molekulárních formách, ale ve zdravém mozku je výhradně forma G4. G1 isoforma BuChE vykazuje v průběhu AD 30–60% zvýšení, zatímco hladina G4 formy klesá, nebo zůstává stejná jako ve zdravém mozku. Bylo prokázáno, že účinnost inhibice cholinesteráz jednotlivými typy iChE je v různých oblastech mozku významně odlišná v důsledku rozdílné selektivity vůči molekulárním isoformám. Tyto odlišnosti v účinnosti inhibice lze také pozorovat u pacienta s AD a bez AD<sup>10</sup>. V lidském mozku se BuChE nachází v neuronech, gliových buňkách, stejně tak v neuritovém plaku a tangles u pacientů s AD. Lidská acetylcholinesteráza (HuAChE) je predominantní u zdravých jedinců, HuBuChE hraje pravděpodobně pouze určitou minoritní roli v regulaci hladiny mozkového acetylcholinu. Zatímco aktivita HuBuChE v případě pacientů postižených AD roste, aktivita HuAChE se nemění, nebo dokonce klesá<sup>8,10</sup>.

### **3.1.2.3 Glutamátergní systém**

K postižení glutamátergního systému dochází nadměrným uvolněním glutamátu a dalších excitačních aminokyselin v nejpostiženějších korových oblastech. Dochází ke sníženému zpětnému vychytávání glutamátu, který se tak nadměrně váže na receptory typu NMDA (*N*-Methyl-*D*-aspartátový receptor). Důsledkem je otevření kalciových kanálů, zvýšení vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do neuronů, aktivace proteinkináz a fosfatáz a následná kaskáda dějů končících neuronální apoptózou. Navíc NMDA-receptory realizují jeden ze základních dějů učení – dlouhodobou potenciaci; tento mechanismus je hyperexcitací NMDA-receptorů porušen<sup>5</sup>.

### **3.1.3 Léčba AD**

Jelikož stále neznáme přesnou etiopathofyziologii tohoto onemocnění, není léčba kauzální, ale i nadále modifikující s cílem zpomalit progresi a prodloužit lehká počáteční stádia choroby.

V současné době se registrovaná léčiva AD dělí do dvou základních skupin. Jsou to inhibitory lidských esteráz (rivastigmin, donepezil a galanthamin) a mírný antagonist NMDA receptorů, memantin.

#### **3.1.3.1 Inhibitory lidských esteráz**

Jsou též nazývány kognitiva. Inhibicí AChE a BuChE dochází k vyšší nabídce Ach v synaptických štěrbinách a tím podpoře neurotransmise. Inhibice cholinesteráz snižuje tvorbu i toxicitu beta-amyloidu, a zasahuje tak do neurodegenerativních mechanismů AD. Tato léčiva jsou indikována jak v počátečních stádiích, tak v kombinaci s memantinem ve stádiích těžkých<sup>5</sup>. V ČR toho času jsou tato léčiva hrazená zdravotními pojišťovnami v případě výsledku MMSE (mini-mental state examination) testu v rozmezí 25 – 13 bodů<sup>11</sup>. MMSE je psychologický test pro určení střední a těžké demence. Pacient je podroben vyšetření v 5 základních oblastech (řeč, paměť, pozornost, rozsah pozornosti a počítání, orientace). V každé oblasti je náležitě bodově ohodnocen. S klesajícím bodovým výsledkem je diagnostikován těžší stupeň demence<sup>7</sup>.

Struktury níže uvedených inhibitorů jsou zobrazeny na Obr. 1.

#### Rivastigmin (Evertas<sup>®</sup>, Nimvastid<sup>®</sup>, Rivastigmin Orion<sup>®</sup>)

Jedná se o karbamátový derivát s inhibičním působením na obě cholinesterázy (AChE i BuChE). Navíc také zvyšuje obsah cholinacetyltransferázy syntetizující v cholinergních neuronech acetylcholin. Je vysoce specifický vůči monomerní formě acetylcholinesteráz G1 a allostericky moduluje nikotinové receptory. Rivastigmin je určen kromě léčby AD také k terapii demence u Parkinsonovy choroby.

#### Donepezil (Adonep<sup>®</sup>, Alzil<sup>®</sup>, Aricept<sup>®</sup>)

Donepezil je piperidinový derivát se selektivním reversibilním inhibičním účinkem na HuAChE. HuBuChE ovlivňuje minimálně. Má dlouhý biologický poločas, díky kterému může být podáván 1 x denně a je dobře snášen. Používá se také při demencích jiného než Alzheimerova typu<sup>5,12</sup>.

#### Galanthamin (Galanthamin Jenson<sup>®</sup>, Galanthamin Mylan<sup>®</sup>)

Alkaloid izolovaný z některých druhů čeledi *Amaryllidaceae*, kde se nachází v hojném množství. Působí inhibičně na AChE a dále allostericky moduluje pre- i postsynaptické nikotinové receptory. Jedná se o reverzibilní selektivní inhibitor AChE s výraznou selektivní inhibiční aktivitou k AChE oproti BuChE. Výsledkem je vyšší uvolňování acetylcholinu z presynaptických zakončení a také do určité míry zabránění desenzitizace postsynaptických muskarinových receptorů. Aktivace presynaptických nikotinových receptorů dále uvolňuje glutamát, serotonin a  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu (GABA). Následkem zvýšeného uvolnění těchto mediátorů jsou lepší účinky na paměť, učení a emoční labilitu. S cholinergním působením galanthaminu jsou spojeny také jeho nejčastější nežádoucí účinky, mezi které patří nevolnost, zvracení, neklid a poruchy spánku. Dále byla častěji zaznamenána ztráta chuti k jídlu. Strukturálně je galanthamin podobný kodeinu, ale bez analgetických účinků, ovšem metabolizován je stejnou biochemickou cestou. Byly zkoumány deriváty této látky a jejich vztah k inhibiční aktivitě vůči AChE, průniku do centrální nervové soustavy (CNS) a toxicitě. Některé projevily významný vzrůst inhibiční aktivity nebo snadnější průnik hematoencefalickou bariérou (HEB) snížením polarity<sup>4</sup>.



### Huperzin A

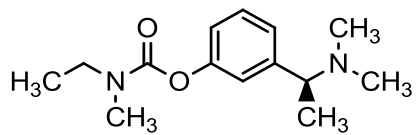
V současné době v ČR nepoužívaný seskviterpenový alkaloid Huperzin A (Obr. 2.) poprvé získaný z rostliny *Huperzia serrata* Trevis z čeledi *Lycopodiaceae* je také významným reverzibilním inhibítorem AChE. V současné době je používán v Číně. V dalších zemích je předmětem klinických studií, kde je intenzivně studován. Zvyšuje hladinu ACh v synapsích, zlepšuje paměť, kognitivní funkce a schopnosti každodenních potřeb u pacientů s diagnostikovanou AD. Dále zvyšuje uvolňování  $\alpha$ -sekretázou štěpených fragmentů APP, což snižuje riziko vzniku Alzheimerových plaků (viz výše). Huperzin A působí protektivně také zvýšením antioxidační účinnosti některých enzymů, například glutation-peroxid-reduktázy či snížením hladiny peroxidovaných lipidů<sup>13</sup>. Oproti donepezilu a rivastigminu má Huperzin A delší působení a oproti dalším v současnosti používaným inhibitorům AChE také rychlejší vstup HEB a lepší biologickou dostupnost při perorálním podání. Předmětem dalších výzkumů jsou i deriváty tohoto alkaloidu s vídí dalšího zlepšení jeho účinků<sup>14</sup>.

Inhibitory lidských cholinesteráz jsou stále významnými léčivými modifikujícími AD. V současnosti jsou hledány látky s inhibičním účinkem jak vůči AChE tak i BuChE, jelikož BuChE se ukazuje jako nový a významný cíl v terapii AD.

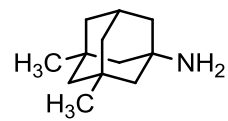
#### **3.1.3.2 Antagonisté NMDA receptorů**

##### Memantin (Ebixa®)

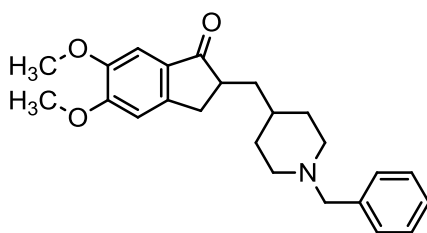
Memantin (Obr. 1.) se s vyšší afinitou než  $Mg^{2+}$  ionty váže na NMDA receptory a inhibuje tak delší příliv  $Ca^{2+}$  iontů, který způsobuje vlastní cytotoxicitu a poškození buněk. Určitá stimulace NMDA receptorů je mj. důležitá pro ukládání dlouhodobé paměti. Hypersenzitivita těchto receptorů ovšem tento důležitý děj potlačuje. Memantin neblokuje glutamátergní neurotransmisi zcela, ale pouze částečně, čímž se snižuje nebezpečí poškození dlouhodobé paměti<sup>5</sup>. Memantin je u nás indikován u těžkých forem AD u pacientů s MMSE nižším než 19 bodů<sup>11</sup>.



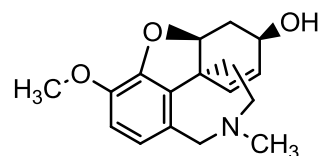
Rivastigmin



Memantin

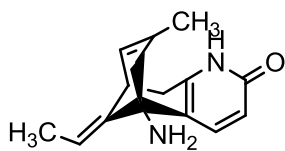


Donepezil

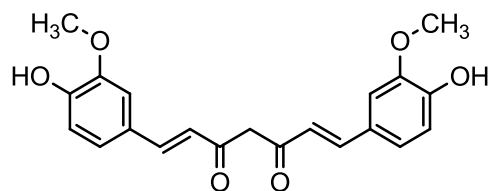


Galanthamin

**Obr. 1.** Struktury látek v současné době používaných k léčbě AD



Huperzin A



kurkumin

**Obr. 2.** Přírodní látky s potenciálem v léčbě AD v současnosti v ČR nepoužívané

### 3.1.3.3 Přírodní látky potenciálně využitelné k léčbě či prevenci AD

Vzhledem k zaměření diplomové práce bych se na tomto místě rád zaměřil na další přírodní látky potenciálně využitelné při léčbě AD, jež jsou v současnosti ve fázi výzkumu.

#### Kurkumin

Kurkumin (Obr. 2.) je hlavním zástupcem tzv. kurkuminoidů, přírodních fenolů obsažených v druhu *Curcuma longa* (v ČR známá jako kurkuma) z čeledi *Zingiberaceae*. Ve světě je známý jako součást indického koření kari, kterému dodává jeho typické žluté zabarvení<sup>15</sup>. Studie prokázaly antioxidační efekt kurkuminu dokonce silnější než tokoferol  $\alpha$ <sup>16</sup>. Dále byl prokázán efekt protizánětlivý způsobený inhibicí činnosti lipoxygenázy a cyklooxygenázy 2<sup>17</sup> a příznivý účinek proti tvorbě senilních plaků inhibicí formování a prodlužování vláken A $\beta$  z jednotlivých peptidů a jeho destabilizací již v nízkých koncentracích. Tento efekt spolu s protizánětlivými a antioxidačními účinky má dobrý potenciál v léčbě AD<sup>18</sup>.

#### Rutaekarpin

Rutaekarpin je chinazolinokarbolinový alkaloid izolovaný z druhu *Evodia rutaecarpa* z čeledi *Rutaceae*. Prokázal se jako silně působící selektivní inhibitor AChE s vasodilatačními a antitrombotickými účinky. V současné době slouží rutaekarpin jako výchozí struktura pro syntézu derivátů se zvýrazněným AChE inhibičním účinkem<sup>14</sup>.

#### Spektalin a 3-O-Acetylspektalin

V rostlině *Senna spectabilis* z čeledi *Fabaceae* se nachází dva alkaloidy piperidinového typu 3-O-Acetylspektalin a spektalin, které se staly předlohou pro přípravu nových selektivních AChE inhibitorů. Tyto deriváty jsou vysoce CNS selektivní, což minimalizuje jejich negativní působení na vedlejší orgánové systémy<sup>14</sup>.

#### Další zajímavé přírodní látky

Mezi další zkoumané látky lze zařadit isaindigoton izolovaný z kořenů čínské rostliny *Isatis indigotica* (*Brassicaceae*) se selektivní inhibiční aktivitou na BuChE nebo deriváty berberinu, alkaloidu izolovaného z kořenů druhu *Coptis chinensis* z čeledi *Ranunculaceae*, které vykazaly až o 1 řád účinnější aktivitu vůči AChE než galanthamin a na rozdíl od něj vykazují i značnou inhibiční aktivitu na BuChE<sup>14</sup>.

## 3.2 Čeleď *Amaryllidaceae*

### 3.2.1 Taxonomické řazení a klasifikace

Říše:	rostliny ( <i>Plantae</i> )
Podříše:	cévnaté rostliny ( <i>Tracheobionta</i> )
Oddělení:	krytosemenné ( <i>Magnoliophyta</i> )
Třída:	jednoděložné ( <i>Liliopsida</i> )
Řád:	chřestotvaré ( <i>Asparagales</i> )
Čeleď:	amarylkovité ( <i>Amaryllidaceae</i> )

Jedná se o rostliny jednodomé s oboupohlavními květy. Listy jsou uspořádány různě u jednotlivých rodů s rozmanitými tvary čepelí a souběžnou žilnatinou. Květy jsou jednotlivé či v květenstvích, pravidelné nebo nepravidelné a souměrné. Okvěti jsou různorodá a různobarevná.

V čeledi *Amaryllidaceae* je známo přibližně 80 rodů s asi 1600 druhy nacházející se od mírného pásu až po tropy. V ČR se nativně vyskytují pouze 3 rody této čeledi, rod *Narcissus* (narcis), rod *Galanthus* (sněženka) a rod *Leucojum* (bledule). Zástupce každého z uvedených rodů je uveden na obrázku níže (Obr. 3.).



A



B



C

**Obr. 3.** Rostliny čeledi *Amaryllidaceae* vyskytující se v ČR

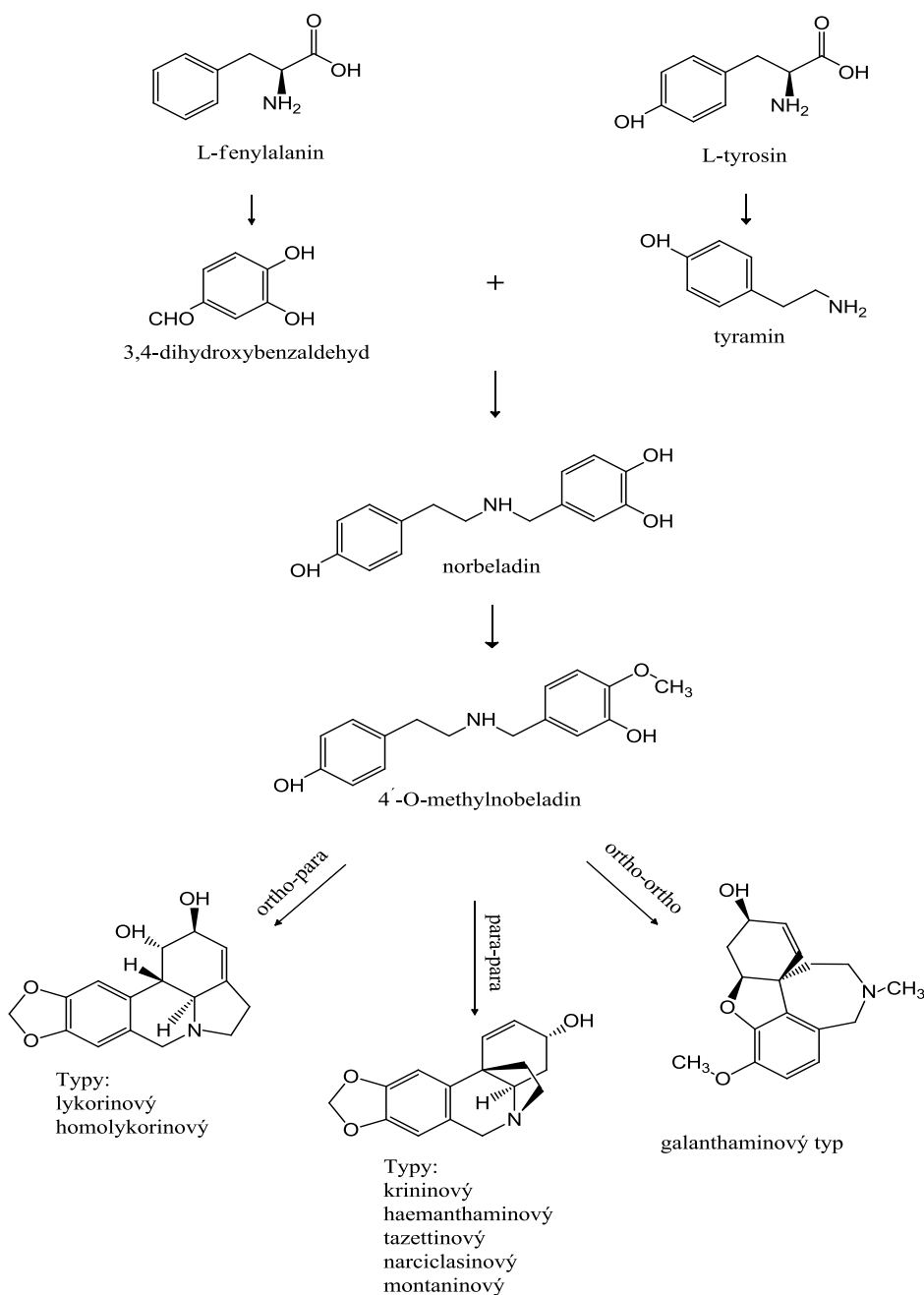
A *Leucojum vernalis* (bledule jarní)<sup>19</sup>

B *Narcissus pseudonarcissus* (narcis žlutý)<sup>20</sup>

C *Galanthus nivalis* (sněženka podsněžník)<sup>21</sup>

### 3.2.2 Biosyntéza alkaloidů

Rostliny čeledi amarylkovité produkují v rámci svého sekundárního metabolismu velmi zajímavou skupinu látek zvanou amarylkovité alkaloidy. Tyto chemicky složité látky mají mnoho zajímavých biologických účinků, mezi které lze jmenovat např. antitumorální, antivirotické, antimalarické nebo inhibiční působení na lidské cholinesterázy<sup>3</sup>. Nejen tyto, ale i další možné účinky těchto alkaloidů jsou stále předmětem mnoha výzkumů. *Amaryllidaceae* alkaloidy se dělí dle strukturních podobností do 8 základních skupin a v současné době je známo již více než 500



**Obr. 4.** Syntéza *Amaryllidaceae* alkaloidů norbelladinovou cestou

izolovaných látek z této čeledi<sup>22</sup>. Schéma obecné norbelladinové syntézy, která je společnou cestou k tvorbě všech osmi základních typů těchto alkaloidů, je znázorněno na předcházejícím obrázku (Obr. 4.). Výchozími látkami jsou L-tyrosin, který se mění na tyramin a L-fenylalanin, jenž prochází změnou na 3,4-Dihydroxybenzaldehyd. Z tyraminu a 3,4-Dihydroxybenzaldehydu po několika reakčních krocích vzniká norbelladin a 4'-O-Methylnorbelladin. Podle způsobu jejich intermolekulárního spojení vzniká 8 základních skeletů.

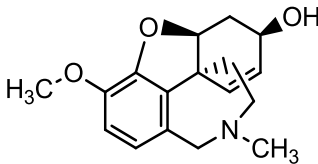
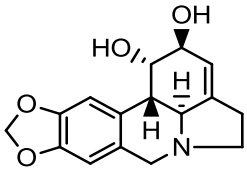
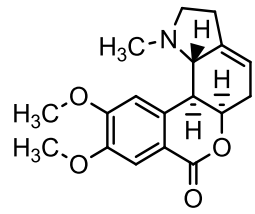
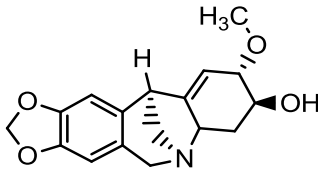
### 3.2.3 Rod *Narcissus*

Rostliny tohoto rodu je možno najít v oblasti středozeří v Evropě, Asii a severní Africe. Na světě je známo 40 – 80 botanických druhů rodu *Narcissus*. Velká rozmanitost ať už kultivovaných nebo divoce rostoucích druhů vedla k rozdělení jednotlivých typů kultivarů do 13 divizí. Mezi obsahové látky narcisů patří mj. šťavelan vápenatý ve formě krystalů. Dříve se věřilo, že tvorba těchto krystalů je nahodilá a spontánní, ovšem nyní převládá názor, že tato tvorba je cíleně řízena za účelem obrany rostliny. Rozpuštěný šťavelan vypouštěný do mízy při poranění rostliny je například příčinou alergických reakcí na kůži po kontaktu s touto tekutinou. U některých živočišných druhů může tato sloučenina narušovat jejich metabolismus vápníku, a tím jej poškodit<sup>23</sup>.

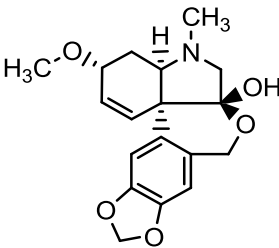
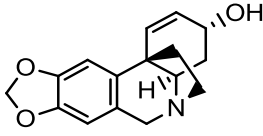
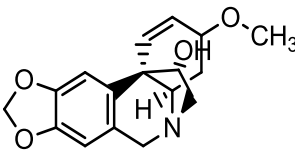
Důležitou obsahovou složkou těchto rostlin jsou specifické alkaloidy tvořené v rámci sekundárního metabolismu. Bylo izolováno a identifikováno již více než 100 jednotlivých alkaloidů. Mezi nejznámější zástupce patří galanthamin a lykorin. Tyto alkaloidy, jejichž obsah v cibulích kolísá mezi 1 až 2% hmotnosti, mají několik farmakologických účinků, které jsou příčinou toxických projevů při požití těchto rostlin. Jednotlivé látky jsou předmětem studia jejich farmakologických účinků, především jejich inhibičního působení na lidské cholinesterázy<sup>23</sup>.

Strukturní typy alkaloidů zastoupené v rodu *Narcissus* shrnuje následující tabulka (Tabulka I).

**Tabulka I**      Strukturní typy *Amaryllidaceae* alkaloidů v rodu *Narcissus*.

Strukturální typ	vzorec	zástupce	výskyt
Galanthaminový		Galanthamin	<i>N. tortifolius</i> <sup>24</sup> <i>N. pseudonarcissus</i> cv. <i>Carlton</i> <sup>25, 26</sup> <i>N. jonquilla</i> <sup>27</sup>
Lykorinový		Lykorin	<i>N. poeticus</i> <sup>28, 29</sup> <i>N. folii</i> <sup>30</sup>
Homolykorinový		Homolykorin	<i>N. broussoneti</i> <sup>31</sup> <i>N. tazetta</i> <sup>3</sup> <i>N. pseudonarcissus</i> cv. <i>Carlton</i> <sup>25</sup>
Montaninový		Pankracin	<i>N. angustifolius</i> subsp. <i>transcarpaticus</i> <sup>32</sup> <i>N. poeticus</i> <sup>33</sup>

**Tabulka I** Pokračování

Strukturní typ	vzorec	zástupce	výskyt
Tazettinový		Tazettin	<i>N. tazetta</i> <sup>34, 35</sup> <i>N. canaliculatus</i> <sup>28</sup> <i>N. tazetta</i> var. <i>chinensis</i> <sup>36</sup>
Krininový		Krinin	<i>N. poeticus</i> var. <i>recurvus</i> <sup>37</sup> <i>N. filifolia</i> <sup>37</sup>
Haemanthaminový		Haemanthamin	<i>N. triandruss</i> cv. <i>thalia</i> <sup>27</sup> <i>N. confusus</i> <sup>38</sup> <i>N. tazetta</i> <sup>26, 28</sup>

### 3.2.3.1 Vybrané alkaloidy rodu *Narcissus*

Nejvýznamnějším alkaloidem izolovaným z rodu *Narcissus* je alkaloid galanthamin užívaný při léčbě Alzheimerovy demence. Galanthamin je v současné době stále získáván hlavně izolací a extrakcí z přírodních zdrojů, neboť přímá syntéza je velmi náročná a nákladná. Poměrně velký obsah tohoto alkaloidu je v druhu *Narcissus confusus* a to 0,1% v čerstvých cibulích.

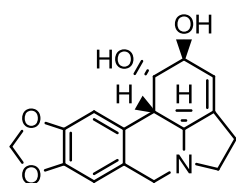
Lykorin (Obr. 5.), hlavní zástupce lykorinového strukturního typu, vykazuje hned několik ve studiích potvrzených biologických účinků. S. Ilavenil, B. Kaleeswaran a S. Ravikumar ve své práci<sup>39</sup> publikovali antioxidační a hepatoprotektivní účinky lykorinu u



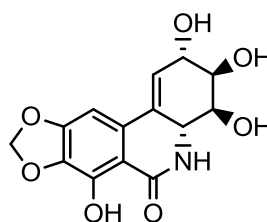
bílých myší, kterým byl pravidelně podáván  $\text{CCl}_4$ , jakožto stresový induktor s hepatotoxickými účinky. Měřenými kritérii byly změny hladin některých enzymů účastnících se antioxidačních mechanismů a produktů oxidačního stresu. Při kontinuálním podávání lykorinu byl zaznamenán signifikantní nárůst oxidačně protektivních enzymů a pokles produktů oxidačního stresu. Byl tedy dokázán hepatoprotektivní účinek lykorinu jakožto vychytávače volných radikálů u těchto myší.

V další práci byly studovány vztahy struktury lykorinu a jeho derivátů s jejich protinádorovými účinky. V této studii bylo testováno více než 300 strukturně odlišných analogů lykorinu a studována jejich rozdílná proapoptotická aktivita vůči rakovinným buňkám. Bylo tak zjištěno 26 strukturních analogů s antitumorovými vlastnostmi. Tato práce může být vodítkem, či jakýmsi ukazatelem u následných prací v hledání cílených struktur s žádanými účinky. Bylo zjištěno, že hlavními nositeli proapoptotických vlastností u těchto struktur jsou fenolické a alkoholické skupiny, aminoskupiny a nenasycené vazby<sup>40</sup>.

Mezi další zajímavé biologické účinky lykorinu lze uvést jeho inhibiční působení vůči hydrolázám obsaženým v parazitu *Trichomonas vaginalis*. Byl zaznamenán silný inhibiční efekt lykorinu na dvě důležité hydrolázy u tohoto parazita. Tyto enzymy hydrolyzují makroergické fosfátové vazby ATP, ADP a AMP. Regulací hladin těchto nukleotidů v přítomnosti lykorinu lze zvýšit imunitní odpověď organismu vůči tomuto parazitovi<sup>41</sup>.



Lykorin



Narciklasin

**Obr. 5.** Vybrané struktury alkaloidů rodu *Narcissus*

Narciklasin, znázorněný na obrázku výše (Obr. 5.), jakožto jeden ze základních strukturních typů *Amaryllidaceae* alkaloidů, vykazuje mimo jiné významné antiproliferativní účinky. Dle studie<sup>42</sup> se narciklasin a některé jeho deriváty projevily jako silné induktory apoptózy buněk HeLa, Vero a Jurkat. Autoři očekávají, že

naměřené výsledky podpoří další intenzivní zkoumání těchto derivátů v klinických studiích. Významnou aktivitu vůči Jurkat buňkám vykazoval též alkaloid tazettin<sup>42</sup>.

U dalšího alkaloidu, homolykorinu, byla testována citlivost vůči HIV-1 respektive jeho účinnost v inhibici replikace viru v MT4 buňkách lymfocytů T společně s jeho cytotoxicitou. Oproti dalším proměřovaným látkám vykázal homolykorin nízkou cytotoxicitu při měřitelné inhibiční aktivitě vůči replikaci HIV-1 ( $IC_{50} = 7,3 \mu\text{g/mL}$ )<sup>43</sup>.

V následující kapitole jsou uvedeni zajímaví zástupci rodu *Narcissus*.

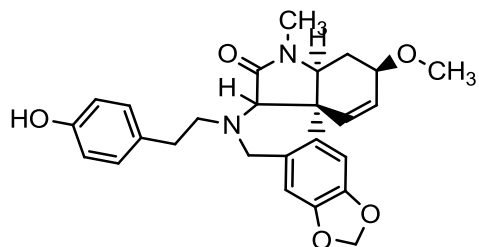
### 3.2.3.2 *Narcissus broussonetii*

Fytochemické studie prováděné na tomto druhu z oblasti severní Afriky (Obr. 6.) vedly k izolaci 23 různých alkaloidů včetně vzácných látek obliquinu, plikaninu a sekoplukaninu nesoucích ve svých molekulách 2 atomy dusíku. Struktury jsou vyobrazeny na Obr. 7. Mezi hlavní identifikované alkaloidy patřily alkaloidy lykorinového a homolykorinového typu (lykorin, homolykorin, tazettin, 8-O-Demethylhomolykorin a galanthindol). Jako hlavní alkaloid byl identifikován

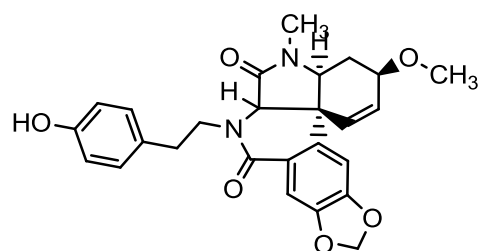


**Obr. 6.** *Narcissus broussonetii*<sup>44</sup>

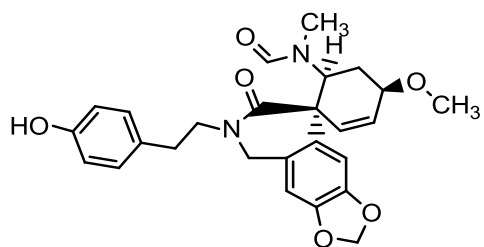
tazettin. Ethanolický extrakt i jednotlivé alkaloidy s největším zastoupením byly testovány na aktivitu vůči parazitu *Trypanosoma cruzi*. Ethanolický extrakt vykázal zajímavou aktivitu, ale čisté alkaloidy byly neaktivní<sup>45</sup>.



Obliquin



Plicamin



Secoplicamin

**Obr. 7.** Vybrané alkaloidní struktury druhu *Narcissus broussonetii*

### 3.2.3.3 *Narcissus serotinus*



**Obr. 8.** *Narcissus serotinus*<sup>46</sup>

Na tomto druhu, jenž je možno nalézt ve Španělsku v oblasti Valencie a který zachycuje fotografie na obrázku výše (Obr. 8.), byla provedena fytochemická práce, při níž byly identifikovány hlavně tyto alkaloidy: narseronin, galanthin, inkartin, masonin a hippeastrin. Dvě hlavní složky obsažené v *Narcissus serotinus* byly nově popsány deriváty alkaloidu narcissidinu. Jednalo se o 3-O-Methylnarcissidin a 1-O-Acetyl-3-O-methylnarcissidin<sup>31</sup>.

Narcissidin se projevil jako účinný proti některým druhům hmyzu. Byla provedena studie, ve které účinně bránil růstu *Spodoptera littoralis*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Rottboellia cochinchinensis* a jiným. Je zřejmé, že tato funkce slouží k ochraně rostliny proti těmto druhům škodlivého hmyzu<sup>47</sup>.

### 3.2.3.4 *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpaticus*



**Obr. 9.** *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpaticus*<sup>48</sup>

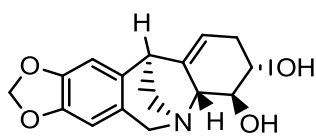
Tento druh, zobrazený na kresbě výše (Obr. 9.), jehož domovinou je transkarpatská oblast na Ukrajině, byl podroben fytochemické studii, v jejímž rámci bylo z čerstvých cibulí izolováno 7 alkaloidů. Jednalo se o nangustin, pankracin, pseudolykorin, vaskonin, ungeremin, cheryllin a 8-O-Demethylhomolykorin. Nangustin je prvním izolovaným alkaloidem 5,11-Methanomorphanthridinového typu se substitucí na uhlících C-3 a C-4. Cheryllin a ungeremin byly u rodu *Narcissus* v tomto druhu popsány vůbec poprvé. Alkaloidy ze skupiny 4-Arylisochinolinového typu, do kterého spadají právě nangustin a ungeremin, jsou potenciálně farmakologicky zajímavé<sup>32</sup>. Na Obr. 10. je možno vidět vybrané struktury z tohoto rostlinného druhu.

Ungeremin prokázal účinky proti leukemii a hrál svou roli při zvýšení cytotoxických účinků lykorinu a také je příčinou inhibičního působení lykorinu na růst cytotoxických buněk myší, kdy bylo zjištěno, že samotný lykorin tuto aktivitu nemá, ale ungeremin, jakožto jeho přirozený metabolit ano a tam, kde k tomuto metabolismu docházelo, byla inhibice růstu zaznamenána<sup>49</sup>. Dále byl prokázán účinek proti lidskému

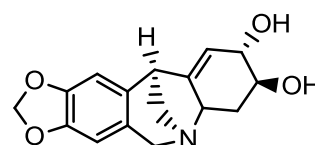
karcinomu vaječníku a žaludku u semisyntetického derivátu ungeremin-acetátu v klinických studiích prováděných v Číně<sup>50, 51</sup>.

U ungereminu, alkaloidu lykorinové řady, byla dále zjištěna interakce s lidskou i bakteriální topoisomerásou typu I a II. Tento efekt spočívá ve vazbě planární struktury ungereminu a kladně nabitého dusíkového atomu se strukturou DNA. Tohoto účinku může být využito při hledání nových antimikrobních léčiv. Ungeremin navíc nevykázal cytotoxické účinky u lidských buněk<sup>52</sup>. Nangustin a pankracin byly dále podrobeny testům citlivosti vůči parazitům *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* a *Plasmodium falciparum*. Nangustin se projevil vůči všem testovaným parazitům jako neúčinný a pankracin projevil slabou účinnost vůči všem testovaným protozoám kromě *Leishmania donovani*, vůči které byl neúčinný<sup>32</sup>.

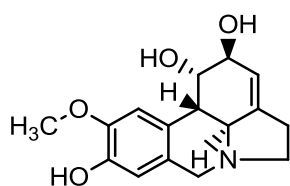
Významné inhibiční účinky proti některým parazitům vykazoval také pseudolykorin. Tento lykorinový analog prokázal dobré inhibiční aktivity vůči *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. cruzi* a *Plasmodium falciparum*<sup>53</sup>.



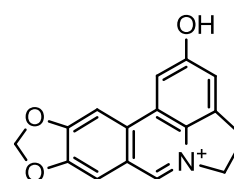
Nangustin



Pankracin



Pseudolykorin



Ungeremin

**Obr. 10.** Vybrané alkaloidy druhu *Narcissus angustifolius subsp. transcarpaticus*

### 3.2.3.5 *Narcissus pseudonarcissus* cv. CARDILA



**Obr. 11.** *Narcissus pseudonarcissus* cv. CARDILA<sup>54</sup>

Tento druh narcisu (Obr. 11.) byl podroben studii<sup>55</sup>, při níž byly pomocí GC/MS identifikovány některé alkaloidy. Nejvíce zastoupené shrnuje následující tabulka (Tab. III.).

**Tabulka II** Vybrané alkaloidy izolované z druhu *N. pseudonarcissus* cv. CARDILA

Izolované alkaloidy	[%]	[ $M^+$ ] a charakteristické ionty (%)
Haemantamin	37,5	287(97);286(100);244(30);216(45);174(43)
Galanthamin	51,95	289(63);288(100);232(11);202(17);115(26)
Lykoramin	3,79	285(95);284(100);216(30);174(52)
Narwedín	1,35	301(15);272(100);240(18);181(23)

## **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 extraktů 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 Preparativní tenkovrstvá chromatografie (TLC)**

Preparativní chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna v systému normálních komor. Ty byly nasyceny mobilní fází. Komory pro preparativní tenkovrstvou chromatografii se sytily 60 minut. Chromatografie byla vzestupná. K separaci byly použity desky Merck precoated silica gel F<sub>254</sub>.

### **4.1.3 Materiál a vybavení**

#### **4.1.3.1 Rozpouštědla**

Diethylamin, p.a. (Lachner)

Diethyleter, p.a. (Penta)

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, p.a.

Ethylacetát, p.a. (Penta)

Methanol LC-MS CHROMASOLV® (Sigma-Aldrich)

Toluen, p.a. (Penta)

#### **4.1.3.2 Chemikálie**

Amoniak, 25% vodný roztok, p.a. (Lachema)

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

## **4.2 Příprava sumárních extraktů a GC/MS analýza**

### **4.2.1 Biologický materiál**

Čerstvé cibule rostlin *Narcissus poeticus var. recurvus*, *N. Jack Snipe*, *N. Sir W. Churchilli*, *N. Katie Heath*, *N. Dutch Master* a *N. Flower Record* byly získány od komerčního prodejce Lukon Glands (Sadská, Česká republika). Verifikace vzorků byla

provedena Prof. RNDr. Lubomírem Opletalem CSc. Dokladné vzorky rostlin jsou uloženy v herbáři na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

#### **4.2.2 Příprava ethanolických a alkaloidních extraktů**

Čerstvé cibule narcisů o přibližné hmotnosti 100 g až 300 g byly rozdrceny a ethanolem extrahovány (3 krát po 50 ml) při teplotě varu ethanolu 30 minut. Následovala filtrace přes křemelinu a odpaření rozpouštědla. Pro biologické testy (cholinesterázovou a antioxidační aktivitu) bylo odebráno 2 × 10 mg suchého extraktu. Po odpaření do sucha byl zbytek rozpuštěn v 10 ml 2% HCl a vytřepán diethyletherem (3 × 15 ml) pro odstranění neutrálních sloučenin. Dalším krokem byla úprava pH na cca 10 přidáním 25% amoniaku k vodné fázi. Vodná fáze byla vytřepána ethylacetátem (3 × 15 ml) a organická odpařena do sucha. Dokonalého vysušení bylo docíleno v exsikatoru. Z každého odparku bylo odebráno 2 krát 10 mg extraktu na biologické testy. Zbytek byl rozpuštěn v methanolu LC-MS a připraven roztok o koncentraci 1 mg/ml pro GC/MS analýzu.

#### **4.2.3 GC/MS analýza a identifikace alkaloidů**

Alkaloidy jednotlivých druhů narcisů byly identifikovány pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 inert pracující s hmotnostním detektorem při elektronové ionizaci 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Separace byla prováděna na koloně DB-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). Teplotní program: z 100°C na 150°C 15°C/min, 1 min stabilizováno na 180°C a z 180°C na 300°C po 5°C/min a 35 min udržována na hodnotě 300°C. Teplota nástřiku 280°C. Průtoková rychlost nosného plynu (helium) byla 0.8 ml/min. Detekční rozmezí bylo  $m/z$  35-600, a teplota detektoru 200°C. Nástřik 1 μL alkaloidního roztoku (1 mg/mL) byl prováděn ve split módu (split poměr 1:10). Jednotlivé alkaloidy byly identifikovány porovnáním jejich hmotnostních spekter s daty v knihovně NIST, s publikovanými spektry v literatuře a také se spektry referenčních sloučenin dříve izolovaných v naší laboratoři.

### 4.3 Izolace a identifikace homolykorinu z rostliny *Narcissus Sir. W. Churchillii*

Alkaloidní extrakt (135 mg) z cibulí *Narcissus Sir. W. Churchillii* (250g) byl nanesen na preparační TLC desky (Silikagel 60, F<sub>254</sub>, Merck). Desky byly vyvíjeny v mobilní fázi To:Et<sub>2</sub>NH (95:5, třikrát). Separací bylo získáno 20 mg čisté látky, která byla porovnáním hmotnostních spekter, NMR analýzou a porovnáním těchto dat s literaturou<sup>43, 56</sup> identifikována jako (11C-S)-Homolykorin:  $[\alpha]_{25}^D$ : + 125° (c 0.02036, CHCl<sub>3</sub>).

#### 4.3.1 GC/MS analýza s využitím chemické ionizace

Za účelem získání molekulárních hmotností alkaloidů homolykorinového typu byl použit plynový chromatograf s hmotnostním detektorem QP2010 plus system s chemickou ionizací (Shimadzu, Japan). Tato metoda byla použita pro nestabilitu radikál-kationtů a nemožnosti spolehlivě identifikovat M<sub>r</sub> jednotlivých látek za využití EI (electron impact) ionizace. Jako reakční plyn byl použit isobutan (3.5; Linde Gas a.s. - Linde Technoplyn a.s., Česká republika). Separace byla prováděna na koloně HP-5MS UI (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA) za stejného teplotního programu popsaného výše. Teplota nástřiku byla 280°C. Nosným plynem bylo helium s průtokovou rychlostí 0.8 mL/min. Nástřik 1 μL alkaloidního roztoku (1 mg/mL) byl prováděn ve split módu (split poměr 1:3). Detekční rozmezí měřených vzorků bylo m/z 70-550. Teplota detektoru byla 200°C.

#### 4.3.2 NMR analýza

NMR spektra byla měřena na spektrometru VNMR S500. Pracovní frekvence byla pro jádra <sup>1</sup>H 499,9 MHz a pro <sup>13</sup>C jádra 125,7 MHz. Spektra <sup>13</sup>C NMR byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě. <sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena v inverzní 5 mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních frekvencí. Všechna měření byla prováděna v deuteriochloroformu při teplotě 25 °C. Hodnoty chemických posunů jsou uváděny v jednotkách ppm. Hodnoty <sup>1</sup>H NMR spekter jsou vztaženy k inertnímu standardu (hexamethyldisilan, 0,04 ppm). Naproti tomu hodnoty <sup>13</sup>C NMR spekter jsou vztaženy k signálu solventu (76,99 ppm).

### 4.3.3 Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost byla měřena na polarimetru ADP 220 BS v roztoku  $\text{CHCl}_3$ .

## 4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidních extraktů a čistých alkaloidů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE

### 4.4.1 Chemikálie a materiál použité pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

#### 4.4.1.1 Chemikálie:

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

#### 4.4.1.2 Materiál:

Jako zdroj acetylcholinesterázy byla použita pouzdra lidských erythrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy byla lidská plazma. Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách.

### 4.4.2 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Reader Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek, USA)

### 4.4.3 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při teplotě 37 °C
- v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v mikrotitračních destičkách

#### 4.4.4 Příprava erytrocytárních pouzder

Erytrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle lehce upravené metody Stecka a Kanta<sup>57</sup>. Plazma (HuBuChE) byla odstraněna z plné krve centrifugací při rychlosti 4000 ot./min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erytrocyty byly přemístěny do 50ml zkumavek a třikrát promyté 5mM fosfátovým pufrém (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot./min., Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erytrocyty byly míchány s 5mM fosfátovým pufrém (pH 7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min a vzniklá pouzdra (HuAChE) byla třikrát promyta fosfátovým pufrém.

#### 4.4.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC<sub>50</sub>)

Pro stanovení hodnoty IC<sub>50</sub> byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)<sup>58</sup>. Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC<sub>50</sub> byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy 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: galataminem (IC<sub>50</sub> HuAChE = 0,63 ± 0,025 µg/ml, HuBuChE = 15,58 ± 0,48 µg/ml) a huperzinem A (IC<sub>50</sub> HuAChE = 7,99 ± 0,24 × 10<sup>-3</sup> µg/ml, HuBuChE >500 µg/ml). % I (inhibice) byla počítána dle vzorce:

$$\%I = 100 - \left( \frac{\Delta A_{BL}}{\Delta A_{SA}} \right) \times 100$$

kde  $\Delta A_{BL}$  je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu a  $\Delta A_{SA}$  je nárůst absorbance měřeného vzorku.

## **5 VÝSLEDKY A DISKUZE**

## 5.1 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus poeticus* var. *recurvus* a jeho GC/MS analýza



**Obr. 12.** *Narcissus poeticus* var. *recurvus*<sup>59</sup>

Na tomto kultivaru, zobrazeném na Obr. 12., byla poprvé provedena fytochemická studie na našem pracovišti<sup>37</sup>. Bylo identifikováno 6 alkaloidů galanthaminového, lykorinového, montaninového, cheryllinového a krininového typu. Všechny nalezené alkaloidy včetně jejich relativního procentuálního zastoupení shrnuje následující tabulka (Tab. III.). Kromě 6 identifikovaných látek, jejichž struktury jsou vidět na obrázku níže (Obr. 13.), bylo v extraktu přítomno dalších 6, které se nám nepodařilo identifikovat na základě hmotnostních spekter porovnáním s žádnou dostupnou databází. 3 z těchto alkaloidů bylo v extraktu v relativním obsahu pod 1%, proto jejich případná izolace a identifikace bude problematická. Chromatografický záznam GC/MS analýzy vidíme na obrázku níže (Obr. 14.). V největším zastoupení byly alkaloidy lykorinového typu a galanthamin. Právě tyto strukturální typy jsou zřejmě zodpovědné za zajímavou inhibiční aktivitu vůči HuAChE, která byla  $IC_{50} = 6,0 \pm 0,1$   $\mu\text{g/ml}$ . Z literatury je známo, že právě alkaloidy galanthaminového a lykorinového typu jsou dobrými inhibitory AChE, přičemž skupina lykorinových alkaloidů má aktivitu

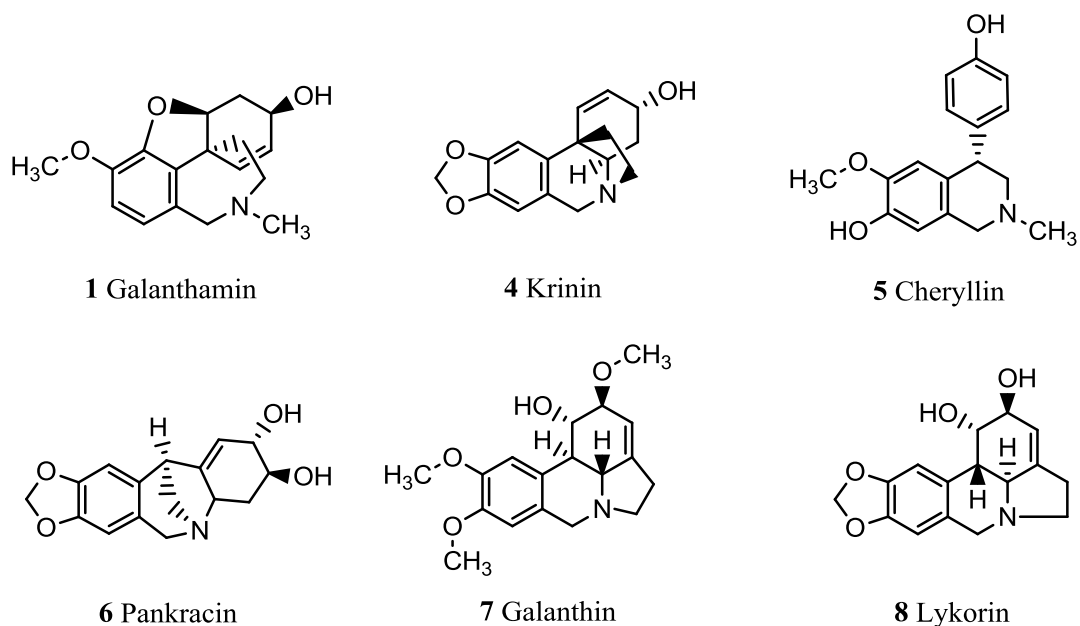
menší<sup>60, 61</sup>. Inhibiční efekt na AChE u lykorinové řady je spojen se substitucí na uhlících C1 a C2<sup>60</sup> a ten může být zvýšen změnou konformace molekuly v planárnější seskupení jak je tomu u alkaloidů assoaninu a oxoassoaninu, které ve své struktuře mají kruh C aromatizován<sup>60</sup>. Extrakt této rostliny vykázal také slibnou inhibiční aktivitu vůči sérové HuBuChE ( $IC_{50} = 23,0 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$ ). V současné době není dostatečné množství studií zabývajících se inhibiční aktivitou *Amaryllidaceae* alkaloidu vůči HuBuChE, abychom mohli říci, které z identifikovaných alkaloidů jsou příčinou zvýšené inhibice HuBuChE u extraktu *N. poeticus var. recurvus*. Na našem pracovišti byl izolován a proměřen v čistém stavu alkaloid lykorin, ten ovšem sám o sobě významnou aktivitu proti HuBuChE nevykázal<sup>62</sup>. Otázkou tedy zůstává, zda jsou za tuto zvýšenou inhibiční aktivitu zodpovědné jiné identifikované alkaloidy, alkaloidy neidentifikované, nebo zda se v rostlině vyskytují ve velmi malém množství alkaloidy nedetekované s velmi silným inhibičním působením. Pro vyřešení těchto otázek bude potřeba izolace jednotlivých alkaloidů a jejich jednotlivé případně i kombinované proměření inhibiční aktivity, neboť vysoká inhibiční aktivita může mít i synergickou podstatu.



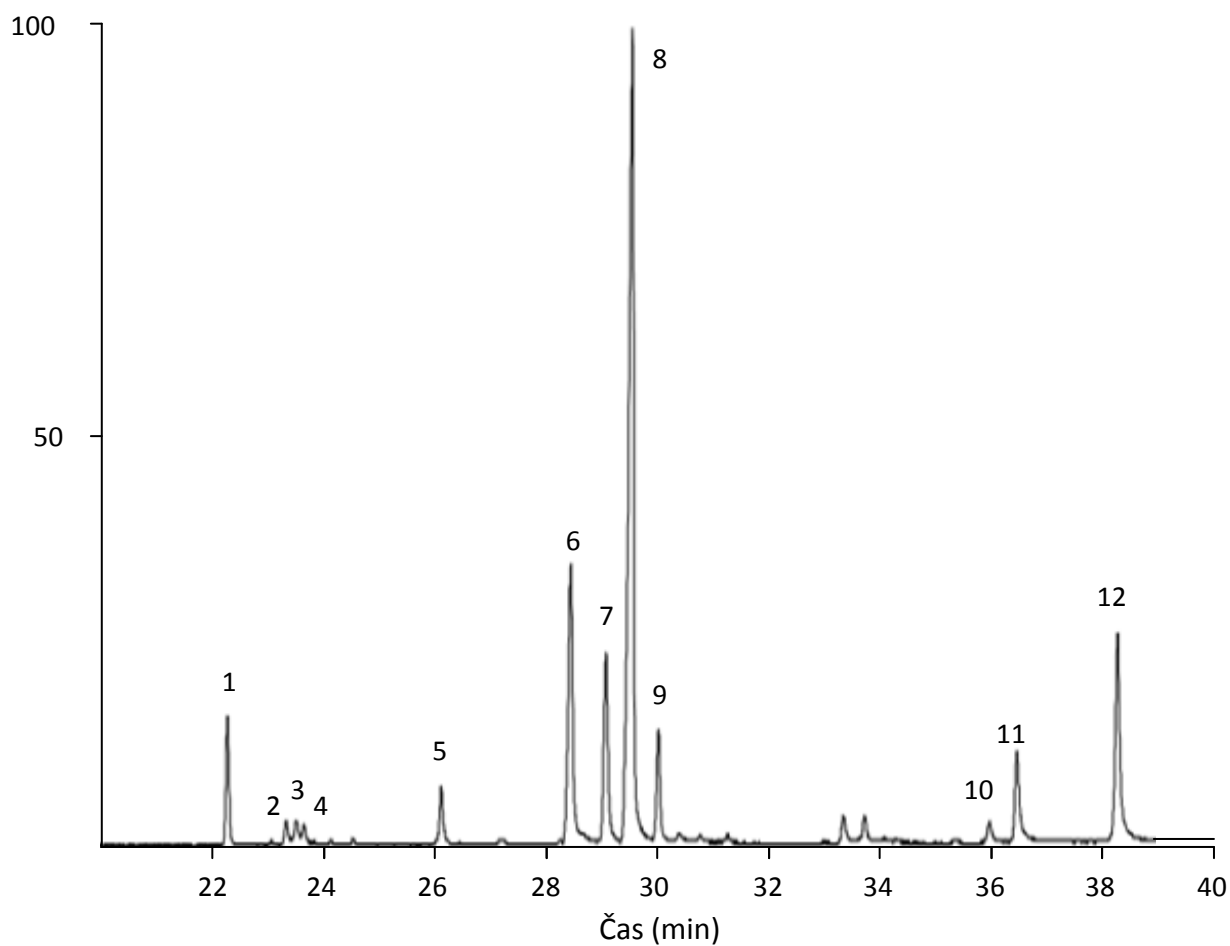
**Tabulka III** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *N. poeticus* var. *recurvus* a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
1 Galanthamin	22,17	287(90), 286(100), 270(20), 244(30), 230(5), 216(45) 269(97), 268(55), 253(100), 254(51),	5	NIST 08 <sup>d</sup>
2 A2 <sup>c</sup>	23,02	240(20), 224(35), 223(75), 199(50), 194(35), 185(20), 165(48)	<1	-
3 A3 <sup>c</sup>	23,23	289(15), 288(22), 269(100), 230(15), 226(20), 212(10), 199(80)	<1	-
4 krinin	23,38	271(100), 254(8), 242(8), 228(25), 216(14), 199(48), 187(43)	2	NIST 08 <sup>d</sup>
5 Cheryllin	26,14	285(63), 242(100), 241(90), 225(77), 211(70), 210(45), 197(13), 181(30) 287(100), 286(23), 270(23), 259(5),	2	NIST 08 <sup>d</sup>
6 Pankracin	28,74	243(25), 223(20), 214(22), 199(24), 185(26)	15	NIST 08 <sup>d</sup>
7 Galanthin	29,43	317(30), 298(15), 284(15), 268(15), 243(100), 242(95)	10	NIST 08 <sup>d</sup>
8 Lykorin	29,79	287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100)	42	NIST 08 <sup>d</sup>
9 A9 <sup>c</sup>	30,05	333(50), 332(100), 296(14), 259(75), 258(78), 242(15), 244(15), 44(22) 355(38), 271(18), 270(100), 269(37),	6	-
10 A12 <sup>c</sup>	36,11	267(19), 253(18), 252(37), 223(35), 69(48), 44(54), 42(54) 373(100), 270(95), 268(98), 252(77),	<1	-
11 A13 <sup>c</sup>	36,69	241(50), 239(46), 223(77), 212(38), 200(25), 185(48), 115(27), 43(60)	5	-
12 A14 <sup>c</sup>	38,52	373(27), 270(100), 252(25), 42(45)	12	-

<sup>a</sup> podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část, <sup>c</sup> nebylo identifikováno



**Obr. 13.** Vybrané struktury identifikovaných látek v rostlině *N. poeticus var. recurvus*



**Obr. 14.** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N. poeticus var. recurvus*

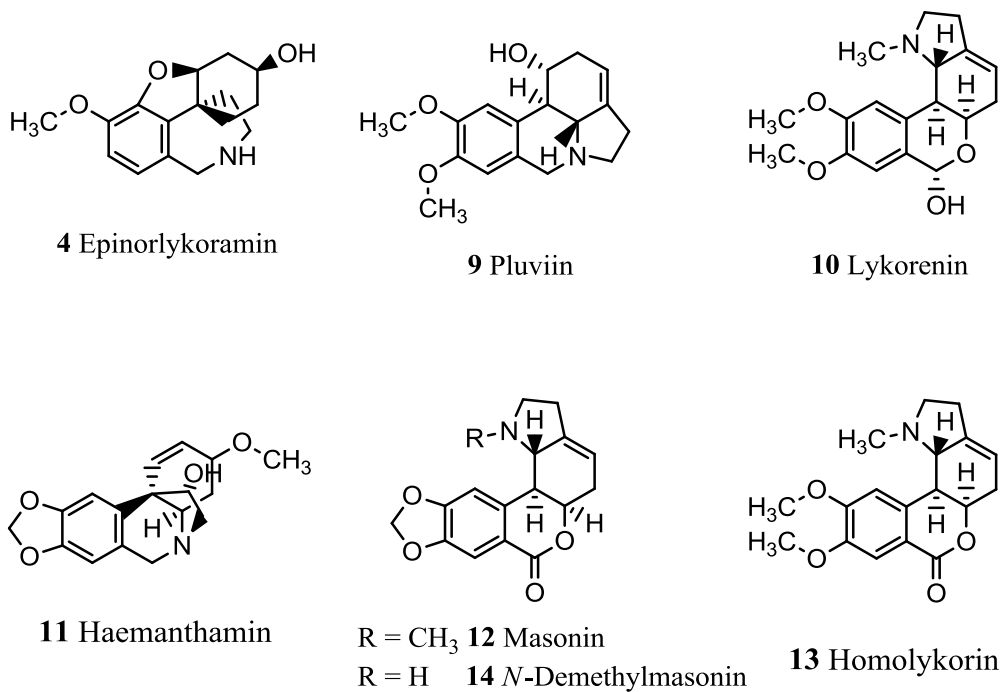
## 5.2 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus Dutch Master* a jeho GC/MS analýza

Na tomto rostlinném druhu dosud nebyla prováděna žádná publikovaná fytochemická práce. Během naší studie se podařilo identifikovat 9 alkaloidů galanthaminového, lykorinového, homolykorinového a haemanthaminového typu. Nejvíce byl zastoupen haemanthaminový a lykorinový typ (65% TIC) oproti zbylým (7,5% TIC). Na Obr. 15. můžeme vidět některé z nich. Zbývající procentuální zastoupení zaujímaly alkaloidy, které se nám nepodařilo identifikovat. Záznam GC/MS analýzy shrnuje tabulka a graf níže (Tab. IV a Obr. 16.). Naměřená inhibiční aktivita vůči HuAChE měla hodnotu  $IC_{50} = 62,9 \pm 1,9 \mu\text{g/ml}$ , což se nejeví jako zajímavé a je zřejmě zapříčiněna nízkým obsahem alkaloidů galanthaminového a lykorinového typu. Naproti tomu hodnota  $IC_{50}$  vůči HuBuChE dosáhla zajímavé hodnoty  $IC_{50} = 25,5 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ . Vzhledem k nejvyššímu zastoupení homolykorinu a haemanthaminu by se mohlo zdát, že právě tyto alkaloidy by mohly být zodpovědné za aktivitu alkaloidního extraktu vůči HuBuChE. Alkaloid homolykorin se nám podařilo izolovat z druhu N. Sir W. Churchilli viz níže, ve kterém byl zastoupen v nejvyšším množství, a byl testován na inhibiční aktivitu vůči HuAChE a HuBuChE, ovšem naměřená hodnota nedosahovala hodnoty inhibice tohoto extraktu. Námi izolovaný haemanthamin byl také podroben testu na aktivitu vůči HuAChE a HuBuChE, získané hodnoty jej však také nečiní významným inhibitorem<sup>62</sup>. Vzhledem k vysokému obsahu různých alkaloidů homolykorinového typu by mohla být zvýšená inhibiční aktivita proti HuBuChE způsobena právě některým z nich, nebo dokonce jejich kombinací. Přibližně čtvrtina detekovaných alkaloidů nebyla identifikována. Tyto neznámé alkaloidy mohou také hrát roli ve zmíněné inhibiční aktivitě. Tento kultivar se tedy jeví jako zajímavý pro další izolaci a identifikaci neznámých alkaloidů za účelem zjištění, které látky jsou zodpovědné za onu zajímavou hodnotu inhibice HuBuChE.

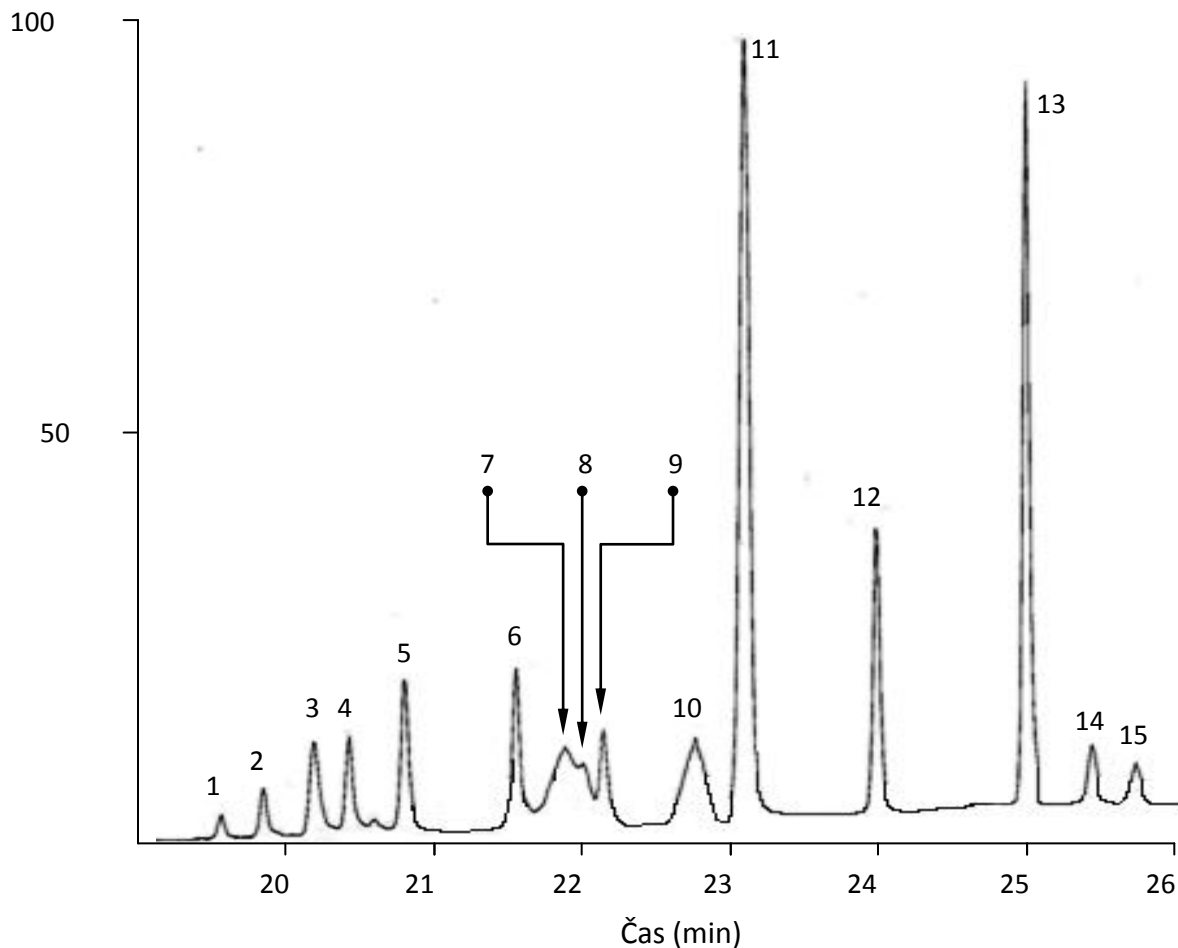
**Tabulka IV** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *N. Dutch* Master a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	RI	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
1 Galanthamin	19,65	2405	287(90), 286(100), 270(20), 244(30), 230(5), 216(45)	1	NIST 11
2 Lykoramin	19,93	2424	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30)	2	NIST 11
3 B3 <sup>c</sup>	20,26	2446	287(10), 286(13), 271(90), 272(100), 256(5), 242(8), 230(35), 202(35), 174(15), 165(12), 128(12), 115(20)	4	-
4 Epinorlykoramin	20,49	2461	275(77), 274(100), 202(12), 188(22), 187(17), 175(13), 115(18) 285(13), 284(17), 273(88),	3	[26]
5 B5 <sup>c</sup>	20,86	2484	272(100), 216(18), 202(18), 188(29), 187(24), 174(18), 159(15), 128(14), 115(23)	5	-
6 B6 <sup>c</sup>	21,60	2534	271(85), 270(100), 240(8), 228(10), 199(15), 174(12), 128(15), 115(17)	5	-
7 B7 <sup>c</sup>	21,92	2555	109(100), 108(18), 94(3), 82(3), 42(3)	6	-
8 B8 <sup>c</sup>	22,04	2563	329(12), 268(12), 242(14), 164(6), 109(100), 108(15), 78(10)	2	-
9 Pluviin	22,18	2573	287(81), 286(48), 268(52), 254(15), 243(66), 242(100), 228(23)	3	NIST 11
10 Lykorenin	22,78	2613	317(<1), 299(3), 191(3), 179 (2), 110(9), 109(100), 108(18), 94(3), 82(2)	7	[47]
11 Haemanthamin	23,11	2636	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	32	NIST 11
12 Masonin	23,98	2695	299(<1), 190(2), 164(4), 134(1), 109(100), 108(23), 94(4), 82(2)	9	NIST 11
13 Homolykorin	24,97	2766	301(-), 207(1), 178(3), 110(8), 109(100), 108(20), 94(3), 82(3)	20	[47]
14 <i>N</i> - Demethylmasonin	25,41	2797	285(<1), 190(2), 162(4), 134(3), 115(2), 96(6), 95(100), 94(20), 80(4)	2	[26]
15 B 15 <sup>c</sup>	25,70	2819	109(100), 108(23)	1	-

<sup>a</sup> podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část, <sup>c</sup> nebylo identifikováno



**Obr. 15.** Vybrané struktury identifikovaných látek v rostlině *N. Dutch Master*



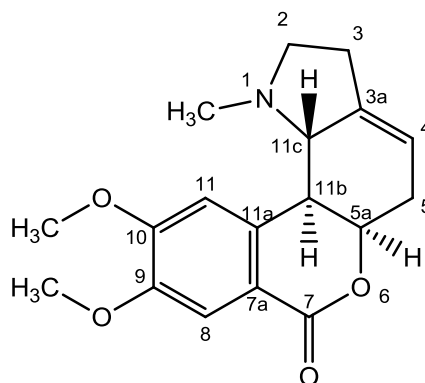
**Obr. 16.** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N. Dutch Master*

### 5.3 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus* Sir. W. Churchilli a jeho GC/MS analýza

*N. Sir W. Churchilli* byl testován již v minulosti<sup>61</sup>, kdy byl z této rostliny izolován alkaloid lykorinového typu ungiminorin. Ten byl podroben testu inhibiční aktivity vůči AChE a byla naměřena hodnota  $IC_{50} = 86 \mu\text{M}$ , resp.  $27,3 \mu\text{g/ml}$ . Při našem měření však tento alkaloid identifikován nebyl. Byly detekovány a identifikovány 4 alkaloidy v množství vyšším než 4% TIC a dále alkaloid chlidantin množství menším než 1% TIC. GC/MS analýza a její chromatografický záznam jsou uvedeny v Tab. V a Obr. 20. Nejvíce byl zastoupen alkaloid homolykorin, a to v 69% zastoupení TIC. Pro úzké spektrum obsažených alkaloidů a vysoké zastoupení homolykorinu byl tento z této rostliny izolován preparační tenkovrstvou chromatografií. Bylo získáno 20 mg čistého alkaloidu, který byl porovnáním MS a NMR spekter s literaturou<sup>43, 56</sup> identifikován včetně prostorové izomerie a otáčivosti jako (11C-S)-Homolykorin:  $[\alpha]_{25}^D: + 125^\circ$  (c 0.02036,  $\text{CHCl}_3$ ) a proměřen na aktivitu vůči HuAChE a HuBuChE. Inhibiční aktivita vůči HuAChE byla  $IC_{50} = 20,1 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$  a vůči HuBuChE byla  $IC_{50} = 47,6 \pm 4,8 \mu\text{g/ml}$ . Porovnáme-li tyto výsledky s hodnotou inhibiční aktivity celého extraktu, které byly  $IC_{50} = 23,0 \pm 9,7 \mu\text{g/ml}$  pro HuAChE a  $IC_{50} = 41,3 \pm 10,4 \mu\text{g/ml}$ , a procentuální zastoupení homolykorinu v extraktu, můžeme tvrdit, že výsledná aktivita vůči HuAChE i HuBuChE je aktivitou homolykorinu. Druhým významně zastoupeným alkaloidem byl haemanthamin, o kterém je ovšem z literatury známo, že nejeví významnou inhibiční aktivitu<sup>60</sup>. Dále byl identifikován lykorin, o kterém je známa jeho mírná inhibiční aktivita vůči HuAChE<sup>63, 64</sup>. Vzhledem k celkově ne příliš významné aktivitě extraktu a jejího vysvětlení obsahem homolykorinu a úzkým alkaloidním profilem se tento kultivar nejeví zajímavým pro další fytochemické práce.

## 5.4 Strukturní analýza homolykorinu

Na základě MS a NMR analýzy a porovnáním dat s literaturou byla izolovaná látka identifikována jako homolykorin (Obr. 17)<sup>43, 56</sup>.



(11C-S)-Homolykorin:  $[\alpha]_{25}^D: +125^\circ$  (c 0.02036,  $\text{CHCl}_3$ )

**Obr. 17.** Struktura homolykorinu

### 5.4.1 NMR analýza homolykorinu

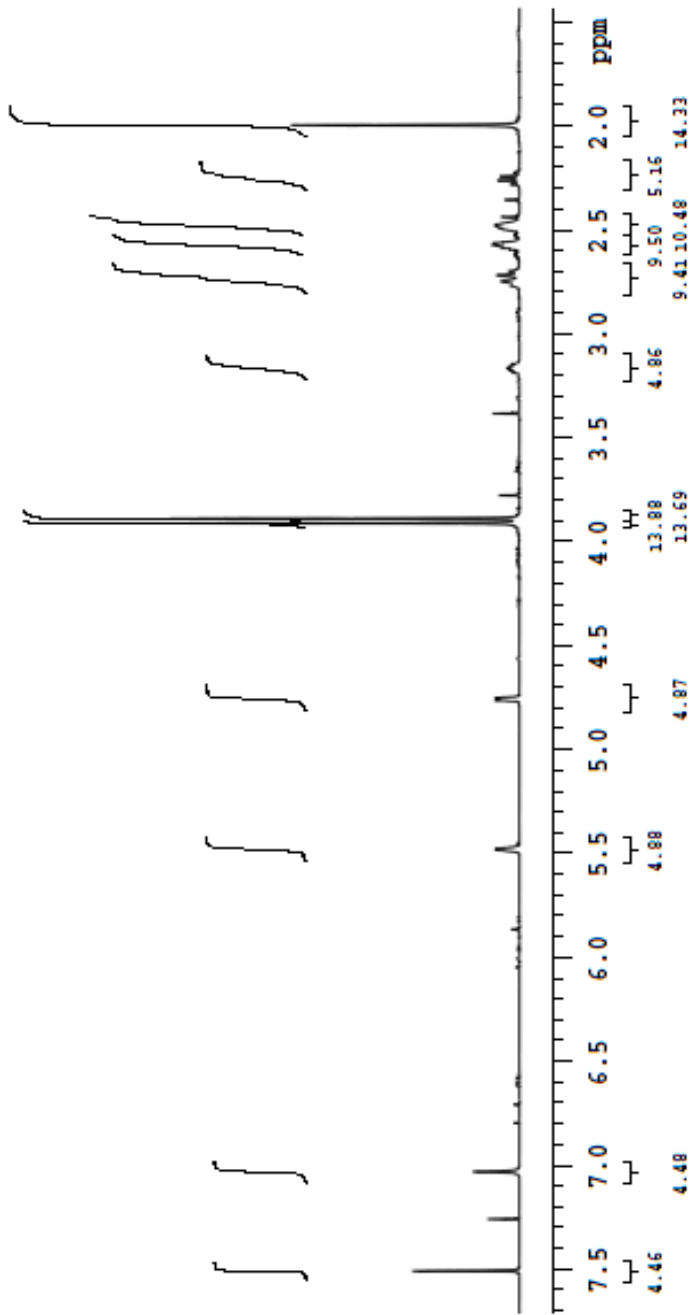
$^1\text{H}$  NMR (Obr. 18.): (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.00 (3H, s, NMe), 2.23 (1H, q,  $J = 9.8$  Hz, H-2), 2.50 (2H, m, H-3), 2.63 (3H, m, H-5, H-11b), 2.71 (1H, brm, H-11c), 3.12 (1H, ddd,  $J=9.8$ , 3.3, 7.2 Hz, H-2), 3.94 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.95 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4.80 (1H, t,  $J = 2.3$ , H-5a), 5.50 (1H, brd,  $J=2.3$  Hz, H-4), 6.96 (1H, s, H-8), 7.56 (2H, m, H5), 2.39 (1H, s, H-8).

$^{13}\text{C}$  NMR (Obr. 19.): (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  28.1 (C3), 31.3 (C5), 43.8 (C11b), 44.2 (NCH<sub>3</sub>), 56.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 56.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 56.6 (C2), 66.6 (C11c), 77.7 (C5a), 110.8 (C11), 111.9 (C8), 115.2 (C4), 116.9 (C7a), 137.8 (C11a), 140.9 (C3a), 148.9 (C9a), 153.1 (C10), 49.4 (C6), 165.9 (C7a), 39.3 (NCH<sub>3</sub>), 29.1 (C5).

Homolycorine

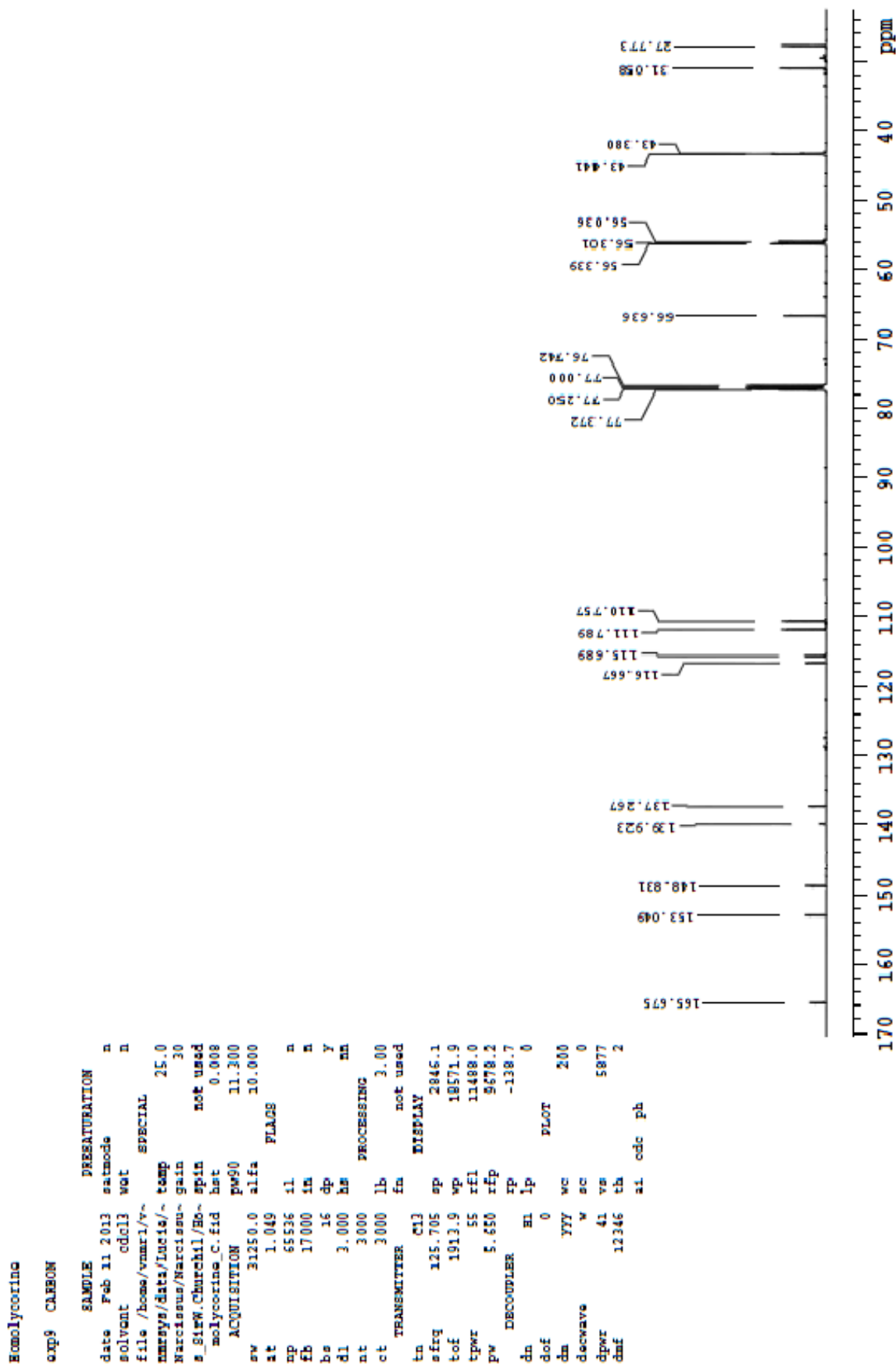
exp8 PROTON

```
SAMPLE PRESATURATION
date Feb 11 2013 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file /home/vnmr1/v/ SPECIAL
nmrns/data/Lucie/~ temp 25.0
Narcissus/Narcissus- gain 20
s_SirW.Churchil/Bo- spin not used
molycorine_H.fid hst 0.008
ACQUISITION pw90 9.100
sw 3765.1 alfa 10.000
at 2.176 FLAGS
rp 16384 il n
fb 4000 in n
bs 32 dp y
di 1.000 hs nn
nt 16 PROCESSING
ct 16 fn not used
TRANSMITTER DISPLAY
tn H1 sp 717.4
sfrq 499.865 wp 3137.2
tof -370.5 rfl 3388.6
tpwr 60 rfp 3629.0
pw 3.000 rp 174.9
DECOUPLER lp PLOT
dn C13 wc 200
dof 0 sc 0
dm nnn vs 95
decwave W40_OneNMR- vs
_W018 th 45
dpr 37 ai cdc ph
dmf 32258
```



Obz. 18. <sup>1</sup>H NMR spektrum homolykorinu



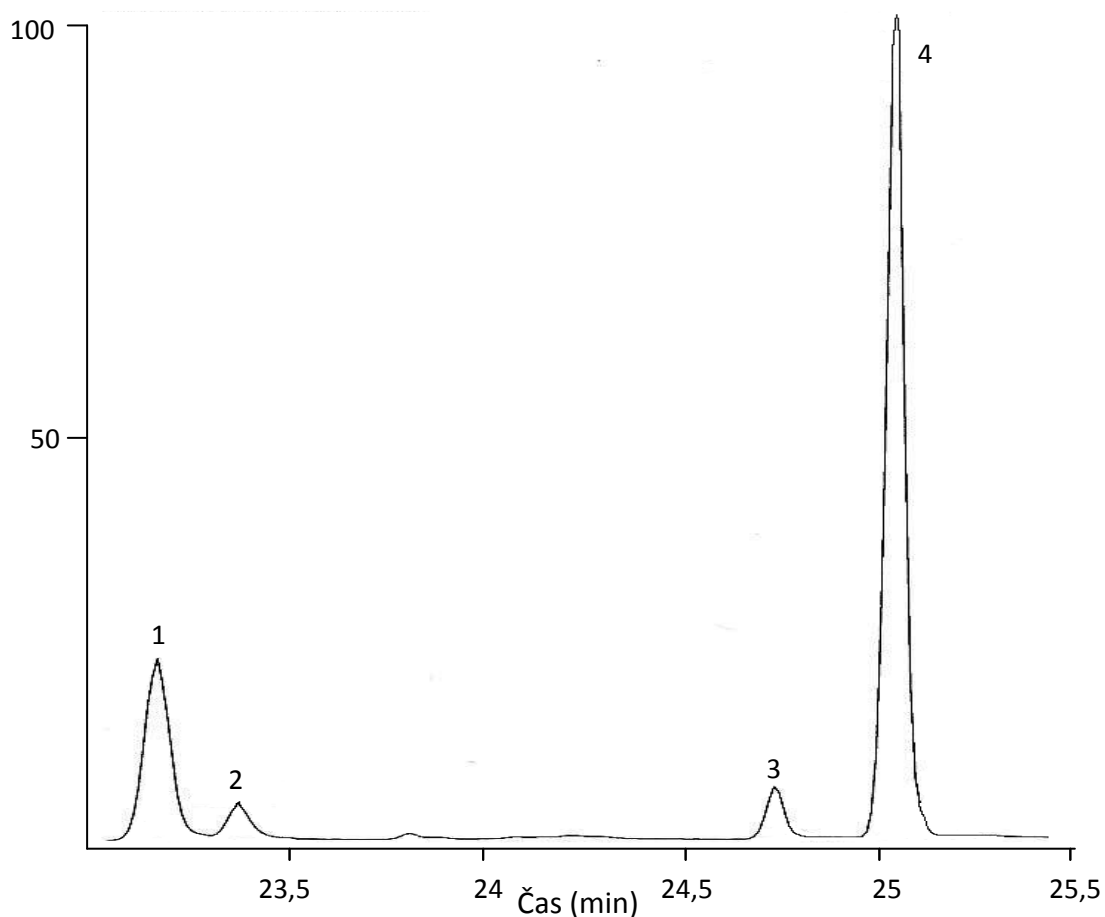


Obz. 19.  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum homolykorinu

**Tabulka V** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *N. Sir W. Churchilli* a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	RI	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
<b>1</b> Haemanthamin	23,12	2637	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	22	NIST 11
<b>2</b> Tazettin	23,33	2651	331(20), 316(20), 298(25), 247(100), 230(10)	5	NIST 11
<b>3</b> Lykorin	24,67	2745	287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100)	4	NIST 11
<b>4</b> Homolykorin	25,00	2769	301(-), 207(1), 178(3), 110(8), 109(100), 108(20), 94(3), 82(3)	69	[47]
<b>5</b> Chlidantin	25,76	2823	287 (100), 286 (60), 256 (55), 244 (10), 202 (30)	<1	[65]

<sup>a</sup> podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část



**Obr. 20.** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N. Sir W. Churchilli*

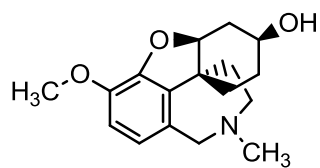
## 5.5 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus Jack Snipe* a jeho GC/MS analýza

Na tomto kultivaru narcisu dosud nebyla publikována žádná fytochemická práce. Při identifikaci alkaloidů GC/MS analýzou jsme potvrdili 8 alkaloidů převážně lykorinového a galanthaminového typu. Záznam z GC/MS analýzy je možno zhlédnout v tabulce na následující straně (Tab. VI), její chromatografický záznam a struktury některých alkaloidů pak na následujících obrázcích (Obr. 22. a 21.). Dále byl v malém množství identifikován tazettin. Tento alkaloid nevykazuje zajímavou aktivitu vůči HuAChE<sup>60</sup>. 3 alkaloidy se identifikovat nepodařilo. Nejvíce byl zastoupen lykorin, který sám o sobě má inhibiční aktivitu vůči esterázám nízkou<sup>60</sup>. Dále ve vysokém zastoupení byl zaznamenán lykoramin, který byl poprvé izolován již v r. 1932 z rostliny *Lycoris Radiata*<sup>66</sup>. Tento alkaloid galanthaminového typu vykazuje podobnou, ovšem nižší aktivitu než galanthamin. Toto snížení aktivity může být zapříčiněno absencí dvojně vazby v cyklohexanovém kruhu, která způsobuje planárnější konformaci molekuly<sup>60</sup>. Významné zastoupení měl i jeden z alkaloidů, které se nám nepodařilo identifikovat. Změřená aktivita extraktu vůči HuAChE měla hodnotu  $IC_{50} = 33,4 \pm 1,7 \mu\text{g/ml}$  a vůči HuBuChE  $IC_{50} = 166,5 \pm 5,0 \mu\text{g/ml}$ . Tyto hodnoty jsou v porovnání se standardy a ostatními extrakty spíše nezajímavé. Alkaloidním spektrem se tato rostlina však jeví zajímavá pro relativně vysoký obsah neidentifikovaných látek, které bude třeba izolovat a provést jejich strukturální identifikaci. Je zde tak potenciál objevit nové, dosud nepoznané látky.

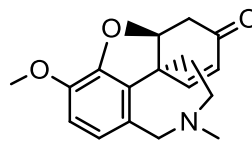
**Tabulka VI** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *N. Jack Snipe* a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	RI	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
<b>1</b> Galanthamin	19,65	2406	287(90), 286(100), 270(20), 244(30), 230(5), 216(45)	8	NIST 11
<b>2</b> Lykoramin	19,93	2424	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30)	16	NIST 11
<b>3</b> B3 <sup>c</sup>	20,27	2446	287(10), 286(13), 271(90), 272(100), 242(8), 230(35), 202(35), 174(15), 115(20)	11	-
<b>4</b> Epinorlykoramin	20,49	2461	275(77), 274(100), 202(12), 188(22), 187(17), 175(13), 115(18)	2	[26]
<b>5</b> Narwedín	20,86	2484	285(90), 284(100), 242(25), 228(20), 216(43), 199(35), 174(50), 128(30), 115(32)	9	NIST 11
<b>6</b> B6 <sup>c</sup>	21,60	2534	271(85), 270(100), 240(8), 228(10), 199(15), 174(12), 128(15), 115(17)	3	-
<b>7</b> 3- <i>O</i> -Acetyl-12-dihydrogalanthamin	21,85	2551	331(59), 330(100), 270(15), 213(20), 212(18), 44(25)	2	[69]
<b>8</b> Tazettin	23,33	2651	331(20), 316(20), 298(25), 247(100), 230(10)	4	NIST 11
<b>9</b> Lykorin	24,69	2745	287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100)	42	NIST 11
<b>10</b> Chlidantin	25,76	2823	287 (100), 286 (60), 256 (55), 244 (10), 202 (30)	1	[57]
<b>11</b> B11 <sup>c</sup>	26,96	2912	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	2	-

<sup>a</sup> podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část, <sup>c</sup> nebylo identifikováno

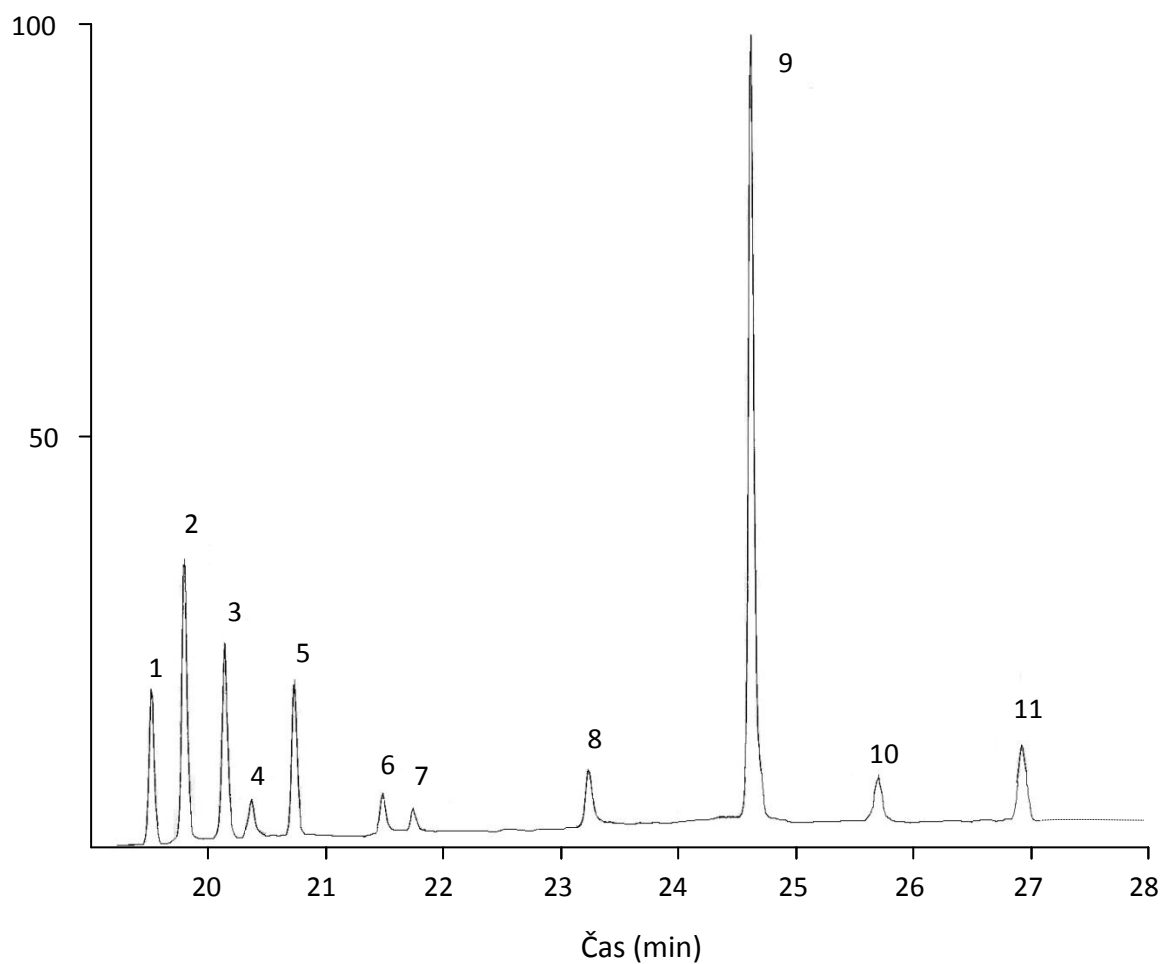


2 Lykoramin



5 Narwedin

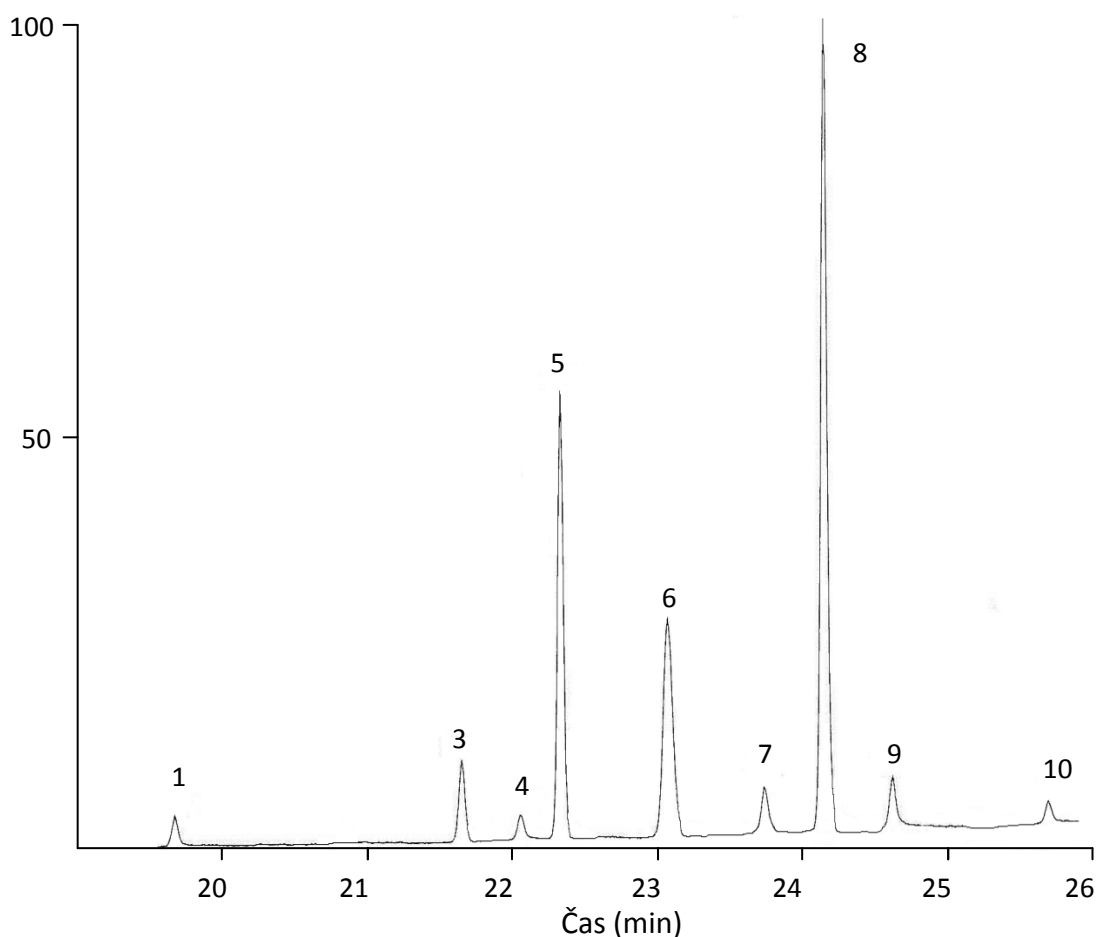
**Obr. 21.** Vybrané struktury identifikovaných látek v rostlině *N. Jack Snipe*



**Obr. 22.** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N. Jack Snipe*

## 5.6 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus* Katie Heath a jeho GC/MS analýza

Na této rostlině jsme fytochemickou prací provedli jako první. V rámci této studie se nám podařilo identifikovat 5 alkaloidů galanthaminového a lykorinového typu, haemanthamin a 4 alkaloidy se identifikovat nepodařilo. Na Obr. 23. je zobrazen chromatografický záznam GC/MS analýzy a seznam nalezených látek shrnut v Tab. VII. Nejvyšší obsah byl zjištěn u galanthinu, alkaloidu z lykorinové řady. Tento alkaloid izolovaný z rostliny *Calostemma purpureum* byl již v minulosti proměřován na inhibiční aktivitu vůči AChE<sup>67</sup>, jež dosáhla hodnoty  $IC_{50} = 20,1 \pm 1,1 \mu\text{g/ml}$ . Druhé nejvyšší zastoupení měl alkaloid, který jsme nebyli schopni identifikovat porovnáním MS spektra s literaturou ani standardy. Na základě retenčního času a hmotnostního spektra se domníváme, že by se mohlo jednat o derivát pluviinu. Pro potvrzení tohoto předpokladu by byla potřeba izolace alkaloidu v čisté podobě. Inhibice HuAChE alkaloidním extraktem *N. Katie Heath* dosáhla hodnoty  $IC_{50} = 18,4 \pm 2,3 \mu\text{g/ml}$ . Tuto



**Obr. 23.** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N. Katie Heath*

aktivitu lze přisoudit právě obsahu alkaloidů galanthaminového typu, obzvláště nejvíce zastoupenému galanthinu, jehož výše uvedená hodnota inhibice se blíží námi získanému výsledku. Hodnota inhibiční aktivity extraktu vůči HuBuChE byla  $IC_{50} = 135,0 \pm 15,4 \mu\text{g/ml}$ , což je v porovnání s dalšími extrakty nezajímavý výsledek. Naměřené inhibiční aktivity činí tuto rostlinu fytochemicky ne příliš zajímavou.

**Tabulka VII** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *N. Katie Heath* a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	RI	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, <i>m/z</i> (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
1 Galanthamin	19,65	2406	287(90), 286(100), 270(20), 244(30), 230(5), 216(45) 285(90), 284(100), 242(25),	5	NIST 11
2 Narwedín	20,84	2483	228(20), 216(43), 199(35), 174(50), 128(30), 115(32)	<1	NIST 11
3 B2 <sup>c</sup>	21,66	2538	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30) 287(3), 274(6), 266(16), 265(77),	2	NIST 11
4 C3 <sup>c</sup>	22,07	2565	264(100), 248(16), 220(14), 207(7), 191(15), 178(23)	1	-
5 B4 <sup>c</sup>	22,36	2583	267(50), 266(100), 250(19), 222(10), 193(7), 180(10)	23	-
6 Haemanthamin	23,11	2636	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15) 287(3), 274(6), 266(16), 265(77),	17	NIST 11
7 C6 <sup>c</sup>	23,78	2682	264(100), 248(16), 220(14), 207(7), 191(15), 178(23)	3	-
8 Galanthin	24,20	2711	317(30), 298(15), 284(15), 268(15), 243(100), 242(95)	45	NIST 11
9 Lykorin	24,69	2745	287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100) 298(13), 297(79), 296(100),	3	NIST 11
10 B9 <sup>c</sup>	25,77	2824	280(25), 266(7), 252(7), 180(7), 167(6), 149(13)	1	-

<sup>a</sup> podmínky GC analýzy viz experimentální část, <sup>c</sup> nebylo identifikováno

## 5.7 Biologická aktivita alkaloidního extraktu z cibulí rostliny *Narcissus Flower Record* a jeho GC/MS analýza

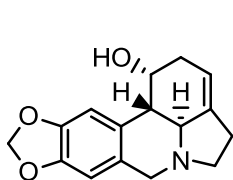
Tento rostlinný druh, na kterém jsme fytochemickou prací dělali jako první, se prokázal širokým spektrem alkaloidů galanthaminového, lykorinového, haemanthaminového a montaninového typu. Struktury vybraných zástupců jsou k vidění na obrázku níže (Obr. 24.). Podařilo se nám identifikovat celkem 12 látek. Nejvíce zastoupen byl haemanthamin a galanthamin. Chromatografický záznam z GC/MS měření je zachycen na Obr. 25. a Tab. VIII uvádí výčet látek z této analýzy. Haemanthamin dle informací z literatury nejeví významnou inhibiční aktivitu<sup>60</sup>. Podobný procentuální obsah byl naměřen dále u lykorinu a galanthinu. Zajímavý obsah zaujímaly také pluviin a jeho deriváty, patřící do strukturní řady lykorinu. Lykorinový typ zahrnuje také identifikovaný alkaloid inkartin, který ovšem dle informací z literatury má jen velmi malou inhibiční aktivitu<sup>68</sup>. Zajímavá inhibiční aktivita vůči HuAChE, která činila  $IC_{50} = 5,6 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$  bude zřejmě způsobena vysokým obsahem galanthaminu a dalších alkaloidů jeho a lykorinové řady. Inhibiční aktivita vůči HuBuChE, jež byla změřena s výsledkem  $IC_{50} = 64,7 \pm 8,7 \mu\text{g/ml}$ , není v porovnání s dalšími extrakty výrazně zajímavá. Tento kultivar se jeví zajímavý svým širokým spektrem alkaloidů a zajímavou inhibiční aktivitou vůči HuAChE, která je ovšem zřejmě způsobena obsahem galanthaminu, a proto tento kultivar není příliš zajímavý pro další fytochemickou práci.



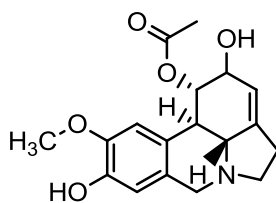
**Tabulka VIII** Alkaloidy identifikované pomocí GC/MS v cibulích rostliny *N. flower* rekord a popis jejich hmotnostních spekter

Sloučenina	RT <sup>a</sup> (min)	RI	[M <sup>+</sup> ] a charakteristické ionty, m/z (% relativní intenzita)	%	Reference pro MS
<b>1</b> Galanthamin	19,66	2406	287(90), 286(100), 270(20), 244(30), 230(5), 216(45)	21	NIST 11
<b>2</b> Lykoramin	19,93	2424	289(65), 288(100), 274(10), 232(10), 202(30)	2	NIST 11
<b>3</b> 1-Acetyl-10-norpluviin	21,18	2505	315(78), 272(5), 254(90), 240(18), 229(41), 228(100), 212(14)	2	[70]
<b>4</b> Karanin	21,46	2525	271(86), 270(46), 252(52), 250(10), 240(12), 227(48), 226(100), 215(5)	2	NIST 11
<b>5</b> Norpluviin	21,92	2555	273(75), 273(33), 254(42), 242(6), 229(50), 228(100), 241(5)	5	NIST 11
<b>6</b> Pluviin	22,18	2573	287(81), 286(48), 268(52), 254(15), 243(66), 242(100), 228(23)	3	NIST 11
<b>7</b> Haemanthamin	23,11	2636	301(15), 272(100), 240(15), 225(5), 211(15)	21	NIST 11
<b>8</b> Pankracin	23,83	2685	287(100), 286(20), 270(17), 243(17), 223(15), 214(16), 199(18), 185(26)	5	NIST 11
<b>9</b> Galanthin	24,20	2711	317(30), 298(15), 284(15), 268(15), 243(100), 242(95)	17	NIST 11
<b>10</b> Lykorin	24,69	2747	287(35), 286(30), 268(20), 250(15), 227(70), 226(100)	17	NIST 11
<b>11</b> Inkartin	24,86	2759	333(45), 332(100), 296(30), 259(70), 258(85), 250(30)	3	[25]
<b>12</b> Narcissidin	27,09	2921	333(28), 332(25), 315(61), 284(100), 266(42), 258(71), 242(26), 230(87), 228(76), 151(30)	2	NIST 11

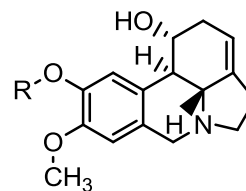
<sup>a</sup> podmínky GC/MS analýzy viz experimentální část



4 Karanin

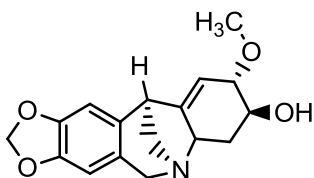


7 1-O-Acetyl-10-norpluviin

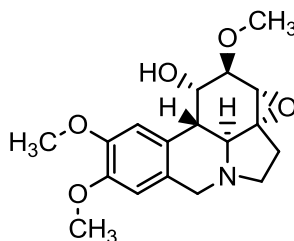


R = CH<sub>3</sub> 6 Pluviin

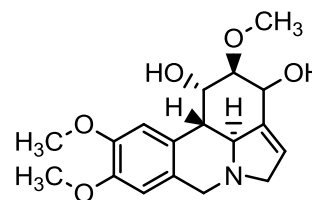
R = H 5 Norpluviin



8 Pankracin

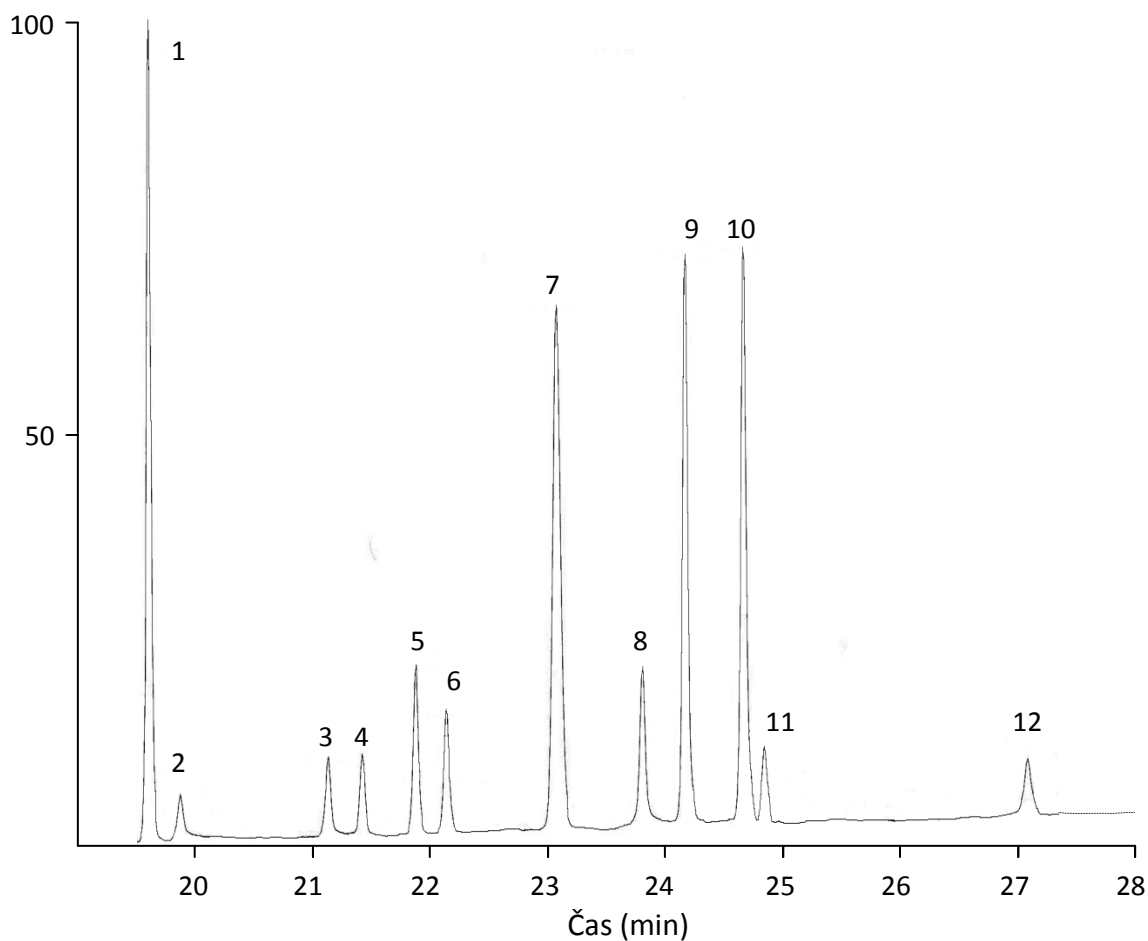


11 Inkartin



12 Narcissidin

**Obr. 24.** Vybrané struktury identifikovaných látek v rostlině *N. Flower Record*



**Obr. 25.** Chromatografický záznam alkaloidního extraktu z cibulí *N. Flower Record*

## **6 ZÁVĚR**

V této diplomové práci bylo podrobena GC/MS analýze celkem 6 druhů či kultivarů rodu *Narcissus* včetně proměření jejich aktivit inhibice lidské acetyl- a butyrylcholinesterázy.

Byla identifikována široká škála alkaloidů několika strukturních typů vyskytujících se charakteristicky v čeledi *Amaryllidaceae*. Látky, které nebyly identifikovány, nebyly nalezeny v knihovných spekter ani se je nepodařilo identifikovat z dostupné literatury a standardů. Tyto neznámé alkaloidy je pro konečnou identifikaci potřeba izolovat v čisté podobě v dostatečném množství pro další strukturní analýzu.

Ze získaných výsledků aktivit jednotlivých extraktů vychází nejvyšší inhibice HuAChE pro extrakt z rostliny *Narcissus Flower Record* s hodnotou  $IC_{50} = 5,6 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$ . Tato aktivita je zřejmě zapříčiněna vysokým obsahem alkaloidů galanthaminového typu. Nejvýznamnější aktivitu vůči HuAChE i HuBuChE zároveň vykázal alkaloidní extrakt z rostliny *Narcissus poeticus var. recurvus* s hodnotami  $IC_{50} = 6,0 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  pro AChE a  $IC_{50} = 23,0 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$  pro BuChE. Inhibice HuAChE bude zřejmě způsobena galanthaminovými strukturními typy, ovšem inhibice HuBuChE nelze takto snadno odvodit pro nedostatek v současné době dostupných dat pro tento enzym. Jelikož tedy nelze s jistotou říci, která z látek je zodpovědná zvýšenou inhibicí HuBuChE, bude potřeba další izolace, identifikace jednotlivých alkaloidů a jejich testování v čisté formě.

Jak již bylo mnohokrát zmíněno výše, roste význam inhibice lidské butyrylcholinesterázy. Z toho důvodu je snahou hledat látky ideálně s duální inhibicí vůči oběma enzymům a také s významnou inhibicí vůči HuBuChE samotné. Z tohoto hlediska se jeví nejzajímavější extrakt rostliny *Narcissus Dutch Master*, který vykázal aktivitu vůči HuBuChE  $IC_{50} = 25,5 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ . Jak je diskutováno výše, nelze s jistotou říci, který alkaloid nebo skupina alkaloidů je za tuto zajímavou inhibici zodpovědných.

Shrneme-li výsledky této diplomové práce, můžeme říci, že ze studovaných druhů se pro další fytochemické práce nejlépe hodí rostliny *Narcissus poeticus var. recurvus* a *Narcissus Dutch Master*, neboť u těchto rostlin je vysoký potenciál izolace alkaloidů jak dosud neznámých, tak známých s dosud nezjištěnou inhibiční aktivitou vůči HuAChE a HuBuChE.

## **7 LITERATURA**

1. MINAŘÍK J. *Farmakognosie*. Vyd. 1. Praha: Avicenum, 1979, 384 s.
2. MORAVCOVÁ J. *Biologicky aktivní přírodní látky*. Interní studijní pomůcka, VŠCHT, Praha, 2006, 108 s. [cit. 2013-04-05] Dostupné na: <http://www.vscht.cz/lam/new/bapl2003-01.pdf>.
3. JIN, Zhong. *Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids*. *Natural Product Reports*. 2009, 26(3), 363-381.
4. KREJČOVÁ, G. a L. ŠEVELOVÁ. Současné poznatky o Galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy*. 2003, 72(1), 37-44.
5. JIRÁK, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*. 2009, 5.
6. PYDYCHOVÁ, E. Alzheimerova nemoc. *Solutio*. 2002, 2002/2003.
7. KOUKOLÍK, F. a R. JIRÁK. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Vyd. 1. Praha: Grada, 1998, 229 s.
8. BRUNOVSKÝ, M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologia pre praxi*. 2007, 2, 107-111.
9. ATACK, John R., Elaine K. PERRY, James R. BONHAM, John M. CANDY a Robert H. PERRY. Molecular Forms of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Aged Human Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*. 1986, 47(1), 263-277.
10. RAKONCZAY, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biologica Hungarica*. 2003, 54(2), 183-189.
11. Ebixa 10 MG. *SUKL* [online]. 2010 [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0026502&tab=prices>
12. JIRÁK, R. Farmakoterapie Alzheimerovy Choroby. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2004, 18(4), 212-214.
13. PARK, So-Young. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Archives of Pharmacal Research*. 2010, 33(10), 1589-1609.
14. MARTIN, J., Z. KRŠKOVÁ aj. DUŠEK. Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékárenství*. 2011, 7(1), 39-41.
15. Curcumin. *Wikipedia* [online]. 2011, 2013 [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Curcumin>

16. SREEJAYAN a M. N. A. RAO. Curcuminoids as Potent Inhibitors of Lipid Peroxidation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1994, 46(12), 1013-1016.
17. AMMON, H.P.T., H. SAFAYHI, T. MACK a J. SABIARAJ. Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids. *Journal of Ethnopharmacology*. 1993, 38(2-3), 105-112.
18. RINGMAN, John L., Sally A. FRAUTCHY, Gregory M. COLE, Donna L. MASTERMAN a Jeffrey L. CUMMINGS. A Potential Role of the Curry Spice Curcumin in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*. 2005, 2(2), 131-136.
19. *Leucojum vernum* - bledule jarní. *Herbář Wendys* [online]. 2008 [cit. 2013-04-05]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K4.php>
20. *Narcissus pseudonarcissus* - narcis žlutý. *Herbář Wendys* [online]. 2008 [cit. 2013-04-05]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K304.php>
21. *Galanthus nivalis* - sněžěnka podsněžník. *Herbář Wendys* [online]. 2008 [cit. 2013-04-05]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K284.php>
22. NAGY, M., D. GRANČAI, P. MUČAJI. Farmakognózia – Biogenéza prírodných látok. Vyd. 1. Osveta, Martin, 2011, 237 s.
23. JONES, M., J. PULMAN a T. WALKER. Drugs from Daffodils. *Chemistry & Industry*. 2011, 4.
24. BASTIDA, J., C. CODINA, F. VILADOMAT, M. RUBIRALTA, J.C. QUIRION, H.P. HUSSON. 9-O-Demethyl-2 $\alpha$ -hydroxyhomolycorine, an alkaloid from *Narcissus tortifolius*. *Phytochemistry*. 1990, 29(8), 2683-2684.
25. KREH, M. a R. MATUSCH. O-Methyloduline and N-demethylmasonine, alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*. *Phytochemistry*. 1995, 38(6), 1533-1535.
26. KREH, M., R. MATUSCH a L. WITTE. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Phytochemistry*. 1995, 38(3), 773-776.
27. BOIT, H.G., W. STENDER, A. BEITNER. XVII. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide. Die Alkaloide Einiger Gartensorten von *Narcissus Jonquilla*, *N. Triandrus* und *N. Cyclamineus*. *Chemische Berichte*. 1957, 90(5), 725-728.
28. BOIT, H. G., W. DÖPKE. Alkaloide von *Narcissus tazetta* und *N. poeticus* (XIII. Mitteil.: Über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chemische Berichte*. 1956, 89(10), 2462-2465.

29. BOIT, H-G. a W. STENDER. Über die Alkaloide von *Narcissus poeticus* (I. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chemische Berichte*. 1954, 87(4), 624-627.
30. ABDJAZIMOV, K. A., S. Y. YUNUSOV, Khim. Prir. Soedin. 1967, 3, 64-65.
31. PIGNI, N. B., S. RÍOS-RUIZ, V. MARTÍNEZ-FRANCÉS, J. J. NAIR, F. VILADOMAT, C. CODINA a J. BASTIDA. Alkaloids from *Narcissus serotinus*. *Journal of Natural Products*. 2012, 75(9), 1643-1647.
32. LABRAÑA, A. KING'ORI MACHOCHO, KRICSFALUSY, R. BRUN, C. CORDINA, F. VILADOMAT a J. BASTIDA. Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry*. 2002, 60, 847-852.
33. WILDMAN, W. C. a C. L. BROWN. Mass spectra of 5,11-methanomorphanthridine alkaloids. The structure of pancracine. *Journal of the American Chemical Society*. 1968, 90(23), 6439-6446.
34. ABDALLAH, O. M. Narcisine, an alkaloid from *Narcissus tazetta*. *Phytochemistry*. 1993, roč. 34, (5), s. 1447-1448.
35. TANI, S., N. KOBAYASHI, H. FUJIWARA, T. SHINGU a A. KATO. Isolation of O-methylmaritidine from bulbs of *Narcissus tazetta* L. *Chemical & Pharmaceutical bulletin*. 1981, 29(11), 3381-3384.
36. MA, G-E., H-Y. LI, Ch-E. LU, X-M. YANG a S-H. HONG. 6a/6b-Hydroxy-3-O-methylepipimaritidine, Two New Alkaloids from *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem. *Heterocycles*. 1986, 24(8), 2089-2092.
37. CAHLÍKOVÁ, L., N. BENEŠOVÁ, K. MACÁKOVÁ, R. KUČERA, V. HRSTKA, J. KLIMEŠ, L. JAHODÁŘ a L. OPLETAL. Alkaloids from Some *Amaryllidaceae* Species and Their Cholinesterase Activity. *Natural Product Communications*. 2012, 7(5), 571-574.
38. BASTIDA, J., F. VILADOMAT, J.M. LLABRÉS, C. CODINA, M. FELIZ, M. RUBIRALTA. Alkaloids from *Narcissus confusus*. *Phytochemistry*. 1987, 26(5), 1519-1524.
39. ILAVENIL, S., B. KALEESWARAN a S. RAVIKUMAR. Antioxidant and Hepatoprotective activity of lycorine against Carbon tetrachloride-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Scholars Research Library*. 2010, 2(6), 267-272.
40. LAMORAL-THEYS, D., C. DECAESTECKER, V. MATHIEU, J. DUBOIS, A. KORNIENKO, R. KISS, A. EVIDENTE a L. POTTIER. Lycorine and its Derivatives for Anticancer Drug Design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2010, č. 10, s. 41-50.



41. GIORDANI, R. B., M. WEIZENMANN, D. B. ROSEMBERG, G. A. DE CARLI, M. R. BOGO, J. A. S. ZUANAZZI a T. TASCA. *Trichomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitology International*. 2010, 59, 226-231.
42. EVIDENTE, A. a A. KORNIENKO. Anticancer evaluation of structurally diverse *Amaryllidaceae* alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews*. 2009, 8(2), 449-459.
43. SZLÁVIK L., A. GYURIS, J. MINAROVITS, P. FORGO, J. MOLNÁR, J. HOHMANN. Alkaloids from *Leucojum Vernum* and antiretroviral activity of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Planta Med.*, 2004, 70, 871-873.
44. Bulb Log Diary. *Scottish Rock Garden Club* [online]. 2005 [cit. 2013-04-05]. Dostupné z: <http://www.srgc.org.uk/bulblog/log2005/191005/log.html>
45. DE ANDRADE, J. P., N. B. PIGNI, L. T. CLAVERIA, S. BERKOV, C. CORDINA, F. VILADOMAT a J. BASTIDA. Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012, 70, 13-25.
46. *Narcissus serotinus*. *Flickr* [online]. 2013 [cit. 2013-04-05]. Dostupné z: <http://www.flickr.com/photos/taurielloanimaliorchidee/6203684918/>
47. SANTANA, O., M. REINA, A. L. ANAYA, F. HEMANDEZ, M. E. IZQUIERDO a A. GONZALEZ-COLOMA. 3-O-acetyl-narcissidine, a bioactive alkaloid from *Hippeastrum puniceum* Lam. (*Amaryllidaceae*). *Journal of biosciences*. 2008, 63(9/10), 639-643.
48. *Narcissus Angustifolius*. Narrow-Leaved *Narcissus*. *Chestofbooks.com* [online]. 2007, 2012 [cit. 2013-04-05]. Dostupné z: <http://chestofbooks.com/flora-plants/flowers/Flower-Garden/193-Narcissus-Angustifolius-Narrow-Leaved-Narcissus.html#.UV60wJOeOSp>
49. GHOSAL, S., S. SINGH, Y. KUMAR, S. UNNIKRISHNAN a S. CHATTOPADHYAY. The Role of Ungeremine in the Growth-Inhibiting and Cytotoxic Effects of Lycorine. *Planta Medica*. 1988, 54(02), 114-116.
50. CHEN, J., K. CHEN, H. JIANG, , M. LIN, R. JI, Theoretical investigation on interaction binding of analogs of AT-1840 to doublestranded polynucleotide. *Natural Science* 1997, 7, 329–335.

51. XU, B., X.W. WANG. Lycobetaine acetate. Antineoplastic alkaloid. *Drugs of the Future*. 1997, 22, 123–129.
52. CASU, L., F. COTTIGLIA, M. LEONTI, A. DE LOGU, E. AGUS, Y-Ch. TSE-DINH, V. LOMBARDO a C. SISSI. Ungeremine effectively targets mammalian as well as bacterial type I and type II topoisomerases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011, 21, 7041-7044.
53. OSORIO, E. J., R. BRUN, C. CODINA, F. VILADOMAT, F. CABEZAS a J. BASTIDA. In vitro antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (*Amaryllidaceae*). *Phytochemistry Letters*. 2010, 3, 161-163.
54. *Narcissus pseudonarcissus* - Wild Daffodil. *APHOTOFLORA* [online]. 2004 [cit. 2013-04-05]. Dostupné z: [http://www.aphotoflora.com/mon\\_narcissus\\_pseudonarcissus\\_wild\\_daffodil.html](http://www.aphotoflora.com/mon_narcissus_pseudonarcissus_wild_daffodil.html)
55. GOTTI, R., J. FIORI, M. BARTOLINI a V. CAVRINI. Analysis of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Narcissus* by GC/MS and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 42(1), 17-24.
56. JEFFS, P. W., A. ABOU-DONIA, D. CAMPAU a D. STAIGER. Alkaloids of the *Amaryllidaceae*. 27. Structures of 9-O-demethylhomolycorine and 5.alpha.-hydroxyhomolycorine. Alkaloids of *Crinum defixum*, *C. scabrum*, and *C. latifolium*. Assignment of aromatic substitution patterns from 1H-coupled carbon-13 spectra. *Journal of Organic Chemistry*. 1985, 50(10), 1732-1737.
57. STECK T. L., J. A. KANT. Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods in Enzymology*. 1974, 31, 172.
58. ELLMAN, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES Jr., R. M. FEATHER-STONE. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961, 7, 88.
59. *Narcissus poeticus var. recurvus*. *Missouri Botanical Garden* [online]. 2011 [cit. 2013-04-05]. Dostupné z: <http://www.missouribotanicalgarden.org/gardens-gardening/your-garden/plant-finder/plant-details/kc/b938/narcissus-poeticus-var.-recurvus.aspx>
60. LÓPEZ, S., J. BASTIDA, F. VILADOMAT, C. CODINA. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some *Amaryllidaceae* alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*. 2002; 71, 2521-2529.

61. HOUGHTON, P., Y. REN, M. J. HOWES. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Report*. 2006, 23, 181-189.
62. Kulhánková A, Cahlíková L, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Opletal L. (2013) Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity*, *in press*: doi: 10.1002/cbdv.201200144.
63. MCNULTY, J., J. J. NAIR, J. R. L. LITTLE, J. D. BRENNAN, J. BASTIDA. Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Biochem. Medicinal Chemical Letters*. 2010, 20, 5290-5294.
64. ELGORASHI, E. E., G. I. STAFFORD a J. VAN STADEN. Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of *Amaryllidaceae* Alkaloids. *Planta Medica*. 2004, 70(3), 260-262.
65. BERKOV., S, J. BASTIDA , F. VILADOMAT , C. CODINA. Analysis of galanthamine-type alkaloids by capillary gas chromatography-mass spectrometry in plants. *Phytochemical Analysis*. 2008, 19, 285-293.
66. WASER, M. *Asymmetric organocatalysis in natural product syntheses*. New York: Springer, 2012, p. cm. ISBN 978-3-7091-1162-8.
67. JENSEN, B. S., S. B. CHRISTENSEN, A. K. JÄGER a N. RONSTED. *Amaryllidaceae* alkaloids from the Australasian tribe Calostemmatae with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2011, 39(2), 153-155.
68. BERKOV, S., R. REYES-CHILPA, C. CODINA, F. VILADOMAT, J. BASTIDA. Revised NMR data for Incartine: an Alkaloid from *Galanthus elwesii*. *Molecules*. 2007, 12, 1430-1435.
69. HAN, S. Y., J. E. SWEENEY, E. S. BACHMAN, E. J. SCHWEIGER, G. FORLONI, J. T. COYLE, B. M. DAVIS a M. M. JOULLIÉ. Chemical and pharmacological characterization of galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor, and its derivatives. A potential application in Alzheimer's disease? *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1992, 27(7), 673-687.
70. CAMPBELL, W. E., J. J. NAIR, D. W. GAMMON, C. CODINA, J. BASTIDA, F. VILADOMAT, P. J. SMITH a C. F. ALBRECHT. Bioactive alkaloids from *Brunsvigia radulosa*. *Phytochemistry*. 2000, 53(5), 587-591.

## **8 SEZNAM ZKRATEK**

A $\beta$	Beta amyloid
AD	Alzheimerova choroba
Ach	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
AMK	Aminokyselina
APP	Amyloidní prekurzorový protein
AMP/ADP/ATP	Adenosin-mono/di/tri-fosfát
BuChE	Butyrylcholinesteráza
CNS	Centrální nervová soustava
ČR	Česká republika
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTNB	Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
EI	Electron impact
GC	Plynová chromatografie
GABA	Gama-aminomáselná kyselina
HEB	Hematoencefalická bariéra
HuAChE	Humánní acetylcholinesteráza
HuBuChE	Humánní butyrylcholinesteráza
IC	Inhibiční koncentrace
MS	Hmotnostní spektrometrie
NIST 11	Knihovna hmotnostních referenčních spekter
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	Nukleární magnetická rezonance
MMSE	Vyšetření mentální úrovně pacientů s AD
RI	Retenční index
RT	Retenční čas
TIC	Totální iontový proud
TLC	Tenkvrstvá chromatografie